

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 , Gh. 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 ABSTRACT

Research Paper

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 DH5 α 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.

Received:

Oct 15th 2023

Revised:

Nov 19th 2023

Accepted:

Dec 23rd 2023

Cite this article: Ebrahimi M, Ferdosi-Shahandashti E, Zarei M, Kardar Gh. 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.

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

محمد رضا ابراهیمی (MSc)^۱ ID، الهه فردوسی شاهاندشتی (PhD)^{۲*} ID، محبوبه زارعی (MSc)^۳ ID،
غلامعلی کاردر (PhD)^۴ ID

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲. مرکز تحقیقات فناوری های 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	چکیده
مقاله پژوهشی	سابقه و هدف: بیماری هموفیلی نوع A، شایع ترین نوع این بیماری است. جهت درمان بیماران هموفیلی، کنسانتره تزریقی فاکتور VIII انسانی، به دو صورت مشتق از پلاسما و نو ترکیب در بازار وجود دارد. با توجه به خطر ابتلا به بیماری های عفونی در اثر تزریق خون یا محصولات خونی اهدایی از جمله فاکتور VIII مشتق از پلاسما، می توان از فاکتور VIII نو ترکیب که از لحاظ ایمنی بی خطر، دارای خلوص بالاتر از نمونه مشتق از خون بوده و نیز نیمه عمر طولانی تری در خون بیماران مصرف کننده دارد، استفاده نمود. هدف از این مطالعه، بیان و سنتز فاکتور VIII نو ترکیب انسانی با استفاده از سیستم بیانی یوکاریوتی عاری از سلول به عنوان استراتژی نوین سنتز داروهای نو ترکیب می باشد. مواد و روش ها: 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 سلول های یوکاریوتی CHO-K1 کشت داده شدند و از تراکم بیش از ده میلیون سلول آن ها، 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 تکنیک های الایزا و دات بلات بررسی گردید. یافته ها: در این پژوهش با تکنیک الایزا میزان بیان فاکتور VIII انعقاد خون نو ترکیب 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 میلی لیتر گزارش شد. در تکنیک دات بلات نیز نتایج کمی ذکر شده به صورت کیفی با شدت رنگ لکه ها تأیید گردید. نتیجه گیری: نتایج حاصل نشان داد که از روش بیان عاری از سلول می توان برای سنتز فاکتور VIII نو ترکیب استفاده نمود. شرایط بکار گرفته شده در این پژوهش جهت بیان بدون سلول فاکتور VIII نو ترکیب، 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 نو ترکیب انسانی سنتز شده دارای تغییرات پس از ترجمه است که جهت عملکردی بودن این پروتئین در بدن انسان بسیار مهم می باشد. واژه های کلیدی: فاکتور VIII نو ترکیب انسانی، رده سلولی CHO-K1، عصاره سلولی، بیان بدون سلولی.
دریافت:	۱۴۰۲/۷/۲۳
اصلاح:	۱۴۰۲/۸/۲۸
پذیرش:	۱۴۰۲/۱۰/۲
استناد:	محمد رضا ابراهیمی، الهه فردوسی شاهاندشتی، محبوبه زارعی، غلامعلی کاردر، بیان و سنتز فاکتور VIII انعقادی نو ترکیب انسانی با استفاده از سیستم بیانی بدون سلول. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۳؛ ۲۶: ۱۷۷.

این مقاله مستخرج از پایان نامه محمد رضا ابراهیمی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۸۰۹۳۷۳ دانشگاه علوم پزشکی بابل می باشد.

* 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 روی 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 (۳ و ۴). 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: کنسارته 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 فایبرینولیتیک‌ها و داروهای هموستاتیک موضعی می‌باشند. 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 HCV، HBV 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 مونوکلونال 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) کامل تری می‌باشد مثل سولفات تیروزین (Tyrosine sulphation) که نتیجه آن، تقویت اتصال به فاکتور ونویلبراند و افزایش نسبتاً کم در طول عمر آن می‌باشد. این عمل همچنین منجر به عدم حضور ساختارهای قندی Gal α 1-3Gal β 1-GlcNAc- (alpha-Gal) R و N-glycolylneuraminic acid در فاکتور VIII، که در برخی شرایط باعث ایجاد پاسخ ایمنی می‌شوند، می‌گردد (۱۱ و ۱۲).

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 (۱۷ و ۱۸). همچنین در تولید مواد بیولوژیک از جمله واکسن‌ها، به این علت که استراتژی‌های فعلی تولید واکسن زمانبر بوده و نیز خطر آلودگی ویروسی، ایمنی زایی و پایداری پایین وجود دارد، پیشنهاد می‌گردد تا از سیستم‌های

بیانی بدون سلول، که دارای فرآیندهای رونویسی و ترجمه خارج سلولی، توانایی بیان و سنتز سریع تر پروتئین و بهینه سازی آسان تری می باشد، استفاده گردد (۱۹). سیستم بیانی بدون سلول را نیز می توان برای استفاده طولانی مدت به حالت لیوفلیزه درآورد (۲۰).

در میان سیستم های 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 نمی افتد، باید از یک میزبان یوکاریوتی استفاده نمود. در سیستم های یوکاریوتی، از سلول های جوانه گندم، مخمر، رتیکولوسیت خرگوش، حشره، HeLa و CHO استفاده می شود که در بین این سلول ها، سلول های CHO و HeLa، تغییرات پس از ترجمه بهتری را انجام می دهند (۲۱). از بین سلول های CHO و HeLa، سلول های CHO نیاز به امکانات کمتری برای رشد و تکثیر داشته و مقرون به صرفه تر هستند. تاکنون با استفاده از سیستم بیانی بدون سلول، فاکتور VIII نو ترکیب تولید نشده است و از آنجا که تولید این فاکتور با استفاده از این روش بسیار ساده تر و ایمن تر می باشد، 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. غلظت های مختلفی از بعضی مواد و عوامل موثر در بیان، در یک گروه شامل ۴ نمونه آزمایشات بیان و سنتز فاکتور VIII نو ترکیب، انجام گردید.

سویه باکتریایی، رده سلولی و پلاسمید: سویه DH5α از باکتری اشرشیاکلی (Stratagene-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 دمن (domain B) و به عنوان پلاسمید بیانی استفاده گردید. محیط ها، آنزیم ها، مواد شیمیایی و کیت ها: 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 میلی گرم در میلی لیتر) در صورت نیاز برای حفظ فشار انتخابی اضافه گردید. آنزیم KpnI از شرکت Roche- آلمان خریداری شد. سلول های 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 پلازما (Biotest-Germany) استفاده شد.

کلون کردن pcDNA3-BDD-hFVIII در میزبان باکتریایی DH5a و استخراج پلاسمید: تکنیک های دستکاری DNA، مانند استخراج DNA پلاسمید، هضم DNA و کلونینگ بر اساس روش های استاندارد انجام شد (۲۳). با استفاده از روش شوک حرارتی برای انتقال وکتور نو ترکیب به درون باکتری E. coli استفاده گردید. پلاسمید نو ترکیب (حاوی ژن کد کننده فاکتور VIII)، به سویه DH5α باکتری اشرشیا کلی منتقل شد، سپس باکتری های 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 نو ترکیب نیز با استفاده از روش هضم آنزیمی با آنزیم kpnI تأیید شد. سپس با دستورالعمل کیت GeneAll exprep Plasmid SV mini، استخراج پلاسمید از کلنی های ترانسفورم شده انجام شد.

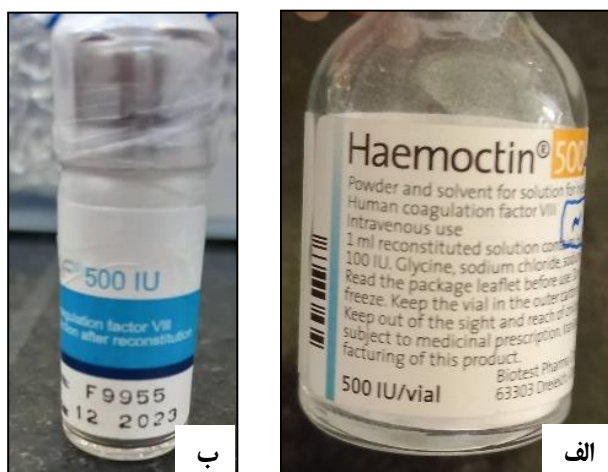
کشت سلولی: در این مطالعه از رده سلولی یوکاریوتی CHO-K1 که مورفولوژی شبه اپیتلیال دارند و در محیط کشت به صورت چسبنده رشد می کنند، استفاده شد. شرایط مناسب برای کشت این رده سلولی محیط RPMI با ۱۰٪ FBS در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO2 و رطوبت ۹۵٪ می باشد. **تهیه عصاره سلولی:** سلول های به دست آمده از فلاسک های سلولی جمع آوری گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰ سانتیفریوژ شدند. در مرحله بعد، با محلول واش (شرکت شفا مل- ایران) شستشو داده شدند. سپس سلول ها در محلول extraction (شرکت شفا مل- ایران) که از قبل به دمای اتاق رسیده بود، غوطه ور 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 شفا مل- ایران). عصاره سلولی به دست آمده با نسبت برابر در مجاورت محلول بیانی تهیه شده قرار گرفت. این میکروتیوب ها به مدت ۲۰ ساعت در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند (۲۳).

%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 بیوتینیل 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 بیوتینیل 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.



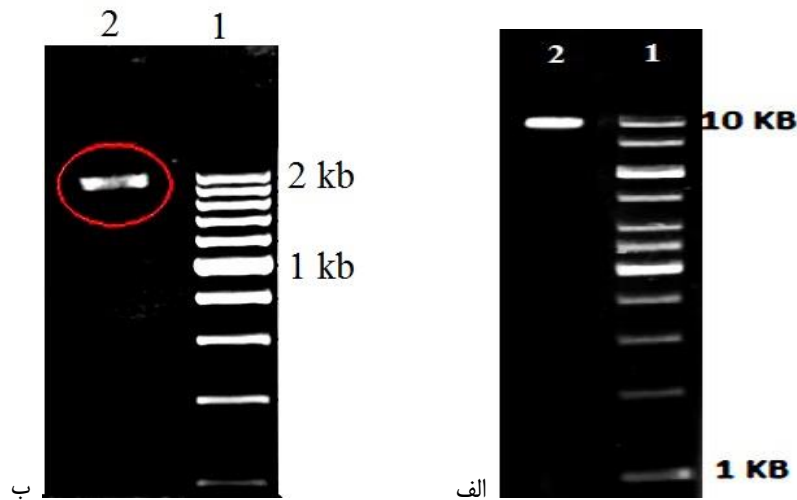
شکل ۱. الف: فاکتور VIII تجاری مشتق از پلاسما، ب: آنتی بادی ضد فاکتور VIII

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 بیوتینیل اضافه گردید و پس از انکوباسیون و شستشو، آنزیم استرپتوآویدین 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 نو ترکیب انسان FVIII، از آزمون آنالیز واریانس Tukey's post hoc استفاده گردید و $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

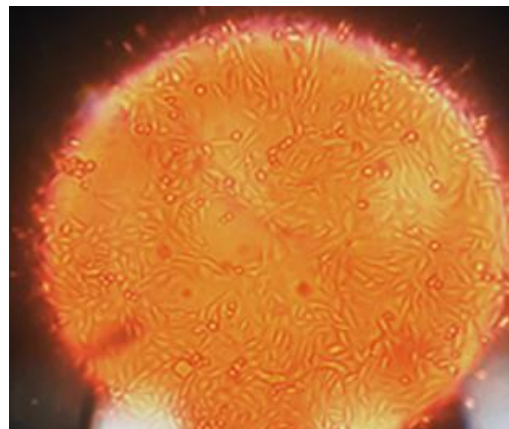
یافته ها

کلون، استخراج و هضم پلاسمید: تکثیر پلاسمید نو ترکیب 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 نو ترکیب 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)

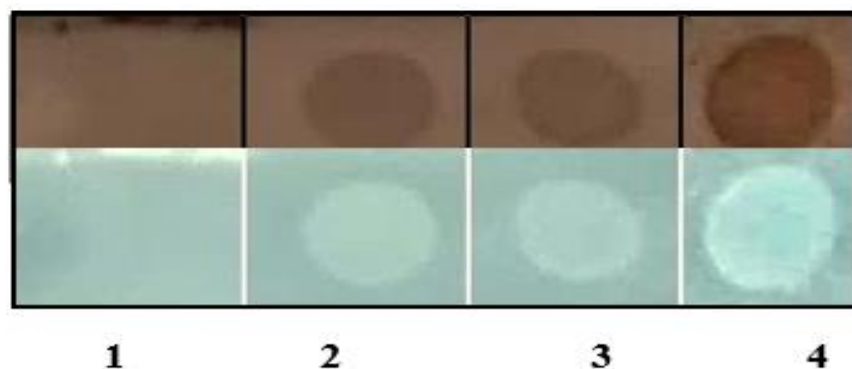
کشت رده سلولی یوکاریوتی CHO-K1: سلول‌های رده CHO-K1، از لحاظ مورفولوژی و تعداد مورد بررسی قرار گرفتند و پس از رسیدن به تراکم ۸۰٪، جهت رسیدن به عدد ۵۰ میلیون سلول، به چندین فلاسک پاساژ داده شدند (شکل ۳).



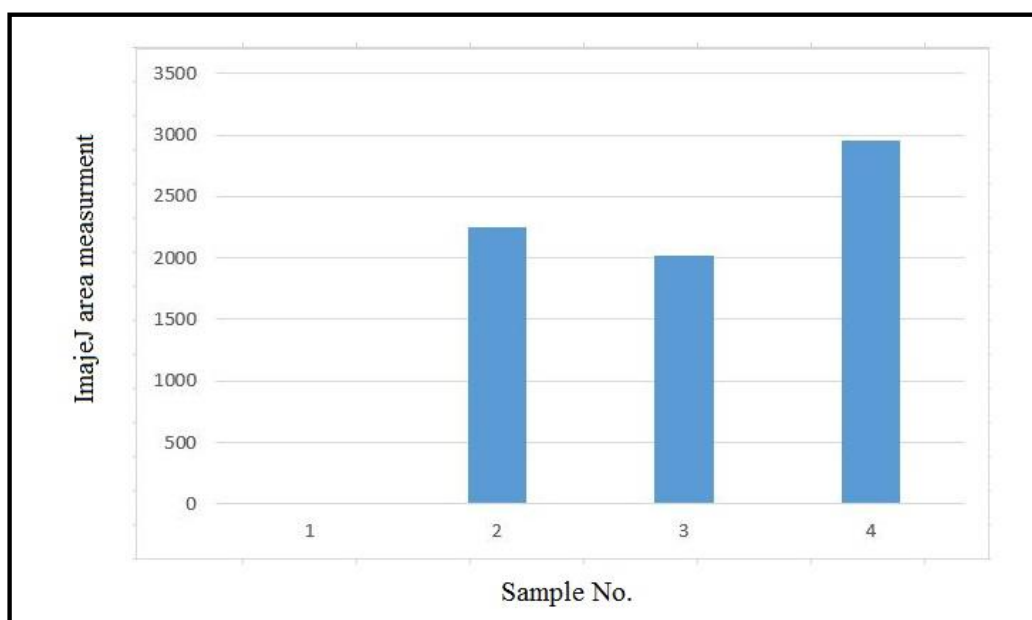
شکل ۳. بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی سلول‌های CHO-K1 یک هفته پس از ذوب شدن

تجزیه و تحلیل بیان فاکتور VIII نو ترکیب 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

تکنیک دات بلات، کمی پر رنگ تر از نمونه انکوبه شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بود (شکل ۴). جهت آنالیز نتایج تکنیک دات بلات نیز با استفاده از نرم افزار image J نتایج به دست آمده تأیید شد (شکل ۵).

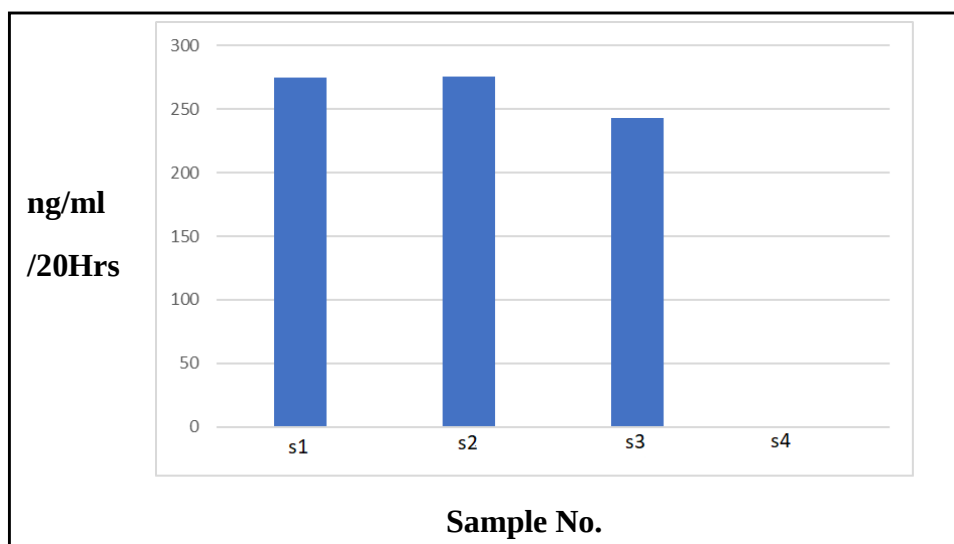


شکل ۴. نتایج تکنیک دات بلات جهت بررسی بیان: ۱- کنترل منفی، ۲- نمونه انکوبه شده در ۳۰ درجه سانتی گراد، ۳- نمونه انکوبه شده در ۳۷ درجه سانتی گراد، ۴- کنترل مثبت نمونه تجاری فاکتور VIII مشتق شده از پلاسما



شکل ۵. نتیجه آنالیز نتایج تکنیک دات بلات با نرم افزار image J (۱- کنترل منفی، ۲- نمونه پایه انکوبه شده در ۳۰ درجه سانتی گراد، ۳- نمونه انکوبه شده در ۳۷ درجه سانتی گراد، ۴- 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 میلی لیتر 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 سانتی گراد
 نمونه ۲: افزایش غلظت عصاره سلولی به میزان ۱/۴ برابر و فسفات به میزان ۱۰ برابر- ۲۰ ساعت دمای ۳۰ درجه سانتی گراد
 نمونه ۳: نمونه پایه شامل محلول بیانی و پلاسمید نوترکیب- ۲۰ ساعت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد
 نمونه ۴: نمونه محلول بیانی بدون اضافه کردن پلاسمید (کنترل منفی)- ۲۰ ساعت دمای ۳۰ درجه سانتی گراد.



شکل ۶. بررسی کمی بیان FVIII در نمونه‌ها با تکنیک الایزا (s1: نمونه ۱، s2: نمونه ۲، s3: نمونه ۳، s4: نمونه ۴)

جدول ۱. مقایسه میزان بیان فاکتور VIII در نمونه‌ها

شماره نمونه‌ها	غلظت فاکتور VIII نو ترکیب 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 نو ترکیب انسانی با استفاده از روش بیان بدون سلول انجام گردید که بهترین دما برای واکنش بیانی عاری از سلول این داروی نو ترکیب، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب با این روش تاکنون انجام نشده است. روش بیانی بدون سلول داروهای نو ترکیب از جمله فاکتور VIII نو ترکیب 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 و ۹۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (۱۴). در مطالعه ما بیان و سنتز این داروی نو ترکیب 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 نو ترکیب کوچکتر دارد.

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

نام محصول	تاریخ دریافت	تغییرات ژنتیکی بر روی قطعه	زئومی 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		
rFVIII-Fc (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 لوسیفر از 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 بهینه‌سازی 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 امکان‌پذیر 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.

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 (rFVIII-Fc) 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 Clinical 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, Plucienniczak G, Ciach T, Plucienniczak 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.

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.