

بررسی پایداری دمایی اینترفرون گامای نو ترکیب انسانی حاصل از میزبان اشریشیا کولی

نرگس ملک ثابت^{۱*}، محمدعلی نصیری خلیلی^۲، محمدرضا معصومیان^۳

۱- مربی بیوشیمی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکترا بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- پژوهشیار شیمی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

*تهران، صندوق پستی ۱۷۷۴-۱۵۸۷۵

Sabet53@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۰/۷/۲۰، پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۱)

چکیده - همزمان با توسعه داروهای پروتئینی نو ترکیب، توجه به مسئله پایداری پروتئین های نو ترکیب با مصرف دارویی نیز از اهمیت بسزایی برخوردار است. در این تحقیق، پایداری اینترفرون گامای نو ترکیب انسانی در بازه زمانی ۰-۹ ماه پس از تولید و در شرایط نگهداری دمایی متفاوت 4°C و 25°C بررسی شد. فعالیت بیولوژیک پروتئین و دایمر شدن کووالان، دامیداسیون و اکسیداسیون پروتئین از طریق روش های کشت سلول مبتنی بر سنجش اثر فعالیت ضد ویروسی پروتئین، آنالیز کروماتوگرافی مایع فشار بالا و الکتروفورز SDS-PAGE ارزیابی شد. نتایج بیانگر این است که فعالیت ضد ویروسی پروتئین در دمای 4°C تقریباً ثابت می ماند، اما روند کاهش فعالیت بیولوژیک با افزایش دما در 25°C ادامه می یابد. روند تشکیل فرم های دامیده - اکسیده و دایمر کووالان در دمای 25°C نسبت به 4°C طی زمان مذکور، سریع تر است. لذا نتایج نشان می دهد که اینترفرون گامای نو ترکیب تولیدی در دمای 4°C نسبت به 25°C از پایداری بیشتری برخوردار است.

کلیدواژه ها: اینترفرون گامای نو ترکیب انسانی، پایداری، دایمر کووالان، دامیده - اکسیده

۱- مقدمه

یکی از مشکلات عمده در تولید پروتئین های دارویی ایجاد فرم های هتروژن نابه جا حین فرآیند تولید است. تغییرات کوچک در ساختار شیمیایی پروتئین ها، در فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک این داروها موثر بوده و

می تواند منجر به ایجاد توده شدن^۱، هضم پروتئینی^۲، پلیمریزاسیون، کاهش فعالیت بیولوژیکی و حتی تغییرات ایمونوژنیسیته دارو شود [۱]. عواملی مانند استرس اکسیداتیو، افزایش دما و تغییر قدرت یونی در ایجاد

1. aggregation
2. proteolysis

تغییرات ساختاری و شیمیایی برگشتناپذیر مؤثرند [۱، ۲ و ۱۱].

rh-IFN- γ حاصل از میزبان E.coli شامل ۱۴۳ اسید آمینه و به فرم دایمر غیر کووالان و در انتهای آمینی متیونینه است [۳-۵]. اگرچه پایداری کم rh-IFN- γ محدودیت‌هایی را در کاربردهای بالینی آن ایجاد می‌کند، اما به علت فعالیت بیولوژیکی گسترده، به عنوان یک عامل دارویی بالقوه در بسیاری از بیماری‌ها محسوب می‌شود [۶]. این پروتئین در فرم محلول چندان پایدار نیست و تمایل به توده شدن دارد [۷].

توده‌ای شدن پروتئین یکی از فرایندهای مهم در این پروتئین است که با نگهداری در شرایط دمایی نامناسب و حتی تغییر در فرمولاسیون آن اتفاق می‌افتد. بررسی پایداری دمایی rh-IFN- γ در یک دوره زمانی ۳ ماهه در دمای ۲۰ °C، ۳۷ °C و ۵۰ °C و با شرایط بافری مختلف حاکی از روند افزایشی تغییرات توده‌ای شدن پروتئین و کاهش فعالیت بیولوژیک است که با استفاده از آنالیزهای الکتروفورز و کشت سلولی انجام شده است [۱۳]. به طور مشابه، مطالعه پایداری rh-IFN- γ ^۱ در دماهای متفاوت (۸۰، ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) با اندازه‌گیری فعالیت بیولوژیکی انجام شده و نتایج دال بر کاهش تدریجی فعالیت بیولوژیکی با افزایش دماست [۱۴]. مطالعات مشابهی در مورد انواع پروتئین‌های نو ترکیب با مصارف دارویی (rh-G-CSF، rh-IFN- β a، aFGF) در دماهای متفاوت که اغلب دمای یخچال (۲-۸ °C) و دمای آزمایشگاه (۲۵-۳۰ °C) را شامل می‌شود، به منظور تعیین الگوی تجزیه و غیر فعال شدن پروتئین، با آنالیزهای

متفاوت مانند الکتروفورز، تعیین فعالیت بیولوژیک، کروماتوگرافی مایع فشار بالا و ... به دلیل اهمیت کاربرد دارویی آن‌ها انجام گرفته است [۱۵].

هدف از این مطالعه بررسی پایداری این محصول در بازه زمانی ۰-۹ ماه پس از تولید و شرایط دمایی ۴ °C و ۲۵ °C است.

۲- مواد و روش‌ها

rh-IFN- γ تخلیص شده از میزبان E.coli سویه BL21 علیه بافر سوکسینات ۵ میلی مولار، PH= ۵، به مدت ۱۲ ساعت و دمای ۴ °C دیالیز شد. محلول پروتئینی با حجم ۲ میلی لیتر و غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تقسیم بندی شده و در دو شرایط دمایی ۴ °C و ۲۵ °C ذخیره شد و در زمان‌های ۰، ۹۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ روز پس از تولید هر بار ۳ ویال انتخاب شد و با روش‌های زیر آنالیز شدند.

الکتروفورز SDS-PAGE مطابق روش لاملی [۸] با ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد انجام شد و با استفاده از رنگ‌های کوماسی بلو و نیترات نقره رنگ آمیزی شد. غلظت پروتئین با روش برادفورد [۹] تعیین شد. سنجش فعالیت زیستی مبتنی بر کاهش اثر سیتوپاتیک (CPE) ویروس VSV^۶ روی سویه سلولی vero^۷ انجام شد، به طوری که تعداد مشخصی سلول vero با سریال رقتی از rh-IFN- γ انکوبه شدند و ۲۴ ساعت بعد سلول‌ها مطابق روش استاندارد با VSV مورد چالش قرار گرفتند و پس از ۴۸-۷۲ ساعت با MTT رنگ آمیزی شدند. پس از حل کردن بلورهای بنفش فورامازان در DMSO، جذب نمونه‌ها در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد [۱۰].

5. Cytophatic effect

6. Vesicular Stomatitis Virus

7. African green monkey kidney

1. recombinant bovine interferon gamma

2. acidic fibroblast growth factor

3. recombinant human interferon beta type a

4. recombinant human granulocyte colony stimulating factor

۳- یافته‌ها

میزان دایمر کووالان هم با روش SDS-PAGE در حضور عامل احیاکننده ۲- مرکاپتواتانول و هم روش کروماتوگرافی غربالی انجام شد. نتایج حاکی از آن است از زمان صفر تا ۳۰ روز هیچ‌گونه فرم دایمر کووالان در دو دمای 4°C و 25°C مشاهده نمی‌شود و پروتئین از خلوص بالایی برخوردار است، ولی از ۶۰ روز به بعد میزان دایمر کووالان در هر دو دما رو به افزایش است؛ با این تفاوت که روند افزایشی فرم دایمر کووالان در دمای 25°C به مراتب سریع‌تر از دمای 4°C است (شکل ۲ و ۳).

دایمر کووالان با روش کروماتوگرافی غربالی، با استفاده از

ستون Ultropak TSK G3000SW LKB column

(10,000– 300,000 Dalton, $7.5 \times 300 \text{ mm}$),

آنالیز شد.

فاز حامل بافر فسفات ۲۰ میلی مولار، $\text{pH}=8/6$ شامل

۱ درصد SDS است. سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه

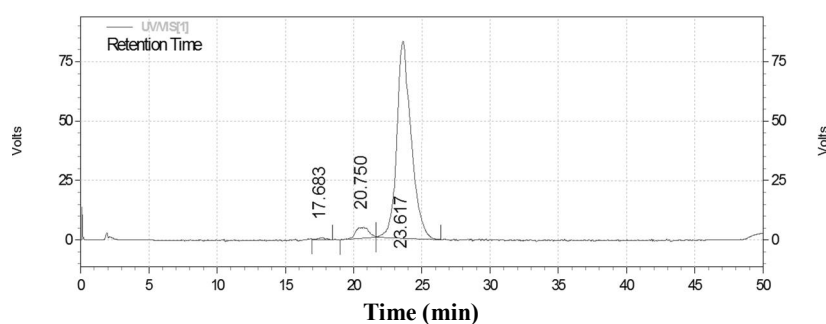
و جذب در ۲۱۴ نانومتر قرائت شد. اشکال دآمیده و

اکسیده پروتئین با روش کروماتوگرافی تعویض کاتیونی^۱

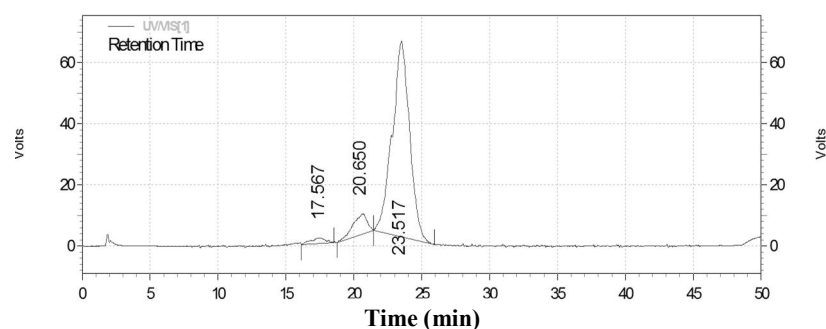
آنالیز شد. ستون تعویض کاتیونی (IEC sp-825,

Shodex $8 \times 75 \text{ mm}$) در یک سیستم کروماتوگرافی

مایع فشار بالا (HPLC) استفاده شد.



الف

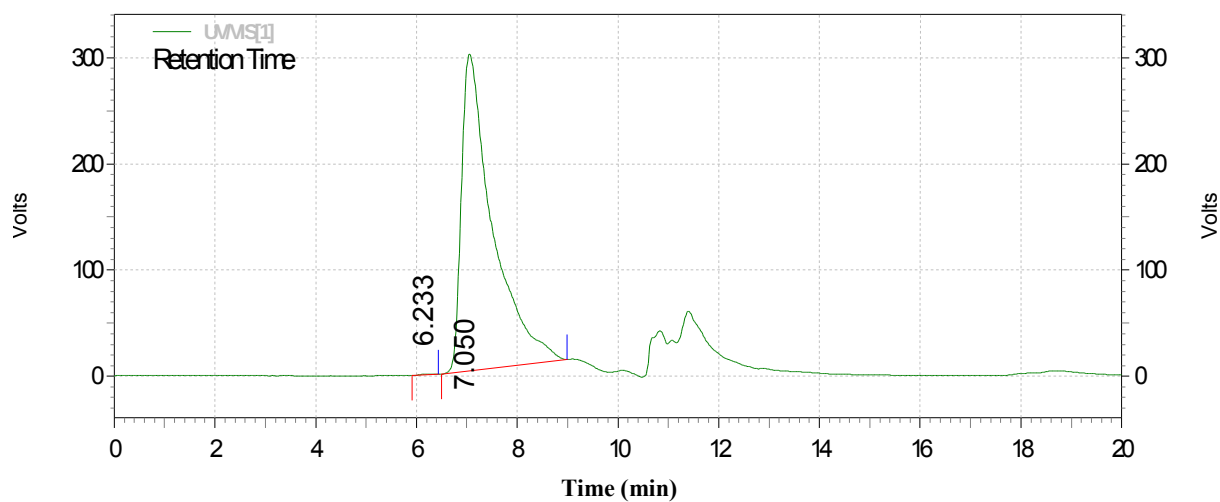


ب

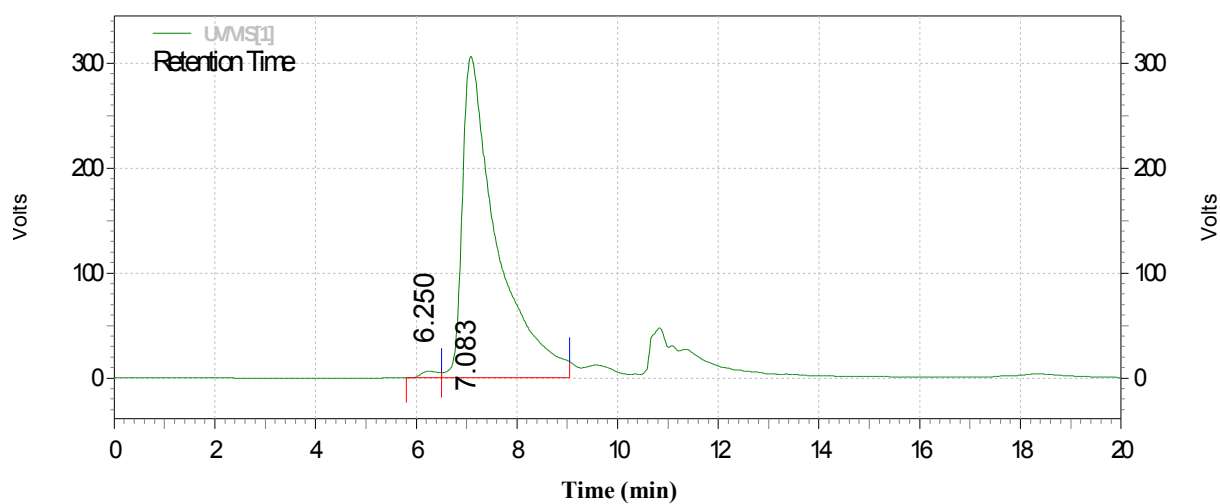
شکل ۱ الف) نمودار HPLC دآمیده-اکسیده γ -rhIFN دمای 4°C پس از ۹ ماه، ب) نمودار HPLC فرم دآمیده-اکسیده

γ -rhIFN دمای 25°C پس از ۹ ماه

1. Cation- exchange chromatography



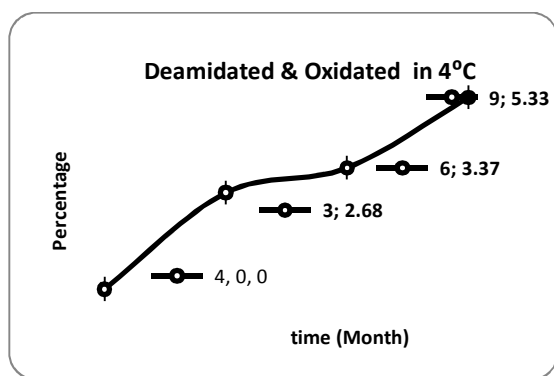
الف



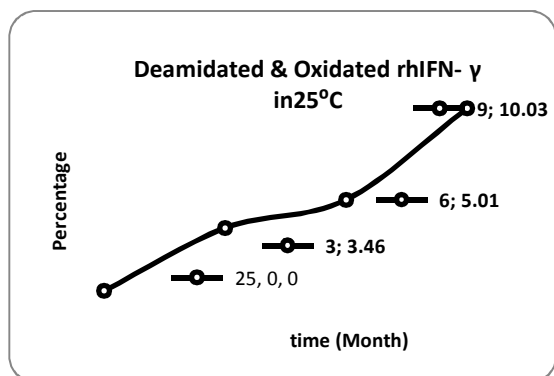
ب

شکل ۲ الف) نمودار HPLC دایمر کووالان γ -IFN-rh در دمای 4°C پس از ۹ ماه، ب) نمودار HPLC دایمر کووالان γ -IFN-rh در دمای 25°C پس از ۹ ماه

پروتئین از خلوص بالایی برخوردار است، اما پس از چهار ماه ذخیره‌سازی در دمای 4°C این میزان به $2/68$ درصد می‌رسد، در حالی که در دمای 25°C به $3/46$ درصد افزایش می‌یابد. مطابق شکل ۴، روند افزایش فرم‌های دآمیده-اکسیده طی ۹ ماه ذخیره در دماهای مورد مطالعه مقایسه شده است که این میزان به ترتیب در دو دمای 4°C و 25°C در ماه ۹ به $5/33$ درصد و $10/03$ درصد افزایش می‌یابد.

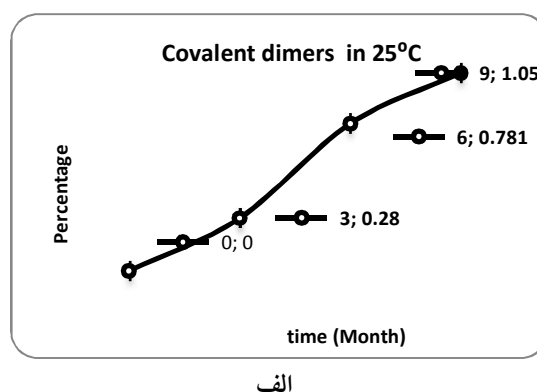


الف

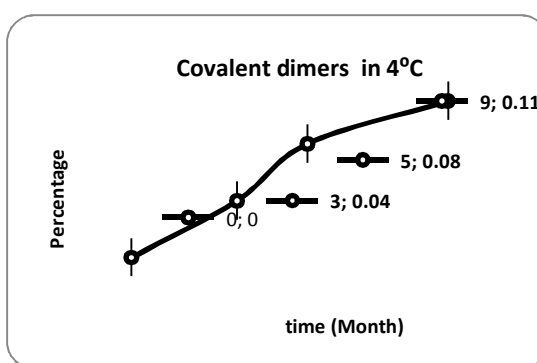


ب

شکل ۴ الف) روند افزایشی فرم دآمیده-اکسیده rh-IFN- γ در دمای 4°C ، ب) روند افزایشی فرم دآمیده-اکسیده rh-IFN- γ در دمای 25°C



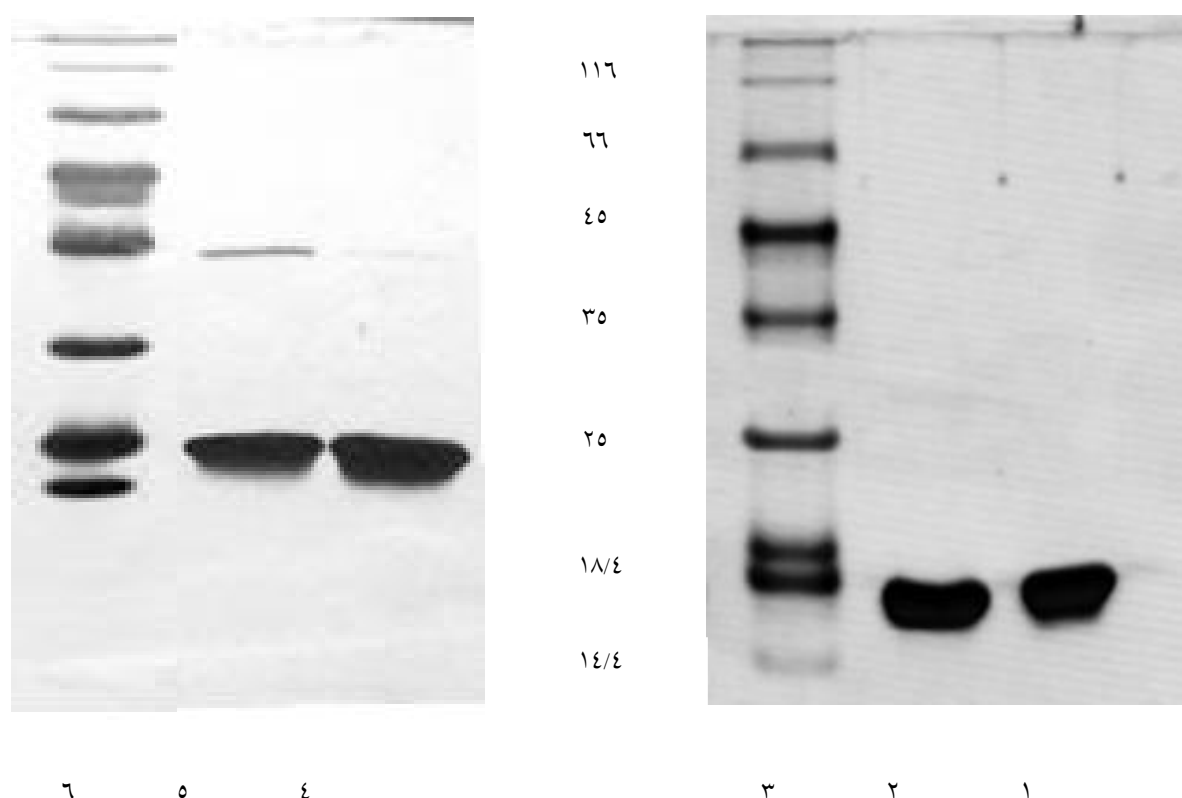
الف



ب

شکل ۳ الف) روند افزایشی دایمر کووالان rh-IFN- γ در دمای 25°C ، ب) روند افزایشی دایمر کووالان rh-IFN- γ در دمای 4°C

در تایید این بررسی، نتایج SDS-PAGE در شکل ۵ باند مشخصی را در محدوده وزن مولکولی ۳۰ KD نشان می‌دهد که به عنوان فرم دایمر پروتئین در نظر گرفته می‌شود و پس از گذشت زمان ۹ ماه ذخیره در دمای 4°C به تدریج میزان آن افزایش می‌یابد. از آنالیز اشکال دآمیده-اکسیده، با توجه به شکل ۱، اینگونه استنتاج می‌شود که فرم‌های تغییر یافته پروتئین زمان‌های شستشوی متفاوتی دارند و پیک اصلی مربوط به پروتئین طبیعی است. مطابق شکل ۴، در زمان صفر،



شکل ۵ نتایج الکتروفورز: ۱- rh-IFN- γ در دمای ۴°C زمان صفر، ۲- rh-IFN- γ در دمای ۲۵°C زمان صفر، ۳- مارکر وزن مولکولی (۱۱۶-۱۴/۴) KD، ۴- rh-IFN- γ در دمای ۴°C زمان ۹ ماه، ۵- rh-IFN- γ در دمای ۲۵°C زمان ۹ ماه، ۶- مارکر وزن مولکولی (۱۱۶-۱۴/۴) KD

جدول ۱ درصد تغییرات ساختاری پروتئین در فاصله زمانی ۰-۹ ماه پس از تولید

زمان (ماه)	۳	۵	۶	۹
میانگین درصد دایمر کووالان (۴°C)	۰/۰۴±۰/۰۱	۰/۰۸±۰/۰۲	—	۰/۱۱±۰/۰۱
میانگین درصد دایمر کووالان (۲۵°C)	۰/۲۸±۰/۰۲	—	۰/۷۸±۰/۰۵	۱/۰۵±۰/۰۸
میانگین درصد دامیده و اکسیده (۴°C)	۲/۶۸±۰/۳۶	—	۳/۳۷±۰/۴۳	۵/۳۳±۰/۲۲
میانگین درصد دامیده و اکسیده (۲۵°C)	۳/۴۶±۰/۶۴	—	۵/۰۱±۰/۲۸	۱۰/۰۳±۰/۲۷

نتایج سنجش فعالیت زیستی در جدول ۱ نشان می‌دهد که در بازه زمانی مورد مطالعه در دمای 4°C با گذشت زمان، همراه با افزایش درصد فرم‌های تغییر یافته $\text{rh-IFN-}\gamma$ ، فعالیت بیولوژیکی پروتئین کاهش چشمگیری ندارد، ولی در دمای 25°C فعالیت بیولوژیک، پس از ۹ ماه، تقریباً $11/6$ درصد کاهش نشان می‌دهد (مطابق جدول ۲).

جدول ۲ مقایسه فعالیت بیولوژیک $\text{rh-IFN-}\gamma$ (IU/mg)

زمان (ماه)	۰	۹
$\text{rh-IFN-}\gamma$ (4°C)	$1/96 \times 10^7 \pm 0/02$	$1/96 \times 10^7 \pm 0/01$
$\text{rh-IFN-}\gamma$ (25°C)	$1/98 \times 10^7 \pm 0/002$	$1/75 \times 10^7 \pm 0/3$

۴- بحث و نتیجه‌گیری

بدیهی است که فعالیت بیولوژیکی پروتئین، تحت انواع تغییرات ساختاری یا فیزیکی‌شیمیایی پروتئین، دستخوش تغییر می‌شود. فرایند اکسیداسیون و دامیداسیون به‌عنوان رایج‌ترین تغییرات پس از ترجمه‌ای پروتئین‌ها و پپتیدهای نوترکیب مطرح است که می‌تواند در هر یک از مراحل پروسه تولید اعم از استخراج، تخلیص، پرکردن و یا ذخیره پروتئین اتفاق بیافتد. همان‌گونه که نتایج این بررسی نشان می‌دهد، تشکیل دایمر کووالان و ایجاد اشکال دامیده-اکسیده حین ذخیره‌سازی، یکی از مشکلات اصلی در تولید $\text{rh-IFN-}\gamma$ است. در این مطالعه، مشخص شد که اشکال تغییر یافته پروتئین در نمونه‌ها (4°C و 25°C) هنگام تولید، صفر است و فعالیت بیولوژیکی پروتئین بالاست ($1/96 \times 10^7$ IU/mg)، اما پس از ۹ ماه ذخیره‌سازی میزان دایمر کووالان به ترتیب در دو دمای 4°C و 25°C به $0/11$ و $1/05$ درصد و میزان

فرم‌های دامیده-اکسیده به‌ترتیب در دو دمای 4°C و 25°C به $5/33\%$ و $10/03\%$ افزایش می‌یابد، حال آنکه فعالیت بیولوژیکی بدون تغییر چشمگیر در دمای 4°C و در دمای 25°C دچار افت می‌شود. از این شواهد دو نکته قابل ملاحظه است: اولاً با افزایش دما از 4°C به 25°C ناپایداری پروتئین افزایش می‌یابد؛ ثانیاً با توجه به اینکه، مطابق با استاندارد فارماکوپه، مقدار دایمر کووالان و اشکال دامیده-اکسیده $\text{rhIFN-}\gamma$ حاصل از *E. coli* باید به ترتیب کمتر از ۲ درصد و ۱۰ درصد باشد [۱۲]، لذا به‌نظر می‌رسد پایداری در دمای 25°C درجه بیش از نه ماه قابل قبول نخواهد بود، ولی زمان بیشتری برای پایداری نمونه در دمای 4°C درجه متصور است. همچنین، استنباط می‌شود، با توجه به اکسیداسیون پروتئین حین ذخیره‌سازی می‌توان به اثر اکسیژن حین پرکردن محصول پرداخت تا بتوان آن را با کیفیت بالاتری، از لحاظ خلوص، در زمان طولانی‌تری نگهداری کرد که در تحقیقات بعدی می‌تواند مورد نظر قرار بگیرد.

۵- مراجع

- [1] Nail, S. L. and Akers, M. J., (2002) *Development and manufacture of protein pharmaceuticals*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp30-39.
- [2] Bummer, P. M. and Koppenol, S., (2000) *Protein Formulation and Delivery*, In: McNally, E. J., ed. Marcel Dekker, New York. 99: p 15-28.
- [3] Farrar, A. M. Schreiber, R. D., (1993) "The molecular cell biology of

- [8] Laemmli, U. K., (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227, 680–685.
- [9] Bradford, M. M., (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein dye-binding", *Anal Biochem*, 72, 248–254
- [10] Yousefi, S., Escobar, M. and Gouldin, C. W. (1985) "A practical cytopathic effect/dye uptake interferon assay for routine use in the clinical laboratory", *Am J Clin Pathol*, 83, 735–740
- [11] Mohammadian-Mosaabadi, J., Naderi-Manesh, H., Maghsoudi, N., Khalilzadeh, R., Shojaosadati, S. A. and Ebrahimi, M., (2005) "Effect of oxidative stress on the production of recombinant human interferon- γ in *Escherichia coli*", *Biotechnol. Appl. Biochem.* 41, 37–42.
- [12] *British Pharmacopoeia*. 2007
- [13] Bumelis, V. A., Bumeliene, Z., Sereikaite, J. and Medelyte, I. (2003) "Analysis of the homogeneity and biological activity of recombinant human interferon gamma", *Biologija*, 2, 51-53
- [14] Xu, Q., Nomura, T., Ikeda, M., Ohta, M., Kameyama, K., Konishi, M., Wu, D. and Inumura, S., (2011) "Stability interferon- γ and its receptor", *Annu RevImmunol*, 11, 571–611.
- [4] Zhang, Z. Tong, K. T., Belew, M., Petterson, T., Janson, J.C., (1992) "Production, purification and characterization of recombinant human interferon- γ ", *J Chromatogr.* 604,143–155.
- [5] Khalilzadeh, R., Shojaosadati, S. A., Maghsoudi, N., Mohammadian-Mosaabadi, J., Mohammadi, M. R., Bahrami, A., Maleksabet, N., Nassiri-Khalilli, M. A., Ebrahimi, M. and Naderimanesh, H., (2004) "Process development for production of recombinant human interferon- γ expressed in *Escherichia coli*", *J Ind Microbiol Biotechnol*, 31, 63–69.
- [6] Bumelis, V. A., Bumeliene, Z., Gedminiene, G., Smirnovas, V., Sereikaite, J., Medelyte, I., (2002) "Investigation of thermal stability of recombinant human interferon-gamma", *Biologija*, 2, 37-41.
- [7] Kendrick, B. S., Cleland, J. L., Lam, X., Nguyen, T., Randolph, T. W., Manning, M. C. and Carpenter, J. F. (1998) "Aggregation of recombinant human interferon gamma: kinetics and structural transition", *J Pharmaceutic Sci.* 87, 1069-1076.

- [15] Pearlman, R. and John Wang, Y., (1996) Formulation, Characterization and Stability of protein Drugs, Plenum Press, New York, pp 208-210, 295-298, 323-326
- of recombinant bovine interferon- γ antiviral activity in the absence of stabilizing additives", *Microbiol Immunol*, 55, 595-8