Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 32, No. 2, Summer 2022 REVIEW ARTICLE

A review of methods to increase the stability of recombinant pharmaceutical proteins during the production and storage process

Somayeh Abolghasemi-Dehaghani[1], Mohsen Gharanfoli[2], Mehran Habibi-Rezaei[3], Ramezan Ali Khavari-Nejad[1]
[1] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran-Iran
[3]Protein Biotechnology Research Lab (PBRL), School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

The production of biotechnological drug proteins plays an important role against disease. The process of producing drug recombinant proteins is not a direct path, because it requires a lot of work and on the other hand, one of the important and significant aspects in the production of proteins is the discussion of their stability and solubility during the expression and purification process. Proteins are stable only in a limited range of temperature and acidity conditions and are highly susceptible to physical and chemical degradation. Today, various solutions have been proposed to increase the solubility and stability of proteins, including guided changes in the protein molecule, and optimization of the instructions for expression, purification and solubility of proteins, which is often the first approach that is not possible. This review article provides solutions to increase the stability of proteins at different levels, including the study of the effect of expression construct design, protein tags and sequences on stability, optimal host cell selection and improved expression conditions. The effect of optimizing buffers used in pharmaceutical formulations such as selecting appropriate amino acids and osmolytes to increase protein stability and how sugars and polyols affect the stability of recombinant pharmaceutical proteins is also investigated.

Keywords: *Therapeutic proteins, Protein stability, Construct design, Formulation, Improvement of expression conditions.*

Cited as: Abolghasemi-Dehaghani S, Habibi-Rezaei M, Ramezan Khavari-Nejad A. A review of methods to increase the stability of recombinant pharmaceutical proteins during the production and storage process. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 32(2): **111-122.**

Correspondence to: Mohsen Gharanfoli
Tel: *+ 982122338948*
E-mail: mgharanfoli@royaninstitute.org
ORCID ID: 0000-0002-8403-7817
Received: 12 Sep 2021; **Accepted:** 10 Nov 2021

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۱۱۱ تا ۱۲۲

Review Article

مروری بر روش‌های افزایش پایداری پروتئین‌های نوترکیب دارویی در طول فرایند تولید و نگهداری

سمیه ابوالقاسمی دهاقانی[۱]، محسن قرنفلی[۲]، مهران حبیبی رضایی[۳]، رمضانعلی خاوری نژاد[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۲]گروه ژنتیک، پژوهشکده تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
[۳]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

تولید پروتئین‌های دارویی زیست فناور نقش مهمی در مبارزه بر علیه بیماری‌ها ایفا می‌کند. فرایند تولید پروتئینی‌های نوترکیب دارویی مسیری مستقیم نیست، زیرا نیاز به کار فراوان دارد و از سوی دیگر یکی از جنبه‌های مهم و قابل توجه در تولید پروتئین‌ها بحث پایداری و حلالیت آنها در طول فرایند بیان و خالص سازی است. پروتئین‌ها تنها در بازه محدودی از شرایط دمایی و اسیدیته پایدار هستند و بسیار مستعد تخریب فیزیکی و شیمیایی هستند. امروزه راهکارهای مختلفی به منظور افزایش میزان حلالیت و پایداری پروتئین‌ها ارایه شده است که شامل تغییرات هدایت شده در ملکول پروتئین و بهینه سازی در دستورالعمل‌های بیان، خالص سازی و فرآیند حلالیت پروتئین‌ها است که در اغلب اوقات رویکرد اول ممکن و دست یافتنی نیست. این مطالعه مروری به ارائه راهکارهای جهت افزایش پایداری پروتئین‌ها در سطوح مختلف می‌پردازد، از جمله بررسی تاثیر طراحی سازه بیانی، توالی و دنباله های پروتئینی بر روی پایداری، انتخاب بهینه سلول میزبان و بهبود شرایط بیان نیز مورد بحث قرار می‌گیرد، همچنین تاثیر بهینه سازی بافرهای به کار رفته در فرمولاسیون دارویی مانند انتخاب آمینو اسید ها و اسمولایت های مناسب به منظور افزایش پایداری پروتئین و چگونگی تاثیر قند ها و پلی اُل‌ها بر روی پایداری پروتئین‌ها نوترکیب دارویی نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

واژگان کلیدی: *پروتئین‌های دارویی زیست فناور، پایداری پروتئین، طراحی سازه بیانی، فرمولاسیون، بهبود شرایط بیان.*

مقدمه

یکی از جنبه‌های مهم و قابل توجه در تولید پروتئین‌ها بحث پایداری و حلالیت آنها است. پایداری پروتئین‌ها در طول فرایند بیان و خالص سازی یکی از موضوعات مهم و چالش بر انگیز است زیرا بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب تحت شرایطی که بیان می‌شوند ناپایدار بوده و فولدینیگ صحیح خود را از دست می‌دهند و یا اینکه دچار شکست پروتئولیتیکی شده و در نهایت کاهش پایداری آنها در سطح ساختار فضایی رخ می‌دهد. از این رو مطالعه پایداری پروتئین‌ها و شناسایی عوامل افزایش دهنده پایداری آنها یکی از موضوع های مهم و مورد توجه در جوامع علمی است (۱). در تولید پروتئین‌های نوترکیب، تولید پروتئین پایدار با فولدینگ صحیح و دارای عملکرد درست جهت استفاده دارویی بسیار حائز اهمیت است (۲). امروزه استراتژی های مختلفی به منظور افزایش میزان حلالیت و پایداری پروتئین ها ارایه شده است که شامل تغییرات هدایت شده در ملکول پروتئین بوده و یا بهینه سازی در پروتکل های بیان، خالص سازی و پروسه حلالیت پروتئین ها به انجام می رسد که در اغلب اوقات رویکرد اول ممکن و دست یافتنی نیست (۱). یکی از

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه ژنتیک، پژوهشکده تولید مثل، پژوهشگاه رویان، محسن قرنفلی
(**email**: mgharanfoli@royaninstitute.org)
ORCID ID: 0000-0002-8403-7817

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۹

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

مشکلاتی که تولید پروتئین‌های نوترکیب با آن مواجه است، تولید پروتئینی با فولدینیگ صحیح و فعال در سلول میزبان است. متاسفانه بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب به صورت فولد شده پایدار و محلول بیان نمی‌شوند و این موضوع یک مانع بزرگ در صنعت داروسازی و بیوتکنولوژی است.

تولید پروتئین‌های دارویی زیست فناور نقش مهمی در مبارزه بر علیه بیماری‌ها ایفا می‌کند. در دهه‌های اخیر رشد تحقیق بر روی این محصولات به طور محسوسی از داروهای کوچک مولکول سبقت گرفته است و انتظار می‌رود این روند در دهه‌های پیش رو نیز ادامه‌دار باشد. تولید یک داروی زیستی مسیری مستقیم نیست، زیرا که از یک سو این فرآیند نیاز به کار فراوان دارد و از سوی دیگر مسئله ناپایداری محصول در طی فرآیند و نیز هنگام نگهداری مطرح است؛ به علاوه چالش‌های دیگری چون نیاز به قوانین محکم، بررسی موشکافانه مقررات GMP (Good Manufacturing Practice) و رقابت شدید در بازار مصرف (به عنوان مثال در اثر ظهور بیوسیمیلارها) پیش رو هستند. از این رو یکی از جنبه‌های مهم و قابل توجه در تولید پروتئین‌ها بحث پایداری و حلالیت آنها در طول فرایند بیان و خالص سازی است، زیرا پروتئین‌ها تنها در بازه محدودی از شرایط دمایی و اسیدیته پایدار هستند (marginal stability) و بسیار مستعد تخریب فیزیکی و شیمیایی هستند. تعداد بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب نیز تحت شرایطی که بیان می‌شوند ناپایدار بوده و تا شدگی صحیح خود را از دست می‌دهند و یا اینکه دچار شکست پروتئولیتیکی شده و در نهایت کاهش پایداری آنها در سطح ساختار فضایی رخ می‌دهد. همچنین پروتئین‌های دارویی تمایل بسیار زیادی برای تجمع (aggregation) دارند، به خصوص زمانی که با غلظت بالای مورد نیاز برای دوزها، نگهداری می‌شوند؛ بنابراین مشکل اساسی در راه تولید پروتئین‌های دارویی که یک کلاس بزرگ از داروها هستند، بحث پایداری و حفظ فعالیت آنها است.

۱- تولید داروهای پروتئینی: چالش ها و پیشرفت ها

پروتئین‌ها و پپتیدها دارای پتانسیل بالای درمانی برعلیه بیماری‌ها و سندرم‌های مختلف هستند؛ از این رو بخش مهمی از صنعت داروسازی را تشکیل داده‌اند. امروزه در شاخه بیوتکنولوژی دارویی، میزان پروتئین‌هایی که به عنوان دارو به بازار عرضه می‌شوند، دارای رشد چشم‌گیری بوده و تعداد بسیاری نیز در مرحله مطالعات بالینی قرار دارند (۳). اداره مواد غذایی و دارویی ایالات متحده آمریکا (FDA) بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب را به عنوان داروهای بیوتکنولوژی، واکسن، آنزیم، سایتوکاین‌های طبیعی و یا نوترکیب ثبت کرده است. این داروهای نوترکیب درمانی که یک سوم از کل داروهای بیولوژیک را دربردارند، همچنین تحت عنوان درمان های بیوتکنولوژی نیز شناخته می‌شوند، زیرا آنها برای اهداف مختلفی شامل تشخیص، پیشگیری، مدیریت بیماری و یا درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴, ۵).

منبع، روش تولید و خالص‌سازی پروتئین‌های درمانی پیشرفت‌های بسیار زیادی کرده است که به طور معمول پروتئین‌های با وزن ملکولی پایین به صورت شیمیایی و آنهایی که دارای تعداد زیادی اسید های آمینه هستند در سلول‌های زنده تولید می شوند. تکنولوژی DNA نوترکیب معمولاً برای تولید پروتئین‌های دارویی نوترکیب از سلول‌های پستانداران استفاده می‌کند. پس از تولید پروتئین‌های نوترکیب موضوعی که مطرح می شود بحث خالص سازی آنها از بین ترکیبات پروتئینی و غیر پروتئینی است. نکته‌ای که باید به آن توجه داشت این است که خالص سازی اشتباه و نادرست پروتئین‌های دارویی و پپتیدها تاثیر به سزایی بر روی پاسخ‌های ایمنی در بیماران دارد، مانند آلودگی‌های پروتئینی که سبب ایجاد واکنش‌های آلرژیک می‌شود و همچنین نحوه خالص سازی پروتئین‌ها تاثیر بسیار زیادی بر روی ساختار پروتئین‌ها دارند که به طبع بر روی عملکرد آنها نیز تاثیر گذار است؛ از این رو روش‌های مختلفی مانند کروماتوگرافی، رسوب دادن، جداسازی و الترافیلتراسیون برای خالص سازی پروتئین‌های دارویی معرفی شده است (۸-۶).

۲-۱- پایدارسازی و فرمولاسیون پروتئین‌های دارویی

پروتئین‌ها کلاس بزرگی از داروها هستند که مشکل اساسی در راه تولید این گونه داروها بحث پایداری آنها است. زمانی که در مورد پایداری پروتئین‌ها صحبت می‌شود اغلب به دنبال درک این نکته هستیم که چرا و چه موقع ساختار طبیعی پروتئین ها تمایل دارند که به ساختار واسرشت (denature) تبدیل شوند. ساختار پایه پروتئین‌ها اشاره به ساختاری دارد که به صورت کاملا بهینه و به درستی تا شده و دارای فعالیت و عملکرد است و در مقابل، فرم واسرشت پروتئین‌ها فاقد ساختار و فعالیت است. این دو فرم زمانی در حالت تعادل قرار دارند که از لحاظ ترمودینامیکی یکسان باشند (۹). پروتئین‌های دارویی تمایل بسیار زیادی برای متراکم شدن دارند، به خصوص زمانی که با غلظت بالای مورد نیاز برای دوزها، نگهداری

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

می‌شوند (۱۰). از آنجا که تجمع پروتئین‌ها سبب ایجاد پاسخ ایمنی در بیماران می‌شود؛ بنابراین تجمع از جمله مواردی است که باید به دقت در طول پروسه تولید و نگه داری پروتئین‌های دارویی مورد بررسی قرار گیرد. بیش از ۵۰ سال است که دانشمندان تلاش‌های بسیار زیادی برای پی بردن به رابطه بین دناتوراسیون پروتئین ها و رقابتی که بین دناتوراسیون برگشت پذیر و برگشت ناپذیر آنها وجود دارد انجام داده‌اند، زیرا تجمع بزرگترین مانع در بیوشیمی پروتئین‌ها علی الخصوص پروتئین های دارویی است.

یکی از تنگناهای اصلی در راه تولید پروتئین‌ها بحث پایداری و حلالیت آنها است، وجود پروتئین با غلظت بالا و پایداری طولانی مدت، عموماً یکی از نیازهای اساسی موجود در تهیه داروهای پروتئینی به صورت مایع است. پروتئین‌ها در غلظت بالا عموما متراکم شده، رسوب می‌کنند و گاهی اوقات ممکن است که به صورت خود به خودی دچار شکست‌های پروتئولیتیکی نیز بشوند؛ بنابراین آماده سازی نمونه پروتئینی که هم دارای غلظت بالا بوده و هم پایداری طولانی مدت در حالت مایع داشته باشد با یکدیگر متناقض و فرایند مشکلی است (۱۱, ۱۲).

شکست پروتئینی یکی دیگر از چالش‌هایی است که در طول فرآیند استخراج و نگهداری پروتئین‌ها با آن روبرو هستیم. پروتئین‌ها در شرایطی که در محیط اصلی خود قرار ندارند ناپایدار شده، پروتئولیز و شکسته می‌شوند و یا تجمع در آنها اتفاق می افتد. در این شرایط امکان شکست-های شیمیایی شامل اکسید شدن، دآمین شدن، قطعه قطعه شدن و تغییر در پیوندهای دی سولفید یا کراس لینک نیز در آنها وجود دارد. مسیر دیگر تجزیه شدن در طول فرمولاسیون دارویی و اکسید شدن پروتئین‌ها است. اکسید شدن پروتئین‌ها هم مانند تجمع سبب ایجاد تغییرات اساسی در ساختار پروتئین‌ها می‌شود که باعث شده ساختار دوم، سوم و چهارم آنها نیز تحت تاثیر قرار گیرد. بسیاری از پروتئین‌ها نسبت به شرایط تجمع و اکسیداسیون حساس هستند. تجمع مانع اصلی در مسیر فرمولاسیون ترکیبات بیولوژیک و در پروسه بیان بالا و خالص سازی است (۱۳). فرمولاسیون پروتئین‌های دارویی در مقایسه با دیگر مواد دارویی بسیار پیچیده است، زیرا تحت تاثیر ناپایداری‌های فیزیکی و شیمیایی در پروتئین‌ها، از طریق پروسه های مختلفی مانند تجمع، دناتوراسیون، هیدرولیز و یا اکسید شدن شکست ایجاد می‌شود. بنابراین مطالعات پیش فرمولاسیون به عنوان یک مرحله مهم در فرمولاسیون مواد دارویی است. به منظور افزایش پایداری پروتئین‌ها، خصوصیات شیمیایی و فیزیکی آنها را باید در نظر گرفت تا بتوان افزودنی‌های مناسب را به پروتئین اضافه کرد. به کار گیری فرمولاسیون مناسب می‌تواند جلوی این گونه تاثیرات را بگیرد و برای فائق آمدن به این مشکل از اصلاحات فیزیکی و شیمیایی و یا از پلیمرها در فرمولاسیون داروها نیز می‌توان استفاده کرد (۱۴).

۲- عوامل تاثیر گذار و روش‌های افزایش پایداری پروتئین ها

۲-۱- عوامل تاثیر گذار در پایداری پروتئین‌ها

علاوه بر دما و حضور واسرشت کننده‌ها از عوامل متغیر دیگری که پایداری پروتئین ها را تحت تاثیر قرار می دهند می‌توان به تاثیر اسیدیته pH، نمک‌ها در غلظت‌های مختلف، کمک حلال‌ها، اسمولایت‌ها، نگهدارنده‌ها و سورفکتانت‌ها اشاره کرد (۱۵, ۱۶). تغییر در هر یک از این عوامل می‌تواند در بعضی از موارد سبب تغییر در تا شدگی و متراکم شدن پروتئین‌ها شده که در نتیجه سبب کاهش پایداری و از دست دادن فعالیت آنها می‌شود (۱۷). پروتئین‌ها در مجاورت نقطه ایزوالکتریک (Isoelectric point) خود پایدار هستند. به طورکلی با در نظر گرفتن استثناهای موجود، برهم کنش‌های الکتروستاتیک نقش کمی در پایداری پروتئین در حالت طبیعی دارند. اتصالات لیگاندها مانند مهار کننده‌ها به آنزیم ها نیز باعث افزایش پایداری پروتئین‌ها می‌شود.

تعداد اتصالات دی سولفیدی در پروتئین‌های خارج سلولی زیاد است. این در حالی است که پروتئین‌های درون سلولی پیوندهای دی سولفیدی در آنها کمتر دیده می‌شود. وجود تعداد زیاد پیوندهای دی سولفیدی در پروتئین‌ها سبب افزایش پایداری در حالت طبیعی پروتئین‌ها از طریق محدودیت در انعطاف پذیری ساختار و در نتیجه کاهش میزان آنتروپی ساختاری پروتئین‌ها می‌شود. با توجه به اینکه هر کدام از ریشه‌های آمینو اسیدی در توالی پروتئینی دارای خواص متفاوتی هستند، از این رو مشارکت یکسانی در پایداری پروتئین‌ها ندارد. مطالعات نشان داده است که عدم دسترسی ریشه‌های آمینو اسیدی، که در سمت داخل پروتئین قرار دارد، به مولکول های حلال سبب شده که این ریشه های آمینو اسیدی در ساختار اولیه مشارکت بیشتری در پایداری پروتئین‌ها نسبت به ریشه‌های آمینواسیدی که در سمت خارج پروتئین ها قرار دارند داشته باشند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

۲- ۲-راهکارهای افزایش پایداری ساختاری و ساختمانی پروتئین‌ها

۱-۲-۲- تاثیر طراحی سازه بیانی،توالی و دنباله‌های پروتئینی بر پایداری پروتئین‌ها

راه حل‌های که برای افزایش پایداری پروتئین‌ها ارایه می‌شود به صورت روش‌های پشت سر هم و سریالی است. مهندسی سازه ژنی تولید کننده پروتئین یک رویکرد عمومی برای افزایش پایداری پروتئین‌ها است، که از طریق آن می‌توان بیان، خالص سازی و فعالیت پروتئین را افزایش داد، که یک حیطه گسترده و پرکاربردی است که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از جمله متدهایی که در این حوزه استفاده می‌شود می‌توان به جهش‌های هدفمند (site directed mutagenesis)، اضافه کردن و یا حذف قطعه ژنی (segment/domain deletion and ligation)، بهینه کردن کدن‌های اسید های آمینه (using novel non-native amino acids)، تغییرات شیمیایی (Chemical modification and additives) و روش‌های احتباسی به کمک ذرات نانو (confinement in nanoparticles) اشاره کرد (۱۲).

۱-۱-۲-۲- طراحی سازه بیانی

طراحی سازه بیانی اولین مرحله‌ای است که بیولوژیست‌های ساختاری در راستای افزایش پایداری، در فرایند بیان و خالص‌سازی پروتئین‌ها باید از آن مطمئن باشند. به طور مثال ممکن است پایداری ساختاری در پروتئین‌ها به علت وجود جایگاه‌های شکست پروتئولیزی تحت تاثیر قرار گیرد، وجود این جایگاه‌ها سبب شده پروتئین‌ها بیشتر تحت تاثیر پروتئازهای که در درون سلول میزبان وجود دارند قرار گیرند. فرایند پروتئولیز را می‌توان به کمک تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و با حذف جایگاه‌های شکست از روی سازه بیانی در طول ساخت پروتئین نوترکیب کاهش داد که در نتیجه حذف این جایگاه‌های شکست، پروتئین‌ها با اندازه واقعی و در مقیاس بالا تولید می‌شوند (۱۸، ۱۹).

ساختار اول بعضی از پروتئین‌ها ذاتا ناپایدار و دارای نیمه عمر کوتاهی هستند. به طور مثال پروتئین هایی که توالی آنها غنی از اسید آمینه‌های پرولین، گلوتامات، سرین و ترئونین (PESTs) است، اغلب دارای نیمه عمر کمتر از دو ساعت هستند. وجود این توالی‌ها (PESTs) پروتئین را برای پروتئولیز شدن توسط ماشین پروتئوزوم‌ها و یا مسیر پروتئولیز توسط calpain مستعد می‌سازد (۲۰، ۲۱).

همچنین توالی انتهای N، یک فاکتور مهم برای اندازه گیری نیمه عمر پروتئین در شرایط آزمایشگاهی است. به طور مثال، اگر این دنباله N غنی از اسید آمینه‌های متیونین، سرین، آلانین،گلایسین، ترئونین، والین و یا پرولین باشد، نیمه عمر پروتئین بیشتر از۲۰ ساعت است و پروتئین پایدار می‌شود؛ در مقابل در صورتی که این دنباله از فنیل آلانین، آسپارتات، لایزین و یا آرژنین تشکیل شده باشد پروتئین ناپایدار شده و نیمه عمر آن کمتر از ۳ دقیقه است که ناپایدار شدن در این روش از طریق مسیر یوبی کوئیتین است. بنابراین تاثیر انتهای N در ناپایداری پروتئین در سیستم‌های بیانی باکتریایی قابل توجه نیست. از این رو به منظور افزایش پایداری این گونه از پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و با بهینه کردن کدون‌های اسیدهای آمینه در این پروتئین‌ها می‌توان نیمه عمر آنها را افزایش داد (۲۲، ۲۳).

۲-۱-۲-۲- تاثیر دنباله‌های پروتئینی بر روی پایداری و افزایش حلالیت پروتئین‌ها

پروتئین‌های نوترکیب زیادی در سیستم‌های باکتریایی مانند اشرشیاکلی تولید می‌شوند که چالش اصلی در مسیر تولید این پروتئین‌ها تشکیل اجسام اینکلوژنی (Inclusion bodies) و تبدیل شدن پروتئین‌ها به ساختارهای نامحلول است که برای یک سیستم بیانی نامطلوب است. به کمک تکنیک‌های مهندسی ژنتیک می‌توان در طراحی سازه‌های ژنی بیان شده در باکتری‌ها از دنباله‌های استفاده کرد که نه تنها به افزایش حلالیت پروتئینها کمک می‌کند، بلکه سبب شده که خالص سازی پروتئین‌ها نیز ساده‌تر شود. نکته دیگری که باید در اینجا مورد توجه قرار گیرد این است دنباله N که توالی آنها برروی پایداری پروتئین‌ها تاثیر گذار است، در سیستم‌های که از دنباله‌ها (TAG) استفاده می‌کنند پوشیده می‌شود؛ از آن رو این دنباله‌ها نمی‌توانند تاثیری بر روی پایداری پروتئین‌ها داشته باشند. علاوه بر تاثیری که دنباله‌ها بر افزایش پایداری پروتئین‌ها می‌گذارند، آنها را می‌توان به عنوان عاملی برای افزایش حلالیت پروتئین هدف نیز در نظر گرفت، مانند MBP TAG (Maltose Binding Protein) که سبب افزایش حلالیت پروتئین هدف شده و مانند چاپرون سبب القای تاشدگی صحیح پروتئین هدف در باکتری *Ecoli* می‌شود.

دنباله‌های پروتئینی در فرایند جداسازی و افزایش بازده خالص‌سازی پروتئین های نوترکیب نیز موثر هستند، پس از اتمام خالص‌سازی روش عمومی برای حذف دنباله‌های

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

تمایلی، استفاده کردن از پروتئاز ها مانند ترومبین و factor Xa است که در نتیجه آن یک تکه تکه شدن غیر اختصاصی انجام شده و کاهش پایداری در پروتئین هدف ایجاد می‌شود. بنابراین استفاده کردن از دنباله‌ها در خالص سازی در صورتی می‌توانند باعث افزایش پایداری ساختاری شوند که خود این دنباله‌ها توانایی جدا شدن از پروتئین‌ها را بدون نیاز به استفاده کردن از پروتئازها داشته باشند. دنباله‌های نظیر intein-based tags که خود آنها توانایی جدا شدن از پروتئین‌ها را دارند، جلوی این نوع ناپایداری‌های ایجاد شده تحت تاثیر پروتئاز ها را در پروتئین می‌گیرند که برای جدا شدن بدون نیاز به پروتئاز های درونی از نیکل نیز می‌توان استفاده کرد (۲۴).

در سیستم‌های بیانی باکتریایی، به منظور جلوگیری از تشکیل اجسام اینکلوژنی و با توجه به اینکه برخی از پروتئین‌ها در فضای سیتوپلاسمی پایدار نیستند، سیستم حاملی pMal (pMal vector system (NEB)) در ارتباط با نشانگر malE برای انتقال پروتئین از ما بین غشای سیتوپلاسمی به فضای پری پلاسمی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در نتیجه پروتئین‌ها به بخش‌های دیگر سلول منتقل شده؛ بنابراین از پروتئولیز شدن آنها جلوگیری شده و سبب افزایش پایداری ساختاری (compositional stability) می‌شود. همچنین استفاده از چپرون‌ها مانند قطعات Fab آنتی بادی‌ها (Fab antibody fragments) که سبب افزایش پایداری پروتئین های غشایی می‌شود به افزایش پایداری پروتئین‌ها نیز کمک می‌کند. از دیگر چاپرون‌هایی که سبب افزایش پایداری پروتئین‌ها در طول بیان می‌شوند می‌توان به DnaK و GroEL اشاره کرد.

امروزه استفاده از روش‌های پیشرفته مهندسی ژنتیک برای ایجاد تغییر در پلاسمید بیانی و سلول میزبان مورد توجه قرارگرفته است؛ بنابراین نیاز به روش های دقیق و سریعی است که بتواند وقایع تا شدگی و تا شدگی را در لحظات اولیه و مستقیما در سلول زنده ثبت کند. این روش‌های انتخابی، کارآیی لازم برای بررسی تا شدگی و حلالیت در شرایط محیط سلول های زنده را دارند، همچنین می‌توانند برای بررسی ترکیباتی که تجمع (aggregation) را مهار می‌کنند و عواملی که باعث افزایش حلالیت به صورت طبیعی و یا با کمک موتاسیون می شوند، مورد استفاده قرار گیرند (۱۸).

تمامی این روش‌ها، علی رغم ارزشمند بودن بسیار زمان بر و نیازمند طراحی های پیچیده و دقیق هستند. به علاوه، در صورت تغییر در هر یک از اسید آمینه‌های پروتئین، باید شبیه سازی‌های دقیقی در مورد تاثیر این تغییر بر کل مجموعه صورت گیرد که خود، فرایند پایدارسازی با این روش را مشکل می‌سازد. از سوی دیگر، در پروتئین‌های دارویی ترجیح بر این است که تغییر چندانی نسبت به سیستم بیولوژیک وجود نداشته باشد، چرا که هر گونه تغییر نیازمند مطالعات سنگین و پرهزینه و بررسی اثرات این تغییرات در بدن است. جایگزین این روش، می‌توان به منظور افزایش پایداری پروتئین‌ها با بهینه کردن شرایط نگه داری و به کارگیری افزودنی‌های مجاز، بافر مناسب، مواد فعال سطحی، بهره گیری از یون‌ها، قندها که تحت عنوان اسمولایت‌ها یا چپرون‌های شیمیایی نامیده می‌شوند، میزان پایداری پروتئین را بدون آنکه نیازی به ایجاد تغییر در ساختار اولیه آنها باشد، افزایش می‌دهد.

۲-۲-۲- انتخاب سلول میزبان و پایداری پروتئین‌ها

پروتئین نوترکیب ممکن است تحت تاثیر پروتئازهای درون سلولی قرار گیرد که در نتیجه آن سبب ایجاد ناپایداری‌های ساختاری در آنها می‌شود و یا اینکه خود پروتئین برای سلول میزبان سمی باشد؛ از آن رو انتخاب نوع سلول میزبان تاثیر زیادی بر روی پایداری پروتئین‌های نوترکیب دارد. سمیت ایجاد شده در اثر بیان پروتئین‌ها در سلول میزبان توسط تنظیم دقیق میزان سطح بیان به کمک پروموتورهای تنظیمی کنترل می‌شود و همچنین میزان بیان پروتئازهای داخلی و به طور کلی پروتئین‌های داخل میزبان را می‌توان کنترل کرد. به طور مثال به کمک پلاسمید pLysS که بیان کننده T7 lysozyme است، به عنوان مهارکننده طبیعی آنزیم T7 RNA polymerase عمل کرده و جلوی فعالیت آن را می‌گیرد. همچنین این پروموتر در سیستم ناقل بیانی pET (Vector) نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد و میزان بیان پروتئین‌های داخلی را کاهش می‌دهد (۲۵, ۲۶). گونه باکتریایی *OmpT* به عنوان میزبان که میزان بیان آنزیم Aspartyl protease را کاهش می‌دهد، به صورت تجاری در شرکت Invitrogen/ThermoFisher Scientific وجود دارد و می‌تواند پایداری پروتئین نوترکیب بیان شده را بالا برد.

استفاده از سیستم‌های بیانی پستانداران مانند Chinese hamster ovary (CHO) cells و embryonic human kidney(HEK) cell به منظور بیان پروتئین‌های انسانی بهتر و کاربردی‌تر است، زیرا کدون‌ها در این سیستم‌های بیانی بهینه شده است و تغییرات پس از ترجمه

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

نیز بر روی پروتئین‌ها اعمال می‌شود؛ درنتیجه پروتئین‌هایی که در این سیستم‌ها بیان شده دارای تا شدگی صحیح بوده، پایدار هستند و فعالیت خود را حفظ کرده‌اند (۲۷).

۳-۲-۲- بهبود شرایط بیان و پایداری پروتئین‌ها

به منظور اطمینان حاصل کردن از تولید پروتئین با تاشدگی صحیح و پایدار که دارای فعالیت باشد، فراهم آوردن شرایط مناسب توسط سلول میزبان از آن جهت که بتواند گروه‌های پروستاتیک، لیگاندها و کوافکتور های مورد نیاز برای پروتئین هدف را تامین کند ضروری است. بسیاری از این عوامل در طول پروسه بیان توسط محیط کشت و سلول‌های میزبان فراهم می‌شوند، اما بسیاری دیگر توسط سلول‌های میزبان سنتز نشده و یا به میزان کافی در دسترس نیست و باید دراختیار سلول قرار گیرند.

حلالیت پروتئین‌ها در طول فرآیند بیان به کمک مواد افزودنی به محیط کشت مانند ترهالوز ،گلایسین، پرولین، مانیتول، ال آرژنین، پتاسیم سیترات، زایلیتول و پتاسیم فسفات افزایش می‌یابد (۲۸). همچنین دما به عنوان عاملی برای افزایش حلالیت و پایداری پروتئین در نظر گرفته شود. به طور مثال ناقل‌های بیانی pCold که پروتئین‌ها را در دمای پایین حدود پانزده درجه سانتی‌گراد بیان می‌کند که در این شرایط پروتئین های سلول‌های میزبان کمتر تولید شده و همچنین جلوی بیان پروتئازها گرفته می‌شود که در نهایت سبب شده پروتئین با بازده بالا و خالص‌تر تولید شود. از فواید دیگر این سیستم می‌توان به این نکته اشاره کرد که در دماهای پایین تکثیر سلولی متوقف شده است و میزان بیان پروتئین‌های داخلی مانند پروتئازها کاهش می‌یابد؛ بنابراین پروتئین هدف بیشتر محافظت شده و خلوص آن افزایش می‌یابد (۲۹). در ادامه به بررسی استراتژی‌های که برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌پردازیم.

۴-۲-۲- تاثیر بهینه سازی بافر در پایداری پروتئین‌ها

انتخاب نوع افزودنی و غلظت مورد استفاده از آنها با هدف افزایش پایداری پروتئین کار مشکل و پیچیده‌ای است، زیرا تعداد افزودنی‌هایی که می‌توان به بافرها به منظور افزایش پایداری پروتئین اضافه کرد، زیاد و متنوع است. بهینه کردن شرایط بافری برای رسیدن به بهترین حلالیت و پایداری در پروتئین به کمک غربالگری به دست می‌آید. نیاز به بهینه سازی بافر برای پروتئین‌هایی با حلالیت و پایداری ابتدایی پایین، بیشتر احساس می‌شود و غربالگری بیشتری نیز باید انجام شود. از آن جا که ترکیبات بافری، لیگاندها و عوامل احیا کننده در بافری که پروتئین در آن حل شده و نگه داری می‌شود تاثیر بسیار زیادی بر روی پایداری پروتئین ها دارد، غربالگری نوع بافر مورد استفاده یک روش بسیار کارامد در پایداری پروتئین، کریستالوگرافی و فرمولاسیون بیولوژیک آنها است. یکی از روش‌های اولیه مورد استفاده در غربالگری بافرها Thermofluor است، در این روش بافرهای متنوع با ترکیبات مختلف و pHهای متفاوت مورد بررسی قرار می‌گیرند و در نهایت با اندازه گیری Tm (protein melting point) تاثیرات آنها بر روی پایداری پروتئین ها مشخص می‌شود. به طور مثال، در این مطالعه تاثیرات بافرهای bis-Tris، citrate و N-(2-acetamido)- iminodiacetic acid (ADA) بر روی پایداری پروتئین ها سنجیده شده است (۳۰, ۳۱).

غربالگری لیگاندها و افزودنی‌ها در پایداری پروتئین‌ها نیز تاثیرگذار است. اتصال لیگاندها به طور خاص باعث افزایش پایداری پروتئین‌ها علی الخصوص سبب افزایش پایداری ساختاری می‌شود. علاوه بر تاثیراتی که ملکول‌های کوچک بر روی پایداری پروتئین‌ها می‌گذارند، یون‌ها و یا دیگر افزودنی‌های ارگانیک نیز سبب پایداری پروتئین‌ها می‌شوند. به طور مثال استفاده از نمک MgCl2 در پایداری و اندازه گیری Tm رایج است که این یون سبب پایداری ساختار چهارم شده و یون منیزیم در بین هوموتترامر قرار گرفته و ساختار آن را پایدار می‌کند (۳۰).

از پایدارکننده‌های دیگر می‌توان به پلیمرهای PEG (Poly (ethylene glycol)) یا MPD (2-methyl-2,4-pentanediol) اشاره کرد. MPD با برقراری اتصال با ریشه اسیدآمینه های آبگریز که در سطح پروتئین قرار دارد سبب افزایش آب پوشی پروتئین می‌شود؛ از آن رو باعث شده که میزان پایداری پروتئین را بالا ببرد.

۵-۲-۲- انتخاب آمینو اسیدها و اسمولایت‌های مناسب به منظور افزایش پایداری پروتئین

حلالیت و پایداری پروتئین‌ها به به طور قابل توجهی به کمک افزودنی‌هایی مانند ترکیبات یونی، نمک‌ها، دترجنت‌ها و اسمولایت‌ها در بافر افزایش می‌یابد (۱۱, ۱۲). امروزه آمینو اسیدها و اسمولایت‌ها به منظور افزایش پایداری پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اسید آمینه آرژنین به عنوان یک ملکول فعال دخیل در فرمولاسیون دارویی استفاده می‌شود، زیرا باعث افزایش حلالیت پروتئین‌ها از داخل اینکلوژن بادی‌ها شده و جلوی متراکم

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

شدن پروتئین را در طول خالص سازی می‌گیرد. این اسید آمینه برخلاف دناتورانت‌های معمولی مانند اوره و گوانیدیم هیدروکلراید با افزایش حلالیت پروتئین‌ها بر روی پایداری آنها تاثیری ندارد. اضافه کردن اسید آمینه‌های باردار مانند آرژنین و گلوتامات به بافر باعث افزایش حلالیت پروتئین‌ها می‌شود، اما تاثیری بر روی ساختار پروتئین ندارد و جلوی برهم کنش های پروتئین –پروتئین و پروتئین -RNA را نمی‌گیرد. همچنین افزودن اسید های آمینه باردار سبب افزایش طول عمر و پایداری پروتئین‌ها شده و جلوی دگریگه، شکست و رسوب آن‌ها را در طول زمان می‌گیرد؛ در نتیجه می‌توان در حضور آنها پروتئین‌ها را با غلظت و حلالیت بالا به دست آورد. مکانیسمی که از طریق آن آرژنین سبب افزایش حلالیت، بدون تاثیر بر روی پایداری می‌شود هنوز ناشناخته و قابل بحث است، از این رو اگر تاثیری که آرژنین بر روی پروتئین و حلالیت آن دارد کاملا مشخص شده بود این اسید آمینه می‌توانست به عنوان یک افزودنی قابل اطمینان برای افزایش پایداری پروتئین مورد استفاده قرار بگیرد (۳۲). به منظور بررسی تاثیر این افزودنی‌ها می‌توان آنها را با غلظت‌های مختلف به محیط اضافه کرده و در نهایت میزان پایداری پروتئین‌ها سنجیده شود.

۶-۲-۲- تاثیر قندها و پلی اُل‌ها بر روی پایداری پروتئین

دلیل به کارگیری واژه اسمولایت برای چنین ترکیباتی این است که این مواد اولین بار در سیستم بیولوژیک به عنوان تنظیم کننده‌های فشار اسمزی شناخته شده و بعدها اثر آنها بر ساختار پروتئین های سلول به اثبات رسید. استفاده کردن از پلیمرهای حساس به دما، پلیمرهای تجزیه پذیر و نانوذرات نیز به افزایش پایداری پروتئین‌ها کمک می‌کنند (۳۳).

قندها به عنوان یک افزودنی کارآمد جهت حفاظت از پروتئین‌ها در مقابل از دست دادن فعالیت و دناتوره شدن شیمیایی و حرارتی معرفی شده است. در میان قندها، ترهالوز به عنوان یک پایدار کننده مناسب برای محافظت کردن از مواد بیولوژیکی در مقابل از دست دادن آب و خشک شدن است. این قند یک اسمولایت سازگار در ارگانیسم‌ها است که تحت شرایط استرس میزان سنتز آن افزایش می‌یابد. با توجه به این خصوصیات منحصر به فرد تمایل بسیار زیادی برای پی بردن به مکانیسم‌هایی که در طول استرس سبب افزایش میزان بیوسنتز ترهالوز در ارگانیسم‌ها می‌شود وجود دارد (۳۴). ترهالوز با توجه به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد خود مانند واکنش پذیری شیمیایی پایین، خصوصیت غیر احیایی، بالا بودن Tg (Glass transition)، تمایل بالا برای برقراری پیوند با ملکول‌های آب و وجود آن به صورت ساختار پلیمری، به عنوان یک پایدار کننده مناسب به منظور محافظت از ساختار پروتئین است. ترهالوز بر روی پایداری پروتئین‌ها در طول لیوفیلیزاسیون بسیار تاثیر گذار است. همچنین هنگامی که پروتئین‌ها در معرض دمای بالا در محلول قرار دارند، از تجمع و تا شدگی آنها جلوگیری می‌کند. قندها به طور کلی سبب محافظت از پروتئین‌ها در مقابل از دست دادن آب می‌شوند. آنها این توانایی را دارند که به جای ملکول‌های آب با پروتئین‌ها پیوندهای هیدروژنی برقرار کنند. در واقع قندها جایگزین ملکول‌های آب از دست رفته در پروتئین خشک شده می‌شوند (۳۵, ۳۶).

مطالعات زیادی که توسط Timasheff و همکارانش انجام شده، نشان داده است که قندها و پلی اُل‌ها سبب پایداری ساختارتاشده (Fold) شده پروتئین‌ها در محلول می‌شوند. در نتیجه تمایل بسیار زیادی که برای آب پوشی در حالت تانشده پروتئین‌ها نسبت به حالت اصلی و پایه وجود دارد؛ بنابراین در حالت تا شدگی که آب پوشی کمتر است، ملکول‌های قند وارد پیوند هیدروژنی با ملکول‌های پروتئین شده در نتیجه باعث پایداری آنها می‌شود. انتظار می‌رود که پروتئین‌ها به روش‌های گوناگونی با کمک حلال‌ها ارتباط برقرار کنند که این وابسته به خصوصیت فیزیکوشیمیایی آنها است. به طور کلی مشاهده شده است که ترهالوز سبب ایجاد محافظت در پروتئین ها به روش‌های مختلف می‌شود که کارایی این حفاظت وابسته ساختار پروتئین‌ها است. علی‌رغم وجود چنین اطلاعاتی، نقش دقیق پروتئین‌ها و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها در محیط، در حضور ترهالوز به منظور افزایش پایداری هنوز مشخص نیست (۳۷).

مطالعات انجام شده توسط Gekko برروی تاثیر اسمولایت‌های پلی‌اُل بر انرژی آزاد پروتئین‌ها نشان داده است که برقراری اینتراکشن‌های ناخواسته بین زنجیره جانبی اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها، با اسمولایت‌های پلی‌اُل تاثیر بیشتری بر روی پایداری پروتئین‌ها نسبت به برقراری پیوند پلی‌اُل با پپتید دارد. از سوی دیگر اخیراً مطالعاتی که بر روی زنجیره جانبی اسیدهای آمینه و

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

ترکیبات مدل، توسط Bolen و همکارانش انجام پذیرفته نشان داده است، تجمع و انباشتگی اینتراکشن‌ها بین زنجیره جانبی اسیدهای آمینه و اسمولایت‌ها که شامل سوکروز و یا دیگر قندها هستند سبب تاشدگی پروتئین می‌شوند، اما در مقابل آن اتصال بین اسمولایت ها و پپتیدها سبب افزایش پایداری پروتئین‌ها می‌شوند (۳۵, ۳۸). از این رو می‌توان گفت پایداری پروتئین‌ها در کل وابسته به برقراری تعادل، بین اینتراکشن‌های مناسب و یا نامناسب، بین ملکول‌های کمک حلال و حالت دناتوره و یا طبیعی ملکول‌های پروتئین است و دلیل اصلی که اسمولایت‌های پلی‌اُلی سبب افزایش پایداری پروتئین‌ها می‌شوند هنوز دقیقا شناخته شده نیست. تاثیرات کمک حلال در پایداری پروتئین‌ها، هم وابسته به ملکول‌های کمک حلال و هم خود ساختار پروتئین است؛ در نتیجه تعمیم دادن تاثیرات کمک حلال‌ها در پایداری پروتئین‌ها در کل به همه انواع کمک حلال‌ها کار صحیح و درستی نیست.

در ادامه به بررسی مدل‌هایی که از طریق آنها، قندها سبب حفظ ساختار و افزایش پایداری پروتئین‌ها می‌شود می‌پردازیم.

مدل احاطه شده با آب (Water entrapment models): ترهالوز با برقراری پیوندهای هیدروژنی با لایه آب اطراف پروتئین‌ها یک ساختار منسجم و بسته را در سطح پروتئین ایجاد می‌کند. در این مدل ملکول‌های آب مانند لایه‌ای بین پروتئین و ترهالوز قرار می‌گیرد از آن رو سبب شده دینامیک ملکول‌های پروتئین که هم اکنون با لایه محکم‌تر متشکل از آب و ترهالوز در ارتباط هستند، نسبت به حالت ابتدایی که پروتئین تنها با آب در ارتباط بوده تغییر پیدا کند و پایداری ملکول های پروتئین را افزایش دهد (۳۹).

مدل جایگزینی ملکول‌های آب (Water replacement models): در تئوری جایگزینی با ملکول‌های آب، ترهالوز تمایل دارد که به طور مستقیم بدون وساطت لایه آب اطراف پروتئین با پروتئین ارتباط برقرار کند که در نتیجه سبب افزایش پایداری پروتئین‌ها می‌شود (۳۹).

بحث

یکی از مشکلات اساسی در راه تولید پروتئین‌های دارویی که یک کلاس بزرگ از داروها هستند، بحث پایداری آنها است. پروتئین‌های دارویی تمایل بسیار زیادی برای متراکم شدن دارند، به خصوص زمانی که با غلظت بالای مورد نیاز برای دوزها، نگهداری می‌شوند (۱۰). با توجه به اینکه فعالیت پروتئین‌ها وابسته به ساختار و انعطاف پذیری آنهاست، هر ارتباطی که بین پروتئین‌ها و ملکول‌های دیگر وجود دارد ممکن است باعث تغییر در کنفورماسیون آنها شود. به طور بالقوه، اختلالاتی که انعطاف پذیری پروتئین را تغییر می‌دهد ممکن است با عملکرد آنها نیز تداخل داشته باشد و این موضوع که چگونه عملکرد، انعطاف پذیری و پایداری پروتئین‌ها با هم در ارتباط هستند هنوز به شدت مورد بحث بوده و درک عمیق از ارتباط بین خصوصیات پروتئین‌ها، تنها یک موضوع علمی صرف نیست، بلکه تاثیر زیادی در طراحی، عملکرد و کاربرد پروتئین ها نیز دارد (۴۰). اگرچه ثبات پروتئین‌ها برای بسیاری از دانشمندان دارای معنای متفاوتی است، اما به طور کلی ثبات پروتئین را می‌توان به توانایی پروتئین‌ها برای حفظ ساختار و عملکرد خود در محیط‌های متفاوت تعریف کرد، همچنین اگر پروتئین‌ها در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی قرار داشته باشند و جمع همه نیروهای مشارکت کننده به سمت G منفی باشد، در این صورت پروتئین تاشده پایدار است. اگر چه که تمام پروتئین‌ها در محیط‌های که از لحاظ فیزیولوژیک پایدار باشند قرار ندارند، از این رو به سمت ناپایداری می‌روند.

از عرضه اولین پروتئین نوترکیب درمانی به بازار در دهه هشتاد میلادی تاکنون تعداد زیادی محصول با موفقیت تجاری سازی شده و دارو های جدید دیگری نیز در مرحله کارآزمایی بالینی به سر می برند. از آنجایی که محصولات پروتئینی اثرات درمانی مفیدی در بیماری‌ها و ناهنجاری‌های انسانی نشان داده‌اند اقبال زیادی در بازار مصرف برای آنها وجود دارد. این درحالی است که داروهای پروتئینی باید فرآیند تولید، حمل و نقل، نگهداری و ذخیره سازی را بدون تخریب شدن پشت سر بگذارند، فراهم آوردن این شرایط بسیار سخت است چرا که پروتئین‌ها در برابر تخریب شیمیایی و فیزیکی آسیب پذیرند و در معرض عوامل آسیب رسان بسیاری نیز قرار دارند. از این رو مطالعه پایداری پروتئین‌ها و شناسایی عوامل افزایش دهنده پایداری آنها یکی از موضوعات مهم و مورد توجه در جوامع علمی است و چالش اساسی در مسیر تولید پروتئین‌های دارویی است که امروزه توجه های زیادی را به سمت خود جلب کرده است. زیرا بسیاری از پروتئین های نوترکیب تحت شرایطی که برای بیان می شوند ناپایدار شده، تا شدگی خود را از دست داده و یا اینکه دچار شکست پروتئولیتیکی می‌شوند که در نهایت سبب کاهش پایداری در سطح ساختار

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

فضایی پروتئین می‌شود. بنابراین در تولید پروتئین‌های نوترکیب، تولید پروتئین پایدار با تاشدگی و عملکرد صحیح که بتواند مورد استفاده دارویی قرار گیرد بسیار حائز اهمیت است، زیرا متاسفانه بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب به صورت تاشده پایدار و محلول بیان نمی‌شوند و این موضوع یک مانع بزرگ در حوزه‌های داروسازی و بیوتکنولوژی است (۲, ۳).

در این دوران با ظهور بیوانفورماتیک و ایجاد تغییرات ژنومیک، همراه با تلاش و تحقیقاتی که بر روی پروتئومیکس انجام شده است، پیشرفت‌های زیادی برروی استفاده از دنباله‌های پروتئینی ایجاد شده است که در تولید پروتئین‌ها به میزان بالا و خالص سازی آنها به شرط حفظ ساختار و عملکرد آنها موثر است، همچنین نقش بسیار تاثیر گذاری در مطالعات بیولوژیک ساختاری دارد. استفاده از این دنباله‌های پروتئینی از یک سو سبب شده که فرایند خالص سازی و جداسازی این پروتئین‌ها راحت‌تر شده و از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه است، همچنین تاثیرات مثبتی بر روی صنعت داروسازی و طراحی دارو ها نیز دارند. همچنین پیش بینی می‌شود که در زمینه دنباله‌های پروتئینی در آینده پیشرفت‌های زیادی صورت می‌گیرد. با استفاده از این تکنیک که دارای کارای قابلیت بالایی است، می‌توان رابطه بین شبکه‌های ارتباطی پروتئین‌ها را بررسی کرد و همچنین داروهای پروتئینی جدیدی را عرضه کرد. همچنین توانایی پی بردن به رابطه بین ساختار و عملکرد پروتئین‌ها در جاهای که به علت محدودیت در تکنیک و اطلاعات در دسترس نیست افزایش می‌یابد.

مطالعه برروی سلول‌های میزبان نیز در سال‌های اخیر توسعه زیادی پیدا کرده‌اند. به نظر می‌رسد که تمام رده‌های تولیدی در حجم بالا، رده‌های سلولی‌ای هستند که به صورت ژنتیکی برای افزایش میزان زنده‌ماندن یا حمل ترنسژن‌های القاکننده رشد توسعه یافته‌اند. گزارش‌های رسیده از آزمایشگاه‌های آکادمیک بیانگر مثال‌های زیادی از چگونگی امکان افزایش رشد، زنده ماندن و تولید رده‌های سلولی نوترکیب با روش‌های مهندسی ژنتیک است. پروتوانکوژن‌ها، ژن‌های کنترل‌کننده سیکل سلولی (سایکلین‌ها)، ژن‌های فاکتور رشد (مثل انسولین و فاکتور رشد) و ژن‌های آنتی آپوپتیک، برای تولید میزبان‌های با تولید بالا در رده‌های سلولی درج می‌شوند (۴۱).

در این مطالعه مروری استراتژی‌های مختلفی به منظور افزایش میزان حلالیت و پایداری پروتئین‌ها ارایه شده است که شامل تغییرات هدایت شده در ملکول پروتئین بوده و یا بهینه سازی در پروتکل های بیان، خالص سازی و پروسه حلالیت پروتئین-ها به انجام می‌رسد که در اغلب اوقات رویکرد اول ممکن و دست یافتنی نیست (۱)، از این رو می‌توان گفت که یک بررسی کامل در محیط اطراف پروتئین‌ها برای افزایش پایداری آنها می‌تواند به اندازه کافی کارآمد باشد و پروتئینی که به صورت منحصر به فردی پایدار است در اختیار ما قرارمی گیرد بدون آنکه نیازی به روش‌های پیچیده مهندسی ژنتیک باشد. بنابراین عوامل متفاوت تاثیر گذار که در طول بیان و خالص سازی پروتئین‌ها به منظور افزایش پایداری آنها مورد بررسی قرار می گیرد امروزه بیشتر به صورت رویکرد طراحی ترکیبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این رویکرد روش‌هایی با کارایی و قابلیت بالا برای به دست آوردن یک استراتژی مناسب به منظور افزایش پایداری پروتئین‌ها در شرایط مختلف بهینه با یکدیگر ترکیب شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲, ۴۲).

REFERENCES

1. Savchenko A, Yee A, Khachatryan A, Skarina T, Evdokimova E, Pavlova M, et al. Strategies for structural proteomics of prokaryotes: Quantifying the advantages of studying orthologous proteins and of using both NMR and X-ray crystallography approaches. Proteins 2003;50:392-399.

2.Deller MC, Kong L, Rupp B. Protein stability: a crystallographer's perspective. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun 2016, 72:72-95.

3.Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. Chem Biol Drug Des 2013;81:136-47.

4.Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. Nat Rev Drug Discov 2008;7:21-39.

5.Tang L, Persky AM, Hochhaus G, Meibohm B. Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. J Pharm Sci 2004;93:2184-204.

6.Nayak AK. Advances in therapeutic protein production and delivery. Int J Pharm Pharm Sci 2010; 2: 2.

7.Sun Jun, Shengqi Rao, Yujie Su, Rongrong Xu,Yan-jun Yang. Magnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles with immobilized metal ions for lysozyme adsorption. Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp 2011;389: 97-103.

8. Sun YL, Patel A, Kumar P, Chen ZS. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. Chin J Cancer 2012;31:51-7.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

9.Papaneophytou CP, Kontopidis G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review. Protein Expr Purif 2014;94:22-32.

10.Akash MS, Rehman K, Chen S. IL-1Ra and its delivery strategies: inserting the association in perspective. Pharm Res 2013, 30:2951-2966.

11.Bondos SE, Bicknell A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. Anal Biochem 2003, 316:223-231.

12.Bagby S, Tong KI, Ikura M. Optimization of protein solubility and stability for protein nuclear magnetic resonance. Methods Enzymol 2001, 339:20-41.

13.Cha KY, Chung HM, Lee DR, Kwon H, Chung MK, Park LS, et al. Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization–embryo transfer. Fertil Steril 2005; 83:1461-1465.

14.Torosantucci R, Schoneich C, Jiskoot W. Oxidation of therapeutic proteins and peptides: structural and biological consequences. Pharm Res 2014;31:541-553.

15.Bolen DW. Protein stabilization by naturally occurring osmolytes. Methods Mol Biol 2001;0168:17-36.

16.Collins KD. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. Methods. 2004;34:300-311.

17.Robertson AD, Murphy KP. Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. Chem Rev 1997;97:1251-1268.

18.Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol 2005;115:113-128.

19.Spiegel H, Schinkel H, Kastilan R, Dahm P, Boes A, Scheuermayer M, et al. Optimization of a multi-stage, multi-subunit malaria vaccine candidate for the production in Pichia pastoris by the identification and removal of protease cleavage sites. Biotechnol Bioeng 2015;112:659-667.

20. Spencer ML, Theodosiou M, Noonan DJ. NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif. J Biol Chem 2004;279:37069-78.

21. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 1986;234:364-8.

22.Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG. Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. J Virol 2006;80:7789-98.

23.Sung D, Kang H. The N-terminal amino acid sequences of the firefly luciferase are important for the stability of the enzyme. Photochem Photobiol 1998;68:749-53.

24.Kopera E, Bal W, Lenarcic Zivkovic M, Dvornyk A, Kludkiewicz B, Grzelak K, Zhukov I, et al. Atomic resolution structure of a protein prepared by non-enzymatic His-tag removal. Crystallographic and NMR study of GmSPI-2 inhibitor. PLoS One 2014;9:e106936.

25.Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J Bacteriol 1995;177:4121-30.

26.Studier FW. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J Mol Biol 1991;219:37-44.

27.Fischer S, Handrick R, Otte K. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. Biotechnol Adv 2015;33:1878-96.

28. Leibly DJ, Nguyen TN, Kao LT, Hewitt SN, Barrett LK, Van Voorhis WC. Stabilizing additives added during cell lysis aid in the solubilization of recombinant proteins. PLoS One 2012;7:e52482.

29.Quistgaard EM. A disulfide polymerized protein crystal. Chem Commun (Camb) 2014; 50:14995-14997.

30.Reinhard L, Mayerhofer H, Geerlof A, Mueller-Dieckmann J, Weiss MS. Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 2013;69:209-214.

31.Ristic M, Rosa N, Seabrook SA, Newman J. Formulation screening by differential scanning fluorimetry: how often does it work? Acta Crystallogr F Struct Biol Commun 2015;71:1359-1364.

32.Platts L, Falconer RJ. Controlling protein stability: Mechanisms revealed using formulations of arginine, glycine and guanidinium HCl with three globular proteins. Int J Pharm 2015;486:131-135.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]
[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]

33.Akash MS, Rehman K, Chen S. Polymeric-based particulate systems for delivery of therapeutic proteins. Pharm Dev Technol 2016;21:367-378.

34.Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, Hinrichs WL. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. Eur J Pharm Biopharm 2017;114:288-295.

35.Kaushik JK, Bhat R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. J Biol Chem 2003;278:26458-65.

36.Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. Protein Sci 2009;18:24-36.

37.Xie G, Timasheff SN. Xie G, Timasheff SN. Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured then for the native protein. Protein Sci 1997;6:211-221.

38.Jain NK, Roy I. Trehalose and protein stability. Curr Protoc Protein Sci 2010;Chapter 4:Unit 4.9.

39.Olsson C, Jansson H, Swenson J. The Role of Trehalose for the Stabilization of Proteins. J Phys Chem B 2016;120:4723-31.

40.Teilum K, Olsen JG, Kragelund BB. Protein stability, flexibility and function. Biochim Biophys Acta 2011;1814:969-76.

41.Betenbaugh MJ, Arden N, Nivitchanyong T. Cell Engineering Blocks Cell Stress and Improves Biotherapeutic Production. BioProcess J 2004; 3: 23-28.

42.Papaneophytou CP, Kontopidis G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review. Protein Expr Purif 2014;94:22-32.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.2.6.3]

[DOI: 10.52547/iau.32.2.111]