مجله ایمنی زیستی
دوره ۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

بررسی سیستم‌های بیانی مختلف برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی، با تاکید بر سلول‌های پستانداران

سید مهدی حسینی وردنجانی، مجتبی طهمورث پور*
دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
***استاد گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران**

smhosseini2020@ut.ac.ir

چکیده

یک پروتئین، تنها به بهترین شکل در سلول اصلی خود، تحت شرایط فیزیولوژیکی خاص که در آن چندین سیستم مولکولی برای تولید کارآمد و کنترل کیفیت در مراحل مختلف از جمله سنتز، تاخوردگی و تغییرات پس از ترجمه با هم کار می‌کنند، بیان خواهد شد. ولی در حال حاضر، تولید پروتئین در کمیت و کیفیت مناسب برای اهداف درمانی یک نیاز ضروری می‌باشد. بنابراین سیستم‌های بیانی مختلف، برای تولید پروتئین نوترکیب توسعه یافتند. سیستم باکتریایی، مخمر، باکلوویروس-سلول حشرات، سلول‌های پستاندارن و اخیرا نیز سیستم‌های فاقد سلول. در این مطالعه تمامی این سیستم‌ها از نظر قابلیت تولید پروتئین نوترکیبی با عملکردی مشابه شکل طبیعی خود، بررسی شده‌اند. همچنین مزایا و معایب هر کدام از این سیستم‌ها نیز ارائه شده است. زمانی که تاخوردگی و میزان تغییرات پس از ترجمه پروتئین نوترکیب بسیار مهم باشند، بیان در سیستم‌های یوکاریوتی، به ویژه استفاده از سلول‌های پستانداران، نه تنها ارگان‌های لازم برای تاخوردگی مناسب و تغییرات پس از ترجمه را فراهم می‌کند، بلکه بیان پروتئین‌های بزرگ و پیچیده را نیز ممکن می‌سازد. با این حال یک سیستم بیانی باید بتواند تولید بالا، بیشترین فعالیت بیولوژیکی، آسانی خالص‌سازی و کمترین زمان تولید برای پروتئین نوترکیب را با هم ترکیب کند.

کلمات کلیدی: سیستم‌های بیانی، پروتئین نوترکیب، سلول‌های پستانداران، بیان ژن پایدار و گذرا

مقدمه

پروتئین‌های درمانی، بزرگترین کلاس جدید محصولات تولیدی در صنایع داروهای زیستی می‌باشند (۱). این نسل جدید تولیدات محصولات بیولوژیک، تا حد زیادی نتیجه مهندسی ژنتیک است. همچنین کمیت و کیفیت تقاضا برای پروتئین‌های نوترکیب پیوسته در حال افزایش است. رشد تقاضا برای پروتئین درمانی، منجر به توسعه تکنولوژی‌هایی برای تولید پروتئین با کیفیت بالا شده است. پروتئین نوترکیب که با دستکاری‌های ژنتیکی و تغییرات DNA در موجودات مختلف به دست می‌آید، موجب تحول عظیمی در نوع و تنوع فرآورده‌های دارویی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

مورد مصرف شده است به طوری که امروزه شاهد مصرف فرآورده‌های نوترکیب دارویی، به جای داروهای شیمیایی دیروز هستیم. در حقیقت در دهه گذشته، پروتئین‌های درمانی تولید شده از سیستم‌های بیانی، چشم‌انداز بهداشت و درمان انسان را تغییر داده است. پروتئین‌های نوترکیب دارویی، دارای عملکرد بسیار اختصاصی بوده و بنابراین بر روی سایر فرآیندهای بیولوژیک غیرمرتبط، اثر سوئی نخواهند گذاشت. همچنین چون مولکول‌هایی از خود بدن می‌باشند، بنابراین سازگاری بیشتری با سیستم بیولوژیک بدن دارند (۲) و از این نظر کمتر دارای عوارض جانبی هستند. این کلاس جدید از داروها برای بسیاری از بیماری‌ها، نظیر اختلالات ژنتیکی، سرطان، فشار خون بالا و ... استفاده می‌شوند که ما تاکنون درمان بهتری برای آن‌ها نداشتیم (۲). از طرف دیگر علاوه بر استفاده از پروتئین‌های نوترکیب در مصارف دارویی، استفاده از این محصولات در صنایع و کارخانجات نیز متداول شده است. صنعتگران از آنزیم‌ها در کارخانجات تهیه خوراک، پارچه‌بافی، چرم‌سازی و ... استفاده می‌کنند. ارزش این‌گونه پروتئین‌ها و همچنین رشد نمایی نیاز به این مواد در جهان، منجر به انجام تحقیقات مستقیم در رابطه با سیستم‌های مقرون به صرفه و کارآمد برای سنتز پروتئین با کیفیت شده است (۲). روش‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب، به‌عنوان اساسی‌ترین روش‌ها در علم بیوتکنولوژی، امکان تولید بسیاری از مولکول‌های حیاتی مانند داروها، انسولین و پروتئین‌های خون، هورمون‌ها مثل هورمون رشد، واکسن‌ها و غیره را فراهم می‌نماید. موجودات زنده به عنوان میزبان برای تولید این پروتئین‌ها مطرح هستند.

سیستم‌های بیانی شامل تکنولوژی‌های مواد بیولوژیکی و دانش فنی مرتبط، مورد نیاز جهت تغییر ژنتیکی موجودات زنده برای ساخت پروتئین نوترکیب و محصولات دیگر می‌باشند. آن‌ها شامل ناقل‌ها (معمولا پلاسمیدها) برای انتقال ماده ژنتیکی به سلول‌های میزبان و همچنین سلول اولیه و تبدیل شده می‌باشند (۳). در برخی موارد، ممکن است ناقلین به خودی خود یک محصول تجاری باشند، از جمله آن‌هایی که در ژن درمانی یا واکسن‌های زنده ویروسی استفاده می‌شوند. اگر چه معمولا شامل کشت میکروارگانیسم‌ها و یا سلول می‌شوند، سیستم‌های بیان می‌توانند ارگانیسم‌های عالی‌تر مانند حیوانات و یا گیاهان تراریخته نیز باشند (۳).

انواع سیستم‌های بیانی با استفاده از سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی و همچنین سیستم‌های ترجمه *in vitro*، می‌توانند برای تولید پروتئین در نظر گرفته شوند. با این حال، زمانی که تاخوردگی و میزان تغییرات پس از ترجمه پروتئین نوترکیب بسیار مهم هستند، استفاده از سیستمی که ویژگی‌های پروتئین‌های طبیعی را به بهترین شکل حفظ کند، ترجیح داده می‌شود. در زمینه برنامه‌های توسعه مواد دارویی، فعالیت بیولوژیکی پروتئین از اهمیت فوق‌العاده برخوردار است. از طرفی انعطاف‌پذیری و سرعت یک سیستم بیانی در تولید پروتئین نوترکیب نیز باید در نظر گرفته شود. یک سیستم بیان کننده پروتئین‌های نوترکیب باید بتواند تولید بالا، آسانی تخلیص پروتئین، بیشترین فعالیت بیولوژیکی و کمترین زمان تولید را با هم ترکیب کند (٤). به هرحال هدف از این مطالعه، بررسی سیستم‌های بیانی مختلف برای تولید انبوه پروتئین نوترکیب از لحاظ

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

هزینه، آسانی استفاده، ویژگی‌های مربوط به تغییرات پس از ترجمه و ... می‌باشد.

۱- سیستم‌های بیانی موجود

به طور کلی دو نوع سیستم بیانی شامل سیستم‌های بیانی فاقد سلول (Cell-free expression systems) و سیستم‌های بیانی مبتنی بر سلول (Cell-based expression systems) وجود دارد. سیستم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی دو دسته عمومی از سیستم‌های مبتنی بر سلول هستند. به‌طور معمول مدیریت سیستم‌های پروکاریوت آسان بوده و برای بیشتر اهداف رضایت بخش هستند (۲). با این حال، محدودیت‌های جدی در استفاده از سلول‌های پروکاریوتی برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی وجود دارد. به‌عنوان مثال، بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی تحت انواع تغییرات پس از ترجمه مثل تاخوردن مناسب، گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، تشکیل پل دی‌سولفید و غیره قرار می‌گیرند. هیچ سیستم کلی برای بیان پروتئین‌های هترولوگ وجود ندارد. تمام سیستم‌های بیان، دارای یکسری مزایا و معایب هستند که باید در انتخاب این‌که کدام یک استفاده شوند، در نظر گرفته شوند. انتخاب بهترین آن‌ها نیاز به بررسی گزینه‌های عملکرد، گلیکوزیلاسیون، تاخوردگی مناسب، اقتصاد و ... دارد.

۱-۲- سیستم‌های فاقد سلول

در اوایل دهه ۱۹۵۰ میلادی فهمیده شد که سلول‌های گسیخته شده از هم، نیز هنوز قادر به تولید پروتئین می‌باشند (۵). بر پایه این مشاهدات، سیستم‌های ترجمه فاقد سلول، توسعه یافته و برای تولید مقدار کمی از برخی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. سپس سیستم‌های بیان فاقد سلول (CF) به عنوان یک ابزار امیدوارکننده و گسترده برای تولید سریع و کارآمد پروتئین ظاهر شدند (٦ و ٨). سیستم فاقد سلول، محیط طبیعی سیتوپلاسم سلولی را تقلید کرده ولی در عین حال مستقل از شرایط و حساسیت سلول‌های زنده می‌باشد. سنتز پروتئین بدون سلول (Cell-free protein synthesis) (CFPS)، تولید پروتئین با استفاده از ماشین‌آلات بیولوژیکی بدون استفاده از سلول‌های زنده است. اجزای معمول CF عبارتند از عصاره سلولی، یک منبع انرژی، یک منبع از اسیدهای آمینه، کوفاکتورها مثل منیزیم و DNA یا ژن مورد نظر می‌باشند. یک عصاره سلولی با تجزیه سلول مورد نظر و خارج کردن دیواره‌های سلولی و ژنوم DNA با سانتریفیوژ بدست می‌آید. آن‌چه باقی می‌ماند ماشین‌آلات لازم سلول از جمله ریبوزوم‌ها، آمینو آسیل tRNA سنتتاز، فاکتورهای شروع ترجمه و طویل کننده زنجیره، نوکلئاز و غیره می‌باشد. متداولترین عصاره‌های سلولی که امروزه استفاده می‌شوند، از *اشرشیاکلای*، رتیکولوسیت خرگوش و سلول‌های حشرات بدست می‌آیند (۹). CFPS به عنوان یک تکنولوژی سنتز پروتئین، ابزاری قابل‌توجه در تولید پروتئین‌های درمانی (۱۰ و ۱۳)، تولید انبوه کتابخانه پروتئینی برای ارزیابی پروتئین و ژنومیکس ساختاری (١٤ و ١٥) می‌باشد.

محیط سنتز پروتئین در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) توسط یک دیواره سلولی و یا شرایط لازم برای حفظ هموستازی برای بقا سلولی، محدود نمی‌شود. در نتیجه این سیستم امکان دسترسی مستقیم و کنترل محیط ترجمه را فراهم می‌کند که برای برخی کاربردها از جمله بهینه‌سازی تولید پروتئین، بهینه‌سازی مجموعه‌های پروتئین، مطالعه سنتز پروتئین و ... مفید

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

است. سیستم فاقد سلول را می‌توان برای بهینه‌سازی ساخت DNA قبل از بیان به صورت *in vivo* بکار برد (۸). همچنین تولید پروتئینی که به‌سختی بیان می‌شوند مانند پروتئین‌های سمی و پروتئین‌های پوشاننده غشاء و سنتز پروتئین تغییر یافته با اضافه کردن اسید آمینه‌های غیر متعارف نیز با این سیستم ممکن است (۸). عملکرد سیستم فاقد سلول با سنتز پروتئین‌های سیتوزولی عملکردی، پروتئین‌های تغییر داده شده پس از ترجمه و پروتئین‌های پوشاننده غشاء مورد بررسی قرار می‌گیرد. علاوه بر این، استفاده از این سیستم به عنوان یک ابزار قدرتمند برای صرفه‌جویی در زمان ساخت و ساز و ارزیابی قالب مناسب برای بیان کارآمد پروتئین در داخل بدن نیز بررسی می‌شود (۸). با این حال این سیستم دارای برخی محدودیت‌ها نیز می‌باشد. یکی از چالش‌های مرتبط با CFPS، تخریب DNA توسط اندونوکلئاز موجود در عصاره سلول است. این امر به‌ویژه زمانی که از DNA خطی استفاده می‌شود، مشکل ساز است.

۲-۲- سیستم‌های مبتنی بر سلول

۲-۲-۱- سیستم‌های پروکاریوتی

باکتری‌ها

سیستم‌های باکتریایی از اولین سسیستم‌های مورد استفاده برای تولید پروتئین نوترکیب محسوب می‌شوند. گسترده‌ترین میزبان مورد استفاده در این نوع سیستم *E. coli* می‌باشد که رواج استفاده از آن مربوط به کوتاه بودن زمان تقسیم سلولی و ویژگی‌های مناسب فیزیولوژی و ژنتیکی آن می‌باشد به طوری که توالی و ژنتیک کامل آن وجود دارد. این ویژگی‌ها، کلونینگ ژن و کشت آن را ساده می‌کند (۱۶ و ۱۷). نرخ رشد بالای این باکتری، به همراه توانایی بیان سطوح بالای پروتئین، به این سویه بهره‌وری حجمی بالا می‌بخشد (۲). باکتری *E.coli* در محیط‌های کشت ساده و ارزان به خوبی رشد می‌کند. کاربرد باکتری باعث می‌گردد که پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع تولید شوند. تقریبا ٤٠ درصد پروتئین‌های نوترکیب در باکتری‌ها تولید می‌شوند که از این میزان ۳۹ درصد آن در *E.coli* بیان می‌شود (۳). با این حال مشکل عمده در این سیستم‌ها این است که فرآورده‌های حاصل، به‌طور محسوسی با فرآورده‌های طبیعی انسانی اختلاف دارند که ناشی از تغییرات پس از ترجمه می‌باشد. برای مثال، پروتئین‌هایی که معمولا در انسان گلیکوزیله می‌شوند، به وسیله باکتری‌ها گلیکوزیله نمی‌شوند. چون باکتری‌ها فاقد امکانات سلول‌های یوکاریوتی جهت انجام تغییرات پس از ترجمه هستند. پردازش پس از ترجمه برای فعالیت زیستی تعدادی از پروتئین‌های انسانی از جمله آنتی‌بادی‌ها لازم است.

۲-۲-۲- سیستم‌های یوکاریوتی

مخمرها

به عنوان میزبان جایگزینی مطلوب برای بیان پروتئین‌های هترولوگ برای تحقیقات، صنعت و یا استفاده‌های پزشکی می‌باشند (۱۸ و ۱۹). مخمرها سلول‌های یوکاریوتی می‌باشند که قابلیت رشد در تراکم بالا، ترشح مقدار فراوان پروتئین نوترکیب و انجام گلیکوزیلاسیون را دارند. این موجودات زنده تک یاخته، مزایای استفاده از باکتری مثل سهولت دستکاری ژنتیکی و نرخ رشد بالا را دارند. اما در مقایسه با سیستم‌های باکتریایی، آن‌ها قادر به انجام بسیاری از تغییرات پس از ترجمه انجام شده توسط سلول‌های یوکاریوتی مانند پردازش‌های پروتئولیتیک،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

تاخوردن، تشکیل پیوند دی‌سولفید و گلیکوزیلاسیون می‌باشند (۲۰). از لحاظ تاریخی، بیشترین استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به دلیل وجود اطلاعات فراوانی که از ژنتیک، زیست شناسی مولکولی و فیزیولوژی این میکروارگانیسم شده است (۲۱ و ۲۲)، ولی اخیرا سویه‌های دیگری از مخمرها نیز قابل دسترس هستند (۲۱). با این حال برخی از محدودیت‌های این سیستم بازدهی پایین محصول، پایداری پایین پلاسمید، هیپر گلیکولیزیشن و ظرفیت کم ترشح می‌باشد.

حشرات

باکلوویروس‌به عنوان یک سیستم برای تولید بیش از حد پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های یوکاریوتی شناخته شدند (۲۳ و ۲٤). سیستم بیانی باکلوویروس- سلول حشرات، یک ابزار قدرتمند برای تولید پروتئین نوترکیب است. عوامل متعددی به محبوبیت آن‌ها کمک کرده است. آن‌ها از یوکاریوت بودن، تغییرات پروتئین، پردازش و سیستم‌های حمل و نقل حاضر در سلول‌های یوکاریوتی عالی بهره می‌برند (۲۵). آن‌ها از یک ویروس مستقل کمکی که می‌تواند به تیتر بالا در سلول حشرات سازگار شده به رشد در کشت‌های معلق کمک کند، استفاده می‌کنند که به سهولت منجر به بدست آوردن مقادیر زیادی از پروتئین‌های نوترکیب می‌شود. پروتئین بیان شده معمولا در قسمت مناسب سلولی بیان می‌شود، به‌عنوان مثال پروتئین‌های غشاء در غشاء متمرکز می‌شوند، پروتئین‌های هسته در هسته‌ها و ترشح پروتئین‌های ترشحی در محیط می‌باشد. اکثریت پروتئین بیان شده در سلول حشره محلول باقی می‌مانند. ژنوم ویروسی بزرگ (۱۳۰kb) بوده و در نتیجه می‌تواند تکه‌های بزرگی از DNA خارجی را در خود جای دهد. در این سیستم بسیاری از ژن‌های با کلوویروس که در سیکل زندگی کشت بافتی غیرضروری هستند، با ژن‌های هترولوگ جایگزین می‌شوند. از آن‌جایی که ژنوم باکلوویروس دارای اندازه نسبتا بزرگی است، بنابراین ژن‌های هترولوگ را می‌توان به داخل آن جای‌سازی کرد. اصلی‌ترین سلول‌های حشرات مورد استفاده SF9، SF21 و High Five می‌باشند (۱)، که به راحتی در محیط کشت رشد کرده، عاری از هر گونه ترکیبات با منشا حیوانی بوده و امنیت ویروسی قوی دارند (۵).

باکلوویروس برای مهره داران غیر عفونی است و نشان داده شده که پروموتورهای آن‌ها در سلول‌های پستانداران غیرفعال هستند که به آن‌ها یک مزیت نسبت به سیستم‌های دیگر هنگامی که آنکوژن‌ها و یا پروتئین‌های بالقوه سمی را بیان می‌کنند، می‌بخشد. همچنین فرآیند توسعه آن‌ها کوتاه است. بیان با استفاده از ناقل باکلوویروس، دارای برخی محدودیت‌ها نیز است. از آن‌جا که باکلوویروس‌ها، بی‌مهرگان را آلوده می‌کنند، ممکن است که پردازش پروتئین تولید شده توسط مهره‌داران متفاوت باشد و این به نظر می‌رسد مشکلی در برخی از تغییرات پس از ترجمه باشد. به عنوان مثال شکاف پروتئولیتیک داخلی در توالی‌های غنی از لیزین و یا آرژنین بسیار ناکارآمد می‌باشد. قابلیت گلیکوزیلاسیون آن‌ها به‌طور کلی محدود به تولید مانوز بالا می‌شود و به الیگوساکاریدهای پیچیده شامل فوکوز، گالاکتوز و اسیدسیالیک پردازش نمی‌شود. همچنین سازش‌پذیری رده‌های سلولی حشرات به روندهای با مقیاس بزرگ سخت می‌باشد (۲٦). علاوه بر این مشخص شده که حتی اگر سلول حشرات نیز به لحاظ ژنتیکی پتانسیل

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

سیالیلیش (sialylation) گلیکوپروتئین‌ها را داشته باشد، این یک عملکرد بسیار اختصاصی است که کمتر اتفاق می‌افتد. بنابراین تولید گلیکوپروتئین نوترکیب سیالیلیت شده در سیستم باکلوویروس- سلول حشرات نیاز به تلاش‌هایی در زمینه مهندسی متابولیک جهت گسترش چرخه‌های طبیعی گلیکوزیلیشن پروتئین در سلول حشرات دارد (۲۷).

پستانداران

تایید فعال کننده پلاسمینوژن بافتی انسان (Human tissue plasminogen activator) به‌عنوان اولین پروتئین درمانی از طریق سلول‌های نوترکیب پستانداران در سال ۱۹۸٦، باعث ظهور کشت سلول پستانداران به عنوان اسب‌های کاری در صنعت تولید داروهای زیستی شد (۲۸). اگر چه سیستم‌های بیانی مختلفی وجود دارد و برخی از آن‌ها بحث شدند، ولی سلول‌های پستانداران، اصلی‌ترین میزبان برای تولید تجاری پروتئین نوترکیب به شمار می‌روند.

در جدول یک، ویژگی‌های سیستم‌های بیانی مختلف خلاصه شده است. در حالت ایده‌آل، پروتئین‌های نیازمند به تغییرات پس از ترجمه، باید در سلول‌های پستانداران بیان شوند. از آن‌جایی که سلول‌های پستانداران قادر به انجام مناسب تغییرات پس از ترجمه و تاخوردگی می‌باشند، در حال حاضر میزبان استاندارد برای تولید پروتئین‌های درمانی محسوب می‌شوند. بیش از ۵۰ درصد از پروتئین‌های درمانی تایید شده و موجود در بازار، با استفاده از سلول‌های پستانداران تولید شده‌اند. از میان ۵۸ داروی زیستی تایید شده بین سال‌های ۲۰۰٦ تا ۲۰۱۰، ۳۲ عدد از آن‌ها در سلول‌های پستانداران تولید شده‌اند (۲۹). اگر اصالت محصول در کاربرد بالینی کاملا ضروری باشد، آن‌گاه با وجود برخی کاستی‌ها، یک میزبان پستاندار به علت ارائه محصولی با بالاترین کیفیت، تنها انتخاب است. البته باید توجه کرد که پردازش الیگوساکاریدی در میان سلول‌های پستانداران، وابسته به گونه و نوع سلول است. به‌طوری که تفاوت‌هایی در الگوی گلیکوزیلاسیون در سلول‌های جوندگان و بافت‌های انسانی گزارش شده است. چرا که رویداد تراریزش در اغلب موارد نیاز به تولید یک رده سلول پایدار دارد که به خودی خود ممکن است پروفایل‌های گلیکوزیلاسیون تغییر کنند و حتی استفاده از رده‌های سلول انسانی نیز از این قاعده مستثنی نیست (۲).

جدول ۱- مقایسه ویژگی‌های مختلف سیستم‌های بیان پروتئین (به ترتیب از بیشترین به کمترین)

آسانی استفاده	سرعت	هزینه	بازدهی	زمان مورد نیاز	تغییرات پس از ترجمه
سیستم فاقد سلول	سیستم فاقد سلول	سلول پستانداران	سلول پستانداران	سلول پستانداران	سلول پستانداران
سیستم باکتریایی	سیستم باکتریایی	سلول حشرات	سلول حشرات	سلول حشرات	سلول حشرات
مخمرها	مخمرها	مخمرها	سیستم باکتریایی	مخمرها	مخمرها
سلول حشرات	سلول حشرات	سیستم باکتریایی	مخمرها	سیستم باکتریایی	سیستم باکتریایی
سلول پستانداران	سلول پستانداران	سیستم فاقد سلول	سیستم فاقد سلول	سیستم فاقد سلول	سیستم فاقد سلول

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

با وجود در دسترس بودن تعداد زیادی از سلول‌های پستانداران، تنها تعداد اندکی از آن‌ها برای صنعت تولید پروتئین نوترکیب مزیت دارند. یک رده سلولی (Cell line)، جمعیتی از سلول‌های یک موجود زنده چند سلولی است که به طور معمول به طور نامحدود تکثیر نمی‌شود، ولی به علت جهش، متحمل مرگ طبیعی سلول نشده و در عوض می‌تواند برای مدت طولانی‌تری در حال تقسیم و رشد باقی بماند. باید قابلیت انتقال بالایی با روش‌های انتقال رایج داشته باشند، به سادگی به محیط‌های فاقد سرم سازگار شوند و گسترش آن‌ها در مقیاس وسیع نیز مقرون به صرفه باشد (۳۰). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پروتئین‌های فیوژن Fc، به‌طور عمده در سلول‌های تخمدان هامستر چینی (Chinese Hamster Ovary cells) (CHO) و سلول‌های میلومای موش (NS0, SP2/0) و هیبریدوما (Mouse myeloma and cells hybridomas) تولید می‌شوند (۳۱). بیشتر پروتئین‌های نوترکیب دارویی تحت توسعه نیز در سلول‌های CHO بیان می‌شوند. محبوبیت سلول‌های CHO را می‌توان به دلایل زیر نسبت داد: اول، این رده سلولی در طی دو دهه گذشته یک میزبان سالم نشان داده است که این مورد، تایید محصولات تولید شده را توسط مراکز نظارتی آسان می‌کند. دوم، قابلیت تولید با اختصاصیت پایین‌تر، که یکی از معایب استفاده از سلول‌های پستانداران برای تولید پروتئین می‌باشد، می‌تواند با تکثیر ژن در CHO حل گردد. برای سلول CHO، سیستم‌های قوی تکثیر ژن مثل تکثیر ژن با واسطه دی‌هیدرو فولات ردوکتاز یا گلوتامین سنتتاز در دسترس هستند. سوم: سلول‌های CHO دارای ظرفیت موثر انجام تغییرات پس از ترجمه بوده و تولید پروتئین‌های نوترکیبی سازگار با نمونه فعال انسانی آن می‌کند. چهارم: دارای ظرفیت سازگار شدن با کشت‌های فاقد سرم نیز می‌باشد (۲۸). البته باید به این نکته نیز اشاره کرد که بسیاری از آزمایشگاه‌های صنعتی به احتمال زیاد استفاده از یک نوع رده سلولی را ترجیح می‌دهند که دو دلیل برای این کار وجود دارد: اول این‌که رده‌های سلولی مختلف تفاوت‌هایی در الگوهای گلیکولیزه کردن پروتئین نوترکیب دارند که این موضوع می‌تواند خواص درمانی پروتئین نوترکیب را تحت تاثیر قرار دهد (۳۲). دوم این‌که معمولا آزمایشگاه‌های صنعتی، به‌طور استاندارد برای استفاده از یک رده سلولی تجهیز شده‌اند و اغلب تمایلی برای تجهیز دوباره خود برای رده سلولی دیگری ندارند.

رده‌های سلولی دیگر مورد استفاده برای تولید پروتئین نوترکیب شامل کلیه کودک هامستر (Baby Hamster Kidney) (BHK21)، فیبروسارکومای انسان (human fibrosarcoma) (HT1080)، لیمفومای انسان (human lymphoma) (Namalwa)، کلیه جنین انسان (Human Embryo Kidney) (HEK293) می‌باشند. نام برخی از رده‌های سلولی در جدول ۲ آورده شده است (۳۳).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

جدول ۲- رده‌های سلولی پستانداران مورد استفاده در تحقیقات و صنعت

ردههای سلولی پستانداران	تعداد	ردههای سلولی پستانداران	تعداد	ردههای سلولی پستانداران	تعداد
Hep G2	۱۵	L929	۸	Hela	۱
DUKX-X11	۱۶	N2a	۹	HEK293T	۲
J558L	۱۷	Human embryonic kidney 293 cells	۱۰	U2OS	۳
So-Rb50	۱۸	Recombinant Chinese hamster ovary cell line	۱۱	A549	٤
NIH 3T3	۱۹	Baby hamster kidney (BHK) cells	۱۲	HT1080	٥
MCF-7	۲۰	Mouse myeloma cells	۱۳	CAD	٦
		Y79	۱٤	P19	۷

آزمایشگاه‌های صنعتی به طور معمول رده‌های سلولی پایداری که ژن کدکننده پروتئین‌های نوترکیب در ژنوم آن‌ها ادغام شده است را توسعه می‌دهند (۳٤). در حال حاضر، یک محدودیت بزرگ در روند توسعه رده‌های سلولی پایدار دارای تولید بالا، زمان زیاد مورد نیاز برای جداسازی می‌باشد. گاهی اوقات روش‌های سریع‌تر برای تولید پروتئین نوترکیب ترجیح داده می‌شوند. نمونه بارز آن زمانی است که شخص باید به سرعت چندین پروتئین نامزد را ارزیابی کند یا زمانی که نیاز دارید چندین مدل از یک پروتئین برای وجود توانایی‌های بالقوه درمانی مورد مطالعه قرار گیرند (۳۰). سیستم‌های بیان گذرا (Transient gene expression) (TGE) می‌توانند این نیاز را برطرف کرده و در مقایسه با سیستم‌های بیان پایدار (Stable gene expression) (SGE) در مدت کوتاهتری پروتئین نوترکیب تولید کنند.

سیستم‌های بیان پایدار و گذرا برای تولید پروتئین

جهت ساخت رده‌های سلولی پایدار، نیاز به ادغام کردن ژن کد کننده پروتئین نوترکیب در درون ژنوم رده سلولی مورد نظر می‌باشد. در نتیجه بیان پایدار، ژن منتقل شده منجر به تولید مداوم پروتئین نوترکیب در دوره طولانی کشت سلول می‌شود (۳٤). برای تولید یک چنین رده سلولی پایدار، ژن کدکننده پروتئین نوترکیب و یک نشانگر انتخابی (۳۵) مثل دی هیدروفولات ردوکتاز با هم منتقل می‌شوند (۳٦). پس از آن فرآیند انتخاب اجرا می‌شود که در آن سلول‌های زنده‌ای که ژن‌های مورد نظر به‌طور موفقیت‌آمیز در آن‌ها ادغام شده و بنابراین آن را بیان می‌کنند، انتخاب می‌شوند. برای دست یافتن به بالاترین بیان پروتئین نوترکیب، به‌طور تدریجی فشار انتخابی در دوره‌های بعدی انتخاب بیشتر می‌شود (به طور مثال با افزایش غلظت متوترکسات ممانعت کننده دی‌هیدروفولات ردوکتاز) تا کلون‌های با تولید بالا که نشانگر انتخابی و ژن کد کننده پروتئین نوترکیب را با هم تکثیر می‌کنند، جدا شوند. معمولا برای به‌دست آوردن کلون‌هایی که به اندازه کافی تولید دارند که بتوان از آن‌ها برای تولید پروتئین در مقیاس بالا استفاده کرد، شش ماه انتخاب نیاز است. این بازه، انتخاب کلون‌های با تولید بالا، بسیار هزینه بر و وقت‌گیر است

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

(۳۰) که به‌عنوان یک محدودیت در تولید پروتئین نوترکیب از سلول‌های پستانداران به عنوان میزبان اصلی شناخته می‌شود. یعنی غربالگری و توسعه پروتئین نوترکیب پس از سرمایه‌گذاری ماه‌ها زمان و پول بدست خواهد آمد. بنابراین تمایل به دست‌یابی به سیستمی جایگزینی که سریعا پروتئین نوترکیب را تولید کرده و بنابراین زودتر و با هزینه کمتر این پروتئین وارد فاز غربال‌گری و آزمون‌های بالینی شود بسیار زیاد است.

سیستم بیان گذرا می‌تواند پاسخگوی این نیاز باشد چرا که پتانسیل تولید مقدار کافی پروتئین نوترکیب مناسب برای تعیین ویژگی‌های اولیه و آزمون‌های بالینی در مدت سه هفته با هزینه نسبتا پایین را دارد (۳۰ و ۳۷). در مقایسه با سیستم بیان پایدار، این سیستم نیازی به رده سلولی جهش یافته (دی هیدرو فولات ردوکتاز منفی، $dhfr^{-1}$) و انتخاب و زیر کشت‌های بعدی برای انتخاب کلونی با تولید و خصوصیات رشدی مناسب ندارد. در عوض سلول‌ها با پلاسمید DNA حاوی ژن کد کننده پروتئین، به‌طور گذرا ترانسفکت می‌شوند. سپس سلول‌های تراسفکت شده، برای یک بازه زمانی یک یا دو هفته کشت می‌شوند. این همان زمانی است که سلول‌های ترانسفکت شده تولید پروتئین نوترکیب خواهند داشت. پروتئین‌های ترشحی، غشایی و داخل سلولی به‌طور موفقیت آمیز در TGE بیان شده‌اند (۳۸ و ۴۰).

تولید پروتئین با TGE دارای چند محدودیت نیز می‌باشد. اولا TGE نیاز به مقدار زیادی پلاسمید DNA دارد که خود هزینه‌بر است (۳۰). به‌طور معمول پروتکل‌های TGE از ۱/۵-۲µg پلاسمید DNA برای کشت‌های با تراکم استاندارد $cells/ml^{10}$ ۲×۱۰^{۶} و ۵۰µg پلاسمید DNA برای کشت‌های با تراکم بالا $cells/ml^{10}$ ۲۰×۱۰^{۶} استفاده می‌کنند (۴۱). دو تا از مهمترین جنبه‌های تصفیه پلاسمید، حصول درصد بالایی از DNA فراپیچ شده و حذف آلودگی‌ها از جمله RNA باکتری و اندوتوکسین، می‌باشد (۴۲). با این‌که که گزارش شده است که این آلودگی‌ها تاثیر معنی‌دار بر کارآیی ترانسفکشن با روش فسفات کلسیم (CaPi) ندارند (۴۳)، حذف لیپوپلی ساکاریدها (LPS) در پردازش‌های بعدی پروتئین حیاتی است (۴۴). ثانیا افزایش مقیاس روش‌های استاندارد انتقال برای سیستم‌های TGE مشکل می‌باشد. به عنوان مثال هر چند لیپیدهای کاتیونی، معرف‌های موثری برای ترانسفکشن می‌باشند، ولی به علت هزینه نسبتا بالا، قابلیت استفاده در TGE در مقیاس وسیع را ندارند. همچنین استفاده از معرف‌های شیمیایی برای ترانسفکشن در این سیستم نیز با مشکل تحویل DNA به هسته‌های سلول رو به رو می‌باشد (۴۵) و یا هر چند روش‌های فیزیکی نظیر میکرواینجکشن (Microinjection) و نوکلئوفکشن (Nucleofection) مشکل تحویل به هسته را ندارند ولی هنوز استفاده از آن‌ها در مقیاس وسیع، به‌روز رسانی نشده است (۳۰). ثالثا بازده حجمی که می‌تواند از TGE به دست آید، هنوز هم نسبتا پایین است. در جدول سه، ویژگی‌های SGE و TGE آورده شده است. تمرکز اصلی تحقیقات TGE در دهه گذشته، بر روی محدودیت آخر معطوف شده است و پیشرفت‌های قابل‌توجهی در عملکرد حجمی بدست آمده است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

جدول ۳- تفاوت‌های بین TGE و SGE در تولید پروتئین نوترکیب

ویژگی‌ها	سیستم بیان پایدار	سیستم بیان گذرا
انتخاب ژنتیکی	بله	خیر
زمان بین ترانسفکشن اولیه تا تولید	شش ماه ≤	۱-۲ هفته
مقدار DNA مورد نیاز برای ترانسفکشن	µ ۳-۱g/ml	µ ۵۰-۱g/ml
قابلیت تولید ویژه	۹۰-۱۰ pg/cell/day	۰/۱۵-۵ pg/cell/day
بازدهی حجمی	۵-۱ g/l	۰/۱-۰۲ g/l
هزینه	بالا	پایین

روش‌های ترانسفکت برای TGE اساسا قابل مقایسه با روش‌ها برای SGE بوده و بسیاری از پروتکل‌های ترانسفکت تا به امروز به چاپ رسیده است (۳۸ و ٤٦) و بنابراین توضیح زیادی در این باره در این مقاله ذکر نمی‌شود و تنها به مواردی که می‌تواند کمیت و کیفیت پروتئین تولید شده را ارتقا دهد، اشاره می‌شود. در ترانسفکشن پایدار DNA، پلاسمید خطی ترجیح داده می‌شود، چرا که احتمال ادغام ژنومی را افزایش می‌دهد. در مقابل، ترانسفکشن گذرا به طور کلی از DNA پلاسمید حلقوی استفاده می‌کند، چرا که DNA در TGE به‌معنی ادغام شدن در ژنوم نیست، بلکه عملکردی به عنوان یک حامل مستقل اطلاعات ژنتیکی دارد. با این حال، نشان داده شده است که DNA پلاسمید فراپیچ شده نیز، ممکن است به ژنوم با توجه به حضور آندونوکلئازها و آنزیم‌های نوترکیبی DNA البته با فراوانی پایین ادغام شود (٣٤). معمولا گفته می‌شود که چند ساعت پس از ترانسفکشن، DNA پلاسمید با سلول‌ها برخورد دارد، اما اغلب رده‌های سلولی بین ۱ تا ۳ روز بعد از ترانسفکشن به نقطه اوج تولید خود می‌رسند (٤٧ و ٤٨). مرحله تولید می‌تواند تا ١٤ روز بعد از ترانسفکشن، بسته به ترکیب خاص سیستم TGE طول بکشد (٤٩).

نتیجه‌گیری

توسعه سیستم‌های بیانی، یک حوزه رو به رشد و چالش برانگیز است که در آن دانش‌های فعلی خط مشی‌های پیشرفت‌های آینده را ارائه می‌دهند. بنابراین تعیین بهترین ترکیب میزبان- ناقل برای تولید پروتئین نوترکیب مشکل است. توسعه این سیستم‌ها یک روند پویا می‌باشد که مرتبا با پدید آمدن میزبان‌های جدید و پیاده‌سازی عناصر ژنتیکی جدید در حال تحول است. بیشتر پروتئین‌های نوترکیبی که امروزه در درمان از آن‌ها استفاده می‌شود، مولکول‌های پیچیده‌ای هستند که برای داشتن فعالیت بیولوژیکی، نیاز به تغییرات پس از ترجمه دارند. سیستم‌های بیانی برای تولید پروتئین نوترکیب با بهره‌گیری از سلول‌های پستانداران توانایی تولید پروتئینی با تاخوردگی مناسب و تغییرات پس از ترجمه که برای کسب فعالیت بیولوژیکی هر پروتئینی نیاز است را دارند. به همین دلیل در طی دو دهه‌ی گذشته، پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از سلول‌های پستانداران، رایج‌ترین پروتئین‌های تولیدی در کاربردهای درمانی بوده‌اند، به‌طوری که بیش از نیمی از تولیدات داروهای زیستی را به خود

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

اختصاص داده‌اند.

در مقیاس بزرگ، TGE این پتانسیل را دارد که مقدار زیادی پروتئین را در یک زمان کوتاه و با هزینه کم تولید کند. این می‌تواند موجب غربالگری سریع و بالا پروتئین نوترکیب در طی مراحل پیش بالینی توسعه مواد دارویی شده و موجب افزایش نرخ موفقیت در توسعه پروتئین‌های درمانی شود. با این حال، با وجود تمام پیشرفت‌های انجام شده در TGE، بازده حجمی که می‌تواند به دست آید، هنوز هم نسبتا کم است. بهره‌وری ویژه سلولی TGE، در حدود ۱۰ پیکوگرم/ سلول/روز می‌باشد. در حالی‌که بهره‌وری ویژه سلولی SGE، معمولا حدود ٤٠ پیکوگرم/سلول/روز می‌باشد. علاوه بر این، به طور کلی درصد زنده بودن سلول‌ها در سیستم‌های TGE در طول مرحله تولید نسبت به سیستم‌های SGE به دلیل این‌که شرایط کشت در TGE تنش بیشتری بر سلول وارد می‌کند، کمتر است. این شکاف‌ها بین TGE و SGE نشان می‌دهد که امکان افزایش بازده حجمی در TGE وجود دارد. این موضوع تحقیقات آینده محققین در صنعت تولید پروتئین نوترکیب خواهد بود.

اولین راهبرد در کشور برای تولید پروتئین نوترکیب، می‌تواند استفاده از سیستم‌های پروکاریوتی و عمدتا استفاده از *E.coli* باشد. اما نظر به نیاز به بیان پروتئین‌های انسانی جهت درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان سینه و یا برخی بیماری‌های قلبی و عروقی رایج در کشور و عدم تطابق فرآیندهای انجام شده در حین ساخت پروتئین در پروکاریوت‌ها با آنچه در بافت‌های انسانی اتفاق می‌افتد، انتخاب این سیستم بی‌نقص نخواهد بود. تولید حیوانات تراریخته از طریق شبیه‌سازی، افق جدیدی در تولید داروهای نوترکیب از طریق برخی تولیدات آن‌ها نظیر شیر در برابر محققان گشوده است. تلاش‌هایی در این زمینه در موسسه رویان انجام شده، ولی هنوز هزینه بالای شبیه‌سازی حیوانات یکی از مشکلاتی است که تولید پروتئین نوترکیب با این سیستم را با چالش بزرگ رو به رو می‌کند. بنابراین استفاده از رده‌های سلولی، به عنوان راهکاری عملی برای تولید پروتئین نوترکیب در کشور می‌تواند مطرح شود. در این زمینه امکان استفاده از برخی سویه‌های اصلاح شده رده سلولی، CHO نظیر K1 و یا DG44برای تولید پروتئین نوترکیب در کوتاه مدت وجود دارد. اما هدف اصلی باید تلاش برای بهبود و یا ساخت رده‌های سلولی پایدار جهت تولید پروتئینی با بیشترین مشابهت با شکل طبیعی خودش باشد. به هرحال یک سیستم بیانی بهینه، می‌تواند با در نظر گرفتن قابلیت تولید، فعالیت بیولوژیکی، هدف و خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین هدف، انتخاب شود. البته به همراه این موارد، زمان مورد نیاز برای راه‌اندازی آن سیستم، هزینه، راحتی استفاده و مسائل امنیتی هر کدام از سیستم‌ها نیز باید مد نظر قرار گیرد. پیشرفت‌های آینده در سیستم‌های بیان بر روی افزایش بهره‌وری برای پاسخگویی به تقاضای رو به رشد برای این محصولات و پالایش عملکردشان به‌طوری که دوز مورد نیاز به حداقل برسد، متمرکز خواهد شد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

References فهرست منابع

1. **Durocher, Y. and Butler, M., 2009.** Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(6), pp.700-707.

2. **Rai, M. and Padh, H., 2001**. Expression systems for production of heterologous proteins. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE-*, *80*(9), pp.1121-1128.

3. **Rader, R.A., 2008.** Expression systems for process and product improvement. *BioProcess Int*, *6*(Suppl 4), pp.4-9.

4. **Magistrelli, G., Malinge, P., Elson, G. and Fischer, N., 2012.** Episomal vectors for rapid expression and purification of proteins in mammalian cells. In *Protein Purification*. IntechOpen.

5. **Sodoyer, R., 2004.** Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *BioDrugs*, *18*(1), pp.51-62.

6. **Klammt, C., Löhr, F., Schäfer, B., Haase, W., Dötsch, V., Rüterjans, H., Glaubitz, C. and Bernhard, F., 2004.** High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *European Journal of Biochemistry*, *271*(3), pp.568-580.

7. **Liguori, L., Marques, B., Villegas**-Méndez, A., Rothe, R. and Lenormand, J.L., 200**7.** Production of membrane proteins using cell–free expression systems. *Expert review of proteomics*, *4*(1), pp.79-90.

8. **Brödel, A.K., Sonnabend, A. and Kubick, S., 2014.** Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, *111*(1), pp.25-36.

9. **Carlson, E.D., Gan, R., Hodgman, C.E. and Jewett, M.C., 2012.** Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnology advances*, *30*(5), pp.1185-1194.

10. **Goerke, A.R. and Swartz, J.R., 2008.** Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnology and bioengineering*, *99*(2), pp.351-367.

11. **Kanter, G., Yang, J., Voloshin, A., Levy, S., Swartz, J.R. and Levy, R., 2007.** Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines. *Blood*, *109*(8), pp.3393-3399.

12. **Yang, J., Kanter, G., Voloshin, A., Michel-Reydellet, N., Velkeen, H., Levy, R. and Swartz, J.R., 2005.** Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system. *Biotechnology and bioengineering*, *89*(5), pp.503-511.

13. **Zawada, J.F., Yin, G., Steiner, A.R., Yang, J., Naresh, A., Roy, S.M., Gold, D.S., Heinsohn, H.G. and Murray, C.J., 2011.** Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnology and bioengineering*, *108*(7), pp.1570-1578.

14. **Goshima, N., Kawamura, Y., Fukumoto, A., Miura, A., Honma, R., Satoh, R., Wakamatsu, A., Yamamoto, J.I., Kimura, K., Nishikawa, T. and Andoh, T., 2008.** Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro–expressed proteome. *Nature methods*, *5*(12), p.1011.

15. **Griffiths, A.D. and Tawfik, D.S., 2003.** Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization. *The EMBO journal*, *22*(1), pp.24-35.

16. **Casadaban, M.J., Martinez-Arias, A., Shapira, S.K. and Chou, J., 1983.** [21] β-Galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in Escherichia coli and yeast. In *Methods in enzymology* (Vol. 100, pp. 293-308). Academic Press.

17. **Shatzman, A.R. and Rosenberg, M., 1987. [69]** Expression, identification, and characterization of recombinant gene products in Escherichia coli. In *Methods in enzymology* (Vol. 152, pp. 661-673). Academic Press.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

18. Valero, F., 2013. Bioprocess engineering of Pichia pastoris, an exciting host eukaryotic cell expression system. In *Protein Engineering-Technology and Application*. IntechOpen.

19. Hitzeman, R.A., Hagie, F.E., Levine, H.L., Goeddel, D.V., Ammerer, G. and Hall, B.D., 1981. Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*, *293*(5835), p.717.

20. Higgins, D.R. and Cregg, J.M., 1998. Introduction to Pichia pastoris. In *Pichia protocols* (pp. 1-15). Humana Press.

21. Gellissen, G. and Hollenberg, C.P., 1997. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha and Kluyveromyces lactis-a review. *Gene*, *190*(1), pp.87-97.

22. Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. and Gellissen, G., 2007. Yeast expression platforms. *Applied microbiology and biotechnology*, *77*(3), pp.513-523.

23. O'Reilly, D.R., Miller, L.K. and Luckow, V.A., 1994. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Oxford University Press on Demand.

24. Kitts, P.A. and Possee, R.D., 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques*, *14*(5), pp.810-817.

25. Matsuura, Y., Miyamoto, M., Sato, T., Morita, C. and Yasui, K., 1989. Characterization of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed by recombinant baculoviruses. *Virology*, *173*(2), pp.674-682.

26. Ikonomou, L., Drugmand, J.C., Bastin, G., Schneider, Y.J. and Agathos, S.N., 2002. Microcarrier culture of lepidopteran cell lines: implications for growth and recombinant protein production. *Biotechnology progress*, *18*(6), pp.1345-1355.

27. Marchal, I., Jarvis, D.L., Cacan, R. and Verbert, A., 200**1.** Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biological chemistry*, *382*(2), pp.151-159.

28. Kim, J.Y., Kim, Y.G. and Lee, G.M., 2012. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied microbiology and biotechnology*, *93*(3), pp.917-930.

29. Walsh, G., 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature biotechnology*, *28*(9), p.917.

30. Baldi, L., Hacker, D.L., Adam, M. and Wurm, F.M., 2007. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology letters*, *29*(5), pp.677-684.

31. Beck, A., Wagner-Rousset, E., Bussat, M.C., Lokteff, M., Klinguer-Hamour, C., Haeuw, J.F., Goetsch, L., Wurch, T., Dorsselaer, A.V. and Corvaïa, N., 2008. Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Current pharmaceutical biotechnology*, *9*(6), pp.482-501.

32. Haack, A., Schmitt, C., Poller, W., Oldenburg, J., Hanfland, P., Brackmann, H.H. and Schwaab, R., 1999. Analysis of expression kinetics and activity of a new B-domain truncated and full-length FVIII protein in three different cell lines. *Annals of hematology*, *78*(3), pp.111-116.

33. Khan, K.H., 2013. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced pharmaceutical bulletin*, *3*(2), p.257.

34. Wurm, F.M., 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, *22*(11), p.1393.

35. Costa, A.R., Rodrigues, M.E., Henriques, M., Azeredo, J. and Oliveira, R., 2010. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *74*(2), pp.127-138.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

36. Urlaub, G., Käs, E., Carothers, A.M. and Chasin, L.A., 1983. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell*, *33*(2), pp.405-412.

37. Pham, P.L., Kamen, A. and Durocher, Y., 2006. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Molecular biotechnology*, *34*(2), pp.225-237.

38. Geisse, S. and Henke, M., 2005. Large-scale transient transfection of mammalian cells: a newly emerging attractive option for recombinant protein production. *Journal of structural and functional genomics*, *6*(2-3), pp.165-170.

39. Shi, C., Shin, Y.O., Hanson, J., Cass, B., Loewen, M.C. and Durocher, Y., 2005. Purification and characterization of a recombinant G-protein-coupled receptor, Saccharomyces cerevisiae Ste2p, transiently expressed in HEK293 EBNA1 cells. *Biochemistry*, *44*(48), pp.15705-15714.

40. Meissner, P., Pick, H., Kulangara, A., Chatellard, P., Friedrich, K. and Wurm, F.M., 2001. Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells. *Biotechnology and bioengineering*, *75*(2), pp.197-203.

41. Backliwal, G., Hildinger, M., Hasija, V. and Wurm, F.M., 2008. High-density transfection with HEK-293 cells allows doubling of transient titers and removes need for a priori DNA complex formation with PEI. *Biotechnology and bioengineering*, *99*(3), pp.721-727.

42. Stadler, J., Lemmens, R. and Nyhammar, T., 2004. Plasmid DNA purification. *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, *6*(S1), pp. S54-S66.

43. Wright, J.L., Jordan, M. and Wurm, F.M., 2003. Transfection of partially purified plasmid DNA for high level transient protein expression in HEK293-EBNA cells. *Journal of biotechnology*, *102*(3), pp.211-221.

44. Wakelin, S.J., Sabroe, I., Gregory, C.D., Poxton, I.R., Forsythe, J.L., Garden, O.J. and Howie, S.E., 2006. "Dirty little secrets"—endotoxin contamination of recombinant proteins. *Immunology letters*, *106*(1), pp.1-7.

45. Lechardeur, D., Verkman, A.S. and Lukacs, G.L., 2005. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Advanced drug delivery reviews*, *57*(5), pp.755-767.

46. Rajendra, Y., Kiseljak, D., Baldi, L., Hacker, D.L. and Wurm, F.M., 2011. A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells. *Journal of biotechnology*, *153*(1-2), pp.22-26.

47. Carpentier, E., Paris, S., Kamen, A.A. and Durocher, Y., 2007. Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells. *Journal of biotechnology*, *128*(2), pp.268-280.

48. Wulhfard, S., Kiseljak, D., Baldi, L., Hacker, D.L. and Wurm, F.M., 2012. Transgene mRNA Levels and Stability Are Key Factors to Enhance Transient Gene Expression in CHO DG44 Cells. In *Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7-10, 2009* (pp. 121-124). Springer, Dordrecht.

49. Matasci, M., Hacker, D.L., Baldi, L. and Wurm, F.M., 2008. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discovery Today: Technologies*, *5*(2-3), pp. e37-e42.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]

Evaluation of Different Expression Systems for the Production of Pharmaceutical Recombinant Proteins with Emphasis on Mammalian Cells

Sayed Mehdi Hosseini Vardanjani, Mojtaba Tahmoorespur*
Ph.D. student of Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
* Professor of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

smhosseini2020@ut.ac.ir

Abstract
A protein will be best expressed in its native cell type under physiological conditions, where a multitude of molecular systems work together for efficient production and quality control at various stages, including synthesis and folding, post-translational modification. However, production of proteins in appropriate quantity and quality is an essential requirement for therapeutic purposes in the present time. So, various expression systems have been developed to produce recombinant proteins: bacteria systems, yeast, baculovirus-infected insect cells, mammalian cells and, more recently, cell-free systems. In this review all of these systems were investigated in terms of capability to produce a recombinant protein with same function to their native. The advantages and disadvantages of each of these systems are also presented. When the folding and the extent of post-translational modifications of the recombinant protein are critical, expression in Eukaryotic systems and in particular the use of mammalian host cells, not only provides the optimal machinery for proper folding and post-translational modifications, but also possible the expression of large and complex proteins. However, an expression system should be capable to combine high yield, highest biological activity, ease of purification, and short timelines.
Keywords: Expression systems, Recombinant proteins, Mammalian cells, Transient and Stable gene expression

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.1.3]