فصل چهارم

سیستمهای بیان زیست داروها

نویسنده: بهناز بخشنده

مقدمه ۳
۱- باکتریها: ۸
۲- مخمرها: ۹
۳- سیستم بیان یوکاریوتی LEXSY: ۹
۴- سلولهای حشرات: ۱۰
۵- سلولهای پستانداران: ۱۰
۶-سیستمهای تولید ترانس ژنیک: ۱۳
۶-۱- حیوانات ترانس ژنیک (pharming): ۱۳
ATryn: اولین زیست داروی تولید شده در سیستمهای ترانس ژنیک ۱۷
۶-۲- جوجههای ترانس ژنیک: ۱۸
۶-۳- گیاهان ترانس ژنیک: ۱۹
شرکتهای تولید کنندهٔ گیاهان ترانسژنیک ۲۱
بیان GFP در گیاهان ترانس ژنیک ۲۲
تولید پروتئینها با استفاده از فناوری اجسام روغنی-Oleosin ترانس ژنیک: ۲۳
منابع: ۲۶

مقدمه

با توجه به سرعت کنونی تحقیقات پروتئین، نیاز به بیان کاراتر و سریعتر ژنها در سیستمهای بیان همولوگ و هترولوگ و تخلیص سریع پروتئینها، روز به روز بیشتر حس می شود. تلاش برای درک رابطه میان ساختار پروتئین و عملکرد زیستی آن شدت یافته است و تعداد زیادی از پروتئینهای کاندید که از طریق برنامه‌های ژنومیکس تولید شده‌اند، جهت بیان و تخلیص مورد توجه قرار گرفته‌اند. بیان مناسب و تکنیکهای کارآمد تخلیص از عوامل بنیادی برای تولید انبوه پروتئین خالص به شمار می روند.

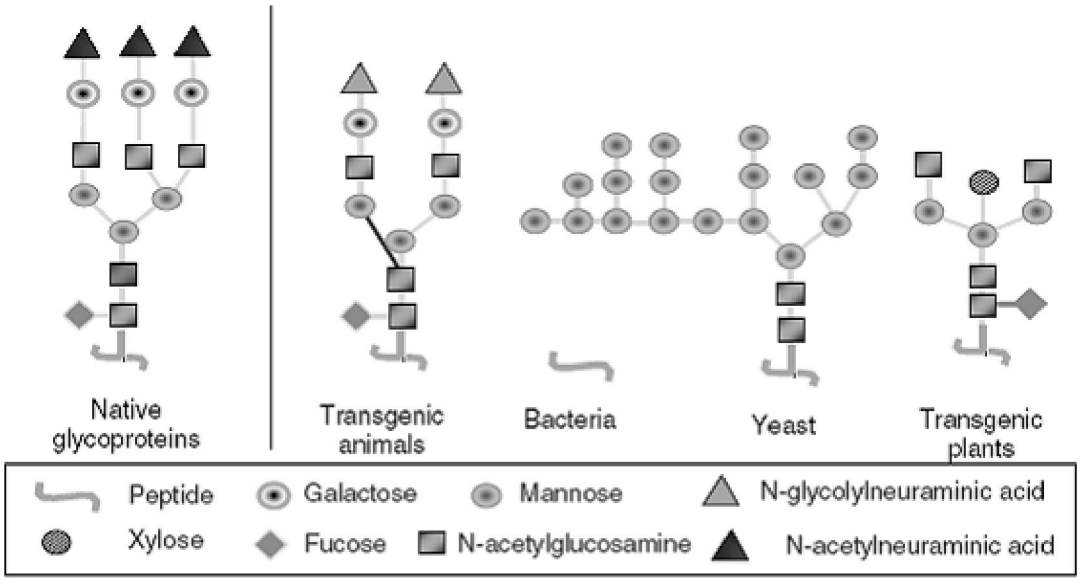
نوع سیستم بیان	کشت سلولهای پستانداران (CHO)	شیر حیوانات ترانس ژن	تخم مرغ جوجه های ترانس ژن	گیاهان ترانس ژن
شرکتهای استفاده کننده	1-Amgen (Thousand Oaks, CA) 2-Genentech (S. San Francisco, CA) 3-Crucell (Leiden, Netherlands)	1-GTC Biotherapeutics (Framingham, MA) 2-PPL Therapeutics (Edinburgh, UK) 3-BioProtein (Paris, France)	1-Avigenics (Athens, GA) 2-Origen Therapeutics (Burlingame, CA) 3-TranXenoGen (shrewsbury, MA) 4-Viragen (Plantation, FL) 5-GeneWorks (Ann Arbor, MI) 6-Vivalis (Nantes, France)	1-Croptech (Blacksburg, VA) 2-Epicyte (San Diego, CA) 3-Large Scale Biology (Owensboro, KY) 4-Meristem Therapeutics (Clermont-Ferrand, France) 5-Prodigene (College Station, TX)
هزینه تقریبی به ازای هر گرم مادهٔ خام	150$	1-2	1-2	0.05$

شکل ۱: مقایسهٔ انواع سیستمهای بیان صنعتی در حال حاضر (۶)

بعلاوه سیستمهای بیان و تکنیکهای تخلیصی که سریعاً میزان زیادی از پروتئینهای نوترکیب خالص را تولید می کنند، برای شناسایی مولکولهای هدف در توسعهٔ صنعت دارویی نقشی حیاتی دارند. کارایی سیستمهای بیان به مرغوبیت سویه‌های میزبان، وکتورها و شرایط رشد میزبان وابسته است. امروزه باکتریها، مخمرها، سلولهای حشرات، اووسیت قورباغه و سلولهای پستانداران جزو شایعترین سیستمهای بیان می باشند. (۱۲)

مانع پیش روی بسیاری از برنامه‌های تحقیقاتی بیان و تخلیص هزینه‌بر و غیر عملی پروتئینها در مقیاسی است که برای ارزیابی و ویژگی سنجی آنها کفایت کند. اغلب در منابع طبیعی مقدار بسیار کمی از پروتئین مورد نظر وجود دارد که تخلیص آن مشکل است و البته معمولاً با تخریب ساختاری پروتئین نیز همراه می باشد. بعلاوه در برخی تحقیقات نیاز به

بررسی نقش ریشه‌های خاص اسیدآمینه‌ای در رابطه با ساختار–عملکرد پروتئین مـی باشـد کـه بـدلیل محـدودیت در تولیـد پروتئینهای دستکاری ژنتیکی شده در سیستمهای باکتریایی، این دسته از تحقیقات نیز با مانع روبرو هستند. (۱۲)
بدین ترتیب در اغلب تحقیقات پیش از هر چیز، تولید مقدار کافی از پروتئین فعال یک شرط اساسی مـی باشـد. بـرای پاسـخ به این نیاز، تکنیکهای مولکولی زیستی با استفاده از سیستمهای یوکاریوتی، پروتئینهای نوترکیب را هماننـد حالـت طبیعـی و فعال آن تولید می کنند.
صنعتگران فعالانه بدنبال فناوریهای نوینی هستند که در عین هزینهٔ کمتر، کارایی بیشتر و فراگیرتر، امکـان افـزایش مقیـاس تولید در آنها به سهولت فراهم باشد. سیستمهای جدید کلونینگ با کارایی بالاتر و سـرعت بیشـتر، قطعـات DNA را میـان سیستمهای وکتوری منتقل می کنند. بعلاوه همگام با پیشرفت دیگر علوم، علاقه برای ایجـاد سیسـتمهای اتوماتیـک رو بـه گسترش است. (۱۲) شکل ۱
در طی سالهای گذشته تعداد زیادی از زیست داروها با گذر از تستهای بالینی به تایید FDA رسیده‌اند و پـس از تولیـد انبـوه، وارد بازار شده‌اند. همهٔ سیستمهای بیان فوائد و مشکلات خـاص خـود را دارنـد. بـدین ترتیـب وابسـته بـه ویژگیهـای مـورد نیاز(case-by-case)، زیست داروها در سیستمهای مختلف میزبانی بیان می شوند. توجه به نوع دستکاریهای پس از ترجمـهٔ محصولات در میزبانهای مختلف، یک نکتهٔ کلیدی در انتخاب میزبان مناسب است. فرآیندهایی از جمله گلیکوزیلاسیون کـه در پروتئینهای انسانی با الگوی خاص صورت می گیرد در برخی میزبانها مثل باکتری بکلی انجـام نمـی‌شـود و یـا در برخـی دیگر مثل مخمر، با الگوی نادرست صورت می‌پذیرد. (۸) شکل۲



شکل۲: مقایسهٔ نوع گلیکوزیلاسیون سیستمهای بیان مختلف (۶)

اگرچه در آینده‌ای نزدیک گیاهان و حیوانات ترانس‌ژنیک بعنوان رقبای قدرتمند در عرصهٔ صنعت وارد می شوند، ولـیکن هـم اکنون تولید صنعتی همهٔ زیست داروها در رده‌های سلولی میکروبی و یا پستانداران صورت می‌پذیرد. (۸)
Escherichia coli و نیز رده‌های سلولی مهندسی شده (BHK, CHO) سیستمهای تولید زیست داروهای تاییـد شـده را تشکیل می دهند. همچنین *Saccharomyces* مهندسی شده برای تولید تعداد محدود اما مهم زیست داروها اسـتفاده مـی

شود، بعنوان مثال آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B نوترکیب (HBsAg) توسط شرکت Glaxosmith kline و انسولین تولید شده توسط شرکت NovoNordisk توسط این مخمر تولید می شوند.

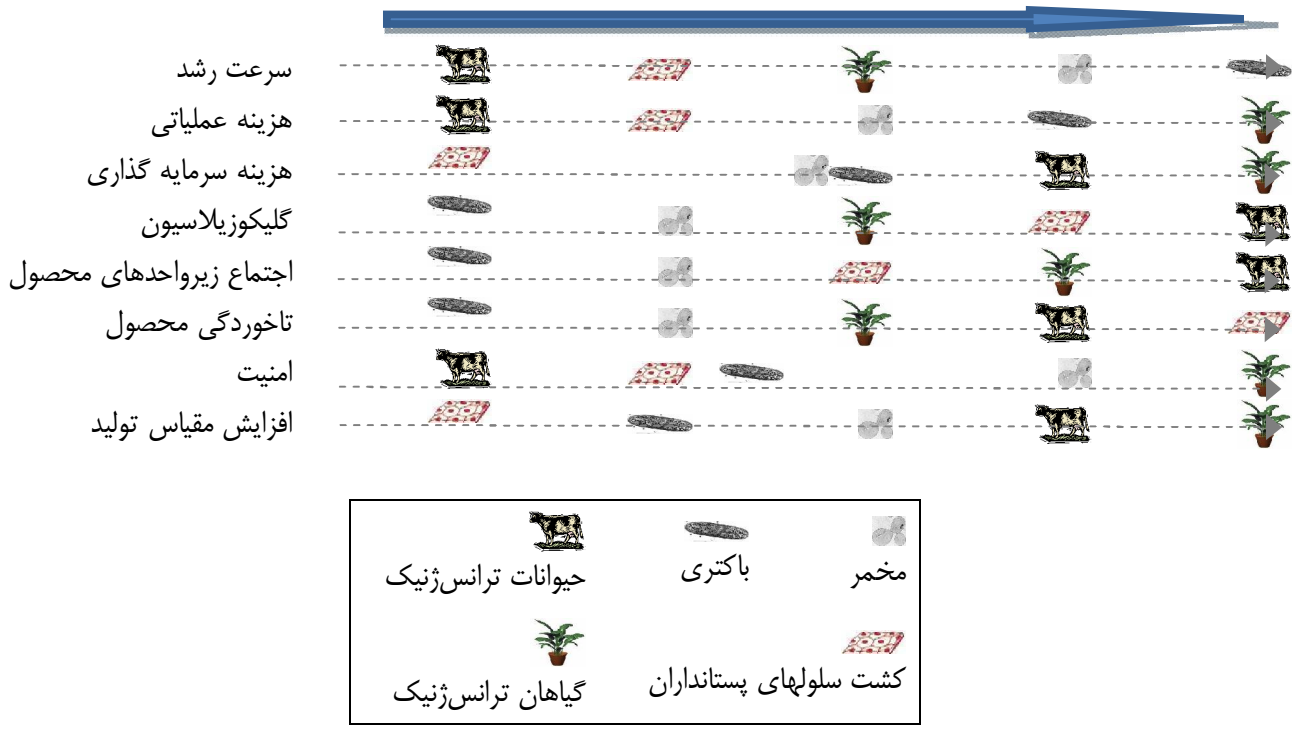
Microbes
Bacteria (prokaryotes) *Escherichia coli (E. coli)* Streptococci Yeasts (eukaryotes) *Saccharomyces cerevisiae* *Pichia pastoris*
Plants
Insect Cells, Baculovirus Vectors
Mammalian Cells
Mammalian cells, nonprimate hamster, Chinese ovary (CHO) murine myeloma cells murine cells other Mammalian cells, primate monkey cells, diploid, kidney, or fetal lung Human cells human cells, transformed with Epstein-Barr virus transformed human cells, gene activation by TKT2 human kidney cells, embryonic human cells, unspecified
Avian Systems
Transgenic Mammals
Goats Rabbits Mice, XenoMouse (used in development only)
Viruses
Recombinant viruses as products (live vaccines) Yellow fever virus vector

جدول ۱: سیستمهای بیان و میزبانهای محصولات نوترکیب (۱۶)

هم اکنون "CaroRx" توسط شرکت Plant Biotechnology در فاز دوم سنجش بالینی برای تولید در میزبان گیاهی است. این آنتی بادی تولید شده در گیاه، برای *Streptococcus mutans* (عامل فساد باکتریایی دندان) اختصاصی است و اتصال این آنتی بادی به باکتری، از چسبیدن باکتری به سطح دندان جلوگیری می کند.

فساد باکتریایی دندان سالانه ۵۰ میلیارد دلار آمریکا، فقط در USA، هزینه دندانپزشکی دارد. درخواست تایید قانونی این محصول در دست اقدام است. در جدول ۱ به اختصار انواع سیستمهای بیان زیست داروها ذکر شده اند.

رو به افزایش



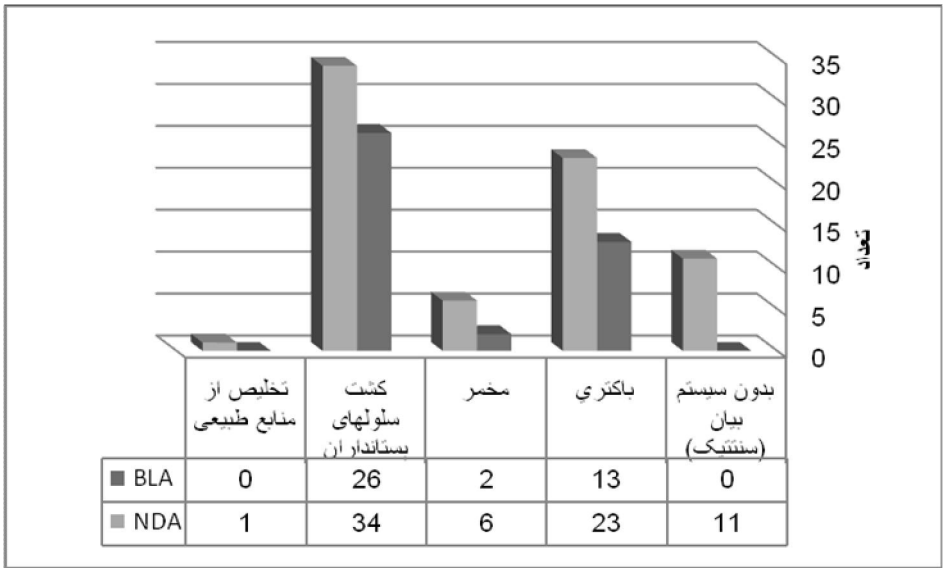
شکل۳: مقایسهٔ انواع سیستمهای بیان زیست داروها (۶)

در جدول ۲، سیستمهای تولید زیست داروها با توجه به برخی ویژگی‌هایشان با هم مقایسه شده‌اند.

ویژگی	*E. coli*	مخمر	سلولهای حشرات	سلولهای پستانداران	حیوانات ترانس‌ژنیک
سرعت بیان	بالا	متوسط	متوسط	متوسط	خیلی بالا
زمان تولید میزبان مناسب	سریع	سریع	متوسط	آهسته	خیلی آهسته
هزینه عملیاتی	کم	کم	زیاد	زیاد	متوسط
بیان خارج سلولی	–	+	+	+	+
بیان سلولهای متیله	+	–	+	+	+
دستکاری پس از ترجمه	–	–	+	+	+
ویژگی دردسرساز	اندوتوکسین	عدم گلیکوزیلاسیون	آلودگی ویروسی	آلودگی ویروسی	آلودگی ویروسی و پریونی
بازآرایی محصول in vitro	+	–	–	–	–
گلیکوزیلاسیون ناخواسته	–	ممکن	ممکن	ممکن	ممکن
بیان همراه پروتئین خودی	–	–	–	–	+

وضعیت قوانین ثبت	خوب	خوب	؟	خوب	؟

جدول۲: مقایسهٔ عواملی که در انتخاب نوع میزبان مهمند (۵)



جدول ۳: مقایسهٔ زیست داروها از نظر سیستم تولید و مسیر قانونی کسب مجوز

در جدول ۳ کلیهٔ زیست داروهای تایید شده تا سال ۲۰۰۶ در دو دسته بندی BLA و NDA با توجه به سیستم تولید صنعتی با هم مقایسه شده‌اند. همانطور که دیده می شود اغلب زیست داروها در سیستم کشت سلولهای پستانداران تولید شده و از مسیر BLA تایید می شوند. همچنین کلیهٔ داروهایی که از مسیر NDA تاییدیه می گیرند بصورت سنتتیک ساخته می شوند. در جدول ۴، سیستمهای تولید زیست داروها از نظر ملاحظات ایمنی و خطرات احتمالی مقایسه شده‌اند.

عامل	سیستم میکروبی	سلولهای حشرات	سلولهای پستانداران	حیوانات ترانس‌ژن
اندوتوکسین‌ها	+	+	+	+
اسیدهای نوکلئیک	+	+	+	+
بار مواد زائد زیستی	+	+	+	+
ویروسها	−	+	+	+
پریونها	−	−	−	+

جدول۴: ملاحظات ایمنی سیستمهای تولید زیست داروها (۵)

۱- باکتری‌ها:

قدیمیترین سیستم تولید زیست داروهای نوترکیب سیستم باکتریایی است که از ۲۰ سال پیش مورد استفاده بوده است و بدلیل سهولت و کم هزینه بودن، هنوز هم استفاده می شود. با استفاده از سیستم بیان *E.coli* می توان در مدت کم در حدود گرم از محصول پروتئینی را به ازای هر لیتر از محیط کشت ارزان بدست آورد. با استفاده از پروموترهای القایی می توان سطح بیان محصول را تا حد ۵۰٪ از کل پروتئین سلول میزبان بالا برد.

اگرچه میزان بیان سیتوپلاسمیک محصول در *E.coli* خیلی بیشتر از بیان پری پلاسمیک آن است، ولیکن بدلیل inclusion bodies و مشکلات تخلیص پروتئین فعال، معمولاً با افزودن توالی *pel*B یا *omp*A به ابتدای توالی پروتئین بیان پری پلاسمیک ترجیح داده می شود. بدلیل عدم گلیکوزیلاسیون، *E.coli* میزبان مناسبی برای تولید آنتی بادی نمی-باشد و تنها می توان از آن بعنوان گزینه‌ای مناسب جهت بیان قطعات آنتی بادی مثل dcFvs, Fabs و یا F(ab)2 یاد کرد. (۸)

Generic	Brand Name	Company
Aldesleukin	PROLEUKIN® IL-2	Chiron Crop.
Anakinra	Kineret	Amgen
Filgrastim	Neupogen	Amgen
Insulin Glargine	Lantus	Aventis
Insulin Human	Humulin	Eli Lilly
Insulin	Lispro	Eli Lilly
Interfron Alfa-2b	Intron-A	Schering Corporation
Interfron Alfacon-1	Infergen	Intermune
Interfron Beta-1b	Betaseron	Berlex Corporation
Nesiritide	Natrecor	Scios Inc.
Oprelvekin	Neumega	Wyeth
Pegfilgrastim	Neulasta	Amgen
Peginterfron Alfa-2a	PEGasys	F.Hoffmann-La Roche;
Peginterfron Alfa-2b	PEG-Intron	Schering-Plough
Retoplase	Retavase	DL BioPharma
Somatropin	Genotropin	Pharmacia
Somatropin	Humatrope	Eli Lilly
Somatropin	Norditropin	Novo Nordisk
Somatropin	Nutropin AQ	Genentech
Teriparatide	Forteo	Eli Lilly

جدول ۵: لیستی از داروهایی که در سیستم باکتریایی تولید می شوند

فوائد: مراحل معین ثبت قانونی. گنجینهٔ ژنتیکی شناخته شده. رشد سریع و ارزان. بیان زیاد محصول در مدت زمان کوتاه (گاهی در طی پنج روز). شناسایی آسان. فرآیند کلونینگ آسان و شناخته شده (۳)

مضرات: همیشه پروتئینهای تولیدی ترشح نمی‌شوند و بدلیل تخریب سلولی، مشکلاتی در تخلیص و جداسازی ایجاد می شود. دارای اندوتوکسین‌ها. عدم دستکاری‌های پس از ترجمه در محصولات. احتمال تاخوردگی نادرست محصول.

محدودیت در اندازهٔ محصول بدلیل گنجایش محدود وکتور کلونینگ. احتمال آسیب به محصول در حین تخلیص و جداسازی (۳)

در جدول ۵ لیستی از زیست داروهایی که در مقیاس صنعتی در سیستم باکتریایی تولید می شوند آورده شده است. در فصل۵ نمایی شماتیک از مراحل تخلیص زیست دارویی که در سیستم تولید باکتریایی *E.coli* تولید می شوند، آمده است.

۲- مخمرها:

پراستفاده‌ترین مخمرها، *S.cervisiae* و *P.pastoris* می باشند. مخمرها سیستمهای تولید حدواسط میان پروکاریوتها (سیستم باکتریایی) و یوکاریوتهای عالیتر (کشتهای سلولی پستانداران) می باشند. (۱)

فوائد: شناسایی بعنوان یک عامل ایمن توسط مراجع قانونی. گنجینهٔ ژنتیکی شناسایی شده. بدون اندوتوکسین. میزان زیاد بیان محصول در مدت زمان تقریباً کوتاه (۲ تا ۸ هفته). سهولت در جداسازی و تخلیص محصول بدلیل ترشح آن. رشد سریع. هزینه ۵۰-۱۰۰ دلار به ازای هر گرم محصول نهایی. محیط کشت ارزان. تاخوردگی معمولاً صحیح محصول. انجام دستکاریهای پس از ترجمه. تولید محصولات بزرگتر نسبت به سیستم باکتریایی (۳)

مضرات: گلیکوزیلاسیون زیاد می تواند فعالیت محصول را تخریب کند. احتمال حضور ایمنوژن و یا آنتی‌ژنها بهمراه محصول. احتمال تاخوردگی نادرست محصول. (۳)

در جدول ۶ لیستی از زیست داروهایی که در مقیاس صنعتی در سیستم مخمری تولید می شوند آورده شده است. در فصل۵ نمایی شماتیک از مراحل تخلیص زیست دارویی که در سیستم تولید مخمری تولید می شوند، آمده است.

Generic	Brand Name	Company
Becaplermin	Regranex	Ortho-McNeil Pharmaceutical (US) Janssen-Cilag (EU)
Glucagon	Glucagen	Novo Nordisk
Insulin Aspart	Novolog	Novo Nordisk
Insulin Human	Novolin	Novo Nordisk
Lepirudin	Refludan	Berlex Corporation
Sargramostim	Leukine	Berlex Laboratories

جدول ۶: لیستی از داروهایی که در سیستم مخمری تولید می شوند

۳- سیستم بیان یوکاریوتی LEXSY:

این سیستم بیان بر پایهٔ پروتوزوآی کینتوپلاستی تک سلولی *Leishmania tarentolae* است که از the Moorish gecko *Tarentola mauritanica* جداسازی شده و برای پستانداران بیماریزا نمی باشد. (bisafety level 1)

استفاده از این سیستم بیان یوکاریوتی به سادگی استفاده از *E. coli* است. دستکاریهای پس از ترجمهٔ پروتئینها در سیستم LEXSY کاملاً مطابق با دستکاریهای یوکاریوتهای عالی می باشد و شامل گلیکوزیلاسیون و تشکیل باندهای دی سولفید

نیز می شود. می توان از وکتورهای دوطرفه (shuttle vectors) نیز در این میزبان استفاده کرد: کلون در *E.coli* و بیان در LEXSY. از دیگر خصوصیات مهم این سیستم بیان امکان بیان پیوسته، القایی و یا ترشحی در آن است. (۱۲)

۴- سلولهای حشرات:

رده‌های سلولی مورد استفاده در این دسته، SF-9 و SF-21 (از *Spodoptera frugiperda*) و Highfive (از Trichoplusia ni) می باشند. (۱) در جدول ۷ این سه رده با هم مقایسه شده‌اند.

Cell line	source	Cell density in culture
Sf9	Spodoptera frugiperda ovarian tissue	>12 x 10^6 cells/ml in suspension on day 6-7 with>98% viability
Sf21	Spodoptera frugiperda ovarian tissue	>6 x10^6 cells/ml in suspension on day 6-7 with>98% viability
Tn5B1-4(high five)	Trichoplusia embryonic tissue	>8 x 10^6 cells/ml in suspension on day 6-7 with>98% viability
S2	Drosophila	> 50-100 x 10^6

جدول۷: مقایسهٔ سه ردهٔ سلولی حشرات جهت تولید زیست داروها (۹)

فوائد: انجام دستکاریهای پس از ترجمه. تاخوردگی صحیح محصول. ترشح محصول. بیان تقریباً زیاد محصول. تولید محصول در ۴ هفته. بی خطر بودن ویروسهای حشرات برای انسانها. (۳)
مضرات: موارد اندک ثبت شده. رشد کند. محیط رشد گران. حذف ویروسهای حشرات مرحله‌ای اضافی در تخلیص است. حاوی پروتئینهای ایمنوژنیک میزبانی. امکان گلیکوزیلاسیون نادرست. ویروسهای پستانداران در گرما کشتهای سلولهای حشرات را آلوده می کند. (۳)
تولیدات: شرکت Novavax از کشت سلولی حشرات جهت تولید ذرات شبه ویروسی (پروتئین پوسته ویروس، بدون مواد ژنتیکی درونی) برای تولید واکسن، دارو و مواد تشخیصی استفاده می کند. (۳)
در فصل۵ نمایی شماتیک از مراحل تخلیص زیست دارویی که در سیستم تولید کشت سلولهای حشرات تولید می شوند، آمده است.

۵- سلولهای پستانداران:

از سال ۱۹۸۶ که شرکت Genentech مجوز ورود به بازار را برای tPA انسانی (اولین پروتئین درمانی که در میزبان رده‌های سلولی پستانداران بیان شد) دریافت کرد تا کنون این نوع سیستم بیان توانسته با قابلیت بالای خود، میزبان چند صد کاندید دارویی در pipeline باشد. هم اکنون ۶۰-۷۰ درصد از داروهای نوترکیب تایید شده در رده‌های سلولی پستانداران بیان می شوند. (۸)

پروسهٔ تولید یک پروتئین خاص در کشت سلولهای پستانداران در مقیاس بزرگ عبارت است از: انتقال ژن پروتئین مورد نظر به سلول میزبان، انتخاب سلولهای حاوی وکتور، سنجش بیان ژن و نگهداری از ردهٔ سلولی بدست آمده، بهینه سازی و تثبیت محیط کشت مناسب، تخلیص پروتئین مورد نظر از محیط کشت سلولی.

رده‌های سلولی که در محیط کشت بصورت سوسپانسیون رشد می کنند، نسبت به رده‌های چسبنده به کف ظرف، جهت تولید محصولات مناسبترند، چراکه در محیط یکسان، به غلظت بالاتری می‌رسند. رایجترین رده‌های سلولی پستانداران که توسط صنعت دارویی استفاده می شوند عبارتند از: CHO (Chinese hamster ovary) (سوسپانسیون)، BHK (baby hamster kidney)، NS0 (mouse myeloma)، سوسپانسیون HEK-293 (کلیه جنین انسانی)، PER-C6 (سلولهای شبکیه‌ای انسانی) (۱)

بازدهی تولید محصول با استفاده از این سیستم بیان به حدود چند گرم به ازای هر لیتر محیط کشت (20-90pg/cell/day) رسیده است که نشان دهندهٔ ۱۰۰ برابر بهبود نسبت به ۲۵ سال پیش می باشد. با استفاده از توالی *kappa* Ig در ابتدای توالی پروتئین می توان محصول را بصورت ترشحی بیان کرد. (۸)

فوائد: تاخوردگی معمولاً صحیح محصول. انجام دستکاریهای صحیح پس از ترجمه. ترشح محصول. مراحل معین ثبت قانونی. تنها انتخاب (بجز ترانس‌ژنیک) برای پروتئینهای بزرگ و پیچیده. (۳)

مضرات: رشد کند. محیط رشد گران. احتمال حضور آلودگی‌ها و آلرژنها در محصولاتی که در محیط سرم‌دار تولید می شوند. شناسایی گران محصول. تخلیص پیچیدهٔ محصول. هزینه ۵۰۰–۵۰۰۰ دلار به ازای هر گرم محصول نهایی. (۳)

در جدول ۸ لیستی از زیست داروهایی که در مقیاس صنعتی در سیستم کشت سلولهای پستانداران تولید می شوند آورده شده است. در فصل۵ نمایی شماتیک از مراحل تخلیص زیست دارویی که در سیستم تولید کشت سلولهای پستانداران تولید می شوند، آمده است.

Generic	Brand Name	Company
Abciximab	Reopro	Centocor, Inc. (subsidiary of Johnson & Johnson) and Eli Lilly and Company
Abciximab	Reopro	Centocor, Inc. (subsidiary of Johnson & Johnson) and Eli Lilly and Company
Adalimumab	Humira	Cambridge Antibody Technologies and Abbott Laboratories
alemtuzumab	Campath	Ilex Oncology, Inc., Millennium Pharmaceuticals, Inc., Genzyme and Berlex Laboratories, Inc Millennium & ILEX (EU); Berlex, ILEX & Millennium Pharmaceuticals (US)

Alteplase	Activase	Genentech, Inc.
Bevacizumab	Avastin	Genetech
Cetuximab	Erbitux	ImClone Systems Inc.
cyclosporine	RESTASIS	Allergan, Inc
Darbepoetin Alfa	Aranesp	Amgen
Darbepoetin Alfa	Aranesp	Amgen
Dornase Alfa	Pulmozyme	Genentech, Inc.
Drotrecogin Alfa	Xigris	Eli Lilly
Efalizumab	Raptiva	Xoma, Ltd. & Genentech, Inc.
Epoetin Alfa	Epogen/Procrit	Amgen
Etanercept	Enbrel	Amgen(us) and Wyeth(eu)
Factor VIIa	NovoSeven	Novo Nordisk
Factor IX	Benefix	Wyeth
Factor VIII	Kogenate FS	Bayer Corp.
Factor VIII	Recombinate	Baxter Healthcare Genetics Institute
Factor VIII	Refacto	Wyeth Europe Ltd. (US)
Folitropin Alfa	Gonal-FREE	Serono S.A. Ares Serono (Europe) Ltd
Folitropin Beta	Follistim AQ	Organon
Gemtuzumab Ozogamicin	Mylotarg	Wyeth
Imiglucerase	Cerezyme	Genzyme Corporation
Infliximab	Remicade	Johnson & Johnson
Interfron Beta-1a	Avonex	Biogen Idec
Interfron Beta-1b	Rebif	Serono
Natalizumab	Tysabri	Biogen Idec and Élan
Omalizumab	Xolair	Genentech / Novartis
Palivizumab	Synagis	MedImmune
Rituximab	Rituxan	IDEC Pharmaceuticals
Somatropin	Saizen	Serono
Somatropin	Serostim	Serono
Tenecteplase	TNKase	Genentech
Thyrotropin Alfa	THyrogen	Genzyme Corp
Urokinase	Abbokinase	ImaRx

جدول ۸: لیستی از داروهایی که در سیستم کشت سلولهای پستانداران تولید می شوند

۶-سیستمهای تولید ترانس ژنیک:

دستیابی به سیستم ایمن، اقتصادی و قابل اعتماد تولید پروتئین یکی از بزرگترین دغدغه‌های شرکتهای دارویی است. سیستم‌های باکتری یایی، مخمر و کشت سلول پستانداران بدلیل هزینهٔ بالا و عدم توانایی در تولید مقادیر زیاد محصول، نیازمند جایگزین مناسبی می باشند. معمولاً هزینهٔ یک واحد تولید از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ دلار آمریکا برای هر گرم محصول پروتئینی تخلیص شده، متغیر است که به نوع محصول، حجم و سیستم تولید آن بستگی دارد. (۴)

بنابر مطالعات صورت گرفته، ساخت واحدهای تولید شرکتهای دارویی، سه تا پنج سال به طول می انجامد. بدین ترتیب شرکتها مجبورند در حین تستهای دارویی، اقدام به ساخت و تجهیز واحدهای تولید نمایند. بدلیل عدم اطمینان از تایید قانونی دارویی و نیز دشواری در پیش بینی بازار مصرف، ریسک سرمایه گذاری بالاست. علاوه بر آن، داشتن داروی تایید شده بدون سیستم تولید مناسب، پیامدهای نامناسبی در بر دارد.

سیستمهای تولید ترانس ژنیک بدلیل حجم تولید بالا، ریسک سرمایه گذاری را کم می کنند و اقتصادی‌تر می باشند. این سیستمها طیف وسیعی از میزبانها و بافتهای حیوانی، گیاهی و طیور را در بر می گیرند. (۴)

۶-۱- حیوانات ترانس ژنیک (pharming):

فوائد: قادر به انجام فرآیندهای پیچیدهٔ تولید محصولات. میزان بالای بیان محصول. تاخوردگی صحیح محصول. سهولت در افزایش مقیاس تولید محصول. تولید ارزان محصول (۲۰-۵۰ دلار به ازای هر گرم محصول نهایی). (۳)

مضرات: تجربیات اندک قانونی جهت ثبت. پتانسیل نامعلوم جهت آلودگی ویروسی. میزان بیان متغیر. مدت زمان طولانی. ابهامات بی پاسخ در تخلیص. تولید پیوسته، تعیین lots و Batches را پیچیده می کند. مشکلات حل نشده در پذیرش عمومی. (۳)

محصولاتی که توسط سیستم حیوانات ترانس ژنیک تولید می شوند:

۱- شرکت PPL therapeutics در اسکاتلند: استفاده از خرگوش و گوسفند جهت تولید آنتی‌تریپسین آلفا یک، لیپاز تحریک شونده با نمک صفرا، کلاژن، سوپراکساید دیس‌موتاز، فاکتورهای چهار و هشت خونی، فیبرینوژن، آلبومین سرم انسانی، فاکتور XIV انعقاد خون، کلسی تونین.

۲- شرکت Pharming در هلند: استفاده از گوساله برای تولید آلفا گلوکوزیداز، مهارکننده C1 استراز، کلاژن، فیبرینوژن، فاکتورهای چهار و هشت خونی، لاکتوفرین.

۳- شرکت Genzyme در آمریکا: استفاده از بز برای تولید مهارکنندهٔ آلفا یک پروتئیناز، آنتی‌ترومبین III، بتا اینترفرون، کلسی‌تونین، هورمون رشد، tPA، واکسن مالاریا، آلبومین سرم انسانی. (۳)

در فصل۵ نمایی شماتیک از مراحل تخلیص زیست دارویی که در سیستم تولید حیوانات ترانس ژنیک تولید می شوند، آمده است.

تولید پروتئینهای درمانی نوترکیب در شیر حیوانات ترانس ژنیک:

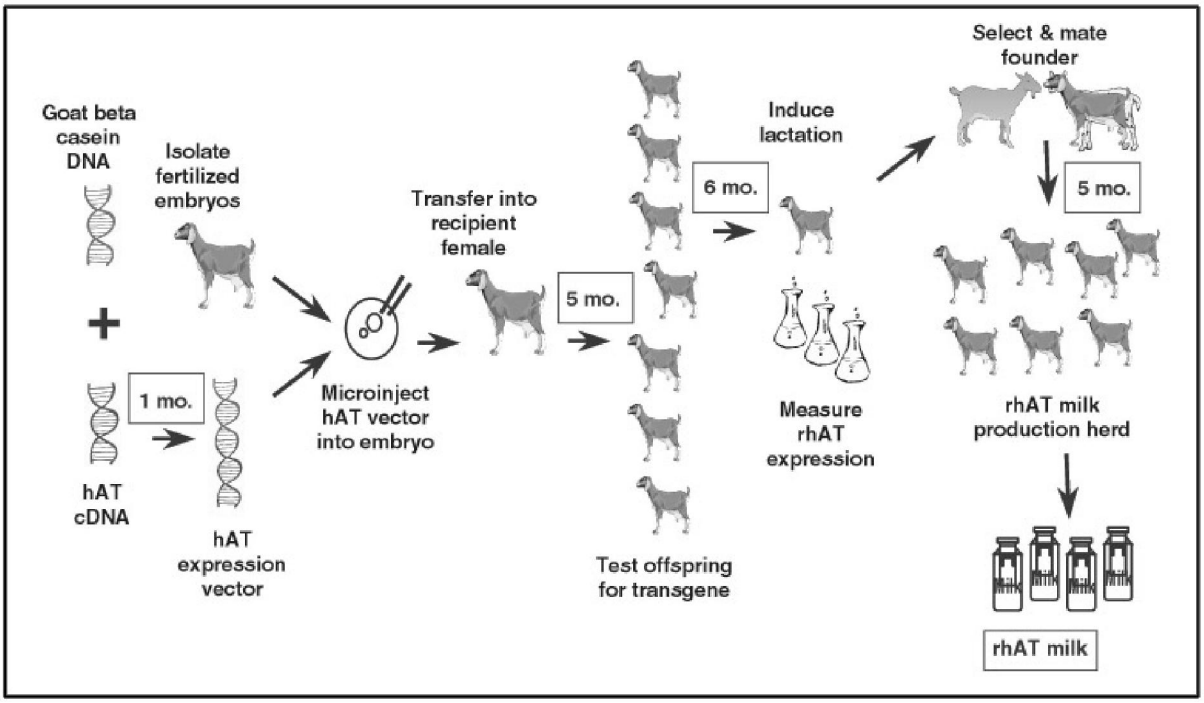
استفاده از شیر ترانس ژنیک یک روش به صرفه جهت تولید مقادیر زیاد پروتئینهای پیچیده است. به زودی تجاری سازی آنتی‌ترومبین نوترکیب انسانی (rhAT) که در شیر بزهای ترانس ژنیک بیان می شود، آغاز می گردد. این محصول توانسته از انجمن پزشکی اروپا (EMEA) تاییدیه بگیرد.

بیوراکتورهای اولیه از جمله اشریشیاکلای و ساکارومایسس، جهت تولید پلی‌پپتیدهای ساده مثل انسولین و هورمون رشد انسانی مناسبند. ولیکن استفاده از این بیوراکتورهای میکروبی برای تولید پروتئینهایی که دستکاری پس از ترجمهٔ پیچیده نیاز دارند (و یا نیازمند تاخوردگی intricate هستند مثل فاکتورهای انعقادی و یا منوکلونال آنتی بادیها) رضایت بخش نیست. (۲)

محصول	شرکت	حیوان تولید کننده	مرحله توسعه
ATryn	GTC Biotherapeutics	بز	نظر مثبت CHMP اروپا فاز سوم در آمریکا
مهارکننده استراز C1	Pharming	خرگوش	فاز سوم
MM-093 (AFP)		بز	فاز دوم
آلفا گلوکوزیداز	Pharming	خرگوش	فاز دوم
هورمون رشد انسانی	BioSidus	گاو	پیش بالینی
آلبومین	GTC Biotherapeutics	گاو	پیش بالینی
فیبرینوژن	Pharming	گاو	پیش بالینی
کلاژن	Pharming	گاو	پیش بالینی
لاکتوفرین	Pharming	گاو	پیش بالینی
آنتی‌تریپسین آلفا	GTC Biotherapeutics	بز	پیش بالینی
واکسن مالاریا	GTC Biotherapeutics	بز	پیش بالینی
CD137(4-1BB)MAb	GTC Biotherapeutics	بز	پیش بالینی

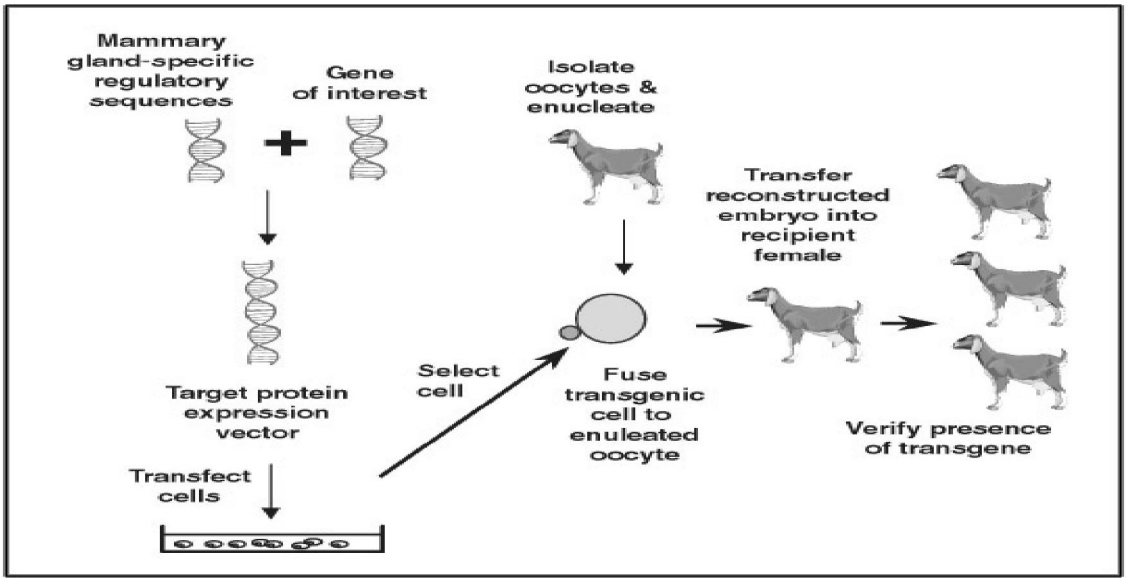
جدول۹: لیستی از داروهای نوترکیب که در شیر حیوانات ترانس ژنیک تولید شده و در پی کسب مجوز بازار می باشند (۲)

بدین ترتیب کشتهای سلولهای پستانداران در مقیاس بزرگ مثلاً CHO توسعه یافتند که جهت ساخت آنتی بادیهای منوکلونال و سیتوکینها مناسبند. با این حال بدلیل دوز درمانی بالای برخی پروتئینها و یا ساختار پیچیدهٔ آنها، هنوز نمی‌توان برخی پروتئینهای نوترکیب را از طریق بیوراکتورهای میکروبی و یا کشتهای سلولی بدست آورد. امروزه منبع استحصال اینگونه پروتئینها مثل آنتی‌ترومبین و آنتی‌تریپسین آلفا یک، پلاسمای انسانی است.



شکل ۴: نمایی شماتیک از فرآیند تولید بزهای ترانس ژنیک جهت تولید آنتی‌تریپسین (۲)

امروزه با فیوژن وکتور بیانی که حاوی ژن مورد نظر است، با توالیهای تنظیمی ویژهٔ غدد شیری و سپس انتقال آن به تخم گونه انتخابی، می توان برخی پروتئینها را در شیر آن گونه، تولید کرد. هنگامیکه هترو-ژن درون ژنوم تخم انتگره می شود، ساختار بیان شیر ویژه بعنوان یک ویژگی غالب به نسلهای آینده حاصل از زاد و ولد این حیوان منتقل می شود. (۲)
محدودیتهای سیستم بیان ترانس ژنیک مربوط به اثرات بالقوه نامطلوب پروتئینهای هترولوگ بر سلامت حیوان تولید کننده می گردد.
اگرچه سیستمهای بیان ترانس ژنیک قادر به انجام دستکاریهای پیچیدهٔ پس از ترجمه از جمله گاما کربوکسیلاسیون، بتا هیدروکسیلاسیون یا گلیکوزیلاسیون N-liked و O-linked می باشند، با این حال شایستگی سیستم تولید به ویژگیهای خاص محصول نیز بستگی دارد.
هدف گیری پروتئینهای هترولوگ جهت بیان در غدد شیری موشهای ترانس ژنیک بصورت مستقل توسط چندین گروه در انتهای دههٔ ۸۰ میلادی گزارش شد. با استفاده از تکنیک Pronuclear microinjection در جنین تک سلولی و یا انتقال وکتور به جمعیتهای اولیهٔ سلولهای سوماتیک در جنین می توان حیوان ترانس ژن تولید کرد. (۲)



شکل ۵: نمایی شماتیک از فرآیند انتقال هسته به هستهٔ سلول سوماتیک جهت تولید حیوان ترانس ژنیک (۲)

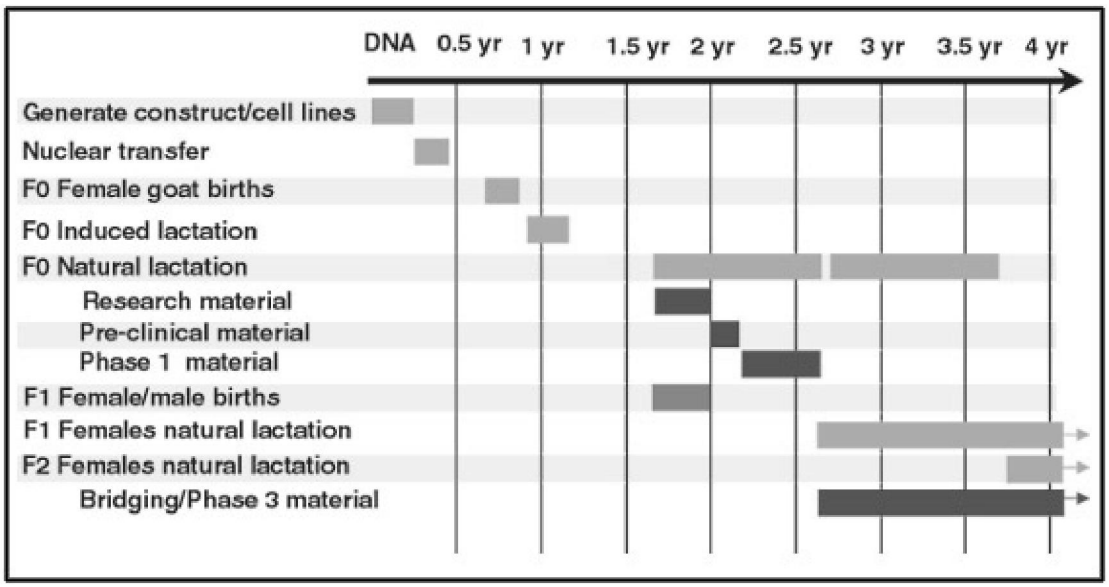
پس از انتگراسیون وکتور در ژنوم سلول تخم ریا، ترانس ژنهای ویژهٔ غدد شیری به نسلهای آیندهٔ این حیوان به ارث می رسند. غلظت پروتئین بیان شده در شیر بصورت روتین در حد یک گرم بر لیتر است که البته این میزان تا ۲۰ گرم بر لیتر هم گزارش شده است. میزان بیان پروتئین مورد نظر به توالی تنظیمی مورد استفاده در غدد شیری، ژن بیان شده و جایگاه انتگراسیون هترو–ژن در ژنوم تخم، وابسته است.

از موشهای ترانس ژنیک بیشتر جهت آزمایش ساختارهای بیان استفاده می شود. بدین ترتیب توالیهای تنظیمی که اثرات قویتری بر بیان ژنهای هترولوگ دارند در غدد شیری شناسایی می شوند.

تولید خرگوشهای ترانس ژنیک با استفاده از تکنیک Pronuclear microinjection، بدلیل بزرگی تخم خرگوش نسبت به موش، ساده و کم هزینه است. همچنین زمان کوتاه میان دوبارداری، تعداد شیردهی‌ها را به هشت بار در سال رسانده است. می توان در مقیاس تجاری در محدودهٔ چند کیلوگرم از پروتئین موردنظر را بدین طریق بدست آورد.

در خوکهای ترانس ژنیک، حجم شیردهی بالاتر است و همچنین دستکاری پس از ترجمهٔ پیچیده‌تری بر محصول صورت می گیرد.

در بزهای ترانس ژنیک، فاصلهٔ زمانی از آغاز انتقال ترانس ژن تا اولین شیردهی ۱۶ تا ۱۸ ماه است. می توان سالانه چند صد کیلوگرم از پروتئین تخلیص شده را بدین طریق بدست آورد. درمورد گاوهای ترانس ژنیک میزان محصول باز هم بیشتر است. (۲)



شکل۶: نمایی از زمان مورد نیاز جهت ایجاد نسلی از بزهای ترانس ژنیک (۲)

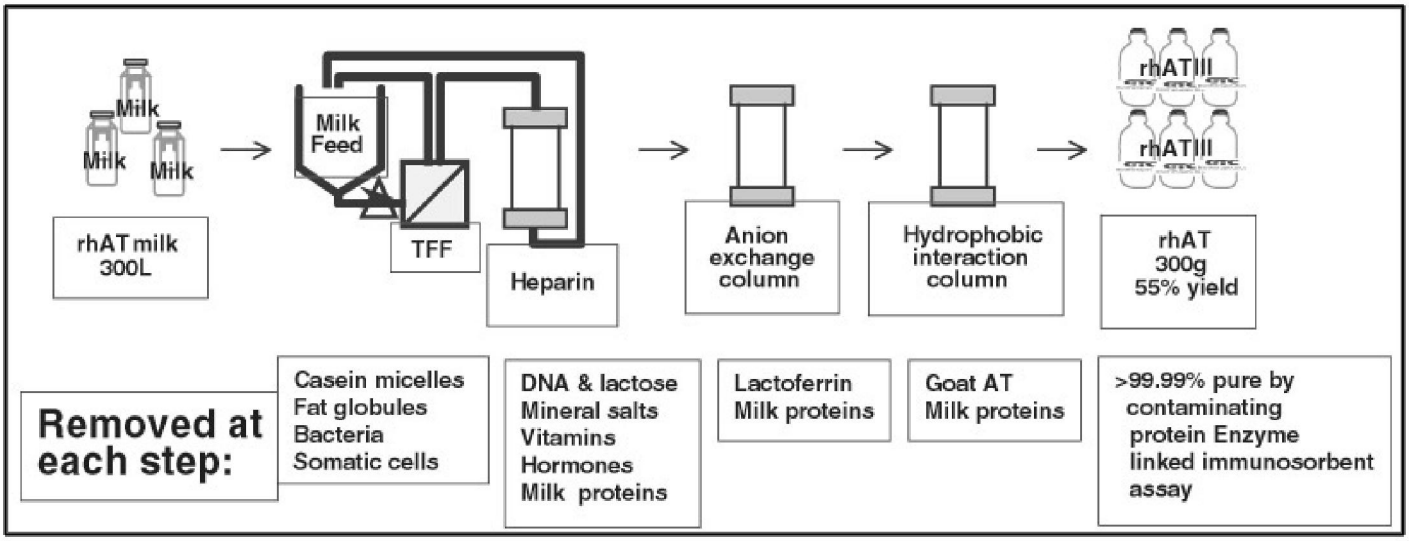
ATryn: اولین زیست داروی تولید شده در سیستمهای ترانس ژنیک

آنتی‌ترومبین یک گلیکوپروتئین پیچیده حاوی جایگاههای گلیکوزیلاسیون N-linked و ۳ باند سولفیدی است. این ویژگیها برای عملکرد صحیح AT ضرورند. همچنین مقدار مصرف درمانی این پروتئین در حد چند گرم به ازای هر دورهٔ درمان است. بزهای ترانس ژنیک بعنوان سیستم بیان این پروتئین استفاده شدند. منطقهٔ پروموتر ژن بتاکازئین بز به hAT cDNA متصل شد. این ترانس ژن در معرض کروموزومهای جنین بز قرار داده شد و در نهایت این جنینها به بزهای مادر به روش تلقیح مصنوعی منتقل گردید. بزهای متولد شده حاوی این ترانس ژن می باشند و قادر به تولید محصول این ژن، rhAT، در شیر خود هستند. غلظت تقریبی rhAT در شیر این بزها ۲گرم در لیتر است. جهت تخلیص و جداسازی پروتئین rhAT از شیر بزهای ترانس ژنیک از فیلتراسیون مماسی، کروماتوگرافی تمایلی هپارین، نانو فیلتراسیون، کروماتوگرافی تعویض یونی و کروماتوگرافی بر پایهٔ اندرکنشهای هیدروفوب با بازده بالاتر از ۵۰٪ استفاده می شود. ساختار rhAT تخلیص شده شبیه آنتی‌ترومبین تخلیص شده از پلاسمای انسانی (hpAT) است. (۲)

با این حال تفاوتهایی در گلیکوزیلاسیون آنها دیده می شود که می توان به حضور فوکوز و GalNAc، میزان مانوز بیشتر و اسید سیالیک و گالاکتوز کمتر در rhAT نسبت به hpAT اشاره کرد.

با این حال تفاوتی در عملکرد این دو پروتئین در مهار ترومبین دیده نمی‌شود. در دوم ژانویه ۲۰۰۶، EMEA استفاده از rhAT را جهت پیشگیری از انسداد انعقادی سیاهرگی در حین جراحی بیمارانی که بصورت مادرزادی کمبود آنتی‌ترومبین دارند، تایید کرد.

امروزه محققان در تلاشند که آلبومین انسانی، هورمون رشد انسانی، مهارکننده C1 استراز، آنتی‌تریپسین آلفا یک و آنتی بادیهای منوکلونال را در شیر حیوانات ترانس ژنیک تولید کنند. (۲)



شکل۷: نمایی شماتیک از فرآیند تخلیص آنتی‌تریپسین از شیر بزهای ترانس ژنیک (۲)

۶-۲- جوجه‌های ترانس ژنیک:

سیستم بیان جوجه‌های ترانس ژن نیز به تازگی مورد توجه صنعتگران قرار گرفته است بطوریکه هم اکنون چندین شرکت بر این اساس بنا نهاده شده‌اند. برای تولید این جوجه‌ها باید ژن انسانی مورد نظر را در منطقه‌ای از ژنوم مرغ وارد کرد که محصول آن در سلولهای غدد لوله‌ای مرغ بیان شود تا محصول در تخم مرغ جای گیرد. (۱۳)

تخم مرغهای این جوجه‌ها حاوی پروتئینهای نوترکیب موردنظر می باشند. برای جلوگیری از آلودگی جوجه‌ها به میکروبها باید قوانین سختی برای محافظت از آنها اعمال کرد که این استریلیزاسیون شدید، سیستم ایمنی جوجه‌ها را در مقابل بیماریها تضعیف کرده و می تواند منجر به خسارات زیادی شود. (۶)

مزایای استفاده از سیستم بیان در تخم مرغ:

۱-بارداری سریع و زمان کوتاه رسیدن به بلوغ (۶ ماه)

۲-هزینه کم تولید: تخم مرغها به ویروس حیوانی آلوده نمی‌شوند. نگهداری از مرغها آسان است.

۳-تولید زیاد پروتئین: یک تخم مرغ در روز، ۲۱ تا در ماه و ۲۵۲ تا در سال برای هر مرغ(۱۵)

۴-دستکاریهای پس از ترجمهٔ پروتئینهای نوترکیب و از جمله گلیکوزیلاسیون در تخم مرغ شبیه انسان است.

شرکت TranXenoGen, Inc

این شرکت بیوتکنولوژی در حال تحقیق بر ANUP برای درمان انواع سرطانها است. از دیگر فعالیتهای آن، بررسی امکان تولید انسولین و آلبومین سرم انسانی در تخم مرغ می باشد. (۱۵)

شرکت Origen Therapeutics

این شرکت آمریکایی بیوتکنولوژی در حال تحقیق و بررسی امکان تولید آنتی بادیهای پلی‌کلونال کاملاً انسانی در تخم مرغ می باشد. (۱۴)

شرکت **AviGenics, Inc.**

این شرکت آمریکایی زیست دارویی در تلاش است تا با انتقال ژن انسانی به ژنوم مرغ، پروتئین نوترکیب دلخواه را با الگوی گلیکوزیلاسیون صحیح در تخم مرغ بیان کند. (۱۳)

محصولات شرکت AviGenics, Inc. (۱۳)

نام محصول	مورد استعمال	وضعیت
AVI-014	درمان نوعی سرطان	پایان فاز اول مطالعات بالینی با تایید FDA و ورود به فاز دوم در سال ۲۰۰۷
AVI-005	درمان نوعی بیماری عفونی	پایان فاز اول مطالعات بالینی با تایید FDA
AVI-010	درمان اختلالات یک اندام	شروع فاز یک در سال ۲۰۰۷
AVI-041 و *AVI-032*		Pre-clinical

۶-۳- گیاهان ترانس ژنیک:

انسانهای غارنشین از گیاه بعنوان دارو استفاده می‌کرده‌اند. در سال ۱۹۸۲ یک شرکت فرانسوی توانست Salicin (مادهٔ سازندهٔ آسپرین) را از درخت بید جدا کند. موضوع بیان در گیاهان نوترکیب از دههٔ ۷۰ میلادی تاکنون مورد بررسی قرار گرفته است. در تلاشهای اولیه سعی شد تا ژنهای مقاومت به آفات و حشرات در غلات بیان شوند که ذرت نوترکیب Bt که حاوی ژن از باکتری *Bacillus thuringensis* است نمونه‌ای موفق از این دسته تحقیقات می باشد. (۶)

بدلیل ترانسفورماسیون و کشت آسان در سیستمهای گیاهی و دستکاریهای پس از ترجمه محصولات همانند سیستمهای انسانی (از جمله استیلاسیون، گلیکوزیلاسیون و فسفریلاسیون) این نوع سیستم بیان روز به روز بیشتر مورد توجه محققان و صنعتگران قرار می گیرد.

گیاهان قادر به بیان فاکتورهای رشد، پروتئینهای سرم، آنزیمها، آنتی بادیها (plantibodies) و واکسنها می باشند. تنباکوی نوترکیب (*Nicotiana tabacum*) اولین میزبان گیاهی است که قادر به بیان IgG1 موشی می باشد. بسته به نوع گیاه و سیستم بیان آن، در برخی گیاهان دستکاریهای پس از ترجمهٔ آنتی بادیها بیشتر به انسان شباهت دارد. سیستم خزه در شرکت آلمانی Biotech GmbH از تواناترین سیستمهای بیان گیاهی است که حتی پروتئین پیچیدهٔ همودیمر VEGF را هم بخوبی تولید می کند.

اگرچه هنوز قوانین مدونی برای تولید و استفاده از گیاهان ترانس ژنیک در مراکز معتبر ارزیابی کیفیت، تصویب نشده است ولیکن از سال ۲۰۰۲ پیش‌نویسهایی تدوین شده و از محققان خواسته شده تا نظرات خود را نسبت به آنها ارائه دهند. (۶)

فوائد: چرخه‌های کوتاهتر رسیدن به تولید محصول نسبت به حیوانات. انبار کردن آسان دانه‌ها. سهولت در افزایش مقیاس تولید محصول. میزان بالای تولید (بیش از یک کیلوگرم محصول به ازای هر جریب زیر کشت). گنجینهٔ ژنتیکی شناخته شده. هیچ ویروس گیاهی، انسان را آلوده نمی‌کند. تولید ارزان (۲۰-۱۰ دلار به ازای هر گرم محصول نهایی) (۳)

مضرات: توانایی بالقوه در آلوده شدن سیستم (قارچهای خاکی، باکتری، حشره‌کشها، علف‌کشها). دستکاریهای پس از ترجمه در گیاهان متفاوت از حیوانات است. احتمال حضور آلرژنها. مشکلات حل نشده در پذیرش عمومی. (۳)

جدول۱۰: مقایسهٔ روشهای مختلف تولید گیاهی زیست داروها (۷)

نوع سیستم	فوائد	مشکلات
گیاهان نوترکیب: تجمع محصول در درون گیاه	بازده، پایداری رده‌های دائمی، صرفه اقتصادی	مقیاس زمانی
گیاهان نوترکیب: ترشح محصول از ریشه یا برگ	قابلیت حفاظت، تخلیص	مقیاس، بازده کم، هزینه زیاد تجهیزات تولید
انتقال ژن به ژنوم کلروپلاست (Transplastomic)	بازده بالا، بیان چندین ژن با هم، سمیت کم، قابل حفاظت	عدم گلیکوزیلاسیون، امکان انتقال افقی ژن
گیاهان ترانسفورم شده با ویروس	بازده بالا، مقیاس زمانی، انجام همزمان چند ترانسفورماسیون	امنیت کم، محدودیت در اندازهٔ قطعات ژنی
Agroinfiltartion	قابلیت حفاظت	هزینه بالا
کشت بافتها یا سلولها	مقیاس زمانی، قابلیت حفاظت، ترشح محصول به محیط، مدارک مدون ثبت	هزینه بالا

جدول۱۱: میزبانهای گیاهی برای تولید زیست داروها (۷)

سویه	فوائد	مشکلات	شرکتهای استفاده کننده از این فناوری
گیاهان مدل			
Arabidopsis thaliana	در دسترس بودن سویه‌های متنوع جهش یافته، ژنوم در دسترس، سهولت در ترانسفورماسیون	عدم تولید به صرفه محصول	
گیاهان ساده			
Physcomitrella patens, Chlamydomonas reinhardtii, Lemna	حفاظت آسان، تکثیر کلونیک، ترشح محصول به محیط، قوانین مدون، امکان نوترکیبی هموگ در Physcomitrella	تنوع زیاد (scalability)	
محصولات برگدار			
تنباکو	حجم بالای محصول، فناوریهای ترانسفورماسیون و بیان شناخته شده، افزایش مقیاس سریع، گیاه غیر خوراکی	پایداری کم محصول در برگهای درو شده، حضور آلکالوییدها	1-Biotechnology Inc. (http://www.planetbiotechnology.com) 2-Meristem Therapeutics (http://www.meristem-therapeutics.com) 3-Chrologen (http://www.chlorogen.com)
شبدر، یونجه	حجم بالای محصول، مفید برای تولید	پایداری کم محصول در برگهای درو	Medicago Inc. (http://www.medicago.com)

	واکسنهای حیوانی، تکثیر کلونیک	شده، حضور اسید اگزالیک	
کاهو	خوراکی، مناسب برای تولید واکسنهای انسانی	پایداری کم محصول در برگهای درو شده	
غلات			
ذرت، برنج	پایداری محصول در حین انبار کردن، حجم بالای محصول، سهولت در ترانسفورماسیون و دستکاری ژنتیکی		Prodigene Inc. (http://www.prodigene.com)
گندم، جو	پایداری محصول در حین انبار کردن	حجم کم محصول، دشواری در ترانسفورماسیون و دستکاری ژنتیکی	
حبوبات			
سویا	به صرفه اقتصادی، تولید بالا، بیان در پوشش دانه	بیان کم محصول، دشواری در ترانسفورماسیون و دستکاری ژنتیکی	
نخود	حجم بالای محصول	بیان کم محصول	
میوه‌ها و سبزیجات			
سیب زمینی، هویج	خوراکی، پایداری محصول در انبار	نیاز به پختن سیب زمینی	
گوجه فرنگی	خوراکی، حفاظت در گلخانه	هزینه بالای رشد، استفاده اجباری از سردخانه پس از چیدن	
دانه‌های روغنی			
Camelina sativa	فرایند اتصال ژن محصول به ژن Oleosin، سیستم جوانه زدن	حجم کم محصول؟	UniCrop (http://www.unicrop.fi/)

شرکتهای تولید کنندهٔ گیاهان ترانسژنیک

۱- شرکت Croptech از تنباکوی ترانس ژنیک جهت تولید آنزیمهای لیزوزومی انسانی استفاده می کند. همچنین به تازگی این شرکت توانسته داروی گلوکوسربروزیداز را برای درمان بیماری Gaucher، در تنباکو تولید کند. برگهای این گیاه معادل یک دوز درمانی می باشند.

۲- شرکت Prodigene با همکاری Sigma، مواد تشخیصی اویدین و بتاگلوکورونیداز تولید شده در ذرت ترانس ژنیک را به بازار عرضه کرده است. این شرکت با همکاری Genencor در تلاش برای تولید آنزیمهای صنعتی در گیاهان ترانس ژنیک است.

۳- مرکز تحقیقاتی Boyce Thompson نیز در تلاش برای ساخت گوجه فرنگی و سیب زمینی دستکاری شده حاوی واکسنهای خوراکی وبا، هپاتیت B و ویروس Norwalk است. (۳)

شرکت	همکار	پروتئین/مورد مصرف	میزبان	مرحله تحقیقاتی
Monsanto	بیمارستان کودکان لندن	آنتی بادی ضد پوسیدگی دندان	ذرت	فاز سوم
Large scale	-	scFv غیر هوچگینی	تنباکو	فازهای سوم

				biology
فاز دوم	ذرت	لیپاز گوارشی	Solvay Pharmaceuticals	Meristem Therapeutics
فاز اول	تنباکو	آنتی بادی	ProdiGene, Plant Bioscience	Large scale biology
فاز اول	ذرت	آنتی بادی ضد سرطان	NeoRx	Monsanto
فاز اول	ذرت	واکسن TGEV	-	ProdiGene
فاز اول	ذرت	آنتی بادی ضد HSV	Dow, Centocor	Epicyte Pharmaceutical
مطالعات پیش بالینی	تنباکو	Enbrel	Immunex	Corp Tech
مطالعات پیش بالینی	تنباکو	آنتی بادیها	Amgen	Corp Tech
مطالعات پیش بالینی	سیب زمینی	آنتی بادیها	ارتش آمریکا	AltaGen Bioscience Inc.
مطالعات پیش بالینی	ذرت	لاکتوفرین انسانی	CNRS	Meristem Therapeutics
مطالعات پیش بالینی	سیب زمینی	محرمانه	Aventis CropScience	MPB Cologne GmbH

جدول۱۲: زیست داروهایی که در میزبان گیاهی بررسی می شوند (۶)

بیان GFP در گیاهان ترانس ژنیک

در عروس دریایی *Aequorea*، ژنی به نام GFP (green fluorescent protein) وجود دارد که پروتئینی با فلورسانت سبز تولید می کند. این ژن در صنعت گیاهان ترانس ژنیک کاربردهای فراوانی دارد. برای تولید گیاهان ترانس ژنیک که دسته‌ای از GMO (Genetically Modified Organism) به حساب می‌آیند، فرآیند ترانسفورماسیون (معرفی ژن به گیاه، جذب توسط گیاه و بیان ژن جدید در گیاه) انجام می‌پذیرد. (۱۰)

روشهای مختلفی برای معرفی ژن به گیاه وجود دارد:

۱- بمباران طلا

۲- استفاده از *Agrobacterium tumefaciens*

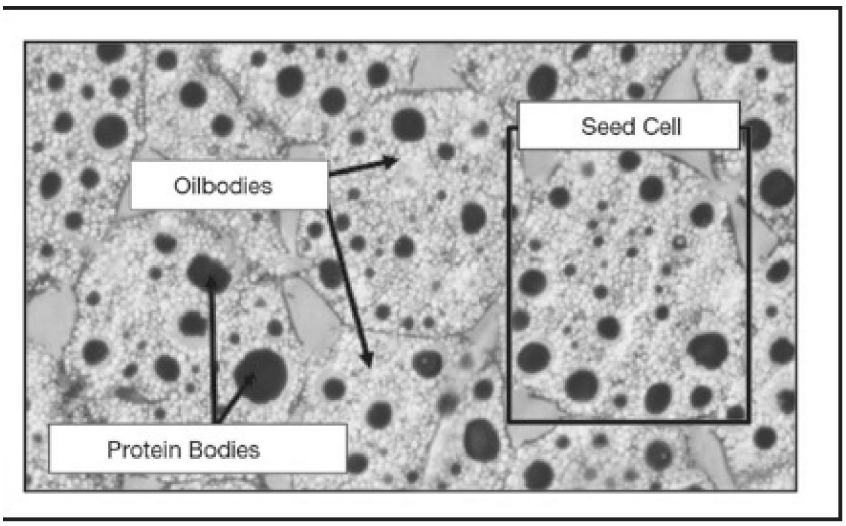
۳- کلون ژن موردنظر در *E.coli* و انتقال طبیعی ژن از *E.coli* به سلول گیاهی در محیط کشت بدلیل ویژگی ذاتی وکتوری در *E.coli*

صنعتگران برای سهولت در جداسازی گیاهان ترانس ژنیک از گیاهان فاقد ژن موردنظر، پس از مرحلهٔ ترانسفورماسیون از ژن GFP استفاده می کنند. اگر ژن GFP را در کنار ژن موردنظر در یک ساختار واحد کلونینگ قرار دهیم، می‌توانیم پس از مشاهدهٔ نور سبز فلورسانت تحت اشعه UV، گیاهان ترانس ژنیک را جداسازی نماییم. GFP در طول موجهای مختلف بجز نور سبز، قادر به تولید نور زرد (yellow fluorescent protein: YFP)، کبود (cyan fluorescent protein: CFP) و یا آبی (blue fluorescent protein: BFP) نیز می باشد. از آنجاییکه کلروفیل ۲ بصورت طبیعی فلورسانت قرمز تولید

می کند، گیاهان ترانس ژن حاوی ژن GFP در نور UV به رنگ مخلوطی از رنگهای سبز یـا زرد و قرمـز دیـده مـی‌شـوند. (۱۰)

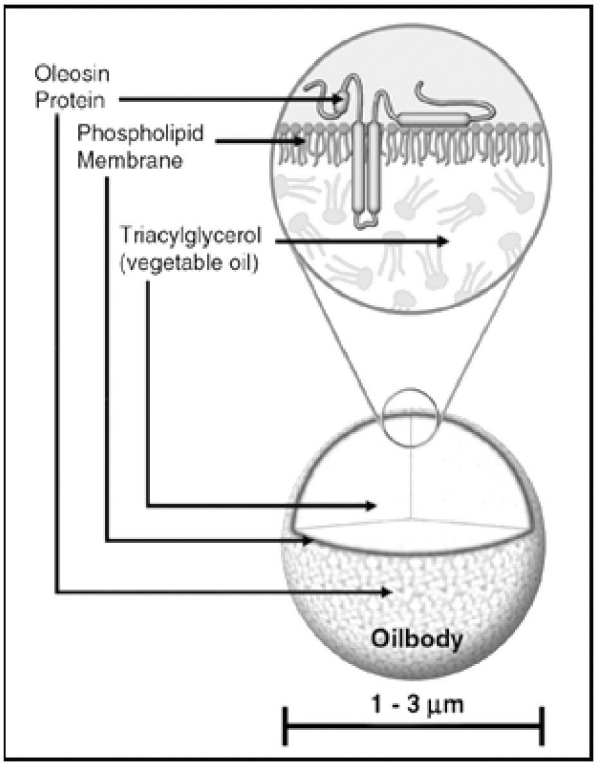
تولید پروتئینها با استفاده از فناوری اجسام روغنی-Oleosin ترانس ژنیک:

فناوری اجسام روغنی-Oleosin از این جهت منحصر به فرد است که همزمان با تولیـد تـودۀ پروتئینـی، فراینـد تخلـیص و بازیافت آن (که ۷۵٪ از هزینۀ تولید را به خود اختصاص می دهد) را هم پوشش می دهد. بدین جهت سرمایه گـذاری بـرای تجهیز واحد تولید با این سیستم بسیار کمتر از سرمایۀ لازم جهت فرمانتاسیون متداول است.
علاوه بر صرفۀ اقتصادی، برخلاف پروتئینهای بیان شده در شیر و یا برگ، پروتئینهای تولید شده در سیستم اجسام روغنی_ Oleosin تا چندین سال پایدارند و می توان دانه‌های حاصل را انبار نمود. بعنوان نمونه گیاه گلرنـگ (Safflower) در یـک زمین کوچک رشد می کند و سیستم خود-گرده افشانی دارد و به سـادگی مـی تـوان آن را از دیگـر زمینهـای تحـت کشـت تفکیک نمود. سیستم تولید اجسام روغنی-Oleosin را می تـوان در دو بخـش بررسـی کـرد: ۱- قابلیـت بیـان پروتئینهـای نوترکیب در اجسام روغنی دانه‌ها، ۲- توانایی جداسازی کم هزینۀ اجسام روغنی حاوی پروتئین مورد نظر از دانه‌ها.
جسم روغنی یک اندامک ذخیره‌ای منحصر بفرد در دانه است. ساختار اجسام روغنی متشکل از یک هسته از لیپیـد خنثـی یـا تری‌آسیل گلیسرول است که با یک نیمه غشاء از جنس فسفولیپید احاطه شده است. (۴)



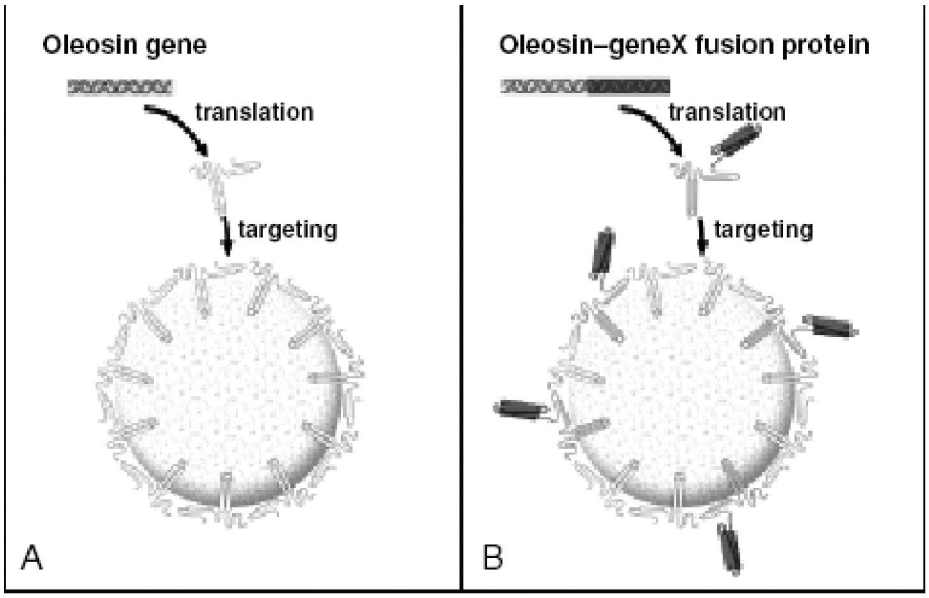
شکل ۸: نمایی از برش عرضی دانه safflower و رنگ آمیزی اجسام روغنی درون آن (۴)

در سطح خارجی این لایه، دسته‌ای از پروتئینهـا بـه نـام Oleosin وجـود دارنـد. Oleosin پـروتئین خاصـی بـا ویژگیهـای سورفکتانتی است که انتهاهای کربوکسیلی و آمینی آن آمفی پاتیک می باشد درحالیکه مرکز آن هیدروفوب است.



شکل۹: شکل شماتیک یک جسم روغنی و جایگاه پروتئین Oleosin در سطح آن (۴)

این مرکز لیپوفیل از غشاء جسم روغنی به داخل آن فرو رفته است درحالیکه بخشهای آمفی پاتیک در سطح خارجی غشاء جسم روغنی گسترده شده‌اند. بدین ترتیب جسم روغنی در پوششی آمفی پاتیک محصور شده که به آن پایداری می بخشد. با استفاده از فناوریهای مهندسی ژنتیک می توان پروتئینهای موردنظر بیان شده را از طریق فیوژن کووالان با Oleosin در سطح اجسام روغنی قرار داد. (۴)

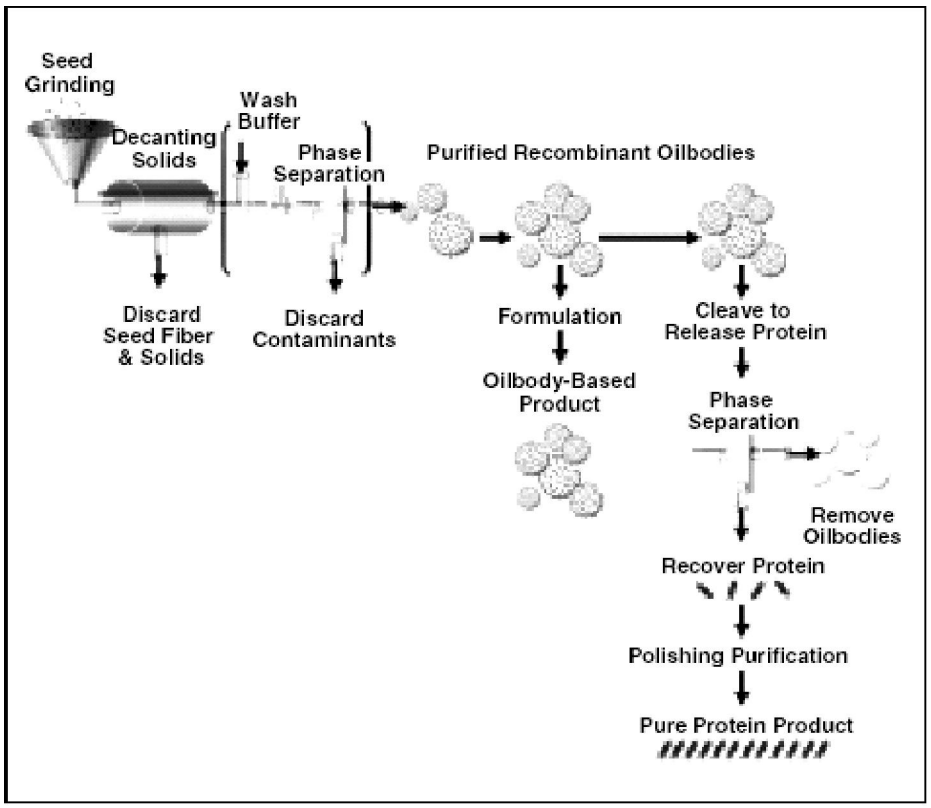


شکل۱۰:A : بیان ژن Oleosin و قرارگیری پروتئین آن در سطح جسم روغنی/B : بیان فیوژن ژن Oleosin-ژنX و قرارگیری آنها در سطح جسم روغنی در سیستم زیستی Stratosome (۴)

ترکیبی از مهندسی اجسام روغنی با تخلیص آنها، پایهٔ سیستم زیستی Stratosome است که مراحل آن بدین ترتیب می باشد:

۱- ابتدا با استفاده از مهندسی ژنتیک، ترانس ژنی که کدکنندهٔ فیوژن ژنOleosin-X است به گیاه عرضه می شود. همانطور که گیاه رشد می کند و دانه‌های آن ایجاد می شوند، این فیوژن پروتئین نیز بیان می گردد و اجسام روغنی درون آنها تولید می شوند.
۲- دانه‌های ترانس ژنیک پس از جمع آوری از مزرعه تحت فرایند جداسازی اجسام روغنی قرار می گیرند.
۳- سپس با استفاده از روشهای شیمیایی و یا آنزیم خاصی که جایگاه فیوژن پروتئین هدف و Oleosin را شناسایی می کند، این پیوند گسسته می شود.
۴- در انتها از طریق سانتریفوژ اجسام روغنی شده و با استفاده از روشهای تخلیص متداول با هزینه اندک، پروتئین موردنظر جداسازی می گردد.

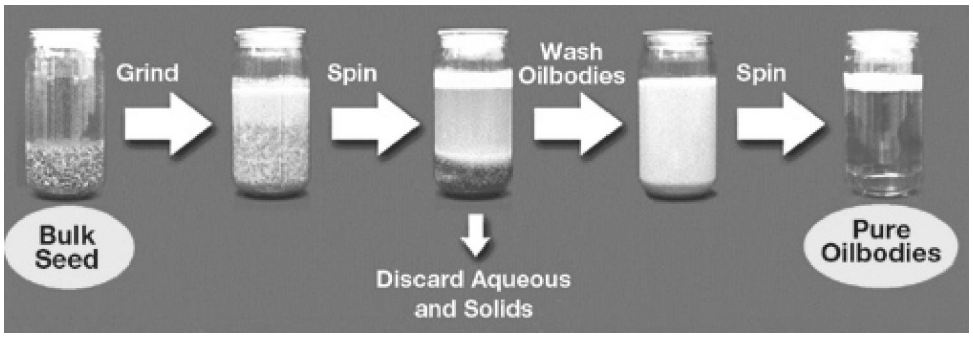
در این سیستم می توان پروتئینهایی با اندازه یک کیلودالتون (نه اسید آمینه) تا بیش از ۱۰۰ کیلو دالتون را تولید کرد. همچنین دستکاریهایی از جمله تشکیل باندهای دی سولفید در این سیستم صورت می گیرد. (۴)



شکل۱۱: فلوچارت سیستم زیستی Stratosome (۴)

فرایند جداسازی: روغن از آب سبکتر است:

دانه‌ها ابتدا توسط آسیاب، هموژن می شوند. سپس در طی یک فرایند کم هزینه جداسازی برپایهٔ آب، مواد دانه از اجسام روغنی با سانتریفوژ جدا می شوند. بدین ترتیب بیش از ۹۸٪ از پروتئینهای ناخواسته حذف می گردند و بخش حاوی اجسام روغنی که غنی از پروتئین نوترکیب موردنظر است تحت دیگر فرایندهای متداول جداسازی قرار می گیرد. بدین ترتیب هزینه‌های تخلیص تا حدود زیادی کاهش می‌یابد. (۴)



شکل۱۲: فرآیند جداسازی اجسام روغنی (۴)

منابع:

1-Efficient Small-Scale Production of Proteins, Oliver Gresch, Ph.D, Hans-Guenter Bruenker, Ph.D, BioPharm International, Feb 9, 2006

2- Production of Recombinant Therapeutic Proteins in the Milk of Transgenic Animals, Yann Echelard, Carol A. Ziomek, Harry M. Meade, BioPharm International, Aug 1, 2006

3- The Applications, BioPharm International, Mar 10, 2006

4- Producing Proteins Using Transgenic Oilbody-Oleosin Technology, Nancy Markley, Cory Nykiforuk, Ph.D., Joe Boothe, Ph.D., Maurice Moloney, Ph.D., BioPharm International, Jun 1, 2006

5- BioProcess Guide: Development strategy - process design, L&K Biosciences 2000-2007

6- Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2nd Edition. Volume 10, Plant-based Expression of Biopharmaceuticals, Jorg Knablein Schering AG, Berlin, Germany

7- Plant-based production of biopharmaceuticals, Rainer Fischer, Eva Stoger, Stefan Schillberg, Paul Christou and Richard M Twyman, Current Opinion in Plant Biology 2004, 7:152–158

9- http://www.expressionsystems.com/documents/General%20Info.pdf

10- GFP Expression in Transgenic Plants and Its Importance, Adam Miettinen, March 8, 2006

11-
http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1007_eukaryotic_expression_system_lexsy.html

12- Catalyzing the Future of Proteomics: Protein Expression & Purification, BioInformatics, LLC , December 1, 2001, 133 Pages - Pub ID: BIF748972

13- http://www.avigenics.com

14- http://www.origentherapeutics.com

15- http://www.tranxenogen.com
16- Expression Systems for Process and Product Improvement, Ronald A. Rader, BioProcess International, June 2008