

## ساخت سویه بیانی پیکیا پاستوریس مولد قطعه‌ی تک‌زنجیره‌ای ناحیه‌ی متغیر آنتی‌بادی علیه ناحیه خارج سلولی EpCAM

فاطمه محمدقلیزاد (Pharm.D Student)، عطیه هاشمی\* (Ph.D)

بخش بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۳

at\_hashemi@sbm.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۸۲۰۰۰۶۷

### چکیده

هدف: مولکول چسباننده سلول‌های اپیتلیال (EpCAM) در سطح سلول‌های توموری اپیتلیال به طور فزاینده‌ای بیان می‌شود. بنابراین EpCAM یک آنتی‌ژن با ارزش در درمان هدفمند محسوب می‌شود. استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال رویکردی جذاب در درمان هدفمند سرطان است. محدودیت‌های آنتی‌بادی‌های منوکلونال نظیر اندازه‌ی بزرگ منجر به توسعه قطعات تک‌زنجیره‌ای ناحیه متغیر آنتی‌بادی (scfv) شد. پیکیا پاستوریس به علت انجام فرایندهای پس از ترجمه و قیمت ارزان به عنوان میزبانی مناسب در بیان پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس بالا مورد توجه است. در این مطالعه، پیکیا پاستوریس بیان‌کننده scfv علیه قسمت خارج سلولی EpCAM (EpEX) ساخته شد.

مواد و روش‌ها: ژن بهینه شده‌ی کدونی مولد پروتئین anti-EpEX-scfv در سایت‌های آنزیمی *XhoI* و *XbaI* و کتور pPICZαB وارد شد. صحت سازه نوترکیب به کمک توالی‌یابی و آنالیز آنزیمی تأیید شد. سازه نوترکیب با کمک الکتروپوراسیون در سویه GS115 وارد شد. کلون‌های مثبت با کمک PCR و با به‌کارگیری سه جفت پرایمر ارزیابی شدند.

یافته‌ها: صحت سازه نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *BamHI* (باند‌های ۲۷۸۸ و ۱۵۳۷ جفت باز) هم‌چنین *XhoI* و *XbaI* (باند‌های ۳۵۰۶ و ۸۱۹ جفت باز) تأیید شد. کلون‌های نوترکیب با کمک PCR با مشاهده دو باند (۲۲۰۰ و ۱۳۲۱ جفت باز) زمانی که دو پرایمر AOX استفاده شد، هم‌چنین یک باند (۹۶۸ جفت باز) زمانی که پرایمر AOX و پرایمر اختصاصی ژن استفاده شد، تأیید شد. هنگامی که دو پرایمر اختصاصی ژن به‌کار گرفته شد، یک باند (۷۵۱ جفت باز) مشاهده شد. نتیجه‌گیری: این یافته‌ها ساخت سویه مهندسی شده را تأیید می‌کند. پروتئین anti-EpEX-scfv می‌تواند انتخابی مناسب در زمینه‌ی ایمنی درمانی سرطان باشد.

واژه‌های کلیدی: پیکیا پاستوریس، anti-EpEX-scfv، آنتی‌بادی منوکلونال، EpCAM، ایمنی درمانی سرطان

### مقدمه

مولکول چسباننده‌ی سلول‌های اپیتلیال (EpCAM) یک گلیکوپروتئین تراغشایی تیب یک به وزن ۳۹-۴۲ کیلودالتون می‌باشد که در سطح سلول‌های اپیتلیال به جز هیاتوسیت‌ها و کراتینوسیت‌ها بیان می‌شود [۱] و منجر به اتصالات هموفیلیکی سلول به سلول غیر وابسته به کلسیم می‌شود [۲]. EpCAM به لحاظ ساختاری شامل یک دومین خارج سلولی (EpEX)، یک دومین بین غشایی و نیز یک دومین داخل سلول (EpICD) می‌باشد [۳].

در سال‌های اخیر درمان سرطان از حالت مرسوم و رایج که با داروهایی با خاصیت سلول‌کشی که به طور غیر اختصاصی سلول‌های عادی را نیز درگیر می‌کرد به سمت درمان هدفمند پیش رفته است. از مزایای این درمان هدفمند می‌توان به مؤثرتر بودن

آن و عوارض جانبی پایین‌تر آن اشاره کرد. امروزه آنتی‌بادی‌هایی با ساختار کامل به دلیل معایبی چون ماندگاری بالا در بافت غیر هدف، سینتوتوکسیسیته‌ی بالا به علت کلیرانس پایین، سایز بزرگ و عدم دسترسی به اپی‌توپ‌های پنهان با قطعات نوترکیب آنتی‌بادی‌های منوکلونال نظیر قطعه‌ی تک‌زنجیره‌ای ناحیه‌ی متغیر آنتی‌بادی (scfv) جایگزین شده‌اند. این ترکیبات به دلیل عملکرد اختصاصی و میل اتصال بالا جایگزین‌های مناسبی برای آنتی‌بادی‌هایی با ساختار کامل به نظر می‌رسند. scfv بخش‌های متغیر (VI, Vh) تشکیل شده است که با یک اتصال‌دهنده‌ی پپتیدی در کنار هم قرار گرفته‌اند [۴]. در خیلی از موارد scfv به دلیل سایز کوچک و کلیرانس بالا از خون و نفوذ به سلول‌های توموری به تنهایی به عنوان عامل هدفمندسازی به‌کار می‌رود [۵]. از آنجائی‌که بیان EpCAM در گروهی از سرطان‌ها در مقایسه با سلول‌های طبیعی افزایش می‌یابد، لذا امروزه انواع

پروموتور القایی AOX1 پیکیا پاستوریس است از بانک ژن انستیتوپاستور ایران تهیه شد. *E. coli* DH5- $\alpha$  در محیط کشت Luria Bertani (LB) (حاوی تریپتون ۱ درصد وزنی-حجمی و عصاره مخمر ۰/۵ درصد و سدیم کلراید ۱ درصد و PH برابر با ۷) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد. و نیز محیط کشت LB با درصد نمک پایین (حاوی تریپتون ۱ درصد وزنی-حجمی و عصاره مخمر ۰/۵ درصد و سدیم کلراید ۰/۵ درصد و PH برابر با ۷/۵) برای کشت انتخابی سویه‌های ترانسفورم شده مقاوم به زئوسین استفاده شد. به منظور جداسازی های ترانسفرمنت حاوی وکتور بیانی از آنتی‌بیوتیک زئوسین  $25 \mu\text{g/ml}$  و آمپی‌سیلین  $100 \mu\text{g/ml}$  در محیط کشت LB استفاده شد. سویه‌ی مخمر پیکیا پاستوریس در محیط YPD (حاوی ۱ درصد وزنی-حجمی عصاره مخمر و ۲ درصد پیتون و ۲ درصد دکستروز) کشت داده شد. در حالی که محیط کشت YPDS علاوه بر مقادیر ذکر شده حاوی سوربیتول ۱ مولار نیز بود. پلیت حاوی YPD آگار برای رشد پیکیا پاستوریس سویه GS115 و پلیت YPD آگار حاوی زئوسین (غلظت  $200 \mu\text{g/ml}$  یا هر غلظت دلخواه دیگری) در انتخاب سویه‌های ترانسفورم شده‌ی پیکیا پاستوریس به کار گرفته شد.

ساخت سازه بیانی **pPICZ $\alpha$ B-anti EpEX- scfv** .  
به منظور بیان کامل توالی انتهایی آمینی anti EpEX- scfv در طراحی سازه مربوطه، ژن مولد این پروتئین بلافاصله پس از سایت برشی Kex2 قرار داده شد. هم‌چنین یک قطعه‌ی ژنی مولد دنباله‌ی شش هیستیدینی در انتهای کربوکسیلیک ژن مورد نظر در جهت تسهیل در فرایند خالص‌سازی قرار داده شد [۱۱]. ژن مولد anti EpEX-scfv پس از بهینه‌سازی کدونی توسط شرکت سنتز شد. به منظور آماده‌سازی کاست بیانی، قطعه سنتز شده ژنی مولد anti EpEX-scfv از وکتور کلونینگ حد واسط به نام pGH-anti EpEX-scfv توسط دو آنزیم *XhoI*، *XbaI* برش داده شد و ژن مولد anti EpEX- scfv در وکتور pPICZ $\alpha$ B طوری قرار گرفت تا پروموتور AOX1 در قسمت بالا دست ژن مورد نظر قرار گیرد. سازه نهایی بیانی، pPICZ $\alpha$ B-anti EpEX-scfv نام گرفت و به داخل سلول‌های باکتریایی مستعد-*E. coli* DH5- $\alpha$  ترانسفورم شد. سپس سویه‌های ترانسفورم شده حامل pPICZ $\alpha$ B-anti EpEX-scfv در محیط کشت LB با غلظت نمک پایین و غلظت زئوسین برابر با  $25 \mu\text{g/ml}$  انتخاب شدند. به منظور تأیید حضور ژن مولد anti EpEX-scfv در سازه بیانی pPICZ $\alpha$ B-anti EpEX- scfv، وکتور نو ترکیب با دو جفت آنزیم (*HindIII* و *BamHI*) هم‌چنین (*XhoI* و *XbaI*) برش داده شد. هم‌چنین صحت وکتور نو ترکیب به کمک توالی‌یابی مورد تأیید قرار گرفت. روش عمومی دست‌کاری ژنتیکی بر اساس

ایمونوتراپی با هدف قرار دادن EpCAM در تشخیص و درمان مورد توجه قرار گرفته است [۶].

به منظور بیان آنتی‌بادی‌های نو ترکیب تاکنون شماری از سیستم‌های بیانی نظیر سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی به کار برده شده‌اند. امروزه اغلب آنتی‌بادی‌های درمانی برای انسان به کمک رده‌های سلولی پستانداران ساخته می‌شوند [۷]. این در حالی است که تولید آنتی‌بادی در این دسته از سلول‌ها یک فرایند وقت‌گیر و گران‌قیمت محسوب می‌شود. در این موارد مخمرها به عنوان سیستم‌های بیانی یوکاریوتی گزینه‌ی مناسبی به نظر می‌رسند. چرا که این یوکاریوت‌ها برخلاف سیستم‌های بیانی باکتریایی، علاوه بر گلیکوزیلاسیون و تسهیل انجام بسیاری از تغییرات پس از ترجمه‌ی معمول دیگر نظیر تاخوردگی صحیح، تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی، پردازش توالی سیگنالی و نیز پردازش پروتئولیتیک قادرند در محیط کشت ارزان خیلی سریع رشد کنند [۸]. امروزه محققین در مطالعات متعددی مخمرها از جمله پاستوریس

(*Pichia pastoris*) را به عنوان سیستم بیانی جایگزین در تولید قطعات آنتی‌بادی‌های منوکلونال ارزیابی کرده‌اند [۹]. این میزبان یوکاریوتی دارای سیستم بیانی کارایی است که دارای محیط کشت مشخص با هزینه‌های تولیدی پایین می‌باشد. علاوه بر آن به آلودگی محیط و استرس‌های وارده حین تولید نیز حساس نمی‌باشد [۱۰]. در این مطالعه با توجه به کاربردهای متعدد قطعه تک زنجیره‌ای ناحیه متغیر آنتی‌بادی علیه EpEX در تشخیص و درمان و به منظور دستیابی به مقادیر بالایی از پروتئین با حلالیت و فعالیت بیولوژیکی مناسب در پیکیا پاستوریس، برای نخستین بار حامل بیانی نو ترکیب حاوی ژن مولد scfv مشتق شده از کلون D5MOCB4 علیه EpEX ساخته شد. هم‌چنین سویه‌های ترانسفورم شده‌ی پیکیا پاستوریس (GS115) با این سازه ایجاد شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه آنزیم‌های محدودکننده و لیگاز از Thermo Fisher کیت استخراج پلاسمید GF-PL-050 از شرکت vivantis کیت خالص‌سازی پلاسمید high pure PCR product purification kit از شرکت Roche، آنتی‌بیوتیک Zeocine از Invitrogen، PCR product (master mix) از Ampliqon و DNA ladder از شرکت سیناکلون خریداری شد.

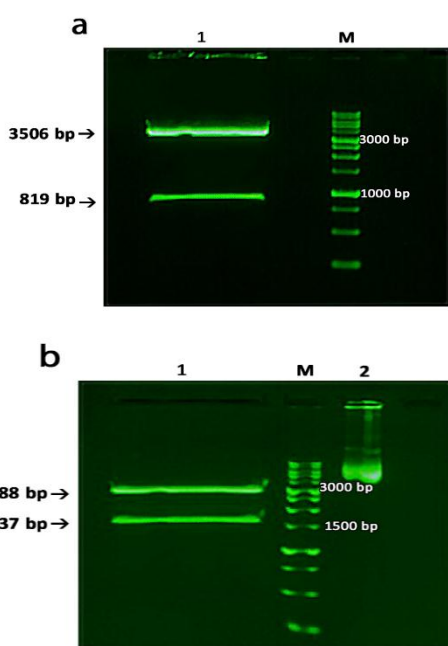
سویه‌های میکروبی، پلاسمیدها و محیط کشت. *E. coli* DH5- $\alpha$  (اهدایی دکتر کرامتی) به عنوان میزبان برای دست‌کاری DNA و پیکیا پاستوریس سویه GS115 با فنوتیپ Mut مثبت برای مطالعات بیانی انتخاب شدند. وکتور pPICZ $\alpha$ B که دارای

اختصاصی ژن AOX1 به‌کار گرفته شد. در تمام واکنش‌ها از سویه‌ی GS115 ترانسفورم شده با پلاسمید pPICZαB به عنوان کنترل منفی استفاده شد. به این گونه که در ۳۰ سیکل که هر سیکل شامل مراحل ۹۵ درجه برای ۵ دقیقه و ۵۱ درجه برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه انجام شد.

### نتایج

#### ساخت سازه نو ترکیب pPICZαB-anti EpEX-scfv

پس از ترانسفورم کردن سلول‌های مستعد DH5-α با محصول الحاقی یا لیگاسیون pPICZαB و pGH-anti EpEX-scfv هم‌ضم آنزیمی شده با استفاده از دو آنزیم *XbaI* و *XhoI* و انجام کشت پلیت ۹ خانه از تک کلون‌های حاصل، محتوای پلاسمید تک کلون‌ها استخراج گردید. به‌منظور تأیید تشکیل پلاسمید نو ترکیب، محصول استخراج با دو جفت آنزیم (*BamHI* و *HindIII*) هم‌چنین (*XbaI* و *XhoI*) مورد هم‌ضم آنزیمی قرار گرفت. مشاهده دو قطعه به اندازه‌های ۲۷۸۸ و ۱۵۳۷ جفت باز در هم‌ضم توسط جفت آنزیم *BamHI-HindIII* و مشاهده قطعاتی به طول ۳۵۰۶ و ۸۱۹ جفت باز در هم‌ضم توسط جفت آنزیم *XbaI* و *XhoI* تأییدکننده تشکیل پلاسمید نو ترکیب pPICZαB-anti EpEX-scfv است (شکل ۱).



شکل ۱- تأیید ساخت سازه نو ترکیب pPICZαB-anti EpEX-scfv به روش هم‌ضم آنزیمی. (a) مشاهده قطعاتی به طول ۳۵۰۶ و ۸۱۹ جفت باز در ستون ۱ ژل الکتروفورز ناشی از هم‌ضم آنزیمی توسط جفت آنزیم *XbaI* و *XhoI* (همچنین مشاهده دو نوار ۲۷۸۸ و ۱۵۳۷ جفت باز در ستون ۱ ژل الکتروفورز ناشی از هم‌ضم آنزیمی توسط جفت آنزیم *BamHI-HindIII* تأیید کننده صحت ساخت سازه نو ترکیب می‌باشد. ستون M لدر ۱ کیلو جفت باز و نمونه هم‌ضم آنزیمی نشده در ستون ۲ مشاهده می‌شوند.

تعیین توالی پلاسمید نو ترکیب با استفاده از پرایمرهای AOX-1 promoter و AOX-2 promoter نشان‌دهنده‌ی صحت سازه

روش‌های استاندارد انجام شد. آنزیم‌های محدودالانتر و لیگاز از شرکت Thermo Fisher Scientific (USA) تهیه شدند. ترکیبات شیمیایی از منابع شیمیایی استاندارد نظیر سیگما و مرک تهیه شدند.

ترانسفورماسیون پیکیا پاستوریس و انتخاب کلونی‌های نو ترکیب. وکتور خطی شده‌ی pPICZαB-scfv توسط آنزیم *SacI* برای ترانسفورم کردن پیکیا پاستوریس سویه‌ی مستعد GS115 طبق پروتکل استفاده شد. بدین ترتیب که سویه‌ی مستعد، با رشد GS115 در محیط YPD مایع و شست و شو با آب سرد و سوربیتول حاصل شد. ۵ میکروگرم از وکتور خطی شده pPICZαB-scfv و نیز وکتور مادر که فقط شامل pPICZαB می‌باشد (به عنوان کنترل منفی) با ۸۰ میکرولیتر سلول‌های مستعد شده، مخلوط شد. سپس جهت الکتروپوراسیون و تکمیل فرایند ترانسفورماسیون از Pulser Xcell (BioRad, Germany) با تنظیمات ۱۵۰۰ ولت و ظرفیت ۲۵ میکروفاراد و مقاومت ۲۰۰ اهم استفاده شد. سپس سویه‌های ترانسفورم شده به مدت ۲-۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت YPD با غلظت زئوسین ۲۰۰ μg/ml انکوبه شد که پس از طی این مدت کلونی‌های ترانسفورم شده ظاهر شدند.

استخراج ژنوم مخمر. به‌منظور استخراج ژنوم مخمر از روش لیتیم استات- سدیم دو دسیل سولفات (LiOAc-SDS) استفاده شد [۱۲]. بدین ترتیب که تک کلون ایجاد شده روی پلیت در ۱۰۰ μL محلول حاوی لیتیم استات ۲۰۰ mM و SDS یک درصد وارد شد. پس از ۵ min انکوباسیون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰۰ μL اتانل ۱۰۰-۹۶ درصد به محتویات افزوده شد و ورتکس شد. سپس پلت همراه با ژنوم به‌کمک سانتریفیوژ رسوب داده شد و با اتانل ۷۰ درصد شستشو داده شد. در نهایت پلت در ۱۰۰ μL آب حل شد و پس از سانتریفیوژ، ۱ μL از بخش سوپرناتانت برای PCR به‌کار گرفته شد.

آنالیز سویه‌های ترانسفورم شده پیکیا پاستوریس توسط PCR. به‌منظور آنالیز حضور سازه ژنی pPICZαB-anti EpEX-scfv در کلونی‌های مقاوم به زئوسین از روش PCR استفاده شد. فرایند PCR با استفاده از سه جفت پرایمر انجام شد. در واکنش اول از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد 5- (GATGATGATGTGAGGAAAC-3 R: 5- scfv و 5- F: GATATTCAAATGACCCAATCT-3) استفاده شد.

واکنش دوم با استفاده از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی ژن AOX1 (F: AOX1 5-GACTGGTCCAATTGACAAGC-R: (F: AOX1 5-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3) و در واکنش سوم، پرایمر فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv و ریورس

## تأیید ورود حامل بیانی نو ترکیب pPICZαB-anti

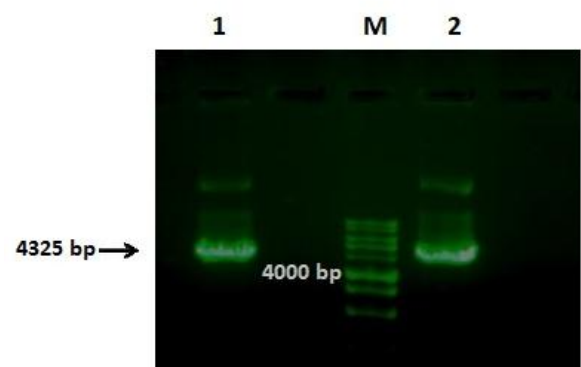
## EpEX- scfv به ژنوم مخمر با استفاده از روش PCR

در واکنش اول با استفاده از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv ترانسفورمنت‌های مثبت با حضور قطعه تکثیر شده ۷۵۱ جفت باز تأیید شدند در حالی که هیچ قطعه تکثیر یافته‌ای در ستون مربوط به کنترل منفی (ژنوم مخمر و ژنوم مخمر حاوی بخش اینتگره شده pPICZαB بدون قطعه ژنی وارد شده یا اینسرت) در الکتروفورز قابل مشاهده نبود (شکل ۴ a و b). نتایج حاصل از آنالیز PCR با استفاده از پرایمر فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv و ریورس اختصاصی ژن AOX1، نشان‌دهنده‌ی قطعه تکثیر شده ۹۶۸ جفت بازی در ترانسفورمنت‌ها است. در حالی که هیچ قطعه تکثیر یافته‌ای در ستون مربوط به کنترل منفی (ژنوم مخمر و ژنوم مخمر حاوی بخش اینتگره شده pPICZαB بدون قطعه ژنی وارد شده) در الکتروفورز قابل مشاهده نبود. نتیجه حاصل از PCR با این جفت پرایمر نشان‌دهنده‌ی حضور ژن مورد نظر به صورت دست‌نخورده روی ژنوم مخمر است (شکل ۴ c و d). هم‌چنین واکنش PCR با استفاده از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی ژن AOX1 منجر به تکثیر قطعات با اندازه‌های ۲۲۰۰ و ۱۳۲۱ جفت باز شد. از آن‌جائی‌که GS115 یک میزبان mut+ است تکثیر ژنوم با استفاده از این جفت پرایمر منجر به تکثیر قطعه‌ی ۲۲۰۰ جفت بازی خواهد شد. هم‌چنین زمانی‌که ژنوم اینتگره شده با پلاسمید pPICZαB به‌عنوان الگو در واکنش PCR به‌کار می‌رود، باندهای ۲۲۰۰ و ۵۹۲ جفت باز به‌دست می‌آید که دلیل آن این است که فاصله این دو جایگاه اتصال پرایمر روی پلاسمیدی که اینتگره شده است ۵۹۲ نوکلئوتید است و در صورتی‌که قطعه ژنی وارد شده هم وارد این بخش شده باشد باندهای حاصله ۲۲۰۰ و اندازه مجموع قطعه ژنی وارد شده و ۵۹۲ که در این جا ۱۳۲۱ جفت باز است بر روی ژل الکتروفورز مشاهده می‌شود (شکل ۴ e و f). در تمام واکنش‌ها از سویه‌ی GS115 ترانسفورم شده با پلاسمید pPICZαB هم‌چنین سویه‌ی GS115 ترانسفورم نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. علاوه بر آن پلاسمید pPICZαB همراه با قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

ژنی از لحاظ ورود ژن، جهت صحت ورود ژن و عدم وجود جهش در توالی ژن بود.

## ورود سازه نو ترکیب pPICZαB-anti EpEX-scfv به

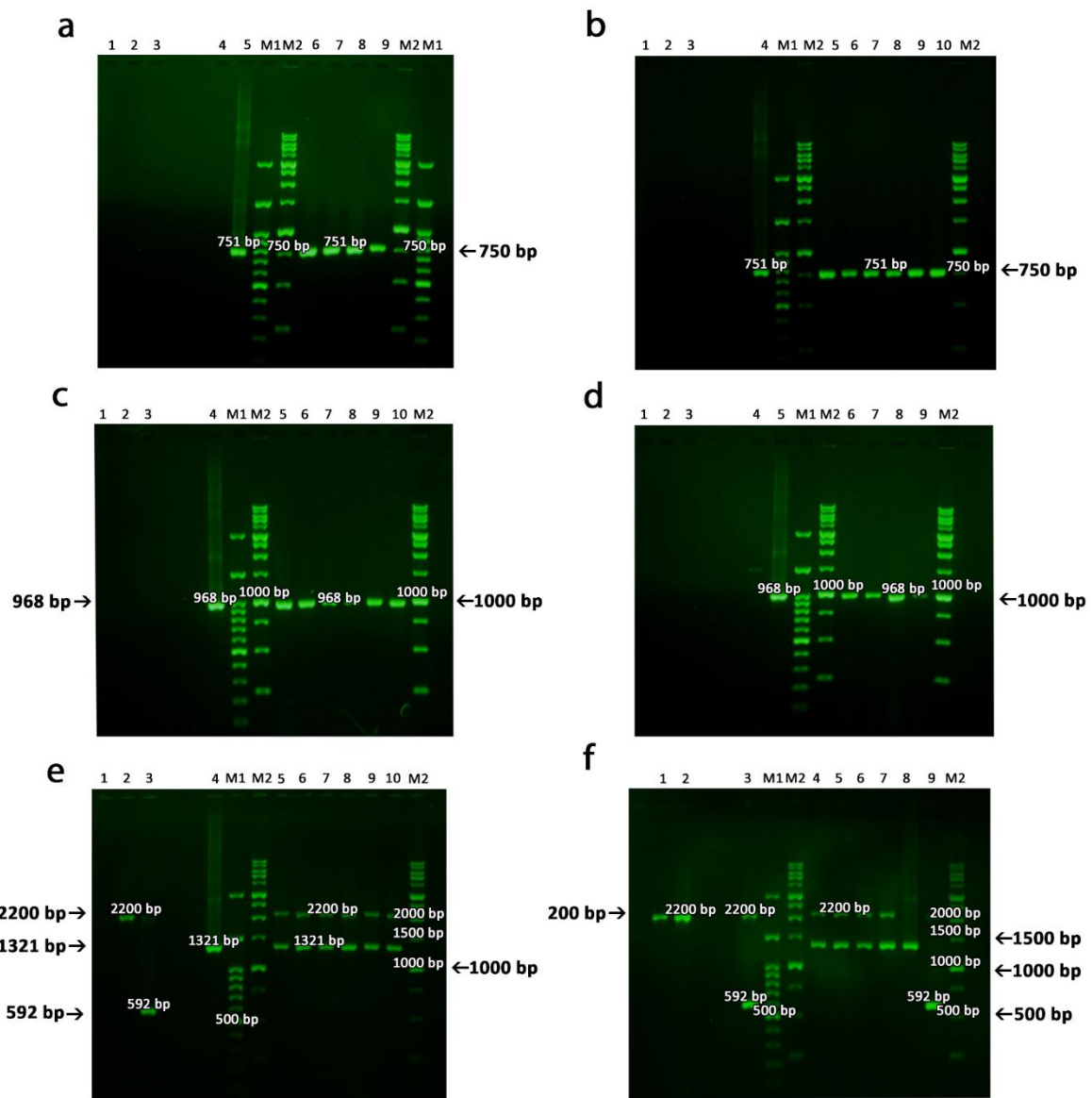
مخمر پیکیا پاستوریس با استفاده از روش الکتروپوراسیون مخلوط وکتور خطی شده‌ی pPICZαB-anti EpEX-scfv توسط آنزیم *SacI* (شکل ۲) و سلول‌ها در معرض پالس الکتریکی قرار گرفت و در نتیجه‌ی تشکیل منافذ موقتی در غشا سلولی، DNA به داخل سلول جذب شد. پس از گذشت ۲-۳ روز از کشت این مخلوط بر روی محیط کشت YPD آگار حاوی ۲۰۰ μg/ml از آنتی‌بیوتیک زئوسین کلونی‌های حاصل مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۲- هضم سازه نو ترکیب pPICZαB-anti EpEX- scfv با آنزیم *SacI* در این شکل ستون ۱ و ۲ نشانگر نمونه pPICZαB-anti EpEX- scfv خطی شده توسط آنزیم *SacI* با اندازه ۴۳۲۵ جفت باز و ستون M لدر ۱ کیلو جفت باز می‌باشند.



شکل ۳- ورود سازه نو ترکیب pPICZαB-anti EpEX- scfv به مخمر پیکیا پاستوریس با استفاده از روش الکتروپوراسیون. مخلوط DNA و سلول‌ها در معرض پالس الکتریکی قرار گرفت و در نتیجه‌ی تشکیل منافذ موقتی در غشا سلولی، DNA به داخل سلول جذب شد. پس از گذشت ۲-۳ روز از کشت این مخلوط بر روی محیط کشت YPD آگار حاوی ۲۰۰ μg/ml از آنتی‌بیوتیک زئوسین کلونی‌های حاصل مشاهده شد.



شکل ۴- تأیید ورود حامل بیانی نو ترکیب pPICZαB-anti EpEX- scfv به ژنوم مخمر با استفاده از روش PCR. واکنش PCR با استفاده از دو پرایمر (a) ریورس و فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv منجر به تکثیر قطعه با اندازه‌ی ۷۵۱ جفت باز (ستون ۷-۹) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ و ۴ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۵ و کتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (b) ریورس و فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv منجر به تکثیر قطعه با اندازه‌ی ۷۵۱ جفت باز (ستون ۵-۱۰) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۴ و کتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (c) پرایمر فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv و ریورس اختصاصی ژن AOX1 منجر به تکثیر قطعه با اندازه‌ی ۹۶۸ جفت باز (ستون ۵-۱۰) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۴ و کتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (d) پرایمر فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv و ریورس اختصاصی ژن AOX1 منجر به تکثیر قطعه با اندازه‌ی ۹۶۸ جفت باز (ستون ۶-۹) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ و ۴ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۵ و کتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (e) ریورس و فوروارد اختصاصی ژن AOX1 منجر به تکثیر قطعات با اندازه‌های ۲۲۰۰ و ۱۳۲۱ جفت باز (ستون ۵-۱۰) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۴ و کتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (f) ریورس و فوروارد اختصاصی ژن AOX1 منجر به تکثیر قطعات با اندازه‌های ۲۲۰۰ و ۱۳۲۱ جفت باز (ستون ۴-۷) شد. ستون ۱، ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳، ۴ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۸ و کتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. ستون M1 شامل لدر ۱۰۰ جفت باز و ستون M2 لدر ۱ کیلو جفت باز می‌باشند.

قطعات آنتی‌بادی به میزان بالا در/شریشی‌کلی تولید شده‌اند، ولی گزارشاتی مبنی بر عدم توانایی این سیستم در بیان و تولید scfvهای مشخصی نیز منتشر شده است. مقاله‌ای که در سال ۱۹۹۵ منتشر شد، نشان داد که ویژگی‌های وابسته به توالی

### بحث و نتیجه گیری

پیشرفت در طراحی سیستم‌های بیانی کارآمدتر برای تولید مقادیر بالای قطعات نو ترکیب آنتی‌بادی با پتانسیل درمانی مناسب مقوله‌ای چالش‌برانگیز است [۱۳]. اگرچه تاکنون بسیاری از



زارع و همکاران در سال ۲۰۱۴ موفق شدند با استفاده از وکتور pPICZα پروتئین scfv علیه CD22 را به میزان ۲۵mg/l به صورت ترشحي در پيکيا بيان کنند [۲۰]. به منظور تأييد ورود ژن به داخل ژنوم مخمر از واکنش زنجيره‌ای پليمرز با کمک سه جفت پراير استفاده شد. مطابق با يافته‌های پيشين در صورت به‌کارگيري جفت پراير متصل‌شونده به ژن مولد الکل اکسيداز (AOX)، در مورد سويه‌هایی نظير GS115 که +mut هستند انتظار داريم پس از الکتروفورز، باندهای ۲۲۰۰ و ۵۹۲ جفت باز در مورد حالت پایه (زمانی که پلاسميد pPICZαB بدون قطعه ژنی وارد شده ژن مورد نظر) مشاهده شود به دليل آن که فاصله دو جايگاه اتصال پراير فوروارد و ريورس AOX روی پلاسميدي که اينتگره شده است ۵۹۲ نوکلئوتيد است. در صورتی که قطعه ژنی وارد شده هم وارد اين بخش شده باشد باندهای حاصله ۲۲۰۰ و باندي مربوط به مجموع اندازه قطعه ژنی وارد شده و ۵۹۲ خواهد شد. مطابق با انتظار باندهای ۱۳۲۱ و ۲۲۰۰ جفت باز در مورد ژنوم حاوی پلاسميد همراه با ژن مولد پروتئين scfv مشاهده شد (شکل ۴ e و f). در مطالعه‌ای مشابه به منظور تأييد ورود ژن مولد scfv علیه CD22 بدخل ژنوم پيکيا پاستوريس سويه GS115 از اين جفت پراير استفاده شد [۲۰]. هم‌چنين chan و همکاران در مطالعه انجام گرفته در سال ۲۰۱۸ به منظور تأييد ورود ژن مولد توپوايزومراز انسانی به داخل ژنوم سويه X33 که +mut است از همين جفت پراير استفاده کردند. نتايج الکتروفورز منتشر شده توسط اين گروه حضور دو باند ۲۲۰۰ و ۲۳۰۰ جفت باز را تأييد کرد [۲۱]. در مطالعه حاضر هم‌چنين برای اطمينان از کامل بودن ژن مولد scfv اينتگره شده داخل ژنوم از جفت پراير اختصاصی ژن استفاده شد و به منظور اطمينان از قرارگيري صحيح قطعه ژنی موردنظر بر روی ژنوم از پراير فوروارد متصل شونده به ابتدای ژن موردنظر و پراير ريورس متصل شونده به ژن مولد AOX استفاده شد (شکل ۴ a-d). Tsai و همکاران نیز به منظور بررسی حضور ژن مولد پروتئين دی سولفيد ايزومراز پلاسموديوم فالسيپاروم در ژنوم پيکيا پاستوريس الکتروپوريت شده با وکتور pPICZA حاوی ژن مورد نظر از جفت پراير اختصاصی متصل‌شونده به ژن استفاده کردند [۲۲].

عوامل متعددی بر بيان ژن‌های هترولوگ در پيکيا پاستوريس مؤثر هستند از آن جمله می‌توان به ترجيح کدونی، محتوای بازهای ژن مورد نظر، محدوديت‌های موجود در سطح رونویسی و ترجمه اشاره کرد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که بهينه‌سازی کدونی بر اساس ترجيح کدونی مخمر منجر به بيان بالا هم‌چنين افزايش فعاليت محصولات ژنی در پيکيا پاستوريس می‌شود [۲۳]. از همين رو در اين مطالعه ابتدا ژن مولد بر اساس ترجيح کدونی مخمر بهينه شد. مشابه اين مطالعه Liu و همکارانش

آمينواسيدي يک قطعه آنتی‌بادی نظير سايز پروتئينی، کارآمدی تاخوردگی، پایداری، محلوليت و مقاومت به پروتاز هم‌چنين سميت پروتئين برای ميزبان بیانی می‌توانند سطح واقعی بيان اين پروتئين را تعيين کنند [۱۴]. با توجه به موارد فوق‌الذکر چنين می‌توان گفت که سيستم ایده‌آل بیانی برای هر scfv باید به طور جداگانه بررسی شود. مطالعات بسياری نشان می‌دهند که پيکيا پاستوريس می‌تواند به‌عنوان ميزبانی مناسب در بيان scfv‌هایی که بيان پایینی در *E. coli* دارند مطرح باشد. به عنوان مثال Krauss و همکاران نشان دادند که بازده توليد آنتی‌بادی انسانی با قطعات متغیر علیه CD22 در ميزبان *E. coli* پایین است (۴۵μg/l) [۱۵]. و اين بازده پایین نیاز به مقادير بالای scfv برای کاربردهای درمانی و تشخيصی را تأمین نمی‌کند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت اين پروتئين به میزان ۲۵ mg/l در ميزبان بیانی پيکيا بيان شد. اين قبيل مطالعات نشانگر موفقیت‌آمیز بودن سيستم بیانی پيکيا پاستوريس در بيان تعدادی از scfv‌ها می‌باشد [۱۶، ۱۷]. در اين مطالعه به منظور افزايش سطح بیانی scfv مشتق شده از کلون D5MOCB4 علیه EpEX، پس از بهينه‌سازی کدونی بر اساس ترجيح کدونی مخمر متيلوتروف پيکيا پاستوريس، ژن مولد اين قطعه‌ی آنتی‌بادی در وکتور بیانی pPICZαB همسانه‌سازی شد. سپس وکتور نوترکيب در سويه GS115 پيکيا پاستوريس ترانسفورم شد و کلون‌های نوترکيب بر اساس مقاومت به ژئوسين جداسازی و تأييد شدند. هر چند scfv مشتق شده از کلون D5MOCB4 علیه EpEX تاکنون در سويه بیانی/شريشیاکلی بيان شده است. اما بازده توليد اين پروتئين به صورت پری‌پلاسمیک در اين ميزبان بیانی به میزان ۱ mg/l گزارش شده است [۱۸]. که بر اين اساس توليد ۱۰۰-۱۰ mg آنتی‌بادی scfv برای موارد کاربردی متعدد دشوار خواهد بود. هم‌چنين از آن جهت که اين پروتئين در /شريشیاکلی به صورت اجسام انکلوزیونی بيان شده است، نیاز به مراحل دناتوراسيون و شکل‌دهی مجدد وجود دارد (بر اساس نتايج منتشر نشده از همين گروه). هدف از اين مطالعه ساخت سويه‌ای است که قادر باشد به منظور تأمین مقدار کافی از پروتئين scfv علیه EpEX برای مطالعات بيولوژيکی، اين پروتئين را به مقدار بالا، به صورت محلول، فعال، با صرف هزینه پایین و بدون به‌کارگيري ترکيبات دناتورکننده فراهم کند.

در اين مطالعه از وکتور pPICZαB استفاده شده است. اين وکتور دارای توالی سيگنال ترشحي فاکتور آلفاست که تاکنون با موفقیت منجر به بيان پروتئين‌های متعدد به صورت ترشحي در پيکيا پاستوريس شده است. به‌عنوان مثال رسپتور فاکتور رشد اپيدرمی انسانی - ۲ نوترکيب با کمک وکتور pPICZαB با موفقیت در اين ميزبان به صورت ترشحي بيان شده است [۱۹]. هم‌چنين

یک لوله آزمایش در زمان کوتاه ۱۵ دقیقه با قدرت استخراج بالا قابل انجام است. این روش قابلیت انجام در سویه‌های مختلف مخمری نظیر هانسونلا پلی‌مریفا، ساکارومایسس سرویزیه و پیکیا پاستوریس را دارد [۱۲]. در مطالعه حاضر از این روش استفاده شد. مطابق با مطالعه ما، Mala و همکارانش نیز جهت استخراج ژنوم پیکیا پاستوریس حاوی ژن مولد قطعه تک‌زنجیره‌ای آنتی‌بادی علیه نورفلوکساسین از این روش استفاده کردند [۳۱].

به منظور افزایش سطح بیانی scfv مشتق شده از کلون GS115 D5MOCB4 علیه EpEX در این مطالعه سویه نو ترکیب GS115 که حاوی ژن مولد این قطعه‌ی آنتی‌بادی در ژنوم خود می‌باشد ساخته شد و سویه ساخته شده با استفاده از روش PCR و سه جفت پرایمر مورد تأیید قرار گرفت. این سویه مهندسی شده را می‌توان در گام بعدی در بیان پروتئین anti-EpEX-scfv به عنوان انتخابی مناسب در زمینه‌ی ایمنی-درمانی سرطان به‌کار گرفت.

### تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است. همچنین کلیه مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دارویی این دانشکده انجام شده است.

### منابع

- [1] Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somat Cell Genet* 1979; 5: 957-971.
- [2] Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, et al. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* 1997; 139: 1337-1348.
- [3] Munz M, Fellingner K, Hofmann T, Schmitt B, Gires O. Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front Biosci* 2008; 13: 5195-5201.
- [4] Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee S-M, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 1988; 242: 423-426.
- [5] Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1992; 52: 3402-3408.
- [6] Di Paolo C, Willuda J, Kubetzko S, Lauffer I, Tschudi D, Waibel R, et al. A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2837-2848.
- [7] Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol* 2013; 4: 217.
- [8] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 2005; 22: 249-270.
- [9] Butler M, Meneses-Acosta A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Appl Microbiol Biot* 2012; 96: 885-894.
- [10] Martínez JL, Liu L, Petranovic D, Nielsen J. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Curr Opin Biotech* 2012; 23: 965-971.
- [11] Yousefian S, Dehnavi E, Borjian Burojeni M. Secretive expression of bacterial  $\beta$ -xylosidase gene including hexahistidin-tag in *Pichia pastoris*. *Koomesh* 2013; 14: 389-395. (Persian).

با جایگزینی کدون‌های نادر با کدون‌های ترجیحی پیکیا پاستوریس توانستند در مقایسه با ژن بهینه نشده به بیان بالاتری از اینترلوکین ۲۵ در این میزبان برسند [۲۴]. در سال ۲۰۱۳ ژن مولد اندواینولیناز استخراج شده از اسپیریلوس نایجر مطابق با ترجیح کدونی پیکیا پاستوریس بهینه شد و توسط He و همکارانش در کنار فرم اولیه در پیکیا بیان شد. نتایج نشان داد که فرم بهینه، پروتئین بیش‌تر با فعالیت بالاتری (حدود ۴،۱۸ برابر) را نسبت به فرم بهینه نشده ژن تولید می‌کند [۲۵]. شبیه این نتایج توسط Li و همکارانش که فرم اولیه و بهینه شده ژن مولد سیستماتین C انسانی را در مخمر پیکیا پاستوریس بیان کردند مشاهده شد. نتایج مطالعه Li نشان داد که بهینه‌سازی کدونی می‌تواند بیان پروتئین را ۳ تا ۵ برابر افزایش دهد [۲۶]. Hu و همکارانش گزارش کردند که افزایش میزان بیان به‌واسطه بهینه‌سازی کدونی بیش‌تر به دلیل تأثیر مثبت بر کارآمدی طول‌سازی در مرحله ترجمه است تا اثر بر آغاز ترجمه. در مطالعه مذکور، آنالیز نورترن بلات نشان داد که سطح mRNA هنگام بیان پروتئین نو ترکیب بین دو فرم اولیه و بهینه شده ژن یکسان است لذا بیان بالاتر، بیش‌تر می‌تواند ناشی از تسهیل مراحل پس از رونویسی باشد [۲۷]. این نتایج مطابق با یافته‌های آزمایشگاهی منتشر شده در مورد بیان در مخمر ساکارومایسس سرویزیه بود. این یافته نشان می‌داد که میزان کدون‌های نادر ارتباط مستقیمی با کاهش پایداری mRNA و سرعت طول‌سازی در مرحله ترجمه دارد [۲۸]. همسو با این نتایج، Ockenhouse و Yadava گزارش کردند که بهینه‌سازی کدونی منجر به افزایش بیان دمین F2 پروتئین EBA-175 در دو میزبان /شریشیاکلی و پیکیا پاستوریس می‌شود هر چند پروتئین بیان شده در پیکیا فعالیت بیولوژیکی بالاتری را نشان می‌دهد [۲۹].

یکی از مشکلات موجود در راستای استخراج سریع و کارآمد ژنوم مخمر حذف دیواره سلولی آن است. در روش‌های رایج از تخریب آنزیمی و یا بیدهای شیشه‌ای به منظور تخریب دیواره سلولی استفاده می‌شود. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Tsygankov و همکارانش انجام شد به‌منظور بررسی تأثیر بیان پروتئین دی سولفید ایزومراز بر بیان اینترفرون نو ترکیب در پیکیا پاستوریس، جهت استخراج ژنوم از بیدهای شیشه‌ای و دستگاه Smash & Grab استفاده شد [۳۰]. این روش‌ها زمانگیر بوده و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه نیستند و به‌کارگیری بیدها نیازمند حضور تجهیزات در آزمایشگاه است. Lööke و همکارانش در سال ۲۰۱۱ پروتکلی را به‌منظور استخراج سریع و کم‌هزینه محتوای ژنومیک مخمر با استفاده از استات لیتیوم و SDS ارائه دادند. این روش نیازی به استفاده از آنزیم و یا دمای بالا هم‌چنین دستگاه آزمایشگاهی ندارد و در

- disulfide isomerase affects expression, folding and O-linked glycosylation of a malaria vaccine candidate expressed in *P. pastoris*. *J Biotechnol* 2006; 121: 458-470.
- [23] Qian P, Li X, Tong G, Chen HJVg. High-level expression of the ORF6 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in *Pichia pastoris*. *Virus Genes* 2003; 27: 189-196.
- [24] Liu Y, Wu C, Wang J, Mo W, Yu M. Codon optimization, expression, purification, and functional characterization of recombinant human IL-25 in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 10349-10358.
- [25] He M, Wu D, Wu J, Chen J. Enhanced expression of endoinulinase from *Aspergillus niger* by codon optimization in *Pichia pastoris* and its application in inulooligosaccharide production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2014; 41: 105-114.
- [26] Li Y, Li D, Xu X, Cui M, Zhen H, Wang Q. Effect of codon optimization on expression levels of human cystatin C in *Pichia pastoris*. *Genet Mol Res* 2014; 13: 4990-5000.
- [27] Hu S, Li L, Qiao J, Guo Y, Cheng L, Liu J. Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. *Protein Expres Purif* 2006; 47: 249-257.
- [28] Liu X, Wu D, Wu J, Chen J. Optimization of the production of *Aspergillus niger*  $\alpha$ -glucosidase expressed in *Pichia pastoris*. *World J Microb Biotechnol* 2013; 29: 533-540.
- [29] Yadava A, Ockenhouse CF. Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infect Immun* 2003; 71: 4961-4969.
- [30] Tsygankov M, Padkina MJ. Influence of PDI Gene Overexpression on the Production of Heterologous Proteins in Yeast *Pichia pastoris*. *Russ J Genet* 2018; 8: 197-205.
- [31] Mala J, Puthong S, Maekawa H, Kaneko Y, Palaga T, Komolpis K, et al. Expression and characterization of functional single-chain variable fragment against norfloxacin in *Pichia pastoris* GS115. *Int Food Res J* 2018; 25: 1726-1732.
- [12] Lööke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* 2011; 50: 325-328.
- [13] Malpiedi LP, Díaz CA, Nerli BB, Pessoa Jr A. Single-chain antibody fragments: Purification methodologies. *Process Biochem* 2013; 48: 1242-1251.
- [14] Knappik A, Plückthun A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng Des Sel* 1995; 8: 81-89.
- [15] Krauss J, Arndt MA, Martin AC, Liu H, Rybak SM. Specificity grafting of human antibody frameworks selected from a phage display library: generation of a highly stable humanized anti-CD22 single-chain Fv fragment. *Protein Eng* 2003; 16: 753-759.
- [16] Tanfous NGB, Kallel H, Jarboui MA, Fathallah DM. Expression in *Pichia pastoris* of a recombinant scFv form of MAb 107, an anti human CD11b integrin antibody. *Enzyme Microb Tech* 2006; 38: 636-642.
- [17] Emberson LM, Trivett AJ, Blower PJ, Nicholls PJ. Expression of an anti-CD33 single-chain antibody by *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* 2005; 305: 135-151.
- [18] Willuda J, Honegger A, Waibel R, Schubiger PA, Stahel R, Zangemeister-Wittke U, et al. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res* 1999; 59: 5758-5767.
- [19] Foroumadi S, Rajabibazl M, Hosseini SH, Rajabi S, Shahidi S, Daraei A, et al. Expression and characterization of recombinant human epidermal growth factor receptor antigen (HER-2) as an indicator of breast cancer in yeast fermented systems. *Koomesh* 2016; 18: 110-116. (Persian).
- [20] Zarei N, Vaziri B, Shokrgozar MA, Mahdian R, Fazel R, Khalaj VJ, et al. High efficient expression of a functional humanized single-chain variable fragment (scFv) antibody against CD22 in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biot* 2014; 98: 10023-10039.
- [21] Chan MK, Lim SK, Miswan N, Chew AL, Noordin R, Khoo BY, et al. Expression of stable and active human DNA topoisomerase I in *pichia pastoris*. *Protein Expres Purif* 2018; 141: 52-62.
- [22] Tsai CW, Duggan PF, Shimp Jr RL, Miller LH, Narum DL. Overproduction of *Pichia pastoris* or *Plasmodium falciparum* protein



# Construction of recombinant *Pichia pastoris* expressing single-chain antibody fragment against extracellular domain of EpCAM

Fatemeh Mohammadgholizad (Pharm.D Student), Atieh Hashemi (Ph.D)\*

Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author. +98 21-88200067 at\_hashemi@sbm.ac.ir

Received: 2 Sep 2018; Accepted: 4 Mar 2019

**Introduction:** Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is highly expressed on epithelial tumors. So, EpCAM is a valuable antigen for targeted therapy. Using monoclonal antibodies (mabs) is an attractive approach for targeted cancer therapy. Importantly, limitations of intact mabs including large size led to the development of antibody fragments such as single chain fragment variable (scfv). *Pichia pastoris* is considered as a suitable host for large-scale production of recombinant proteins because of post-translation modification system and low cost. Here, the *Pichia* expressing a scfv against EpCAM extracellular domain (EpEX) was constructed.

**Materials and Methods:** The codon optimized gene encoding anti-EpEX-scfv protein was cloned in the *XhoI* and *XbaI* sites of the pPICZαB vector. The recombinant plasmid was confirmed by restriction enzyme analysis and sequencing. The constructed plasmid was integrated into GS115 strain by electroporation. Positive clones were evaluated by PCR using three sets of primers.

**Results:** Restriction enzyme analysis utilizing *HindIII* and *BamHI* (2788, 1537 bp bands), as well as *XhoI*, *XbaI* (3506, 819 bp bands) confirmed construction of recombinant pPICZαB-anti EpEX- scfv. In this way, PCR based screening results of integrants showed two bands (2200 and 1321 bp), when AOX1 primer set was used as well as one band (968 bp) when the 3' insert-specific primer paired with 5' AOX1 primer. There was one band (751 bp) in PCR result of confirmed integrants when insert-specific primer set was utilized.

**Conclusion:** These findings imply that the engineered strain was constructed. The anti-EpEX-scfv protein can be used as a potential candidate in cancer immunotherapy.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, Anti-EpEX-scfv, Monoclonal Antibodies, EpCAM, Cancer Immunotherapy.