OX40L-Fc гагнаас уургийн плазмидыг гарган авсан дүн

Т.Хүсэлт-Од[1], Г.Энхтүшиг[1],С.Энхтуяа[1], Т.Өлзийхүү[2], У.Сувд-Эрдэнэ[1], Б.Өлзийсайхан[2], Б.Амарбаясгалант[2], Б.Галиндэв[3], Ц.Билэгтсайхан[4], Б.Ариунзаяа[2], А.Оюунбаатар[5], Б.Бадмамараг[2], М.Мишээлт[2], Б.Энх-Амар[2], Н.Золмөнх[2], Т.Хонгорзул[2], С.Цогтсайхан[2], Л.Энхсайхан[2], Ч.Гансүх[2]

[1]Анагаах Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль, Био-Анагаахын Сургууль
[2]Анагаах Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль, Био-Анагаахын Сургууль, Дархлаа судлалын тэнхим
[3]Анагаах Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль, Био-Анагаахын Хүрээлэн
[4]Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль
[5]Анагаах Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль, Био-Анагаахын Сургууль, Бичил-амь судлал, халдварын сэргийлэлт хяналтын тэнхим
Цахим шуудан: t.khuseltod@gmail.com, Утас: 90147954

Түлхүүр үг:
Хавдрын эсрэг дархлаа эмчилгээ
Рекомбинант ДНХ технологи
Гибсон угсралт
Хавдрын эсрэг хэсэг газрындархлаа Эмчилгээ.

Товч утга

Үндэслэл: Хавдрын эсрэг дархлаа эмчилгээний суурь судалгаа болон эмнэлзүйн туршилт судалгааны сүүлийн үеийн үр дүнгээс үзэхэд дархлаа эмчилгээ нь хавдрын боломжит эмчилгээ болохыг харуулж байна. Т эсийн OX-40 дохио дамжуулах замыг идэвхжүүлэх нь Т зохицуулагч эсийг дарангуйлж Т эффектор эсийг идэвхижүүлдэг. Хоёр үндсэн төрлийн OX-40 агонистыг энэ зорилгоор ашигладаг. Үүнд anti-OX40 хүнийжүүлсэн эсрэгбие болон OX40L-Fc гагнаас уураг орно. OX40L-Fc гагнаас уураг нь анти-OX40 хүнийжүүлсэн эсрэгбиеийг бодвол эдийн засгийн хувьд хэмнэлттэй төдийгүй Монгол улсад үйлдвэрлэх боломжтой байгаа нь энэхүү судалгааны үндэслэл болж байна. **Зорилго:** OX40L-Fc гагнаас уургийн плазмидыг рекомбинант ДНХ технологийн аргаар гарган авах. Арга, аргачлал: Плазмидын загварчлалыг US20160024176A1 патент бүхий MEDI6383 OX40L-Fc гагнаас уургийн амин хүчлийн дарааллыг ашиглан SnapGene программ дээр загварчлалыг гаргав. Оруулга ДНХ дарааллуудыг ПГУ-ын аргаар олшруулан бэлтгэсэн. Векторын дарааллыг HindIII, XhoI рестрикцийн эсгэгээр зүсэн бэлтгэлээ. ПГУ бүтээгдэхүүнүүд болон зүсэгдсэн векторыг цэвэршүүлэн гарцыг дүгнэсэн. Бэлэн болсон дарааллуудыг Гибсон угсралтын аргаар угсарсан ба угсрагдсан плазмидыг ПГУ-ын аргаар болон рестрикцийн эсгэгээр зүсэн шалгасан. **Үр дүн:** Гибсон угсралтын аргаар плазмидыг загварчлалын дагуу угсрахад агар дээр нэг клон ургасан бөгөөд ургасан клоныг шалгахад IgG4Fc, Traf, OX40L гэх дарааллууд тус ПГУ аргаар олширсон. Рестрикцийн эсгэгээр зүсэн шалгахад амжилттай зүсэгдсэн. **Дүгнэлт:** Плазмидыг ПГУ аргаар болон рестрикцийн эсгээр зүсэн шалгахад плазмид угсрагдсан байна.

Үндэслэл: Хавдрын эсрэг дархлаа эмчилгээний суурь судалгаа болон эмнэлзүйн туршилт судалгааны сүүлийн үеийн үр дүнгээс үзэхэд дархлаа эмчилгээ нь хавдрын боломжит эмчилгээ болохыг харуулж байна. Хавдрын антиген өвөрмөц эффектор Т эсүүд хавдрын бичил орчинд тодорхойлогддог боловч хавдрын дархлаа дарангуйлах шинж чанарын улмаас эдгээр Т эсүүд хангалттай идэвхжиж чаддаггүй. Хавдрын антиген өвөрмөц эффектор Т эсийн идэвхжил нь CTLA-4, PD-1 хамааралт саатуулагч дохио, TNFR дэд бүлгийн рецепторын идэвхжүүлэгч дохионы тэнцвэрт байдлаар зохицуулагддаг. Мөн хавдрын эд дэх зохицуулагч Т эсүүд нь хавдрын антиген өвөрмөц эффектор Т эсийн үйлчлэлийг дарангуйлах нөлөө үзүүлдэг. TNFR дэд бүлд хамаарагдах OX-40 дохио дамжуулагч молекул нь эффектор Т эс болон зохицуулагч Т эсийн гадаргууд аль алинд илэрдэг. OX-40-оор дамжсан дохио нь эффектор Т эсийг идэвхжүүлж зохицуулагч Т эсийг дарангуйлах хам үйлчлэл үзүүлдэг учраас OX-40-д чиглэсэн дархлаа эмчилгээ нь хавдрыг устгахад ихээхэн үр дүнтэй байж болохыг өмнөх туршилт судалгаанууд харуулж байна. Үүний нэг жишээ болох Ronald Levy-ээр ахлуулсан станфордын судалгааны багийн CpG ODN болон анти-OX40 моноклон эсрэгбиеийг ашиглан хулганын хавдрын загвар дээр хийсэн эмчилгээний үр дүн 97% амжилттай байна. OX40-н агонист нь хавдрын Т зохицуулагч эсэд үйлчилж Т зохицуулагч эсийн үйл ажиллагааг дарангуйлж, Т эффектор эсийн үйл ажиллагааг дэмжсэнээр хавдрын эсрэг дархлааны хариу урвалыг өрнүүлдэг. Т эсийн OX-40 дохио дамжуулах замыг идэвхжүүлэхэд 2 үндсэн OX-40 агонистыг ашигладаг бөгөөд үүний нэг нь anti-OX40 хүнийжүүлсэн эсрэгбие нөгөө нь OX40L-Fc гагнаас уураг юм. OX40L-Fc гагнаас уураг нь OX40-н 2 лигандыг иммуноглобулины Fc төгсгөлтэй

холбосон уураг юм. Энэхүү уураг нь Fc төгсгөлөөрөө эсрэгбиеээр дамжих эс хордуулах урвалыг өрнүүлж хавдрын эсрэг дархлааны хариу урвалыг өрнүүлдэг. OX40L-Fc гагнаас уураг нь анти-OX40 хүнийжүүлсэн эсрэгбиеийг бодвол технологийн хувьд гарган авахад хялбар бөгөөд масс үйлдвэрлэлд шилжвэл эдийн засгийн хувьд хэмнэлттэй төдийгүй Монгол улсад үйлдвэрлэх боломжтой байгаа нь энэхүү судалгааны үндэслэл болж байна.

Зорилго: Үсэрхийлэлт хорт хавдрын эсрэг хэсэг газрын дархлаа эмчилгээнд зориулан OX40L-Fc гагнаас уургийн плазмидыг рекомбинант ДНХ технологийн аргаар гарган авах.

Арга, аргачлал: Энэхүү судалгааг Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль (АШУҮИС)-ийн Био-Анагаахын сургуулийн Дархлаа судлалын тэнхимийн дэргэдэх "Эмнэлзүйн эмгэг судлалын лаборатори", Бичил амь судлал, халдварын сэргийлэлт хяналтын тэнхимийн дэргэдэх "Бичил амь судлалын лаборатори", АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын Хүрээлэн дэх Иммунобиологийн лаборатори, Молекул биологийн лаборатори түшиглэн хийж гүйцэтгэсэн. Судалгаа хийх ёс зүйн зөвшөөрлийг АШУҮИС Ёс Зүйн Хяналтын Хорооны (2023/3-09) хурлаар батлуулсан.

Плазмидын загварчлал

Плазмидын загварчлалыг US20160024176A1 патент бүхий MEDI6383 OX40L-Fc гагнаас уургийн амин хүчлийн дараалыг ашигласан (Зураг 1).

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKQ
DKIEALSSKVQQLERSIGLKDLAMADLEQKVLEMEASTQVSHRYPRIQSIKVQFTEYK
EKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVISLHYQKDEEPLFQLKKV
RSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILI QNPGEFCVL

Зураг 1. US20160024176A1 патент бүхий MEDI6383 OX40L-Fc гагнаас уургийн амин хүчлийн дараалал

Плазмидын загварчлалыг SnapGene программ дээр гибсон угсралтын функцийг ашиглан pcDNA3.1 вектор плазмидын загварчлалыг гаргасан. Цэнхэр өнгөөр IgG4Fc, Нил ягаан өнгөөр Traf, Ногоон өнгөөр OX40L хэсгүүдийн амин хүчлийн дараалал

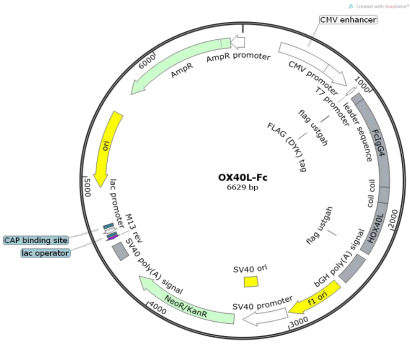
Оруулга ДНХ болон вектор дарааллуудыг бэлтгэсэн аргачлал: Оруулга ДНХ дарааллуудыг ПГУ-ын аргаар олшруулан агарозын гелд гүйлгэн дүгнэж, цэвэршүүлэн ялган авч гарцыг нанодроп спектофотометр багажаар хэмжин дүгнэсэн. pcDNA3.1_3XFlag векторын дарааллаас HindIII, XhoI рестрикцийн эсгэгээр зүсэн pcDNA3.1 дарааллыг салган бэлтгэсэн. ПГУ бүтээгдэхүүнүүд болон зүсэгдсэн векторыг агарозын гелд гүйлгэн дүгнэж, цэвэршүүлэн ялган авч гарцыг нанодроп спектофотометрийн багажаар хэмжин дүгнэсэн.

Плазмид угсарсан аргачлал: Бэлэн болсон дарааллуудыг Гибсон угсралтын аргаар угсарсан ба угсрагдсан плазмидыг трансформацын аргаар XL10Gold Ultra Competent Cell бактерийн эсэд оруулж ампциллинтай агар дээр тарив. Агар дээр ургасан бактерийн клоныг сонгон авч шөлөнд суспенз бэлтгэн 37oC-д 250RPM хурдтайгаар 16 цагийн турш өсгөвөрлөн бэлэн болсон бактерийн өсгөврөөс плазмидын ДНХ ялгах цомогийг ашиглан плазмидын ДНХ-г цэвэршүүлэн ялган авч нанодроп спектофотометрийн багажаар гарцыг хэмжин дүгнэсэн.

Угсарсан плазмидыг шалгасан аргачлал: Ялган авсан плазмидын ДНХ-г ашиглан IgG4Fc, Traf, OX40 дарааллуудыг тус тусад нь ПГУ-ын аргаар олшруулан шалгасан. Рестрикцийн эсгэгээр шалгахдаа DraI рестрикцийн эсгэг ашиглан шалгасан.

Үр дүн: Плазмидын загварчлалыг SnapGene программ ашиглан загварчилсан дүн

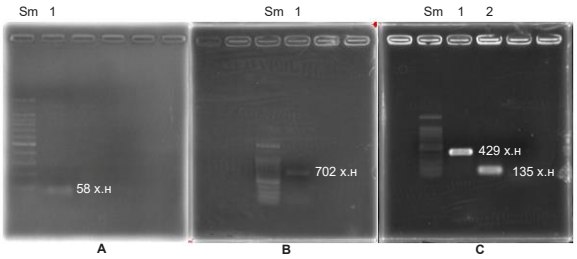
US20160024176A1 патент бүхий MEDI6383 OX40L-Fc гагнаас уургийн амин хүчлийн дараллын дагуу плазмидын загварчлалыг гаргахад 6629 хос нуклеотидын урттай плазмидын загварчлал бэлэн болсон ба энэхүү плазмидын загварчлал нь Leader, IgG4Fc, Traf, OX40L дарааллуудыг агуулсан (Зураг 2).



Зураг 2. OX40L-Fc плазмидын загварчлал

SnapGene программ дээр US20160024176A1 патент бүхий MEDI6383 уургийн huIgG4PFc, Traf2 coil-coil, huOx40L амин хүчлийн дараллын дагуу плазмидын загварчлалыг гибсон угсралтын функцыг ашиглан загварчилсан ба нэмэлтээр Leader буюу secretion signal дарааллыг оруулга гурван ДНХ дарааллын өмнө оруулж загварчилсан.

Оруулга ДНХ дараалал болон вектор дарааллыг бэлтгэсэн дүн: Плазмидын загварчлалын дагуу оруулга ДНХ дарааллыг бэлтгэхэд 58 хос нуклеотидын урттай Leader дараалал, 702 хос нуклеотидын урттай IgG4Fc дараалал, 135 хос нуклеотидын урттай Traf дараалал, 429 хос нуклеотидын урттай OX40L дарааллууд тус тус амжилттай полимеразын гинжин урвалаар олшрогдсон (Зураг 3) ба ДНХ дарааллуудыг цэвэршүүлэн ялган авахад Leader 18.8 нг/мкл, IgG-4Fc 26.9 нг/мкл, Traf 34 нг/мкл, OX40 165.3 нг/мкл концентрацитайгаар тус тус ялгагдсан (Хүснэгт 1).



Зураг 3. Leader, IgG4Fc, OX40, Traf дараалууд агарозын гелд гүйсэн байдал

Sm –100 хос нуклеотидын ДНХ хэмжээ тогтоогуур ашиглан A1- Leader, B1- IgG4Fc, C1- OX40L, C2- Traf дараалуудын олшруулалтыг дүгнэсэн.

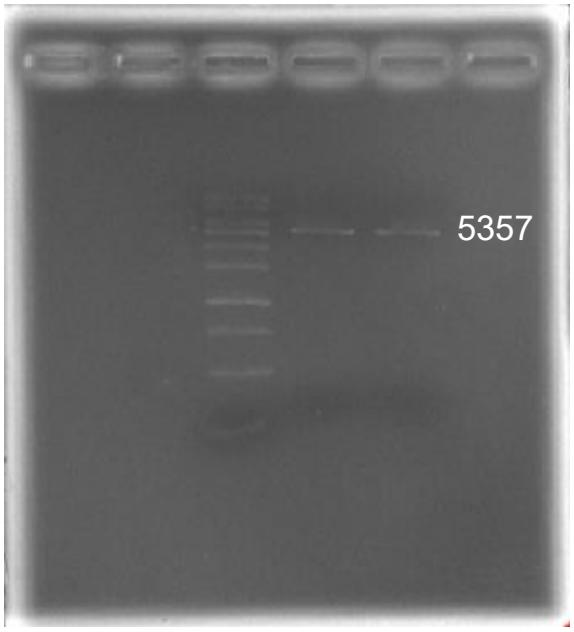
Хүснэгт 1. Leader, IgG4Fc, Traf, OX40 дараалуудыг цэвэршүүлэн ялган авч гарцыг

Дараалууд	нг/мкл	A260/280	A260/230
Leader	18.8	1.77	2.34
IgG4Fc	26.9	2.02	2.12
Traf	34	1.78	2.22
OX40	165.3	1.85	2.36

Вектор дараалал болох pcDNA3.1_3XFlag-г HindIII, XhoI рестрикцийн эсгэгээр зүсэн бэлтгэхэд 5357 хос нуклеотидын урттай pcDNA3.1 вектор, 158 хос нуклеотидын урттай 3XFlag дараалууд тус тус (Зураг 4) бэлэн болсон ба 5357 хос нулеотид бүхий pcDNA3.1 дараалыг цэвэршүүлэн ялган авахад 21.1 нг/мкл концентрацитайгаар ялгав. (Хүснэгт 2).

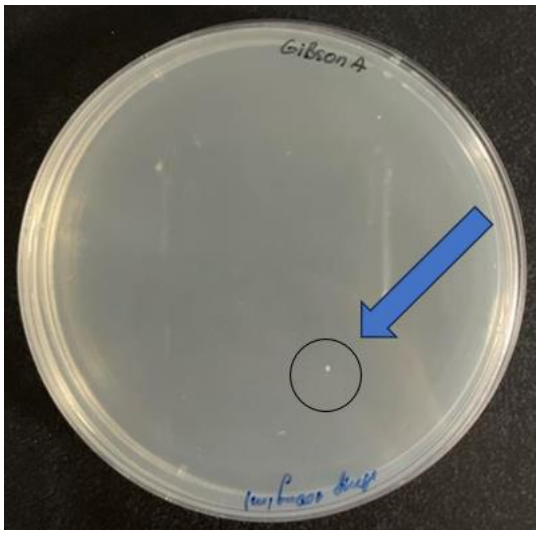
Хүснэгт 2. Вектор дараалыг цэвэршүүлэн ялган авч гарцыг хэмжсэн дүн

Дараалууд	нг/мкл	A260/280	A260/230
Вектор	21.1	1.77	1.95



Зураг 4. Вектор дараалал агарозын гелд гүйсэн байдал

Sm-1000 хос нуклеотидын урттай ДНХ хэмжээ тогтоогуур ашиглан вектор дараалал болох pcDNA3.1_3XFlag-г HindIII, XhoI рестрикцийн эсгэгээр зүсэн бэлтгэхэд 5357 хос нуклеотидын урттай pcDNA3.1 вектор, 158 хос нуклеотидын урттай 3XFlag дараалууд тус тус зүсэгдсэн.



Зураг 5. Угсрагдсан плазмидыг агуулж буй бактери агар (ампциллин 100мкг/мл) дээр ургасан байдал

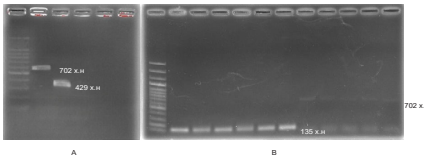
Цэнхэр сумаар заасан нэг ширхэг бактерийн клон нь ампциллинд тэсвэртэй угсрагдсан OX40L-Fc плазмидыг агуулж буй бактерийн клон.

Плазмид угсарсан дүн: Цэвэршүүлсэн оруулга 4 ДНХ дараалал болон вектор дараалуудыг ашиглан гибсон угсралтын аргаар плазмидыг загварчлалын дагуу угсрахад агар дээр нэг клон ургасан (Зураг 5) үүнээс үзэхэд ампциллинд тэсвэртэй генийг агуулсан векторт угсарсан плазмид мөн болхыг баталж байна. Агар дээр ургасан бактерийн клоноос плазмидын ДНХ-г цэвэршүүлэн ялган авахад 185.4 нг/мкл концентрацитай плазмидын ДНХ-г ялгасан (Хүснэгт3).

Хүснэгт 3. Агар дээр ургасан клоноос плазмидын ДНХ цэвэршүүлэн ялган авч гарцыг хэмжсэн дүн

нг/мкл	A260/A280	A260/A230
185.4	1.87	2.28

Плазмидыг шалгасан дүн



Зураг 6. IgG4Fc, OX40, Traf дараалуудыг ПГУ аргаар шалгасан дүн

Sm-100 хос нуклеотидын ДНХ хэмжээ тогтоогуур ашиглан A1- IgG4Fc, A2- OX40L, B1-6 Traf, B7-11 Ig G4Fc дараалуудыг шалгасан.



Зураг 7. DraI рестрикцийн эсгэгээр плазмидын ДНХ-г зүсэн шалгасан дүн

Sm- 100 хос нуклеотидын ДНХ хэмжээ тогтоогуур ашиглан 1-Угсарсан плазмидыг DraI рестрикцийн эсгэгээр зүссэн ба угсарсан плазмид нь оруулга ДНХ 4 дараалал бүхэлдээ плазмидад байна.

Хэлцэмж: Одоогийн байдлаар OX40L-Fc гагнаас уургийн плазмидын загварчлал болон хэрхэн плазмидыг угсарсан болон шалгасан талаарх мэдээлэл хомс байна. Одоогоор зөвхөн US20160024176A1 патент бүхий MEDI6383 OX40L-Fc гагнаас уургийн амин хүчлийн дарааллын мэдээлэл байна. OX40L-Fc плазмидын угсралтын талаарх мэдээлэл хомс байгаа ч бидний плазмидын угсралтын арга зүйд рекомбинант ДНХ технологийн өргөн хэрэглэгддэг аргуудыг ашигласан.

Цаашид бидний боловсруулсан плазмидын угсралт хийх аргачлалаар өөрсдийн боловсруулж буй OX40L-Fc гагнаас уургыг рекомбинант аргаар гарган авах боломжтой юм.

Цаашид плазмидын уураг нийлэгжүүлэх идэвх болон үйл ажиллагааг судалж туршилтын амьтанд хавдрын эмчилгээний үр нөлөөг судлах шаардлагатай.

Дүгнэлт:

1. US20160024176A1 патент бүхий MEDI6383 OX40L-Fc гагнаас уургийн амин хүчлийн дарааллын дагуу плазмидын загварчлалыг Snap-Gene программ ашиглан загварчилсан.
2. Гибсон угсралтын дүнд агар дээр ургасан клоноос плазмидын ДНХ-г ялган авч ПГУ аргаар болон рестрикцийн эсгэг ашиглан шалгахад плазмид угсрагдсан байна.

Талархал: Энэхүү судалгааг “OX-40 агонистыг хавдрын хэсгийн дархлаа эмчилгээнд хэрэглэх нь” ШУТСангийн санхүүжилттэй 2019 оны төслийн хүрээнд хийж гүйцэтгэсэн.
Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургуулийн Био-Анагаахын сургуулийн Дархлаа судлалын тэнхимийн дэргэдэх “Эмнэлзүй эмгэг судлалын лаборатори”, Бичил амь судлал, халдварын сэргийлэлт хяналтын тэнхимийн дэргэдэх “Бичил амь судлалын лаборатори”, АШУУИС-ийн Био-Анагаахын Хүрээлэн дэх Иммунобиологийн лаборатори, Молекул биологийн лабораторийн хамт олонд чин сэтгэлээсээ талархал илэрхийлж байна.

Ном зүй:

1. *Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, Soria JC, Zitvogel L, Marabelle A. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. European journal of cancer (Oxford, England : 1990). 2016;52:50-66.*
2. *Linch SN, McNamara MJ, Redmond WL. OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal. Frontiers in oncology. 2015;5:34.*
3. *Czerwinski DK, Shree T, Haebe S, et al. Loss of the OX40 Target in Lymphoma Patients after Combining an Anti-OX40 Agonist Antibody with in Situ Vaccination. Blood. 2023;142:3020.*
4. *Oberst MD, Augé C, Morris C, et al. Potent Immune Modulation by MEDI6383, an Engineered Human OX40 Ligand IgG4P Fc Fusion Protein. Molecular cancer therapeutics. 2018;17(5):1024-1038.*

The result of OX40L-Fc fusion protein plasmid assem-

Khuselt-Od T[1], Enkhtushig[1] G, EnkhtuyaS[1], Ulziikhuu T[2], Suvd-Erdene U[1], Ulziisaikhan B[2], Amarbayasgalant B[2], Galindev B[3], Bilegtsaikhan Ts[4], Ariunzaya B[2], Oyunbaatar A[5], Badmaarag B[2], Misheelt M[2], Enkh-Amar B[2], Zolmunkh N[2], Khongorzul T[2], Tsogtsaikhan S[2], Enkhsaikhan L[2], Gansukh Ch[2]

1MNUMS, School of Bio-Medicine
[2]MNUMS, School of Bio-Medicine, Department of Immunology
3MNUMS, Institute of Bio-Medicine
[4]Mongolian National University of Medical Sciences
[5]MNUMS, School of Bio-Medicine, Department of Microbiology, Department of Infection Control
Email: t.khuseltod@gmail.com, Tel: +976-90147954

Background: Recent studies investigating the efficacy of immunotherapy against malignancies and the consequential importance of immune modulation have elucidated the promising potential of immunotherapeutic interventions in combatting cancer. Activation of the OX-40 pathway has been identified as a pivotal mechanism in augmenting T-cell effector functions. To this end, two primary classes of OX-40 agonists have been harnessed: anti-OX40 monoclonal antibodies and OX40L-Fc fusion proteins. Notably, OX40L-Fc fusion proteins offer distinct advantages over anti-OX40 monoclonal antibodies, particularly in terms of production simplicity, thus holding promise for potential implementation within the biomedical landscape of Mongolia. The impetus for this study is derived from these foundational insights.

Aim: Assembling the OX40L-Fc fusion protein plasmid using recombinant DNA technology

Materials and method: The design of the plasmid blueprint was conducted utilizing SnapGene software, adhering to the specifications outlined in US patent US20160024176A1 for MEDI6383 OX40L-Fc fusion protein. Synthesis of DNA sequences ensued in accordance with the Polymerase Chain Assembly (PCA) technique as per established protocols. Subsequently, ligation of vector sequences and synthesized inserts was performed employing HindIII and XhoI restriction enzymes. Following this, purification of the resultant plasmids and digested vectors was executed, with the integrity of the constructs being validated via agarose gel electrophoresis. Subsequent to assembly, Gibson assembly methodology facilitated seamless fusion, with confirmation of resulting plasmids accomplished through PCR amplification and restriction enzyme digestion.

Results: The application of the Gibson assembly technique yielded the synthesis of a plasmid clone in accordance with the prescribed design parameters. Upon scrutiny, the cloned entity exhibited the integrated sequences of IgG4Fc, Traf, and OX40L, as intended. Subsequent validation via restriction enzyme analysis affirmed the successful integration of the targeted fragments into the construct.

Conclusion: Upon validation through both Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis and restriction enzyme digestion, the plasmid was confirmed to have been effectively assembled.

Keywords: against cancer immunotherapy, recombinant DNA, technology