Archive of SID
Modares Journal of Biotechnology
Volume 9, Issue 1, Winter 2018
Pages: 79-92
Type: Analytic Review

Production of Recombinant Human Growth Hormone and Future Challenges

Ghasemi R.[1] *MSc*, Hashemzadeh H.[1] *MSc*, Razavi H.[2] *MSc*, Yakhchali B.* *PhD*

*Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
[1]Department Nanobiotechnology, Bioscience Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Nanobiotechnology Recearch Centre, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Growth hormone is a non-glycosylated polypeptide strand of the pituitary glands of all vertebrates that has a wide range of biological activities and considering the importance of this hormone and its importance and diverse therapeutic applications in medicine, its recombinant production can be of great importance. In recent decades, protein engineering and genetic engineering have resulted in a high level of expression and production of this protein in a variety of hosts, including *Escherichia coli* bacteria using new techniques and methodes, hormone purification and assay are carried out easily. Therefore, the aim of this review was to investigate the production of recombinant human growth hormone (rhGH) and future challenges.

Conclusion: One of the problems of the expression and purification of the human growth hormone may involve that maybe noted the production of inclusion bodies in the expression of recombinant proteins in the cell cytoplasm, the contamination caused by host proteins, low protein recovery from these inclusion bodies, low protein secretion into the Periplasmic space, high cost of production, especially in Purification stage and so on. Due to the lack of need for glycosylated hormone and high efficiency and simplicity of work, bacterial systems, especially *Escherichia coli*, are the most economical and effective systems for the expression of heterologous proteins. The hormone purification stage is usually the most costly process. Therefore, an optimal design for achieving the highest target protein recovery with the elimination of all contamination from the final product and reducing the purification step is required.

Keywords
Growth Hormone [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68013006];
Polypeptide [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010455];
Pituitary Gland [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010902];
Recombinant Drug [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68013006];
Genetic Engineering [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005818];
Escherichia coli [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004926]

*Corresponding Author
Tel: +98 (21) 44580395
Fax: -
Post Address: National Institute of Genetics & Biotechnology, Pajouhesh Boulevard, Town of Science & Technology Research, 15 Kilometer, Highway Tehran- Karaj, Tehran, Iran. Postal Code: 1497716316
bahar@nigeb.ac.ir
Received: May 6, 2016 Accepted: October 29, 2017 ePublished: March 20, 2018

www.SID.ir

Archive of SID

تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب و چالش‌های پیش رو

روح‌اله قاسمی MSc
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
هادی هاشم‌زاده MSc
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
حمیده رضوی MSc
مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج)، تهران، ایران
باقر یخچالی* PhD
گروه بیوتکنولوژی صنعتی و زیست‌محیطی، موسسه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

چکیده
مقدمه: هورمون رشد، یک رشته پلی‌پپتید غیرگلیکوزیله ترشحی از سلول‌های غدد هیپوفیز همه مهره‌داران است که تنوع وسیعی از فعالیت‌های زیستی را دارا بوده و با توجه به اهمیت این هورمون و کاربردهای درمانی مهم و متنوع آن در پزشکی، تولید نوترکیب آن می‌تواند از درجه اهمیت بالایی برخوردار باشد. در دهه‌های اخیر، مهندسی پروتئین و مهندسی ژنتیک سبب شده است که میزان بالایی از سطح بیان و تولید این پروتئین در میزبان‌های مختلفی از جمله باکتری *اشریشیاکلی* حاصل شود و با تکنیک‌های جدید، خالص‌سازی و سنجش هورمون تولیدی به‌آسانی انجام گیرد. بنابراین هدف پژوهش مروری حاضر، بررسی تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب (rhGH) و چالش‌های پیش رو انجام گرفت.
نتیجه‌گیری: از جمله مشکلاتی که در مسیر بیان و تخلیص هورمون رشد انسانی می‌توان به تولید اجسام توده‌ای در بیان پروتئین‌های نوترکیب در سیتوپلاسم سلول‌ها، آلودگی‌های ناشی از پروتئین‌های میزبان، ریکاوری پایین پروتئین از این توده‌ها، ترشح کم پروتئین‌ها به فضای پری‌پلاسمی، هزینه بالای تولید مخصوصاً در مرحله تخلیص و غیره اشاره کرد. به‌علت عدم نیاز به گلیکوزیله‌شدن این هورمون و نیز راندمان بالا و سادگی کار، سیستم‌های باکتریایی مخصوصاً *اشریشیاکلی* اقتصادی‌ترین و موثرترین سیستم‌ها در بیان پروتیئن‌های هترولوگ هستند و می‌توان عنوان کرد که باکتری *اشریشیاکلی* کارآمدترین میزبان برای تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب است. مرحله خالص‌سازی هورمون معمولاً پرهزینه‌ترین مراحل تولید محسوب می‌شود. از این رو یک طراحی مطلوب به‌منظور داشتن بالاترین میزان ریکاوری پروتئین هدف همراه با حذف همه آلودگی‌ها از محصول نهایی و کاهش مراحل تخلیص مورد نیاز است.
کلیدواژه‌ها: هورمون رشد، پلی‌پپتید، غدد هیپوفیز، داروی نوترکیب، مهندسی ژنتیک، باکتری اشریشیاکلی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۵
*نویسنده مسئول: bahar@nigeb.ac.ir

مقدمه
داروهای انسانی، بیومولکول‌های طبیعی هستند که در بدن از هورمون‌ها، آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها و لیمفوکین‌ها مشتق می‌شوند. پروتئین‌های درمانی نوترکیب، چهره پزشکی مدرن را در دهه‌های گذشته تغییر داده و به‌طور پیوسته سبب درمان بیماری‌های متعدد و صعب‌العلاج شده‌اند. از پروتئین‌های درمانی نوترکیب شناخته‌شده در بازار جهانی که به‌صورت تجاری تولید می‌شوند، می‌توان به اریتروپوئیتین (EPO)، اینترفرون α، هورمون رشد انسانی یا سوماتروپین (hGH)، انسولین انسانی و فعال‌کننده پلاسمینوژن بافت (tPA) اشاره کرد. هورمون‌ها اکثراً ماهیت پروتئینی داشته و به‌عنوان پیام‌رسان‌های شیمیایی از یک سلول (یا گروهی از سلول‌ها) به سلول‌های هدف تخصیص یافته‌اند. هورمون‌ها عملکردهای بسیاری در بدن انسان دارند و می‌توانند سبب تحریک رشد یا ممانعت از آن، القا یا توقف آپوپتوز، فعال‌سازی یا جلوگیری از سیستم ایمنی و تنظیم سوخت‌وساز بدن شوند. با پیشرفت‌هایی که در تکنولوژیDNA نوترکیب اتفاق افتاده است، اکنون تولید این بیومولکول‌های زیستی در یک موجود زنده، غیر از منبع طبیعی آنها امکان‌پذیر است[1]. این کار به‌وسیله کلون‌کردن ژن مسئول تولید بیومولکول‌های مطلوب در داخل ژنوم یک موجود زنده متفاوت انجام می‌شود.

hGH یک پپتید تک‌زنجیره‌ای کوچک است که توسط سوماتوتروف‌های اسیددوست بخش جلویی غده هیپوفیز که حدود ۵۰% از غده را تشکیل می‌دهند، ساخته شده و سپس در جریان خون رها می‌شود. hGH به‌وسیله ژن GHN قرارگرفته در یک گروه ۵تایی ژنی حاوی دو ژن GH (GH-N OR GH_1 و GH- OR GH_2 V) به‌علاوه ۲ تا ۳ ژن کدکننده سوماتومامووتروپین کوریونیک مربوطه (Chorionic Somatomammotropin) روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ کد می‌شود و دارای طیف وسیعی از عملکردهای زیستی است[2, 3]. چندین شکل از این هورمون در بدن وجود دارد، اما نوع غالب آن (hGH_1) دارای ۱۹۱ آمینواسید با وزنی معادل ۲۲کیلودالتون است که در چهار ساختار آلفا- هلیکس با دو پل دی‌سولفیدی بین آمینواسیدهای ۵۳ و ۱۶۵ (لوپ بزرگ) و آمینواسیدهای ۱۸۲ و ۱۸۹ (لوپ کوچک) بسته‌بندی می‌شود[4, 5] و مسئول رشد بعد از تولد است و همچنین نقش تعدیل‌کننده سوخت‌وساز کربوهیدارت‌ها، لیپیدها، نیتروژن و مواد معدنی را دارد. این هورمون تنها عضو خانواده HGH بوده که به‌صورت تجاری تولید شده است. از هورمون‌های رشد نوترکیب انسانی تولیدشده در سطح جهان می‌توان به سایزن و سروستیم (Serono Laboratories؛ ایالات متحده)، ژنوتونرم (Pharmacia؛ ایالات متحده)، نوتروپین (Genetech؛ ایالات متحده)، هوماتروپ (Eli Lilly؛ ایالات متحده) و نوردیتروپین (Novo Nordisk؛ ایالات متحده) اشاره کرد. این هورمون‌های نوترکیب از نظر پایداری در محلول دارای محدودیت هستند (برای ۲ هفته در ۸-۲°C) و عموماً به روش خشک‌شده در برودت نگهداری می‌شود[6].

هورمون رشد تولیدشده توسط غده هیپوفیز، برای اولین‌بار در سال ۱۹۲۱ به‌وسیله *ایوانس* و *لانگ* توصیف شده است[7]، سپس *لی* و *ایوانس* در سال ۱۹۴۴ هورمون رشد انسانی را جداسازی کرده‌اند[8]. بعد از جداسازی hGH، برای اولین‌بار در دهه ۱۹۶۰، از آن به‌عنوان درمان کوتاهی قد ناشی از کم‌کاری هیپوفیز استفاده شد[9]. در آن زمان، هورمون رشد برای استفاده بالینی فقط باید از غدد هیپوفیز بعضی اجساد به دست می‌آمد. استفاده از هورمون رشد انسانی مشتق‌شده از غده هیپوفیز قدامی، با اثبات ارتباط آن با بیماری کروتزفلدجاکوب ممنوع شد[10, 11]، بنابراین نیاز ضروری به تولید این هورمون با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک احساس شد. فناوری DNA نوترکیب، تولید ایمن و در مقیاس بالای هورمون رشد انسانی نوترکیب را در سیستم‌های مختلف ناهمگن، بدون ریسک انتقال پاتوژن‌های (عوامل تولید بیماری) انسانی تسهیل کرده است[12, 13]. به‌وسیله مهندسی ژنتیک، ژن‌های مسئول برای تولید hGH جداسازی و cDNA کدکننده hGH ابتدا در باکتری‌ها به‌عنوان میزبان برای تولید هورمون نوترکیب کلون شدند[14]. *گودل* و همکاران در سال ۱۹۷۹ برای اولین‌بار هورمون رشد انسانی نوترکیب را تولید[15] و *گری* و همکاران در سال ۱۹۸۵، این hGH را در فرم طبیعی به‌وسیله *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*) به‌عنوان میزبان تولید کرده‌اند[12] و در نهایت در سال ۱۹۸۵، hGH نوترکیب برای استفاده بالینی مورد تایید قرار گرفت[9].

www.SID.ir

Archive of SID

هورمون رشد انسانی تنوع وسیعی از عملکردهای زیستی شامل سنتز پروتئین، تکثیر سلولی[16]، سوخت‌وساز پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها، رشد و مصونیت[17]، تحریک تقسیم و تکثیر سلول‌های غضروفی، افزایش رسوب کلسیم و معدنی‌شدن استخوان، تحریک رشد سلول در هر اندامی از بدن انسان، افزایش سوخت‌وساز، ترمیم سلول‌های تخریب‌شده، تحریک سنتز پروتئین‌ها، کاهش تجزیه پروتئین‌ها، تحریک سیستم ایمنی، افزایش تجزیه لیپیدها، افزایش انتقال گلوکز، بهبود مثبت تعادل نیتروژن و افزایش زیاد در جذب آمینواسید را بر عهده دارد[18].

به‌علاوه از این هورمون در درمان کوتاهی قد ناشی از کم‌کاری هیپوفیز، نارسایی مزمن کلیه، سندروم ترنر، بزرگسالان با نقص هورمون رشد یا نشانگان اکتسابی کمبود ایمنی (HIV) استفاده می‌شود[19]. همچنین، هورمون رشد انسانی برای درمان سوختگی‌ها، خونریزی زخم‌ها و شکستگی استخوان مورد استفاده قرار گرفته است[16, 19-21]. براساس مطالب ذکرشده، پژوهش مروری حاضر با هدف بررسی تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب (rhGH) و چالش های پیش رو انجام گرفت.

میزبان‌های مختلف استفاده‌شده در تولید هورمون نوترکیب

همان طور که عنوان شد، تولید هورمون رشد نوترکیب اولین‌بار توسط *گودِل* و همکاران در سال ۱۹۷۹ به‌وسیله باکتری *اشریشیاکلی* انجام گرفت[15]. علاوه بر *اشریشیاکلی*، میزبان‌های بیانی دیگری مانند *باسیلوس‌سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) [22-24] یوکاریوت‌ها مانند *ساکارومایسس‌سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*، مخمر متیلوتروپیک *پیکیاپاستوریس* (*Pichia pastoris*) با توانایی انجام تغییرات بعد از ترجمه و ظرفیت ترشح بالا[19, 26-29]، نژادهای نوترکیب سودوموناس (Pseudomonas) [23, 25, 30]، سلول‌های پستانداران مانند سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO) [31] و باکلوویروس‌ها[32] برای تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به نظر می‌رسد سلول‌های پستانداران، مناسب‌ترین میزبان برای زیست‌ساخت هورمون رشد انسانی نوترکیب باشد[31]. حدود ۶۰ تا ۷۰% پروتئین‌های دارویی نوترکیب در سلول‌های پستانداران تولید شده‌اند[33]. علی‌رغم فراوانی رده‌های سلولی در دسترس، امروزه حدود ۷۰% پروتئین‌های درمانی نوترکیب توسط سلول‌های CHO ساخته شده‌اند. البته رده‌های سلولی دیگری مانند رده سلولی مشتق‌شده از ملانومای موشی (NSO) ، کلیه کودک همستر (BHK)، کلیه جنین انسان (HEK-293) و سلول‌های شبکیه انسان نیز در این زمینه کاربرد دارند[34].

ویژگی‌هایی که سلول‌های CHO را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی مناسب می‌کند، عبارت از توانایی کشت به‌حالت معلق در تراکم بالا به‌جای حالت چسبیده، قابلیت اصلاحات ژنتیک (به‌گونه‌ای که اجازه ورود و بیان DNA خارجی را داده و به‌میزان زیادی پروتئین خارجی را بیان می‌کند)، قابلیت تولید پروتئین به‌صورت گلیکوزیله، انجام اصلاحات پس از ترجمه (برای فعالیت زیستی پروتئین لازم است) و ایمن‌بودن سلول‌ها به‌گونه‌ای که هیچ ماده سمی اضافی به پروتئین تولیدشده نمی‌افزاید، است. از طرف دیگر در مطالعه‌ای مشخص شده است که ۴۴ ویروس بیماری‌زای انسانی که انواع مهم آن عبارت از HIV، آنفلوآنزا، فلج اطفال، سرخک و هرپس، قابلیت همانندسازی در این رده سلولی را ندارند. براساس موارد گفته‌شده و تجربیات به‌دست‌آمده طی دو دهه اخیر، آزمایشات ایمنی سازمان بهداشت جهانی، پروتئین‌های درمانی تولیدشده توسط این رده سلولی را تایید می‌کند، به‌صورتی که امروزه فروش سالانه محصولات تولیدشده توسط سلول‌های CHO به بیش از ۳۰میلیارد دلار در سرتاسر جهان رسیده است[33]. اما به‌علت مشکل‌بودن استقرار و حفظ ثبات سلول‌های نوترکیب پستاندار و نیز بازده کم، این سلول‌ها سیستم‌های جذابی برای تولید هورمون رشد انسانی نبوده‌اند. باتوجه به محدودیت سلول‌های CHO و نیز مزایای باکتری *اشریشیاکلی*، اغلب برای تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب از این باکتری استفاده شده است. در واقع به‌علت اینکه هورمون رشد انسانی غیرگلیکوزیله است و نیاز به تغییرات پس از ترجمه مثل گلیکوزیله‌شدن ندارد، سیستم‌های بیانی پروکاریوتی از قبیل *اشریشیاکلی* به‌منظور تولید این هورمون ترجیح داده می‌شوند[15, 35-38].

تاکنون در پژوهش‌های زیادی از *اشریشیاکلی* برای بیان این هورمون استفاده شده است[4, 12, 13, 15, 35-51]. در این پژوهش‌ها، تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در محیط کشت، به‌عنوان اجسام توده‌ای در سیتوپلاسم و در فضای پری‌پلاسمیک *اشریشیاکلی* مورد مطالعه قرار گرفته است. یکی از مسایلی که در بیان هورمون رشد انسانی نوترکیب در *اشریشیاکلی* با آن مواجه می‌شویم، وجود اسیدآمینه متیونین در ابتدای پروتئین است. مشابه دیگر پروتئین‌های ترشحی یوکاریوتی، هورمون رشد به‌طور طبیعی فاقد فرمیل‌متیونین در انتهای آمین خود است، اما هنگامی که این پروتئین‌ها در سیتوپلاسم باکتری تولید می‌شوند، معمولاً فرمیل‌متیونین را در انتهای آمین خود نگه می‌دارند[10]. اسیدآمینه متیونین سمت پایانه آمین هورمون رشد انسانی (Met-hGH) وhGH که به‌ترتیب در سیتوپلاسم و فضای پری‌پلاسمی (فضای میان غشا و دیواره سلولی) *اشریشیاکلی* ترشح می‌شوند، برای استفاده بالینی به‌طور گسترده‌ای در دسترس هستند. هر دو شکل دارای فعالیت درمانی بوده که معادل پروتئین مشتق‌شده از غده هیپوفیز هستند[17, 38].

گزارش شده است که اسیدآمینه متیونین در سمت پایانه آمین هورمون رشد انسانی نوترکیب (Met-rhGH) ممکن است در تولید آنتی‌بادی در بیمارانی که با هورمون رشد درمان می‌شوند، نقش داشته باشد[52]. برای غلبه بر این مشکل، چندین روش مورد استفاده قرار گرفته است که شامل ترشح هورمون[30, 53, 54] و حذف آنزیمی قسمت اضافی ملحق‌شده به سمت آمین انتهایی است[23]. یک راه حل برای حذف فرمیل‌متیونین انتهای آمین از پروتئین بالغ، ترشح پروتئین به فضای پری‌پلاسمی باکتری میزبان با استفاده از یک پپتید پیام‌رسان مناسب است. به‌طور مثال در مطالعه‌ای، بیان پری‌پلاسمی rhGH در سیستم بیانی *اشریشیاکلی* القاشده با گالاکتوپیرانوزید (IPTG) و لاکتوز مجهز به سیگنال پپتید pelB گزارش شده است[55]. در مطالعه دیگری بیان پری‌پلاسمی هورمون رشد انسانی در مخمر با استفاده از یک سیگنال پپتید مصنوعی به دست آمده است[56]. همچنین مشخص شده است که متیونین انتهای آمین در پروتئین‌های طبیعی که اسیدآمینه دوم آنها آرژنین، آسپاراژین، گلوتامین، ایزولوسین، لوسین، لیزین یا متیونین است که رزیدیوی پنالتیمیت (Penultimate) نامیده می‌شوند دست‌نخورده باقی می‌ماند. در مقابل هنگامی که رزیدیوی پنالتیمیت، اسیدآمینه‌های آلانین، گلایسین یا ترئونین و والین است، متیونین آغازین به‌طور کارآمدی حذف می‌شود. در Met-rhGH، دومین اسیدآمینه فنیل‌آلانین است که نشان داده شده

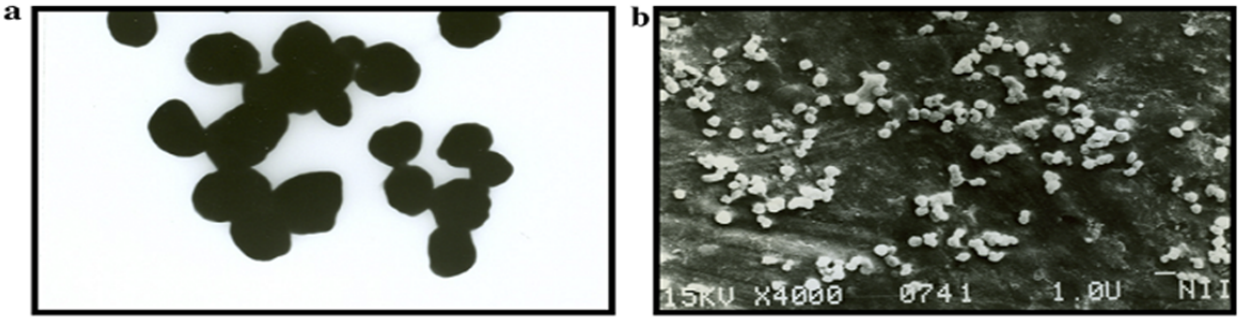
www.SID.ir

Archive of SID

است که روی حذف فرمیل‌متیونین موثر نیست[57]. همان طور که ذکر شد، در مطالعات مختلف بیان هورمون رشد انسانی نوترکیب در محیط کشت در سیتوپلاسم سلولی و در فضای پری‌پلاسمیک سلولی مورد مطالعه قرار گرفته است که هر کدام در مرحله بیان و تخلیص مسایل و مزایا و معایب خاص خود را دارند که در پژوهش حاضر به آن پرداخته شد.

بیان سیتوپلاسمی

در باکتری *اشریشیاکلی* که در تولید پروتئین‌های نوترکیب بسیار مورد استفاده قرار گرفته است، در اکثر موارد بیش‌بیان یک پروتئین نوترکیب، باعث تجمع و انباشتگی پروتئین‌های تاحدی تاخورده به‌صورت توده‌های درون‌سلولی می‌شود[47]. در بیان سیتوپلاسمی، تشکیل اجسام توده‌ای، بیان ژن در سیتوزول را دچار اختلال می‌کند[58]. تشکیل این توده‌های پروتئینی به‌طور کلی به بیش‌بیان پروتئین‌ها در سلول‌هایی که فاقد عناصر لازم (از جمله چاپرون‌ها) برای تاخوردن پروتئین‌ها به‌شکل طبیعی هستند، نسبت داده می‌شود. البته پروتئین‌های خود باکتری نیز هنگامی که بیش‌بیان می‌شوند، به‌صورت اجسام توده‌ای تجمع پیدا می‌کنند[39]. تشکیل این اجسام سبب اختلال در تولید پروتئین‌های نوترکیب در فرم فعال زیستی و قابل حل در میزبان *اشریشیاکلی* می‌شود. ویژگی توده‌های پروتئینی در اجسام توده‌ای، وجود ساختار ثانویه مشابه فرم طبیعی پروتئین بیان‌شده و مقاومت آنها به تجزیه پروتئولیتیک است[39]. همچنین اندازه این توده‌ها از ۰/۵ تا ۰/۷میکرومتر متغیر بوده که به‌طور میانگین ۰/۶۴میکرومتر و با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و روبشی (SEM) به دست آمده و با دستگاه زتاسایزر مورد تایید قرار گرفته است[47] (شکل ۱).



شکل ۱) تصاویر اجسام توده‌ای rhGH خالص
a: تصویر اجسام توده‌ای rhGH خالص گرفته‌شده با میکروسکوپ TEM
b: تصویر اجسام توده‌ای rhGH گرفته‌شده با میکروسکوپ SEM

همین عامل، خالص‌سازی آنها از سلول را تسهیل می‌کند.

مشخص شده است که ارتباط‌های یونی و آب‌گریزی، نیروهای غالب مسئول تشکیل اجسام توده‌ای rhGH طی بیش‌بیان آنها در باکتری *اشریشیاکلی* هستند[39]. در پژوهشی، آنالیز آماری از ترکیب ۸۱ پروتئینی که برخی به‌شکل اجسام توده‌ای در *اشریشیاکلی* درمی‌آیند و برخی توده‌های پروتئینی را تولید نمی‌کنند، نشان داده است که ۶ پارامتر متوسط بار، بخش‌های سیستئین و پرولین، آب‌دوستی، تعداد کلی اسیدآمینه‌ها و بخش‌های شامل رزیدیوهایی که ترن‌ها (Turn) را تشکیل می‌دهند، با تشکیل این اجسام مرتبط بوده است. دو پارامتر اول به‌شدت مرتبط با تشکیل اجسام توده‌ای هستند، در حالی که چهار پارامتر آخر، ارتباط ضعیفی را نشان می‌دهند. این یافته‌ها برای ایجاد یک مدل برای پیش‌بینی احتمال تشکیل اجسام توده‌ای منحصراً بر پایه ترکیب اسیدآمینه‌ای یک پروتئین استفاده می‌شود[59, 58]. همچنین به‌دلیل شرایط احیایی سیتوزول باکتریایی در حالت طبیعی، باندهای دی‌سولفیدی تشکیل نشده و بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که تجمع هورمون به‌علت باندهای دی‌سولفیدی نبوده است[39]. از این رو به‌دلیل محیط احیایی سیتوزول باکتری، تشکیل توده‌های تجمعی پروتئین‌های دارای باند دی‌سولفیدی در این محیط‌ها مورد انتظار است. بنابراین پروتئین‌های پستانداران که ساختار پیچیده سوم آنها به تشکیل باندهای دی‌سولفیدی وابسته است، ممکن نیست در ساختار سه‌بُعدی (فضایی) صحیح خودشان در سیتوپلاسم باکتریایی تولید شوند[58]. همچنین از آنجایی که هورمون رشد نوترکیب الیگومر نمی‌تواند در حضور عوامل احیایی قوی مثل بتامرکاپتواتانول یا گلوتاتیون به مونومر تجزیه شود، می‌توان نتیجه گرفت که هیچ باند کوالان دی‌سولفیدی مسئول تشکیل الیگومر در اجسام توده‌ای هورمون نیست. وجود باندهای کوالان غیردی‌سولفیدی در الیگومرها از طریق مطالعات طیف‌سنجی رامان گزارش شده است[39, 60]. همچنین علی‌رغم حضور دو باند دی‌سولفیدی در rhGH، تجمع وسیع پروتئین طی تاخوردن مجدد به‌علت تشکیل باند دی‌سولفیدی نادرست مشاهده نشده بود که ممکن است به‌علت قرارگرفتن در معرض اکسیداسیون کافی هوا طی فرآیند تخلیص باشد و نشان می‌دهد که اکسیداسیون هوا اثر زیادی روی بازآرایش باندهای دی‌سولفیدی داشته است[39].

چندین روش برای به‌حداقل‌رساندن تشکیل اجسام توده‌ای و بهبود تاخوردن صحیح پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به رشد کشت‌های باکتریایی در دمای پایین‌تر، انتخاب نژادهای مختلف از *اشریشیاکلی*، جایگزینی اسیدآمینه‌های انتخابی، تولید همزمان چاپرون‌ها، استفاده از تیوردوکسین *اشریشیاکلی* به‌عنوان یک قطعه اتصالی یا تولید همزمان با پروتئین مورد نظر، رشد و القای سلول‌های تحت استرس‌های اسمزی در حضور سوربیتول و گلایسیل بتائین، اضافه‌کردن قندهای غیرقابل تخمیر به محیط کشت، تغییر pH محیط کشت و استفاده از سویه‌های دارای نقص تیوردوکسین‌ردوکتاز اشاره کرد[58].

ریکاوری پروتئین مورد نظر از اجسام توده‌ای

ریکاوری پروتئین فعال از اجسام توده‌ای طی چند مرحله شامل جداسازی این توده‌ها، محلول‌سازی، تاخوردگی مجدد و تخلیص انجام می‌گیرد[47]. تشکیل این اجسام، سبب جداسازی آسان می‌شود و ریکاوری پروتئین‌های بیان‌شده را در شکل دناتوره تسهیل می‌کند[39]. در تولید rhGH، از آنجایی که اجسام توده‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

غالباً حاوی هورمون رشد هستند، محلول‌سازی و ریفولدینگ قبل از تخلیص انجام می‌گیرد و میزان ریکاوری پروتئین به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر کارآیی این مراحل قبل از تخلیص است[50]. در بعضی از موارد، بازده کلی پروتئین فعال از این توده‌های پروتئینی بسیار پایین بوده است و این فرآیندهای خالص‌سازی اغلب پرهزینه و وقت‌گیر هستند. بنابراین تلاش‌های بسیاری برای افزایش کارآیی محلول‌سازی و ریفولدینگ به‌عنوان یک روش برای بهبود ریکاوری کلی rhGH فعال از اجسام توده‌ای انجام گرفته است[50, 61-63].

محلول‌سازی: عموماً پروتئین‌های بیان‌شده به‌صورت اجسام توده‌ای به‌وسیله استفاده از غلظت‌های بالای حلال‌های کائوتروپیک، محلول‌سازی می‌شوند. عوامل کائوتروپیک از قبیل اوره، گوانیدین‌هیدروکلراید (Gdn-HCl) و نمک‌های تیوسیانات [39, 47, 64, 65]، دترجنت‌ها (شوینده‌های مصنوعی) از قبیل سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS)، ان- ستیل‌تری‌متیل‌آمونیوم‌بروماید (CTAB) و ان- لوریل‌سارکوزین‌سدیم (NLS) همراه با عوامل احیایی مانند بتامرکاپتواتانول، دی‌تیوتریتول یا سیستئین به‌طور گسترده‌ای برای محلول‌سازی پروتئین‌های اجسام توده‌ای استفاده می‌شوند[39]. همچنین به‌طور گسترده‌ای گزارش شده است که اجسام توده‌ای هورمون رشد بیان‌شده در *اشریشیاکلی* به‌وسیله pH قلیایی می‌تواند محلول‌سازی شود[4, 39, 66]. این تغییر pH تغییر در توزیع بار در مولکول پروتئین‌ها را ایجاد می‌کند که عموماً پایداری آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و ممکن است به بازشدن پروتئین‌های طبیعی منجر شود، اما در مورد هورمون رشد انسانی به نظر نمی‌رسد که هیچ نشانه‌ای از بازشدن تاخوردگی عمومی ساختار ثانویه دیده شود. همچنین در پژوهشی مشخص شده است که بازشدن تاخوردگی متاثر از pH برای پروتئین مشابه هورمون رشد انسانی (هورمون رشد گاوی) برگشت‌پذیر بوده است[39].

pH خیلی قلیایی (بالای ۱۲/۵) با اینکه به محلول‌سازی rhGH از توده‌های پروتئینی کمک می‌کند، اما باعث تخریب وسیعی در هورمون رشد می‌شود[39]. مشخص شده است که ازبین‌رفتن ساختار ثانویه طی محلول‌سازی در غلظت بالای دناتورانت‌ها (اوره ۸مولار یا گوانیدین‌هیدروکلراید ۶مولار) و واکنش در میان مولکول‌های پروتئینی دناتوره‌شده منجر به تشکیل توده‌هایی می‌شود که بررسی‌ها نشان داده‌اند، این اتفاق عامل اصلی ریکاوری پایین پروتئین‌های فعال از اجسام توده‌ای است[39, 47, 67].

برای حل این مشکل، دناتوراسیون ملایم (pH=۱۲/۵ همراه با اوره ۲مولار) به‌طور گسترده‌ای برای محلول‌سازی و ریفولدینگ پروتئین‌های این توده‌ها استفاده شده است[39, 47, 62]. این محلول‌سازی ملایم، اساساً ساختار ثانویه مشابه حالت طبیعی را در پروتئین‌ها حفظ و به کاهش تجمعات آنها طی ریفولدینگ کمک می‌کند[47, 66]. گزارش شده است که در این مقادیر pH و غلظت اوره، محلول‌سازی بالاتر هورمون رشد مشاهده شده است و اضافه‌کردن اوره بیشتر به محلول‌سازی مقدار بیشتری از هورمون کمکی نکرده است. افزایش محلول‌سازی هورمون در بافر ذکرشده می‌تواند هم در اثر اوره و هم pH باشد که نشان‌دهنده وجود هر دو اینتراکشن‌های یونی و هیدروفوبی در اجسام توده‌ای است. از آنجایی که پروتئین‌ها نمی‌توانند در این غلظت پایین از اوره دناتوره شوند، اوره احتمالاً فقط در جداسازی فیزیکی مولکول‌ها به‌وسیله مختل‌کردن ارتباط‌های آب‌گریز عمل می‌کند[39]. غلظت پایین دناتورانت (اوره۲مولار) به کاهش تشکیل ساختارهای رندوم‌کویل طی محلول‌سازی منجر شده و بنابراین به بازده بالاتر ریفولدینگ کمک می‌کند[48]، در نتیجه هورمون رشد از اجسام توده‌ای بدون مختل‌شدن ساختار ثانویه طبیعی خود محلول‌سازی می‌شود. این موضوع با آنالیز هورمون محلول‌سازی‌شده در pH برابر با ۱۲/۵ حاوی اوره ۲مولار به‌وسیله طیف‌سنجی فلورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی (CD) مورد تایید قرار گرفته است[39].

در پژوهشی محلول‌سازی هورمون در pH برابر با ۱۲/۵ حاوی اوره ۲مولار با بافرهای دیگر حاوی ۱% SDS، ۱% CTAB، ۸مولار اوره و ۶مولار گوانیدین‌هیدروکلراید در pH برابر با ۸، مورد مقایسه قرار گرفته است و مشخص شده که محلول‌سازی هورمون رشد به مقدار مشابهی انجام شده است. ماکزیمم محلول‌سازی در بافر تریس حاوی دترجنت یونی ۱% SDS مشاهده شده است که می‌تواند به‌علت خصوصیت یونی SDS باشد که به یونیزاسیون پروتئین‌ها و در نتیجه محلول‌سازی هورمون رشد کمک می‌کند. محلول‌سازی با کمک CTAB ساختار ثانویه پروتئین بیان‌شده را به‌حالت اول برمی‌گرداند[68]، اما استفاده از آن به‌علت نیاز به شست‌وشوی زیاد و مراحل اضافی کروماتوگرافی برای حذف CTAB از مخلوط پروتئین اجتناب می‌شود. به‌طور مشابه، SDS دترجنتی است که به پروتئین، اتصال محکمی می‌یابد و به شست‌وشوی بیشتری برای حذف کامل این دترجنت از محلول پروتئینی نیاز است. بالابودن محلول‌سازی هورمون از اجسام توده‌ای در همه بافرهای ذکرشده در بالا نشان داد که اینتراکشن‌های هیدروفوبی، احتمالاً غالب‌ترین نیرو برای تجمع پروتئین‌ها طی بیش‌بیان پروتئین‌ها است، اما حضور پیوندهای یونی یا کوالان در تشکیل و ثبات اجسام توده‌ای را نمی‌توان نادیده گرفت[39]. همچنین مشخص شده است که بیان هورمون در *اشریشیاکلی* همیشه با تشکیل دایمر و الیگومر همراه بوده است که در اجسام توده‌ای حضور دارند. جداسازی rhGH در pH قلیایی همیشه همراه با حضور دایمر بوده (۴۴کیلودالتون در SDS-PAGE) که در حدود ۸-۵% از کل این توده‌ها است و می‌توان با تکنیک‌های کروماتوگرافی آنها را جداسازی کرد. در مطالعه‌ای اجسام توده‌ای محلول‌سازی‌شده در تریس ۱۰۰میلی‌مولار در pH برابر با ۱۲/۵، حاوی اوره ۲مولار با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی و کروماتوگرافی توسط ژل بیشتر، خالص‌سازی و دایمرها و الیگومرها به‌وسیله کروماتوگرافی توسط ژل حذف شدند[39].

ریفولدکردن پروتئین

زمانی که اجسام توده‌ای محلول‌سازی شدند، مرحله بعدی ریفولدکردن پروتئین‌ها است. پروتئین‌های محلول‌شده بعد از اینکه عوامل کائوتروپیک یا دیگر نمک‌ها به‌وسیله دیالیزکردن پروتئین‌ها در بافرهای حاوی عوامل احیاکننده و اکسیدکننده حذف می‌شوند[69] یا رقیق‌سازی انجام می‌گیرد، دوباره به‌شکل طبیعی تا می‌خورند. اغلب، افزودنی‌هایی مثل استون، استوآمید، اوره، دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) و پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) برای افزایش بازده تاخوردن پروتئین‌های فعال مورد استفاده قرار می‌گیرند[70]. برای جلوگیری از تجمع، پروتئین‌ها عموماً در غلظت‌های بسیار پایین ریفولد می‌شوند. این مطلب سبب افزایش زمان فرآیند خالص‌سازی پروتئین ریفولدشده می‌شود. در حقیقت، هزینه اصلی ریفولدینگ اجسام توده‌ای، مربوط به ریفولدینگ پروتئین در غلظت‌های کم پروتئین است[47]. برای فایق‌آمدن بر این مشکل، روش‌های جدیدی برای ریفولدینگ و خالص‌سازی پروتئین‌های حل‌شده مورد بررسی قرار گرفته‌اند[47, 71]. علی‌رغم وجود چندین پروتکل استاندارد برای محلول‌سازی و ریفولدینگ پروتئین‌ها، اغلب ریکاوری پروتئین‌های فعال زیستی از اجسام توده‌ای، خیلی کم است.

www.SID.ir

Archive of SID

ترشح در فضای پری‌پلاسمی

ترشح rhGH بیان‌شده به فضای پری‌پلاسمی در مقایسه با بیان سیتوپلاسمی دارای چندین مزیت زیر است:

۱- فضای پری‌پلاسم فقط ۴% از پروتئین سلولی[58] یا تقریباً ۱۰۰ پروتئین[72] را دارا است، به همین دلیل پروتئین هدف به‌طور موثری در این فضا متمرکز می‌شود و تخلیص آن به‌طور قابل توجهی ساده‌تر است.

۲- محیط اکسیدکننده فضای پری‌پلاسمی، فولدینگ پروتئین‌ها را تسهیل می‌کند. دی‌سولفیداکسیدوردوکتازها و ایزومرازهای مستقر در پری‌پلاسم *اشریشیاکلی*، تشکیل باندهای دی‌سولفیدی را کاتالیز می‌کنند که تاخوردگی صحیح را موجب می‌شوند. به این دلیل فضای پری‌پلاسم مکان ایده‌آلی برای بیان برخی از پروتئین‌ها با خاصیت درمانی است[73].

۳- شکستن "*در بدن موجود زنده*" سیگنال پپتید طی انتقال به پری‌پلاسم به‌احتمال زیاد به پروتئین با انتهای آمینی صحیح منتج می‌شود.

۴- تجزیه پروتئین در پری‌پلاسم کمتر اتفاق می‌افتد[58].

۵- همچنین ساده‌سازی مراحل پایین‌دستی تولید پروتئین، جداسازی از پروتئین‌های سیتوپلاسمی خصوصاً پروتئازها و همچنین تغلیظ پروتئین‌های نوترکیب در یک محیط اکسایشی که برای تشکیل باندهای دی‌سولفیدی و ریفولدینگ پروتئین و نهایتاً برای ایجاد ساختار فعال زیستی مناسب است، از جمله مزایای دیگر ترشح در فضای پری‌پلاسمی است[42].

گزارش‌هایی در مورد بیان پری‌پلاسمی هورمون رشد انسانی نوترکیب وجود داشته است[12, 13, 35, 41, 51, 74, 75]. انتقال یک پروتئین از غشای داخلی به پری‌پلاسم به‌طور معمول نیازمند یک سیگنال پپتید است[58]. سیگنال پپتیدهای مختلفی به‌طور موفقیت‌آمیزی در *اشریشیاکلی*، برای انتقال پروتئین به پری‌پلاسم مورد استفاده قرار گرفته است که شامل سیگنال پپتیدهای پروکاریوتی مانند سیگنال پپتید آلکالین‌فسفات (PhoA)، OmpA، OmpT، LamB and OmpF، β-lactamase، اینتروتوکسین LT-A, LT-B و ST-II در *اشریشیاکلی*، پروتئین A از *استافیلوکوکوس‌اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، اندوگلوکاناز از *باسیلوس‌سوبتیلیس*، PelB از *اروینیاکاروتوورا* (*Erwinia carotovora*) و ریبونوکلئاز (RNase) موش می‌شود[58]. انتقال پروتئین به پری‌پلاسم باکتریایی یک فرآیند بسیار پیچیده است و حضور یک سیگنال پپتید همیشه موجب انتقال موثر از غشای درونی نمی‌شود. اکنون مشخص شده است که در کنار سیگنال پپتید، ویژگی‌های ساختاری دیگری در پروتئین‌ها در انتقال از غشا موثر هستند[58]. فرآیند تخلیص rhGH ترشح‌شده در فضای پری‌پلاسمی باکتریایی شامل ریکاوری پروتئین مورد نظر و حذف ناخالصی پروتئین میزبان است[76]. هورمونی که به پری‌پلاسم انتقال می‌یابد، می‌تواند به‌آسانی در شکل طبیعی خود به‌وسیله اختلال در غشای بیرونی *اشریشیاکلی* جداسازی شود که به کاهش مراحل، پیچیدگی و زمان فرآیند تخلیص منتهی می‌شود.

ترشح در محیط کشت

پروتئین‌های سنتزشده در صورتی که به‌درون محیط کشت ترشح شوند، مزایای قابل توجهی دارند. ساده‌ترشدن تخلیص، حداقل پروتئولیزشدن، بهبود فولدینگ پروتئین و صحت پایانه آمین پروتئین از جمله این مزایا است[58]، اما معمولاً ترشح پروتئین‌های سنتزشده به‌درون محیط کشت اتفاق نمی‌افتد. در باکتری *اشریشیاکلی* به‌طور معمول پروتئین‌های خیلی کمی ترشح می‌شوند و دستکاری مسیرهای انتقال برای تسهیل ترشح پروتئین‌های بیگانه، هنوز به‌عنوان یک کار دشوار باقی مانده است[77]. در نتیجه برای درک مشکلات درگیر در ترشح پروتئین‌ها، فهمی از مسیرهای ترشحی در *اشریشیاکلی* ضروری است[58]. برای ترشح پروتئین در *اشریشیاکلی* می‌توان از روش‌هایی استفاده کرد که می‌تواند در دو گروه بهبود مسیرهای موجود درگیر در ترشح پروتئین‌های ترشحی[78] و استفاده از توالی سیگنال، قطعات اتصالی، پروتئین‌های دارای خاصیت نفوذپذیری و موادی که روی ترشح پروتئین تاثیر می‌گذارند یا سبب نفوذپذیری غشا می‌شوند، تقسیم‌بندی شوند[58].

از استراتژی‌های مختلفی برای ترشح پروتئین‌ها به محیط کشت استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به اتصال پروتئین به پروتئین‌هایی که به‌طور معمول ترشح می‌شوند، بیان همزمان ژن *kil* برای نفوذپذیرکردن غشا نسبت به پروتئین مورد نظر، اتصال به ترکیبات ژن *OmpF*، استفاده از توالی سیگنال *OmpA*، استفاده از توالی سیگنال پروتئین A، استفاده از توالی سیگنال فاکتور آلفای مخمر *ساکارومایسس‌سرویزیه*، استفاده از گلایسین در محیط، قطعات اتصالی، بیان همزمان با پروتئین آزادکننده باکتریوسین و استفاده از گلایسین و پروتئین آزادکننده باکتریوسین را نام برد[58]. همچنین در این روش پروتئین در محیط کشت رقیق می‌شود و تخلیص آن مشکلاتی را ایجاد می‌کند که از کروماتوگرافی تمایلی و تغلیظ می‌توان برای تخلیص آن استفاده کرد[58].

تولید هورمون در سلول‌های CHO به‌عنوان یک جایگزین برای تولید در *اشریشیاکلی* محسوب می‌شود. این موجود دارای این مزیت است که هورمون، به محیط کشت عاری از پروتئین ترشح و خالص‌سازی آن تسهیل شده و دیگر به مراحل محلول‌سازی اجسام توده‌ای و ریفولدینگ پروتئین‌ها نیازی نیست[31]. همچنین تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در مخمر *پیکیاپاستوریس* نیز انجام گرفته است که به‌دلیل تولید بالای آن، سطح ترشح کارآمد و درجه بالایی از تخلیص در محیط کشت، سیستم مفیدی برای تولید rhGH است. استفاده از این مخمر، مراحل مورد نیاز برای تخلیص را کاهش داده و عدم وجود اندوتوکسین‌ها باعث شده است که از این مخمر در تولید rhGH برای اهداف درمانی استفاده شود[19].

خالص‌سازی

در تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع و به‌طور خاص تولید سوماتروپین انسانی، مرحله خالص‌سازی که شامل جداسازی آنها از ترکیبات غیرپروتئینی و نهایتاً خالص‌سازی آنها از دیگر پروتئین‌های غیرهدف است، پرهزینه‌ترین مرحله به شمار می‌رود[76]. از این رو یک طراحی مطلوب به‌منظور داشتن بالاترین میزان ریکاوری پروتئین هدف همراه با حذف همه آلودگی‌ها از محصول نهایی مورد نیاز است. هدف نهایی تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب، استفاده از آن برای اهداف درمانی است و این نکته حایز اهمیت است که به خلوص بالای ۹۹% برسد. جداسازی و تخلیص پروتئین‌های درمانی از محیط، به‌اندازه تولید آنها بااهمیت است. از آنجایی که فرآیندهای تخلیص ۵۰ تا ۸۰% هزینه تولید محصولات درمانی را شامل می‌شود، کاهش تعداد مراحل خالص‌سازی، افزایش بازدهی و خلوص محصول در هر مرحله به‌طور کارآمدی هزینه‌های تولید را کاهش خواهد داد.

www.SID.ir

Archive of SID

آلودگی‌ها و ناخالصی‌ها

محصولات فعال زیستی برای کاربردهای درمانی که از منابع میکروبی به دست می‌آیند، باید به‌طور قابل ملاحظه‌ای عاری از آلودگی‌ها و ناخالصی‌ها باشند[40]، بنابراین یک برنامه تخلیص مناسب مورد نیاز است تا علاوه بر حداکثر ریکاوری پروتئین هدف، حذف همه آلودگی‌ها از محصول نهایی را تامین کند. ناخالصی‌های هورمون رشد انسانی نوترکیب ترشح‌شده در فضای پری‌پلاسمیک *اشریشیاکلی*، شامل فرم‌های مختلف مرتبط با rhGH از قبیل مشتقات پلیمرها، سولفوکسیدها و دزامیدوها، اندوتوکسین‌های باکتریایی، پروتئین‌های سلول میزبان (ECP)، آنتی‌بیوتیک و DNA باکتریایی است[76]. برای سوماتروپین‌هایی که قابلیت استفاده با کاربردهای درمانی انسان هستند، باید حضور این آلودگی‌ها در حد معینی نگه داشته شود (۶% برای دایمرها و فرم‌های با جرم مولکولی بالا، ۱۳% برای مشتقات دآمیده‌شده و مشتقات متیونین‌سولفوکساید، ۵ واحد اندوتوکسین (EU) در میلی‌گرم محصول، ۱۰ قسمت در میلیون (وزنی/وزنی، ppm) برای ECP، سطوح غیرقابل تشخیص تتراسیکلین و DNA) [76]. در واقع کاهش ECP سخت‌ترین کار در خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب به‌منظور استفاده در کاربردهای درمانی است[79-82]. در تحقیقاتی که برای خالص‌سازی هورمون رشد انسانی انجام گرفته است، بسیاری از آنها گزارشی در مورد عملکرد خلوص rhGH همراه با کاهش آلودگی‌های ECP مطرح نکرده‌اند[76]. *دی‌الیویرا* و همکاران در سال ۱۹۹۹، یک فرآیند شش‌مرحله‌ای از روش خالص‌سازی با بازده بالا برای آماده‌سازی گرید بالینی هورمون رشد انسانی نوترکیب ترشح‌شده در فضای پری‌پلاسمی باکتریایی را شرح داده‌اند. آنها روی بازده ریکاوری هورمون و حداکثر حذف آلودگی‌های سلول میزبان متمرکز شده بودند. در این پژوهش، از یک مرحله رسوب‌گذاری و پنج مرحله کروماتوگرافی (شکستن با سولفات‌آمونیوم، ژل فیلتراسیون سفاکریل S-100، تعویض یونی DEAE- سفاروز جریان سریع، یک ژل فیلتراسیون سفاکریل S-100 بیشتر و کروماتوگرافی‌های برهم‌کنش هیدروفوبی فنیل-سفاروز CL4B و کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارآیی بالا (HPSEC) استفاده کرده‌اند و بعد از هر مرحله کروماتوگرافی، سنجش ایمونورادیومتریک انجام شده است. در مطالعه ذکرشده، ریکاوری rhGH بالاتر از ۴۰% با غلظت آلودگی پروتئین‌های *اشریشیاکلی* زیر ۱۰ppm گزارش شده است[76]. در مطالعه‌های دیگر مثل پژوهش *فریکلاند* و همکاران و همچنین *فلاد*، کاهش ECP در حدود ۲۰ برابر (از بیشتر از ۲۰۰ppm تا کمتر از ۱۰ppm) را با اضافه‌کردن یک کروماتوگرافی تعویض یون و یک مرحله ته‌نشینی به برنامه خالص‌سازی سه مرحله‌ای اصلی‌شان گزارش کرده‌اند [79, 80].

همان‌گونه که اشاره شد، بعد از کشت در فرمانتور (دستگاهی است که شرایط بهینه را برای رشد میکروارگانیزم‌ها مثل قارچ و باکتری و مخمر فراهم می‌کند)، هورمون رشد در محیط فرمانتور همراه با تعدادی از محصولات دیگر از قبیل پروتئازها و دیگر پروتئین‌های میزبان، نمک‌ها و آمینواسیدها قرار می‌گیرد. اگر چه نمک‌زدایی و اولترافیلتراسیون با استفاده از غشاهای مناسب می‌تواند تعدادی از این ترکیبات محیط را حذف کند، اما دیگر روش‌های خالص‌سازی اکثراً بر پایه جداسازی تمایلی ضروری هستند. در خالص‌سازی rhGH عموماً ترکیبی از روش‌های کروماتوگرافی جذبی شامل تعویض یونی، برهم‌کنش هیدروفوبی و کلات فلزی با یک مرحله نهایی ژل فیلتراسیون برای سایزبندی و حذف توده‌ها انجام می‌گیرد[31]. همان‌گونه که عنوان شد، کاهش مراحل تخلیص در کم‌کردن هزینه‌های تولید بسیار موثر است، به همین دلیل کروماتوگرافی تمایلی به‌عنوان روشی که تعداد مراحل مورد نیاز برای خالص‌سازی را کاهش داده و بازده بالایی برای محصول ایجاد می‌کند، بسیار مورد توجه است[83]. همچنین خلوص بالا همراه با قابلیت اجرا در مقیاس وسیع و ریکاوری خوب همراه با تغلیظ پروتئین هدف از جمله مزایای دیگر کروماتوگرافی تمایلی است. برای استفاده از کروماتوگرافی تمایلی، موضوع مهم انتخاب لیگاند مناسب است و بایستی لیگاندی انتخاب شود که تمایل بالایی به مولکول هدف داشته باشد. از آنجایی که لیگاندها برای پروتئین‌های هدف بسیار انتخاب‌پذیر هستند، این فرآیند می‌تواند به‌آسانی برای جداکردن مقادیر کم پروتئین هدف حتی از مخلوط‌های پیچیده و بسیار زیاد مورد استفاده قرار گیرد[84]. تعدادی از یون‌های فلزی مثل Ni^{+2}، Cu^{+2}، Zn^{+2}، Co^{+2}، Ca^{+2}، Mg^{+2}و Fe^{+3} می‌تواند به‌عنوان لیگاند برای کروماتوگرافی تمایلی فلزی، مورد استفاده قرار گیرد. *اوئدا* و همکاران در سال ۲۰۰۳ از Ni^{+2} برای تخلیص پرولاکتین انسانی نوترکیب استفاده کرده‌اند[85]. *گوپتا* و همکاران در سال ۲۰۰۳ مقایسه‌ای در مورد اثر یون‌های مختلف فلزی روی تخلیص هورمون رشد نوترکیب گوسفندی انجام داده‌اند و بازده بالاتر ۸۳% با Ni^{+2}، نسبت به بازده ۷۳/۵% با Cu^{+2} که به‌عنوان لیگاند استفاده شد، به دست آورده‌اند[86]. *لایسن* و همکاران در سال ۱۹۹۷ تاثیر تراکم لیگاند ثابت فلزی در کروماتوگرافی تمایلی را برای تخلیص rhGH بررسی کرده‌اند. در این مطالعه استفاده از کلات Cu(II)، تمایل بالایی را به rhGH نشان داده و بعد از یک مرحله، تخلیص ۸۰% خلوص حاصل شده است[87]. در مورد استفاده از برچسب هیستیدین مشخص شده است که یک تک‌هیستیدین برای اتصال به ستون Cu^{+2} به‌اندازه کافی خوب است، ولی باقی یون‌های فلزی، نیازمند توپوگرافی His-(X)n-His هستند. در مطالعه دیگری *سلیک* و همکاران در سال ۲۰۰۷، اریتروپوئیتین نوترکیب با برچسب پلی‌هیستیدین (His_6) را تولید کرده و برای خالص‌سازی این پروتئین از رزین‌های بر پایه Co^{+2} استفاده کرده‌اند. اگر چه این برچسب‌ها خلوص ویژه‌ای از پروتئین هدف را با ریکاوری بالا فراهم کرد، اما از آنجایی که اتصال‌ها قوی هستند، ممکن است شست‌وشوی زیادی نیاز باشد. علاوه بر این، حذف برچسب‌ها که درون ساختار پروتئین بیان شده‌اند، نیاز به مراحل اضافی‌تری دارد که ممکن است دوباره ساختار و ریکاوری پروتئین هدف را تحت تاثیر قرار دهد[88]. در یک محیط هیدروفیلی، اسیدآمینه‌های هیستیدین ۱۸ و ۲۱ در rhGH در معرض حلال قرار گرفته و بنابراین به‌وسیله لیگاندهای فلزی روی ستون تمایلی بیشتر قابل دسترس می‌شوند[31]. در مطالعه‌ای، rhGH، تمایل بالایی برای ستون جاذب باردار با مس را از خود نشان داده است[31, 89].

سیستمی که برای تخلیص هورمون رشد انسانی نوترکیب در مطالعات مختلف بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است، شامل استفاده از برچسب پلی‌هیستیدین (His tag) در سمت پایانه N یا C پروتئین هدف و یک مرحله خالص‌سازی پروتئین بیان‌شده در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی است[81, 90]. به‌علت اندازه کوچک His tag، این قطعه اسیدآمینه‌ای به‌طور ناچیزی ایمونوژنیک بوده و نیاز به جداسازی بعد از خالص‌سازی ندارد، همچنین برچسب His_6 به نظر نمی‌رسد که با عملکرد پروتئین rhGH سنتزشده تداخلی داشته باشد، به این دلیل که پروتئین

www.SID.ir

Archive of SID

تخلیص‌شده از لحاظ زیستی فعال است[81]. معمولاً قطعه هیستیدین در سمت پایانه کربونیل پروتئین نوترکیب قرار می‌گیرد تا نتواند با شروع ترجمه تداخلی ایجاد کند، اما در بعضی موارد اتصال His_6 در ترمینال C می‌تواند یک تغییر کنفورماسیونی در پروتئین ایجاد کند[81, 91]. اتصال هیستیدین به پایانه آمین پروتئین مورد نظر نیز گزارش شده است، اما در مورد پروتئین‌های ترشحی، تاکنون دنباله هیستیدینی را فقط در پایانه کربونیل اتصال داده‌اند. زیرا پایانه آمین به سیگنال پپتید اتصال می‌یابد که پروتئین را به سمت پری‌پلاسم یا شبکه آندوپلاسمی هدایت می‌کند[91]. به‌دلیل حضور بارهای مثبت روی آمینواسید هیستیدین در pH سیتوپلاسم، پیش‌بینی می‌شود که قرارگیری ساده رشته هیستیدین بین سیگنال پپتید و پروتئین بالغ می‌تواند مانع خروج پروتئین از سلول و شکستن صحیح سیگنال پپتید شود. با وجود این، اَشکال تحت شرایط خاص مثلاً وقتی اسیدکربوکسیلیک پایانه کربونیل با بخش پروتئینی ارتباط دارد، ممکن است ضروری باشد که رشته هیستیدین به پایانه آمین اتصال یابد[91]. در مجموع His_6 چه در سمت آمین و چه در سمت کربونیل می‌تواند باعث تولید کارآمد پروتئین‌ها شود[81, 90]. با اضافه‌کردن برچسب شش‌آمینواسیدی هیستیدین به توالی‌های پروتئین نه‌تنها می‌توان پروتئین‌ها را با استفاده از آنتی‌هیستیدین جداسازی کرد، بلکه می‌توان آنها را با استفاده از ستون نیکل در کروماتوگرافی تمایلی به‌راحتی و با خلوص بالا خالص‌سازی نمود[92, 93]. در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که هورمون رشد انسانی نوترکیب می‌تواند به‌طور کارآمدی همراه با His tag تولید شود، به‌سرعت به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی Ni^{+2} خالص‌سازی شود و پروتئین حاصله از لحاظ زیستی، فعال است[81]. بعد از بیان، عصاره سلولی روی کروماتوگرافی تمایلی فلزی که از قبل با یک یون فلزی شارژ شده است، قرار می‌گیرد. تحت شرایط خاص فقط پروتئین نوترکیب با هیستیدین مهندسی‌شده به ستون به‌واسطه واکنش با یون‌های فلزی می‌چسبد. شست‌وشوی پروتئین به‌وسیله یک لیگاند رقابتی مثل ایمیدازول یا به‌وسیله کاهش pH انجام می‌گیرد[91].

در پژوهشی برای تولید rhGH در باکتری *اشریشیاکلی* از توالی پنتاپپتیدی پایانه آمین فاکتور آلفای نکروزیس (مرگ سلولی) تومور انسانی (hTNF-α)، ۱۰ اسیدآمینه هیستیدین و محل برشی اینتروکیناز (Asp- Asp-Asp-Asp-Lys or D_4K) به‌عنوان یک توالی اتصالی به هورمون رشد استفاده شده است. TNF-α، سیتوکین‌پلیوتروپیک ۱۵۷اسیدآمینه‌ای با طیف وسیعی از عملکردهای زیستی از جمله فعالیت آنتی‌توموری است که بیان بالا و پایداری را در *اشریشیاکلی* نشان می‌دهد. به‌منظور افزایش سهم هورمون نسبت به TNF-α در پروتئین اتصالی، توالی پنتاپپتید پایانه آمین (PS-DKP) از TNF-α در این مطالعه استفاده شده است. پروتئین نامحلول به‌وسیله pH قلیایی محلول‌سازی و خالص‌سازی توسط کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام شد. بعد از شکسته‌شدن قطعه اتصالی به‌وسیله سایت برشی اینتروکیناز، هورمون رشد نوترکیب به‌وسیله یک مرحله کروماتوگرافی تعویض آنیونی با خلوص ۹۹% تخلیص شد. سهولت و سرعت این فرآیند به‌علاوه بهره‌وری بالا، آن را مناسب تولید rhGH در مقیاس بالا ساخته است. همچنین از این قطعه اتصالی می‌توان برای تولید دیگر پروتئین‌های مهم درمانی استفاده کرد. عنوان شده است که اندازه کوچک این قسمت اضافی ملحق‌شده به هورمون (۲۰اسیدآمینه‌ای) و باهم‌بودن مکان اتصال به فلز و سایت برشی بسیار ویژه آنزیمی، سبب بیان بالا می‌شود. قطعه اتصالی کوچک در مقایسه با سیستم‌های رایج دیگر از قبیل پروتئین A استافیلوکوکوس، بتاگالاکتوزیداز، پروتئین متصل‌شونده به مالتوز و تیوردوکسین دارای مزایا است، به‌صورتی که مشکل اصلی سیستم‌های رایج بالا در مورد پروتئین‌های کوچک است که قسمت امتزاجی قسمت عمده پروتئینی را شامل می‌شود که می‌تواند به‌شدت از نظر ایمنی مشکل‌ساز باشد، اما در قطعه اتصالی عنوان‌شده، اندازه قطعه (۲۰ اسیدآمینه) می‌تواند سهم پروتئین هدف را افزایش دهد، بهره‌وری بالایی ایجاد کند و به‌علت طبیعت آب‌دوستی، قطعه اتصالی ممکن است در معرض محیط حلال قرار گیرد و بنابراین بازده شکسته‌شدن توسط اینتروکیناز را بالا می‌برد. همچنین ۱۰ اسیدآمینه هیستیدین سبب تسهیل تخلیص پروتئین ترکیبی به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی فلزی با انتخاب‌پذیری بالا شده است[4] . در مطالعه‌ای دیگر *موخیجا* و همکاران در سال ۱۹۹۵ از پروتئین اتصالی حاوی برچسب هیستیدین استفاده کرد و سپس به‌وسیله یک مرحله کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از آگارز Ni^{+2}-NTA (اسیدنیتریلوتری‌استیک) خالص‌سازی هورمون را انجام داده‌اند[81]. در پژوهشی روی خالص‌سازی rhGH، *باترسبی* و همکاران در سال ۱۹۹۵ ترکیبی از کروماتوگرافی تمایلی (به‌صورتی که رسپتور پروتئین به‌عنوان لیگاند مورد استفاده قرار گرفت) و HPLC فاز معکوس را برای تخلیص rhGH استفاده کرده‌اند. با استفاده از این ترکیب، ۷۰% پروتئین با خلوص بالا ریکاوری شده است[94]. آپتامرها نیز از جمله لیگاندهایی هستند که می‌توانند برای خالص‌سازی پروتئین‌ها از مخلوط محیط کشت به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی مورد استفاده قرار گیرند. اخیراً *کالیک* و همکاران در سال ۲۰۱۰ یک توالی الیگونوکلئوتیدی (آپتامر) که تمایلی به سمت هورمون رشد انسانی نوترکیب دارد را معرفی کرده و تاثیرات زمان و pH روی اتصال آپتامر به rhGH را مورد بررسی قرار داده‌اند. بالاترین کارآیی اتصال در pH برابر با ۷ به دست آمد و قوی‌ترین تمایل در $85^{\circ}C$ مختل شد. همچنین با استفاده از آپتامر، خلوص ۹۹/۸% هورمون رشد همراه با ریکاوری ۴۱% به دست آمد[95].

نوع دیگری از کروماتوگرافی تمایلی، کروماتوگرافی ایمونوافینیتی (Immunoaffinity) است که فرآیندهای خالص‌سازی با کارآیی بالا را فراهم می‌کند، اما دارای مشکلاتی نظیر شسته‌شدن آنتی‌بادی‌های تمایلی از ماتریکس کروماتوگرافی و نیاز به تولید آنتی‌بادی مونوکلونال در گرید کلینیکی است[31]. علاوه بر مطالعات تخلیص هورمون رشد انسانی نوترکیب با استفاده از کروماتوگرافی، *خدابنده* و همکاران روشی را برای رسوب اسیدی (رسوب ایزوالکتریک) پروتئین‌های میزبان و دیگر ناخالصی‌ها در محیط فرمانتور ارایه داده‌اند. در حقیقت پروتئین‌ها در محلول‌ها به‌دلیل عواملی مثل pH، قدرت یونی، دما و خصوصیات الکترواستاتیک حلال تغییرات زیادی در حلالیت‌پذیری‌شان اتفاق می‌افتد. پروتئین‌ها در محلول‌ها، pHهای ایزوالکتریک مختلفی داشته‌اند و بنابراین می‌توان اغلب با استفاده از ته‌نشینی ایزوالکتریک، آنها را از یکدیگر جداسازی کرد[40]. pH اپتیمم بایستی برای هر دسته پروتئین تعیین شود که به فاکتورهایی از قبیل نسبت مونومرها به الیگومرها و مقدار پروتئین‌های میزبان در گونه‌های مختلف بستگی دارد[96]. بر پایه این موضوع تلاش‌هایی برای جداسازی هورمون رشد انسانی نوترکیبی که از نظر زیستی فعال باشد، از پروتئین‌های ریفولدشده به‌وسیله ته‌نشینی انتخابی ناخالصی‌های مربوط به میزبان همراه با هورمون دایمر و الیگومر انجام شده است[40]. در مطالعه‌ای که روی خالص‌سازی هورمون رشد انسانی نوترکیب در

www.SID.ir

Archive of SID

میزبان *اشریشیاکلی* انجام گرفته مشخص شده است که pH اپتیمم برای رسوب پروتئین‌های میزبان ۴/۹ است. نقطه ایزوالکتریک هورمون رشد نوترکیب به‌وسیله الکتروفورز ایزوالکتریک فوکوسینگ، ۵-۴/۹ تعیین شده است[40-46]. با این روش و در این pH، خالص‌سازی بیشتر از ۹۹% و ریکاوری حدود ۴۰% به دست آمده است و با استفاده از پلی‌آکریل‌آمید/سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS-PAGE) و آنالیز وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی در مقابل هورمون تولیدشده در خرگوش مورد تایید قرار گرفته است. همچنین از کروماتوگرافی غربال مولکولی برای تعیین نسبت مونومر، دایمر و الیگومرهای بالاتر استفاده شده است[40]. مونومرها و الیگومرهای هورمون رشد، نقاط ایزوالکتریک همپوشانی دارند[97] و ممکن است به‌وسیله رسوب انتخابی در یک محدوده باریک pH جدا شوند. نشان داده شده است که جداسازی موثر مونومرها از الیگومرها به‌وسیله رسوب امکان دارد[40].

در یکی از مطالعات گذشته، *سینگ* و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ستون‌های شعاعی (radial) و محوری (axial) کروماتوگرافی تعویض آنیونی برای مقایسه خلوص هورمون رشد انسانی نوترکیب تولیدشده در *اشریشیاکلی* در قالب اجسام توده‌ای استفاده کرده‌اند و مشخص شده است که کروماتوگرافی با ستون radial سریع‌تر و با نرخ خلوص بالاتر، ۴۲% ریکاوری هورمون خالص را نشان داده است[47]. در پژوهشی دیگر روی بیان هورمون رشد انسانی نوترکیب در سلول‌های پستانداران، از سلول‌های ترانسفورم کلیه میمون استفاده شده است. در این مطالعه ۴۸-۲۸% rhGH، از محیط کشت سلول‌های ترانسفورم کلیه میمون به دست آمده است. از آنجایی که ترشح پروتئین‌ها در محیط فرمانتور، اغلب در حجم بالایی از محیط سوپ با تولید در غلظت‌های کم محصول اتفاق می‌افتد، فیلتراسیون اولیه محیط سوپ برای حذف مواد نامحلول و تغلیظ محصول مورد نیاز است. در این مطالعه، کروماتوگرافی برهم‌کنش هیدروفوبی به‌عنوان اولین گام برای تغلیظ و تا حدی تخلیص rhGH از محیط فرمانتور از لاین سلولی کلیه میمون ترانسفورم‌شده مورد استفاده قرار گرفته است. تخلیص بیشتر rhGH به‌وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE- سفاروز و کروماتوگرافی توسط ژل به دست آمده است[98]. در مطالعه‌ای دیگر، تخلیص هورمون رشد انسانی نوترکیب از سوپ کشت سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) به‌وسیله الکتروفورز گرادی‌فلو (Gradiflow) به‌عنوان جایگزینی برای کروماتوگرافی‌های مرسوم انجام گرفته است[31]. فناوری گرادی‌فلو به حرکت الکتروفورزی پروتئین‌ها در یک میدان الکتریکی از غشای پلی‌آکریل‌امید نازک با اندازه منافذ مشخص برای جداسازی پروتئین‌ها بر پایه اندازه یا بار تحت شرایط طبیعی متکی است[99]. در این پژوهش با استفاده از بافر ۵۰میلی‌مولارتریس هپس (HEPES) در pH برابر با ۷/۵، جداسازی هورمون با خلوص ۹۸% و بازده ۹۰% حاصل شده است. این مطالعه نشان داده است که فناوری الکتروفورز گرادی‌فلو توانایی خالص‌سازی هورمون رشد را با سطح خلوص و بازده بالا داشته و همچنین پتانسیل تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب و دیگر پروتئین‌های درمانی در گرید بالینی را دارا است[31].

روش‌های آنالیز

مطالعات مختلفی در زمینه تولید نوترکیب هورمون رشد انسانی در میزبان‌های مختلف انجام گرفته است (جدول ۱).

از روش‌های آنالیزی مختلفی که برای بررسی صحت هورمون تولیدشده و تخلیص‌شده مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱- rhGH نمونه‌های کشت‌شده در فرمانتور با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-PAGE به دست می آید. سرم آلبومین گاوی، جداگانه روی هر ژل همراه با نمونه‌های کشت‌شده به‌عنوان استاندارد برای کمیت‌سنجی پروتئین لود می‌شود. باندهای پروتئین به‌وسیله یک اولتراسکن غلظت‌سنج لیزری اسکن می‌شود. با این آنالیز، درصد پروتئین نوترکیب در کل پروتئین سلولی تعیین می‌شود و مقدار تولید پروتئین نوترکیب از ارتباط بین غلظت آلبومین سرم گاوی و منطقه باند اندازه‌گیری‌شده به دست می‌آید[4, 19, 44, 48, 100, 104] و می‌توان نسبت هر پروتئین را به‌وسیله محاسبه منطقه زیر پیک‌ها به دست آورد[40]. غلظت‌سنج روبشی برای کمیت‌سنجی باندهای پروتئینی روی ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید رنگ‌شده با کوماسی‌بلو روش قابل اطمینانی بوده است[31, 48].

۲- حضور rhGH به‌وسیله روش وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی خاص علیه hGH تایید می‌شود[40, 44, 45, 46, 49].

۳- از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارآیی بالا (RP-HPLC) برای ارزیابی کمیت و کیفیت rhGH در مراحل خالص‌سازی استفاده می‌شود[31, 50, 76]. همچنین از این کروماتوگرافی برای جداسازی و کمیت‌سنجی پروتئین‌های تاخورده و تانخورده استفاده شده است[104].

۴- هضم rhGH و hGH تجاری به‌عنوان استاندارد به‌وسیله تریپسین انجام می‌گیرد و محصول هضم نمونه‌ها به‌وسیله HPLC فاز معکوس، جداسازی و با هم مقایسه می‌شوند[4, 37].

۵- به‌وسیله روش تهیه نقشه پپتید می‌توان صحت ساختار اولیه هورمون ترشح را نشان داد. همچنین با استفاده از آنالیز توالی پایانه آمین می‌توان فهمید که آیا فرآیند سنتز به‌درستی انجام شده است یا خیر[26, 37, 48].

۶- برای تعیین اندازه و نسبت مونومر، دایمر و الیگومرهای بالاتر هورمون، کروماتوگرافی غربال مولکولی مورد استفاده قرار گرفته است[40, 50, 51].

۷- از رزونانس پلاسمون سطحی و الیزا برای ارزیابی اتصال rhGH خالص‌شده و رسپتور آن می‌توان استفاده کرد[51] . همچنین از الیزا برای تعیین غلظت rhGH نمونه‌ها استفاده شده است[49] .

۸- در مطالعه‌ای از بیوآنالیزور ۲۱۰۰ (Agilent؛ ایالات متحده) برای آنالیز هورمون نوترکیب خالص‌سازی‌شده استفاده شده است که این وسیله نسل جدیدی از الکتروفورز کاپیلاری است که به‌علت نسبت جرم به بار ثابت و حضور ماتریکس پلیمری غربال‌گر در تراشه بیوآنالیزور، مولکول‌ها را بر پایه اندازه‌شان جداسازی می‌کند. داده‌ها در این وسیله در یک الکتروفروگرام به‌وسیله رسم شدت فلورسانس در مقابل زمان ماندگاری در ثانیه ارایه می‌شود[48].

۹- غلظت پروتئین به‌وسیله روش برادفورد تعیین می‌شود. سرم آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد استفاده و جذب در ۵۹۵نانومتر در پروتئین استاندارد و نمونه‌ها با اسپکتروفوتومتر خوانده می‌شود[19, 24].

۱۰- اسپکتروسکوپی جرمی به‌منظور تخمین وزن مولکولی rhGH مورد استفاده قرار گرفته است[4, 47, 50, 51].

۱۱- از آنالیزهای اسپکتروسکوپیک برای بررسی صحت هورمون رشد نوترکیب خالص‌شده استفاده می‌شود. برای مقایسه ساختار دوم و کنفورماسیون هورمون استاندارد و پروتئین نوترکیب خالص‌شده از

www.SID.ir

Archive of SID

طیف CD در ناحیه دور فرابنفش (UV) با کمک اسپکتروپولاریمتر استفاده شده است[37, 47, 48, 50, 104]. همچنین طیف UV و طیف نشری فلورسانس برای بررسی صحت پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد[39].

جدول ۱) نتایج پژوهش‌های مختلف در زمینه تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب

میزبان	مراحل و روش تخلیص	سیستم بیانی	میزان تولید
باکتری (*اشریشیاکلی*)	بردن پروتئین باقی‌مانده در سوپرناتانت روی کروماتوگرافی تمایلی نیکل؛ برش قطعه اضافی توسط اینتروکیناز[100]	سیتوپلاسمی	۱۵گرم بر لیتر هورمون رشد فیوژن
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی در اوره ۲مولار و pH برابر با ۱۲؛ تاخوردگی مجدد به‌وسیله رقیق‌سازی؛ کروماتوگرافی تعویض آنیونی و ژل فیلتراسیون[47]	سیتوپلاسمی	ریکاوری ۱۰۵میلی‌گرم پروتئین از ۲۵۰میلی‌گرم اینکلوژن بادی
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی در بافر تریس حاوی اوره ۲مولار و n- پروپانول ۶مولار؛ تاخوردگی مجدد به‌وسیله رقیق‌سازی؛ کروماتوگرافی تعویض یونی و ژل فیلتراسیون[101]	سیتوپلاسمی	بازیافت ۲۴میلی‌گرم هورمون از ۵۰میلی‌گرم اینکلوژن بادی
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی با بافرهای مختلف؛ کروماتوگرافی تعویض یونی(DEAE-Sephrose) و غربال مولکولی (SEC) [39].	سیتوپلاسمی	۱/۶گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی در pH برابر با ۱۲/۲ برای یک ساعت و سپس در pH برابر با ۱۱/۵ برای یک شب؛ تاخوردگی مجدد به‌وسیله تنظیم pH تا ۸؛ تخلیص به‌وسیله کم‌کردن pH تا ۴/۹[44]	سیتوپلاسمی	۲/۷گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی در بافر تریس- هیدروکلرید (Tris-HCl) و pH برابر با ۱۱/۵؛ تاخوردگی مجدد به‌وسیله رقیق‌سازی با بافر Tris-HCl و pH برابر با ۸/۰ ؛ تخلیص پروتئین فیوژن به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی نیکل و سپس برش به‌وسیله اینتروکیناز؛ کروماتوگرافی تعویض آنیونی[4]	سیتوپلاسمی	۲/۲۲گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی در گوانیدین‌هیدروکلراید ۶مولار؛ تخلیص به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی نیکل [81, 102]	سیتوپلاسمی	۳۰~میلی‌گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی در اوره ۸مولار و pH برابر با ۱۰/۵؛ تاخوردگی مجدد با رقیق‌سازی اولترافیلتراسیون؛ تخلیص پروتئین به‌وسیله کم‌کردن pH تا ۴/۹ به‌وسیله اضافه‌کردن HCl؛ سانتریفیوژ سوسپانسیون و سپس تنظیم pH سوپ تا ۷ به‌وسیله سدیم‌هیدروکسید (NaOH)؛ کروماتوگرافی SEC برای تعیین نسبت مونومر ها، دایمرها و الیگومرها[40]	سیتوپلاسمی	۱۲۴میلی‌گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی به‌وسیله محلول اوره؛ تاخوردگی مجدد با رقیق‌سازی اولترا فیلتراسیون؛ تخلیص هورمون رشد به‌وسیله کم‌کردن pH تا ۴/۹ به‌وسیله اضافه‌کردن HCl؛ سانتریفیوژ سوسپانسیون و سپس تنظیم pH سوپ تا ۷ به‌وسیله NaOH [43]	سیتوپلاسمی	۵۳میلی‌گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی در بافر Tris–HCl و pH برابر با ۱۰ حاوی SDS ۱۰% و سپس رقیق‌سازی[103]	سیتوپلاسمی	۳/۲گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	محلول‌سازی در اوره ۸مولار و pH برابر با ۱۲/۵؛ تاخوردگی مجدد به‌وسیله رقیق‌سازی در بافر Tris-HCl و pH برابر با ۸/۸؛ تعویض بافر با استات‌سدیم در pH برابر با ۴/۵ حاوی ساکارز، توین- ۸۰ و EDTA؛ سانتریفیوژ و بردن سوپ روی کروماتوگرافی تعویض آنیونی[48]	سیتوپلاسمی	۷۵۰میلی‌گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	تخلیص به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی نیکل[49]	سیتوپلاسمی	۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	[104]	سیتوپلاسمی	۲گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	[41]	پری‌پلاسمی	۳/۹میلی‌گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	کروماتوگرافی تعویض آنیونی و غربال مولکولی[37]	پری‌پلاسمی	۲۰/۲میلی‌گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	تخلیص به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی نیکل[51]	پری‌پلاسمی	۱/۴~میلی‌گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارآیی بالا؛ برای به‌دست‌آوردن هورمون با درجه کلینیکی: یک مرحله رسوب، دو مرحله ستون ژل فیلتراسیون، دو مرحله ستون تعویض یونی و یک مرحله کروماتوگرافی برهم کنش هیدروفوبی انجام شد[75].	پری‌پلاسمی	۱۲/۸میلی‌گرم بر لیتر
باکتری (*اشریشیاکلی*)	سانتریفیوژ محیط و جمع‌آوری پلت؛ مخلوط‌کردن پلت در بافر TES (Tris-HCl، EDTA، ساکارز و pH برابر با ۸/۰)؛ سانتریفیوژ سلول‌ها و نگهداری پلت‌ها به‌عنوان بخش سیتوپلاسمی؛ اضافه‌کردن تریکلرواستیک‌اسید به سوپرناتانت، سانتریفیوژ، سپس حل‌کردن پلت حاصله در بافر نمونه و نگهداری به‌عنوان بخش پری‌پلاسمی[42]	پری‌پلاسمی	-
باکتری (*اشریشیاکلی*)	تیمار با آمونیوم‌سولفات، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون اول، کروماتوگرافی تعویض آنیونی (DEAE-Sepharose fast flow)؛ کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون دوم، کروماتوگرافی تعویض آنیونی Q- سفاروز و کروماتوگرافی برهم‌کنش هیدروفوبی روی فنیل- سفاروز CL4B[76].	پری‌پلاسمی	۱۷۷میلی‌گرم بر لیتر هورمون خالص
باکتری(*باسیلوس‌سوبتیلیس*)	تغلیظ محیط کشت به‌وسیله اولترافیلتراسیون[24]؛ تخلیص با کروماتوگرافی تمایلی بر پایه آپتامر	ترشح در محیط کشت	۷۰میلی‌گرم بر لیتر
مخمر(*پیکیاپاستوریس*)	سانتریفیوژ محیط کشت و نگهداری سوپرناتانت[19]	ترشح در محیط کشت	۴۹میلی‌گرم بر لیتر
مخمر (*پیکیاپاستوریس*)	سانتریفیوژ محیط کشت و نگهداری سوپرناتانت[26]	ترشح در محیط کشت	۱۹۰میلی‌گرم بر لیتر
مخمر (*پیکیاپاستوریس*)	سانتریفیوژ محیط و تغلیظ سوپ با اولترافیلتراسیون؛ کروماتوگرافی تمایلی بر پایه کوبالت و سپس حذف قطعه اضافی توسط آنزیم برشی[105]	ترشح در محیط کشت	۶۵میلی‌گرم بر لیتر پروتئین خالص بعد از دایجست
مخمر (*پیکیاپاستوریس*)	[106]	ترشح در محیط کشت	۲۷۰میلی‌گرم بر لیتر
مخمر (*پیکیاپاستوریس*)	[107]	ترشح در محیط کشت	۰/۶۴گرم بر لیتر
مخمر (*پیکیاپاستوریس*)	[28]	ترشح در محیط کشت	۰/۱۱گرم بر لیتر به‌وسیله سویه Mut^S ۰/۱۶گرم بر لیتر به‌وسیله سویه Mut^+
سلول تخمدان هامستر چینی	الکتروفورز در مقیاس بالای گرادی‌فلو[31]	ترشح در محیط کشت	۱۰۵~میلی‌گرم بر لیتر

تعیین فعالیت زیستی هورمون رشد انسانی نوترکیب

به دو روش کلی انجام می‌گیرد:

۱- سنجش تکثیر سلول NB2: لاین سلولی لیمفومای NB2 رت برای کمیت‌سنجی فعالیت زیستی هورمون خالص‌سازی‌شده استفاده می‌شود. رشد این لاین سلولی، وابسته به لاکتوژن‌های پستانداران مانند پرولاکتین و hGH است و ابزار مفیدی برای کمّی‌کردن توانایی hGH نوترکیب است[51]. فعالیت زیستی rhGH به‌وسیله عمل بهبوددهندگی رشد آن روی لاین سلولی لیمفومای NB2 رت تعیین می‌شود. هورمون نوترکیب تجاری به‌عنوان استاندارد استفاده می‌شود. به‌طور کلی، لاین سلولی NB2 در محیط

www.SID.ir

Archive of SID

کشت مناسبی رشد داده شده و سپس رشد این سلول‌ها در فاز G0/G1 به‌وسیله انکوبه‌کردن سلول‌ها در محیط کشت دارای محدودیت و معمولاً FBS (سرم جنینی گاوی) متوقف می‌شود. برای شروع تکثیر سلولی، غلظت‌های مختلف از BSA (آلبومین سرم گاوی)، hGH تجاری یا هورمون نوترکیب به محیط کشت اضافه می‌شود و بهبود رشد به‌وسیله شمارش تعداد سلول‌ها انجام می‌گیرد[39, 47, 50, 51, 81]. همچنین در مطالعه‌ای از لاین سلولی BaF/GM برای سنجش فعالیت هورمون نوترکیب استفاده شده است. تکثیر این لاین سلولی وابسته به دوز مصرفی هورمون رشد است. این روش سنجش دارای پایین‌ترین حد تشخیصی است که تاکنون گزارش شده است(حدود ۰/۰۲نانوگرم در میلی‌لیتر)[108].

۲- سنجش اتصال به رسپتور (Radiolabeled Receptor Assay):

در مطالعات مختلفی فعالیت زیستی rhGH تولیدشده از طریق توانایی اتصال آن به رسپتور هورمون رشد روی سلول‌های IM9 به‌عنوان منبع رسپتورهای hGH مورد آنالیز قرار گرفته است [4, 40, 43]. هورمون تجاری با I^{125}، برچسب‌دار می‌شود[43]. این روش به‌طور خلاصه بدین صورت است که لاین سلولی IM-9 لیمفوسیت انسانی، ۲۴ ساعت قبل از سنجش در محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰% سرم جنینی گوساله (FCS)، ۱۰۰میلی‌مولار HEPES و با pH برابر با ۷ کشت می‌شوند. قبل از سنجش، سلول‌ها از محیط به‌وسیله سانتریفیوژ جداسازی شده و دوبار با بافر سنجش (۱۰۰میلی‌مولار HEPES، ۱۲۰میلی‌مولار سدیم‌کلرید (NaCl)، ۱/۲میلی‌مولار منیزیم‌سولفات (MgSO4)، ۲/۵میلی‌مولار کلریدپتاسیم (KCl)، ۱۵میلی‌مولار سدیم‌استات، ۱۰میلی‌مولار گلوکز، ۱میلی‌مولار EDTA و ۱۰میلی‌گرم در لیتر آلبومین سرم گاوی در pH برابر با ۷) شست‌وشو می‌شوند. سلول‌ها با غلظت‌های افزایشی از hGH غیربرچسب‌دار و غلظت ثابت از hGH برچسب‌دار با I^{125} انکوبه و بعد از شست‌وشوی سلول‌ها با بافر سنجش، رادیواکتیویته با استفاده از یک شمارنده گاما اندازه‌گیری می‌شود. به‌طور کلی، این مقاله، مروری بر تلاش‌هایی که تاکنون برای تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب انجام گرفته است، داشت و مسایل و مشکلاتی که در مسیر بیان و تخلیص هورمون با آن مواجه بوده‌اند، ذکر شد. به‌دلیل محدودیت به‌دست‌آوردن هورمون رشد انسانی از منشا انسانی، استفاده از مهندسی ژنتیک برای تولید این هورمون نیازی اجتناب‌ناپذیر است. در واقع مهندسی ژنتیک پتانسیل بسیار بالایی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب خصوصاً هورمون رشد در میزبان‌های مختلف دارد و می‌توان از توانایی این علم برای حل هرچه‌بیشتر مشکلاتی که در مسیر تولید پروتئین‌های نوترکیب با آن مواجه بوده‌اند، استفاده کرد. می‌توان با شناخت بیشتر از مسیرهای متابولیک و ساختار ژنتیک گونه‌های مختلف *اشریشیاکلی* و همچنین به‌کاربردن تکنیک‌های جدید خالص‌سازی، سطح بیان و خلوص هورمون رشد را تا حد معنی‌داری افزایش داد. هنوز توسعه استراتژی‌های مختلف به‌منظور افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های میزبان همراه با کاهش تولید اجسام توده‌ای، کاهش مراحل خالص‌سازی و متعاقب آن کاهش هزینه تولید و رسیدن به خلوص بسیار بالا تا حد گرید کلینیکی مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

از جمله مشکلاتی که در مسیر بیان و تخلیص هورمون رشد انسانی وجود دارد می‌توان به تولید اجسام توده‌ای در بیان پروتئین‌های نوترکیب در سیتوپلاسم سلول‌ها، آلودگی‌های ناشی از پروتئین‌های میزبان، ریکاوری پایین پروتئین از این توده‌ها، ترشح کم پروتئین‌ها به فضای پری‌پلاسمی، هزینه بالای تولید مخصوصاً در مرحله تخلیص و غیره اشاره کرد. به‌علت عدم نیاز به گلیکوزیله‌شدن این هورمون و نیز راندمان بالا و سادگی کار، سیستم‌های باکتریایی مخصوصاً *اشریشیاکلی* اقتصادی‌ترین و موثرترین سیستم‌ها در بیان پروتیئن‌های هترولوگ هستند و می‌توان عنوان کرد که باکتری *اشریشیاکلی* کارآمدترین میزبان برای تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب است. مرحله خالص‌سازی هورمون معمولاً پرهزینه‌ترین مراحل تولید محسوب می‌شود. از این رو یک طراحی مطلوب به‌منظور داشتن بالاترین میزان ریکاوری پروتئین هدف همراه با حذف همه آلودگی‌ها از محصول نهایی و کاهش مراحل تخلیص مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از دکتر *سجاد جانفزا* به‌دلیل نظریات کارشناسی ایشان در راستای بهبود کیفیت مقاله، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: روح‌اله قاسمی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰%)؛ هادی هاشم‌زاده (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۱۵%)؛ حمیده رضوی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۱۵%)؛ باقر یخچالی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰%).

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Nielsen J, Villasen J, Liden, G. Bioreaction engineering principles. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003.

2- Zhan X, Giorgianni F, Desiderio DM. Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary. Proteomics. 2005;5(5):1228-41.

3- Baumann GP. Growth hormone isoforms. Growth Horm IGF Res. 2009;19(4):333-40.

4- Shin NK, Kim DY, Shin CS, Hong MS, Lee J, Shin HC. High-level production of human growth hormone in Escherichia Coli by a simple recombinant process. J Biotechnol. 1998;62(2):143-51.

5- Sereikaite J, Statkute A, Morkunas M, Radzevicius K, Borromeo V, Secchi C, et al. Production of recombinant mink growth hormone in E. Coli. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;74(2):316-23.

6- Saboury AA, Kordbacheh M, Sanati MH, Mizani F, Shamsipur M, Yakhchali MB, et al. Thermodynamics of binding copper (II) ion by human growth hormone. Asian J Chem. 2005;17:2773-82.

7- Inankur B. Recombinat human growth hormone production by Pichia pastoris and determination of its interaction with peptide ligands [Dissertation]. Ankara: Middle East Technical University; 2010.

8- Li CH, Evans HM. The isolation of pituitary growth hormone. Science. 1944;99(2566):183-4.

9- Kopchick JJ. History and future of growth hormone research. Horm Res. 2003;60(Suppl 3):103-12.

10- Koch TK, Berg BO, De Armond SJ, Gravina RF. Creutzfeldt-Jakob disease in a young adult with

www.SID.ir

Archive of SID

growth hormone by Pichia pastoris. Gene. 2004;340(2):261-6.
28- Calik P, Orman MA, Celik E, Halloran SM, Calik G, Ozdamar TH. Expression system for biosynthesis and purification of recombinant human growth in Pichia pastoris and structural analysis by MALDI-ToF mass spectrometry. Biotechnol Prog. 2008;24(1):221-6.
29- Apte-Deshpande A, Rewanwar S, Kotwal P, Raiker VA, Padmanabhan S. Efficient expression and secretion of recombinant human growth hormone in the methylotrophic yeast Pichia pastoris: Potential applications for other proteins. Biotechnol Appl Biochem. 2009;54(4):197-205.
30- Gray GL, McKeown KA, Jones AJ, Seeburg PH, Heyneker HL. Pseudomonas aeruginosa secretes and correctly processes human growth hormone. Bio Technol. 1984;2:161-5.
31- Catzel D, Lalevski H, Marquis CP, Gray PP, Van Dyk D, Mahler SM. Purification of recombinant human growth hormone from CHO cell culture supernatant by Gradiflow preparative electrophoresis technology. Protein Expr Purif. 2003;32(1):126-34.
32- Geng ZH, Liu Y, Gao P, Zhao DM, Li S, Yu XD, et al. Enhancing hGH expression level in insect cells by shortening the 5'-UTR of hGH cDNA. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2002;18(4):505-8. [Chinese]
33- Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu W, Yap MGS. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. Chem Eng Prog. 2007;103(10):40-7.
34- Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol. 2004;22(11):1393-8.
35- Chang CN, Key M, Bochner B, Heyneker H, Gray G. High-level secretion of human growth hormone by Escherichia Coli. Gene. 1987;55(2-3):189-96.
36- Kato C, Kobayashi T, Kudo T, Furusato T, Murakami Y, Tanaka T, et al. Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from Escherichia Coli. Gene. 1987;54(2-3):197-202.
37- Becker GW, Hsiung HM. Expression, secretion and folding of human growth hormone in Escherichia Coli: Purification and characterization. FEBS Lett. 1986;204(1):145-50.
38- Hsiung HM, Cantrell A, Luirink J, Oudega B, Veros AJ, Becker GW. Use of bacteriocin release protein in E. Coli for excretion of human growth hormone into the culture medium. Bio Technol. 1989;7:267-71.
39- Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from Escherichia Coli. Protein Expres Purif. 2000;18(2):182-92.
40- Khodabandeh M, Yakhchali B, Rahimi M, Vaseli N, Moghaddasi Jahromi Z, Zomorrodipour A, et al. Purification of large quantities of biologically active recombinant human growth hormone. Iran J Biotechnol. 2003;1(4):207-12.
41- Soares CRJ, Gomide FIC, Ueda EKM, Bartolini P. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the λPL promoter: Use of HPLC for product quantification. Protein Eng. 2003;16(12):1131-8.
42- Ghasemi F, Zomorodipour A, Shojai S, Ataei F, Khodabandeh M, Sanati MH. Using L-arabinose for production of human growth hormone in Escherichia Coli, studying the processing of gIII: hGH precursor. Iran J Biotechnol. 2004;2(4):250-60.
idiopathic hypopituitarism: Possible relation to the administration of cadaveric human growth hormone. N Engl J Med. 1985;313(12):731-33.
11- Brown P, Preece M, Brandel JP, Sato T, McShane L, Zerr I, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. Neurology. 2000;55(8):1075-81.
12- Gray GL, Baldridge JS, McKeown KS, Heyneker HL, Chang CN. Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in Escherichia Coli: Natural and bacterial signal sequences are interchangeable. Gene. 1985;39(2-3):247-54.
13- Ghorpade A, Garg LC. Efficient processing and export of human growth hormone by heat labile enterotoxin chain B signal sequence. FEBS Lett. 1993;330(1):61-5.
14- Martial JA, Hallewell RA, Baxter JD, Goodman HM. Human growth hormone: Complementary DNA cloning and expression in bacteria. Science. 1979;205(4406):602-7.
15- Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itakura K, Yansura DG, et al. Direct expression in Escherichia Coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. Nature. 1979;281(5732):544-8.
16- Tritos NA, Mantzoros CS. Recombinant human growth hormone: Old and novel uses. Am J Med. 1998;105(1):44-57.
17- Jorgensen KD. Comparison of the pharmacological properties of pituitary and biosynthetic human growth-hormone-demonstration of antinatriuretic antidiuretic and barbital sleep effects of human growth-hormone in rats. Acta Endocrinol (Copenh). 1987;114(1):124-31.
18- Fong Y, Rosenbaum M, Tracey KJ, Raman G, Hesse DG, Matthews DE, et al. Recombinant growth hormone enhances muscle myosin heavy-chain mRNA accumulation and amino acid accrual in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(9):3371-4.
19- Ecamilla-Trevino LL, Viader-Salvadó JM, Barrera-Saldaña HA, Guerrero-Olazarán M. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in Pichia pastoris. Biotechnol Lett. 2000;22(2):109-14.
20- Roehr B. The many faces of human growth hormone. BETA. 2003;15(4):12-6.
21- Krysiak R, Gdula-Dymek A, Bednarska-Czerwińska A, Okopień B. Growth hormone therapy in children and adults. Pharmacol Rep. 2007;59(5):500-16.
22- Nakayama A, Ando K, Kawamura K, Mita I, Fukazawa K, Hori M, et al. Efficient secretion of the authentic mature human growth hormone by Bacillus subtilis. J Biotechnol. 1988;8(2):123-34.
23- Franchi E, Maisano F, Testori SA, Galli G, Toma S, Parente L, et al. A new human growth hormone production process using a recombinant Bacillus subtilis strain. J Biotechnol. 1991;18(1-2):41-54.
24- Ozdamar TH, Sentürk B, Yilmaz OD, Calik G, Celik E, Calik P. Expression system for recombinant human growth hormone production from Bacillus subtilis. Biotechnol Prog. 2009;25(1):75-84.
25- Tokunaga T, Iwai S, Gomi H, Kodama K, Ohtsuka E, Ikehara M, et al. Expression of a synthetic human growth hormone gene in yeast. Gene. 1985;39(1):117-20.
26- Eurwilaichitr L, Roytrakul S, Suprasongsin C, Manitchotpisit P, Panyim S. Glutamic acid and alanine spacer is not necessary for removal of MFα-1 signal sequence fused to the human growth hormone produced from Pichia pastoris. World J Microbiol Biotechnol. 2002;18(6):493-8.
27- Ascacio-Martínez JA, Barrera-Saldaña HA. Production and secretion of biologically active recombinant canine

www.SID.ir

Archive of SID

57- Vassileva-Atanassova A, Mironova R, Nacheva G, Ivanov I. N-terminal methionine in recombinant proteins expressed in two different Escherichia Coli strains. J Biotechnol. 1999;69(1):63-7.
58- Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia Coli. Microbiol Rev. 1996;60(3):512-38.
59- Wilkinson DL, Harrison RG. Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia Coli. Biotechnology (N Y). 1991;9(5):443-8.
60- Thamann TJ. Raman spectroscopic studies of a dimeric form of recombinant bovine growth hormone. Anal Biochem. 1998;265(2):202-7.
61- St John RJ, Carpenter JF, Balny C, Randolph TW. High pressure refolding of recombinant human growth hormone from insoluble aggregates, Structural transformations, kinetic barriers, and energetics. J Biol Chem. 2001;276:46856-63.
62- Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J Biosci Bioeng. 2005;99(4):303-10.
63- Sonoda H, Sugimura A. Improved solubilization of recombinant human growth hormone inclusion body produced in Escherichia Coli. Biosci Biotechnol Biochem. 2008;72(10):2675-80.
64- Clark ED. Protein refolding for industrial processes. Curr Opin Biotechnol. 2001;12(2):202-7.
65- Middelberg AP. Preparative protein refolding. Trends Biotechnol. 2002;20(10):437-43.
66- Khan RH, Rao KB, Eshwari AN, Totey SM, Panda AK. Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of Escherichia Coli. Biotechnol Prog. 1998;14(5):722-8.
67- De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. Methods Enzymol. 1999;309:217-36.
68- Puri NK, Crivelli E, Cardamone M, Fiddes R, Bertolini J, Ninham B, et al. Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from Escherichia Coli inclusion bodies by using a cationic surfactant. Biochem J. 1992;285(Pt 3):871-9.
69- Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Isolation renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in Escherichia Coli as inclusion bodies. Biotechnol Bioeng. 1993;41(1):3-13.
70- Yasuda M, Murakami Y, Sowa A, Ogino H, Ishikawa H. Effect of additives on refolding of a denatured protein. Biotechnol Prog. 1998;14(4):601-6.
71- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. Protein Expr Purif. 2003;28(1):1-8.
72- Pugsley AP, Schwartz M. Export and secretion of proteins by bacteria. FEMS Microbiol Lett. 1985;32(1):3-38.
73- Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia Coli. Protein Expr Purif. 2012;82(1):240-51.
74- Chang JY, Pai RC, Bennett WF, Bochner BR. Periplasmic secretion of human growth hormone by Escherichia Coli. Biochem Soc Trans. 1989;17(2):335-7.
75- Teresa M, Ribela CP, Camargo IM, Oliveira JE, Bartolini P. Single-step purification of recombinant human growth hormone (hGH) directly from bacterial osmotic shock fluids, for the purpose of (125)I-hGH preparation. Protein Expr Purif. 2000;18(2):115-20.
43- Zomorrodipour A, Yakhchali B, Khodabandeh M, Deezagi A, Hosseini Mazinani SM, Valian Borujeni S, et al. The over-expression of biologically active human growth hormone in a T5-based system in Escherichia Coli, studying temperature effect. J Sci Islam Repub Iran. 2004;15(1):27-32.
44- Tabandeh F, Shojaosadati SA, Zomorodipour A, Khodabandeh M, Sanati MH, Yakhchali B. Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant Escherichia Coli. Biotechnol Lett. 2004;26(3):245-50.
45- Tabandeh F, Yakhchali B, Shojaosadati SA, Khodabandeh M, Sanati MH. Growth kinetics and human growth hormone production of a heat-inducible recombinant Echerichia Coli during batch fermentation. Iran J Sci Technol Trans A. 2004;28(A1):11-7.
46- Tabandeh F, Shojaosadati SA, Yakhchali B, Khodabandeh M, Sanati MH. Evaluation of heat induction strategy for recombinant human growth hormone expression in fed-batch fermentation. Iran J Biotechnol. 2005;3(1):24-30.
47- Singh SM, Sharma A, Panda AK. High throughput purification of recombinant human growth hormone using radial flow chromatography. Protein Expres Purif. 2009;68(1):54-9.
48- Soorapaneni S, Apte-Deshpande A, Sabnis-Prasad K, Kumar J, Raiker VA, Kotwal P, et al. Arabinose promoter based expression of biologically active recombinant human growth hormone in E. Coli: Strategies for over expression and simple purification methods. J Microb Biochem Technol. 2010;2(2):38-45.
49- Rezaei M, Zarkesh-Esfahani SH. Optimization of production of recombinant human growth hormone in Escherichia Coli. J Res Med Sci. 2012;17(7):681-5.
50- Kim MJ, Park HS, Seo KH, Yang HJ, Kim SK, Choi JH. Complete solubilization and purification of recombinant human growth hormone produced in Escherichia Coli. PloS One. 2013;8(2):e56168.
51- Sockolosky JT, Szoka FC. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. Protein Expres Purif. 2013;87(2):129-35.
52- Ahangari G, Ostadali MR, Rabani A, Rashidian J, Sanati MH, Zarindast MR. Growth hormone antibodies formation in patients treated with recombinant human growth hormone. Int J Immunopathol Pharmacol. 2004;17(1):33-8.
53- Hsiung HM, Mayne NG, Becker GW. High–level expression, efficient secretion and folding of human growth hormone in Escherichia Coli. Bio Technol. 1986;4:991-5.
54- Nakayama A, Kawamura K, Shimada H, Akaoka A, Mita I, Honjo M, et al. Extracellular production of human growth hormone by a head portion of the prepropeptide derived from Bacillus amyloliquefaciens neutral protease in Bacillus subtilis. J Biotechnol. 1987;5(3):171-9.
55- Kiany J, Zomorodipour A, Ahmadzadeh Raji M, Sanati MH. Construction of recombinant plasmids for periplasmic expression of human growth hormone in Escherichia Coli under T7 and lac promoters. J Sci Islam Repub Iran. 2003;14(4):311-6.
56- Kohara A, Yamamoto Y, Kikuchi M. Processing and secretion of human growth hormone with an artificial signal sequence. Biosci Biotechnol Biochem. 1994;58(4):779-81.

www.SID.ir

Archive of SID

biologically active human granzyme B. J Immunol Methods. 2011;371(1-2):8-17.
94- Battersby JE, Mukku VR, Clark RG, Hancock WS. Affinity purification and microcharacterization of recombinant DNA-derived human growth hormone isolated from an in vivo model. Anal Chem. 1995;67(2):447-55.
95- Çalık P, Balcı O, Özdamar TH. Human growth hormone-specific aptamer identification using improved oligonucleotide ligand evolution method. Protein Expr Purif. 2010;69(1):21-8.
96- Puri NK, Cardamone M. A relationship between the starting secondary structure of recombinant porcine growth hormone solubilised from inclusion bodies and the yield of native (monomeric) protein after in vitro refolding. FEBS Lett. 1992;305(3):177-80.
97- Brostedt P, Roos P. Isolation of four isomers of the 20,000 dalton variant of human pituitary growth hormone. Prep Biochem. 1988;18(3):277-91.
98- Lefort S, Ferrara P. Hydrophobic adsorbants for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixtures. J Chromatogr A. 1986;361:209-16.
99- Corthals GL, Margolis J, Williams KL, Gooley AA. The role of pH and membrane porosity in preparative electrophoresis. Electrophoresis. 1996;17(4):771-5.
100- Shin CS, Hong MS, Kim DY, Shin HC, Lee J. Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of Escherichia Coli. Appl Microbiol Biotechnol. 1998;49(4):364-70.
101- Singh SM, Sharma A, Upadhyay AK, Singh A, Garg LC, Panda AK. Solubilization of inclusion body proteins using n-propanol and its refolding into bioactive form. Protein Expr Purif. 2012;81(1):75-82.
102- Appa Rao KB, Garg LC, Panda AK, Totey SM. High-level expression of ovine growth hormone in Escherichia coli: Single-step purification and characterization. Protein Expr Purif. 1997;11(2):201-8.
103- Panda AK, Khan RH, Rao KA, Totey SM. Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of Escherichia coli expressing ovine growth hormone. J Biotechnol. 1999;75(2-3):161-72.
104- Cho TH, Ahn SJ, Lee EK. Refolding of protein inclusion bodies directly from E. Coli homogenate using expanded bed adsorption chromatography. Bioseparation. 2001;10(4-5):189-96.
105- Calik P, Orman MA, Celik E, Halloran SM, Calik G, Ozdamar TH. Expression system for synthesis and purification of recombinant human growth hormone in Pichia pastoris and structural analysis by MALDI-ToF mass spectrometry. Biotechnol Prog. 2008;24(1):221-6.
106- Çalık P, Bayraktar E, İnankur B, Soyaslan EŞ, Şahin M, Taşpınar H, et al. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by Pichia pastoris. J Chem Technol Biotechnol. 2010;85(12):1628-35.
107- Çalık P, Bozkurt B, Zerze GH, İnankur B, Bayraktar E, Boy E, et al. Effect of co-substrate sorbitol different feeding strategies on human growth hormone production by recombinant Pichia pastoris. J Chem Technol Biotechnol. 2013;88(9):1631-40.
108- Maimaiti M, Tanahashi Y, Mohri Z, Fujieda K. Development of a bioassay system for human growth hormone determination with close correlation to immunoassay. J Clin Lab Anal. 2012;26(5):328-35.
76- De Oliveira JE, Soares CRJ, Peroni CN, Gimbo E, Camargo LMC, Morganti CL, et al. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in Escherichia Coli periplasmic space. J Chromatogr A. 1999;852(2):441-50.
77- Blight MA, Chervaux C, Holland IB. Protein secretion pathways in Escherichia Coli. Curr Opin Biotechnol. 1994;5(5):468-74.
78- Stader JA, Silhavy TJ. Engineering Escherchia Coli to secrete heterologous gene products. Methods Enzymol. 1990;185:166-87.
79- Fryklund LM, Bierich JR, Ranke MB. 5 Recombinant human growth hormone. Clin Endocrinol Metab. 1986;15(3):511-35.
80- Flodh H. Human growth hormone produced with recombinant DNA technology: Development and production. Acta Paediatr Scand Suppl. 1986;325:1-9.
81- Mukhija R, Rupa P, Pillai D, Garg LC. High-level production and one-step purification of biologically active human growth hormone in Escherichia Coli. Gene. 1995;165(2):303-6.
82- Whitmire ML, Eaton LC. An immunoligand assay for quantitation of process specific Escherichia Coli host cell contaminant proteins in a recombinant bovine somatotropin. J Immunoassay. 1997;18(1):49-65.
83- Wang G, Salm JR, Gurgel PV, Carbonell RG. Small peptide ligands for affinity separations of biological molecules. In: Galan MA, Del Valle EM, editors. Chemical engineering: Trends and developments. New York: Wiley; 2005. pp. 63-83.
84- Mondal K, Gupta MN. The affinity concept in bioseparation: Evolving paradigms and expanding range of applications. Biomol Eng. 2006;23(2-3):59-76.
85- Ueda EKM, Gout PW, Morganti L. Current and prospective applications of metal ion–protein binding. J Chromatogr A. 2003;988(1):1-23.
86- Gupta V, Eshwari ANS, Panda AK, Agarwal GP. Optimization of immobilized metal ion affinity chromatography for single-step purification of recombinant ovine growth hormone expressed in Escherichia Coli. J Chromatogr A. 2003;998(1-2):93-101.
87- Liesiene J, Racaityte K, Morkeviciene M, Valancius P, Bumelis V. Immobilized metal affinity chromatography of human growth hormone, Effect of ligand density. J Chromatogr A. 1997;764(1):27-33.
88- Celik E, Çalık P, Halloran SM, Oliver SG. Production of recombinant human erythropoietin from Pichia pastoris and its structural analysis. J Appl Microbiol. 2007;103(6):2084-94.
89- Maisano F, Testori SA, Grandi G. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human growth hormone. J Chromatogr A. 1989;472:422-7.
90- Janknecht R, Nordheim A. Affinity purification of Histidine-tagged proteins transiently produced in HeLa cells. Gene. 1992;121(2):321-4.
91- Seidler A. Introduction of a Histidine tail at the N-terminus of a secretory protein expressed in Escherichia Coli. Protein Eng. 1994;7(10):1277-80.
92- Ribeiro CW, Soares-Costa A, Falco MC, Chabregas SM, Ulian EC, Cotrin SS, et al. Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. Biotechnol Prog. 2008;24(5):1060-6.
93- Gehrmann M, Doss BT, Wagner M, Zettlitz KA, Kontermann RE, Foulds G, et al. A novel expression and purification system for the production of enzymatic and

www.SID.ir