دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وهفتم – شماره ۱۴۲
شهریور ۱۳۹۸

تولید قطعات آنتی‌بادی نوترکیب انسانی تک-زنجیره ضد مولکول 4-1BB در باکتری اشریشیاکلی

نویسندگان: سلمان باقری، المیرا صفایی قمصری، شیما عباداللهی، زهرا شریف‌زاده*

بخش ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: زهرا شریف‌زاده **E-mail: zsharifzadeh@gmail.com**

چکیده

مقدمه و هدف: آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه 4-1BB در درمان بیماری‌های اتوایمیون، عفونت‌های ویروسی و همچنین ایمونوتراپی سرطان‌ها کاربرد دارند. آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی به علت وجود مشکلاتی از قبیل ایمنی‌زایی و اندازه بزرگ، کارایی محدودی در بالین دارند. قطعات آنتی‌بادی کاملاً انسانی از قبیل قطعات scFv می‌توانند جایگزین خوبی برای کاربردهای ایمنی‌درمانی باشند. هدف از این مطالعه تولید قطعات آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای انسانی بر ضد 4-1BB به منظور استفاده از آن در ایمنی‌درمانی سرطان است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر ژن scFv انسانی علیه 4-1BB در وکتور (+)pET-22 کلون شده و در باکتری *E. coli* TOP 10F بیان شد. تائید اولیه scFv تولید شده توسط وسترن بلات و الایزا انجام شد. در ادامه عملکرد این آنتی‌بادی در تحریک سلول‌های بیان‌کننده 4-1BB با بررسی میزان بیان CD69 در سطح سلول‌ها، بیان mRNA و تولید پروتئین IL-2 مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج این پژوهش نشان دادند که ژن scFv طراحی‌شده در میزبان باکتریایی، بیان شده و قادر به شناسایی آنتی‌ژن 4-1BB است. تیمار سلول‌های CCRF-CEM با scFv ضد 4-1BB موجب القای تولید سایتوکاین IL-2 شده و بیان CD69 را بر سطح سلول‌های هدف افزایش می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: آنتی‌بادی تک‌زنجیره ای انسانی علیه 4-1BB به خوبی در سیستم بیانی باکتری E. coli تولید شده و قادر به شناسایی آنتی‌ژن هدف و فعال‌سازی سلول‌های CCRF-CEM است. از این آنتی‌بادی نوترکیب می‌توان در مطالعات بعدی جهت فعال‌سازی سلول‌های T در روش‌های سلول درمانی سرطان استفاده نمود.

واژگان کلیدی: مولکول 4-1BB، سلول درمانی، قطعات مناطق متغیر آنتی‌بادی تک زنجیره (scFv)، آنتی‌بادی نوترکیب انسانی

دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۲
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۸/۰۵/۳۰
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۵

مقدمه

4-1BB (TNFRSF9, CD137) یک فاکتور نکروز دهنده توموری و یکی از اعضاء خانواده بزرگ TNFRSF(Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily) است که توسط گروه B. kwon در سال ۱۹۹۲ کشف شد(۱). 4-1BB به عنوان یک مولکول کمک تحریکی در سطح سلول‌های T بیان می‌شود. واکنش بین این مولکول و لیگاندش گسترش سلول‌های T ترجیحاً CD8+ را در محیط درون‌تنی (in vivo) و برون‌تنی (in vitro) القاء می‌کند و همچنین از فعال‌سازی مرگ سلولی القاء شده (AICD) در سلول‌های TCD8+ جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، باعث تمایز و تنظیم در جهت افزایش ژن‌های ضد آپوپتوز و القاء ترشح سایتوکاین‌هایی مانند TNF-α و IFN-γ می‌گردد(۲, ۳). این مولکول و لیگاندش می‌توانند بطور مستقل از CD28 و از طریق کمپلکس TCR-CD3 در جهت فعال کردن سلول‌های T عمل کنند(۱). علاوه بر این، پیام‌های کمک تحریکی که از طریق 4-1BB ارسال می‌شوند به بلوغ سلول دندریتیک کمک می‌کنند(٤).

به خاطر ویژگی‌های ضدتوموری 4-1BB این گیرنده به عنوان یک هدف ایده‌آل برای ایمنی‌درمانی سرطان در نظر گرفته شده است. پیام‌رسانی 4-1BB از طریق تقویت فعالیت سلول‌های T مانند CD8 و همچنین فعالیت سلول‌های دندریتیک می‌تواند هدف قوی و مؤثری در درمان بیماری‌های اتوایمیون، عفونت‌های ویروسی، رد پیوند آلوگرافت و همچنین ایمنی ضدتوموری باشد(۵-۷). آگونیست‌های مختلفی جهت القاء بیان 4-1BB در سلول‌های T شناخته شده‌اند که شامل فعال‌سازی با سایتوکاین‌های IL-2 و IL-4، فعال‌کننده‌های پلی‌کلونال (Con A و PHA)، آنتی‌بادی‌های منوکلونال anti-TCR (mAb) و anti-CD3 است(۲, ۵).

آنتی‌بادی‌های منوکلونال آگونیست 4-1BB نقش درمانی قابل توجهی را در انواع سرطان‌ها، بیماری‌های اتوایمیون و عفونت‌های ویروسی نشان داده‌اند و فعالیت آنها جهت ایمنی‌درمانی سرطان در سرطان‌های کولون، هپاتوسلولار کارسینوما و لیمفوما در کارآزمایی‌های بالینی فاز I و II می‌باشند(۸, ۹). در بیماران مبتلا به لیمفوما استفاده از دو آنتی‌بادی منوکلونال Urelumab و Utomilumab علیه 4-1BB منجر به افزایش جمعیت سلول‌های T CD8 شده و نتایج امیدوارکننده‌ای را در درمان این بیماری نشان داده است(۱۰). همچنین نقش مؤثر این آنتی‌بادی‌ها در عفونت‌های ویروسی در مدل‌های درون‌تنی اثبات داده است(۱۱). طبق نتایج به دست آمده، در موش‌های آلوده به ویروس آنفلوانزا و یا ویروس LCMV (Lymphocytic choriomeningitis)، آنتی‌بادی منوکلونال4-1BB منجر به افزایش جمعیت سلول‌های T گشته و منجر به افزایش بقاء موش در عفونت‌های حاد می‌شود. همچنین قادر به کاهش بیماری‌های اتوایمیون در بسیاری از مدل‌های موشی (مانند لوپوس اریتروماتوز سیستمیک، آسم و...) است(۱۱, ۱۲).

بسیاری از آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده منشأ موشی داشته و کاربرد محدودی در درمان انسان دارند. این محدودیت به علت خاصیت ایمنی‌زایی این آنتی‌بادی‌ها است. از سوی دیگر اندازه بزرگ آنتی‌بادی‌های کامل موجب محدودیت دسترسی آنها به بعضی از آنتی‌ژن‌های هدف می‌شود. به دلیل وجود این مشکلات، تولید آنتی‌بادی‌های انسانی با اندازه کوچکتر در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.

هدف از این تحقیق تولید قطعه آنتی‌بادی نوترکیب تک زنجیره متغیر scFv انسانی علیه مولکول 4-1BB با استفاده از همسانه‌سازی ژن scFv آگونیست 4-1BB و بیان آن در باکتری است. در مرحله بعد، توانایی شناسایی آنتی‌ژن توسط scFv تولید شده با تکنیک الایزا بررسی شده و عملکرد این آنتی‌بادی در افزایش بیان CD69 و تولید سایتوکاین IL-2 مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

روش کار

پلاسمید، سویه باکتری، محیط کشت و مواد مصرفی

جهت همسانه‌سازی توالی scFv از پلاسمید pET-

(+)22(Biomatik, Canada) استفاده شد. باکتری E.coli TOP10F و سلول CRF-CEM از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. آنتی‌بادی anti-c-Myc کنژوگه با HRP (horseradish peroxidase) از شرکت Roche(Germany)، آنتی‌بادی anti-c-Myc کنژوگه با رنگ فلورسئین-ایزوتیوسیانات (FITC) از شرکت abcam (USA) و آنتی‌بادی منوکلونال anti-CD69 کنژوگه با فیکواریترین (PE) از شرکت BioLegend (San Diego, USA) خریداری شد. ۳,۳'- دی آمینو بنزیدین (DAB)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، آمپی سیلین، کانامایسین سولفات، ایزوپروپیل-D-b- تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) و فنیل متیل سولفونیل- فلوراید (PMSF) از شرکت Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) و IL-2 نوترکیب انسانی از شرکت R&D systems تهیه شدند. از پپتید سنتتیک با توالی TKKGCKDCCFGTFNTFN که از روی دمین خارج سلولی مولکول 4-1BB توسط شرکت Biomatik (Canada) سنتز شده بود به عنوان آنتی‌ژن 4-1BB استفاده شد.

ساخت سازه بیانی anti-4-1BB scFv

توالی نوکلئوتیدی مناطق متغیر زنجیره سبک (VL) و زنجیره سنگین (VH) آنتی‌بادی انسانی ضد 4-1BB از پتنت شماره US8821867B2 شرکت Pfizer استخراج و توسط لینکر ۱۵ آمینواسیدی (VH-(Gly4Ser)3-VL) به یکدیگر متصل شدند. در ناحیه انتهای ۳' ژن، توالی کدکننده c-Myc اضافه شد تا تشخیص و بررسی محصول ژن توسط وسترن بلات و الایزا تسهیل شود. به منظور همسانه‌سازی ژن مورد نظر در پلاسمید pET-(+)22، جایگاه برش آنزیم *Nco*I در انتهای ´۵ و جایگاه برش آنزیم *Xho*I در انتهای ´۳ ژن وارد شد. بعد از بهینه‌سازی کدون‌های ژن scFv طراحی‌شده، سازه مورد نظر توسط شرکت Biomatik در داخل وکتور pET-22(+) سنتز شد. سازه نهایی به داخل باکتری *E.coli* سویه TOP 10F انتقال داده شد و باکتری‌های نوترکیب حامل ژن scFv روی پلیت حاوی محیط LB (Luria-Bertani medium) با آمپی سیلین (۱۰۰ µg/ml) کشت داده شدند.

تولید آنتی‌بادی انسانی scFv علیه آنتی‌ژن 4-1BB

کلون‌های رشد کرده در محیط کشت برای تولید scFv استفاده شدند. باکتری TOP 10F در محیط 2XYT (۱۶ گرم Tryptone، ۱۰ گرم Yeast Extract و ۵ گرم Nacl در یک لیتر آب مقطر) با آمپی سیلین۱۲۰µg/ml در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد تا دانسیته جذب نوری (OD) رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ به حدود ۰/۹ رسید. بیان scFv توسط IPTG ۱ میلی‌مولار القاء شد و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد. رسوب باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ در دور rpm ۳۷۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد جمع‌آوری شده و در PBS همراه با PMSF ۱ میلی مولار حل شد. عمل شکست دیواره توسط روش استاندارد شوک اسموتیک جهت استخراج آنتی‌بادی‌های ضد 4-1BB موجود در پری‌پلاسم انجام شد. بدین منظور، باکتری‌ها در بافر TES(sucrose -EDTA -Tris) (هایپرتونیک) سرد حل شده و بر روی یخ به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. سپس بافر TES ٤ مرتبه رقیق شده (هیپوتونیک) اضافه شد و بر روی یخ همراه با شیک به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. بعد از سانتریفوژ در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سوپ رویی حاوی قطعات scFv جمع آوری شدند.

تائید بیان scFv ضد 4-1BB توسط وسترن بلات

پس از استخراج قطعات scFv بیان شده از پری‌پلاسم باکتری و تعیین مقدار با روش برادفورد، مقادیر مساوی پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰٪ جداسازی شد. بدنبال الکتروفورز SDS-PAGE، پروتئین جدا شده به غشاء نیتروسلولز منتقل شده و غشاء توسط BSA ۳٪ در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه‌روز بلاک شد. سپس غشاء همراه با آنتی‌بادی منوکلونال ضد c-Myc (۲۰۰۰ مرتبه رقیق شده) کنژوگه با HRP به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از سه بار شستشو با PBS و ۰/۰۵٪ PBST (PBS حاوی ۰/۰۵٪ tween-20، pH ۷/۲)، باندهای پروتئینی توسط رنگ‌آمیزی دی آمینوبنزیدین (DAB) شناسایی شدند.

بررسی اتصال scFv ضد 4-1BB توسط تست الایزا

از روش الایزا برای بررسی توانایی شناسایی آنتی‌ژن 4-1BB توسط scFv تولید شده استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید 4-1BB و BSA با غلظت ۱۰μg/ml در چاهک‌های الایزا به عنوان آنتی‌ژن هدف و مقدار مساوی از پروتئین BSA (bovine serum albumin) به عنوان کنترل منفی کوت شد. پس از اتمام مراحل انکوباسیون، شستشو و بلاکینگ، scFv ضد 4-1BB اضافه شد. در مرحله بعد پس از اضافه نمودن آنتی‌بادی ضد c-Myc کنژوگه با HRP، سوبسترای TMB (Tetra methyl benzidine) اضافه گردید. قرائت OD با دستگاه قرائت‌گر الایزا در طول موج ٤٥٠ نانومتر انجام گرفت.

بررسی اختصاصیت scFv ضد 4-1BB

تست الایزای اختصاصیت با به‌کارگیری آنتی‌ژن‌های مختلف انجام شد تا واکنش‌های متقاطع احتمالی scFv تولید شده ارزیابی شوند. آنتی‌ژن‌های 4-1BB، IGF1R، c-Met، ROR1، PD1، شیر خشک بدون چربی و BSA به عنوان با غلظت ۱۰μg/ml در پلیت ۹٦ خانه کوت شدند سپس با scFv ضد 4-1BB انکوبه شدند تا واکنش scFvها مورد بررسی قرار بگیرد. ادامه مراحل طبق مراحل ذکر شده در بالا انجام شده و نتایج OD با دستگاه قرائت گر الایزا خوانش شد.

بررسی اتصال scFv بر سطح سلول‌های CCRF-CEM توسط فلوسیتومتری

اتصال scFv تولید شده به مولکول 4-1BB در سطح سلول‌های CCRF-CEM با فلوسایتومتری بررسی شد. سلول‌های CCRF-CEM در محیط RPMI 1640 با ۱۵٪ FBS، ۱۰۰ μg/ ml استرپتومایسین و ۱۰۰ U/ml پنی سیلین کشت داده شدند. جهت تحریک بیان مولکول 4-1BB، سلول‌ها با ۲۰۰ng/ml آنتی‌بادی ضد CD3 همراه با IU/ml ۳۰۰ IL-2 به مدت ٤٨ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها دو مرتبه با PBS-5%FBS شستشو داده شدند. سپس ۵×۱۰^{۵} سلول (درصد زنده‌مانی سلول‌ها ۹۵٪ بود که با تریپان‌بلو سنجیده شد) در بافر به تنهایی و یا همراه با آنتی‌بادی به مدت ٤٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از دو مرتبه شستشو با بافر، سلول‌ها با آنتی‌بادی anti-c-Myc کنژوگه با FITC به مدت ٤٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. همچنین سلول‌ها با آنتی‌بادی منوکلونال تجاری goat anti-4-1BB و آنتی‌بادی anti-goat-FITC به عنوان کنترل مثبت انکوبه شدند. از آنتی‌بادی تک‌زنجیره ضد c-Met (ES1) به عنوان کنترل ایزوتایپ استفاده شد. در نهایت با دستگاه فلوسیتومتری Partec PASIII (Partec GmbH, Munster, Germany) خوانش صورت گرفت و نتایج بدست آمده توسط نرم‌افزار FlowJo 7.6.1 (Tree Star, Inc. Ashland, OR, USA) آنالیز شدند.

بررسی بیان CD69 به عنوان یک مارکر بیانی در سطح سلول فعال

به منظور نشان دادن فعال شدن سلول‌های CCRF-CEM توسط scFv تولید شده، بیان مارکر CD69 اندازه‌گیری شد. بعد از تحریک اولیه سلول‌ها که با روش قبل انجام شد، سلول‌ها به مدت ۲٤ ساعت با anti-4-1BB scFv و یک scFv غیر مرتبط (ES1) تیمار شدند. سپس حدود $۱۰^{٦}$ سلول، دومرتبه با بافر شستشو (PBS-0.5% BSA) شسته شدند و با آنتی‌بادی منوکلونال anti-CD69 PE رنگ‌آمیزی سلولی صورت گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی و در دمای ٤ درجه سانتیگراد، سلول‌ها شستشو داده شدند و توسط دستگاه فلوسایتومتری خوانش صورت گرفت. نتایج بدست آمده توسط نرم‌افزار FlowJo 7.6.1 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) آنالیز شدند.

بررسی سطح بیان ژن IL-2 mRNA توسط Real-time PCR

برای بررسی میزان بیان ژن سایتوکاین IL-2 در سلول‌های تحریک شده با scFv ضد 4-1BB به همراه نمونه‌های کنترل از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. به همین منظور ابتدا RNA تام از رسوب سلول‌های CCRF-CEM تیمار شده با آنتی‌بادی با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (Qiagen) استخراج شد. برای اندازه‌گیری غلظت RNA استخراج شده از نسبت جذب نوری $A_{260/280}$ در دستگاه Nanodrop استفاده گردید. جهت

سنتز cDNA، از کیت سنتز cDNA (Roche, Gipf-Oberfrick, Switzerland) استفاده شد و مراحل مختلف مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. سطوح بیان mRNA توسط کیت دومرحله‌ای Quantitech SYBR Green RT PCR kit(Takara) با دستگاه Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia) تعیین شد. پرایمرهای طراحی‌شده برای IL-2 شامل 5′GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGA-3′ و 3′ATGTACACCATGCAACTCCTGTCT-5′ بود. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) به عنوان ژن رفرانس برای آنالیز بیان mRNA استفاده شد. بعد از تیمار با آنتی‌بادی تغییرات در بیان IL-2 توسط متد $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

ارزیابی تولید IL-2 توسط سلول‌های تیمار شده با scFv ضد 4-1BB

جهت اندازه‌گیری تولید سایتوکاین، تحریک اولیه سلول‌های CCRF-CEM با آنتی‌بادی ضد CD3 همراه با IL-2 انجام شد. سپس سلول‌ها در حضور و عدم حضور آنتی‌بادی تک‌زنجیره تیمار شدند. بعد از ٤٨ ساعت سوپ رویی سلول‌های تیمار شده و سلول‌های کنترل برای بررسی تولید IL-2 توسط کیت standard sandwich ELISA(R&D Systems) ارزیابی شد.

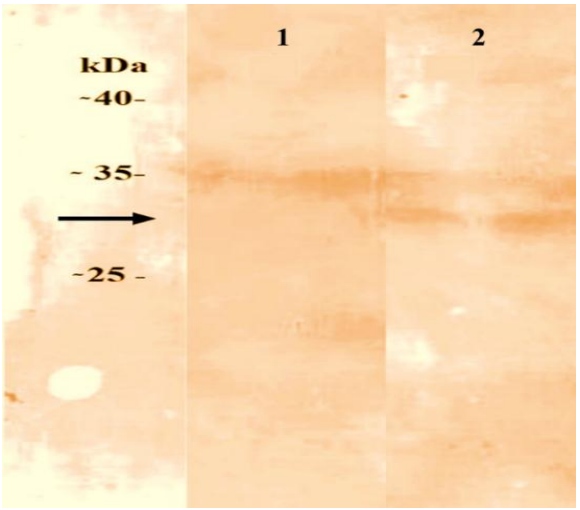
بررسی‌های آماری

جهت آنالیز داده‌ها و محاسبه p value از تست One-way analysis of variance (ANOVA) وt-test استفاده شد و نتایج بر حسب mean ± standard deviation(SD) گزارش شدند.

نتایج

بیان scFv ضد 4-1BB در باکتری TOP 10F

بعد از کشت باکتری‌های نوترکیب حامل پلاسمید pET-22b-scFv بر روی پلیت آمپی‌سیلین، به علت وجود ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک روی پلاسمید pET-22b(+)، برخی از باکتری‌ها در محیط رشد کردند و کلنی تشکیل دادند که نشان‌دهنده ورود پلاسمید به داخل باکتری بود. آنالیز وسترن بلات جهت تائید بیان درست و وزن مولکولی scFv انجام شد. وجود باند حدود ۲۹ کیلودالتون پس از انکوباسیون غشاء با آنتی‌بادی anti-c-myc کنژوگه با HRP بیان موفقیت‌آمیز scFv در کلون انتخابی را نشان می‌دهد (شکل ۱).

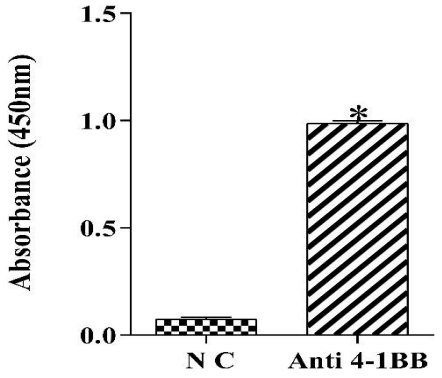


شکل ۱. وسترن بلات پروتئین scFv بیان شده در کلون انتخابی

پروتئین‌های پری‌پلاسمیک استخراج شده، پس از جداسازی با الکتروفورز SDS-PAGE روی ژل ۱۰ درصد، روی غشای نیتروسلولز بلات شد. بعد از انکوباسیون با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد c-Myc باندهای پروتئینی با استفاده از سوبسترای DAB مشاهده شدند. باندهای حدود ۲۹ کیلودالتونی مربوط به پروتئین scFv است. ستون اول: عصاره پری پلاسمی *E.coli* TOP10F القاء نشده به عنوان کنترل منفی. ستون دوم: عصاره پری‌پلاسمی E. *coli* TOP10F القاشده توسط IPTG.

بررسی اتصال scFv ضد 4-1BB به آنتی‌ژن هدف

بعد از القای بیان با IPTG و تائید بیان scFv با اندازه مورد انتظار، فعالیت اتصالی scFv توسط آزمون الایزا بررسی شد. شکل ۲ نشان می‌دهد که scFv تولید شده توانایی شناسایی و اتصال به آنتی‌ژن 4-1BB را دارد.



شکل ۲. اتصال scFv ضد 4-1BB به آنتی‌ژن هدف

بعد از تولید scFv محلول تست الایزا انجام شد. از آنتی‌ژن BSA به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نتایج بصورت میانگین±SD با ۳ مرتبه تکرار آزمایش نشان داده شده است. NC: کنترل منفی.

اختصاصیت

واکنش متقاطع احتمالی scFv ضد 4-1BB با دیگر پروتئین‌ها توسط الایزا ارزیابی شد. نتایج حاصل از این روش نشان دادند که scFv تولید شده با اختصاصیت بالا به آنتی‌ژن هدف وصل شده و واکنش متقاطعی با دیگر آنتی‌ژن‌ها نشان نمی‌دهد (جدول ۱).

جدول ۱. بررسی اختصاصیت scFv ضد 4-1BB به آنتی‌ژن‌های مختلف بوسیله الایزا

	آنتی‌ژن					
	4-1BB	c-Met	ROR1	PD1	BSA	Skimmed Milk
Anti 4-1BB	1.3	0.65	0.48 0.12	0.4	0.59	0.5

بررسی شناسایی مولکول 4-1BB بیان شده در سطح سلول توسط scFv ضد 4-1BB

به منظور ارزیابی اتصال scFv جداسازی شده به آنتی‌ژن 4-1BB در سطح سلول‌های CCRF-CEM روش فلوسیتومتری به کار گرفته شد. اتصال توسط آنتی‌بادی anti-c-Myc کنژوگه با FITC ارزیابی شد و سلول‌های CCRF-CEM تحریک نشده به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. شکل ۳ (ردیف بالا) نشان می‌دهد که سلول‌هایی که تحریک اولیه نداشته‌اند و بنابراین مولکول 4-1BB را نیز بیان نمی‌کنند بعد از مجاورت با آنتی‌بادی‌ها هیچ تغییری در شدت فلورسنت نشان نمی‌دهند. در مقابل، سلول‌هایی که تحریک اولیه را داشته‌اند و مولکول 4-1BB را بیان می‌کنند توانایی اتصال به scFv ضد 4-1BB را دارند. برحسب شدت فلورسنت، آنتی‌بادی تک‌زنجیره اختصاصی توانست به ٪۲۰ سلول‌های CCRF-CEM تحریک شده متصل شود.

القای بیان CD69 بر سطح سلول‌های CCRF-CEM تحریک شده با scFv ضد 4-1BB

سطح بیان CD69 به عنوان مارکر فعال شدن سلول‌های T توسط آنتی‌بادی ضد CD69 کونژوگه با PE و فلوسیتومتری بررسی شد. پس از تحریک سلول‌های CCRF-CEM در حضور و عدم حضور scFv ضد 4-1BB و آنتی‌بادی کنترل ES1، این سلول‌ها با فلوروکروم CD69-PE نشاندار و توسط دستگاه Partec PAS آنالیز شدند. همان طور که در شکل ٤ نشان داده شده است، میزان بیان مارکر فالیت CD69 در سلول‌های CCRF-CEM تحریک شده با scFv ضد 4-1BB نسبت به نمونه کنترل (سلول‌های تیمار نشده) ٪١٤ افزایش یافته است.

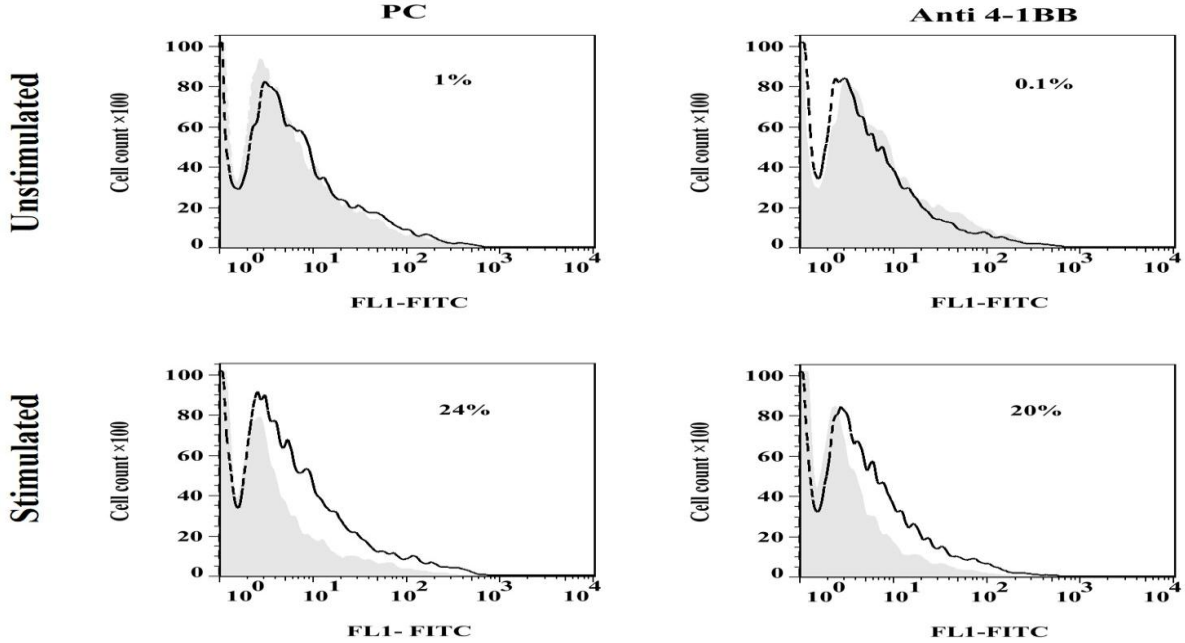
بررسی سطح بیان ژن mRNA سایتوکاین IL-2 در سلول‌های CCRF-CEM تیمار شده با scFv ضد 4-1BB

سطح بیان mRNA سایتوکاین IL-2 در سلول‌های تیمار شده CCRF-CEM توسط Real time PCR ارزیابی شد. برای انجام این روش، پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، سلول‌های CCRF-CEM تیمار شده جمع آوری و میزان بیان ژن‌های مورد نظر بررسی گردید. همچنین در این مطالعه ژن HPRT به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. در نهایت مقادیر Cyclic threshold (CT) مربوط به هر نمونه از دستگاه Corbet استخراج و پس از نرمالیزه کردن داده‌ها میزان بیان ژن‌ها توسط فرمول $۲^{-\Delta\Delta CT}$ و نسبت به نمونه کنترل محاسبه شد. نتایج نشان دادند که تیمار با scFv ضد 4-1BB بیان mRNA سایتوکاین IL-2 را در سلول‌های تیمار شده از ۱ (±۰/۱۳) به ۵ (±۰/۱٤) افزایش داد

(P<0/05) (شکل ۵). با این حال تفاوت معنی‌داری در بیان IL-2 mRNA در سلول‌های تیمار شده با scFv کنترل (ES1) مشاهده نشد.

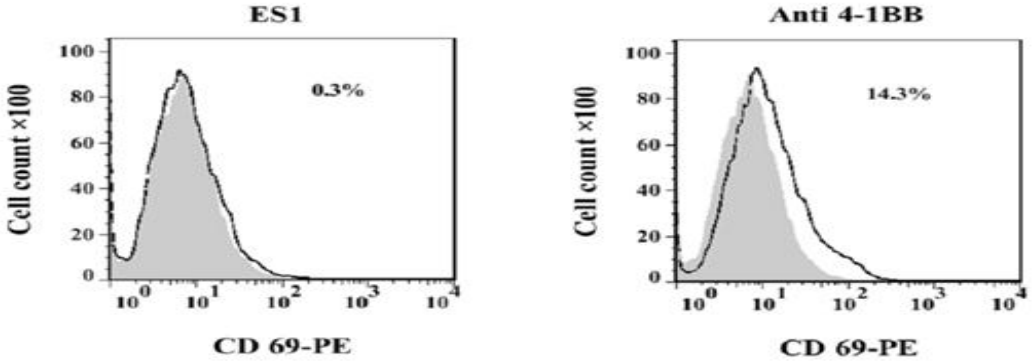
القاء ترشح IL-2 توسط scFv ضد 4-1BB

میزان ترشح IL-2 توسط سلول‌های CCRF-CEM تیمار شده با scFv و ES1 با استفاده از ELISA اندازه‌گیری شد. شکل ٦ نشان می‌دهد که scFv ضد 4-1BB منجر به افزایش قابل توجه در تولید IL-2 در مقایسه با گروه تیمار نشده کنترل شد ($p < 0.05$). علاوه بر این ES1 نتوانست تولید IL-2 را در سلول‌های CCRF-CEM القاء کند.



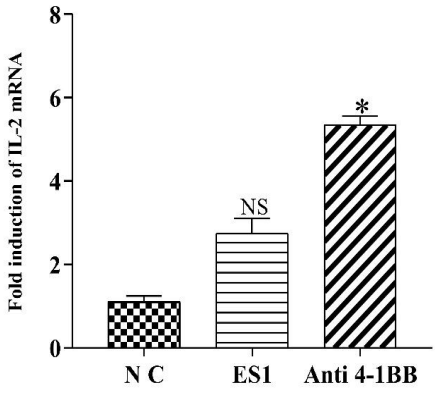
شکل ۳. اتصال scFv تولید شده به مولکول 4-1BB موجود در سطح سلول CCRF-CEM

ردیف بالا سلول‌های تحریک نشده‌ای هستند که توان بیان 4-1BB را ندارند و ردیف پایین سلول‌هایی که پس از تحریک 4-1BB را بیان کرده‌اند. همانطور که در شکل مشخص است scFv به سطح سلول‌های تحریک نشده متصل نشده است در حالی که توانسته به میزان قابل توجهی به هدف خود در سطح سلول تحریک شده متصل شود. نمودار با حاشیه خط‌چین مربوط به scFv ضد 4-1BB و نمودار خاکستری‌رنگ نمونه کنترل ES1 را نشان می‌دهد.



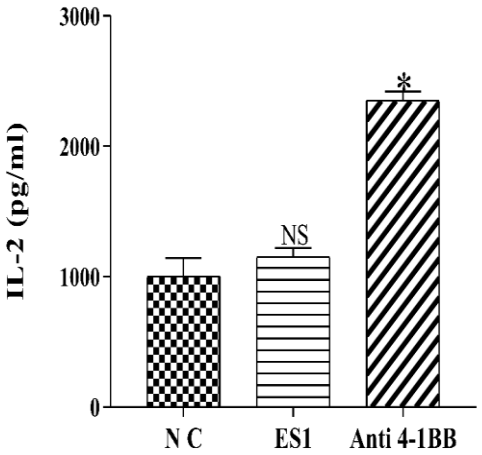
شکل ٤. اثر scFv ضد 4-1BB بر بیان CD69.

سطح بیان مارکر فعالیت سلولی CD69 بر روی سلول‌ها توسط آنتی‌بادی anti-CD69 PE اندازه‌گیری و درصد بیان CD69 توسط نمودار هیستوگرام نمایش داده شد. شکل‌های هیستوگرام با رنگ طوسی نشان‌دهنده‌ی سلول‌های CCRF-CEM تیمار نشده کنترل است و شکل‌های هیستوگرام با خط نقطه‌ای مشکی نشان‌دهنده‌ی سلول‌های CCRF-CEM تیمار شده با scFv ضد 4-1BB و ES1 می‌باشند. در مقایسه با گروه کنترل scFv می‌تواند بیان CD69 را در سطح سلول‌های CCRF-CEM ٪١٤ القاء کند، درحالی‌که ES1 نتوانسته است تغییری در بیان CD69 ایجاد کند.



شکل ۵. اثر scFv ضد 4-1BB روی بیان mRNA سایتوکاین IL-2

بیان mRNA نسبت به بیان ژن HPRT محاسبه شد. در سلول‌های تیمار شده با scFv ضد 4-1BB افزایش معنی‌داری در بیان mRNA سایتوکاین IL-2 مشاهده شد (P<0.05)، در حالی که ES1 نتوانست تولید IL-2 را در سلول‌های CCRF-CEM القاء کنند. *: P<0.05، NS: عدم مشاهده تغییر معنی،NC: کنترل منفی.



شکل ۶. تولید IL-2 توسط سلول‌های CCRF-CEM تیمار شده با scFv ضد 4-1BB.

میزان تولید سایتوکاین توسط سلول‌های CCRF-CEM تیمار شده با scFv ضد 4-1BB با روش الایزا اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده از ترشح سایتوکاین برحسب mean ± SD (pg/ml) با سه بار تکرار است. scFv ضد 4-1BB بطور قابل توجهی تولید IL-2 را افزایش داد (P<0.05) اما ES1 اثری بر روی ترشح IL-2 نداشت.

*: P<0.05، NS: عدم مشاهده تغییر معنی دارد، NC: کنترل منفی.

بحث و نتیجه‌گیری

4-1BB یک مولکول کمک‌تحریکی است که بر روی طیف وسیعی از سلول‌های ایمنی بخصوص سلول‌های TCD8 بیان می‌شود. 4-1BB باعث القاء تولید IL-2، IFN-γ و TNF-α در سلول‌های T شده و همچنین با اثر بر ژن‌های ضد آپوپتوز Bcl-2 و Bcl-xL منجر به مهار مرگ سلولی فعال شده در این سلول‌ها می‌گردد(۱۳). علاوه بر این نقش مؤثر پیام‌رسانی مولکول 4-1BB در طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل تومورهای بدخیم، بیماری‌های خود ایمنی و عفونت‌های ویروسی ثابت شده است. نتایج آزمایش‌های بسیاری نشان داده است که هدف قرار دادن مسیر پیام‌رسانی 4-1BB اثرات قابل توجهی در بهبود استراتژی‌های درمانی دارد که موجب بررسی و تحقیق بیشتر در مورد آنتی‌بادی‌های منوکلونال انسانی بر علیه 4-1BB به عنوان یک عامل درمانی شده است. به نظر می‌رسد که توسعه آنتی‌بادی بر علیه 4-1BB می‌تواند در درمان سرطان‌های انسانی، عفونت‌های ویروسی و بیماری‌های خودایمنی مفید واقع شود.

خاصیت ایمنی‌زایی و اندازه بزرگ آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی موجب محدود شدن کاربرد این آنتی‌بادی‌ها در بالین شده است؛ بنابراین تولید آنتی‌بادی‌های انسانی با اندازه کوچکتر می‌تواند کاربرد زیادی در تشخیص و درمان بیماری‌های مختلف داشته باشد(۱٤, ۱۵). به خاطر مزیت‌های زیادی که scFvها نسبت به آنتی‌بادی‌های کامل دارند، این قطعات تک-زنجیره‌ی آنتی‌بادی به عنوان ابزارهای مناسبی برای هدف قرار دادن بیومارکرهای مختلف معرفی شده‌اند و تاکنون scFvهای مختلفی با فعالیت ضدتوموری و تعدیل‌کننده تولید شده است. از مزایای scFv (حاوی نواحی VLو VH) در مقایسه با آنتی‌بادی‌های منوکلونال می‌توان به اندازه کوچکتر، در نتیجه دسترسی بهتر به آنتی‌ژن هدف، حلالیت بالا، قابلیت دست‌ورزی راحت‌تر و زمان کوتاهتر تولید اشاره کرد(۱٦, ۱۷). اندازه کوچک scFv، نفوذ سریع‌تر و عمیق‌تر را به داخل بافت‌های توموری

در مقایسه با آنتی‌بادی‌های منوکلونال سبب می‌شود. علاوه بر این قطعات scFv انسانی از نظر ژنتیکی پایدارتر هستند و می‌توان آنها را به مدت چندین سال در دمای یخچال نگهداری نمود(۱۸, ۱۹). آنتی‌بادی‌های تک‌زنجیره نه تنها به دلیل فقدان قطعه ثابت (Fc) ایمنی‌زایی و اثرات جانبی را در بافت‌ها و اندام‌های مختلف کاهش می‌دهند بلکه در مقایسه با آنتی‌بادی‌های کامل، پروتئین‌های کوچک، غیرگلیکوزیله و فاقد پیوند دی‌سولفیدی می‌باشند. عدم نیاز به تغییرات پس از ترجمه سبب شده که بتوان قطعات scFv را به راحتی در باکتری‌هایی از قبیل اشریشیاکلی تولید نمود و دیگر نیازی به کشت سلول پستانداران و یا استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نیست(۲۰, ۲۱).

در این پژوهش تولید scFv انسانی علیه آنتی‌ژن 4-1BB با استفاده از همسانه‌سازی و بیان توالی مربوطه در *E.coli* انجام شد. این scFv اختصاصیت مناسبی برای اتصال به آنتی‌ژن هدف و مولکول 4-1BB بر سطح سلول‌های CCRF-CEM داشته و با سایر پروتئین‌ها واکنش متقاطعی ندارد. نتایج این پژوهش اثبات نمود که تیمار با scFv ضد 4-1BB بیان CD69 را بر سطح سلول‌های CCRF-CEM افزایش داده و بیان mRNA سایتوکاین IL-2 و نیز تولید پروتئین IL-2 را القاء می‌کند. scFv ضد 4-1BB از طریق هدف قرار دادن 4-1BB در محیط برون‌تنی قادر به ایجاد پاسخ‌های ایمنی در سلول‌های CCRF-CEM است و این امر نشان‌دهنده‌ی ویژگی و توانایی scFv در تنظیم ایمنی است.

هدف از این مطالعه تولید scFv های انسانی علیه 4-1BB بوده است. نتیجه اصلی که می‌توان از این مطالعه به دست آورد این است که scFv تولید شده دارای عملکرد مناسب در تحریک سلول‌های T انسانی را داشته و می‌توان از آن در مطالعات سلول‌درمانی سرطان جهت فعال‌سازی سلول‌های ایمنی استفاده نمود.

قدردانی و تشکر

از همکاری صمیمانه آقای دکتر فرهاد ریاضی‌راد در بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران تشکر و قدردانی می‌گردد. این تحقیق با حمایت مالی معاونت تحقیقات، فناوری و آموزش انستیتو پاستور ایران "گرنت پژوهشی شماره ۸۱۸ " انجام شده است.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

منابع

1. Sanchez-Paulete AR, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME, Azpilikueta A, Etxeberria I, Bolaños E, et al. Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy. European Journal of Immunology 2016;46(3): 22-513.
2. Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy. BMB Reports 2014;47(3):122.
3. Barsoumian HB, Yolcu ES, Shirwan H. 4-1BB signaling in conventional T cells drives IL-2 production that overcomes CD4+ CD25+ FoxP3+ T regulatory cell suppression. PloS One 2016;11(4):e0153088.
4. Kuang Y, Weng X, Liu X, Zhu H, Chen Z, Chen H. Effects of 4-1BB signaling on the biological function of murine dendritic cells. Oncology Letters 2012;3(2):81-477.
5. Bitra A, Doukov T, Croft M, Zajonc DM. Crystal structures of the human 4-1BB receptor bound to its ligand 4-1BBL reveal covalent receptor dimerization as a potential signaling amplifier. Journal of Biological Chemistry 2018:jbc. RA118. 003176.
6. Sturgill ER. TNFR Agonists: A Review of Current Biologics Targeting OX40, 4-1BB, CD27, and GITR. American Journal of Hematology/Oncology 2017;13(11).
7. Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB signaling beyond T cells. Cellular & Molecular Immunology 2011;8(4):1-28.
8. Curran MA, Geiger TL, Montalvo W, Kim M, Reiner SL, Al-Shamkhani A, et al. Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. Journal of Experimental Medicine 2013;210(4):743-55.
9. Vinay DS, Kwon BS. Therapeutic potential of anti-CD137 (4-1BB) monoclonal antibodies. Expert Opinion on Therapeutic Targets 2016;20(3):361-73.

10. Chester C, Sanmamed MF, Wang J, Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. Blood 2017:blood-2017-06-741041.
11. Dharmadhikari B, Wu M, Abdullah NS, Rajendran S, Ishak ND, Nickles E, et al. CD137 and CD137L signals are main drivers of type 1, cell-mediated immune responses. Oncoimmunology 2016;5(4):e1113367.
12. Mbanwi AN, Watts TH, editors. Costimulatory TNFR family members in control of viral infection: outstanding questions. Seminars in Immunology; 2014: Elsevier.
13. Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB agonists: multi-potent potentiators of tumor immunity. Frontiers in Oncology 2015;5:117.
14. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985;228(4705):1315-7.
15. Keller T, Kalt R, Raab I, Schachner H, Mayrhofer C, Kerjaschki D, et al. Selection of scFv antibody fragments binding to human blood versus lymphatic endothelial surface antigens by direct cell phage display. PloS One 2015;10(5):e0127169.
16. Roncolato EC, Campos LB, Pessenda G, e Silva LC, Furtado GP, Barbosa JE. Phage display as a novel promising antivenom therapy: a review. Toxicon 2015;93:79-84.
17. Ma H, O'Kennedy R. Recombinant antibody fragment production. Methods 2017;116:23-33.
18. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. Clinical and Developmental Immunology 2012;2012.
19. Qamsari ES, Sharifzadeh Z, Bagheri S, Riazi-Rad F, Younesi V, Abolhassani M, et al. Isolation and characterization of anti c-met single chain fragment variable (scFv) antibodies Journal of Immunotoxicology 2017;14(1):23-30.
20. J.Abdolalizadeh JMz, M. Nouri. Isolation of Anti-tumor Necrosis Factor-Alpha(TNF-α) scFvs Antibody from phage antibody library. Journal of Babol University of Medical Sciences 2013;15(3):79-87.
21. Safarpour H, Shahmirzaie M, Rezaee E, Barati M, Safarnejad MR, Shirazi FH. Isolation and characterization of novel phage displayed scFv fragment for human Tumor necrosis factor alpha and molecular docking analysis of their interactions. Iranian journal of pharmaceutical research: Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2018;17(2):743.

Daneshvar

Medicine

Production of recombinant human single chain anti-4-1BB molecule antibody in *Escherichia coli*

Salman Bagheri, Elmira Safaie Qamsari, Shima Ebadollahi, Zahra Sharifzadeh*

Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

*** Corresponding author e-mail: zsharifzadeh@gmail.com**

Abstract

Background and Objective: Monoclonal antibodies against 4-1BB have been used in the treatment of autoimmune diseases, viral infections, as well as immunotherapy of cancers. Because of their foreign nature and the large size, the murine monoclonal antibodies have restricted efficacy in clinical use. Fully human antibody fragments such as scFv fragments can be an attractive alternative for immunotherapeutic applications. The aim of this study was the production of human scFv antibodies against 4-1BB in order to use it in cancer immunotherapy.

Materials and Methods: In this study, anti-4-1BB scFv gene was cloned in pET-22(+) and expression in *E. coli* TOP 10F.The initial analysis of the gene product was performed by western blot and ELISA. Furthermore, its efficacy in stimulating 4-1BB expressing cells was evaluated by assessing the cell surface expression of CD69 and IL-2 mRNA and protein expression**.**

Results: The results showed that the designed scFv gene was well expressed in *E. coli* and specifically reacts to the target antigen. The CCRF-CEM cell' treatment with anti-4-1BB scFv induced IL-2 production and increased CD69 expression on the surface of target cells.

Conclusion: The anti-4-1BB single-chain antibody was successfully expressed in *E. coli* expression system and is able to detect target antigen and activate CCRF-CEM cells. This recombinant antibody could be useful for T cell activation in cancer cell therapy approaches.

Keywords: 4-1BB molecule, Cell therapy, Single-chain fragment variable (scFv), Human recombinant antibody

Scientific-Research Journal of Shahed University
27th Year, No.142
August- September 2019

Received: 03/07/2019
Last revised: 21/08/2019
Accepted: 27/08/2019

Daneshvar(medicine) shahed University/ 27th year/2019 /NO.142