مقاله پژوهشی

طراحی و ساخت سازه ژنی ایمونوتوکسین ضد EGFRVIII متصل به اگزوتوکسین A سودوموناس ائروژنوزا برای سرطان گلیوبلاستوما

نویسندگان:

مریم ایرانی[1]، محمدرضا ذوالفقاری[2]*، صفر فرج نیا[3]*، راضیه نظری[4]، لیلا رهبرنیا[5]

۱- دانشجوی دکترای میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۲- دانشیار میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۳- استاد بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴- استادیار میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۵- استادیار زیست فناوری پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.1, Spring 2023

چکیده:

مقدمه: سرطان از رایج‌ترین علل مرگ و میر انسانی در جوامع امروزی است که تلاش‌های بسیار گسترده‌ای برای مقابله با آن در حال انجام است. ایمونوتوکسین‌های مبتنی بر Anti-EGFRVIII می‌توانند با هدایت بخش‌های توکسینی به سلول‌های سرطانی که بیان بیش از حد گیرنده EGFRVIII دارند، منجر به مرگ سلولی آن‌ها شوند. هدف مطالعه حاضر توسعه یک ایمونوتوکسین انسانی جدید ضد EGFRVIII (huscFv-PE38 EGFRVIII) با ادغام ژنتیکی آنتی بادی تک زنجیره ای ضد EGFRVIII انسانی با اگزوتوکسین A کوتاه شده سودوموناس آئروژینوزا (PE) (PE38KDEL) است.

روش کار: قطعه PE-38 اگزوتوکسین A با استفاده از PCR تکثیر و به huscFv PET22b-Anti- EGFRVIII متصل شد. واکنش با روش PCR و هضم آنزیمی تایید شد. ایمونوتوکسین حاصل در E. coli BL21 (plys S) بیان و سپس توسط ستون کروماتوگرافی Ni-NTA تخلیص شد. پس از آن، واکنش ایمونوتوکسین تخلیص شده با روش‌های الایزا و MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: آزمایش‌های PCR و هضم آنزیمی، صحت و یک پارچگی ساختار ایمونوتوکسین طراحی شده را تأیید کردند. تخلیص ایمونوتوکسین بیان شده توسط ستون کروماتوگرافی نیکل منجر به ساخت یک ایمونوتوکسین نوترکیب بسیار خالص با وزن مولکولی ۶۳ کیلو دالتون در ژل SDS-PAGE شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ایمونوتوکسین طراحی شده می‌تواند به عنوان یک انتخاب امیدوارکننده برای مهار سلول‌های سرطانی EGFRVIIIمثبت در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: درمان هدفمند سرطان، EGFRVIII ، huscFv-PE38، ایمونوتوکسین، اگزوتوکسین A سودوموناس

Pars J Med Sci 2023;21(1):62-72

مقدمه:

سرطان به مجموعه ای از بیماری‌ها اطلاق می شود که از تکثیر مهار نشده سلول‌ها پدید می‌آیند [۱]. نزدیک به ۱۹/۳ میلیون مورد سرطان جدید (۱۸/۱ میلیون به استثنای سرطان پوست غیرملانومایی) و بیش از ۱۰ میلیون مرگ ناشی از سرطان (۹/۹ میلیون بدون سرطان پوست غیرملانومایی) در سال ۲۰۲۰ در سراسر جهان رخ داده است [۲].

پنج روش درمانی اصلی برای سرطان عبارتند از جراحی، شیمی درمانی، هورمون درمانی، پرتو درمانی و ایمنی درمانی یا درمان بیولوژیکی. راهبردهای جدید برای درمان سرطان، موسوم به درمان هدفمند، مبتنی بر طراحی داروهایی است که سلول‌های سرطانی را به طور خاص با حداقل اثرات نامطلوب روی بافت‌های طبیعی هدف قرار دهند. توسعه این نوع درمان نیازمند شناسایی تغییرات ژنتیکی است که رشد سلول های سرطانی را تحریک

* نویسنده مسئول، نشانی: – دکتر محمدرضا ذوالفقاری، دانشیار میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.
– دکتر صفر فرج نیا، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
پست الکترونیک:mreza.zolfaghary@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۶ اصلاح: ۱۴۰۲/۱/۲۲ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۱

می‌کند. هدف بالقوه برای این درمان می تواند نوعی پروتئین یا گیرنده اختصاصی باشد که در اثر جهش ایجاد شده است. عامل رشد اپیدرمی هدف ایده آلی برای درمان سرطان به روش درمان هدفمند است [۳، ۴].

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal Growth – EGFR Factor Receptor) به عنوان یک عضو از خانواده گیرنده‌های تیروزین کیناز اولین گیرنده مرتبط با سرطان در انسان است [۵]. مسیر سیگنالینگ این گیرنده اغلب به طور اختصاصی به پیشرفت سرطان‌زایی سرطان‌های اپیتلیال انسان کمک می‌کند [۶]. تغییرات بیان گیرنده، شامل افزایش بیان ژن و جهش های فعال کننده ژن است. EGFR دارای یک دامین خارج سلولی (ECD) به طول ۶۲۱ اسیدآمینه، یک دامین غشایی گذرنده از غشا (TM) به طول ۲۳ آمینواسید و یک دامین درون‌سلولی فعال آنزیمی (ICD) به طول ۵۴۲ آمینواسید است. اتصال به لیگاند منجر به تشکیل دایمر در گیرنده و فعال شدن دومین کینازی می‌شود. این امر سیگنال‌دهی از طریق یکی از چندین مسیر که باعث رشد، بقا و گسترش سلول‌های پستانداران می‌شود را ایجاد می‌کند. جهش‌های فعال کننده می‌تواند در دامین خارج یا داخل سلولی رخ دهد [۷، ۸].

EGFRVIII یک آنتی‌ژن اختصاصی تومور است که در بافت‌های طبیعی دیده نمی‌شود و این امکان را ایجاد می‌کند که بدون آسیب رساندن به بافت‌های طبیعی، بافت‌های سرطانی را هدف قرار داد [۹]. تاکنون چندین آنتی‌بادی موشی علیه EGFRVIII ایجاد شده است. آنتی‌بادی‌های موشی اغلب ویژگی مطلوبی نداشته و از آن جایی که منشاء غیر انسانی دارند، ممکن است باعث القا تولید آنتی‌بادی شوند [۱۰]. برای غلبه بر این مشکل، فرایند انسانی‌سازی آنتی‌بادی‌ها پیشنهاد شده است که در آن ایمنی‌زایی آنتی‌بادی‌های غیرانسانی با جایگزینی آمینواسیدهای غیر ضروری آنتی‌بادی موشی با توالی انسانی کم می‌شود [۱۱، ۱۲]. همچنین مشاهده شده است که کارآیی آنتی‌بادی‌های ضد EGFR تحت تأثیر جهش‌های مختلف ژن‌های EGFR و K-ras قرار می‌گیرد. این محدودیت را می‌توان با ایمونوتوکسین‌هایی (IT) که سمیت را مستقیماً به سلول‌های هدف وارد می‌کنند، برطرف کرد [۱۳]. ایمونوتوکسین‌ها، فیوژن پروتئین‌هایی هستند که از دو قطعه عملکردی شامل قطعه هدفمند کننده که می‌تواند یک آنتی‌بادی کامل یا قطعه‌ای از آنتی‌بادی و یا یک لیگاند باشد و قطعه دوم که معمولاً یک توکسین با منشا باکتریایی و یا گیاهی است. در نسل‌های جدید ایمونوتوکسین از برخی آنزیم‌ها با منشاء انسانی همچون گرانزیم ها و RNases که خاصیت ایجاد اختلال در سلول و القا مرگ سلولی را دارند به عنوان قطعه سلول کش استفاده شده است [۱۴]. ایمونوتوکسین‌ها چندین مزیت منحصر به فرد در مقایسه با روش‌های شیمی درمانی مرسوم دارند. اختصاصیت بسیار بالا، توانایی سلول‌کشی فوق‌العاده و نداشتن مقاومت دارویی از جمله این مزیت‌ها است. تاکنون بیش از ۱۰۰۰ ایمونوتوکسین نوترکیب بر علیه سرطان ساخته شده است. با این وجود، بیشتر موفقیت‌ها در ایمونوتوکسین تراپی علیه بدخیمی‌های خونی حاصل شده است [۱۵، ۱۶].

اگزوتوکسین‌های باکتریایی مشتق شده از Pseudomonas aeroginosa (PE) و Corynebacterium diphteriae دو سم رایج مورد استفاده در ایمونوتوکسین‌ها در آزمایش های بالینی هستند. در ایمونوتوکسین‌ها، یک آنتی‌بادی جایگزین دامین اتصال توکسین به سلول می‌شود و در نتیجه آن ها فقط به سلول‌هایی متصل می‌شوند که اهداف گروه آنتی‌بادی را نشان می‌دهند [۱۷، ۱۸].

برای دست‌یابی به یک ایمونوتوکسین با حداقل ایمونوژنیسیته باید دو کار همزمان انجام شود. اولین کار، به حداقل رساندن ایمونوژنیسیته جزء آنتی بادی بدون کاهش افینیتی آن می‌باشد که این کار با انسانی‌سازی قابل حصول است و دومین کار، کم کردن ایمنی زایی جزء توکسین از ایمونوتوکسین است [۱۹، ۲۰]. در سال ۲۰۱۳ ویدیالاکشمی و همکاران و بعد از آن در سال ۲۰۱۶ ایکیوهو و همکاران ایمونوتوکسین D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL را تهیه و اثر سیتوتوکسیت آن روی EGFRwt و EGFRVIII تومورهای مغزی بررسی کردند. یافت ها نشان داد که ایمونوتوکسین تهیه شده دارای فعالیت ضد توموری به دلیل تاثیر روی EGFRwt و EGFRVIII است. این ایمونوتوکسین به طور کاملاً موثری در شرایط in vitro و in vivo (مدل های ارتوتوپیک سلول‌های گزانوگرافت گلایوبلاستما که EGFRwt، EGFRVIII و یا هر دو تولید می‌شوند) دارای فعالیت سیتوتوکسیک بود [۲۱، ۲۲].

در سال ۲۰۱۴ لانگاری و همکاران کلونینگ، بیان و ارزیابی فعالیت اگزوتوکسین A نوترکیب سودوموناس آئروژینوزا را انجام دادند. آن‌ها فرم کوتاه شده توکسین را در وکتور تکثیر و کلون کردند. وکتور نوترکیب به داخل سلول‌های اشیریشیاکلی منتقل و بعد از بیان و تخلیص توکسین، ارزیابی عملکرد آن در سلول‌های یوکاریوتی HUVEC و 293KDR انجام شد. یافته‌ها حاکی از سمیت بیشتر توکسین تخلیص شده از طریق آزمون MTT بود [۲۳].

در سال ۲۰۱۶ فاراجنیا و همکاران آنتی بادی تک زنجیره‌ای ضد EGFRمتصل به اگزو توکسین PE-40 را تهیه و اثر آن روی سلول‌های سرطانی بیان کننده EGFR ارزیابی کردند. برای این منظور ژن مربوط به ScFv انسانی شده ضد EGFR به روش PCR تکثیر و در وکتور بیانی کلون شد. سپس ژن PE-40 به

روش PCR تکثیر و پایین دست ژن ScFv کلون شد و در باکتری E. coli ترانسفرم شده و بیان پروتئین با افزودن القا کننده، القا شد. آن ها پروتئین نوترکیب تخلیص شده و اثر سمیت آن روی سلول‌های تومرال A431 که میزان بیان بالایی از EGFR را دارد بررسی کردند. یافته‌ها نشان دهنده اثر سیتوتوکسیک ایمونوتوکسین تهیه شده بود [۲۴].

هدف مطالعه حاضر طراحی و ساخت سازه ژنی بیان کننده ایمونوتوکسین ضد EGFRVIII و اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا بود.

روش کار:

سویه‌های باکتریایی، پلاسمیدها، کشت

Pseudomonas aeruginosa از DSMZ آلمان و وکتور بیانی E. coli BL21 (plys S) و pET-22b از نواژن آمریکا خریداری شد. محیط تغذیه‌ای آگار و Luria-Bertani (LB) به ترتیب از مرک و Quelab تهیه شد.

تکثیر قطعه ExoA-PE38 با PCR

Pseudomonas aeruginosa در محیط تغذیه ای آگار (۱۵ گرم آگار، ۵ گرم پپتون و ۳ گرم عصاره گوشت با PH نزدیک به ۷/۳) به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. کل DNA ژنومی P. aeruginosa با کیت استخراج DNA (Gene All، کره) استخراج شد. قطعه PE38 با استفاده از مجموعه پرایمرهای Forward ACTAAGCTTGCTTCTGGTGGTCCG و Reverse ACCCTCGAGTTACAGTTCGTCT TTCGGCGGCTTACCCGGCTG حاوی سایتهای آنزیمی برای آنزیم‌های محدودکننده HindIII و XhoI، در انتهای ۵ پرایم پرایمرها تکثیر شدند تا در حین PCR، توالی‌های آنزیم محدودکننده به قطعه PE38 اضافه شود. از کیت Phusion® Master Mix با GC Buffer (آزمایشگاه بیو، نیوانگلند) برای PCR این قطعه استفاده شد.

برنامه چرخه حرارتی برای این واکنش PCR شامل دناتوراسیون در ۹۸ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل ۹۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

کلونینگ HuscFv-PE38

وکتور نوترکیب PET22b-huscFv قبلاً در آزمایشگاه تهیه شده بود [۲۰]. وکتور PET22b-huscFv با Hind III و XhoI هضم و سپس به محصول PE38 حاصل از PCR ای که قبلاً با همین آنزیم‌ها هضم شده لیگیت شد. سپس محصول لیگاسیون huscFv-PE38 نوترکیب به سلول‌های مستعد E. coli DH5α انتقال داده شد. در نهایت، کلونی‌های ظهور یافته روی پلیت، با PCR، آنزیم محدود کننده و سکانسینگ شناسایی و تایید شدند.

بیان ایمونوتوکسین نوترکیب HuscFv-PE38 در E. coli برای بیان huscFv-PE38 ، پلاسمید PET22b (+) نوترکیب به سویه E. coli BL21 (plys S) انتقال داده شد. کشت ۲۰۰ میلی لیتری باکتری حاوی PET22b (+) نوترکیب در محیط LB حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر آمپی سیلین در ۳۷ درجه سانتی گراد تهیه شد. هنگامی که OD کشت سلولی به ۰/۷ رسید، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار اضافه و کشت به مدت چهار ساعت دیگر انکوبه شد. رسوب سلولی به کمک دستگاه سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری و ۲۰۰ میلی گرم از وزن مرطوب سلول‌ها در ۳ میلی لیتر بافر لیز مجدداً معلق شد (۱۰۰ میلی مولار NaCl، ۵۰ میلی مولار NaH2 PO4، ۱ میلی مولار PMSF ، pH 8.0). سلول باکتریایی که به حالت تعلیق درآمده و ۳۰ چرخه سونیکاسیون (سونیکاسیون به مدت۳۰ ثانیه با فواصل استراحتی۳۰ ثانیه) روی یخ انجام شد. لیزات سلولی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی و رسوب حاصل از نظر حضور huscFv-PE38 با استفاده از ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۱۰٪ و رنگ آمیزی Coomassie blue مورد آزمایش و تایید قرار گرفت.

تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA و ریفولدینگ اینکلوزین بادی

طبق دستورالعمل شرکت سازنده، از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA (Qiagen، Chatsworth، CA، USA) برای تخلیص پروتئین نوترکیب با تگ His استفاده شد.

خالص‌سازی تحت شرایط دناتوراسیون و با استفاده از اوره ۸ مولار انجام شد. رسوب تهیه شده بعد از سونیکاسیون (اینکولوژن بادی) سه مرتبه با PBS و Triton X-100 ۱٪ شسته شده، در ۴-۶ میلی‌لیتر بافر لیز اوره ۸ مولار حل و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۹۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی با رزین ۲ میلی لیتر مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و در نهایت به ستون منتقل شد. آلودگی پروتئینی ناخواسته با استفاده از بافر شستشوی ۲۰ میلی مولار سدیم فسفات ، ۳۰۰ میلی مولار NaCl ، ۵۰ میلی مولار ایمیدازول با pH=8.0 از ستون شستشو شد. سپس پروتئین مورد نظر از ستون با استفاده از بافر شستشوی ۲۰ میلی مولار فسفات سدیم، ۳۰۰ میلی مولار NaCl و ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول با pH=8.0، جدا و جمع آوری شد. برای

ریفولدینگ پروتئین از روش دیالیز مرحله‌ای [۲۶] استفاده شد و خروجی با SDS-PAGE و رنگ آمیزی Coomassie blue بررسی شد. خلوص پروتئین نیز با SDS-PAGE بررسی شد.

روش الایزا غیرمستقیم برای بررسی فعالیت اتصال آنتی ژنی HuscFv-PE38 Anti-EGFRVIII

اختصاصیت و فعالیت huscFv-PE38 ریفولد شده با روش الایزا غیرمستقیم تعیین شد. سلول‌های U87MG EGFRVIII به عنوان کنترل مثبت EGFRVIII و سلول‌های CHO به عنوان کنترل منفی آن استفاده شدند. به طور خلاصه، ۱۰۵ سلول در هر چاهک در پلیت های کشت به مدت یک شبانه روز کشت داده شد. سلول‌ها در فرمالین ۱۰ درصد به همراه PBS (pH 7.4) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق ثابت و سپس سه مرتبه با BSA-PBS یک درصد شستشو داده شدند. بعد از آن، پلیت حاوی سلول توسط BSA-PBS سه درصد به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه و سه بار شستشو داده شد. غلظت های مختلف huscFv-PE38 ریفولدی به پلیت اضافه شده به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه و پلیت شستشو شد. در مرحله بعد، پلیت با آنتی بادی ضد انسانی متصل به HRP (رقت ۱: ۲۰۰۰ در BSA-PBS یک درصد) به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه و پلیت شستشو شد. در نهایت، سوبسترا TMB اضافه و OD در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی قدرت ایمونوتوکسین در مهار رشد سلولی و کشتن سلول هدف با استفاده از آزمون MTT

قدرت ایمونوتوکسین در جلوگیری از تکثیر سلولی به کمک آزمون MTT روی دو رده سلولی U87MG و CHO مورد آزمون قرار گرفت. این سلول ها به ترتیب به تعداد ۵۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت (در هر چاهک، ۱۰۰میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵۰۰ سلول) ریخته شده و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از رقت های مختلف ایمونوتوکسین (۳/۲، ۱/۶، ۰/۸، ۰/۴ و ۰/۲ میکروگرم در میلی لیتر) به هر چاهک اضافه شد (هر رقت ۳ تکرار). پس از سه روز انکوباسیون در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، محیط کشت سلول ها تخلیه و با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه و ۵۰ میکرو لیتر محلول فیلتر شده MTT با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر جایگزین شد. پلیت ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و سپس این مخلوط با دقت حذف شده و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به همراه ۲۵ میکرولیتر بافر گلیسین– سورنسن به هر چاهک اضافه شد (یک لیتر بافر گلیسین– سورنسن حاوی ۷۵/. گرم گلیسین و ۵۸/. گرم NaCl بود که pH آن با NaOH یک نرمال به ۱۰/۵ رسانده شده بود). پس از حل شدن کریستال های ارغوانی رنگ فورمازان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر میکروپلیت ریدر اندازه گیری شد.

یافته‌ها:

ساخت و بیان ایمونوتوکسین نوترکیب

تکثیر توالی PE38 Pseudomonas aeruginosa به روش PCR با پرایمرهای طراحی شده منجر به تولید یک محصول PCR با طول نزدیک به ۱۱۴۰ جفت باز شد (شکل ۲).

محصول PCR پس از برش به کمک آنزیم های با اثر محدود پیش بینی شده در پرایمرها در محل HindIII-XhoI و وکتور انتخاب شده huscFv PET22b-aEGFRVIII کلون شد. این کار منجر به سازه بیانی PET22b-Aegfr-vIIhuscFv-PE38 شد که با هضم محدود کننده (شکل ۳) و PCR (شکل ۴) تأیید شد.

چندین سویه بیانی E. coli برای بیان پروتئین نوترکیب بررسی شد که در بین آن‌ها باکتری E. coli BL21 (plys S) بیان بالاتری نسبت به سویه های دیگر نشان داد. باکتری مذکور حاوی PET22b-huscFv-PE38 در محیط LB کشت داده شدند و بیان huscFv-PE38 نوترکیب با IPTG ۱میلی مولار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای دوره های زمانی مختلف القا شد. نتایج نشان داد که بالاترین مقدار ایمونوتوکسین نوترکیب در ساعت بیان شد. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE نشان داد که huscFv-PE38 به صورت یک باند پر رنگ در حدود ۶۳ کیلو دالتون بیان شده است. تجزیه و تحلیل بیان ایمونوتوکسین نوترکیب نشان داد که بیشتر محصول پروتئینی به صورت اینکلوژن بادی و در رسوب ظاهر شده است (شکل ۵).

تخلیص و فولد دوباره پروتئین نوترکیب

برای تخلیص و فولد دوباره پروتئین نوترکیب huscFv-PE38، اینکولوژن بادی‌ها در اوره ۸ مولار حل شدند و با استفاده از کروماتوگرافی ترکیبی با استفاده از رزین Ni-NTA خالص شدند. این روش تخلیص منجر به پروتئینی با خلوص حدود ۹۸ درصد می‌شود که در تجزیه و تحلیل SDS-PAGE پروتئین خالص نشان داده شده است (شکل ۶).

از روش دیالیز مرحله ای، پروتئین نوترکیب دارای فولد مناسب به دست آمد. روش برادفورد برای تعیین غلظت پروتئین نوترکیب IT غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر را نشان داد.

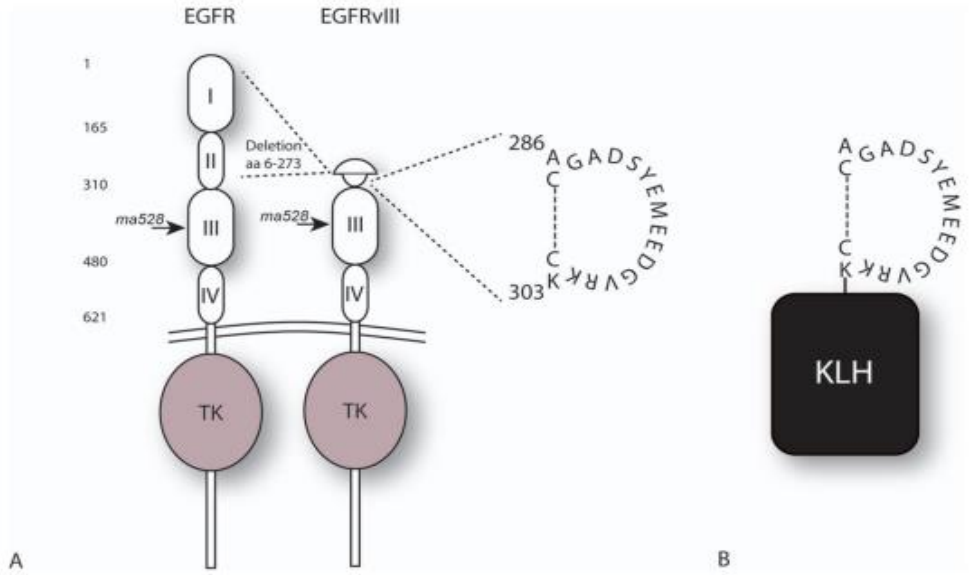
نتیجه سنجش الایزا

تحلیل واکنش huscFv-PE-38 روی سلول‌های کارسینوم U87MG EGFRVIII با روش الایزا نشان داد anti-

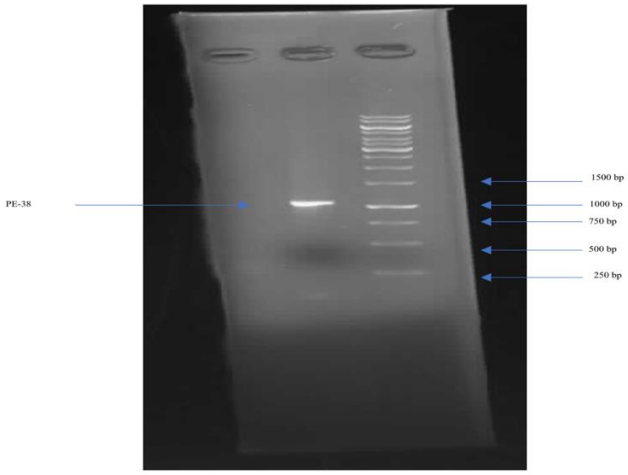
EGFRVIIIhuscFv-PE-38 قادر به تشخیص و اتصال به EGFRVIII در سطح سلول های U87MG EGFRVIII است. حداکثر OD در الایزا در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر huscFv-PE38 به دست آمد. نیمی از فعالیت اتصال دهنده IT نوترکیب و huscFv ۰/۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

نتایج آزمون MTT

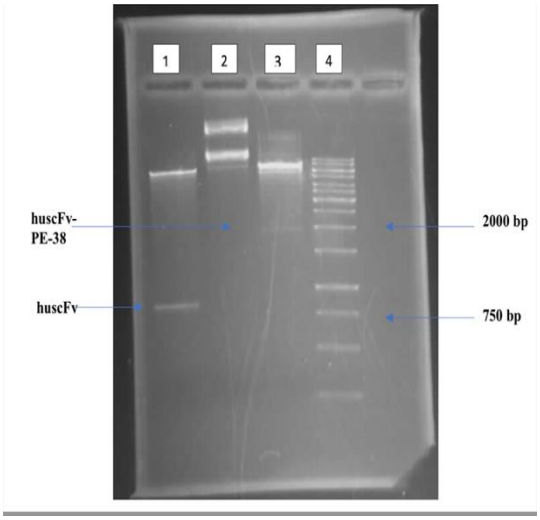
اثر سمیت و اثر مهار رشد سلولی huscFv-PE38 توسط آزمون MTTروی سلول‌های U87MG ارزیابی شد. نتایج آزمون مذکور نشان داد که فعالیت مهار رشد سلولی به میزان ۷۳، ۶۸، ۶۴، ۵۹، ۵۵، ۴۰ و ۳۷ درصد می توان با استفاده از مقادیر ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ و ۰/۰۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ایمونوتوکسین بازترکیب شده به دست آمد. ارزش IC50 برای این ایمونوتوکسین و huscFv به ترتیب برابر با ۲۵۰ نانوگرم و ۲۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. ایمونوتوکسین هیچ واکنش و اثر مهار رشد روی خط سلولی منفی EGFRVIII-CHO نشان نداد.



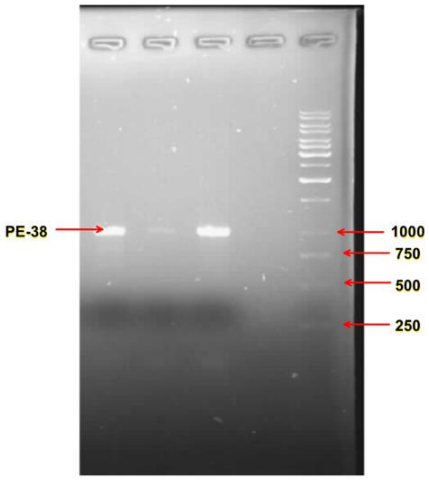
شکل 1 : تصویر شماتیکی از نوع وحشی EGFR، EGFRVIII و اسیدهای‌آمینه ۲۸۶-۳۰۳ حلقه ECD.
(A) در مقایسه با EGFR نوع وحشی، EGFRVIII دارای حذف درون قاب (اگزون ۲-۷) است که منجر به از دست دادن ۲۶۷ اسید آمینه از ECD می‌شود. حلقه محدود دی‌سولفید در ECD (۲۸۷ تا ۳۰۲) به طور اساسی در EGFRVIII نشان داده می‌شود و هنگامی که wtEGFR روی سلول‌های سرطانی بیش از حد بیان می‌شود تا حدی در معرض دید قرار می‌گیرد. فلش ها محل اتصال سایت پادتن ma528 را نشان می‌دهد.
(B) اسیدهای آمینه ۲۸۶-۳۰۳ با KLH ترکیب شده و بارها و بارها به عنوان یک ایمونوژن به موش‌ها تزریق شد [۳].



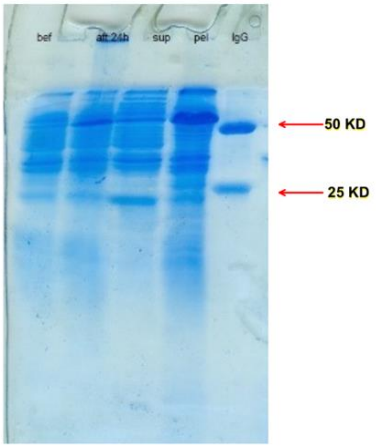
شکل ۲: تصویر ژل آگارز محصول PCR برای تکثیر توالی PE38 Pseudomonas aeruginosa



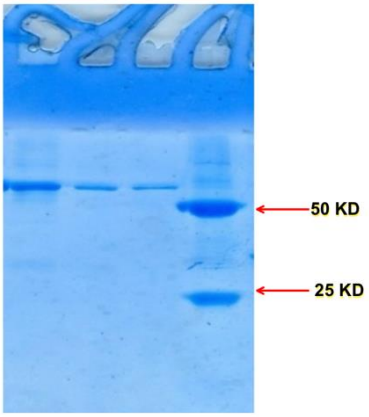
شکل ۳: تصویر ژل آگارز تایید سازه بیانی PET22b-aEGFRvIIhuscFv-PE38 با هضم آنزیم های محدود کننده



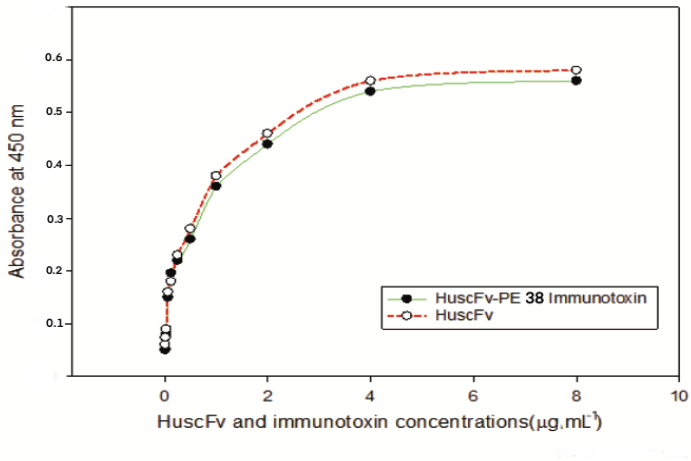
شکل ۴: تصویر ژل آگارز تایید کانستراکت بیانی PET22b-aEGFRvIIhuscFv-PE38 با PCR



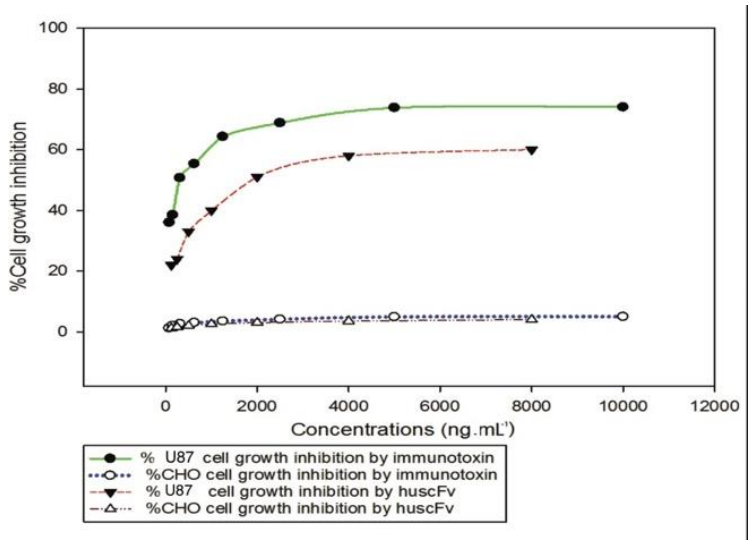
شکل ۵: تصویر ژل SDS-PAGE پروتئین huscFv-PE38 که به صورت یک باند پر رنگ در حدود ۶۳ کیلو دالتون بیان شده است.



شکل ۶: تصویر ژل SDS-PAGE پروتئین huscFv-PE38 تخلیص شده با ستون رزین Ni-NTA



شکل ۷: نتایج آزمون الایزا برای ایمونوتوکسین huscFv-PE38 و آنتی‌بادی انسانی شده.
ایمونوتوکسین و آنتی‌بادی huscFv فعالیت مشابهی روی خط سلولی U87MG با افزایش بیش از اندازه EGFRVIII نشان دادند.



شکل ۸: آزمایش مهار رشد سلولی روی ایمونوتوکسین huscFv-PE-38 و آنتی بادی huscFv با استفاده از آزمون MTT
huscFv-PE-38 و آنتی بادی huscFv تأثیر مهاری روی سلول‌های U87MG (خط سلولی با بیش از اندازه بیان EGFRVIII) را نشان دادند، در حالی که تأثیر مهاری معناداری روی سلول‌های منفی EGFRVIII CHO نداشتند. ایمونوتوکسین تأثیر مهاری رشد قابل توجه‌ای بر روی سلول‌های U87MG نسبت به آنتی بادی huscFv نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری:

شدت یافتن بیماری و مقاومت دارویی دو دلیل رایج شکست درمان سرطان با روش‌های مرسوم هستند. EGFR اغلب در انواع مختلف سرطان، دچار جهش یا بیان بیش از حد می‌شود و از این‌رو، می‌تواند به عنوان هدف چندین نوع درمان محسوب شود. یک رویکرد، هدف قرار دادن EGFR با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال همچون cetuximab است که برای سرطان‌های متاستاتیک کولورکتال، سر و گردن، ریه غیرسلولی و پوست تایید شده است [۲۷–۲۹]. رویکرد دیگر استفاده از مهارکننده‌های تیروزین کیناز برای مهار کردن فسفوریلاسیون سوبستراهای EGFR است. با این حال، یک مشکل عمده در درمان‌های هدفمند فعلی EGFR، عوارض جانبی ناشی از تعامل دارو با EGFR است که توسط بافت‌های طبیعی غیر هدف بیان می‌شود [۳۰].

هدف اصلی مطالعه حاضر شناسایی آنتی‌بادی‌های جدیدی بود که می‌توانند گیرنده EGFRVIII را از گیرنده‌های EGFR متمایز کنند. این ویژگی برای گلیوبلاستوما که در آن ۲۵–۳۳ درصد از بیماران، نوع EGFRVIII را بیان می‌کنند مهم است. علاوه بر این، مهارکننده‌های تیروزین کیناز فعلی و همچنین آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مؤثر نیستند. بنابر این، شناسایی آنتی‌بادی‌های جدیدی که EGFRVIII را هدف قرار دهند، می‌تواند به توسعه درمان‌های هدفمند برای سرطان‌هایی که گیرنده EGFRVIII در آن ها بیان می شود، کمک کنند.

ایمونوتوکسین‌ها به عنوان عوامل درمانی جدید برای بدخیمی‌هایی که به درمان‌های معمول مقاوم هستند، پیشنهاد شده‌اند. با این حال، این راهبرد دارای محدودیت‌هایی ناشی از ایمنی‌زایی بالا و اندازه بزرگ ایمونوتوکسین‌ها است. انسانی سازی و به حداقل رساندن اندازه mAbs، دو راهبرد برای رفع این محدودیت‌ها خواهند بود [۳۱].

در مطالعه حاضر، یک آنتی‌بادی ضد EGFRVIII که با اگزوتوکسین کوتاه شده سدوموناس ائروژنوزا (PE-38) و یک پیوند دهنده پپتیدی ترکیب شده است تهیه شد. نتایج نشان داد که ترکیب این دو، میل ترکیبی قسمت آنتی‌بادی را کاهش نمی‌دهد. در مطالعات قبلی نیز چاندراموهان و همکاران گزارش کردند که Anti-EGFRwt و EGFRVIII هدف خود را با میل ترکیبی بالا تشخیص می‌دهند.

در سال ۲۰۰۴ امیدفر و همکاران با ایمونیزه کردن شتر با پپتید سنتزی مشتق از EGFRVIII که دارای ۱۴ آمینو اسید است (LEEKKGNYVVTDHC)، موفق به تولید آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای تک دامین شتری شد. حیوان شتر سیستم ایمنی منحصر به فردی داشته و قادر است آنتی بادی های فاقد زنجیره سبک تولید کند که در عین حال فعالیت خود را حفظ کرده اند. آنتی بادی تولید شده توسط این پژوهشگران قابلیت اتصال به پپتید سنتزی و همچنین آنتی‌ژن‌های تخلیص شده از افراد مبتلا به سرطان ریه را داشت. آنتی‌بادی تولید شده در سطح نانومولار قادر به تشخیص پپتید EGFRVIII و همچنین گیرنده تخلیص شده از بیماران بود [۳۲].

در مطالعه حاضر، فولد صحیح و فعالیت ضدتوموری ایمونوتوکسین با استفاده از روش الایزا تایید شد. نتایج آزمون الایزا نشان داد که ایمونوتوکسین فولد شده، سلول‌های U87VIII را با میل ترکیبی بالا (OD50% = 0.1µg.mL-1) تشخیص می‌دهد.

همچنین نتایج مطالعه حاضر با برخی از مطالعات قبل تفاوت هایی دارد. هکسام و همکاران یک scFv(BC3)-PE38 IT تولید کردند که در مقایسه با آنتی‌بادی اولیه (والد) (BC3 mAb) به طور قابل توجهی، فعالیت اتصال کمتری به آنتی‌ژن را نشان می‌داد. این تفاوت ممکن است به دلیل اثر منفی ادغام huscFv به توکسین ایمونوتوکسین باشد.

نتایج مطالعه حاضر با گزارش‌های دی‌پائولو و همکاران مطابقت دارد. آن ها یک ایمونوتوکسین ضد EpCAM را از یک آنتی‌بادی ضد EpCAM انسانی تولید کردند. این ایمونوتوکسین فعالیت اتصال آنتی‌ژنی برابر با آنتی‌بادی ضد EpCAM انسانی داشت. همچنین هکسام و همکاران فعالیت اتصال مشابه scFv (UCHT1)-PE38 IT و UCHT1 scFv را گزارش کردند. در سال ۲۰۰۰، ناکایاشیکی و همکاران یک آنتی‌بادی ضد EGFRVIII را از mAb موش 3C10 (IgG2b) تولید کردند. آن ها اظهار کردند که این آنتی‌بادی به طور خاص آنتی‌ژن مربوطه را تشخیص می‌دهد، اما میل ترکیبی آن تقریباً چهار برابر کمتر از میل ترکیبی والدین است [۳۳–۳۶].

به طور کلی، تا به امروز، هم تومورهای خونی و هم تومورهای جامد برای درمان با ایمونوتوکسین‌های مبتنی بر PE مورد مطالعه قرار گرفته اند (۳۷). ایمونوتوکسین‌های مبتنی بر PE برای درمان تومورهای هماتولوژیک نتایج بالینی خوبی در انواع مختلف لوسمی و لنفوم غیرهاچکین نشان داده‌اند که اهداف مشترک آن‌ها، CD22، CD25، CD30 و سایر گیرنده‌های مرتبط با بدخیمی‌های سلول B بودند و در همان زمان، عوارضی مانند اورمی همولیتیک ظاهر شد که برای بدن انسان مضر است [۳۸]. برعکس، درمان تومور جامد با ایمونوتوکسین‌ها به دلیل تفاوت در ساختار بافت تومور و وضعیت کلی سیستم ایمنی پیچیده‌تر است. برای تومورهای جامد بدخیم، کاربرد بالینی ایمونوتوکسین‌ها هنوز به دلیل ایمنی‌زایی و سمیت غیراختصاصی، محدود است. همان طور که قبلاً بیان شد، تواناییایمونوتوکسین‌ها به منظور نفوذ به اندودرم مویرگی و فضای خارج سلولی برای رسیدن به تومورها، به دلیل وضعیت ماکرومولکولی آنتی‌بادی، محدود است. بنابراین،

کوچک‌سازی آنتی‌بادی‌های متصل به توکسین یا قطعات آنتی‌بادی می‌تواند میل ترکیبی بین داروی آنتی‌بادی و آنتی‌ژن هدف را تضمین کرده و نیمه عمر دارو در پلاسما را برای رسیدن به حالت توزیع بهینه بهبود بخشد. حذف اپی‌توپ‌های بالقوه ایمنی زای توکسین و ترکیب آنتی‌بادی‌های انسانی، همه دستورالعمل‌های ایده‌آلی برای بهبود ایمنی ایمونوتوکسین‌ها هستند. علاوه بر این، هنگام غربالگری آنتی‌ژن‌های گیرنده هدف مناسب و تنظیم میل آنتی‌بادی بر اساس سطح بیان آنتی‌ژن، عوامل مختلفی از جمله ویژگی آنتی‌ژن، اندوسیتوز و محدودیت‌های اتصال به آنتی‌ژن باید در نظر گرفته شوند [۳۹]. انتخاب آنتی‌بادی‌های متصل‌شونده به هدف با ویژگی و کارایی بالا باعث افزایش میزان آزاد شدن ایمونوتوکسین‌ها در سلول‌ها می‌شود. توسعه آتی ایمونوتوکسین‌های نوترکیب مبتنی بر PE بر ساخت یک ایمونوتوکسین نوترکیب مؤثر از طریق یک سری راهبردهای جدید تمرکز خواهد داشت که نفوذپذیری و توزیع متعادل در بافت‌های تومور هدف را تضمین می‌کند. انتظار می‌رود این بهینه‌سازی‌ها، استفاده گسترده تر از ایمونوتوکسین‌های درمانی بیشتر را در کاربردهای بالینی ترویج کنند [۴۰].

References:

1. Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. J Cancer Res Prac. 2017;4(4):127-9.
2. Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—the role of sunlight. Adv Exp Med Biol. 2008:89-103.
3. Seebacher N, Stacy A, Porter G, Merlot A. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):1-39.
4. Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L. Current challenges in cancer treatment. Clin Ther. 2016;38(7):1551-66.
5. Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. Cancers. 2017;9(5):52.
6. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. Mol Oncol. 2018;12(1):3-20.
7. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. Expert Opin Ther Targets . 2012;16(1):15-31.
8. Rajaram P, Chandra P, Ticku S, Pallavi B, Rudresh K, Mansabdar P. Epidermal growth factor receptor: Role in human cancer. Indian J Dent Res. 2017;28(6):687.
9. Gan HK, Burgess AW, Clayton AH, Scott AM. Targeting of a conformationally exposed, tumor-specific epitope of EGFR as a strategy for cancer therapy. Cancer Res. 2012;72(12):2924-30.
10. Shawler DL, Bartholomew R, Smith L, Dillman R. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. J. Immun journal. 1985;135(2):1530-5.
11. Safdari Y, Farajnia S, Asgharzadeh M, Khalili M. Antibody humanization methods–a review and update. Biotechnol Gene. Eng Rev. 2013;29(2):175-86.
12. Rutkowska A, Stoczyńska-Fidelus E, Janik K, Włodarczyk A, Rieske P. EGFR VIII: an oncogene with ambiguous role. J Oncol 2019; 109258.
13. Akbari B, Farajnia S, Zarghami N, Mahdieh N, Rahmati M, Khosroshahi SA, et al. Design, expression and evaluation of a novel humanized single chain antibody against epidermal growth factor receptor (EGFR). Protein Expr Purif 2016;127:8-15.
14. Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Mol Cells. 2005;20(1).
15. Li YM, Hall WA. Targeted toxins in brain tumor therapy. J Toxicol 2010;2(11):2645-62.
16. Havaei SM, Aucoin MG, Jahanian-Najafabadi A. Pseudomonas exotoxin-based immunotoxins: over three decades of efforts on targeting cancer cells with the toxin. Front Oncol. 2021;11:781800.
17. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. AAPS J. 2006;8(3):532-51.
18. Dieffenbach M, Pastan I. Mechanisms of resistance to immunotoxins containing pseudomonas exotoxin a in cancer therapy. Biomolecules. 2020;10(7):979.
19. Allured VS, Collier RJ, Carroll SF, McKay DB. Structure of exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa at 3.0-Angstrom resolution. Proc Natl Acad Sci. 1986;83(5):1320-4.
20. Kreitman RJ, Hassan R, FitzGerald DJ, Pastan I. Phase I trial of continuous infusion anti-mesothelin recombinant immunotoxin SS1P. Clin. Cancer Res. 2009;15(16):5274-9.
21. Bao X, Chandramohan V, Reynolds RP, Norton JN, Wetsel WC, Rodriguiz RM, et al. Preclinical toxicity evaluation of a novel immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, administered via intracerebral convection-enhanced delivery in rats. Invest New Drugs. 2016;34(2):149-58.
22. Chandramohan V, Bao X, Yu X, Parker S, McDowall C, Yu Y-R, et al. Improved efficacy against malignant brain tumors with EGFRwt/EGFRVIII targeting immunotoxin and checkpoint inhibitor combinations. J Immunother Cancer. 2019;7(1):142.
23. Jahangir Langari, Majid Golkar, Hossein Khanahmad, Morteza Karimipoor, Roghayeh Arezumand, Ramazan Behzadi, et al. Cloning,

Expression and Evaluation of Pseudomonas Aeruginosa Exotoxin A. *J Isfahan Med Sch 2014;* 32 (294): 1110-8.
24.Falahatgar D, Farajnia S, Zarghami N, Tanomand A, Khosroshahi SA, Akbari B, et al. Expression and evaluation of huscfv antibody-pe40 immunotoxin for target therapy of egfr-overexpressing cancers. Iran J Biotechnol. 2018;16(4):1743.
25.Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. 2005;23(9):1126-36.
26.Sinacola JR, Robinson AS. Rapid refolding and polishing of single-chain antibodies from Escherichia coli inclusion bodies. Protein Expr Purif. 2002;26(2):301-8.
27.Passaro A, Jänne PA, Mok T, Peters S. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer. Nat Cancer. 2021;2(4):377-91.
28.Petty R, Dahle-Smith A, Stevenson D, Osborne A, Massie D, Clark C, et al. Gefitinib and EGFR gene copy number aberrations in esophageal cancer. 2017.
29.Kozuki T. Skin problems and EGFR-tyrosine kinase inhibitor. J clin oncology. 2016;46(4):291.
30.Widakowich C, de Castro Jr G, De Azambuja E, Dinh P, Awada A. Side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. J. Oncol. 2007;12(12):1443-55.
31.Akbari B, Farajnia S, Zarghami N, Mahdieh N, Rahmati M, Khosroshahi SA, et al. Construction, expression, and activity of a novel immunotoxin comprising a humanized antiepidermal growth factor receptor scFv and modified Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. Anticancer Drugs. 2017;28(3):263-70.
32.Omidfar K, Rasaee M, Modjtahedi H, Forouzandeh M, Taghikhani M, Golmakani N. Production of a Novel Camel Single-Domain Antibody Specificfor the Type III Mutant EGFR. Tumor Biol. 2004;25(5-6):296-305.
33.Di Paolo C, Willuda J, Kubetzko S, Lauffer I, Tschudi D, Waibel R, et al. A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity. Clinical Cancer Res. 2003;9(7):2837-48.
34.Guo J-Q, You S-Y, Li L, Zhang Y-Z, Huang J-N, Zhang C-Y. Construction and high-level expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for acidic isoferritin in Escherichia coli. J Biotechnol. 2003;102(2):177-89.
35.Hexham JM, Dudas D, Hugo R, Thompson J, King V, Dowling C, et al. Influence of relative binding affinity on efficacy in a panel of anti-CD3 scFv immunotoxins. Mol Immunol 2001;38(5):397-408.
36.Nakayashiki N, Yoshikawa K, Nakamura K, Hanai N, Okamoto K, Okamoto S, et al. Production of a single-chain variable fragment antibody recognizing type III mutant epidermal growth factor receptor. Jpn J Cancer Chemother. 2000;91(10):1035-43.
37.Bou Zerdan M, Moussa S, Atoui A, Assi HI. Mechanisms of immunotoxicity: Stressors and evaluators. Int J Mol Sci. 2021;22(15):8242.
38.Madhumathi J, Devilakshmi S, Sridevi S, Verma RS. Immunotoxin therapy for hematologic malignancies: where are we heading? Drug Discov Today. 2016;21(2):325-32.
39.Wu T, Zhu J. Recent development and optimization of pseudomonas aeruginosa exotoxin immunotoxins in cancer therapeutic applications. Int Immunopharmacol. 2021;96:107759.
40.Onda M, Wang Q-c, Guo H-f, Cheung N-KV, Pastan I. In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9 (Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. Cancer Res. 2004;64(4):1419-24.

Original Article

Design and construction of genetic construct expressing anti-EGFR VIII immunotoxin contains exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* for glioblastoma cancer

Maryam Irani[1], Safar Farajnia[*2], MohammadReza Zolfaghari[*3], Razieh Nazari[4] Leila Rahbarnia [5]

Received:2023.03.17 Revised:2023.04.11 Accepted: 2023.5.22

1. PhD student in microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
2. Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
4. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
5. Assistant Professor of Medical Biotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.1, Spring 2023

Pars J Med Sci 2023; 21(1):62-72

Abstract:

Introduction:
Cancer is one of the most common causes of human mortality in today's societies, and extensive efforts are being made to combat it. EGFRVIII is a tumor-specific antigen that is not observed in normal tissues, making it possible to target cancerous tissues without damaging normal tissues. ANTI-EGFRVIII-based immunotoxins can lead to the death of cancer cells that express an excessive amount of the EGFRVIII receptor by directing toxic components to these cells.

Materials and Methods:
The objective of the present study is to develop a new human immunotoxin against EGFRVIII (huscFv-PE38) by genetically fusing a single-chain human anti-EGFRVIII antibody with a truncated form of the Pseudomonas aeruginosa exotoxin A (PE) (PE38KDEL).
Materials and methods: The PE-38 exotoxin a fragment was amplified using PCR and attached to pET22b-antiEGFRVIII huscFv. The reaction was confirmed by PCR and enzymatic digestion. The immunotoxin was expressed in E. coli BL21 (plysS) and then purified using Ni-NTA chromatography. After that, the purified immunotoxin reaction was evaluated using ELISA methods and MTT test.

Results:
The PCR and restriction digestion experiments confirmed the accuracy and integrity of the designed immunotoxin structure. Purification of the expressed immunotoxin using Ni-NTA chromatography column resulted in a highly pure, non-recombined immunotoxin with a molecular weight of 63 kDa shown on SDS-PAGE gel.

Conclusion:
The results of this study demonstrate that the designed immunotoxin was successfully cloned, expressed, and purified, and can be considered as a promising candidate for the inhibition of EGFRVIII-positive cancer cells.

Keywords: Targeted Cancer Therapy, EGFRVIII, huscFv-PE38, Immunotoxin, Pseudomonas Exotoxin A

* Corresponding author Email: mreza.zolfaghary@gmail.com