مقاله پژوهشی

فصلنامهٔ بیماری‌های پستان ایران، سال هفتم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۳

طراحی و مهندسی ساختار پلی سیترونیک قطعه F(ab`)2 آنتی‌بادی ضدگیرنده HER2 جهت بیان در میزبان باکتریایی

لیلا فرهمند: گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاددانشگاهی، تهران، ایران

رضوان اسمعیلی: گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاددانشگاهی، تهران، ایران

کیوان مجیدزاده اردبیلی*: گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاددانشگاهی- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، آنتی‌بادی‌های منوکلونال نوترکیب و مشتقات آنها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل هدف درمانی در نظر گرفته شده‌اند. آنتی‌بادی‌های منوکلونال به صورت رایج در میزبان پستانداران تولید می‌شوند که هزینه‌های تولید در این میزبان بسیار بالاست و در نتیجه قیمت داروهای این گروه درمانی مهم بالا بوده که به مصرف کنندگان این داروها هزینه بالایی تحمیل می‌شود. به این منظور انتخاب یک سیستم تولیدی ارزان و راحت مثل میزبان‌های باکتریایی برای کاهش هزینه تولید این محصولات به عنوان یک سرفصل بزرگ برای موضوعات در حال رشد در سیستم‌های بیان مواد نوترکیب به شمار می‌رود.

روش بررسی: در این مطالعه، یک ساختار پلی‌سیترونی از قطعه F(ab`)¬2 از آنتی HER2 که قادر به بیان درد در سیستم باکتریایی باشد طراحی شد.

همچنین در ساختار ناحیه لولای آنتی‌بادی تغییراتی داده شد تا این قطعه به شکل صحیح بیان شده و تابخورد و از تشکیل انواع مختلفی از ساختارهای هتروژنو غیرفعال جلوگیری شود. نهایتاً ساختار ژنی‌سنتز شده در حامل باکتریایی، بدون استفاده از روش‌های معمول کلون‌سازی و به صورت مستقیم وارد شد.

یافته‌ها: ساختار پلی‌سیترونیک قطعه $F(ab`)_2$ آنتی‌بادی ضدگیرنده HER-2 به‌خوبی طراحی شد. تمامی اجزای لازم جهت رونویسی، ترجمه، تاخوردگی مناسب، شناسایی و خالص‌سازی در نظر گرفته شد. اصلاحات ناحیه لولا جهت به طور موفقیت‌آمیزی انجام گرفت. کاستژنی $F(ab`)_2$ با پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. کاست بیان شونده حاصل با موفقیت در داخل حامل پلاسمیدی PET-32 EK/LIC و در جایگاه LIC اضافه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که قطعه $F(ab`)_2$ اصلاح شده با استفاده از روش کلون‌سازی غیروابسته به اتصال به طور موفقیت‌آمیزی وارد حامل بیانی E.coli شد. اگرچه مطالعات انجام شده در زمینه طراحی و تولید قطعه $F(ab`)_2$ بسیار محدود است، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که میزبان‌های باکتریایی مسیرهای جایگزین مناسب و سیستم بیانی مقرون به صرفه از نظر اقتصادی برای تولید قطعات آنتی‌بادی هستند.

واژه‌های کلیدی: آنتی بادی نوترکیب، کلون‌سازی، ساختار پلی‌سیسترونی، میزبان باکتریایی، گیرنده HER-2.

* نشانی نویسنده پاسخگو: خیابان انقلاب، خیابان ابوریحان، پلاک ۶۵، طبقه اول، کیوان مجیدزاده اردبیلی.
نشانی الکترونیک: kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1393.7.2.1.1]

مقدمه

امروزه هدف درمانی تأثیر بسزایی در درمان انواع مهمی از سرطان‌ها دارد و به عنوان یک روش ایمن و با عملکرد اختصاصی بالاتر و عوارض جانبی کمتر از روش‌های درمانی قبلی، دارای اعتبار بیشتری است (۱). پیشرفت روش‌های مولکولی و کشف ساختار و عملکرد آنتی‌بادی‌ها، امکان تولید نسل‌های جدید این ترکیبات که تحت عنوان آنتی‌بادی‌های مهندسی شده هستند را فراهم ساخته است. آنتی‌بادی‌های مهندسی شده شامل آنتی‌بادی‌های کایمریک، انسانی شده و نوترکیب انسانی هستند (۲).

تا امروز بیش از ۳۰ منوکلونال آنتی‌بادی شامل آنتی‌بادی‌های کامل و مشتقاتشان توسط انجمن غذا و داروی آمریکا برای مصارف مختلف به تصویب رسیده و تقریباً صدها کارآزمایی بالینی در این زمینه درحال انجام است (۳). علی‌رغم مزیت‌های این عوامل درمانی، هزینه درمان با این ترکیبات فوق‌العاده بالاست و بسیاری از بیماران قادر به تأمین هزینه‌های آن نیستند (۴).

آنتی‌بادی‌ها، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که با یک الگوی گلیکوزیلاسیون آسان در سیستم میان پستانداران مثل سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) تولید می‌شوند، مهم‌ترین سایت‌های بالقوه آنتی‌بادی برای گلیکوزیلاسیون در نواحی Fc آنها قرار گرفته است که عملکرد ایمنی وابسته به سلول مثل سیتوتوکسیتی وابسته به سلول Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) را انجام می‌دهند (۵).

از آنجایی‌که عملکرد درمانی برخی از آنتی‌بادی‌ها وابسته به ADCC نیست بنابراین اثر آنها غیروابسته به ناحیه FC و در نتیجه محل قندار این قسمت است (۶). در این موارد ناحیه FC را به راحتی می‌توان از آنتی بادی حذف و یا از قند دارکردن این قسمت صرف‌نظر کرد.

یکی از گروه‌های پرکاربرد آنتی‌بادی‌ها، قطعات آنتی‌بادی‌ها هستند که نسبت به آنتی بادی‌های کامل مزیت‌هایی بالقوه دارند. از جمله اینکه قطعات آنتی‌بادی قدرت اتصال به آنتی ژن با همان قدرت آنتی‌بادی کامل را دارد در حالی که قدرت نفوذ آنها به داخل تومور بیشتر و پتانسیل آنتی ژنسیته آنها کمتر است. امروزه قطعات آنتی‌بادی‌ها در زمینه تشخیص و درمان کاربردهای زیادی دارند (۸).

یکی از مسائل مهم در زمینه تولید آنتی‌بادی‌ها، تشکیل ساختار فضایی صحیح و فعال است که در این زمینه یکی از مهم‌ترین موضوعات تشکیل باندهای دی سولفیدی صحیح است (۹).

در این مطالعه ما تلاش کردیم که یک قطعه ژنی پلی سیترونیک $f`(ab`)_2$ که از لحاظ ژنتیکی اصلاح شده است طراحی کرده و آن را با یک روش ساده و بسیار سریع در یک حامل باکتریایی کلون کنیم. LIC (Ligation Independent Cloning) که در حقیقت کلونینگ غیروابسته به اتصال است یک روش آسان و کارآمد برای کلونینگ است. برخلاف بسیاری از روش‌های کلونینگ این روش احتیاجی به مراحل خالص‌سازی، هضم آنزیم محدود الاثر ندارد (۱۰). ژن انتخاب شده وابسته به آنتی‌بادی انسانی anti $EGFR_2$ انسانی (رسپتور ۲ فاکتور رشد اپیدرمی) است. این مولکول به دومین خارج سلولی EGFR-2 (همچنین به عنوان HER_2 شناخته می‌شود) اتصال می‌یابد و از دایمر شدن آن با گیرنده‌های دیگر خانواده HER جلوگیری کرده و با توانایی بالا از تکثیر سلول‌های توموری انسانی جلوگیری می‌کند (۱).

مواد و روش‌ها

آنزیم‌های PCR و مواد لازم برای تکثیر ژن و الکتروفورز ژل از شرکت فرمنتاز (Fermentas) خریداری شدند. سوش‌های باکتریایی مورد نیاز برای کلون‌سازی و بیان پروتئین و پلاسمید از شرکت EMD Bioscience تهیه شد. مواد مورد نیاز کشت و ترکیبات لازم دیگر از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شدند.

- **طراحی ساختار کاست بیان‌کننده**

در سیستم بیان‌کننده پلی سیترونی ژن‌های مربوط به زنجیره سبک و سنگین قطعه $f(ab`)_2$ به صورت پشت سرهم روی کاست ژنی تحت کنترل یک پروموتور قرار گرفتند. جایگاه‌های اتصال به ریبوزوم و توالی‌های His. Tag و S. Tag بین زنجیره‌های سبک و سنگین و در فرادست توالی زنجیره سنگین اضافه شدند که اجازه ترجمه مجزا و همزمان هر دو زنجیره را به سیستم می‌دهد. جایگاه LIC که توسط پرایمر سنس کد می‌شود طراحی شد تا محل اثر آنزیم انتروکیناز باشد تا این

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1393.7.2.1.1]

پروتئین‌ها پس از شکست توسط انتروکیناز هیچ اسید آمینه غیرطبیعی نداشته باشد.

- اصلاح ناحیه لولا

ناحیه CH_1 (دومین ۱ از ناحیه ثابت زنجیره سنگین) که ناحیه لولای آنتی‌بادی را تشکیل می‌دهد حاوی چند اسید آمینه سیستئین در انواع آنتی‌بادی است که به منظور جلوگیری از تولید انواع ساختارهای هتروژن این ناحیه به این گونه اصلاح شد که در ساختار ژن طراحی شده کدون دو اسیدآمینه از سه اسیدآمینه سیستئین ناحیه نامبرده تبدیل به کدون اسیدآمینه آلانین شدند.

- تکثیر ژن قطعه f(ab`)2 با کمک روش PCR

DNA ساختار طراحی شده که ناحیه $F(ab`)_2$ از آنتی‌بادی انسانی شده ضدگیرنده HER-2 را کد می‌کند در شرکت (bio S&T) (آمریکا) ساخته شد. سپس ساختار طراحی شده توسط روش PCR و با استفاده از پرایمرهایی که برای کلون کردن محصول در حامل PET 32EK/ LIC طراحی شده بودند تکثیر شد. این پرایمرها در حقیقت بازوهای مورد نیاز واکنش LIC را به دوطرف سکانس مورد نظر اضافه می‌کنند. توالی‌های پرایمر به صورت زیر است:

پرایمر سنس: 5` GAC GAC GAC AAG ATG 3`

پرایمر آنتی سنس: 5`GA GGA GAA GCC CGG TAA 3`

پرایمرهای PCR با کمک نسخه 3.01 نرم‌افزار Gene Runner طراحی شده و توسط شرکت سیناژن (تهران- ایران) ساخته شد.

واکنش PCR در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۵ میکرولیتر از بافر واکنش x ۱۰، ۵ میکرولیتر از dNTP (۰.۲ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر از دو پرایمر (۱۲/۵ میلی مول در میکرولیتر)، ۱/۲۵ واحد از آنزیم DNA پلیمراز pfu و ۲ میکرولیتر از DNA الگو (۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) بود. تکثیر با پروفایل دمایی زیر انجام شد: شروع با دو دقیقه تقلیب در C^0 ۹۴، در ادامه کار ۳۰ سیکل مداوم از C^0 ۹۴ به مدت ۱ دقیقه (تقلیب)، C^0 63 به مدت ۴۵ ثانیه (اتصال) و C^0 ۷۲ به مدت ۲ دقیقه (تکثیر) با یک زمان اضافی طویل شدن در C^0 ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از تکثیر، ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها الکتروفورز شدند تا از تکثیر قطعات PCR مطمئن شویم.

- کلون سازی قطعه F(ab`)2 در حامل بیانی

بر اساس دستورالعمل استاندارد LIC، بر روی محصول تخلیص شده PCR با استفاده از آنزیم T DNA4 پلیمراز و در حضور dATP بازوهای سازگار ایجاد شد، سپس قطعه تیمار شده به حامل PET-32 EK/LIC اضافه شد. کاست ژنی ساخته شده PET-32 -$F(ab`)_2$ EK/LIC به داخل سلول‌های دارای صلاحیت Nova Blue Gigasingles ™ با استفاده از روش کلرید کلسیم انتقال یافت (۱۲) و باکتری‌های حاوی کاست ژنی در LB آگار که حاوی تترا سایکلین (۱۲/۵ µg/ml) و آمپی سیلین (۵۰ µg/ml) هستند کشت داده شد (۱).

- تأیید کلون‌های ساخته شده

حضور کاست پلی‌سیتروتیک در کلونی‌های کشت داده شده با سه روش بررسی و تأیید شد:

۱- کلونی PCR با پرایمرهای اختصاصی حامل برای بررسی حضور ژن کلون شده.

۲- تجزیه و تحلیل با آنزیم‌های محدودالاثر Nco I و XbaI انجام گرفت و انتظار می‌رفت که هضم آنزیمی سبب تولید ۳ قطعه با اندازه‌های ۳/۷ کیلوباز، ۱/۴ کیلو باز و ۷۰۰ جفت باز شود.

۳- ترتیب قرارگیری صحیح توالی‌ها با تعیین توالی دو طرفه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

- تشکیل اپرون پلی سیترونیک

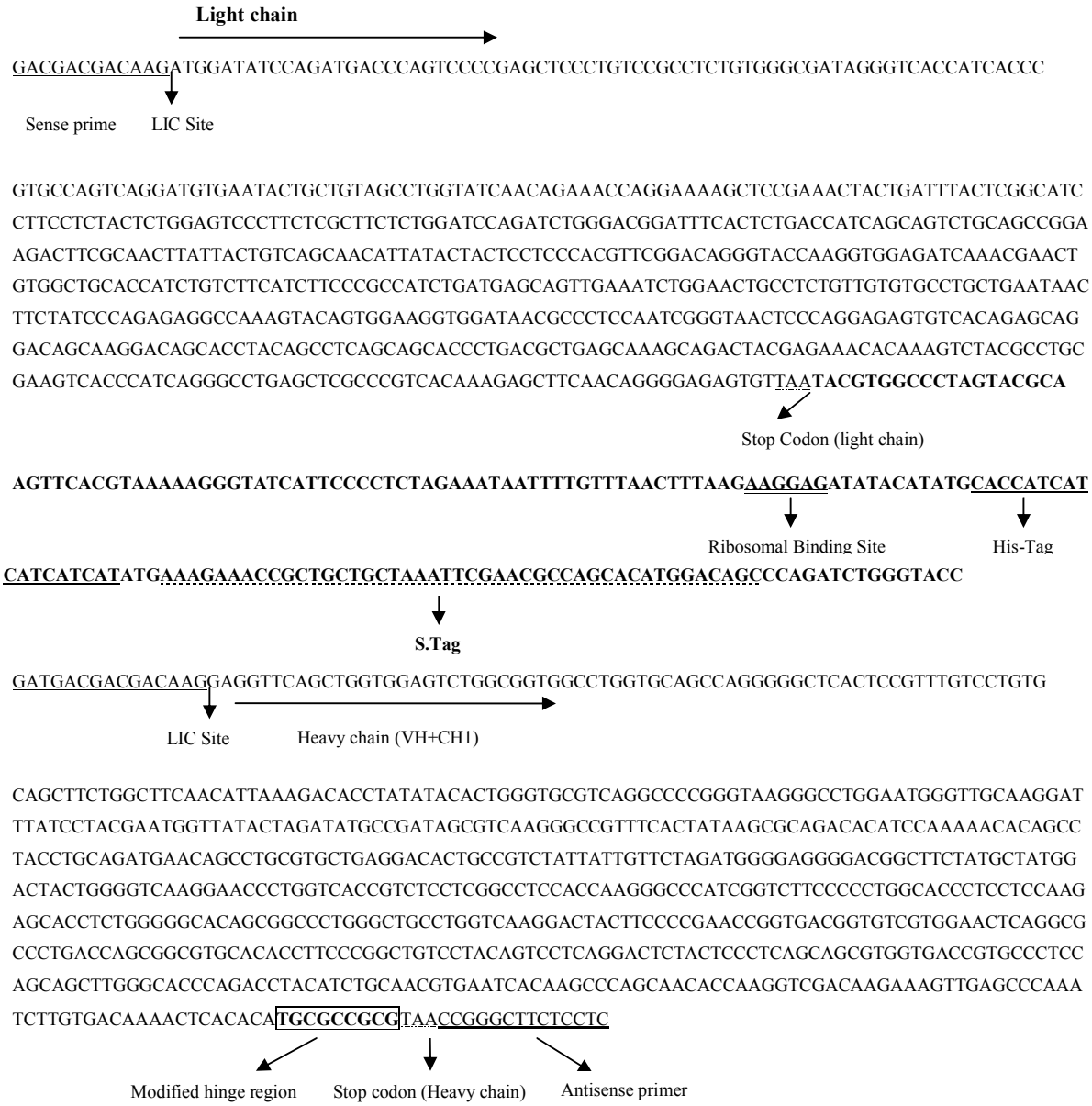
شکل ۱ ساختار پلی سیترونیک قطعه $F(ab`)_2$ آنتی‌بادی ضدگیرنده HER-2 را نشان می‌دهد. در این ساختار تمامی اجزای لازم جهت رونویسی، ترجمه، تاخوردگی مناسب، شناسایی و خالص سازی پروتئین هدف وجود دارد.

- طراحی ناحیه لولا

همان‌طور که قبلاً اشاره شد توانایی تشکیل انواع مختلفی از باندهای دی سولفیدی ممکن است سبب تشکیل شدن انواعی از قطعات ناخواسته از آنتی‌بادی‌ها می‌شود (۱۳). TGCGCCGCG یک ناحیه لولای اصلاح شده است که به‌جای چند سیستئین ردیف اسید آمینه ای CAA را کد می‌کند (شکل ۱).

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-12]

DOR: 20.1001.1.17359406.1393.7.2.1.1]



شکل ۱: ساختار کاست پلی‌سیترونیک برای کلون‌سازی و بیان قطعه ژن قطعه $F(ab`)_2$ آنتی‌بادی ضدHER-2 **در میزبان باکتریایی**

پرایمرهای سنس و آنتی‌سنس به انتهاهای '۵ و '۳ از ساختار هدف اضافه می‌شوند تا انتهاهای سازگار مربوط به حامل را بسازد. پرایمر سنس ۴ اسید آمینه انتهایی از شکاف انتروکیناز (EK) را کد می‌کند تا پروتئین هدف در فرم ذاتی بیان شود. جایگاه اتصال به ریبوزوم (RBS) برای کارایی بالای شروع ترجمه است. His.Tag و S.Tag برای جداسازی و تخلیص ساده پروتئین هدف استفاده شدند. کدون‌های توقف برای پایان دادن رونویسی، به انتهای سکانس زنجیره‌های سبک و سنگین اضافه شدند.

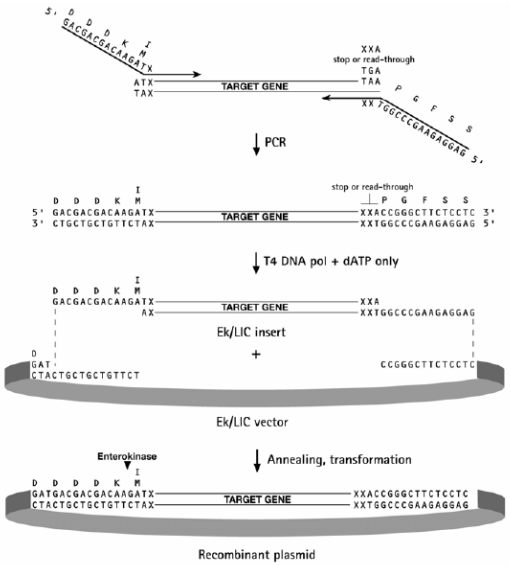
[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1393.7.2.1.1]

- تکثیر ساختار F(ab`)2Anti Fragment HER-2

ساختار طبق توالی اسید آمینه‌های مربوط به آنتی‌بادی ضدگیرنده HER-2 با تصحیح کدون‌های مورد استفاده در باکتری E.Coli ساخته شد. (شماره‌های دسترسی بانک ژنی AY513485 و AY513484). شکل ۲ ساختارهای بازوهای که با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای سنس و آنتی سنس به ساختار اضافه می‌شود را نشان می‌دهد.

کاست ژنی $F(ab`)_2$ با پرایمرهای اختصاصی به طرز موفقیت‌آمیزی تکثیر شد. این حامل برای کلون‌سازی مستقیم محصولات PCR به‌راحتی آماده شد.



شکل ۲: شکل شماتیک از استراتژی LIC .

پس از تکثیر با پرایمرهای مربوط به حامل قسمت اضافه شده در PCR در مجاورت آنزیم DNA T4 پلیمراز نوترکیب و dATP+ قرار می‌گیرد. در مرحله آخر سکانس آماده شده به حامل خطی وارد شده و کاست حلقوی تشکیل می‌شود.

- کلون‌سازی غیروابسته به اتصال ساختار قطعه F(ab`)2

کاست بیان شونده حاصل با موفقیت در داخل حامل پلاسمیدی PET-32 EK/LIC و در جایگاه LIC اضافه شد. هر کاست بیان‌کننده حاوی مواد زیر است.

۱- پروموتور T7 که در ساختار طراحی شده نسخه‌برداری زنجیره سبک و سنگین قطعه $F(ab`)_2$ را کنترل می‌کند.

۲- جایگاه اتصال به ریبوزوم که قبل از ژن هر زنجیره قرار دارد. اولین جایگاه اتصال ریبوزوم متعلق به حامل باکتریایی بکار برده شده است و دومین جایگاه که بین جایگاه مربوط به قرارگیری دو زنجیره اضافه شد, زنجیره دوم را ترجمه می‌کند.

۳- دو کدون پایان که خاتمه‌دهنده فرایند ترجمه است و در انتهای سکانس مربوط به هر زنجیره قرار می‌گیرد.

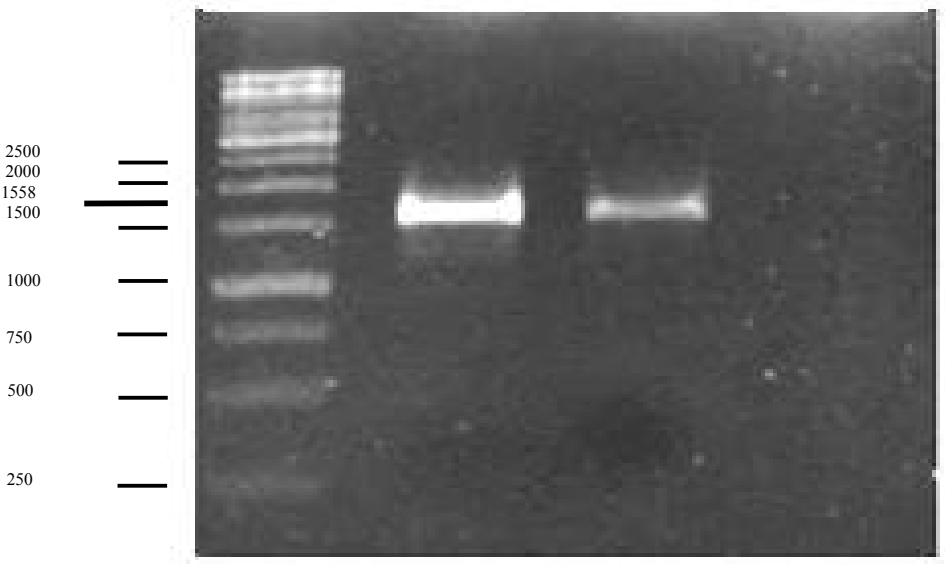
۴- His.Tag و S.Tag که در فرودست ژن هر دو زنجیره قرار دارد.

- تأیید کلونینگ

همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است کلونی‌های بررسی شده توسط روش PCR، حاوی قطعه مورد نظر ما است. همچنین شکل ۴ ساختار پلی‌سیترونیک قطعه $F(ab`)_2$ که در جایگاه LIC کلون شده را نشان می‌دهد. و نیز شکل ۵ نتیجه هضم آنزیمی کاست ژنی PET-32 EK/ LIC -Anti HER-2 $F(ab`)_2$ را نشان می‌دهد. اندازه ساختار بیان شونده ۵/۹ کیلو باز بود. نتیجه هضم با آنزیم‌های NcoI و XbaI سه قطعه با اندازه‌های جداگانه ۳/۷ کیلوباز و ۱/۴ کیلوباز و ۷۰۰ جفت باز بود که در شکل ۵ نشان داده شده است. این امر کلون‌سازی موفقیت‌آمیز کاست ژنی در حامل بیان‌کننده PET-32 EK/LIC را تأیید می‌کرد. تجزیه و تحلیل نهایی با استفاده از تعیین توالی، موفقیت‌آمیز و جهت قرارگیری درست ساختار در فرودست جایگاه شکست توسط انتروکیناز را نشان داد (اطلاعات نشان داده نشده است).

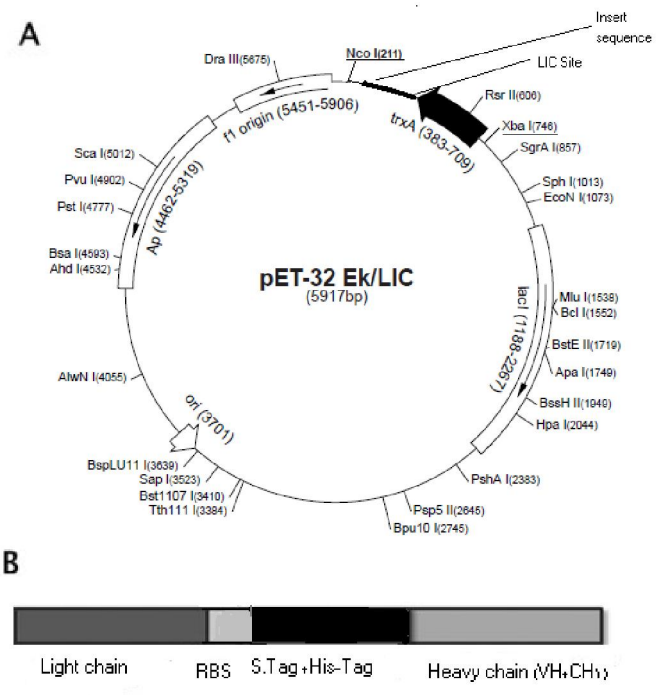
[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-12]

DOR: 20.1001.1.17359406.1393.7.2.1.1]



شکل ۳: محصولات مربوط به کلونی PCR،ربا استفاده از پرایمرهای اختصاصی حامل PET-32 EK/LIC.

محصولات روی ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز شد. ستون ۱ نشانگر ۱ کیلوبازی را نشان می‌دهد. ستون ۲ و ۳ محصولات کلونی PCR و ستون ۴ کنترل منفی را نشان می‌دهد.

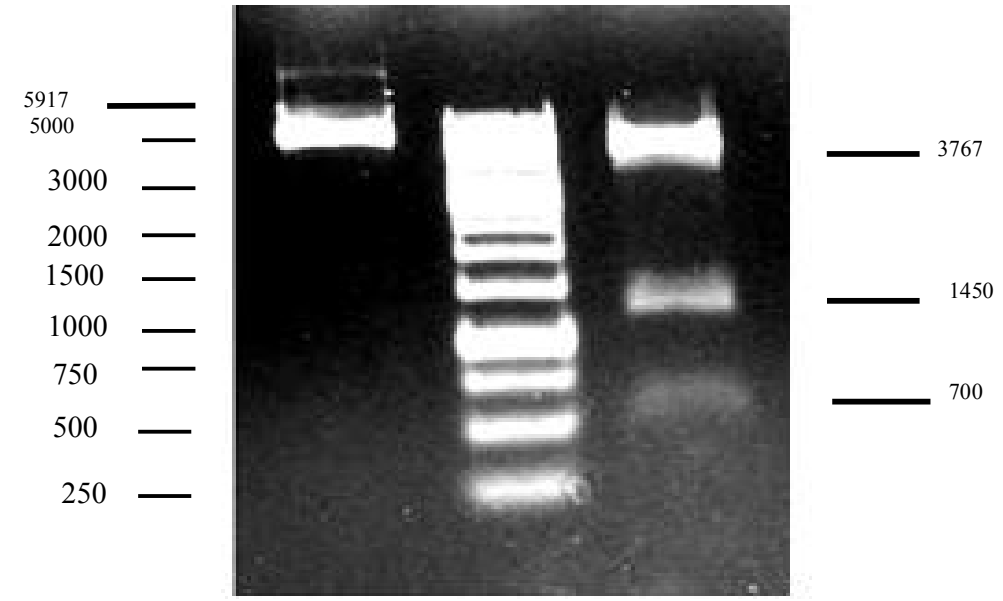


شکل ۴:

A: حامل بیانی PET-32 EK/LIC. (B): قطعه $F(ab`)_2$ در ساختار پلی سیترونیک نشان داده شده است.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1393.7.2.1.1]



شکل ۵: محصول هضم محدودالاثر قطعه $F(ab`)_2$ -PET32-EK/ LIC توسط آنزیم‌های NCOI و XbaI که سه قطعه را ایجاد می‌کند.

ستون ۱ کاست هضم نشده را نشان می‌دهد (۵/۹ کیلوباز). ستون ۲ نشانگر ۱ کیلوبازی را نشان می‌دهد. ستون ۳ قطعاتی را که توسط هضم آنزیمی NCOI و XbaI ایجاد شده‌اند را نشان می‌دهد (۳/۷ کیلوباز، ۱/۴ کیلوباز و ۷۰۰ جفت باز)

بحث

به دلیل مزیت‌های ارزشمند آنتی‌بادی‌ها و قطعات آنها به عنوان عوامل درمانی و تشخیص خصوصاً در تشخیص و درمان سرطان، بسیاری از تحقیقات در این زمینه به منظور جایگزینی میزبان‌های پستاندار با سیستم‌های اقتصادی‌تر و پیشرفته‌تر انجام شده است (۱۴). اخیراً قطعات آنتی‌بادی‌ها به عنوان مولکول‌هایی با مزیت‌های بیشتر نسبت به آنتی‌بادی‌های کامل ظاهر شده‌اند.

Batra و همکارانش گزارش کردند که قطعات کوچک آنتی‌بادی مانند scFv، Fab و $F(ab`)_2$ فارماکوکینتیک بهتری برای نفوذ به بافت در مقایسه با آنتی‌بادی کامل نشان می‌دهند. در ضمن این قطعات اختصاصیت کاملی برای اتصال فراهم می‌کند (۱۵). Allison و همکارانش گزارش کردند که قطعه $F(ab`)_2$ تمایل بالاتری برای اتصال به سطح آنتی ژن‌ها دارد. همچنین نیمه عمر سرمی بالاتری در مقایسه با قطعات کوچک‌تر دارد (۱۶). برطبق مطالعاتی که انجام گرفته است می‌توان این‌گونه بیان کرد که قطعه $F(ab`)_2$ مزیت‌های زیادی بر آنتی‌بادی کامل دارد، همچنین بهتر از قطعات کوچک‌تر به عنوان عاملی برای شیمی‌درمانی و اهداف تشخیصی عمل می‌کند. بنابراین ما تلاش کردیم که ساختار ژنی Anti HER-2 $F(ab`)_2$ را به منظور بیان در سیتوپلاسم میزبان باکتریایی بسازیم.

قطعه $F(ab`)_2$ را می‌توان با جدا کردن ناحیه FC از آنتی‌بادی‌های IgG، با کمک شکست پروتئولیتیک (۱۷) و یا با استفاده از دومین‌های مشتق از آنتی بادی‌های نوترکیب و با بیان در میزبان مناسب تولید کرد (۱۸).

یکی از مهم‌ترین مباحث در رابطه با تولید آنتی‌بادی و برخی از قطعات آن مانند قطعه $F(ab`)_2$ تشکیل ساختار صحیح و تاخوردگی مناسب پروتئین است. Jaenicke و همکارانش نشان دادند که ممکن است ترکیبی از باندهای دی سولفیدی متفاوت در پروتئین تشکیل شود. نوع شکل‌گیری باند دی‌سولفیدی بستگی به تعداد سیستئین‌ها

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-12]

DOR: 20.1001.1.17359406.1393.7.2.1.1]

در پروتئین اصلی (قبل تا خوردن) دارد. همچنین مقدار ترکیبات با افزایش تعداد باندهای دی سولفیدی پیوسته افزایش می‌یابد و نهایتاً امکان هتروژنیستی را افزایش می‌دهد (۱۹).

از آنجایی‌که قطعه $F(ab`)_2$ مربوط به آنتی‌بادی IgG-1 به طور طبیعی سه سیستئین در ناحیه لولا دارد ۱۵ راه مختلف برای اتصال این باندها وجود دارد. اگر باندها به طور تصادفی تشکیل شوند تنها یک پانزدهم از مولکول‌های پروتئین ایجاد شده شکل سه بعدی صحیح و در نتیجه فعال خواهند داشت. در این طرح، قطعه $F(ab`)_2$ با برخی اصلاحات در ناحیه لولا به منظور جلوگیری از تشکیل باند دی سولفیدی داخل زنجیره‌ای غیر صحیح طراحی شد.

بیان آنتی‌بادی‌ها و قطعات آنها در میزبان‌های مختلف مانند آسپرزیلوس نایجر (۲۰) گیاهان (۲۱) و مخمرها (۲۲) در برخی از مقالات با مقادیر و خصوصیات متفاوت گزارش شده است. یکی از میزبان‌هایی که در سال‌های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است باکتری‌ها هستند. ویژگی‌های مهم این میزبان عبارت‌اند از تولید محصول با مقادیر بالا، دوره‌های کوتاه‌تر تولید، کاهش هزینه‌های فرایندهای فرودستی، عدم احتیاج به مراحل غیرفعال‌سازی ویروس و محیط کشت پیچیده.

بیشتر گزارشات در خصوص تولید آنتی‌بادی در میزبان باکتریایی مربوط به قطعات آنتی‌بادی است.

Flamez و همکارانش کلون‌سازی زنجیره‌های سبک و سنگین مربوط به قطعه $F(ab`)_2$ را در پلاسمیدهای جداگانه گزارش کردند (۲۳). Carter و همکارانش بیان قطعه Fab را در سیستم پلی‌سیترونیک گزارش کردند و قطعه $F(ab`)_2$ آنتی‌بادی را با کمک تعاملات شیمیایی، از قطعات بیان شده تک ظرفیتی تهیه کردند (۲۴).

Simmons L.C و همکارانش قطعه $f(ab`)_2$ را با سیستم دی‌سیترونی بیان کردند. در این سیستم ژن‌های مربوط به زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی در یک پلاسمید و تحت کنترل پروموتورهای جداگانه قرار می‌گیرد (۲۵). همان‌طور که قبلاً اشاره شد ما تلاش کردیم تا ساختار پلی‌سیترونی $F(ab`)_2$ را تولید کنیم. ساختن کاست بیان‌شونده پلی‌سیترونیک ساده‌تر است و بیان آن از سیستم‌های چند سیترونی بهتر کنترل می‌شود چرا که ژن‌هایی که در کاست‌های بیان‌شونده پلی-سیترونیک هستند به جای چندین پروموتور تحت کنترل یک پروموتور هستند.

نتیجه‌گیری

سیستم طراحی شده در این پروژه قادر است رونوشت‌هایی بزرگ‌تر از ۱۰ کیلوباز در طول را تولید کند چرا که بیان ژن بر پایه رونویسی با آنزیم T_7 RNA پلیمراز است (۱۱). همان‌طور که قبلاً اشاره شد کلون‌سازی ساختار Anti HER-2 $F(ab`)$ به داخل حامل PET32 EK/ LIC با روش LIC، به راحتی و سریع انجام گرفت و از آنجایی‌که در این روش از آنزیم‌های محدودالاثر استفاده نمی‌شود تکنولوژی LIC به توالی ژن هدف وابسته نیست و اجازه کلونینگ کارآمد و صحیح را به هر ژنی می‌دهد.

References

1. Fang L, Barekati Z, Zhang B, et al. Targeted therapy in breast cancer: what's new?. Swiss Med Wkly 2011; 141:13231.
2. Steinitz M. Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments. Hum Antibodies 2009; 18:1-10.
3. Beck A, Wurch T, Corvaïa N. Editorial: therapeutic antibodies and derivatives: from the bench to the clinic. Curr Pharm Biotechnol 2008; 9: 421- 2.
4. Kelley B. Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. MAbs 2009; 1:443-52.
5. Natsume A, et al. Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. Cancer Res 2008; 68: 3863-72.
6. Franklin SE, Mayfield SP. Recent developments in the production of human

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1393.7.2.1.1]

therapeutic proteins in eukaryotic algae. Expert Opin Biol Ther 2005; 5: 225-35.

7. Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJM, Choudhury A, Batra SK. Pharmacokinetics and biodistribution of geneticallyengineered antibodies. Q J Nucl Med 1998; 42: 225-41.

8. Strohl WR. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. Curr Opin Biotechnol 2009; 20: 685-91.

9. Knappik A, Krebber C, Pluckthun A. The effect of folding catalysts on the in vivo folding process of different antibody fragments expressed in Escherichia coli. Biotechnology (N Y) 1993; 11:77-83.

10. Aslanidis C, de Jong PJ. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). Nucleic Acids Res 1990; 18:6069-74.

11. Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:4285-9.

12. Liu HY, Rashidbaigi A. Comparison of various competent cell preparation methods for high efficiency DNA transformation. Biotechniques 1990; 8(21): 24-5.

13. Humphreys DP, Vetterlein OM, Chapman AP, et al. F(ab')2 molecules made from Escherichia coli produced Fab' with hinge sequences conferring increased serum survival in an animal model. J Immunol Methods 1998; 217:1-10.

14. Li J, Zhu Z. Research and development of next generation of antibody-based therapeutics. Acta Pharmacol Sin 2010; 31:1198-207.

15. Batra SK, Jain M, Wittel UA, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. Curr Opin Biotechnol 2002; 13:603-8.

16. Allison DE, Gourlay SG, Koren E, et al. Pharmacokinetics of rhuMAb CD18, a recombinant humanised monoclonal antibody fragment to CD18, in normal healthy human volunteers. BioDrugs 2002; 16:63-70.

17. Andersen DC, Reilly DE. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. Curr Opin Biotechnol 2004; 15:456-62.

18. Verma R, Boleti E, George AJ. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. J Immunol Methods 1998; 216:165-81.

19. Jaenicke R, Rudolph R. Folding proteins. In: Creighton, T.E. _Ed.., Protein structure: A Practical Approach, 1st ed. IRL Press Oxford 1989; 191.

20. Ward M, Lin C, Victoria DC, et al. Characterization of humanized antibodies secreted by Aspergillus niger. Appl Environ Microbiol 2004; 70:2567-76.

21. Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, et al. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. Nat Biotechnol 1998; 16:1361-4.

22. Burtet RT, Santos-Silva MA, Buss GA, et al. Production of a recombinant Fab in Pichia pastoris from a Monocistronic expression vector. J Biochem 2007; 142: 665-9.

23. Flamez D, Remaut E, Fiers W. Production in Escherichia coli of a functional murine and murine: human chimeric F(ab')2 fragment and mature antibody directed against human placental alkaline phosphatase. J Biotechnol 1995; 42:133-43.

24. Carter P, Kelley RF, Rodrigues ML, et al. High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. Biotechnology (NY) 1992; 10:163-7.

25. Simmons LC, Reilly D, Klimowski L, et al. Expression of full- length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. J Immunol Methods 2002; 263:133-47.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-12]

DOR: 20.1001.1.17359406.1393.7.2.1.1]