Journal of Police Medicine

Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 139-150

Review Article

Recent Improvements in Production of Recombinant Proteins

Received: 19 June 2013 **Revised:** 3 September 2013 **Accepted:** 5 September 2013

Seyed Babak Mousavi[1]
Seyed Abbas Shojaosadati[2*]

[1]Ph.D student, Biotechnology Group, Chemical Engineering Faculty, Tarbiyat Modares University, Tehran, Iran.
[2]Professor, Biotechnology Group, Chemical Engineering Faculty, Tarbiyat Modares University, Tehran, Iran.

[*]**Corresponding Author:**
Seyed Abbas Shojaosadati
Tel : (+98)9121300501
Email: shoja_sa@modares.ac.ir

ABSTRACT

Recombinant protein production is a fundamental aspect of biotech industry in 21st century in . Harnessing the natural protein expression powers of prokaryotic as well as eukaryotic hosts, enabled the development of a multi-billion dollar industries. Recombinant proteins have gained enormous importance for clinical applications. Most of therapeutic recombinant proteins are produced in mammalian cells although, Escherichia coli has been the most widely used host for the production of recombinant proteins. Various yeast expression systems have been successfully used over the years for production of recombinant proteins. Good characteristics of yeast, combined with revolutionary advances in systems and synthetic biology, micro-array technology and the rapidly evolving databases on the Web, have made a prominent place for yeast within the range of expression systems. The demand for recombinant therapeutic proteins is significantly increasing and there is a constant need to improve the existing expression systems, and also developing novel systems to face the therapeutic proteins demands. Cell-free expression system for production of recombinant proteins has also introduced which has many advantages over production of recombinant proteins in cell systems. Rapid growing and developing market of recombinant therapeutics and industrial enzymes have doubled the necessity of developing and optimizing industrial strains and biological process. Using systems biology and applying engineering principles for optimization and development of biological systems are effective strategies, that using them in the development of recombinant protein production processes is increasing rapidly.

Keywords: recombinant protein, e. coli, yeast, mammalian cell, systems biology

پاییز۱۳۹۲ – دوره ۲ – شماره ۳– صفحات ۱۳۹–۱۵۰

مجله طب انتظامی

مقاله مروری

پیشرفت های اخیر در تولید پروتئین های نوترکیب

تاریخ دریافت: ۲۹ خرداد ۱۳۹۲ **تاریخ اصلاح:** ۱۲ شهریور ۱۳۹۲ **تاریخ پذیرش:** ۱۴ شهریور ۱۳۹۲

چکیده

سید بابک موسوی[۱]

سید عباس شجاع الساداتی[۲*]

تولید پروتئین‌های نوترکیب یکی از مهمترین دستاوردهای زیست فناوری در قرن بیستم است. استفاده از قدرت طبیعی سلول‌های میزبان پروکاریوتی و یوکاریوتی در بیان پروتئین‌های نوترکیب باعث توسعه صنایع چند میلیارد دلاری شده است. پروتئین ها ی نوترکیب اهمیت بسیار زیادی برای کاربردها ی پزشکی پیدا کرده‌اند. اکثر پروتئین‌های نوترکیب دارویی در سلول‌های پستاندارن تولید می‌شوند، با این حال باکتری اشریشیاکلای میزبانی است که بیشترین استفاده را برای تولید پروتئین ها ی نوترکیب داشته است. در طی سالیان سامانه‌های بیانی مختلفی از مخمرها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته اند. ادغام ویژگی‌ها ی خوب مخمرها با پیشرفت‌های مهم در زیست شناسی سامانه‌ها و زیست شناسی ترکیبی و فناوری ریز آرایه، جایگاه خوبی را برای مخمرها در بین سامانه‌های بیانی ایجاد کرده است. یک نیاز دائمی برای بهتر کردن سامانه‌های بیان موجود و همچنین توسعه سامانه‌ها ی بیانی جدید برای رویارویی با تقاضای پروتئین‌های دارویی وجود دارد. سامانه بدون سلول برای سنتز پروتئین ها ی نوترکیب نیز مطرح شده و مزایای زیادی نسبت به تولید پروتئین در سامانه‌ها ی سلولی دارد. رشد سریع و در حال توسعه بازار داروهای نوترکیب و آنزیم‌های صنعتی نیاز به توسعه و بهینه سازی سویه‌ها ی صنعتی و فرآیندها ی زیستی را دو چندان برابر کرده است. استفاده از زیست شناسی سامانه‌ها و به کار گیری اصول مهندسی برای بهینه سازی و توسعه سامانه‌های زیستی راهبردها ی موثری هستند که استفاده از آن‌ها در توسعه فرایندها ی تولید پروتئین ها ی نوترکیب به سرعت در حال افزایش است.

کلید واژه‌ها: پروتئین‌های نوترکیب، اشریشیاکلای، مخمر، سلول پستانداران، زیست شناسی سامانه‌ها

[۱]دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[۲]استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:**

سید عباس شجاع اساداتی

تلفن: ۹۱۲۱۳۰۰۵۰۱(۹۸+)

پست الکترونیک:

shoja_sa@modares.ac.ir

مقدمه

پروتئین‌ها واحدها ی سازنده حیات هستند که در بخشی از فرایند سوخت و ساز طبیعی سلول‌ها ی زنده ساخته می‌شوند. با استفاده از مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین می‌توان پروتئین ها را در مقیاس صنعتی تولید کرد [۱]. با استفاده از فناوری DNA نوترکیب می توان پروتئین ها ی صنعتی را به صورت اقتصادی با کیفیت پایدار و ایمنی اصلاح یافته تولید کرد. تولید صنعتی پروتئین نوترکیب منجر به توسعه محصولات بهبود یافته‌ای برای کاربردهای مختلف می‌شود؛ مثل دارو رسانی (به عنوان مثال کپسول ژلاتین)، آنزیم‌ها ی فرایندها ی زیستی (به عنوان مثال سلولازها، زایلانازها، لیگنازها ، پروتئازها، آمیلازها، لیپازها و ایزومرآزهای مورد نیاز برای

Journal of Police Medicine
Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 139-150

تبدیل مواد خام کشاورزی به سوخت‌های زیستی)، محصولات مصرفی (به عنوان مثال آنزیم های مورد استفاده در شوینده ها ، آنزیم‌ها ی مورد استفاده در صنایع نساجی، آنزیم‌ها ی سفید کننده، پپتیدهای ضد یخ)، پپتیدهای آنتی‌بیوتیک، عوامل غیرفعال کننده مواد شیمیایی خطرناک و پلیمرهای مبتنی بر پروتئینی با عملکرد پیشرفته (به عنوان مثال ابریشم عنکبوت، الاستین، پپتیدهای طراح) [۲]. با ظهور فناوری DNA نوترکیب در دهه ۱۹۷۰، تولید پروتئین‌های نوترکیب درمانی به صورت اقتصادی و با بازدهی بالا با استفاده از باکتری اشریشیاکلای آغاز شد. در اوایل دهه ۱۹۸۰، FDA نخستین داروی پروتئینی نوترکیب (انسولین انسانی نوترکیب) تولید شده در باکتری اشریشیاکلای نوترکیب را برای درمان دیابت تایید کرد. سپس راه برای توسعه سایر داروهای نوترکیب باز شد. از آن زمان به بعد، علاوه بر اشریشیاکلای، میزبان‌های بیانی مختلف، مانند مخمر، قارچ‌های رشته‌ای، سلول های حشرات و سلول های پستانداران، حیوانات تراریخته و گیاهان برای تولید داروهای نوترکیب مختلف و یا پیچیده‌تر مانند پادتن مونوکلونال مورد استفاده قرار می گیرند [۳]. تا کنون FDA[1] و EMEA[2] مجوز استفاده از ۱۵۰ پروتئین نوترکیب را برای استفاده به عنوان دارو صادر کرده اند. فروش جهانی زیست داروها حدود ۸۰-۷۰ میلیارد دلار برآورد می‌شود. همچنین تخمین زده می‌شود فروش سالیانه آنزیم‌های صنعتی (مانند پروتئازها، آمیلازها، لیپازها، سلولازها، پولولانازها و پکتینازها) نیز که به طور عمده با استفاده از فرآیندهای نوترکیب تولید می‌شوند، تا سال ۲۰۱۵ به ۷۴/۳ میلیارد دلار در سال برسد [۴].

طراحی سامانه بهینه برای تولید پروتئین نوترکیب شامل چندین مرحله مهم است: ۱) انتخاب سویه میزبان که توانایی تازدن[3] صحیح و تغییرات پس ترجمه‌ای[4] پروتئین را داشته باشد؛ ۲) انتخاب حامل مناسب با پروموتر قوی و یک نشانگر انتخابگر؛ ۳) ژن بهینه ساز کدون؛ ۴) امتزاج ژن با یک برچسب اپیتوپ برای خالص سازی راحت‌تر پروتئین؛ ۵) انتخاب توالی سیگنال برای هدایت پروتئین نوترکیب به فضای داخل سلولی یا خارج سلولی؛ ۶) جلوگیری از تخریب محصول به وسیله پروتئازها؛ ۷) طراحی محیط کشت تخمیر (منابع کربن و نیتروژن، شرایط القا) و ۸) بهینه سازی پارامترهای فرآیندهای زیستی (دما، pH، انتقال اکسیژن) [۵].

انتخاب سامانه بیان پروتئین

برای هر محصول، سامانه بیان مناسب باید انتخاب و با توجه به خواص محصول و سامانه بیان، از لحاظ ژنتیکی و شرایط کشت بهینه سازی شود. ارزان ترین، راحت ترین و سریع ترین راه بیان پروتئین‌ها با استفاده از باکتری اشریشیاکلای انجام می شود. با این حال باکتری‌ها قادر به بیان پروتئین‌های خیلی بزرگ نیستند. همچنین، باکتری‌ها برای پروتئین‌های حاوی چندین پیوند دی سولفیدی و پروتئین‌هایی که نیاز به اصلاحات پس ترجمه‌ای دارند، سامانه مناسبی برای انتخاب نیستند. پروتئین های بزرگ معمولاً در سامانه ها ی یوکاریوتی بیان می‌شوند در حالی که پروتئین‌های کوچک در سامانه‌های پروکاریوتی بیان می‌شوند. برای پروتئین‌هایی که نیاز به گلیکوزیلاسیون[5] دارند، سامانه سلول‌های پستانداران، قارچ ها یا باکلوویروس ها انتخاب می‌شوند [۱]. پروتئین های غیر گلیکوزیله که ۴۰٪ کل پروتئین‌های درمانی موجود در بازار را تشکیل می‌دهند معمولاً با استفاده از اشریشیاکلای یا مخمرها تولید می‌شوند. پروتئین‌های-N گلیکوزیله معمولاً در سلول‌های پستانداران تولید می‌شوند که الگوی گلیکوزیلاسیون آن‌ها شبیه الگوی انسانی است. ۵۰٪ پروتئین ها ی درمانی موجود در بازار با استفاده از سلول ها ی تخمدارن همستر چینی (CHO) تولید می شوند که فرایند تولید خیلی پر هزینه است و گلیکوپروتئین‌هایی که تولید می شوند دقیقاً مانند نمونه انسانی نیستند و در بعضی موارد باید تغییراتی روی آن ها اعمال شود. مخمر ها، قارچ ها و سلول های حشرات به طور کلی قادر به انجام الگوی گلیکوزیلاسیون پستانداران نیستند. با این حال پیکیاپاستوریس بطور ژنتیکی مهندسی شده است تا بتواند الگوی گلیکوزیلاسیون انسانی را انجام دهد [۶].

در جدول ۱ فهرست پرفروش ترین داروهای نوترکیب در سال ۲۰۰۷ به همراه میزبان های آن ها آورده شده است. از بین ۲۷ محصول زیست دارویی تایید شده توسط FDA (از ژوئن ۲۰۰۸ تا ژانویه ۲۰۱۱)، ۱۸مورد پروتئین‌های نوترکیبی هستند که با استفاده از سلول‌ها، سازواره‌ها یا حیوانات تولید می‌شوند. ۹ مورد بقیه واکسن‌ها

[1:] Food and Drug Administration, [2:] European Medicines Agency, [3:] Folding, [4:] Post Translational Modification, [5:] Glycosylation

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۲ – دوره۲ – شماره ۳– صفحات ۱۳۹–۱۵۰

و داروهایی هستند که به وسیله منابع طبیعی مانند پلاسمای انسان، بافت، سلول‌های سرطانی، ویروس‌های ضعیف شده و باکتری تولید می‌شوند. از بین ۱۸ محصول نوترکیب، ۱۲ مورد با استفاده از سامانه‌های بیان سلول‌های پستانداران، ۳ مورد با استفاده از اشریشیاکلای و ۳ مورد باقی مانده با استفاده از باکلوویروس، مخمر و بزهای تراریخته تولید می‌شوند. که این هم اهمیت استفاده از سامانه‌های پستانداران را در تولید داروهای نوترکیب نشان می‌دهد [۷].

تقریباً ۴۵ سال پیش مشخص شد که می‌توان پروتئین‌های نوترکیب را علاوه بر بیان پروتئین‌های غیر متجانس در میزبان‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی، با استفاده از عصاره سلول به دست آمده از کافت باکتری اشریشیاکلای، به صورت بدون سلول[1] بیان کرد. در حال حاضر سنتز پروتئین به روش بدون سلول در مواردی که مشکلاتی از قبیل تجمع پروتئین ها به شکل توده های پروتئینی نامحلول، تخریب پروتئین به دلیل فعالیت شدید پروتئازهای داخل سلولی و سمی بودن پروتئین هدف برای سلول میزبان رخ می‌دهد،

جدول ۱: پرفروش ترین داروهای نوترکیب در سال ۲۰۰۷ [۷].

محصول	درآمد بر حسب دلار	تاریخ تایید	سامانه بیان	استعمال
EPOs	۱۰،۷۹۴	۱۹۸۹	سلول پستانداران	کم خونی
Insulins	۱۰،۱۳۲	۱۹۹۲	اشریشیاکلای	دیابت
IFNs	۷۴۵۵	۱۹۹۳	اشریشیاکلای و مخمر	عفونت ویروسی و سرطان
Enbrel	۵۲۷۵	۱۹۹۸	سلول پستانداران	آرتریت روماتوئید
Remicade	۴۹۴۸	۱۹۹۸	سلول پستانداران	آرتریت روماتوئید
Rituxan	۴۶۰۰	۱۹۹۷	سلول پستانداران	NHL و CLL
Neupogen/Neulasta	۴۲۷۷	۲۰۰۲/۱۹۹۸	اشریشیاکلای	مایلوزوپرسیو در شیمی درمانی
Clotting Factors	۴۱۶۸	۱۹۹۷	سلول پستانداران	هموفیلی
Herceptin	۴۰۴۶	۱۹۹۸	سلول پستانداران	سرطان پستان
Lovenox	۳۶۰۵	۲۰۰۷	N/A	بیماری عروق کرونر
Avastin	۳۴۲۴	۲۰۰۴	سلول پستانداران	سرطان
Humira	۳۰۰۰	۲۰۰۲	سلول پستانداران	آرتریت روماتوئید
Growth Hormones	۲۵۴۵	۱۹۸۵	اشریشیاکلای	کمبود هورمون رشد
Prevnar/Prevenar	۲۴۳۹	۲۰۰۲	باکتریایی	پیشگیری از بیماری ناشی از باکتری پنوموکوکوس
Gardasil	۱۴۸۱	۲۰۰۶	مخمر	جلوگیری از سرطان مهبل
Erbitux	۱۳۳۶	۲۰۰۴	سلول پستانداران	سرطان
Lucentis	۱۲۱۹	۲۰۰۶	اشریشیاکلای	تباهی لکه زرد
Synagis	۱۲۰۰	۱۹۹۸	سلول پستانداران	عفونت ویروس سینسیتیال دستگاه تنفسی
Cerezyme	۱۱۴۴	۱۹۹۴	سلول پستانداران	بیماری گوشه

[1]: Cell Free

Journal of Police Medicine
Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 139-150

جدول ۲: ویژگی‌های سامانه بیان اشریشیاکلای [۱]

مزایا	معایب
بیان سریع	مشکل در بیان پروتئین‌های حاوی پیوندهای دی سولفیدی
بازده بالا	تولید پروتئین همراه با زهرابه داخلی
آسان بودن کشت وایجاد تغییرات ژنتیکی	تولید استات در کشت تراکم سلولی بالا
ارزان بودن فرآیند	بیان پروتئین به شکل توده‌های نامحلول غیر فعال
اقتصادی و سریع بودن کشت در مقیاس بالا	نیاز به باز تاخوردگی پروتئین‌های بیان شده به صورت اجسام الحاقی

تبدیل به یک روش مفید جایگزین برای سامانه های بیان سلولی شده است [۸].

نیاز مداوم برای بهبود سامانه ها ی بیان موجود و همچنین توسعه روش‌های نوین برای پاسخ به تقاضای در حال رشد برای پروتئین‌های درمانی همواره وجود دارد. رده سلول انسانی به عنوان یک جایگزین جدید و قدرتمند برای تولید پروتئین‌های درمانی انسانی پدید آمده است چرا که انتظار می‌رود این سامانه، پروتئین نوترکیب را با تغییرات پس ترجمه‌ای شبیه به همتای طبیعی خود بیان کند و واکنش ایمنی بالقوه علیه اپیتوپ غیر انسانی را کاهش دهد. در حال حاضر، اطلاعات کمی در مورد کشت سلول‌های انسانی برای تولید زیست داروهای در دست است. این سلول ها در مقیاس آزمایشگاهی تولید کارآمدی نشان داده‌اند و می‌توانند به ابزار مهمی برای صنعت داروسازی تبدیل شوند[۹]. اطلاعات پروتئوم[1] و ترانسکریپتوم[2] ریزسازواره‌ها اطلاعات ارزشمندی را به دست می‌دهند که می‌توان از آن‌ها برای توسعه روش‌های مهندسی متابولیک و مهندسی سلول استفاده کرد. در سال‌های اخیر ریز تراشه‌ها و ریز آرایه‌ها به ابزار استانداردی برای تجزیه و تحلیل با توان عملیاتی بالا در سطح بیان ژن تبدیل شده‌اند. استفاده از این اطلاعات و به کارگیری مهندسی ژنتیک و مهندسی سلول، پژوهشگران را قادر ساخته است تا با استفاده از روش های منطقی به جای روش های حدس و خطا میزبان بهتری برای کشت تراکم سلولی بالا طراحی کنند [۱۰]. با توجه به کاربرد زیاد باکتری اشریشیاکلای، مخمرها و سلول های پستانداران در تولید پروتئن‌های نوترکیب و همچنین جذابیت سامانه های بدون سلول در تولید پروتئین های نوترکیب در ادامه این سامانه‌ها به طور خلاصه مورد بررسی قرار می‌گیرند.

اشریشیاکلای

سامانه بیان اشریشیاکلای همچنان به عنوان پرکاربرد ترین سامانه بیانی باکتریایی و به عنوان اولین انتخاب برای تحقیقات آزمایشگاهی و توسعه اولیه محصول در فعالیت های تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد و به عنوان یک معیار مناسب برای مقایسه میان سامانه‌های بیان مختلف است. همچنین در کارهای مهندسی پروتئین و تجزیه و تحلیل ساختاری توان بالا[3] بیشتر از باکتری اشریشیاکلای استفاده می‌شود [۱۲ و ۱۱]. استفاده از باکتری اشریشیاکلای دارای مزایا و معایبی است که به طور خلاصه در جدول ۲ آورده شده است.

اگرچه ریز سازواره‌های مختلفی به عنوان میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند، باکتری اشریشیاکلای میزبان غالب استفاده شده در ۳۰٪ فرآیندهای زیستی در هر دو زمینه تولید زیست داروها و آنزیم‌های صنعتی است [۱۳]. کارهایی که برای افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در اشریشیاکلای انجام می شود در حالت کلی شامل چهار بخش است: ۱) کاهش پاسخ تنشی؛ ۲) افزایش اصلاحات پس ترجمه‌ی؛ ۳) افزایش ترشح پروتئین و ۴) کاهش تولید استات [۱۴ و ۱۰].

مطالعات نشان می‌دهد که روش‌های به کار رفته برای ترشح پروتئین تولید شده به محیط کشت در اشریشیاکلای در حالت کل به چهار دسته تقسیم می‌شوند. ۱) انجام کارهای مهندسی روی سامانه‌های اختصاصی که بطور طبیعی در اشریشیاکلای‌های بیماری

[1:] Proteome, [2:] Transcriptome, [3:] High Throughput Structure Analysis

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۲ – دوره۲ – شماره ۳– صفحات ۱۳۹–۱۵۰

زا وجود دارد؛ ۲) استفاده از پروتئین‌های حامل با سازوکار جابجایی ناشناخته؛ ۳) استفاده از سلول‌هایی با پوشش جهش یافته؛ ۴) بیان پروتئین مورد نظر همراه با پروتئینی که باعث افزایش کافت سلول می‌شود [۱۴].

برای کاهش تولید استات از سه روش می‌توان استفاده کرد:

۱) حذف ژن مسیر تولید استات؛

۲) جلوگیری از سوخت و ساز اضافی با محدود کردن سامانه جذب گلوکز با تغییر منبع کربن، به کار گیری روش‌های دقیق خوراک دهی و انجام کارهای مهندسی ژنتیک روی سامانه جذب گلوکز؛

۳) جلوگیری از سوخت و ساز اضافی با هدایت جریان‌های سوخت و ساز مرکزی و حفظ مقدار کافی از پیش سازهای اسیدهای آمینه [۱۵].

مشکلات بالقوه استفاده از نشانگرهای آنتی بیوتیکی و نشانگرهای مقاوم در برابر آنتی بیوتیک در تولید پروتئین های نوترکیب در مقیاس بالا از زمان‌های گذشته مورد توجه قرار گرفته است، اما به تازگی تلاش‌هایی برای توسعه روش‌های جایگزین برای گزینش پذیری سلول انجام شده است. در تولید پروتئین نوترکیب، ژن مقاوم به آنتی بیوتیک موجود در پلاسمید معمولاً آنزیم مقاوم کننده را به صورت پیوسته در سطحی که لزوم ندارد، بیان می کند. این بیان بدون توقف، بار سوخت و ساز اضافی بر سلول میزبان وارد می‌کند و می تواند باعث شود که هم آنزیم مقاوم کننده و هم خود آنتی بیوتیک به صورت یک آلودگی در محصول مورد نیاز ظاهر شوند [۱۶]. علاوه بر این مهندسی فرایند گلیکوزیلاسیون و دیگر اصلاحات پس ترجمه‌ای در سامانه اشریشیاکلای، پیشرفت های ارزشمندی در سال‌های اخیر به شمار می‌روند. تا چند سال گذشته تصور می‌شد که اشریشیاکلای قادر به گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های بیان شده نیست، اما کشف سامانه گلیکوزیلاسون بر پایه نیتروژن در باکتری گرم منفی کمپیلوباکتر ججونی[1] و انتقال آن به سامانه اشریشیاکلای امکان استفاده از اشریشیاکلای برای بیان گلیکوپروتئین‌ها را فراهم آورده است [۱۷].

مخمرها

سامانه‌های بیانی متعددی از مخمرها به طور موفقیت آمیز برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته اند. طیف گسترده‌ای از میزبان‌های بیان مخمری وجود دارد که شامل گونه‌های ساکارومایسیس سرویزیه، پیکیا پاستوریس، هانسنولا پلیمورفا، کلویورومایسیس لاکتیس و ... است. این سویه‌ها ویژگی‌های زیادی مانند مقاوم بودن در برابر گرما یا نور، سرعت زیاد در رسیدن به تراکم سلولی بالا و استفاده از منابع کربن غیر عادی را دارا می‌باشند. چندین سویه نیز مهندسی شده‌اند تا پروتئاز منفی باشند و الگوی گلیکوزیلاسیون انسانی داشته باشند. همچنین، در دسترس بودن حامل‌ها، پروموتورها و نشانگرهای متنوع به همراه دانش گسترده در زمینه روش‌های تخمیر در مقیاس صنعتی و پیشرفت‌های اخیر در فناوری پست ژنومیکس، زیست شناسی سامانه‌ها و زیست شناسی ترکیبی[2]، امکان طراحی سامانه‌های اقتصادی تر مخمر را به منظور تامین نیاز در حال افزایش برای پروتئین‌های نوترکیب و گلیکو پروتئین‌ها به وجود آورده است [۵].

دو گونه پر کاربرد مخمر برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، ساکارومایسیس سرویزیه و مخمر متیلوتروف پیکیا پاستوریس، است. ساکاروماسیس سرویزیه اولین سامانه بیانی مخمر توسعه یافته شده است که مشخصاتش کاملاً تعیین شده است. اما به دلیل ناپایداری پلاسمید، بازده پایین در بیان پروتئین و گلیکوزیلاسیون بیش از حد پروتئین‌ها استفاده از آن را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب محدود کرده است. این امر منجر به توسعه سامانه‌های بیان دیگری از مخمرها شده است که در حال حاضر به خوبی توسعه یافته‌اند [۱۸]. یکی از این سامانه ها مخمر های متیلوتروف هستند که از مسیر سوخت و سازی استفاده می‌کنند که آن ها را قادر به استفاده از متانول به عنوان تنها منبع کربن می‌کند [۱۹ و ۱]. استفاده از مخمر های متیلوتروف نسبت به ساکارومایسیس سرویزیه مزایایی دارد که عبارتند از: ۱) محصول دهی بالای پروتئین؛ ۲) اجتناب از گلیکوزیلاسیون بیش از حد؛ ۳) رشد در محیط کشت حاوی متانول که مانع از رشد دیگر میکرو ارگانیسم‌ها می‌شود؛ ۴) راه اندازی و نگهداری ارزان سامانه؛ ۵) ادغام چندین نسخه از DNA خارجی در

[1:] Campylo Bacter Jejuni , [2:] Synthetic Biology

Journal of Police Medicine
Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 139-150

داخل DNA کروموزومی که سویه‌های نوترکیب پایداری را نتیجه می‌دهد [۲۰].

با این حال استفاده از پیکیا پاستوریس برای بیان پروتئین نوترکیب معایبی نیز دارد. تعدادی از پروتئین‌ها برای تاخوردگی صحیح به چاپرون‌ها نیاز دارند که پیکیا پاستوریس قادر به تولید آن‌ها نیست. گرین–گراس[1] با عوض کردن آنزیم‌های مسئول گلیکوزیلاسیون در مخمر با مشابه آن ها از سلول‌های پستانداران، الگوی گلیکوزیلاسیون پیکیا پاستوریس را تغییر داد تا پروتئین نوترکیب به شکل کاملاً فعال بیان شود [۲۱].

همچنین مدل های ریاضی جامعی از سوخت و ساز مخمر برای شناسایی یا شبیه سازی روش‌های مهندسی متابولیک مورد استفاده قرار می گیرند، که ممکن است به میزان قابل توجهی به توسعه فرایندهای تولید پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از مخمرها کمک کند [۲۲].

سلول‌های پستانداران

سلول های پستانداران منبع طبیعی بسیاری از پروتئین‌های درمانی می‌باشند و به عنوان بهترین سامانه برای تولید پروتئین ها ی نوترکیب با کاربرد بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند. زیرا این سامانه‌ها توانایی تغییرات پس ترجمه‌ای دارند و پروتئین‌هایی شبیه به پروتئین ها ی انسانی تولید می کنند. بیش از نیمی از زیست داروهای موجود در بازار با استفاده از سلول های پستانداران تولید می‌شوند و چند صد مورد نیز در مراحل توسعه بالینی هستند [۲۳ و ۷]. اگر چه بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب به طور کامل توسعه یافته و سلول های تخمدان موش چینی برای اکثر محصولات موجود در بازار و محصولات در حال توسعه مورد استفاده قرار می گیرد، پیشرفت های مهمی در زمینه توسعه و مهندسی رده‌های سلولی جدید (شامل سازوکار ژنتیکی بیان، خاموش کردن ژن و هدف گیری ژنی) در سال های اخیر گزارش شده است [۷]. با پیشرفت های اخیر در مهندسی ژنتیک می‌توان پروتئین های نوترکیب را با بازده بالایی در سلول های پستانداران تولید کرد. در برخی موارد، استفاده از سلول های پستانداران به عنوان میزبان غیر قابل اجتناب است. حامل ها یا اجزای مورد استفاده برای مهندسی سلول‌های پستانداران، در بسیاری از موارد، از ویروس‌های سرطان زا به دست می‌آیند و از رده‌های سلولی تراریخت شده به عنوان میزبان استفاده می‌شود. بنابراین، استفاده از آن‌ها برای تولید داروها نگرانی‌ها در مورد ایمنی محصولات را افزایش می‌دهد [۲۳]. در طول ۲۵ سال گذشته بازده حجمی رده ها ی سلولی نوترکیب در حدود ۲۰ برابر افزایش یافته است که به طور عمده نتیجه پیشرفت در بهینه سازی محیط کشت و طراحی فرآیندهای زیستی است. انتظار می‌رود افزایش بازده در آینده از روش‌های انتقال ژن، استفاده از سویه‌های اصلاح ژنتیکی شده و بهینه سازی فرایند ها ی زیستی در زیست واکنش گاه ها حاصل شود [۲۴]. اخیراً محصول دهی کشت سلول های پستاندارن در زیست واکنش گاه ها در برخی موارد به حدود یک گرم در لیتر نیز رسیده است که تقریباً ۱۰۰ برابر بازده فرایندهای مشابهی است که در اواسط سال‌های ۱۹۸۰ انجام می‌شد. این افزایش بهره‌وری حجمی محصول، حاصل پیشرفت هایی در بهینه سازی محیط کشت و کنترل فرایند است. هنوز هم زمینه‌هایی برای بهبود سامانه‌های سلول‌های پستانداران از طریق پیشرفت‌های بیشتر در سامانه های تولید و همچنین از طریق مهندسی سلول میزبان و حامل وجود دارد [۲۵].

سامانه بیان بدون سلول

نیروی محرکه توسعه این فناوری، توانایی بالقوه آن در بیان سریع پروتئین فعال از DNA نوترکیب (rDNA) بوده است. سامانه‌های بدون سلول دارای مزایای متمایزی نسبت به استفاده از سامانه‌های سلولی برای تولید پروتئین از rDNA می‌باشند. بدون نیاز به فرایندهای فرعی مورد نیاز برای زیست پذیری و رشد سلول، سامانه سنتز پروتئین به روش بدون سلول امکان بهینه سازی عصاره سلولی برای تولید انحصاری محصول تک پروتئینی را فراهم می کند. فقدان دیواره سلولی، محیط باز و چند منظوره ای را برای نظارت فعال، نمونه گیری سریع و دستکاری مستقیم فرایند سنتز پروتئین و همچنین امکان غربال گری بدون نیاز به مرحله کلونینگ ژن را فراهم می کند که باعث توسعه سریع محصول و فرایند می‌شود [۲۶]. اگرچه هر سازواره‌ای می‌تواند به صورت بالقوه منشاء کافت خام برای سامانه بدون سلول باشد، اما عمومی ترین سامانه های بیان بدون

[1]: Gerngross

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۲ – دوره۲ – شماره ۳- صفحات ۱۳۹-۱۵۰

سلول شامل عصاره اشریشیاکلای (ECE)، رتیکیولوسیت خرگوش (RRL)، جوانه گندم (WGE) و سلول های حشرات (ICE) هستند. ازآنجا که نحوه عمل این سلول‌ها خیلی با همدیگر تفاوت دارد، عصاره به دست آمده از آن‌ها نیز خیلی با هم متفاوت است [۲۸ و ۲۷].

فرایند سنتز پروتئین به روش بدون سلول را می توان به دو صورت غیر مداوم (بسته) و پیوسته انجام داد. اجزای ضروری مورد نیاز برای سنتز پروتئین در هر دو روش یکسان است. با این حال در روش غیر مداوم (سامانه بسته) فرایند سنتز پروتئین تا زمانی ادامه پیدا می‌کند که یکی از اجزا تجزیه شود (مانند mRNA) یا یکی از اجزا در مخلوط واکنش تمام شود (مانند ATP)، که معمولاً این فرایند یک تا دو ساعت طول می‌کشد [۲۹]. در روش جریان پیوسته اسیدهای آمینه، منبع انرژی و دیگر اجزای مورد نیاز به طور پیوسته به محفظه واکنش افزوده می‌شوند و فراورده‌های جانبی سنتز پروتئین (GDP, AMP و غیره) از طریق غشای اولترا فیلتر از محفظه واکنش حذف می‌شوند تا فرایند سنتز پروتئین برای مدت طولانی تری ادامه پیدا کند تا امکان تولید صدها مولکول پروتئین از یک مولکول mRNA فراهم شود [۳۰]. در طول چندین سال پیشرفت های زیادی در زمینه روش های سنتز پروتئین به روش بدون سلول حاصل شده است که در نتیجه این پیشرفت‌ها، مدت زمان واکنش تا ۱۰۰ ساعت افزایش پیدا کرده است. با بهینه سازی شرایط واکنش میزان سنتز پروتئین با استفاده از این روش برای کلورامفنیکول استیل ترنسفراز در ۲۱ ساعت تا ۶ گرم در هر میلی لیتر مخلوط واکنش افزایش پیدا کرد [۳۱]. این پیشرفت ها سنتز پروتئین به روش بدون سلول را به سامانه‌ای مناسب برای مقاصدی مانند برچسب زنی ایزوتوپی پروتئین‌ها، سنتز پروتئین‌های مصنوعی دارای اسید آمینه های غیر طبیعی، سنتز کتابخانه های پروتئینی برای ژنومیک وظیفه گرا[1]، زیست شناسی ساختاری و بیان ذرات شبیه ویروس تبدیل کرده است [۳۱، ۲۹، ۲۶].

تولید صنعتی پروتئین‌های نوترکیب

قبل از راه اندازی فرایند تولید صنعتی پروتئین های نوترکیب باید بسیاری از مشکلات در ارتباط با تولید و خالص سازی آن برطرف شود. یکی از مشکلات مهم نحوه بیان پایین پروتئین است که فرایند خالص سازی را نیز پیچیده و کل فرایند را به خطر می اندازد [۳۲]. اخیراً استفاده از ابزار زیست شناسی سامانه ها در توسعه و بهبود سویه‌ها و استفاده از روش‌های زیست فناوری سامانه‌ها با استفاده از اطلاعات امیکس (ژنومیکس،پروتومیکس و ...) و به کارگیری مهندسی ژنتیک برای ارزیابی و توسعه مهندسی زیست فناوری سویه‌های صنعتی، به شدت در حال افزایش است [۳۳]. در شکل ۱ طرح شماتیک استفاده از ابزار زیست شناسی سامانه‌ها در توسعه‌ی مهندسی زیست فناوری سویه های صنعتی و مهندسی فرآیندهای زیستی نشان داده شده است.

این یافته‌ها در طراحی مسیرهای سوخت و ساز و روش‌های تخمیر برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و متابولیت‌ها با استفاده از کشت تراکم سلولی بالا خیلی ارزشمند هستند [۱۰]. با افزایش تقاضا برای داروهای نوترکیب نیاز به افزایش مقیاس فرایندهای تولید پروتئین نوترکیب افزایش یافته است. در کشت غیر مداوم می توان به ۱۰-۵ گرم وزن خشک در هر لیتر دست یافت ولی با استفاده از روش‌های خوراک دهی در کشت غیر مداوم می‌توان به وزن خشک بالای ۵۰ گرم بر لیتر نیز دست پیدا کرد [۳۴]. مطالعات و کارهای توسعه‌ای زیادی در زمینه کشت تراکم سلولی بالا انجام شده است. کشت تراکم سلولی بالا به طور گسترده‌ای برای تولید پروتئین نوترکیب از باکتری اشریشیاکلای استفاده می‌شود و بسیاری از کارهای تحقیقاتی روی تولید پروتئین نوترکیب به دلیل شناخته شده بودن ژنتیک و ساختار اشریشیاکلای، روی این باکتری انجام می شوند [۱۰, ۳۵].

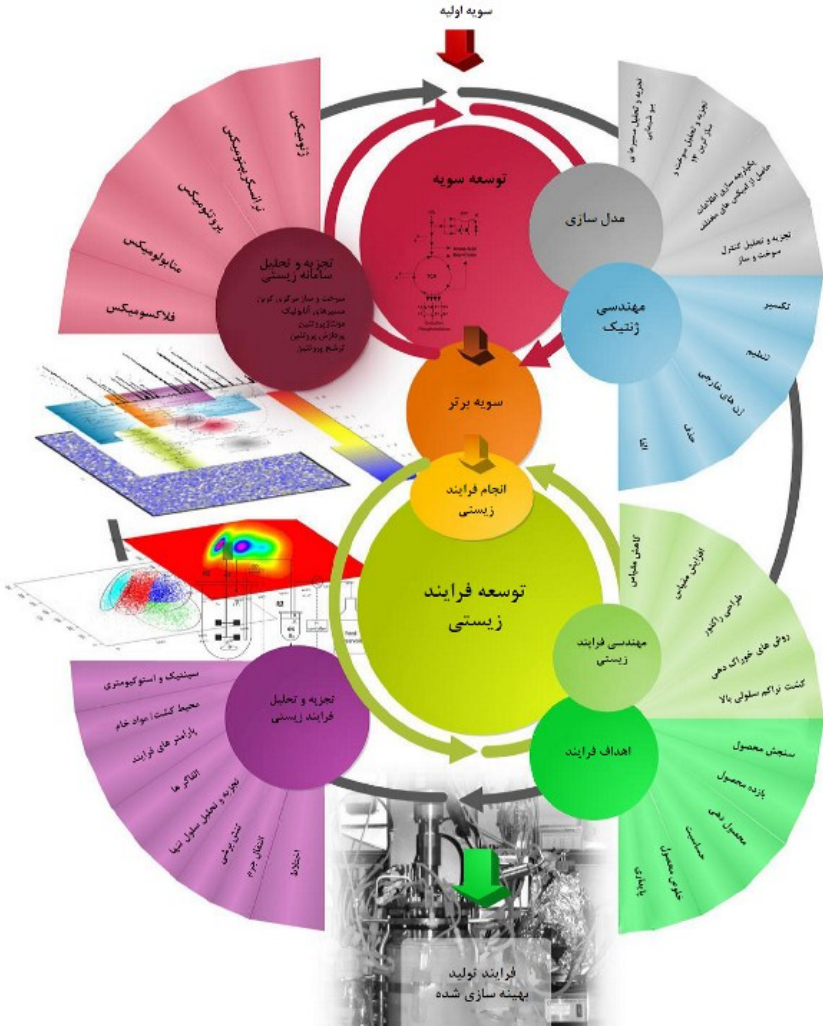
پارامترهای عملیاتی فرآیندهای زیستی که می‌توانند عملکرد و کیفیت محصول را خیلی تحت تاثیر قرار دهند عبارتند از: ترکیب محیط کشت، دما، pH، میزان اختلاط و هوادهی، استراتژی های خوراک دهی و روش های القا [۳۶]. در کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی هدف اصلی رسیدن به غلظت بالای محصول است و روش خوراک دهی یکی از مهم ترین عوامل در موفقیت این فرایند است. روش‌های خوراک دهی مختلف شامل خوراک دهی با سرعت ثابت، افزایش مرحله به مرحله سرعت خوراک دهی و خوراک دهی

Journal of Police Medicine
Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 139-150

نمایی برای دستیابی به تراکم سلولی بالا در کشت‌های غیر مداوم همراه با خوراک دهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۳۷ و ۱۰]. روش خوراک دهی نمایی برای رشد سلول‌ها در سرعت رشد ویژه ثابت یا متغیر توسعه یافته است. در این روش با کنترل سرعت رشد ویژه در مقادیر کمتر از مقدار بحرانی، می‌توان تولید استات (یکی از مهم ترین مشکلات کشت تراکم سلولی بالا) را به حداقل رساند [۳۸]. بابایی پور با طراحی روش خوراک دهی «سرعت رشد ویژه بیشینه قابل دسترس» توانست در ۱۸ ساعت به وزن خشک ۱۲۰ گرم بر لیتر و ۴۰ گرم بر لیتر اینترفرون گاما دست پیدا کند [۳۵].

مشکل اصلی در ارتباط با کشت سلولی تراکم بالا، سرعت مصرف بالای اکسیژن و سوبسترا و تجمع متابولیت‌های مهار کننده رشد در سوسپانسیون سلولی در حین کشت است [۳۹]. با افزایش ظرفیت انتقال اکسیژن در زیست واکنش گاه، می‌توان به تراکم سلولی و محصول دهی بالاتری دست یافت. زیرا محدودیت اکسیژن باعث تولید چندین متابولیت مانند مخلوط اسید ها یی مانند ساکسینیت، استات، اتانول، لاکتات و هیدروژن می‌شود که نامطلوب هستند و باعث کاهش محصول دهی در زیست واکنشگاه می‌شوند. همچنین باید در نظر گرفته شود که اکسیژن خود به تنهایی برای بعضی ریز سازواره‌ها سمی است [۱۰].

با بهینه سازی محیط کشت تعریف شده و معرفی استراتژی های خوراک دهی برای تامین منبع کربن می‌توان از تجمع اجزای محیط کشت پیچیده اجتناب کرد. برای به حداقل رساندن تولید این مواد مهار کننده رشد می‌توان شرایط کشت را بهینه سازی کرد. بهینه سازی محیط کشت برای تولید پروتئین نوترکیب جدید با توجه به



شکل ۱: زیست فناوری سامانه‌ها برای توسعه سویه‌های صنعتی و مهندسی فرآیندهای زیستی [۳۳]

[1:] Functional Genomics

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۲ – دوره۲ – شماره ۳– صفحات ۱۳۹–۱۵۰

نوع میکروارگانیسم و محصول متفاوت است [۴۰ و ۳۹]. یک روش دیگر برای حذف مواد مهار کننده رشد استفاده از راکتورهای دیالیزی است که در آن‌ها متابولیت‌های مهار کننده رشد با استفاده از غشاهای دیالیزی از سوسپانسیون سلولی حذف می‌شوند و در نتیجه مدت زمان فاز رشد لگاریتمی سلول‌ها و بازده تولید افزایش می یابد. فکس[1] و کاستر[2] موفق شدند در کشت باکتری نوترکیب اشریشیاکلای K12 با استفاده از راکتور دیالیزی با حجم ۳۰۰ لیتری با مدول غشایی خارجی به وزن خشک ۱۹۰ گرم بر لیتر برسند که مقدار پروتئین نوترکیب تولید شده با این روش در مقایسه با کشت غیر مداوم خوراک دهی شده ۸/۳ برابر بود [۳۹].

نتیجه گیری

تولید پروتئین های نوترکیب به عنوان یکی از مهمترین شاخه های زیست فناوری مدرن است و شامل کسب و کار میلیارد دلاری در هر دو زمینه تولید زیست داروها و آنزیم‌های صنعتی است. اگرچه ریز سازواره‌های مختلفی به عنوان میزبان برای تولید پروتئین های نوترکیب مورد استفاده قرار می گیرند، باکتری اشریشیاکلای میزبان غالب استفاده شده در ۳۰٪ فرآیندهای زیستی در هر دو زمینه تولید زیست داروها و آنزیم‌های صنعتی است. بطور معمول پروتئین های بزرگ و پیچیده در سامانه‌های یوکاریوتی بیان می‌شوند در حالی که پروتئین های کوچکتر و ساده تر در سامانه های پروکاریوتی بیان می شوند. کشت سلول های پستانداران، به دلیل توانایی آن‌ها برای تازدن صحیح پروتئین‌ها، مونتاژ و اصلاحات پس ترجمه‌ی تبدیل به سامانه غالب برای تولید پروتئین نوترکیب برای کاربردهای بالینی شده است. بنابراین، کیفیت و اثر بخشی پروتئین‌های نوترکیبی که در سلول های پستانداران تولید می شوند در مقایسه با میزبان دیگر مثل باکتری ها، گیاهان و مخمر بهتر است. همچنین سنتز پروتئین به روش بدون سلول به عنوان یک فناوری قدرتمند برای تولید راحت و کارآمدتر پروتئین های نوترکیب به سرعت در حال توسعه است. وقتی سامانه های بیان سلولی و بیان بدون سلول پروتئین با هم ادغام می‌شوند، یک ابزار قدرتمند برای سنتز و تولید پروتئین ها فراهم می‌آورند. وقتی که اصول مهندسی نیز وارد کار شود، تاثیر فوق العاده ای در پژوهش‌های زیستی و تولید صنعتی حاصل می شود. روش‌های مختلف کشت با به کارگیری سویه‌های میزبان و سامانه‌های بیان مختلف با موفقیت برای تولید پروتئین‌های نوترکیب به کار گرفته شده‌اند. روش ها ی مختلف از جنبه های متفاوت را می توان برای بهبود تولید پروتئین های نوترکیب به کار گرفت از جمله: طراحی میزبان، تنظیم بیان پروتئین نوترکیب، طراحی محیط کشت، روش های کشت و حتی کنترل و تجزیه و تحلیل فرآیند، با موفقیت برای افزایش بازده فرایند کشت تراکم سلولی بالا مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه محدوده کاملی از ابزار آزمایشی و محاسباتی زیست شناسی سامانه ها برای بررسی اجزاء مختلف سلولی در سطح ترنسکریپتوم، پروتئوم یا متابلوم و بر هم کنش کارکردی آن‌ها یعنی فلاکسوم، در دسترس است. این ابزار پایگاهی عقلگرایانه برای مهندسی متابولیک سامانه‌ها به منظور تغییر طراحی ریز سازواره‌ها به سویه‌های سطح بالا فراهم می‌کند.

منابع

1. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv 2009; 27: 297-306.
2. Ritala A, Wahlström EH, Holkeri H, Hafren A, Mäkeläinen K, Baez J, et al. Production of a recombinant industrial protein using barley cell cultures. Protein Expr Purif 2008; 59: 274-81.
3. Huang CJ, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements. J Ind Microbiol Biotechnol 2012; 39: 383-99.
4. Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. Drug Discov Today 2010; 15: 773-80.
5. Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. Biotech Adv 2012; 30: 1108-18.
6. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks—2003. Nat Biotech 2003; 21: 865-70.
7. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. Biotech Adv 2012; 30: 1158-70.
8. Nathans D, Notani G, Schwartz JH, Zinder ND. Biosynthesis of the coat protein of coliphage f2 by e. coli extracts. Proc Natl Acad Sci U S A 1962; 48: 1424-31.
9. Swiech K, Picanco-Castro V, Covas DT. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. Protein Expr Purif 2012; 84: 147 -53.
10. Shojaosadati SA, Varedi Kolaei SM, Babaeipour V, Farnoud AM. Recent Advances in High Cell Densi-

[1]: Fochs, [2]: koster

ty Cultivation for Production of Recombinant Protein. Iran J Biotech 2008; 6: 63-84.
11.Gordon E, Horsefield R, Swarts HGP, de Pont JJHHM, Neutze R, Snijder A. Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in Escherichia coli. Protein Expr Purif 2008; 62: 1-8.
12.Koehn J, Hunt I. High-Throughput Protein Production (HTPP): A review of enabling technologies to expedite protein production. Methods Mol Biol 2009; 498: 1-18.
13.Waegeman H, Mey MD. Increasing Recombinant Protein Production in E. coli by an Alternative Method to Reduce Acetate. Advances in Applied Biotechnology 2012.
14.Ni Y, Chen R. Extracellular recombinant protein production from Escherichia coli. Biotechnol Lett 2009; 31: 1661-70.
15.De Mey M, Lequeux GJ, Beauprez JJ, Maertens J, Van Horen E, Soetaert WK, et al. Comparison of Different Strategies to Reduce Acetate Formation in Escherichia coli. Biotechnol Prog 2007; 23: 1053-63.
16.Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. Biotech Adv 2012; 30: 1102-7.
17.Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, Hitchen PG, Marolda CL, Kowarik M, et al. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 3016-21.
18.Gellissen G, Strasser AW, Suckow M. Key and criteria to the selection of an expression platform. Production of recombinant proteins–Novel microbial and eukaryotic expression systems 2005: 1-5.
19.Maghsoudi A, Hosseini S, Shojaosadati SA, Vasheghani-Farahani E, Nosrati M, Bahrami A. A new methanol-feeding strategy for the improved production of β-galactosidase in high cell-density fed-batch cultures of Pichia pastoris Mut+ strains. Biotechnol. Bioprocess Eng 2012; 17: 76-83.
20.Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast Pichia pastoris. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 5022-7.
21.Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nat Biotech 2004; 22: 1409-14.
22.Papini M, Salazar M, Nielsen J. Systems Biology of Industrial Microorganisms. In: Wittmann C, Krull R, editors. Biosystems Engineering I. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. 120: Springer Berlin Heidelberg 2010; 51-99.
23.Ramabhadran TV. Products from genetically engineered mammalian cells: Benefits and risk factors. Trends Biotechnol 1987; 5: 175-9.
24.De Jesus M, Wurm FM. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. Eur J Pharm Biopharm 2011; 78: 184-8.
25.Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotech 2004; 22: 1393-8.
26.Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC. Cell-free protein synthesis: Applications come of age. Biotech Adv 2012; 30: 1185-94.
27.Zawada JF, Yin G, Steiner AR, Yang J, Naresh A, Roy SM, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. Biotechnol Bioeng 2011; 108: 1570-8.
28.Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. Trends Biotechnol 2005; 23: 150-6.
29.Stiege W, Erdmann VA. The potentials of the in vitro protein biosynthesis system. J Biotechnol 1995; 41: 81-90.
30.Rattan SI, Kristensen O. Continuous gene expression in vitro: the Spirin system. Trends Biotechnol 1990; 8: 275-6.
31.Kigawa T, Yabuki T, Yoshida Y, Tsutsui M, Ito Y, Shibata T, et al. Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. FEBS Lett 1999; 442: 15-9.
32.Rolland D, Raymond F, Gauthier M, Fournier C, Charrier JP, Jolivet M, et al. Strategies for improving production and purification of a recombinant protein: rP30 of Toxoplasma gondii expressed in the yeast Schizosaccharomyces pombe. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2008; 861: 186-95.
33.Korneli C, David F, Biedendieck R, Jahn D, Wittmann C. Getting the big beast to work—Systems biotechnology of Bacillus megaterium for novel high-value proteins. J Biotechnol 2013; 163: 87-96.
34.Yee L, Blanch HW. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of Escherichia coli. Biotechnology (N Y) 1992; 10: 1550-6.
35.Babaeipour V, Shojaosadati SA, Robatjazi SM, Khalilzadeh R, Maghsoudi N. Over-production of human interferon-γ by HCDC of recombinant Escherichia coli. Process Biochem 2007; 42: 112-7.
36.Choi JH, Keum KC, Lee S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli. Chem Eng Sci 2005; 61: 876-85.
37.Liu C, Gong Z, Shen B, Feng E. Modelling and optimal control for a fed-batch fermentation process. Appl Math Model 2013; 37: 695-706.
38.Lee J, Lee SY, Park S, Middelberg APJ. Control of fed-batch fermentations. Biotechnol Adv 1999; 17: 29-48.

39.Fuchs C, Köster D, Wiebusch S, Mahr K, Eisbrenner G, Märkl H. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of Escherichia coli. J Biotechnol 2002; 93: 243-51.

40.Mahmoud K. Recombinant Protein Production:Strategic Technology and a Vital Research Tool. Res J Cell Mol Biol 2007; 1: 9-22.