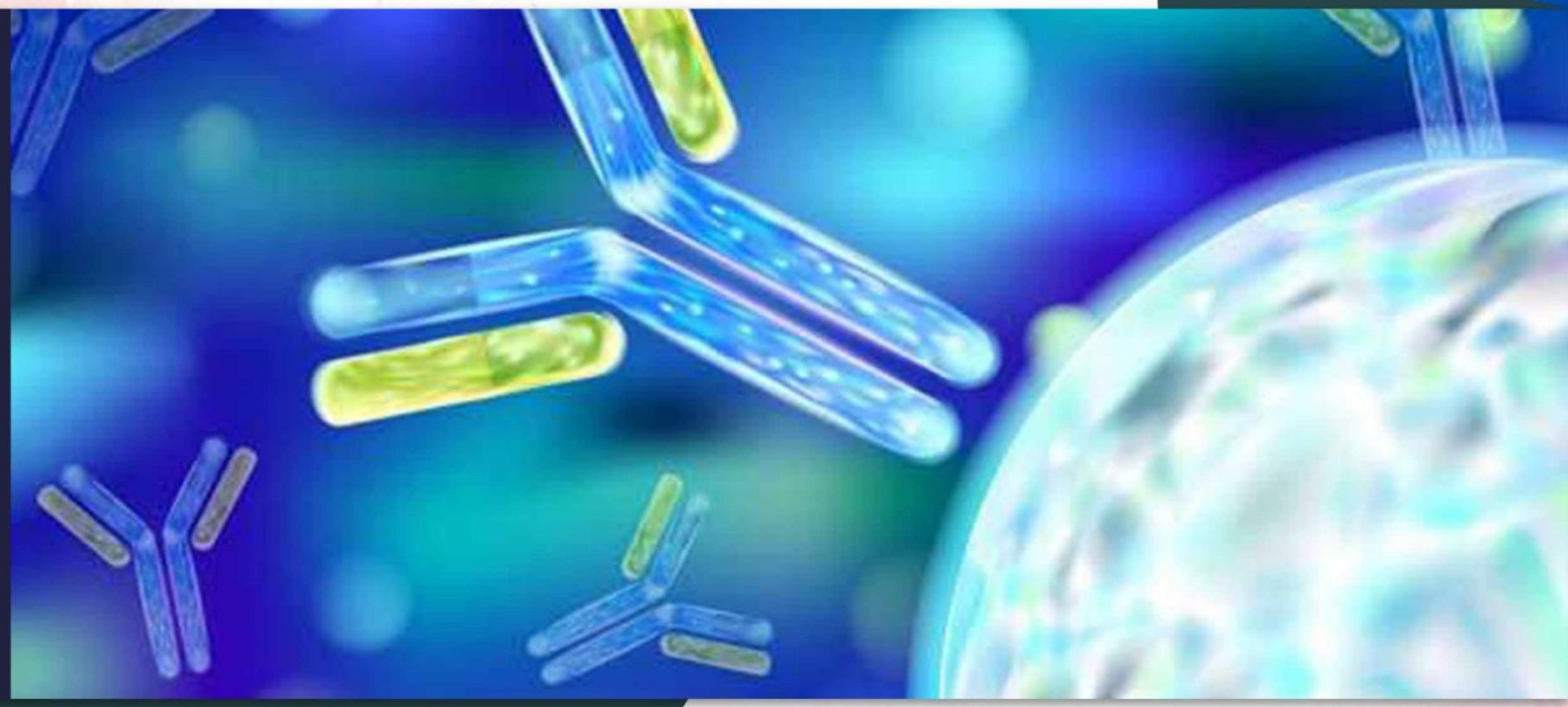
با حمایت صندوق نوآوری و شکوفایی و به سفارش یک شرکت دانش بنیان منتشر می شود :

ریاست جمهوری
صندوق نوآوری و شکوفایی

۱۸۶

فراخوان

طراحی و بیان پروتئین A نوترکیب مولتی‌مری و ارزیابی قابلیت آن در تخلیص آنتی‌بادی‌های کلاس IgG



مهلت ارسال پروپوزال‌ها: ۱۴۰۳/۰۱/۱۵

پروتئین A باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به‌دلیل توانایی اتصال به مولکول‌های IgG یکی از شناخته‌شده‌ترین پروتئین‌های دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت است و به همین واسطه به عنوان ابزاری در تشخیص و تخلیص آنتی‌بادی‌ها کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده است؛ به‌نحوی که این مولکول به یکی از پرکاربردترین سیستم‌های تخلیص تمایلی تبدیل شده است. در تخلیص آنتی‌بادی‌ها از رزین‌های مختلفی استفاده می‌شود. عموماً شستشوی این نوع رزین‌ها تحت شرایط اسیدی یا قلیایی قوی انجام می‌شود. مطالعات نشان داده است که با تکرار این چرخه در طول زمان، مقدار قابل توجهی از ظرفیت اتصال ماتریکس به لیگاند پروتئینی کاهش می‌یابد که می‌تواند هزینه فرآیند تخلیص را بسیار افزایش دهد.

در این طرح، دستیابی به دانش‌فنی ساخت و تولید رزین بر پایه پروتئین A نوترکیب به نحوی که از نظر عملکردی قابل مقایسه با رزین وارداتی موجود و از نظر هزینه مقرون به صرفه باشد، مدنظر می‌باشد. میزان بیان پروتیئن حداقل ۲ g/L، خلوص بالای ۹۰٪ پروتئین A تولیدشده و میزان ریکاوری بالای ۸۰٪ برای اتصال پروتئین A به رزین آگارز فعال‌شده مورد انتظار است. همچنین بیان پروتئین بایستی به‌صورت محلول بوده و پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده در حداقل ۱۵ سیکل به اسید و قلیا مقاوم باشد.

- شرکت در این فراخوان تحقیقاتی و ارائه پروپوزال در قالب انفرادی، گروهی، شرکتی و سازمانی مجاز است
- پروپوزالی که بیشترین تناسب را با الزامات این نیاز تحقیقاتی داشته باشد انتخاب و به عنوان مجری به شرکت دانش‌بنیان معرفی خواهد شد

ارسال پروپوزال ها از طریق سامانه غزال به نشانی: ghazal.inif.ir

ارتباط با کارگزاری داناشریف: ۰۲۱-۸۸۴۸۶۴۹۸

دانا شریف
DANA SHARIF

باسمه‌تعالی

صندوق نوآوری و شکوفایی به‌منظور تقویت توان توسعه فناوری شرکت‌های دانش‌بنیان با رویکرد نوآوری باز و همکاری فناورانه، خدمت جدیدی را طراحی و عرضه کرده است که در قالب آن، نیازهای تحقیقاتی و فناورانه شرکت‌ها و شتاب‌دهنده‌های دانش‌بنیان و متعاقباً، گروه‌های پژوهشی و فناور توانمند برای اجرای طرح‌های تحقیقاتی و توسعه فناوری‌های موردنیاز این شرکت‌ها و شتاب‌دهنده‌ها را شناسایی می‌نماید.

آنچه پیش‌رو دارید، نیاز تحقیقاتی/فناورانه یکی از شرکت‌های دانش‌بنیان متقاضی است که توسط صندوق نوآوری و شکوفایی شناسایی و در قالب فراخوان منتشرشده است. لطفاً به موارد زیر توجه فرمایید:

۱) شرکت در این فراخوان تحقیقاتی و ارائه پروپوزال در قالب انفرادی، گروهی، شرکتی یا سازمانی مجاز است. همه پژوهشگران، دانشجویان، دانش‌آموختگان و اعضای هیئت‌علمی دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی، شرکت‌های دانش‌بنیان و فناور و سایر علاقه‌مندان می‌توانند با تدوین و ارسال پروپوزال در این فراخوان شرکت کنند.

۲) پروپوزال‌ها صرفاً باید در چارچوب تدوین‌شده صندوق نوآوری و شکوفایی و **حداکثر تا تاریخ ۱۴۰۳/۰۱/۱۵** در قالب فایل word در سامانه غزال به آدرس ghazal.inif.ir ارسال شوند. پروپوزال‌هایی که در چارچوبی غیرازآن، یا به روش‌های دیگر به دست صندوق برسند، وارد فرایند ارزیابی نخواهند شد.

۳) پس از اتمام مهلت ارسال پروپوزال‌ها، فرایند ارزیابی آن‌ها توسط صندوق نوآوری و شکوفایی آغاز خواهد شد. پروپوزالی که بیشترین تناسب را با الزامات این نیاز تحقیقاتی داشته باشد، انتخاب و به‌عنوان «مجری» برای مذاکرات تکمیلی به شرکت دانش‌بنیان متقاضی معرفی خواهد شد.

۴) در صورت توافق پروپوزال‌دهنده منتخب (مجری تحقیق) و شرکت دانش‌بنیان (متقاضی تحقیق)، قرارداد ۳ جانبه‌ای مابین «صندوق»، «متقاضی» و «مجری» منعقد خواهد شد. در قالب این قرارداد، صندوق نوآوری تا ۷۰ درصد هزینه اجرای طرح تحقیقاتی را به شکل بلاعوض به متقاضی خواهد پرداخت تا به‌طور مرحله‌ای و متناسب با پیشرفت اجرای طرح، در اختیار مجری قرار گیرد.

۵) گرچه در این فراخوان، گام‌های کلی برای اجرای تحقیق موردنظر پیش‌بینی و معرفی‌شده است، اما پیشنهاددهندگان می‌توانند افزون بر برنامه معرفی‌شده، از هر روش یا فناوری دلخواه و در قالب یک برنامه تحقیقاتی متفاوت برای حل این مسئله تحقیقاتی و دستیابی به اهداف آن استفاده کنند.

۶) درصورت عضویت تیم منتخب در بنیاد ملی نخبگان تهران، طرح مشمول حمایت مجزا از این نهاد نیز خواهد شد.

۷) تدوین و ارسال پروپوزال در قالب این فراخوان، به‌منزله بهره‌مندی از حمایت‌های صندوق نوآوری و شکوفایی نخواهد بود و برای فرستنده حقی ایجاد نمی‌کند. صندوق نوآوری و شکوفایی خود را ملزم به رعایت محرمانگی دانسته و مفاد کلیه طرح‌های ارسالی محرمانه نزد صندوق باقی خواهد ماند.

۸) هرگونه سؤال یا ابهام در خصوص این فرایند را با شرکت سامان صدرای داناشریف به‌عنوان کارگزار صندوق در میان بگذارید. (شماره تماس: ۸۸۴۸۶۴۹۸-۰۲۱)

درباره شرکت متقاضی

این شرکت دانش‌بنیان در زمینه تحقیق و توسعه دانش‌فنی، تولید و فروش محصولات بیولوژیکی و شیمیایی با منشاء بیولوژیک فعالیت می‌نماید. در کنار این فعالیت‌ها، با توجه به فقدان تولیدکننده داخلی در خصوص تولید موفق و کارآمد رزین‌های کروماتوگرافی تمایلی (Affinity) بر پایه پروتئین‌های نوترکیب و با در نظر گرفتن تحریم‌های موجود، این شرکت در نظر دارد با تولید نمونه داخلی رزین تمایلی بر پایه پروتئین A، نقشی در کاهش هزینه‌های تولید و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب از جمله آنتی‌بادی‌ها در شرکت‌های دارویی داشته باشد.

ضرورت مسئله

در تخلیص آنتی‌بادی‌ها از رزین‌های مختلفی استفاده می‌شود که از جمله آن می‌توان به AF-rProtein A HC-650F، KanCap A، MabSelect Sure و MabSelect Sure LX اشاره نمود. در طی فرآیند کروماتوگرافی، عموماً شستشوی این نوع رزین‌ها تحت شرایط اسیدی یا قلیایی قوی انجام می‌شود. مطالعات نشان داده است که با تکرار این چرخه در طول زمان، مقدار قابل توجهی از ظرفیت اتصال ماتریکس به لیگاند پروتئینی کاهش می‌یابد که می‌تواند هزینه فرآیند تخلیص را بسیار افزایش دهد؛ بنابراین بایستی شرایطی ایجاد گردد که لیگاند پروتئین A برای مدت زمان بیشتری به ماتریکس جامد متصل باقی بماند. با ارزیابی عملکرد رزین MabSelect SuRe LX (رزین پروتئین A مقاوم به قلیا) که برای جداسازی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال عموماً در بیش از ۱۰۰ سیکل تخلیص استفاده می‌شود، ظرفیت اتصال پویا حفظ شده و بازده تخلیص در طول پالایش و تراکم لیگاند نیز بدون تغییر باقی می‌ماند. بعلاوه، میزان پروتئین A جداشده از ستون و ناخالصی‌های پروتئینی سلول میزبان نیز تقریباً ثابت می‌ماند. مطالعات بیشتر با استفاده از غلظت‌های بالاتر هیدروکسید سدیم نیز نتایج قابل قبولی را نشان داده است. این داده‌ها نشان می‌دهد که رزین MabSelect SuRe LX را می‌توان بارها و بارها در طول فرآیند تخلیص در شرکت‌های تولیدی استفاده نمود. این مطالعات نشان می‌دهد که پروتئین A به کار رفته در رزین MabSelect SuRe LX بسیار پایدار است و در برابر شستشوهای مکرر، به‌طور مؤثری مقاومت می‌کند. با توجه به نیاز شرکت‌های تولیدکننده آنتی‌بادی‌های مونوکلونال درمانی و نیز شرکت‌های فعال در زمینه محصولات پلاسمایی به استفاده از رزین فوق و با عنایت به قیمت بالای نمونه وارداتی آن و مدت زمان طولانی از زمان ثبت سفارش تا دریافت رزین سفارش داده شده، به نظر می‌رسد که تولید آن در داخل کشور علاوه بر صرفه جویی زیاد ارزی، می‌تواند برای شرکت تولیدکننده آن سود مناسبی نیز داشته باشد.

مسئله اصلی تحقیق

(نیاز تحقیقاتی)

«طراحی و بیان پروتئین A نوترکیب مولتی‌مری و ارزیابی قابلیت آن در تخلیص آنتی‌بادی‌های کلاس IgG»

مشروح مسئله تحقیقاتی

پروتئین A باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به واسطه توانایی در برقراری پیوند با طیف وسیعی از IgGها از گونه‌های مختلف پستانداران، یکی از شناخته شده‌ترین پروتئین‌های دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت است و به همین واسطه به عنوان ابزاری در تشخیص و تخلیص آنتی‌بادی‌ها کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده و به یکی از پرکاربردترین سیستم‌های تخلیص تمایلی تبدیل شده است. در تخلیص آنتی‌بادی‌ها از رزین‌های مختلفی استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به AF-rProtein A HC-650F، KanCap A، MabSelect Sure و MabSelect Sure LX اشاره نمود.

کارخانه سازنده	نام تجاری
GE Healthcare	MabSelect SuRe
Tosoh	ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F
Mitsubishi Chemical Corporation	MabSpeed rP202
Kaneka	KanCap Pre-packaged Column
JSR Life Sciences	Amsphere A3
Merck Millipore	MiniChrom Column Eshmuno A

با تولید نسل جدید آنتی‌بادی‌ها (آنتی‌بادی‌های مونوکلونال)، می‌توان در درمان بیماری‌ها گام‌های مؤثری برداشت. از این جهت، در صنعت داروسازی نیاز به انواع رزین‌های کروماتوگرافی مناسب، جهت تخلیص این مولکول‌های درمانی روزبه‌روز بیشتر احساس می‌شود. با توجه به عدم تولید داخلی این رزین‌ها و با در نظر گرفتن تحریم‌های موجود، به نظر می‌رسد که تولید نمونه داخلی آن‌ها می‌تواند نقش به‌سزایی در کاهش هزینه‌ها در تولید و تخلیص آنتی‌بادی‌ها داشته باشد.

در ارزیابی عملکرد رزین MabSelect SuRe LX مشخص گردیده است که تمیزکردن در محل (CIP) آن با هیدروکسید سدیم علاوه بر حفظ ظرفیت اتصال پویا و بازده تخلیص در طی پالایش، باعث عدم تغییر تراکم لیگاند شده و میزان پروتئین A جداشده از ستون و میزان ناخالصی‌های پروتئینی ناشی از سلول میزبان نیز تقریباً ثابت می‌ماند. مطالعات بیشتر با استفاده از غلظت‌های بالاتر هیدروکسید سدیم نیز نتایج قابل قبولی را نشان داده است. این داده‌ها نشان می‌دهد که این رزین را می‌توان بارها و بارها در طول

فرآیند تخلیص استفاده نمود. مطالعه‌ای که بر روی طول عمر رزین‌های مورد استفاده در تخلیص آنتی‌بادی‌ها انجام شده نشان می‌دهد که در استفاده از رزین MabSelect SuRe LX، ظرفیت اتصال پویا و همچنین بازده ستون در بالاتر از ۱۰۰ سیکل تخلیص پایدار باقی می‌ماند. نکته قابل توجه این است که مقدار پروتئین A جداشده از بستر و پروتئین‌های سلول میزبان در تمام این ۱۰۰ سیکل بسیار کم بوده که نشان‌دهنده اتصال بسیار پایدار پروتئین A به این رزین است که در برابر شستشوهای مکرر با هیدروکسید سدیم، به‌عنوان عامل تمیزکننده در فرایندCIP، به‌طور مؤثری مقاومت می‌کند. مطالعه سنجش پایداری قلیایی نیز نشان داده است که ظرفیت اتصال پویای رزین MabSelect SuRe LX در ۳۰۰ سیکل با استفاده از هیدروکسید سدیم نسبتاً پایدار است.

گام‌های تحقیق

- طراحی سازه با روش‌های بیوانفورماتیکی
- سنتز سازه بیانی
- تأمین مواد اولیه مورد نیاز و تجهیزات لازم
- بیان پروتئین نوترکیب در فاز آزمایشگاهی و بهینه‌سازی آن
- تخلیص Protein A در فاز آزمایشگاهی و بهینه‌سازی آن
- بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب در فاز پایلوت و بهینه‌سازی فرآیندها
- کونژوگاسیون پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده به رزین
- ارزیابی رزین تولیدشده
- ارزیابی کلیه فرآیندها به صورت سه بار تکرار
- دریافت تأییدیه از شرکت‌های مایل به تست رزین طراحی شده
- تهیه مستندات، ارائه گزارش نهایی

خروجی‌های مورد انتظار تحقیق

- بیان پروتئین A به میزان حداقل ۲g/L
- خلوص بالای پروتئین A تولیدشده (خلوص بالای ۹۰٪)
- بیان پروتئین بایستی به صورت محلول و نه inclusion body باشد.
- میزان ریکاوری اتصال پروتئین A به رزین آگارز فعال شده بالای ۸۰٪ باشد.
- مقاومت پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده و متصل‌شده به رزین به اسید و قلیا در طی ران‌های متوالی (حداقل ۱۵ سیکل) باشد.

- میزان ریکاوری (درجه خلوص) آنتی‌بادی یا Fc-fusion هدف از ستون طراحی‌شده بالای ۸۵٪ باشد.
- قابلیت قیاس رزین تولیدشده از نظر ویژگی‌های زیر با رزین Mabselect sure LX تجاری ساخت شرکت Cytiva:

معیار	محدوده پذیرش
ماتریکس	آگارز
قابلیت اتصال دینامیک (DBC)	حدوداً ۶۰mg/ml resin
محدوده pH فعالیت	۳-۱۲
پایداری شیمیایی	پایدار در بافرهای آبی مورد استفاده در کروماتوگرافی برپایه پروتئین A

الزامات تحقیق

- طراحی ساختار پروتئین A بایستی مشابه با فرم تجاری MabSellect Sure LX باشد به نحوی‌که مقاومت به فرایند CIP در شرایط NaOH غلیظ و استفاده از اسید طبق مشخصات ذکرشده در قسمت‌های بعدی را داشته باشد.
- استفاده از تگ جهت تخلیص پروتئین بلامانع است تا تخلیص پروتئین A مقرون به صرفه باشد. ترجیحاً تگ هیستیدینی استفاده شود. البته پس از انجام بررسی‌های بیوانفورماتیکی، کمترین اثر را بر اتصال پروتئین A به رزین و مولکول آنتی‌بادی داشته باشد.
- ارائه گزارش عملیاتی اجرای پروژه شامل کلیه فرآیندهای انجام‌شده اعم از نوع و میزان مواد استفاده شده، زمان انجام مراحل، نحوه اجرای فرآیندها و راندمان آن‌ها، نتایج مربوط به کنترل خلوص پروتئین، روش‌های بهینه‌سازی، پارامترهای کلیدی موثر بر فرآیند، بایدها و نبایدهای اجرایی، تمامی دستورالعمل‌ها در شرایط بهینه، نتایج مربوط به آنالیزهای انجام شده و تفسیر آن‌ها

گلوگاه‌های احتمالی

- میزان بیان کم پروتئین A نوترکیب در سلول *E coli* که بایستی بهینه‌سازی گردد.
- دشواری‌های احتمالی در تخلیص پروتئین نوترکیب که بایستی بر آن غلبه نمود.
- بروز مشکلات احتمالی در اتصال پروتئین نوترکیب به رزین که بایستی مسلط به روش‌های جایگزینی بود.
- کاهش ظرفیت اتصال رزین طراحی‌شده به آنتی بادی‌های هدف در مقایسه با رزین تجاری که بایستی مسلط به روش‌های حل مشکل بود.

زیرساخت‌ها و تجهیزاتی که متقاضی می‌تواند در اختیار مجری قرار دهد

تمامی تجهیزات موردنیاز برای R&D محصولات بیوتکنولوژی به‌صورت خدماتی در شتابدهنده‌های همکار در اختیار مجری خواهد بود. از جمله این تجهیزات می‌توان به اتاق کشت میکروبی، هود، فرمانتور، سانتریفوژ با حجم بالا، دستگاه FPLC برای تخلیص پروتئین‌ها، HPLC برای بررسی‌های کنترل کیفی محصولات و ... اشاره نمود.

معیارهای ارزیابی و انتخاب مجری

- سابقه فعالیت در مراکز تحقیقاتی و پژوهشی معتبر
- تیم متخصص در زمینه رشته‌های بیوتکنولوژی پزشکی/میکروبی، مهندسی ژنتیک، شیمی در مقیاس آزمایشگاهی و نیمه‌صنعتی
- آزمایشگاه تحقیقاتی مجهز به تجهیزات مورد تأیید شرکت
- قابلیت انجام کار تیمی و مشارکتی و مدیریت زمان
- دارا بودن امکانات و تجهیزات موردنیاز جهت انجام پروژه

تسهیم مالکیت فکری

- **مالکیت معنوی**: مجری در مالکیت معنوی ناشی از اجرای تحقیق سهیم خواهد بود و انتشار مقاله مشترک توسط مجری و متقاضی در ژورنال‌های داخلی و خارجی، ارائه مقاله در کنفرانس‌ها و سمینارها با موافقت و اشاره به نام همه دست‌اندرکاران مجاز خواهد بود.
- **مالکیت منافع مادی**: با توجه به مدل کسب‌وکار شرکت متقاضی، منافع مالی ناشی از توسعه این فناوری تماماً متعلق به شرکت متقاضی بوده و مجری صرفاً حق‌الزحمه اجرای پروژه تحقیقاتی را دریافت خواهد کرد.

ارسال پروپوزال

پروپوزال‌ها صرفاً باید در چارچوب موردنظر صندوق نوآوری و شکوفایی، تدوین و حداکثر تا **تاریخ** **۱۴۰۳/۰۱/۱۵** در سامانه غزال صندوق نوآوری و شکوفایی به نشانی ghazal.inif.ir ثبت شوند. پروپوزال‌هایی که در چارچوبی غیرازآن، یا به روش‌های دیگر به دست صندوق نوآوری و شکوفایی برسند، وارد فرآیند ارزیابی نخواهند شد.

ریاست جمهوری

صندوق نوآوری و شکوفایی

تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، خیابان پردیس،

زاینده‌رود شرقی، شماره ۲۴، مجتمع شکوفایی

شرکت‌های دانش‌بنیان

کدپستی: ۱۹۹۱۹۱۳۱۱۱

تلفن: ۰۲۱-۴۲۱۷۰۰۰۰

پست الکترونیکی: info@inif.ir

دانا شریف

DANA SHARIF

Challenge.ir

تهران، گیشا، خیابان سیزدهم، نبش خیابان کسروی،

پلاک ۹

تلفن: ۰۲۱۸۸۴۸۶۴۹۸

پست الکترونیکی: Info@Danasharifco.ir