Journal of Cell and Tissue
https://jct.araku.ac.ir
ISSN: 2345-3567

Investigation of downstream processes of pharmaceutical proteins with a focus on increasing the production efficiency of human follicle-stimulating hormone using VHH antibody-based affinity chromatography

Abolghasemi-Dehaghani S

- Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Abolghasemi-Dehaghani S. Investigation of downstream processes of pharmaceutical proteins with a focus on increasing the production efficiency of human follicle-stimulating hormone using VHH antibody-based affinity chromatography. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(1):70-89.

https://doi.org/10.61882/JCT /16.1. 70

KEYWORDS

Downstream processes pharmaceutical,
Human Follicle Stimulating Hormone
VHHs Antibody
Recombinant DNA

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Downstream processes are crucial in pharmaceutical protein manufacturing, bridging drug synthesis and final product formulation. They involve purification strategies to isolate active pharmaceutical ingredients (APIs) from natural or cellular sources, ensuring high purity and potency. Advances in technology and purification methods have significantly impacted the efficiency and quality of pharmaceutical products, particularly for biological drugs like human follicle-stimulating hormone (hFSH) and VHHs antibodies

Aims: To highlight the importance of downstream processes in pharmaceutical protein production, focusing on the purification techniques employed for proteins like human follicle-stimulating hormone and VHHs antibodies, and to demonstrate how technological innovations improve yield, efficiency, and product quality.

Materials and methods: The study emphasizes the use of strategic purification approaches, including advanced chromatographic methods such as recombinant DNA technology for producing hFSH and affinity chromatography utilizing VHHs antibodies. These methods are tailored to preserve the structural and functional integrity of target proteins and enhance purification efficiency.

Results: Innovative purification strategies, especially affinity chromatography with VHHs antibodies, have led to a significant increase in yield (~60%), reduced processing time, and improved purity. These techniques effectively streamline production, reduce costs, and maintain the biological activity of

* Corresponding author. Tel.:09124127463; Fax: 23562000
E-mail address: abolghasemi.somayeh@gmail.com
DOI: https://10.61882/JCT/16.1.70
Received: 13 Feb. 2024; Received in revised form: 26 Feb. 2025; Accepted: 29 Apr. 2025
Review Article
© Author

target proteins like hFSH.

Discussion: The integration of cutting-edge technologies—recombinant DNA, affinity chromatography, and sophisticated purification strategies—has transformed downstream processing. These advancements support the shift from natural sourcing to recombinant production, improving efficiency, product quality, and cost-effectiveness, and fostering progress in biopharmaceutical manufacturing.

Conclusion: Refinement of downstream processes, driven by technological innovation, advances the production of vital biological drugs such as hFSH. These developments symbolize a move toward higher standards of quality and efficiency in pharmaceutical manufacturing, showcasing human ingenuity and the ongoing pursuit of excellence in healthcare and biotechnology

سلول و بافت، دوره ۱۶، شماره ۱، سال ۱۴۰۴، صفحات ۷۰ تا ۸۹

سلول و بافت

شاپا الکترونیکی: ۳۵۶۷-۲۳۴۵

بررسی فرایندهای پایین‌دستی در تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی: تمرکز بر افزایش بازده تولید هورمون محرک فولیکولی انسانی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی مبتنی بر آنتی‌بادی‌های VHHs

سمیه ابوالقاسمی دهاقانی *

- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه ژنتیک

واژگان کلیدی

فرآینـد هـای پـایین دستی
محصـولات دارویـی
هورمـون محـرک فولیکـولی انسـانی
آنتـی‌بـادی‌هـای تمایلیVHHs
فنـاوری DNA نوترکیب

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۰۹

چکیده

هدف: بررسی و مقایسه فرآیندهای پایین‌دستی در پروتئین‌های دارویی، با تمرکز بر توسعه روش‌های خالص‌سازی مؤثر و کارآمد، به‌خصوص در مورد هورمون محرک فولیکولی انسانی، و بهره‌گیری از فناوری‌های نوین مانند آنتی‌بادی‌های VHH و کروماتوگرافی تمایلی. **مواد و روش‌ها:** استفاده از فنون خالص‌سازی چندمرحله‌ای و کروماتوگرافی تمایلی مبتنی بر آنتی‌بادی‌هایVHH ، تولید هورمون محرک فولیکولی انسانی به‌صورت نوترکیب، و به‌کارگیری رزین‌های کروماتوگرافی مخصوص برای جداسازی سریع و با بهره‌وری بالا. مقایسه بازده و زمان انجام فرآیندهای مختلف صورت گرفت. **نتایج:** استفاده از کروماتوگرافی تمایلی مبتنی بر آنتی‌بادی‌های VHH منجر به استخراج پروتئین در یک مرحله و با بازده حدود ۶۰٪ شد، در حالی‌که روش‌های چند مرحله‌ای بازده تقریبی ۴۰٪ داشتند. این روش زمان کم‌تری صرف کرده و هزینه‌های تولید را کاهش داد. **نتیجه‌گیری:** به‌کارگیری فناوری‌های نوین مانند آنتی‌بادی‌های VHH و کروماتوگرافی تمایلی، فرآیندهای پایین‌دستی را بهبود می‌بخشد، باعث افزایش بهره‌وری، کاهش هزینه‌ها، و حفظ ساختار و عملکرد پروتئین‌های دارویی می‌شود، که در نهایت به ارتقای کیفیت و کارایی تولید داروهای بیولوژیک منجر می‌شود.

۱- مقدمه:

توسعه روش‌های جداسازی و خالص‌سازی ماکرومولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها یکی از مهم‌ترین پیش نیازها در بیوتکنولوژی است، زیرا در دهه‌های گذشته توسعه فناوری نوترکیبی DNA موجب انقلابی بزرگ در تولید مولکول‌های زیستی در مقیاس صنعتی شده است. فرآیند پایین دستی (Dowonstream processing) با جداسازی و تخلیص محصول زیستی از محیط کشت پیچیده سلول سر و کار دارد (۱, ۲) و همچنین فرآیند خالص سازی محصول دارویی می بایست از لحاظ زمان، کارآمدی و نیز اقتصادی مقرون به صرفه باشد. در طراحی فرآیندهای پایین دستی دو عامل اصلی تمام طراحی را تحت تاثیر قرار می‌دهد: ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین ۲- نیاز نهایی از پروتئین خالص شده و نوع استفاده از آن که

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۲۴۱۲۷۴۶۹؛ فکس: ۲۳۵۶۲۰۰۰

آدرس پست الکترونیک: abolghasemi.somayeh@gmail.com

مشخص کننده فرآیند خالص‌سازی است. اگر هدف استفاده از پروتئین در آزمایش‌های تشخیصی باشد تنها حذف ناخالصی‌های عمده کفایت می کند (مانند استفاده از پروتئین برای روش‌های سنجش ایمنی یا زمانی که پروتئین به‌منظور مطالعه در واکنش‌های پروتئین-پروتئین استفاده می‌شود. اما برای کاربردهای دارویی بایستی استانداردهای بیشتری برای خلوص پروتئین رعایت شود. به‌طوری‌که در پایان فرآیند خالص سازی، محصول بایستی عاری از تمام سموم، تب زاها (Pyrogen)، پروتئین‌های میزبان، ویروس‌ها و DNA باشد (۳-۷). در گذشته یک محقق فرآیند پائین دستی (Down stream) برای جداسازی یک پروتئین مجبور بودند پروتئین را از منابع طبیعی آن تهیه کنند و ممکن بود در این فرایند فرصت‌های زیادی را برای به‌دست آوردن پروتئین از دست بدهند. اما با وجود بسیاری از فنون زیست‌شناسی مولکولی، این مشکل برطرف شده است. به‌عنوان مثال، زمانی که یک محقق زیست‌شناسی مولکولی یک ژن کلون شده را توالی‌یابی می‌کند، حجم زیادی از اطلاعات درباره مولکول نهایی، مانند اندازه مولکول، محتوای اسیدآمینه‌ای آن، نقطه ایزوالکتریک، جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون، دومین‌های ساختاری و خصوصیات فولدینگ آن به‌دست می‌آورد. دانستن گوشه‌ای از این پارامترها می‌تواند برای شروع یک راهبرد خالص‌سازی حتی قبل از بیان پروتئین مفید باشد (۳-۶).

با توجه به سند چشم انداز جمهوری اسلامی ایران در افق ۱۴۰۴ مبنی بر دست‌یابی به جایگاه اول اقتصادی، علمی و فناوری در سطح منطقه و این‌که صنعت تولید داروهای بیولوژیک از هر سه منظر اقتصادی، علمی و فناوری حائز اهمیت است، حرکت به‌سمت تولید هورمون محرک فولیکول انسانی (FSH) انسانی به‌روش نوترکیب، به‌عنوان یکی از داروهای مهم جهت استفاده در درمان ناباروری و تکنولوژی‌های کمک‌باروری، بسیار حائز اهمیت است. در مطالعاتی که برروی پروتئین FSH انسانی صورت گرفته است تاکنون روش‌هایی که برای خالص سازی این پروتئین ارائه شده شامل چندین مرحله کروماتوگرافی می‌باشد که در نهایت بازده خالص سازی حدود ۴۰ درصد می باشد، اما با به‌کار بردن کروماتوگرافی‌های تمایلی CaptureSelect مبتنی بر آنتی‌بادی‌های VHHs، پروتئین مورد نظر در یک مرحله با بازده بالا در حدود ۶۰ درصد که از لحاظ ساختاری و عملکردی نیز فعال می‌باشند، در زمان کوتاه تر استخراج می‌شود که در نهایت سبب کاهش هزینه‌های تولید نیز می‌شود.

هدف از این پژوهش بررسی و بهبود فرآیندهای خالص‌سازی FSH انسانی به‌وسیله فناوری‌های نوین و ایجاد چارچوبی مناسب برای تحقق اهداف بلند مدت در تولید داروهای بیولوژیک است. با توجه به اهمیت این پژوهش، به بررسی دقیق رویکردهایی پرداخته شده است که می‌تواند به بهینه‌سازی تولید FSH انسانی و ارتقای سطح علمی و فناورانه کشور کمک کند.

۲-مواد و روش‌ها

استخراج پروتئین های نوترکیب دارویی: پروتئین‌ها می‌توانند به‌طور طبیعی در تخم‌مرغ و شیر وجود داشته باشند و یا در یک کشت سلولی پستانداران در محیط کشت ترشح شوند و یا این‌که درون سلولی باشند. پروتئین‌های درون سلولی می بایست از داخل سلول استخراج و جدا شوند. برخلاف باکتری‌ها، مخمرها یا گیاهان، سلول‌های حیوانی دیواره سلولی ندارند. به‌منظور استخراج پروتئین‌های داخل سلولی، در ابتدا سلول‌ها باید شکسته شوند و سپس مولکول‌های پروتئین نوترکیب در یک محلول آزاد می‌شوند. به‌منظور بهینه سازی پایداری و افزایش بازده استخراج پروتئین در شکست سلولی استفاده از دترجنت مناسب اهمیت دارد و با توجه به طبیعت و ساختارهای مختلف پروتئین ها، دترجنت متناسب با نوع پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد، تا از ایجاد اختلالات ساختاری در پروتئین جلوگیری کند. زمانی‌که پروتئین‌ها غشایی هستند و یا این‌که از بافت‌های سرشار از لیپید، پلی ساکارید و سایر اجزای غیر پروتئینی بازیابی می‌شوند، بر اساس نوع و جایگاه پروتئین‌ها، روش مناسب

برای استخراج آن‌ها اتخاذ می‌شود. به‌عنوان مثال، از روش‌های شیمیایی و یا مکانیکی، مانند شوک اسمزی، هضم آنزیمی، فراصوت، یا همگن سازی (۷-۹) به‌کار برده می‌شود. پس از استخراج مخلوطی از پروتئین‌ها، می‌توان مرحله "آخرین" اما مشکل سازترین مرحله بازیابی که خالص سازی است را آغاز کرد.

خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب دارویی: اگرچه فناوری تولید محصولات زیست درمانی (biotherapeutics) از زمان توسعه ایده‌های مختلف برای سنتز داروهای متفاوت در حال تغییر بوده است، اما دانشمندان همچنان به خالص سازی به‌عنوان جدی‌ترین مانع در تولید زیست داروها اشاره می‌کنند، زیرا پروتئین‌های مورد استفاده برای درمان انسانی، از جمله بیوداروها، می‌بایست عاری از پروتئین های اضافی، اندوتوکسین‌ها و آلاینده باشند. فرآیند خالص سازی شامل جداسازی پروتئین هدف با حفظ ساختار شیمیایی و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها است که این فرایند خالص سازی بین ۴۵ تا ۹۲ درصد از هزینه تولید محصولات پروتئینی دارویی نوترکیب را شامل می‌شود (۷, ۰۱ ,۱۱) اگرچه پیشرفت در تکنولوژیِ فرآیندهای بالادستی تولید باعث بالا رفتن میزان محصول از چند میلی‌گرم به چند گرم در لیتر شده است، اما هزینه تولید بیوداروها به‌علت هزینه بالای فرایندهای پایین دستی همچنان بالا است (۲۱, ۳۱) . بر این اساس، استراتژی خالص سازی در کل فرآیند تولید بسیار حائز اهمیت است و عواملی دیگری مانند تولید با بازده بالا، سهولت، ملاحظات اقتصادی و تکرارپذیری در آزمایشگاه‌ها نیز باید در نظر گرفته شوند (۴۱, ۵۱). گاهی اوقات در صنعت بیودارویی درجه خلوص از ۹۹ درصد فراتر می‌رود و برای به‌دست آوردن محصولی با این درجه از خلوص روش کروماتوگرافی مورد نیاز است. با توجه به تمامی نکات مطرح شده، فرآیند خالص سازی از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا نقش غیرقابل انکاری در ایید خلوص داروی پروتئینی ایفا می‌کند (۷).

خلوص، فعالیت و ایمنی محصول نهایی پروتئینی تولید شده، از ابتدا فرایند تولید بیوداروها درتمامی مراحل از جنبه‌های مهم و متفاوتی مانند توسعه سلول میزبان، کشت سلولی، ایجاد بانک سلولی، سنتز پروتئین، فرآیند خالص سازی و تجزیه و تحلیل ساختاری و عملکردی پروتئین، فرمولاسیون و ذخیره سازی مورد بررسی قرار می‌گیرد. دستورالعمل‌های شورای بین‌المللی هماهنگ‌سازی الزامات فنی برای داروها مورد استفاده انسانی، ابزارهایی را برای اطمینان از ثبات و تکرار پذیری این فرآیند های پیچیده در طول زمان ارائه می‌کند. که شامل مفاهیم فناوری تحلیل فرآیند (Process Analytical Technology) و کیفیت در طراحی(Quality by Design) است. به‌طور کلی، اکثریت داروهای زیستی در سراسر جهان، توسط سازمان بهداشت جهانی، اتحادیه اروپا، ایالات متحده آمریکا و ژاپن تایید شده است و همچنین می‌بایست الزامات قانونی موسوم به عملکرد بالینی خوب (Good Clinical Practice)، عملکرد خوب آزمایشگاهی(Good Laboratory Practice) ، عملکرد خوب تولید (Good Manufacturing Practice) و ارزیابی ایمنی زیستی (Biosafety evaluation) را رعایت کنند. این دستورالعمل‌ها سه زمینه اصلی در تولید بیوداروها را پوشش می‌دهد: (۱) کنترل منابع بیولوژیکی و مواد خام، (۲) کنترل فرآیند تولید و (۳) کنترل محصول نهایی. با توجه به الزامات تعیین شده، محصولات بیولوژیکی تولید شده توسط سیستم‌های بیانی مختلف می‌بایست از لحاظ وجود سمیت و یا حضور ویروسی آزمایش شوند. فرآیندهای دقیق ساخت و تأیید داروهای زیستی با توجه به نوع سلول میزبان، نوع داروی پروتئینی و سطوح قابل قبول مولکول‌های مختلف باقیمانده در یک بررسی عالی توسط Sahoo و همکاران (۱۹) مورد بحث قرار گرفته است. در این‌جا ابتدا به‌صورت کلی به بررسی چگونگی یک فرایند پایین دستی می‌پردازیم و در ادامه مروری بر روش‌های متداول خالص‌سازی مبتنی بر کروماتوگرافی منتخب ارائه شده است.

فرایندهای پایین دستی: پردازش پایین دستی بیوداروییDownstream processing) که به‌عنوان DSP نیز شناخته می‌شود را می‌توان تحت عنوان روش‌های برای بازیابی و خالص سازی یک ماده دارویی (drug substance) DS((از منابع طبیعی مانند سلول‌های حیوانی یا باکتریایی تعریف کرد. . فرآیندهای پایین دستی جزئی از مراحل تولید محصولات زیستی می‌باشد که هدف از پردازش پایین دستی جداسازی، خالص سازی و تغلیظ ماده دارویی و یا سایر محصولات سنتز شده از ماتریکس توده ای و پیچیده ی سلولی است (۱۶) پردازش پایین دستی بیوداروییی در فرآیندهای تولید مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها یا پروتئین‌های دارویی و همچنین در ساخت الیگونوکلئوتیدها، پلی ساکاریدها و واکسن‌های مختلف قابل استفاده است. که معمولا به‌عنوان یک فرایند مستقل و واحد پس از فرایند رشد و افزایش سلولی و سنتز مواد دارویی و یا سایر محصولات تکمیلی تعریف می‌شود. فرآوری پایین‌دستی همچنین شامل فعالیت‌های فرمولاسیون نیز می‌باشد که نشان‌دهنده گذار از ماده دارویی به محصول دارویی (Drug product) است. علاوه بر این، ملاحظات پردازش پایین دستی شامل مدیریت منابع و جریان زباله‌های تولیدی و مخاطرات زیستی نیز می‌شود. در ابتدا فعالیت‌های پردازش پایین دستی در مقیاس آزمایشگاهی، آزمایشی و تولیدی انجام می‌شود و در ادامه کار تیم‌های فناوری تحلیل فرآیند Process Analytical Technology (PAT) و علم و فناوری ساخت (Manufacturing Science and Technology) بر روی بهینه‌سازی فرآیند، افزایش مقیاس و عیب‌یابی فرایند تولید تمرکز دارند (۱۷).

مراحل مرتبط با پردازش پایین دستی: بسته به ماهیت محصول و روش سنتز، پردازش پایین دستی به‌طور کلی ترکیبی از مراحل زیر را شامل می شود برداشت و فیلتراسیون اولین گام برای جداسازی محصول از مابقی مواد زائد موجود در محیط ، با تمرکز بر بهینه سازی حفظ عملکرد و کیفیت محصول است که بدین‌منظور از روش‌های متعددی مانند فیلتراسیون، سانتریفیوژ کردن، لیز اسیدی، استفاده از سورفکتانت ویا از فرایند های رسوب دهی استفاده می‌شود (۱۷). پس از آن در مرحله جداسازی اولیه میزان ناخالصی‌ها و محصولات جانبی به حداقل می‌رسد و یک جداسازی اولیه‌ای بر روی محصول انجام می‌شود. تفاوت آن با Harvest در این است که اساسا تمام مواد زائد قبلی حذف شده است. استراتژی‌های جداسازی بسته به ماهیت مولکول هدف متغیر است. اصولا آنتی‌بادی‌ها توسط رزین‌های میل ترکیبی مانند پروتئین A و پروتئین G و همچنین برخی روش‌های مهندسی شده انتخابی دیگر جدا می‌شوند. پروتئین‌های غیر آنتی‌بادی و الیگونوکلئوتیدها اغلب توسط روش‌های رایجی که در هر روش خالص سازی از ویژگی خاصی پروتئین‌ها استفاده می‌کند جداسازی می‌شوند. هنگامی‌که پروتئین‌ها در اندازه متفاوت هستند، کروماتوگرافی براساس اندازه (Size Exclusion Chromatography) استفاده می‌شود. وقتی به بارالکتریکی مربوط می‌شود، یون کروماتوگرافی تبادلی(Ion- Exchange Chromatography) استفاده می‌شود. هنگامی که خصوصیات آب‌گریزی در نظر گرفته می‌شود، کروماتوگرافی تعامل هیدروفوبیک Hydrophobic Interaction(Chromatography) و کروماتوگرافی فاز معکوس (Reversed-Phase Chromatography) استفاده می‌شود. و در نهایت، هنگامی‌که به ویژگی لیگاند مربوط می‌شود، کروماتوگرافی میل ترکیبی استفاده می‌شود. در ادامه روش‌ها مبتنی بر گروماتوگرافی به تفصیل مورد بررسی قرار گرفته است.

کروماتوگرافی تبادل یونی: اولین مرحله برای جداسازی مولکول های پروتئین کروماتوگرافی تبادل یونی است (۱۰) این نوع کروماتوگرافی دارای ستونی حاوی دانه‌های ژل مانند است که در آن از روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک نیز استفاده می‌شود. دانه‌های ماتریکس ستون کروماتوگرافی ژل‌های دارای بار مثبت یا منفی هستند که بسته به بار پروتئین مورد نظر انتخاب

می‌شوند. آن‌ها معمولا از پلی ساکاریدهایی مانند آگارز، سلولز، یا دکستران متصل به گروه‌های جانبی مانند دی اتیل آمینو اتیل (DEAE؛ مبدل آنیون) و کربوکسی متیل (یک مبدل کاتیونی) است که می‌توانند یون‌ها را مبادله کنند (۱۸). از آنجایی‌که پروتئین‌ها آمفوتر هستند، تمایل دارند تحت شرایط خاص pH به رزین تبادل یونی متصل شوند. بسته به pH، پروتئین‌ها بار مثبت، خنثی یا منفی دریافت کرده و به رزین متصل می‌شوند یا هیچ جاذبه الکتریکی از خود نشان نمی‌دهند و از ستون شسته می‌شوند. پس از آن، پروتئین‌های متصل شده به رزین تبادل یونی توسط بافرهای نمکی از ستون شسته و جدا می‌شوند. یون‌های موجود در نمک با پروتئین‌های چسبیده به رزین رقابت می‌کنند، بنابراین پیوندهای الکتریکی بین پروتئین‌ها و ماتریکس می‌شکنند. متعاقبا، پروتئین‌ها به‌دلیل افزایش بار، شسته می‌شوند. ثابت شده است که این روش برای جداسازی پروتئین‌های بارهای مختلف در pH خاص مناسب است.

کروماتوگرافی میلی ترکیبی: علیرغم پیشرفت‌های عمده که در روش‌های جداسازی غیر کروماتوگرافی مانند رسوب، جداسازی دو فاز آبی ATPS و کریستالیزاسیون انجام گرفته است اما روش‌های کروماتوگرافی و به‌عنوان استاندارد طلایی در صنعت بیوداروسازی است. کروماتوگرافی‌های تک مرحله ای، به‌ویژه کروماتوگرافی میل ترکیبی، محبوب‌ترین روش در بین همه روش‌های کروماتوگرافی است و به‌طور گسترده‌ای برای تولید داروهای زیستی مورد توجه قرار گرفته است، زیرا توانایی جداسازی یک نوع پروتئین خاص از مخلوطی از پروتئین‌های غیر ضروری و آلاینده‌های مختلف بر اساس میل پروتئین به گروه‌های شیمیایی موجود برروی ذرات رزین دارا می‌باشد و به‌طور قابل توجهی به هزینه تولید یک داروی زیستی کمک می کند (۱۵). پس از آن، پروتئین متصل شده به رزین‌های تمایلی با تغییر پارامترهای فیزیکی (به‌عنوان مثال، pH یا دما)، و همچنین تغییر قدرت یونی، ترکیبات بافری، اضافه کردن شلاتورهای مختلف جدا شده و یا جداسازی رقابتی انجام شود (۱۹).

گاهی اوقات، خواص شیمیایی پروتئین هدف به‌طور کامل شناسایی نمی‌شود. در این مورد، برای به‌دست آوردن اتصال قوی و انتخابی بین پروتئین هدف و لیگاندهای موجود برروی سطح ستون از پروتئین‌های رابط استفاده می شود. آن‌ها با اتصال دو ژن یا بیشتر در کدگذاری اولیه پروتئین ایجاد می‌شوند، همچنین قطعه کوچکی از DNA به انتهای ژن متصل می‌شود که در ادامه پروتئین مورد نظر ترجمه می‌شود. این دنباله کوتاه، که به‌عنوان "دنباله " tag شناخته می شود، دلیل اتصال قوی به ذرات رزین داخل ستون است (۱۴). دنباله‌های هیستیدینی که به ستون‌ها کروماتوگرافی میل ترکیبی بر پایه فلزات (IMAC) مانند مس، کبالت، نیکل و روی دارد (۲۰) متصل شده است، یک روش رایج برای خالص سازی پروتئین نوترکیب است که به‌منظور بهینه کردن شرایط اتصال معمولا Ni(II)-nitrilotriacetic acid مورد استفاده قرار می‌گیرد. دنباله‌های هیستیدینی به‌طور معمول در بافرهای نزدیک حالت خنثی بهتر به ستون متصل می‌شوند (۲۱). هنگامی‌که پروتئین‌های دنباله دارجدا می‌شوند، خالص سازی از طریق شستشوی ملایم به کمک بافر ایمیدازول انجام می‌شود (۲۱) بنابراین احتمال اندکی برای از دست دادن ساختار و تاخوردگی و کاهش فعالیت پروتئین وجود دارد. همچنین در مرحله بعد ممکن است که نیاز به جدا سازی دنباله هیستیدین باشد. با توجه به این‌که استفاده کردن از پروتئازها برای جدا سازی دنباله‌ها در طول فرایند تولید هزینه بر است از روش‌های جایگزین مانند استفاده کردن از دنباله‌های که به خودی خود جدا می شوند به‌عنوان روش جایگزین استفاده شده است (۲۲). روش ارائه شده در اینجا برای خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب دارویی دارای مزایای بی‌شماری است و برای برای خالص سازی بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا دنباله‌های هیستیدینی بار الکتریکی، خصوصیات ایمنی زایی و سمیت ندارد (۲۱). علاوه بر این، معرف‌ها به‌صورت تجاری در دسترس هستند و تنها یک

ستون مورد نیاز است (۲۲). از سوی دیگر، ممکن است که فلزات سنگین فوق الذکر از ستون خارج شوند و میزان بهره‌وری خالص سازی در طول فرایند تولید نیز کاهش می‌یابد.

کروماتوگرافی‌ها تمایلی بر پایه آنتی‌بادی‌ها نوعی دیگری از کروماتوگرافی‌های تمایلی است که در آن‌ها آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه پروتئین هدف بر روی ستون قرار دارد. این روش براساس اتصال اختصاصی آنتی‌بادی و آنتی ژن طراحی شده است که روش بسیار دقیقی است، اما دارای دو اشکال جدی و قابل توجه است، اول این‌که برای به‌دست آوردن آنتی‌بادی نیاز به پروتئین خالص است که به حیوان تزریق شود و سبب ایجاد آنتی‌بادی شود و از سوی دیگر برای شستشوی پروتئین هدف می‌بایست pH در حدود ۲ باشد و یا این‌که از اوره و یا عوامل کائوتروپیک استفاده شود که سبب آسیب رسیدن به ساختار و در نتیجه عملکرد پروتئین‌ها می‌شود (۲۳).

کروماتوگرافی برهمکنش هیدروفوبیک HIC و کروماتوگرافی فاز معکوس RPC: پروتئین‌ها شامل آمینو اسیدهایی با زنجیره‌های جانبی آب‌گریز و آب‌دوست هستند که تمایل آن‌ها را به آب مشخص می‌کند. این مشخصه نقش اصلی در تاخوردگی پروتئین دارد. کروماتوگرافی هیدروفوبیک از فعل و انفعالات آب‌گریز به‌منظور خالص سازی پروتئین‌ها استفاده می‌کند (۲۴). پروتئین‌ها به‌دلیل آب‌گریز بودن به رزین آب‌گریز متصل می‌شوند. این فرآیند نیاز به غلظت نمک بالایی در ستون دارد زیرا مولکول‌های آب قسمت‌های آب‌گریز پروتئین‌ها را احاطه کرده‌اند و از اتصال آن‌ها به لیگاندهای آب‌گریز در محیط‌های کروماتوگرافی جلوگیری می‌کند. برای مثال، می‌توان با افزودن سولفات آمونیوم با این مشکل مقابله کرد. برای به‌دست آوردن پروتئین‌های متصل شده، گرادیان نمک کاهش می‌یابد. همچنین راندمان فرآیند شستشو با افزودن، موادی مانند الکل‌ها افزایش می‌یابد (۱۰).

اساس کار کروماتوگرافی فاز معکوس مشابه کروماتوگرافی برهمکنش هیدروفوبیک است. تفاوت اصلی مربوط به محیط کروماتوگرافی است. در HIC غلظت عناصر آب‌گریز متصل به رزین ۲۰-۱۰ μmol/mL است، در حالی‌که در RPC به چندین صد میکرومول در میلی‌لیتر می‌رسد. این منجر به اتصال قوی‌تر در کروماتوگرافی فاز معکوس می‌شود. همچنین در شستشوی ستون از حلال‌های مانند متانول که قطبیت کم‌تری نسبت به آب دارد استفاده می‌شود. بنابراین در مقایسه با کروماتوگرافی برهمکنش هیدروفوبیک، کروماتوگرافی فاز معکوس خطر دناتوره شدن مولکول‌های پروتئین را بیشتر می‌کند، اما در عین حال، برای تجزیه و تحلیل کیفی سودمند است (۲۴, ۲۵) .

کروماتوگرافی جداسازی بر اساس اندازه (SEC): این روش از تفاوت در اندازه پروتئین‌ها برای جداسازی استفاده می‌کند. مخلوطی از پروتئین‌ها وارد ستون‌های پر از ژل‌های منفذدار از جنس زنجیره‌های پلی ساکاریدی می‌شود. اگر پروتئین بزرگی بر روی ستون برده شود در داخل منافذ قرار نمی‌گیرد در نتیجه خیلی سریع پایین می‌آید. در مقابل، پروتئین‌های کوچک‌تر در داخل منافذ ژل قرار می‌گیرد و از ستون دیرتر خارج می‌شود. نرخ جداسازی کروماتوگرافی بر اساس اندازه کم است بنابراین این استراتژی را نمی‌توان برای جداسازی پروتئین‌هایی که از لحاظ اندازه‌ی آن‌ها به‌طور جزئی از یکدیگر متفاوت است استفاده کرد (۲۶).

تبادل بافر و تغلیظ کردن: اولترافیلتراسیون(Ultrafiltration)، اغلب در پردازش زیستی پایین دست برای تغلیظ محصول رقیق استفاده می‌شود. اولترافیلتراسیون مولکول‌ها را در یک محلول بر اساس اندازه منافذ غشا یا وزن مولکولی جدا می‌کند.

محصول رقیق را تغلیظ کرده و مولکول‌ها را در محلول بر اساس اندازه منافذ غشا یا وزن مولکولی جدا می‌کند. در این مرحله ناخالصی‌های باقیمانده با استفاده از روش‌های متوالی، با حذف ساختار و فعالیت محصول حذف می‌شود. هدف نهایی در این مرحله دستیابی به محصول با خلوص بالا و در عین حال با حداقل کاهش در بازده تولید است (۲۷, ۲۸). دیافیلتراسیون (Diafiltration) محصولات تولیدی را از بافر موجود به بافر جدید برای فرآیندهای آتی و یا با بافر فرمولاسیون نهایی مبادله می‌کند. اولترافیلتراسیون و دیافیلتراسیون با هم به‌عنوان تبادل بافر شناخته می‌شوند (۲۹, ۳۰).

فرمولاسیون: فرمولاسیون فرآیندی است که یک ماده دارویی را به‌یک محصول دارویی فرموله شده تبدیل می‌کند. فرمولاسیون، مولکول محصول را از محیط، حلال یا سایر حالت‌های فیزیکی به شکلی مناسب برای تجویز بالینی تبدیل می‌کند. مولکول‌های محصول دارویی بر اساس نحوه استفاده از آن‌ها، از طریق استنشاق، تزریق یا دوز خوراکی فرموله می‌شود. همچنین پایداری بلندمدت محصول و مواد جانبی مربوطه برای اطمینان از میزان دوز اندازه‌گیری شده و ویژگی‌های کیفیت حیاتی (Critical Quality Attributes) محصول در مراحل پس از پردازش، ذخیره‌سازی و حمل و نقل ارزیابی می‌شوند. علاوه بر استریل بودن، موارد دیگری از جمله اطمینان از حذف ناخالصی‌ها و اندوتوکسین ها و جلوگیری از تخریب محصول دارویی در حفظ ایمنی و اثربخشی در طول ساخت و نگه‌داری طولانی مدت یک پروتئین درمانی ضروری است و می‌بایست مورد بررسی قرار گیرد (۳۱, ۳۲)، محصولات دارویی فرموله شده شامل پروتئین‌ها به‌ویژه mAb، پلی ساکاریدها، سیستم‌های نانوذرات، مواد آلی، الیگونوکلئوتیدها و بسیاری از انواع واکسن‌ها هستند که واکسن‌های با یک ادجوانت،که معمولا ذرات مبتنی بر آلومینیوم و یا یک امولسیون آلی فرموله می‌شوند. فرمولاسیون واکسن و سنتز ادجوانت به‌طور خاص یک جریان کاری هستند که به‌خوبی در راکتورهای که به‌صورت موازی کار می‌کنند به انجام می رسند(۳۳).

خالص‌سازی هورمون محرک فولیکولی انسانی به کمک لیگاندهای میل ترکیبی Camelid VHH

هورمون محرک فولیکولی انسانی: هورمون محرک فولیکولی یک پروتئین هتروداِیمر از خانواده گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد که توسط سلول‌های گنادوتروپ غده هیپوفیز ترشح می‌شود. زیرواحد آلفای FSH در تمامی اعضای خانواده هورمون‌های گنادوتروپینی از لحاظ توالی اسیدآمینه‌ای یکسان بوده اما در قند متصل شده دارای تفاوت است گیرنده این هورمون در زنان بر روی سلول‌های فولیکولی تخمدان قرار دارد و اتصال هورمون به گیرنده‌اش باعث به راه افتادن مسیرهایی می‌شود که تحریک تکثیر سلول‌های گرانولوزا را به‌دنبال دارد. این هورمون تولید استروژن را در فولیکول تنظیم می‌کند و موجب بلوغ فولیکول و تمایز سلول‌های گرانولوزا شده و در تخمک‌گذاری نقش دارد (۳۴, ۳۵). عملکرد این هورمون تنها در فرآیند تخمک‌گذاری نمی باشد بلکه در سال ۲۰۱۲ با مطالعه بر روی ۲۹ زن نابارور (۳۰-۴۰ ساله) که تحت درمان IVF قرار گرفته بودند، متوجه اثرات مثبت FSH نوترکیب بر متابولیسم استخوان‌ها شدند. در این مدل آزمایشی نشان داده شد که FSH نوترکیب می‌تواند به‌طور مستقیم بر روی متابولیسم و تراکم استخوانی زنان یائسه تاثیرگذار باشد (۳۶). با توجه به اینکه FSH بلوغ تخمک در خانم‌ها و اسپرماتوژنز در آقایان را کنترل می‌کند، FSH انسانی برای درمان افرادی که فاقد توانایی تولید این هورمون و یا دارای توانایی تولید کم آن هستند، همچنین جهت استفاده در تکنولوژی های کمک‌باروری مثل IVF و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (Intracytoplasmic sperm injection) به‌کار می‌رود. گنادوتروپین FSH ادراری در اوایل دهه ۱۹۶۰ برای اولین بار جهت القای تخمک‌گذاری مورد استفاده قرارگرفت (۳۷). اما استفاده از گنادوتروپین‌های ادراری مشکلاتی داشت که از جمله آن‌ها می‌توان به سختی جمع‌آوری نمونه از ادرار، آلودگی با پروتئین‌های غیر FSH، ناهمگنی فراوان و به‌طور خاص

وجود LH و کارایی کم‌تر آن نسبت به نوع نوترکیب اشاره کرد به همین جهت امروزه با پیشرفت تکنولوژی DNA نوترکیب و تولیدFSH انسانی نوترکیب، محصولی با کیفیت بالاتر و در دسترس برای درمان تولید می‌شود (۳۷).

خالص سازی هورمون محرک فولیکولی انسانی: چالش اصلی در تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی در مقیاس‌های صنعتی فرآیندهای پایین دستی آن‌ها است زیرا علاوه بر زمان بر بودن، هزینه‌های عملیاتی آن‌ها نیز بالا است و تا ۷۰ درصد از کل هزینه فرآیند تولید پروتئین را به‌خود اختصاص دهد. اگرچه، در بسیاری از موارد، خالص سازی یک پروتئین نوترکیب با روش تولید خاص آن تسهیل می شود اما همچنین در طول مسیر چالش‌های زیادی وجود دارد و خالص سازی ممکن است با مشکلاتی مواجه شود، به‌ویژه زمانی که با کاهش پایداری، تشکیل ایزوفرم‌ها یا انواع بدفرآوری(Misprocessed variants) شده مواجه هستیم.

تاکنون روش‌های مختلفی برای خالص‌سازی فاکتور محرک فولیکولی در مقالات گزارش شده است که مربوط به خالص سازی پروتئین از ادرار زنان یائسه و یا هیپوفیز می باشد که با روش استخراج این پروتئین از منابع نوترکیب متفاوت می‌باشد. روش‌های مختلفی برای خالص‌سازی FSH نوترکیب انسانی در مقالات گزارش شده‌اند، شامل چندین مرحله کروماتوگرافی مانند تبادل یونی، کروماتوگرافی آب‌گریز، و فیلتراسیون ژل، که بسیار پیچیده و پرهزینه هستند. از آن‌جاکه در یک فرآیند خالص سازی، کلید یک پروتکل موفق و کارآمد، کاهش مراحل کروماتوگرافی است، زیرا در نهایت سبب کاهش هزینه‌ها و افزایش بازده محصول نهایی تولید بدون تاثیر بر کیفیت و کاهش فعالیت پروتئین می‌شود. بنابراین استفاده کردن از روش‌های متعدد برای به‌دست آوردن rhFSH با خلوص بالا باعث می‌شود که راندمان تصفیه کم‌تر از حد انتظار باشد (۳۸, ۳۹)

در مطالعه‌ای توسط NA و همکاران (۴۰) ارائه شده از چندین مرحله آماده سازی و کروماتوگرافی برای خالص سازی استفاده کرده اند به این ترتیب که پس از جداسازی سلول‌ها از محیط کشت به‌کمک سانترفیوژ، سوپرناتانت سلولی را در مجاورت ZnCl2 قرار می‌دهند که پروتئین‌های که گلیکوزیلاسیون نداشته و یا اینکه گلیکوزیلاسیون کاملی ندارند رسوب کنند. پس از جداسازی رسوب پروتئنی سوپرناتانت به‌دست آمده را برروی ستون DEAE Sepharose و پس از آن Source 15 PHE و Hydroxyapatite و در نهایت از ۱۵ Source استفاده شده است. هرچند در نهایت محصول به‌دست آمده از لحاظ ساختاری و عملکردی مناسب بوده است اما بازده تولید در این روش پایین است. زیرا هر مرحله اضافی در فرآیندخالص سازی، منجر به کاهش میزان فرآورده خواهد شد. بنابراین به‌منظور بالا بردن میزان بازدهی، بایستی مراحل خالص‌سازی به حداقل رسانده و یک طرح ساده برای خالص سازی تهیه شود (۴۱-۴۳) در جدول ۱ تعدادی از مقالات و ثبت اختراعات که در آن خالص سازی پروتئین FSH انجام شده اشاره و مورد بررسی قرار گرفته است. در ادامه به بررسی روش تک مرحله ای مبتنی بر آنتی‌بادی برای جداسازی پروتئین نوترکیب FSH با بازده تولید بالا می‌پردازیم.

جدول۱: روش‌های خالص سازی پروتئین نوترکیب FSH

مقالات ارائه شده مراحل خالص سازی	Method for purifying FSH or a FSH mutant(44)	Method for purifying FSH(45)	FSH and FSH variant formulations, products and methods(46)	Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility(47)
مرحله اول	فیلتراسیون	فیلتراسیون	Proflux M12 فیلتراسیون	دیافیلتراسیون
مرحله دوم	کروماتوگرافی تمایلی بر پایه رنگ	Q-Sepharose کروماتوگرافی تبادل یونی	کروماتوگرافی تبادل Q-Sepharose یونی	کروماتوگرافی تبادل یونی DEAE Sepharose
مرحله سوم	کروماتوگرافی تبادل یونی ضعیف	کروماتوگرافی تمایلی بر پایه رنگ(DAC)	فیلتراسیون Zeta Plus 30-SP	کروماتوگراف تمایلی بر پایه آنتی‌بادی
مرحله چهارم	کروماتوگرافی هیدروفوبیک	DEAE Sepharose کروماتوگرافی تبادل یونی	کروماتوگرفی تبادل یونی کاتیونی (CEX)	کروماتوگرافی تبادل یونیQ Sepharose FF
مرحله پنجم	کروماتوگرافی تبادل یونی قوی	کروماتوگرافی هیدروفوبیک	کروماتوگرافی تمایلی بر پایه رنگ (DAC)	کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون C18
مرحله ششم		الترافیلتراسیون	کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون Superdex 75	Sephacryl S200 کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون
مرحله هفتم		کروماتوگرافی فاز معکوس		
مرحله هشتم		نانوفیلتراسیون		
بازده نهایی تولید	۴۳%	۳۲%	۴۰%	۳۶%

آنتی‌بادی‌های تک زنجیره VHHs: در دهه ۱۹۷۰، روش خالص سازی تمایلی برای ایمونوگلوبولین G توسط پروتئین A معرفی شده که روشی کاملا تثبیت شده است که به‌صورت کارآمد و با غلظت مناسب فرآیند جداسازی را به انجام می‌رساند (۴۸, ۴۹). با توجه به مزایایی این روش برای جداسازی، روش جدیدی برای خالص سازی طیف وسیعی از بیوداروها بر مبنای آنتی‌بادی‌ها و کروماتوگرافی میلی ترکیبی ارائه شده است که یک ماتریس کروماتوگرافی سازگار با تولید فرآورده‌های زیستی است که از لحاظ اقتصادی نیز توجیه پذیر می‌باشد (۵۰-۵۲).

در طول دو دهه گذشته فناوری تولید آنتی‌بادی نوترکیب به‌علت استفاده کردن از آن‌ها در زمینه درمان به‌سرعت در حال پیشرفت است. آنتی‌بادی‌های معمولی مولکول‌های پیچیده ای می‌باشند که از دو زنجیره سبک و سنگین تشکیل شده است. اولیگوساکاریدهای از طریق اتصال N به دومین زنجیره سنگین در قسمت دومین ثابت(CH2) آنتی‌بادی متصل شده است که

برای انجام عملکرد آنتی‌بادی‌ها و طول عمر آن‌ها در سرم ضروری است. انتهای متغییر دو زیر واحد سبک و سنگین آنتی‌بادی‌ها برای اتصال به آنتی‌ژن کافی است و جدا کردن دو زیر واحد سبک و سنگین در آنتی‌بادی‌ها اگرچه باعث شده فعالیت اتصال به آنتی ژن در آن‌ها باقی بماند اما حلالیت و تمایل آنتی‌بادی‌ها نسبت به آنتی‌ژن‌ها کاهش می یابد (۵۳, ۵۴) چنین قطعات آنتی‌بادی را می‌توان به‌عنوان یک قطعه آنتی‌بادی تک ظرفیتی Fab یا به‌صورت تک زنجیره‌ای تولید کرد (scFv) که در آن دامنه‌های VH و VL توسط پیوند دهنده پلی پپتیدی به‌هم متصل می‌شوند.

با کشف این موضوع که شترهای مانند bactrian, dromedaries, و llamas آنتی‌بادی‌های فاقد زنجیره‌های سبک دارند و انتهای N آن‌ها بدون نیاز به اتصال به دومین دیگر به آنتی‌ژن‌ها متصل می‌شوند پیشرفت و دیدگاه جدیدی در مورد تولید آنتی‌بادی‌های تک زنجیره(Nanobodies®) و VHH آنتی‌بادی‌ها ایجاد کرد، همچنین در این آنتی‌بادی‌ها زنجیره‌های سنگین فاقد قطعه CH1 می‌باشد که در آنتی‌بادی‌های معمولی به زنجیره سبک متصل می‌شود و به میزان کم‌تری با دامنه VH در تعامل است. اگر چه پس از این آنتی‌بادی‌های تک زنجیره در ماهی‌های غضروفی نیز کشف شد اما آنتی‌بادی موجود در شتر به‌علت این که کار کردن با آن‌ها راحت‌تر بوده و فعالیت ایمنی زایی آن‌ها نیز بیشتر است در کاربردهای بیوتکنولوژی بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است.

کاربرد آنتی‌بادی‌های تک زنجیره: از زمان کشف آنتی‌بادی‌های تک زنجیره در سال ۱۹۹۳، مطالعه بر روی این قطعات آنتی‌بادی تک دامنه به‌سرعت رو به رشد بوده است. VHH ها دارای کاربردهای بسیار گسترده ای هستند، مانند استفاده در شامپوها برای پیشگیری از شوره سر، کروماتوگرافی‌های تمایلی و یا در حس‌گرهای زیستی گزارش شده است. اما کاربردهای درمانی آن‌ها هنوز چالش برانگیزتر هستند. VHHها همچنین دارای مزایا و کاربردهای بسیاری در بیوتکنولوژی دارویی نیز می‌باشد. با توجه به این‌که درمان با آنتی‌بادی‌های کامل و متعارف گاهی اوقات عوارض جانبی به‌دلیل ماهیت دو ظرفیتی بودن آن‌ها مانند اتصال عرضی به هدف یا وجود منطقه Fc که سبب ایجاد واکنش‌های ایمینوژنسیتی در سلول‌ها شده، دیده می‌شود، اما ظاهرا چنین انتظار می‌رود که این عوارض جانبی با استفاده از VHH تک ظرفیتی رخ ندهد. هم اکنون چندین نوع از آنتی‌بادی‌های تک زنجیره در زمینه بیماری‌های مختلف در حال مطالعه هستند، از جمله انکولوژی و بیماری ها عفونی، التهابی و نورودژنراتیو است (۵۵-۵۸). VHH ها به‌ویژه برای ایمونوتراپی در بیماری‌های دهان به‌دلیل مقاومت آن‌ها در برابر pH بالا و ظرفیت اتصال به مولکول هدف در حضور غلظت بالای عوامل کائوتروپ مناسب هستند (۵۹, ۶۰). با توجه به کاربردهای این نوع از آنتی‌بادی‌ها آن‌ها را می‌توان از نظر اقتصادی در میکروارگانیسم‌ها مانند مخمر تولید کرد که پایداری بالایی نیز دارند اما تولید آن‌ها درسلول‌های میکروبی اغلب دست و پا گیر هستند، به‌خصوص هنگام که گونه‌ای چند ظرفیتی تولید می‌شود و نیاز به اتصال قطعات است.

ساخت رزین‌های تمایلی مبتنی بر آنتی‌بادی‌های تک زنجیره VHH: هرچند که اندازه آنتی‌بادی تک زنجیره کم‌تر از یک دهم اندازه یک آنتی‌بادی چهار زنجیره‌ای معمولی است، اما آنتی‌بادی های تک زنجیره VHH می‌تواند تمایل و اختصاصیت ویژه و بیشتری را به مولکول هدف نشان بدهد، از این‌رو برای ساختن رزین‌های کروماتوگرافی علاوه بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب‌تر نسبت به آنتی‌بادی‌های معمول دارای پایداری مناسب‌تری نیز می‌باشند (۶۱, ۶۲). این ویژگی‌های ذاتی ماتریکس‌های میل ترکیبی مبتنی بر VHH سبب شده که آن‌ها توانایی جداسازی HCP، DNA و پاکسازی ویروسی

برای انواع مختلف بیوداروها از جمله پروتئین‌های نوترکیب مانند فاکتور هشت (۵۱، ۵۲، ۶۳) هورمون تحریک کننده فولیکولی FSH (۶۴)، ویروس‌های مرتبط با آدنو برای ژن درمانی (۶۵، ۶۶) و آنتی‌بادی‌های انسانی و قطعات Fab آنتی‌بادی‌هایی که توسط پروتئین A پوشانده نشده‌اند را دارا باشد (۶۷-۶۹). زمانی که بیوداروها دارای تغییرات پس از ترجمه بوده و سبب ایجاد اشکال دارویی متفاوت از آن‌ها می‌شود، در نتیجه آن فرایند پایین دستی آن‌ها سخت و چالش برانگیز است، زیرا آن‌ها از نظر بیولوژیکی نیز متفاوت می‌باشند (۷۰، ۷۱) برای حل این مشکل از فناوری وابسته به VHH استفاده شده که توانایی انتخاب پذیری برای اشکال مطلوب بیوداروها از لحاظ بیولوژیکی را دارا می‌باشند. بنابراین در توسعه فرایندهای پایین دستی بیوداروها و در فرایند تولید cGMP پروتئین‌های نوترکیب (۵۱، ۵۲) و با توجه به مزایای کروماتوگرافی میل ترکیبی مبتنی بر VHH امروزه فرایند تولید و خالص سازی را به‌میزان بیشتری پشتیبانی می‌کند.

جداسازی هورمون محرک فولیکولی انسانی نوترکیب به‌کمک رزین™ CaptureSelect. در مطالعات اخیر ارائه شده توسط Eifler و همکاران (۷۲). رزین کروماتوگرافی میل ترکیبی جدیدی بر اساس قطعات VHH مشتق شده از شتر تولید و معرفی شده است. محصول مشابهی نیز توسط شرکت The Life Technology Company به‌عنوان ماتریکسی برای خالص سازی rhFSH بر همین اساس ساخته و به بازار عرضه شده است. این محصول توانایی جداسازی FSH انسانی را از منابع نوترکیب در یک مرحله و با بازیابی و خلوص بالا را دارا می‌باشد. این ماتریکس تمایلی می‌تواند پروتئین FSH را در صورتی که دو زیر واحد به هم متصل هستند جداسازی کند و به زیر واحدهای α و β به‌صورت منفرد متصل نمی‌شود. شرایط شستشو در pH خنثی که حفظ فعالیت بیولوژیکی FSH را تضمین می‌کند یکی دیگر از ویژگی‌های قابل توجه این ماتریکس است (۷۶ و ۷۷). Detmers و همکاران (۷۷). از این رزین برای خالص سازی rhFSH استفاده کرد و توانستند بازده خالص سازی را تا ۳۷ درصد افزایش دهند که نسبت به روش‌های متداول چند مرحله‌ای ذکر شده در جدول یک پروتئین به‌صورت فعال، در زمان کوتاه تر و با درجه خلوص بالاتر خالص سازی شده که در نهایت باعث کاهش هزینه‌ی فرایندهای پایین دستی می‌شود.

مروری بر مطالعات نشان می‌دهد که اکثر گلیکوپروتئین‌های متصل شده به ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی نسبتا به‌راحتی از آن‌ها واجذب می‌شوند، اما برخی از آن‌ها آنقدر محکم به ستون متصل شده اند که تکنیک‌های شستشوی رایج برای دفع آن‌ها بی‌اثر هستند. تحقیقات انجام شده در پژوهشگاه رویان نشان داده که با استفاده از روش های رایج،rhFSH به‌طور کامل از ماتریکس تمایلی CaptureSelect™ جدا نمی‌شود، پروتئین جدا نشده نه تنها بازده خالص سازی پروتئین هدف را کاهش می‌دهد، همچنین سبب افزایش فشار برگشتی ستون شده و در نهایت فرایند کروماتوگرافی را مختل کرده که ممکن است سبب از دست رفتن پروتئین مورد نظر شود (۷۲-۷۴) در پژوهشگاه رویان، Abolghasemi و همکاران (۷۵) به بررسی اثر عوامل مختلف بر جداسازی rhFSH از ماتریکس میل ترکیبی CaptureSelect پرداختند. که در این پژوهش روش‌هایی به‌منظور بهبود جداسازی پروتئین‌های که به‌صورت محکم به ستون متصل هستند ارائه شده است و ظرفیت اتصال پروتئین هدف به رزین میل ترکیبی نیز بهینه شده است. که در نهایت توانستند بازده تولید محصول نهایی را به طور چشم‌گیری تا حدود ۶۰ درصد افزایش دهند.

۳-بحث

پروتئین‌های نوترکیب دارویی به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود و توانایی آن‌ها در درمان بیماری‌ها، به‌سرعت در حال رشد در بازار دارویی هستند. همان‌طور که در این مقاله ذکر شد، به‌کارگیری فناوری DNA نوترکیب و فرآیندهای کشت انبوه سازمان‌ها، زمینه‌ساز تولید مقادیر زیادی از این پروتئین‌ها شده است. یکی از چالش‌های عمده در تولید پروتئین‌های نوترکیب، تخلیص موثر آن‌ها است، به‌ویژه هنگامی‌که این پروتئین‌ها در محیط‌های پیچیده تولید می‌شوند که شامل ناخالصی‌های مرتبط با سلول‌های میزبان و سایر مواد غیر ضروری هستند. پروتئین‌های نوترکیب دارویی با رشد سالانه ۱۵درصدی بخش عمده‌ای از بازار بزرگ فرآورده‌های دارویی را به‌خود اختصاص داده است. ترکیب فناوری DNA نوترکیب و فرآیندهای کشت انبوه ارگانیسم‌ها امکان تولید زیاد این فرآورده‌ها را که تولید انبوه و کم هزینه آن‌ها از منابع طبیعی غیرممکن و یا بسیار مشکل است، مثل انواع اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها، هورمون‌های رشد، سرم آلبومین انسانی و....، را فراهم کرده است. در مقالاتی که اخیرا توسط محققان صاحب نظر در تولید پروتئین نوترکیب ارائه شده تاکید شده است که توسعه یک روش با کارآیی بالای تولید پروتئین نوترکیب مستلزم بررسی نحوه اثر پارامترهای مختلفی بر روی تخلیص پروتئین نوترکیب است و بهینه سازی مستقل آن‌ها منجر به بهره‌وری حداکثری نخواهد شد. توسعه یک فرآیند پایین دستی، برای رسیدن به اهداف تعیین شده در طول مسیر خالص سازی پروتئین‌های دارویی مانند خلوص بالا و عملکرد بهینه محصول، می‌تواند چالش برانگیز باشد، به‌خصوص هنگامی‌که پروتئین‌ها در منابع نوترکیب هستند و مخلوط پیچیده‌ای حاوی سطوح بالایی از ناخالصی‌های مرتبط با سلول میزبان و ناخالصی‌های مرتبط با محصول وجود دارد. همچنین تکنیک های مرسوم برای جداسازی پروتئین‌ها که بر اساس تفاوت‌های آن‌ها پایه گذاری شده است مانند تفاوت در خواص فیزیکی مانند بار، آب‌گریزی و اندازه اغلب برای رسیدن به سطح خلوص مورد نظر به چندین مرحله کروماتوگرافی نیاز دارد که در نهایت می‌بایست فرایند را از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه سازد، زیرا سبب از دست رفتن محصول در هر مرحله می‌شود (۷۳). در حالت ایده آل، در یک فرآیند پایین دستی کارآمد می‌بایست تعداد مراحل را کم‌تر کرد تا محصول با بازده مناسب به‌دست بیاید. زیرا افزایش هر مرحله در طول فرآیند سبب شده در هرمرحله میزانی از پروتئین را از دست می‌رود که در نهایت بازده تولید کاهش می‌یابد.

کروماتوگرافی میل ترکیبی یک فناوری خالص‌سازی منحصر به‌فرد و تنها تکنیکی است که با به‌کارگیری یک بیولیگاند خاص، می‌تواند مولکول‌های زیستی و پروتئین‌ها را بر اساس ساختار شیمیایی خاص یا عملکردهای بیولوژیکی آن‌ها جدا کند. در این روش، از آن‌جایی‌که بیولیگاند ظرفیت و تمایل بالایی برای پروتئین مورد نظر دارد، به‌کمک این روش بازیابی مواد فعال تا چندین برابر بیشتر از آن‌چه که با پروتکل‌های خالص‌سازی معمول که نیازمند مراحل کروماتوگرافی متعدد و در نهایت منجر به بازده کلی پایین‌تر شوند، امکان پذیر است (۷۶, ۷۷). امروزه گونه جدیدی ازکروماتوگرافی‌های تمایلی برای جدا سازی بیوداروها بر اساس آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای طراحی شده است، گونه‌ای از شترها قادر به تولید این نوع از آنتی‌بادی‌های عملکردی هستند که فاقد زنجیره‌های سبک می‌باشند و انتهای N آن به‌طور کامل قادر به اتصال آنتی‌ژن است. این قطعات آنتی‌بادی‌های تک زنجیره را VHHs و یا Nanobodies® می‌نامند که در بیوتکنولوژی دارای کاربردها و مزایایی بسیاری هستند و به‌خوبی در میکروارگانیسم‌ها به‌میزان بالایی بیان شده و در این شرایط بیانی دارای پایداری و حلالیت خوب و مناسبی نیز هستند. امروزه با به‌کارگیری تکنولوژی این نوع از آنتی‌بادی‌ها برای تولید ماتریکس‌های اختصاصی کروماتوگرافی به‌منظور

خالص سازی داروهای بیوتکنولوژیک تحول بزرگی در خالص سازی بیوداروها ایجاد شده و فرایندهای پایین دستی به‌درستی در راستای هدف خود که کاهش تعداد مراحل و افزایش بازده تولید می‌باشد به انجام رسیده است (۷۸, ۷۹).

۴- نتیجه گیری

حرکت به‌سمت تولید FSH انسانی به‌روش نوترکیب، به‌عنوان یکی از داروهای مهم جهت استفاده در درمان ناباروری و تکنولوژی‌های کمک‌باروری، بسیار حائز اهمیت است. در مطالعاتی که برروی پروتئین FSH انسانی صورت گرفته است تاکنون روش‌هایی که برای خالص سازی این پروتئین ارائه شده شامل چندین مرحله کروماتوگرافی می‌باشد که در نهایت بازده خالص سازی حدود ۴۰ درصد می‌باشد، اما با به‌کار بردن کروماتوگرافی‌های تمایلی CaptureSelect مبتنی بر آنتی‌بادی‌های VHHs، پروتئین مورد نظر در یک مرحله با بازده بالا در حدود ۶۰ درصد که از لحاظ ساختاری و عملکردی نیز فعال می‌باشند، در زمان کوتاه تر استخراج می‌شود که در نهایت سبب کاهش هزینه‌های تولید نیز می شود. با توجه به اهمیت روز افزون داروهای بیولوژیک در صنعت دارویی و همچنین اهمیت ویژه تولید پروتئین FSH انسانی برای درمان ناباروری، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از روش‌های نوین همچون کروماتوگرافی‌های تمایلی با استفاده از VHHs، نه تنها می‌تواند به افزایش بازده خالص‌سازی منجر شود، بلکه همچنین زمان و هزینه‌های تولید را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. این دستاوردها به‌عنوان یک ضرورت در افق ۱۴۰۴ هدف اقتصادی، علمی و فناوری جمهوری اسلامی ایران، مسیر مناسبی برای دستیابی به جایگاه اول منطقه در این حوزه ایجاد می‌کند. به اشتراک‌گذاری و به‌کارگیری یافته‌های این تحقیق می‌تواند به تسریع توسعه و بهبود کیفیت داروهای بیولوژیک در کشور کمک کند. با توجه به تحولات اخیر در صنعت بیوتکنولوژی و نیاز به تامین نیازهای درمانی بومی، این پژوهش می‌تواند به‌عنوان یک الگو برای تحقیقات آینده در این زمینه عمل کرده و امیدواری‌های جدیدی را در درمان‌ها و تکنولوژی‌های کمک‌باروری ایجاد کند.

۵- منابع

1. Kelley B, Blank G, Lee A. Downstream processing of monoclonal antibodies: current practices and future opportunities. Process scale purification of antibodies. 2009:1-23.

2. Sommerfeld S, Strube J. Challenges in biotechnology production—generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 2005;44(10):1123-37.

3. Choe W-S, Nian R, Lai W-BJCes. Recent advances in biomolecular process intensification. 2006;61(3):886-906.

4. Gerngross TUJNb. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. 2004;22(11):1409-14.

5. Jungbauer A, Kaar WJJob. Current status of technical protein refolding. 2007;128(3):587-96.

6. Babaeipour V, Mofid MR, Khanchezar S, Faraji F, Abolghasemi S. Bench-scale Overproduction and Purification of recombinant GCSF in Escherichia coli fed-batch process. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2017;7(8):149-55.

7. Owczarek B, Gerszberg A, Hnatuszko-Konka KJBri. A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. 2019;2019.

8. Wu X, Gong F, Wang WJP. Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. 2014;14(6):645-58.

9. El-Gayar KJIJoM, Sciences A. Principles of recombinant protein production, extraction and purification from bacterial strains. 2015;2(2):18-33.

10. Saraswat M, Musante L, Ravidá A, Shortt B, Byrne B, Holthofer HJBri. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. 2013;2013.

11. Labrou NEJPDP. Protein purification: an overview. 2014:3-10.

12. Pavlou AK, Reichert JM. Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. Nature biotechnology. 2004;22(12):1513-9.

13. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature biotechnology. 2004;22(11):1393-8.

14. Khan KJB, Sciences C. Gene expression systems and recombinant protein purification, Research Journal of Pharmaceutical. 2014;5(6):450-63.

15. Dehaghani SA, Babaeipour V, Mofid M, Divsalar A, Faraji F. An efficient purification method for high recovery of recombinant human granulocyte colony stimulating factor from recombinant E. coli. Int J Environ Sci Dev. 2010;1(2):111-4.

16. Dutra G, Komuczki D, Jungbauer A, Satzer PJEiLS. Continuous capture of recombinant antibodies by ZnCl2 precipitation without polyethylene glycol. 2020;20(7):265-74.

17. Najafpour G. Biochemical engineering and biotechnology :Elsevier; 2015.

18. Sadler SE. Technology assisted strategies for the synthesis of bioconjugates: Northeastern University; 2014.

19. Wiktorek-Smagur A, Hnatuszko-Konka K, Gerszberg A, Kowalczyk T, Luchniak P, Kononowicz AKJTP-A, et al. Green way of biomedicine–how to force plants to produce new important proteins. 2012:63-90.

20. Bornhorst JA, Falke JJJMie. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. 2000;326:245-54.

21. Zhao X, Li G, Liang SJJoamic. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. 2013;2013.

22. Coolbaugh M, Tang MS, Wood DJAb. High-throughput purification of recombinant proteins using self-cleaving intein tags. 2017;516:65-74.

23. Gajda E, Bugla-Płoskońska GJAiH, Doswiadczalnej EMPHiM. Lizozym-występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań. 2014;68.

24. Queiroz J, Tomaz C, Cabral JJJob. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. 2001;87(2):143-59.

25. Palomares LA, Estrada-Moncada S, Ramírez OTJRge. Production of recombinant proteins. 2004:15-51.

26. Mori S, Barth HG. Size exclusion chromatography: Springer Science & Business Media; 1999.

27. Richardson D, Itkonen J, Nievas J, Urtti A, Casteleijn MGJSr. Accelerated pharmaceutical protein development with integrated cell free expression, purification, and bioconjugation. 2018;8(1):1-11.

28. Fan Y. Split Inteins As Versatile Tools in Applications of Downstream Purification and Bioconjugation: The Ohio State University; 2019.

29. Müller JJ, Neumann M, Scholl P ,Hilterhaus L, Eckstein M, Thum O, et al. Online monitoring of biotransformations in high viscous multiphase systems by means of FT-IR and chemometrics. 2010;82(14):6008-14.

30. Landgrebe D, Haake C, Höpfner T, Beutel S, Hitzmann B, Scheper T, et al. On-line infrared spectroscopy for bioprocess monitoring. 2010;88(1):11-22.

31. Lalloo R, Maharajh D, Görgens J, Gardiner NJAM, Biotechnology. A downstream process for production of a viable and stable Bacillus cereus aquaculture biological agent. 2010;86(2):4.۵۰۸-۹۹

32. Gomis-Fons J, Löfgren A, Andersson N, Nilsson B, Berghard L, Wood SJJob. Integration of a complete downstream process for the automated lab-scale production of a recombinant protein. 2019;301:45-51.

33. Wang J, Peng Y, Xu H, Cui Z, Williams ROJAP. The COVID-19 vaccine race: challenges and opportunities in vaccine formulation. 2020;21(6):1-12.

34. Levi-Setti PE, Cavagna M, Baggiani A, Zannoni E, Colombo GV, Liprandi V. FSH and LH together in ovarian stimulation. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2004;115:S34-S9.

35. Jazayeri SH, Amiri-Yekta A, Gourabi H, Abd Emami B, Halfinezhad Z, Abolghasemi S, et al. Comparative assessment on the expression level of recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH) in serum-containing versus protein-free culture media. Molecular Biotechnology. 2017;59:490-8

36. Omodei U, Mazziotti G, Donarini G, Gola M, Guella V, Pagani F, et al. Effects of recombinant follicle-stimulating hormone on bone turnover markers in infertile women undergoing in vitro fertilization procedure. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2013;98(1):330-6.

37. Gomes MKO, Vieira CS, Moura MD, Manetta LA, Leite SP, Reis RM, et al. Controlled ovarian stimulation with exclusive FSH followed by stimulation with hCG alone, FSH alone or Hmg. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2007;130(1):99-106.

38. Sugimura A, Daimon K, Mihara K, Ito Y. Method for production of recombinant human FSH. Google Patents; 2011.

39. Ziegler T, Rossi M, Datola A, Fiumi S. Method for purifying FSH or a FSH mutant. Google Patents; 2013.

40. Na KH, Kim SC, Seo KS, Lee SH, Kim WB, Lee KCJJom, et al. Purification and characterization of recombinant human follicle stimulating hormone produced by Chinese hamster ovary cells. 2.٤٠٢-٣٩٥:(٢)١٥;٠٠٥

41. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T, purification. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. Protein expression. 2003;28(1):1-8.

42. Vallejo LF, Rinas UJMcf. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. 2004;3(1):1-12.

43. Wang F, Liu Y, Chen J, Su ZJCP. Chromatographic refolding of proteins: molecular action and column control. 2005;3(6):337-42.

44. Method For Purifying Fsh or A Fsh Mutant. 2)٠١٠JP6231056B2.(

45. Method for purifying FSH. patent. 2007-06-07(US7754860B2).

46. Hoffmann JA, Lu J. FSH and FSH variant formulations, products and methods. Google Patents; 2009.

47. Update RHFPDGJHR. Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. 1998;4(6):862-81.

48. Hjelm H, Hjelm K, Sjöquist JJFl. Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. 1972;28(1):73-6.

49. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low DJJoCB. Downstream processing of monoclonal antibodies—application of platform approaches. 2007;848(1):28-39.

50. Eifler N, Medaglia G, Anderka O, Laurin L, Hermans PJBp .Development of a novel affinity chromatography resin for platform purification of lambda fabs. 2014;30(6):1311-8.

51. McCue J, Kshirsagar R, Selvitelli K, Lu Q, Zhang M, Mei B, et al. Manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor VIII Fc fusion protein. 2015;43(4):213-9.

52. Winge S, Yderland L, Kannicht C, Hermans P, Adema S, Schmidt T, et al. Development, upscaling and validation of the purification process for human-cl rhFVIII (Nuwiq®), a new generation recombinant factor VIII produced in a human cell-line. 2015;115:165-75.

53. Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter GJN. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. 1989;341(6242):544-6.

54. Yoo T, Roholt O ,Pressman DJS. Specific binding activity of isolated light chains of antibodies. 1967;157(3789):707-9.

55. Dolk E, Van Der Vaart M, Lutje Hulsik D, Vriend G, de Haard H, Spinelli S, et al. Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. 2005;71(1):442-50.

56. Pleschberger M, Saerens D, Weigert S, Sleytr UB, Muyldermans S, Sára M, et al. An S-layer heavy chain camel antibody fusion protein for generation of a nanopatterned sensing layer to detect the prostate-specific antigen by surface plasmon resonance technology. 2004;15(3):664-71.

57. Revets H, De Baetselier P, Muyldermans SJEoobt. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. 2005;5(1):111-24.

58. Verheesen P, Ten Haaft M, Lindner N, Verrips C, De Haard JJBeBA-GS. Beneficial properties of single-domain antibody fragments for application in immunoaffinity purification and immuno-perfusion chromatography. 2003;1624(1-3):21-8.

59. Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LG ,et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. 2002;11(3):500-15.

60. Dumoulin M, Last AM, Desmyter A, Decanniere K, Canet D, Larsson G, et al. A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. 2003;424(6950):783-8.

61. Harmsen M, De Haard HJAm, biotechnology. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. 2007;77(1):13-22.

62. Van der Linden R, Frenken L, De Geus B, Harmsen M, Ruuls R, Stok W, et al .Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. 1999;1431(1):37-46.

63. McCue JT, Selvitelli K, Walker JJJocA. Application of a novel affinity adsorbent for the capture and purification of recombinant factor VIII compounds. 2009;1216(45):7824-30.

64. Detmers F, Mueller F, Rohde JJBI. Increasing purity and yield in biosimilar production, taking protein purification to the next level. 2013;11:36-40.

65. Kotin RMJHmg. Large-scale recombinant adeno-associated virus production. 2011;20(R1):R2-R6.

66. Smith RH, Levy JR, Kotin RMJMT. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. 2009;17(11):1888-96.

67. Ishihara T, Nakajima N, Kadoya TJJoCB. Evaluation of new affinity chromatography resins for polyclonal, oligoclonal and monoclonal antibody pharmaceuticals. 2010;878(23):2141-4.

68. Reinhart D, Weik R, Kunert RJJoim. Recombinant IgA production: single step affinity purification using camelid ligands and product characterization. 2012;378(1-2):95-101.

69. Spooner J, Keen J, Nayyar K, Birkett N, Bond N, Bannister D, et al. Evaluation of strategies to control Fab light chain dimer during mammalian expression and purification: A universal one-step process for purification of correctly assembled Fab. 2015;112(7):1472-7.

70. Wendeler M, Pabst TM, Wang J, Strouse RJ, Wang X, Hunter AKJJoCA. Process-scale purification and analytical characterization of highly gamma-carboxylated recombinant human prothrombin. 2014;1325:171-8.

71. Linke T, Aspelund MT, Thompson C, Xi G, Fulton A, Wendeler M, et al. Development and scale-up of a commercial fed batch refolding process for an anti-CD 22 two chain immunotoxin. 2014;3.۹-۱۳۸۰:(٦)۰

72. Eifler N, Medaglia G, Anderka O, Laurin L, Hermans P. Development of a novel affinity chromatography resin for platform purification of lambda fabs. Biotechnology progress. 2014;30(6):1311-8.

73. Jagschies G, Sofer GK, Hagel L. Handbook of process chromatography: development, manufacturing, validation and economics: Elsevier; 2007.

74. Soper AS, Aird SD. Elution of tightly bound solutes from concanavalin A Sepharose: Factors affecting the desorption of cottonmouth venom glycoproteins. Journal of Chromatography A. 2007;1154(1-2):308-18.

75. Abolghasemi-Dehaghani S, Gharanfoli M, Habibi-Rezaei M, Khavari-Nejad RAJJoLC, Technologies R. Enhanced recovery yield by utilizing an improved purification method for recombinant human follicle-stimulating hormone expressed in CHO cells: Applying CaptureSelect™-FSH affinity matrix. 2021:1-11.

76. Janson J-C. Protein purification: principles, high resolution methods, and applications: John Wiley & Sons; 2012.

77. Carr C. The Role of Chromatography in the Characterization and Analysis of Protein Therapeutic Drugs. LCGC; 2014.

78. Frenken LG, Van Der Linden RH, Hermans PW, Bos JW, Ruuls RC, De Geus B, et al. Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae. 2000;78(1):11-21.

79. Van de Laar T, Visser C, Holster M, López CG, Kreuning D, Sierkstra L, et al. Increased heterologous protein production by Saccharomyces cerevisiae growing on ethanol as sole carbon source. 2007;96(3):483-94.