

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

Somayeh Abolghasemi-Dehaghani¹, Mohsen Gharanfoli², Mehran Habibi-Rezaei³, Ramezan Ali Khavari-Nejad¹

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

مروری بر روش های افزایش پایداری پروتئین های نو ترکیب دارویی در طول فرایند تولید و نگهداری

سمیه ابوالقاسمی دهقانی^۱، محسن قرنفل^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 پروتئین های دارویی زیست فناوری نقش مهمی در مبارزه بر علیه بیماری ها ایفا می کند. فرایند تولید پروتئینی های نو ترکیب دارویی مسیری مستقیم نیست، زیرا نیاز به کار فراوان دارد و از سوی دیگر یکی از جنبه های مهم و قابل توجه در تولید پروتئین ها بحث پایداری و حلالیت آنها در طول فرایند بیان و خالص سازی است. پروتئین ها 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 پروتئین ها ارائه شده است که شامل تغییرات هدایت شده در ملکول پروتئین و بهینه سازی در دستورالعمل های بیان، خالص سازی و فرایند حلالیت پروتئین ها است که در اغلب اوقات رویکرد اول ممکن و دست یافتنی نیست. این مطالعه مروری به ارائه راهکارهای جهت افزایش پایداری پروتئین ها در سطوح مختلف می پردازد، 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 می گیرد، همچنین تاثیر بهینه سازی بافرهای به کار رفته در فرمولاسیون دارویی مانند انتخاب آمینو اسید ها و اسمولالیت های مناسب به منظور افزایش پایداری پروتئین و چگونگی تاثیر قند ها و پلی آل ها بر روی پایداری پروتئین ها نو ترکیب دارویی نیز مورد بررسی قرار می گیرد.

واژگان کلیدی: پروتئین های دارویی زیست فناوری، پایداری پروتئین، طراحی سازه بیانی، فرمولاسیون، بهبود شرایط بیان.

مقدمه

یکی از جنبه های مهم و قابل توجه در تولید پروتئین ها بحث پایداری و حلالیت آنها است. پایداری پروتئین ها در طول فرایند بیان و خالص سازی یکی از موضوعات مهم و چالش بر انگیز است زیرا بسیاری از پروتئین های نو ترکیب تحت شرایطی که بیان می شوند ناپایدار بوده و فولدینگ صحیح خود را از دست می دهند و یا اینکه دچار شکست

پروتئولیتیکی شده و در نهایت کاهش پایداری آنها در سطح ساختار فضایی رخ می دهد. از این رو مطالعه پایداری پروتئین ها و شناسایی عوامل افزایش دهنده پایداری آنها یکی از موضوع های مهم و مورد توجه در جوامع علمی است (۱). در تولید پروتئین های نو ترکیب، 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 ارائه 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 قرنفل
(email: mgharanfoli@royaninstitute.org)

ORCID ID: 0000-0002-8403-7817

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۹

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 درمان‌های 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 اسیدهای آمینه هستند در سلول‌های زنده تولید می‌شوند. تکنولوژی DNA نوترکیب معمولاً برای تولید پروتئین‌های دارویی نوترکیب از سلول‌های پستانداران استفاده می‌کند. پس از تولید پروتئین‌های نوترکیب موضوعی که مطرح می‌شود بحث خالص‌سازی آنها از بین ترکیبات پروتئینی و غیر پروتئینی است. نکته‌ای که باید به آن توجه داشت این است که خالص‌سازی 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 خالص‌سازی 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 خالص‌سازی 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 پروتئین‌ها تمایل دارند که به ساختار واسرشت (denature) تبدیل شوند. ساختار پایه پروتئین‌ها اشاره به ساختاری دارد که به صورت کاملاً 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

مشکلاتی که تولید پروتئین‌های نوترکیب با آن مواجه است، تولید پروتئینی با فولدینگی صحیح و فعال در سلول میزبان است. متأسفانه 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 فناوری 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 (Good Manufacturing Practice) GMP 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 خالص‌سازی 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: چالش‌ها و پیشرفت‌ها

پروتئین‌ها و پپتیدها دارای پتانسیل بالای درمانی بر علیه 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

فرمولاسیون مواد دارویی است. به منظور افزایش پایداری پروتئین ها، خصوصیات شیمیایی و فیزیکی آنها را باید در نظر گرفت تا بتوان افزودنی های مناسب را به پروتئین اضافه کرد. به کار گیری فرمولاسیون مناسب می تواند 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 می توان استفاده کرد (۱۴).

۲- عوامل تاثیر گذار و روش های افزایش پایداری پروتئین ها

۱-۲ عوامل تاثیر گذار در پایداری پروتئین ها

علاوه بر دما و حضور واسرشت کننده ها از عوامل متغیر دیگری که پایداری پروتئین ها را تحت تاثیر قرار می دهند می توان به تاثیر اسیدیته pH، نمک ها در غلظت های مختلف، کمک حلال ها، اسمولایت ها، نگهدارنده ها و سورفکتانت ها اشاره کرد (۱۵، ۱۶). تغییر در هر یک از این عوامل می تواند در بعضی از موارد سبب تغییر در تا شدگی و متراکم شدن پروتئین ها شده که در نتیجه سبب کاهش پایداری و از دست دادن فعالیت آنها می شود (۱۷). پروتئین ها در مجاورت نقطه ایزوالکتریک (Isoelectric point) خود پایدار هستند. به طور کلی با در نظر گرفتن استثنای موجود، برهم کنش های الکتروستاتیک نقش کمی در پایداری پروتئین در حالت طبیعی دارند. اتصالات لیگاندها مانند مهار کننده ها به آنزیم ها نیز باعث افزایش پایداری پروتئین ها می شود.

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

می شوند (۱۰). از آنجا که تجمع پروتئین ها سبب ایجاد پاسخ ایمنی در بیماران می شود؛ بنابراین تجمع از جمله مواردی است که باید به دقت در طول پروسه تولید و نگه داری پروتئین های دارویی مورد بررسی قرار گیرد. بیش از ۵۰ سال است که دانشمندان تلاش های بسیار زیادی برای پی بردن به رابطه بین دنا تورا سیون پروتئین ها و رقابتی که بین دنا تورا سیون برگشت پذیر و برگشت ناپذیر آنها وجود دارد انجام داده اند، زیرا تجمع بزرگترین مانع در بیوشیمی پروتئین ها علی الخصوص پروتئین های دارویی است.

یکی از تنگناهای اصلی در راه تولید پروتئین ها 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. پروتئین ها در غلظت بالا عموماً متراکم شده، رسوب می کنند و گاهی اوقات ممکن است که به صورت خود به خودی دچار شکست های 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 چالش هایی است که در طول فرآیند استخراج و نگهداری پروتئین ها با آن روبرو هستیم. پروتئین ها در شرایطی که در محیط اصلی خود قرار ندارند ناپایدار شده، پروتئولیز و شکسته می شوند 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 پروتئین ها است. اکسید شدن پروتئین ها هم مانند تجمع سبب ایجاد تغییرات اساسی در ساختار پروتئین ها می شود که باعث شده ساختار دوم، سوم و چهارم آنها نیز تحت تاثیر قرار گیرد. بسیاری از پروتئین ها 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 پروتئین های دارویی در مقایسه با دیگر مواد دارویی بسیار پیچیده است، زیرا تحت تاثیر ناپایداری های فیزیکی و شیمیایی در پروتئین ها، از طریق پروسه های مختلفی مانند تجمع، دنا تورا سیون، هیدرولیز و یا اکسید شدن شکست ایجاد می شود. بنابراین مطالعات پیش فرمولاسیون به عنوان یک مرحله مهم در

۲-۲-راهکارهای افزایش پایداری ساختاری و ساختمانی پروتئین‌ها

۲-۲-۱- 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).

۲-۲-۱-۱- 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 نو ترکیب 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 پروتئین‌هایی 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، گلیسین، ترئونین، والین و یا پرولین باشد، نیمه عمر پروتئین بیشتر از ۲۰ ساعت است و پروتئین پایدار می‌شود؛ در مقابل در صورتی که این دنباله از فنیل آلانین، آسپاراتات، 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).

۲-۲-۱-۲- تاثیر دنباله‌های پروتئینی بر روی پایداری و

افزایش حلالیت پروتئین‌ها

پروتئین‌های نو ترکیب زیادی در سیستم‌های باکتریایی مانند اشرشیاکلی تولید می‌شوند که چالش اصلی در مسیر تولید این پروتئین‌ها تشکیل اجسام اینکلوزنی (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 بر روی 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 *E. coli* می‌شود.

دنباله‌های پروتئینی در فرایند جداسازی و افزایش بازده خالص‌سازی پروتئین‌های نو ترکیب نیز موثر هستند، پس از اتمام خالص‌سازی روش عمومی برای حذف دنباله‌های

صورت تغییر در هر یک از اسید آمینه های پروتئین، باید شبیه سازی های دقیقی در مورد تاثیر این تغییر بر کل مجموعه صورت گیرد که خود، فرایند پایداری سازی با این روش را مشکل می سازد. از سوی دیگر، در پروتئین های 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، می توان به منظور افزایش پایداری پروتئین ها با بهینه کردن شرایط نگه داری و به کارگیری افزودنی های مجاز، بافر مناسب، مواد فعال سطحی، بهره گیری از یون ها، قندها که تحت عنوان اسمولایت ها یا چپرون های شیمیایی نامیده می شوند، میزان پایداری پروتئین را بدون آنکه نیازی به ایجاد تغییر در ساختار اولیه آنها باشد، افزایش می دهد.

۲-۲-۲- انتخاب سلول میزبان و پایداری پروتئین ها

پروتئین نو ترکیب ممکن است تحت تاثیر پروتئازهای درون سلولی قرار گیرد که در نتیجه آن سبب ایجاد ناپایداری های ساختاری در آنها می شود و یا اینکه خود پروتئین برای سلول میزبان سمی باشد؛ از آن رو انتخاب نوع سلول میزبان تاثیر زیادی بر روی پایداری پروتئین های نو ترکیب دارد. سمیت ایجاد شده در اثر بیان پروتئین ها در سلول میزبان توسط تنظیم دقیق میزان سطح بیان به کمک پروموتورهای تنظیمی کنترل می شود و همچنین میزان بیان پروتئین های داخلی و به طور کلی پروتئین های داخل میزبان را می توان 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 می گیرد. همچنین این پروموتور در سیستم ناقل بیانی pET (Vector) نیز مورد استفاده قرار می گیرد و میزان بیان پروتئین های داخلی را کاهش می دهد (۲۵، ۲۶). گونه باکتریایی *OmpT* به عنوان میزبان که میزان بیان آنزیم Aspartyl protease را کاهش می دهد، به صورت تجاری در شرکت Invitrogen/ThermoFisher Scientific وجود دارد و می تواند پایداری پروتئین نو ترکیب بیان شده را بالا برد.

استفاده از سیستم های بیانی پستانداران مانند Chinese hamster ovary (CHO) cells و human kidney (HEK) cell به منظور بیان پروتئین های انسانی بهتر و کاربردی تر است، زیرا کدون ها در این سیستم های بیانی بهینه شده است و تغییرات پس از ترجمه

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 می شود. بنابراین استفاده کردن از دنباله ها در خالص سازی در صورتی می توانند باعث افزایش پایداری ساختاری شوند که خود این دنباله ها توانایی جدا شدن از پروتئین ها را بدون نیاز به استفاده کردن از پروتئازها داشته باشند. دنباله های نظیر intein-based tags که خود آنها توانایی جدا شدن از پروتئین ها را دارند، جلوی این نوع ناپایداری های ایجاد شده تحت تاثیر پروتئاز ها را در پروتئین می گیرند که برای جدا شدن بدون نیاز به پروتئاز های درونی از نیکل نیز می توان استفاده کرد (۲۴).

در سیستم های بیانی باکتریایی، به منظور جلوگیری از تشکیل اجسام اینکلوزنی و با توجه به اینکه برخی از پروتئین ها 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 می گیرند. در نتیجه پروتئین ها به بخش های دیگر سلول منتقل شده؛ بنابراین از پروتئولیز شدن آنها جلوگیری شده و سبب افزایش پایداری ساختاری (compositional stability) می شود. همچنین استفاده از چپرون ها مانند قطعات Fab آنتی بادی ها (Fab antibody fragments) که سبب افزایش پایداری پروتئین های غشایی می شود به افزایش پایداری پروتئین ها نیز کمک می کند. از دیگر چپرون هایی که سبب افزایش پایداری پروتئین ها در طول بیان می شوند می توان به DnaK و GroEL اشاره کرد.

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

تمامی این روش ها، علی رغم ارزشمند بودن بسیار زمان بر و نیازمند طراحی های پیچیده و دقیق هستند. به علاوه، در

نیز بر روی پروتئین‌ها اعمال می‌شود؛ در نتیجه 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 تا شدگی صحیح و پایدار که دارای فعالیت باشد، فراهم آوردن شرایط مناسب توسط سلول میزبان از آن جهت که بتواند گروه‌های پروستاتیک، لیگاندها و کوفاکتورهای 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 در اختیار سلول قرار گیرند.

حلالیت پروتئین‌ها در طول فرآیند بیان به کمک مواد افزودنی به محیط کشت مانند ترهالوز، گلیسین، پرولین، مانیتول، آل آرژنین، پتاسیم سترات، 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 پروتئین‌های سلول‌های میزبان کمتر تولید شده و همچنین جلوی بیان پروتئین‌ها گرفته می‌شود که در نهایت سبب شده پروتئین با بازده بالا و خلوص تر 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 پروتئین‌ها 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 پروتئین‌ها دارد، غربالگری نوع بافر مورد استفاده یک روش بسیار کارآمد 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 T_m (protein melting point) تاثیرات آنها بر روی پایداری پروتئین‌ها مشخص می‌شود. به طور مثال، در این مطالعه تاثیرات بافرهای citrate، bis-Tris و N-(2-acetamido)-iminodiacetic acid (ADA) بر روی پایداری پروتئین‌ها سنجیده شده است (۳۰، ۳۱).

غربالگری لیگاندها و افزودنی‌ها در پایداری پروتئین‌ها نیز تاثیرگذار است. اتصال لیگاندها به طور خاص باعث افزایش پایداری پروتئین‌ها علی‌الخصوص 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 $MgCl_2$ در پایداری و اندازه گیری T_m رایج است که این یون سبب پایداری ساختار چهارم شده و یون منیزیم در بین هوموترامر قرار گرفته و ساختار آن را پایدار می‌کند (۳۰).

از پایدارکننده‌های دیگر می‌توان به پلیمرهای Poly (PEG) (2-methyl-2,4-MPD یا (ethylene glycol)) pentanediol اشاره کرد. MPD با برقراری اتصال با ریشه اسیدآمینوهای آبریز 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 آمینو آرژنین به عنوان یک ملکول فعال دخیل در فرمولاسیون دارویی استفاده می‌شود، زیرا باعث افزایش حلالیت پروتئین‌ها از داخل اینکلوزن بادی‌ها شده و جلوی متراکم

شدن پروتئین را در طول خالص سازی می گیرد. این اسید آمینه برخلاف دنا تورانت های معمولی مانند اوره و گوانیدیم هیدروکلراید با افزایش حلالیت پروتئین ها بر روی پایداری آنها تاثیری ندارد. اضافه کردن اسید آمینه های باردار مانند آرژنین و گلو تامات به بافر باعث افزایش حلالیت پروتئین ها می شود، اما تاثیری بر روی ساختار پروتئین ندارد و جلوی برهم کنش های پروتئین - پروتئین و پروتئین - RNA را نمی گیرد. همچنین افزودن اسید های آمینه باردار سبب افزایش طول عمر و پایداری پروتئین ها شده و جلوی دگرپیکه، شکست و رسوب آن ها را در طول زمان می گیرد؛ در نتیجه می توان در حضور آنها پروتئین ها را با غلظت و حلالیت بالا به دست آورد. مکانیسمی که از طریق آن آرژنین سبب افزایش حلالیت، بدون تاثیر بر روی پایداری می شود هنوز ناشناخته و قابل بحث است، از این رو اگر تاثیری که آرژنین بر روی پروتئین و حلالیت آن دارد کاملاً مشخص شده بود این اسید آمینه می توانست به عنوان یک افزودنی قابل اطمینان برای افزایش پایداری پروتئین مورد استفاده قرار بگیرد (۳۲). به منظور بررسی تاثیر این افزودنی ها می توان آنها را با غلظت های مختلف به محیط اضافه کرده و در نهایت میزان پایداری پروتئین ها سنجیده شود.

۶-۲-۲- تاثیر قندها و پلی آل ها 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 کننده های 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 پروتئین ها کمک می کنند (۳۳).

قندها به عنوان یک افزودنی کارآمد جهت حفاظت از پروتئین ها 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 ارگانسیم ها است که تحت شرایط استرس میزان سنتز آن افزایش می یابد. با توجه به این خصوصیات منحصر به فرد تمایل بسیار زیادی برای پی بردن به مکانیسم هایی که در طول استرس سبب افزایش میزان بیوسنتز ترهالوز در

ارگانسیم ها می شود 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 T_g (Glass transition)، تمایل بالا برای برقراری پیوند با ملکول های 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 پروتئین ها در طول لیوفیلیزاسیون بسیار تاثیر گذار است. همچنین هنگامی که پروتئین ها در معرض دمای بالا در محلول قرار دارند، از تجمع و تا شدگی آنها جلوگیری می کند. قندها به طور کلی سبب محافظت از پروتئین ها در مقابل از دست دادن آب می شوند. آنها این توانایی را دارند که به جای ملکول های آب با پروتئین ها پیوندهای هیدروژنی برقرار کنند. در واقع قندها جایگزین ملکول های آب از دست رفته در پروتئین خشک شده می شوند (۳۵).

مطالعات زیادی که توسط Timasheff و همکارانش انجام شده، نشان داده است که قندها و پلی آل ها سبب پایداری ساختار تا شده (Fold) شده پروتئین ها در محلول می شوند. در نتیجه تمایل بسیار زیادی که برای آب پوشی در حالت تان شده پروتئین ها نسبت به حالت اصلی و پایه وجود دارد؛ بنابراین در حالت تا شدگی که آب پوشی کمتر است، ملکول های قند وارد پیوند هیدروژنی با ملکول های پروتئین شده در نتیجه باعث پایداری آنها می شود. انتظار می رود که پروتئین ها به روش های گوناگونی با کمک حلال ها 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 روش های مختلف می شود که کارایی این حفاظت وابسته ساختار پروتئین ها است. علی رغم وجود چنین اطلاعاتی، نقش دقیق پروتئین ها و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها در محیط، در حضور ترهالوز به منظور افزایش پایداری هنوز مشخص نیست (۳۷).

مطالعات انجام شده توسط Gekko بر روی تاثیر اسمولایت های پلی آل بر انرژی آزاد پروتئین ها نشان داده است که برقراری اینتراکشن های ناخواسته بین زنجیره جانبی اسیدهای آمینه در پروتئین ها، با اسمولایت های پلی آل تاثیر بیشتری بر روی پایداری پروتئین ها نسبت به برقراری پیوند پلی آل با پپتید دارد. از سوی دیگر اخیراً مطالعاتی که بر روی زنجیره جانبی اسیدهای آمینه و

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 اسمولایت‌ها 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 پلی‌آلی سبب افزایش پایداری پروتئین‌ها می‌شوند هنوز دقیقاً 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 ملکول‌های 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 پروتئین‌ها 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 داروهای جدید دیگری نیز در مرحله کارآزمایی بالینی به سر می‌برند. 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 پروتئین‌های نوترکیب تحت شرایطی که برای بیان می‌شوند 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

در حجم بالا، رده های سلولی ای هستند که به صورت ژنتیکی برای افزایش میزان زنده ماندن یا حمل ترنسژن های القا کننده رشد توسعه یافته اند. گزارش های رسیده از آزمایشگاه های آکادمیک بیانگر مثال های زیادی از چگونگی امکان افزایش رشد، زنده ماندن و تولید رده های سلولی نو ترکیب با روش های مهندسی ژنتیک است. پروتئوکوزن ها، ژن های کنترل کننده سیکل سلولی (سایکلین ها)، ژن های فاکتور رشد (مثل انسولین و فاکتور رشد) و ژن های آنتی آپوپتیک، برای تولید میزبان های با تولید بالا در رده های سلولی درج می شوند (۴۱).

در این مطالعه مروری 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)، از این رو می توان گفت که یک بررسی کامل در محیط اطراف پروتئین ها برای افزایش پایداری آنها می تواند به اندازه کافی کارآمد باشد و پروتئینی که به صورت منحصر به فردی پایدار است در اختیار ما قرار می گیرد بدون آنکه نیازی به روش های پیچیده مهندسی ژنتیک باشد. بنابراین عوامل متفاوت تاثیر گذار که در طول بیان و خالص سازی پروتئین ها به منظور افزایش پایداری آنها مورد بررسی قرار می گیرد امروزه بیشتر به صورت رویکرد طراحی ترکیبی مورد استفاده قرار می گیرد. در این رویکرد روش هایی با کارایی و قابلیت بالا برای به دست آوردن یک استراتژی مناسب به منظور افزایش پایداری پروتئین ها در شرایط مختلف بهینه با یکدیگر ترکیب شده و مورد استفاده قرار می گیرد (۲، ۴۲).

فضایی پروتئین می شود. بنابراین در تولید پروتئین های نو ترکیب، تولید پروتئین پایدار با تاشدگی و عملکرد صحیح که بتواند مورد استفاده دارویی قرار گیرد بسیار حائز اهمیت است، زیرا متاسفانه بسیاری از پروتئین های نو ترکیب به صورت تاشده پایدار و محلول بیان نمی شوند و این موضوع یک مانع بزرگ در حوزه های 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، پیشرفت های زیادی بر روی استفاده از دنباله های پروتئینی ایجاد شده است که در تولید پروتئین ها 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 دنباله های پروتئینی از یک سو سبب شده که فرایند خالص سازی و جداسازی این پروتئین ها راحت تر 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 می شود که در زمینه دنباله های پروتئینی در آینده پیشرفت های زیادی صورت می گیرد. با استفاده از این تکنیک که دارای کارایی قابلیت بالایی است، می توان رابطه بین شبکه های ارتباطی پروتئین ها را بررسی کرد و همچنین توانایی پی بردن به رابطه بین ساختار و عملکرد پروتئین ها در جاهای که به علت محدودیت در تکنیک و اطلاعات در دسترس نیست افزایش می یابد.

مطالعه بر روی سلول های میزبان نیز در سال های اخیر توسعه زیادی پیدا کرده اند. به نظر می رسد که تمام رده های تولیدی

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.

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.

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 than 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.