Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

Expression and Synthesis of Recombinant Human Coagulation Factor VIII Using a Cell-Free Expression System

M. Ebrahimi (MSc)[1], E. Ferdosi-Shahandashti (PhD)[*2], M. Zarei (MSc)[3], G. A. Kardar (PhD)[4]

1.Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.
2.Biomedical and Microbial Advanced Technologies (BMAT) Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.
3.Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.
4.Immunology, Asthma and Allergy Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

***Corresponding Author: E. Ferdosi-Shahandashti (PhD)**
Address: School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.
Tel: +98 (11) 32199592. **E-mail:** elaheh.ferdosi@yahoo.com

Article Type
Research Paper

Received:
Oct 15th 2023
Revised:
Nov 19th 2023
Accepted:
Dec 23rd 2023

ABSTRACT

Background and Objective: Hemophilia A is the most common type of this disease. For the treatment of hemophiliacs, the injectable concentrate of human factor VIII, derived from plasma and recombinant, is available in the market. Due to the risk of contracting infectious diseases due to blood transfusions or donated blood products, including plasma-driven factor VIII, recombinant factor VIII can be used, which is safe and has a higher purity than the blood-derived sample, while showing a longer half-life in the blood of consuming patients. The aim of this study is to evaluate the expression and synthesis of recombinant human factor VIII using a cell-free eukaryotic expression system as a new strategy for the synthesis of recombinant drugs.

Methods: In this experimental study, pcDNA3 vector containing the gene fragment without B-domain of blood coagulation factor VIII was transformed into susceptible DH5α bacteria. After the multiplication of the bacteria and the increase of the target vector, the amplified vector was extracted at this stage and its quality and concentration were determined. Then CHO-K1 eukaryotic cells were cultured and cell extract was prepared from the density of more than ten million of their cells. The extracted vector was combined with cell extract and expression solution, and the expression process was carried out at 30°C and 37°C. The level of expression was evaluated by ELISA and dot blot techniques.

Findings: Based on the ELISA technique adopted in this study, the expression level of recombinant human blood coagulation factor VIII in the base sample at a temperature of 30°C, sample 2 at a temperature of 30°C, base sample at a temperature of 37°C, and sample 4 of negative control at a temperature of 30°C were respectively reported as 275, 276, 273 and 0 ng/ml in a period of 20 hours. In the dot blot technique, the mentioned quantitative results were qualitatively confirmed by the color intensity of the spots.

Conclusion: The results showed that the cell-free expression method can be used for the synthesis of recombinant factor VIII. Under the conditions used in this research for cell-free expression of recombinant factor VIII, volume ratio of 50/50 of CHO-K1 cell extract was suitable, and the basic expression solution at 30°C showed the highest concentration of the product. Due to the use of CHO-K1 eukaryotic cell extract, the synthesized recombinant human factor VIII has post-translational modifications, which are very important for the functionality of this protein in the human body.

Keywords: *Recombinant Human Factor VIII, CHO-K1 Cell Line, Cell Extract, Cell-Free Expression.*

Cite this article: Ebrahimi M, Ferdosi-Shahandashti E, Zarei M, Kardar GA. Expression and Synthesis of Recombinant Human Coagulation Factor VIII Using a Cell-Free Expression System. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2024; 26: e17.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]

Copyright © 2024 Babol University of Medical Sciences. Published by Babol University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

بیان و سنتز فاکتور VIII انعقادی نوترکیب انسانی با استفاده از سیستم بیانی بدون سلول

محمدرضا ابراهیمی (MSc)[۱]، الهه فردوسی شاهاندشتی (PhD)[۲*]، محبوبه زارعی (MSc)[۳]، غلامعلی کاردر (PhD)[۴]

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۲. مرکز تحقیقات فناوری‌های نوین زیست پزشکی و میکروبی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۴. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۲/۷/۲۳
اصلاح: ۱۴۰۲/۸/۲۸
پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲

چکیده

سابقه و هدف: بیماری هموفیلی نوع A، شایع‌ترین نوع این بیماری است. جهت درمان بیماران هموفیلی، کنسانتره تزریقی فاکتور VIII انسانی، به دو صورت مشتق از پلاسما و نوترکیب در بازار وجود دارد. با توجه به خطر ابتلا به بیماری‌های عفونی در اثر تزریق خون یا محصولات خونی اهدایی از جمله فاکتور VIII مشتق از پلاسما، می‌توان از فاکتور VIII نوترکیب که از لحاظ ایمنی بی‌خطر، دارای خلوص بالاتر از نمونه مشتق از خون بوده و نیز نیمه عمر طولانی‌تری در خون بیماران مصرف کننده دارد، استفاده نمود. هدف از این مطالعه، بیان و سنتز فاکتور VIII نوترکیب انسانی با استفاده از سیستم بیانی یوکاریوتی عاری از سلول به عنوان استراتژی نوین سنتز داروهای نوترکیب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی وکتور pcDNA3 حاوی قطعه ژنی بدون دمین B فاکتور VIII انعقاد خون، به داخل باکتری DH5α مستعد شده، ترانسفورم گردید. پس از تکثیر باکتری و افزایش وکتور مورد نظر، در این مرحله وکتور تکثیر یافته استخراج شد و کیفیت و غلظت آن تعیین گردید. سپس سلول‌های یوکاریوتی CHO-K1 کشت داده شدند و از تراکم بیش از ده میلیون سلول آن‌ها، عصاره سلولی تهیه شد. وکتور استخراج شده با عصاره سلولی و محلول بیانی ترکیب و فرآیند بیان در دمای ۳۰°C و ۳۷°C انجام شد. میزان بیان با تکنیک‌های الایزا و دات بلات بررسی گردید.

یافته‌ها: در این پژوهش با تکنیک الایزا میزان بیان فاکتور VIII انعقاد خون نوترکیب انسانی در نمونه پایه با دمای ۳۰°C، نمونه ۲ با دمای ۳۰°C، نمونه پایه با دمای ۳۷°C و نمونه ۴ کنترل منفی با دمای ۳۰°C در مدت ۲۰ ساعت به ترتیب ۲۷۵، ۲۷۶، ۲۷۳ و صفر نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. در تکنیک دات بلات نیز نتایج کمی ذکر شده به صورت کیفی با شدت رنگ لکه‌ها تائید گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان داد که از روش بیان عاری از سلول می‌توان برای سنتز فاکتور VIII نوترکیب استفاده نمود. شرایط بکار گرفته شده در این پژوهش جهت بیان بدون سلول فاکتور VIII نوترکیب، نسبت حجمی ۵۰/۵۰ از عصاره سلولی CHO-K1 مناسب بوده است و محلول بیانی پایه در دمای ۳۰°C بیشترین غلظت محصول را بیان نمود. به دلیل استفاده از عصاره سلولی یوکاریوتی CHO-K1، فاکتور VIII نوترکیب انسانی سنتز شده دارای تغییرات پس از ترجمه است که جهت عملکردی بودن این پروتئین در بدن انسان بسیار مهم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور VIII نوترکیب انسانی، رده سلولی CHO-K1، عصاره سلولی، بیان بدون سلولی.

استناد: محمدرضا ابراهیمی، الهه فردوسی شاهاندشتی، محبوبه زارعی، غلامعلی کاردر. بیان و سنتز فاکتور VIII انعقادی نوترکیب انسانی با استفاده از سیستم بیانی بدون سلول. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۳؛ ۲۶: e۱۷.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]

▣ این مقاله مستخرج از پایان نامه محمدرضا ابراهیمی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۸۰۹۳۷۳ دانشگاه علوم پزشکی بابل می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر الهه فردوسی شاهاندشتی
آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی. تلفن: ۰۱۱-۳۲۱۹۹۵۹۲ رایانامه: elaheh.ferdosi@yahoo.com

مقدمه

فاکتور VIII (FVIII) یکی از پیچیده‌ترین گلیکوپروتئین‌های پلاسما می‌باشد که نقش کلیدی در مسیر داخلی انعقاد خون ایفا می‌کند (۱). کمبود میزان فاکتور VIII در گردش خون منجر به بیماری هموفیلی A که یک بیماری خون ریزی دهنده وابسته به X است، می‌شود که در مردان و زنان هموزیگوت رخ می‌دهد (۲). ژن فاکتور VIII بر بروی کروموزوم X واقع است (Xq28). جهش در ژن کد کننده فاکتور VIII عمدتاً به طور انحصاری در سلول‌های زایای مردانه اتفاق می‌افتد. نتیجه این جهش، فقدان یا کاهش سنتز فاکتور VIII یا سنتز یک پروتئین غیر نرمال می‌باشد (۴و۳). سالانه حدود ۱۰۰۰۰ مورد جدید از هموفیلی A در سراسر جهان با نرخ شیوع ۱ در ۵۰۰۰ در مردان گزارش می‌شود (۵).

مبنای درمان هموفیلی، افزایش میزان فعالیت فاکتور انعقادی ناکافی به منظور جلوگیری از خون ریزی می‌باشد. داروهایی که در پیشگیری و درمان استفاده می‌شوند عبارت از: کنساتره فاکتور VIII انسانی مشتق شده از پلاسما، فاکتور VIII نوترکیب ساخته شده توسط تکنولوژی مهندسی ژنتیک، دسموپرسین (DDAVP) (مشتق شده از هورمون ضد ادراری)، داروهای دیگر نظیر آنتی فیبرینولیتیک‌ها و داروهای هموستاتیک موضعی می باشند. در درمان‌های رایج هموفیلی A، به جز عوارض و بیماری‌های ناشی از انتقال عوامل ناشناخته عفونی، می‌توان به ایجاد آنتی بادی‌های مهار کننده علیه فاکتور VIII تزریقی در خون بیمار، اشاره کرد. شیوع مهار کننده در بیماران مبتلا به هموفیلی A نوع شدید، تقریباً ۱۵ الی ۳۵٪ است (۸-۶).

سه نسل دارویی برای فاکتور VIII نوترکیب انسانی وجود دارد. اولین نسل دارویی شامل فاکتور VIII نوترکیبی می‌باشد که از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی و فارماکوکینتیکی، مشابه نوع طبیعی آن می‌باشد. تاکنون هیچ موردی از آلودگی با HBV، HCV و HIV در خصوص استفاده از این فرمول‌های دارویی گزارش نشده است. با این حال، خطر انتقال ذرات ویروسی در مورد داروهای نسل اول هنوز به طور کامل برطرف نشده است. پروتئین‌های انسانی و حیوانی که در محیط‌های کشت استفاده می‌شوند و همچنین آلبومین انسانی که به عنوان پایدار کننده نهایی محصول استفاده می‌شود، هنوز پتانسیل عفونت را دارا هستند. در نسل دوم، آلبومین انسانی با ترکیبات کربوهیدرات که نقش پایدار کننده را بازی می‌کنند، جایگزین شده است. از آنجایی که محیط کشت حاوی پروتئین انسانی می‌باشد، می‌تواند به عنوان یک منبع عفونت باشد، نسل دوم وارد یک پروسه غیر فعال سازی ویروسی می‌شود. نکته قابل توجه در نسل دوم، حذف شدن دومین B می‌باشد. بیان mRNA فاکتور VIII فاقد دومین B در سلول‌های CHO-K1 (Chinese hamster ovary)، ۲۰ برابر بیشتر از میزان بیان mRNA طبیعی فاکتور VIII می‌باشد. محیط کشت با پروتئین‌های انسانی یا حیوانی غنی نشده است و به جای آلبومین، از کربوهیدرات به عنوان پایدار کننده استفاده شده است. امروزه تحقیق بر روی نسل جدید این محصول، در حال انجام است که در فرآیند خالص سازی، به جای آنتی بادی منوکلونال موشی، از لیگاندهای تولید شده توسط فرآیندهای شیمیایی استفاده می‌شود (۹).

نسل سوم فاکتور VIII انعقادی نوترکیب، دارویی را برای هموفیلی فراهم کرده که عملاً خطر انتقال ذرات ویروسی در آن حذف شده است (۱۰). تولید فاکتور VIII نوترکیب در رده سلول‌های انسانی، از لحاظ تئوری مزیت‌هایی دارد که در عمل نیز به آن پی برده‌اند. این محصول، شامل تغییرات پس از ترجمه (post-translational modification) کامل‌تری می‌باشد مثل سولفاته شدن تیروزین (Tyrosine sulphation) که نتیجه آن، تقویت اتصال به فاکتور ونویلبراند و و افزایش نسبتاً کم در طول عمر آن می‌باشد. این عمل همچنین منجر به عدم حضور ساختارهای قندی Galα1-3Galβ1-GlcNAc-R (alpha-Gal) و N-glycolylneuraminic acid در فاکتور VIII، که در برخی شرایط باعث ایجاد پاسخ ایمنی می‌شوند، می‌گردد (۱۲و۱۱).

اساس قانون بیان با استفاده از سیستم بیانی بدون سلول، توسط Eduard Buchner، نه برای سنتز پروتئین، بلکه برای تبدیل قند به اتانول و دی اکسید کربن معرفی شد. بیشتر از ۶۰ سال بعد، Nirenberg و Matthaei سیستم بیانی بدون سلول را بر مبنای باکتری E. coli به منظور مطالعه فرآیندهای مرتبط با ترجمه گسترش دادند. این سیستم، مسیر را برای بسیاری از سیستم‌های بیانی پیچیده که امروزه در دسترس هستند، هموار کرد (۱۳). بیان پروتئین در شرایط in vivo نیازمند مقادیر قابل توجهی از زمان و منابع می‌باشد. در مقابل، سیستم بیانی بدون سلول، دسترسی سریع‌تر به پروتئین مورد نظر را فراهم می‌کند. همچنین این روش می‌تواند در بیان پروتئین‌های سخت بیان (مثل پروتئین‌های سمی و پروتئین‌های گذرنده از غشا) و پروتئین‌هایی با مشخصات بهبود یافته با استفاده از اسیدهای آمینه غیر استاندارد، مورد استفاده قرار گیرد (۱۴). توانایی ذاتی سلول‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، به دلیل مصرف بخش قابل توجهی از منابع سلولی جهت تولید مثل و بقای سلول‌ها، محدود می‌باشد (۱۵). امروزه با ابداع سیستم بیان بدون سلول، به دلیل تنوع و قابل حمل بودن این سیستم‌ها، پتانسیل استفاده از آن‌ها حتی در خارج از آزمایشگاه‌ها، افزایش یافته است (۱۶). همچنین با همراه کردن ژن‌های گزارشگر و استفاده از آن‌ها در این سیستم، می‌توان از این سیستم در تشخیص ویروس‌ها، مدل سازی متابولیک (Metabolic modeling)، تشخیص توکسین، سنسورهای زیستی (Biosensors) و تایید مدار ژنتیکی (Genetic circuit validation) استفاده کرد (۱۸و۱۷). همچنین در تولید مواد بیولوژیک از جمله واکسن‌ها، به این علت که استراتژی‌های فعلی تولید واکسن زمانبر بوده و نیز خطر آلودگی ویروسی، ایمنی‌زایی و پایداری پایین وجود دارد، پیشنهاد می‌گردد تا از سیستم‌های

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]

بیانی بدون سلول، که دارای فرآیندهای رونویسی و ترجمه خارج سلولی، توانایی بیان و سنتز سریع‌تر پروتئین و بهینه سازی آسان‌تری می‌باشد، استفاده گردد (۱۹). سیستم بیانی بدون سلول را نیز می‌توان برای استفاده طولانی مدت به حالت لیوفلیزه درآورد (۲۰).

در میان سیستم‌های بیانی بدون سلول، سیستم بیانی بدون سلول بر مبنای باکتری E. coli بیشترین کاربرد و بیشترین بازده در تولید پروتئین را دارد (۲۱) ولی از آنجا که پروتئین هدف ما یک پروتئین یوکاریوتی بوده و تغییرات پس از ترجمه در سیستم بیانی پروکاریوتی اتفاق نمی‌افتد، باید از یک میزبان یوکاریوتی استفاده نمود. در سیستم‌های یوکاریوتی، از سلول‌های جوانه گندم، مخمر، رتیکولوسیت خرگوش، حشره، HeLa و CHO استفاده می‌شود که در بین این سلول‌ها، سلول‌های CHO و HeLa، تغییرات پس از ترجمه بهتری را انجام می‌دهند (۲۱). از بین سلول‌های CHO و HeLa، سلول‌های CHO نیاز به امکانات کمتری برای رشد و تکثیر داشته و مقرون به صرفه‌تر هستند. تاکنون با استفاده از سیستم بیانی بدون سلول، فاکتور VIII نوترکیب تولید نشده است و از آنجا که تولید این فاکتور با استفاده از این روش بسیار ساده‌تر و ایمن‌تر می‌باشد، در این پژوهش بر آن شدیم تا به بررسی امکان تولید این پروتئین با روش بیان بدون سلول بپردازیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل با کد IR.MUBABOL.REC.1399.023، از رده سلولی یوکاریوتی CHO-K1 استفاده گردید. غلظت‌های مختلفی از بعضی مواد و عوامل موثر در بیان، در یک گروه شامل ۴ نمونه آزمایشات بیان و سنتز فاکتور VIII نوترکیب، انجام گردید.

سویه باکتریایی، رده سلولی و پلاسمید: سویه DH5α از باکتری اشرشیاکلی (Strategene-USA)، به عنوان میزبان پروکاریوتی برای مراحل کلونینگ استفاده شد. رده سلولی CHO-K1 (انستیتو پاستور- ایران)، به عنوان میزبان یوکاریوتی جهت بیان hFVIII استفاده شد. پلاسمید pcDNA3-hFVIII از مطالعه قبلی (۲۲) تهیه شد و به عنوان منبعی برای cDNA hFVIII بدون دمین B (domain B) و به عنوان پلاسمید بیانی استفاده گردید.

محیط‌ها، آنزیم‌ها، مواد شیمیایی و کیت‌ها: محیط LB آگار (۱۰ گرم بر لیتر تریپتون، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۱۰ گرم بر لیتر NaCl، pH 7.0 با NaOH، خریداری شده از شرکت مرک- آلمان) به عنوان محیط کشت باکتریایی استفاده شد و پودر آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در صورت نیاز برای حفظ فشار انتخابی اضافه گردید. آنزیم KpnI از شرکت Roche- آلمان خریداری شد. سلول‌های CHO-K1 در RPMI-1640 با ۱۰٪ سرم جنین گاوی غیر فعال شده با حرارت (Gibco) و Pen-Strep 1X (Sigma-Germany) رشد کردند. از آنتی بادی Anti-Factor VIII، (کلون GMA-012) (Sigma-Germany) برای اندازه گیری آنتی ژن hFVIII و کنسانتره فاکتور مشتق از پلاسما (Biotest-Germany) استفاده شد.

کلون کردن pcDNA3-BDD-hFVIII در میزبان باکتریایی DH5a و استخراج پلاسمید: تکنیک‌های دستکاری DNA، مانند استخراج DNA پلاسمید، هضم DNA و کلونینگ بر اساس روش‌های استاندارد انجام شد (۲۳). با استفاده از روش شوک حرارتی برای انتقال وکتور نوترکیب به درون باکتری E. coli استفاده گردید. پلاسمید نوترکیب (حاوی ژن کد کننده فاکتور VIII)، به سویه DH5α باکتری اشریشیا کلی منتقل شد، سپس باکتری‌های ترانسفورم شده پس از کشت بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آمپی سیلین جداسازی شدند تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند. پلاسمید نوترکیب نیز با استفاده از روش هضم آنزیمی با آنزیم kpnI تأیید شد. سپس با دستورالعمل کیت GeneAll exprep Plasmid SV mini، استخراج پلاسمید از کلنی‌های ترنسفرم شده انجام شد.

کشت سلولی: در این مطالعه از رده سلولی یوکاریوتی CHO-K1 که مورفولوژی شبه اپیتلیال دارند و در محیط کشت به صورت چسبنده رشد می‌کنند، استفاده شد. شرایط مناسب برای کشت این رده سلولی محیط RPMI با ۱۰٪ FBS در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO2 و رطوبت ۹۵٪ می‌باشد.

تهیه عصاره سلولی: سلول‌های به دست آمده از فلاسک‌های سلولی جمع آوری گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۰۰ سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، با محلول واش (شرکت شفامل- ایران) شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها در محلول extraction (شرکت شفامل- ایران) که از قبل به دمای اتاق رسیده بود، غوطه‌ور شدند. پس از انجام این مرحله از کار، سوپرناتانت سلولی جمع آوری گردید. سوپرناتانت جمع آوری شده، به عنوان عصاره سلولی برای مراحل بعدی جمع آوری و ذخیره شد.

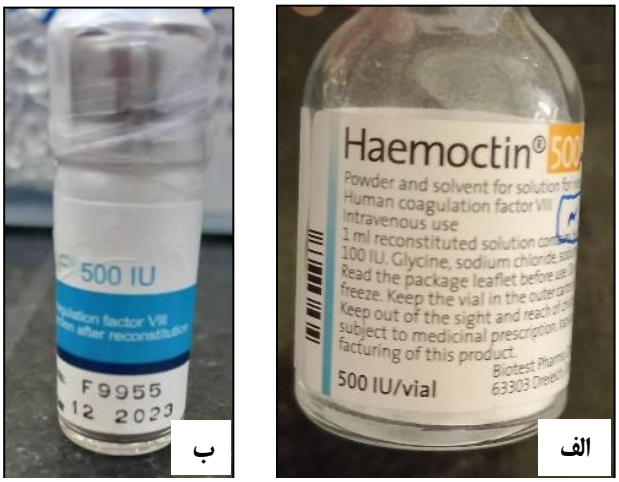
مرحله بیان: در این مرحله، محلول بیان که متشکل از ۱۸ ماده مختلف است جهت بیان ژن فاکتور VIII استفاده شد (شرکت شفامل- ایران). عصاره سلولی به دست آمده با نسبت برابر در مجاورت محلول بیانی تهیه شده قرار گرفت. این میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ ساعت در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۲۳).

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]

٪۵۰ v/v …… Cell extract

٪۵۰ v/v …… Expression solution (solution X)

تکنیک دات بلات: بدین منظور از کاغذ PVDF (Sigma- Germany) استفاده شد. نمونه فاکتور VIII مشتق از پلاسما (Biotest- Germany) تجاری تهیه شد و به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱–الف) سپس در معرض هوا و در دمای اتاق قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. در این تکنیک از آنتی بادی بیوتینیله ضد فاکتور VIII (Sigma- Germany) استفاده شد. برای آماده سازی غشا، به مدت ۵ دقیقه در متانول غوطه‌ور و سپس در محلول PBS قرار داده شد. سپس بر روی سطح مناسبی قرار گرفت و با مارکر علامت گذاری شد. نمونه‌ها و کنترل‌ها به مقدار ۳/۵ میکرولیتر بر روی کاغذ به صورت لکه قرار گرفتند. نمونه فاکتور VIII مشتق از پلاسما تجاری، تهیه شد و به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. سپس در معرض هوا و در دمای اتاق قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. سپس کاغذ بر روی شیکر و در مجاورت با محلول بلاک کننده به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس کاغذ سه بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه با محلول PBS/T شسته شد. در مرحله بعد، غشا به مدت ۱ ساعت با آنتی بادی بیوتینیله ضد فاکتور VIII با رقت ۱ به ۴۰۰ در PBS/T در شیکر مجاور گشت و مجدداً سه بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه با محلول PBS/T شسته شد. سپس غشا به مدت ۱ ساعت با استرپتوآویدین کونژوگه با آنزیم HRP با رقت ۱ به ۲۰۰۰ در PBS/T بر روی شیکر تیمار گشت و مجدداً سه مرحله و هر بار ۳۰ ثانیه با PBS/T شستشو داده شد. سپس محلول سوبسترا شامل ۱۵۰ میکرولیتر DAB و ۱۵۰ میکرولیتر Peroxidase buffer بر روی غشا ریخته شد و پس از ۱۵ دقیقه و ظاهر شدن لکه‌ها، با آب مقطر شستشو داده شد.



شکل ۱. الف: فاکتور VIII تجاری مشتق از پلاسما، ب: آنتی بادی ضد فاکتور VIII

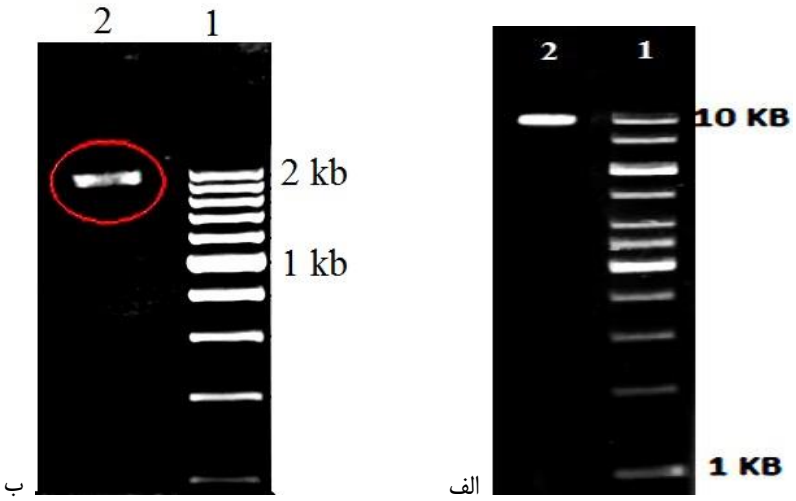
اندازه گیری آنتی ژن FVIII با تکنیک الایزا: آنتی ژن rhFVIII در محیط کشت توسط روش الایزا (Sandwich ELISA) روی میکروپلیت، پوشیده شده با آنتی بادی مونوکلونال آنتی hFVIII موشی، مورد سنجش قرار گرفت. ابتدا محلول بیانی واجد FVIII به چاهک‌ها اضافه شد و پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، سه بار با محلول شستشو (بافر فسفات دارای ٪۰/۰۵ توئین ۲۰) شسته شد. در ادامه به چاهک‌ها آنتی بادی مونوکلونال ضد hFVIII بیوتینیله اضافه گردید و پس از انکوباسیون و شستشو، آنزیم استرپتاویدین به چاهک‌ها اضافه گردید و پس از انکوباسیون مشابه مراحل قبل و ۵ بار شستشو ماده رنگ زا (TMB) اضافه شد و با اسید سولفوریک ۲ نرمال واکنش متوقف شد. رنگ به دست آمده در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. محلول بیانی فاقد پلاسمید به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

همه تست‌های این مطالعه سه بار تکرار گردید و جهت مقایسه میانگین نتایج کمی، در بررسی بیان پروتئین نوترکیب انسان FVIII، از آزمون آنالیز واریانس Tukey's post hoc استفاده گردید و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]

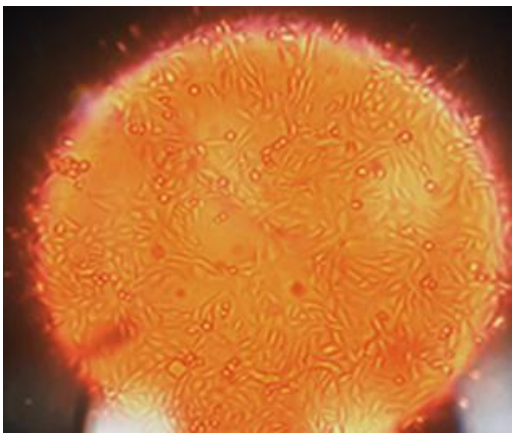
یافته ها

کلون، استخراج و هضم پلاسمید: تکثیر پلاسمید نوترکیب در میزبان باکتریایی انجام شد. وجود یک باند ۱۰ کیلوبازی در نتایج الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده، کیفیت پلاسمیدها را تایید کرد (شکل ۲–الف). پلاسمید استخراج شده، مربوط به اندازه cDNA FVIII (حدود ۲ کیلوبایت)، نیز توسط هضم kpnI پلاسمید نوترکیب تایید گردید. پلاسمید انتخاب شده برای تجزیه و تحلیل بیان در نظر گرفته شد (شکل ۲–ب).



شکل ۲. الف: باند حاصل از الکتروفورز پلاسمید خطی شده، ب: باند حاصل از الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی (ستون ۱: لدر، ستون ۲: نمونه)

کشت رده سلولی یوکاریوتی CHO-K1: سلول‌های رده CHO-K1، از لحاظ مرفولوژی و تعداد مورد بررسی قرار گرفتند و پس از رسیدن به تراکم ۸۰٪، جهت رسیدن به عدد ۵۰ میلیون سلول، به چندین فلاسک پاساژ داده شدند (شکل ۳).

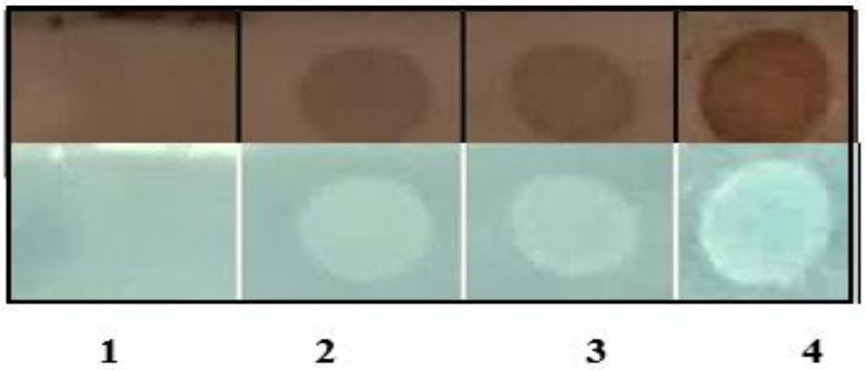


شکل ۳. بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی سلول‌های CHO-K1 یک هفته پس از ذوب شدن

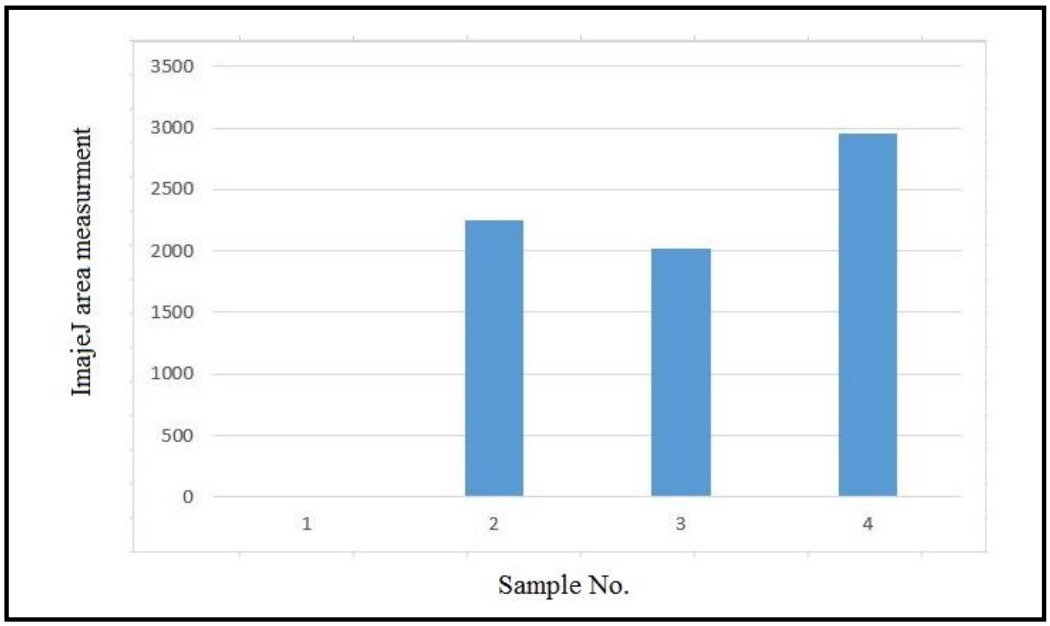
تجزیه و تحلیل بیان فاکتور VIII نوترکیب انسانی: محلول‌های بیانی پس از ۲۰ ساعت از انکوباتور خارج شده و سپس جهت تایید بیان از تکنیک دات بلات استفاده شد. روش پایه بیان بدون سلول، لکه پر رنگی بر روی کاغذ PVDF بر جای گذاشت. همچنین جهت مقایسه میزان بیان در نمونه‌ها، دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد امتحان گردید. نمونه کنترل منفی (نمونه ۱) فاقد لکه می‌باشد و لکه مربوط به نمونه پایه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]

تکنیک دات بلات، کمی پر رنگ‌تر از نمونه انکوبه شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۴). جهت آنالیز نتایج تکنیک دات بلات نیز با استفاده از نرم‌افزار image J نتایج به دست آمده تائید شد (شکل ۵).



شکل ٤. نتایج تکنیک دات بلات جهت بررسی بیان: ۱- کنترل منفی، ۲- نمونه انکوبه شده در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۳- نمونه انکوبه شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ٤- کنترل مثبت نمونه تجاری فاکتور VIII مشتق شده از پلاسما



شکل ۵. نتیجه آنالیز نتایج تکنیک دات بلات با نرم افزار image J (۱- کنترل منفی، ۲- نمونه پایه انکوبه شده در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۳- نمونه انکوبه شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ٤- کنترل مثبت مشتق شده از پلاسما)

با توجه به نتایج به دست آمده از تکنیک ELISA، بالاترین سطح بیان rFVIII در محلول بیانی به مدت ۲۰ ساعت، حدود ۲۷۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر برآورد شد (شکل ۶). جهت بررسی کمی نمونه‌ها و نیز به منظور بهینه سازی بیان، از ۳ نوع واکنش زیر به همراه کنترل (نمونه ۴) استفاده گردید (جدول ۱).

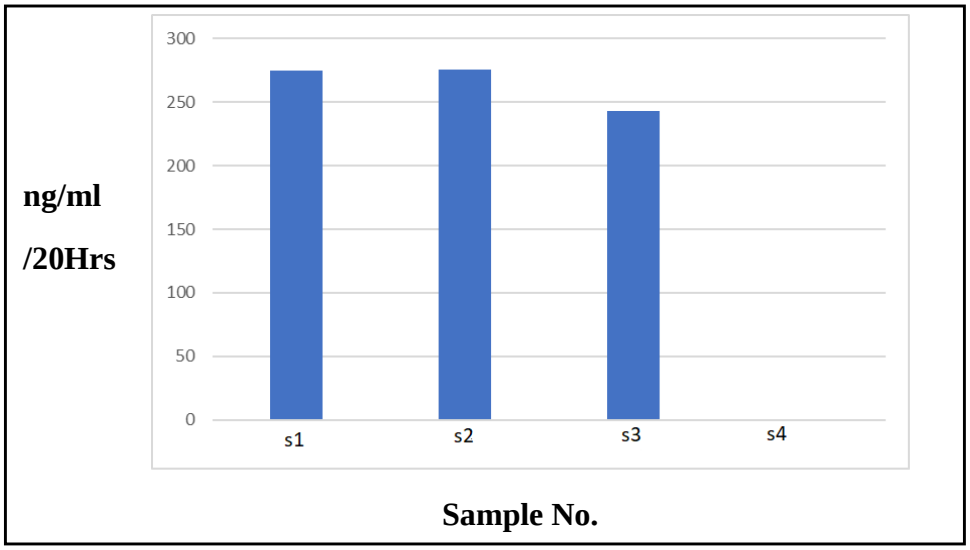
نمونه ۱: نمونه پایه شامل محلول بیانی و پلاسمید نوترکیب- ۲۰ ساعت دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

نمونه ۲: افزایش غلظت عصاره سلولی به میزان ۱/۴ برابر و فسفات به میزان ۱۰ برابر- ۲۰ ساعت دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

نمونه ۳: نمونه پایه شامل محلول بیانی و پلاسمید نوترکیب- ۲۰ ساعت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

نمونه ۴: نمونه محلول بیانی بدون اضافه کردن پلاسمید (کنترل منفی)- ۲۰ ساعت دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]



شکل ٦. بررسی کمی بیان FVIII در نمونه‌ها با تکنیک الایزا (s1: نمونه ۱، s2: نمونه ۲، s3: نمونه ۳، s4: نمونه ٤)

جدول ۱. مقایسه میزان بیان فاکتور VIII در نمونه‌ها

شماره نمونه‌ها	غلظت فاکتور VIII نوترکیب بیان شده (ng/ml)
نمونه ۱	۲۷۵
نمونه ۲	۲۷۶
نمونه ۳	۲۴۳
نمونه ۴	۰

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش بیان و سنتز فاکتور VIII نوترکیب انسانی با استفاده از روش بیان بدون سلول انجام گردید که بهترین دما برای واکنش بیانی عاری از سلول این داروی نوترکیب، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بوده است و همچنین بیشترین میزان بیان با ۱/۴ برابر کردن عصاره سلولی به دست آمد. با توجه به نسبت‌های متفاوت در نظر گرفته شده در این پژوهش، به نظر می‌رسد برای این واکنش بیانی، حالت پایه یعنی نسبت ۵۰/۵۰ عصاره سلولی و محلول بیانی مناسب می‌باشد. فاکتورهای VIII نوترکیب موجود در بازار همگی بر پایه سیستم in vivo و بیان داخل سلولی می‌باشند که با استفاده از رده‌های سلولی HEK، CHO و BHK طراحی، تولید و به فروش می‌رسند (جدول ۲) (۲۳). علت استفاده از این سیستم‌ها، تغییرات پس از ترجمه یا PTM مناسب و شرایط ساده‌تر کشت این رده‌های سلولی، بویژه رده سلولی CHO می‌باشد.

در این تحقیق برای اولین بار در کشور، از سیستم بیانی بدون سلول یوکاریوتی استفاده شد و با توجه به مطالعات دیگر در سراسر جهان، بیان فاکتور VIII نوترکیب با این روش تاکنون انجام نشده است. روش بیانی بدون سلول داروهای نوترکیب از جمله فاکتور VIII نوترکیب به ما این امکان را می‌دهد که از فرآیند تخلیص داروها که از مهم‌ترین قسمت کار تولید و مستلزم هزینه بالایی است، بی‌نیاز شده یا به فرآیند بسیار ساده و مختصری از تخلیص محصول نیاز باشد. در مطالعات دیگر، با روش بیان بدون سلول، پروتئین‌هایی مثل پروتئین‌های غشایی، سنتز شده‌اند که غلظت به دست آمده از این پروتئین‌ها، ۴۹ میکروگرم در میلی‌لیتر و۹۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (۱۴). در مطالعه ما بیان و سنتز این داروی نوترکیب با سیستم بیانی بدون سلول، ۲۷۶ نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش شد که دلیل کمتر بودن این غلظت در مقایسه با مطالعات ذکر شده، می‌تواند به دلیل وزن مولکولی بسیار بالای این پروتئین (۲۸۰ کیلو دالتون) نسبت به پروتئین‌های معمول از جمله پروتئین‌های غشایی که وزن مولکولی سبک‌تری دارند، باشد، که احتمالاً بیان و سنتز دشوارتری از دیگر پروتئین‌های نوترکیب کوچکتر دارد.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]

جدول ۲. فاکتورهای VIII نوترکیب موجود در بازار (مبتنی بر بیان سلولی)

نام محصول	تاریخ دریافت تاییدیه سازمان غذا و دارو	تغییرات ژنتیکی بر روی قطعه ژنومی فاکتور VIII	رده سلولی میزبان
Kogenate FS	۱۹۹۳	Full length	BHK
Hleixate FS	۱۹۹۳	Full length	BHK
Advate	۲۰۰۳	Full length	CHO
Moroctocog alfa (Xyntha)	۲۰۰۸	BDD	CHO
Turoctocog alfa (NovoEight)	۲۰۱۳	B-domain truncated	CHO
Simoctocog alfa (Nuwiq)	۲۰۱۵	Full length	HEK
Octocog alfa (Kovaltry)	۲۰۱۶	Full length	BHK
rVIII-single (Afstyla)	۲۰۱۶	B-domain and four amino-acids of a3 domain deleted	CHO
rFVIIIFc (Eloctae)	۲۰۱۴	BDD rFVIII with fused Fc	HEK
rFVIII-pegylated (Adynovate)	۲۰۱۵	Full-length rFVIII	CHO

در مطالعه Brödel و همکاران، با استفاده از لیزات سلولی با غلظت ۵۰۰ میلیون سلول در میلی‌لیتر، در مدت زمان واکنش ۴ ساعت در دمای واکنش ۳۳ درجه سانتی‌گراد، پروتئین لوسیفراز سنتز شده است (۱۴). دمای واکنش این پژوهش با مطالعه ما تقریباً مشابه بوده است ولی مدت زمان بیان آن بسیار پایین‌تر از مطالعه ما بوده که یک دلیل آن می‌تواند بیان و سنتز ساده‌تر این پروتئین با وزن مولکولی بسیار کمتر از پروتئین فاکتور VIII باشد. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، Thoring و همکاران جهت سنتز پروتئین‌های غشایی از لیزات، از غلظت ۵۰۰ میلیون سلول در میلی‌لیتر، در مدت زمان ۵۱ ساعت و دمای واکنش ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. همچنین در این مطالعه به منظور بهینه سازی و بیان حداکثر از روش بیان بدون سلول با تعویض مداوم (continuous exchange cell-free systems) استفاده گردید که پایه این روش بر اساس واکنش و یک محفظه تغذیه جداگانه است که با یک غشای نیمه تراوا جدا شده است و در نتیجه، انرژی به طور دائم به محفظه واکنش می‌رسد و همچنین مواد زائد حاصل از واکنش که می‌توانند مهار کننده ادامه واکنش نیز باشند از محفظه واکنش حذف می‌شوند (۲۴). با توجه به هزینه‌بر بودن این روش، استفاده از این روش در این مطالعه امکان پذیر نبود.

در نتیجه از آن جایی که محصول حاصل از روش بیان و سنتز بدون سلول، بر خلاف کلونینگ و بیان سلولی، نیاز به تخلیص پر هزینه ندارد، می‌تواند از نظر زمانی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت باشد. در آینده، بیان بیشتر داروهای نوترکیب می‌تواند با استفاده از روش بیان بدون سلول با هزینه کمتر و بدون انجام تکنیک زمانبر و پر هزینه کلونینگ انجام گیرد. البته امروزه تعداد انگشت شماری از شرکت‌های تجاری بیوتکنولوژیک آمریکا و کشورهای اروپایی در این زمینه فعالیت خود را آغاز نموده و تا به امروز، کیت بیان بدون سلول برخی از پروتئین‌های انسانی را تولید نمودند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل به جهت حمایت از تحقیق، همچنین از شرکت دانش بنیان شفا زیست ارمون آمل، مستقر در مرکز رشد فناوری و نوآوری دانشگاه علوم پزشکی بابل، به دلیل حمایت‌های دانشی و فنی قدردانی می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]

References

1.Selvaraj SR, Scheller AN, Miao HZ, Kaufman RJ, Pipe SW. Bioengineering of coagulation factor VIII for efficient expression through elimination of a dispensable disulfide loop. J Thromb Haemost. 2012;10(1):107-15.

2.Krishnamoorthy S, Liu T, Drager D, Patarroyo-White S, Chhabra ES, Peters R, et al. Recombinant factor VIII Fc (rFVIIIFc) fusion protein reduces immunogenicity and induces tolerance in hemophilia A mice. Cell Immunol. 2016;301:30-9.

3.Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. Thromb Res. 2007;119(1):1-13.

4.Thompson AR. Structure and function of the factor VIII gene and protein. Semin Thromb Hemost. 2003;29(1):11-22.

5.Orlova NA, Kovnir SV, Vorobiev II, Yuriev AS, Gabibov AG, Vorobiev AI. Stable Expression of Recombinant Factor VIII in CHO Cells Using Methotrexate-Driven Transgene Amplification. Acta Naturae. 2012;4(1):93-100.

6.Mcpherson RA, Pincus MR. Henry's Ckinical Diagnosis and management by laboratory methods, 24th ed. Elsevier; 2021. p. 837-40.

7.Kasper CK, Pool JG. Letter: Measurement of mild factor VIII inhibitors in Bethesda units. Thromb Diath Haemorrh. 1975;34(3):875-6.

8.Peerschke EI, Castellone DD, Ledford-Kraemer M, Van Cott EM, Meijer P; NASCOLA Proficiency Testing Committee. Laboratory assessment of factor VIII inhibitor titer: the North American Specialized Coagulation Laboratory Association experience. Am J Clin Pathol. 2009;131(4):552-8.

9.Saenko EL, Ananyeva NM, Shima M, Hauser CA, Pipe SW. The future of recombinant coagulation factors. J Thromb Haemost. 2003;1(5):922-30.

10.Mazurkiewicz-Pisarek A, Płucienniczak G, Ciach T, Płucienniczak A. The factor VIII protein and its function. Acta Biochim Pol. 2016;63(1):11-6.

11.Sandberg H, Kannicht C, Stenlund P, Dadaian M, Oswaldsson U, Cordula C, et al. Functional characteristics of the novel, human-derived recombinant FVIII protein product, human-cl rhFVIII. Thromb Res. 2012;130(5):808-17.

12.Kannicht C, Ramström M, Kohla G, Tiemeyer M, Casademunt E, Walter O, et al. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. Thromb Res. 2013;131(1):78-88.

13.Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, Kubick S. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. Chembiochem. 2015;16(17):2420-31.

14.Brödel AK, Sonnabend A, Kubick S. Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. Biotechnol Bioeng. 2014;111(1):25-36.

15.Kim KJ, Lee SJ, Kim DM. The Use of Cell-free Protein Synthesis to Push the Boundaries of Synthetic Biology. Biotechnol Bioprocess Eng. 2023;28:922-8.

16.Monck C, Elani Y, Ceroni F. Cell-free protein synthesis: biomedical applications and future perspectives. Chem Eng Res Des. 2022;177:653-8.

17.Sato W, Rasmussen M, Deich C, Engelhart AE, Adamala KP. Expanding luciferase reporter systems for cell-free protein expression. Sci Rep. 2022;12(1):11489.

18.Westbrook A, Tang X, Marshall R, Maxwell CS, Chappell J, Agrawal DK, et al. Distinct timescales of RNA regulators enable the construction of a genetic pulse generator. Biotechnol Bioeng. 2019;116(5):1139-51.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]

19.Hu VT, Kamat NP. Cell-free protein synthesis systems for vaccine design and production. Curr Opin Biotechnol. 2023;79:102888.

20.Warfel KF, Williams A, Wong DA, Sobol SE, Desai P, Li J, et al. A Low-Cost, Thermostable, Cell-Free Protein Synthesis Platform for On-Demand Production of Conjugate Vaccines. ACS Synth Biol. 2023;12(1):95-107.

21.Gregorio NE, Levine MZ, Oza JP. A User's Guide to Cell-Free Protein Synthesis. Methods Protoc. 2019;2(1):24.

22.Kardar GA, Zomorodipour A, Moin M, Pourpak Z, Sadeghi M, Ataei F. The effects of novel mutations in A1 domain of human coagulation factor VIII on its secretion level in cultured mammalian cells. Iran J Biotechnol. 2010;8(3):139-49.

23.Cafuir LA, Kempton CL. Current and emerging factor VIII replacement products for hemophilia A. Ther Adv Hematol. 2017;8(10):303-13.

24.Thoring L, Dondapati SK, Stech M, Wüstenhagen DA, Kubick S. High-yield production of "difficult-to-express" proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates. Sci Rep. 2017;7(1):11710.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.17]