

کلونینگ ، بیان و تخلیص دیابادی -Anti- CTLA-1 – Anti-PDL-1

4 در میزبان *E. coli* با استفاده از تگ pelB

عاطفه خداکرمی¹، خسرو خواجه²، یعقوب فتح الهی³، بهاره دبیرمنش^{4*}

1- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2- استاد گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3- استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

4- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* نویسنده مسئول:

تلفن: 021-82883428

دورنگار: 021-82884485

ایمیل: dabirmanesh@modares.ac.ir

پذیرش: 1403/1/6

دریافت: 1402/4/22

چکیده

نقاط بازرسی ایمنی، مولکول‌هایی هستند که سیستم ایمنی را تنظیم می‌کنند. برخی از سلول‌های تومور می‌توانند لیگاند‌های متصل‌شونده به این نقاط بازرسی ایمنی را برای فرار از پاسخ‌های ایمنی ضد توموری بیان کنند. برخی از عوامل مانند آنتی‌بادی‌ها می‌توانند این نقاط بازرسی را مهار کنند. هدف از این مطالعه بیان یک دیابادی دومنظوره جدید در فضای پری پلاسمیک باکتری (*E. coli* BL21(DE3)) برای مهار همزمان دو نقطه بازرسی ایمنی، پروتئین مرتبط با (CTLA 4) و لیگاند متصل‌شونده به پروتئین PD-1 (PD L1) است.

دیابادی دومنظوره براساس ژن نواحی متغیر آنتی‌بادی‌های anti PD-L1 و anti CTLA 4 طراحی و برای بیان در باکتری *E. coli* BL21(DE3) بهینه‌سازی و در پلاسمید بیانی pET21 کلون شد. پس از ترنسفرم کردن به داخل سویه بیانی *E. coli* BL21(DE3) اثر شرایط بیانی مختلف کشت بررسی شد، بیان Dia-21 با وزن مولکولی 55 کیلو دالتون با الکتروفورز ژل SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. بهترین شرایط برای بیان پری پلاسمیک به فرم محلول بیان با 0/5 میلی مولار IPTG در دمای 23 درجه سانتی‌گراد محیط کشت LB و زمان 18 ساعت به دست آمد. پروتئین بیان‌شده سپس با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل آگارز با بازده نهایی 0/4 میلی گرم در لیتر تخلیص و در نهایت میل ترکیبی برهم‌کنش پروتئین خالص‌شده به وسیله Cell-ELISA بررسی شد.

در این مطالعه پروتئین دیابادی نوترکیب در یک سیستم باکتریایی کلون، بیان و خالص‌سازی و برهم‌کنش این پروتئین با گیرنده سطح سلولی PDL-1 در رده سلولی MDA-MB 231 به عنوان

سلول با این گیرنده و همچنین سلول فیبروبلاستی HFF به‌عنوان سلول کنترل منفی و فاقد گیرنده PDL-1 از طریق Cell-Elisa بررسی شد که نتایج آزمایش نشان‌دهنده اتصال این روتئین نوترکیب با گیرنده سطح سلولی PDL-1 بود.

واژه‌های کلیدی: نقاط بازرسی ایمنی، دیابادی نوترکیب، CTLA-4، PDL-1، بیان پری‌پلاسمیک، باکتری *E.coli* BL21 (DE3).

1- مقدمه

روش درمانی مؤثرتر سرطان با دوزهای پایین‌تر از ماده فعال، روش‌های درمانی متفاوتی ایجاد شده است که از آن می‌توان ایمونوتراپی را نام برد. به این روش در سال‌های پیشین توجه بسیاری شده است. این روش را می‌توان استفاده از ویژگی‌های سیستم ایمنی در درمان سرطان تعریف کرد. ایمونوتراپی می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی مستقل استفاده شود یا در ترکیب با سایر روش‌های درمانی مانند جراحی، شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی استفاده شود [5-7].

از بین روش‌های مختلف ایمونوتراپی، درمان بر مبنای مهارکننده نقاط کنترلی¹ در چند سال گذشته مورد توجه بیشتر پژوهشگران قرار گرفته است که مطالعه Tasuku Honjo و James P. Allison در سال 2018 روی دو خانواده مهم از مهارکننده‌های نقاط کنترلی به نام CTLA-4 و PDL-1 منجر به دریافت جایزه نوبل فیزیولوژی پزشکی شد. در مهارکننده‌های نقاط کنترلی (یا تعدیل‌کننده کنترل ایمنی)² پاسخ سیستم ایمنی به‌وسیله پروتئین‌های سطحی لنفوسیت T_{reg} تعدیل و از پاسخ بیش از حد و طولانی‌مدت جلوگیری می‌کند. این نقاط مهارتی شامل پروتئین‌هایی به نام پروتئین‌های بازرسی ایمنی³ هستند که بر سطح لنفوسیت‌های T بیان می‌شوند. زمانی که پروتئین‌های بازرسی ایمنی پروتئین‌های

سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل اصلی مرگ‌ومیر در سطح جهان است. با افزایش جمعیت و افزایش سن در سراسر جهان، سرطان عامل اصلی مرگ زودرس است و امید به زندگی را در بسیاری از کشورها کاهش می‌دهد. سرطان یک بیماری بسیار پیچیده است که با رشد کنترل‌نشده سلول‌ها و گسترش سلول‌های غیرطبیعی در بدن تنها در سال 2017 باعث مرگ بیش از 9/6 میلیون نفر در سراسر جهان شده است [1]. با توجه به آمارهای به‌دست‌آمده از انجمن سرطان آمریکا در سال 2021، متخصصان اعلام کردند که نزدیک به 1/9 میلیون نفر به سرطان مبتلا شده‌اند و تقریباً 608,570 نفر بر اثر سرطان جان خود را از دست داده‌اند [2]. همچنین پیش‌بینی می‌شود مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان تا سال 2030 به 22 میلیون نفر برسد. در میان روش‌های مختلف به‌کارگرفته شده در درمان سرطان، جراحی به‌طور معمول اولین روش انتخابی است. راهبرد مناسب برای درمان با توجه به نوع و مرحله سرطان انتخاب می‌شود. به سایر روش‌های درمانی می‌توان به شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و ترکیبی از هر دو روش اشاره کرد [3، 4].

امروزه برای درمان سرطان از یک روش درمانی یا ترکیبی از روش‌های درمانی مختلف استفاده می‌شود ولی همچنان موفقیت مطلوب در درمان سرطان به دست نیامده است. به‌منظور کاهش و مقابله با عوارض جانبی و انجام

1 Immune checkpoint inhibitors
2 Immune checkpoint modulators
3 Immune checkpoint proteins

سلول‌های T را افزایش می‌دهند. این داروها به تحریک سلول‌های T کمک می‌کنند تا به سلول‌های سرطانی حمله کنند. همچنین می‌توان گفت که CTLA-4 همچنین می‌تواند به مهار رشد سلول‌های سرطانی کمک کند. این موضوع اهمیت درمانی دارد به‌ویژه در سلول‌های سرطانی که از افزایش سرعت رشد بالا برخوردار هستند. در کل، استفاده از داروها که به PD-L1 و CTLA-4 متصل می‌شوند، می‌تواند به بهبود واکنش سیستم ایمنی در مبارزه با سلول‌های سرطانی کمک کند و برای بسیاری از بیماران با سرطان اهمیت دارد. این داروها به عنوان ابزارهای مؤثری در درمان سلولی سرطانی شناخته می‌شوند [13-15].

پروتئین‌های دارویی، یکی از گران‌ترین و مهم‌ترین محصولات هستند که بشر توانسته است آنها را از راه‌هایی بجز روش طبیعی، سنتز و تولید کند. در سال‌های پیشین آنتی‌بادی‌ها همواره یک نقش محوری در پژوهش‌های مرتبط با شناسایی و درمان سرطان در بدن به‌عنوان یک داروی هدفمند داشته‌اند. در این میان، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کاملاً انسانی به دلیل عدم ایمونوژنیسیته و کارایی بالا در درمان بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند [11]. در سال‌های پیشین با توجه به مشکلاتی که در مسیر تولید آنتی‌بادی‌ها وجود دارد، فرم‌های جدیدی از آنتی‌بادی‌ها مطالعه شده است که از آنها در این راستا ساخت قطعه‌های آنتی‌بادی (ScFv) است که مزیت‌های آن اندازه کوچک، پاکسازی⁴ سریع از خون و نفوذپذیری بهتر به بافت‌ها است که دامنه گسترده‌ای از کاربردهای تشخیصی و درمانی داشته باشند [12]. ScFv در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها توانایی بیشتری برای وارد شدن به بافت‌های متراکم مانند تومورها دارد. مولکول ScFv کوچک‌ترین قطعه متغیر آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای است که می‌تواند به‌صورت

خاصی را در سلول‌های دیگر شناسایی می‌کنند، مسیر پیام‌رسانی در لنفوسیت‌های T فعال و منجر به غیرفعال شدن پاسخ ایمنی در این سلول‌ها می‌شود [8؛ 9]. به‌تازگی پژوهش‌های بسیاری درباره اهمیت مولکول‌های PD-L1 و CTLA-4 انجام گرفته است که در زمینه درمان سرطان نقش بزرگی ایفا می‌کنند. این مولکول‌ها به‌عنوان هدف‌های مهم برای تراپی سلولی سرطانی شناخته می‌شوند. در ادامه توضیحات بیشتری در مورد اهمیت آنها ارائه می‌شود:

اهمیت PD-L1: در مهار سیگنال‌دهی منفی: PD-L1 با اتصال به PD-1 بر سلول‌های T ایمنی موجب مهار تحریک سلول‌های T می‌شود. این سیگنال‌دهی منفی در مقابل سلول‌های سرطانی ممکن است باعث ناتوانی سیستم ایمنی در شناسایی و نابودی سلول‌های سرطانی شود. بسیاری از سلول‌های سرطانی افزایش PD-L1 را به‌عنوان یک سازوکار فرار از سیستم ایمنی به کار می‌گیرند. این باعث مقاومت به درمان‌های مختلف مانند درمان‌های تارگت شده و درمان‌های ایمنی محور می‌شود. همچنین داروهایی مانند Pembrolizumab, Durvolumab و Nivolumab به PD-L1 متصل می‌شوند و از مکانیسم فرار سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند. این داروها به بهبود واکنش سیستم ایمنی برای مبارزه با سلول‌های سرطانی کمک می‌کنند و در درمان برخی از نوع‌های سرطان مؤثر هستند [10-12].

مهار تحریک اولیه سلول‌های لنفوسیت T با اتصال CTLA-4 به CD80 و CD86 روی سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APCs) متصل می‌شود و مهار تحریک اولیه سلول‌های T را ایجاد می‌کند. این مهار باعث می‌شود که سلول‌های T نتوانند به سلول‌های سرطانی حمله کنند. همچنین داروهایی مانند Ipilimumab که ساختار آنتی‌بادی دارند به CTLA-4 متصل می‌شوند و تحریک

4 Clearanse

BL21(DE3) به عنوان میزبان اختصاصی برای بیان ژن کلون شده استفاده شد.

2-2 طراحی و کلونینگ سازه ژنی Dia-21

در این مطالعه، نخست سکانس کامل ژن مربوط به آنتی بادی ضد CTLA-4 که آنتی بادی Durvalumab با کد (DrugBank Accession Number: DB11714) و سکانس کامل ژن مربوط به آنتی بادی ضد PDL-1 که Ipilimumab با کد (DrugBank Accession Number: DB06186) از بانک دارویی Drugbank گرفته شد. علت انتخاب این دو آنتی بادی براساس K_H، تمایل اتصال آنها به پروتئین هدف و همچنین ناحیه اتصال آنها می باشد و سپس از آنجا که برای طراحی ژن دیابادی مورد نظر نیاز به ناحیه متغیر سبک و سنگین هر کدام از این آنتی بادی ها بود، پس این نواحی برای هر کدام از این آنتی بادی ها تعیین شد. پس از آن ناحیه سبک anti CTLA-4 به ناحیه سنگین anti PDL-1 از راه یک لینکر G4S و همچنین ناحیه سبک anti CTLA-4 به ناحیه سنگین anti PDL-1 از راه یک لینکر G4S دیگر به هم متصل و در نهایت برای اتصال این دو ساختار به یکدیگر یک لینکر بزرگتر (G4S*3) استفاده شد. در نهایت ساختار مورد نظر برای این طرح به صورت 1 ناحیه متغیر زنجیره سنگین آنتی بادی ضد PDL-1 به ناحیه متغیر زنجیره سبک CTLA-4 با یک لینکر G4S و در طرف دیگر ناحیه متغیر زنجیره سنگین آنتی بادی CTLA-4 به ناحیه متغیر زنجیره سبک PDL-1 با یک لینکر G4S متصل و سپس لینک بزرگتر که طول 15 آمینواسیدی است و توالی سه بار تکرار از G4S دارد، این دو ساختار را به هم اتصال داد (شکل 1). پس از طراحی سازه مورد نظر سکانس طراحی شده با توجه به برتری کدونی باکتری *E. coli* برای سنتز ارسال و سپس سنتز ژن در بین دو سایت برش *NdeI* و *XhoI* به وسیله این شرکت در وکتور pUC57 انجام شد [18].

اختصاصی به آنتی ژن هدف خود متصل شود. این مولکول یک آنتی بادی تک ظرفیتی با وزن مولکولی حدود 25-30 کیلودالتون است که در آن زنجیره های متغیر سبک (V_L) و زنجیره متغیر سنگین (V_H) با یک اتصال دهنده پپتیدی انعطاف پذیر متصل شده اند. همچنین با کنار هم قرار گرفتن دو یا چهار ساختار ScFv به ترتیب ساختار دیابادی⁵ و تترابادی⁶ شکل می گیرد که به دلیل افزایش ظرفیت آنتی بادی شدت اتصال⁷ افزایش پیدا می کند [16-19].

با توجه به اهمیت PD-L1 و CTLA-4 در درمان سرطان به عنوان مهارکننده های نقاط کنترلی و همچنین نتایج مثبت مطالعه ها بر این دو پروتئین و ارزشمند و سودآور بیان آنتی بادی های این دو پروتئین به صورت دیابادی در سال های گذشته، در این مطالعه دیابادی بر اساس آنتی بادی های این دو پروتئین طراحی کرده و از آنجا که بیشتر ساختارهای دیابادی به فرم اینکولوژن بادی هستند و یکی از دلایل ایجاد این فرم وجود تعداد زیادی باند دی سولفید در این ساختارها بوده است، بر آن شدیم تا اثر تگ پری پلاسمیک pel B بر میزان بیان و حلالیت دیابادی مورد نظر مطالعه و بررسی شد [19-26].

2- مواد و روش ها

2-1 مواد

آنزیم polymerase، آنزیم های محدودگر *XhoI* و *NdeI* و بقیه آنزیم ها از شرکت فرمتاز آمریکا⁸ خریداری شد. SDS، EDTA و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت بایوبیسیک کانادا⁹ خریداری شد. مواد استفاده شده در تهیه ژل اکریل آمید و سایر مواد از شرکت سیگما آلمان¹⁰ تهیه شد. در این پژوهش از باکتری *E. coli* سویه

5 Diabody

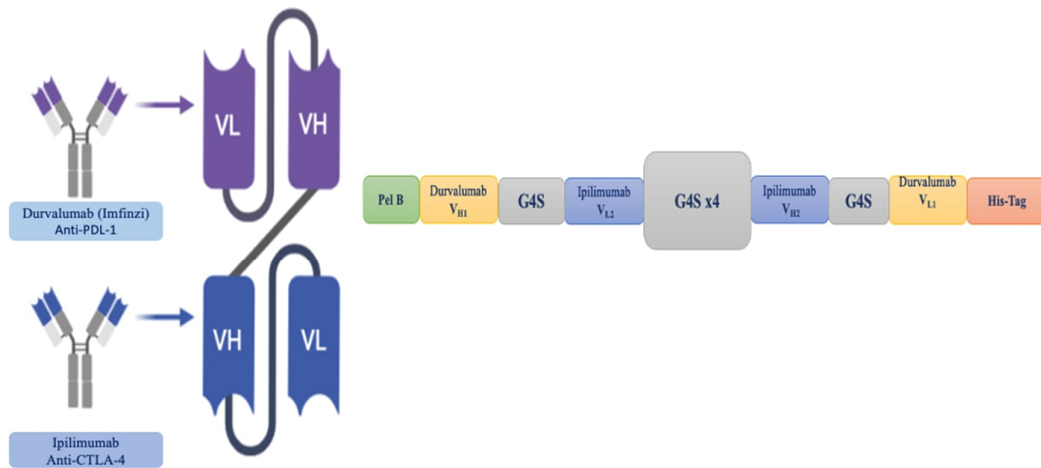
6 Tetrabody

7 Affinity

8 USA-Fermentase

9 Biobasic - Canada

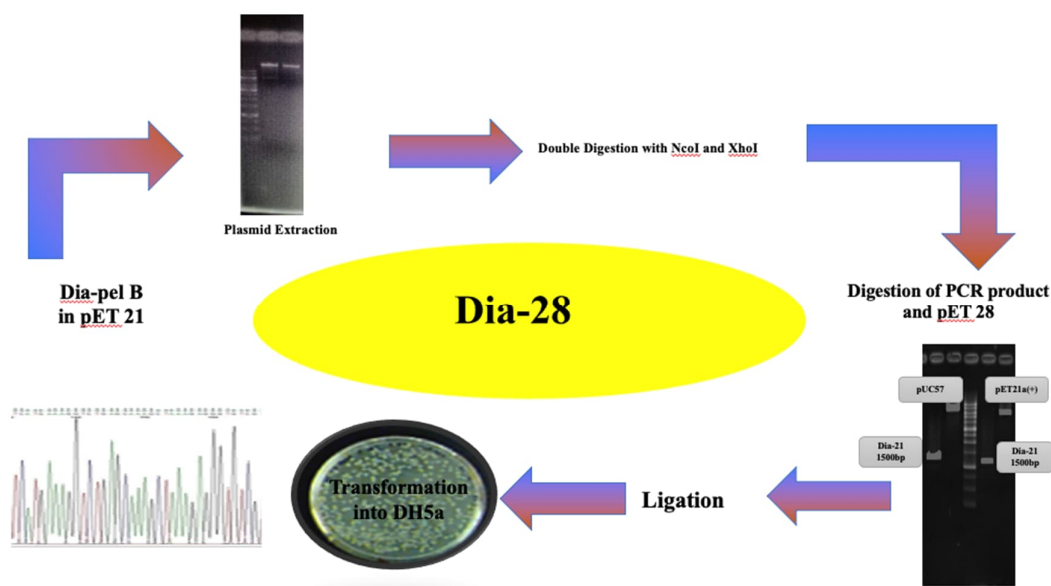
10 Sigma - Germany



شکل 1 ساختار دی‌بابادی anti PDL.1 / anti CTLA.4

در ادامه بر وکتور استخراج‌شده به‌وسیله دو آنزیم محدودکننده *XhoI* و *NdeI* هضم آنزیمی انجام گرفت. وکتور بیانی pET21a نیز به‌وسیله این دو آنزیم برش داده شد. در ادامه برای اتصال، ژن و وکتور pET21a به نسبت 1 به 3 به‌وسیله آنزیم T4 ligase برای مدت یک شب در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. وکتور حاوی ژن به باکتری بیانی *E.coli* BL21(DE3) برای بیان منتقل شد. تعدادی از پلاسمیدهای تأییدشده با این روش‌ها برای تعیین توالی با پرایمر T7 promotor و T7 terminator، ارسال شدند که وجود ساختار دارای تگ pel B (که یک تگ پریپلاسمیک است) تأیید شد (شکل 2) [28].

پس از ایجاد وکتور نوترکیب و بعد از ترنسفورم کردن آن در سلول‌های *E. coli* DH5a، سلول‌های ترنسفورم‌شده در محیط کشت LB آگار (جامد) با آمپی‌سیلین 100mg/ml، کانامایسین 50 mg/ml و بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. سپس از کلونی‌های رشد کرده روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، یک پلیت مادر تهیه شد. با استفاده از پرایمرهایی که برای تکثیر قطعه ژنی استفاده شدند، Colony PCR بر تعدادی از کلونی‌ها انجام شد. از کلونی‌هایی که حاوی ژن تشخیص داده شدند، استخراج پلاسمید انجام گرفت و این پلاسمیدها با مارکر سائز مناسب روی ژل مشاهده شدند [27].



شکل 2 مراحل انجام کلونینگ دیابادی. anti PDL.1 / anti CTLA.1

سپس محلول به دست آمده را با سانتریفیوژ با دور $12000 \times$ به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد ته نشین شدند. در مرحله بعدی پلت به دست آمده را در بافر حاوی 5 میلی مولار $MgSO_4$ حل کرده و محلول به دست آمده را به مدت 1 ساعت در دمای 4 درجه با 100 RPM انکوبه می کنیم و پس از آن محلول را با همان شرایط قبلی سانتریفیوژ کرده و نمونه ها را از هم جدا می کنیم. همه نمونه ها به همراه بافر نمونه در دمای 100 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه حرارت داده شدند. برای آنالیز بیان پروتئین نوترکیب نمونه ها روی ژل 12 درصد SDS-PAGE بارگذاری و به وسیله بریلیانت بلو G-250 رنگ آمیزی شدند. پس از تأیید بیان و به دست آوردن پروتئین مورد نظر نمونه ها برای مرحله تخلیص ضد بافر تریس 50 میلی مولار pH 8 دیالیز شدند [22، 31].

2-5 تخلیص پروتئین

به منظور تخلیص پروتئین مورد نظر، از روش کروماتوگرافی تمایلی¹¹ و از ستون نیکل سفارز¹² استفاده شد. دیابادی

2-3 بیان پروتئین Dia-21 در باکتری *E. coli* BL.21
 نخست تک کلنی از باکتری حاوی وکتور نوترکیب مورد نظر در حجم 10 mL محیط کشت LB مایع حاوی آمپی سیلین $100 \mu\text{g/ml}$ به مدت 16 ساعت کشت داده شد. سپس به نسبت 1:100 در 100 mL محیط کشت جدید تلقیح و در انکوباتور در دمای 37°C با دور 180 rpm منتقل شد و بعد از رسیدن به OD_{600} برابر 0/5 مختلف IPTG (0/5، 0/25، 0/30، 0/37) و زمان های متفاوت (2، 4، 6 و 12 ساعت) بررسی شد. بیان بهینه در غلظت نهایی غلظت 0/5 mM IPTG در دمای 23°C به مدت 12 ساعت تعیین شد. سلول ها پس از 12 ساعت انکوباسیون با سانتریفیوژ جمع آوری شدند (4°C ، 4 min، 20 g، 12000). [29].

2-4 به دست آوردن پروتئین پری پلاسمیک

در مرحله بعد رسوب به دست آمده از بیان پروتئین را در بافر هایپوتونیک حاوی 500 میلی مولار سوکروز، 0/5 mM تریس اسیدی و 1 mM EDTA حل کرده و سپس به مدت 1 ساعت در 100 RPM دمای 4 درجه قرار می دهیم.

11 Affinity Chromatography

12 Nickel - Sepharose

غشا با بافر شستشو 3 بار و هر بار به مدت 5 دقیقه شسته شد. سپس از سوسترای دی آمینو بنزیدین¹⁶ به همراه 10 میکرولیتر پراکسید هیدروژن 30 درصد برای مشخص شدن باندهای موردنظر استفاده شد و پس از ظهور، باند غشا با آب مقطر شسته و نگهداری شد. در پایان از کاغذ حاوی باند، اسکن تهیه شد [33].

2-7 بررسی اتصال اولیه و تأیید آن با روش Cell-ELISA

برای بررسی اتصال میل ترکیبی پروتئین‌های نو ترکیب به گیرنده PDL-1 از سلول MDA-231 (که از نظر تعداد این گیرنده جزء سلول‌های با بیان بالا است) استفاده شد و برای کنترل منفی از رده سلولی فیروپلاستی HFF (که از نظر بیان این گیرنده بسیار پایین است) برای تست Cell-ELISA استفاده شد (شکل 3). در آغاز 15000 سلول/چاهک در پلیت‌های میکروتیتر Nunc-ImmunoPlates® Maxisorp (فرانکفورت، آلمان) کاشته شدند. سپس در دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. زمانی که تراکم سلولی به 70 درصد رسید، سلول‌ها به وسیله فرمالدئید (10 درصد حجمی) تثبیت و در ادامه با محلول بلاکینگ BSA 5 درصد وزنی بر حجم (-PBS) 5% BSA) تثبیت متوقف شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف Dia-21 به مدت 2 ساعت تیمار شدند. پلیت پنج بار با PBS-tween20 شسته شد. سپس پلیت‌ها با آنتی His-taq به عنوان آنتی‌بادی کنژوگه به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. آنگاه سوستر TMB براساس پروتکل شرکت بایوراد¹⁷ آماده شد. سپس واکنش با اسید سولفوریک 1 نرمال متوقف شد و میزان جذب هر چاهک در طول موج 450 نانومتر توسط دستگاه بایوتک¹⁸ قرائت شد [34].

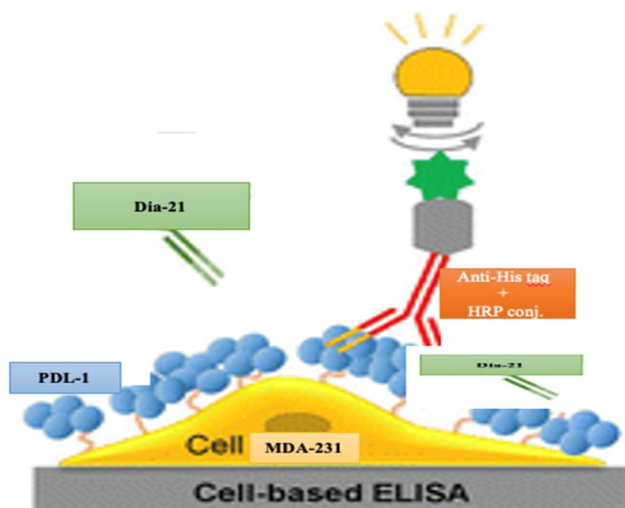
نو ترکیب بیان‌شده دنباله هیستیدینی (His6-tag) در انتهای کربوکسیل (C-Terminal) خود دارد. این دنباله هیستیدینی تمایل زیادی به نیکل دارد و میانکش محکمی با آن برقرار می‌کند. به این منظور، نخست ستون به‌وسیله بافر تریس 50 میلی‌مولار pH 8 ایمیدازول 10 میلی‌مولار به تعادل رسید. سپس عصاره سلولی به ستون منتقل و به آرامی از روی ستون عبور داده شد و به دنبال آن حذف پروتئین‌های متصل‌نشده به ستون به‌وسیله بافر شستشو¹³ انجام شد و در آخر برای جداسازی پروتئین‌های متصل به ستون از بافر جداکننده¹⁴ استفاده شد. بافر جداکننده تریس 50 میلی‌مولار به همراه ایمیدازول 250 میلی‌مولار با pH 8 دارد. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می‌شود. خلوص و تعیین وزن مولکولی نمونه تخلیص‌شده بر ژل 12 درصد SDS-PAGE براساس روش Laemmli کنترل شد [30؛ 32].

2-6 بلاکینگ

به منظور شناسایی آنتی‌ژن یا آنتی‌ژن‌های اختصاصی، پس از الکتروفورز نمونه بر روی ژل پلی‌اکریلامید، یک ورقه از غشای نیتروسلولز به اندازه ژل بریده شد و بر روی ژل قرار داده شد و پس از قرار گرفتن چندین لایه کاغذ واتمن در دو طرف، الکتروفورز به مدت 4 ساعت در ولتاژ 80 ولت ران شد در ادامه از سرم گاوی با غلظت 3% در فسفات بافر سالین حاوی 5% تونین¹⁵ 20 بعنوان بلاکینگ بافر (بافر مسدودکننده) استفاده شد. پس از 3 بار شستشو غشای آن به مدت 1 ساعت در آنتی‌بادی اولیه کنژوگه با پراکسیداز (که با رقت 1:1000 آماده شد بود) انتقال داده شد. سپس به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت این زمان،

16 DAB
17 Bio-Rad
18 Bio Tek Epoch Plate Reader

13 Washing Buffer
14 Elution Buffer
15 PBS-TWEEN20 0.05%



شکل 3 Cell-Based Elisa برای تأیید اتصال دیابادی به گیرنده PDL-1 سطح سلول MDA-231

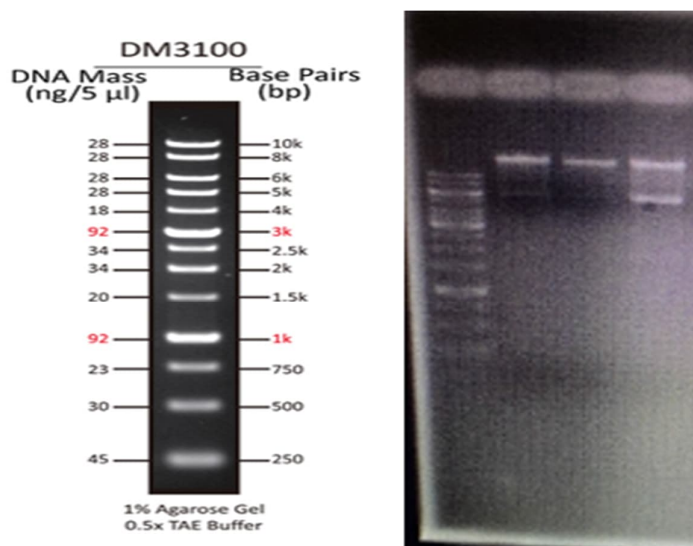
3- نتایج

3-1 کلونینگ ژن Dia-21

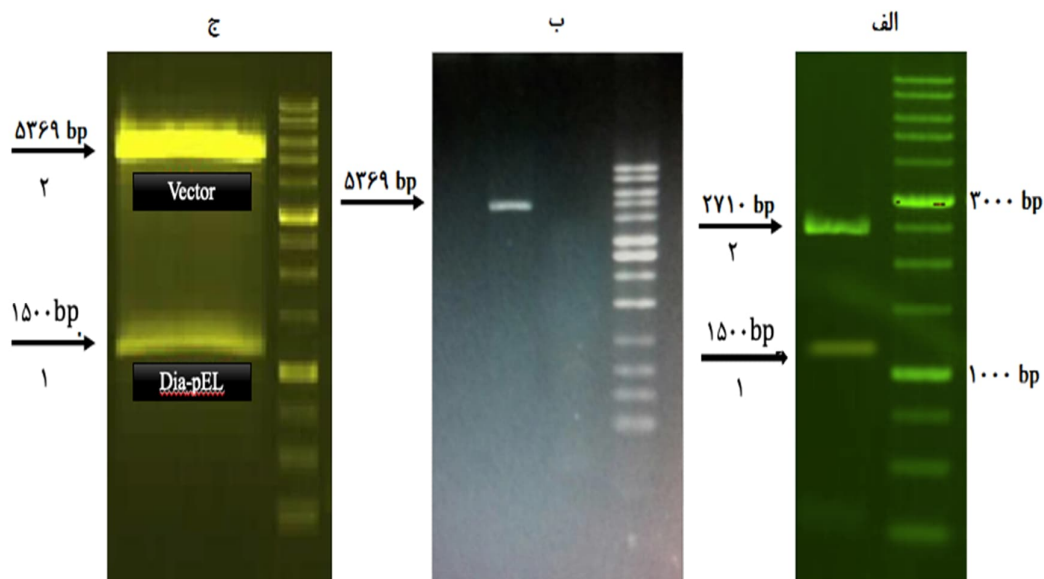
برای ادامه فرایند و بیان انتقال پیدا کرد. از سویه‌های مثبت پلاسمید استخراج شد. هضم دوگانه پلاسمید نو ترکیب pET21a با آنزیم‌های *XhoI* و *NdeI* برای تأیید وارد شدن ژن مورد نظر به وکتور pET21a انجام شد (شکل 4 و 5).

نخست توالی ژنی مربوط به آنزیم دیابادی در وکتور pUC57 بین دو سایت برش *XhoI* و *NdeI* بهینه و سنتز شد. پس از سنتز برای تکثیر پلاسمید مورد نظر به *E. coli* DH5a منتقل شد. در ادامه برای مراحل کلونینگ قطعه ژنی به داخلی وکتور بیانی pET21 مراحل کار به این شکل انجام شد که پس از انجام واکنش هضم آنزیمی، قطعه‌های مورد نظر برای انجام استخراج از ژل به وسیله اسکالپل بریده شدند. قطعه‌های بریده شده از ژل به وسیله کیت استخراج از ژل شرکت جین آل¹⁹ بازیافت شدند. پس از تعیین غلظت قطعه ژنی و ناقل بریده شده، با نسبت یک به پنج به همراه آنزیم DNA T4 لیگاز و بافر مربوط مخلوط شدند. محصول به دست آمده به باکتری مستعد شده *E. coli* سویه DH5a منتقل شد و پس از تست آلودگی روی پلیت‌های جامد با و بدون آنتی بیوتیک، از تک کلونی‌های رشد کرده روی پلیت آمپی سیلین کشت مستر تهیه شد و وکتور مورد نظر به باکتری *E. coli* BL21

¹⁹ Genall



شکل 4 استخراج پلازمید برای تأیید و انتخاب کلونی موردنظر

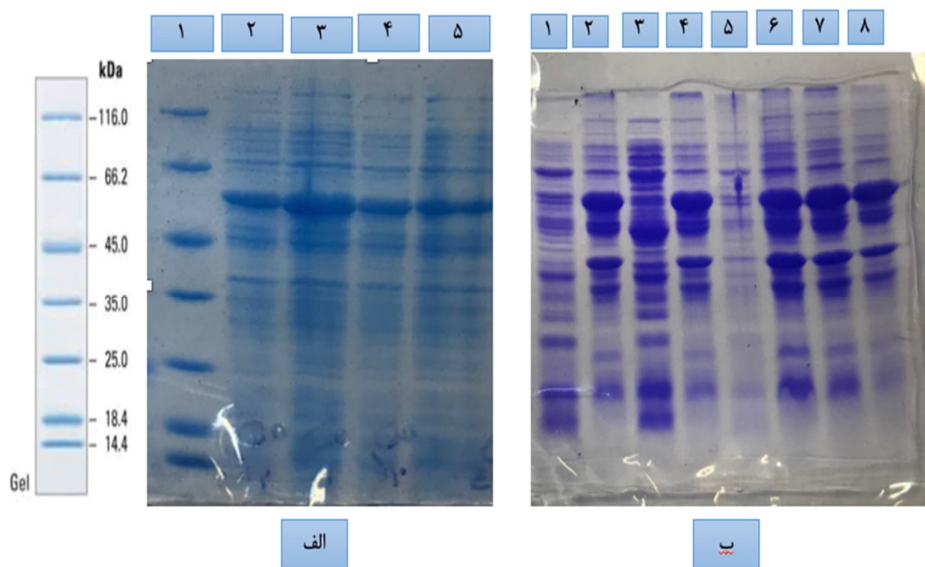


شکل 5 مراحل کلونینگ الف - ژل هضم دوگانه با آنزیم‌های محدودکننده *XhoI* و *NdeI* و کتور نو ترکیب *pUC57*. 1: باند مربوط به پلاسمید خطی *pUC57*. 2: باند مربوط به ژن جدا شده از پلاسمید بعد از هضم آنزیمی ب - پلاسمید *pET21a* خطی شده به وسیله هضم آنزیم‌های محدودکننده *XhoI* و *NdeI* ج - ژل فرایند هضم دوگانه با آنزیم‌های محدودکننده *XhoI* و *NdeI* پلاسمید خطی شده در ناحیه بین 5000 bp مشخص است.

پروتئین محلول و فعال، شرایط مختلف بیانی (غلظت‌های مختلف IPTG، محیط کشت مختلف، دما و زمان) سنجش و در نهایت بهترین شرایط بیان با غلظت 0/5 mM IPTG در دمای 23 °C به مدت 12 ساعت تعیین شد (شکل 6).

3-2 بررسی بیان پروتئین و تأیید بیان به روش وسترن بلائینگ

بعد از اطمینان کامل از درست بودن توالی ژن سنتز شده، به منظور بیان پروتئین نو ترکیب، باکتری نو ترکیب در محیط کشت LB مایع کشت داده شد. سپس برای به دست آوردن بهترین شرایط بیان با مقادیر بالایی از



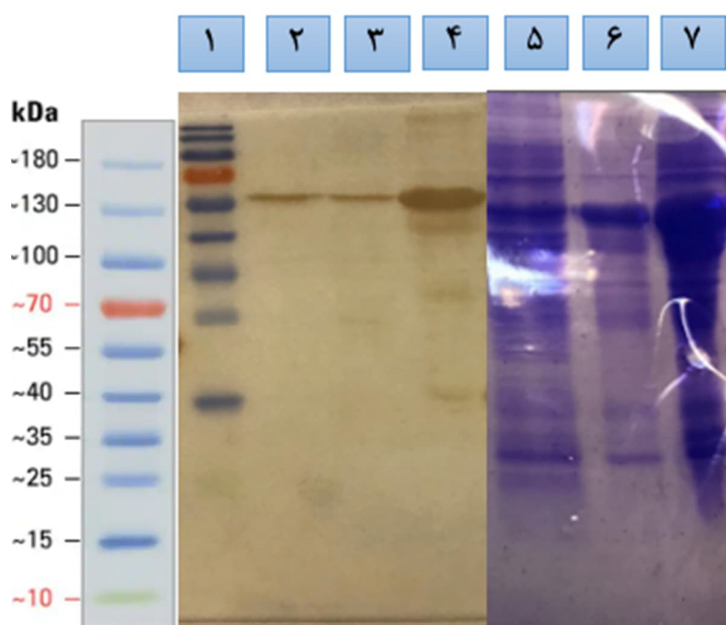
شکل 6 بررسی شرایط بیانی مختلف الف- بیان دیابادی در دمای 23 درجه در غلظت‌های مختلف IPTG (1؛ مارکر پروتئینی، 2) نمونه سوپرناتانت غلظت 0/5 میلی مولار IPTG (3) نمونه پلت غلظت 0/5 میلی مولار IPTG (4) (2) نمونه سوپرناتانت غلظت 0/25 میلی مولار IPTG (5) (2) نمونه پلت غلظت 0/25 میلی مولار IPTG؛ ب- بیان دیابادی در دمای مختلف و غلظت 1 میلی مولار IPTG (1) (2) نمونه سوپرناتانت دمای 37 درجه و غلظت 1 میلی مولار IPTG (3) نمونه پلت دمای 37 درجه و غلظت 1 میلی مولار IPTG (3) نمونه سوپرناتانت دمای 30 درجه و غلظت 1 میلی مولار IPTG (4) نمونه پلت دمای 30 درجه و غلظت 1 میلی مولار IPTG (5) نمونه سوپرناتانت دمای 18 درجه و غلظت 1 میلی مولار IPTG (6) نمونه پلت دمای 18 درجه و غلظت 1 میلی مولار IPTG (7) نمونه سوپرناتانت دمای 23 درجه و غلظت 1 میلی مولار IPTG (8) نمونه پلت دمای 23 درجه و غلظت 1 میلی مولار IPTG

دیابادی به دست آمد و برای استفاده در مرحله تخلیص بافر تریس بر 50 mM، pH 8 دیالیز گذاشته شد. برای تأیید بیان به دست آمده از باکتری روش وسترن بلائینگ با آنتی بادی بر دنباله هیستیدینی انجام شد. در این

پس از بیان نخست باید پروتئین مورد نظر به روش بافر اسموتیک، پروتئین‌های پری پلاسمیک استخراج شود. پس با توجه به روش استفاده از بافر هایپوتونیک پروتئین

توین 20 شد. سپس در مقابل آنتی‌بادی بر دنیال هیستیدینی که با رقت 1:1000 رقیق شد بود، به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت این زمان، غشا با بافر شستشو 3 بار و هر بار به مدت 5 دقیقه شسته شد و سپس غشا در کنار سوبسترا DAB قرار گرفت. پس از ظهور باند غشا با آب مقطر شسته و نگهداری شد (شکل 7).

روش پس از انجام ژل الکتروفورز SDS-PAGE، ژل از تانک خارج و ساندویچ وسترن براساس روش شرکت Bio-Rad با غشای PVDF بسته شد. فرایند انتقال به مدت سه ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد با شدت 200 میلی‌آمپر انجام شد. سپس غشای PVDF از دستگاه خارج و با بافر بلاک (BSA 3% -PBS) به مدت یک شبانه‌روز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد بلاک شد. در مرحله بعد غشا با بافر شستشو حاوی غلظت 0.05%



شکل 7 ژل SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ برای تعیین بیان پروتئین (1) مارکر پروتئین بر ژل وسترن بلاتینگ، (2) نمونه سوپرناتانت بر ژل وسترن بلاتینگ، (3) نمونه پلت بر ژل وسترن بلاتینگ، (4) نمونه توتال بیان پروتئین بر ژل وسترن بلاتینگ، (5) نمونه سوپرناتانت بر ژل SDS-PAGE، (6) نمونه پلت بر ژل SDS-PAGE، (7) نمونه توتال بیان پروتئین بر

ژل SDS-PAGE

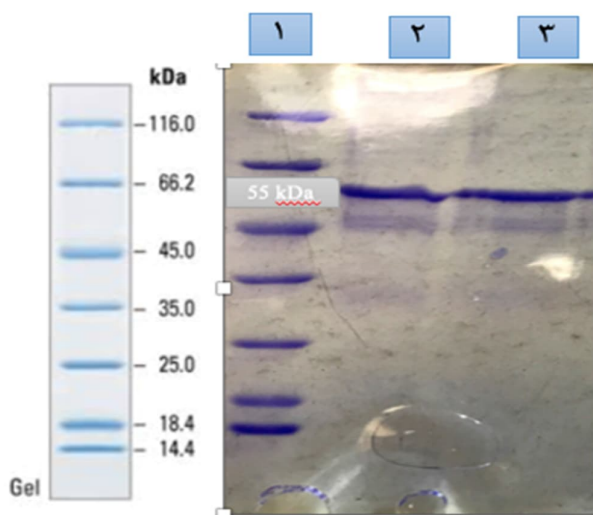
100 قرار داده شد و سپس محلول به‌دست‌آمده سانتریفیوژ با دور 12000 g به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد ته‌نشین شدند. محلول رویی و رسوب سلولی روی SDS-PAGE برده شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هم در محلول رویی و هم رسوب پروتئین وجود دارد. در این مطالعه دیابادی موردنظر در محلول رویی

3-3 تخلیص

پس از بیان در شرایط بهینه، مایع رویی سلول‌های سانتریفیوژ شده حاصل از محیط کشت دور ریخته شد و رسوب آن (که حاوی سلول‌ها و پروتئین موردنظر بود) در بافر هایپوتونیک پری‌پلاسمیک حل شد. سپس محلول به‌دست‌آمده یک ساعت در دمای 4 درجه یا شیک RPM

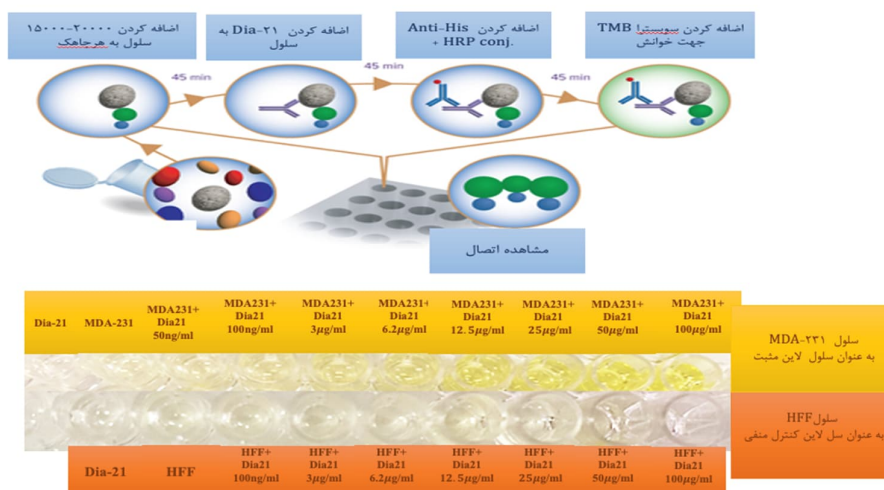
میلی مولار انجام گرفت. در نهایت پروتئین در غلظت 250 میلی مولار ایمیدازول تخلیص شد. پروتئین تخلیص شده در محلول رویی، تکباند با وزن مولکولی حدود 55 کیلو دالتون روی ژل SDS-PAGE دیده شد (شکل 8).

برای ادامه طرح استفاده شد. در مرحله بعد، تخلیص مایع رویی حاوی پروتئین نو ترکیب به وسیله ستون تمایلی نیکل با استفاده از گرادیان ایمیدازول به ترتیب در غلظت های 60 میلی مولار، 100 میلی مولار و 250



شکل 8 ژل SDS-PAGE نمونه های تخلیص شده نمونه 1: مارکر پروتئین؛ نمونه 2: Elution1؛ نمونه 3: Elution2 همان طور که نتایج الیزا نشان داد، با افزایش غلظت Dia-21 افزایش جذب مشاهده شد که نشان دهنده اتصال PDL-1 به Dia-21 است (شکل 9).

3-4 بررسی اتصال اولیه و تأیید آن به روش الیزا
برای بررسی اتصال Dia-21 تخلیص شده با گیرنده سطح سلولی PDL-1 از روش الیزا سلولی استفاده شد.



شکل 9 بررسی ایترکشن اولیه پروتئین Dia-21 با گیرنده PDL-1 سطح سلول

سلول کنترل منفی HFF از نظر گیرنده PDL-1 منفی و بدون تغییر رنگ و سلول MDA-231 با وجود بیان بالا گیرنده

PDL-1

4- بحث

در سیستم‌های بیان باکتری‌ها همچنان از مشکلات اصلی این سیستم است. چندین مطالعه نشان داده شده است که بیان پروتئین‌های به فرم *ScFv* در میزبان *E. coli* به فرم نامحلول می‌باشد [37].

scFv را می‌توان برای تولید در مقیاس بزرگ و در سیستم‌های بیان باکتریایی تولید کرد درحالی‌که *scFvs* به‌طور معمول به دلیل فولد نادرست، پیوندهای دی‌سولفیدی به‌صورت نامحلول بیان می‌شوند. تعدادی از آنتی‌بادی‌های عملکردی گاهی اوقات می‌توانند با انجام فولد دوباره از ساختارهای اینکلوژن بادی ایجادشده در ناحیه سیتوپلاسمی بازگردانده شوند، اما این روش برای همه آنتی‌بادی‌ها مؤثر نیست. تعدادی از آنتی‌بادی‌های عملکردی به دلیل داشتن پیوندهای دی‌سولفیدی در فضای پری‌پلاسمیک باکتری‌ها بیان می‌کنند که میزان بازده بیان پروتئین در این فضا محدودتر است [20].

متغیر تک‌زنجیره‌ای (*scFv*) یک قطعه آنتی‌بادی است که از نواحی متغیر زنجیره‌های سنگین و سبک تشکیل شده است. این ساختارها با وجود داشتن میل ترکیبی خاص و ایمنی‌زایی پایین و نفوذپذیری بالا به‌طور معمول به فرم نامحلول در فضای احیایی سیتوپلاسم باکتری بیان می‌شوند. یک استراتژی برای به‌دست‌آوردن *scFv* محلول و فعال از نظر عملکردی، انتقال *scFv* به محیط اکسیدی پری‌پلاسم است که در آن امکان تشکیل پیوند دی‌سولفیدی به فرم صحیح افزایش پیدا می‌کند [38].

در این مطالعه، ساختار دی‌پادی طراحی شده که قابلیت اتصال مشترک به گیرنده‌های *CD19* و *CD3* دارد، طراحی شد که برخلاف فرمت‌های مشابه *IgG*، این ساختارها به دلیل اندازه کوچک‌تر، نفوذ بافتی بهتر را از خود نشان می‌دهند. علاوه‌بر این، این ساختارها را می‌توان در سلول‌های پروکاریوتی مانند باکتری *E. coli* بیان کرد [39-41].

آنتی‌بادی دو منظوره اختصاصی (که قابلیت اتصال به دو لیگاند مختلف را دارند) در سال‌های گذشته یک راه درمانی جایگزین برای استفاده همزمان از دو آنتی‌بادی در درمان سرطان‌های مختلف محسوب شده است. تاکنون دو آنتی‌بادی بلیناتوماب²⁰ و کاتوماکسوماب²¹ به‌وسیله FDA تأیید شده‌اند و بیش از 30 آنتی‌بادی در مراحل کارآزمایی بالینی قرار دارند. آنتی‌بادی بلیناتومب یک *scFv* پشت سر هم است که به‌وسیله فناوری درگیر با سلول‌های *T bispecific* تولید می‌شود که به‌طور همزمان *CD3* را روی *T* و *CD19* را روی سلول‌های *B* هدف قرار می‌دهد. این آنتی‌بادی اختصاصی با دو آنتی‌ژن هدف برای درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد در کودکان و بزرگسالان استفاده می‌شود. در مورد هدف‌گیری همزمان گیرنده‌های *PD-1* و *CTLA-4* چندین الگوی مختلف آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه وجود دارد که چندین مورد آنها در مرحله آزمایش‌های بالینی هستند [35، 36].

استراتژی‌های مطالعه چنین آثاری شامل توسعه پروتئین‌های کایمریک است که در آن پروتئین‌هایی با عملکردهای مختلف در یک مولکول چندمنظوره طراحی و بیان شود، برای مثال یک مولکول چندگونه‌ای است که می‌تواند به‌طور همزمان به لنفوسیت‌های *T* و یک آنتی‌ژن سلول تومور متصل شود. پروتئین‌های فیوژن دوگونه‌ای مختلف نیز گزارش شده است. برای به‌دست‌آوردن پروتئین‌های کایمریک و تعیین عملکرد آنها، سنتز *de novo* و استفاده از سیستم‌های بیانی باکتریایی روش مؤثری به شمار می‌آیند. سیستم‌های بیانی باکتریایی مزایای چشمگیری نسبت به سایر سیستم‌های بیانی دارند که از این مزایا می‌توان به آسانی کنترل، هزینه کم و بهره‌وری بالا اشاره کرد. با این وجود پیش‌بینی، کنترل ویژگی و عملکرد بیولوژیکی پروتئین‌های دو عملکردی به‌دست‌آمده

20 Blinatumomab

21 Catumaxomab

همچنین در مقاله‌ای (که در سال 2019 چاپ شد) محیطی و همکارانش اذعان داشتند که بیان فرم محلول ScFv بر HER-2 زمانی که در باکتری *E. coli* BL21 DE3 انجام می‌شود، بسیار کمتر از زمانی است که این بیان در باکتری *E. coli* Shuffel Strain که در فضای سیتوپلاسمی خود دارای تگ Dsb C با خاصیت چاپرونیست، می‌باشد [42].

در این مطالعه کاهش دمای بیان تا 23°C میزان بیان محلول پروتئین پری پلاسمیک را افزایش داد. همچنین در مطالعه‌های دیگر گزارش شده است که کاهش دما در بیان قطعه‌های آنتی‌بادی نو ترکیب میزان آن را به‌طور چشمگیری افزایش داده است و این موضوع به دلیل کاهش سرعت تولید پروتئین و در نتیجه افزایش سرعت ایجاد فولد صحیح پروتئین می‌باشد که از تشکیل ساختارهای اینکلوژن بادی جلوگیری می‌کند، برای مثال در مطالعه گزارش شده است که بیان پری پلاسمیک محلول قطعه Fab آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی H6 3 با کاهش دمای بیان به کمتر از 23°C بسیار بهبود پیدا کرده است [43].

5- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، بیان دیابادی Bispecific بر دو لیگاند PD-L1 و CTLA-4 در فضای پری پلاسمیک بررسی و بیان این دیابادی به وسیله SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. بهترین شرایط بیان برای این پروتئین در فضای پری پلاسمیک انکوباسیون 8 ساعت در دمای 23°C با غلظت 0/5 میلی‌مولار IPTG که در نتیجه خالص‌سازی 0,4 mg/L پروتئین به دست آمد. پژوهش و توسعه ساختارهای دارویی همچون scFvها و دیابادی‌ها در درمان سرطان مفید خواهد بود. با این حال، بررسی فعالیت بیولوژیکی در شرایط آزمایشگاهی و ارزیابی‌های عملکرد این ساختارها نیازمند مطالعه‌های بیشتری خواهد بود.

باکتری *E. coli* به‌طور گسترده به‌عنوان یک سلول میزبان برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب استفاده شده است. با این حال، تولید یک پروتئین با عملکرد زیستی فعال و با ساختار و فولد صحیح یکی از چالش‌های اصلی این پلتفرم بیانی است. بیان پری پلاسمی مزایایی نسبت به بیان در فضای سیتوپلاسمی دارد که از جمله این موارد به محیط اکسیدکننده فضای پری پلاسمیک و حضور برخی چپرون‌ها (برای مثال pELb، DsbA و DsbC) که تشکیل فرم صحیح پیوندهای دی‌سولفید را تسهیل می‌کنند و همچنین سطح پایین پروتئین‌ها در مقایسه با فضای سیتوپلاسمی اشاره کرد. با این حال، از معایب بیان پروتئین در این فضا کاهش میزان بیان و به‌دست آوردن پروتئین با عملکرد مناسب و صحیح می‌توان اشاره کرد [42].

در مطالعه‌ای که دویی و همکارانش در سال 2016 روی بیان ScFv که بر علیه EGFRvIII انجام گرفت، نشان دادند که غلظت القاکننده IPTG تأثیر معناداری بر بیان محلول پروتئین در محدوده غلظت بین 0/25-1 mM نداشته است. همچنین به‌طور مشابه گزارش شده است که تفاوتی معناداری در بیان پروتئین scFv (anti-EGFRvIII) در فضای پری پلاسمیک و سیتوپلاسمیک با غلظت IPTG از 0/1-1 mM مشاهده نشد. با این حال، غلظت‌های پایین‌تر از IPTG (0/1-1 mM) منجر به افزایش 2 تا 10 برابری بیان پری پلاسمیک یک قطعه فعال زیستی Fab شد. در این مطالعه نشان داده شد که غلظت القاکننده بالاتر منجر به بیان بالاتر و در نتیجه ایجاد پروتئین‌های نامحلول به فرم اینکلوژن بادی بیشتری می‌شود [39].

در مطالعه‌ای سال 2019 که لوو و همکاران با اضافه کردن تگ GFP به ساختار ScFv پروتئین Anti-PB2 و بررسی بیان آن در فضای سیتوپلاسمی و پری پلاسمی بیان مناسبی از این پروتئین مشاهده کردند که به تأثیر وجود این GFP تگ بر بیان دانستند [20].

checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(6):345-362.

[13] Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38:1-12.

[14] Van Coillie S, Wiernicki B, Xu J. Molecular and cellular functions of CTLA-4. *Regul Cancer Immune Checkpoints Mol Cell Mech Ther*. Published online 2020:7-32.

[15] Oyewole-Said D, Konduri V, Vazquez-Perez J, Weldon SA, Levitt JM, Decker WK. Beyond T-cells: functional characterization of CTLA-4 expression in immune and non-immune cell types. *Front Immunol*. 2020;11:608024.

[16] Ghaderi H, Alipour A, Holagh AMZ, Abdollahpour-Alitappeh M, Kaghazian H, Shahsavarani H. Recombinant antibody fragment therapeutics: Current status and future prospects of scFv, nanobody, and mimotopes. *J Drug Deliv Sci Technol*. Published online 2023:105009.

[17] Seifert O, Rau A, Beha N, Richter F, Kontermann RE. Diabody-Ig: a novel platform for the generation of multivalent and multispecific antibody molecules. In: *MAbs*. Vol 11. Taylor & Francis; 2019:919-929.

[18] Math BA, Waibl F, Lamp LM, Fernández-Quintero ML, Liedl KR. Cross-linking disulfide bonds govern solution structures of diabodies. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2023;91(9):1316-1328.

[19] Hentrich C, Kellmann SJ, Putyrski M, et al. Periplasmic expression of SpyTagged antibody fragments enables rapid modular antibody assembly. *Cell Chem Biol*. 2021;28(6):813-824.

[20] Liu M, Wang B, Wang F, et al. Soluble expression of single-chain variable fragment (scFv) in *Escherichia coli* using superfolder green fluorescent protein as fusion partner. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103:6071-6079.

[21] Morrison MS, Wang T, Raguram A, Hemez C, Liu DR. Disulfide-compatible phage-assisted continuous evolution in the periplasmic space. *Nat Commun*. 2021;12(1):5959.

[22] Jo BH, Hwang IS. Characterization and high-level periplasmic expression of thermostable α -carbonic anhydrase from *Thermosulfurimonas dismutans* in *Escherichia coli* for CO₂ capture and utilization. *Int J Mol Sci*. 2019;21(1):103.

[23] Juibari AD, Ramezani S, Rezadoust MH. Bioinformatics analysis of various signal peptides

تشکر و قدردانی

به این وسیله نویسندگان این مقاله کمال تشکر را از دانشگاه تربیت مدرس که با همکاری صمیمانه خود ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، ابراز می‌دارند.

منابع

[1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(1):17-48.

[2] Tzenios N. OBESITY As a risk factor for different types of cancer. *EPRA Int J Res Dev*. 2023;8(2):97-100.

[3] Behranvand N, Nasri F, Zolfaghari Emameh R, et al. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunol Immunother*. 2022;71(3):507-526.

[4] Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *Int J Oncol*. 2019;54(2):407-419.

[5] Mishra AK, Ali A, Dutta S, Banday S, Malonia SK. Emerging Trends in Immunotherapy for Cancer. *Diseases*. 2022;10(3):60.

[6] Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga NA, Del Rincon S V, Papneja N, Miller WH. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol*. 2020;27(s2):87-97.

[7] Kruger S, Ilmer M, Kobold S, et al. Advances in cancer immunotherapy 2019–latest trends. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):1-11.

[8] Wilky BA. Immune checkpoint inhibitors: The linchpins of modern immunotherapy. *Immunol Rev*. 2019;290(1):6-23.

[9] Marin-Acevedo JA, Kimbrough EO, Lou Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):1-29.

[10] Makuku R, Khalili N, Razi S, Keshavarz-Fathi M, Rezaei N. Current and future perspectives of PD-1/PDL-1 blockade in cancer immunotherapy. *J Immunol Res*. 2021;2021:1-15.

[11] Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727.

[12] Doroshov DB, Bhalla S, Beasley MB, et al. PD-L1 as a biomarker of response to immune-

- [35] Moazzami R, Mirzahosaini H, Naddafi F, Davami F. A Comparative Investigation of the Bispecific Antibody: Expression in Expi293F Cells and *E. coli*. *Intern Med Today*. 2021;27(3):400-417.
- [36] Lin L, Li L, Zhou C, et al. A HER2 bispecific antibody can be efficiently expressed in *Escherichia coli* with potent cytotoxicity. *Oncol Lett*. 2018;16(1):1259-1266.
- [37] Kranz DM, Gruber M, Wilson ER. Properties of bispecific single chain antibodies expressed in *Escherichia coli*. *J Hematother*. 1995;4(5):403-408.
- [38] Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Mol Immunol*. 2015;67(2):95-106.
- [39] 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(1):141-152.
- [40] Shibui T, Nagahari K. Secretion of a functional Fab fragment in *Escherichia coli* and the influence of culture conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1992;37:352-357.
- [41] Rodriguez-Carmona E, Cano-Garrido O, Dragosits M, et al. Recombinant Fab expression and secretion in *Escherichia coli* continuous culture at medium cell densities: Influence of temperature. *Process Biochem*. 2012;47(3):446-452.
- [42] Ahmadzadeh M, Farshdari F, Nematollahi L, Behdani M, Mohit E. Anti-HER2 scFv expression in *Escherichia coli* SHuffle® T7 express cells: effects on solubility and biological activity. *Mol Biotechnol*. 2020;62:18-30.
- [43] Taherian E, Mohammadi E, Jahanian-Najafabadi A, Moazen F, Akbari V. Cloning, optimization of periplasmic expression and purification of recombinant granulocyte macrophage-stimulating factor in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Adv Biomed Res*. 2019;8.
- for periplasmic expression of parathyroid hormone in *E. coli*. *J Med Life*. 2019;12(2):184.
- [24] Dariushnejad H, Farajnia S, Zarghami N, Aria M, Tanomand A. Effect of DnaK/DnaJ/GrpE and DsbC chaperons on periplasmic expression of Fab antibody by *E. coli* SEC pathway. *Int J Pept Res Ther*. 2019;25:67-74.
- [25] Osgerby A, Overton TW. Approaches for high-throughput quantification of periplasmic recombinant proteins. *N Biotechnol*. 2023;77:149-160.
- [26] de Marco A. Recombinant expression of nanobodies and nanobody-derived immunoreagents. *Protein Expr Purif*. 2020;172:105645.
- [27] Sambrook J, Russell DW. Detection of DNA in agarose gels. *Cold Spring Harb Protoc*. 2006;2006(1):pdb-prot4022.
- [28] Yuryev A. PCR primer design using statistical modeling. *PCR Prim Des*. Published online 2007:93-103.
- [29] Zimbro MJ, Power DA, Miller SM, Wilson GE, Johnson JA. Difco & BBL manual: manual of microbiological culture media. (*No Title*). Published online 2003.
- [30] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680.
- [31] Van E. Biotechnological applications of periplasmic expression in *E. coli*. *Enzym Eng*. Published online 2012.
- [32] SDS-PAGE C. Techniques of Protein and Nucleic Acid Purification. *Biochemistry*. Published online 2021:150.
- [33] Mishra M, Tiwari S, Gomes A V. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017;14(11):1037-1053.
- [34] Ozgul S, von Daake S, Kakehi S, et al. An ELISA-based screening platform for ligand-receptor discovery. In: *Methods in Enzymology*. Vol 615. Elsevier; 2019:453-475.

Cloning, Expression of Anti-PDL1/ Anti-CTLA-4 diabody Using Bacterial PelB Leader sequence in *E. coli* BL21 strain

Atefeh Khodakarami¹, Khosro Khajeh², Yaghoub Fathollahi³, Bahareh Dabirmanesh^{4*}

ph.D Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Professor Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Professor Department of Physiology, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Associate Professor Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Correspondence: dabirmanesh@modares.ac.ir
P.O. Box: 14115-175, Tehran, Iran

Received:2023/7/13

Accepted: 2024/3/25

Abstract

Immune checkpoints are molecules that regulate the immune system. However, some tumor cells can express the ligands of immune checkpoints to escape from antitumor immune responses. Some agents, such as antibodies, can inhibit these checkpoints that prevent the immune system from targeting and killing cancer cells. The aim of this study was to express a novel bispecific diabody in the periplasmic space of *E. coli* for simultaneous targeting of two immune checkpoints, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and programmed death- ligand 1 (PD-L1).

The bispecific diabody was constructed based on the variable regions gene of anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 antibodies. The optimum codon for expression in *E. coli* was chemically synthesized and subcloned in the pET21 expression plasmid. After transformation, the effect of cultivation conditions on periplasmic expression of the protein in *E. coli* BL21(DE3) was evaluated. Then, the bispecific diabody was purified.

Expression of diabody with a molecular weight of 55 kDa was verified by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting analysis. The best condition for soluble periplasmic expression was obtained by incubation with 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside at 23°C, 18h. The protein was successfully purified using affinity chromatography with a final yield of 0.4 mg/L. The affinity of the purified protein interaction was checked by ELISA.

In this study, recombinant protein was cloned, expressed, and purified in a bacterial system. The interaction of this protein with the cell surface receptor PDL1 was investigated using MDA-MB 231 cells, which express PDL1, and HFF fibroblast cells as a negative control. The cell-based ELISA assay analyses revealed the binding of this protein to the cell surface receptor PDL1.

Keywords: Immune checkpoints, Recombinant Diabody, CTLA-4, PD-L1, Periplasmic expression, *E. coli* BL21 (DE3) strain