

Research Paper

A Comparative Investigation of the Bispecific Antibody: Expression in Expi293F Cells and E.coli



Reza Moazzami¹, Hasan Mirzahosaini¹, Fatemeh Naddafi², *Fatemeh Davami¹

1. Iran Medical Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

2. Pharmaceutical Sciences Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.



Citation Moazzami R, Mirzahosaini H, Naddafi F, Davami F. [A Comparative Investigation of the Bispecific Antibody: Expression in Expi293F Cells and E.coli (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(3):400-417. <https://doi.org/10.32598/hms.27.3.3478.1>

doi <https://doi.org/10.32598/hms.27.3.3478.1>



Received: 31 Mar 2021

Accepted: 15 Jun 2021

Available Online: 01 Jul 2021

Key words:

Blinatumomb, Dual-character antibody, Acute lymphoblastic leukemia

ABSTRACT

Aims Dual-Character antibodies can simultaneously target two surface markers. Blinatumomab is a C19 / CD3 antibody from the BiTE family (Bispecific T cell engager antibody) and was approved by the US Food and Drug Administration for clinical use. This antibody effectively targets malignant cells in patients with acute infoblastic leukemia. In the production of large quantities of such antibodies on an industrial scale, selecting the appropriate host remains a critical issue. Mammalian cells and strains of E.coli are the most common hosts for producing antibodies and antibody components on an industrial scale, respectively.

Methods & Materials In this study, a dual-specific antibody was used in the mammalian system of plasmid pcDNA3.1 (+) and for expression in the bacterial system of plasmid pET22b. The antibody produced in both systems was purified using nickel affinity resin under similar conditions. Next, SDS-PAGE and Western blot analysis was performed on both study samples. Finally, the binding properties of the antibody secreted from both systems were assessed by the ELISA test.

Findings The present study results suggested that antibodies produced by the mammalian expression system provided better binding properties than the expression system in bacteria.

Conclusion This study indicated that in the case of antibodies to two traits of the BiTE family, like Blinatombe, mammalian cells generate a more efficient and successful expression system; although the bacterium can produce much larger amounts of the antibody.

Extended Abstract

1. Introduction

Applying monoclonal Antibodies (mAb) to diagnose and treat various diseases, including cancer, has become a standard and effective method. There exist >70 monoclonal antibodies on the world pharmaceutical market, and numerous are in various stages of testing [1]. However, in some cases, monoclonal antibodies have limi-

tations, e.g., the size and complexity of the molecule reduce its potential to penetrate tumor tissues; the flat structure of the interacting segments complicates catalytic cavities to penetrate deep into enzymes [2, 3]. To overcome such limitations and increase the antitumor activity of antibodies, there are various approaches, like antibody engineering to increase affinity; the invention of antibody conjugate antibodies or the use of antibody fragments; finally, the creation of bispecific antibodies. Binding to two different targets by a single antibody molecule is an intriguing idea in cancer treatment research. Such molecules can perform several

* Corresponding Author:

Fatemeh Davami

Address: Iran Medical Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Tel: +98 (912) 6046412

E-mail: f.davami@gmail.com

functions, as follows: the inhibition of the cell surface receptor; simultaneous blockade of two ligands; the cross-linking of two surface receptors, and the placement of a T cell adjacent to the tumor [4]. Three dual-character antibodies have been licensed by legal authorities; catumaxomab [5], blinatumomab, and emicizumab [6]. The benefits of dual-character compounds include their bilateral effect on different tumor targets and their cumulative or synergistic drug effects due to the overlap of cancer signaling pathways. These antibodies come in a wide variety of formats, including those with and without Fc [4]. The BiTE Bispecific T cell engager format consists of two single antibody chains linked together by a polypeptide linker. In BiTEs, one arm is targeted against CD3 and one arm against the tumor antigen. The features of this format include the ability of T cell-cell polyclonal antigen-dependent activation and the induction of T cell proliferation. Thus, BiTE has a great ability to lysis the target cell. Blinatumomab, or CD3 × CD19bsAb anti, is the first drug in the BiTE family to be introduced by Amgen in 2014 to treat Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) [7].

Blinatomb is a protein fusion with a molecular weight of 55 KD that contains two scFv (Single Chain Fragment Variable) antibody chains. This protein consists of 4 variable domain cDNAs plus 3 linker peptides, 2 long linkers to bind to make the scFv fragment, and a short linker to bind the two fragments. This structure provides the flexibility and freedom of action required to connect each arm to the target epitopes located on the surface of the two cells. In the N-terminal part of this protein is scFv binding to murine CD19 antibody derived from mAb HD37. Moreover, in the C-terminal part of the scFv is terminal binding to 3 CD antibody derived from mAb L2K murine antibody [8]. The presence of a hexahistidine sequence at the C-terminus of this protein allows it to be purified by affinity resins Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) [9].

The persistent and high expression of CD19 molecule on malignant B cells and its role in the survival and proliferation of these cells made it a target marker on B cells. Unlike CD20 and CD22, the CD19 receptor is expressed in almost all developmental stages of B cell lineage. It is a reliable marker for treating this category. Furthermore, in patients, almost 100% of malignant cells express this antigen [10]. CD19 is a PI3 kinase activator. This enzyme is a key element in signaling in malignant cells [11]. The in vitro performance of CD3 × CD19 anti in T cell and CD19 expression cells was strongly significant in simultaneous culture experiments. The minimum concentration required for lysis of CD19 target cells was approximately pg/mL [12].

Additionally, CD3+, CD4+, or CD8+ T cells present a similar ability to lysis target cells and perform so with vigor. Of course, naïve T cells are an exception [13]. Moreover, anti-CD3 × CD19 is sufficient for T cell activation and requires no prior activation or stimulants. T cell activation leads to the expression of CD69 and C25 as well as the up-regulation of adhesion molecules, like CD2 on its surface. Besides, it releases inflammatory cytokines, such as IFN γ , TNF α , IL2, IL6, IL1, finally the sequential proliferation of T cells [14]. The mechanism of T cell-cell killing in CD19 target cells involves the formation of a strong cytolytic synapse between the two cells, followed by the depletion of the toxic proteins perforin and granzymes from the secretory T vesicles on the target cell. The activation of caspase enzymes in the target cell indicates the significance of the apoptosis pathway parallel to the pathway of secretory vesicles to destroy the target cell [8].

For producing therapeutic recombinant proteins, including monoclonal antibodies, various hosts are used, such as bacteria, baculovirus, yeast, plant cells, and mammalian cells [15]. Among these, the mammalian cell class due to its ability to produce protein by natural folding and creating proper post-translational modifications are especially important. Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line is the most widely used cell line for generating antibodies; producing about two-thirds of recombinant therapeutic proteins in this class [16]. HEK293 human embryonic kidney is a human kidney embryonic cell. It is widely used for the transient expression of TGE recombinant proteins. Despite its epithelial origin, it adapts well to suspended culture conditions. Due to the human nature of this class, the recombinant proteins expressed in it are similar to human proteins concerning post-translational changes. Furthermore, the process of translation, folding, and maturation processes occur with considerable adequacy. The transient gene expression approach is commonly used to shortly produce large amounts of protein for the biochemical studies of the drug and to perform preclinical investigations [17, 18]. Expi 293 cell is a HEK293 cell-derived class for culture in high cell density suspension and serum-free culture medium. The chemically defined form of these properties makes this cell suitable for industrial production [19].

The mammalian cell expression system is currently the most common method of producing this antibody; however, *Escherichia coli* has the potential to produce proteins without a glycosylation pattern, as well as the ease of ordering the production process and the cost-effectiveness of the bacterial culture raw materials has made this host a suitable host for the production of Fc-free antibodies and dual-specific antibodies [20]. Accordingly, a significant portion of therapeutic proteins without glycosylation pattern is

produced in this host, and BL21 (DE3) is among the most common industrial and research strains. The long history of industrial use of *E. coli*, as well as the appropriate rules of the drug production supervisory departments to this host, are significant advantages of this production platform [21].

Considering the single-chain and non-glycosylation of Blinatombe, the capacity of the bacterial expression system to produce this antibody was used; we compared it with the antibody produced in eukaryotic cells. This is because no such comparison has been made for the Blinatombe antibody. The great advantages of *E. coli*, as a suitable host include its industrial production parameters; the availability of inexpensive culture media for the production of biopharmaceuticals in this host; the expression of monoclonal antibodies of two BiTE family traits (due to no post-translational changes). The commercial manufacturer expressed Blinatombe in the host of CHO. This study aimed to examine the expression and binding properties of antibodies expressed in both systems and compare them.

2. Materials and Methods

Cells and consumables

Expi293F cell and related culture medium (Expi293 Recombination Expression Medium) and its specific transfection agent (ExpiFectamine™ 293 transfection Reagent), as well as Pen/Strep and L-Glu antibiotics and pcDNA3.1 (+) vector (Invitrogen; CA, USA), were prepared. Ni-NTA chromatographic resin was obtained from QIAGEN (USA). Trypan blue and 3-d3 aminobenzidine (DAB) and anti-histamine conjugated with HRP and TMB were prepared from Sigma-Aldrich (USA). *E. coli* BL21 strain (DE3) and vector pET-22b were obtained from Novagen (USA). Restriction enzymes were collected from Thermo Fisher Scientific (USA). NALM-6 and Jurkat cell lines were obtained from the cell bank of the Pasteur Institute of Iran.

Expressive structures and expression in *E. coli*

The expression constructs expressing the two antibodies of blinatumomab from the PGH vector in the pET-22b vector were cloned by HindIII and NcoI enzymes. BL21 (DE3) strain was used for protein expression. The pET-22b vector was designed for the periplasmic expression of the target protein. The strain transformed by the expressive vector in the LB medium was incubated to reach OD=0.5 in a wavelength of 600 nm. Then, 0.5mM IPTG was used for induction. The cells were isolated by centrifugation after 4 hours of culture. Besides, a culture batch without induction was considered as a negative control.

Expression structure and the expression of Expi293F cell line

The coding sequence of the blinatombe protein was cloned from the PGH vector into the pcDNA3.1 vector. This measure helped to construct the expression structure in the cellular system by two enzymes, NheI and HindIII. These expression constructs were then transfected into Expi293F cells. Expi293F cells were cultured in specific and without serum culture medium Expi293™ expression medium with penicillin-streptomycin (2mM) antibiotics. The cells were cultured in a CO₂ incubator shaker in a humid environment and in rotating glass bottles at 125 rpm. The cells were passaged every three days at a density of approximately 3×10^5 cells/mL. The cell count method with trypan blue was employed to calculate the frequency of cells. In short, the transfection was performed according to the manufacturer's method, as follows: The day before the transfection, the cells were cultured in an additive-free medium. The next day, the transfectamine™ 293 reagents and plasmid were mixed with specific relativity. Incubations were added to the cells. After 16-18 hours, ExpiFectamine™ Transfection Enhancer 1 and 2 were added to the cells according to the manufacturer's instructions. On the seventh day, the supernatant was isolated from the cells and stored to assess expression.

Protein purification

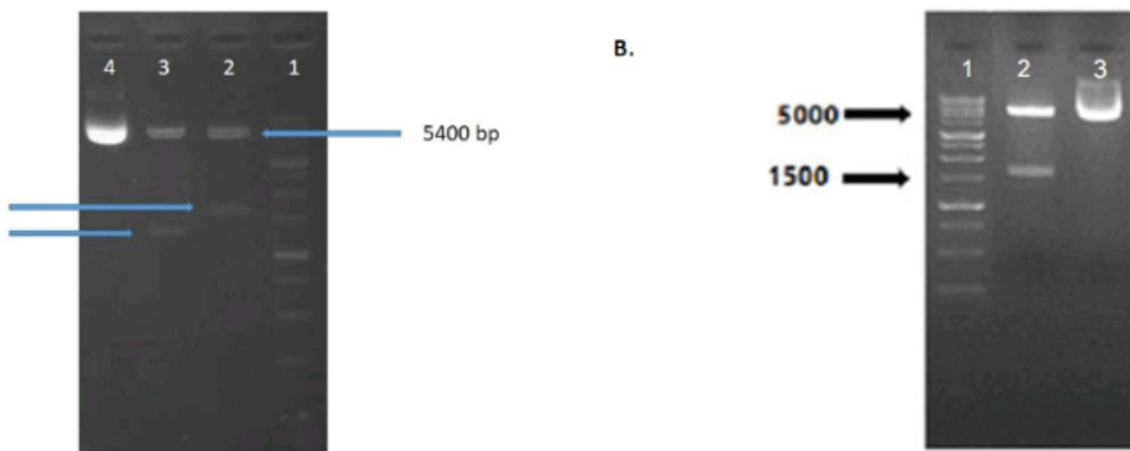
To purify the antibodies expressed by the Expi293F cell line, Ni-NTA (Ni-Nitrilotriacetic acid) column was used. Initially, the cell soup was filtered by a 0.45 µm filter. The column was then washed with a binding buffer [NaH₂PO₄ (50 mM), NaCl (300 mM), imidazole (10 mM), pH=8.0]. Accordingly, NaH₂PO₄ (50 mM), NaCl (300 mM), imidazole (20 mM), pH=8.0 were washed and finally buffered by NaH₂PO₄ (50 mM), NaCl (300 mM), imidazole (250 mM; pH=8.0). The purification of the protein expressed in bacteria was similar to that of the cell. The difference concerned the chemical composition of the triple buffers, i.e., changed as follows:

Binding buffer: (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris, 8M Urea pH=8);

Washing buffer: (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris, 8M Urea pH=6.3);

Elution buffer: (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris, 8M Urea pH=4.5).

SDS PAGE and Western blot analysis



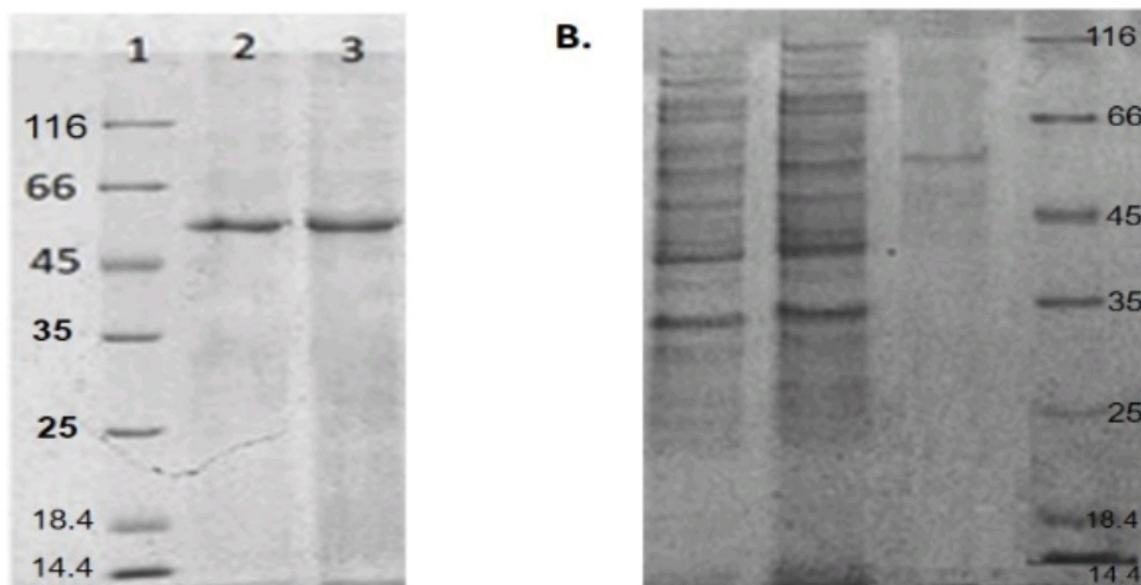
Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 1. Gel electrophoresis of expression structures

A: Agarose gel electrophoresis related to antibody gene cloning in pcDNA3.1 vector for expression in Expi293F cell row 1) DNA marker 1kb row 2) The digestion of gene construct containing antibody coding fragment [pcDNA3.1 + bsAb] by NheI restriction enzymes HindIII and the creation of fragments 5429 and 1587 bp of rows 3) The digestion of gene constructs containing antibody coding fragment [pcDNA3.1 + bsAb] by XhoI restriction enzymes Making fragments 5731 and 1269 bp of rows 4) Cloned gene structure [pcDNA3.1 + bsAb] not digested; B: Gel electrophoresis related to antibody gene cloning in vector pET-22b for expression in BL21 (DE3) strain 1) DNA marker 1kb. Row 2) Digestion of gene constructs containing antibody-coding fragments by NcoI and HindIII restriction enzymes and generation of 5493 and 1587 bp fragments Row 3) Undigested gene constructs.

SDS PAGE and Western blot analysis were implemented to evaluate protein expression. Kumasi blue staining was used to detect proteins. The proteins were electrophoresed

in a 12% gel at 100 volts for 80 minutes. SDS PAGE was followed by Western blotting. This process was performed by a semi-dry transfer cell Trans-Blot (Biorad) using nitro-



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 2. SDS PAGE analysis of purified antibodies

A: Purified protein from the Expi293F cell expression system. Row 1) Marker protein 116-14 kDa Row 2 and 3) Purified fractions of cell soup; B: The purified protein of the BL21 (DE3) expression system. Row 1) Marker protein 116-14 kDa Row 2) Uninduced cell lysate. 3) IPTG-induced cell lysates 4) Purified fraction of IPTG-induced lysates.

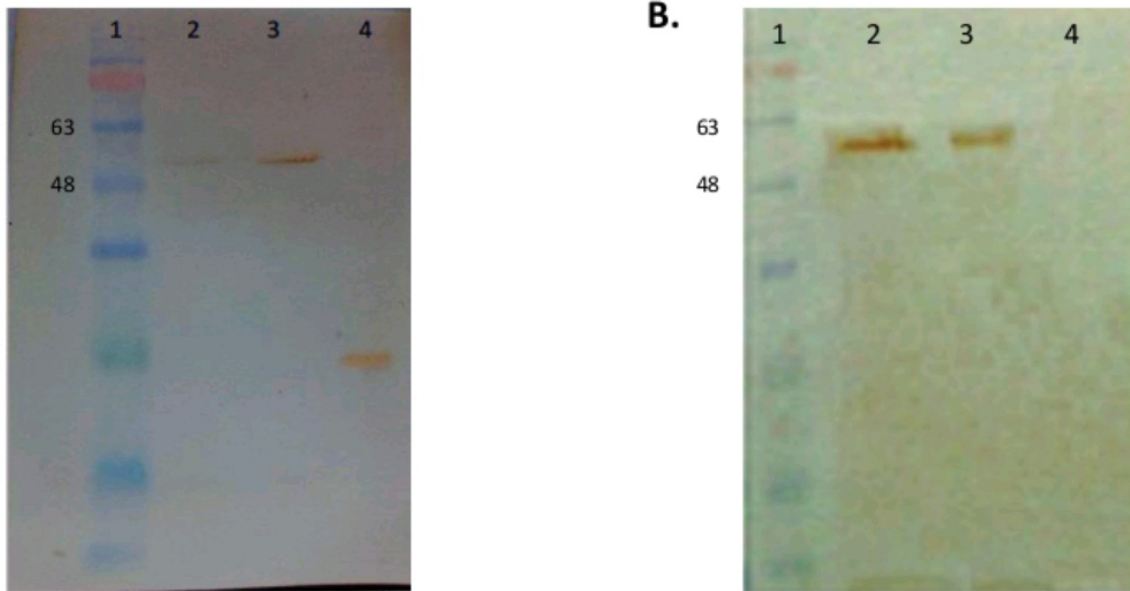


Figure 3. Western blot antibody test

A: Western blotting performed on antibodies expressed in the Expi293F cell expression system. Row 1) Marker protein 10–180 kDa rows 2 and 3) Antibody of two purified traits. Row 4) Positive control protein with histidine sequence; B: Western blotting was performed on antibodies expressed in the BL21 (DE3) strain expression system. Row 1) Marker protein 10–180 kDa. Row 2) Cell lysates after induction with IPTG (containing dual-character antibodies) Row 3) Positive control protein with histidine sequence. Row 4) Uninduced cell lysate and no dual-character antibody (negative control). In both expression systems, coloring was performed by DAB.

cellulose membrane (GE Healthcare) to transfer proteins. After transfer, the membrane was blocked by 4% Bovine Serum Albumin (BSA). Next, the antibody against polyhistidine conjugated with HRP in a dilution of 1: 1500 was used. For the appearance of protein spots, 3 and 3 Deminobenzidine (DAB) methods were used.

ELISA Assessment

An ELISA test was used to evaluate the expression level of antibodies secreted by two different expression systems. For this purpose, CD19-expressing cell lines, called NALM-6, and CD3-expressing cell lines, called Jurkat were cultured in 96 cells overnight. The cells were then fixed using 3.7% formaldehyde. After washing the cells 3 times, the unoccupied surfaces of the well were blocked by 2% bovine serum albumin for one hour. Next, the cells were incubated overnight with the serial dilutions of the antibody expressed at 4°C (12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.58 pg/mL). After performing the re-washing steps, 100 µL of antibody against HRP-conjugated polyhistidine was added to each well at a dilution of 1: 250 in 1% BSA. After one hour and re-rinsing, 100 µL of TMB (3,30,5,50 Tetramethylbenzidine) was added to each well to perform a dyeing reaction. Finally, the light absorption of each well was read

with an ELISA reader at 450 nm. Cell line without CD19 and CD3 markers (CHO cell) was also used as a negative control.

3. Results

The sequence encoding the blinatombe gene was successfully cloned into the pcDNA3.1 vector using two restriction enzymes NheI and HindIII. To confirm the cloning accuracy of the structure made by the two mentioned enzymes, an enzyme was digested which led to the creation of two pieces with a size of approximately 1600 and 5400 bp (Figure 1-A). In the case of the expression construct in bacteria, the coding sequence was successfully cloned into the pET-22b vector. Enzymatic digestion in this case also indicated the formation of 5000 and 1600 bp formats (Figure 1-B). Finally, by sequencing the created structures, the cloning accuracy was confirmed in both cases.

The expression level in both expression systems was determined after purifying the protein with a nickel column (Figure 2). Moreover, the purified protein from each system was determined to be concentrated. This was 2.3 mg/L for Expi293F cells and 100 mg/L for the bacterial expression system. SDS PAGE analysis, followed by Western blotting

was performed per expression system; this measure indicated the expression of 55 kDa target protein at the respective site (Figure 3).

To evaluate the frequency of expression per case, a densitometric system was used to determine the density of each band in SDS PAGE gel. The obtained results revealed that the band related to the expression system in bacteria contained approximately 19.3% of the total proteins. Additionally, the band related to the mammalian cell expression system contains about 7.1% of the total cultured proteins (Table 1).

Antibody binding ability expressed by ELISA was assessed. Two NALM-6 cell lines were applied for CD19 and Jurkat cell line for CD3. Both classes were treated with serial dilutions of antibodies (Figure 4). The relevant results reflected that the extent of antibody binding expressed from the Expi293F cellular system was approximately twice as high as the antibody binding expressed in BL21 (DE3).

4. Discussion

The expression system of mammalian cells is of considerable significance in the biopharmaceutical industry. The special features of this system include high sensitivity; expensive culture media; the inherent complexity of

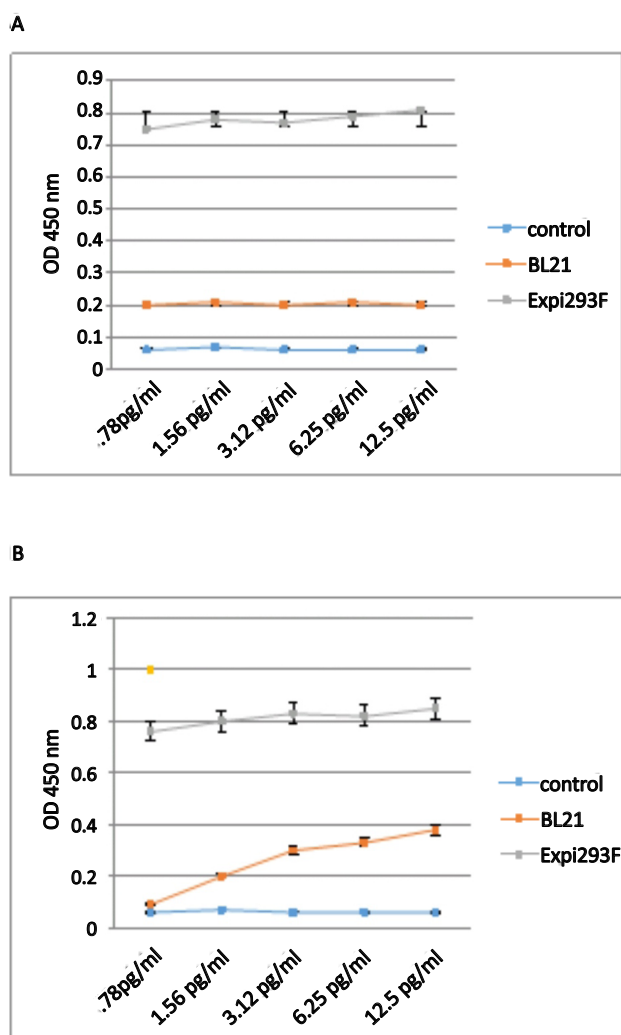


Figure 4. Investigating the effect of antibody binding produced in Expi 293F expression system and BL-21 (DE3) strain to surface marker

A: of Jurkat cell; and B: NALM-6 cell in both types of antibody cells produced in the mammalian expression system further attaches to the target cell than the bacterial expression system.

Table 1. SDS-PAGE gel densitometric analysis of the frequency of each band before and after purification with Ni-NTA column

Expression system	%	
	Before purification	After purification (%)
Expi 293F	8.11	3.7
BL21 (DE3)	8.30	3.19

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

eukaryotic cells, as well as the time-consuming process of culturing these cells. Such characteristics assist researchers in the field of industrial protein production research; they could use alternative systems in cases where simpler and cheaper hosts can be replaced. This also applies to producing antibody fragments or single-chain antibodies without a glycosylation pattern. A relevant challenge is to study the possibility of producing each molecule of a drug or antibody candidate protein in simpler expression systems, like bacteria. It is necessary to explore the possibility of production in cheaper systems for each protein separately; thus, the possibility of producing antibodies against the CD19 marker, as a powerful and expensive drug in the treatment of leukemia, was investigated (this antibody was available at the time of the release of the most expensive therapeutic antibody). This study compared and evaluated the produced protein using the method of rapid antibody production in the mammalian expression system (temporary expression system) and simultaneous expression in the bacterial system.

After successful cloning and expression of dual-character antibody in both systems, this antibody was purified and its production was confirmed. The expression levels in bacteria and Expi293F cells equaled 100 mg/L and 2.3 mg/L, respectively. Mack et al. obtained the expression of 15 mg/L by the antibody expression of two anti-EpCAM × anti-CD3 properties in BiTE format in the bacterial host [22]. McCall et al. produced a dual-character antibody in a similar format against anti-HER2 / neu × anti-CD16 in bacteria with an expression level of about 3.7 mg/L. Kuo et al. expressed the anti-CD123 × anti-CD3 antibody in the CHO-K1 host in a format similar to BiTE at a rate of about 5 mg/L [23]. The level of expression in E.coli expression systems is generally higher than that in mammalian expression systems; however, Root et al. achieved a significant expression of 1300 mg/L [24]. De Nardis et al. also produced dual-specific antibodies against HER2 and HER3 in the CHO-DG44 host in IgG-like formulation with an expression level of about 1200 mg/L [25].

The examined bacterial system reflected the ability to produce higher amounts of antibodies; however, the generated antibody had a lower binding power, compared to mammalian cells. Examining antibody binding characteristics produced per system by ELISA test signified that the mammalian expression system is more efficient in antibody production than the bacterial production system. In other words, the binding rate to each of the target indices (i.e., CD19 & CD3) was averagely about twice as high. This is probably due to differences in folding systems and protein processing in mammalian cells and bacteria. Previous studies provided similar results [22]. Flow cytometric analysis can be used to more accurately evaluate the antibody binding power produced. Besides, a mixed lymphocyte culture system in the presence of target cells can be used to evaluate the cytotoxic effect of antibodies on the target cell [12, 26]. Additionally, further studies are suggested to evaluate the expression of this antibody in other common expression systems, such as other mammalian cells or yeast cells. Another approach is to implement different expression vectors in the mammalian expression system.

5. Conclusion

This study indicated that in the case of antibodies to two traits of the BiTE family, like Blinatumbe, mammalian cells present a more efficient and successful expression system; although the bacterium can produce much larger amounts of the antibody.

Authors: Reza Moazami (laboratory and research methods, data analysis and text writing and editing) Hassan Mirza Hosseini (data analysis and text writing and editing) Fatemeh Nadafi (laboratory and research methods, text writing and editing) Fatemeh Davami (Research idea, conceptualization, data analysis, and text writing and editing)

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This research has obtained the ethics code IR.PII.REC.1399.008 from Pasteur Institute of Iran.

Funding

This research has been done using the research grant of Pasteur Institute of Iran and in this institute.

Authors' contributions

Laboratory and research methodology: Reza Moazami and Fatemeh Nadafi; Data analysis, writing – original draft, and writing – review & editing: All Authors; Conceptualization: Fatemeh Davami.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

بیان مقایسه‌ای آنتی‌بادی دوخصیصه‌ای علیه مارکر CD19 بیماری لوکمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) در میزبان E.Coli و Expi293F

رضا معظمی^۱، حسن میرزاحسینی^۱، فاطمه ندافی^۲، فاطمه دوامی^۱

۱. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۱ فروردین ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۲۵ خرداد ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۴۰۰

اهداف: آنتی‌بادی‌های دوخصیصه‌ای قادر به هدف‌گیری هم‌زمان دو مارکر سطحی هستند. بلیناتومومب یک آنتی‌بادی علیه CD3/CD19 از خانواده (Bispecific T cell engager antibody) BiTE است و سازمان غذا و داروی ایالات متحده آن را برای مصارف بالینی تأیید کرده است. این آنتی‌بادی به نحو مؤثری سلول‌های بدخیم را در بیماران مبتلا به لوکمی لنفوبلاستیک حاد هدف قرار می‌دهد. در تولید مقادیر زیاد از چنین آنتی‌بادی‌هایی در مقیاس صنعتی انتخاب میزبان مناسب یک مسئله مهم و حیاتی است. سلول‌های پستانداری و سویه‌های باکتری E.Coli به ترتیب از رایج‌ترین میزبان‌ها برای تولید آنتی‌بادی و قطعات آنتی‌بادی در مقیاس صنعتی هستند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه برای بیان آنتی‌بادی دوخصیصه‌ای در سیستم پستانداری پلاسمید (+) pcDNA3.1 و برای بیان در سیستم باکتریایی پلاسمید pET22b استفاده شد. آنتی‌بادی تولیدشده در هر دو سیستم با استفاده از رزین افینیتی نیکل در شرایط مشابه تخلیص شد و در مرحله بعد آنالیز SDS-PAGE و وسترن بلات روی هر دو نمونه صورت پذیرفت و نهایتاً ویژگی‌های اتصال آنتی‌بادی ترشح‌شده از هر دو سیستم با آزمون الایزا سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج بیانگر این بود که آنتی‌بادی تولیدشده سیستم بیانی پستانداری دارای ویژگی‌های اتصال بهتری نسبت به سیستم بیانی در باکتری است.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که در آنتی‌بادی‌های دو ویژگی از خانواده BiTE، مانند Blinatumab، سلول‌های پستانداران یک سیستم بیان کارآمدتر و موفق‌تر تولید می‌کنند. اگرچه باکتری می‌تواند مقادیر بیشتری از آنتی‌بادی را تولید کند.

کلیدواژه‌ها:

بلیناتومومب، آنتی‌بادی دوخصیصه‌ای، لوکمی لنفوبلاستیک حاد

مقدمه

چنین محدودیت‌هایی و افزایش فعالیت ضدتوموری آنتی‌بادی‌ها رویکردهای متفاوتی مثل مهندسی آنتی‌بادی برای افزایش افینیتی، ابداع آنتی‌بادی‌های کونژوگه^۱، استفاده از قطعات آنتی‌بادی‌ها^۲ و نهایتاً ایجاد آنتی‌بادی‌های دوخصیصه‌ای^۳ وجود دارد. اتصال به دو هدف متفاوت با یک مولکول آنتی‌بادی واحد یک ایده جذاب در تحقیقات درمان سرطان است. چنین مولکول‌هایی قادر به انجام چند عمل هستند: (۱) مهار رسپتور سطح سلولی؛ (۲) بلوک کردن هم‌زمان دو لیگاند؛ (۳) اتصال متقاطع دو رسپتور سطحی؛ (۴) در مجاورت تومور قرار دادن سلول T [۴]. تاکنون سه آنتی‌بادی

امروزه استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال (mAb) برای تشخیص و درمان بیماری‌های گوناگون از جمله سرطان تبدیل به یک روش استاندارد و مؤثر شده است. اکنون بیش از ۷۰ آنتی‌بادی منوکلونال در بازار دارویی دنیا موجود است و تعداد زیادی نیز در مراحل کارآزمایی قرار دارند [۱]. با این وجود در برخی از موارد آنتی‌بادی‌های منوکلونال دارای محدودیت‌هایی نیز هستند، برای مثال بزرگی و پیچیدگی مولکول از پتانسیل نفوذ آن به بافت‌های توموری می‌کاهد و یا ساختار مسطح بخش‌های تعامل‌کننده نفوذ به عمق حفره‌های کاتالیتیک در آنزیم‌ها را با دشواری مواجه می‌کند [۲، ۳]. برای برطرف کردن

1. Antibody Drug Conjugate
2. Antibody fragments
3. Bispecific

* نویسنده مسئول:

فاطمه دوامی

نشانی: تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی ایران.

تلفن: ۶۰۴۶۴۱۲ (۹۱۲) +۹۸

پست الکترونیکی: f.davami@gmail.com

دوخصیصه‌ای توانسته‌اند از مراجع قانونی مجوز ورود به بازار را کسب کنند: Catumaxomab [۵]، blinatumomab و Emi-cizumab [۶]. از مزایای ترکیبات دوخصیصه‌ای می‌توان به اثر دوجانبه آن‌ها روی اهداف متفاوت توموری و ایجاد تأثیرات دارویی تجمعی یا سینرژیک به دلیل هم‌پوشانی مسیرهای سیگنالینگ سرطان اشاره کرد. این آنتی‌بادی‌ها دارای فرمت‌های بسیار متنوعی هستند که شامل انواع دارای بخش Fc و انواع فاقد آن است [۴]. فرمت Bispecific T cell engager (BiTE) شامل دو تک‌زنجیره آنتی‌بادی است که از طریق یک لینکر پلی‌پپتیدی به هم متصل شده‌اند. در BiTE‌ها یک بازو علیه CD3 و یک بازو علیه آنتیژن توموری هدف‌گیری شده. از ویژگی‌های این فرمت می‌توان به توانایی فعال‌سازی وابسته به آنتیژن پلی‌کلونال سلول T و القا پرولیفریشن سلول T اشاره کرد. بدین ترتیب BiTE توانایی زیادی در لیز کردن سلول هدف دارد. بلیناتومومب^۴ یا در واقع CD3×CD19bsAb anti (Acute Lymphoblastic leukemia) شرکت Amgen برای درمان NHL (non-Hodgkin's lymphoma) در سال ۲۰۱۴ معرفی کرده [۷].

سلول‌های CD4⁺، CD3⁺ یا CD8⁺ توانایی مشابهی در لیز سلول‌های هدف نشان می‌دهند و با قدرت این کار را می‌کنند. البته سلول‌های T na⁺ve در این مورد استثنا هستند [۱۳]. خود CD3×CD19 anti برای فعال‌سازی سلول T کفایت لازم را داراست و نیازی به فعال‌سازی قبلی یا مواد کمک محرکی نیست، فعال شدن سلول T منجر به بیان و ظهور CD69 و CD25 و همچنین Up regulation ژن مولکول‌های چسبانی مثل CD2 بر سطح آن شده و از طرف دیگر باعث ره‌ایش سیتوکاین‌های التهابی مثل IL1، IL2، IL6، IL12، TNF α ، IFN γ و نهایتاً تکثیر متوالی سلول‌های T می‌شود [۱۴]. مکانیسم سلول‌کشی سلول T در مورد سلول هدف دارای CD19 شامل تشکیل یک سیناپس سیتوتلیتیک محکم بین دو سلول و متعاقب آن تخلیه پروتئین‌های سمی پرفورین و گرانزیم‌ها از وزیکول‌های ترشحی T سل روی سلول هدف است. فعال شدن آنزیم‌های کاسپاز در سلول هدف گویای اهمیت مسیر آپتوز به موازات مسیر وزیکول‌های ترشحی برای از بین بردن سلول هدف است [۸].

امروزه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب درمانی از جمله آنتی‌بادی‌های منوکلونال از میزبان‌های گوناگونی شامل: باکتری، باکولوویروس، مخمر، سلول‌های گیاهی و سلول‌های پستانداری استفاده می‌شود [۱۵] که از بین آن‌ها رده سلول‌های پستانداری به علت داشتن توانایی تولید پروتئین با تاخوردگی طبیعی و ایجاد تغییرات پس از ترجمه (-Post Translational Modifications) صحیح اهمیت ویژه دارند. رده سلولی CHO (Chinese hamster ovary) پرکاربردترین رده سلولی برای تولید آنتی‌بادی‌هاست، به نحوی که حدود دو سوم از پروتئین‌های نوترکیب درمانی در این رده تولید می‌شوند [۱۶]. رده سلولی HEK293 human embryonic kidney (سلول جنینی کلیه انسان است و در حال حاضر به طور گسترده‌ای برای بیان موقت TGE (Transient Gene Expression) پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود و علی‌رغم منشأ اپیتلیالی به‌خوبی با شرایط کشت معلق سازگاری می‌یابند. به دلیل انسانی بودن این رده پروتئین‌های نوترکیب بیان‌شده در آن، از نظر تغییرات پس از ترجمه مشابه پروتئین‌های انسانی هستند و روند ترجمه، تاخوردگی و بلوغ آن‌ها با کفایت چشمگیری صورت می‌گیرد. رویکرد بیان موقت ژن معمولاً برای تولید مقادیر زیاد پروتئین در زمان کوتاه برای بررسی‌های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی دارو و انجام مطالعات پیش‌بالینی استفاده می‌شود [۱۷، ۱۸]. سلول Expi 293 یک رده مشتق از سلول HEK293 است که برای کشت در شرایط معلق با تراکم سلولی بالا و در محیط کشت

بلیناتومومب فیوژن پروتئینی با وزن مولکولی ۵۵ KD و شامل دو زنجیره متغیر آنتی‌بادی (Single Chain Fragment Variable) است. این پروتئین از طریق cdNA چهار دامین متغیر به علاوه سه پپتید لینکر ساخته شده، دو لینکر بلند برای اتصال برای ساخت بخش scFv و یک لینکر کوتاه برای متصل کردن این دو بخش. این ساختار انعطاف و آزادی عمل لازم اتصال هر یک از بازوها به اپیتوپهای هدف واقع بر سطح دو سلول را فراهم می‌کند. در بخش N ترمینال این پروتئین scFv متصل‌شونده به CD19 مشتق از آنتی‌بادی موشی mAb HD37 و در بخش C ترمینال scFv متصل‌شونده به 3CD مشتق از آنتی‌بادی موشی mAb L2K قرار دارد [۸]. وجود یک توالی هگزاهیس‌تیدینی در C ترمینال این پروتئین امکان تخلیص آن توسط رزین‌های افینیتی کروماتوگرافی IMAC Immobilized metal ion affinity (chromatography) را فراهم می‌کند [۹].

بیان دائمی و بالای مولکول CD19 روی سلول‌های بدخیم B و نقش آن در بقا و پرولیفراسیون این سلول‌ها باعث شد که به عنوان شاخص هدف روی سلول B در نظر گرفته شود، برخلاف CD20 و CD22 رسپتور CD19 تقریباً در تمامی مراحل رشدی دودمان سلول B بیان می‌شود، از این رو یک مارکر مطمئن برای درمان این رده محسوب می‌شود. از طرف دیگر نشان داده شده که در افراد بیمار تقریباً ۱۰۰ درصد سلول‌های دچار بدخیمی این آنتیژن را بیان می‌کنند [۱۰]. CD19 یک فعال‌کننده PI3 کیناز است، این آنزیم یک عنصر کلیدی در میسر سیگنالینگ در سلول‌های بدخیم است [۱۱]. عملکرد in vitro مربوط به

4. Blinatumomab

وکتور pET-22b از شرکت Novagen (USA) تهیه شدند. آنزیم‌های محدودکننده از شرکت Thermo Fisher Sci (USA) entific خریداری شدند. رده سلولی NALM-6 و Jurkat از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند.

سازه بیانی و بیان در E.Coli

سازه بیانی بیان‌کننده آنتی‌بادی دوخصیصه‌ای بلیناتومومب از وکتور pGH در وکتور pET-22b توسط آنزیم‌های HindIII و NcoI کلون گردید. سویه BL21 (DE3) برای بیان پروتئین استفاده شد؛ وکتور pET-22b برای بیان پری پلاسمیک پروتئین هدف طراحی شده است و سویه ترانسفورم شده توسط وکتور بیانی در محیط کشت LB واجد آمپیسیلین تارسیدن به $OD=0.5$ در طول موج ۶۰۰ نانومتر آنکوبه شد. سپس برای القا از IPTG باغلظت ۰.۵mM استفاده شد. جداسازی سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ پس از ۴ ساعت کشت صورت گرفت، یک بیج کشت بدون القا هم به‌منزله کنترل منفی در نظر گرفته شد.

سازه بیانی و بیان رده سلولی Expi293F

توالی کدکننده پروتئین بلیناتومومب از وکتور pGH در وکتور pcDNA3.1 برای ساخت سازه بیانی در سیستم سلولی، توسط دو آنزیم NheI و HindIII ساب کلون شد، سپس این سازه بیانی به سلول‌های Expi293F ترانسفکت شدند. سلول‌های Ex-293FTM در محیط کشت اختصاصی و بدون سرم Expi293TM Expression Medium به همراه آنتی‌بیوتیک‌های پنسیلین استرپتومایسین (2mM) کشت شدند. سلول‌ها در شیکر آنکوباتور CO₂ در محیط مرطوب و در بطری‌های شیشه‌ای در حال دوران با سرعت 125rpm کشت شدند. سلول‌ها هر سه روز یک بار در چگالی حدوداً 5×10^3 cells/mL پاساژ داده می‌شدند. از روش شمارش سلولی با تریپانبلو برای محاسبه تعداد سلول‌ها استفاده شد. به طور خلاصه ترانسفکشن طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده و به این نحو صورت گرفت: روز پیش از ترانسفکشن سلول‌ها در محیط فاقد ماده افزودنی کشت شدند؛ روز بعد، ماده ترانسفکشن‌کننده (ExpiFectamineTM 293 Reagent) و پلاسمید که با نسبتی مشخص با هم مخلوط شده بودند بعد آنکوباسیون به سلول‌ها اضافه شدند. پس از ۱۶ تا ۱۸ ساعت هم ExpiFectamineTM Transfection Enhancer 1&2 براساس دستورالعمل سازنده به سلول‌ها افزوده شدند. در روز هفتم محیط رویی از سلول‌ها جدا شده و برای ارزیابی میزان بیان ذخیره گردید.

تخلیص پروتئین

برای تخلیص آنتی‌بادی بیان‌شده توسط رده سلولی Expi293F از ستون Ni-NTA (Ni-Nitrilotriacetic acid) استفاده شد؛

عاری از سرم و به شکل Chemically Defined تطابق یافته ویژگی‌ها این سلول را برای تولید صنعتی مناسب کرده [۱۹].

هرچند در حال حاضر سیستم بیانی سلول‌های پستانداری سیستم روش رایج تولید این آنتی‌بادی است اما در مقابل پتانسیل باکتری Escherichia coli برای تولید پروتئین‌های بدون الگوی گلائیکوزیلاسیون و همچنین سهولت دست‌ورزی فرآیند تولید و ارزان بودن مواد اولیه کشت باکتریال این میزبان را به میزبان مناسب برای تولید آنتی‌بادی‌های فاقد Fc و آنتی‌بادی‌های دوخصیصه‌ای تبدیل کرده است [۲۰]. به طوری که اکنون تولید بخش قابل توجه‌ای از پروتئین‌های درمانی فاقد الگوی گلائیکوزیلاسیون در این میزبان انجام می‌شود و در این میان سویه BL21 (DE3) یکی از رایج‌ترین سویه‌های صنعتی و تحقیقاتی است. تاریخچه طولانی استفاده صنعتی از ای.کولای و همچنین قوانین مناسب بخش‌های نظارتی تولیدی دارو در رابطه با این میزبان از مزیت‌های توجه‌برانگیز این پلت‌فرم تولید است [۲۱].

در این پژوهش سعی شده است با توجه به تک‌زنجیره و بدون گلائیکوزیلاسیون بودن بلیناتومومب از ظرفیت سیستم بیانی باکتری برای تولید این آنتی‌بادی و مقایسه آن با آنتی‌بادی تولیدشده در سلول یوکاریوتی استفاده شود، چون درباره آنتی‌بادی بلیناتومومب تاکنون چنین مقایسه‌ای صورت نگرفته. مزایای زیاد ای.کولای به عنوان میزبان مناسب از نظر پارامترهای تولید صنعتی و در دسترس بودن محیط‌های کشت ارزان‌قیمت برای تولید زیست‌داروها در این میزبان و همچنین قابل بیان بودن آنتی‌بادی‌های منوکلونال دوخصیصه‌ای خانواده BiTE (به دلیل نداشتن تغییرات پس از ترجمه‌ای) در آن از یک سو و وجود این واقعیت که تولیدکننده تجاری بلیناتومومب را در میزبان CHO بیان نموده، از سوی دیگر ما را برآن داشت که در این پژوهش به بررسی بیان و ویژگی‌های اتصالی آنتی‌بادی بیان‌شده در هر دو سیستم و مقایسه آن‌ها بپردازیم.

مواد و روش‌ها

سلول‌ها و مواد مصرفی

سلول Expi293F و محیط کشت مربوطه (Expi293TM Expression Medium) و ماده ترانسفکشن مخصوص به آن (ExpiFectamineTM 293 transfection Reagent) و همچنین آنتی‌بیوتیک L-Glu و Pen/Strep (+) از شرکت Invitrogen (CA, USA) تهیه شدند. رزین کروماتوگرافی Ni-NTA از شرکت QIAGEN (USA) خریداری شد. تریپان بلو و ماده ۳ و ۳ دی آمینوبنزیلیدین (DAB) و آنتی پلی هیستیدین کونژوگه با HRP و TMB از شرکت (USA) Sigma-Aldrich تهیه شدند. سویه E.Coli BL21 (DE3) و



افتخار دانش

تصویر ۱. ژل الکتروفورز سازه‌های بیانی؛ الف) آگاروز ژل الکتروفورز مربوط کلونینگ ژن آنتی‌بادی در وکتور pcDNA3.1 برای بیان در سلول Expi293F، ردیف (۱) DNA مارکر 1kb؛ ردیف (۲) هضم سازه ژنی واجد قطعه کدکننده آنتی‌بادی [pcDNA3.1+bsAb] توسط آنزیم‌های محدودکننده NheI و HindIII و ایجاد قطعات ۹۲۴۵ و ۷۸۵۱ جفت بازی؛ ردیف (۳) هضم سازه ژنی واجد قطعه کدکننده آنتی‌بادی [pcDNA3.1+bsAb] توسط آنزیم‌ها محدودکننده XhoI ایجاد قطعات ۱۳۷۵ و ۹۶۲۱ جفت بازی؛ ردیف (۴) سازه ژنی کلون شده [pcDNA3.1+bsAb] هضم نشده. ب) ژل الکتروفورز مربوط به کلونینگ ژن آنتی‌بادی در وکتور 22b-pET برای بیان در سوبه BL21 (DE3)؛ ردیف (۱) DNA مارکر 1kb؛ ردیف (۲) هضم سازه ژنی واجد قطعه کدکننده آنتی‌بادی توسط آنزیم‌های محدودکننده HindIII و NcoI و ایجاد قطعات ۳۹۴۵ و ۷۸۵۱ جفت بازی؛ ردیف (۳) سازه ژنی هضم نشده.

درصد بلوکه شد. در مرحله بعد از آنتی‌بادی علیه پلی‌هیستیدین کونژوگه با HRP در رقت ۱:۱۵۰۰ استفاده گردید، برای ظاهر شدن لکه‌های پروتئینی از روش ۳ و ۳ دآمینوبنزیدين (DAB) استفاده شد.

سنجش الایزا

برای بررسی سطح بیان آنتی‌بادی ترشح شده توسط دو سیستم بیانی مختلف از یک تست الایزا استفاده شد. به این منظور رده سلول‌های بیان کننده CD19 به نام NALM-6 و رده سلولی بیان کننده CD3 به نام Jurkat در پلیت ۹۶ خانه به مدت یک شب کشت شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از فرمالدهید ۳/۷ درصد تثبیت شدند، پس از سه بار شست‌وشوی سلول‌ها، سطوح اشغال نشده چاهک توسط آلبومین سرم گاوی ۲ درصد به مدت یک ساعت بلوکه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با رقت‌های سریالی از آنتی‌بادی بیان شده در ۴°C به مدت یک شب انکوبه شدند (۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸). پس از مراحل شست‌وشوی مجدد ۱۰۰ μl از آنتی‌بادی علیه پلی‌هیستیدین کونژوگه با HRP در رقت ۱:۲۵۰ در BSA ۱ درصد به هر چاهک افزوده شد. پس از یک ساعت و شست‌وشوی مجدد ۱۰۰ μl از ماده TMB (۳,۳',۵,۵'-Tetramethylbenzidine) برای انجام واکنش رنگ‌زایی به هر چاهک افزوده شد. نهایتاً جذب نوری هر چاهک با دستگاه خوانش الایزا در طول موج ۴۵۰ nm قرائت شد. از رده سلولی فاقد مارکرهای CD3، CD19 (سلول CHO) هم به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

ابتدا سوپ سلولی توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد. سپس ستون با بافر NaCl (300 mM), NaH₂PO₄ (50mM) Binding (pH = 8.0) شست‌وشو داده شد؛ در مرحله بعد نمونه با سرعت 1ml/min روی ستون اعمال گردید و سپس ستون توسط بافر NaCl (300 mM), NaH₂PO₄ (50mM) Wash (pH = 8.0) شست‌وشو داده شد و نهایتاً بافر NaCl (300 mM), NaH₂PO₄ (50mM) Elution (pH = 8.0) پروتئین مورد نظر را از ستون خارج کرد. برای تخلیص پروتئین بیان شده در باکتری مراحل کار مشابه با تخلیص پروتئین بیان شده از سلول بود. با این تفاوت که ترکیب شیمیایی بافرهای سه‌گانه به این شرح تغییر یافته بود:

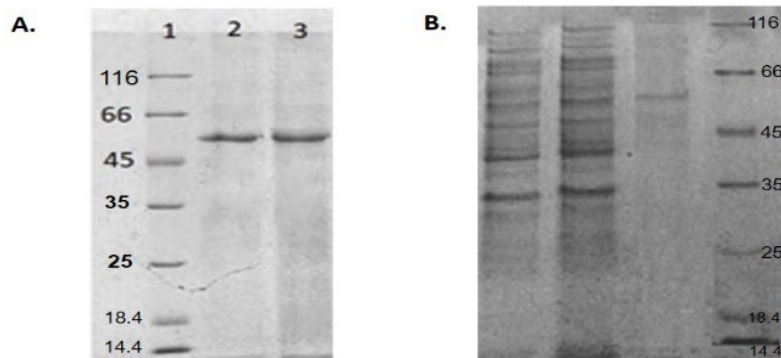
Binding buffer: (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M Urea pH = 8)

Washing buffer: (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M Urea pH = 6.3)

Elution buffer: (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M Urea pH = 4.5)

آنالیز SDS PAGE و وسترن بلات

از آنالیز SDS PAGE و وسترن بلات برای ارزیابی میزان بیان پروتئین استفاده شد. رنگ‌آمیزی کوماسی بلو برای آشکارسازی پروتئین‌ها به کار رفت. پروتئین‌ها در ولتاژ ۱۰۰ ولت در زمان ۸۰ دقیقه در ژل ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. متعاقب SDS PAGE وسترن بلاتینگ صورت پذیرفت. این فرایند توسط دستگاه وسترن Blot (Biorad) Trans-Blot (semi-dry transfer cell) با استفاده از غشای نیترو سلولز (GE Healthcare) برای انتقال پروتئین‌ها انجام شد؛ پس از انتقال، غشا توسط آلبومین سرم گاوی (BSA) ۴



فوق دانش

تصویر ۲. آنالیز PAGE SDS آنتی بادی تخلیص شده؛ الف) پروتئین تخلیص شده حاصل از سیستم بیانی سلول Expi293F. ردیف ۱) پروتئین مارکر 116-14 kDa؛ ردیف ۲ و ۳) فراکشن های تخلیص شده از سوپ سلولی؛ ب) پروتئین تخلیص شده سیستم بیانی BL21 (DE3)؛ ردیف ۱) پروتئین مارکر 116-14 kDa؛ ردیف ۲) لیزات سلولی القا شده؛ ردیف ۳) لیزات سلولی القا شده با IPTG؛ ردیف ۴) فراکشن تخلیص شده از لیزات سلولی القا شده با IPTG

آنالیز بیان پروتئین

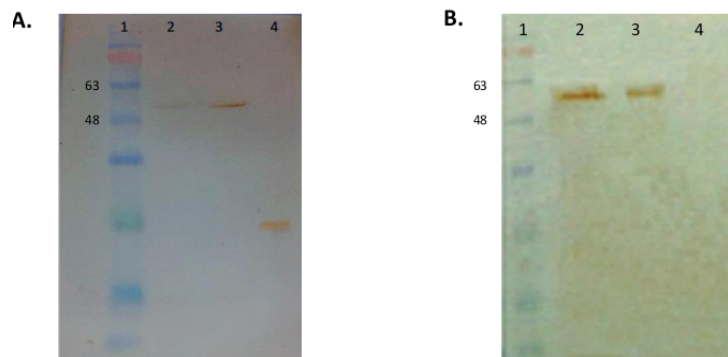
میزان بیان در هر دو سیستم بیانی متعاقب انجام تخلیص پروتئین با ستون نیکل صورت گرفت (تصویر شماره ۲) و پروتئین تخلیص شده از هر سیستم تعیین غلظت شد. این میزان درباره سلول Expi293F به میزان 3/2 mg/L و درباره سیستم بیان در باکتری 100 mg/L بود. آنالیز SDS PAGE و متعاقباً وسترن بلات برای هر کدام از سیستم های بیانی انجام شد که مبین بیان پروتئین ۵۵ کیلو دالتونی هدف در جایگاه مربوطه بود (تصویر شماره ۳).

برای بررسی درصد بیان در هر مورد، از سیستم دانسیتومتری برای تعیین میزان چگالی هر باند در ژل SDS PAGE استفاده شد. نتایج این آنالیز نشان داد که باند مربوط به سیستم بیانی در باکتری حدوداً ۱۹/۳ درصد از کل پروتئین ها و باند مربوط به سیستم بیان سلول پستانداری در حدود ۷/۱ درصد از کل

یافته ها

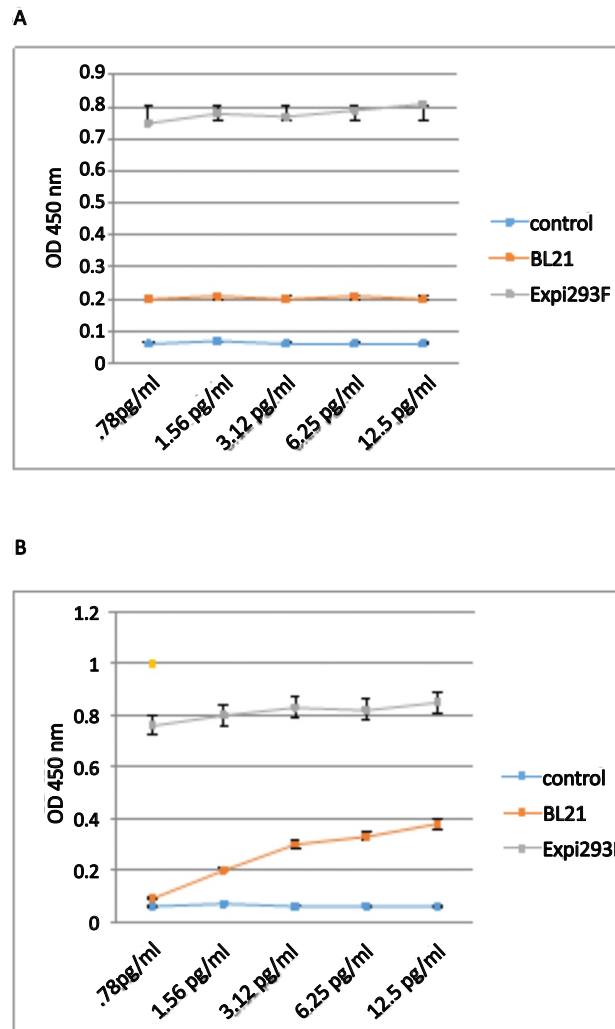
تولید سازه های بیانی

توالی کدکننده ژن بلینا تومومب با موفقیت در وکتور pcD-NA3/1 با استفاده از دو آنزیم محدودکننده HindIII و NheI کلون شد. برای تأیید صحت کلونینگ سازه ساخته شده توسط دو آنزیم مذکور هضم آنزیمی شد که منجر به ایجاد دو قطعه با سایز حدوداً 1600 و 5400 bp گردید (تصویر شماره ۱-الف). درباره سازه بیانی در باکتری هم توالی کدکننده با موفقیت در وکتور pET-22b کلون شد، هضم آنزیمی در این مورد هم نشان دهنده ایجاد دو قطعه 5000 و 1600 bp شد (تصویر شماره ۱-ب). در نهایت با تعیین توالی سازه های ایجاد شده صحت کلونینگ در هر دو مورد تأیید شد.



فوق دانش

تصویر ۳. آزمون وسترن بلات آنتی بادی؛ الف) وسترن بلات انجام شده روی آنتی بادی بیان شده در سیستم بیان سلول Expi293F. ردیف ۱) پروتئین مارکر 10-180 kDa؛ ردیف ۲ و ۳) آنتی بادی دوخصیصه ای تخلیص شده؛ ردیف ۴) پروتئین کنترل مثبت دارای دنباله هیستیدینی؛ ب) وسترن بلات انجام شده بروی آنتی بادی بیان شده در سیستم بیانی سویه BL21 (DE3)؛ ردیف ۱) پروتئین مارکر 10-180 kDa؛ ردیف ۲) لیزات سلولی پس از القا با IPTG (حاوی آنتی بادی دوخصیصه ای؛ ردیف ۳) پروتئین کنترل مثبت دارای دنباله هیستیدینی؛ ردیف ۴) لیزات سلولی القا شده و فاقد آنتی بادی دوخصیصه ای (کنترل منفی). در هر دو سیستم بیانی رنگ آمیزی توسط DAB صورت گرفته است.



افتخ دانش

تصویر ۴. بررسی اثر میزان اتصال آنتی‌بادی تولیدشده در دو سیستم بیانی Expi 293F و سویه BL-21(DE3) به مارکر سطحی. الف) سلول Jurkat (ب) سلول NALM-6 در مورد هر دو نوع سلول آنتی‌بادی تولیدشده در سیستم بیانی استاندارد نسبت به سیستم بیانی باکتریال به میزان بیشتری به سلول هدف متصل می‌شود.

سلولی Jurkat برای CD3 استفاده شد. هر دو رده با رقت‌های سریالی از آنتی‌بادی تیمار شدند (تصویر شماره ۴). نتایج مبین این بود که میزان اتصال آنتی‌بادی بیان‌شده از سیستم سلولی Expi293F حدوداً دو برابر بیشتر از اتصال آنتی‌بادی بیان‌شده در سویه BL21 (DE3) است.

پروتئین‌های کشت را شامل می‌شود (جدول شماره ۱).

بررسی توانایی اتصال آنتی‌بادی به سلول هدف

بررسی توانایی اتصال آنتی‌بادی بیان‌شده با استفاده از آزمون الایزا بررسی شد. دو رده سلولی NALM-6 برای CD19 و رده

بحث

جدول ۱. آنالیز دانسیتومتری ژل EGAP-SDS درصد هر باند از قبل و بعد از تخلیص با ستون ATN-iN

سیستم بیانی	قبل از تخلیص	بعد از تخلیص
Expi 293F	۱۱/۸٪	۷/۳٪
BL21(DE3)	۳۰/۸٪	۱۹/۳٪

افتخ دانش

آزمون الایزا، نشان داد که سیستم بیان پستانداری در تولید آنتی‌بادی از سیستم تولید باکتریال کارآمدتر است، یعنی میزان اتصال به هر کدام از شاخص‌های هدف (یعنی CD3 و CD19) به طور متوسط حدود دوبرابر است. این امر احتمالاً ناشی از تفاوت در سیستم‌های فولدینگ و پردازش پروتئینی در سلول پستانداری و باکتری‌هاست. مطالعات پیشین نیز نشان‌دهنده نتایج مشابهی هستند [۲۲]. برای بررسی دقیق‌تر قدرت اتصال آنتی‌بادی تولیدشده می‌توان از آنالیز فلوسایتومتری و همچنین برای بررسی اثر سایتوتوکسیک آنتی‌بادی بر سلول هدف از سیستم کشت مختلط لنفوسیتی در حضور سلول‌های هدف استفاده کرد [۲۶، ۱۲]. همچنین برای بررسی‌های بیشتر می‌توان بیان این آنتی‌بادی را در سایر سیستم‌های بیانی رایج مانند سایر سلول‌های پستانداری و یا سلول‌های مخمری مطالعه کرد، یک رویکرد دیگر نیز استفاده از وکتورهای بیانی متفاوت در سیستم بیان پستانداری است.

نتیجه‌گیری

انجام این پژوهش نشان داد که درباره آنتی‌بادی‌های دوخصیصه‌ای خانواده BiTE مانند بلیناتومومب، سلول‌های پستانداری سیستم بیانی کارا تر و موفق‌تری هستند، هرچند باکتری توانایی تولید مقادیر بسیار بیشتری از آنتی‌بادی را دارد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش دارای کد اخلاق IR.PII.REC.1399.008 از انستیتو پاستور ایران است.

حامی مالی

این پژوهش با استفاده از گرنت تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران و در این مؤسسه انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

روش‌شناسی آزمایشگاهی و پژوهشی: رضا معظمی و فاطمه ندافی؛ تحلیل داده‌ها، نگارش و ویرایش متن: همه نویسندگان؛ ایده پژوهشی و مفهوم‌سازی: فاطمه دوامی.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی اعلام نکردند.

هرچند که امروزه سیستم بیانی سلول‌های پستانداری در صنعت بایوفارما جایگاه ویژه‌ای به خود اختصاص داده‌اند اما ویژگی‌های خاص این سیستم مانند حساسیت زیاد، گران بودن محیط‌های کشت و پیچیدگی ذاتی سلول‌های یوکاریوتی و همچنین زمان‌بر بودن فرآیند کشت این سلول‌ها این فرصت را در زمینه تحقیقات تولید صنعتی پروتئین‌های درمانی برای محققین به وجود آورده تا در مواردی که امکان جایگزینی میزبان‌های ساده‌تر و ارزان‌تر وجود داشته باشد، از سیستم‌های جایگزین استفاده کنند. این امر درباره تولید قطعات آنتی‌بادی یا آنتی‌بادی‌های تک‌زنجیره‌ای که فاقد الگوی گلیکوزیلاسیون هستند هم مصداق دارد. یک چالش در این زمینه بررسی امکان تولید هر مولکول پروتئین کاندیدای دارویی یا آنتی‌بادی در سیستم‌های بیانی ساده‌تر مانند باکتری است، در واقع لازم است که درباره هر پروتئین امکان تولید را در سیستم‌های ارزان‌تر به طور مجزا بررسی کرد. از این رو بررسی امکان تولید آنتی‌بادی علیه مارکر CD19 به عنوان یک داروی توانمند و در عین حال گران‌قیمت در درمان سرطان خون پژوهش شد (این آنتی‌بادی در زمان عرضه گران‌قیمت‌ترین آنتی‌بادی درمانی عرضه شده بود). در این مطالعه سعی شد با استفاده از روش تولید سریع آنتی‌بادی در سیستم بیانی پستانداری (سیستم بیان موقت) و بیان هم‌زمان در سیستم باکتریال به مقایسه و بررسی پروتئین تولیدشده پرداخته شود.

پس از کلونینگ و بیان موفق آنتی‌بادی دوخصیصه‌ای در هر دو سیستم این آنتی‌بادی تخلیص و تولید آن تأیید شد. میزان بیان در باکتری و سلول Expi293F به ترتیب به میزان ۱۰۰ و ۲/۳ بود. مک و همکاران با بیان آنتی‌بادی دوخصیصه‌ای anti-EpCAM × anti-CD۳ در فرمت BiTE در میزان باکتری به بیان ۱۵ mg/L دست پیدا کردند [۲۲]. در مطالعه‌ای دیگر ام سی سل و همکاران توانستند یک آنتی‌بادی دوخصیصه‌ای در فرمتی مشابه را علیه anti-HER2/neu × anti-CD16 در باکتری با سطح بیان حدود ۳/۷ mg/L تولید کنند. کو و همکاران نیز توانستند در میزبان CHO-K1 آنتی‌بادی anti-CD123 × anti-CD3 در فرمتی شبیه به BiTE به میزان حدود ۵ mg/L بیان کنند [۲۳]. با وجود اینکه سطح بیان در سیستم‌های بیانی E.Coli عموماً بالاتر از سیستم‌های بیانی پستانداری است اما روت و همکاران توانستند برای بیان آنتی‌بادی دوخصیصه‌ای anti-P-cadherin × anti-CD3 در سلول CHO با یک فرمت مشابه BiTE به سطح بیان چشمگیر ۱۳۰۰ mg/L دست پیدا کنند [۲۴]. د ناردیس و همکاران توانستند آنتی‌بادی دوخصیصه‌ای علیه HER2 و HER3 را در میزبان CHO-DG44 در فرمت شبه IgG با سطح بیان حدود ۱۲۰۰ mg/L تولید کنند [۲۵]. هرچند در این مطالعه سیستم باکتری توانایی تولید مقادیر بیشتری از آنتی‌بادی را نشان داد اما آنتی‌بادی تولیدشده در مقایسه با سلول‌های پستانداری قدرت اتصال پایین‌تری داشت. بررسی ویژگی‌های اتصال آنتی‌بادی تولیدشده در هر کدام از سیستم‌ها به کمک

References

- [1] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 2004; 22(11):1393-8. [DOI:10.1038/nbt1026] [PMID]
- [2] Weidle UH, Auer J, Brinkmann U, Georges G, Tiefenthaler G. The emerging role of new protein scaffold-based agents for treatment of cancer. *Cancer Genomics-Proteomics*. 2013; 10(4):155-68. [PMID]
- [3] Cruz E, Kayser V. Monoclonal antibody therapy of solid tumors: Clinical limitations and novel strategies to enhance treatment efficacy. *Biologics: Targets & Therapy*. 2019; 13:33-51. [DOI:10.2147/BTT.S166310] [PMID]
- [4] May C, Sapra P, Gerber HP. Advances in bispecific biotherapeutics for the treatment of cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2012; 84(9):1105-12. [DOI:10.1016/j.bcp.2012.07.011] [PMID]
- [5] Thakur A, Lum LG. "NextGen" biologics: Bispecific antibodies and emerging clinical results. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2016; 16(5):675-88. [DOI:10.1517/14712598.2016.1150996] [PMID]
- [6] Husain B, Ellerman D. Expanding the boundaries of biotherapeutics with bispecific antibodies. *BioDrugs*. 2018; 32(5):441-64. [DOI:10.1007/s40259-018-0299-9] [PMID]
- [7] Baeuerle PA, Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Research*. 2009; 69(12):4941-4. [DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-0547] [PMID]
- [8] Nagorsen D, Baeuerle PA. Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab. *Experimental Cell Research*. 2011; 317(9):1255-60. [DOI:10.1016/j.yexcr.2011.03.010] [PMID]
- [9] Löffler A, Kufer P, Lutterbüse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 × CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood*. 2000; 95(6):2098-103. [DOI:10.1182/blood.V95.6.2098] [PMID]
- [10] Portell CA, Wenzell CM, Advani AS. Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2013; 5(Suppl 1):5-11. [DOI:10.2147/CPAA.S42689] [PMID]
- [11] Baracho GV, Miletic AV, Omori SA, Cato MH, Rickert RC. Emergence of the PI3-kinase pathway as a central modulator of normal and aberrant B cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*. 2011; 23(2):178-83. [DOI:10.1016/j.coi.2011.01.001] [PMID]
- [12] Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, Hoffmann P, Syring U, Hanakam F, et al. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *International Journal of Cancer*. 2002; 100(6):690-7. [DOI:10.1002/ijc.10557] [PMID]
- [13] Kischel P, Guillonneau F, Dumont B, Bellahcène A, Stresing V, Clézardin P, et al. Cell membrane proteomic analysis identifies proteins differentially expressed in osteotropic human breast cancer cells. *Neoplasia*. 2008; 10(9):1014-20. [DOI:10.1593/neo.08570] [PMID]
- [14] Brandl C, Haas C, d'Argouges S, Fisch T, Kufer P, Brischwein K, et al. The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and re-directed target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007; 56(10):1551-63. [DOI:10.1007/s00262-007-0298-z] [PMID]
- [15] Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*. 2012; 30(5):1108-18. [DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.09.011] [PMID]
- [16] McAtee AG, Templeton N, Young JD. Role of Chinese hamster ovary central carbon metabolism in controlling the quality of secreted biotherapeutic proteins. *Pharmaceutical Bioprocessing*. 2014; 2(1):63-74. <https://www.vanderbilt.edu/younglab/pdf/mcatee14.pdf>
- [17] Baldi L, Hacker DL, Adam M, Wurm FM. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters*. 2007; 29(5):677-84. [DOI:10.1007/s10529-006-9297-y] [PMID]
- [18] Wurm F, Bernard A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999; 10(2):156-9. [DOI:10.1016/S0958-1669(99)80027-5] [PMID]
- [19] Wang Q, Chen Y, Park J, Liu X, Hu Y, Wang T, et al. Design and production of bispecific antibodies. *Antibodies*. 2019; 8(3):43. [DOI:10.3390/antib8030043] [PMID]
- [20] Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 2009; 27(3):297-306. [DOI:10.1016/j.biotechadv.2009.01.008] [PMID]
- [21] Humphreys DP. Production of antibodies and antibody fragments in *Escherichia coli* and a comparison of their functions, uses and modification. *Current Opinion in Drug discovery & Development*. 2003; 6(2):188-96. [PMID]
- [22] Mack M, Riethmüller G, Kufer P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92(15):7021-5. [DOI:10.1073/pnas.92.15.7021] [PMID]
- [23] Kuo SR, Wong L, Liu JS. Engineering a CD123xCD3 bispecific scFv immunofusion for the treatment of leukemia and elimination of leukemia stem cells. *Protein Engineering, Design & Selection*. 2012; 25(10):561-9. [DOI:10.1093/protein/gzs040] [PMID]
- [24] Root AR, Cao W, Li B, LaPan P, Meade C, Sanford J, et al. Development of PF-06671008, a highly potent anti-P-cadherin/anti-CD3 bispecific DART molecule with extended half-life for the treatment of cancer. *Antibodies*. 2016; 5(1):6. [DOI:10.3390/antib5010006] [PMID]
- [25] De Nardis C, Hendriks LJA, Poirier E, Arvinte T, Gros P, Bakker ABH, et al. A new approach for generating bispecific antibodies based on a common light chain format and the stable architecture of human immunoglobulin G1. *Journal of Biological Chemistry*. 2017; 292(35):14706-17. [DOI:10.1074/jbc.M117.793497] [PMID]
- [26] Hoffmann P, Hofmeister R, Brischwein K, Brandl C, Crommer S, Bargou R, et al. Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *International Journal of Cancer*. 2005; 115(1):98-104. [DOI:10.1002/ijc.20908] [PMID]

This Page Intentionally Left Blank