مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۱، شماره ۳، پائیز ۱۳۹۸

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

تولید پروتئین‌های نوترکیب از طریق مهندسی ناقل‌های ویروسی

علی‌اکبر غلامی [۱*]، علی نیازی[۲] و فاطمه سعید[۳]

۱- دانشجوی دکتری، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران

۲- استاد پژوهشکده زیست فناوری دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

۳-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی کشاورزی و منابع طبیعی شیروان، ایران

gholami.2359@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۰۶، تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۱۹

صفحه ۷۴-۵۱

چکیده

تولید پروتئین‌های نوترکیب از مهم‌ترین دستاوردهای بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در سال‌های اخیر بوده است. امروزه تقاضای زیادی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب جهت درمان و تشخیص وجود دارد. بنابراین، محققان در تلاش برای توسعه مدل‌های تراریخته مختلف جهت تولید این داروها هستند. از آنجا که یک ژن خارجی را می توان در سیستم‌های میزبانی مختلف بیان کرد، بنابراین، یافتن یک سیستم بیان با کارایی و ایمنی زیستی بالا امری ضروری است. از جمله سیستم‌های ایجاد شده برای تولید پروتئین‌های نوترکیب می توان به باکتری‌ها، مخمرها، گیاهان و حیوانات اشاره کرد. انتخاب نوع سیستم بیان برای تولید هر پروتئین نوترکیب مشکل است. روش‌های مختلفی برای انتقال ژن و تولید محصولات تراریخته وجود دارد، اما همه‌ی روش‌های انتقال ژن در تولید محصولات تراریخته کارا نیستند. امروزه یکی از ابزارهای مؤثر و پرکاربرد برای انتقال ژن، ناقل‌های ویروسی هستند. ناقل‌های ویروسی به دلیل توانایی بالای آن‌ها در الحاق ژن به سلول میزبان مورد توجه محققان قرار گرفته است. حذف برخی ژن‌های اصلی و کد کننده پروتئین‌های ساختاری ویروس به صورت جداگانه توسط ناقل‌های کمک‌کننده، بهبود یافته است و همچنین برای بسته‌بندی پیکره ویروس از سلول‌های بسته‌بندی کننده استفاده شده است، که این امر ایمنی کار با این ناقل‌های ویروسی را بالاتر می‌برد. در بین ناقل‌های ویروسی، ناقل‌های لنتی‌ویروس یکی از قوی‌ترین و پرکاربردترین ناقل‌های موجود هستند. تاکنون سه نسل از ناقل‌های لنتی‌ویروس طراحی شده است، به‌طوری‌که هر نسل نسبت به نسل قبل ایمنی زیستی بالاتری داراست.

واژه‌های کلیدی: پروتئین نوترکیب، ناقل‌های ویروسی، لنتی‌ویروس، HIV-1.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

مقدمه

پروتئین‌ها به‌عنوان اساس و بنیان ساختار حیات می‌باشند، که همه‌ی موجودات زنده این مولکول‌ها را به‌عنوان بخشی از متابولیسم طبیعی بدن خود تولید می‌کنند. پروتئین‌ها نقش مهمی را در پیام‌رسانی سلولی، پاسخ ایمنی، چسبندگی سلولی و چرخه سلول ایفا می‌کنند (۱). در حال حاضر تخمین زده شده است که بین ۲۵۰۰۰- ۴۰۰۰۰ ژن مختلف در ژنوم انسان وجود دارد. با پیرایش‌های متعدد و تغییرات پس از ترجمه (گلیکوزیلاسیون، فسفریلاسیون، استیلاسیون) تعداد پروتئین ها با عملکرد متفاوت بسیار بیشتر خواهد بود (۲).

از پروتئین‌ها به صورت گسترده در تحقیقات پزشکی و صنعت استفاده می شود، اما استخراج پروتئین از منابع طبیعی خود دشوار و پرهزینه بوده و علاوه‌براین استفاده از این پروتئین‌ها می‌تواند خطراتی به دنبال داشته باشد. به عنوان مثال بسیاری از مردم در معرض بیماری‌های ناشی از فراورده‌های آلوده خونی و هورمونی قرار دارند. در ضمن برخی پروتئین‌ها مانند قطعات تک زنجیره FV به‌طور طبیعی یافت نمی‌شوند. فن‌آوری دی.ان.ای نوترکیب امکان تولید طیف گسترده‌ای از پپتیدها و پروتئین‌ها را در سلول‌های طبیعی فراهم می‌کند (۳). پروتئین‌های دارویی یکی از گران‌ترین و مهم‌ترین محصولاتی است که بشر توانسته است از راه‌هایی غیر از روش طبیعی، آن‌ها را سنتز کند. در حال حاضر حدود ۲۰ پروتئین نوترکیب در بازار وجود دارد که ۶۰٪ فروش آن‌ها مربوط به شش پروتئین داروئی است که عبارتند از: اریتروپویتین، عامل محرک کلونی گرانولوسیت، واکسن هپاتیت B، هورمون رشد انسانی، انسولین و آلفا اینترفرون (۴). پروتئین‌های دارویی دارای مزایای متعددی نسبت به داروهای شیمیایی هستند از این‌رو تقاضا برای داروهای زیستی روز به روز در حال افزایش است (۲). چون به‌طور معمول قیمت این داروها، فراوانی آن‌ها را محدود می‌کند لازم است سیستم‌هایی توسعه یابند که بتواند داروهای زیستی را با قیمت مناسب در اختیار مصرف‌کنندگان قرار داد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

سیستم‌های رایج تولید پروتئین مانند استفاده از روش‌های فرمانتاسیون باکتریایی و سیستم‌های مخمری دارای عملکرد و کیفیت پایین هستند و جوابگوی تقاضای رو به افزایش بازار برای داروهای زیستی نیستند. افزایش حجم و میزان باکتری‌های نوترکیب برای تولید بیشتر پروتئین‌های دارویی می‌تواند امنیت زیستی بشر را به خطر اندازد. همچنین استفاده از باکتری‌ها و قارچ‌ها امکان آلودگی محصول به پاتوژن‌های بیماری‌زای انسانی را افزایش می‌دهد (۵).

تغییر ساختار پروتئین به خاطر فرآیند پردازش و بسته‌بندی متفاوت بعد از ترجمه ژن هدف از دیگر مشکلات اساسی این سیستم‌ها است که این امر به خاطر تفاوت در ساختار سلول‌های یوکاروتی و پروکاریوتی است (۶). سیستم‌های گیاهی می‌توانند روش مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب باشند اما مشکل تفاوت فرایند گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون و بسته‌بندی پروتئین‌ها بعد از ترجمه و امکان آلودگی با عوامل بیماری‌زایی جدید مانند قارچ‌ها و باکتری‌های موجود در خاک، در گیاه نیز وجود دارد (۵،۷، ۸). در حالی‌که در سیستم‌های حیوانی، پروتئین نوترکیب تولید شده شباهت زیادی به پروتئین طبیعی تولید شده در بدن انسان دارند. علاوه بر مزیت یادشده سیستم‌های حیوانی خطری برای امنیت زیستی ایجاد نمی‌کنند، امکان تولید انبوه پروتئین نوترکیب وجود دارد و در این سیستم‌ها خطرات ناشی از پاتوژن‌های عامل بیماری انسان و یا سموم بالقوه خطرناک کاهش یافته است (۵). تولید حیوانات تراریخته به عنوان یک بیورکتور برای تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌تواند راه‌حلی برای محدودیت‌های سیستم فرمانتاسیون سلول‌های یوکاریوتی باشند. تاکنون حیوانات تراریخته زیادی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و استخراج پروتئین دارویی از فراورده آن‌ها تولید شده‌اند. برخی شرکت‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از سیستم‌های فرمانتاسیون سلول پستاندار استفاده می‌کنند. این سیستم‌ها می‌توانند پروتئین‌های نوترکیبی، کاملاً مشابه با نوع طبیعی آن تولید کنند. با این

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

وجود، این سیستم‌ها دارای محدودیت‌هایی است، از جمله آن که برای به دست آوردن کلون بیان‌کننده ژن هدف با بیان دائم زمان زیادی نیاز است. همچنین برای به دست آوردن هر گرم پروتئین نوترکیب به طوری که هزینه هر گرم از پروتئین نوترکیب معادل ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ دلار بوده، که بسیار هزینه‌بر است (۹). روش‌های مختلفی برای انتقال ژن و تولید محصولات تراریخته وجود دارد، اما همه‌ی روش‌های انتقال ژن در تولید محصولات تراریخته کارا نیستند. از جمله روش‌های انتقال ژن می‌توان به روش‌های شیمیایی مانند فسفات- کلسیم، روش‌های فیزیکی مانند ریز تزریقی و روش‌های استفاده از ناقل‌های ویروسی مانند ناقل‌های آدنوویروسی و لنتی‌ویروسی را نام برد.

انتقال ژن با ناقل‌های ویروسی

در روش‌های غیر ویروسی، انتقال ژن که شامل روش‌های فیزیکی و شیمیایی است، درصد موفقیت پایین بوده و نمی‌توان انتظار داشت که قطعه‌ی هدف با نسبت مناسبی در ژنوم میزبان وارد شود. در واقع این احتمال که قطعه‌ی هدف در ژنوم القا شود، بسیار اندک است و قطعه‌ی دی.ان.ای آزاد تنها برای مدت کوتاهی قادر است جدا از دی.ان.ای کروموزومی سالم بماند و بعد از مدتی به وسیله‌ی آنزیم‌های سلولی مورد تجزیه قرار می‌گیرد (۱۰)، ویروس‌ها به طور طبیعی توانایی بالایی در انتقال و الحاق ژنوم خود در ژنوم سلول میزبان را دارند (۱۱). افزایش اطلاعات در مورد چرخه زندگی ویروس‌ها باعث شده است تا با حذف و جایگزینی برخی از ژن‌های ویروسی و قرار دادن ژن هدف در ساختار ژنتیکی آن‌ها ویروس‌های نوترکیبی را ایجاد کرد که برای اهداف انتقال ژن استفاده شود (۱۲). در تمام ناقل‌های ویروسی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک حذف‌هایی در ژن‌های اصلی و فرعی ویروس ایجاد شده است و این ویروس‌های نوترکیب تنها قادر به الحاق دی.ان.ای هدف در ژنوم سلول‌های میزبان هستند. برای ساخته شدن کامل ناقل‌های ویروسی نوترکیب عناصر لازم به‌صورت جداگانه توسط پلاسمیدهای کمک‌کننده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

تأمین می‌شود و برای بسته‌بندی ویروس از سلول‌های بسته‌بندی‌کننده استفاده می شود که این امر ایمنی کار با این ناقل‌های ویروسی را بالاتر می‌برد. برای اینکه ناقل ویروسی بتواند دامنه وسیع‌تری از سلول‌ها را آلوده کند، پوشش ویروسی را با پوشش ویروس‌هایی که دارای کارایی بیشتری هستند و تعداد بیشتری از سلول ها را آلوده می‌کنند، تعویض می‌شود (۱۰،۱۳).

ناقل‌های ویروسی مبتنی بر دی.ان.ای

- ناقل‌های آدنو ویروس

این ناقل‌ها از ویروس‌های آدنوویروس که ذرات ویروسی بدون پوشش به اندازه ۹۰ تا ۱۰۰ نانومتری هستند، مشتق شده‌اند. این ناقل‌ها قدرت الحاق دی.ان.ای به دامنه وسیعی از سلول‌ها، هم در شرایط in vitro و هم شرایط in vivo را دارا هستند. نوع وحشی ویروس باعث بیماری‌های تنفسی و دیگر بیماری های عفونی در انسان می‌شود (۱۴). برای تولید این ناقل‌ها، دی.ان.ای دو رشته‌ای ویروس استخراج شده و قسمت‌های مربوط به عناصر cis از توالی دی.ان.ای که در بسته‌بندی ویروس نقش دارند را حذف کرده و قطعه‌ی هدف را در ترکیب دی.ان.ای ویروس اضافه می‌کنند. در این ناقل‌ها بخش‌هایی از دی.ان.ای ویروسی که سیگنال‌های بسته‌بندی را رمز می‌کند و همچنین، LTR '۵ بدون تغییر باقی می ماند (۱۵، ۱۶). آدنوویروس‌ها از ناقل‌ها انتقال‌دهنده ژن بسیار خوب به شمار می روند و برای سطوح بیانی بالا در تولیدات تراژن و در سلول‌های کشت‌شده استفاده می‌شود، همچنین این ویروس به‌عنوان یک ویروس نوترکیب بالقوه برای ژن‌درمانی است (۱۷). این ویروس‌ها دارای ژنوم بسیار ساده بوده و دستورزی و مهندسی آن بسیار آسان است، پایدارند و قابل انتقال به تیپ‌های زیادی از سلول‌ها در حیوانات مختلف بوده و توانایی الحاق ژن، هم در سلول‌های در حال تقسیم و هم سلول‌های رشدیافته می‌باشند (۱۵، ۱۷). این ناقل‌ها توانایی بسته‌بندی قطعاتی در حدود ۸/۳ جفت باز را دارا هستند (۱۸).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

- ناقل‌های Adeno-Associated (AAV) Viruses vector

این ناقل‌ها از ویروس‌های بدون پوشش بسیار ساده از خانواده‌ی پاراویریده بدست می‌آیند. دی.ان.ای این ویروس‌ها تک‌رشته‌ای است و ویروس طبیعی دارای ژنوم ۴/۷ جفت باز بوده که بین دو LTR دارای ۱۴۵ نوکلئوتیدی قرار دارد (۱۹). این ویروس دارای ۲ ژن مهم *rep* و *cap* است که *rep* پروتئین‌های مرتبط با چرخه حیات ویروسی و *cap* پروتئین‌های ساختاری ویروس را رمز می‌کند (۲۰). این ناقل به خاطر بیماری‌زا نبودن و ایمونوژنیسیتی کم، پایداری و پتانسیل آن برای القای ژن به‌عنوان یک ناقل خوب برای ژن‌درمانی ظاهر شد (۲۰). تاکنون هیچ نوع بیماری مرتبط با این ویروس، چه در انسان و چه در جمعیت‌های حیوانی گزارش نشده است. همچنین، توانایی این ویروس برای الحاق ژن هم در سلول‌های در حال تقسیم و هم سلول‌های بالغ و بیان طولانی‌مدت ژن توسط این ناقل در بافت‌هایی مانند مغز، ماهیچه‌های اسکلتی و کبد باعث شده است که این ویروس به عنوان یک ناقل ایده‌آل برای انتقال ژن و ژن‌درمانی تلقی می‌شود (۱۵، ۲۱، ۲۲).

- ناقل‌های هرپس ویروس

این ناقل‌ها از ویروس‌های هرپس ویروس که ویروس‌های پوشش‌دار با دی.ان.ای دو رشته‌ای به طول ۱۵۰ جفت باز است، تولید می‌شوند. دو نوع هرپس ویروس به عنوان ناقل گسترش یافته که شامل EBV و HSV است (۱۰، ۱۹، ۲۳). به دلیل اینکه تأثیر آلوده‌سازی HBV تنها محدود به سلول‌های لنفوسیت B و تعداد کمی از سلول‌های دیگر است به‌عنوان یک ناقل انتقال ژن متداول استفاده نمی‌شود درحالی‌که HSV به دلیل آلوده سازی دامنه وسیع‌تری از سلول‌ها، بیشتر از آن به‌عنوان یک ناقل انتقال ژن استفاده می‌شود (۱۰، ۲۴).

ناقل‌های ویروسی مبتنی بر آر.ان.ا

- ناقل‌های رتروویروسی

رتروویروس‌ها دارای پوشش پروتئینی بوده و ماده‌ی ژنتیکی این ویروس‌ها،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

آر.ان.ا است. ویژگی مهم این ویروس‌ها، رونویسی معکوس و الحاق ماده‌ی ژنتیکی به ژنوم سلول است (۱۹، ۲۵، ۲۶). این ویروس‌ها بعد از اتصال به سلول، ماده‌ی ژنتیکی خود را که به فرم آر.ان.ای تک‌رشته‌ای بوده وارد سلول کرده و به کمک آنزیم ریورس ترانس‌کریپتاز آر.ان.ای تک‌رشته‌ای را به دی.ان.ای دو رشته‌ای تبدیل کرده و درون ژنوم سلول الحاق می‌کنند. تمامی رتروویروس‌ها دارای ۳ ژن اساسی بوده که برای ساخت دوباره و سرهم‌بندی ویروس مورد نیاز هستند که این ژن‌ها شامل *gag*, *pol*, *env* هستند. *gag* پروتئین‌های ساختاری، *env* پروتئین‌های پوشاننده و *pol* پروتئین‌های مربوط به پردازش ژنوم ویروسی را تولید می‌کنند. رتروویروس‌هایی که دارای پیچیدگی بیشتری هستند (مانند HIV-1) دارای ژن‌های فرعی بوده که برای دوام و رونوشت ژنوم ویروس به‌کارمی‌رود (۱۴). ویروس‌های نوترکیب با حذف توالی‌های خاص در ژنوم ویروس و جایگزین کردن ژن هدف در ژنوم ویروس ایجاد می‌شود. در این ناقل‌ها به خاطر حذف‌های ویژه در ژنوم ویروس، خطر بیماری‌زایی ویروس از بین می‌رود به طوری که این ناقل‌ها تنها قادرند دی.ان.ای هدف را طی یک چرخه‌ی آلوده سازی سلولی در ژنوم میزبان الحاق کنند (۲۷). بیشترین ناقل‌های رتروویروسی از آنکوویروس‌ها مانند MLV و یا لنتی‌ویروس‌ها مانند HIV1، SIV، EILV، FLV، BIV بدست می‌آیند (۲۸).

- ناقل‌های لنتی‌ویروس

لنتی‌ویروس‌ها از خانواده رتروویروسها بوده و در گروه لنتی‌ویرینه‌ها قرار دارد. این ویروس‌ها دارای پوشش پروتئینی بوده و دارای ژنوم آر.ان.ا به همراه ریورس ترانس کریپتاز معکوس هستند (۲۹). ذرات ویروسی حدود ۱۰۰ نانومتر بوده و دارای ژنوم ۹-۱۰ جفت باز هستند (۳۰). تیپ وحشی این ویروس‌ها باعث بیماری نقص ایمنی در انسان و موجودات مختلف می‌شود (۳۱). ژنوم ویروسی دارای قسمت‌های مختلف است که هر کدام دارای نقش خاصی در چرخه زندگی ویروس دارا هستند. ناقل‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

لنتی‌ویروسی با ایجاد حذف‌هایی در برخی از ژن‌های اصلی و فرعی ویروس و مهندسی بر روی ژنوم ویروسی به دست می‌آیند. از ویژگی‌های مثبت ناقل‌های لنتی‌ویروسی که باعث برتری این ناقل‌ها نسبت به دیگر ناقل‌های ویروسی شده می‌توان به موارد زیر اشاره کرد.

- قدرت الحاق‌کنندگی بالا و بیان پایدار ژن موردنظر در ترکیب دی.ان.ای سلول‌های هدف (۳۲).
- امکان درج قطعه جدید هم در سلول‌های بالغ و هم در سلول‌های در حال تقسیم (۳۴، ۳۵).
- عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته و بیان خالص ژن رمزکننده پروتئین و تولید پروتئین دارویی خالص به‌خاطر عدم وجود هیچ‌گونه قطعه رمزکننده پروتئین‌های ویروسی در ویروس نوترکیب (۳۶، ۳۷).
- امنیت زیستی بالا به‌خاطر حذف تمام قطعه‌های بیماری‌زای ویروس و عدم ایجاد پاسخ‌ایمنی به‌دلیل نیمه عمر پایین پروتئین‌های ساختاری ویروس (۳۸).
- قدرت انتقال قطعه‌های بزرگ‌تر
- تولید ویروس نوترکیب در مدت زمان بسیار کوتاه

که با توجه به این ویژگی‌ها است که ناقل‌ها لنتی‌ویروسی می‌توانند ابزار مناسبی برای انتقال ژن، ژن درمانی و تولید حیوانات نوترکیب باشند.

آشنایی با ناقل‌های لنتی ویروسی

رتروویروس‌ها و لنتی‌ویروس‌ها در بخشی از چرخهٔ زندگی، ژنوم خود را در ژنوم میزبان وارد کرده بنابراین می‌توانند ابزاری برای بیان طولانی مدت یک تراژن را حتی برای تمام عمر فراهم کنند. به‌دلیل آنکه ویروس‌های وحشی و طبیعی موجود در طبیعت سبب ایجاد بیماری می‌شوند، در طراحی ناقل‌های ویروسی قابلیت تکثیر ویروس‌ها حذف شده یا تغییر داده می‌شود. در تولید ناقل‌های ویروسی ایدهٔ پایه این است که ویروسی تولید شود که پس از یک چرخهٔ عفونت، تراژن به‌طور پایدار در ژنوم میزبان وارد شده و بیان شود. این ویروس باید تغییریافته باشد به طوری‌که تنها تعداد محدودی از ژن‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

مورد نیاز ویروس در ژنوم ناقل مهندسی شده وجود داشته باشد و با همین تعداد اندک ژن‌های ضروری، ژنوم ناقل ویروسی به خوبی در یاخته میزبان بیان شود. با این استراتژی، ژن نوترکیب موردنظر به‌طور مداوم بیان می‌شود، اما ویروس عفونی تولید نمی‌شود. برای ایجاد چنین ناقل ویروسی، روش متداول پذیرفته شده، کلونینگ اجزای مختلف ژنوم در سه یا چهار پلاسمید مختلف و سپس انتقال هم‌زمان این پلاسمیدها به منظور تولید ویروس در یک رده‌ی سلولی مناسب است. برخلاف رتروویروس‌ها که قابلیت درگیر نمودن سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند را ندارند، لنتی‌ویروس‌ها سلول های در حال استراحت و تمایزیافته را مشابه سلول‌هایی که فعالانه تقسیم می‌شوند درگیر می‌کنند و به همین دلیل بر سایر رتروویروس‌ها برتری دارند (۳۹). تاکنون لنتی‌ناقل‌ها را به‌طور مؤثری در شرایط آزمایشگاه به سلول‌های تمایزیافته‌ای نظیر سلول‌های مغز، چشم، کبد و سلول‌های خون‌ساز وارد کرده‌اند و این لنتی‌ناقل‌های حامل ژن‌های نوترکیب بیان طولانی‌مدت تراژن را فراهم کرده‌اند. مزیت دوم ناقل‌های لنتی‌ویروسی این است که ژنوم این ویروس‌ها ظرفیت ورود توالی‌های نسبتاً بزرگ از تراژن را دارد. اگرچه تاکنون ویروس‌های عامل کم‌خونی عفونی اسب (Feline Immunodeficiency Virus) (FIV)، نقصان ایمنی گربه (Equine Infectious Anemia Virus) (EIAV) و نقصان ایمنی گاو (Bovine Immunodeficiency Virus) (BIV) به‌عنوان ابزارهای ژن‌درمانی استفاده شده‌اند، اما ناقل‌های برمبنای ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) بیشتر توسعه‌یافته و منجر به بهبود طراحی ناقل شده‌اند (۴۰، ۴۱، ۴۲). در طی سال‌های اخیر پیشرفت‌های شایان توجهی در طراحی ناقل‌های لنتی‌ویروسی برمبنای HIV-1 برای ممانعت از تولید تصادفی ویروس‌هایی که از نظر ازدیاد کامل هستند، صورت گرفته است (۴۳). در تمام این تلاش‌ها هدف جلوگیری از نوترکیبی بین اجزای مختلف ناقل و متعاقب آن عفونت است. از عمده‌ترین روش‌ها برای رسیدن به این هدف، حذف

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

عناصر cis از سازه بسته‌بندی، حذف ژن‌های فرعی HIV، جزءبندی نمودن بخش‌های مختلف بسته‌بندی در پلاسمیدهای مجزا، استفاده از سازه‌های بیانی مجزا و به حداقل رساندن همولوژی یا شباهت بین عناصر مختلف تولید ناقل است (۴۴).

برای تولید لنتی‌ناقل‌های القاکننده، نخستین مرحله، انتقال ناقل‌ها به سلول های میزبان است. برای انتقال بیشتر از رده سلولی HEK-293T (Human Embryonic Kidney cell cultures) که آنتی‌ژن اصلی SV40-T (*Siman Virus* S40) را بیان می‌کنند استفاده می‌شود (۳۹).

بر اساس نوع سیستم بسته‌بندی، یک یا دو عدد از پلاسمیدهای بسته‌بندی شامل ژن‌های ساختاری ویروس، یک پلاسمید حاوی تراژن و عناصر cis مورد نیاز برای فراگرفتن و بسته‌بندی و یک پلاسمید حاوی ژن رمزکنندهٔ انولوپ هترولوگ (اغلب VSV-G) برای تولید ناقل لنتی ویروسی استفاده می‌شود (۴۵).

تولید ناقل‌های لنتی‌ویروسی تیپ کاذب بر مبنای HIV-1 به منظور انتقال ژن

در چند سال اخیر مشخص شده است در بین ناقل‌های لنتی‌ویروسی، ناقل‌هایی که مشتق شده از HIV-1 هستند، بهترین نوع ناقل‌ها هستند. ژنوم HIV حاوی ۹ چارچوب خوانش است و حداقل برای ۱۵ پروتئین مشخص رمز صادر می‌کند (۳۷). درعین حال در ژنوم این ویروس مقداری عناصر cis عمل‌کننده (cis acting) نیز وجود دارد. این عناصر برای تکثیر و تولید اولیه‌ی لنتی‌ویروس‌ها ضروری نیستند، اما در مراحل مختلف چرخهٔ زندگی ویروس برای بلوغ ذره‌ی لنتی ویروسی لازم بوده و شامل LTR، ناحیهٔ فعال‌کنندهٔ Tat activating Region (tat)، نواحی گیرنده و دهندهٔ برش، سیگنال‌های بسته‌بندی و تشکیل دایمرها، عناصر پاسخ‌دهنده به Rev response elements (rev) و تنه‌های پلی‌یورین مرکزی cPPT (central polypurine tract) و انتهایی هستند. راهبرد اصلی تولید ناقل‌های ویروسی که از نظر تکثیر ناقص هستند شامل حذف تمام ژن‌های غیرضروری از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

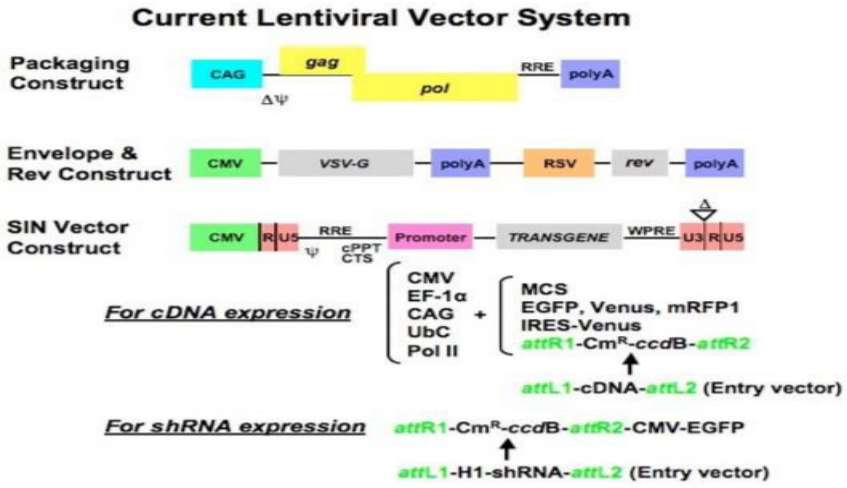
ژنوم HIV و مجزا نمودن توالی‌های cis عمل‌کننده از ترانس عمل‌کننده (Trans acting) است. به طوری که توالی‌های ترانسی که واقعاً برای تولید ذرهٔ ویروسی لازم هستند باقی بمانند. توالی‌های ترانس شامل عناصر *gag*،*pol* و *env* می‌باشند. با حضور این ژن‌ها لنتی‌ویروس تولید می شود اما دچار نقص در تکثیر، بلوغ و یا بیماری‌زایی است (۴۴) (شکل ۱).

در حال حاضر روش‌هایی برای تولید تیپ‌های کاذب ناقل‌های HIV-1 بسیار تغلیظ شده منتشر شده است. این ناقل‌های تیپ کاذب عمدتاً حاوی پروتئین های غشایی (env) ویروس‌های دیگر و عمدتاً شامل گلیکوپروتئین G از ویروس تورم دهان تاولی (VSV) گلیکوپروتئین غشایی ویروس لوسمی موشی مولونی (Moloney murine leukemia virus) و یا گلیکوپروتئین غشایی ویروس هاری هستند (۴۶).

به‌طور عمده استوک‌های ویروسی بسیار تغلیظ شده، از طریق انتقال سلول‌های مناسب با بسته‌های پلاسمید موردنیاز و با بهره‌گیری از محیط کشت سلول استاندارد یا محیط فاقد سرم تهیه شده و با اولتراسانتریفوژ یا اولترافیلتراسیون تغلیظ می‌شوند به نحوی که تیتر ویروس حتی تا ۱۰۹ واحد ترانسداکشن در هر میلی‌لیتر می‌رسد. لنتی‌ناقل‌ها به‌طور گسترده‌ای برای تحویل ژن در In vitro استفاده می‌شوند و بیان طولانی‌مدت تراژن را در بسیاری از رده‌های سلولی نظیر سلول‌های سیستم عصبی مرکزی، سلول‌های خون‌ساز، شبکیه، ماهیچه، کبد، ریه، جزایر پانکراس و ... فراهم می‌آورند. ناقل‌های لنتی‌ویروسی به‌طور سنتی با انتقال هم‌زمان و گذرای سلول‌های کلیهٔ جنین انسان T۲۹۳ با استفاده از سه یا چهار پلاسمید مختلف شامل پلاسمیدهای بسته‌بندی یا کمکی، پلاسمید حامل ژن غشا و پلاسمید انتقال‌دهندهٔ ژن تهیه می شوند. با این روش ناقل‌های لنتی‌ویروسی با تیتر ۱۰۷ -۱۰۶ واحد ترانسداکشن در میلی‌لیتر به دست می‌آید (۴۵).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]



شکل ۱- ناقل لنتی ویروس و نحوه بیان آن برای cDNA و shRNA (https://cfm.brc.riken.jp)

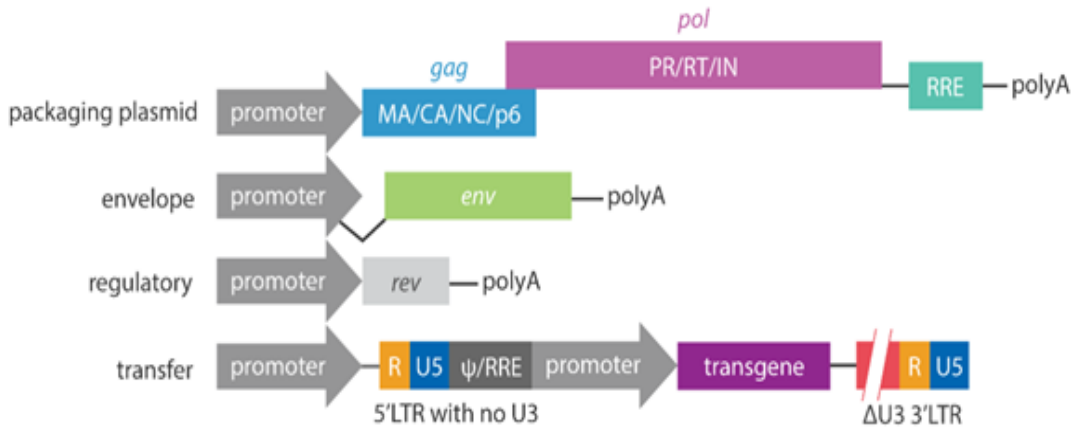
انواع سیستم‌های بسته‌بندی ناقل‌های لنتی ویروسی

بهترین ناقل‌ها برای تحویل siRNA و shRNA، لنتی‌ویروس‌های مشتق شده از HIV-1 هستند، زیرا این ناقل‌ها به طور پایدار سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند را درگیر می‌کنند و برخلاف ناقل‌های رتروویروسی در سلول‌های میزبان دچار خاموشی تحمیل‌شده نمی‌شوند. به همین دلایل در بیان تراژن‌ها در بسیاری از انواع رده‌های سلولی و در بازهٔ زمانی طولانی مؤثر و ایمن هستند. این ناقل‌ها در رده های سلولی اولیه نیز به خوبی برای تحویل پایدار تراژن یا shRNA کارآمد هستند. طراحی لنتی ناقل‌ها برای تحویل و بیان shRNA و siRNA ساده بوده و در عین حال اختصاصیت بالایی دارد (۴۵). سیستم‌های بسته‌بندی لنتی‌ناقل‌های مشتق شده از HIV، با حذف مرحله به مرحله‌ی عناصر cis مورد نیاز برای ازدیاد لنتی ویروس تکامل یافته‌اند. در این لنتی‌ناقل ها عناصر ترانس شامل *gag* و *pol* حفظ شده است. سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی شامل ۳ نسل است (۴۵). در سیستم‌های بسته‌بندی برای تولید لنتی‌ناقل ها، به طور عمده به ۳ جزء مهم نیازمند هستیم: یک ناقل لنتی‌ویروسی که شامل تراژن یا shRNA یا LTR احاطه‌کننده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

(Flanking LTR) بوده که ناقل انتقال نامیده می‌شود. دو ناقل دیگر؛ یکی شامل مجموعه‌ای از پلاسمیدهای بسته‌بندی که شامل پلاسمیدهای حاوی ژن‌های اصلی لنتی‌ویروس و دیگری شامل ناقل انولوپ است (۳۹). پلاسمید انتقال، جزء بسیار مهمی در بسته‌بندی یا تولید ناقل لنتی ویروسی است و بیشترین ملاحظات را باید در مورد آن در نظر گرفت. در اغلب موارد انتخاب پلاسمید انولوپ و پلاسمیدهای بسته‌بندی وابسته به نوع پلاسمید انتقال و تراژن موجود در آن است. در شکل ۲، یک نمای کلی از ژنوم لنتی‌ویروس‌ها شامل LTR و تمام اجزای مهم ژنوم ویروسی نمایان شده است. پلاسمید انتقال، پلاسمیدهای بسته‌بندی و پلاسمیدهای انولوپ، همه شامل برخی از اجزای ژنوم لنتی‌ویروسی هستند (۴۴).



شکل ۲- پلاسمیدهای موجود در سیستم بسته‌بندی لنتی‌ویروسی (۲۵)

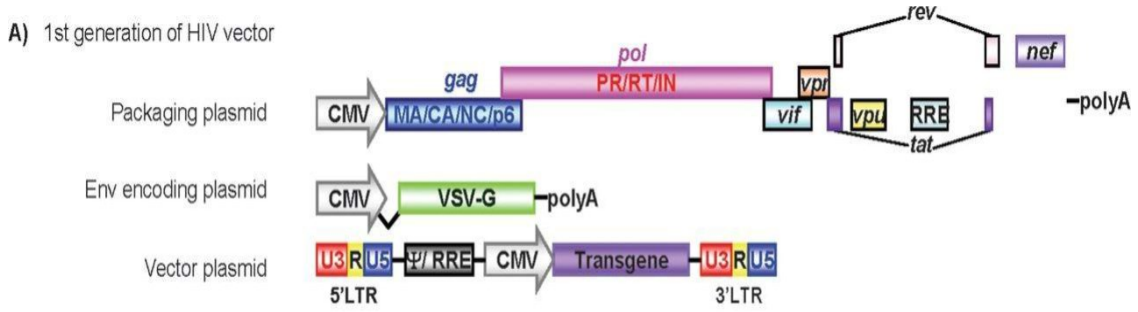
نسل اول سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی

سیستم بسته‌بندی لنتی‌ویروسی نسل اول توسط نالدینی (Naldini) و همکاران در سال ۱۹۹۶ به وجود آمد (۳۷). در این سیستم نیز پلاسمیدهای لنتی‌ویروسی به طور موقت در سلول‌های 293 T ترانسفکت می‌شوند. پلاسمیدهای لنتی ویروسی در این سیستم عبارت‌اند از پلاسمید بسته‌بندی که شامل تمام ژن‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

ویروس HIV به جز ژن *env* از این ویروس است، پلاسمید انولوپ که معمولاً حاوی گلیکوپروتئین غشایی *env* از ویروس تورم دهان تاولی (VSV-G) است و ناقل انتقال محتوی ژن یا cDNA مورد نظر و حداقل عناصر cis عمل‌کننده از ویروس HIV در این سیستم بسته‌بندی پلاسمیدهای کمکی برای تولید ناقل لنتی ویروسی از یکدیگر مجزا هستند تا خطرات امنیت زیستی ناقل لنتی‌ویروسی کاهش پیدا کند اما با این وجود، ژن‌های فرعی HIV در پلاسمید بسته‌بندی وجود دارد و این مسئله سبب احتمال بروز خطرات زیستی به دنبال استفاده از این ناقل‌ها می‌شود (۴۷، ۴۸، ۴۹، ۵۰) (شکل ۳). نکته‌ی قابل توجه این است که در این نسل بسته‌بندی، در پلاسمید بسته‌بندی تعداد زیادی از عناصر cis و ژن‌های فرعی HIV وجود دارند.



شکل ۳- سیستم بسته‌بندی لنتی‌ویروسی نسل اول (۲۵)

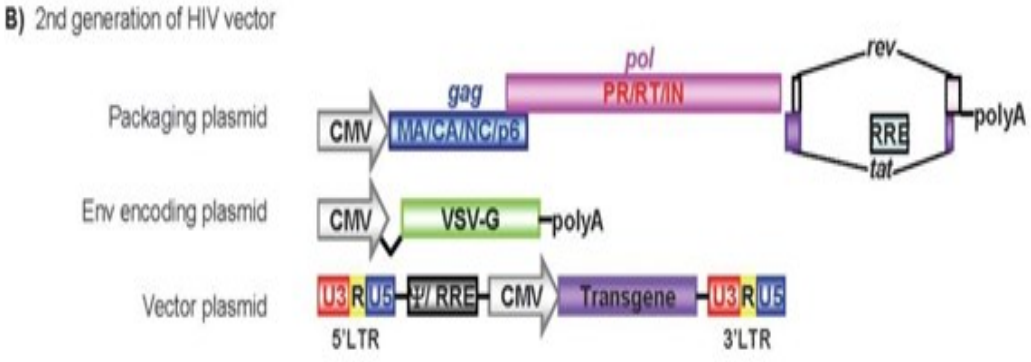
نسل دوم سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی

سیستم بسته‌بندی لنتی‌ویروسی نسل دوم توسط زافری (Zufferey) و همکاران در سال ۱۹۹۷ متکامل گردید (۵۱). همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در سیستم های نسل دوم یک پلاسمید بسته‌بندی وجود دارد که شامل تمام اجزای مهم بسته‌بندی (*gag* و *pol* و *rev* و *tat*) است. در این سیستم برای تولید ویروس یک پلاسمید بسته‌بندی واحد، پلاسمید انولوپ و ناقل انتقال کفایت می‌کند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

معمولاً ناقل‌های لنتی‌ویروسی واجد 5' LTR نوع وحشی باید در سیستم بسته‌بندی نسل دوم، بسته‌بندی شوند، چرا که این ناقل‌ها برای فعال شدن به *tat* نیاز دارند. پلاسمید انتقال در سیستم بسته‌بندی نسل ۲ فقط با پلاسمیدهای بسته‌بندی نسل دوم حاوی *tat* قابل بسته‌بندی است اما در سیستم بسته‌بندی نسل سوم با هر دو سیستم نسل ۲ و ۳ بسته‌بندی قابل انجام است. در هر دو نوع سیستم بسته‌بندی نسل ۲ و ۳، پلاسمید انولوپ معمولاً برای VSV-G رمز صادر می‌کند. از نظر ایمنی زیستی، سیستم‌های بسته‌بندی نسل دوم بدان سبب که از پلاسمیدهای مجزا برای رمز کردن ژن‌های مختلف HIV استفاده می‌کنند بسیار ایمن هستند، در این سیستم ناحیهٔ 5′ UTR دچار حذف‌هایی شده است و به مشوق‌ها یا پیشبرنده‌های هتروژن نظیر CMV یا RSV متصل شده است که این امر نیز در زیاد شدن ایمنی کار با این ناقل‌های ویروسی مؤثر است. در این سیستم بسته‌بندی، ژن‌های فرعی HIV از پلاسمید بسته‌بندی حذف شده است. با حذف ژن های فرعی HIV از پلاسمید بسته‌بندی، حاشیه‌ی امنیت ناقل زیاد شده است (۱، ۱۹، ۲۱، ۳۱) نکته‌ی قابل توجه این است که در این نسل بسته‌بندی، در پلاسمید بسته‌بندی تعداد زیادی از عناصر cis و ژن‌های فرعی HIV حذف شده است و تنها *rev*،*tat* و *RRE* باقی‌مانده است.



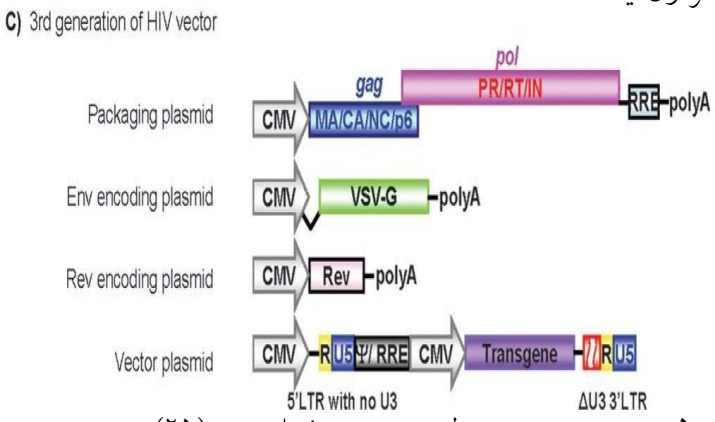
شکل ۴- سیستم بسته‌بندی لنتی‌ویروسی نسل دوم (۲۵)

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

نسل سوم سیستم‌های بسته‌بندی لنتی‌ویروسی

سیستم بسته‌بندی لنتی‌ویروسی نسل سوم برای بیان shRNA در ابتدا توسط دال (Dull) و همکاران در سال ۱۹۹۸ توصیف شده است (۵۲). با استفاده از این سیستم دال و همکاران ناقل‌های بیانی shRNA حاوی *GFP* را در انواع کاذب VSV-G با تیتر بالایی به دست آوردند. اجزای لازم برای بسته‌بندی نسل سوم لنتی‌ویروس‌ها عبارت‌اند از یک پلاسمید انتقال، یک پلاسمید انولوپ و ۲ پلاسمید بسته‌بندی که یکی از این ناقل‌ها حاوی *gag* و *pol* و دیگری حاوی *rev* است (۴۹) (شکل ۵). بنابراین سیستم بسته‌بندی لنتی‌ویروس نسل سوم شامل چهار پلاسمید است و ناقل انتقال آن که شامل تراژن یا کاست خاموشی است، باید در یک Back bone لنتی ویروسی شامل تمام توالی‌های cis لازم برای تولید و بسته‌بندی آر.ان.ای ژنومی تحویل داده شود. سه پلاسمید دیگر فاکتورهای ترانس را فراهم نموده و برای بسته‌بندی لازم هستند. در سیستم های بسته‌بندی نسل سوم به دلیل از بین بردن نیاز به *tat* برای ازدیاد کردن ویروس و استفاده از چهار پلاسمید به جای سه پلاسمید در بسته‌بندی، ایمنی کار با ناقل تا حد بسیار بالایی ارتقا یافته است (۴۴، ۴۵، ۴۹) نکته‌ی قابل توجه این است که در این نسل بسته‌بندی، در پلاسمید بسته‌بندی تنها *RRE* باقی‌مانده است و *rev* به پلاسمید دیگری منتقل شده است.



شکل ۵- سیستم بسته‌بندی لنتی‌ویروسی نسل سوم (۲۵)

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

تکامل سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی

- نسل چهارم سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی

- لنتی‌ناقل‌های دچار نقصان اینتگراز IDLV (Integrase-deficient lentivirus)

-لنتی‌ناقل‌های خود غیرفعال‌کننده SIN (self- inactivating Lenti vector)

تکامل سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی با بهینه‌سازی کدون‌ها به نحوی که بیان ژن‌های *pol/gag* به‌طور غیر وابسته به *rev* تأمین شود بیشتر تغییر پیدا کرده است. در سیستم‌های لنتی‌ویروسی نسل چهارم (شکل ۷)، برای کاهش بیشتر احتمال تولید لنتی‌ناقل‌هایی که قابلیت ازدیاد کامل دارند یا کاهش نوترکیبی غیر همولوگ، یک ساختار بسته‌بندی بین لنتی ویروسی (trans lenti viral) ایجاد شد که در آن ناحیهٔ رمز صادرکننده برای ژن‌های *gag-pol* به دو قسمت تقسیم‌شده و هریک از قسمت‌ها در دو کاست بیانی مجزا وارد شدند. در واقع این سیستم از نوعی آبشار فعال‌شدن ترانس استفاده می کند تا بیان بیشتری از اجزای ضروری ویروس را در اختیار پژوهشگر قرار دهد.

این روش بسته‌بندی لنتی‌ناقل‌ها مشتمل بر پنج جزء مجزا است که با نسبت‌های معین با یکدیگر مخلوط می‌شوند تا تولید ناقل در یک سطح بهینه انجام شود. جدا نمودن ژن‌های *gag* و *pol* و *env* به طور کارآمدی وقوع نوترکیبی‌های منجر به ایجاد ذرات لنتی‌ویروسی کامل از نظر ازدیاد RCRs (Replication-Competent Recombinants) را کاهش می‌دهد در عین حال همانند نسل‌های قبلی لنتی‌ناقل ها، این نسل از ناقل‌های لنتی‌ویروسی نیز تیپ کاذبی از VSV-G هستند تا قابلیت درگیر نمودن تعداد زیادی از میزبان‌ها به دست بیاید. در این سیستم از فعال‌کننده‌ی ترانس بیان ژن قابل القا با تتراسیکلین از نوع Tet- Off (tetracycline-controllable expression system (tet-off or tet-on system)) برای تقویت بیان ژن *gag-pro* استفاده می‌شود و فعال‌کننده ی ترانس *tat*، بیان پروتئین *pol* را تقویت می‌کند. ژن این پروتئین در این سیستم بسته‌بندی در پلاسمید مجزایی وجود دارد (شکل ۶). از سویی دیگر ناقل‌های لنتی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

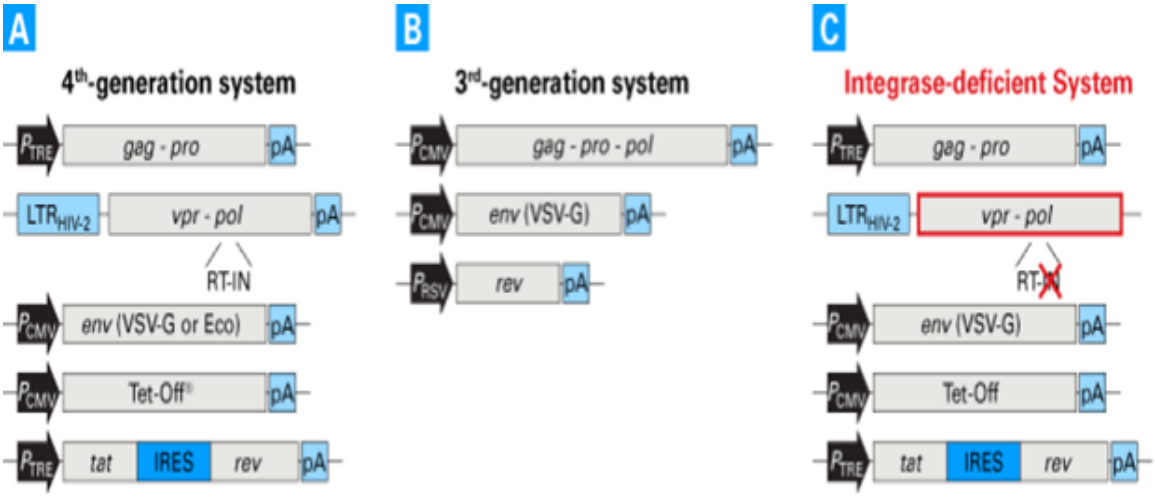
[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

ویروسی که نقصان اینتگراز داشته و در سلول‌های هدف به صورت اپی‌زوم حلقوی ازدیاد کردن پیدا می‌کنند برای بیان پایدار تراژن درسلول‌های غیرقابل تقسیم در شرایط In vivo و In vitro از سیستم بسته‌بندی لنتی‌ویروسی نسل چهار متکامل شده‌اند (شکل ۷). این ناقل‌ها به اختصار IDLV نامیده می‌شوند. جهش‌های حذفی در اینتگراز سبب شده است که احتمال فراگرفتن ژنوم ناقل در سلول هدف کاهش شدیدی پیدا کند. در این ناقل‌ها از فراگرفتن ژنوم پرووویروس در ژنوم سلول میزبان به‌طور کامل ممانعت به عمل آمده و درسلول میزبان مقدار بسیار زیادی اپی زوم لنتی‌ویروسی تولید می‌شود که کمبود پیام‌های شروع و ادامه‌ی ازدیاد در آن‌ها سبب می‌شود به تدریج با تقسیم شدن سلول‌های میزبان غلظت آن‌ها کاهش پیدا کند. اما این ناقل‌ها در سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند به‌طور پایدار باقی می مانند. در مقایسه با سایر لنتی‌ناقل‌ها، در ناقل‌های IDLV خطر موتاژنز فراگیر بسیاراندک بوده و خطر ایجاد مجدد لنتی ویروس‌های نوترکیبی که قابلیت ازدیاد را مجدداً پیدا کرده‌اند (Replication RCL competent lentivirus) در آن‌ها به حداقل کاهش‌یافته است. برای زیاد شدن بیان تراژن در سازه ناقل انتقال از عناصر cis نظیر جایگاه اتصال پرایمر، سیگنال بسته‌بندی، تنهٔ پلی‌یورین مرکزی (central polypurine tract cPPT)، جایگاه‌های پذیرنده و دهندهٔ (Wood chuck) برش و یک عنصر تنظیمی پس از رونویسی مشتق شده از ویروس هپاتیت موش خرما به نام WPRE Hepatitis (Woodchuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element) علاوه‌بر کاست بیانی تراژن استفاده می‌شود (شکل ۶). مطالعات دیگر در مورد سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی منجر به تولید ناقل خود غیرفعال کننده (SIN) شد. در ناقل‌های SIN جهش حذفی بزرگی در 3' LTR انجام شده که قدرت ازدیاد *tat* حذف شده و ناقل غیر وابسته به LTR از U3 ویروس را از بین برده است. در این ناقل‌ها ناحیهٔ پیشبرنده نظیر، ایجاد شده است. این جهش حذفی

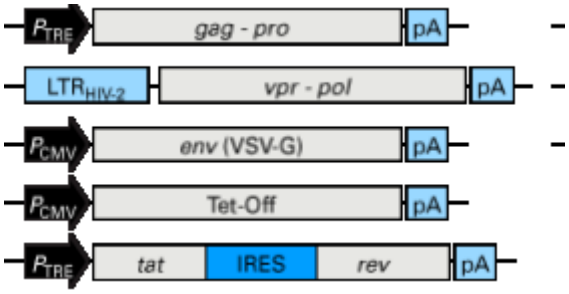
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

در طول رونویسی معکوس به 5' LTR منتقل شده و ویروس از نظر رونویسی غیرفعال می‌شود؛ بنابراین پلاسمید در سلول فعال میزبان تولید نمی‌شود. در عین حال در این ناقل‌ها از پیشبرنده‌های هترولوگ نظیر CMV استفاده شده است تا رونویسی mRNA ناقل به طور کامل انجام پذیرد (۴۴، ۴۵، ۴۹، ۵۳).



شکل ۶- لنتی‌ناقل‌های نسل چهارم (مجزا شدن پلاسمیدهای حاوی ژن‌های *gag* و *pol* وجود پلاسمید حاوی فعال‌کننده‌ی ترانس *tet*- Off)، لنتی ناقل‌های دچار نقصان اینتگراز (واجد جهش حذفی در ژن اینتگراز) (8).



شکل ۷- لنتی ویروس نسل چهارم (۵۳).

نتیجه‌گیری نهایی

امروزه با توجه به اهمیت پروتئین‌های نوترکیب تقاضا برای تولید افزایش‌یافته است. روش‌های مختلفی برای انتقال ژن وجود دارد، یک روشی که به تازگی برای انتقال ژن و تولید پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد استفاده از ناقل‌های ویروسی از جمله لنتی‌ویروس‌ها است. به

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

دلیل آنکه ویروس‌های وحشی و طبیعی موجود در طبیعت سبب ایجاد بیماری می شوند، باید یک سری تغییراتی در ناقل های ویروسی ایجاد کرد تا خطرات امنیت زیستی ناقل‌های ویروسی کاهش پیدا کند. امروزه اکثر تلاش‌های محققین برای توسعه سیستم‌های ناقل‌های لنتی‌ویروس، مبتنی بر ویروس HIV-I متمرکز شده است. سیستم‌های بسته‌بندی لنتی‌ناقل‌های مشتق شده از HIV، با حذف مرحله به مرحله‌ی عناصر cis مورد نیاز برای تکثیر لنتی‌ویروس متکامل شده‌اند. در این لنتی‌ناقل‌ها عناصر ترانس شامل *gag* و *pol* حفظ شده است. در سیستم های بسته‌بندی لنتی‌ویروسی نسل اول، تنها ژن *env* حذف شده است. به منظور تقویت ایمنی زیستی در طراحی ناقل‌های جدید چندین گروه ژنی شامل ژن‌های فرعی به جز *tat* و *rev* از ژنوم HIV حذف شدند در نسل دوم کاست‌های بسته‌بندی لنتی‌ویروسی به وجود آمد. در کاست نسل سوم ژن *tat* نیز حذف شده است و *rev*، جایگاه‌های ضروری پیرایش و جایگاه‌های فرآوری پس از رونویسی باقی مانده‌اند. در این نسل، به جای از یک پیشبرنده هترولوگ (معمولاً CMV) برای زیاد شدن قابلیت بسته‌بندی استفاده می‌شود.

فهرست منابع

References

1. Demain A.L. and Vaishnav P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology Advances. 27: 297-306.

2. Leader B.J., Baca Q.E. and Golan D. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. Nature Reviews Drug Discovery. 7: 21.

3. Ma J.K-C., Drake P.M.W. and Christou P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nat Rev Genet. 4: 794-805.

4. Kwon T.H., Kim Y.S., Lee J.H. and Yang M.S. (2003). Production and secretion of biologically active human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic tomato suspension cultures. Biotechnol Lett. 25(18):1571-4.

5. Bakhshandeh B. and shahrzad Z. (2009). The future of biopharmaceutics production. International Conference on CBEE. Singapore 9 - 11 October 2009.

6. Daniell H., Streatfield S.J. and Wycoff K. (2001). Medical molecular farming: production

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in Plant Sci. 6: 219-226.

7. Gomes A.R., Byregowda S.M., Veeregowda B.M. and Balamurugan V. (2016). An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. Adv. Anim. Vet. Sci. 4(7): 346-356.

8. Puetz J. and FWurm F.M. (2019). Recombinant proteins for industrial versus pharmaceutical purposes: a review of process and pricing. Processes. 7, 476; doi:10.3390/pr7080476.

9. BioPharm International. (2006). The Applications. [online]<http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=312960> [10 Mar 2006].

10. Twyman R.M. (2005). Gene transfer to animal cells (advanced methods). UK. BIOS Scientific Publishers. 28-41.

11. Walther W. and Stein U. (2000). Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. Drugs. 60: 249-71.

12. Blomer U., Ganser A. and Scherr M. (2002). Invasive drug delivery. Adv Exp Med Biol. 513: 431-451.

13. Ronald J.M., Corinna B. and Richard O.S. (2008). Viral vectors for in vivo gene transfer in Parkinson's disease: properties and clinical grade production. Pubmed. 209: 58-71.

14. Kaponen J. (2008). Lentiviral vector for gen transfer. English. University of Kuopio. Department of Biotechnology and Molecular Medicine. Kuopio university publications. 19-30.

15. Lanza R., Langer R. and Vacanti J.P. (2011). Principles of tissue engineering. Academic press. 4: 67-74.

16. Debyser Z. (2003). Biosafety of lentiviral vectors. Current Gene Therapy.3: 517-525.

17. Curiel D. and Douglas J. (2002). Adenoviral vectors for gene therapy. USA. Elsevier Inc. PP: 71-104.

18. Baylor P. (2007). Adenovirus Vectores. [online]<http://vector.bcm.tmc.edu/Adenovirus_pages/Adenovirus_Vectors.htm>[16 Apr 2007]

19. Yazdani A., Alirezaie Z., Motamedi M.J. and Amani J. (2018). Gene Therapy: A New Approach in Modern Medicine. Int J Med Rev. 2018 Sep; 5(3):106-117.

20. Berns K.I. (1990). Parvoviridae and Their Replication, 2nd ed, New York. Raven Press USA. PP: 1743–1764.

21. Hildegard B., Luca P., Oliver C., Sibille Q. and Michael H. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. Journal of Gene Medicine. 10: 717 – 733.

22. Okada T., Shimazaki K., Lijun W., Lu Y., Matsushita T. and Mizukami H. (2002).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain. Elsevier Science (USA). 28: 237–247.

23. Lundstrom K. (2018). Viral vectors in gene therapy. Diseases 2018, 6, 42; doi:10.3390/diseases6020042

24. David A., Stephen M., Beverley M. and Donald M. (1993). Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA. Following Infection Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. Virology. 197:459-462.

25. Edward B., Fink D. and Glorioso J. (2002). Gene delivery using herpes simplex virus vectors. DNA and Cell Biology 21: 915-936.

26. Sakuma T., Michael A. and Yasuhiro I. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. Biochem. J. 443, 603–618.

27. Brian W.J. (2002). Production and purification of HSV-1 Vectors and its use for gene transfer to humane CD34+ cells, PHD Thesis, University of Pittsburgh, Pennsylvania. 12-20.

28. Romain Z., Dull T., Mandel R.J., Bukovsky A., Quiroz D., Naldini L. and Trono D. (1998). Self-Inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. Journal of Virology. 72: 9873–9880.

29. Sinn P.L., Sauter S.L. and McCray P.B. (2005). Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectorsdesign, biosafety, and production. Gene Ther. 12: 1089-1098.

30. Quinonez R. and Sutton R.E. (2002). Lentiviral vectors for gene delivery into cells. DNA and Cell Biology. 21: 937-951.

31. Mancini G. and Horvath T.L. (2018). Viral vectors for studying brain mechanisms that control energy homeostasis. Cell Metabolism. 27, June 5. 1168-1175.

32. Segura M.M., Kamen A. and Garnier A. (2006). Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. Biotechnology Advances. 24: 321-337.

33. Sven A., Olivier H. and Amine K. (2009). Recent progress in lentiviral vector mass production. Biochemical Engineering Journal. 5059: 1-16.

34. Reinhard F. (2004). Lentiviral transgene vectors. EMBO Rep. 5: 28–29.

35. Kuate S., Stefanou D., Hoffmann D., Wildner O. and Uberla K. (2004). Production of lentiviral vectors by transient expression of minimal packaging genes from recombinant adenoviruses. Journal of Gene Medidine.

36. Wolkowicz R. and Nolan G.P. (2003). Retroviral technology aplications for expressed peptide libraries. Front Biosci. 8: 603-619.

37. Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M. and Trono D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science. 272, 263–267.

38. Zeger D. (2003). Biosafety of lentiviral vectors. Current Gene Therapy. 3: 517-525.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

39. Ansorge S., Henry O. and Kamen A. (2010). Recent progress in lentiviral vector mass production. Biochemical Engineering Journal. Review. 48: 362-377.

40. Susan L. and Uprichard S.L. (2005). The therapeutic potential of RNA interference. FEBS Letters (2005), 5996- 6007.6: 1197–1205.

41. Leonard J.N. and Schaffer D.V. (2006). Antiviral RNAi therapy: emerging approachesfor hitting a moving target. Gene Therapy. 13: 532–540.

42. Iqba M., Poole E., Goodbourn S. and McCauley J.W. (2004). Role for bovine viral diarrhea virus erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. Journal of Virology 136–145.

43. Follenzi A., Santambrogio and Annoni A.L. (2007). Immune responses to lentiviral vectors in current gene therapy. Bentham Science Publishers, Herzog (Ed). pp. 306-315.

44. Abbas-Terki T., Blanco-Bose W., Déglon N., Pralong W. and Aebischer P. (2002). Lentiviral-mediated RNA interference. Human Gene Therapy. 13(18):2197-201.

45. Manjunath N., Wu H., Subramanya S. and Shankar P. (2009). Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. Advanced Drug Delivery Reviews. 61: 732–745.

46. Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M. and Yee J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 8033–8037.

47. Coil D.A. and Miller A.D. (2004). Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. J. Virol. 78, 10920–10926.

48. Gleba Y., Klimyuk V. and Marillonnet S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants.Curr. Opin. Biotechnol. 18, 134–141.

49. Henry S.D., van der Wegen P., Metselaar H.J., Tilanus H.W., Scholte B.J. and van der Laan L.J. (2006). Simultaneous targeting of HCV replication and viral binding with a single lentiviral vector containing multiple RNA interference expression cassettes. Molecular Therapy. 14(4):485-493.

50. Milone M.C. and O'Doherty U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. Leukemia. 32:1529–1541.

51. Zufferey R., Nagy D., Mandel R.J., Naldini L. and Trono D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. Nat. Biotechnol. 15, 871–875.

52. Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D. and Naldini L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J. Virol.72, 8463–8471.

53. Durand S. and Cimarelli A. (2011). The Inside out of lentiviral vectors. Viruses. 2011, 3, 132-159; doi:10.3390/v3020132.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]

Production of Recombinant Proteins through Viral Vector Engineering

Ali Akbar Gholami[1*], Ali Niazi[2], Fatemeh Saeed[3]

1-PhD student Institute of Biotechnology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2-Professor, Institute of Biotechnology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
3- Master of Science In Agricultural Engineering – biotechnology, Higher Eduction Complex of shirvan, Iran.

gholami.2359@gmail.com

Abstract:

Production of recombinant proteins has been the most important achievements of biotechnology and genetic engineering in recent years. Therefore, there is a great demand to the production of recombinant proteins for treatment and diagnosis. Researchers are trying to develop different transgenic models for the production of these drugs today. Since it can be expressed a foreign gene in different host systems, therefore finding a system with high yield and safety is necessary. Among the systems developed for the production of recombinant proteins it can be referred to bacteria, yeast, plants and animals. Choosing the type of expression system for the production of each recombinant protein is important. There are several methods for gene transfer and production of transgenic products, but all the methods are not efficient genetically engineered crops. Today, one of the most effective and widely used tools for gene transfer is virus-derived vectors. Virus-derived vectors have been an interest to researchers because of their ability to integrate genes into host cells. The deletion of some basic and structural protein-coding genes from viruses was separately improved by helper vectors. For packing the virus particle, it was used of the packing cells, enhancing the safety of these vectors. Among virus-derived vectors, lentiviral-derived vectors are one of the most powerful and widely used vectors available. So far, three generations of lentiviral-derived vectors were designed, so that each generation is containing the higher bio-safety compared to the previous generation.

Keywords: Recombinant Protein, Viral Vectors, Lentivirus, HIV-1.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1398.12.3.4.1]