

Optimization of the Refolding Process for Recombinant Anti-EGFR Immunotoxin Produced in the *Escherichia coli*

Akbari Bahman^{1*} 

¹Dept of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 08 June 2021
Revised: 26 June 2021
Accepted: 21 September 2021

*** Correspondence to:**
Bahman Akbari
Dept of Medical Biotechnology,
Faculty of Medicine, Kermanshah
University of Medical Sciences,
Kermanshah, Iran
Email: ba1389@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: Overexpression of the EGFR is associated with carcinogenesis, and it is observed in more than 70% of head and neck cancers. The expression of an immunotoxin against EGFR designed as an alternative to full antibody led to the production of aggregated protein in the form of inclusion bodies. This study aimed to investigate the 8M urea and 6M guanidine hydrochloride approaches for obtaining the immunotoxin as the soluble and effective form with correct folding.

Material & Methods: The BL21 (DE3) cells containing the pET28a-huimmunotoxin construct were induced by 1 mM IPTG at 37°C for 24 h, and the amount of expression was checked by SDS-PAGE. This immunotoxin was in the form of inclusion bodies and was solubilized individually in 8 M urea and 6 M guanidine hydrochloride and then purified by Ni-NTA affinity chromatography, which was observed as a single band in SDS-PAGE analysis. To correctly refold the obtained immunotoxin, the purified samples were poured into a dialysis bag, and denaturing agents were removed in a multi-step process called stepwise dialysis. The reactivity assessment of the purified and refold immunotoxin was assessed by ELISA technique using A431 cell lysate.

Findings: The immunotoxin (17 mg/ml) was expressed using the bacteria cells in the form of inclusion bodies. The refolded humanized immunotoxin had a high reactivity with A431 cells, indicating the suitable folding of the purified immunotoxin. The 50% binding activity rates of humanized immunotoxin obtained from urea and guanidine hydrochloride approaches were 0.8 and 1.7 µg/ml, respectively.

Discussion & Conclusion: The results of this study revealed that the urea approach was very effective in solubilizing and proper refolding of immunotoxins that were expressed in bacteria cells as inclusion bodies.

Keywords: Guanidine hydrochloride, Inclusion body, Refolding, Single chain antibody, Urea

➤ How to cite this paper

Akbari B. Optimization of the Refolding Process for Recombinant Anti-EGFR Immunotoxin Produced in the *Escherichia coli*. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;29(5): 63-74.



بهینه‌سازی فرایند ر فولدینگ ایمونوتوکسین ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی تولید شده در باکتری اشیشیا کلائی

بهمن اکبری*^۱ ID^۱ گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳۰

نویسنده مسئول:

بهمن اکبری

گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
Email: ba1389@yahoo.com

مقدمه: بیان بیش از حد EGFR با سرطان‌زایی همراه است و در بیش از ۷۰ درصد سرطان‌های سر و گردن دیده می‌شود. بیان ایمونوتوکسین ضد EGFR که به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بادی کامل طراحی شده است، به تولید پروتئین تجمع‌یافته موسوم به اینکلوژن‌بادی منجر می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی دو روش اوره ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار برای به دست آوردن ایمونوتوکسین به‌عنوان فرم محلول و با تاشدگی صحیح بود.

مواد و روش‌ها: سلول‌های BL21 (DE3) حاوی وکتور pET28a-huimmunotoxin توسط ۱ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت القا شد و میزان بیان توسط SDS-PAGE بررسی گردید. ایمونوتوکسین به‌دست آمده که به‌صورت اینکلوژن‌بادی بود، جداگانه در اوره ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار حل شد و سپس با کروماتوگرافی Ni-NTA خالص گردید که به‌صورت تک باند در SDS-PAGE دیده شد. برای ریفولد مناسب ایمونوتوکسین به‌دست آمده، نمونه‌های حاصل از تخلیص در کیسه دیالیز ریخته و طی یک فرایند چندمرحله‌ای موسوم به stepwise dialysis، عوامل دنا توره‌کننده حذف گردیدند. واکنش‌پذیری ایمونوتوکسین تخلیص‌شده ریفولدشده توسط تکنیک الایزا با استفاده از لایزت سلولی A431 ارزیابی گشت.

یافته‌ها: ایمونوتوکسین به مقدار 17mg/ml توسط باکتری به‌صورت اینکلوژن‌بادی بیان شد. ایمونوتوکسین انسانی ریفولدشده با سلول‌های A431 واکنش‌پذیری بالایی داشت که نشان‌دهنده تاشدگی مناسب ایمونوتوکسین خالص شده بود. فعالیت اتصال ۵۰ درصد ایمونوتوکسین انسانی شده به‌دست آمده از روش‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید، به ترتیب ۰/۸ و ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که روش اوره، روش مؤثری در محلول‌سازی و ایجاد فولدینگ مناسب در ایمونوتوکسین‌هایی است که در باکتری به‌صورت اینکلوژن‌بادی تولید می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: اوره، ایمونوتوکسین، اینکلوژن‌بادی، گوانیدین هیدروکلراید، ر فولدینگ

◀ **استناد:** اکبری، بهمن. بهینه‌سازی فرایند ر فولدینگ ایمونوتوکسین ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی تولید شده در باکتری اشیشیا کلائی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی ۱۴۰۰؛ ۲۹(۵): ۷۴-۶۳.

را پرکاربردترین سازواره پروکاریوتی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب کرده است (۵).

علی‌رغم این پتانسیل‌ها، پروتئین‌های نوترکیب مانند ایمونوتوکسین و آنتی‌بادی‌های تک‌زنجیره‌ای وقتی که توسط میزبان باکتریایی بیان شده باشند، تمایل بسیاری به درهم فرورفتن و تشکیل اینکلوزن‌بادی دارند (۵). اگرچه تشکیل اینکلوزن‌بادی نامطلوب به نظر می‌رسد؛ اما تشکیل آن‌ها می‌تواند مزایایی چون مقاومت پروتئین بیان‌شده در برابر تجزیه درون‌سلولی و سطوح بیانی بالا تا ۳۰ درصد مجموع پروتئین‌های سلولی را داشته باشد (۶).

ایجاد پروتئین فعال از اینکلوزن‌بادی با استفاده از عوامل دنا‌توره‌کننده‌ای از قبیل اوره و گوانیدین هیدروکلراید و سپس حذف این عوامل به صورت تدریجی امکان‌پذیر است (۹-۷)؛ در نتیجه، اگر یک روش ارزان، کارا و با بازدهی فراوان برای ری‌فولدینگ اینکلوزن‌بادی ایمونوتوکسین معرفی گردد، تولید آن توسط سیستم باکتریایی گسترش بیشتری خواهد یافت. برای بسیاری از پروتئین‌های دارویی، تشکیل صحیح پیوند دی‌سولفیدی برای داشتن فعالیت زیستی در ساختار فضایی سه‌بعدی ضروری است.

اینکلوزن‌بادی‌ها پروتئین‌های متراکم، کروی و جمع‌شده‌ای هستند که بیشتر در سیئوپلاسم پروکاریوت‌ها به علت بیان بیش‌ازحد پروتئین‌های با منشأ خارجی یا هترولوگ تشکیل می‌شوند (۱۰). پس از تخریب دیواره سلولی، اینکلوزن‌بادی از سایر بقایای سلولی توسط سانتریفوژ جدا می‌شود (۱۱). این توده پروتئینی ناخالص با استفاده از غلظت‌های بالای عوامل دنا‌توره‌کننده مانند اوره، گوانیدین هیدروکلراید، شوینده‌هایی مانند سدیم دودسیل سولفات و عوامل کاهنده اضافی مانند دی‌تیوتریتول حل می‌شود. پروتئین‌های حل‌شده طی حذف همین عوامل، شکل و ساختار خود را به دست می‌آورند و فرایند ری‌فولدینگ رخ می‌دهد (۱۲). تشکیل نادرست پیوندهای دی‌سولفیدی می‌تواند باعث فولدینگ

سرطان‌های جامد از جمله سرطان‌های کلورکتال، سر و گردن، ریه و سینه از عوامل بزرگ مرگ‌ومیر در دنیا هستند. روش‌های مرسوم درمان این دسته از بیماری‌ها شامل جراحی، شیمی‌درمانی، هورمون‌درمانی، رادیوتراپی و ایمونوتراپی است (۲، ۱). علاوه بر این، روش‌های دیگری نیز وجود دارند که در دو دهه اخیر به‌عنوان روش‌های نویدبخش در درمان سرطان ظاهر شده‌اند و تحت عنوان Targeted therapies شناخته می‌شوند (۳). گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) که به‌طور غیرعادی در اقسام مختلفی از سرطان‌های جامد انسانی به مقدار فراوان بیان می‌گردد، هدف مناسبی برای درمان هدفمند سرطان است (۴). می‌توان با استفاده از ایمونوتوکسین انسانی‌شده ضد این گیرنده، کارایی درمان را بالا برد. تولید ایمونوتوکسین انسانی‌شده در E.coli عمدتاً به‌صورت اینکلوزن‌بادی است؛ در نتیجه، ضرورت یافتن روش مناسبی برای تبدیل اینکلوزن‌بادی تولیدشده به ایمونوتوکسین با فولدینگ مناسب احساس می‌شود که میل اتصال و تمایل بالایی به آنتی‌ژن هدف داشته باشد.

با توسعه فناوری پروتئین نوترکیب، بیان ژن‌های خارجی در میزبان‌های سلولی امکان‌پذیر شد. این توانایی به پیشرفت شگرفی در تولید داروهای پروتئینی نوترکیب موسوم به زیست‌داروها منجر گشت. اصطلاح زیست‌دارو، نخستین بار در دهه هشتاد میلادی، برای توصیف دسته‌ای از پروتئین‌های دارویی تولیدشده با استفاده از روش‌های نوترکیب استفاده شد. زیست‌دارو تقریباً یک‌سوم داروهای درحال توسعه را تشکیل می‌دهد. فناوری DNA نوترکیب سرآغاز عصر جدیدی در علوم دارویی شد. انسولین انسانی اولین زیست‌داروی تولیدشده بود.

اشریشیاکلاهی اولین میزبان و مهم‌ترین سامانه بیانی استفاده‌شده در تولید داروهای نوترکیب است. زمان کوتاه تولید پروتئین خارجی، سادگی کار، دانش وسیع تخمیر و درنهایت، ظرفیت بالای تجمع پروتئین‌های خارجی تا بیش از ۲۰ درصد محتوای پروتئین سلولی، اشریشیاکلاهی

ایجاد فولدینگ و تاخوردگی صحیح در پروتئین‌های نو ترکیب مانند ایمونوتوکسین بود که در باکتری E.coli به صورت اینکلوژن‌بادی بیان شده‌اند.

مواد و روش‌ها

الف. کلون و بیان توالی کدکننده ایمونوتوکسین انسانی شده در E.coli

به منظور کلون و بیان توالی ایمونوتوکسین انسانی شده ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، از پلاسמיד pET-28a و باکتری E.Coil سویه BL21-DE3 استفاده شد. وکتور pET-28a که واجد توالی ایمونوتوکسین انسانی شده ضد EGFR بود، به درون باکتری E.coli سویه BL21-DE3 ترانسفورم گشته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت LB حاوی کانامایسین کشت گردید. برای القای بیان پروتئین، ایزوپروپیل دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) (Merck, Germany) با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه شد. به منظور یافتن بهترین زمان انکوباسیون پس از القا، انکوباسیون در زمان‌های مختلف ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶ ساعت و یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد و نتایج آن‌ها توسط SDS-PAGE آنالیز گردید.

پس از تأیید بیان ایمونوتوکسین توسط میزبان، تولید ایمونوتوکسین در مقیاس بزرگ (۲۰۰ میلی‌لیتر) انجام شد و کل پلت سلولی حاصل در ۶ میلی‌لیتر بافر لیزکننده سلول (Merck)، EDTA 2 mM (Carol Erba)، 50mM (pH 8.0) (Tris-HCl) حل گردید؛ سپس محلول سلولی تحت فرایند سونیکاسیون (۲۰ بار، هر بار ۳۰ پالس همراه با ۳۰ ثانیه توقف) قرار گرفت. در ادامه، MgSO₄ (Thermo)، 20 μg/ml DNase (Sigma-Aldrich)، 20 mM به محلول سونیکه شده اضافه گشت. پس از سونیکه کردن سلول‌ها، محلول حاصل سانتریفیوژ (۲۰۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه) شد تا اینکلوژن‌بادی‌ها از پروتئین‌های محلول جدا شوند؛ سپس سوپرناتانت و پلت به دست آمده توسط SDS-PAGE بررسی شد تا مشخص گردد که ایمونوتوکسین به صورت

نامناسب پروتئین و تشکیل توده شود و موجب تأثیر منفی بر زیست فعالی پروتئین دارویی گردد. تبدیل اینکلوژن بادی‌های نامحلول و غیرفعال به پروتئین محلول با صورت‌بندی صحیح و زیست فعال چالش اصلی در این موارد است.

بازیابی فراوان محصول از اینکلوژن‌بادی، در فرایندهای پایین‌دستی تولید پروتئین نو ترکیب، زمانی محقق خواهد شد که بتوان بازده فرایند ری‌فولدینگ (تغییر شکل پروتئین از حالت دناتوره به پروتئین با ساختار سوم صحیح) را برای تبدیل حداکثر پروتئین‌های حل شده به پروتئین‌های فعال زیستی افزایش داد. فرایند ری‌فولدینگ پروتئین‌ها مورد توجه صنایع داروسازی است. از اواخر دهه ۸۰ میلادی، پژوهش درباره فرایند ری‌فولدینگ آغاز شد (۱۳-۱۶). در بسیاری از پروتئین‌های دارویی، تشکیل صحیح پیوند دی‌سولفیدی برای داشتن فعالیت زیستی در ساختار فضایی سه‌بعدی ضروری است. تشکیل نادرست این پیوند، سبب فولدینگ نامناسب پروتئین می‌شود و موجب تأثیر منفی بر فعالیت زیستی دارو می‌گردد، به ویژه درباره پروتئین‌های بیان شده در اشریشیا کلائی این امر صادق است (۱۶).

سازوکار ری‌فولدینگ پروتئین‌ها به طور دقیق مشخص نشده است؛ اما به نظر می‌رسد که پروتئین‌ها ابتدا به صورت‌بندی‌ها و ساختارهای واسطی درمی‌آیند و سپس به ساختار طبیعی می‌رسند. صورت‌بندی پروتئین مشخصه‌ای از شکل سه‌بعدی و فعالیت آن است (۱۷). فرایند ری‌فولدینگ آسان نیست و اغلب نیازمند انجام آزمایش‌هایی همراه با حدس و خطا است (۱۸). مرحله ری‌فولدینگ مهم‌ترین مرحله برای به دست آوردن پروتئینی فعال از نظر زیستی است (۱۱). به علت فعالیت نداشتن ایمونوتوکسین در حالت اینکلوژن‌بادی و نیاز به یافتن روش مناسبی برای تبدیل ایمونوتوکسین‌های تولید شده به فرم اینکلوژن‌بادی به صورت فعال از نظر فعالیت زیستی، هدف از انجام این تحقیق، معرفی و بهینه‌سازی روشی مناسب، کارا و باصرفه اقتصادی برای

فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری واجد ایمونوتوکسین درون کیسه دیالیز ریخته شدند تا طی یک فرایند چندمرحله‌ای موسوم به روش Stepwise dialysis، به تدریج اوره از کیسه خارج گردد، به طوری که بر فولدینگ ایمونوتوکسین اثر منفی نگذارد، به این صورت که هر ۲۴ ساعت، از میزان اوره محلول اطراف کیسه دیالیز کاسته شد تا به صفر رسید (0M، 0.5M، 1M، 2M، 3M، 6M). همه بافرها pH=8 داشتند.

البته در مرحله 1M، برای ایجاد پیوند دی‌سولفیدی مناسب در ایمونوتوکسین و ایجاد فولد صحیح در آن، علاوه بر بافر رفرولدینگ محتوی 1 M urea، (Tris-Hcl(10 mM), NaH₂po₄(100 mM)، دو ماده 375 μM (Merck) و 400 mM L-Argenin (Merck) Oxidized glutathione(GSSG) نیز به محلول خارج از کیسه اضافه شدند؛ سپس فالكون حاوی کیسه دیالیز به مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۴ درجه انکوبه گردید. درنهایت، پس از مرحله 0M اوره، بافر درون فالكون حاوی کیسه دیالیز دور ریخته شد و ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS یک درصد که محتوی {NaH₂po₄(100 mM)(Merck) و Kcl (2.7 mM)(Merck) و Nacl (137 mM) (Merck) و { KH₂po₄(2 mM)(Merck) بود، به درون فالكون ریخته و مجموعه فوق به مدت یک شبانه‌روز در یخچال انکوبه گردید. در پایان، محلول حاوی ایمونوتوکسین رفرولد شده از کیسه خارج و غلظت آن با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد؛ سپس نمونه مدنظر در فریزر ۲۰- نگهداری گردید تا از آن در مرحله بعدی برای واکنش الیزا استفاده شود.

ج. حل کردن ایمونوتوکسین بیان شده به صورت اینکلوژن بادی در گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار، تخلیص ایمونوتوکسین حل شده و درنهایت، حذف تدریجی گوانیدین هیدروکلراید از مجاورت ایمونوتوکسین

پس از تأیید بیان شدن ایمونوتوکسین به صورت اینکلوژن بادی، ابتدا اینکلوژن بادی (پلت) حاصل از ۲۰۰

محلول بیان شده یا به صورت اینکلوژن بادی.

ب. حل کردن ایمونوتوکسین بیان شده به صورت اینکلوژن بادی در محلول اوره ۸ مولار، تخلیص ایمونوتوکسین حل شده و درنهایت، حذف تدریجی اوره از مجاورت ایمونوتوکسین

پس از تأیید بیان شدن ایمونوتوکسین به صورت اینکلوژن بادی، ابتدا اینکلوژن بادی (پلت) حاصل از ۲۰۰ میلی‌لیتر کشت باکتری در ۵ میلی‌لیتر بافر حل‌کننده اینکلوژن بادی ریخته شد که محتوی (Merck) NaH₂po₄(100mM) و Tris-Hcl(10mM) و اوره ۸ مولار (Merck) بود؛ سپس با ورتکس کردن، پلت کاملاً در این محلول حل و محلول حاضر به مدت یک شبانه‌روز در یخچال انکوبه گردید؛ پس از آن، با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا ناخالصی‌ها حذف شوند؛ سپس سوپرناتانت حاصل برای تخلیص توسط ستون نیکل استفاده گردید، بدین صورت که سوپرناتانت به آرامی به ستون تخلیص اضافه شد. فراکسیون به دست آمده از زیر ستون (Flow through) جمع‌آوری و برای بررسی بعدی توسط ژل SDS-PAGE، در دمای 4 C° نگه‌داری گردید؛ سپس دوباره ستون با 17ml بافر رفرولدینگ حاوی اوره ۸ مولار شسته شد و فراکسیون به دست آمده از زیر ستون در دمای 4 C° نگه‌داری گردید (First Wash). آنگاه ستون با 17 ml بافر رفرولدینگ حاوی ایمیدازول 25 mM برای جدا شدن پروتئین‌هایی که به طور غیراختصاصی به ستون چسبیده‌اند، شسته شد (Second Wash). در انتها، ستون با 5ml بافر رفرولدینگ حاوی ایمیدازول (Elution Buffer) 275 mM برای جدا کردن ایمونوتوکسین‌هایی که از طریق His-tag خود به ستون متصل بودند، شستشو داده شد و محلول حاصل در فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری جمع‌آوری و در یخچال نگه‌داری گردید.

پس از فرایند تخلیص، ۲۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های تخلیص شده موجود در فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری در چاهک‌های ژل SDS-PAGE ریخته شدند تا وجود ایمونوتوکسین در آنها اثبات شود؛ سپس

موسوم به روش Stepwise dialysis، به تدریج گوانیدین هیدروکلراید از کیسه خارج شود، به طوری که بر فولدینگ ایمونوتوکسین اثر منفی نگذارد، به این صورت که هر ۲۴ ساعت، از میزان گوانیدین هیدروکلراید موجود در محلول اطراف کیسه دیالیز کاسته شد تا به صفر رسید (0M، 0.5M، 1M، 2M، 3M، 6M).

البته در مرحله 1M، برای ایجاد پیوند دی-سولفیدی مناسب در ایمونوتوکسین و ایجاد فولد صحیح در آن، علاوه بر بافر ر فولدینگ (1 M Guanidine hydrochloride)، 1 mM EDTA at 100 mM Tris-HCl، 200 mM NaCl، دو ماده L-Argenin 400 mM و ۳۷۵ μM (pH 8.3)، به محلول خارج از Oxidized glutathione (GSSG) به محلول خارج از کیسه اضافه شدند؛ سپس فالكون حاوی کیسه دیالیز به مدت ۱ شبانه روز در دمای ۴ درجه انکوبه گردید. در نهایت، پس از مرحله 0M گوانیدین هیدروکلراید، بافر درون فالكون حاوی کیسه دیالیز دور ریخته شد و ۱۰ میلی لیتر بافر PBS یک درصد که محتوی KCl (2.7 و NaCl (137 mM) و NaH₂PO₄ (100 mM) و (KH₂PO₄ (2 mM) بود، به درون فالكون ریخته شد و مجموعه فوق به مدت یک شبانه روز در یخچال انکوبه گردید. در پایان، محلول حاوی ایمونوتوکسین ر فولد شده از کیسه دیالیز خارج و غلظت ایمونوتوکسین با دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد؛ سپس نمونه مدنظر در فریزر نگهداری گردید تا از آن در مرحله بعدی برای واکنش الیزا استفاده شود.

د. اندازه گیری واکنش پذیری و اختصاصیت ایمونوتوکسین ر فولد شده حاصل از روش های اوره و گوانیدین هیدروکلراید با تکنیک الیزای نسبی

میزان میل ترکیبی و واکنش پذیری ایمونوتوکسین ر فولد شده از هر دو روش، بر روی سلول های توموری A431 که به مقدار فراوانی EGFR را بیان می کنند، تعیین گردید، به این ترتیب که ابتدا این سلول های توموری در محیط کشت RPMI حاوی پنی سیلین/استرپتومایسین

میلی لیتر کشت باکتری در ۵ میلی لیتر بافر حل کننده ریخته شد که محتوی 6 M guanidine hydrochloride، 100 mM Tris-HCl، 1 (Merck)، 200 mM NaCl، 100 mM EDTA at pH=8.3 بود؛ سپس با ورتکس کردن، پلت کاملاً در این محلول حل گردید. آنگاه به آن محلول 10 mM mercaptoethanol (Merck) اضافه شد تا فرایند محلول شدن اینکلوژن بادی ها کامل گردد؛ سپس مجموعه حاضر به مدت ۱ شبانه روز در یخچال انکوبه شد. در نهایت، محلول مدنظر سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه) گردید تا هر نوع ماده محلول نشده ای حذف شود.

پس از سانتریفیوژ، از محلول رویی که حاوی ایمونوتوکسین حل شده بود، برای تخلیص در ستون Ni-NTA که حاوی ۲ میلی لیتر رزین-نیکل بود، استفاده گردید، به این صورت که این محلول رویی، به درون ستون نیکل ریخته شد. فراكسیون به دست آمده از زیر ستون (Flow through) جمع آوری و برای بررسی توسط SDS-PAGE در دمای 4 C° نگه داری گردید؛ سپس دوباره ستون با 17 ml بافر ر فولدینگ شسته شد و فراكسیون به دست آمده از زیر ستون در دمای 4 C° نگه داری گردید (First Wash). آنگاه ستون با 17 ml بافر ر فولدینگ حاوی ایمیدازول 25 mM برای جدا کردن پروتئین هایی شسته شد که به طور غیر اختصاصی به ستون چسبیده اند (Second Wash). در پایان، ستون با 5 ml بافر ر فولدینگ حاوی ایمیدازول 275 mM (Elution Buffer) شستشو داده شد تا ایمونوتوکسین هایی که از طریق His-tag خود به ستون متصل بودند، جدا و از ستون خارج شوند و در فراكسیون های ۱ میلی لیتری جمع آوری و در یخچال نگه داری گردیدند.

پس از فرایند تخلیص، ۲۰ میکرو لیتر از هریک از نمونه های تخلیص شده موجود در فراكسیون های ۱ میلی لیتری در چاهک های ژل SDS-PAGE ریخته شدند تا وجود ایمونوتوکسین در آن ها اثبات گردد؛ سپس فراكسیون های ۱ میلی لیتری واجد ایمونوتوکسین درون کیسه دیالیز ریخته شدند تا طی یک فرایند چند مرحله ای

با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک متوقف شد و در نهایت، میزان جذب هر چاهک در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. به منظور مقایسه میزان میل اتصالی و اختصاصیت آنتی‌بادی ریفولد شده با هر یک از روش‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید، از نرم‌افزار Sigma plot vol.14 برای رسم نمودار و محاسبه OD50% استفاده گردید.

یافته‌ها

کلون و بیان توالی کدکننده ایمونوتوکسین تک‌زنجیره‌ای انسانی شده در E.coli: وکتور pET-28a که واجد توالی ایمونوتوکسین انسانی شده ضد EGFR بود (شکل شماره ۱)، به خوبی درون باکتری E.Coil سویه BL21-DE3 ترانسفورم شد.

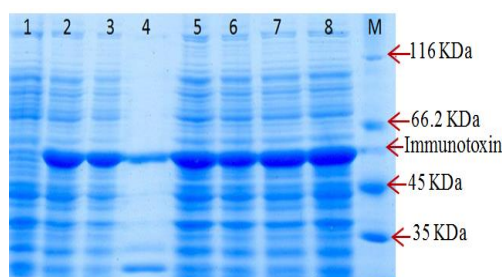
نتیجه کشت باکتری E.Coil سویه BL21-DE3 حامل وکتور واجد ژن ایمونوتوکسین در زمان‌های مختلف ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶ ساعت و یک شبانه‌روز نشان داد که انکوباسیون به مدت یک شبانه‌روز بهترین نتیجه را در پی دارد (شکل شماره ۲).

کشت داده شدند؛ سپس از سلول‌های کشت شده به میزان ۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت الیزا ریخته شد؛ پس از آن، پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور انکوبه گردید تا سلول‌ها به خوبی به کف چاهک‌ها بچسبند و رشد کنند و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی را در سطح خود به میزان مناسب تولید نمایند؛ سپس همه چاهک‌ها با محلول بلاکینگ (BSA 3%) بلاک گردیدند (انکوباسیون به مدت ۱ ساعت)؛ پس از آن، نمونه ایمونوتوکسین ریفولد شده با روش اوره ۸ مولار و نمونه ایمونوتوکسین ریفولد شده با روش گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار، در رقت‌های مختلف درون آن چاهک‌ها ریخته شد. پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، محلول درون چاهک‌ها دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه (Thermo) اضافه گردید که در اینجا، پروتئین anti-His-Tag کوئزوگه آنتی‌بادی ثانویه بود (انکوباسیون به مدت ۱ ساعت). آنگاه محلول درون چاهک‌ها دور ریخته شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (Thermo) (TMB) اضافه گردید. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، واکنش

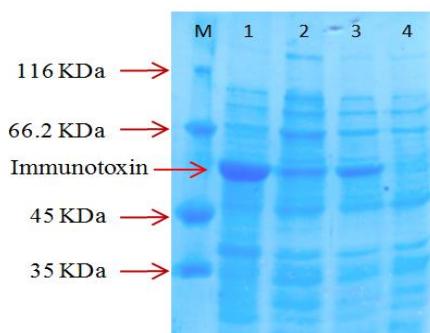
```

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSYGMGWFRRQAPGGLEAVAGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAAAAGSTWYGTLYEYDYWGQGLTVVSSGGGGSGGGGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDYVMGWFRQAPGG
LEAVAAISRNLTRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAANSAGTVVSPRSREYDYWGQGLTVVSSKASGGGR
HRQPRGWELPTGAFLDGGDVSFSTRGTQNWIVRLLQAHQLEERGVYVFGYHGTFLLEAAQSIVFGGVRAASQDLAAIWAQ
FYIAGDPLAAYGYAQDQEPDAAAGRIIRNGALLRVYVPASSLPGFYRTSLTLAAPEAAAGEVERLIGHPLPLALDAITGPEEEGRLETL
GWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKQAIASLPDYASQPGKPKKDEL
  
```

شکل شماره ۱. توالی ایمونوتوکسین انسانی شده ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی؛ آمینواسیدهای سیاه‌رنگ؛ توالی نانوبادی‌های انسانی شده ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی؛ آمینواسیدهای آبی‌رنگ؛ توالی لینکرها؛ آمینواسیدهای قرمز رنگ؛ توالی اگزوتوکسین A اصلاح شده سودوموناس آئروژینوزا (PE).



شکل شماره ۲. سنجش بیان ایمونوتوکسین به کمک ژل 12% SDS-PAGE حاصل از کشت باکتری در زمان‌های مختلف؛ ستون ۱. نمونه پیش از القا؛ ستون ۲. نمونه ۲ ساعت پس از القا؛ ستون ۳. نمونه ۴ ساعت پس از القا؛ ستون ۴. نمونه mAb (دارای اندازه مشخص به عنوان راهنمای اندازه پروتئین)؛ ستون ۵. نمونه ۶ ساعت پس از القا؛ ستون ۶. نمونه ۸ ساعت پس از القا؛ ستون ۷. نمونه ۱۶ ساعت پس از القا؛ ستون ۸. نمونه یک شبانه‌روز پس از القا؛ M: راهنمای اندازه پروتئین



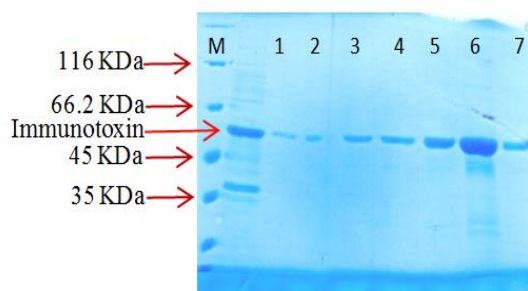
شکل شماره ۳. سنجش بیان پروتئین نوترکیب به کمک ژل SDS-PAGE 12%؛ ستون ۱. نمونه پلت ۲۴ ساعت پس از القا (القا با 1mM IPTG)؛ ستون ۲. نمونه سوپ ۲۴ ساعت پس از القا (القا با 1mM IPTG)؛ ستون ۳. نمونه ۲۴ ساعت بعد (القا با 1mM IPTG)؛ ستون ۴. نمونه پیش از القا؛ M. راهنمای اندازه پروتئین

دیالیز ریخته شدند و کار حذف تدریجی مواد دنا توره کننده (اوره ۸ مولار) صورت گرفت، به طوری که فولدینگ مناسب در ایمونوتوکسین ایجاد گردد و دوباره اینکلوژن بادی تشکیل نشود. در پایان، محلول درون کیسه دیالیز خارج و به کمک دستگاه نانودراپ، غلظت ایمونوتوکسین حاصل اندازه گیری شد که میزان آن 95g/ml بود؛ همچنین نمونه خارج شده از کیسه دیالیز برای انجام تست الیزا، در فریزر ۲۰- نگهداری گردید.

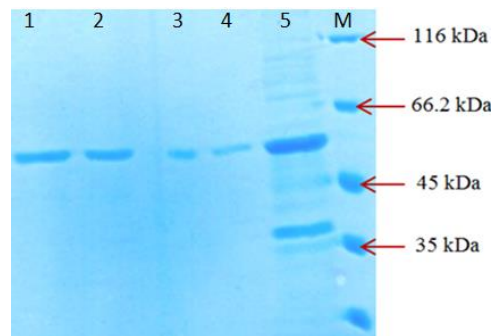
حل کردن ایمونوتوکسین بیان شده به صورت اینکلوژن بادی در محلول گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار، تخلیص ایمونوتوکسین حل شده و در نهایت، حذف تدریجی گوانیدین هیدروکلراید از مجاورت ایمونوتوکسین، بدون اثر منفی بر فولدینگ آن: نتیجه تخلیص در ژل SDS-PAGE 10% لود شد تا صحت تخلیص تأیید گردد (شکل شماره ۵). در فراکسیون های ۱، ۲، ۳ و ۴ حاصل از تخلیص، ایمونوتوکسین محلول شده موجود است

پس از انجام SDS-PAGE مشخص شد که ایمونوتوکسین عمدتاً به صورت اینکلوژن بادی و به مقدار بسیار ناچیز به شکل محلول در باکتری تولید شده است (شکل شماره ۳).

حل کردن ایمونوتوکسین بیان شده به صورت اینکلوژن بادی در محلول اوره ۸ مولار، تخلیص ایمونوتوکسین حل شده و در نهایت، حذف تدریجی اوره از مجاورت ایمونوتوکسین بدون اثر منفی بر فولدینگ: نتیجه تخلیص در ژل SDS-PAGE 10% ریخته شد تا صحت تخلیص تأیید گردد (شکل شماره ۴). همان طور که در ژل نیز مشاهده می شود، ستون نیکل توانسته است ایمونوتوکسین را که برچسب هیستیدینی داشت، به خوبی تخلیص کند. در همه فراکسیون های ۱ میلی لیتری حاصل از تخلیص ایمونوتوکسین حل شده با روش اوره ۸ مولار، ایمونوتوکسین وجود داشت (شکل شماره ۴)؛ در نتیجه، همه محتویات تیوب های تخلیص ۱ الی ۶ درون کیسه



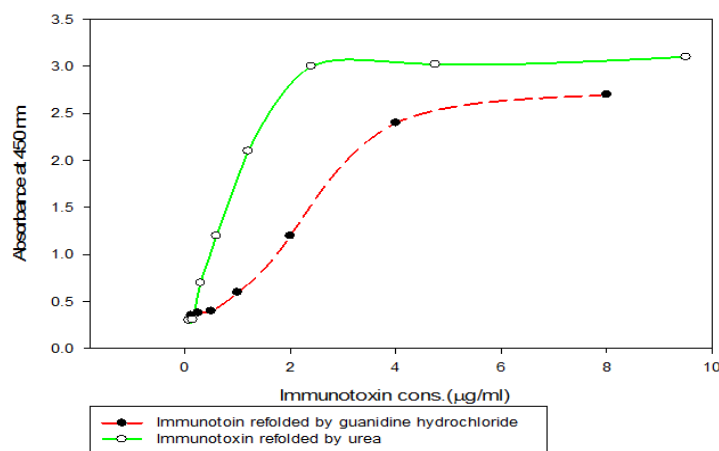
شکل شماره ۴. ژل SDS-PAGE 10% نمونه های تخلیص شده ایمونوتوکسین حل شده با روش اوره ۸ مولار؛ ستون ۱. تیوب تخلیص ۱؛ ستون ۲. تیوب تخلیص ۲؛ ستون ۳. تیوب تخلیص ۳؛ ستون ۴. تیوب تخلیص ۴؛ ستون ۵. تیوب تخلیص ۵؛ ستون ۶. تیوب تخلیص ۶؛ ستون ۷. تیوب تخلیص ۷؛ ستون ۸. نمونه پلت محلول شده؛ M. راهنمای اندازه پروتئین



شکل شماره ۵. ژل تخلیص ایمونوتوکسین حاصل از انحلال اینکلوژن بادی بیان شده توسط باکتری BL21(DE3)، با روش گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار؛ ستون ۱. فراکسیون تخلیص ۱؛ ستون ۲. فراکسیون تخلیص ۲؛ ستون ۳. فراکسیون تخلیص ۳؛ ستون ۴. فراکسیون تخلیص ۴؛ ستون ۵. نمونه پلت محلول شده؛ M. راهنمای اندازه پروتئین

ریفولد شده حاصل از اوره و گوانیدین هیدروکلراید با روش الیزای نسبی بر سلول‌های توموری A431: میزان میل اتصالی و واکنش پذیری ایمونوتوکسین ریفولد شده با روش‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر روی سلول‌های توموری A431 با روش الیزای نسبی صورت گرفت که نتیجه حاصل در شکل شماره ۶ نشان داده شده است. میزان میل اتصالی ایمونوتوکسین حاصل از روش اوره به مراتب بهتر و بیشتر از ایمونوتوکسین حاصل از روش گوانیدین هیدروکلراید بود، به طوری که میزان OD 50% ایمونوتوکسین ریفولد شده با روش اوره و روش گوانیدین هیدروکلراید، به ترتیب برابر $7/1 \mu\text{g/ml}$ و $8/0 \mu\text{g/ml}$ بود. در واقع، میزان میل اتصالی ایمونوتوکسین حاصل از روش اوره در مقایسه با ایمونوتوکسین حاصل از روش گوانیدین هیدروکلراید، حدود دو برابر بیشتر بود.

(شکل شماره ۵)؛ در نتیجه، همه فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری ۱، ۲، ۳ و ۴ درون کیسه دیالیز ریخته شدند و کار حذف تدریجی عامل دناتورکننده (گوانیدین هیدروکلراید) صورت گرفت، به طوری که فولدینگ مناسب در ایمونوتوکسین ایجاد گردد و دوباره اینکلوژن بادی تشکیل نشود. در پایان، محلول از درون کیسه دیالیز خارج و به کمک دستگاه نانودراپ (TM 2000, USA)، غلظت ایمونوتوکسین حاصل اندازه‌گیری شد که میزان آن $55 \mu\text{g/ml}$ بود. در مقایسه با مقدار ایمونوتوکسین حل شده توسط روش اوره، مقدار کمتری ایمونوتوکسین با روش گوانیدین هیدروکلراید به دست آمد (حدود ۶۰ درصد). نمونه خارج شده از کیسه دیالیز، برای انجام تست الیزا روی آن در مراحل بعدی، در فریزر ۲۰- نگهداری شد. اندازه‌گیری واکنش‌پذیری و اختصاصیت ایمونوتوکسین



شکل شماره ۶. میل اتصالی ایمونوتوکسین ریفولد شده با دو روش اوره و گوانیدین هیدروکلراید روی سلول‌های توموری A431 (تهیه شده با نرم افزار Sigma plot vol.14)

بحث و نتیجه گیری

پژوهش حاضر با هدف معرفی و بهینه سازی روشی مناسب، کارا و باصرفه اقتصادی برای ایجاد فولدینگ و تاخوردگی صحیح در پروتئین های نوترکیب مانند ایمونوتوکسین صورت گرفت که در باکتری E.coli به صورت اینکلوژن بادی بیان شده اند. به علت سهولت کار با سیستم های بیانی باکتریایی و میزان بیان بالای پروتئین نوترکیب توسط آن ها، این گونه میزبان ها برای تولید پروتئین های نوترکیب غیر گلیکوزیله مورد توجه قرار گرفته اند (۲۰، ۱۹). اگرچه سیستم باکتریایی برای تولید پروتئین های نوترکیب غیر گلیکوزیله به طور گسترده ای استفاده می شود، تولید محصول فعال به سبب ترشح ناکارآمد محدود شده و بیش از ۹۰ درصد از پروتئین های نوترکیب تولید شده داخل سلول باقی می ماند (۲۰). تجمع پروتئین در محیط احیای سیتوپلاسمی باعث ایجاد تجمعات پروتئینی نامحلول موسوم به اینکلوژن بادی می شود (۱۹). اینکلوژن بادی ها معمولاً در اثر بیش بیانی، تاخوردگی جزئی و ناکارآمد پروتئین نوترکیب و دسترسی نداشتن به چاپرون های مولکولی به وجود می آیند (۲۲، ۲۱). اینکلوژن بادی ها از واسطه های پروتئینی با فولد ناقص تشکیل می شوند و تجمعاتی از پلی پپتیدهای یک نوع را در برمی گیرند. پروتئین های درون تجمعات اینکلوژن بادی ها ساختار ثانویه ای مشابه پروتئین اصلی دارند. در بیشتر موارد، حدود ۲۷-۱۵ درصد پروتئین کل به صورت پروتئین فعال از نظر بیولوژیکی، از اینکلوژن بادی ها به دست می آید و در تولید پروتئین نوترکیب از E.coli موجب هزینه فراوانی می شود (۱۱).

تاکنون پروتکل های متعددی برای محلول کردن دوباره اینکلوژن بادی ها و به دست آوردن پروتئین فعال در آزمایشگاه ارائه شده است که در اغلب آن ها، اینکلوژن بادی به دست آمده در محلول دنا توره کننده حل می گردد و سپس دوباره ری فولد می شود (۲۳، ۱۱). روش های مرسوم برای فولدینگ دوباره پروتئین های نوترکیب نامحلول شامل Dialysis یا Dilution در حجم

فراوانی از بافر ری فولدینگ یا کروماتوگرافی است. داده هایی که از مقالات مختلف درباره افزایش فولدینگ مجدد از اینکلوژن بادی به دست آمده، بیانگر این است که اضافه کردن موادی با وزن مولکولی پایین به کاهش تجمع پروتئین ها کمک می کند. سورفاکتانت ها و دترجنت ها می توانند به ری فولدینگ دوباره پروتئین ها کمک کنند (۲۴). نتایج الیزای مطالعه ما نیز این موضوع را تأیید کرد که اضافه کردن موادی مانند Oxidized glutathione و آرژنین و استفاده از مواد دترجنت مانند اوره، تریس و سدیم دودسیل سولفات در تسهیل فرایند ری فولدینگ پروتئین نوترکیبی که به صورت اینکلوژن بادی تولید شده است، تأثیر مثبتی دارد؛ زیرا محصول نهایی به خوبی آنتی ژن هدف خود را بر روی سلول هدف شناسایی کرد. در مطالعه حاضر، از دو روش اوره ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار برای محلول سازی و ایجاد فولدینگ صحیح ایمونوتوکسین انسانی شده ای استفاده گردید که به صورت اینکلوژن بادی در باکتری E.coli تولید شده بود. هرچه میل اتصالی ایمونوتوکسین ایجاد شده از یک روش ری فولدینگ بیشتر باشد، به این معنی است که ایمونوتوکسین ری فولد شده ساختار و فولد صحیح تر دارد؛ در نتیجه می توان با تست الیزا، کارایی روش های ری فولدینگ متفاوت را باهم مقایسه کرد (۲۵). نتایج الیزای ایمونوتوکسین حاصل از فرایند ری فولدینگ نشان داد که میزان فعالیت اتصالی ۵۰ درصد ایمونوتوکسین حاصل از روش اوره، ۲ برابر کمتر از ایمونوتوکسین حاصل از روش گوانیدین هیدروکلراید بود. در واقع، این نتایج کارایی بیشتر روش اوره در ایجاد فولدینگ صحیح برای ایمونوتوکسین های انسانی شده را نشان داد که به صورت اینکلوژن بادی در میزبان باکتریایی بیان شده بودند.

همان طور که گفته شد، در مطالعه ما، ایمونوتوکسین به مقدار ۱۷mg/ml در میزبان باکتریایی به صورت اینکلوژن بادی بیان شد و روش اوره عملکرد خوبی در ایجاد فولدینگ مناسب در این اینکلوژن بادی ها داشت، به طوری که میزان میل اتصالی ایمونوتوکسین ری فولد شده با

در تضاد با نتایج به‌دست آمده در مطالعه ما که روش اوره برای ریفولدینگ اینکلوژن‌بادی مناسب‌تر بود، مطالعاتی وجود دارد که گزارش کرده‌اند روش گوانیدین عملکرد خوبی در ایجاد فولدینگ مناسب در اینکلوژن‌بادی‌های حاصل از بیان پروتئین نو ترکیب در باکتری داشته است. بوجنر و همکاران در مطالعه‌ای گزارش کرده‌اند که روش گوانیدین هیدروکلراید در ریفولد قطعات Fab آنتی‌بادی‌ها بسیار مؤثر است (۲۹). شاید علت این امر ماهیت متفاوت قطعات Fab آنتی‌بادی با ایمونوتوکسین و آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای باشد؛ زیرا قطعات Fab بزرگ‌تر هستند و ساختار متفاوتی با ایمونوتوکسین دارند؛ همچنین کیم در سال ۲۰۰۳ گزارش کرده است که ایمونوتوکسینی متشکل از یک آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای ضد (CEA) Carcinoembryonic antigen و آگزوتوکسین سودوموناس آئروژینوزا را که به صورت اینکلوژن‌بادی بیان شده بود، با روش گوانیدین هیدروکلراید به صورت محلول و فعال به‌دست آورده است، به طوری که میل اتصالی آن حفظ شده بود (۳۰).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در مقایسه با روش گوانیدین هیدروکلراید، روش اوره می‌تواند به‌عنوان روش کارا و مناسبی برای محلول‌سازی و ایجاد فولدینگ صحیح در ایمونوتوکسین و آنتی‌بادی‌های تک‌زنجیره‌ای استفاده شود که به صورت اینکلوژن‌بادی در میزبان باکتریایی بیان می‌گردند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات عزیزانی که در نگارش این مقاله همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافی در این مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.KUMS.REC.1398.568

روش اوره تقریباً دو برابر ایمونوتوکسینی بود که با روش گوانیدین ریفولد شده بود. مشابه چنین نتیجه‌ای در چندین مطالعه به‌دست آمده است. در یک مطالعه، سان و همکاران در سال ۲۰۱۴ توانستند مقدار فراوانی آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای را که به صورت اینکلوژن‌بادی در باکتری بیان شده بود با روش اوره، ریفولد کرده و آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای با افینیتی بالا در مقیاس mg ایجاد کنند (۲۶)؛ همچنین منز و همکاران در سال ۲۰۱۱، یک آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای ضد اینتیمین (anti-intimin scFv) را طراحی و در باکتری E.coli بیان کردند. از آنجا که عمده پروتئین بیان شده به صورت اینکلوژن‌بادی بود، این گروه با استفاده از روش اوره توانستند آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای با فولدینگ صحیح و افینیتی بالا را از این اینکلوژن‌بادی‌ها به‌دست آورند (۹).

همچنین پولیمینیدو و همکاران در سال ۲۰۰۸، در مطالعه‌ای برای تولید آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای (POM2 scFv) از روش اوره جهت ریفولد اینکلوژن‌بادی‌هایی استفاده کردند که طی بیان این آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای در باکتری E.coli Rosetta pLysS ایجاد شده بود. نتایج نشان داد که آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای ریفولد شده کارایی مناسبی در شناخت آنتی‌ژن هدف خود داشت. اکبری و همکاران در سال ۲۰۱۷، ایمونوتوکسین ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی را به صورت اینکلوژن‌بادی در میزبان باکتریایی بیان نمودند؛ سپس با استفاده از روش اوره و دیالیز مرحله به مرحله، اینکلوژن‌بادی‌ها را به ایمونوتوکسین فعال تبدیل کردند، به طوری که نتایج الیزای نسبی نشان از میل اتصالی قابل قبول ایمونوتوکسین ریفولد شده در مقایسه با آنتی‌بادی مرجع داشت (۲۷)؛ همچنین اکبری و همکاران در سال ۲۰۱۶، آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای انسانی شده ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی را که به صورت اینکلوژن‌بادی در باکتری بیان شده بود، با روش اوره و دیالیز مرحله به مرحله ریفولد کردند و آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای با میل اتصالی قابل قبول در مقیاس μg را به دست آوردند. در این مطالعه نیز از الیزای نسبی استفاده شده بود (۲۸).

References

- Mathew M, Verma RS. Humanized immunotoxins a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Sci*2009;100:1359-65. doi. 10.1111/j.1349-7006.2009.01192.x
- Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in cancer signaling mechanisms drugs and acquired resistance. *Cancers*2021;13:2748. doi.10.3390/cancers13112748
- Li YM, Hall WA. Targeted toxins in brain tumor therapy. *Toxins*2010;2:2645-62. doi.10.3390/toxins2112645
- Davies RL, Grosse VA, Kucherlapati R, Bothwell M. Genetic analysis of epidermal growth factor action: assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci*1980;77:4188-92. doi. 10.1073/pnas.77.7.4188
- Mckenna N. Challenges in scale up of antibody production companies overcoming obstacles in production process. *Genet Eng*2001;21:10.
- Li M, Su ZG, Janson JC. Invitro protein refolding by chromatographic procedures. *Prot Expr Pur*2004;33:1-10. doi.10.1016/j.pep.2003.08.023
- Tsumoto K, Shinoki K, Kondo H, Uchikawa M, Juji T, Kumagai I. Highly efficient recovery of functional single chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent application to a human single chain Fv fragment. *J Immunol Meth*1998;219:119-29. doi.10.1016/s0022-1759(98)00127-6
- Sinacola JR, Robinson AS. Rapid refolding and polishing of single chain antibodies from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Prot Expr Pur*2002;26:301-8. doi.10.1016/s1046-5928(02)00538-7
- Menezes MA, Aires KA, Ozaki CY, Ruiz RM, Pereira MC, Abreu PA, et al. Cloning approach and functional analysis of anti intimin single chain variable fragment. *BMC Res Notes*2011;4:1. doi.10.1186/1756-0500-4-30
- Zettlmeissl G, Rudolph R, Jaenicke R. Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry*1979;18:5567-71. doi.10.1021/bi00592a007
- Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*2005;99:303-10. doi. 10.1263/jbb.99.303
- Gerami SM, Farajnia S, Mahboudi F, Babaei H. Optimizing refolding condition for recombinant tissue plasminogen activator. *Iran J Biotechnol* 2011;9:253-9.
- Goodman M. Market watch sales of biologics to show robust growth through to 2013. *Nat Rev Drug Discov*2009; 8:837. doi.10.1038/nrd3040
- Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*2009;27:297-306. doi. 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
- Bhopale G, Nanda R. Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. *Curr Sci*2005;89:614-22.
- Zhang L, Chou CP, Mooyoung M. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by *Escherichia coli* expression system. *Biotechnol Adv*2011;29:923-9. doi.10.1016/j.biotechadv.2011.07.013
- Walsh G. Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Trend Biotechnol*2005;23:553-8. doi.10.1016/j.tibtech.2005.07.005
- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Prot Exp Pur*2003;28:1-8. doi.10.1016/s1046-5928(02)00641-1
- Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*2012;2012. doi.10.1155/2012/980250
- Weisser NE, Hall JC. Applications of single chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol Adv*2009;27:502-20. doi.10.1016/j.biotechadv.2009.04.004
- Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*2004;22:1399-408. doi.10.1038/nbt1029.
- Villaverde A, Carrio MM. Protein aggregation in recombinant bacteria biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett*2003;25:1385-95. doi.10.1023/a:1025024104862
- Yang Z, Zhang L, Zhang Y, Zhang T, Feng Y, Lu X, et al. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two step denaturing and refolding method. *PLoS One*2011;6:22981. doi.10.1371/journal.pone.0022981
- Oganesyan N, Kim SH, Kim R. On column chemical refolding of proteins. *Pharmacogenomics* 2004;4:22-5.
- Goldstein NI, Giorgio NA, Jones ST, Saldanha JW. Humanized anti EGF receptor monoclonal antibody. *Patents*; 2006;2:231-6.
- Sun H, Wu G, Chen Y, Tian Y, Yue Y, Zhang G. Expression production and renaturation of a functional single chain variable antibody fragment against human ICAM1. *Braz J. Med Biol Res*2014;47:540-7. doi.10.1590/1414-431x20143276
- 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 Drug*2017;28:263-70. doi. 10.1097/CAD.0000000000000452
- 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. *Prot Exp Pur*2016;127:8-15. doi.10.1016/j.pep.2016.06.001
- Buchner J, Rudolph R. Renaturation, purification and characterization of recombinant F ab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1991;9(2):157-62. doi.10.1038/nbt0291-157
- Kim SH. Expression and purification of recombinant immunotoxin a fusion protein stabilizes a single chain Fv in denaturing condition. *Prot Exp Pur*2003;27:85-9. doi. 10.1016/s1046-5928(02)00539