مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۱، شماره‌ی ۸۸ آذر و دی ۱۳۹۲، صفحات ۱۲ تا ۲۱

تولید آنتی بادی تک زنجیره‌ای انسانی شده ضد مارکر CD۲۰ در *E.coli*

وحیده احمدزاده[۱]، دکتر صفر فرج‌نیا[۲]، دکتر محمدعلی حسینپور فیضی[۳]، دکتر رمضانعلی خاوری نژاد[٤]

نویسنده‌ی **مسوول**: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی vahideh_ahmadzadeh@yahoo.com

دریافت: ۹۲/۲/۲۹ پذیرش: ۹۲/۵/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *رتوکسی‌مب (Rituximab) آنتی‌بادی مونوکلونال کایمریک بر ضد آنتی ژن CD ۲۰ بوده، به‌طور گسترده برای درمان لنفومای سلول‌های B استفاده می‌گردد. با این وجود سایز بزرگ و ایمنی‌زایی آنتی‌بادی‌های کامل موشی همواره به عنوان مشکل در ایمونوتراپی مطرح بوده است. جهت حل این مشکل می‌توان از قطعات کوچک آنتی‌بادی انسانی شده استفاده نمود. هدف از این تحقیق تولید آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای انسانی به منظور کاربرد آن در درمان ناهنجاری‌های مرتبط با سلول B است.*

روش بررسی: *به منظور طراحی آنتی‌بادی Rituximab انسانی شده با استفاده از روش CDR-grafting، نواحی CDR موشی به قسمت‌های Framework ایمونوگلوبولین‌های Germline انسانی منتخب دارای بیشترین شباهت با همتای موشی منتقل شدند. توالی نوکلئوتیدی طراحی شده در E.coli بیان شده، سپس تخلیص گردید. میزان بیان آنتی‌بادی نوترکیب با روش SDS-PAGE و واکنش آن با رده‌ی سلولی Raji با استفاده از تکنیک Dot blot مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *در انتخاب نواحی Framework انسانی به‌منظور انجام CDR Grafting ایمونوگلوبولین‌های IGHV۱-٤٦*۰۳ و IGKV۱-۳۹*۰۱ بیشترین شباهت را با آنتی بادی اولیه نشان دادند. بررسی بیان با روش SDS-PAGE مشخص کرد آنتی بادی تولیدی با غلظت بالا در E.coli بیان گردیده، با افینیتی مناسب نسبت به آنتی ژن CD ۲۰ بیان شده در سطح سلول‌های Raji واکنش نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای انسانی تولید شده می‌تواند به مارکر CD ۲۰ متصل گردیده، به‌عنوان روش درمانی برای هدف قرار دادن این آنتی ژن در درمان سرطان‌های مرتبط به کار رود.*

واژگان کلیدی: انسانی کردن، آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای، CD ۲۰

مقدمه

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ابزار دقیق و مناسبی جهت تحقیقات بیولوژیکی و درمانی بوده (۱) و با اتصال به مارکرهای مختلف در سطح سلول‌های توموری اثرات خود را اعمال می‌نمایند. یکی از مارکرهای مهم در درمان لنفوم غیر هوچکین (NHL)، CD۲۰ است (۳و۲). این مارکر در سطح سلول‌های B پیش‌ساز و بالغ ایجاد شده

۱- دانشجوی دکترای تخصصی زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی
۲- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، دانشیار مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۳- دکترای تخصصی رادیوبیولوژی، استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
٤- دکترای تخصصی فیزیولوژی گیاهی، استاد گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

و در هنگام تکامل سلول‌های B به سلول‌های پلاسمایی بیان آن از بین می‌رود (٤). CD۲۰ جزیی از کمپلکس مولتیمریک سطح سلولی تنظیم کننده عبور Ca^{2+} از غشا بوده، احتمالا در تنظیم فعالیت و تکثیر سلول‌های B موثر است و در ایجاد پاسخ آنتی‌بادی مستقل از سلول‌های T (TI) نقش مهمی دارد (۵). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با منشا موشی (Murine) به‌دلیل ایجاد واکنش‌های حساسیتی، نیمه عمر کوتاه و قدرت نفوذ کم به تومورها پاسخ‌های ناکارآمد را در میزبان منجر می‌شوند. به‌دلیل وجود این مشکلات تولید آنتی‌بادی به‌صورت نوترکیب مطرح گردید. آنتی‌بادی‌های نوترکیب عبارتند از: ۱- آنتی‌بادی‌های Chimeric ۲- آنتی‌بادی‌های Humanized ۳- آنتی‌بادی‌های Human (۱۰-٦). اولین آنتی‌بادی موشی بر ضد CD۲۰ به نام B۱ در سال ۱۹۸۰ تولید شد. Rituximab (Rituxan) به عنوان یکی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده به روش مهندسی ژنتیک بر ضد مارکر CD۲۰ در سال ۱۹۹۷ توسط FDA تایید گردید (۱۱). در بین روش‌های متنوع انسانی کردن آنتی‌بادی (مانند Resurfacing, Superhumanization ,Deimmunization) CDR-Grafting به‌عنوان روش مناسبی برای بهبود عملکرد آنتی‌بادی‌ها در درمان بیماری‌ها تلقی می‌گردد. آنتی‌بادی‌های انسانی شده از ترکیب مناطق بسیار متغیر (CDR) آنتی‌بادی‌های موشی با ناحیه‌ی Framework آنتی‌بادی‌های انسانی به‌دست می‌آیند (۱٤-۱۲). نواحی Framework انسانی به‌عنوان پذیرنده‌ی قسمت‌های CDR موشی از منابع مختلفی مانند Consensus، Germline و به‌دست می‌آید (۱۵). در سال‌های اخیر تمایل زیادی به استفاده از قطعات آنتی‌بادی (دارای وزن تقریبی ۱۵ تا ۵۵ KD) مانند scFv به جای مولکول کامل آن (با وزن تقریبی ۱۵۰KD) صورت گرفته است. این قطعات شامل ناحیه‌ی متغیر زنجیر سبک (V_L) و ناحیه‌ی متغیر زنجیره سنگین (V_H) بوده که توسط یک قطعه پپتیدی انعطاف پذیر به عنوان لینکر (به‌طول تقریبی ۲۵ تا ۵۰ اسیدآمینه و معمولا دارای طول ۱۵ مری است) به هم متصل شده‌اند. معمول‌ترین لینکر پپتید ۱۵ تایی $(Gly_4\ Ser)_3$ است. این فرم از آنتی‌بادی فاقد منطقه‌ی FC بوده، به راحتی در سیستم بیانی *E. coli* قابل تولید است و امکان تغییرات ژنتیکی در جهت ارتقای خصوصیات آنتی‌بادی همچون افزایش تمایل اتصال و تغییر دادن اختصاصیت آن را برای محققان فراهم می‌کند (۱۷و۱٦). هدف از این تحقیق تولید آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای انسانی شده بر ضد مارکر CD۲۰ از طریق کلون و بیان توالی مربوطه در *E.coli* به منظور بود. استفاده از آن در تشخیص و درمان بیماری‌های مرتبط است.

روش بررسی

آنالیزهای بیوانفورماتیکی: به‌منظور انسانی کردن آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای ضد CD۲۰ از طریق سایت http://www.imgt.org شبیه‌ترین ایمونوگلوبولین‌های Germline انسانی به آنتی‌بادی Rituximab را شناسایی کرده، از بین آن‌ها ایمونوگلوبولین‌های دارای Chothia Canonical Structures مشابه (در ناحیه‌ی CDRs) با آنتی‌بادی اولیه برای هر دو زنجیره‌ی سنگین و سبک با استفاده از سایت http://www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html انتخاب گردیدند (۲۰-۱۸). سپس تغییرات لازم تحت عنوان Backmutations در مناطق Interface Domain (بر اساس الگوی Kabat) و Vernier Zones اعمال گردید (۲۳-۲۱). در نهایت CDRs موشی آنتی‌بادی کایمریک به ناحیه Framework آنتی‌بادی Germline انسانی منتخب پیوند (Graft) گردیدند.

طراحی ژن مربوط به آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای ضدCD۲۰ : برای طراحی آنتی‌بادی انسانی شده زنجیره‌های سبک و

سنگین مطلوب به‌دست آمده توسط لینکر ۱۵ آمینو اسیدی $(Gly_4Ser)_3$ به یکدیگر متصل گردیده و پس از بهینه‌سازی کدون (Codon Usage Optimization) برای بیان در باکتری، در نهایت با افزودن مناطق برش آنزیمی (در انتهای '۵ جایگاه برش برای آنزیم MlsI (MscI و انتهای '۳جایگاه برش برای آنزیم XhoI)، توالی نوکلئوتیدی آنتی‌بادی مورد نظر به صورت سفارشی تهیه شد.

بیان آنتی‌بادی نوترکیب انسانی شده در *E.Coli*: به منظور بیان ژن آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای، ژن طراحی شده به *E.Coli* سویه DH۵α ترانسفورم گردیده سپس با آنزیم‌های محدودگر از حامل pUC۵۷ جدا شده وبه حامل pET۲۲b، برش داده شده با آنزیم‌های فوق الذکر متصل گردید. کلنی‌ها برای دارا بودن قطعه الحاقی مورد نظر به روش تعیین توالی، PCR و هضم آنزیمی غربال و شناسایی گردیدند. این سازه‌ی ژنی به باکتری BL۲۱ ترانسفورم شده و در محیط کشت LB Broth تا رسیدن به OD=۰/۵ رشد داده شد. سپس با افزودن IPTG با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت سه ساعت القا گردید.

خالص سازی آنتی‌بادی نوترکیب: برای خالص سازی آنتی‌بادی نوترکیب، سویه‌ی حاوی سازه‌ی بیانی در حجم یک لیتر کشت داده شده و پس از القا توسط IPTG با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۳ ساعت به کمک سانتریفوژ باکتری‌ها جمع‌آوری شدند. رسوب باکتریایی در بافر لیز کننده (PH ۸، ۵۰ mM NaH_2PO_4، ۳۰۰mM NaCl) سونیکه گردید. سپس مخلوط حاوی باکتری لیز شده سانتریفوژ گردیده و به دو قسمت سوپرناتانت و رسوب تفکیک شد. برای پی بردن به ماهیت پروتئین مورد نظر فراکسیون‌های سوپرناتانت و رسوب از طریق آنالیز SDS-PAGE بررسی گردیدند. سپس سوپرناتانت حاصل از سونیکاسیون از ستون (Ni-NTA (Qiagen (قبلا با بافر مربوطه متعادل سازی شده بود) عبور داده شد. در نهایت آنتی‌بادی نوترکیب مورد نظر با استفاده از بافر حاوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار از ستون جداسازی و جمع‌آوری گردیده و در برابر PBS دیالیز شد. کیفیت پروتئین خالص سازی شده با استفاده از ژل SDS-PAGE دوازده درصد کنترل گردید.

کشت سلولی: رده‌ی سلولی Raji (بیان کننده‌ی آنتی ژن سطحی CD۲۰) در محیط کشت RPM۱٦٤۰ دارای FBS۱۰٪ (Fetal Bovine Serum) (Sigma) حاوی ۲۰۰ میکرومول در هر لیتر ال-گلوتامین و نیز پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و اتمسفر مرطوب حاوی Co_2 ۵ درصد کشت داده شد.

آنالیز Dot blot: به منظور بررسی واکنش آنتی‌بادی نوترکیب با رده‌ی سلولی Raji تست Dot blot انجام گرفت. برای این کار پس از بلوکه کردن جایگاه‌های غیر اختصاصی نوار PVDF با Skimmed Milk، نمونه سلولی لیز شده Raji (به مقدار٤ میکرولیتر) بر روی کاغذ نقطه گذاری شد. بعد از یک ساعت انکوباسیون و شستشو با TBST آنتی‌بادی اولیه خالص شده به نسبت ۱:۸ به مدت یک ساعت با نوار PVDF مجاور گردید. پس از شستشو، نوار برای یک ساعت با HRP-conjugated anti-mouse IgG با رقت ۱:۲۰۰۰ انکوبه شده و نهایتا واکنش از طریق مجاورت نوار باسوبسترای DAB آشکارسازی گردید.

یافته‌ها

انسانی کردن آنتی‌بادی نوترکیب ضد CD۲۰: به‌منظور تولید آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای انسانی شده ایمونوگلوبولین‌های Germline انسانی IGHV۱-٤٦*۰۳ و IGKV۱-۳۹*۰۱ به‌ترتیب با شباهت ۷۲/٤ درصد و ٦۳/۸ درصد در ناحیه‌ی Framework برای زنجیره‌های سبک و

سنگین و دارای Chothia Canonical Structures مشابه با آنتی‌بادی کایمریک Rituximab انتخاب گردیدند (جدول ۱).

جدول ۱: ارزیابی CDR Canonical Class زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین‌های Germline انسانی IGHV1-46*03 و IGKV1-39*01 تعیین شده به‌وسیله‌ی Cothia et al. (۱۹۹۲)

Canonical Class	CDR	Canonical class	CDR
? Similar to class 1/10A but:H102 (Chothia Numbering) = L (allows: YHVISDG)	H1	2/11A	L1
? Similar to class 2/10A, but:H50 (Chothia Numbering) = I (allows: REWYGQVLNKA) H71 (Chothia Numbering) = R (allows: VAL)	H2	1/7A	L2
?		1/9A	L3

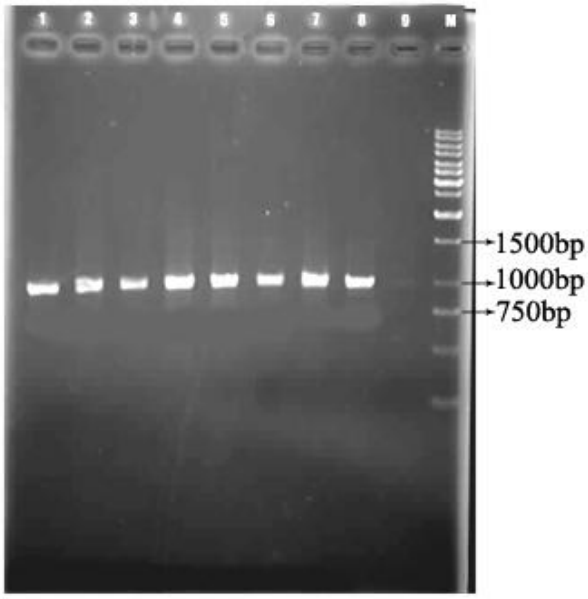
نوع این ساختارها در CDRs زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی اولیه به ترتیب زیر است:

L1:1 (۱ Canonical Structure از LCDR1. (زنجیره سبک) این نوع ساختار در ایمونوگلوبولین‌های Germline انسانی وجود ندارد)، L2:1 و H1:1 L3:1 (۱ Canonical structure از HCDR1 (زنجیره سنگین)) و H2:2، تعیین Canonical Structure HCDR3 به علت تنوع بالای آن مشکل است. پس ازانتخاب ایمونوگلوبولین‌های انسانی با بیشترین شباهت تغییرات لازم در مناطق Vernier zones (براساس الگوی نامگذاری IMGT عبارتند از:

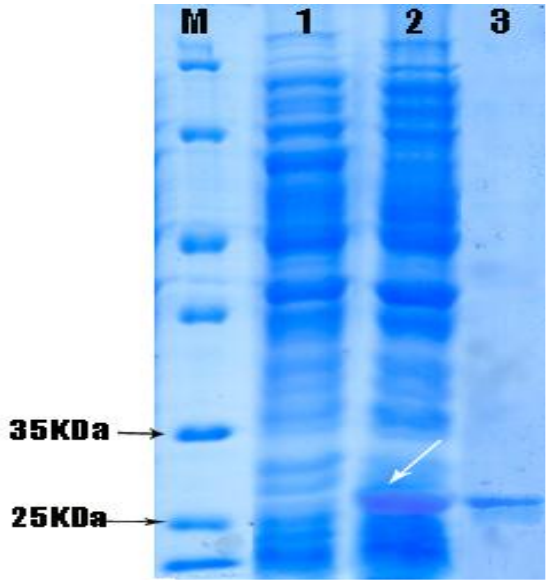
H2 ,H29 ,H30 ,H31 ,H32 ,H52 ,H53 ,H54 ,H76 L2, L4, ,H78 ,H80 ,H82 ,H87 ,H105 ,H106 ,H118, L41 L42, L52, L53, L54, L55, L78, L80, L84, L85, L87, L118) و VH/VL Interface Domains اعمال گردید. در نهایت از طریق روش CDR-Grafting, CDRs موشی آنتی‌بادی کایمریک به ناحیه Framework زنجیره‌های سبک و سنگین Germline انسانی منتخب Graft گردیدند.

بیان آنتی‌بادی نو ترکیب در *E.coli* و تخلیص آن:

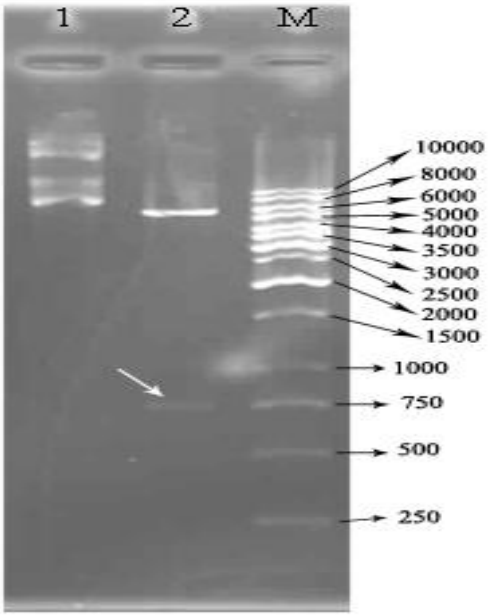
به‌منظور بیان آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای انسانی شده قطعه‌ی الحاقی مورد نظر پس از تایید تعیین توالی دروکتور pET22b ساب کلون شده و حضور ژن‌های ناحیه‌ی متغیر زنجیره‌ی سبک و سنگین به دو روش الگوی هضم آنزیمی و الگوی PCR مورد تایید قرار گرفت (شکل ۲ و ۱). سازه‌ی ژنی در میزبان BL21 ترانسفرم شده سپس سلول‌ها در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شدند و نمونه‌برداری قبل از القا و۳ ساعت بعد از القا با IPTG انجام گرفت. آنتی‌بادی تولید شده به علت دارا بودن فیوژن 6His-Tag توسط کروماتوگرافی تمایلی Ni^{+}-NTAresin تخلیص شد.



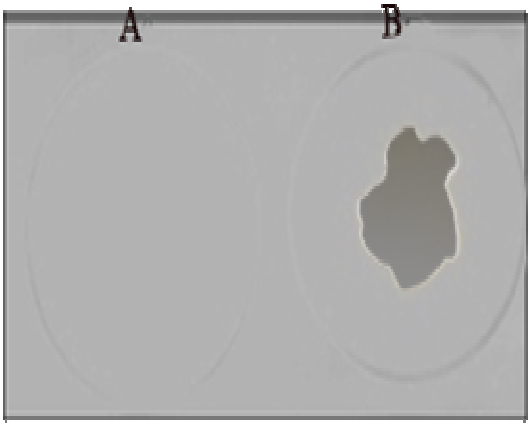
شکل ۱: تایید ساب کلونینگ در وکتور pET ۲۲b با روش PCR. ستون‌های ۸-۱. کلون‌های مثبت pET ۲۲b-scFv ۹. کنترل منفی، M. DNA سایز مارکر



شکل ۳: آنالیز SDS-PAGE آنتی‌بادی نوترکیب ستون‌های: M. پروتئین مارکر، ۱. نمونه قبل از القا ۲. نمونه پس از القا (۲۶KD). ۳. آنتی‌بادی خالص شده. فلش نشان‌دهنده‌ی آنتی‌بادی انسانی شده است.



شکل ۲: هضم آنزیمی به منظور تایید ژن و خارج شدن قطعه از پلاسمید pET ۲۲b-scFv ستون‌های: ۱. پلاسمید نوترکیب هضم نشده، ۲. پلاسمید نوترکیب هضم شده، M. DNA سایز مارکر



شکل ٤: تکنیک Dot blot. A کنترل منفی، B. واکنش آنتی‌بادی نوترکیب انسانی شده با آنتی ژن CD ۲۰ در سطح رده‌ی سلولی Raji

بررسی بیان با SDS-PAGE و Dot blot: بررسی بیان آنتی‌بادی نوترکیب به‌وسیله‌ی تکنیک SDS-PAGE انجام

شد و مشخص گردید پروتئین مورد نظر بعد از افزودن IPTG به‌صورت باند واضحی در محدوده‌ی ۲۶ کیلو دالتونی تولید گردیده است. عبور سوپرناتانت حاصل از سونیکاسیون از ستون منجر به تخلیص پروتئین مورد نظر در خلوص بالا و با غلظت ٦٦/٦ g/ml (اندازه‌گیری شده با نانودراپ) گردید که به‌صورت باند ۲٦ کیلودالتونی در ژل SDS-PAGE رنگ آمیزی شده با کوماسی‌بلو مشخص گردید (شکل ۳). آنالیز با استفاده تکنیک Dot blot مشخص کرد آنتی‌بادی نوترکیب تولیدی دارای افینیتی مناسب نسبت به آنتی ژن CD۲۰ بیان شده در سطح سلول‌های Raji بودند (شکل ٤).

بحث

اگرچه تا کنون آنتی‌بادی‌های موشی زیادی علیه آنتی‌ژن‌های متعددی تولید شده‌اند، اما مواردی مانند ایجاد پاسخ ایمنی بر ضد این آنتی‌بادی‌ها و سایز بزرگ آنتی‌بادی‌های کامل کاربرد آن‌ها جهت مقاصد درمانی و تشخیصی را محدود کرده است. برای غلبه بر این محدودیت‌ها تولید آنتی‌بادی‌های انسانی شده با وزن‌های ملکولی کمتر رواج یافت. روش‌های متعددی برای انسانی کردن آنتی‌بادی‌ها به کار می‌رود که از بین آن‌ها CDR-Grafting به‌عنوان یکی از روش‌های متداول شناخته می‌گردد. در این روش نواحی CDR موشی به نواحی Framework آنتی‌بادی انسانی پیوند زده می‌شوند (۲۵و۲٤). Hu Wei-Gang و همکارانش از روش CDR-grafting برای انسانی کردن آنتی‌بادی مونوکلونال ضد Ricin استفاده کردند. در این مطالعه آن‌ها ایمونوگلوبولین‌های Germline انسانی را به‌عنوان پذیرنده‌ی نواحی CDR در نظر گرفتند. ایمونوگلبولین‌های Germline انسانی فاقد موتاسیون‌های سوماتیک بوده بنابراین دارای قابلیت ایمنی‌زایی کم در انسان هستند. در این تحقیق ایمونوگلبولین‌های Germline انسانی IGKV۱-۳۹*۰۱ و IGHV۱-٤٦*۰۳ منتخب (به‌عنوان پذیرنده‌ی نواحی CDR موشی) دارای هموژی بالا در هر دو ناحیه‌ی Frameworks و CDRs با همتای موشی و ساختار کانونی مشابه با آنتی‌بادی اولیه بودند. در بسیاری از موارد انسانی کردن آنتی‌بادی‌ها همراه با کاهش افینیتی آن‌ها نسبت به آنتی ژن هدف است، بنابراین با حفظ اسید امینه‌های مهم موشی با اعمال موتاسیون برگشتی می‌توان این مشکل را برطرف نمود. Remy Robert و همکارانش در انسانی کردن آنتی‌بادی WO-۲ اسیدهای امینه مهم موشی (واقع در مناطق Vernier) را در آنتی‌بادی نهایی طراحی شده حفظ کردند (۲۷و ۲٦، ۱۵). در بین قطعات کوچک آنتی‌بادی‌های نوترکیب، scFv بیشترین کاربرد را در مطالعات، درمان و تشخیص بیماری‌ها دارد. چنین مولکول‌هایی حرکت سریع در جریان خون داشته دارای قدرت نفوذ خوب در تومورهای هدف، ایمونوژنیسیتی کم، کاهش نگاهداری در کلیه و دیگر ارگان‌های غیر هدف، آسان بودن و هزینه کمتر ساخت با مقیاس زیاد هستند (۱). در مطالعه‌ی حاضر جهت‌گیری VH-linker-VL انتخاب و scFv بر اساس آن ساخته شد. طبق مطالعات جهت گیری ژن‌ها به صورت VH-linker-VL میزان بیان بهتری داشته، scFv دارای لینکر مذکور، اتصال بهتر و در صورت داشتن توکسین، توکسیتوسیتی بیشتری را در *E.coli* نشان می‌دهد. به‌منظور بیان ژن در سیستم بیانی *E.coli* حامل بیانی pET۲۲b مورد استفاده قرار گرفت. در سیستم pET پروموتور بسیار قوی و اختصاصی فاژ T ۷ توسط RNA پلیمراز *E.coli* رونویسی نمی‌شود. کیفیت بیان scFv، از مهم‌ترین موضوعات قابل بحث در زمینه‌ی آنتی‌بادی‌های تک زنجیره می‌باشد با توجه به اینکه scFv از انواع پروتئینی غیرگلیکوزیله و فاقد باندهای دی سولفیدی بوده و نیازی به اصلاحات بعد از ترجمه نظیر استیلاسیون، آسیلاسیون،

کربوکسیلاسیون) ندارد، در سیستم باکتریایی نظیر *E.coli* به خوبی قابل بیان است (۳۰-۲۸). آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای انسانی شده بر ضد CTLA٤ (CD١٥٢) توسط چن و همکارانش به‌وسیله‌ی سیستم بیانی باکتریایی تولید شد (۳۱). بنابراین با توجه به خصوصیات ژن مورد نظر و همچنین ویژگی‌های وکتور بیانی pET٢٢b، سلول بیانی *E.coli* سویه BL٢١ برای بیان پروتئین مناسب بود. بیان در سه ساعت بعد از القا توسط IPTG به حداکثر مقدار خود رسید. نتیجه‌ی بیان ژن آنتی‌بادی نوترکیب با واسطه حامل pET٢٢b و پپتید نشانه‌ی pelB تولید پروتئین محلول در پری پلاسم بود که خود را به‌صورت باندی در SDS-PAGE نشان داد. وجود نشانگر His-tag٦ در انتهای آنتی‌بادی هدف تخلیص آن با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی (Ni-NTA) را تسهیل نمود. نتاج Dot Blot نشان داد آنتی‌بادی نوترکیب انسانی شده دارای افینیتی مناسب نسبت به آنتی ژن CD٢٠ بیان شده در سطح سلول‌های Raji بوده، بنابراین میل ترکیبی خود را در مقایسه با آنتی‌بادی اولیه کایمریک حفظ نموده است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای انسانی شده در سیستم بیانی باکتری *E.coli* تولید شده، پس از خالص سازی قادر به شناسایی آنتی ژن CD٢٠ بیان شده در سطح سلول‌های Raji است. بنابراین این آنتی‌بادی نوترکیب به دلیل دارا بودن میل ترکیبی مناسب نسبت به آنتی ژن هدف و قدرت ایمنی‌زایی کم در انسان می‌تواند به عنوان روش درمانی برای هدف قرار دادن این مارکر در سرطان لنفوما به کار رود.

References

1- Pucca MB, Bertolini TB, Barbosa JE, Ribeiro SV, Porto GS. Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals . *Braz J Pha Sci*. 2011; 47: 31-38.

2- Liang Y, Buckley TR, Tu L, Langdon SD, Tedder TF. Structural organization of the human MS4A gene cluster on chromosome 11q12. *Immunogenetics*. 2001; 53: 357-368.

3- Jazirehi AR, Bonavida B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene*. 2005; 24: 2121-2143.

4- Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994; 15: 450-454.

5- Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest*. 2010; 120: 214-222.

6- Schirrmann T, Meyer T, Schutte M, Frenzel A, Hust M. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules*. 2011; 16: 412-426.

7- Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20: 450-459.

8- Shibasaki S, Ueda M. Therapeutic antibodies and other proteins obtained by molecular display technologies. *Recent Pat Biotechnol*. 2009; 3: 19-27.

9- Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods*. 2008; 329: 112-124.

10- Peterson NC. Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells, and immunoglobulins. *ILAR J*. 2005; 46: 314-319.

11- Meerten T, Hagenbeek A. CD20-targeted therapy: a breakthrough in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Neth J Med*. 2009; 67: 251-259.

12- Chiu WC, Lai YP, Chou MY. Humanization and characterization of an anti-human TNF-alpha murine monoclonal antibody. *Plos One*. 2011; 6: e16373.

13- Jayaram N, Bhowmick P, Martin AC. Germline VH/VL pairing in antibodies. *Protein Eng Des Sel*. 2012; 25: 523-529.

14- Parker AS, Zheng W, Griswold KE, Bailey-Kellogg C. Optimization algorithms for functional deimmunization of therapeutic proteins. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11:180.

15- Robert *R*, Streltsov VA, Newman J, Pearce LA, Wark KL, Dolezal O. Germline humanization of a murine Aβ antibody and crystal structure of the humanized recombinant Fab fragment. *Protein Sci*. 2010; 19: 299-308.

16- Gilmartin AA, Lamp B, Rumenapf T, Persson MA, Rey FA, Krey T. High-level secretion of recombinant monomeric murine and human single-chain Fv antibodies from Drosophila S2 cells. *Protein Eng Des Sel*. 2012; 25: 59-66.

17- Weisser NE, Hall JC. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol Adv*. 2009; 27: 502-20.

18- Abhinandan KR, Martin AC. Analysis and prediction of VH/VL packing in antibodies. *Protein Eng Des Sel*. 2010; 23: 689-697.

19- Asano R, Nakayama M, Kawaguchi H, Kubota T, Nakanishi T, Umetsu M, et al. Construction and humanization of a functional bispecific EGFR x CD16 diabody using a refolding system. *FEBS J*. 2012; 279: 223-233.

20- Foote J, Winter G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol*. 1992; 224: 487-499.

21- MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol*. 1996; 262: 732-745.

22- Martin ACR. Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. antibody engineering. *Antibody Engineering*. 2010; 8: 35-51.

23- de BB, Madera M, Chothia C. VH gene segments in the mouse and human genomes. *J Mol Biol*. 2004; 342: 131-143.

24- Hwang WY, Almagro JC, Buss TN, Tan P, Foote J. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods*. 2005; 36: 35-42.

25- Kim HY, Tsai S, Lo SC, Wear DJ, Izadjoo MJ. Production and characterization of chimeric monoclonal antibodies against Burkholderia pseudomallei and B. mallei using the DHFR expression system. *Plos One*. 2011; 6: 19867.

26- Makabe K, Nakanishi T, Tsumoto K, Tanaka Y, Kondo H, Umetsu M et al. Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody. *J Biol Chem.* 2008; 283: 1156-1166.

27- Wei-Gang Hu, Junfei Yin, Damon Chau, Laurel M, Negrych, John W. Humanization and characterization of an anti-ricin neutralization monoclonal antibody. *Plos One.* 2012; 7.

28- Buhler P, Wetterauer D, Gierschner D, Wetterauer U, Beile UE, Wolf P. Influence of structural variations on biological activity of anti-PSMA scFv and immunotoxins targeting prostate cancer. *Anticancer Res*. 2010; 30: 3373-3379.

29- Zhou N, Paemen L, Opdenakker G, Froyen G. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human gelatinase B-inhibitory single-chain immunoglobulin variable fragment (scFv). *FEBS Lett.* 1997; 414: 562-566.

30- Su YC, Lim KP, Nathan S. Bacterial expression of the scFv fragment of a recombinant antibody specific for Burkholderia pseudomallei exotoxin. *J Biochem Mol Biol*. 2003; 36: 493-498.

31- Chen LH, Huang Q, Wan L, et al. Expression, purification, and in vitro refolding of a humanized single-chain Fv antibody against human CTLA4 (CD152). *Protein Expr Purif.* 2006; 46: 95-502.

Generation of Humanized Single Chain anti-CD20Antibody Marker in *E.coli*

Ahmadzadeh V[1], Farajnia S[2], Hosseinpour Feizi MA[3], Khavarinejad RA[1]

[1]Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[2]Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

[3]Dept. of Biology, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Corresponding Author: Ahmadzadeh V, Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

E-mail: vahideh_ahmadzadeh@yahoo.com

Received: 19 May 2013 **Accepted:** 12 Aug 2013

Background and Objectives: Rituximab is an anti-CD20 chimeric monoclonal antibody widely used for the treatment of malignant B cells lymphoma. However, the immunogenicity of murine-derived monoclonal antibodies and the large size of full length antibodies restrict cancer immunotherapy. Humanized single chain antibodies can be a solution and a promising alternative for application in immunotherapy. The aim of this study was to produce a humanized scFv antibody for a potential use in the diagnosis and treatment of B cell lymphoma.

Materials and Methods: We used a CDR grafting based approach to design a humanized scFv gene fragment. The CDRs were grafted onto the closest human frameworks. The designed sequence was expressed in *E.coli* then purified. The level of expression was analyzed by SDS-PAGE and the reactivity to CD20 expressing cell line was explored by immunoblotting.

Results: Similarity analyses revealed that human germline gene IGHV1-46*03 and IGKV1-39*01 have the highest homology with their murine counterparts. Analysis by SDS-PAGE exhibited a high expression level in E. coli. Reactivity to CD20 expressing Raji cells showed that the produced antibody maintained the binding capacity to human CD20 marker.

Conclusion: In our study, humanized anti- CD20 scFv indicated an original antigen-binding affinity. The findings serve as a basis for the development of novel therapeutic strategies in the treatment of CD20- expressing cancers.

Keywords: Humanization, Single-chain antibody variable fragment, CD20