انتقال سازه بیانی حاوی ژن‌های کایمریک IgG1 و Fv1 به رده سلولی تخمدان هامستر در بیان اینفلیکسیماب در سیستم بطری‌های غلطان

زهره سرابی‌نژاد[1]
داود نوری اینانلو[2]
شهرام تیموریان[3*]

۱- گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران.
۲- گروه ژنتیک مولکولی، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیق و توسعه، تهران، ایران.
۳- گروه ژنتیک پزشکی و زیست‌شناسی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران تلفن: ۸۶۷۰۳۲۴۳-۰۲۱
E-mail: teimourian.sh@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹٤/۱۰/۰۱ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۲/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۲/۳۰

زمینه و هدف: اینفلیکسیماب (Infliximab) شکلی از آنتی‌بادی‌های نوترکیب کایمریک می‌باشد که هدف مناسبی برای مهار فاکتور نکروز توموری آلفا در بیماری‌های التهابی است. پژوهش کنونی با هدف ارزیابی بیان آنتی‌بادی منوکلونال اینفلیکسیماب در مقیاس نیمه‌صنعتی در سلول تخمدان هامستر چینی انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه با هدف تولید نیمه صنعتی، از بهمن ۱۳۹۳ تا مرداد ۱۳۹٤ در مرکز رشد دانشگاه تهران انجام گردید. وکتور حاوی ژن‌های اینفلیکسیماب، به باکتری *E.coli* انتقال و وجود ناقل پلاسمیدی حاوی ژن برروی ژل ۲٪ آگارز بررسی شد پلاسمید جداسازی و توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, Germany) به سلول تخمدان هامستر چینی ترانسفکت شد. سلول‌ها توسط G-418، دو هفته تیمار و سلول‌های ترانسفکت شده انتخاب شدند. میزان تولید اینفلیکسیماب در کلون‌های انتخابی پس از ٤٨ ساعت با کیت الایزا IgG، مورد سنجش قرار گرفت. کلون با بیان بالا کشت و محصول با ستون افینیتی پروتیین A خالص شد. جهت تایید خلوص، از روش Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) و برای تعیین راندمان تخلیص، از تست الایزا استفاده شد.

یافته‌ها: بررسی ژل آگارز، وکتور حاوی ژن را تایید نمود. ارزیابی غلظت اینفلیکسیماب پس از ترانسفکشن با استفاده از تست الایزا IgG در ٤۵۰ nm، بیشترین و کمترین میزان بیان را به‌ترتیب ۲۳ ng/ml و ٦ ng/ml نشان داد. در مرحله تخلیص با ستون افینیتی پروتیین A، پیک مربوط به اینفلیکسیماب، در بازه زمانی ۰/۷ الی ۰/۸ دقیقه مشاهده و راندمان تخلیص، ۷۰٪ محاسبه شد و وجود باندهای ۲۵ و ۵۰ کیلو دالتونی بر روی ژل پس از تخلیص حضور اینفلیکسیماب را تایید نمود.

نتیجه‌گیری: در پژوهش کنونی بیان اینفلیکسیماب در مقیاس نیمه‌صنعتی با استفاده از سیستم بطری غلطان با درصد بیان بالا و راندمان تخلیص حدود ۷۰٪ انجام شد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، آنتی‌بادی منوکلونال، اینفلیکسیماب، تخمدان هامستر چینی.

مقدمه

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) سایتوکین اصلی التهابی بوده و نقش مرکزی در دفاع میزبان، التهاب و عملکرد سیستم ایمنی دارد که با پاتوژنز، توسعه و پیشرفت انواع عفونت‌ها، بیماری‌های خودایمنی، بیماری‌های بدخیم و غیره ارتباط دارد.[1] مقادیر سرمی TNF-α برای هموستاز ایمنی مهم است، در حالی‌که تولید نامناسب آن در پاتوژنز انواع بیماری‌های التهابی مزمن مانند آرتریت روماتویید[2و3] مالتیپل اسکلروز (MS)، بیماری روده ملتهب، بیماری کرون و غیره نقش دارد.[4] خنثی کردن مقادیر اضافی TNF-α استراتژی درمانی موثر برای این بیماری‌ها به‌شمار می‌رود.[5]

اینفلیکسیماب (Infliximab) با نام تجاری رمی‌کید (Remicade)، یک آنتی‌بادی مونوکلونال کایمریک IgG1 بر ضد TNF می‌باشد که تمایل زیادی برای اتصال به TNF-α دارد و مانع اتصال این سایتوکین

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-15]

به گیرنده‌های خود می‌گردد (فاکتور نکروز کننده تومور، به‌وسیله مونوسیت‌ها و ماکروفاژها و T-cell تولید می‌گردد و یک سایتوکین مهم در مسیر پاتوژنز التهاب و نفوذ سلول‌های التهابی به ناحیه درگیر می‌باشد (که این عدم اتصال باعث کاهش التهاب می‌گردد. اینفلیکسیماب توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA))، برای درمان بیماری‌هایی چون آرتریت روماتویید متوسط تا شدید، بیماری کرون و کولیت اولسراتیو، اسپوندیلیت آنکلیوزان، آرتریت پسوریاتیک و پسوریازیس تایید شده است و در مواردی که به‌خصوص بیمار به درمان‌های متعارف پاسخ نمی‌دهد، تجویز می‌گردد.

پروتیین‌های دارویی یکی از گران‌ترین و مهمترین محصولاتی هستند که بشر توانسته است آنها را از راه‌هایی به‌جز روش طبیعی، سنتز و تولید کند.[۶] اولین گروه آنتی‌بادی‌های درمانی، پروتیین‌های موشی بودند که با تکنیک هیبریدومای موشی تولید شدند و در واقع آنتی‌بادی‌های نسل اول به‌شمار می‌رفتند.[۷] محدودیت اصلی در استفاده درمانی از این مولکول‌ها، ایمونوژنیسیتی آنها بود.[۸و۹] از این‌رو برای مرتفع کردن این مشکل، بحث آنتی‌بادی‌های کایمریک مطرح شد که آنتی‌بادی‌های نسل دوم محسوب می‌شوند. در این آنتی‌بادی‌ها بین قسمت متغیر (V) ژن آنتی‌بادی موشی و قسمت ثابت (C) ژن انسانی ارتباط ایجاد می‌شود.[۱۰] از روش‌های تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال نوترکیب می‌توان به Stirrer tank bio-reactors، Wave bio-reactor و Roller bottle system اشاره نمود. هدف از این مطالعه، تهیه و تولید آنتی‌بادی مونوکلونال از نوع کایمریک به‌نام اینفلیکسیماب، علیه پروتیین TNF-α انسانی، با استفاده از سیستم بطری غلطان (Roller bottle) در مقیاس نیمه‌صنعتی در رده سلولی تخمدان هامستر چینی می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه، یک پژوهش با هدف تولید نیمه‌صنعتی و حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد بوده که از بهمن ۱۳۹۳ تا مرداد ۱۳۹٤ در مرکز رشد واحدهای فناوری فرآورده‌های دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. کشت باکتری *E.coli* سویه DH5α در محیط Luria-Bertani (LB) Agar با روش متداول میکروبیولوژیکی تحت شرایط استریل انجام گرفت. تک کلنی‌های ایجاد شده در محیط LB Agar در محیط کشت Luria-Bertani (LB) broth تلقیح گردید. این محیط در مراحل مختلف کلونینگ و تهیه پلاسمید در مورد سلول‌های نوترکیب، واجد ژن کلون شده، مورد استفاده قرار گرفت. باکتری مورد استفاده در این طرح، باکتری *E.coli* سویه DH5α می‌باشد. جهت سلول‌های مستعد در این پژوهش از روش شیمیایی کلرید کلسیم براساس دستورکار استفاده شد.[۱۱] پس از تهیه سلول‌های مستعد براساس دستورکار، ترانسفورماسیون انجام شد. آنتی‌بیوتیک انتخابی کانامایسین بود.[۱۱]

بر اساس دستورکار ارایه شده توسط سازنده کیت (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)، تخلیص پلاسمید انجام شد. پس از خالص‌سازی، پلاسمید به ۲۰ °C- منتقل گردید. رده سلولی CHO از انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی تهیه و در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) همراه با ۱۰٪ FBS در فلاسک T25 کشت داده شد. پس از ۲٤ ساعت محیط کشت سلول تعویض شد. هر ٤۸ ساعت محیط قدیمی تعویض و سلول‌ها پاساژ داده شدند. پلاسمید تخلیص شده طی فرایند لیپوفکشن وارد سلول‌های CHO شد. به‌منظور ترانسفکشن سلول‌ها، از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, USA) استفاده شد. ابتدا شمارش سلولی توسط لام هموسایتومتر انجام گرفت، سپس براساس دستورکار شرکت سازنده، ترانسفکشن انجام شد (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, USA). ۷۲ ساعت پس از اولین تعویض محیط، ۱۰ µl آنتی‌بیوتیک G-418 اضافه شد (۷۲ ساعت زمانی است تا پروموتر راه‌اندازی شود). هر دو روز محیط تعویض و به آن آنتی‌بیوتیک G-418 اضافه گردید. این کار چهار تا پنج بار طی ۱٤ روز انجام گرفت. سلول‌هایی که زنده باقی ماندند سلول‌های ترانسفکت شده بودند.

ابتدا ۱۰ کلون را جدا نموده، پس از شمارش سلولی، از هر کلنی ۱۰۰۰۰ سلول به هر چاهک انتقال دادیم و به‌طور همزمان به هر خانه، محیط کشت DMEM همراه با سرم (Fetal bovine serum (FBS ۱۰٪ اضافه نمودیم و پس از ٤۸ ساعت، ۲۰-۱ µl از نمونه (سوپ سلولی مربوط به هر چاهک)، با مقدار نامعلوم آنتی‌بادی (IgG) روی فاز جامد (پلیت پلی‌استیرن) ریخته شد. پس از واکنش آنتی‌بادی‌های موجود در نمونه با آنتی- آنتی‌بادی کوت شده در کف پلیت‌های کیت، آنتی- آنتی‌بادی دیگری که با آنزیمی تحت عنوان Horseradish peroxidase (HRP) کونژوگه شده اضافه گردید، در نتیجه آنتی‌بادی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-15]

اختصاصی، در بین دو آنتی‌ژن ساندویچ می‌گردد. سپس سوبسترای کروموژنیک به‌نام tetramethylbenzidine - '3.3'.5.5 (TMB) اضافه شد و در انتها فعالیت آنزیم باند شده تعیین گردید. در انتها غلظت نمونه‌ها پس از تعیین Optical density (OD) آنها در ٤٥٠ nm با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. کلون دارای بیشترین میزان بیان آنتی‌بادی منوکلونال در محیط DMEM همراه با سرم ۱۰٪ کشت داده شد. سپس با ترپیسین ۱٪، سلول‌ها جداسازی و به فلاسک ۲۵ انتقال داده شد.

پس از ٢٤ ساعت محیط کشت سلول را تعویض و پس از رسیدن تراکم سلول به‌میزان ۹۰٪، سلول‌ها را به فلاسک ۷۵ پاساژ داده شدند. سپس سلول‌ها به سیستم Roller bottle انتقال و در محیط کشت تکثیری حاوی محیط DMEM با ۱۰٪ سرم کشت داده شدند. پس از ٤٨ ساعت و تکثیر سلول‌ها، محیط کشت بیانی حاوی محیط DMEM بدون سرم، ۱٪ انسولین اضافه گردید. در انتها سوپرناتانت (محیط کشت حاوی منوکلونال آنتی‌بادی بیان شده) پس از ٤٨ ساعت جمع‌آوری و برای مراحل بعدی در دمای ٤ °C نگهداری گردید. ابتدا سوپ سلولی که حاوی اینفلیکسیماب مترشحه از سلول است را جمع‌آوری کرده و به نسبت ۱:۲ با بافر متعادل‌سازی ستون مخلوط نمودیم و با استفاده از فیلتر سرسرنگی آن را فیلتر نمودیم. مراحل تخلیص طی دستورکار تخلیص اینفلیکسیماب انجام شد.[۱۲] پس از تخلیص، نمونه‌های مناسب جمع‌آوری و با استفاده از تکنیک الکتروفورز بروی ژل ۱۰٪ پلی‌آکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو، میزان خلوص اینفلیکسیماب، براساس دستورکار مورد ارزیابی قرار گرفت.[۱۳] به‌منظور بررسی میزان راندمان مرحله خالص‌سازی، نمونه‌های حاصل از کشت سلول، پیش و پس از وارد شدن به ستون کروماتوگرافی با استفاده از کیت الایزا IgG (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, USA) مورد سنجش قرار گرفت و در انتها راندمان تخلیص محاسبه شد.

یافته‌ها

توالی زنجیره‌های سنگین و سبک اینفلیکسیماب در جدول ۱ آورده شده است. VL اشاره به ژن ناحیه متغیر زنجیره سبک و VH اشاره به ژن ناحیه متغیر زنجیره سنگین، J بخش اتصالی بین ناحیه متغیر و ثابت زنجیره‌ها می‌باشد.

ناقل مورد استفاده در این طرح pVITRO2-neo-mcs بوده که از جمله ناقل‌های رایج برای سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد. مشخصات ناقل مورد استفاده همراه با جزییات دقیق آن در شکل ۱ نشان داده شده است.

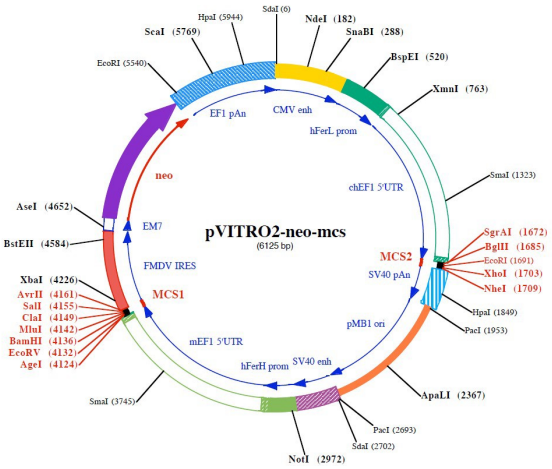
پس از ترانسفورماسیون، با توجه به اینکه محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به‌عنوان محیط انتخابی جهت جداسازی باکتری‌هایی که ناقل هدف را دریافت کرده‌اند بود، در نتیجه فقط باکتری‌های حاوی ناقل در محیط LB آگار شروع به رشد کرده و تشکیل کلونی دادند. خالص‌سازی پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (Roche, USA) انجام گرفت. الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز ۲٪ انجام شد. نتایج الکتروفورز، خلوص پلاسمید حامل را نشان داد (شکل ۲).

۱۰ کلون پایدار تحت G-418/Ml 800µg، برای آنالیز میزان بیان انتخاب شدند. تعداد ۱۰٤ سلول در هر چاهک (شمارش سلولی با استفاده از لام هموسایتومتر انجام گرفت) در محیط کشت حاوی DMEM

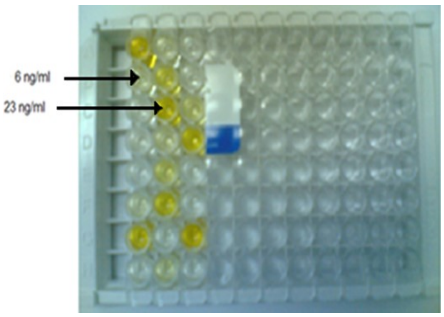
جدول ۱: توالی آمینو اسیدی زنجیره‌های سنگین و سبک اینفلیکسیماب

Chain	Sequence
Light chain (VL)	Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Thr Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys
Heavy chain (VH)	Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn His Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-15]

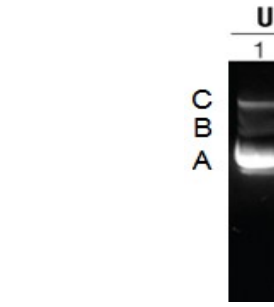


شکل ۱: ناقل پلاسمیدی دابل اکسپرشن pVITRO2-neo-mcs



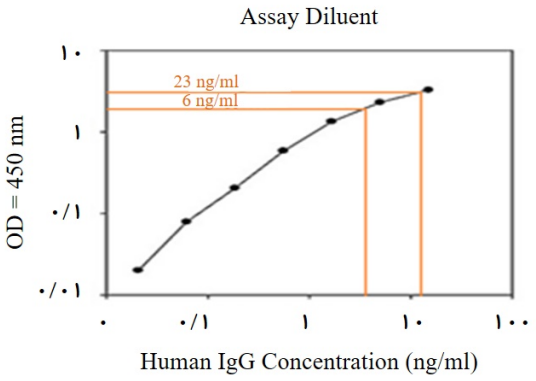
شکل ۳: ۱۰ چاهک ترانسفکت پایدار تحت G-418 انتخابی

از هر کلنی تعداد مساوی از سلول‌ها، جهت آنالیز مناسب‌ترین میزان بیان، با استفاده از تست الایزا IgG انتخاب شده‌اند.



شکل ۲: الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده

هر دو ردیف ۱ و ۲ مربوط به پلاسمید به‌صورت برش نخورده می‌باشد. باند A مربوط به پلاسمید Supercoiled، باند B مربوط به پلاسمید Relax و باند C مربوط به پلاسمید linear می‌باشد. پلاسمید مورد نظر دارای وزن مولکولی ۶۱۲۵ bp می‌باشد.

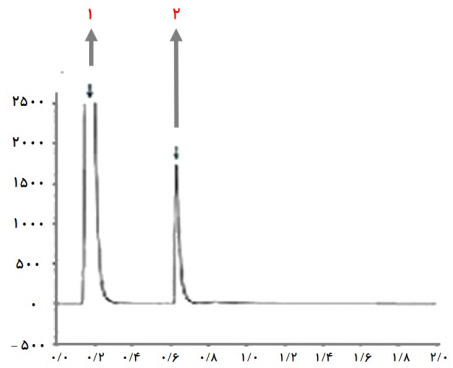


شکل ٤: میزان جذب با توجه به نمونه پروتیینی در طول موج ٤٥٠ nm تعیین و بیشترین و کمترین میزان بیان براساس منحنی استاندارد به‌ترتیب ۲۳ ng/ml و ٦ ng/ml محاسبه گردید.

همراه با سرم FBS ۱۰٪ کشت داده شد، که پس از ٤٨ ساعت، در معرض تست الایزا مورد سنجش و اندازه‌گیری قرار گرفت (شکل ۳). با توجه به منحنی استاندارد، غلظت خانه‌ها بررسی شد. بیشترین غلظت با توجه به منحنی استاندارد ۲۳ ng/ml و کمترین غلظت ٦ ng/ml بود (شکل ٤). بهترین عملکرد تولید آنتی‌بادی کلنی پس از چهل و هشت ساعت، ۱ pg/cell بود.

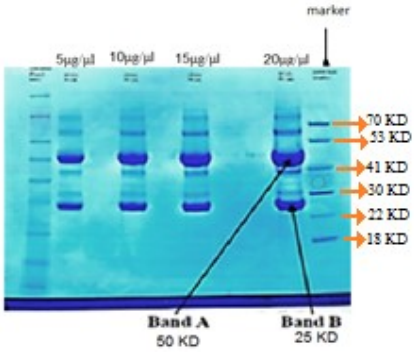
مراحل تخلیص طی دستورکار تخلیص اینفلیکسیماب انجام گرفت. پس از مرحله شستشو با استفاده از بافر شستشو با سرعت ۵ ml/min، تمامی موارد اضافی و غیراتصالی به ستون، خارج شد. پیک مشاهده شده پیش از پیک دوم موید این مطلب است. پس از مرحله شستشو، بافر خارج‌سازی اضافه شد. پس از مدت زمان مشخص، به‌تدریج پیک مربوط به اینفلیکسیماب در فاصله زمانی ۰/۸–۰/۷ دقیقه مشاهده گردید (شکل ۵). نمونه‌های حاصل از کشت کلون بیان‌کننده اینفلیکسیماب (سوپ سلولی) پس از خالص‌سازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی افینیتی پروتیین A، برای بررسی راندمان تخلیص، با استفاده از کیت الایزا IgG مورد سنجش قرار گرفت. سپس با استفاده از دستگاه خوانشگر،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-15]



شکل ۵: تخلیص Infliximab بر روی ستون پروتیین A

پیک شماره ۱ مربوط به مرحله Washing (ناخالصی‌های موجود در ستون) و پیک شماره ۲ مربوط به مرحله Elution نمونه اصلی که در زمان ۰/۷ الی ۰/۸ دقیقه مشاهده شده است.



شکل ٦: نتایج SDS-PAGE بر روی ژل آکریل آمید ۱۰٪ با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو باند A با وزن ۵۰ kDa مربوط به زنجیره سنگین (Heavy chain) و باند B با وزن ۲۵ kDa مربوط به زنجیره سبک (Light chain) اینفلیکسیماب می‌باشد. ردیف ۱ نمونه با غلظت ۵ µg/µl، ردیف ۲ نمونه با غلظت ۱۰ µg/µl، ردیف ۳ نمونه با غلظت ۱۵ µg/µl و ردیف ٤ نمونه با غلظت ۲۰ µg/µl می‌باشد.

میزان غلظت پروتیین پیش و پس از مرحله خالص‌سازی اندازه‌گیری شد. پس از محاسبات انجام‌شده با توجه به غلظت ورودی (۲۳۰ µg) و خروجی (۱٦۱ µg) اینفلیکسیماب به ستون، راندمان تخلیص حدود ۷۰٪ تخمین زده شد. جهت تایید حضور اینفلیکسیماب از SDS-PAGE استفاده شد. همان‌طور که در شکل ٦ مشاهده می‌شود، باندهای مربوط به زنجیره سبک (۲۵ kDa) و زنجیره سنگین (۵۰ kDa) در حالت آزاد و بدون اتصال از طریق پیوندهای دی‌سولفیدی، نشان‌دهنده بیان آنتی‌بادی منوکلونال اینفلیکسیماب توسط سلول CHO بود.

بحث

یکی از مناسب‌ترین راهکارهای مقابله با آثار زیانبار TNF-α استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال اینفلیکسیماب است و تاثیر درمان آن علیه TNF-α در معالجه آرتریت روماتویید اثبات شده است.[۱٤] تاکنون چند عدد از بلاک‌کننده‌های TNF-α توسط موسسه غذا و داروی آمریکا برای معالجه انواع مختلفی از بیماری‌ها تایید شده است. از جمله می‌توان به آدالیموماب، اینفلیکسیماب، اتانرسپت (در سال ۲۰۰۸ برای بیماری کرون و در سال ۲۰۰۹ برای آرتریت روماتویید) سرتولیزوماب و گولیموماب (در سال ۲۰۰۹ برای آرتریت روماتویید، آرتریت پسوریایی و اسپوندیلیت انکیلوزان) اشاره کرد.[۱۵و۱٦] با توجه به پژوهش‌های انجام شده، در این میان اینفلیکسیماب در مقایسه با سایر آنتی‌بادی‌های ضد TNF-α، قوی‌ترین و شاید بهترین آنها محسوب می‌گردد.[۱۷]

پژوهش کنونی در جهت تولید آنتی‌بادی منوکلونال کایمریک (آنتی‌بادی نیمه‌انسانی- موشی) انجام گردید چرا که باتوجه به یافته‌های سایر مطالعات، مشکل اساسی برای کاربرد درمانی آنتی‌بادی‌های منوکلونال حیوانی (آنتی‌بادی‌های نسل اول) آن است که به‌جای آنتی‌بادی انسانی، آنتی‌بادی موشی ایجاد می‌شود که با وجود تشابه ساختاری، اختلافات بین این دو، برای ایجاد یک پاسخ ایمونولوژیک، پس از تزریق این آنتی‌بادی به بدن انسان کافی خواهد بود که در نهایت سبب حذف سریع آنها از خون به‌علت فعالیت سیستم التهابی و تولید آنتی‌بادی ضد موش انسانی می‌گردد.[۱۸] در تلاشی برای رفع این مانع، روش‌هایی برای استفاده از DNA نوترکیب، به‌کار گرفته شد. یکی از این روش‌ها، DNA ترکیبی حاصل از ترکیب ژن موشی و ژن انسانی است. بیان این DNA کایمریک از طریق کشت سلول، آنتی‌بادی‌هایی نیمه‌انسانی- موشی ایجاد می‌کند. بنابراین برای به حداقل رساندن ایمونوژنیسیتی بیان‌شده، بحث انسانی کردن آنتی‌بادی‌ها، کاربردی‌تر خواهد بود (آنتی‌بادی‌های نسل سوم).[۱۹]

در رابطه با نوع سیستم بیانی به‌کار رفته، در پژوهش کنونی از سیستم بیانی سلول‌های پستانداران و سلول‌های هامستر چینی به‌عنوان سیستم بیانی یوکاریوتی، استفاده شد. با توجه به یافته‌های سایر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-15]

مطالعات[٢٠] چندین سیستم بیانی برای تولید آنتی‌بادی و قطعات آن، شامل باکتری، مخمر، گیاهان، سلول‌های حشره و سلول‌های پستانداران در دسترس می‌باشد که هر کدام مزایا، کاربردهای بالقوه و محدودیت‌های خاص خود را دارند باکتری‌ها نمی‌توانند آنتی‌بادی گلیکوزیله کامل را بیان کنند، زیرا فاقد سیستم اصلاحات پس از ترجمه هستند. البته تولید آنتی‌بادی‌های غیرگلیکوزیله در باکتری‌ها با آلودگی با لیپوپلی‌ساکاریدهای باکتری همراه است که بازده تولید آنتی‌بادی‌های فعال را در خلال فرآیند خالص‌سازی کاهش می‌دهد.[٢١] در مطالعه کنونی با توجه به مطالعات انجام گرفته، سلول تخمدان همستر چینی، مناسب‌ترین سلول می‌باشد. مهمترین دلیل استفاده از این سیستم، آن است که سیستم‌های بیانی سلول‌های پستانداران برای بیان آنتی‌بادی‌های کامل، قطعات بزرگتر و پروتیین‌های چندزنجیره‌ای مناسب می‌باشند.[٢١] در این مطالعه بیان اینفلیکسیماب در مقیاس نیـمه‌صنعتی با انتـقال وکتور پلاسمیدی حاوی ژن اینفلیکسیماب به سلول‌های تخمدان هامستر چینی به‌عنوان سیستم بیانی یوکاریوتی و کشت در سیستم بطری غلطان با درصد بالا و راندمان تخلیص حدود ٧٠٪ انجام شد. به‌منظور جلوگیری از پاسخ‌های ایمونولوژیک که در آنتی‌بادی‌های غیر انسانی دیده می‌شود، از روش آنتی‌بادی کایمریک استفاده شد که مانع از حذف سریع پروتیین از جریان خون می‌شود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی تحت عنوان "انتقال سازه بیانی حاوی ژن‌های کایمریک IgG1 و Fv1 به رده سلولی تخمدان هامستر چینی به‌منظور بررسی بیان اینفلیکسیماب در سیستم بطری‌های غلطان" در مقطع کارشناسی ارشد از بهمن ١٣٩٣ تا مرداد ١٣٩٤ می‌باشد که در مرکز رشد فناوری فرآورده‌های دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید. از حمایت‌های مادی و معنوی این مرکز قدردانی می‌گردد.

References

1. Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* 2005;23:787-819.
2. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214(2):149-60.
3. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001;19:163-96.
4. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(7):1215-28.
5. Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(9):736-46.
6. Wolf R, Matz H, Orion E, Ruocco V. Anti-TNF therapies--the hope of tomorrow. *Clin Dermatol* 2002;20(5):522-30.
7. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495-7.
8. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC Jr. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* 1985;45(2):879-85.
9. Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, Dillman RO. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol* 1985;135(2):1530-5.
10. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(21):6851-5.
11. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 116-8.
12. Fahrner RL, Knudsen HL, Basey CD, Galan W, Feuerhelm D, Vanderlaan M, et al. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2001;18:301-27.
13. Mostafaei A. Protein Gel Electrophoresis, Theoretical and Practical Approach. 3rd ed. Tehran: Tazkieh Publishing Co.; 2005. p. 1-10. [Persian]
14. Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;10(5):301-16.
15. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1993;36(12):1681-90.
16. Dommasch E, Gelfand JM. Is there truly a risk of lymphoma from biologic therapies? *Dermatol Ther* 2009;22(5):418-30.
17. Smolen JS, Weinblatt ME. When patients with rheumatoid arthritis fail tumour necrosis factor inhibitors: what is the next step? *Ann Rheum Dis* 2008;67(11):1497-8.
18. Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today* 2000;21(8):364-70.
19. Kriangkum J, Xu B, Nagata LP, Fulton RE, Suresh MR. Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. *Biomol Eng* 2001;18(2):31-40.
20. Schillberg S, Fischer R, Emans N. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(3):433-45.
21. Wu AM, Yazaki PJ. Designer genes: recombinant antibody fragments for biological imaging. *Q J Nucl Med* 2000;44(3):268-83.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-15]

TUMJ Tehran University Medical Journal, April 2016; Vol. 74, No. 1: 9-15 Original Article

Transfection of an expressive construct including IgG1 and Fv1 genes in ovary cell line for infliximab expression

Zohreh Sarabinejad M.Sc.[1]
Davoud Nouri Inanlou Ph.D.[2]
Shahram Teimourian Ph.D.[3*]

1- Islamic Azad University of Damghan Branch, Damghan, Iran.
2- Department of Research and Development, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3- Department of Medical Genetics, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Hemmat Highway, Iran University, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 86703243
E-mail: teimourian.sh@iums.ac.ir

Abstract

Received: 22 Dec. 2015 Revised: 01 May 2016 Accepted: 18 May 2016 Available online: 19 May 2016

Background: Infeliximab is a form of chimeric antibody which neutralizes the most important inflammatory cytokine, TNF-α, in inflammatory disorders. The aim of current study was to pilot expression of chimeric infliximab in Chinese Hamster ovary (CHO) cells.

Methods: In this research study, pVITRO2-neo-mcs vector that consist of infliximab light chain and heavy chain was used to transform into the *E.coli* by $CaCl_2$ method. The plasmid was then purified and transfected to cultured CHO cells by Lipofectamine 2000® (Invitrogen GmbH, Germany). Transfected cells were selected upon G-418 treatment after 2 weeks and the level of expression, based on standard curve, was measured using IgG ELISA kit after 48 hours for each clone. High level expressed clone was then cultured in roller bottles and recombinant chimeric product was purified by protein A affinity chromatography. The purity of the product was analyzed by 10% gel SDS-PAGE from eluted samples. The efficacy of the purification was analyzed by ELISA before and after purification step. This article is a master's student thesis from February 2015 to August 2016 in pharmaceutical technology development center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Results: The purified plasmid was analyzed on 2% agarose gel. After selective pressure of G-418, 10 stable transfect clones were assessed for infliximab secretion by IgG ELISA kit at 450 nm. The maximum and minimum expression which detected by ELISA were 23 ng/ml and 6 ng/ml, respectively. The band width of infliximab fraction during purification procedure was observed at 0.7-0.8 min. The efficiency of the purification by ELISA was 70%. On SDS-PAGE analysis, two bands, 25 and 50 kDa, respect to light and heavy chains of Infliximab, was confirmed the expression of recombinant protein.

Conclusion: In the current study, the construct for infliximab monoclonal antibody production was designed using genetic engineering techniques and the expression was confirmed by conventional molecular biology methods. The high yield production was carried out in semi-industrial scale using roller bottles with a 70 percentage of purification efficiency.

Keywords: Chinese hamster ovary, gene expression, infliximab, monoclonal antibody.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-15]