

## افزایش بیان گیرنده آنتی ژن کایمیریک بر سطح لنفوسیت های T به کمک الحاق ژنومی

فرنوش جعفری ایری سفلی<sup>۱</sup>، فاطمه رهبری زاده<sup>۲</sup>، محمد جواد رسایی<sup>۳</sup>، سید حمید آقایی بختیاری<sup>۴</sup>، سپیده خالقی<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

فعال سازی اختصاصی سیستم ایمنی به ویژه لنفوسیت های T، یکی از اهداف اساسی در حوزه ایمونوتراپی سرطان است. به منظور القای سلول های ایمنی فرد بیمار، از گیرنده های کایمیریکی که حاوی خاصیت اتصال ویژه به آنتی ژن ها هستند، استفاده شده است تا لنفوسیت های T سیتوتوکسیک را فعال کنند. گیرنده کایمیریک، متشکل است از قسمت متصل شونده به آنتی ژن از آنتی بادی که از طریق یک مولکول اتصال دهنده خارج سلولی به ناحیه داخل غشایی و نیز دومین های سیتوپلاسمی شروع کننده سیگنالینگ لنفوسیتی متصل می باشد. هدف از این بیان پایدار و افزایش یافته CAR (Chimeric Antigen Receptor) بر سطح سلول های T، فعال شدن مؤثر سیستم ایمنی بر علیه سلول های توموری بود.

#### مواد و روش ها

در یک مطالعه تجربی، نواحی متغیر آنتی بادی های زنجیره سنگین شتری (VHH یا نانوبادی) به جای قسمت هدف گیرنده آنتی ژن در ساختار گیرنده کایمیریک استفاده شد. برای بیان پایدار و افزایش یافته گیرنده کایمیریک حاوی VHH، از سیستم اینتگراز PhiC31 به منظور الحاق ژن گیرنده کایمیریک در داخل ژنوم سلول های T استفاده شد. سازه های بیان کننده گیرنده های کایمیریک و اینتگراز PhiC31 به داخل رده سلولی Jurkat، کوترانسفکت گردیدند و بیان گیرنده های کایمیریک در روزهای اول و سی ام بعد از ترانسفکشن، با روش semi-quantitative RT-PCR اندازه گیری شد.

#### یافته ها

نتایج تحقیق در روز سی ام نشان داد که کوترانسفکشن سازه های بیانی اینتگراز فاژ PhiC31 و سازه های حاوی CAR، منجر به بیان پایدار و افزایش یافته این گیرنده ها می شود.

#### نتیجه گیری

بر اساس نتایج تحقیق، آنزیم اینتگراز PhiC31، قابلیت استفاده در ایمونوتراپی به واسطه سلول های T حاوی گیرنده کایمیریک را دارد.

**کلمات کلیدی:** اینتگراز، کانسر، ایمونوتراپی

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱

تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۱

۱- دانشجوی PhD بیوتکنولوژی پزشکی - دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی - دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی - دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱

۳- PhD بیوشیمی - استاد گروه بیوتکنولوژی پزشکی - دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی - دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

## مقدمه

سرطان، یک مشکل تهدیدکننده حیات در سرتاسر جهان و یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر می‌باشد. سرطان‌ها از تکثیر کنترل نشده و انتشار کلون‌های سلول‌های تغییر یافته ایجاد می‌شوند. این احتمال که سرطان می‌تواند به وسیله پاسخ‌های ایمنی اختصاصی ریشه‌کن شود، در حال بررسی است. سلول‌های توموری، از سلول‌های میزبان منشأ می‌گیرند و بنابراین در بسیاری از موارد، شبیه سلول‌های طبیعی هستند. از سوی دیگر، اکثر تومورها، آنتی‌ژن‌های کمی را بیان می‌کنند که ممکن است به عنوان پیگانه شناسایی شوند و در نتیجه، اکثر تومورها، ایمونوژنیسیته ضعیفی دارند (۱، ۲). مکانیسم اصلی ایمنی تومور، کشتن سلول‌های توموری به وسیله لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک CD8+ (سل ترایی) است (۳، ۴). سه روش عمده برای T سل ترایی وجود دارد: الف) جداکردن سلول‌های T علیه یک آنتی‌ژن خاص از بدن فرد؛ در این روش سلول‌های T مستقیماً از بیوپسی تومور جدا می‌شوند. بعد از جداسازی لنفوسیت‌ها، عملکرد آن‌ها علیه آنتی‌ژن‌های سرطانی خاص ارزیابی می‌شود و لنفوسیت‌های انتخاب شده با کمک سایتوکاین‌ها در محیط کشت تکثیر شده و به بیمار منتقل می‌شوند. ب) تولید سلول‌های T علیه آنتی‌ژن‌های سرطانی با مهندسی ژنتیک (گیرنده سلول T).

ج) گیرنده آنتی‌ژن کایمیریک (CAR = Chimeric Antigen Receptor)؛ در این روش نواحی متغیر رشته‌های  $\alpha$  و  $\beta$  TCR با VH (ناحیه متغیر آنتی‌بادی از زنجیره سنگین) و VL (ناحیه متغیر آنتی‌بادی از زنجیره سبک) یک آنتی‌بادی منوکلونال جایگزین می‌شوند. با انتقال این گیرنده کایمیریک به سلول‌های T، این سلول‌ها قادر به شناسایی هدف‌های توموری خود و کشتن آن‌ها می‌باشند. از بین این سه روش در این تحقیق، از روش گیرنده کایمیریک استفاده شد.

دانشمندان بر آن بودند که خصوصیات منحصر به فرد سلول‌های T شامل نفوذ مؤثر در تومور، ترشح سایتوکاین و سایتوتوکسیسیته را با خصوصیات آنتی‌بادی (ویژگی بالا علیه آنتی‌ژن‌ها) ادغام کنند تا اختصاصی‌ترین پاسخ‌ها را

علیه تومورها ایجاد نمایند، به این منظور برای فایق آمدن به محدودیت‌های ایمونوترایی سلولی انتخابی و برای ایجاد روش درمانی که به افراد بیمار با نوع خاصی از سرطان وابسته نباشد، برای اولین بار در جهان ساخت گیرنده کایمیریک دارای نانو بادی در آزمایشگاه ما انجام شد، که از چهار جزء اصلی تشکیل شده است (۵، ۶). این اجزا شامل: الف) مولکول متصل شونده به آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی که در بیشتر مطالعه‌ها از آنتی‌بادی تک رشته‌ای (scFv = single-chain variable fragment) که از اتصال VL و VH با کمک متصل‌کننده (linker) پپتیدی به وجود می‌آید استفاده شده است ولی در این تحقیق به جای scFv از آنتی‌بادی تک دومینی شتری (VHH یا نانوبادی) استفاده شد.

ب) بازوی خارج سلولی فضا ساز (Extracellular spacer region) که در این مطالعه نواحی CH2 و CH3 مولکول IgG3 با یک و دو ناحیه لولا به عنوان بازوی خارج سلولی فضا ساز به کار گرفته شد.

ج) قطعه سیگنال دهنده که در این تحقیق CD3 $\zeta$  به عنوان قطعه سیگنال دهنده به کار رفت.

د) قطعه کمک محرک که در این تحقیق از قطعه CD28 به عنوان قطعه کمک محرک در ساخت گیرنده کایمیریک استفاده شد.

برای اولین بار اشهار و همکاران رویکرد گیرنده کایمیریک را بنا نهادند و در آن خصوصیات سلول‌های T با خصوصیات آنتی‌بادی تلفیق شد و برای اولین بار ویلکی و همکاران گزارش کردند که تومور مارکر MUC1 را می‌توان با سلول‌های بیان‌کننده گیرنده کایمیریک هدف‌گیری کرد (۸، ۷). آن‌ها از scFv که از هیبریدومای HMFG2 جداسازی شده بود و دومین‌های سیگنالینگ CD28 و CD3 $\zeta$  استفاده کردند و نشان دادند که در رشد تومورها در موش، تاخیر ایجاد شد (۸). هدف از این مطالعه بیان پایدار و افزایش یافته CAR بر سطح سلول‌های T جهت فعال شدن مؤثر سیستم ایمنی بر علیه سلول‌های توموری بود.

## مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. مشکل اصلی

گیرنده های کایمیریک، منشاء موشی مولکول scFv می باشد که در بدن انسان ایجاد ایمونوژنیسیته می کند (۹). برای حل این مشکلات باید از نوعی آنتی بادی که همولوژی بالایی با آنتی بادی های انسانی داشته و دارای اندازه کوچکی نیز باشد استفاده کرد. در سال ۱۹۹۳ در سرم انواع شترهای یک کوهانه و لاما، نوع منحصر به فردی از آنتی بادی هایی که فاقد رشته سبک هستند شناسایی شد. این آنتی بادی های شتری که به آنتی بادی های زنجیره سنگین (HCAb=Heavy Chain Antibody) معروف شده اند، نسبت به همتای خود در آنتی بادی های معمولی به علت غیاب اولین دومین CH1 وزن کمتری دارند و فقط از طریق تک دومین VH شان (که برای تفاوت نسبت به VH معمولی VHH گفته می شود)، به آنتی ژن وصل می شوند. به این ترتیب تک دومین VHH، کوچک ترین قطعه آنتی بادی متصل شونده به آنتی ژن است که قطعه کامل آن وزنی در حدود ۱۵-۱۲ کیلودالتون دارد (۱۱، ۱۰).

نانوبادی ها، ویژگی های منحصر به فردی دارند که باعث شده بتوان از آن ها جهت هدف گیری آنتی ژن های توموری استفاده کرد. از آن جمله می توان به ایمونوژنیسیته کم، تمایل و اختصاصیت بالا به آنتی ژن اشاره کرد (۱۳)، انسانی کردن رزیدوهای خاصی در مولکول نانوبادی (به خصوص در ۱۰ اسید آمینه سطحی آن ها)، اثری بر ویژگی های نانوبادی نداشته است و حتی در مواردی باعث پایدارتر شدن ساختار آن ها شده است (۹). در گروه تحقیقاتی ما، برای اولین بار از مولکول VHH یا نانوبادی به عنوان قطعه متصل شونده به آنتی ژن توموری در ساختار گیرنده های کایمیریک استفاده شده است (۱۴). آنتی ژنی که در مطالعه حاضر مورد هدف گیری قرار می گیرد، آنتی ژن MUC1 است که از آنتی ژن های سطحی در دسترس برای هدف گیری با آنتی بادی بوده و در طیف وسیعی از سرطان ها بیان آن مشاهده شده است.

مشکل دیگر این روش، الحاق ناخواسته و بیان پایین گیرنده کایمیریک در سلول های ترانسفکت شده است، که برای استفاده از آن ها در موارد کلینیکی و درمانی خوب نیست. ویجتز و همکارانش این گونه گزارش کرده اند که تراکم بالای گیرنده های کایمیریک روی سطح سلول های T،

منجر به لیز شدن بهتر سلول های توموری شده است (۱۵). تاکنون بیشتر از وکتورهای رتروویروسی به منظور بیان بالای این گیرنده ها بر روی سطح سلول استفاده شده است. به همین دلیل در این تحقیق تلاش شد که این گیرنده را به صورت پایدار و در محل های ویژه در داخل ژنوم الحاق کنیم تا بیان بالا و پایدار در سلول های T ایجاد شود. برای الحاق اختصاصی پلاسمید بیان کننده گیرنده کایمیریک، از آنزیم ایتگرز فاژ PhiC31 باکتری *Streptomyces lividans* استفاده شده است. ایتگرز PhiC31 منجر به الحاق پلاسمید در موقعیت های ترجیحی از ژنوم پستانداران می شود و باعث بیان پایدار و طولانی مدت ژن خارجی الحاق شده در ژنوم می گردد (۱۶).

ایتگرز فاژ PhiC31، موجب نو ترکیبی مؤثر بین توالی attP ژنوم فاژ و توالی attB در کروموزم باکتری می شود. هر دو این توالی ها یعنی هم attB و هم attP، تکرارهای معکوسی را دارند که ناحیه کراسینگ اور مرکزی را در بر می گیرند و آنزیم ریکامبیناز بعد از اتصال به این قطعات، موجب بریده شدن آن ها از مرکز (ناحیه کراسینگ اور) می شود. سپس این قطعات به یکدیگر متصل شده و به این ترتیب منجر به الحاق ژنوم فاژ در ژنوم باکتری می شوند.

نتایج مطالعه ها نشان می دهد که قطعاتی مشابه attB و attP، در ژنوم انسان و پستانداران وجود دارد که به ترتیب Pseudo attB و Pseudo attP نامیده می شوند و نو ترکیبی بین attB که در پلاسمید گذاشته شده است با Pseudo attB های ژنومی انسانی انجام می شود (۱۸، ۱۷).

بهترین راه برای استفاده از سیستم PhiC31 در سلول های پستانداران این است که attB را روی سازه ژنی که قرار است در ژنوم الحاق شود، قرار دهند تا در جایگاه های Pseudo attP موجود در ژنوم الحاق گردد. به منظور افزایش کارایی آنزیم ایتگرز PhiC31 و تسریع در ورود این آنزیم به هسته، توالی هدایت به هسته (NLS یا Nuclear Localization Signal) را به ناحیه انتهای C آن اضافه کردیم. این توالی اسید آمینه ای، امکان بازشناسی و انتقال پروتئین ها توسط کمپلکس منفذ هسته ای را فراهم می کند (۱۹).

حضور این ژن در پلاسמיד pCDNA3.1/HYGRO<sup>(+)</sup>، واکنش هضم آنزیمی و تعیین توالی بر روی وکتور حاصله انجام شد.

*انتقال هم زمان سازه‌های CAR و سازه‌های بیان‌کننده آنزیم ایتنگراز PhiC31 به سلول‌های Jurkat (E6.1):*

قدم بعدی در این تحقیق، آماده‌سازی رده سلولی لنفوسیتی T به منظور کوترانسفکشن آن‌ها توسط سازه‌های فوق بود. از رده سلولی Jurkat (E6.1) به این منظور استفاده شد. کشت سلول‌های Jurkat در محیط کشت RPMI-1640 (حاوی ۱۰٪ FBS) و در انکوباتور حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> صورت گرفت. به منظور ترانسفکشن سلول‌ها، از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (اینویتروژن) استفاده شد که برای ترانسفکشن سلول‌های یوکاریوتی، یک عامل بسیار مناسب به شمار می‌رود. محلول لیپوفکتامین حاوی زیر واحدهای لیپیدی است که در محیط آبی به شکل لیپوزوم در می‌آید و با ماده‌ای (DNA) که لازم است به داخل سلول ترانسفکت شود، کمپلکس تشکیل می‌دهد. این لیپوزوم‌های حاوی DNA، می‌توانند به غشای پلاسمایی سلول‌های زنده فیوژ شوند و به سلول وارد شوند، سپس اسیدهای نوکلئیک وارد سیتوپلاسم و یا هسته سلول (یعنی محل بیان یا رونویسی) می‌شوند. تفاوت استفاده از لیپوفکتامین و الکتروپوریشن در این است که در روش الکتروپوریشن، سلول‌ها در اثر جریان الکتریکی دچار مرگ و میر می‌شوند و در نتیجه نهایتاً میزان بازده ترانسفکشن پایین‌تر است، در حالی که در لیپوفکشن با استفاده از عوامل لیپیدی (مثل لیپوفکتامین)، انتقال اسیدهای نوکلئیک به درون سلول‌ها بدون آسیب رساندن به این سلول‌ها انجام می‌شود.

یک روز قبل از ترانسفکشن، در هر چاهک پلیت ۶ خانه، ۱۰<sup>۵</sup> × ۴/۸ سلول اضافه شد و روز بعد محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک ۶۱ mg/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ mg/mL استرپتومایسین) از روی سلول‌ها برداشته شد و سپس محیط بدون آنتی‌بیوتیک و حاوی ۱٪ FBS به آن‌ها اضافه شد. روز ترانسفکشن، ابتدا با محیط تازه RPMI-1640 بدون آنتی‌بیوتیک حاوی ۱٪ FBS، تعویض محیط انجام شد. ۸ میکرولیتر از لیپوفکتامین با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت

تکثیر قطعه attB و کلون کردن این قطعه به داخل سازه‌های حاوی CAR:

وکتورهای CAR pCMV-1 Hinge و pCMV-2 Hinge و CAR، وکتورهای بیان‌کننده گیرنده‌های کایمیریک هستند که گیرنده‌های کایمیریک آن‌ها از قطعات: ۱) CD3 به عنوان قطعه سیگنال‌دهنده، ۲) CD28 به عنوان قطعه کمک تحریک کننده ۳) ناحیه CH2 و CH3 با یک و دو منطقه لولا از مولکول IgG3 به عنوان ناحیه فضا‌ساز و ۴) منطقه VHH ویژه MUC1، تشکیل شده است (۹). برای الحاق ژن‌های این گیرنده‌ها به داخل ژنوم سلول‌های T، لازم است که قطعه attB به داخل این سازه‌ها کلون گردد. بدین منظور قطعه attB با استفاده از آغازگرهای attB جلو‌برنده: 5'- GTA CGA GAT CTG TCG ACA TGT AGG 3'- TCAC- attB معکوس: 5'- AGC TGA GAT CTT 3'- GCC CGC CGT GAC CG 3' و از روی سازه حاوی این قطعه یعنی سازه PTA-attB (Michele Calos) از دانشگاه استنفورد) توسط واکنش PCR تکثیر شد و پس از هضم آنزیمی قطعه attB و نیز سازه‌های CAR pCMV-1 Hinge و CAR pCMV-2 Hinge با آنزیم Bgl II، این قطعه به داخل سازه‌های مذکور کلون گردید. سپس با واکنش هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت.

*ساخت سازه pCMV-INT-NLS:*

در این تحقیق به منظور بررسی اثرات قطعه NLS (Nuclear Localization Signal) در انتقال PhiC31 به داخل هسته و نیز عملکرد ایتنگراز PhiC31 و به منظور بررسی بیان ژن INT-NLS تحت کنترل پروموتور CMV و هم چنین مقایسه آن با پروموتور CAG، ژن آنزیم و NLS را در وکتور pCDNA3.1/HYGRO<sup>(+)</sup> کلون نمودیم که روش این کلونینگ به شرح زیر است: توالی آنزیم و NLS (INT-NLS) از وکتور pCAG-INT-NLS (دکتر Ralf Kuehn از Institute of Developmental Genomics, Helmholtz, Germany) با استفاده از آنزیم XbaI که اولاً می‌توانست INT-NLS را به طور کامل خارج کند و ثانیاً در جایگاه کلونینگ (MCS) از pCDNA3.1/HYGRO<sup>(+)</sup> وجود داشته باشد، هضم کردیم. سپس این قطعه را در وکتور pCDNA3.1/HYGRO<sup>(+)</sup> ساب کلون نموده، جهت تایید

۱۶۴۰-RPMI خام (بدون FBS و آنتی بیوتیک) مخلوط شد. ۲/۵ µg از هر کدام از سازه های CAR و آنزیم ایتگراز با هم مخلوط و سپس به ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت ۱۶۴۰-RPMI خام (بدون FBS و آنتی بیوتیک) اضافه و به آرامی تکان داده شد.

محلول های حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از این مرحله، هر دو با هم مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و سپس کمپلکس نهایی قطره قطره در نقاط مختلف هر چاهک ریخته شد. بعد از انجام ترانسفکشن، ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه گردیدند. سپس محیط کشت سلول ها تعویض شد و این بار از محیط ۱۶۴۰-RPMI کامل (حاوی آنتی بیوتیک و ۱۰٪ FBS) استفاده شد. موارد تیمار سلولی شامل:

- ۱- سلول های بدون تیمار
- ۲- سلول های ترانسفورم شده با وکتور خالی / pCDNA3.1 / HYGRO (+)
- ۳- سلول ترانسفورم با سازه pCMV-1 Hinge CAR
- ۴- سلول ترانسفورم با سازه pCMV-2 Hinge CAR
- ۵- سلول های کو ترانسفورم با pCMV-1 Hinge CAR- attB و pCAG-INT-NLS
- ۶- سلول های کو ترانسفورم با pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCMV-INT-NLS
- ۷- سلول های کو ترانسفورم با pCMV-2 Hinge CAR-attB و pCMV-INT-NLS است.

#### بررسی بیان ژن در سطح mRNA:

به منظور بررسی بیان ژن گیرنده های کایمیریک در هر کدام از تیمار های مختلف، واکنش semi-quantitative RT-PCR صورت گرفت. برای این آزمون، تعداد ۵ × ۱۰<sup>۵</sup> از سلول های هر چاهک استفاده شد.

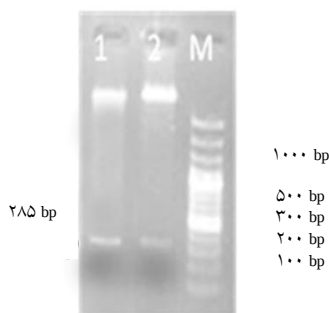
در این مرحله از سلول های تیمار شده و کنترل، تخلیص RNA صورت گرفت. بر روی mRNA ها، واکنش ساخت cDNA طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (شرکت فرمتاز) انجام شد. بر طبق این دستورالعمل بعد از اضافه کردن ۵/۰ µg آغاز گر oligodT به ۵۰۰ ng از Total

RNA و انکوباسیون در دمای ۷۰ °C به مدت ۵ دقیقه، به ترتیب آنزیم RT ، dNTP ، و RNase inhibitor اضافه شدند و مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ °C انکوبه گردید. در نهایت آنزیم Reverse transcriptase به مخلوط اضافه شد و مخلوط در دمای ۴۲ °C به مدت یک ساعت انکوبه گردید. سپس با استفاده از نمونه cDNA های تهیه شده، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای P2: 5'-TGC TCT AGA TGG CTG TTA GCG AGG-3' و P3: 5'-CCG CTC GAG TTT TGG GTG CTG GTG GTG GTT G-3' که قطعه پلاژید CD28-CD3 را تکثیر می کند، انجام شد.

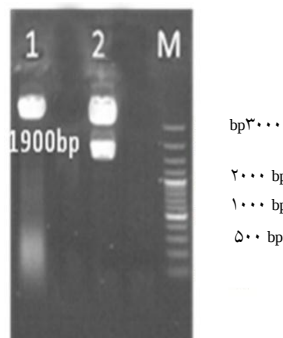
این قطعه در سلول های ترانسفکت نشده به دلیل عدم حضور گیرنده کایمیریک بیان نمی شود بنابراین میزان بیان آن در سلول های ترانسفکت شده، نشانگر میزان بیان در سلول هایی است که ترانسفکشن آن ها با موفقیت صورت گرفته است. در این تحقیق از بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و برای هر نمونه یک واکنش PCR نیز با آغازگرهای بتا اکتین جلوبرنده 5'-TCC CTG GAG AAG AGC TAC G-3' و معکوس 5'-GTA GTT TCG ATG CCA CA-3' انجام شد.

#### ارزیابی محصول PCR:

برای ارزیابی نتایج PCR، از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز و آنالیز با نرم افزار Uvitec استفاده گردید. تمام مراحل تخلیص RNA، ساخت cDNA و انجام PCR در روز یک و نیز روز سی بعد از ترانسفکشن انجام و تکرار شد. تخلیص RNA با استفاده از کیت MN (آلمان، Macherey Nagel) طبق دستورالعمل زیر انجام شد. پس از لیز سلولی با بافرهای لیزکننده، لیزات سلولی بر روی ستون های سیلیکا ژل برده شد و بعد از چندین مرحله شستشو توسط محلول های موجود در کیت، در نهایت RNA از ستون جدا شده و در آب مقطر عاری از آنزیم RNase حل گردید. میزان کمی RNA استخراج شده با قرائت جذب نوری (OD) آن در ۲۶۰ nm اندازه گیری شد. برای ساخت cDNA برای این که به میزان مساوی RNA برای همه واکنش ها استفاده شود، از نمونه حاوی کمترین غلظت، ۱۰۸ برداشته شد و از طریق فرمول N1V1=N2V2



شکل ۲: نتیجه هضم آنزیمی تایید کلونینگ قطعه attB. ستون ۱ پلاسمید pCMV-1 Hinge CAR-attB و ستون ۲ پلاسمید pCMV-2 Hinge CAR-attB را نشان می‌دهد. M نمایانگر مارکر است.



شکل ۳: نتیجه هضم آنزیمی وکتورهای pCAG-INT-NLS و pCDNA3.1/Hygro(+) با آنزیم XbaI. ستون ۱ نمایانگر وکتور و ستون ۲ نشانگر خطی شده و ستون ۳ نشانگر وکتور pCAG-INT-NLS است که قطعه INT-NLS از آن خارج شده است. M نمایانگر مارکر است.

#### نتیجه ساخت سازه pCMV-INT-NLS:

سازه‌های pCAG-INT-NLS و pCDNA3.1/ HYGRO (+) هر دو توسط آنزیم XbaI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند که در نتیجه آن وکتور pCDNA3.1 خطی می‌شود و از وکتور pCAG-INT-NLS ژن INT-NLS که ۱۹۰۰ bp است خارج می‌شود (شکل ۳). وکتور pCDNA3.1/ HYGRO (+) خطی شده و قطعه INT-NLS از روی ژل تخلیص شدند. وکتور حاصل (pCMV-INT-NLS) با تعیین توالی و هضم آنزیمی تایید شد.

نتایج اندازه‌گیری میزان بیان در روز یک و سی/م بعد از ترانسفکشن:

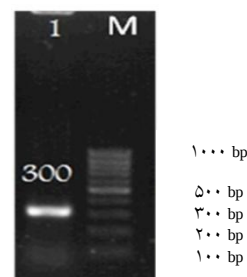
نتایج حاصل از بیان mRNA در روز یک در سلول‌های

مقادیر لازم برای بقیه موارد محاسبه شد. به این ترتیب برای واکنش‌های ساخت cDNA، مقادیر مساوی RNA ریخته شد و سپس واکنش PCR بر روی cDNA حاصل از مرحله قبل انجام شد. میزان بیان توسط نرم‌افزار Uvitec اندازه‌گیری شد و اعداد، نمایانگر میزان بیان گیرنده کایمیریک و کنترل داخلی بتا اکتین، برای رسم نمودار به کار گرفته شدند.

#### یافته‌ها

نتیجه تکثیر قطعه attB و کلون کردن این قطعه به داخل سازه‌های pCMV-1 Hinge CAR و pCMV-2 Hinge CAR:

بعد از انجام PCR، محصول بر روی ژل ۱٪ برده شد و در ناحیه حدود ۲۸۵ bp باند، قطعه attB مشاهده شد (شکل ۱). این قطعه سپس در سازه‌های pCMV-1 Hinge CAR و pCMV-2 Hinge CAR کلون شد. برای تایید کلونینگ با روش هضم آنزیمی، از آنزیم BglII استفاده شد. سازه‌ها قبل از کلونینگ دارای یک جایگاه برش برای آنزیم BglII می‌باشند. در صورتی که قطعه attB وارد سازه شده باشد، آنزیم BglII در دو جایگاه وکتور را می‌شکند و یک باند ۲۸۵ جفت بازی از سازه خارج خواهد شد. محصول واکنش هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شده و خروج باند ۲۸۵ جفت بازی در اثر هضم تایید شد (شکل ۲). پس از تایید کلونینگ به روش هضم آنزیمی، بر روی دو نمونه سازه حاوی attB (pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCMV-2 Hinge-attB) تعیین توالی انجام شد (شرکت فزایوتک) و نتیجه تعیین توالی مؤید عمل کلونینگ بود.

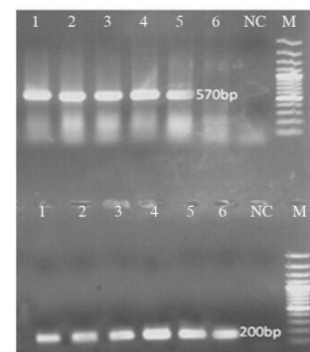


شکل ۱: نتیجه تکثیر قطعه attB. ستون ۱ نمایانگر باند ۲۸۵ bp قطعه attB می‌باشد و M نمایانگر مارکر است.

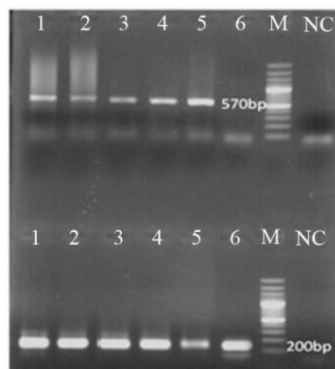
جدول ۱: میزان بیان CD28-ZETA و بتا اکتین در سلول های Jurkat در روز ۱ و ۳۰ بعد از ترانسفکشن

| تیمارهای مختلف                       | بیان CD28-ZETA روز ۱ | بیان بتا اکتین روز ۱ | بیان CD28-ZETA روز ۳۰ | بیان بتا اکتین روز ۳۰ |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| pCMV-1 hinge CAR                     | ۵۳۳۳۶ ± ۴/۶          | ۲۶۵۴۱ ± ۳/۴          | ۷۳۹۸ ± ۲/۵            | ۲۶۲۵۴ ± ۴/۶۱          |
| pCMV-2 hinge CAR                     | ۴۹۴۴۳ ± ۴/۲          | ۲۶۳۳۷ ± ۳/۸          | ۱۵۸۲ ± ۲/۳            | ۲۶۴۹۶ ± ۵             |
| pCMV-1 و pCAG-INT-NLS hinge CAR-attB | ۴۹۶۹۴ ± ۴/۳          | ۲۶۹۴۵ ± ۳/۵          | ۲۵۲۶ ± ۲/۵            | ۲۶۳۴۳ ± ۴/۲           |
| pCMV-1 و pCMV-INT-NLS hinge CAR-attB | ۳۷۷۰۳ ± ۳/۸          | ۲۶۷۲۹ ± ۳/۵          | ۸۴۱۶ ± ۳/۲            | ۲۶۳۱۰ ± ۳/۸           |
| pCMV-2 و pCMV-INT-NLS hinge CAR-attB | ۶۱۸۲۰ ± ۴/۵          | ۲۶۷۲۵ ± ۳/۸          | ۴۰۰۴۷ ± ۲/۶           | ۲۷۰۰۵ ± ۴/۳           |
| pCDNA3.1 HYGRO (+)                   | ۰ ± ۰                | ۲۶۷۰۰ ± ۴/۱          | ۰ ± ۰                 | ۲۶۳۹۴ ± ۳/۵           |

کو ترانسفکشن وکتورهای Hinge CAR – attB pCMV-2 و pCMV-INT-NLS حدوداً سی برابر بیشتر از pCMV-2 Hinge CAR بدون ایتگرز می باشد و این نتایج به وضوح قدرت Integrase-NLS را در افزایش بیان و نیز پایداری بیان نشان می دهد (شکل های ۴ و ۵ و جدول ۱).



شکل ۴: نتایج PCR سلول های Jurkat در روز ۱ بعد از ترانسفکشن. ستون ۱ نمایانگر PCR روی نمونه pCMV-1 Hinge CAR، ستون ۲ نمایانگر PCR روی نمونه pCMV-2 Hinge CAR، ستون ۳ نمایانگر PCR روی نمونه کو ترانسفکشن pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCAG-INT-NLS، ستون ۴ نمایانگر PCR روی نمونه کو ترانسفکشن pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCMV-INT-NLS، ستون ۵ نمایانگر PCR روی نمونه کو ترانسفکشن pCMV-2 Hinge CAR-attB و pCMV-INT-NLS، ستون ۶ نمایانگر PCR روی نمونه pCDNA3.1/HYGRO(+) است. NC نمایانگر سلول های تیمار نشده و M نمایانگر مارکر است و ردیف پایین عیناً نمونه های ردیف بالا است ولی با آغازگرهای بتا اکتین.



شکل ۵: نتایج PCR سلول های Jurkat در روز ۳۰ بعد از ترانسفکشن. ستون ۱ نمایانگر PCR روی نمونه pCMV-1 Hinge CAR و ستون ۲ نمایانگر PCR روی نمونه pCMV-2 Hinge CAR، ستون ۳ نمایانگر PCR روی نمونه کو ترانسفکشن pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCAG-INT-NLS، ستون ۴ نمایانگر PCR روی نمونه کو ترانسفکشن pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCMV-INT-NLS، ستون ۵ نمایانگر PCR روی نمونه کو ترانسفکشن pCMV-2 Hinge CAR-attB و pCMV-INT-NLS، ستون ۶ نمایانگر PCR روی نمونه pCDNA3.1/HYGRO(+) است. NC نمایانگر سلول های تیمار نشده و M نمایانگر مارکر است و ردیف پایین عیناً نمونه های بالا است ولی با آغازگرهای بتا اکتین.

Jurkat، دال بر این است که نتایج کو ترانسفکشن وکتورهای pCMV-INT و pCMV-1 Hinge CAR-attB، ۱/۵ برابر بیشتر از تیمار بدون ایتگرز است و نتایج بیان mRNA بقیه حالات کو ترانسفکشن، بیشتر و یا حداقل برابر تیمار بدون ایتگرز است در حالی که در روز سی، نتایج

## بحث

در طی دهه گذشته، ایمونوتراپی یکی از محورهای توجه در درمان سرطان بوده است و دانشمندان امید فراوانی به درمان سرطان با این روش دارند. پیشرفت‌های دانش ما از سیستم ایمنی و نیز شناسایی آنتی‌ژن‌های موجود بر روی سلول‌های توموری، باعث پیشبرد استراتژی‌های جدید در ایمونوتراپی شده و ایمونوتراپی را به یکی از اختصاصی‌ترین روش‌های درمان سرطان تبدیل نموده است (۲۰). یکی از روش‌های مهم در درمان ایمونوتراپی غیر فعال، ایمونوتراپی سلولی انتخابی می‌باشد. ایمونوتراپی سلولی نیز خود دارای استراتژی‌های متنوعی است که یکی از این استراتژی‌ها، استفاده از گیرنده‌های کایمیریک در سطح سلول‌های T می‌باشد. در این روش از اختصاصیت آنتی‌بادی، برای شناسایی آنتی‌ژن‌های سرطانی و خصوصیت ترشح سایتوکاین و کشندگی سلولی لنفوسیت‌های T استفاده می‌شود. با استفاده از یک سازه ژنی حاوی گیرنده کایمیریک، سلول‌های T قابلیت شناسایی آنتی‌ژن‌های سرطانی مختلف را به دست می‌آورند. در این سازه ژنی، آنتی‌بادی نقش شناسایی آنتی‌ژن را به عهده دارد و قسمت‌هایی که از لنفوسیت T جدا شده‌اند (CD28 و CD3) نقش ایجاد پیام در لنفوسیت T را دارا هستند. ایجاد پیام نهایتاً در لنفوسیت T منجر به فعالیت سیتوتوکسیسیته می‌شود (۲۱، ۲۲). برای اولین بار اشهار و همکاران، گیرنده کایمیریک هتروداایمر را در سال ۱۹۸۹ با جایگزینی ژن‌های ناحیه متغیر رشته‌های  $\alpha$  و  $\beta$  TCR با VH و VL یک آنتی‌بادی مونوکلونال در دو سازه مجزا ابداع کردند (۲۲). سپس این سازه‌ها به داخل سلول‌های T ترانسفکته شدند و با انتقال این گیرنده به سلول‌های T، این سلول‌ها قادر به شناسایی هدف‌های توموری خود و کشتن آن‌ها گردیدند. اولین طراحی گیرنده کایمیریک اثبات کرد که سلول‌های T بیان‌کننده این گیرنده‌ها، می‌توانند فعال شوند و هدف سلولی خود را در یک مسیر غیر وابسته به MHC لیز کنند. در سال ۱۹۹۳، نسل دوم گیرنده‌های کایمیریک پا به عرصه ظهور گذاشت که در آن‌ها اشهار و همکاران از آرایه تک زنجیره‌ای برای ساخت گیرنده کایمیریک استفاده کردند. در این روش، scFv یک آنتی‌بادی، از طریق یک رابط خارج

سلولی به دومین‌های داخل غشایی و داخل سلولی سلول‌های T متصل شده است. این آرایه جدید، شناسایی آنتی‌بادی را با پیام‌رسانی سلول‌های T با یک پروتئین منفرد انجام می‌دهد. یکی از موارد عدم موفقیت در استفاده از گیرنده‌های کایمیریک که در بسیاری از کارآزمایی‌های بالینی هم به آن برخورد شده است، مشکل ایمونوژنیسیته scFv با دلیل منشا موشی آن است. هر چند که پیشرفت‌های فراوانی در انسانی کردن این آنتی‌بادی‌ها صورت گرفته است ولی هنوز هم این آنتی‌بادی‌ها ایمنی‌زا هستند (۲۳، ۱۷). آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین طبیعی سرم شترسانان که فاقد زنجیره سبک و دومین CH1 می‌باشند، دارای خصوصیات منحصر به فردی از نظر حلالیت و پایداری هستند که می‌توانند جایگزینی مناسب برای scFv در گیرنده کایمیریک باشند. قطعه آنتی‌بادی تک دومینی (VHH)، ویژگی بسیار خوبی برای آنتی‌ژن‌های مربوطه دارند و از نظر ویژگی و تمایل، قابل مقایسه با scFv هستند. از طرف دیگر و مهم‌تر این که VHH شباهت بسیار زیادی با اعضای خانواده VH3 انسانی دارد که به جهت همولوژی بالا، بر خلاف scFv ایمونوژنیسیته ایجاد نمی‌کند. ضمناً VHH به خاطر اندازه بسیار کوچک، قابلیت شناسایی اپی‌توپ‌های منحصر به فرد فضایی که از دسترس بقیه انواع آنتی‌بادی دور هستند را دارد. با در نظر گرفتن خصوصیات VHH، برای حل مشکل ایمنی‌زایی گیرنده‌های کایمیریک و به منظور کوچک کردن اجزای این گیرنده در آزمایشگاه، به جای scFv از VHH برای ساخت گیرنده کایمیریک استفاده شد. به این منظور در گام اول، آنتی‌بادی نوترکیب تک دومینی، از کتابخانه ژنی شتر ایمن شده با بافت‌های سرطانی و آنتی‌ژن سرطانی MUC1 جدا سازی شد. قطعه CD3 به عنوان قطعه سیگنال دهنده، CD28 به عنوان قطعه کمک محرک و ناحیه CH2 و CH3 با یک و دو ناحیه لولا از مولکول IgG3 به عنوان ناحیه فضا‌ساز انتخاب شدند و به داخل وکتور pCMV-1/HYGRO(+)/pCDNA3.1 کلون و سازه‌های pCMV-2 Hinge CAR و Hinge CAR ساخته شدند (۱۴). مشکل دیگر استفاده از گیرنده‌های کایمیریک، الحاق ناخواسته و بیان پایین آن‌ها در سلول‌های موقتاً ترانسفکت

شده، می باشد. به عبارتی چون پلاسמיד در داخل سلول های یوکاریوتی تکثیر نمی شود، بعد از ترانسفکشن به مرور زمان تعداد سلول های T حاوی پلاسמיד نوترکیب ضمن تکثیر سلول ها، رقیق و کم خواهند شد. از طرفی حتی در مواردی که الحاق تصادفی (Random Integration) وجود دارد، پلاسמיד یوکاریوتی در محل های نامشخص و حتی شاید نزدیک به ژن های انکوژن الحاق می شود که برای استفاده از سلول های T ترانسفکت شده حاوی وکتور دارای گیرنده کایمیریک، یک مشکل عمده محسوب می شود. در راستای حل این مشکل، در این تحقیق تلاش شد که گیرنده کایمیریک حاوی VHH را به صورت پایدار و در محل های ویژه در داخل ژنوم سلول های T الحاق کنیم تا بیان بالا و پایدار به دست آوریم. به منظور بررسی میزان بیان گیرنده کایمیریک حاوی نانو بادی علیه آنتی ژن MUC1 با استفاده از آنزیم PhiC31 و نیز آنزیم PhiC31 متصل به توالی NLS، به دو گیرنده ساخته شده توسط بختیاری (CAR Hinge pCMV-1 و Hinge pCMV-2) قطعۀ ژنی attB اضافه شد و پس از کوترانسفکشن همراه با وکتورهای حاوی ایتتگراز و نیز حاوی ایتتگراز به همراه NLS (تحت پروموتور CMV و CAG) به داخل سلول های Jurkat بیان شده در سطح RNA، مورد بررسی قرار گرفت (۱۴). با توجه به نتایج RT-PCR که بعد از سی روز بر روی سلول های ترانسفکت شده انجام شد، بیان پایدار و افزایش یافته ژن گیرنده کایمیریک در سلول های Jurkat به اثبات رسید، که مؤید الحاق ژن در ژنوم و تأیید تأثیر ایتتگراز PhiC31 در افزایش و پایداری بیان در سلول های T می باشد. نتایج نشان می دهد که بالاترین عملکرد مربوط به گیرنده کایمیریک با منطقه فضا ساز حاوی دو لولا (pCMV-2 Hinge CAR - attB) در شرایط کوترانسفکشن با pCMV-INT-NLS است که می توان گفت گیرنده حاوی دو ناحیه لولا، دارای بیان بالاتری در سطح mRNA است که این منجر به افزایش تراکم بالاتر پروتئین گیرنده در سطح سلول خواهد شد و بیان طولانی مدت تر گیرنده یعنی افزایش حدود سی برابری بیان (نسبت به نمونه pCMV-2 Hinge CAR بدون

آنزیم ایتتگراز) در روز سی بعد از ترانسفکشن، دال بر کارایی آنزیم ایتتگراز PhiC31 می باشد. ویجتنز و همکارانش گزارش کرده اند که تراکم بالای CAR بر روی سطح سلول های T، منجر به لیز سلول های توموری حاوی مقادیر متوسط از آنتی ژن وابسته به تومور می شود (۱۴). انتقال ژن توسط رترو ویروس ها منجر به بیان پایدار CAR در سلول های T می گردد ولی از طرفی خطر الحاق تصادفی نیز وجود دارد. ولی در مورد آنزیم ایتتگراز PhiC31، تنها تعداد جایگاه های معدودی در ژنوم گزارش شده است و تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر فعال شدن انکوژن های سلولی به دنبال الحاق توسط این آنزیم وجود ندارد. این جایگاه ها در ژنوم سلول های T نیز مطالعه و بررسی شده اند (۲۴). گروهی از محققین، پلاسמיד بیان کننده ایتتگراز PhiC31 و پلاسמיד حاوی attB را به داخل رده های سلولی T شامل ED40515(-) و Jurkat، کوترانسفکت کرده اند و ورود پلاسמיד حاوی attB را به داخل ژنوم سلول های T ردیابی کرده اند. آن ها چندین جایگاه الحاق را در ژنوم معرفی کرده اند که دو جایگاه در نواحی بین ژنی روی کروموزوم های ۱۳ و ۱۸ قرار گرفته اند و بیشترین نرخ الحاق در سلول های هماتوپوئیتیک در این نواحی بوده است (۲۵).

### نتیجه گیری

نتایج این تحقیق، بیان کننده کارایی مؤثر آنزیم ایتتگراز PhiC31 در الحاق ژن های گیرنده های کایمیریک به داخل ژنوم سلول های T است و استفاده از این آنزیم یک راه مؤثر برای تولید سلول های T دارای سازه گیرنده کایمیریک ضد سرطانی به صورت پایدار و با بیان افزایش یافته به منظور استفاده در ایمونوتراپی سرطان می باشد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی است و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و نیز کمیته زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس (TMU-88-8-67) انجام شده است.

## References :

- 1- Duong CP, Westwood JA, Berry LJ, Darcy PK, Kershaw MH. Enhancing the specificity of T-cell cultures for adoptive immunotherapy of cancer. *Immunotherapy* 2011; 3(1): 33-48.
- 2- Stagg J, Johnstone RW, Smyth MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2007; 220: 82-101.
- 3- Eshhar Z. Adoptive cancer immunotherapy using genetically engineered designer T-cells: First steps into the clinic. *Curr Opin Mol Ther* 2010; 12(1): 55-63.
- 4- Tey SK, Bollard CM, Heslop HE. Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2006; 84(3): 281-9.
- 5- Hombach A, Abken H. Costimulation tunes tumor-specific activation of redirected T cells in adoptive immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(5): 731-7.
- 6- Eshhar Z. The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 181: 329-42.
- 7- Gross G, Gorochoy G, Waks T, Eshhar Z. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. *Transplant Proc* 1989; 21(1 Pt 1): 127-30.
- 8- Wilkie S, Picco G, Foster J, Davies DM, Julien S, Cooper L, *et al.* Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol* 2008; 180 (7): 4901-9.
- 9- Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem* 2009; 284(5): 3273-84.
- 10- Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5(1): 111-24.
- 11- Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10(11): 1212-24.
- 12- Ulrichs H, Silence K, Schoolmeester A, de Jaegere P, Rossenu S, Roodt J, *et al.* Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed anti platelet drugs. *Blood* 2011; 118(3): 757-65.
- 13- Bakhtiari SH, Rahbarizadeh F, Hasannia S, Ahmadvand D, Iri-Sofla FJ, Rasaee MJ. Anti-MUC1 nanobody can redirect T-body cytotoxic effector function. *Hybridoma (Larchmt)* 2009; 28(2): 85-92.
- 14- Weijtens ME, Hart EH, Bolhuis RL. Functional balance between T cell chimeric receptor density and tumor associated antigen density: CTL mediated cytotoxicity and lymphokine production. *Gene Ther* 2000; 7(1): 35-42.
- 15- Sorrell DA, Kolb AF. Targeted modification of mammalian genomes. *Biotechnol Adv* 2005; 23(7-8): 431-69.
- 16- Calos MP. The phiC31 integrase system for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2006; 6(6): 633-45.
- 17- Chalberg TW, Portlock JL, Olivares EC, Thyagarajan B, Kirby PJ, Hillman RT, *et al.* Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. *J Mol Biol* 2006; 357(1): 28-48.
- 18- Andreas S, Schwenk F, Küter-Luks B, Faust N, Kühn R. Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(11): 2299-306.
- 19- Krüger C, Greten TF, Korangy F. Immune based therapies in cancer. *Histol Histopathol* 2007; 22(6): 687-96.
- 20- Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(24): 10024-8.
- 21- Stancovski I, Schindler DG, Waks T, Yarden Y, Sela M, Eshhar Z. Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J Immunol* 1993; 151(11): 6577-82.
- 22- Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20 Pt 1): 6106-15.
- 23- Thistlethwaite F, Mansoor W, Gilham DE, Hawkins RE. Engineering T-cells with antibody-based chimeric receptors for effective cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7(1): 48-55.
- 24- Chalberg TW, Portlock JL, Olivares EC, Thyagarajan B, Kirby PJ, Hillman RT, *et al.* Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. *J Mol Biol* 2006; 357(1): 28-48.
- 25- Ishikawa Y, Tanaka N, Murakami K, Uchiyama T, Kumaki S, Tsuchiya S, *et al.* Phage phiC31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines. *J Gene Med* 2006; 8(5): 646-53.

**Original Article**

## **High-expression of chimeric antigen receptor on T lymphocytes by genomic insertion**

**Jafari Iri Sofla F.<sup>1</sup>, Rahbarizadeh F.<sup>1</sup>, Rasaee MJ.<sup>1</sup>, Aghaii Bakhtiari H.<sup>1</sup>, Khaleghi S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares Medical University, Tehran, Iran

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

The specific activation of the immune system especially T lymphocytes has been a long-term goal of cancer immunotherapy. In an approach to induce the patient's own immune cells, chimeric antigen receptors (CAR) were used to activate cytotoxic T lymphocytes. The CAR consists of an antigen binding domain of antibody molecule linked through an extracellular linker to transmembrane and cytoplasmic domains of lymphocyte-triggering moieties.

#### **Materials and Methods**

In our research group, variable domains of heavy chain antibodies (VHH or nanobody) derived from camelids were used instead of the antigen-binding domain in chimeric receptors constructs. To obtain a stable and increased expression of VHH harboring CAR, the PhiC31 integrase system was used for CAR gene integration into the T-cell genome. Constructs expressing CAR and PhiC31 integrase were co-transfected into the Jurkat cell line and CAR expression was quantified after one day and 30 days after transfection by a semi-quantitative RT-PCR method.

#### **Results**

Our results on day 30 confirmed that co-transfection of PhiC31 integrase constructs and CAR expressing constructs resulted in stable and high expression of the receptors.

#### **Conclusions**

Based on our results, we conclude that PhiC31 integrase enzyme can be used for immunotherapy of cancer mediated by T cells expressing chimeric receptors.

**Key words:** Integrase, Cancer, Immunotherapy

Received: 22 May 2011

Accepted: 2 Nov 2011

---

Correspondence: Rahbarizadeh F., PhD of Medical Biochemistry. Associate Professor of Medical Biotechnology. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University. P.O. Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883884 ; Fax : (+9821) 88013030  
E-mail: Rahbarif@modares.ac.ir