

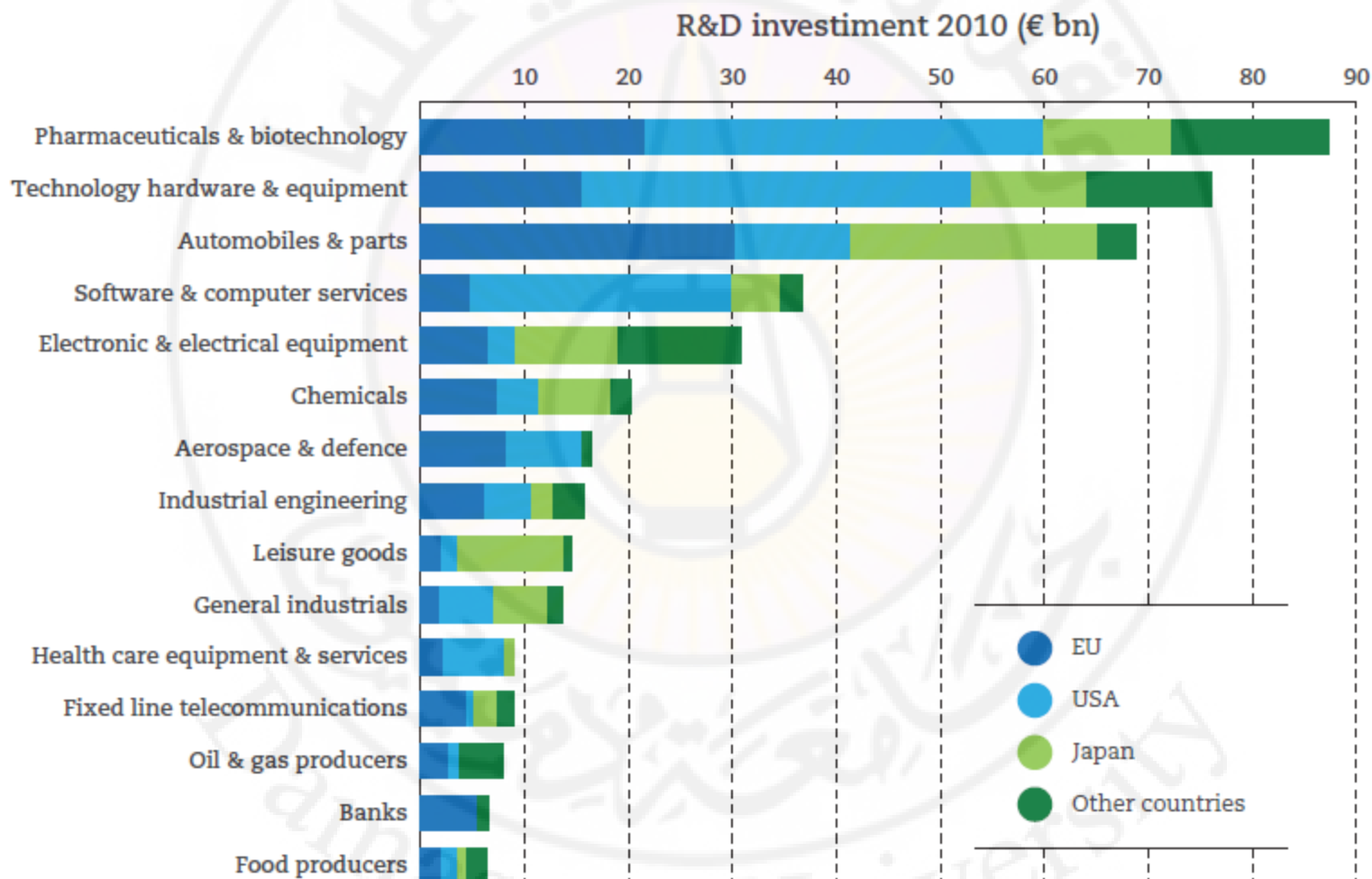
خصائص وأمثلة عن الأدوية البيولوجية

PROPERTIES & EXAMPLES OF BIOLOGICAL DRUGS

National Cancer Institute Definition of a Biological Drug:
A substance that is made from a living organism or its products and is used in the prevention, diagnosis, or treatment of cancer and other diseases.

يفوق الاستثمار في أبحاث وتطوير الأدوية R&D أي مجال آخر

Chart 5: R&D investments by sector (EUR billion)²²



أهم الاختلافات بين الأدوية البيولوجية (البروتينية) والأدوية صغيرة الوزن الجزيئي

الأدوية صغيرة الوزن الجزيئي Small molecule drugs	الأدوية البيولوجية Biological drugs	
صغير	كبير	الوزن الجزيئي
منخفضة أو متوسطة	عالية	درجة التعقيد
عالية	منخفضة	درجة التجانس
داخل الخلايا بشكل رئيسي	خارج الخلايا/ على سطح الخلايا	موقع التأثير الدوائي
مصطنعة	طبيعية (مع بعض التعديل أحيانا)	المادة الدوائية الفعالة (API)
صلب (في الغالب)	محلول (في الغالب)	الشكل الصيدلاني
ممتازة وسهلة	جيدة (درجة عالية من الصعوبة)	تكرارية التصنيع
بسيطة (في الغالب)	معقدة (نتيجة التغيرات خلال التصنيع) وضرورة تجنب التلوث	طرق التحليل
سهولة التقليد	صعوبة التقليد	الأدوية المثلثة Generics
إعطاء فموي (في الغالب)	تسريب وريدي (في الغالب)	طريق الإعطاء
عالية	منخفضة (متطلّبة)	الثباتية Stability

أجيال الأدوية البيولوجية

Generation	Type	Examples
1 st	Replacement of naturally derived proteins	Insulin Growth Hormone Blood Factors
2 nd	Proteins with therapeutic benefits used in non-defecient patients	tPA Hep B vaccine IL-2
3 rd	Antibodies	Humira Herceptin Avastin
X	Nucleic Acids (anti-sense RNA/Naked DNA/RNAi) Gene Therapy Cell based Therapies (autologous or allogenic stem cells) Personalized medicine	

أمثلة لأدوية بيولوجية مع استطبائاتها/تطبيقاتها

Product	Application
Blood factor VIII (clotting factor)	Used to treat hemophilia
Epidermal growth factor	Used to stimulate antibody production in patients with immune system disorders
Growth hormone	Used to correct pituitary deficiencies and short stature in humans; other forms used in cows to increase milk production
Insulin	Used to treat diabetes mellitus
Interferons	Used to treat cancer and viral infections
Interleukins	Used to treat cancer and stimulate antibody production
Monoclonal antibodies	Used to diagnose and treat a variety of diseases including cancers
Tissue plasminogen activator	Used to treat heart attacks and stroke

Top 10 Biological Drugs in the United States

more than \$1 billion in annual sales in 2017

Commercial (Generic) Names/ <u>manufacturer</u>	Top Indications	Sales in 2017
Humira (Adalimumab) <u>AbbVie/Abbott</u>	Rheumatoid arthritis, plaque psoriasis, Crohn's disease	\$18.4 billion
Rituxan (Rituximab) <u>Roche</u>	Non-Hodgkins lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, rheumatoid arthritis	\$9.2 billion
Enbrel (Etanercept) <u>Pfizer/Amgen</u>	Rheumatoid arthritis, plaque psoriasis, psoriatic arthritis	\$7.9 billion
Herceptin (Trastuzumab) <u>Roche</u>	HER2+ breast cancer	\$7.4 billion
Avastin (Bevacizumab) <u>Roche</u>	Breast, colorectal, kidney, non-small-cell lung, glioblastoma, ovarian cancers	\$7.1 billion

Top 10 Biological Drugs in the United States

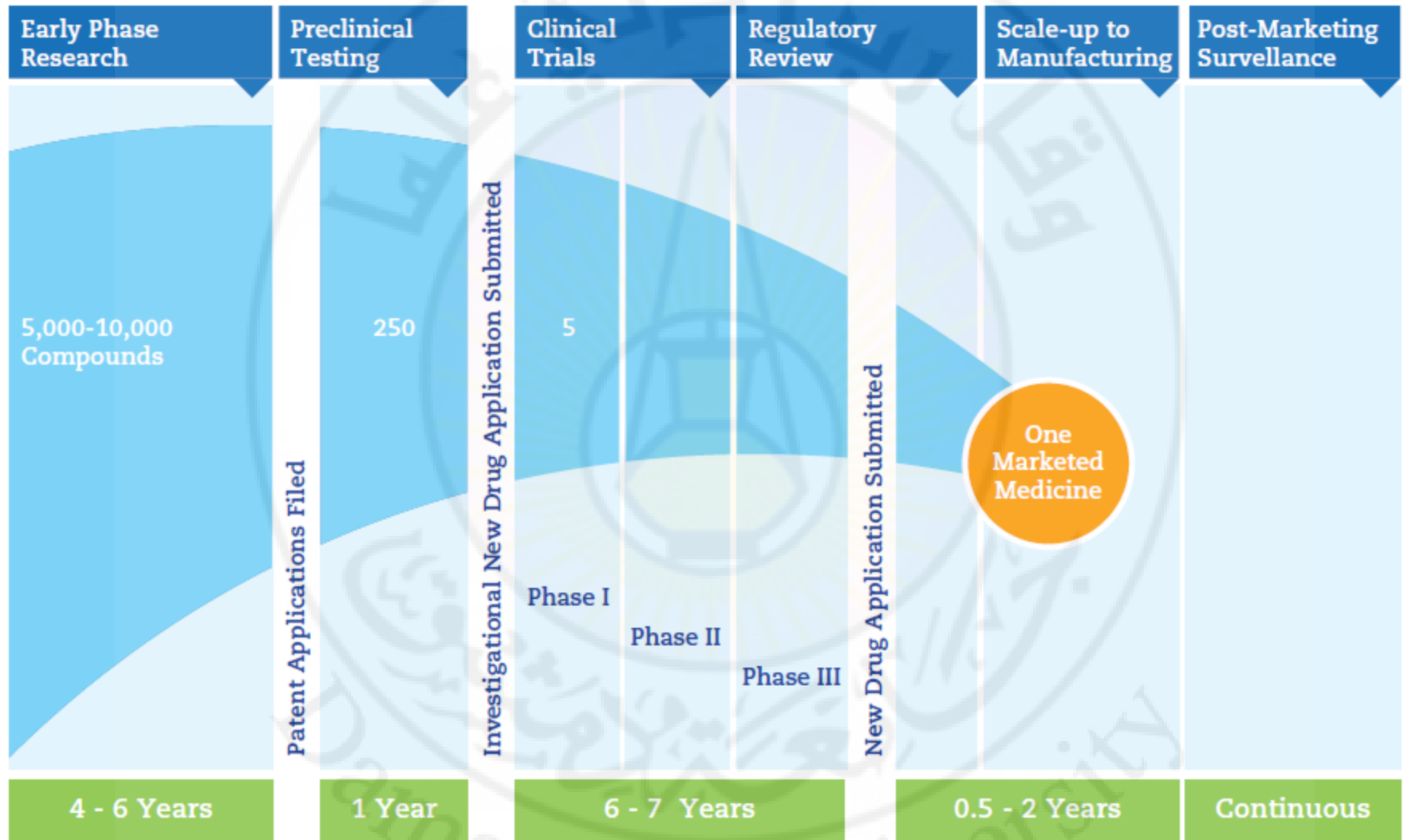
more than \$1 billion in annual global sales in 2017

Commercial (Generic) Names/ <u>manufacturer</u>	Top Indications	Sales in 2017
Remicade (Infliximab) <u>Johnson & Johnson</u>	Rheumatoid arthritis, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, plaque psoriasis, ulcerative colitis	\$7.1 billion
Lantus (Insulin glargine) <u>Sanofi</u>	Diabetes	\$5.7 billion
Neulasta (Pegfilgrastim) <u>Amgen</u>	Neutropenia related to cancer chemotherapy	\$4.7 billion
Avonex (Interferon beta- 1a) <u>Biogen Idec</u> CinnoVex, a biosimilar, in Iran	Multiple sclerosis (MS)	\$2.1 billion
Lucentis (Ranibizumab) <u>Roche, Novartis</u>	Age-related macular degeneration	\$1.5 billion

Trade Name	Description	Marketer	2010 Rev
1. Enbrel	TNF Mab, rDNA	Amgen / Pfizer	\$7,287
2. Avastin	VEGF Mab, rDNA	Roche	\$6,973
3. Rituxan	CD20 Mab, rDNA	Roche / Biogen	\$6,859
4. Remicade	TNF Mab, rDNA Mab, rDNA	Johnson & Johnson	\$6,520
5. Herceptin	HER2 receptor	Roche	\$5,859
6. Humira	TNF Mab, rDNA	Abbott	\$5,488
7. Lantus	Insulin glargine, rDNA	Sanofi	\$4,834
8. Neulasta	G-CSF, rDNA, PEG	Amgen	\$3,558
9. Lucentis	VEGF Mab Fab, rDNA	Roche	\$3,106
10. Aranesp	EPO, darbo-, rDNA	Amgen	\$2,995
11. Avonex	Interferon beta-1a, rDNA	Biogen Idec	\$2,518
12. Prevnar-7	Pneumococcal Vaccine(7)-CRM197	Pfizer	\$2,400
13. Rebif	Interferon beta-1a, rDNA	Merck	\$2,297
14. NovoLog	Insulin aspart, rDNA	Novo Nordisk	\$2,198
15. Novolin	Insulin, rDNA	Novo Nordisk	\$2,185
16. Advate	Factor VIII, rDNA	Baxter	\$2,095
17. Humalog	Insulin lispro, rDNA	Lilly	\$2,054
18. Procrit / Eprex	EPO, rDNA	Johnson & Johnson	\$1,900
19. Erbitux	EGF receptor Mab, rDNA	Bristol-Myers Squibb	\$1,791
20. Pegasys	Interferon alfa, rDNA, PEG	Roche	\$1,775
21. Betaseron	Interferon betaser, rDNA	Bayer	\$1,661
22. NovoSeven	Factor VIIa, rDNA	Novo Nordisk	\$1,483
23. BOTOX	Botulinum Toxin A	Allegan	\$1,414
24. NeoRecormon	EPO, rDNA	Roche	\$1,387
25. Kogenate	FS Factor VIII, rDNA	Bayer	\$1,383

26. Neupogen	G-CSF, rDNA	Amgen	\$1,286
27. Levemir	Insulin detemir, rDNA	Novo Nordisk	\$1,271
28. Engerix-B	Hepatitis B Vaccine, rDNA	GlaxoSmithKline	\$1,200
29. Tysabri	Integrin Mab, rDNA	Biogen Idec / Elan	\$1,089
30. Humulin	Insulin, rDNA	Lilly	\$1,089
31. Synagis	RSV Mab, rDNA	MedImmune/AstraZeneca	\$1,038
32. Gardasil	HPV vaccine, rDNA	Merck	\$998
33. Varivax	Varicella Vaccine	Merck	\$929
34. Norditropin	Somatropin, rDNA	Novo Nordisk	\$887
35. Genotropin	Somatropin, rDNA	Pfizer	\$885
36. Forteo	Parathyroid hormone, rDNA	Lilly	\$830
37. PEG-Intron	Interferon alfa-2b, rDNA	Merck	\$737
38. Orencia	CTLA4-Ig, rDNA	Bristol-Myers Squibb	\$733
39. Cerezyme	Glucocerebrosidase, rDNA	Genzyme/Sanofi	\$720
40. Xolair	immunoglobulin E Mab, rDNA	Roche & Novartis	\$692
41. Gonal-f	FSH rDNA	Merck Serono	\$674
42. BeneFIX	Factor IX, rDNA	Pfizer	\$643
43. Menactra	Meningococcal Vaccine	Sanofi	\$626
44. Pulmozyme	DNase, rDNA	Roche	\$554
45. Soliris	Complement C5 Mab, rDNA	Alexion	\$541
46. Follistim AQ	FSH rDNA	Merck Serono	\$528
47. Nutropin	Somatropin, rDNA	Roche	\$504
48. TNKase	tPA, TNK-, rDNA	Roche	\$496
49. Helixate FS	Factor VIII, rDNA	Bayer	\$480
50. Actemra	IL-6 receptor mAb, rDNA	Roche	\$428

يتضمن الاستثمار R&D جميع مراحل تطوير الدواء





SELECTED BIOLOGICAL PROTEINS/ BIOPHARMACEUTICAL DRUGS

الإنسولين البشري ومماثلاته

Human Insulin and analogs

الإنسولين البشري



- Humulin (Eli Lilly) هو أول عديد ببتيدي مأشوب يحصل على موافقة الـ FDA عام 1982.
- يصطنع الإنسولين البشري في *E. coli* وهو مماثل كيميائياً وفيزيائياً للإنسولين المفرز من المعثكلة. ومن حسناته تحريضه شبه المعدوم لجملة المناعة نسبةً لأنواع الإنسولين الحيوانية التي استعملت قبله.
- قبل عام 1986، كان الإنسولين يحضّر بإنتاج كل من سلسلتي A و B بشكل منفصل في الجراثيم ومن ثم يتم ربطهما كيميائياً. أما حالياً، فتصطنع طليعة الإنسولين proinsulin ثم يشطر الببتيدي C إنزيمياً. وقد أبدى الـ Humulin المحضّر بكلا الطريقتين خصائص حركية دوائية وسريرية متشابهة.
- توجد العديد من مستحضرات الـ Humulin هي: regular (R)، isophane or NPH، (N) lente، (L) ultralente (U)، Humulin 50/50، Humulin 70/30. ويمكن الحصول على تأثير سريع أو بطيء أو متوسط السرعة عبر هذه المستحضرات.
- في عام 1996 اصطنع الإنسولين في خميرة *Saccharomyces cerevisiae* (خميرة الخبز) من قبل شركة Novo Nordisk وسمّي بـ Novolin.

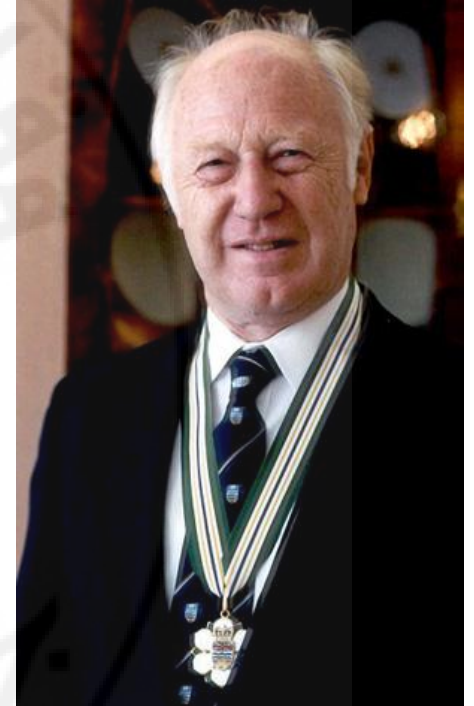
مماثلات الإنسولين البشري

Human Insulin Analogs

- اصطنعت لاحقاً مماثلات للإنسولين تملك ميلاً منخفضاً للتكدّس aggregation والارتباط الذاتي self-association وتملك لذلك تأثيراً سريعاً يشبه بذلك حركية الإنسولين المفرز بشكل طبيعي.
- وقد أدت التعديلات في تتالي بعض الحموض الأمينية إلى ظهور شكلين صيدلانيين للإنسولين المشوب سريع التأثير هما: insulin lispro (Humalog, Eli Lilly) و insulin aspart (Novolog, Novo Nordisk)، إضافةً إلى إنسولين مديد التأثير long-acting هو insulin glargine (Lantus, Aventis). ويمكن إعطاء المماثلين سريعَي التأثير خلال الوجبة أو بعدها مما يشكل أفضلية هامة.

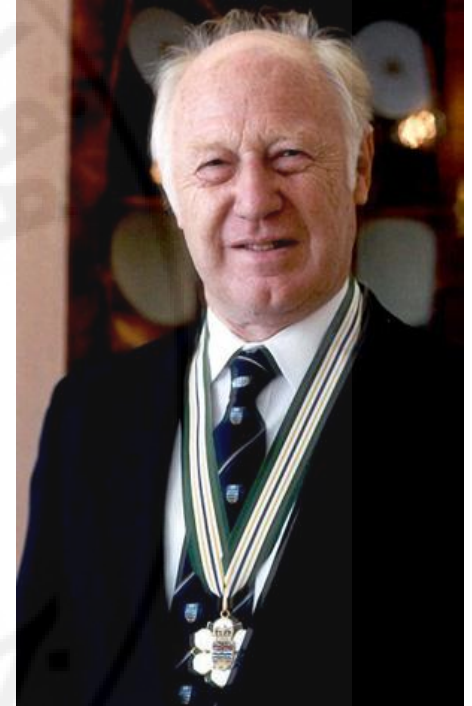
Michael Smith won Nobel Prize in 1993

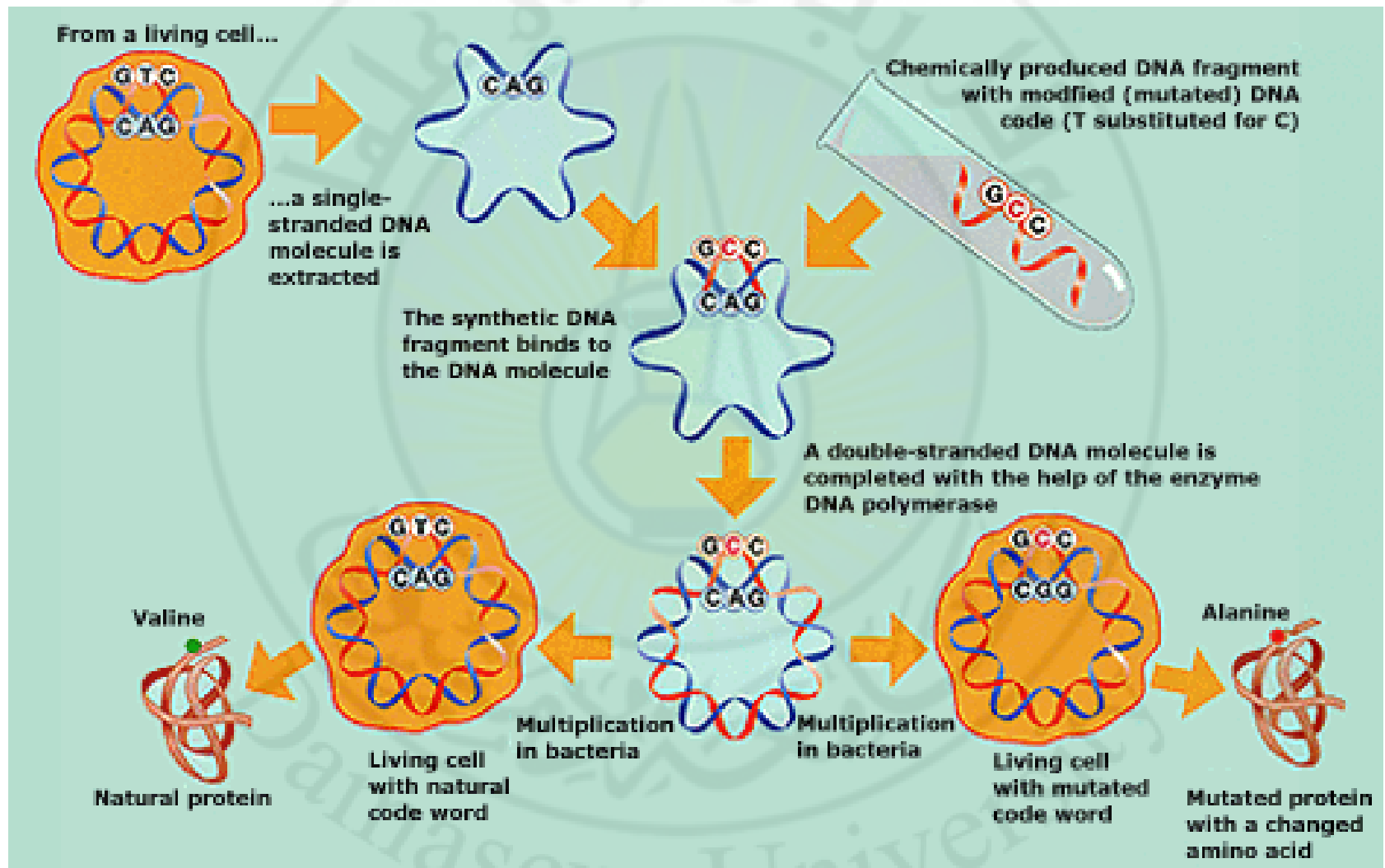
- Using site-directed mutagenesis the information in the genetic material can be changed. A synthetic DNA fragment is used as a tool for changing one particular code word in the DNA molecule. This reprogrammed DNA molecule can direct the synthesis of a protein with an exchanged amino acid. **Michael Smith's** method has become one of biotechnology's most important instruments.

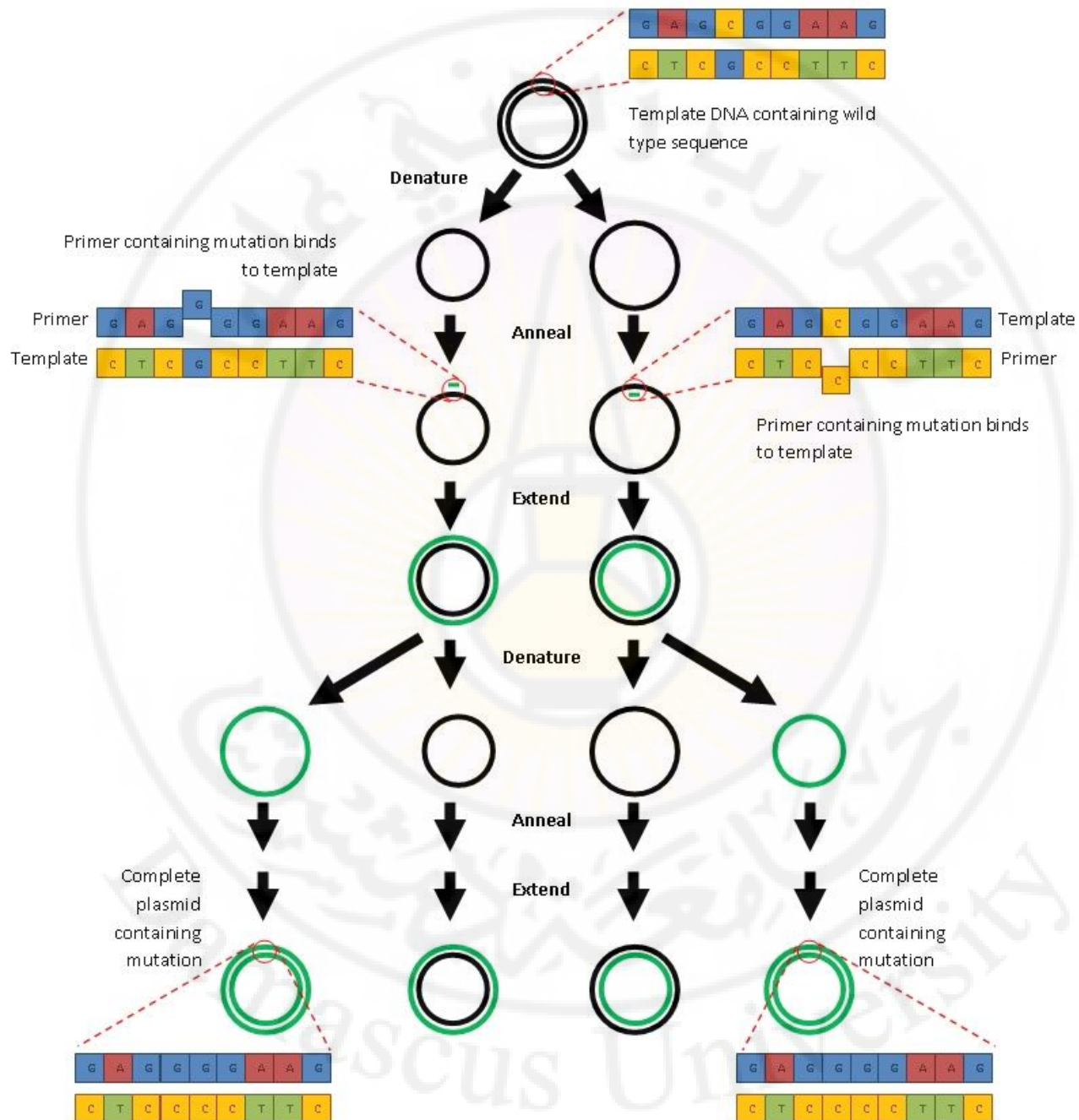


Michael Smith won Nobel Prize in 1993

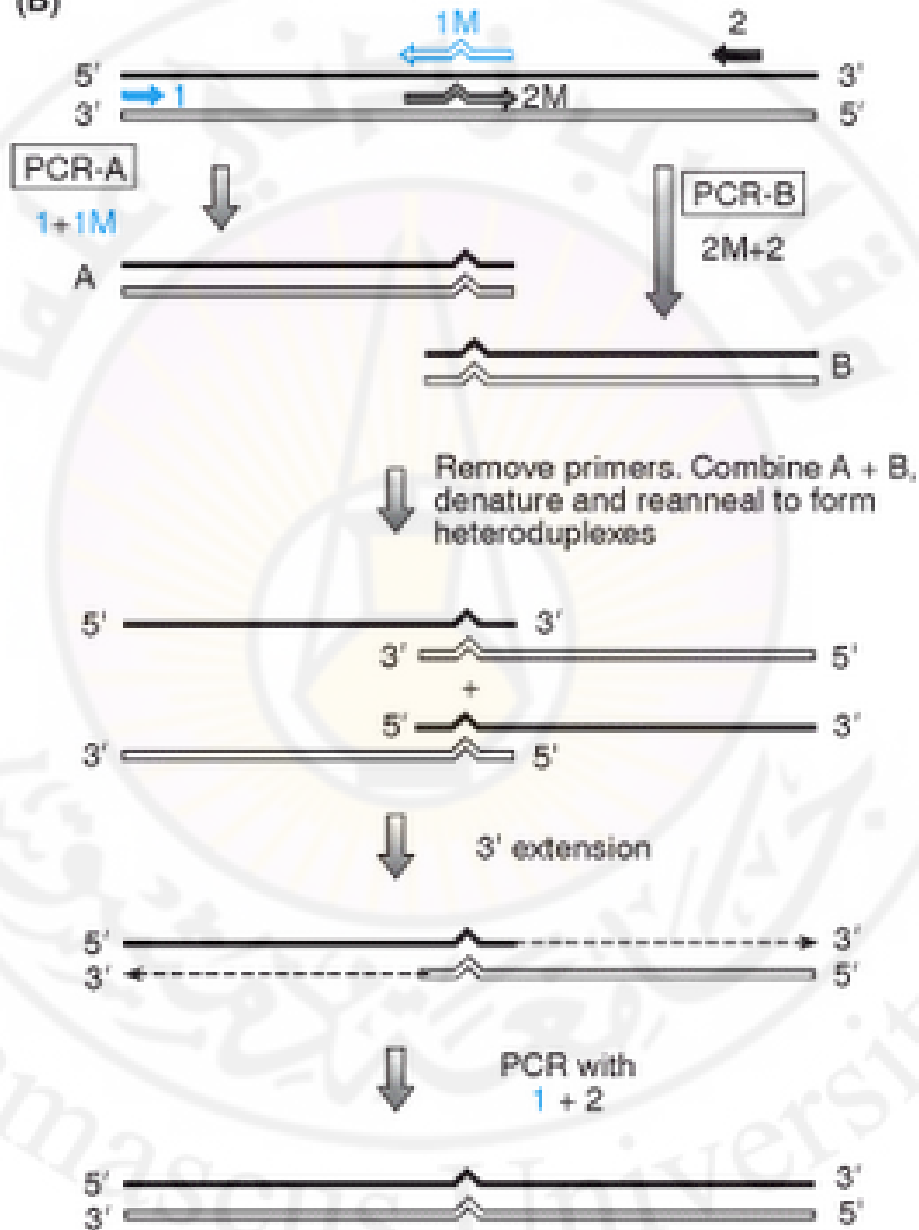
- **With Smith's site-directed mutagenesis** the researchers can study in detail how proteins function and how they interact with other biological molecules. Site-directed mutagenesis can be used, for example, to systematically change amino acids in enzymes, in order to better understand the function of these important biocatalysts. The researchers can also analyse how a protein is folded into its biologically active three-dimensional structure. The method can also be used to study the complex cellular regulation of the genes and to increase our understanding of the mechanism behind genetic and infectious diseases, including cancer.



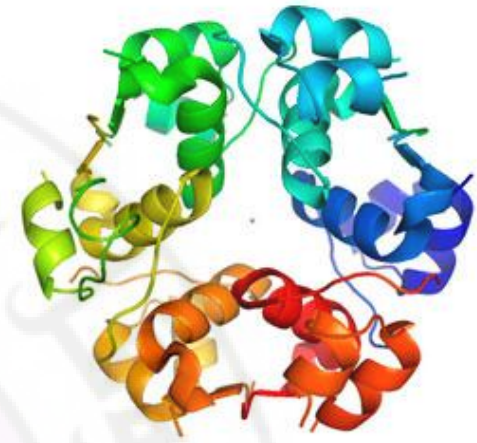
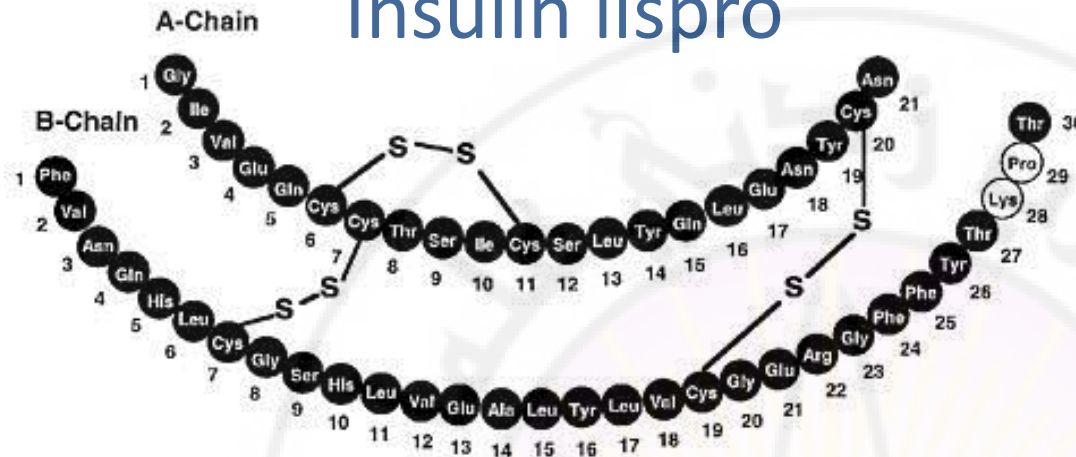




(B)

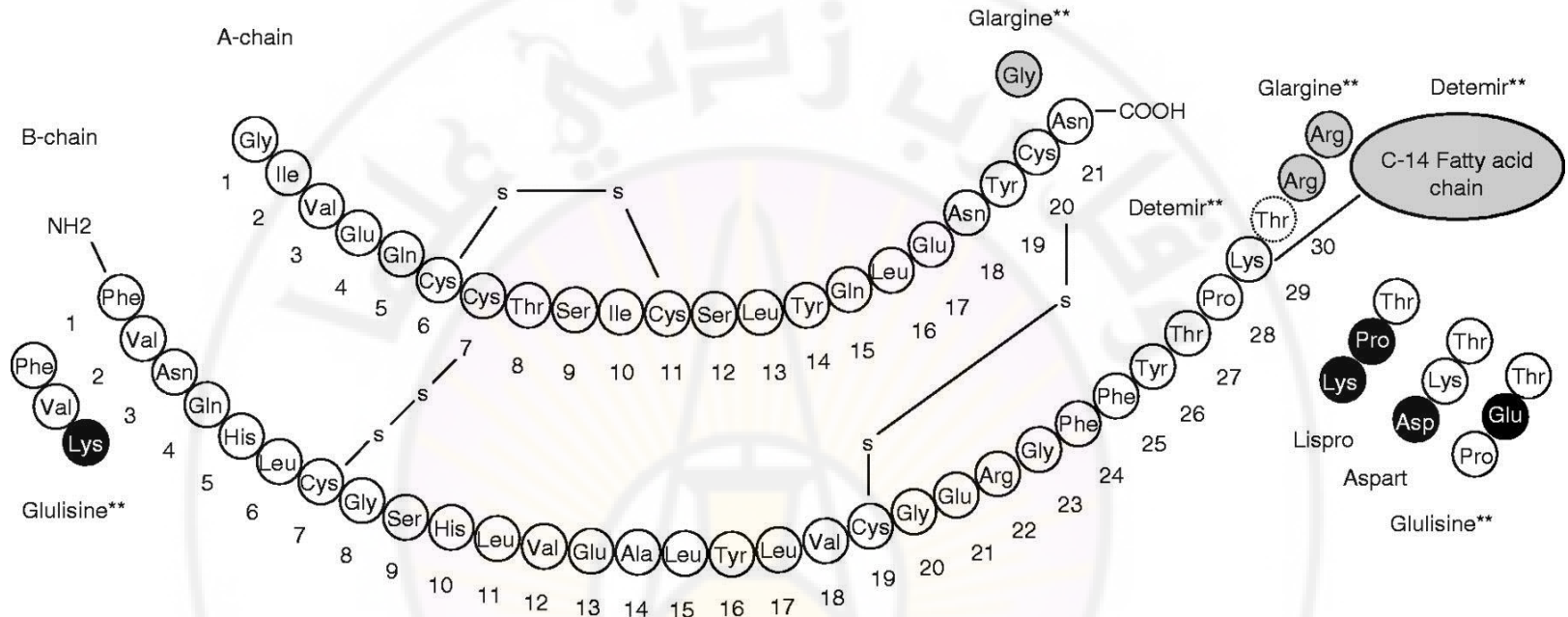


Insulin lispro



- استبدال الحمضان Lys (B28) و Pro (B29) في السلسلة B للإنسولين البشري مكان Pro (B28) و Lys (B29). وأنتج البروتين في *E. coli*.
- تكون ثمالة Pro في الموقع B28 ضرورية لشكل b-sheet وتشكيل وحدة مثنوية من البروتين dimer unit. وعند عكس موقعي Lys و Pro فإن ذلك يحذف موقع مهم للروابط الكارهة للماء وبالتالي يخفض الميل لتشكيل جزيئات مثنوية.
- عادةً ما يضاف الزنك لمستحضرات الإنسولين من أجل زيادة الثباتية، وتتواجد جزيئات الإنسولين بسبب ذلك كوحدات سداسية hexamer. وينفصل insulin lispro بسرعة أكبر بشكل جزيئات موحدة monomers بسبب ضعف قدرته على تشكيل مثنويات في البنية السداسية. وهكذا يملك امتصاصية سريعة، وبداية سريعة، ومدة تأثير أقصر من الإنسولينات النظامية، مما يتيح مرونة في تحديد كمية ووقت تناول الجرعات خلال أو بعد الوجبات.
- لا يبدو أن عكس الـ Pro و Lys يزيد من القدرة الاستمناعية للإنسولين lispro.

Insulin aspart & glargine & glulisine



- استبدلت ثمالة واحدة في insulin aspart بـ Asp عوضاً عن Pro في الموقع B28 وحضر البروتين في الخميرة. وهذا البروتين مصادق عليه للحقن تحت الجلد SC عن طريق مضخة إنسولين.
- يصطنع insulin glargine في E. Coli ويختلف عن الإنسولين النظامي باستبدال Gly بدلاً من Asn في الموقع A21 وإضافة ثمالي Gly في النهاية الكربوكسيلية للسلسلة B. والإنسولين glargine مديد التأثير ويعطي مستويات قريبة من المستويات الأساسية للإنسولين بعد حقنة واحدة قبل النوم.
- استبدلت ثمالة (B3) Lys عوضاً عن Asn و (B29) Glu عوضاً عن Lys لتطوير insulin glulisine (Apidra, Sanofi). ونجم عن ذلك إنسولين سريع التأثير يستخدم قبل أو بعد الطعام بوقت قصير.



- قبل توفر البروتين المأشوب، كان هرمون النمو يستخلص من خزعات الغدة النخامية مع توفر كميات قليلة جداً لا تناسب احتياجات السوق الدوائية، إضافةً إلى أن تلك المستحضرات كثيراً ما احتوت على تلوث فيروسي أدى في بعض الحالات إلى تدرّك في المادة العصبية للمرضى الذين تلقوا العلاج.
- أول مستحضر لهرمون النمو المأشوب كان somatrem (Protropin, Genentech) واحتوى على ثمانية ميثونيل إضافية في النهاية الأمينية بعد إنتاجه في E. Coli، وأبدى قدرة استمناعية أكبر من الهرمون الطبيعي. بعد ذلك، تم استبداله لاحقاً بالهرمون الطبيعي المأشوب somatotropin في صنفين: Humatrope (Eli Lilly) و Nutropin (Genentech)، وكلاهما مصادق عليه لمعالجة العوز في هرمون النمو لدى الأطفال.
- هنالك أيضاً بروتين مأشوب بقري (bovine somatotropin (bST) متوفر في السوق باسم Posilac لشركة Monsanto لتحفيز إنتاج الحليب لدى البقر.

الإنترفيرونات Interferons

- الإنترفيرونات هي عائلة من البروتينات تملك كموناً عالياً لعلاج الأمراض الفيروسية والسرطانات وهي تنتج بمعظمها حالياً في *E. coli*، وهي مصادق عليها لعلاج أنواع من ابيضاضات الدم والسااركومة والتصلب المتعدد MS.
- تنتمي معظم الإنترفيرونات إلى أصناف ثلاثة: ألفا وبيتا وغاما، مع كون الصنف ألفا أكبر تلك الأصناف واحتوائه على أكثر من 20 عضواً (بروتيناً). وتصنف الإنترفيرونات ألف وبيتا كـ Type I interferons وتنتجها جميع الخلايا في الجسم استجابةً للإنتان الفيروسي، بينما ينتج الإنترفيرون غاما (Type II interferon) من قبل الخلايا التائية والخلايا القاتلة الطبيعية NK.
- يتألف الإنترفيرون ألفا من 166 حمض أميني ووزن جزيئي يتراوح بين 17.5-23 Kd. وهو حمضي مع نقطة التوازن الكهربائي isoelectric point بين 5.7-7. يتألف الإنترفيرون بيتا من 166 حمض أميني ووزن جزيئي 23 Kd، مع كونه معتدلاً ونقطة توازن كهربائي بين 6.8-7.8. ويتألف الإنترفيرون غاما من 143 حمض أميني مع كونه قلويّاً مع نقطة توازن كهربائي بين 8.6-8.7 ويتخرب بالحموضة.

دورناز ألفا Dornase alpha

- الدورناز ألفا (Pulmozyme, Genentech) هو بروتين مأشوب لإنزيم deoxyribonuclease I، يُقدّم كحلاّلة هوائية aerosol وتمت المصادقة عليه من قبل FDA عام 1994 لعلاج التليف الكيسي cystic fibrosis. يتم إنتاجه في خلايا مبيض الفأر (القداد) الصيني Chinese hamster ovary (CHO) cells ويتضمن 260 حمض أميني مع وزن جزيئي حوالي 37 Kd. يقوم هذا الإنزيم المأشوب بتحطيم الدنا خارج الخلوي الذي يتراكم بتركيز عالية في المفرزات الهوائية لدى مرضى التليف الكيسي، مما يؤدي إلى التقليل من المخاط الكثيف الناتج عن تلك المفرزات، كما يقلل من الإنتانات الناجمة عن ذلك.
- وبسبب كون المخاط يتراكم أيضاً لدى المرضى المصابين بالتهاب رئوي، والتهاب قصبات، ووذمة رئوية، فإن هذا البروتين يمكن وصفه لعلاج جميع تلك الحالات أيضاً.

الببتيدات المضادة للجراثيم antimicrobial peptides

- تمتلك ببتيدات الـ Magainins (وهي تتواجد في الضفادع وتملك خاصية قوية مضادة للجراثيم إيجابية وسلبية الغرام) 23 حمضاً أمينياً ولا تحتوي على السيستئين ولها بنية ثانوية α -helix.
- تمتلك الـ defensins قدرة أكثر فعالية في مقاومة الجراثيم إيجابية الغرام وتحتوي على 29-34 حمضاً أمينياً وعلى ثلاثة جسور ثنائية الكبريت وهي قاعدية basic.
- وهذه الببتيدات غير سامة للخلايا حقيقية النوى ويمكن استخدامها موضعياً كمضادات جرثومية.

مفعّل البلاسمينوجين النسيجي (tPA) tissue plasminogen activator

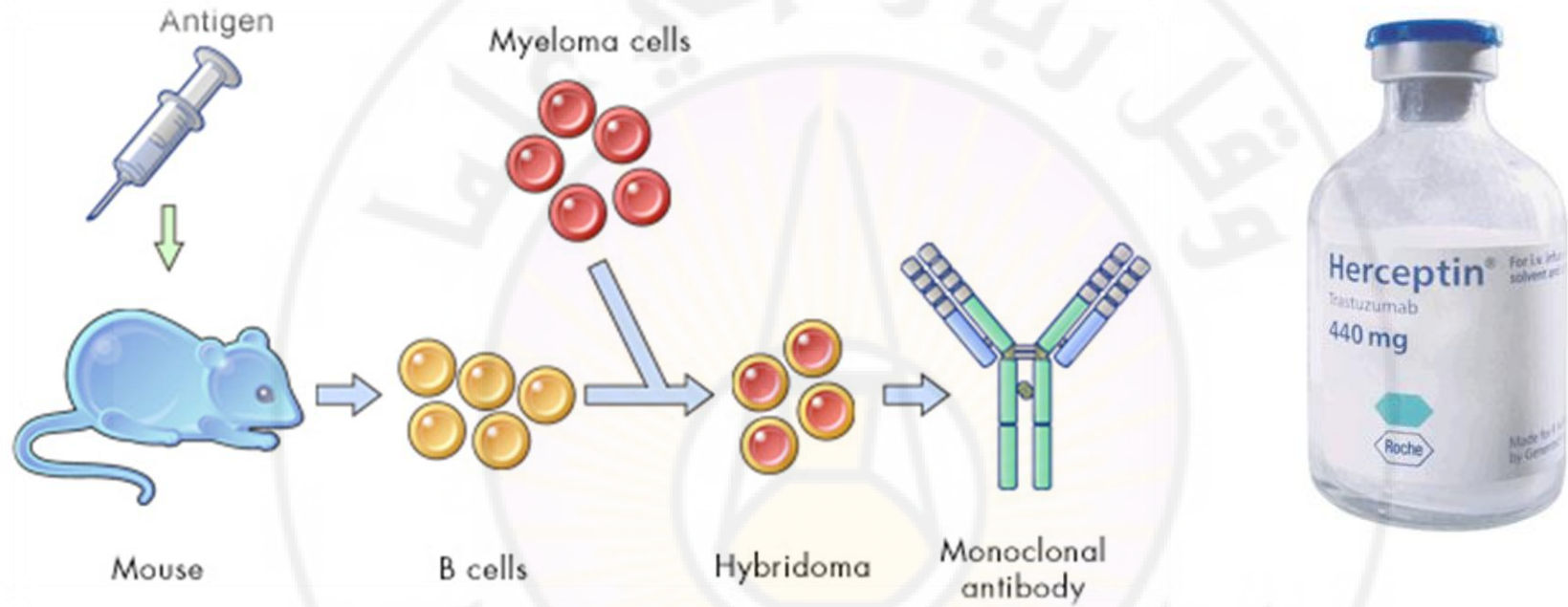
- إنّ Activase (Alteplase, Genentech)

هو بروتين سكري مأشوب ذو 527 حمض أميني ينتج في خلايا CHO وهو مطابق للبروتين الطبيعي. يحرّض تدرك الخثرة ويستعمل في تدبير احتشاء القلب الحاد، السكتة الإفقارية الحادة، والصمة الرئوية.

- وهناك شكلان معدّلان للبروتين الطبيعي ذو المناطق البنيوية الخمس الوظيفية، ويملكان عمر نصفي أطول من البروتين الطبيعي هما: Reteplase (Roche) يتألف من منطقتي tPA فعالتين فقط وهو غير سكري وينتج في E. coli، و Tenecteplase (Genentech) ويحتوي على استبدال ثلاثة حموض أمينية ولديه نوعية أعلى للارتباط بالفبرين.



الأضداد وحيدة النسيلة (mAbs) monoclonal antibodies



- يتم إنتاج الأضداد وحيدة النسيلة عبر سلسلة من العمليات تبدأ عادة من حقن المستضد في الفأر وتنتهي بتنقية الضد وحيد النسيلة في الزجاج *in vitro*.
- وهناك أنواع عدّة من الأضداد وحيدة النسيلة منها الفأري والخييري chimeric والمؤنس humanized ويتم إنتاج النوعين الأخيرين عبر الهندسة الوراثية genetic engineering التي تحافظ على شكل ونوعية specificity الضد الناتج تجاه المستضد المطلوب لكنها تقلل من استمناع الضد المؤشوب لدى حقنه في المرضى

أنواع الأضداد وحيدة النسيلة

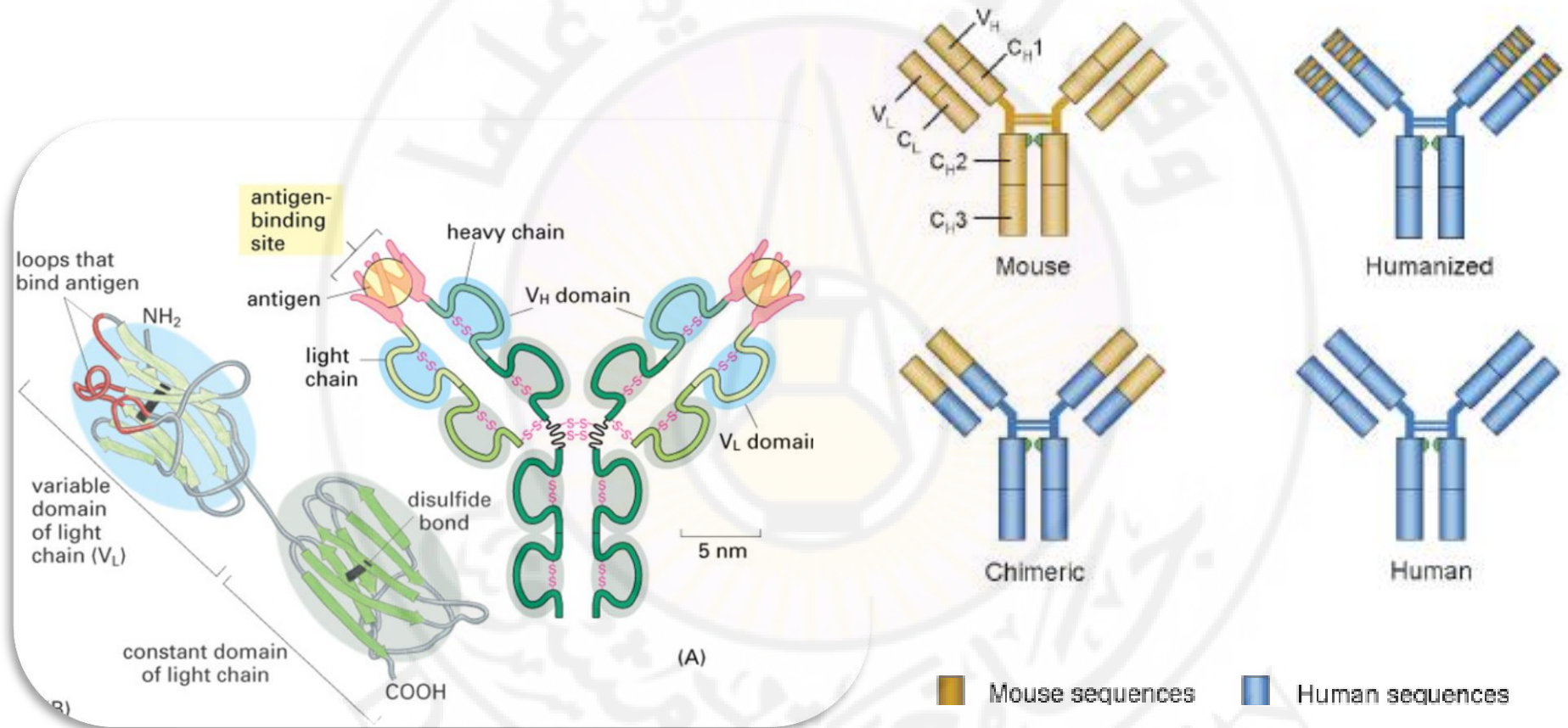
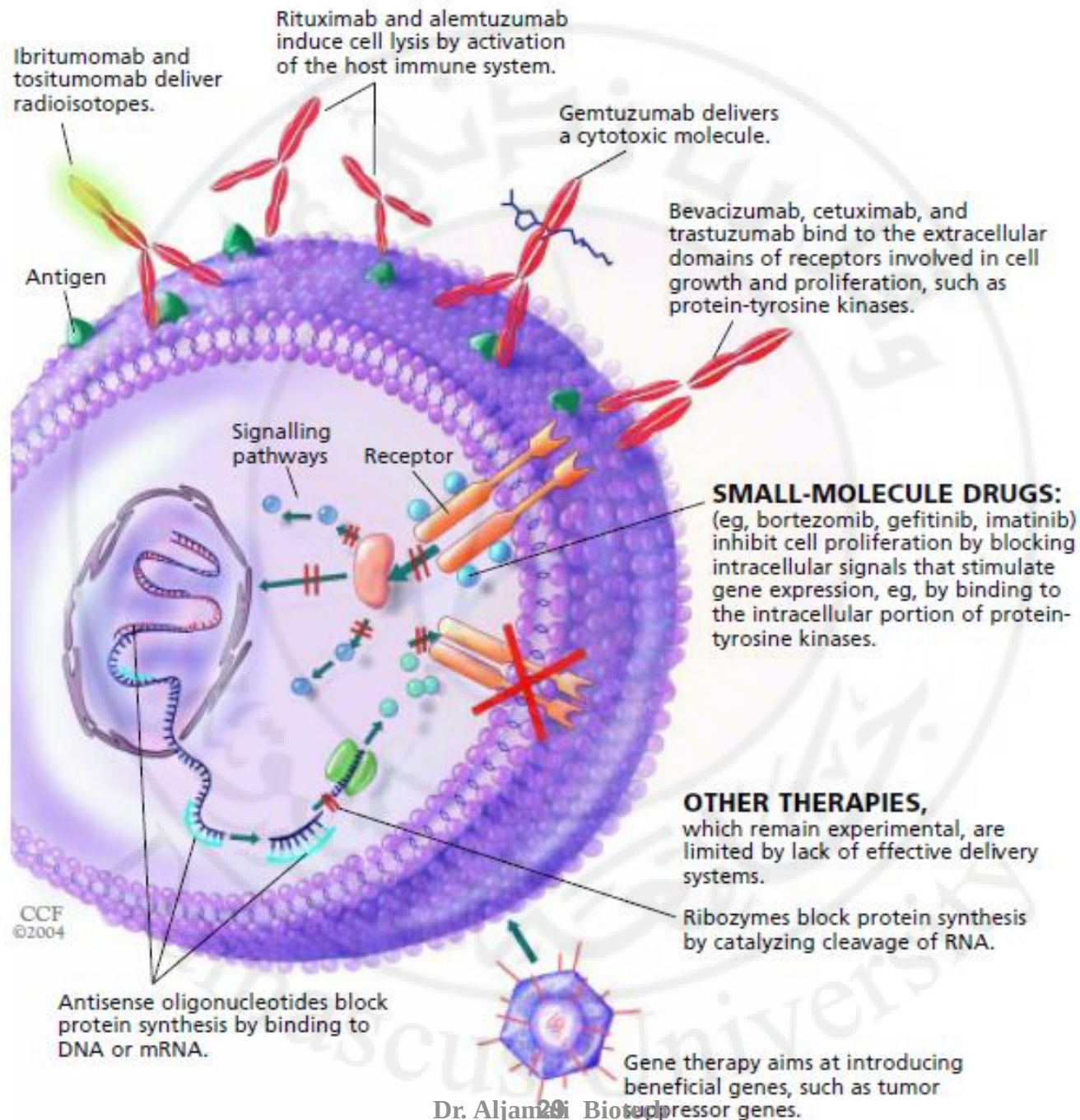


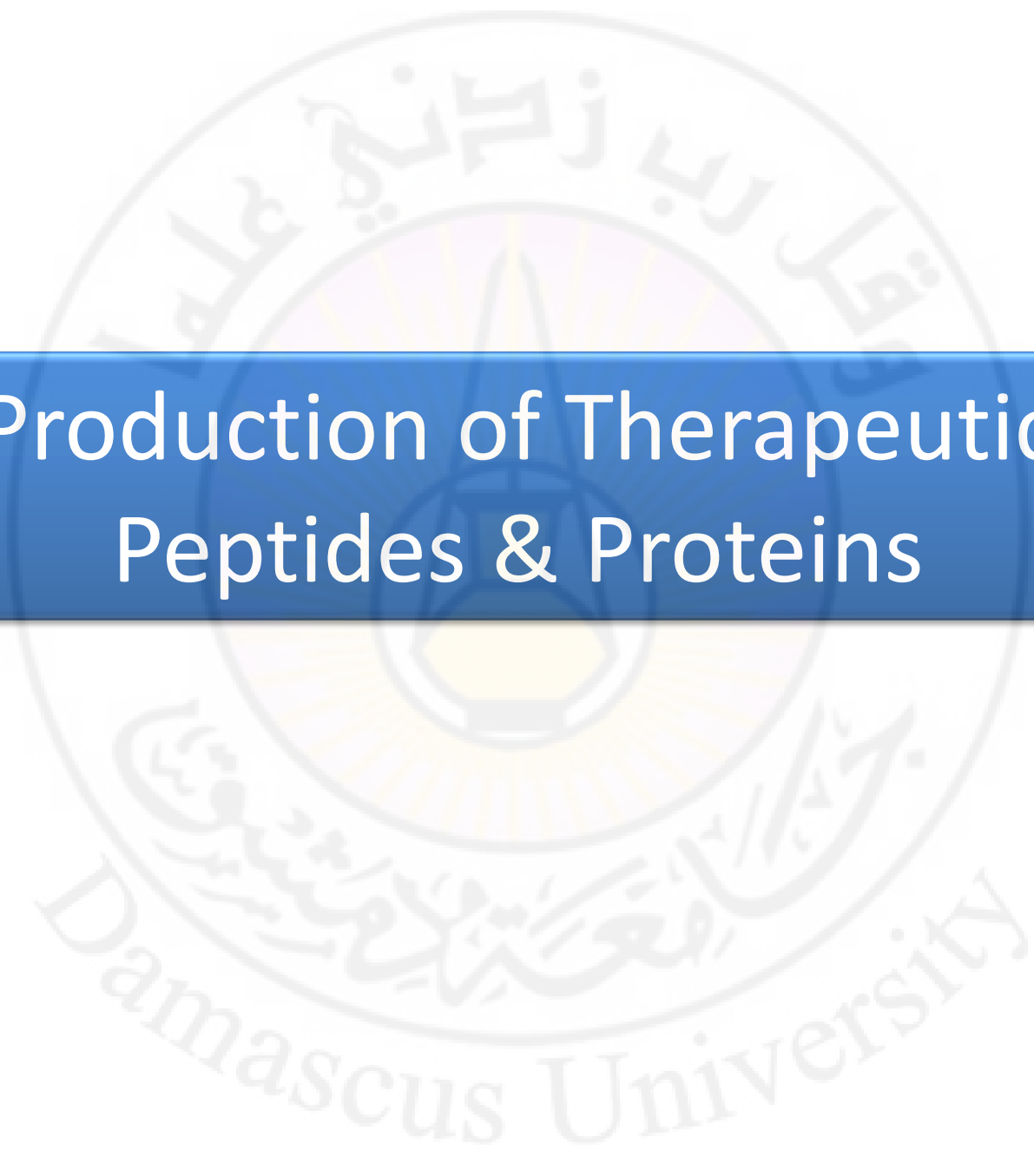
Table 1. Approved therapeutic antibodies.

Year (FDA)	Trade name (Generic)	Type of antibody (Target antigen)	Disease indication	Company
1986	OKT 3 (muromanab-CD3)	Murine (CD3)	Allograft rejection	Ortho Biotech
1994	ReoPro (abciximab)	Chimeric Fab (GPIIb/IIIa)	Adjunct to PTCA	Centocor
1995	Panorex (edrecolomab)	Chimeric (CA17-1A)	Colorectal cancer	GSK/Centocor
1997	Rituxan (rituximab)	Chimeric (CD20)	Non-Hodgkins lymphoma	IDEC
1997	Zenapax (daclizumab)	Humanized (IL2R)	Prevention of kidney transplant rejection	PDL
1998	Herceptin (trastuzumab)	Humanized (Her2/neu)	Metastatic breast cancer	Genentech
1998	Synagis (palivizumab)	Humanized (RSV F)	RSV prophylaxis	MedImmune
1998	Simulect (basiliximab)	Chimeric (IL2R)	Prevention of kidney transplant rejection	Norvatis
1998	Remicade (infliximab)	Chimeric (TNF- α)	Rheumatoid arthritis, Crohn's disease	Centocor
2000	Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin)	Humanized-calicheamicin(CD33)	CD33-acute myeloid leukemia	Celltech
2001	Campath (alemtuzumab)	Humanized (CD52)	B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia	Millennium
2002	Zevalin (ibritumomab tiuxetan)	Murine-Y-90 (CD20)	Non-Hodgkins lymphoma	IDEC
2002	Humira (adalimumab)	Human (TNF- α)	Crohn's disease, RA	CAT/BASF
2003	Xolair(omalizumab)	Humanized (IgE)	Asthma	Tanox/Genentech/Novartis
2003	Raptiva (efalizumab)	Humanized (CD11a)	Psoriasis	Xoma/Genentech
2003	Bexxar (tositumomab)	Murine-I-131 (CD20)	Non-Hodgkins lymphoma	Corixa/GSK
2004	Erbitux (cetuximab)	Chimeric (EGFR)	Colorectal cancer	Imclone
2004	Avastin (bevacizumab)	Humanized (VEGF)	CRC, breast, renal, NSCL cancer	Genentech



البروتينات المندمجة Fusion Proteins

- Alefacept (Amevive, Biogen) هو بروتين مدمج ذو وزن جزيئي 91 Kd ينتج في خلايا CHO ويحتوي على الجزء خارج الخلوي للمستضد الوظيفي للكريات البيض والذي يرتبط عادة مع بروتين CD2، مدمجاً مع منطقة Fc للـ IgG البشري. وهذا البروتين متوفر لعلاج الصدف اللوي المزمن chronic plaque psoriasis.
- Etanercept (Enbrel, Wyeth) هو بروتين مدمج مثنوي ذو وزن جزيئي 150 Kd يحتوي على مستقبل عامل النخر الورمي TNF مرتبطاً مع جزء Fc للـ IgG البشري، وينتج في خلايا CHO ويوصف لعلاج التهاب المفاصل الرثواني.
- Denileukin diftitox هو بروتين مدمج ذو وزن جزيئي 58 Kd يحتوي على شكل معدّل من ذيفان الدفتريا مدمجاً مع الإنترلوكين 2 (IL-2) البشري وينتج في E. coli ويعطى بشكل محلول حشوي لعلاج اللفوما التائية الجلدية.

The background of the slide features a large, faint watermark of the Damascus University logo. The logo is circular, with Arabic calligraphy at the top and bottom, and a central emblem depicting a sun or starburst. The text "Damascus University" is written in English at the bottom of the circle.

Production of Therapeutic Peptides & Proteins

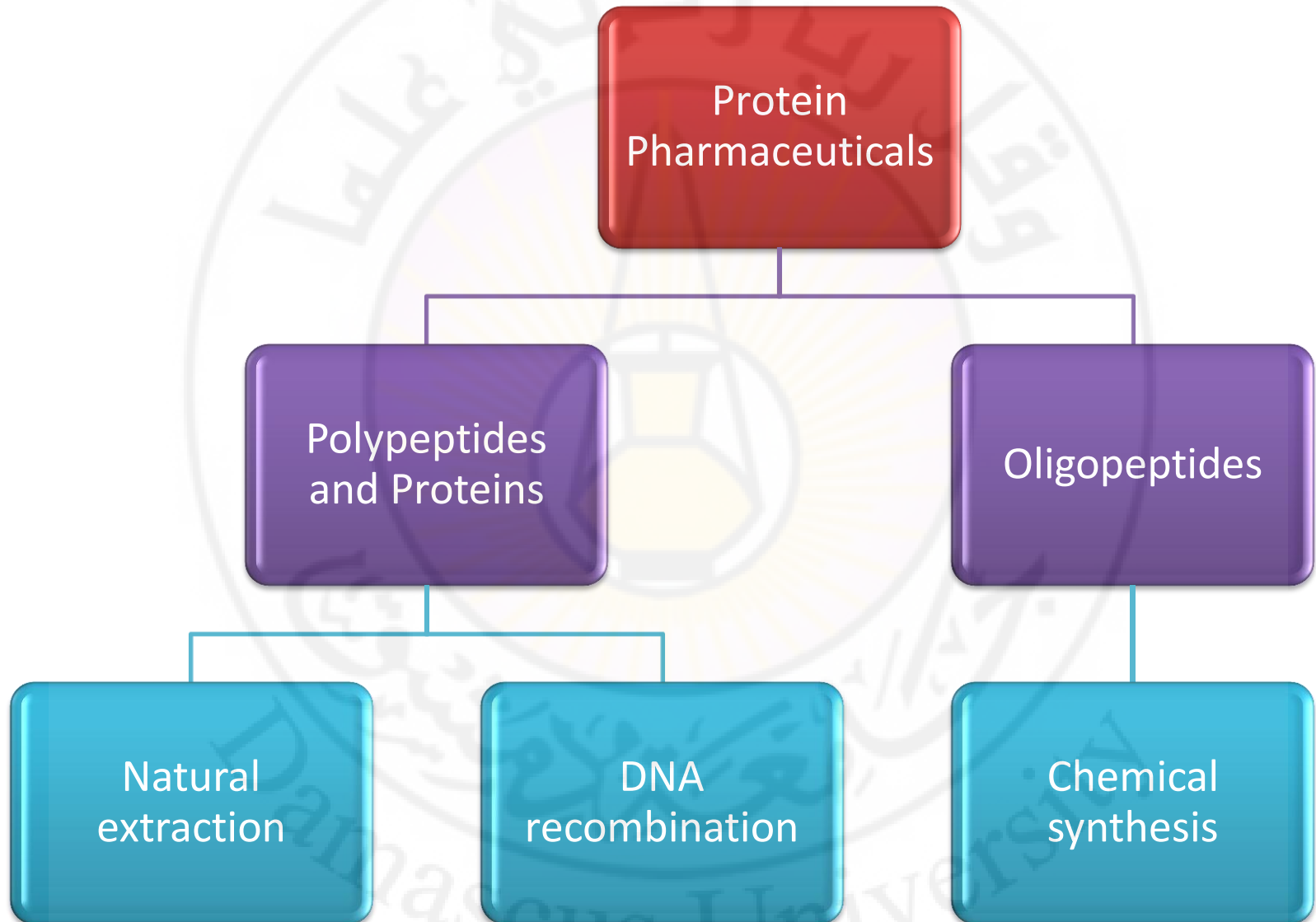
ترتبط تسمية الببتيد أو البروتين بوزنه الجزيئي

- Peptide الببتيد: consists of 2 or more amino acids
- Oligopeptide قليلات الببتيد: consists of 10 or fewer amino acids
- Polypeptides عديدة الببتيد: chains of 10 to 50 amino acids
- Proteins البروتينات: polypeptides of more than 50 amino acids

Naturally-Occurring Peptide & Protein Hormones

Hormone	Size (a.a.)	Location	Site of action includes
ACTH	39	Anterior pituitary	Adrenal cortex
ADH (VP)	9	Posterior pituitary	Kidney / CNS
Calcitonin	32	Thyroid	Bones
GH	191	Anterior pituitary	Bones / muscles / liver
Oxytocin	9	Posterior pituitary	Mammary gland. / Uterus / CNS
Prolactin	198	Anterior pituitary	Mammary gland
Insulin	51	Pancreas	Liver / Muscles / Adipocytes

إنتاج/اصطناع الأدوية الببتيدية والبروتينية



قليلات الببتيد Oligopeptides

- يمكن إنتاج قليلات الببتيد عبر:
 - بشكل رئيسي عبر الاصطناع على الطور الصلب Solid Phase Synthesis (SPS)
 - الاستخلاص من مصادر طبيعية (مثل الكالسيتونين من سمك السلمون)
 - تقانة الدنا المأشوب rDNA technology



- طوّر العالم Bruce Merrifield تقنية SPS عام 1963 وحاز عليها جائزة نوبل في الكيمياء عام 1984.

- وعلى الرغم من كون هذه التقنية فعّالة وذات مردود كبير وسريعة لكنها تطبّق فقط على الببتيدات ذات الوزن الجزيئي الصغير، كما أنها لا تمكّن بالطبع من إضافة تعديلات مشابهة للتعديلات اللاحقة للترجمة post-translational modifications كما يحدث في الخلايا الطبيعية.

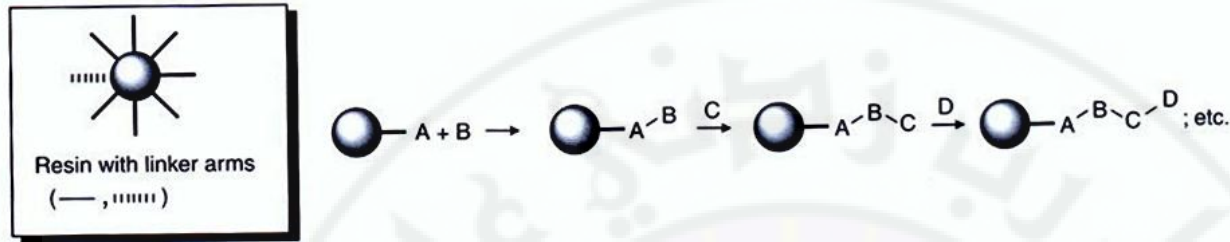
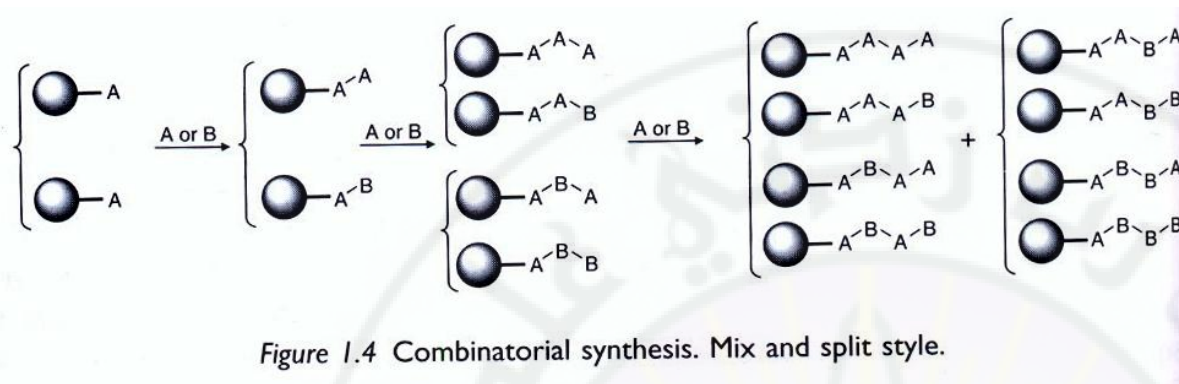


Figure 1.3 Single resin/single peptide (Merrifield style) methodology.

- تعتمد SPS على ربط حمض أميني ما براتين resin (جسم صلب حامل كيميائياً) ومن ثم فإن الحمض الأميني الأول يرتبط مع حمض أميني ثان وثالث وهكذا، إلى أن يكتمل العدد الكلي للحموض الأمينية التي يرغب بتضمينها في قليل الببتيد. وفي نهاية التفاعل، يتم فك الراتنج عن الببتيد ومقايضة الفعالية الوظيفية للببتيد المتشكل (أو لعدة ببتيديات).
- خلال تصنيع الببتيد، تتم تغطية (وحماية) المجموعات الوظيفية في السلاسل الجانبية للحموض الأمينية المستخدمة في اصطناع الببتيد بطرق كيميائية بحيث يُحصَر التفاعل بمجموعتي الكربوكسيل والأمين لتشكيل الرابطة الببتيدية فقط خلال التفاعل.
- وتكون العملية مؤتمتة بشكل كامل بحيث تعتبر من التقنيات عالية النتاج High throughput procedures والتي تصطنع مئات إلى آلاف الببتيديات في وقت قصير نسبياً، كما يمكن أن تتم عملية إضافة الحمض الأميني بشكل متتابع ومتغير بحيث يصطنع ما يطلق عليه بـ مكتبة ببتيديّة peptide library مؤلفة ببتيديات متغيرة تغطي عدداً كبيراً من احتمالات الارتباط بين الحموض الأمينية المستخدمة في التفاعل.



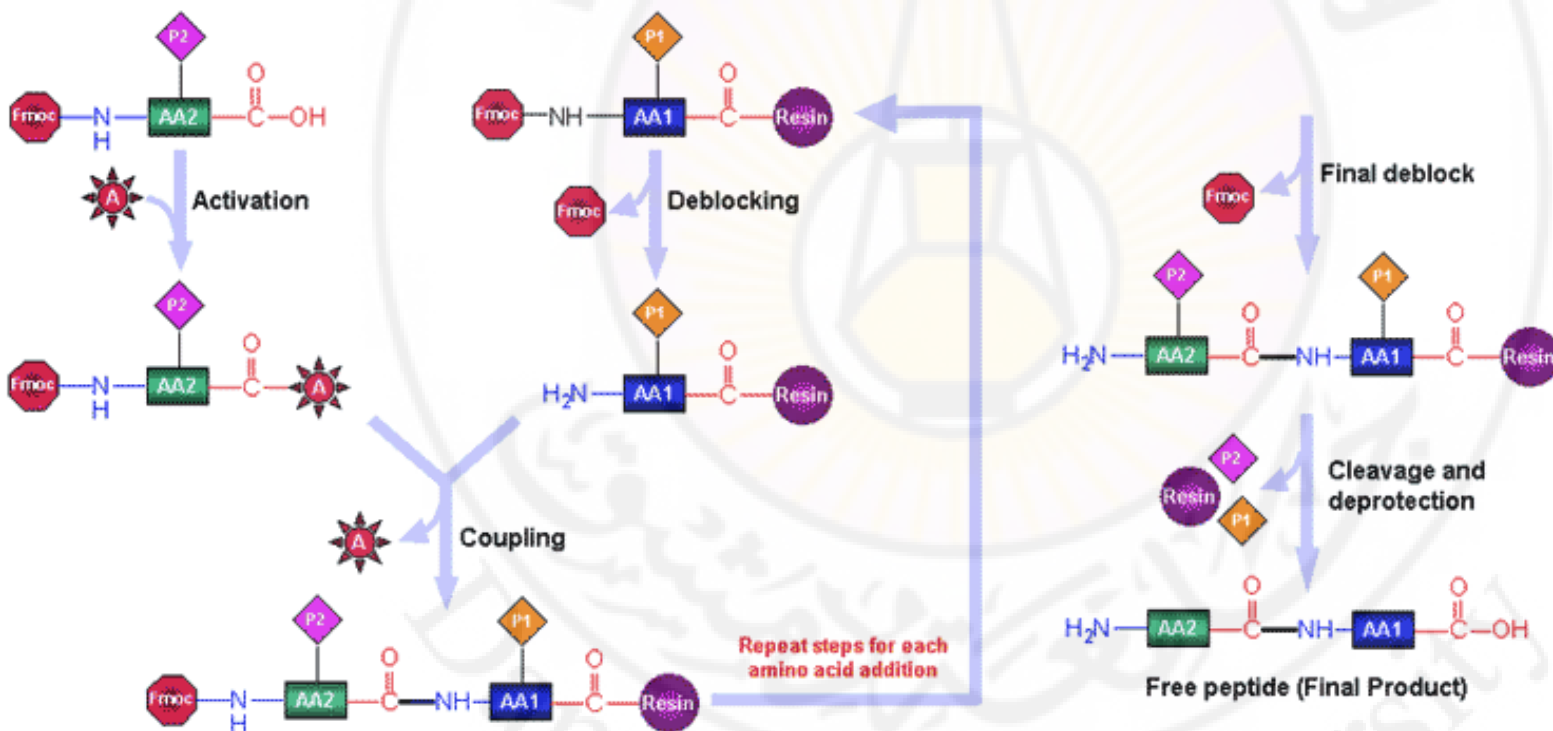
SPS



تصنيع الببتيدات على الطور الصلب

Solid Phase Peptide Synthesis

Solid Phase Peptide Synthesis Scheme



	Resin
	Amino acid 1
	Amino acid 2
	Fmoc-protecting group
	Activator
	Side-chain protecting group 1
	Side-chain protecting group 2



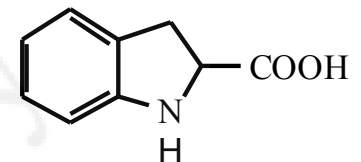
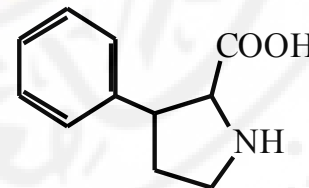
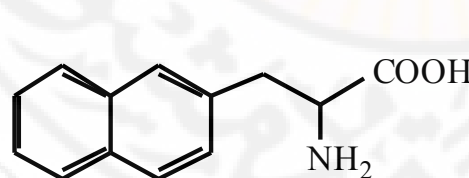
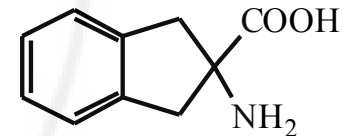
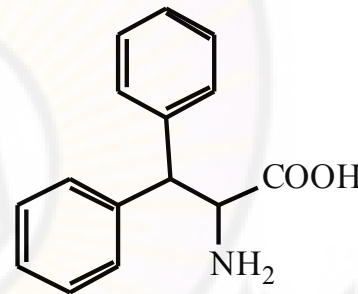
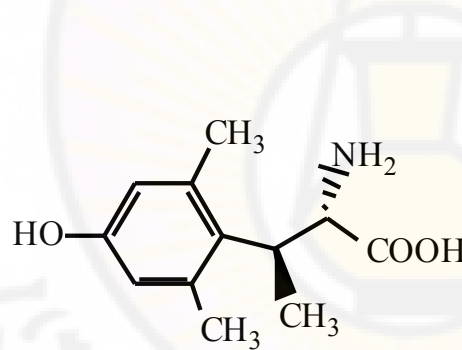
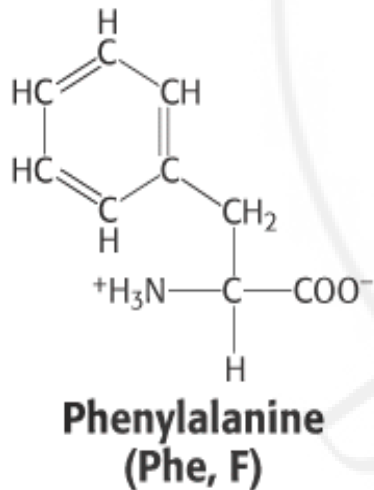
- تُمكن معرفة الببتيد الفعال دوائياً من خلال تقسيم الببتيدات الناتجة على مكتبات أصغر في أنابيب يحتوي كل منها على مجموعة من الببتيدات معروفة التتالي الببتيدي لكل الببتيدات المكوّنة للمجموعة (المكتبة الصغيرة). وبعد اختبار جميع المجموعات، يمكن تحديد الببتيد الفعال بكونه القاسم المشترك بين جميع الببتيدات التي أظهرت الفعالية الدوائية.
- إن ميزة هذه الطريقة هي اختصار الوقت بشكل كبير اللازم لتحديد التتالي الببتيدي الفعال

محاكيات الببتيدات Peptidomimetics

- الببتيدات هي جزيئات داخلية ترتبط بالعديد من المستقبلات، وتعمل كنواقل عصبية وهرمونات ومسكنات وغيرها.
- لا تشكّل الببتيدات الطبيعية أدوية جيّدة بسبب كونها:
 - تتخرّب بسرعة بإنزيمات البروتياز في السبيل المعدي المعوي وفي المصل
 - ذات توافر حيوي ضعيف بسبب انخفاض امتصاصها في الأمعاء
 - تطرح بسرعة
 - ترتبط بالعديد من المستقبلات
- إنّ محاكي الببتيد peptidomimetic هو مركّب يُحاكي أو يحصر التأثير الحيوي لببتيد داخلي عبر التأثير مع نفس المستقبل ودون امتلاكه الخصائص السابقة غير المرغوب بها.
- في منتصف 1970s، اكتشف تشابه عميق بين النهاية الأمينية لبنية beta-endorphin وبعض مماثلات المورفين. واقترح ذلك أن تلك المركبات يمكن أن ترتبط بالمستقبل ذاته بنفس الطريقة. ومنذ ذلك الحين، نشط الباحثون في اكتشاف وتطوير محاكيات للببتيدات يمكنها أن تمتلك تأثيراً دوائياً مهماً، واعتمدوا لذلك على منهجين:
 - الأول: المحافظة على جميع الثمالات الأمينية المهمة لارتباط الببتيد بمستقبله وأدائه للفعالية الدوائية
 - الثاني: استبدال جميع الثمالات الأخرى بأجزاء غير ببتيدية تزيد من ثباتية الجزيء وتثبّت الببتيد بالشكل الفراغي conformation الأنسب للارتباط بالمستقبل.

مثال 1: استبدال الفيل ألانين

- عند استبدال الحمض الأميني الفيل ألانين بأي من الجزيئات الأخرى الموضحة بالشكل فإن ذلك يؤدي إلى زيادة حب الدسم (امتصاص)، وصلابة الشكل (rigid conformation، والوقاية من إنزيمات البروتياز.



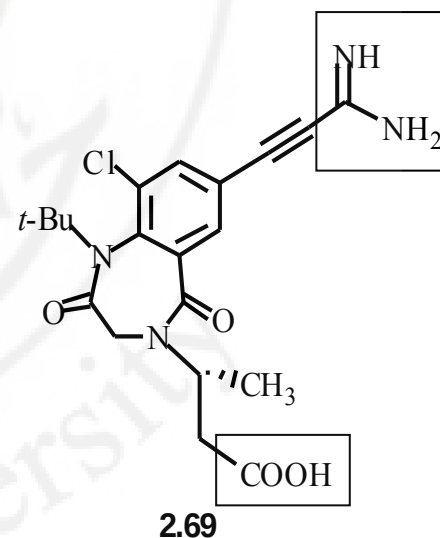
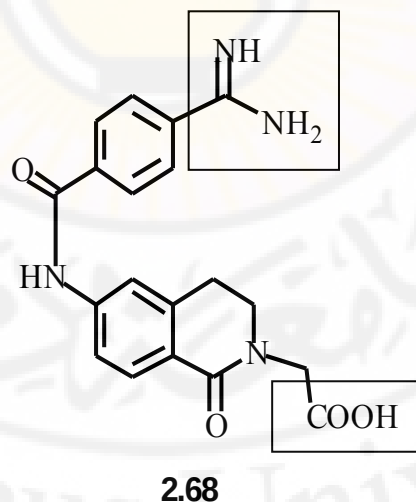
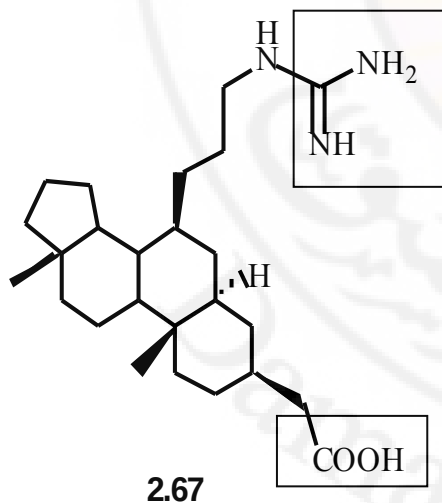
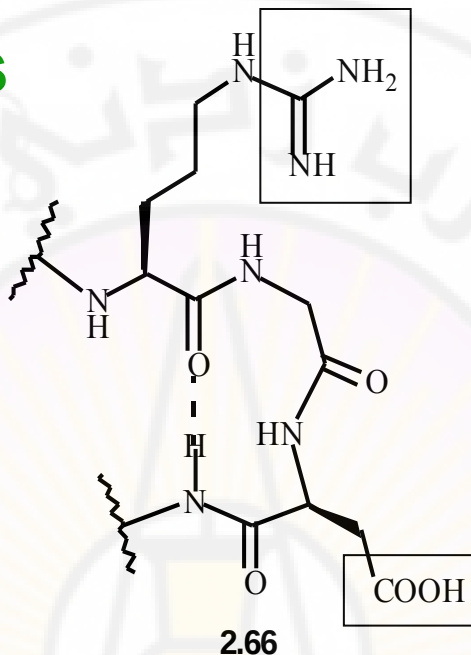
مثال 2: محاكيات الببتيد RGD

- نتيجة أبحاث عديدة لدراسة بنية مضادات التخثر في سم الثعابين، والتي تسبب نزفاً مميتاً أحياناً، تبين أن آلية تلك جزيئات تتعلّق بتداخلها مع ارتباط بروتين الفيبرينوجين/الفيبرين مع المستقبل GPIIb/IIIa على سطح الصفائح platelets، حيث تبين أن المنطقة الأهم في بروتين الفيبرينوجين والخاصة بالارتباط إلى المستقبل تمتلك الببتيد الثلاثي (أرجينين، غليسين، أسبارتات) RGD. ويمكن للببتيدات التي تمتلك RGD في بنيتها أن تنافس الفيبرينوجين على الارتباط مع GPIIb/IIIa وبالتالي تمنع تخثر الدم.
- إثر ذلك، صمّمت العديد من محاكيات الببتيد بناءً على الفرضية أن الحمض الأميني الغليسين G يشكل رابطاً فقط بين R و D، وأن هذين الأخيرين هما الثمالتان المهمتان للفعالية.
- وتم تطوير العديد من المركبات التي تستطيع الارتباط ببروتين GPIIb/IIIa بعد استبدال الغليسين بعدد من الجزيئات الصلبة مثل الستيروئيدات أو الإيزوكينولون أو البنزوديازيبينديون

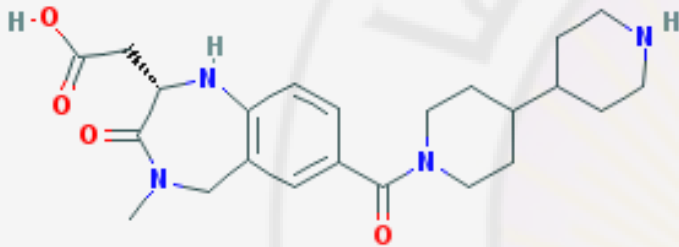
RGD peptidomimetics

Arg-Gly-Asp (RGD)

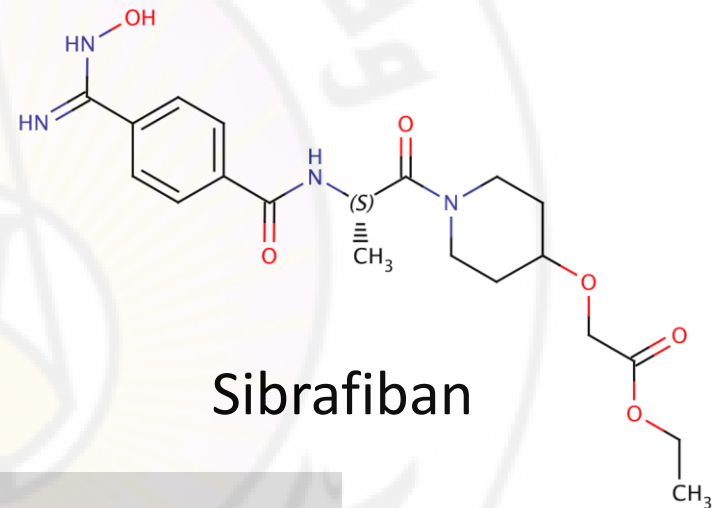
common β -turn
motif that binds to
GPIIb/IIIa receptors



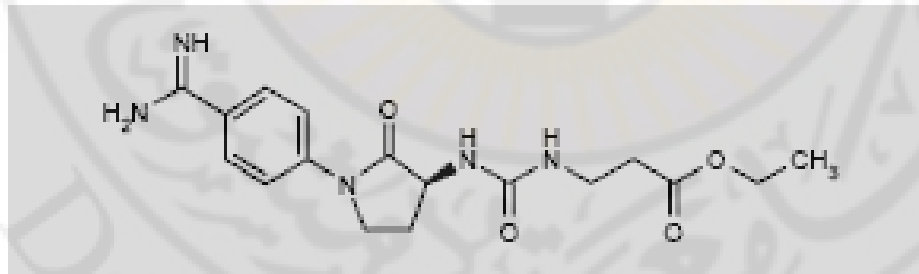
طوّرت عدة محاكيات لببتيد RGD وأدرج بعضها في التجارب السريرية ووصل بعضها
الطور الثالث إلا أن تلك التجارب أنهيت إما بسبب عدم إظهار الفعالية المنشودة أو بسبب
النزف الشديد الذي ترافق مع زيادة في معدل الوفيات بالمقارنة مع الدواء الغفل Placebo



Lotrafiban



Sibrafiban



Orbofiban

التقانة الحيوية الصيدلانية والبروتينات الحيوية الصيدلانية

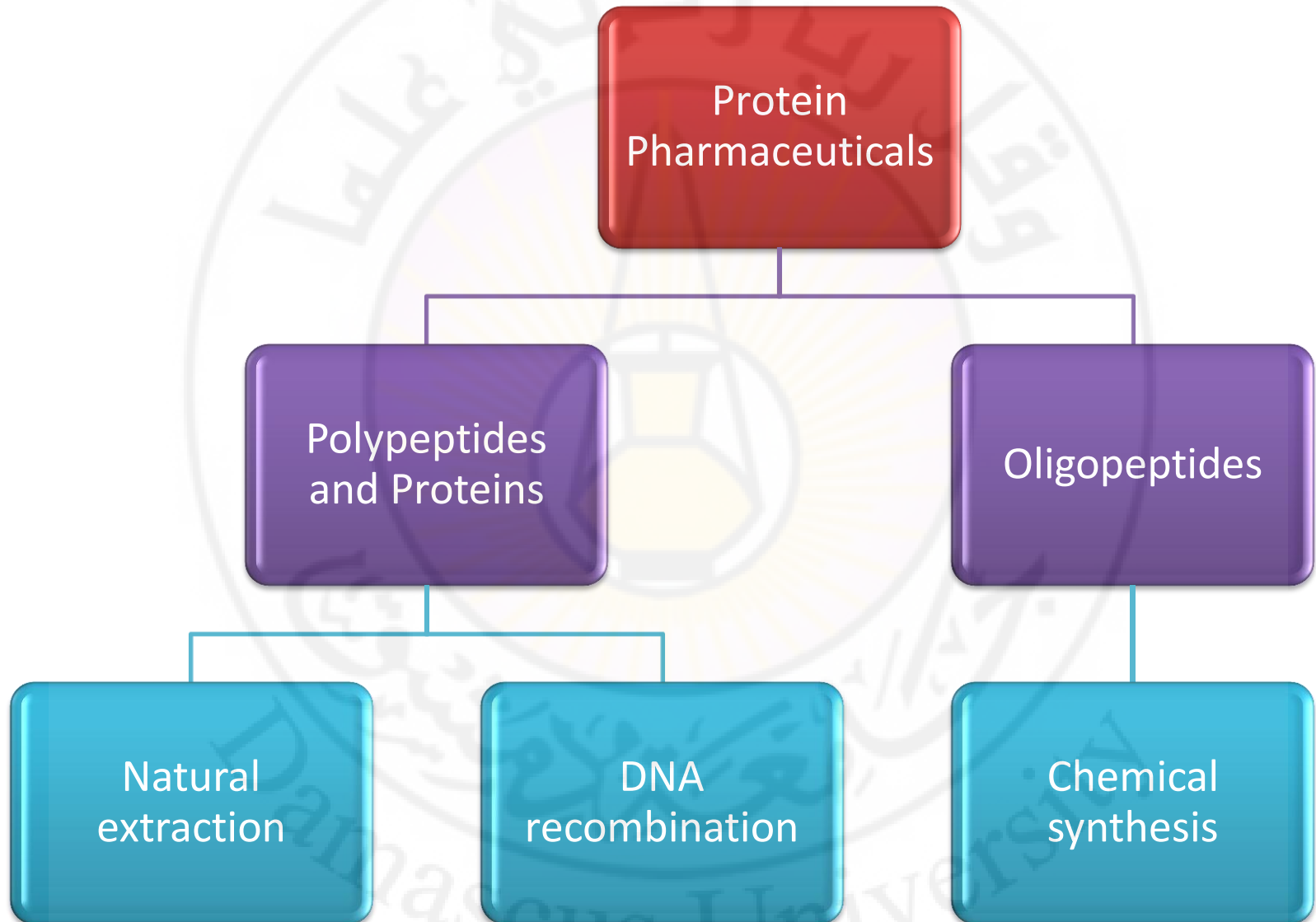
PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY & BIOPHARMACEUTICAL PROTEINS

Biopharmaceutical Proteins on the Market
Production of Pharmaceutical Proteins

The background of the slide features a large, faint watermark of the Damascus University logo. The logo is circular, with the university's name in Arabic 'جامعة دمشق' at the top and 'Damascus University' at the bottom. In the center is a stylized emblem featuring a sunburst and a central figure.

**في نهاية هذه المحاضرة سنكون قادرين على إدراك طرق
استخلاص البروتينات الدوائية عبر تجزئة البلازما
Plasma fractionation**

إنتاج/اصطناع الأدوية الببتيدية والبروتينية



١. تحضير البروتينات عبر تجزيء البلازما (الاستخلاص) Plasma fractionation/Extraction



- يجري تحضير البروتينات
المشتقة من البلازما
بإحدى الطرائق التالية
1. طريقة Cohn
 2. طريقة الصدمة الحرارية Heat Shock
 3. طريقة الاستشراب اللوني Chromatography

النسب المئوية (%) لمكونات الدم

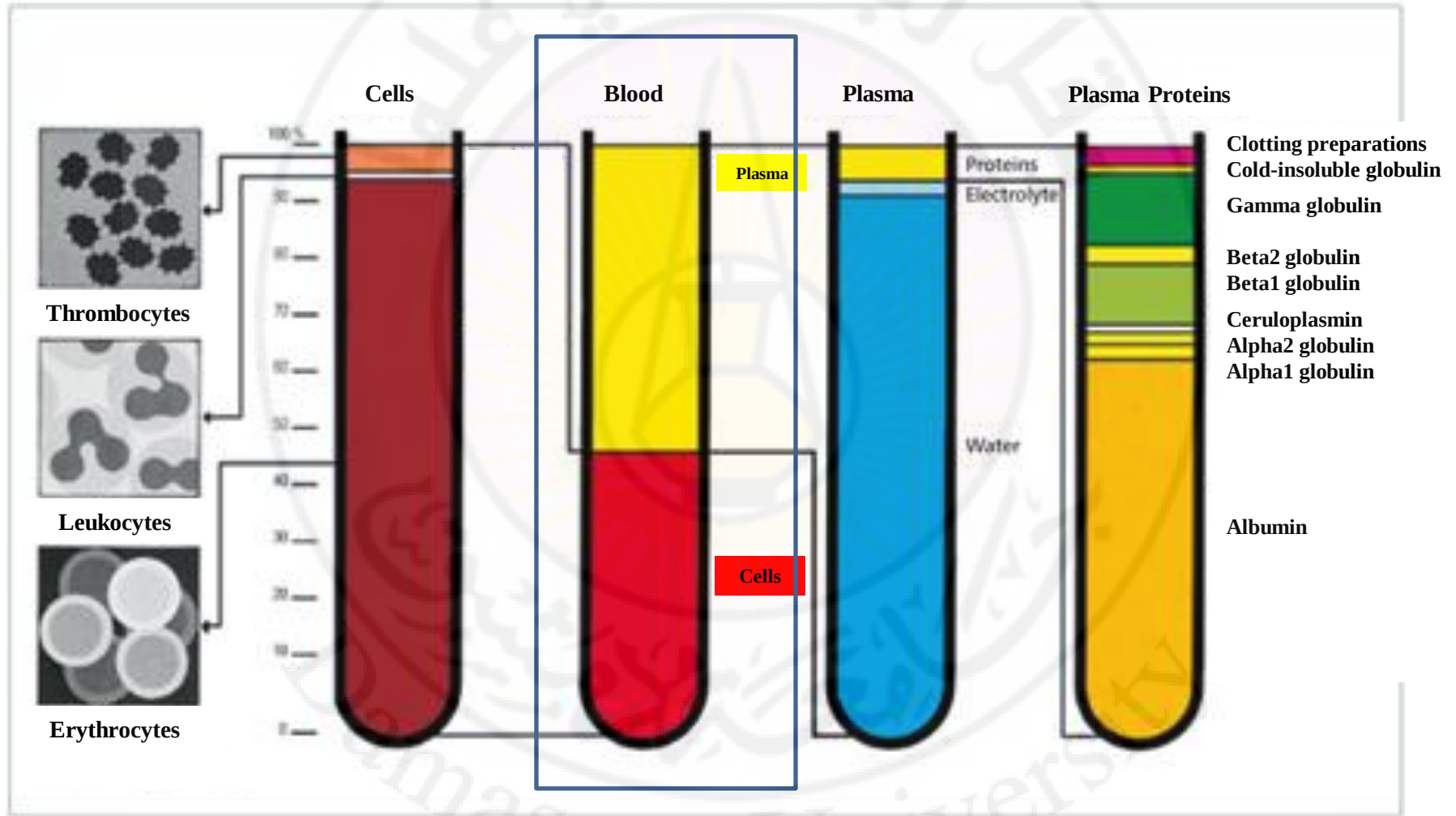


Table 1. Plasma proteins of current therapeutic interest; the wide concentration range is one of the challenges of designing process separation processes.

Protein	Concentration in Plasma	Indication
Albumin	40 g/L	Volume restoration after trauma, shock, burns
Alpha ₁ proteinase inhibitor	1.5 mg/mL	Hereditary emphysema
Anti-D IgG	titer varies ^a	Rh prophylaxis in pregnancy and childbirth
Antithrombin III	100 µg/mL	Antithrombin III deficiency
C1-inhibitor	170 µg/mL	Hereditary angioedema
Factor IX	10 µg/mL	Hemophilia B
Factor VIII	0.5 µg/L	Factor VII deficiency
Factor XI	0.3 µg/mL	Hemophilia B
Factor XIII	30 µg/mL	Factor XIII deficiency
Fibrinogen	3 g/L	Tissue sealant component
Fibronectin	300 µg/mL	Wound healing
Hepatitis B IgG	titer varies ^a	Hepatitis immunity
Immunoglobulin G	Up to 12.5 g/L	Primary and secondary immune deficiency
Measles IgG	titer varies ^a	Measles protection and treatment
Protein C	4 µg/mL	Neonatal thrombosis
Rabies IgG	titer varies ^a	Rabies risk
Tetanus IgG	titer varies ^a	Tetanus protection and treatment
Thrombin	150 µg/mL ^b	Tissue sealant component
Varicella Zoster IgG	titer varies ^a	Chicken pox protection
Von Willebrand factor	10 µg	Von Willebrand's disease

^aTiters (antibody concentrations) vary in µg/mL ranges. ^bAs prothrombin

مقدمة

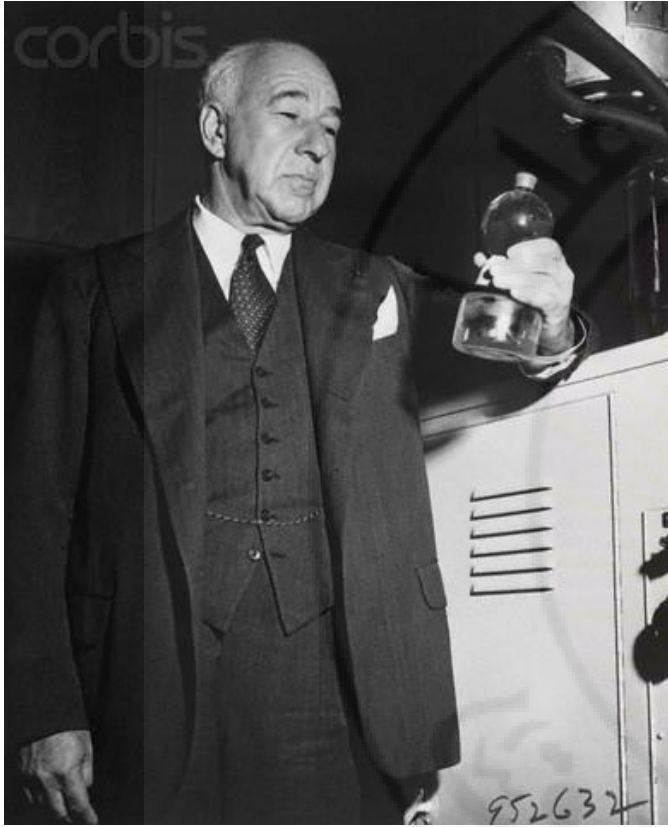
- تحتوي البلازما على 60 غ/لتر من البروتينات، يُستفاد من 57 غراماً منها لتحضير منتجات بروتينية علاجية!

مقدمة

- يعدّ تجزيء البروتينات protein fractionation الصناعة الأضخم لإنتاج البروتينات العلاجية، حيث ينتج 500 طن من ألبومين المصل البشري human serum (HAS) و 40 طناً من الغلوبولينات المناعية المجهزة للحقن الوريدي intravenous immunoglobulins (IVIG) سنوياً من 22 مليون لتر من البلازما. وتزوّد هذه الصناعة، والتي يبلغ حجم وارداتها قرابة 7 مليارات سنوياً بالبروتينات لأكثر من مليون مريض كل عام.
- وتنتج خمس شركات فقط أكثر من 70% من هذه البروتينات العلاجية المشتقة من البلازما وهي
 - Alpha Therapeutics
 - Aventis Behring
 - Bayer Biological Products
 - Baxter Bioscience
 - CSL/ZLB Biopharma

مقدمة

- ولا تفي كمية المنتجات المتوفرة حاجة السوق الدوائية من هذه الأدوية البيولوجية، حيث يغطي المنتج منها فقط عُشر حاجة السوق، وهي بالكاد تكفي مجتمعةً سوق الولايات المتحدة والدول الأوروبية فقط.
- أسس العالم Edwin J. Cohn من خلال عمله قبل وخلال الحرب العالمية الثانية لصناعة تجزيء البروتينات المشتقة من البلازما plasma-derived protein fractionation. ونتيجة عمله الدؤوب ذاك، تم ترخيص أول مستحضر للألبومين البشري في آب 1941، ومستحضر IgG المعدّ للحقن العضلي في أيلول 1943، وأول مستحضر لـ IVIG في أيلول 1981.
- واليوم، يمكن إنتاج البروتينات المشتقة من البلازما بإحدى الطرائق الثلاث:
 - طريقة Cohn
 - طريقة الصدمة الحرارية
 - طرق الاستشراب اللوني



Edwin Cohn 1892-1953

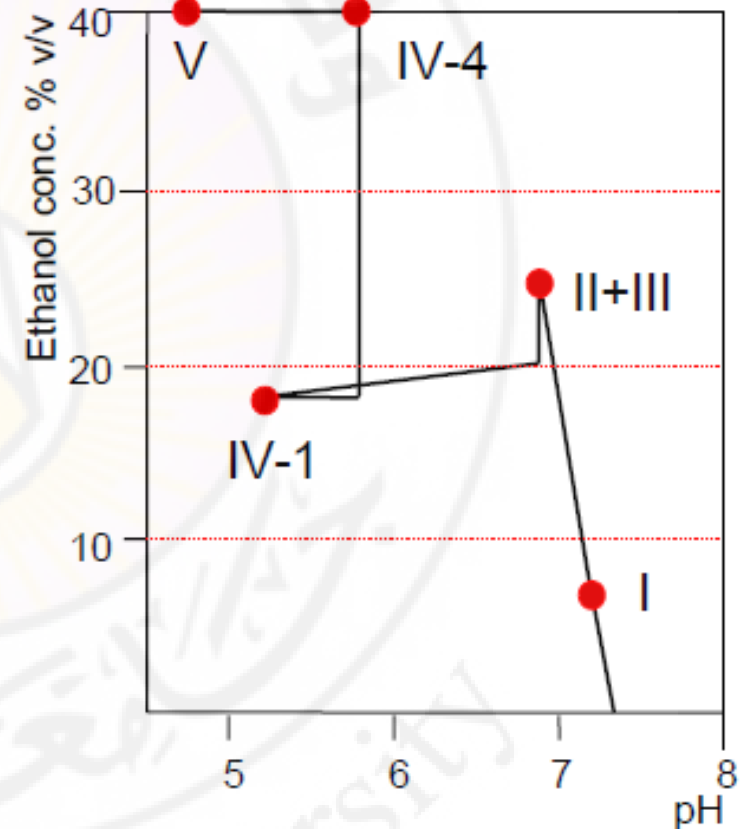
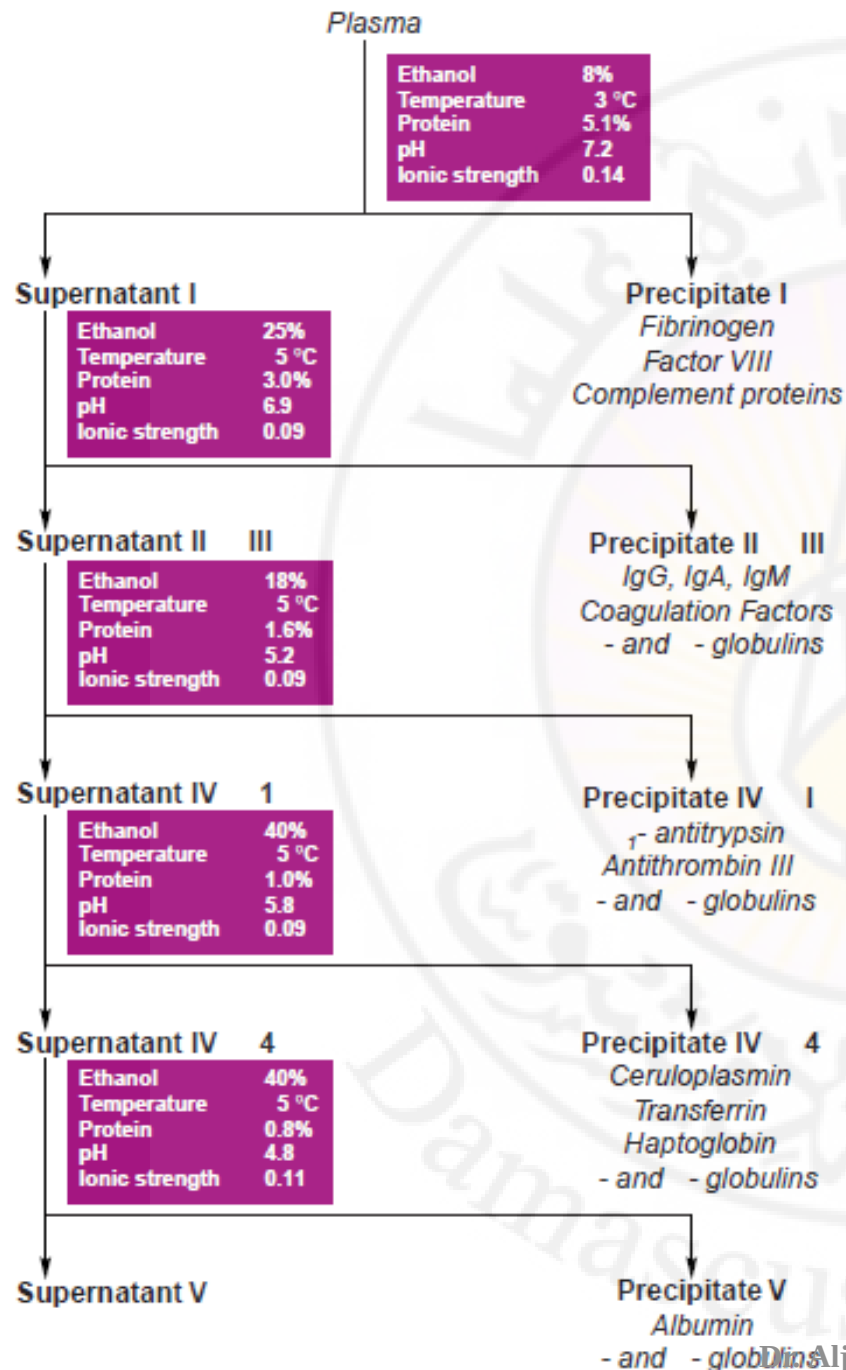
Helped hundreds of soldiers during WWII with proteins extracted from plasma. Nominated for Noble Prize 1950 in Physiology or Medicine

Fall 2019

١. طريقة Cohn Cohn procedure

- تعتمد طريقة كون على استخلاص وترسيب البروتينات عبر تغيير تراكيز الكحول الإيثيلي ودرجات الباهاء في مستخلصات بلازما الدم، إضافةً إلى التبريد، حيث ترفع تراكيز الإيثانول وتخفض درجة الباهاء بشكل تدريجي لا يؤدي إلى تخرب البروتينات.
- ينتج عن طريقة Cohn خمسة رواسب تضم عدة أنواع من البروتينات التي تترسب بدرجة باهاء وتراكيز إيثانول محددة.
- لا تزال هذه الطريقة تستخدم بشكل واسع لتحضير بروتين الألبومين

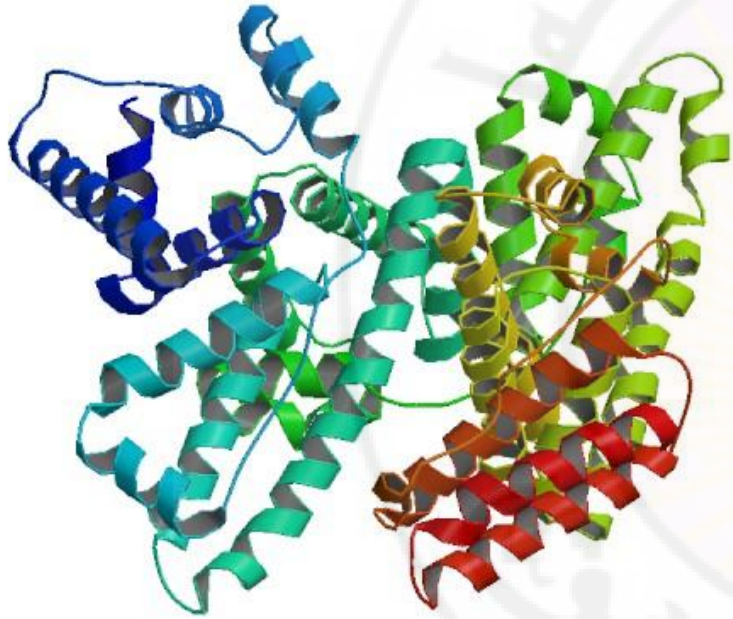
طريقة Cohn



توزع بروتينات البلازما باستخدام طريقة Cohn

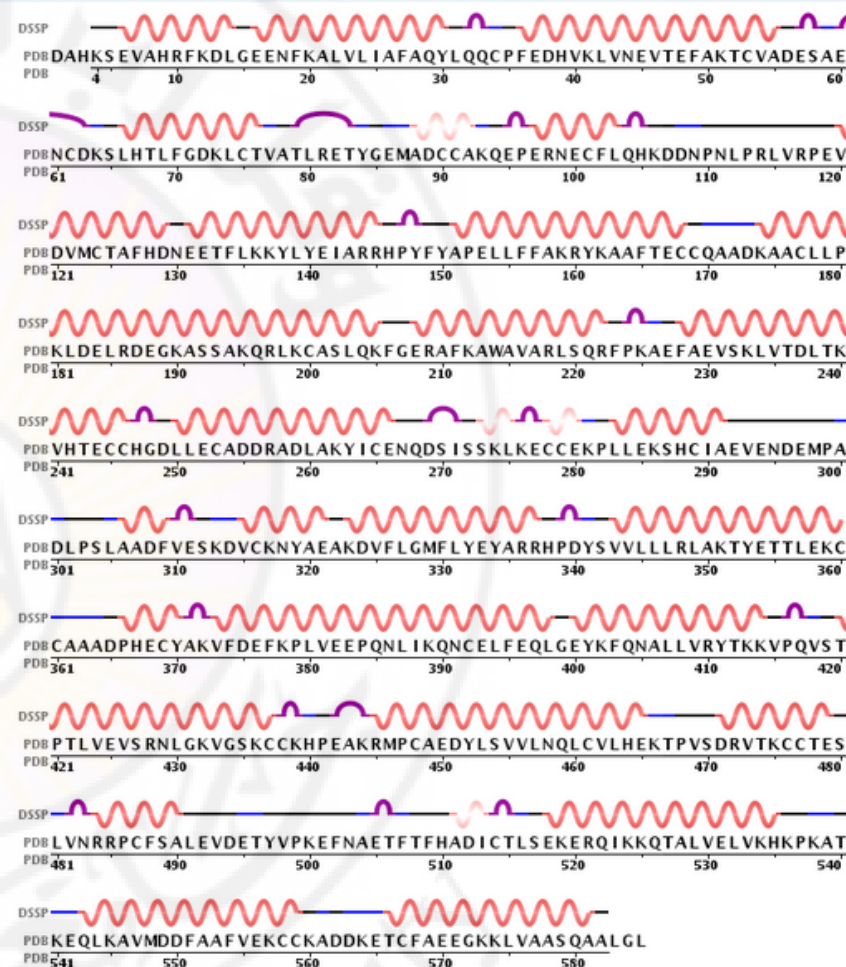
Fraction	Ethyl alcohol (%)	pH	Proteins
I	8-10	7.2	Fibrinogen, Factor VIII, Fibronectin, C1q, C1r, C1s
II + III	25	6.9	IgG, IgA, IgM, Factors II, Factor VII, Factor IX, Factor X and Globulins
IV - 1	18	5.2	α - and β -Globulins, AT-III, α_1 -Antitrypsin, IgM, Complement components
IV - 4	40	5.8	α - and β -Globulins, Transferrin, Cerruplasmin, Haptoglobin
V	40	4.8	Albumin, α - and β -Globulins

II. طريقة الصدمة الحرارية Heat Shock

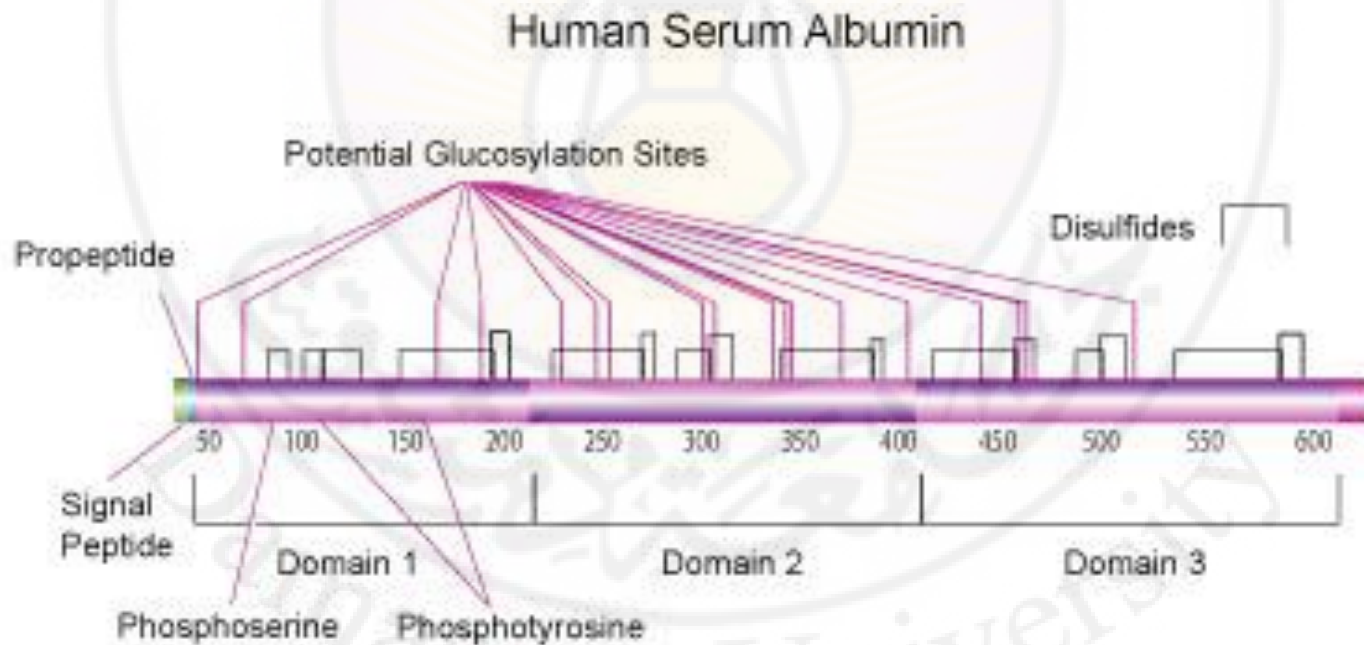


- تعتمد طريقة الصدمة الحرارية على الثباتية الحرارية للألبومين بالمقارنة مع معظم بروتينات البلازما الأخرى. فالألبومين لا يتمسخ بشكل تلقائي، ويمكن لمحاليل الألبومين أن تسخن للدرجة 60 مئوية لتنشيط العوامل الممرضة.
- لدى استعمال حمض الكابريلي caprylic acid بتركيز 0.04 مول/ل، يمكن استخلاص الألبومين من المصل في الدرجة 60 مئوية وباهاء 5، بينما تتمسخ بقية بروتينات البلازما وتصبح غير منحلة في الشروط نفسها.
- يمكن تركيز الألبومين المستخلص إما عبر الترشيح الفائق Ultrafiltration أو بالترسيب. وتبلغ نقاوة الألبومين المستخلص بهذه الطريقة أعلى من 98%.

- Albumin is a major plasma protein and binds to the number of drugs altering their pharmacokinetics. It is single chain polypeptide of 585 residues, which comprises about 60% of the plasma protein.
- Albumin is chiefly responsible for maintenance of blood tonic pressure and pH.
- The human serum albumin (HSA) is named a multifunctional plasma carrier protein because of its ability to bind to an unusually broad spectrum of ligands. These includes inorganic cations, organic anions, various drugs, amino acids, and perhaps most important and physiologically available hydrophobic molecules such as bilirubin and fatty acids



- Its primary structure is characterized by low content of tryptophan, a high content of cysteine stabilizing a series of main loops, and charged amino acids such as aspartic and glutamic acids, lysine and arginine. The apparent repeating structural features, large and small loops and connecting segments, suggest that albumin evolved through a series of gene duplications. Its secondary structure is constituted of 67% of helix of six turns and 17 disulfide bridge. The tertiary structure is composed by three domains I, II, III.



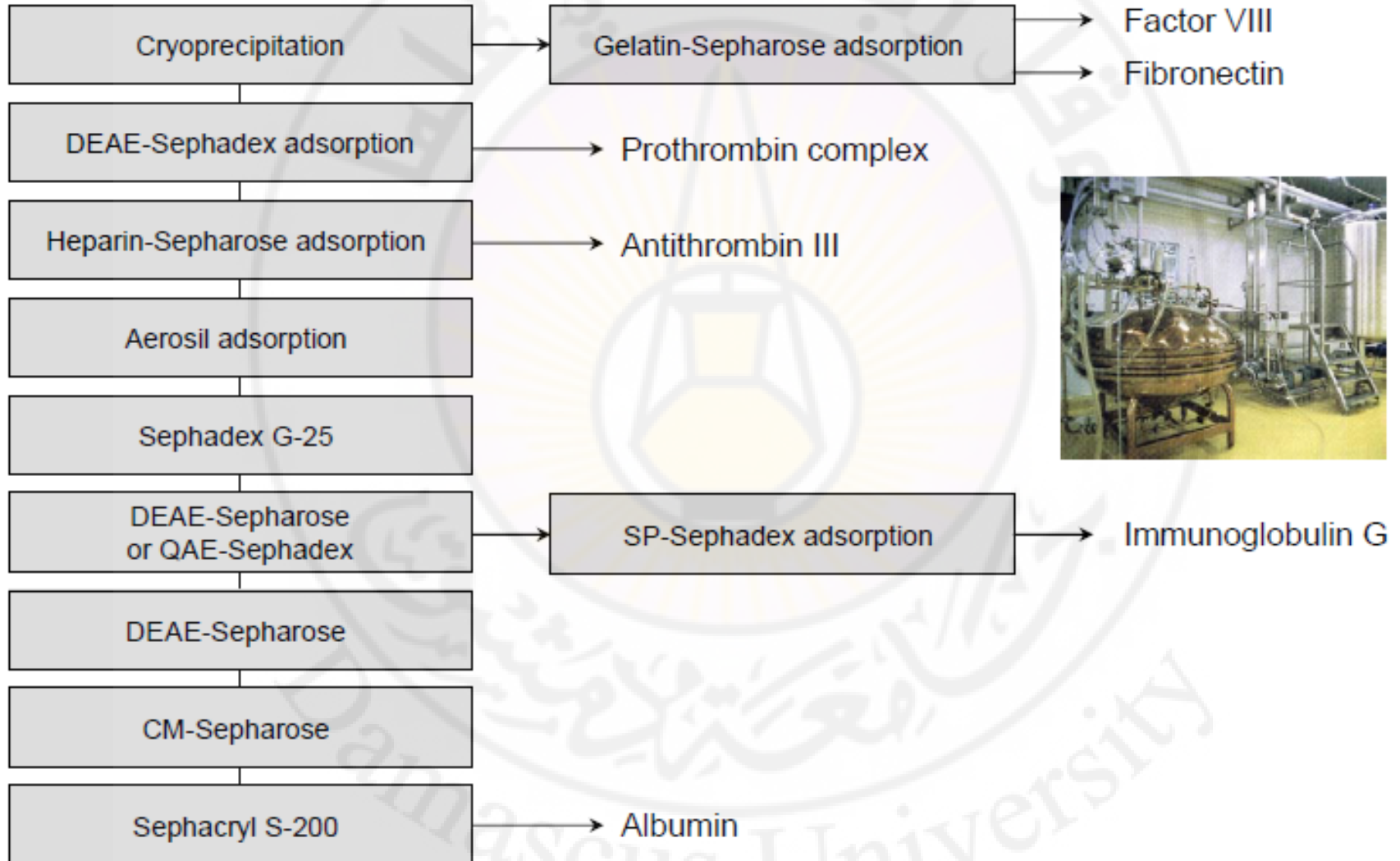
III. طريقة الاستشراب اللوني Chromatography process

- يعدّ الاستشراب اللوني أهم الطرق للتقليل من عدم تجانس الألبومين، وتستخدم العديد من التقنيات لتنقية الألبومين. ودون شك يعد الاستشراب اللوني بالإلفة affinity chromatography أهم الطرق المستخدمة في تنقية البروتينات ويعتمد على الارتباط النوعي للجزيئات إما بواسطة أضداد نوعية تستخدم في التقاط capture البروتينات النوعية لها أو باستخدام لجينات ligands تلتقط البروتينات الرابطة لها.
- تستخدم أنواع متغايرة من الراتينات resins والتي تختلف في خصائصها الكيميائية والفيزيائية، كالمقطبية والشحنة ودرجة الادمصاص adsorption والنفوذية، وغيرها.
- هنالك العديد من طرق الاستشراب اللوني تعتمد على خواص مميزة للبروتينات التي يرغب فصلها منها
 - الاستشراب اللوني الكاره للماء hydrophobic chromatography، ويعتمد على فصل البروتينات الكارهة للماء وتكوين الحموض الأمينية غير القطبية في البروتين المعزول،
 - الاستشراب اللوني المبادل للأيونات Ion exchange، ويعتمد على شحنة البروتينات التي تتركسها الحموض الأمينية المشحونة charged amino acids في البروتين المعزول،
 - الاستشراب المعتمد على خصائص كيميائية معينة للبروتينات المعزولة
 - الاستشراب بالإلفة

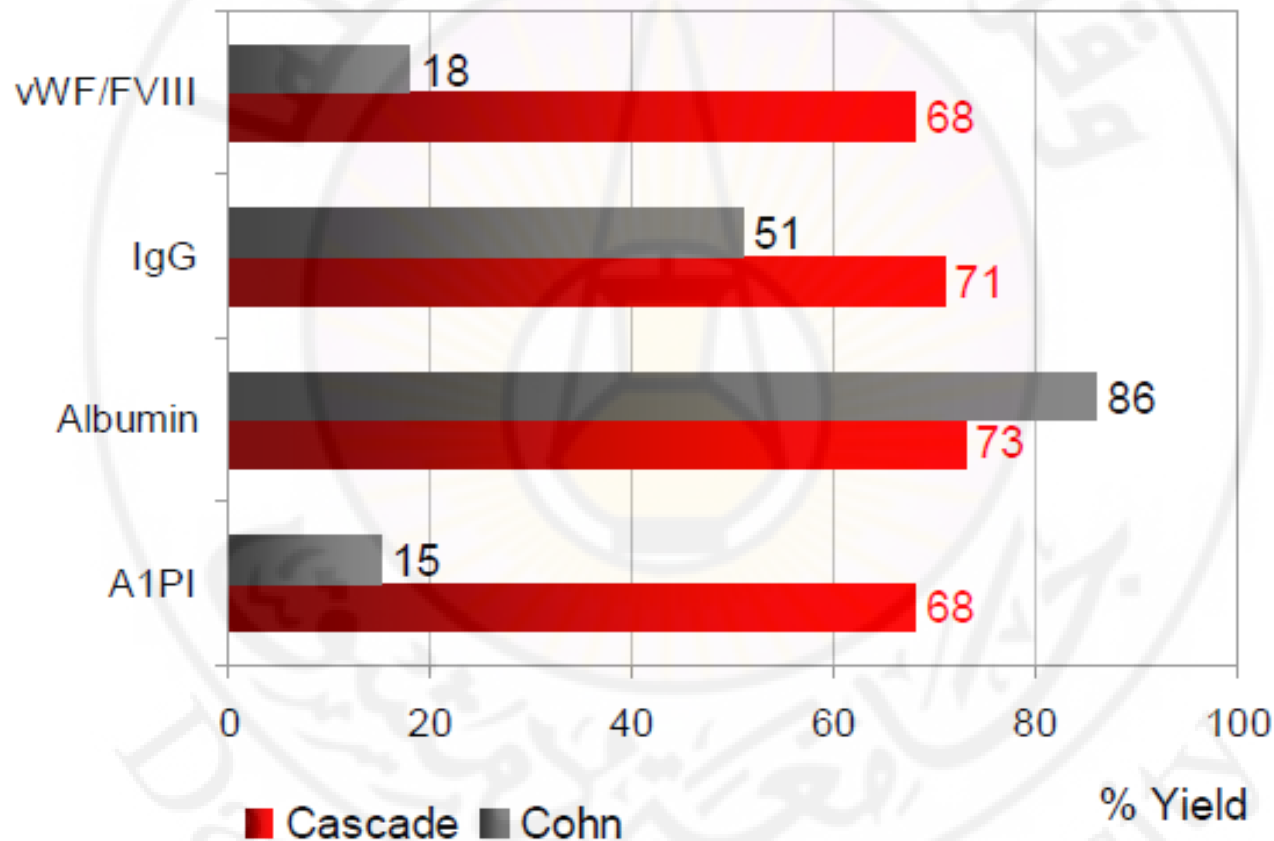
مقارنة بين أنماط مختلفة من طرق الاستشراب اللوني

Property	Affinity Bio-specific	Group-specific	Ion-exchange	Hydrophobic/ Reversed phase
Adsorption capacity	Low	Medium-high	High	Medium-high
Selectivity	High	Medium-high	Low-medium	Low-medium
Recovery	Medium	High	High	Medium
Loading condition	Mild	Mild	Mild	Sometimes harsh
Elution condition	Harsh	Mild	Mild	Mild
Regeneration	Incomplete	Complete	Complete	Incomplete
Cost	High	Low	Low	Low

مثال عن تجزيء البلازما باستخدام شلال cascade من طرق متغايرة للاستشراب اللوني.
تطبق هذه الطرق لاستخلاص العديد من بروتينات البلازما وخاصة عوامل التخثر



مقارنة مردود استخلاص بعض البروتينات من البلازما بطريقتي Cohn أو شلال cascade من الاستشراب اللوني المتغاير (غير المتجانس)



بعض المنتجات البروتينية العلاجية المشتقة من البلازما Plasma-derived therapeutic products (2010)

Albumin	(> 20)*	Von Willebrand factor	(6)
Immunoglobulin	(> 20)	Fibrinogen	(6)
Factor VIII	(> 20)	Thrombin	(3)
Factor IX	(17)	Fibrin sealant	(6)
Factor VII	(3)	Prothrombin complex	(15)
Factor XI	(2)	Antithrombin	(15)
Factor XIII	(2)	α -1-Antitrypsin	(4)
Protein C	(2)	C1-Esterase inhibitor	(2)
Activated protein C	(1)	Haptoglobin	(1)
Factor VIIa	(1)	Activated Prothrombin complex	(1)

* Number of manufacturers worldwide

Buminate[®], Baxter

Prepared by Cohn cryoprecipitation method

- Buminate[®] 5%, Albumin (Human), USP, 5% Solution is indicated for Hypovolemia, Hypoalbuminemia due to general causes and burns, and use during or prior to cardiopulmonary bypass surgery.
- Buminate[®] 25%, Albumin (Human), USP, 25% Solution is indicated for Hypovolemia, Hypoalbuminemia due to general causes, burns, adult respiratory distress syndrome (ARDS), and nephrosis, for use during or prior to cardiopulmonary bypass surgery, and Hemolytic disease of the newborn (HDN).



Carimune® NF

CSL Behring (prepared by chromatography and nanofiltration)

- Carimune® NF is indicated for the maintenance treatment of patients with primary immunodeficiencies (PID, e.g., common variable immunodeficiency, X-linked agammaglobulinemia, severe combined immunodeficiency).



Carimune® NF is preferable to intramuscular Immune Globulin (Human) preparations in treating patients who require an immediate and large increase in the intravascular immunoglobulin level

Optivate®

Bio Product Laboratories (BPL), (prepared by affinity chromatography)

- Plasma-derived human factor VIII and von Willebrand factor (VWF)
- Optivate® is presented as a powder and solvent for solution for injection containing nominally 250 IU, 500 IU or 1000 IU human coagulation factor VIII per vial.
- Treatment and prophylaxis of bleeding in patients with haemophilia A (congenital factor VIII deficiency).



مساوي البروتينات المشتقة من البلازما

- تتمتع البروتينات الطبيعية المشتقة من البلازما بعدد من المساوي تشمل ما يلي:
 - لا تتوفر المصادر الطبيعية بشكل كبير
 - من الصعب أن تحقق اكتفاء حاجة السوق
 - طريقة الاستخلاص صعبة ومتطلّبة
 - يمكن أن تؤدي إلى تفاعلات مناعية
 - يمكن أن تحتوي مستحضراتها جراثيم وفيروسات ممرضة
- لهذا كله، تبرز دور البروتينات المحضّرة بتقانة الدنا المأشوب كبديل هام وناجع للبروتينات المستخلصة من البلازما

التقانة الحيوية الصيدلانية والبروتينات الحيوية الصيدلانية

PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY & BIOPHARMACEUTICAL PROTEINS

Biopharmaceutical Proteins on the Market
Production of Pharmaceutical Proteins

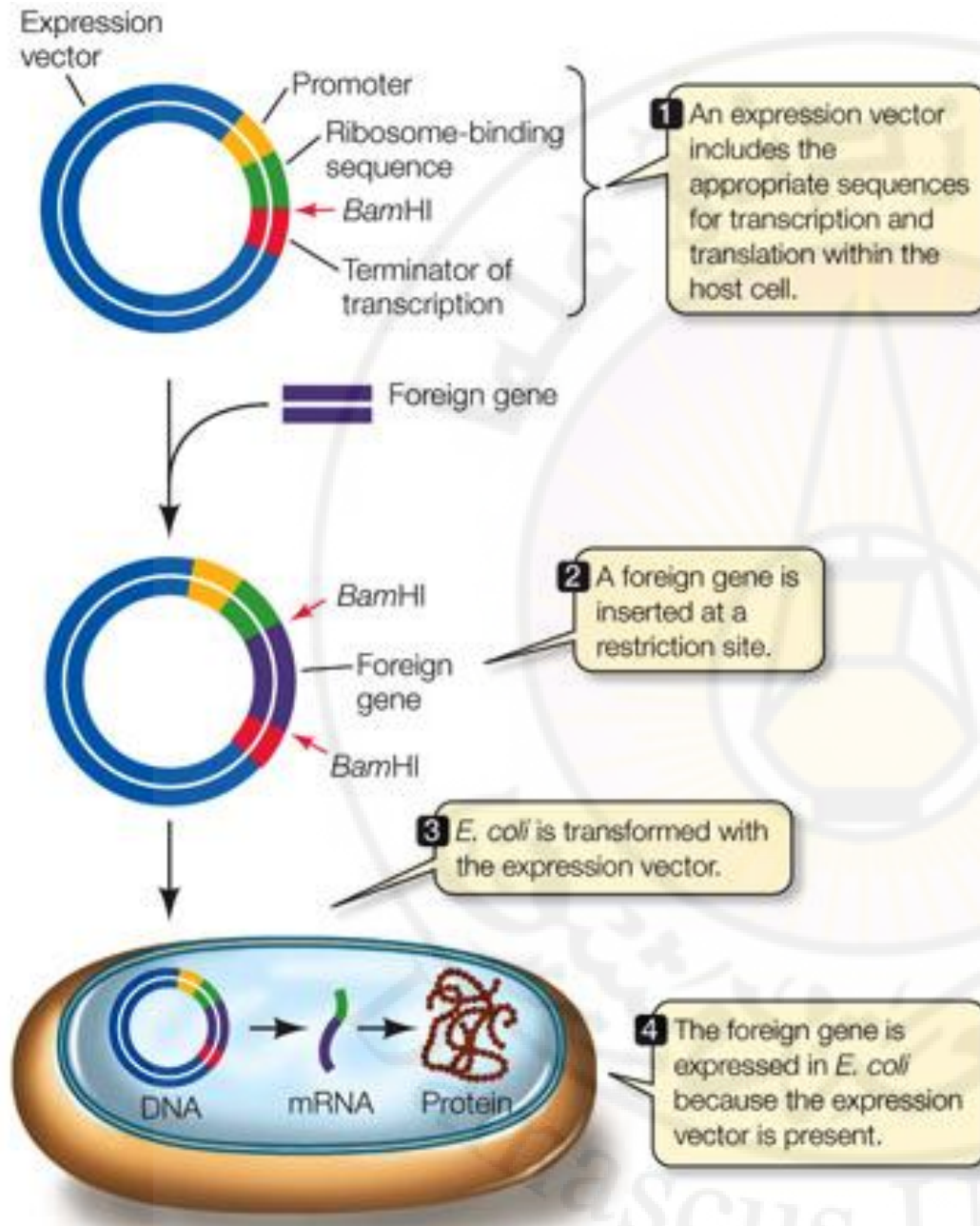
في نهاية هذه المحاضرة سنكون قادرين على:

التعرّف على المنظومات المستخدمة للتعبير عن البروتينات protein
expression systems لإنتاج البروتينات المأشوبة

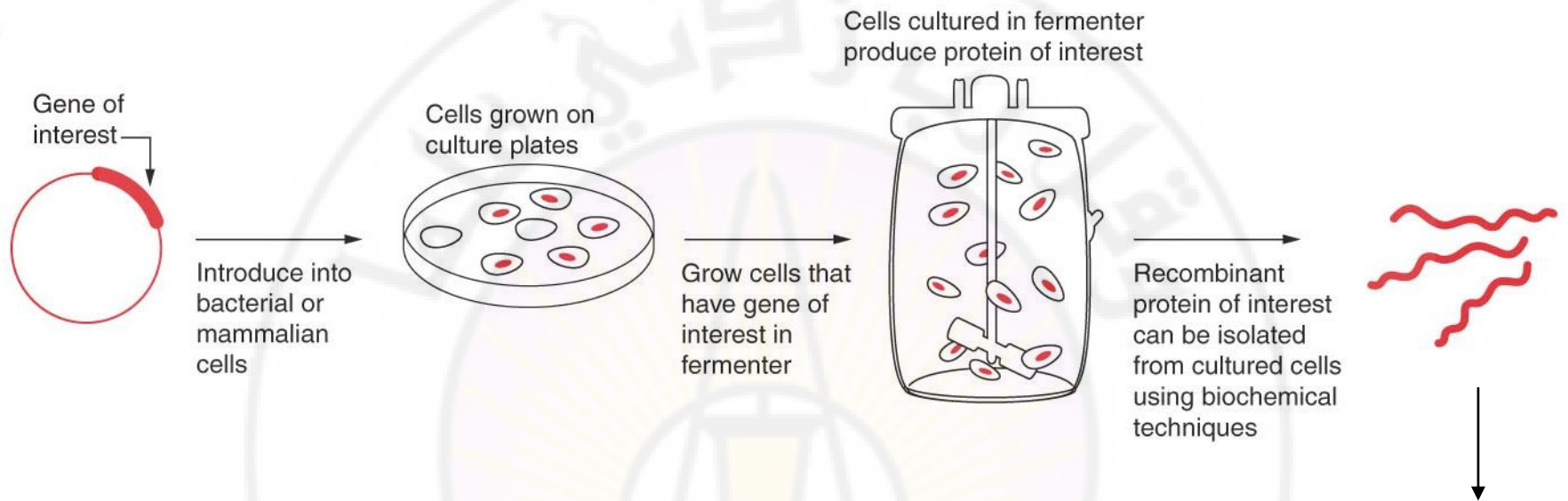
The logo of Damascus University is a circular emblem. It features a central yellow lamp with a flame, set against a background of radiating yellow lines. The lamp is encircled by a purple ring. The entire emblem is surrounded by a larger circle containing the university's name in Arabic script at the top and 'Damascus University' in English at the bottom.

منظومات التعبير عن البروتينات المؤشبة

II. إنتاج البروتينات المأشوبة

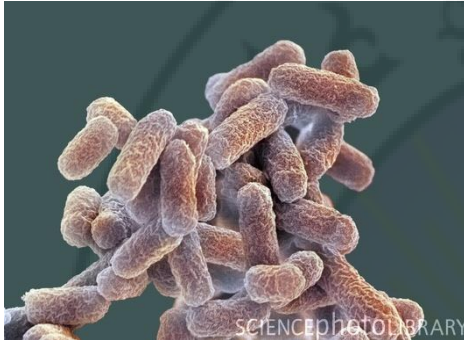


- إن البروتينات المأشوبة هي أرخص وأكثر وفرة وأماناً من معظم البروتينات المستخلصة
- يتضمن إنتاج البروتينات المأشوبة 6 خطوات هي:
 1. عزل المورثة الخاصة بالبروتين
 2. غرس المورثة في ناقل (بلازميد) مناسب للتعبير الجيني
 3. استحالة الجراثيم بالبلازميد
 4. نمو الخلايا بطريقة التخمير Fermentation
 5. عزل وتنقية البروتين المأشوب
 6. صياغة الشكل الصيدلاني للبروتين الدوائي



يمكن نظرياً تحضير البروتينات الدوائية في أي من الكائنات المعدلة وراثياً

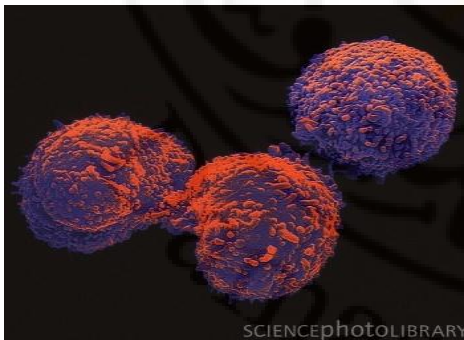
Bacteria



Yeast



Mammalian cells



- وتوجد عدة منظومات للتعبير الجيني هي:

- *Escherichia coli* and other bacteria

- *Pichia pastoris* and other yeasts

- Baculovirus (with insect cells)

- Mammalian cell culture

- Plants

- Animals

- Cell free

مقارنة منظومات التعبير الجيني الثلاث الأهم لإنتاج البروتينات المشوبة

Protein Feature	Prokaryotic	Eukaryotic	Eukaryotic
	Bacteria	Yeast	Mammalian
Concentration	High	High	Low
Molecular weight	Low	High	High
Secretion	No	Yes/No	Yes
Folding	Incorrect	Correct	Correct
Glycosylation	No	Incorrect	Correct
Retrovirus	No	No	Possible
Contamination	Endotoxin	Low risk	Viruses
Production Quality	Low	Moderate	High
Scale-Up Capacity	High	High	Low

يجري اختيار منظومة التعبير الجيني وفقاً لحجم البروتين وخصائصه

- Choice depends on size and character of protein
 - Large proteins (>100 kD)? Choose **eukaryote**
 - Small proteins (<30 kD)? Choose **prokaryote**
 - Glycosylation essential? Choose **baculovirus** or **mammalian cell culture**
 - High yields, low cost? Choose *E. coli*
 - Post-translational modifications essential? Choose **yeast**, **baculovirus** or other **eukaryotes**

أمثلة على البروتينات الدوائية المنتجة في منظومات تعبير جيني مختلفة

Type	Examples	Comment
Bacteria	Insulins	No glycosylation Short cycle time
Yeast	Growth factors	Modified glycosylation
Mammalian cells	Antibodies	Mammalian glycosylation Long cycle time
Goats	AT III	Very long cycle time Cost effective at large scale.



تختلف طرائق الزرع وإكثار الخلايا حسب الغاية وكمية البروتين المرغوبة

- ويكتفى عادة بإكثار الخلايا بفلاسكات الزرع للأغراض البحثية، بينما تستخدم المخمرات Fermentors والمفاعلات الحيوية Bioreactors لإكثار الخلايا في أحجام أكبر والحصول على كميات متوسطة (المخمرات) أو كبيرة (المفاعلات الحيوية) من البروتينات.

- تستخدم أوساط عديدة يلائم كل منها نوعاً محدداً من الخلايا، مثال:

– الجراثيم (Luria Broth, LB medium)

– الخلايا الثديية (Dulbicco's Modified Eagle Medium, DMEM+ Fetal Bovine Serum, FBS)



الخطوات اللاحقة لاستحالة الجراثيم

- الغرلة بيضاء – زرقاء Blue-white screening
- انتقاء المستعمرات إيجابية التنسيل
- حل الخلايا الجرثومية في المستعمرات إيجابية التنسيل
- تطبيق تفاعل PCR مباشرة على محلول الخلايا الجرثومية (Colony PCR) وترحيل نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي للكشف على المستعمرات إيجابية التنسيل
- اختيار المستعمرات إيجابية تفاعل PCR وتكثير الخلايا وعزل البلاسميد منها ثم إجراء تفاعل قطع باستخدام إنزيمات التقييد للتأكد الأخير من وجود القطعة المنسلة.
- القيام بمقايضة التعبير عن البروتين المأشوب

غريلة المستعمرات الجرثومية

A

STEP 1 Isolate *E. coli* plasmid Bluescript II DNA and mouse genomic DNA.

E. coli plasmid Bluescript II

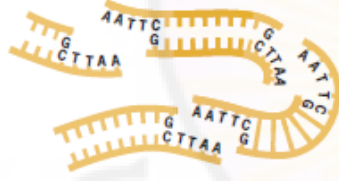
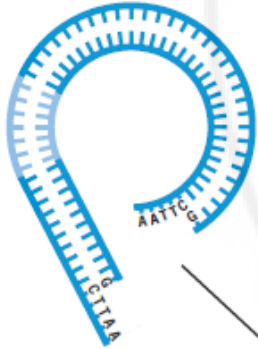
Gene conferring resistance to ampicillin

Mouse DNA

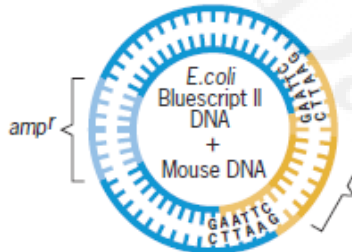
Gene for β -globin



STEP 2 Cleave plasmid and mouse DNAs with restriction endonuclease *EcoRI*.



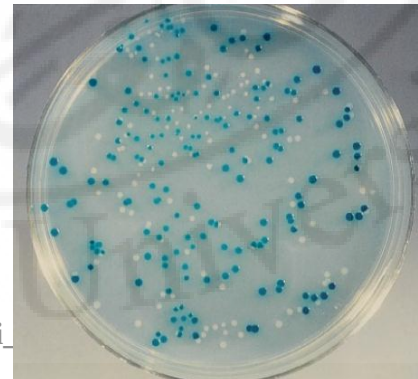
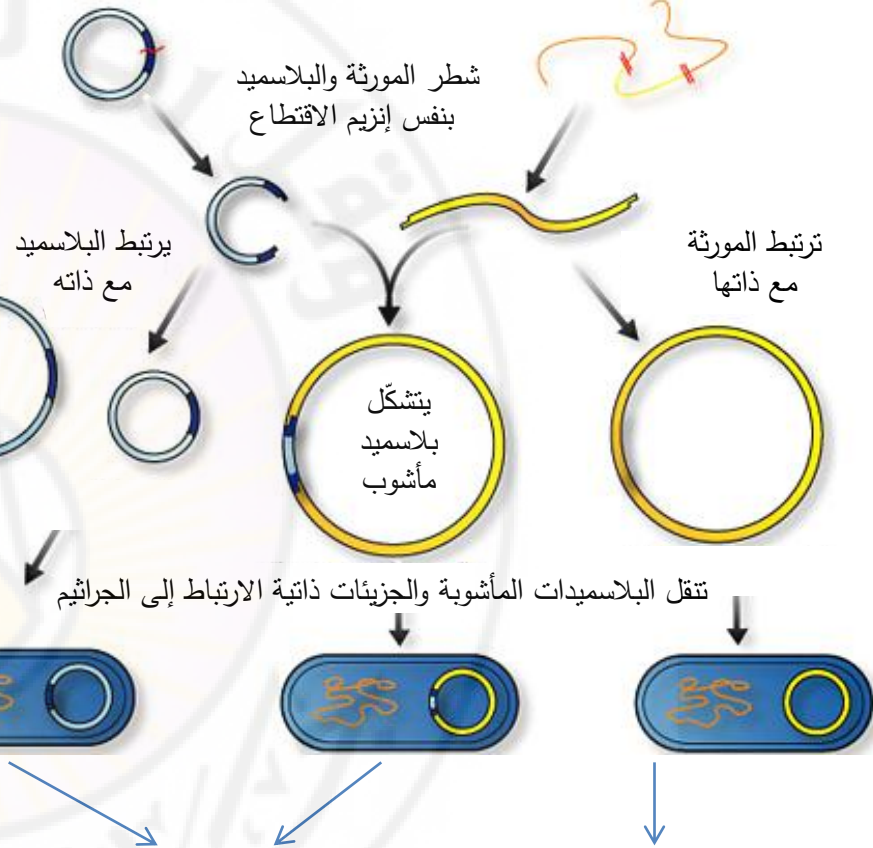
STEP 3 Mix plasmid and mouse DNAs under annealing conditions and treat with DNA ligase.



Recombinant DNA containing mouse *EcoRI* restriction fragment inserted into self-replicating *E. coli* plasmid DNA.

For example, gene encoding the β -globin chain.

B



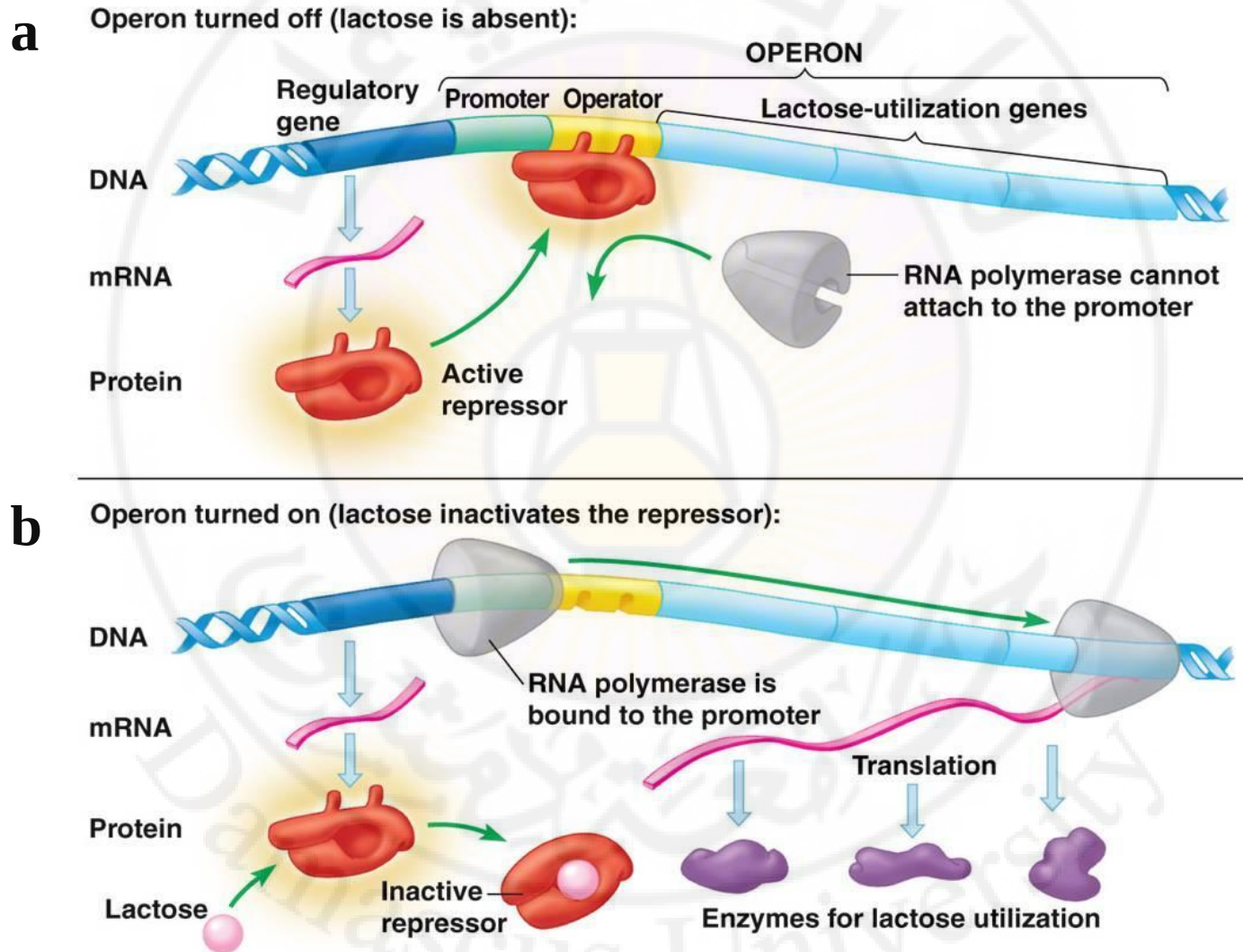
Antibiotic Resistance Screening

- Most cloning vectors carry an ampicillin resistance gene (amp^r), and will confer ampicillin resistance to the E. coli cells if the transformation process was successful.
- This would mean that when the clones are plated out on ampicillin-containing medium, only cells containing a plasmid would be resistant to the antibiotic and, therefore, be able to grow.
- However, this does not show whether the cell contains the recombinant plasmid (with the inserted gene of interest) or only the re-ligated vector (without the inserted gene of interest).

Blue-White Screening

- This method also involves the insertional inactivation of a gene and uses the production of a blue compound as an indicator . The gene is *lacZ*, which encodes the enzyme β -galactosidase, and is under the control of the *lac* promoter.
- If the host *E. coli* strain is expressing the lac repressor, expression of a *lacZ* gene on the vector may be induced using IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), and the expressed enzyme can utilize the synthetic substrate X-gal (5-bromo-4-chlore-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) to yield a blue product.

Lac Operon



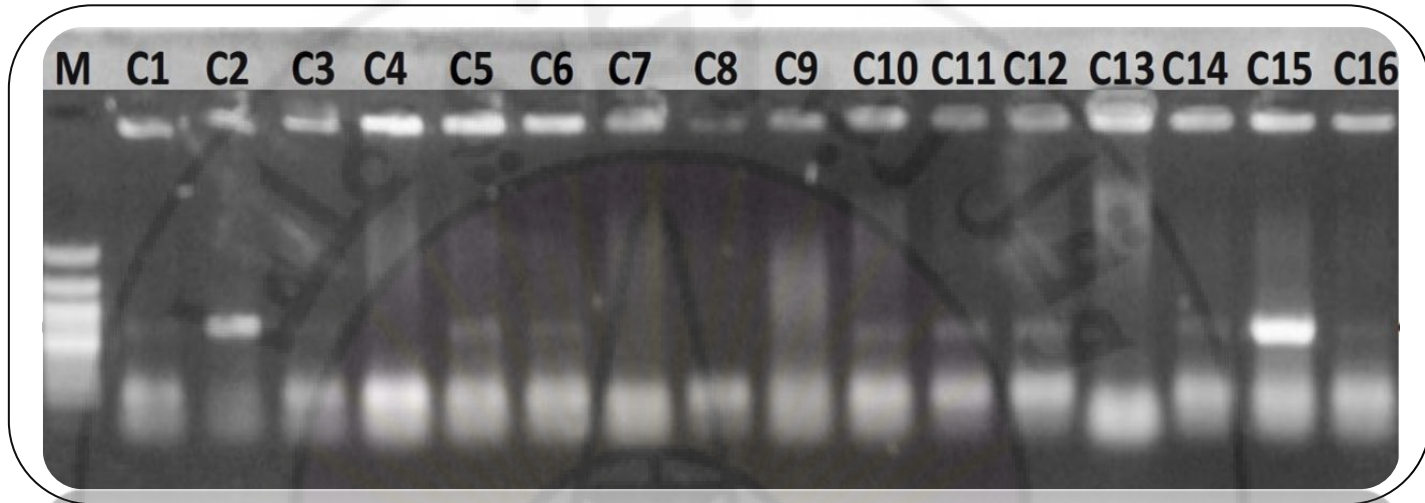
Blue-White Screening

- Insertion of a DNA fragment into the *lacZ* gene (insertional inactivation of *lacZ*) in the production of a recombinant plasmid would prevent the development of the blue colour.
- In this method, the transformed cells are spread onto a plate containing an antibiotic (to select for transformants in the usual way), IPTG and X-gal, to yield a mixture of blue and white colonies. The white colonies have no expressed β -galactosidase and are hence likely to **contain the inserted target fragment**. The blue colonies probably contain religated vector.

الخطوات اللاحقة للتنسيل

- الغرلة بيضاء – زرقاء Blue-white screening
- انتقاء المستعمرات البيضاء
- حل الخلايا الجرثومية
- تطبيق تفاعل PCR مباشرة على محلول الخلايا الجرثومية (Colony PCR) وترحيل نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي للكشف على المستعمرات إيجابية التنسيل
- اختيار المستعمرات إيجابية تفاعل PCR وتكثير الخلايا وعزل البلاسميد منها ثم إجراء تفاعل قطع باستخدام إنزيمات التقييد للتأكد الأخير من وجود القطعة المنسلة.
- القيام بمقايضة التعبير عن البروتين المأشوب

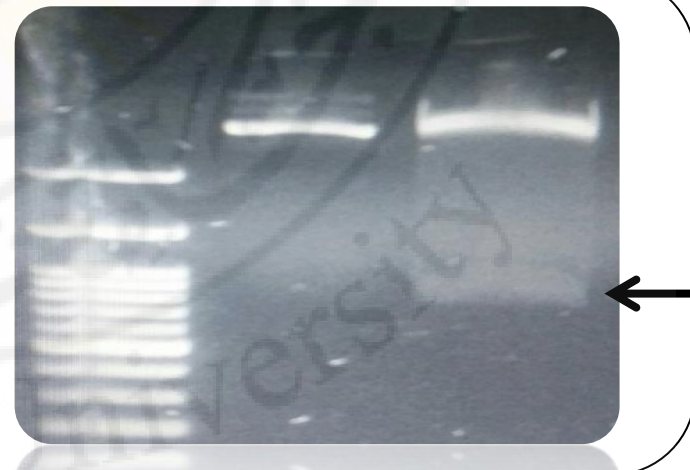
Colony PCR



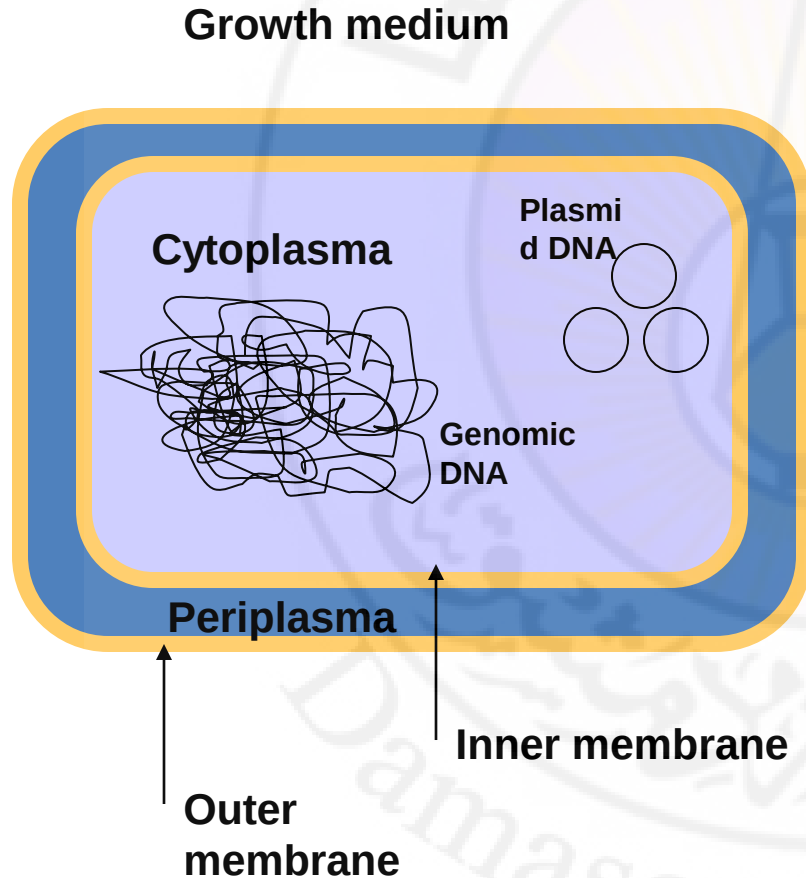
Plasmid PCR



Restriction



Protein expression in Bacteria (Choice of E.coli compartment)



Cytoplasmic expression

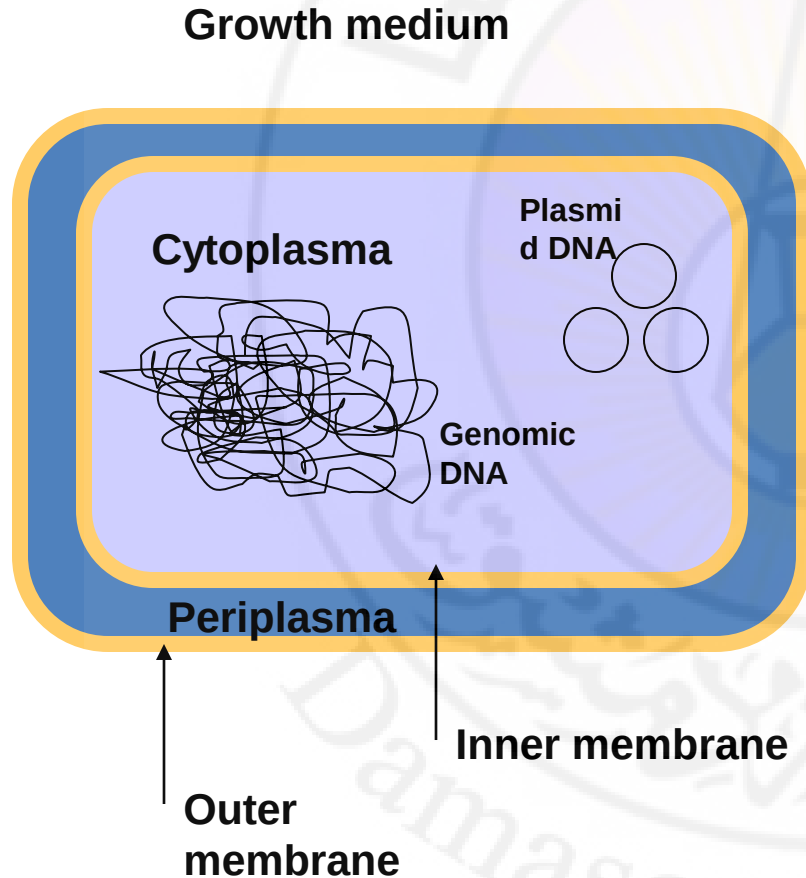
Advantages:

- No need for signal sequences,
- High concentration of expressed proteins

Disadvantages:

- Formation of inclusion bodies
- (No disulfide bond formation) (reducing environment),
- Protein instability,

Protein expression in Bacteria (Choice of E.coli compartment)



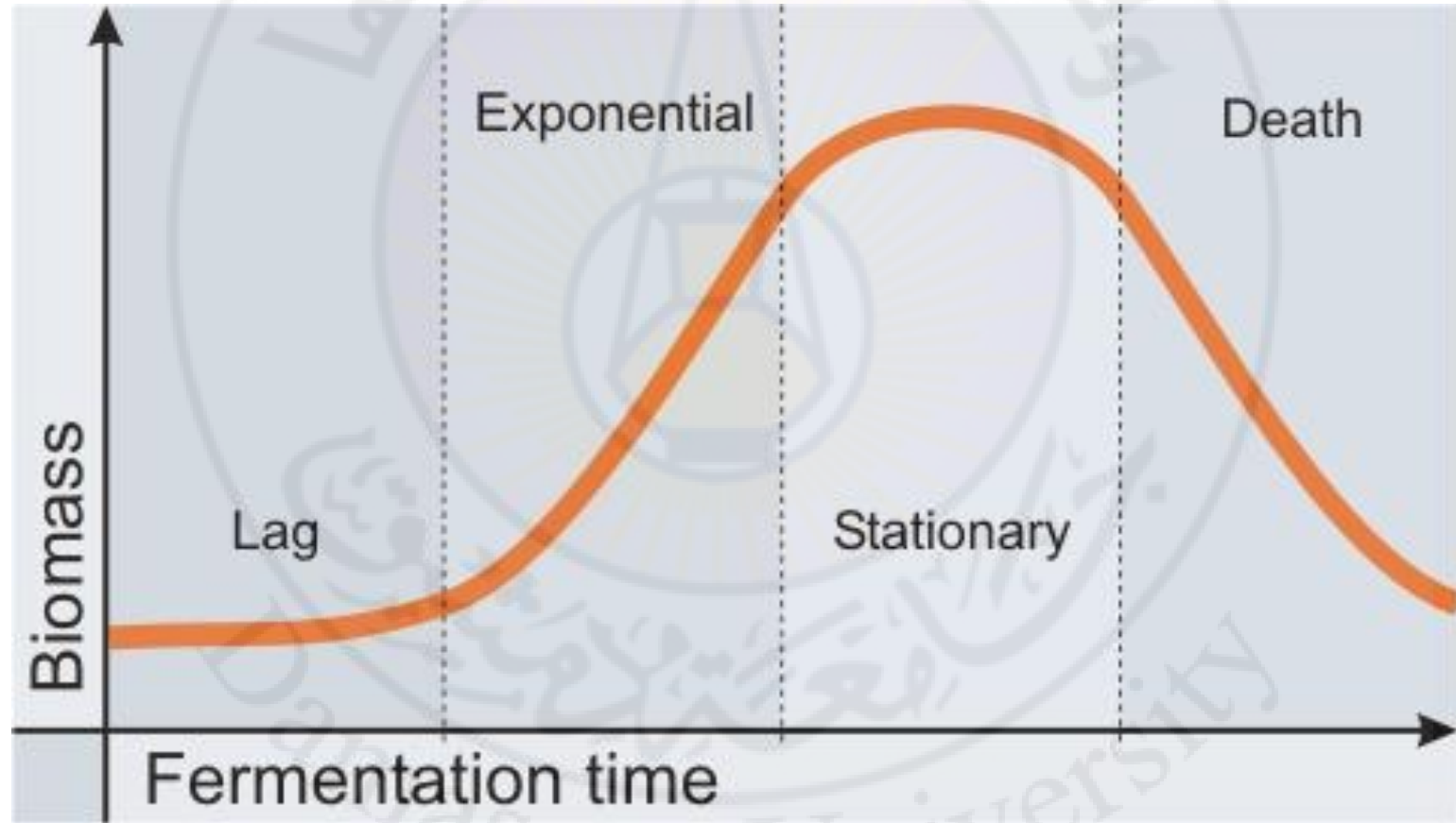
Periplasm Advantages

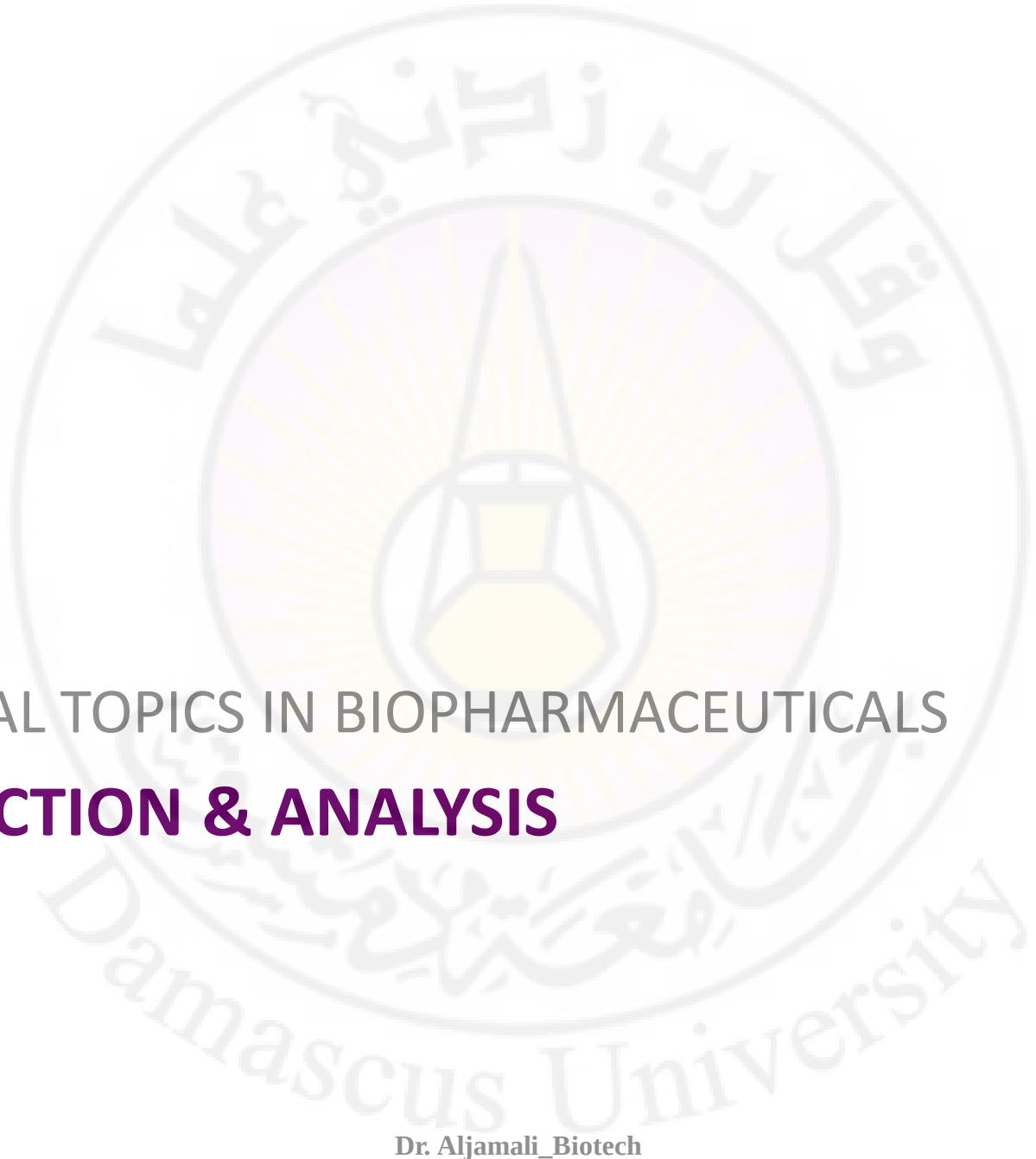
- Improved folding (no inclusion body formation)
- Disulfide bridge formation (oxidizing environment)
- Less protein degradation.

Disadvantages.

- Low protein concentration due to inefficient transport and small compartment

يجب الانتباه إلى أن يستخلص البروتين المنتج من الخلايا في نهاية طور النمو الأسّي exponential وبداية الطور الثابت حيث يكون نمو الخلايا أعظمياً وإنتاج البروتين في حدّه الأعلى (عادةً عند الكثافة الضوئية OD 0.6 لمعلق الخلايا)، بينما ينخفض الإنتاج بشكل هام في نهاية الطور الثابت لنمو الخلايا



The background of the slide features a large, faint watermark of the Damascus University logo. The logo is circular, with Arabic calligraphy at the top and bottom. In the center is a stylized yellow and white emblem resembling a sun or a lamp with rays emanating from it.

SPECIAL TOPICS IN BIOPHARMACEUTICALS

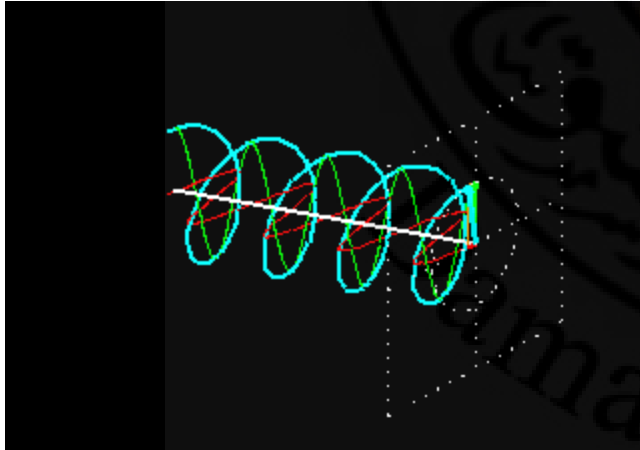
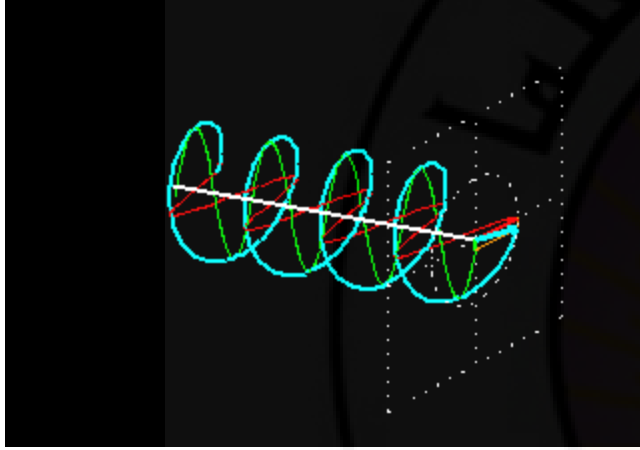
DETECTION & ANALYSIS

طرق كشف وتحليل البروتينات

- هنالك عدة طرق لكشف وتحليل البروتينات منها بسيطة وأخرى معقدة:

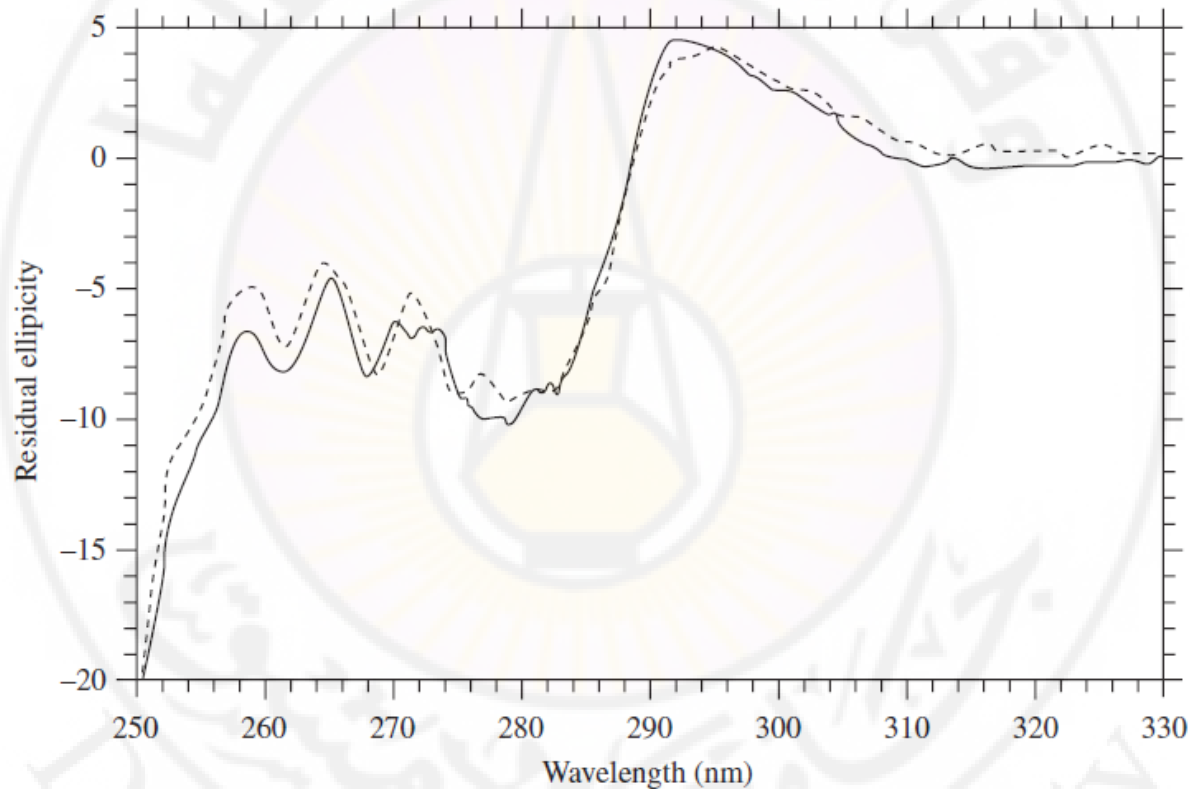
1. قياس الامتصاص بمقياس الطيف بطول موجة 280nm
2. الرحلان الكهربائي أحادي أو ثنائي الأبعاد
3. مقياس الطيف المفلور Fluorescence spectroscopy
4. ازدواج اللون الدائري Circular dichroism
5. الطنين النووي المغناطيسي NMR
6. الطرق المناعية مثل ELISA
7. تحليل البروتينات المغلزة Glycosylated proteins

ازدواج اللون الدائري (CD) Circular Dichroism



- فيما عدا الغليسين، تكون الحموض الأمينية الأخرى غير متناظرة بسبب وجود الكربون غير المتناظر بالمرآة Chiral carbon. وتعزى الخصائص الضوئية لعديدات الببتيد إلى المراكز غير المتناظرة لمكوناتها من الحموض الأمينية، بحيث تتأثر عديدات الببتيد بشكل مختلف مع الضوء المستقطب الدائري اليميني واليساري.
- في طول موجة Far-UV (أقصر من 250 nm)، يمكن تمييز البنى الثانوية للبروتين (حلزون/صفيحة/التفاف)، ويمكن لطيف CD أن يحسب نسبة كل بنية ثانوية منها في مجمل البروتين
- في طول موجة Near-UV (250-300 nm) يمكن تمييز البنية الثالثية للبروتين، ويعد CD لذلك من أفضل الطرق لدراسة التغيرات في شكل البروتين conformation

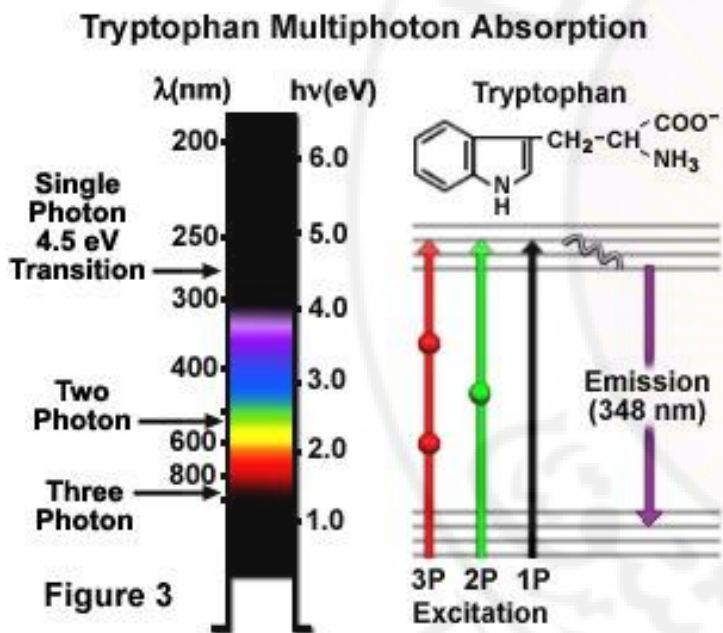
ازدواج اللون الدائري (CD) Circular Dichroism



Near-UV CD for recombinant hGH solution (1 mg/ml) (solid line) and for recombinant hGH containing cyclohexanol (dashed line).

الطيف المفلور Fluorescence Spectroscopy

- تبدي الثمالات الأمينية العطرية Phe، Trp، Tyr فلورة وتكون شدة الفلورة الأكبر للـ Trp، بسبب كون حلقة الإندول هي الأكبر.

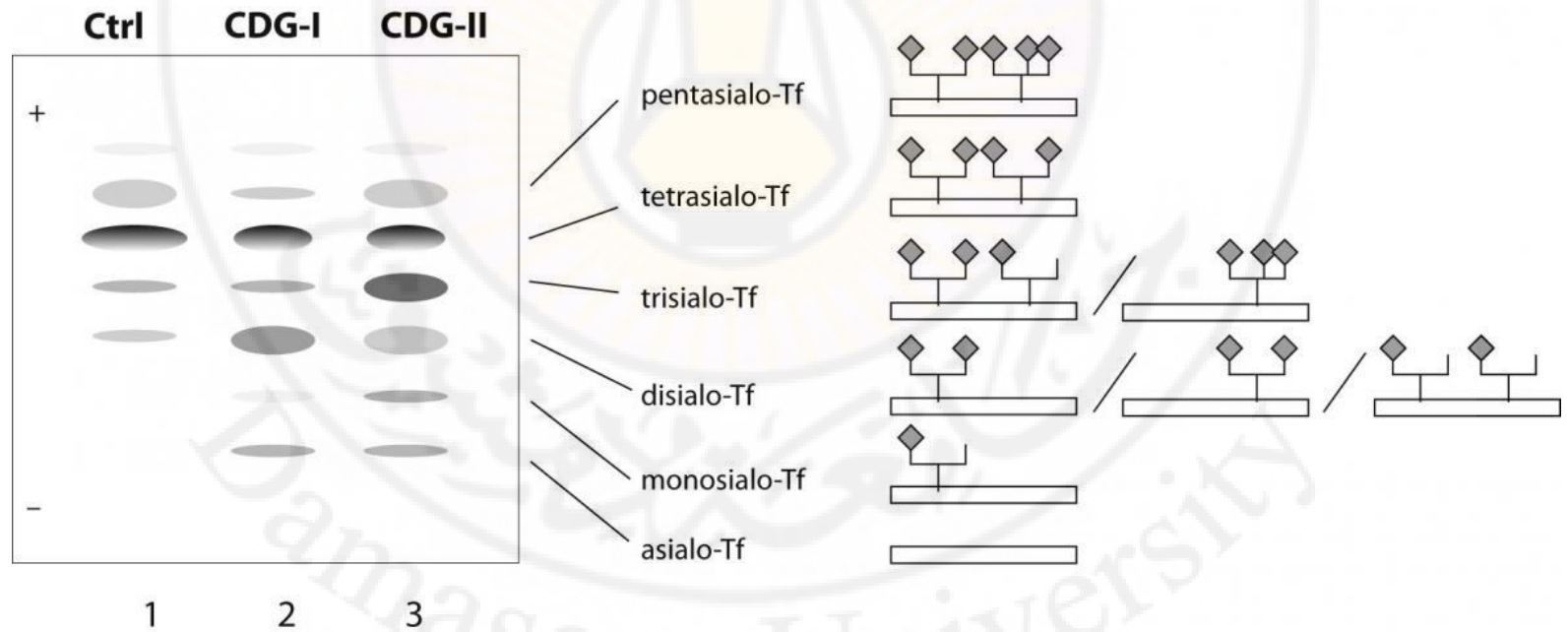


- تبدي معظم البروتينات فلورة بطول موجة 300-400 نم عندما يتم تحريضها بطول موجة 250-300 نم.

- تحتوي معظم البروتينات على ثمالة Trp واحدة أو عددا قليلاً منها وعادة ما تكون ثمالات Trp غير القطبية مدفونة داخل جزيئة البروتين. ولذلك، يترافق تغير طي البروتين (والذي يسبق عادةً التكدس aggregation) مع زيادة في شدة الفلورة. إضافة لذلك، يتفلور Trp المدفون داخل الجزيئة بطول موجة أعظمي 325-330 نم، بينما تتفلور ثمالة Trp المعرضة للسطح بطول موجة 350-355.

البروتينات المغلزة Glycosylated Proteins

- تعدّ تقنية IEF الطريقة المعيارية لدراسة الاختلاف في التعديلات اللاحقة للترجمة PTM الخاصة بإضافة جزيئات السكار على البروتين، وتحصل هذه الاختلافات عند التعبير عن مورثة البروتين المأشوب في خطوط خلوية مختلفة أو منظومات تعبير مختلفة
- يعتمد مبدأ التحليل على اختلاف الشحنة السالبة التي تضيفها السكار للبروتين باختلاف نوع وعدد السكار المضافة، وتبدو بسبب ذلك عدة عصابات في هلامة IEF.



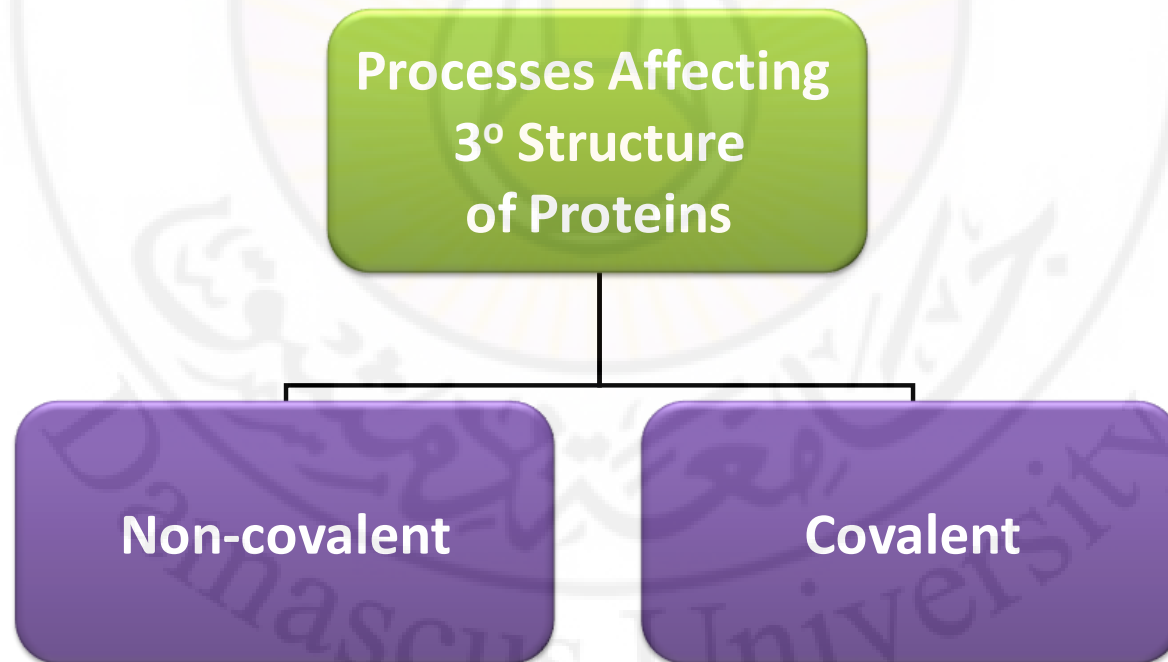
The background of the slide features a large, faint watermark of the Damascus University logo. The logo is circular, with Arabic calligraphy at the top and bottom. In the center is a stylized yellow and white emblem resembling a sun or a lamp with rays emanating from it.

SPECIAL TOPICS IN BIOPHARMACEUTICALS

PROTEIN INSTABILITY

عدم ثباتية البروتينات Protein Instability

- تقسم عدم ثباتية البروتينات إلى:
 - عدم ثباتية فيزيائية (غير تساهمية)
 - عدم ثباتية كيميائية (تساهمية)
 - أهم ثلاثة عمليات تخضع لها البروتينات خلال الحفظ هي إزالة الأמיד deamidation، والأكسدة oxidation و التكدس aggregation



Protein Instability عدم ثباتية البروتينات

- تضم العمليات غير التساهمية
المسببة لعدم الثباتية الفيزيائية

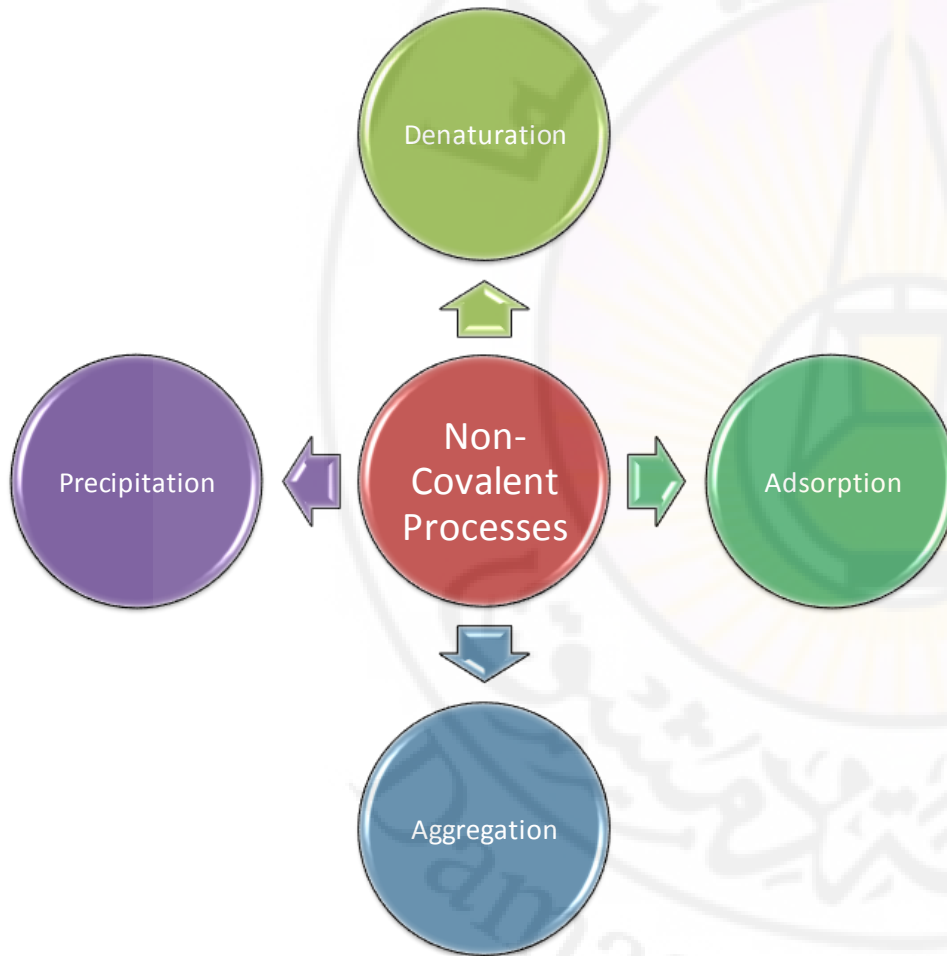
:physical instability

– التمسّخ denaturation

– الترسيب precipitation

– التكدّس aggregation

– الادمصاص adsorption



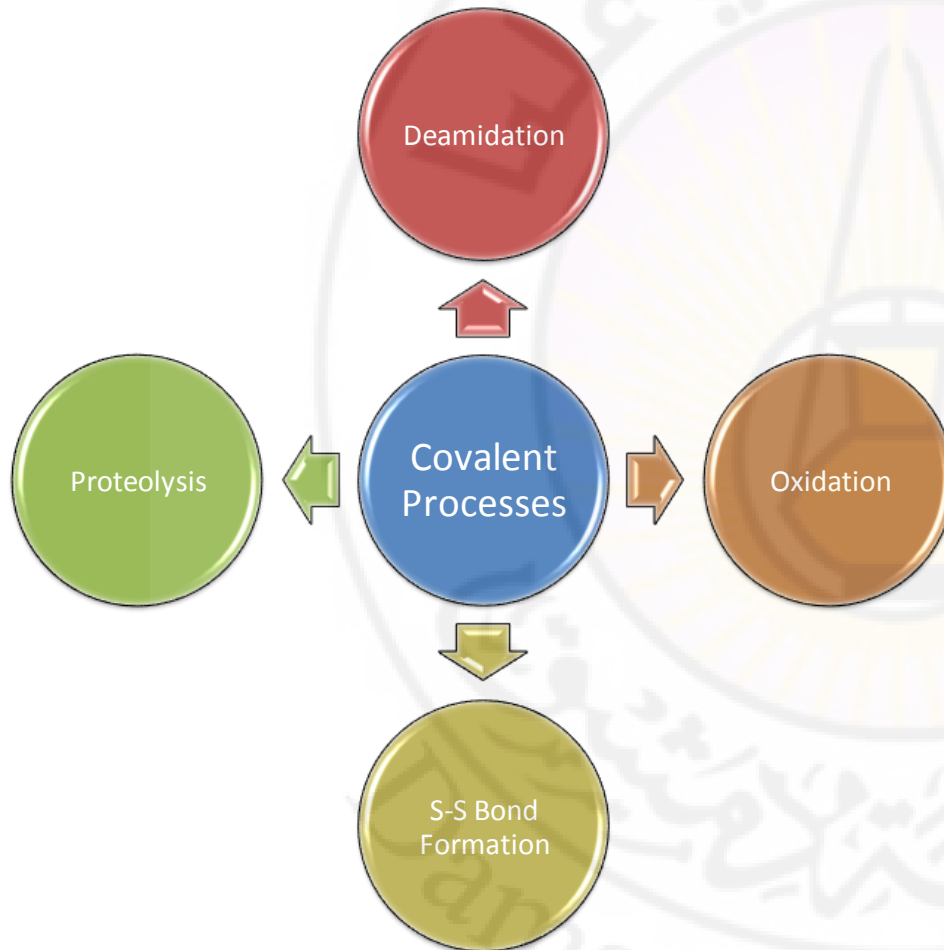
Protein Instability عدم ثباتية البروتينات

- تضم العمليات التساهمية المسببة لعدم الثباتية الكيميائية chemical instability:

– إزالة الأميد deamidation

– الأكسدة oxidation

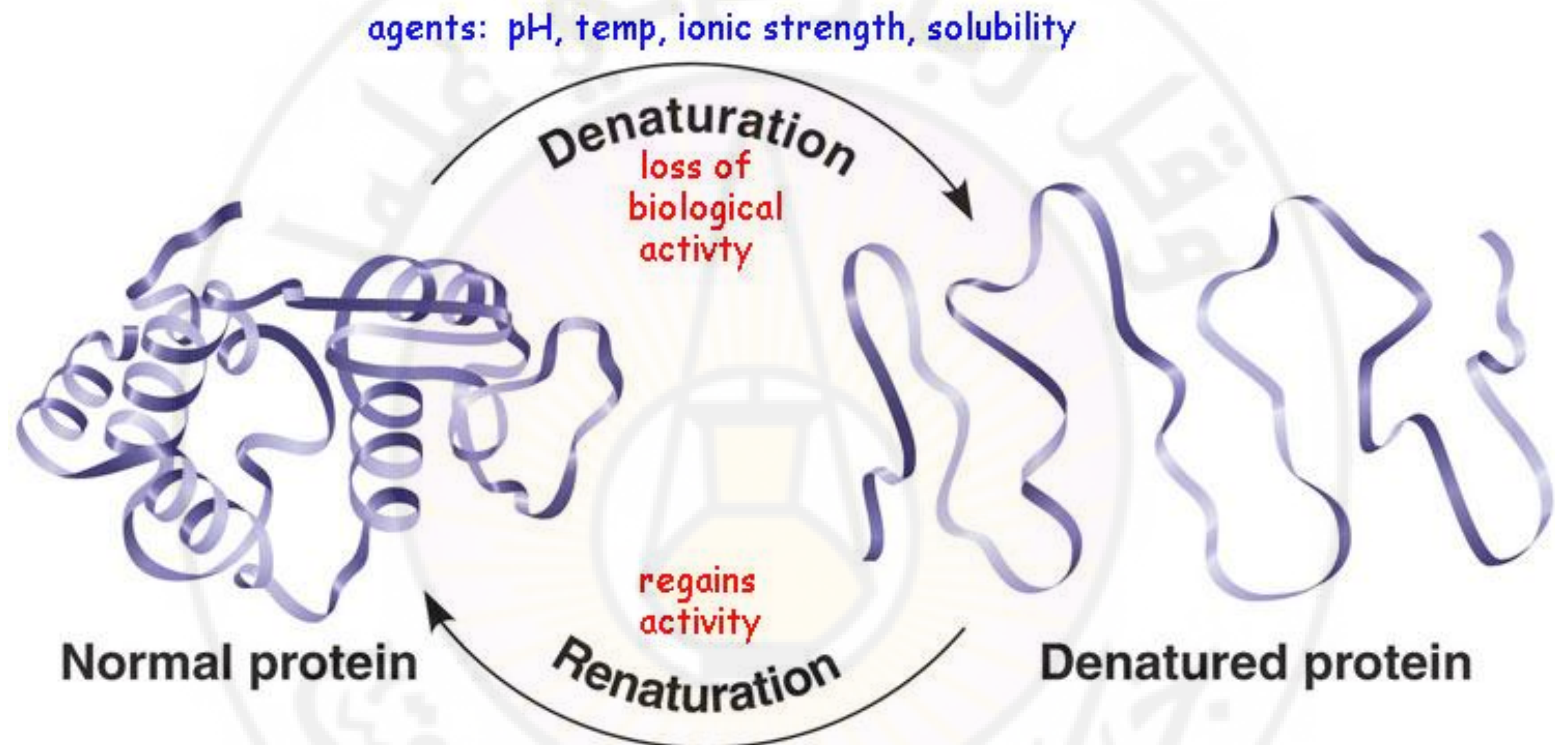
– الحلمة hydrolysis والتقطيع المتواسط بالإنزيمات البروتيازات proteolysis



التمسخ Denaturation

- تشير عملية التمسح إلى تخرب البنية الثانوية والثالثية للبروتين، والذي يمكن أن يكون عكوساً أو غير عكوس وينتج عن تغيرات كبيرة في الحرارة أو الباهاء أو عن العوامل الممسّخة denaturing agents.
- يحدث التمسح عادة كانتقال سريع وحاد بين الشكل المطوي folded وغير المطوي unfolded، حيث أن تخرب طي قسم من البروتين يؤدي إلى تخرب طي كامل البروتين بسرعة في عملية تعاونية cooperative.
- تعرّف درجة انصهار البروتين melting temp بأنها الحرارة عند الحالة التي يكون فيها نصف البروتين مطوياً ونصفه الآخر غير مطوي.
- عادةً ما يكون الفشل في إعادة طي البروتين (تمسخ غير عكوس) نتيجة تعديلات كيميائية أو فيزيائية (ادمصاص) تحصل للبروتين الممسّخ،
- كما يمكن للبروتين أن يعيد الطي refold لكن ليس لشكله الأساسي. في هذه الحالة، يمكن استعمال بعض العوامل الممسّخة مثل هيدروكلوريد الغوانيديين guaniding أو البولة hydrochloride أو اليوريا urea متبوعاً ذلك بالتحال dialysis للمساعدة على إعادة طي البروتين الممسّخ.
- ويمكن الكشف عن تمسخ البروتين بـ : CD، Fluorescence spectroscopy و NMR

Denaturation (unfolding)



- Hi or low pH (>10 , <3)
- Hi or low temp ($>60^{\circ}\text{C}$, $<0^{\circ}\text{C}$)
- Organic solvents and Urea
- Salts (Hofmeister Series)
- Interaction with surface (also in adsorption)

most stabilizing
strongly hydrated anions

$\text{citrate}^{3-} > \text{sulfate}^{2-} > \text{phosphate}^{2-} > \text{F}^{-} > \text{Cl}^{-} > \text{Br}^{-} > \text{I}^{-} > \text{NO}_3^{-} > \text{ClO}_4^{-}$

most destabilizing
weakly hydrated anions

$\text{N}(\text{CH}_3)_4^{+} > \text{NH}_4^{+} > \text{Cs}^{+} > \text{Rb}^{+} > \text{K}^{+} > \text{Na}^{+} > \text{H}^{+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Al}^{3+}$

weakly hydrated cations

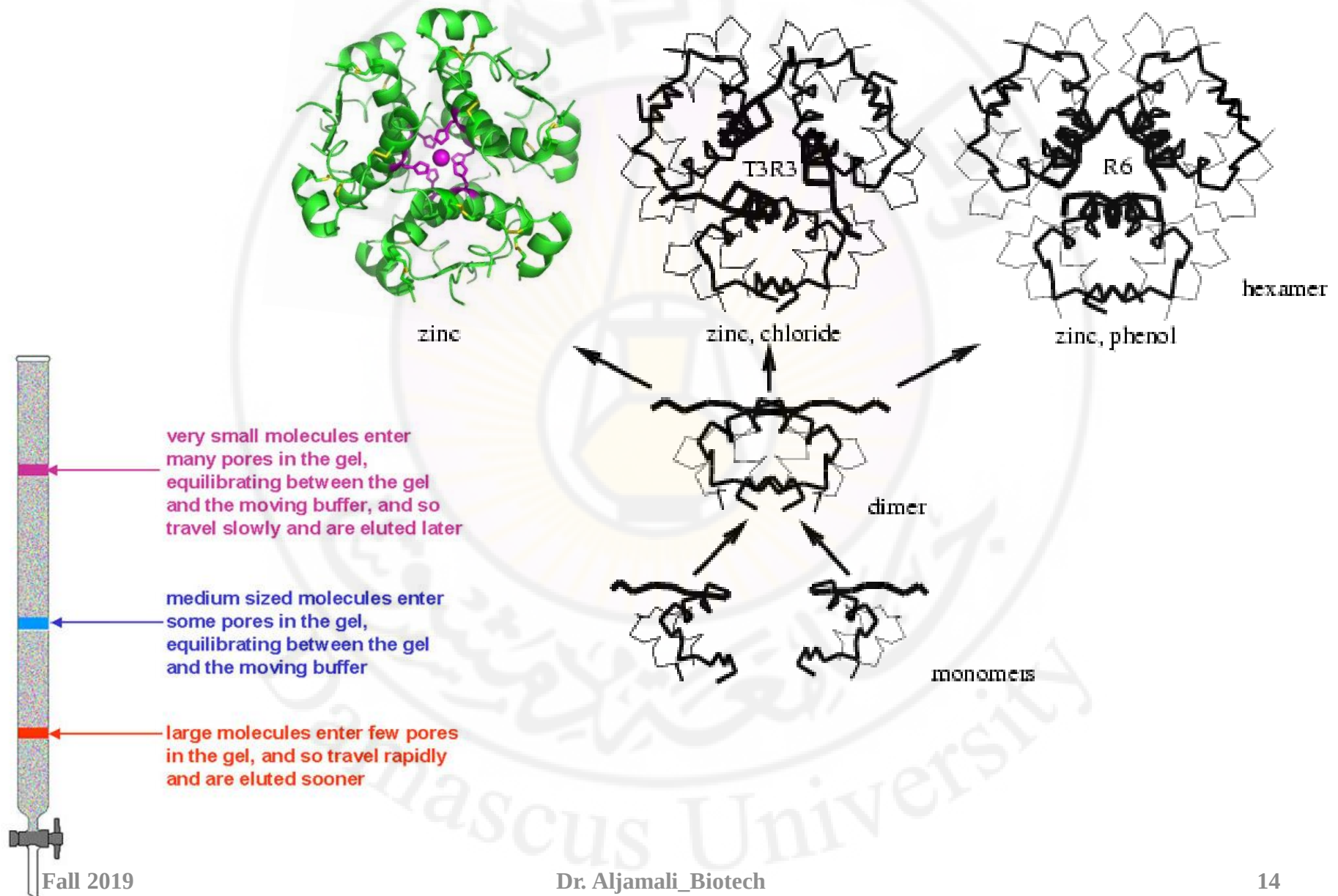
strongly hydrated cations

التكدس Aggregation

- نظرياً، يكون التكدس مفضلاً ثرموديناميكياً ويزيد من ثباتية البروتين.
- مع ذلك، للتكدس مساوئ عديدة، منها:
 - يمكن للتكدس أن يلغي الفعالية الحيوية للبروتين على الرغم من كونه عملية فيزيائية. ويشاهد ذلك عادةً عند تحول البروتين من الشكل الموحد monomer إلى المثنوي dimer أو الثلاثي trimer إلخ.
 - يمكن للتكدس أن يبطئ من تحرر الدواء من الشكل الصيدلاني (مثال: الإنسولين)
 - يمكن أن يسبب التكدس ترسب البروتين.
 - يمكن للبروتينات المتكدسة أن تحرض استجابة مناعية
- يُكشف عن التكدس بسهولة باستخدام SEC (الاستشراب بالاستبعاد، والذي يعتمد على الوزن الجزيئي)، كما يمكن إجراء الرحلان الكهربائي للكشف عن متماثرات البروتين
- يمكن للتكدس أن يؤدي إلى تشكّل رواسب مرئية بالعين كما في بعض الأدوية، كما يمكن الكشف عنها بمقياس العكر بطول موجة 600 نم.
- ينجم التكدس فيزيائياً (نتيجة تشكيل روابط كارهة للماء، أو نتيجة الادمصاص، أو نتيجة الرج الشديد للمستحضر الدوائي) أو كيميائياً (نتيجة تشكيل جسور ثنائية الكبريت)، وغالباً ما يحدث التكدس لاحقاً لتمسخ البروتين

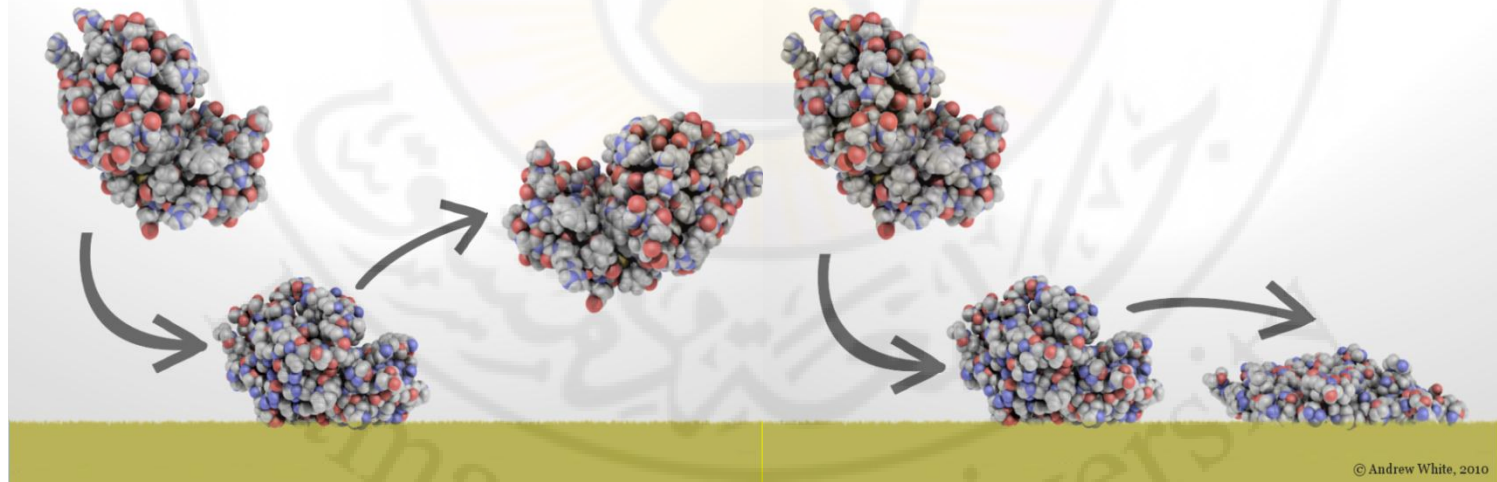


Insulin Aggregates



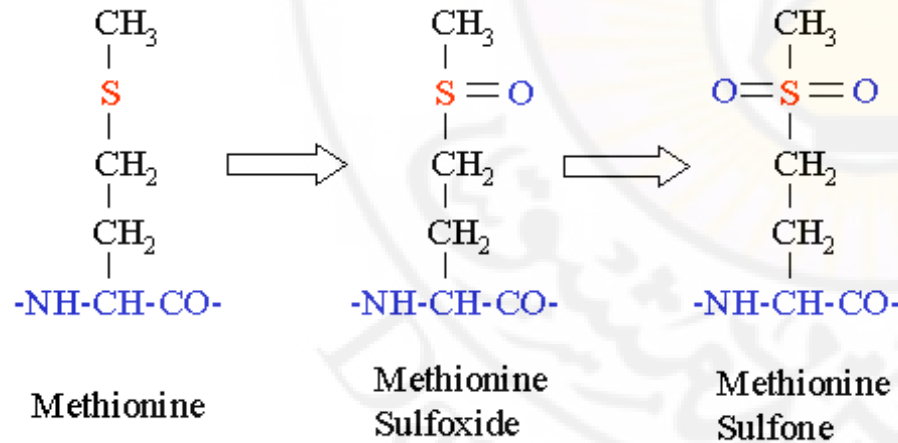
الادمصاص Adsorption

- على الرغم من كون البروتين المطوي محباً للماء hydrophilic، فهو يحتوي ثملات كارهة للماء في داخله hydrophobic، وعند التماس مع سطح كاره للماء فإن تلك الثملات الداخلية تنقلب إلى خارج البروتين (مما يؤدي إلى تمسخه) وتتأثر مع السطح الكاره للماء وغالباً ما يؤدي ذلك كله إلى تكّس البروتينات وحتى ترسبها.



الأكسدة Oxidation

- تعدّ الأكسدة أحد أهم طرق تخرّب البروتينات في المحاليل وحتى في المستحضرات المجفّدة lyophilized.
- تضم الحموض الأمينية العرضة للأكسدة Met، Cys، His، Trp، Tyr. وتتضمّن تفاعلات الأكسدة الأكثر شيوعاً في البروتينات الدوائية خلال الحفظ حمضيّ الميثيونين والسيستئين.
- يتأكسد الميثيونين بسهولة حتى بالهواء العادي ويشكّل سلفوكسيد الميثيونين، بينما يتشكّل سلفون الميثيونين في شروط مؤكسدة أقوى

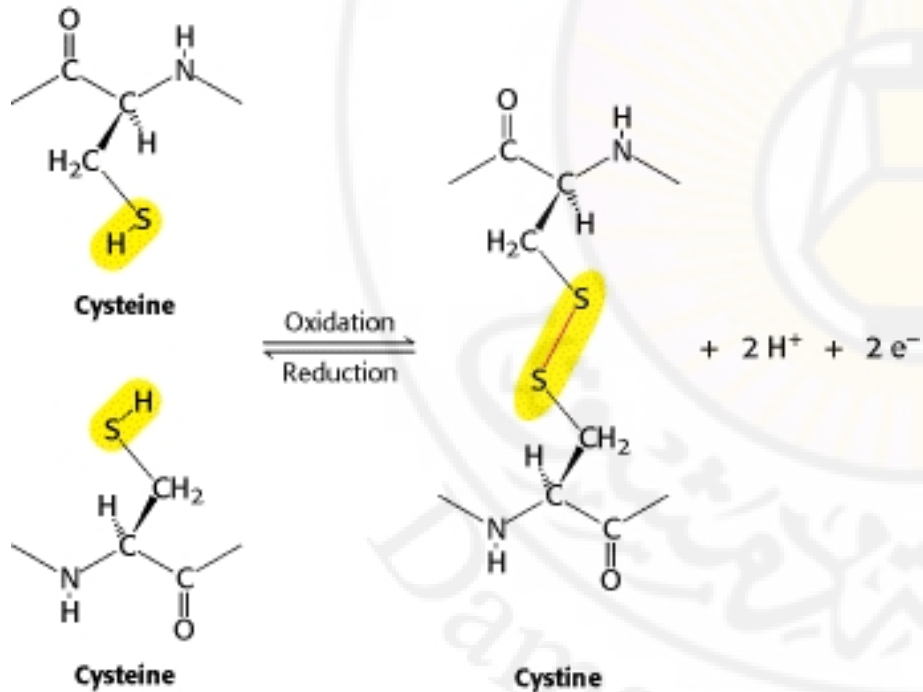


- يمكن لبعض السواغات المستخدمة في تحضير الأدوية البيولوجية (مثل العوامل الفعالة على السطح polysorbate) أن تحتوي على مقادير زهيدة متبقية من الماء الأكسجيني hydrogen peroxide والذي يؤدي أيضاً إلى أكسدة الميثيونين.

Oxidation الأوكسدة

- يتأكد السيستئين بسهولة أيضاً ليشكل الجسر ثنائي الكبريت مع سيستئين مجاور. وخلال الحفظ، يمكن لمجموعات السلفهيدريل التابعة للسيستئين أن تتأكسد وتعطي جسوراً كبريتية إما ضمن السلسلة الببتيدية نفسها أو مع سلاسل مجاورة، وهذه الأخيرة تؤدي إلى تكّس البروتينات. لذلك، فإن احتوى الشكل الفعال للبروتين الدوائي على سيستئين غير مؤكسد، غالباً ما يعتمد إلى صياغة الدواء وتعبيته وحفظه تحت ضغط من النيتروجين لمنع التأكسد.

- يمكن أيضاً التقليل من الأكسدة باستخدام



- مضادات أكسدة antioxidants، مثل BHT و BHA و propyl gallate، وفيتامين E.

- مواد مُرجعة: الميثيونين،

- ‘sodium sulfite

- ascorbic acid thioglycerol
thioglycolic acid

- العوامل المستخلبة :chelating

- ‘citric acid’ ‘EDTA

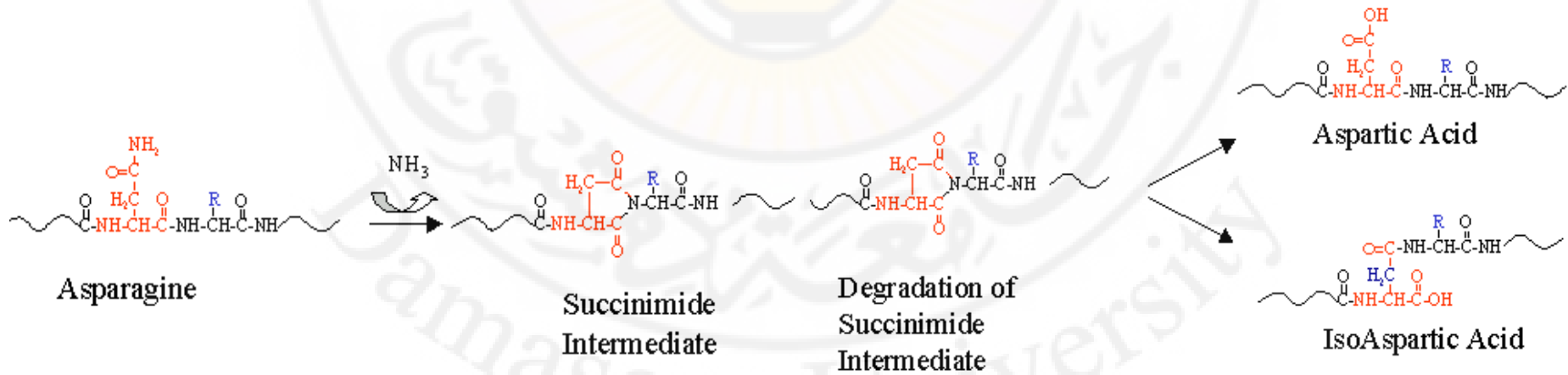
- .thioglycolic acid

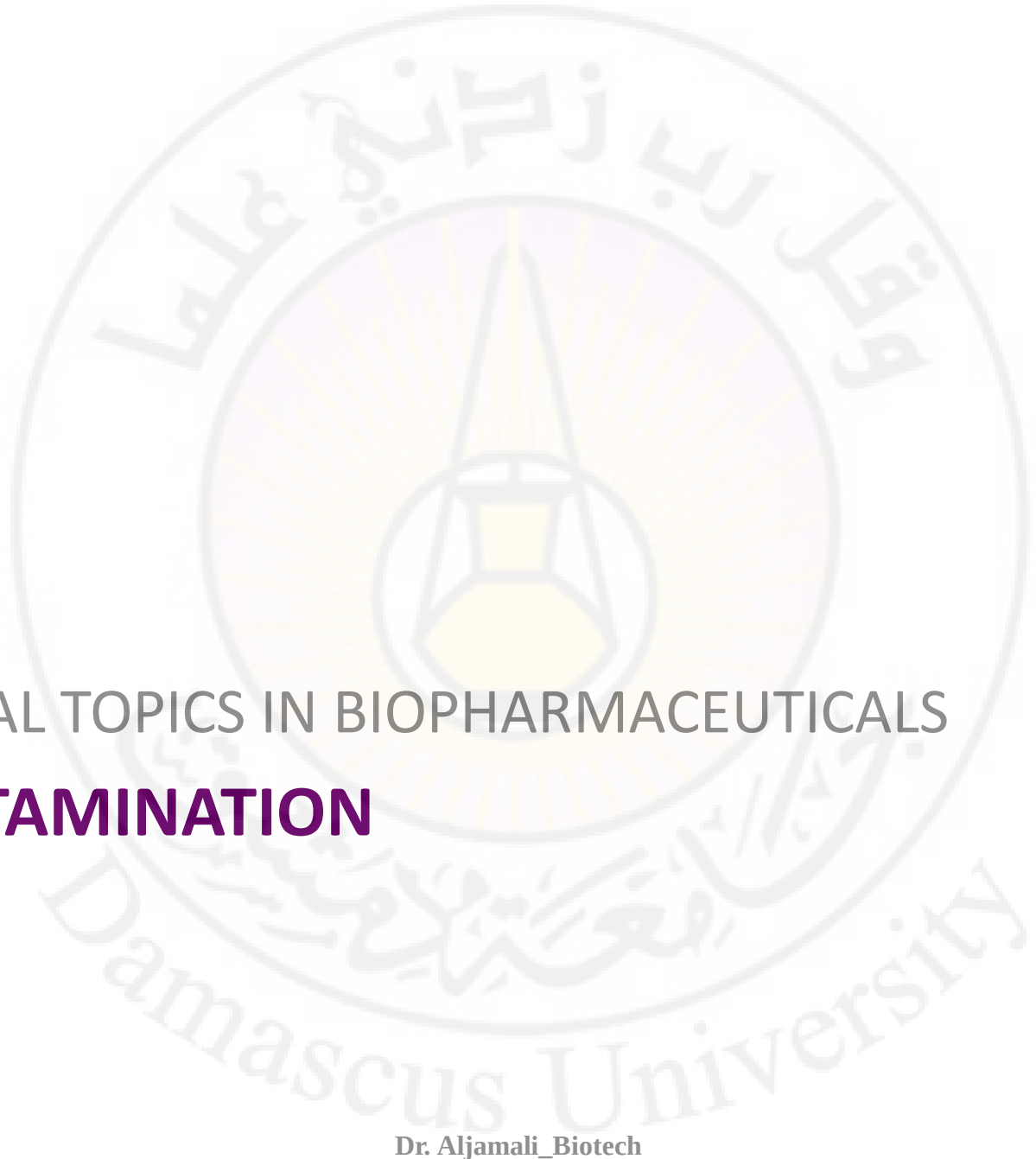
الحلمة Hydrolysis

- تعدّ الرابطة الببتيدية غير فعالة كيميائياً بشكل عام، باستثناء الرابطة الببتيدية بين Asp-Pro والتي تعدّ الأكثر تعرّضاً للحلمة التلقائية autohydrolysis.
- مثال: تبين أن البروتين المأشوب recombinant macrophage colony stimulating factor (rM-CSF) يتخرّب في وسط حمضي نتيجة تفكك الروابط الببتيدية بين Asp169-Pro170 و Asp213-Pro214. والجدير بالذكر أن نفس البروتين يحتوي على ثنائي ببتيدي آخر هو Asp45-Pro46، إلا أن هذا الأخير لا يتعرض للحلمة بسبب وقوعه مدفوناً داخل نواة البروتين مما يحميه من الحلمة.
- يمكن أن تنتج الحلمة بتواسط إنزيمات البروتيازات والتي تتوزّع عادة في:
 - GI (وتخرّب الأدوية المعطاة عبر الفم)، Plasma (تخرّب الأدوية المعطاة وريدياً)، البروتيازات داخل الخلوية (تخرّب الدواء فقط إذا تمكّن من دخول الخلايا)
- وهناك ستة أنواع الأشهر بين البروتيازات هي:
 - Serine proteases ،Threonine proteases ،Cycteine proteases ،Aspartic acid proteases ،Metalloproteases و Glutamic acid proteases .

إزالة الأميد

- إن من بين تفاعلات الحلمهة المسببة لتخرب البروتين هي عملية إزالة الأميد من ثمالي الأسباراجين Asn والغلوتامين Gln لتتحولا إلى الحمض الأسبارتي Asp والحمض الغلوتامي Glu. ويمكن أن يحدث ذلك تلقائياً في درجات باهاء حذية.
- وعلى الرغم من أن الحموض الأمينية المقابلة Asp و Glu تحدث بشكل طبيعي، إلى أن إزالة الأميد يمكن أن تؤثر في الفعالية الحيوية للبروتين، ونصف عمره، وشكله، وتكدسه، وحتى تحريضه لجلمة المناعة.
- بشكل عام، يكون Gln أكثر تعرّضاً لإزالة الأميد من Asn.



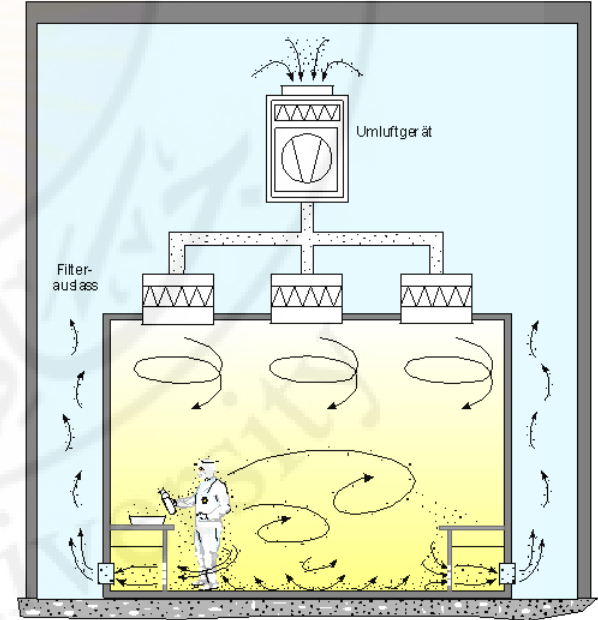
The logo of Damascus University is a circular emblem. It features a central yellow sunburst or star-like shape. Above this shape, the Arabic text "وقل رب زدني علما" (O Lord, increase my knowledge) is written in a semi-circle. Below the central shape, the name "Damascus University" is written in English, also in a semi-circle. The entire logo is rendered in a light gray, semi-transparent style in the background.

SPECIAL TOPICS IN BIOPHARMACEUTICALS

CONTAMINATION

التلوث والعقامة

- إن من غير الممكن تعقيم المنتج النهائي للأدوية البيولوجية. لذلك، كان لا بد من اتخاذ خطوات عديدة وصارمة لتحقيق العقامة خلال عمليات التحضير.
- من تلك الخطوات:
 - أن تكون جميع الأجهزة والأدوات المستخدمة عقيمة
 - أن يجري العمل في غرف نظيفة Clean rooms وباستخدام تهوية مفلترة بفلتر تعرف باسم HEPA Filters
 - أن يجري التحري وبشكل مستمر على الفيروسات والجراثيم ومولدات الحرارة Pyrogens



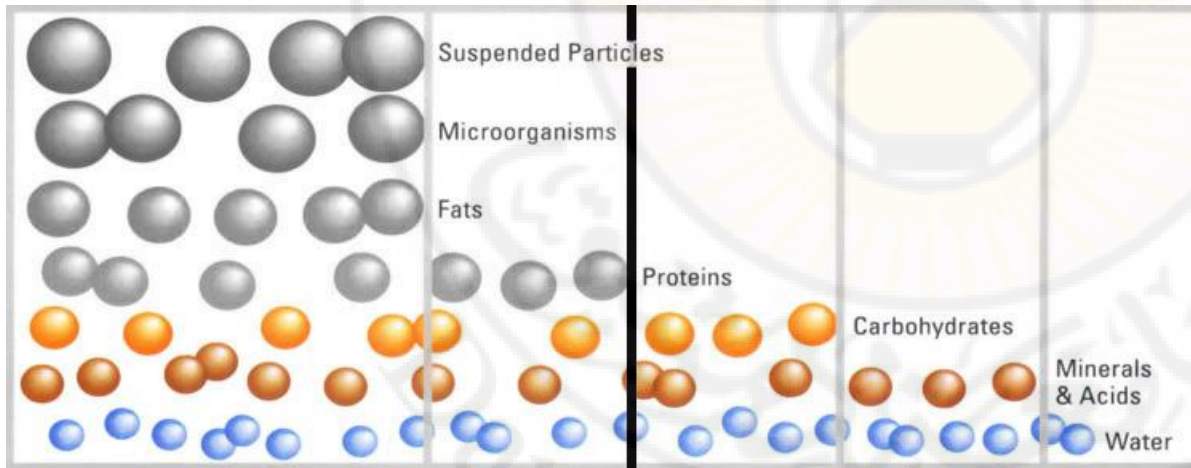
التلوث الفيروسي والخطوات الممكن اتباعها للحد منه

- يمكن معالجة الفيروسات إما عن طريق تثبيط الفعالية inactivation أو الإزالة removal كما في الجدول التالي أدناه.
- ملاحظة: يمكن لبعض الخطوات الموضحة بالجدول أن تؤدي إلى تخرّب البروتين.

Category	Type	Example
Inactivation	Heat	Pasteurization
	Radiation	UV-light
	Dehydration	Lyophilization
	Cross linking	Formaldehyde
	Neutralization	Antibodies
Removal	Chromatography	Affinity chromatography
	Filtration	Ultrafiltration
	Precipitation	Cryoprecipitation

التلوث بالجراثيم وموّلّادات الحرارة والخطوات الممكن اتباعها للحد منها

- يمكن استعمال فلاتر ذات مسام بقطر 0.22 ميكرو متر للتخلص من الجراثيم
- يجب استخدام صادّات حيوية في الأوساط الخاصّة بالزراع الخلوي
- يمكن الكشف عن موّلّادات الحرارة (مثل الذيفانات الداخلية endotoxins و LPS المشكلة للجدار الخلوي للجراثيم) بإحدى طريقتين:
 - الحقن بالأرانب: وهذه الطريقة كمية وغير كمّية حيث لا يمكن قياس تراكيز الذيفانات البيروجينات
 - اختبار Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test: وهو اختبار يجري في الزجاج ويكشف فقط عن وجود LPS



- يمكن استخدام الترشيح الفائق ultrafiltration للتخلّص من الجراثيم والجزيئات الصلبة وبعض أنواع الدسم ($LPS > 10$ kDa). كما يمكن استخدام الاستشراب المبادل للشوارد على اعتبار LPS ذات شحنة سالبة كبيرة.

التلوّث بالدنا الخلوي Cellular DNA

- تجدر الإشارة إلى أن معظم منظومات التعبير الجيني الثديية mammalian expression systems هي عبارة عن خطوط خلوية غير مستميتة immortalized اصطنعت عن طريق إعدادها بمورثات مولدة للورم oncogenes
- ويمكن أن تتلوّث بعض البروتينات المأشوبة المحضّرة في تلك المنظومات بقطع من الدنا تحمل المورثة المولّدة للورم.
- لذلك، من الضروري جداً أن تزيل طريقة التنقية الدنا والرنا الخلوي، على ألاّ يتعدّى تركيز الدنا في المنتج النهائي 10 بيكو غرام / لكل جرعة دواء!!
- يمكن تحرّي وجود آثار الدنا في مستحضرات البروتين باختبار تهجين للدنا DNA hybridization test يكشف عن وجود مورثات معيّنة أو قطع من الدنا المجيني الخاص بالخطوط الخلوية المستخدمة.

التقانة الحيوية الصيدلانية والبروتينات الحيوية الصيدلانية

Special Topics in Protein

- *Preformulation / Formulation*
- *Delivery of Biopharmaceutics*

ما قبل الصياغة Preformulation

- تتضمن العمليات التي تسبق صياغة الشكل الصيدلاني للبروتينات الدوائية (والتي تُجرى على المحضّر الخام للبروتين) الاهتمام بعوامل عدة منها: بنية ونقاوة البروتين، والعوامل التي تؤثر على ثباتيته الفيزيائية والكيميائية، ووسائل تحقيق الثباتية. stability وتقييم الانحلالية.
- يتم إثبات مرتسم profile المكونات السكرية الأساسية للبروتين، ومرتسم انحلالية البروتين وثباتيته ونقطة التساوي الكهربائي الخاصة به والتي تحدد درجة الباهاء التي يجب حفظه بها. كما تجري دراسة تأثير العديد من الوقاءات على الثباتية. وأخيراً، يجب أن تحدد الدراسات السابقة للصياغة الشوائب الموجودة في مستحضر البروتين الخام لأنها ستؤثر غالباً على ثباتية المنتج.
- وعلى الرغم من أن التطور في وسائل التقانة الحيوية أدّى إلى منتجات بروتينية نقية، فإن هذه البروتينات النقية غالباً ما تكون في الواقع أكثر عرضة للتخرّب وذلك بسبب كون هذه البروتينات لا تتواجد في بيئتها الطبيعية التي عادةً ما تساهم في ثباتها، حيث تضم هذه البيئة عادةً بروتينات أخرى وسكريات ودسم أو أملاحاً تساعد جميعها في ثبات البنية البروتينية.

مختصر الطرق التحليلية لاختبارات التخرب والنقاوة المستخدمة قبل صياغة الشكل الصيدلاني الفعّال

Table 4.3 Analytical Methods for Degradation/Purity Tests

Degradation reaction	Analytical methods
Purity testing	SDS-PAGE (reducing and nonreducing), UV assay, SEC-HPLC, CEX-HPLC, LAL test, ECP enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot, DNA hybridization
Deamidation	Isoelectric focusing, ion exchange chromatography
Oxidation	Reverse-phase HPLC, peptide analysis
Aggregation	Size exclusion chromatography, SDS-PAGE, light scattering, analytical ultracentrifugation

The logo of Damascus University is a circular emblem. It features a central yellow sunburst with a stylized yellow and white structure in the center. The emblem is surrounded by Arabic calligraphy in a circular border. Below the emblem, the words "Damascus University" are written in a serif font.

SPECIAL TOPICS IN BIOPHARMACEUTICALS

FORMULATION

يجب أن تتغلب عمليات الصياغة formulation على العديد من التحديات التي تواجه تركيب الأدوية البروتينية

- لا يمكن استخدام نفس الصيغ الصيدلانية الخاصة بالأدوية التقليدية بسبب أن معظم تلك الصيغ تخرب البروتينات (مثال، عمليات الضغط والتحتير والرج agitation وتغيرات درجة الحرارة والخلط شديد السرعة high shear mixing)
- بالنسبة للبروتينات، لا يتجاوز عمر التخزين shelf life أربعة أسابيع بعد حل المحضر البروتيني (في غياب المضافات المناسبة)، ويُرجى من المحضر الصيدلاني الأمثل المحافظة على ثباتية الدواء في الزجاج وفي العضوية



ولحل معظم المشاكل المتعلقة بصياغة البروتينات، يمكن استخدام المُضافات Additives



- من أهم المضافات:
 - وقاءات buffers
 - مادة تزيد الانحلالية solubility enhancer
 - مضاد للادمصاص anti-adsorption
 - مضاد للتكدّس anti-aggregation
 - مادة حافظة preservative
 - مضاد للأكسدة anti-oxidant
 - واقٍ من البرودة والتجفيد lyoprotectant/cryoprotectant
 - عوامل فعالة على السطح
 - عوامل خاصّة بمنظومة إيذاء الدواء delivery system

المواد الحافظة Preservatives

- أحد التحديات التي تواجه البروتينات في المحلول هو تلوثه بالأحياء الدقيقة. الأمر الذي ينطبق أيضاً على البروتينات المجفّدة بعد حلّها وحفظها لمدة أسابيع بعد ذلك.
- من المواد الحافظة الشائع استخدامها في محاليل البروتينات
 - Sodium bisulfite
 - Thimerosal
 - Benzyl alcohol

الثباتية: الوقاءات Buffers واختيار درجة الباهاء

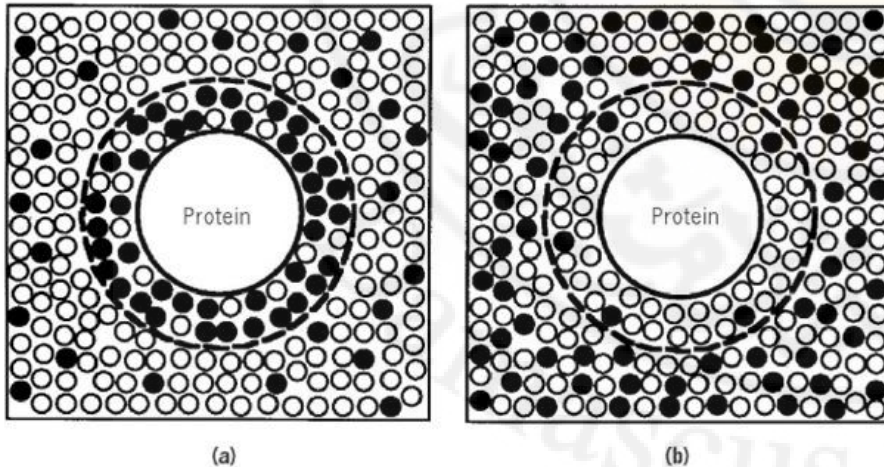
- إضافة إلى دورها في ضبط الباهاء، يمكن للوقاءات أن تؤثر في انحلالية البروتين
- يفضل استخدام وقاء ذو باهء بعيدة عن نقطة تساوي التكهرب PI للبروتين
- يمكن أن يحدث تخرّب البروتين عند pH معيّنة (مثلاً: إزالة الأمين deamidation والتي يمكن أن تحصل عند pH حمضية والأكسدة oxidation التي تحصل عادةً في pH قلوية)
- يمكن لدرجات الباهاء الحديّة pH أن تخرّش منطقة الحقن
- من أهم الوقاءات المستخدمة للبيتيدات والبروتينات:
 - الفوسفات phosphate (pH 6.2 to 8.2)
 - الأسيتات acetate (pH 3.8 to 5.8)
 - السيترات citrate (pH 2.1 to 6.2)
 - السوكسينات succinate (pH 3.2 to 6.6)
 - تريإيثانول أمين triethanolamine (pH 7.0 to 9.0)
 - وقاءات الحموض الأمينية (الهستيدين، الغليسين، الأرجنين)

انحلالية البروتين Solubility

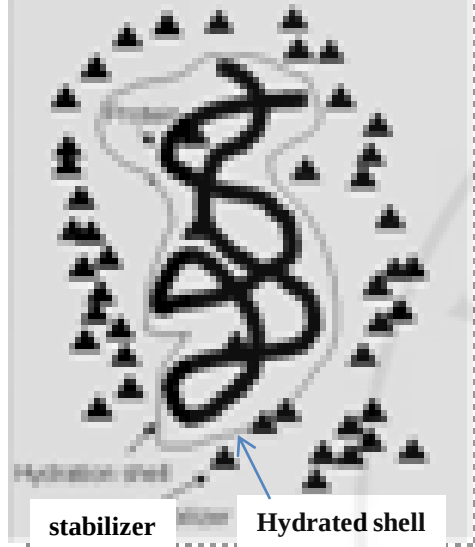
- تعدّ انحلالية البروتين من أشدّ التحديات التي تواجه صياغة الشكل الصيدلاني وأهمها بسبب أن التمسّخ الفيزيائي والتكدّس يسببان فقداناً في الانحلالية وربما فعالية البروتين.
- تعرّف انحلالية البروتين بأنها المقدار الأعظمي للبروتين الذي يمكن حلّه في ظروف معيّنة، وبحيث يكون المحلول رائقاً ولا يشكّل فيه البروتين هلاماً أو راسباً.
- تكون انحلالية البروتين في حدّها الأدنى قرب نقطة PI له. كما تخفض المحلات العضوية من انحلالية البروتين.
- بشكل عام، تكون البروتينات ذات البنية الحلزونية helix-structure أكثر انحلالية من البروتينات ذات البنية الصفائحية b-sheet، كما تؤدي غلظة البروتين إلى زيادة انحلاليته أيضاً.
- كثيراً ما يستخدم الترسيب بـ 8000 polyethylene glycol (PEG) لقياس انحلالية البروتين، حيث أن العلاقة بين انحلالية البروتين ومستويات PEG 8000 هي خطّية linear. يتم "استبعاد" جزيئات الـ PEG من سطح البروتين، بحيث يكون البروتين مركّزاً في حجم صغير ويطرسّب عند تجاوزه لانحلاليته. وتسمّى هذه الآلية بالاستبعاد التفضيلي preferential exclusion.

الاستبعاد التفضيلي Preferential Exclusion

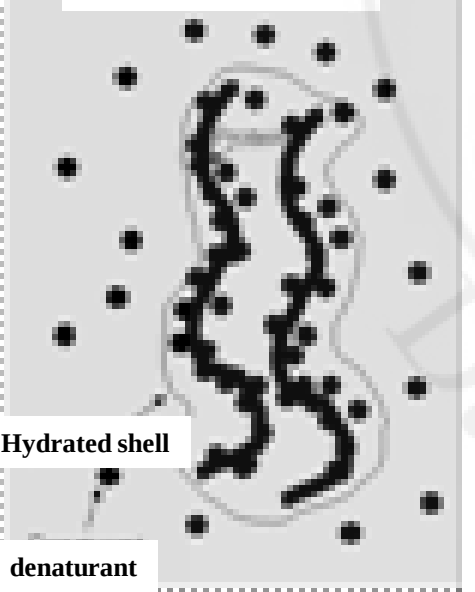
- تتنافس جزيئات المواد المضافة عادة مع الماء للارتباط مع البروتين، لذلك يوصف الاستبعاد التفضيلي من البروتين (للمادة المضافة) أحياناً بالإمالة التفضيلية preferential hydration للبروتين، بحيث يكون تركيز المادة المضافة أقل في البيئة المحيطة بالبروتين من باقي أجزاء المحلول!
- هنالك آليتان يمكن أن توضح أيّاً منهما استبعاد المادة المضافة (أو السواغ excipient)
 1. يمكن للاستبعاد أن يحدث فراغياً (بسبب الإعاقة الفراغية لجزيئات السواغ) حيث تأخذ جزيئات السواغ حجماً أكبر من جزيئات الماء حول البروتين فتحلّ مكانها جزيئات الماء ويجري استبعاد السواغ إلى أجزاء المحلول الأخرى.
 2. يمكن للمادة المنحلة (المادة المثبتة stabilizing agent في السواغ) أن ترتبط بالماء بشكل أفضل من ارتباطها بمواد منحلة أخرى أو من ارتباط جزيئات الماء مع بعضها البعض.



Preferential exclusion



Preferential binding



يمكن أن يسهم الاستبعاد التفضيلي للمادة المثبتة في السواغ في تثبيت الشكل المطوي (الفعال) والمنحل للبروتين

يؤدي استبعاد مادة السواغ من سطح البروتين إلى خلق حالة غير مفضلة ثرموديناميكياً بسبب أن الطاقة الحرة لكل من البروتين والسواغ تزداد، ويكون استبعاد السواغ من الشكل غير المطوي unfolded أكبر منه في الشكل المطوي folded بسبب زيادة سطح الشكل غير المطوي، مؤدياً إلى زيادة عدم الثباتية الثرموديناميكية للشكل غير المطوي للبروتين. ونتيجة لذلك، يتم تثبيت الشكل المطوي للبروتين.

وهكذا، فإن تثبيت الشكل الفعال للبروتين (نتيجة استخدام السواغ المثبت) ينتج عن عدم ثباتية الشكل غير المطوي للبروتين

يمكن لمواد معينة (مثل اليوريا urea) أن ترتبط تفضيلاً preferential binding مع جزيئات البروتين، ويكون ذلك غالباً لجزيئات البروتين غير المطوي unfolded وبالتالي تزيد من تمسخ البروتينات وتستخدم كمادة ممسّخة denaturing agent ومرسّبة للبروتينات

بعض المضافات الشائعة في محاليل البروتينات: الألبومين والحموض الأمينية

- بسبب ثباتيته وانحلاليته المتميزتين، استخدم الألبومين بشكل شائع كمادة مضافة (سواغ) في محاليل البروتينات الدوائية.
- تستخدم تراكيز بين 0.1 و 1.0 % كمواد مثبتة ولمنع ادمصاص الببتيدات والبروتينات الدوائية على السطوح المختلفة للعبوات.
- إن أحد مساوئ استخدام الألبومين كسواغ في المحاليل البروتينية هو تداخله في العديد من التقنيات التحليلية لقياس كمية البروتين. إضافة إلى ضرورة تجنب تلوث المستحضر الدوائي بشوائب (أو مواد بيولوجية) يمكن أن تأتي من تحضير الألبومين (علماً أن الألبومين المأشوب توفر حديثاً)
- استخدمت بعض الحموض الأمينية لخفض الادمصاص، وتثبيط التكدس، وتثبيت البروتينات تجاه التمسّخ بالحرارة.
- من أفضل الحموض الأمينية في زيادة انحلالية البروتين هي (Gly, Asp, Glu, Arg, Lys, His).
- ويمكن لهذه الحموض الأمينية تثبيت الشكل الفعال من البروتين بآلية الاستبعاد التفضيلي.

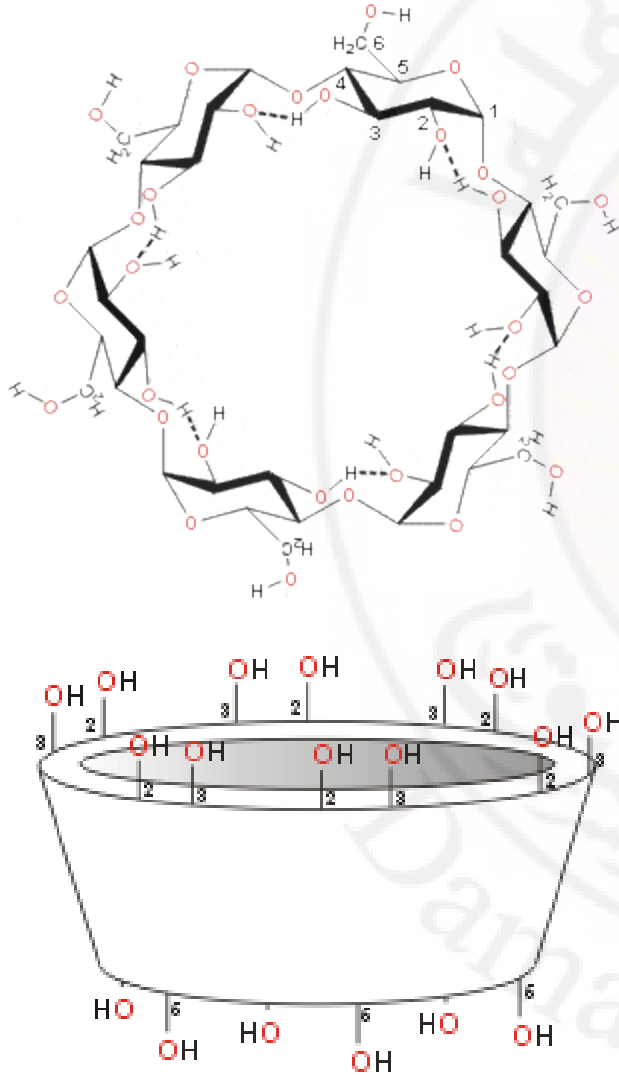
بعض المضافات الشائعة في محاليل البروتينات: السكريات

- يمكن استبعاد السكروز بشكل تفضيلي من سطوح البروتين نظراً للروابط القوية التي يبيديها مع الماء والتي يزيد بها من قوى التوتر السطحي للماء. يفيد ذلك في تثبيت الشكل الفعال للبروتين.
- مع ذلك، يمكن أن يزيد السكروز من احتمال التلوث الجرثومي

المواد المستخلبة chelating والمرجعة reducing

- يمكن لبعض الشوارد الموجبة والسالبة أن ترتبط بالبروتين وتؤدي إلى انخفاض في انحلاليته وثباته. تستخدم لأجل ذلك مواد مستخلبة مثل EDTA والتي أيضاً يمكن أن تخفض من عملية أكسدة البروتين بوجود بعض المعادن.
- تستخدم أحياناً مادة beta mercaptoethanol (بتراكيز محدّدة) لمنع تأكسد مجموعات السلفهيدريل في البروتينات (على ألا ترجع الجسور ثنائية الكبريت والتي غالباً ما تتوضع داخل البروتين)

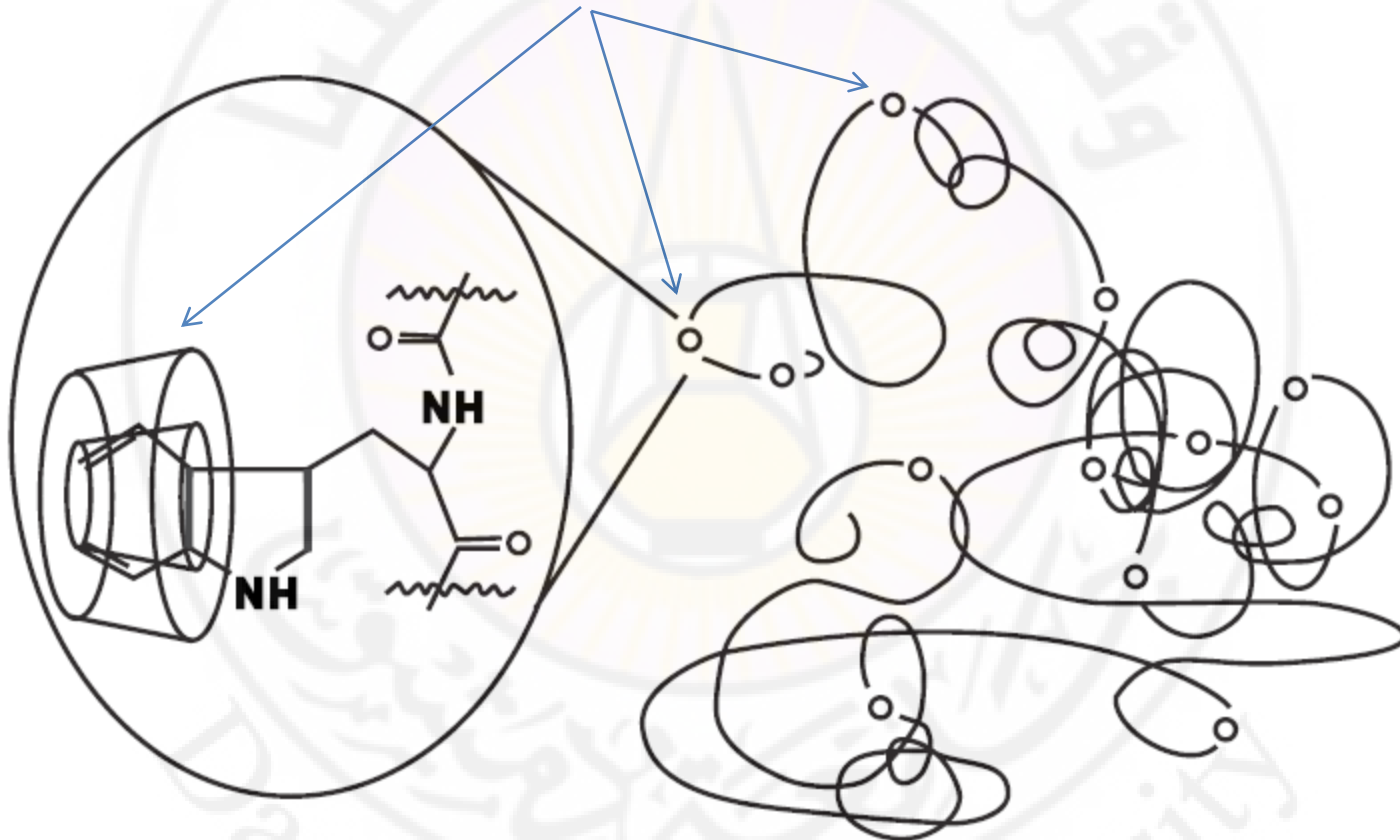
بعض المضافات الشائعة في محاليل البروتينات: السيكلودكستريينات cyclodextrin



- السيكلودكستريينات هي سكريات تستخدم بشكل شائع في زيادة انحلالية وثباتية البروتينات في العبوات وخاصة قبل إيتاء الدواء.
- يمكن أن تمنع السيكلوديكستريينات من تكّس البروتينات، والذي ينجم عن تخرب طي البروتين إما نتيجة الادمصاص على السطح أو نتيجة رج الدواء قبل الاستعمال وما ينجم عنه من سطوح ماء-هواء air-water interfaces بحيث تتكشف الحوض الأمينية الكارهة للماء نحو طور الهواء وتؤدي إلى التكدس والتمسّخ.
- تتضمن آلية الاستفادة من السيكلودكستريينات حجز أو انغراس inclusion الجزء المنكشف من البروتين ضمن الحلقة الفراغية لمركب السيكلودكستران، وبحيث يمنع ذلك تأثر أجزاء البروتين المنكشفة (الكارهة للماء) مع بعضها البعض وبالتالي تمنع تكدس البروتين.
- يتم ذلك غالباً عبر انغراس المجموعات الوظيفية الجانبية للحموض الأمينية العطرية في حلقة السيكلودكستران.

آلية عمل السيكلودكستريانات

Cyclodextrins



بعض المضافات الشائعة في محاليل البروتينات: الكحولات عديدة الإماهة Polyhydric alcohols

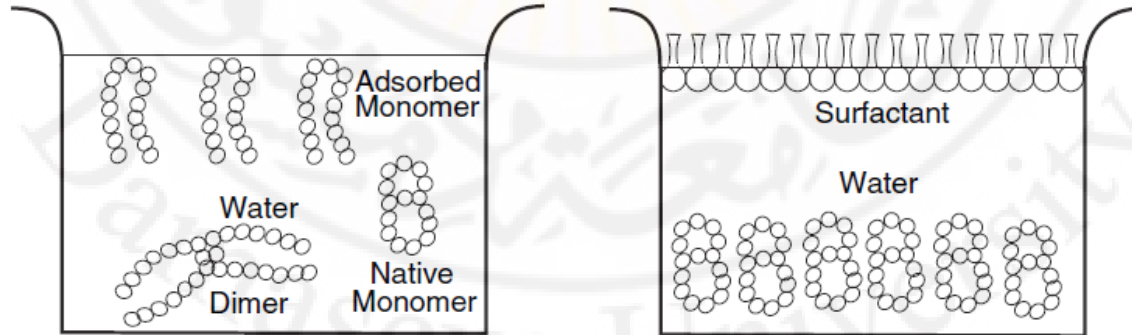
- وتتضمن جزيئات مثل الغليسيرول والسوربيتول والمانيتول، وهذه الجزيئات على الرغم من إفتها للارتباط مع المجموعات القطبية للبروتين إلا أن الاستبعاد التفضيلي لها هو السائد نتيجة روابطها القوية جداً مع جزيئات الماء
- يجب الانتباه إلى أن بعض هذه المواد يمكن أن يزيد احتمالية التلوث بالأحياء الدقيقة.

الأملاح Salts

- يتم استبعاد الأملاح من سطح البروتين- محل protein-solvent interface بسبب زيادة التوتر السطحي للبروتين المماه بالماء.
- وباستخدام تراكيز منخفضة من الأملاح، تكون البروتينات محاطة بشوارد معاكسة لها بالشحنة وبالتالي تنقص من الطاقة الحرة الساكنة electrostatic free energy مما يؤدي إلى زيادة انحلالية البروتين.
- يتم استبعاد NaCl و Na_2SO_4 بشكل تفضيلي بينما يبدي CaCl_2 و MgCl_2 بعض الارتباط مع سطح البروتين.

العوامل الفعالة على السطح Surfactants

- يعدّ الـ Polysorbate 80 من أكثر العوامل الفعالة على السطح استخداماً في محاليل الأدوية البروتينية
- ويكون الهدف من استخدام تلك العوامل هو منع تأثر البروتين مع السطوح الهوائية التي تتشكّل خلال رج العبوات أو حل المسحوق البروتيني المجفّد، حيث تتجمع العوامل الفعالة على السطح عند تلك السطوح المتشكلة وتمنع إزالة طي البروتين وتكدسه وترسبه.
- من جهة أخرى، يمكن للعامل الفعال على السطح أن يرتبط مع البروتين ويخفض من تواجد المجموعات البروتينية الكارهة للماء والتي تتسبب عادة في تكدّس البروتين نتيجة التأثيرات بين جزيئات البروتين فيما بينها

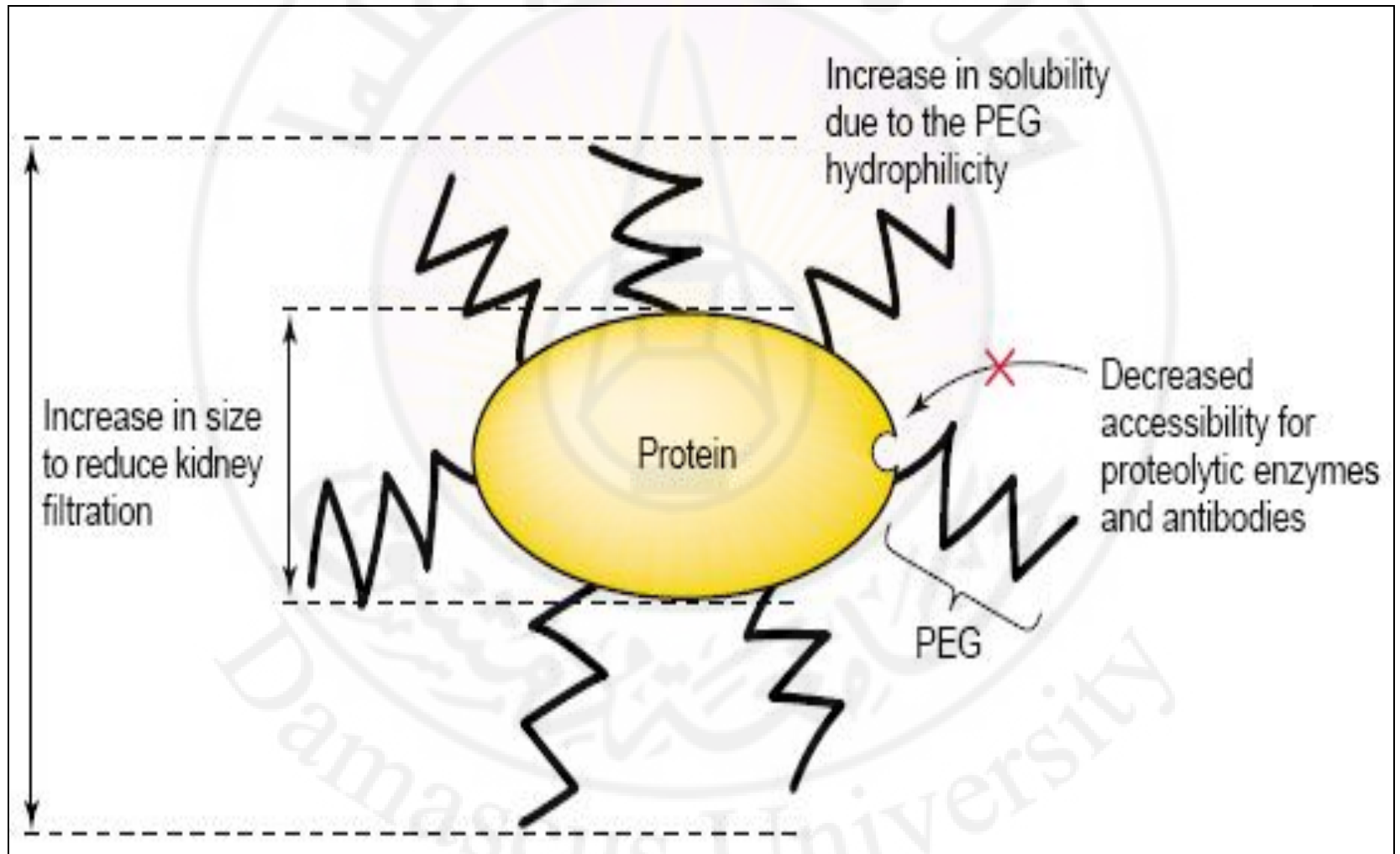


الزجاج المستخدم في عبوة الدواء

- يجب استخدام زجاج رقيق من النمط الأول Type I glass فقط.
- كما يجب الانتباه إلى طبيعة المادة المطاطية المرنة التي تستخدم في إغلاق الفيالات بسبب أنواعها العديدة التي يمكن أن تضيف شوائب لمحاليل البروتينات قد تسبب ترسيب البروتينات أو تمسخها على الأقل.
- يمكن استخدام سدادات مغطاة بالتفلون

البولي إيثيلين غليكول PEG

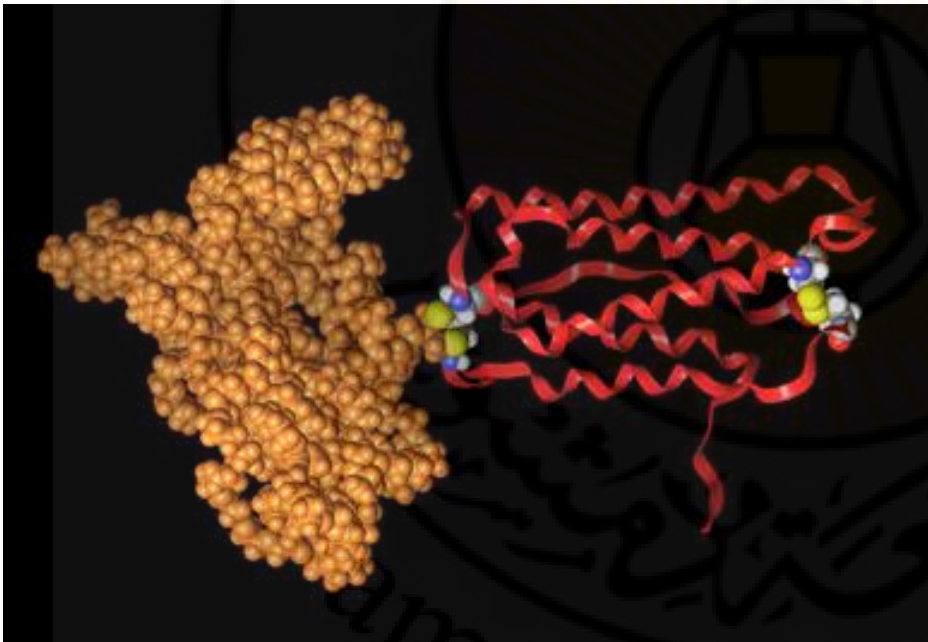
- يتم استبعاد PEG تفضيلاً من سطح البروتين بسبب حجمه الكبير نسبياً إلا أنه قد يسبب تمسخ البروتين نظراً لخواصه الكارهة للماء وارتباطه ببعض البروتينات خاصة عند درجات حرارة مرتفعة.
- مع ذلك، يمكن استخدام PEG كمانع لادمصاص البروتين على سطح العبوات الدوائية كما أن خواصه الكارهة للماء تضعف كثيراً في درجات حرارة منخفضة (صفر أو تحت الصفر) مما أدى إلى استعماله كمثبت للبروتين خلال التجميد نظراً لأن استبعاده في تلك الدرجات من سطح البروتين يكون أعظماً.
- من جهة أخرى، يمكن ربط جزيئات PEG تساهمياً covalently (وهو ما يدعى بـ Pegylation) مع جزيئات البروتين ولذلك عدة تطبيقات من أهمها زيادة العمر النصفى للدواء البروتيني نتيجة خفض التصفية الكلوية أو منع الحلمة بإنزيمات البروتيناز نتيجة إعاقتها فراغياً



PEGylation

- Covalent attachment of PEG to another molecule such as protein.

Interferon alfa is surrounded by a PEG chain.

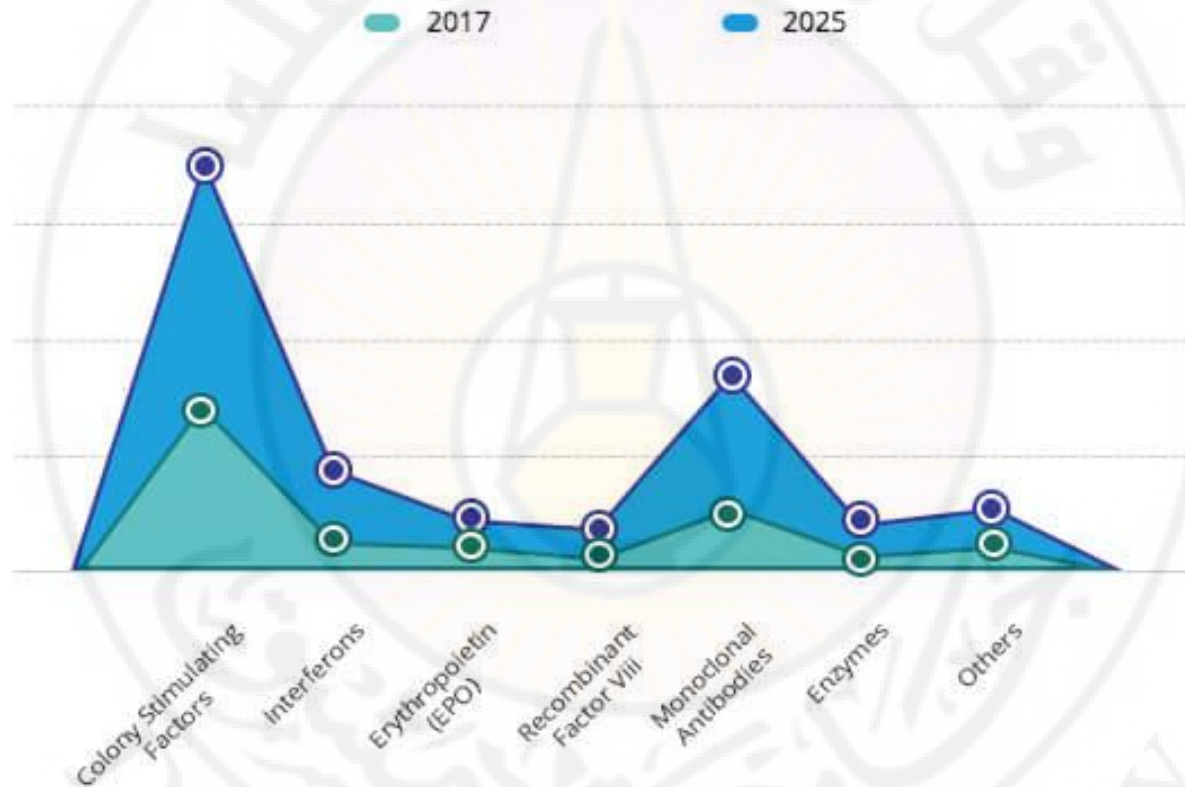


PEGylated proteins in the market

Brand Name	Drug name	Parent Drug	Indication	Approval Year
Adagen®	Pegadamase	Adenosine deaminase	Severe combined immunodeficiency disease (SCID)	1990
Oncaspar®	Pegaspargase	Asparaginase	Leukaemia	1994
PEG-INTRON®	Peginterferon-a2b	IFN-a2B	Hepatitis C	2000
PEGASYS®	Peginterferon-a2a	IFN-a2A	Hepatitis C	2001
Neulasta®	Pegfilgrastim	Granulocyte-colony stimulating factor (GCSF)	Neutropenia	2002
Somavert®	Pegvisomant	Growth Hormone antagonist	Acromegaly	2003
Macugen®	Pegaptanib	Anti-VEGFC aptamer	Age-related macular degeneration	2004
Mircera®	Epoetin beta-methoxy polyethylene glycol	Erythropoietin (EPO)	Anemia associate with Kidney disease	2007
Cimzia®	PEG-Certolizumab pegol	Anti-TNF Fab	Rheumatoid arthritis & Crohn's disease	2008

GLOBAL PEGYLATED PROTEIN THERAPEUTICS MARKET

BY PRODUCT TYPE



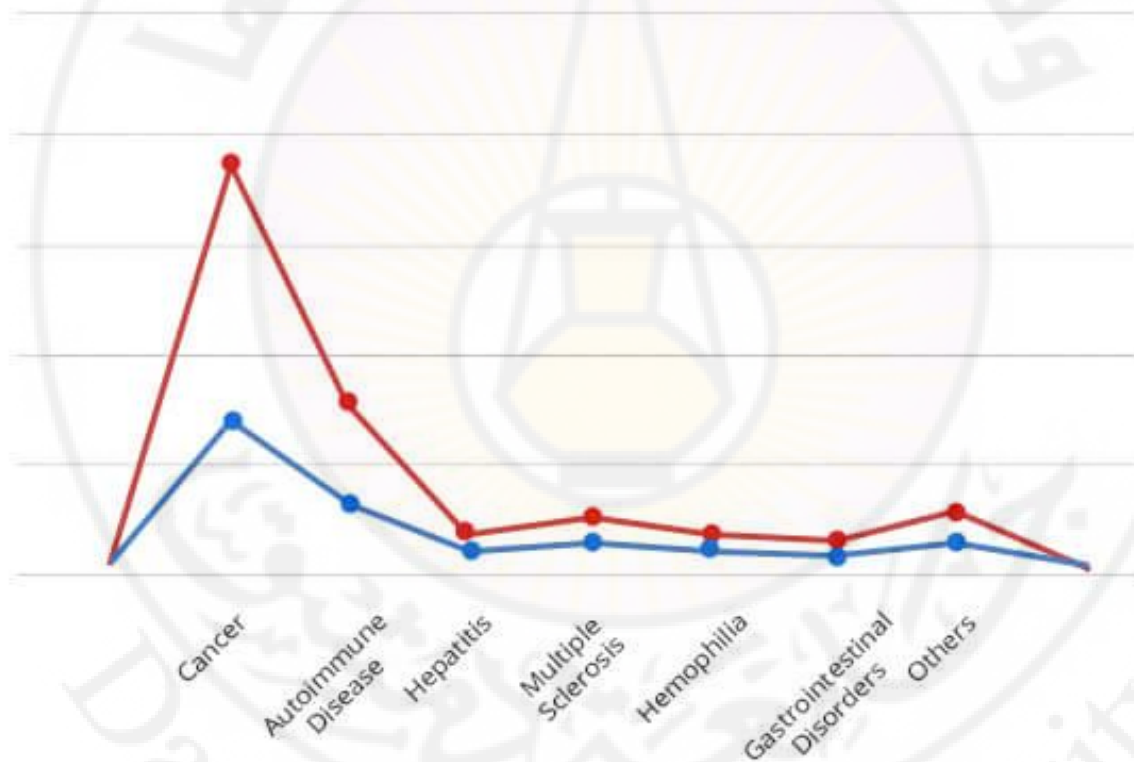
COLONY STIMULATING FACTOR segment holds a dominant position in 2017 and would continue to maintain the lead over the forecast period.

GLOBAL PEGYLATED PROTEIN THERAPEUTICS MARKET

BY APPLICATION

2017

2025



CANCER segment is projected as one of the most lucrative segments.

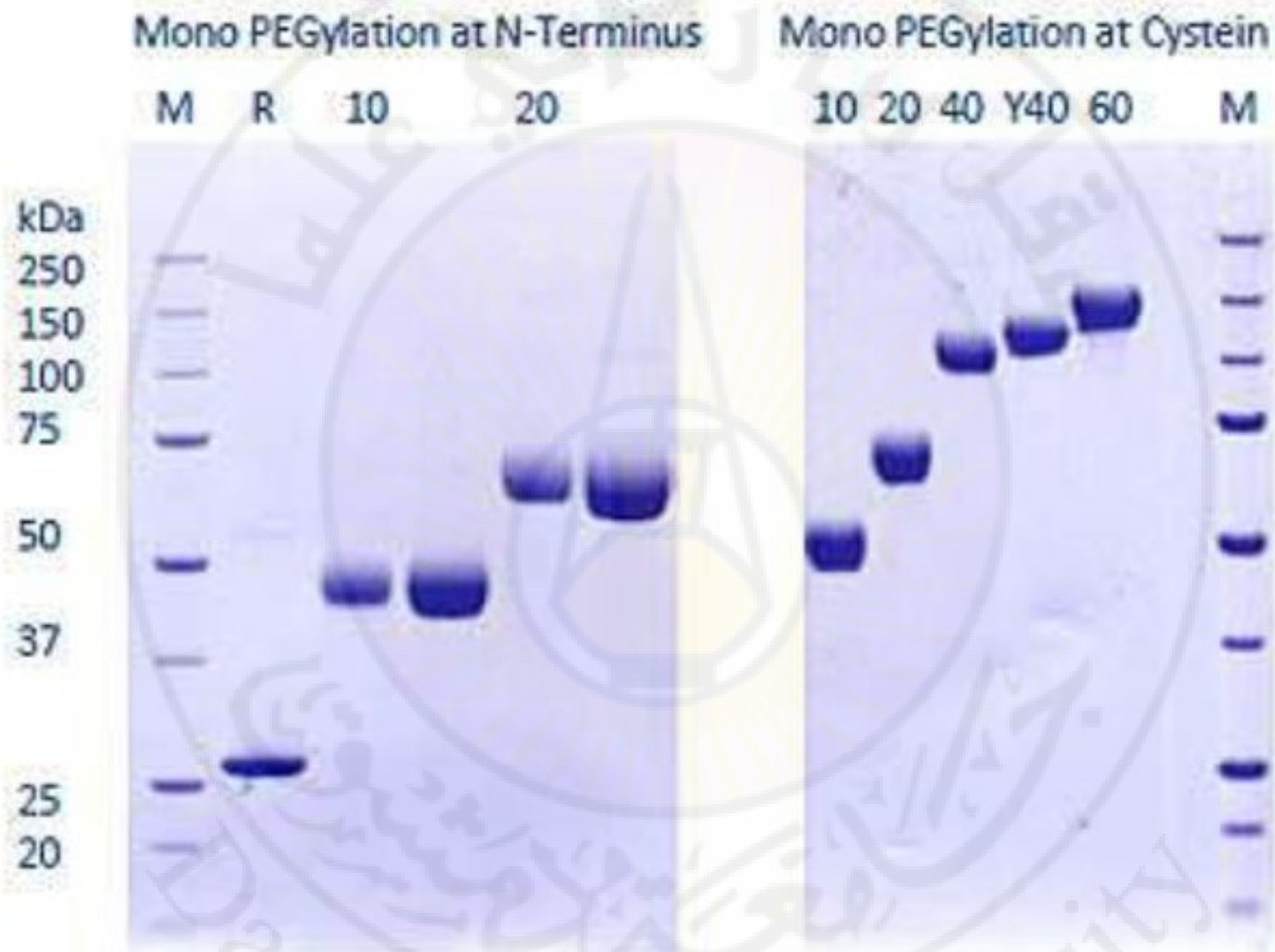
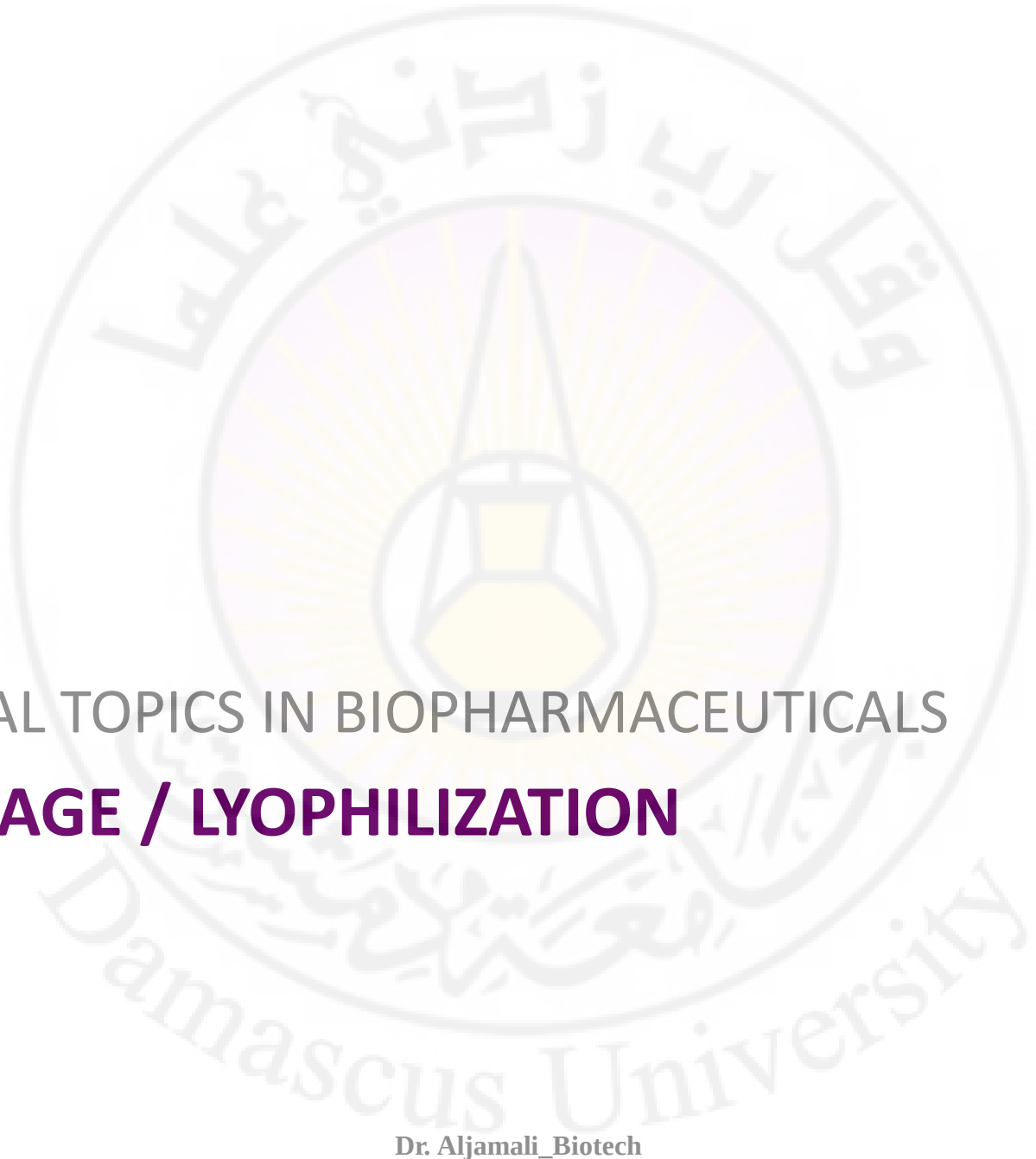


Figure 3: SDS-PAGE of Final PEG-drug conjugates
M = Marker; R= unmodified protein; Numbers indicate MW of PEG in kDa

The logo of Damascus University is a circular emblem. It features a central yellow sunburst or star-like symbol. The top half of the circle contains Arabic calligraphy in a light grey font. The bottom half of the circle contains the words "Damascus University" in a light grey serif font.

SPECIAL TOPICS IN BIOPHARMACEUTICALS

STORAGE / LYOPHILIZATION

الحفظ Storage

تمكن صياغة الأشكال الصيدلانية للبروتين على شكل:

1. محاليل مائية aqueous solutions

1. تعتمد ثباتية محاليل البروتينات على pH والقوة الشاردية ودرجة الحرارة والمواد stabilizers المستخدمة

2. يُستخدم زجاج رقيق وأملس (type I glass) لمنع الادمصاص.

3. تستخدم أوعية محكمة الإغلاق air-tight container

4. تستخدم أوعية عاتمة dark containers

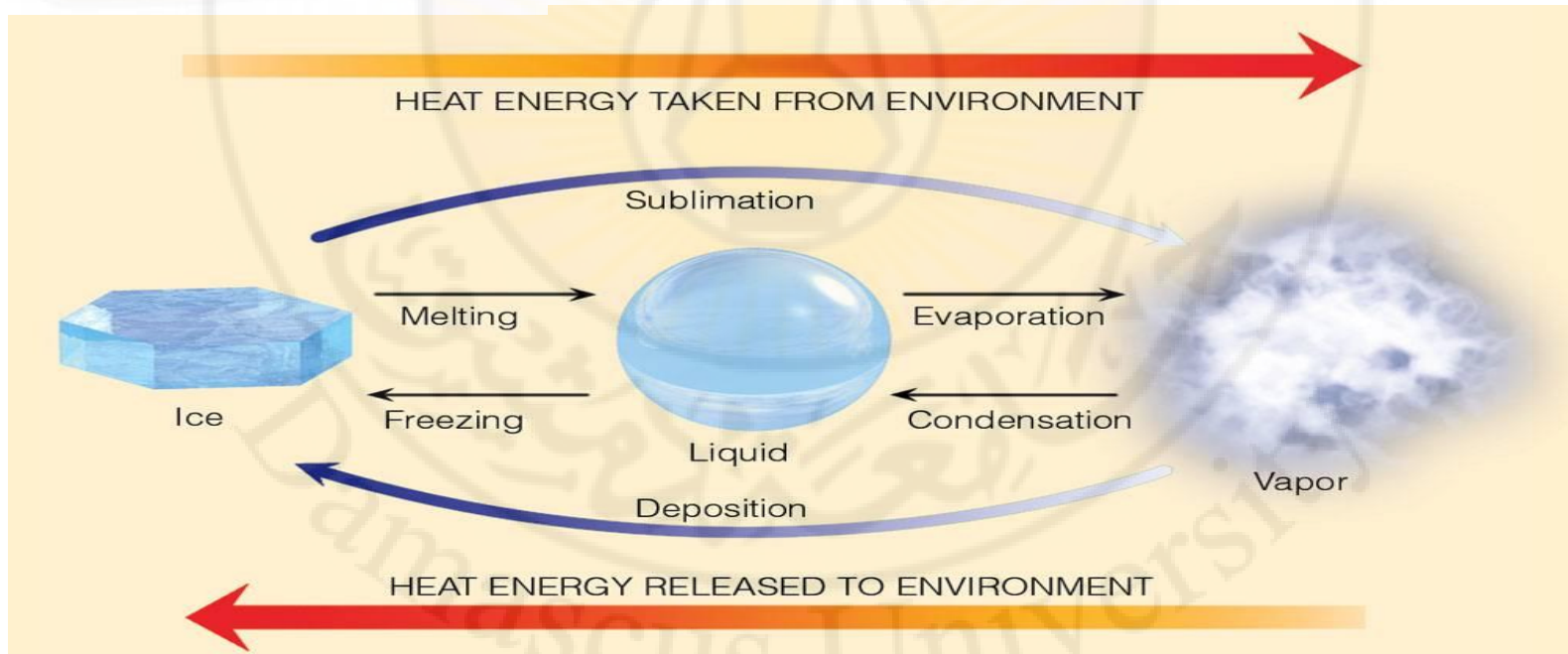
2. أشكال مجفّدة lyophilized (freeze-dried) form

3. أشكال جافّة صلبة solid form (pills)

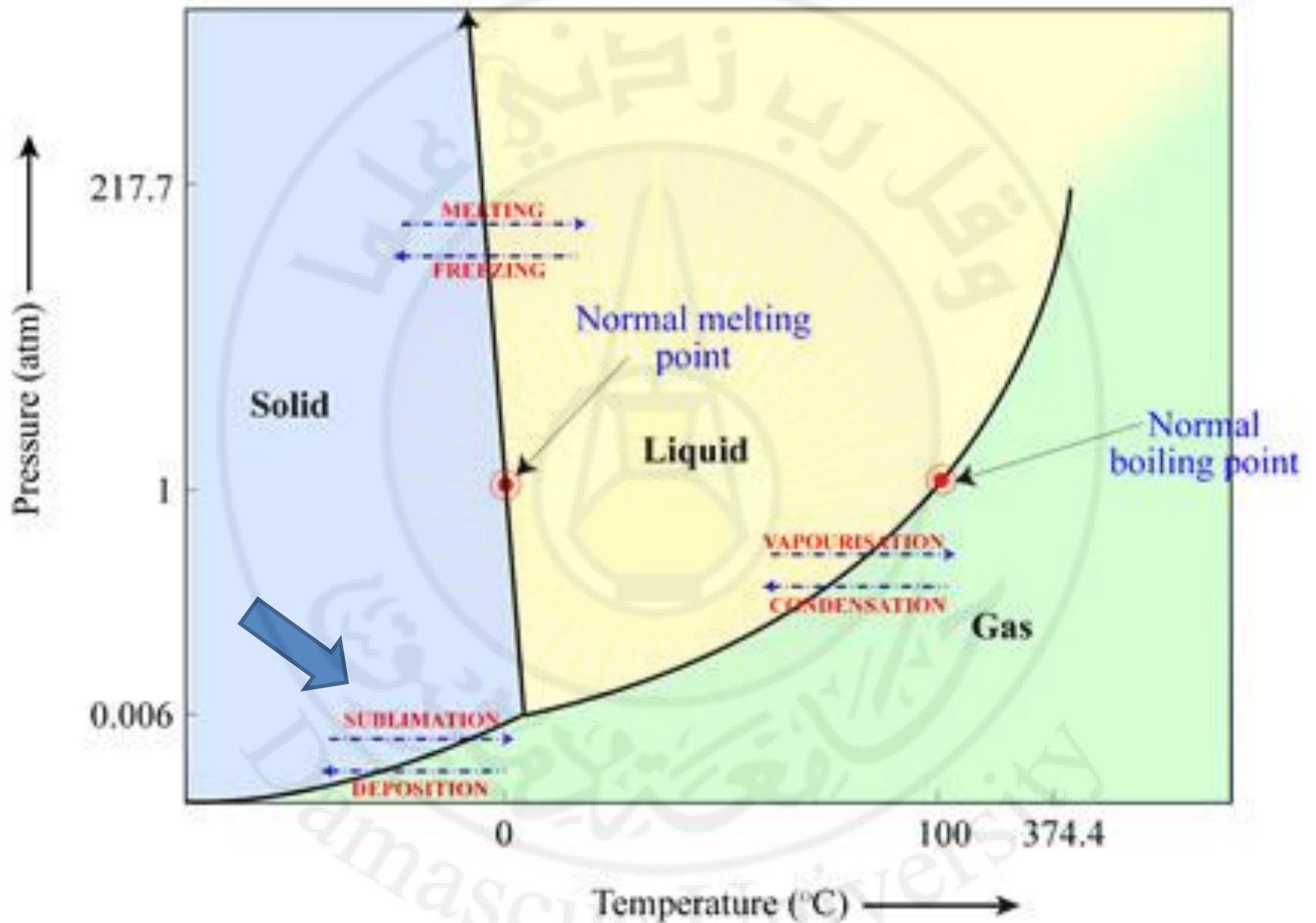
التجفيد Freeze-drying (lyophilization)



- يحرّض وجود الماء في محاليل البروتينات التخرّب الكيميائي والفيزيائي، والذي ينقص من نصف عمر الدواء
- يزيل التجفيد الماء من خلال التصعّد وليس التبخر



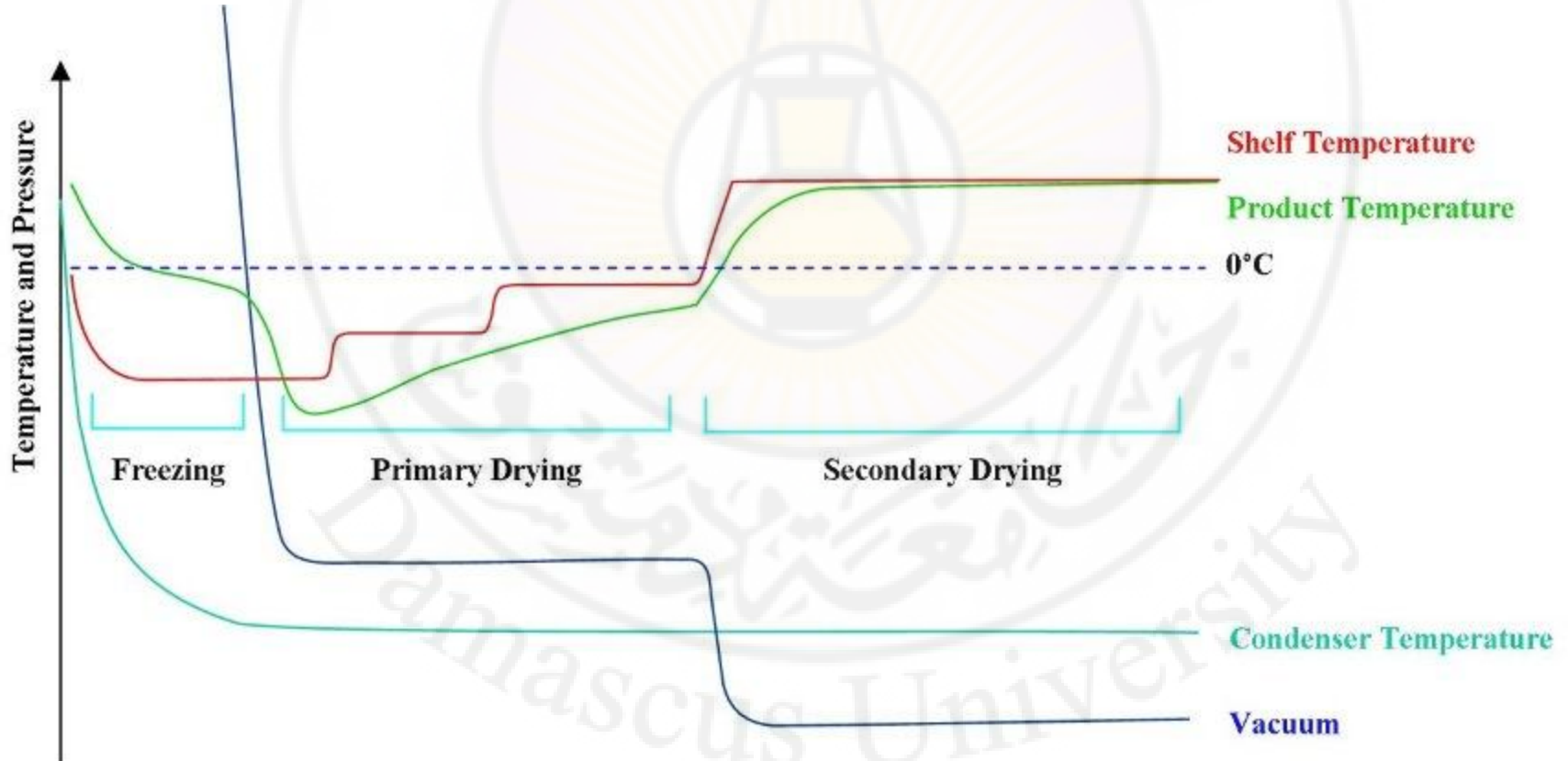
© 2007 Thomson Higher Education



خطوات التجفيد

يتضمن التجفيد ثلاث خطوات:

1. **التجميد:** تبلور جزيئات الماء (المرتبطة أو غير المرتبطة للبروتين أو السواغ)
2. **التجفيف الأولي:** إزالة الماء غير المرتبط بعملية التصعد
3. **التجفيف الثانوي:** إزالة الماء المرتبط بالبروتين (أو بالسواغ) بعملية التصعد



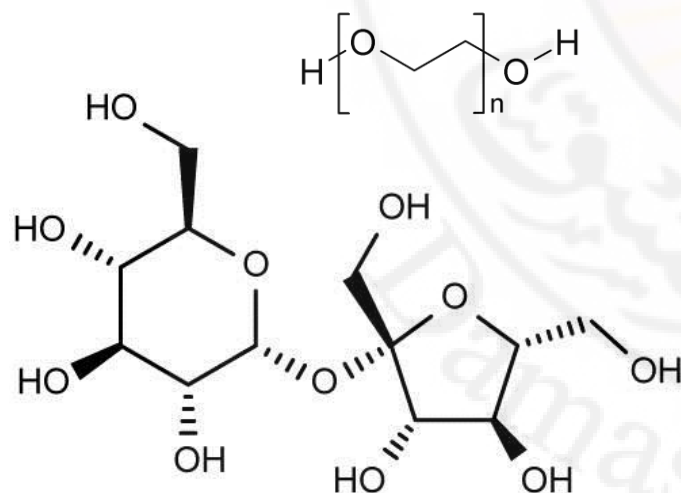
التجفيد



1. في غياب السواغ المناسب للتجفيد، يمكن أن يحصل تخرّب غير عكوس للبروتين
2. تمنع السواغات المستخدمة في التجفيد (والتي تدعى واقيات التجفيد (lyoprotectants) الزائد للبروتينات خلال عملية التجفيد ومنها:

1. PEG: ويقوم بتغليف البروتين، غير أنه ليس مثبتاً جيداً

2. Sucrose: يجمّد جزيئات الماء حول البروتين (بالاستبعاد التفضيلي)، وهو أيضاً مادة حافظة بتركيز أعلى من 60%.

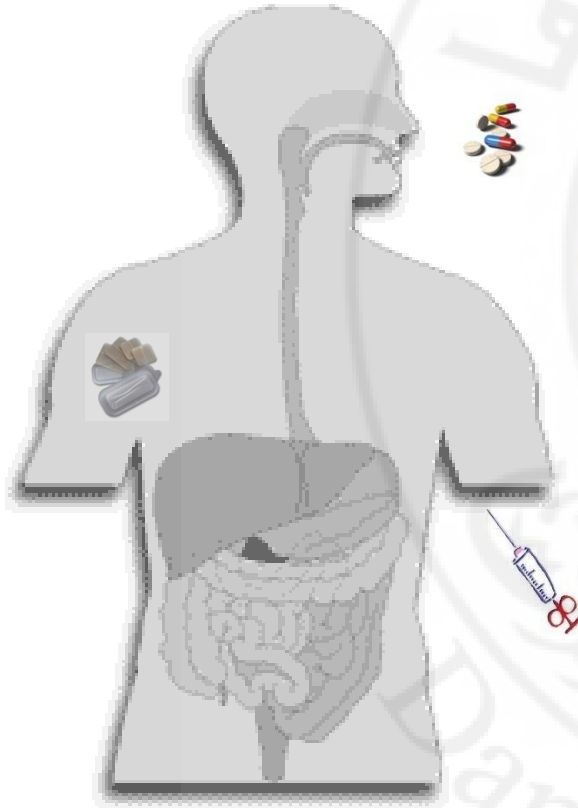


The logo of Damascus University is a circular emblem. It features a central yellow sunburst or star-like symbol. The top half of the circle contains Arabic calligraphy in a light grey font. The bottom half of the circle contains the words "Damascus University" in a light grey serif font.

SPECIAL TOPICS IN BIOPHARMACEUTICALS

DELIVERY

طرق إيتاء البروتينات



1. الطريق الحشوي Parenteral Administration

2. الإعتاء الفموي Oral administration

3. الإعتاء الجلدي Transdermal

4. الاستنشاق Inhalation

5. طرق حديثة

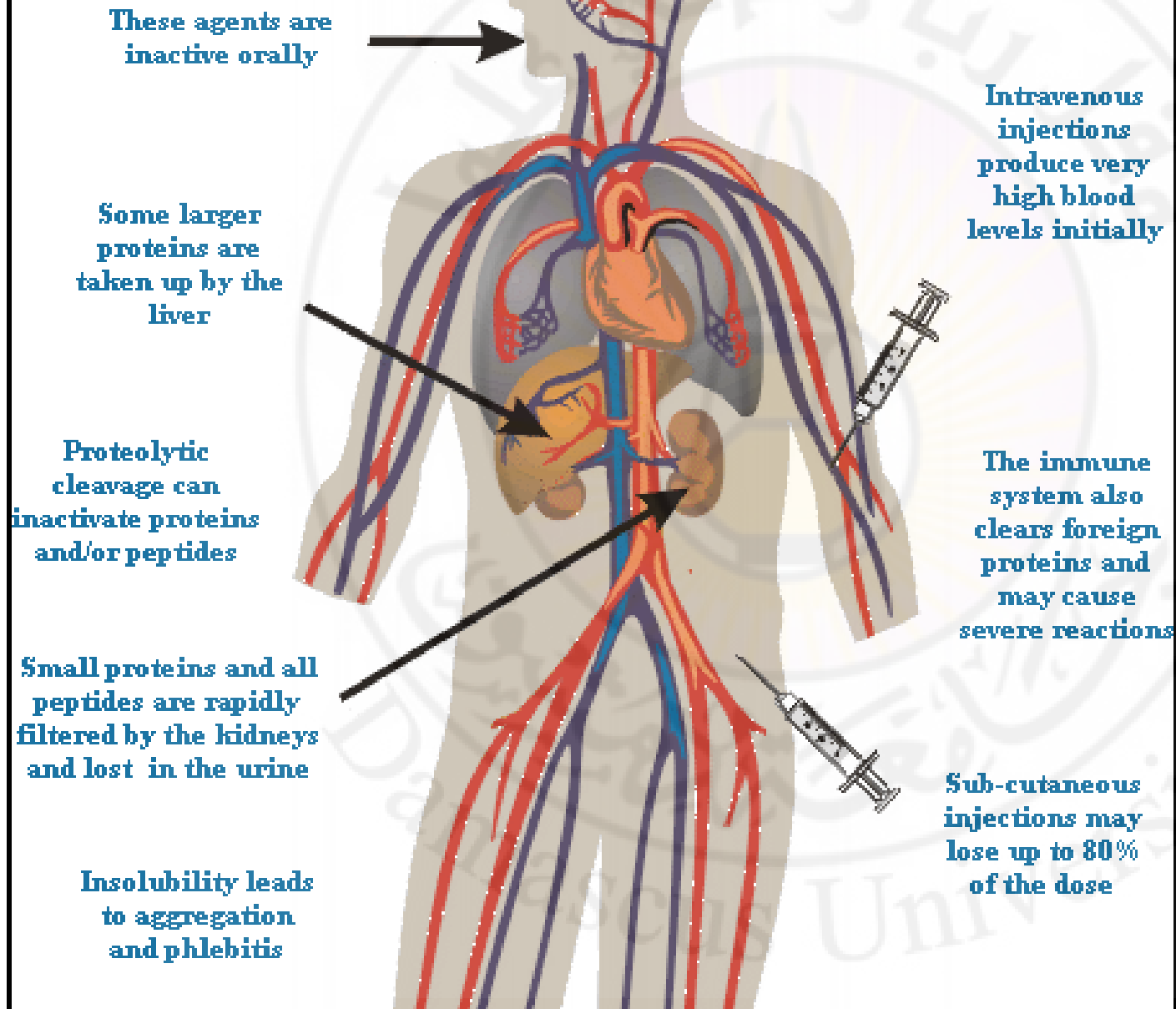
1. الليبوزومات Liposomes

2. الكرات المكروية Microspheres والجسيمات

النانوية Nanoparticles

3. الكبسولات الحيوية Bio-capsules

بعض الحقائق حول إيتاء الدواء البروتيني



Protein administration

Oral

Amylase
&
Mucosa

HCl
&
Proteases

Deglycosylation,
Adsorption
&
Denaturation

Denaturation
&
Degradation

Parenteral

Plasma
Proteases

Albumin
&
Lipoproteins

Immune
System

Proteolysis

Adsorption
&
Clearance

Response



الإيتاء الحشوي Parenteral Administration

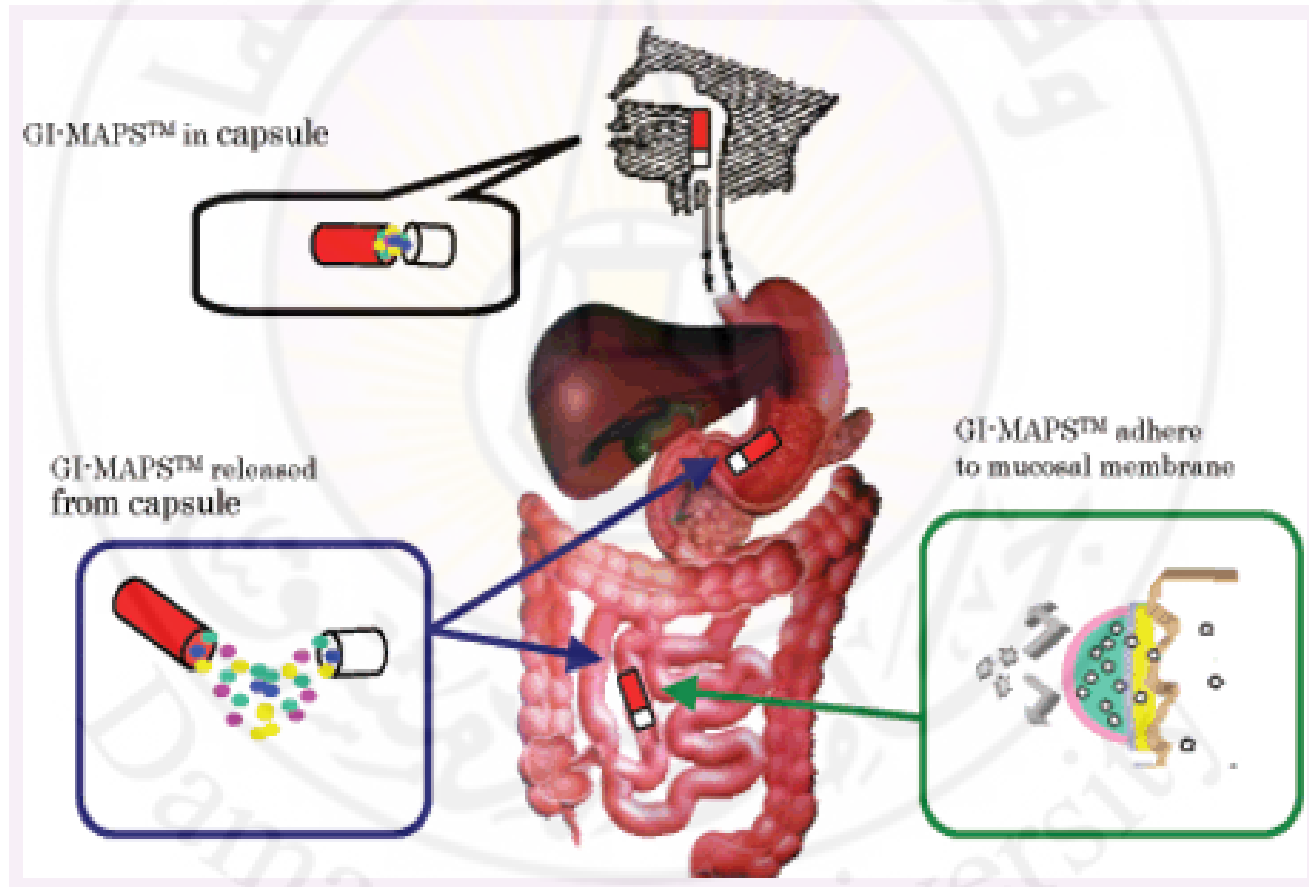
1. يعدّ طريق الإيتاء لـ 95% من البروتينات الدوائية
2. يسمح بامتصاص سريع وكلي
3. يسمح باستعمال جرعات صغيرة (من حيث حجم الجرعة الواحدة)
4. يتجنّب استقلاب المرور الأول first pass metabolism
5. يتجنّب المناطق التي عادةً تخرّب البروتين
6. لكن:

1. هناك مشاكل مع الجرعات العالية: قد يحصل تموت (necrosis) لبعض الأنسجة
2. يولد أحيانا رد فعل نسيجي موضعي وتفاعلات فرط تحسس
3. الطريق الحقني غير مرغوب

الإيتاء عن طريق الفم Oral Administration

- على الرغم من أن الطريق الفموي هو الأكثر رغبة بالنسبة للمرضى، إلا أن التحطم بالبروتيازات والاستقلاب الكبير بالمرور الأول وضعف الامتصاص بالأمعاء، جميعها عوامل تحدّ من استخدام هذا الطريق لإيتاء البروتينات.
- يبلغ التوافر الحيوي bioavailability لمعظم الببتيدات والبروتينات أقل من 1% عند إعطائها عن طريق الفم!
- مع ذلك، هنالك استثناءات مثل السيكلوسبورين، وهو ببتيد من 11 حمض أميني، حيث يبلغ التوافر الحيوية 50%.
- وهناك عدة وسائل لتحسين التوافر الحيوي للبروتينات المعطاة عن طريق الفم، منها:
 - الإيتاء النوعي في الموقع site-specific delivery
 - تعديلات كيميائية (ربط جزيئات تحسّن من امتصاص البروتينات وتمنع تخرّبها)
 - منظومات إيتاء حيوية ملتصقة bioadhesive delivery system مثل mucoadhesive polymer system (MAPS)
 - تحضير حالات فموية Oral aerosols

Oral (GI-MAPS®)



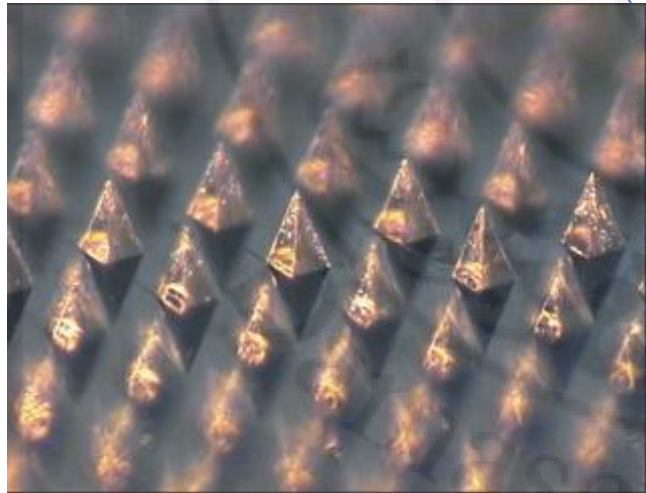
الإيتاء عن طريق الفم Oral Administration



- يمكن الإيتاء عن طريق تحضير الدواء في حالات يتم امتصاص الدواء البروتيني منها عبر مخاطيات السبيل المعدي المعوي

- مثال: الإنسولين الفموي Oralin (وهو في الواقع شِدقي buccal وليس فموي oral) من شركة Generex، وهو مصادق للتوزيع في الهند والإكوادور. يُمتص الإنسولين عبر طبقات رقيقة في الفم والحنجرة. ويحضّر الإنسولين الفموي بإضافة بعض المواد والمثبتات التي تمنع تمسخه خلال تحضير الحلات

الإيتاء عبر الجلد Transdermal Administration



- تستخدم لذلك لصاقات جلدية transdermal patches بحيث تكون البروتينات متضمنة داخل مطرس matrix (مخزن الدواء) مع بعض المضافات
- تغطّي اللصاقات بإبر صغيرة تخترق طبقة الجلد بحيث تنتشر البروتينات مباشرة إلى الدم عبر الأوعية الشعرية.
- وهذه الطريقة أقل ألماً من الحقن الوريدية

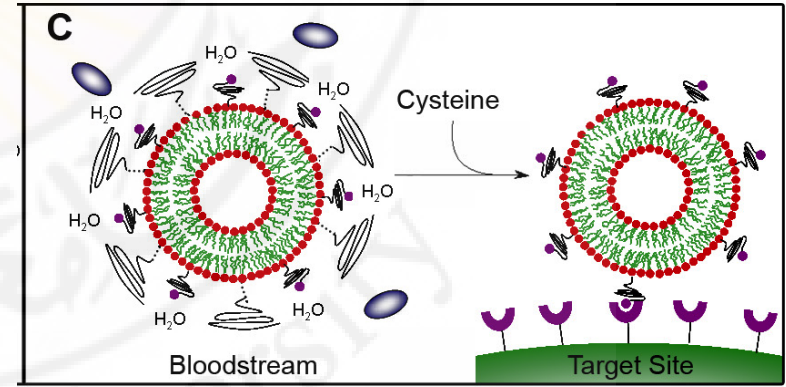
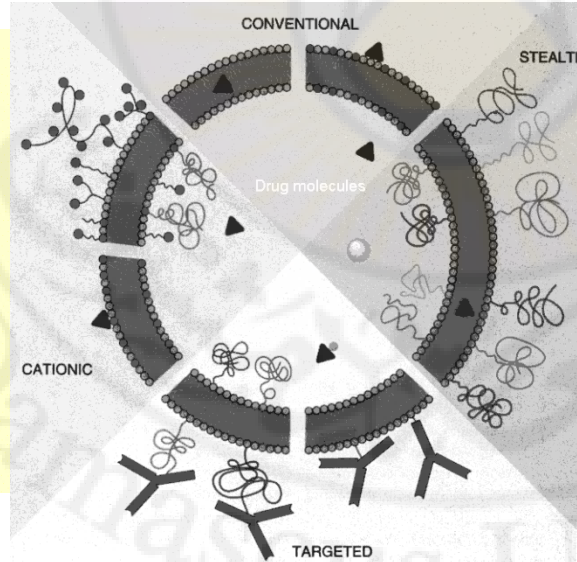
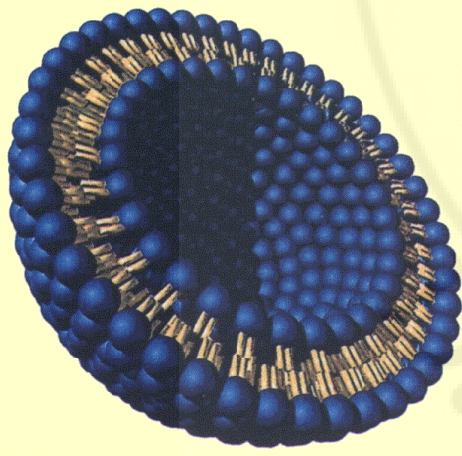
الإيتاء عبر الاستنشاق Inhalation



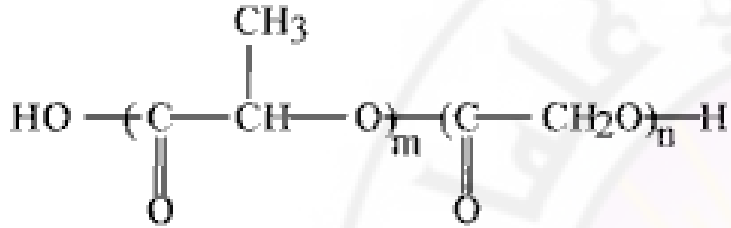
- مثال Exubera وهو إنسولين مستنشق inhaled insulin عبارة عن مسحوق جاف يمكن استنشاقه عبر الأنف وامتصاصه عبر المخاطية التنفسية.
- وقد حظي هذا المستحضر على رضى العديد من المرضى حيث أنه أدى تأثيراً دوائياً مشابهاً للإنسولين الحقن.
- لكن ظهرت لدى حوالي خمس المرضى أعراض سعال متوسطة، كما أن سعره الباهظ جداً مقارنة بالإنسولين سريع الفعالية short acting الحقني أدى بالنهاية إلى سحب الدواء من السوق عام 2007 بصورة رئيسية بسبب ضعف المبيعات.

طرق أخرى: الليبوزومات Liposomes

- تحتوي الليبوزومات على طبقة (أو عدة طبقات) من ثنائيات الفوسفوليبيدات، وعلى لب محب للماء تتوزع فيه البروتينات.
- يبلغ قطرها من 80 إلى 100 نم.
- يمكنها أن تحتجز من قبل التوعية المسربة leaky-vasculature للخلايا السرطانية.
- يمكن أن تغطى بجزيئات PEG لحمايتها من البلعمة من قبل البالعات الكبيرة.
- ويمكن أن تغطى بأضداد (أو جزيئات موجهة أخرى) في سبيل تطبيق المعالجات الموجهة Targeted therapies.

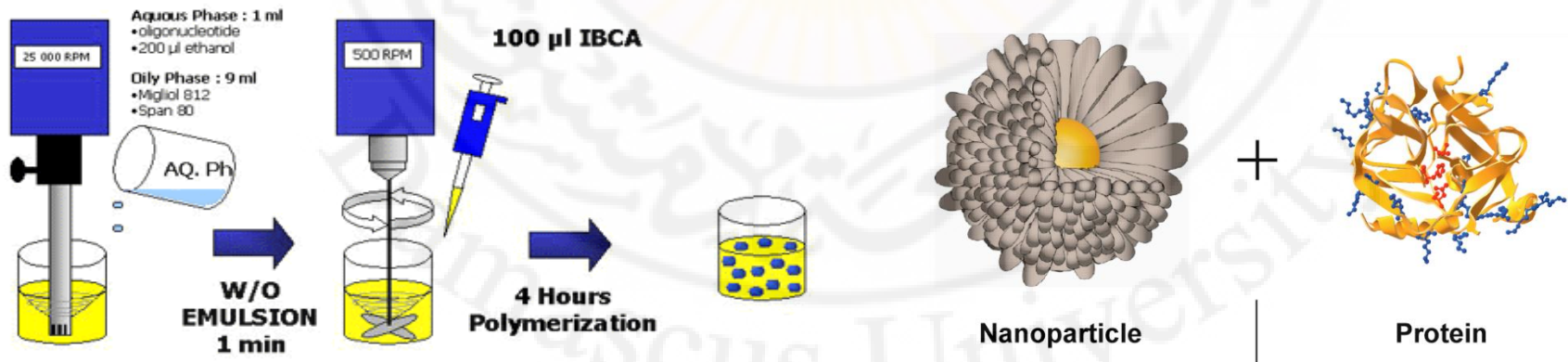


الكرات المِكرَوية Microspheres والجسيمات النانوية Nanoparticles

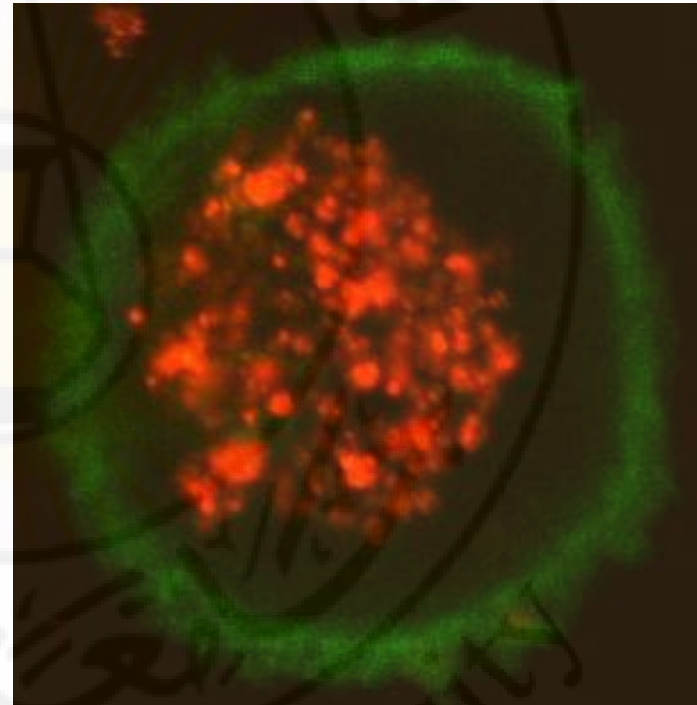
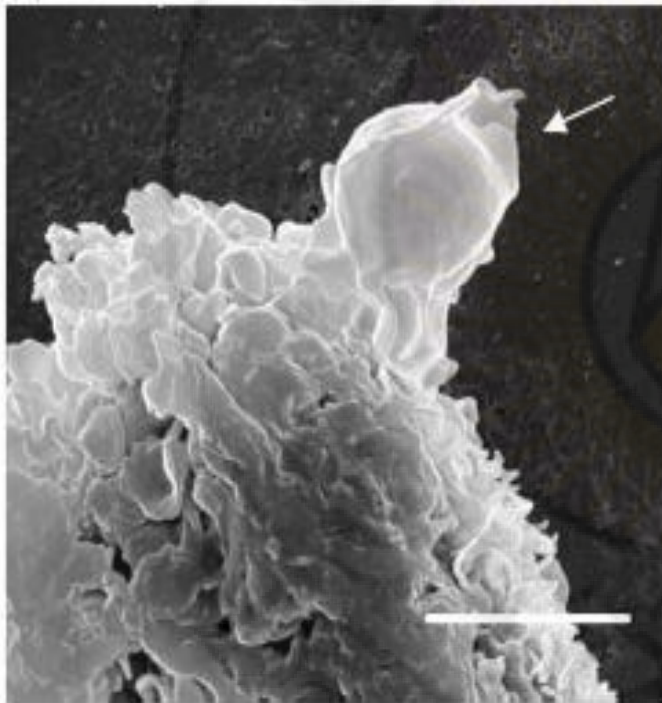


Chemical structure of PLGA polymer.
The "m" component represents lactic acid and "n" component represents glycolic acid.

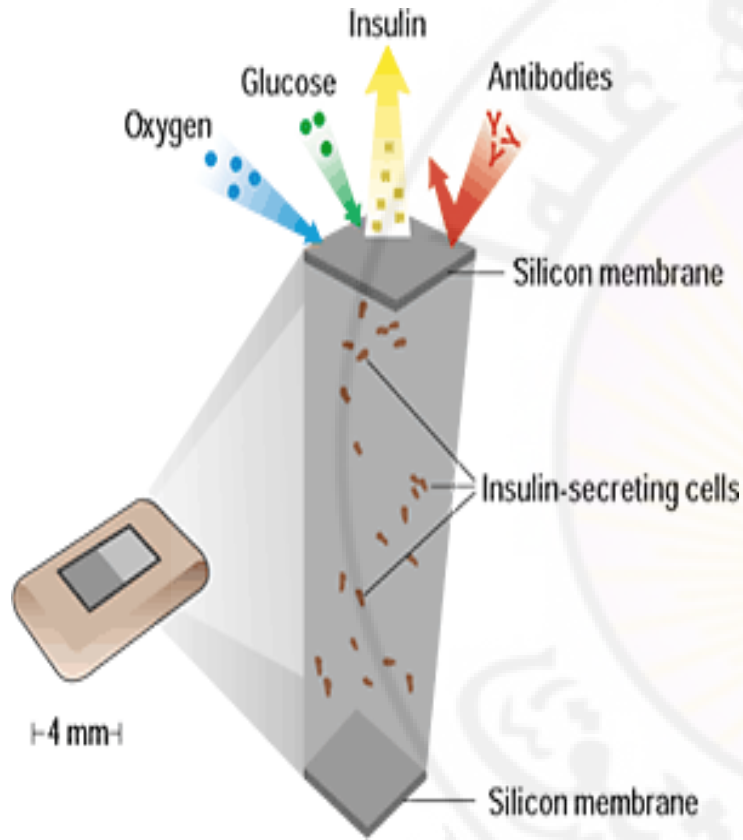
- تشبه هذه الجزيئات من حيث المبدأ الليبوزومات، حيث يتواجد البروتين في الطور الداخلي المحب للماء، إلا أنها تختلف عن الليبوزومات بأنها مغطاة ليس بطبقة من الفوسفوليبيدات بل بطبقة من بوليمرات تتخرب حيوياً biodegradable polymers لها أيضاً أقطاب محبة للماء وكارهة للماء، كما يمكن أن تكون الكرات ذات مسام نفوذة porous يتحرر منها البروتين بعد التقاط الكرات أو الجسيمات من قبل الخلايا المستهدفة
- تختلف هذه الجزيئات بحسب أبعادها..



قبط uptake الجسيمات النانوية من قبل الخلايا المتغصّنة المناعية



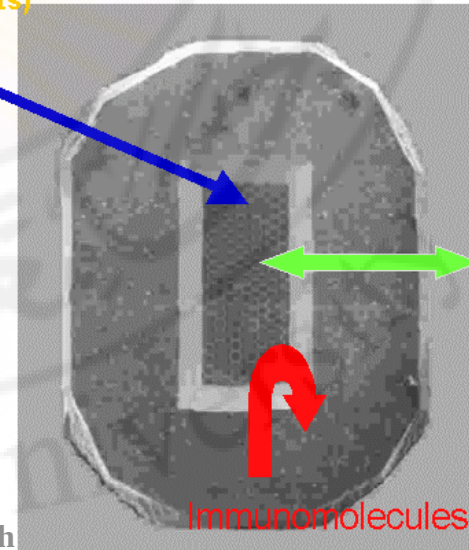
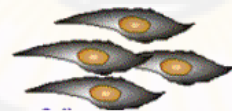
الكبسولات الحيوية Biocapsules



تضمّ الكبسولات الحيوية خلايا حية تنتج بروتيناً وتفرزه إلى الجسم. وتكون الخلايا محمية من وصول الأضداد التي تستهدف الخلايا الغريبة عن الجسم.

مثال عنها: الكبسولات المفرزة للإنسولين، وهي تحوي خلايا ورم عدّي منتجة للإنسولين insulinoma يصل إليها الغلوكوز بشكل حر من دم المريض ويحرّض بذلك إفراز الإنسولين في هذه الخلايا بحيث يتناسب مع كمية الغلوكوز الداخلة إلى الخلايا

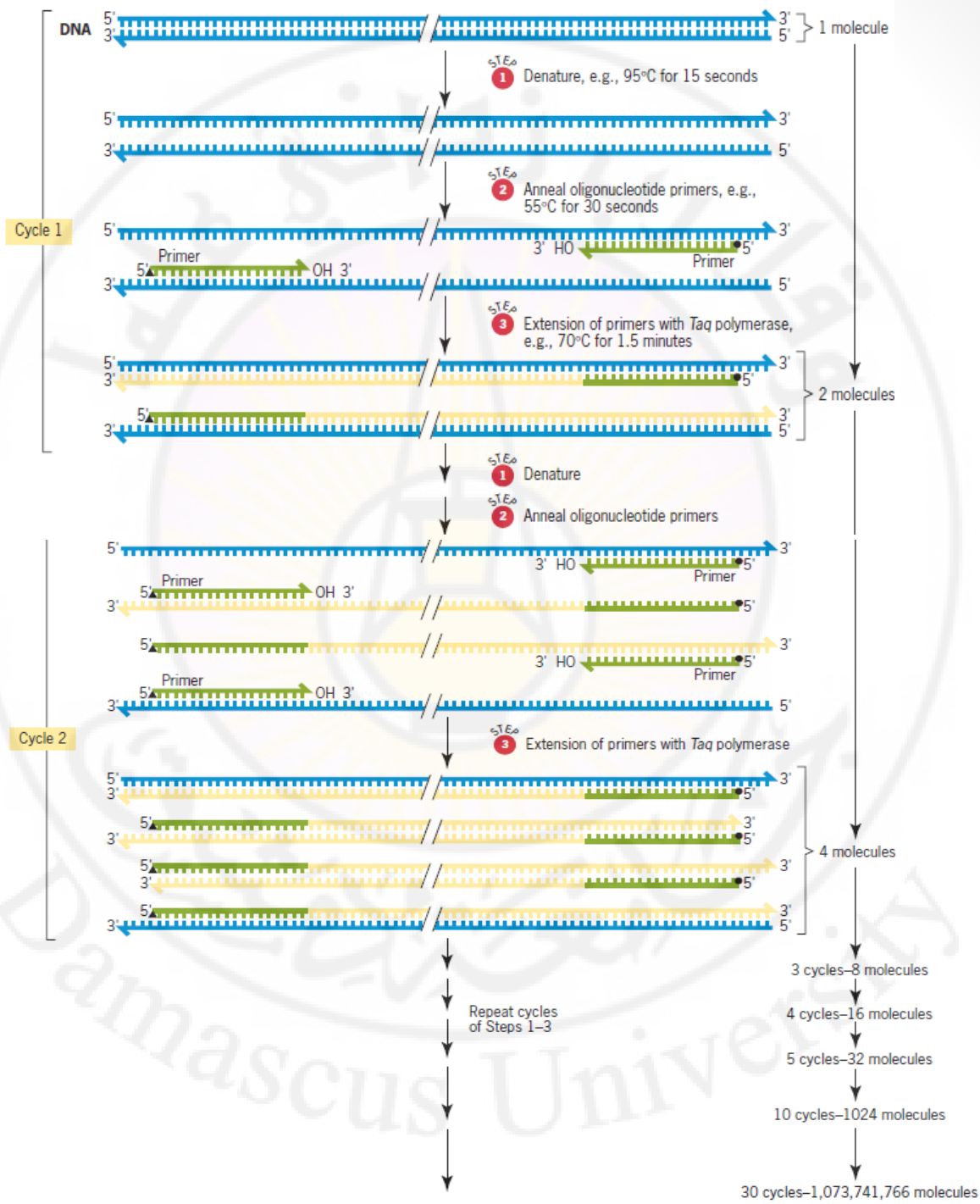
Hormone-secreting cells
(i.e. pancreatic islets)



تقنيات جزيئية

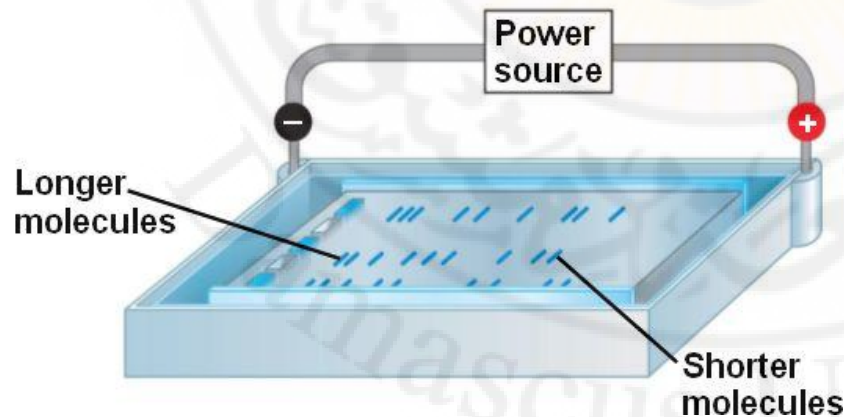
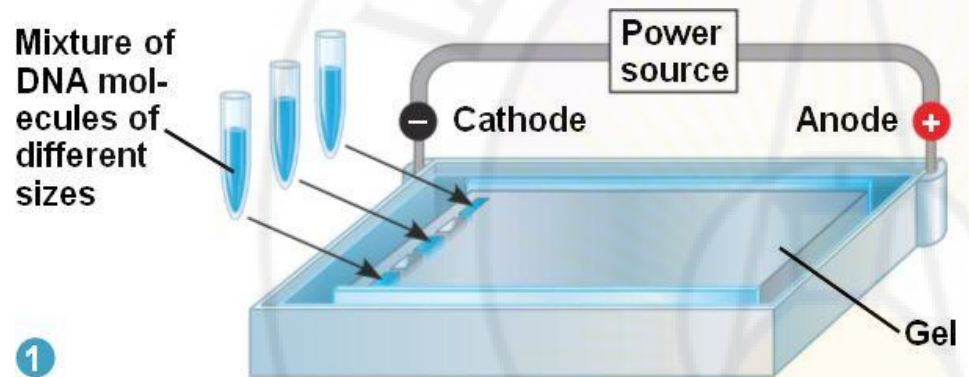
تضخيم الدنا

- تفاعل البوليميراز التسلسلي التقليدي
- الرحلان الكهربائي
- تفاعل البوليميراز التسلسلي بالنسخة العكسية
- تفاعل البوليميراز التسلسلي اللحظي والكمّي

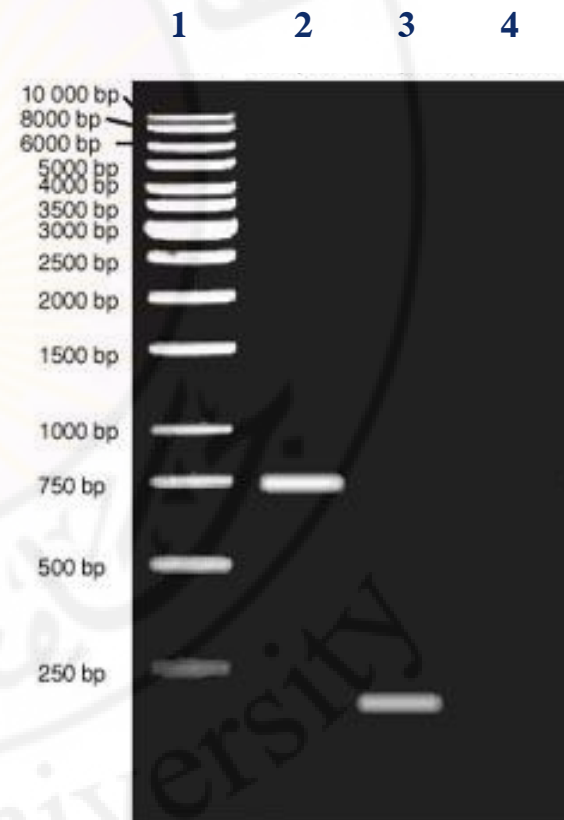


الرحلان الكهربائي لنواتج تضخيم الدنا

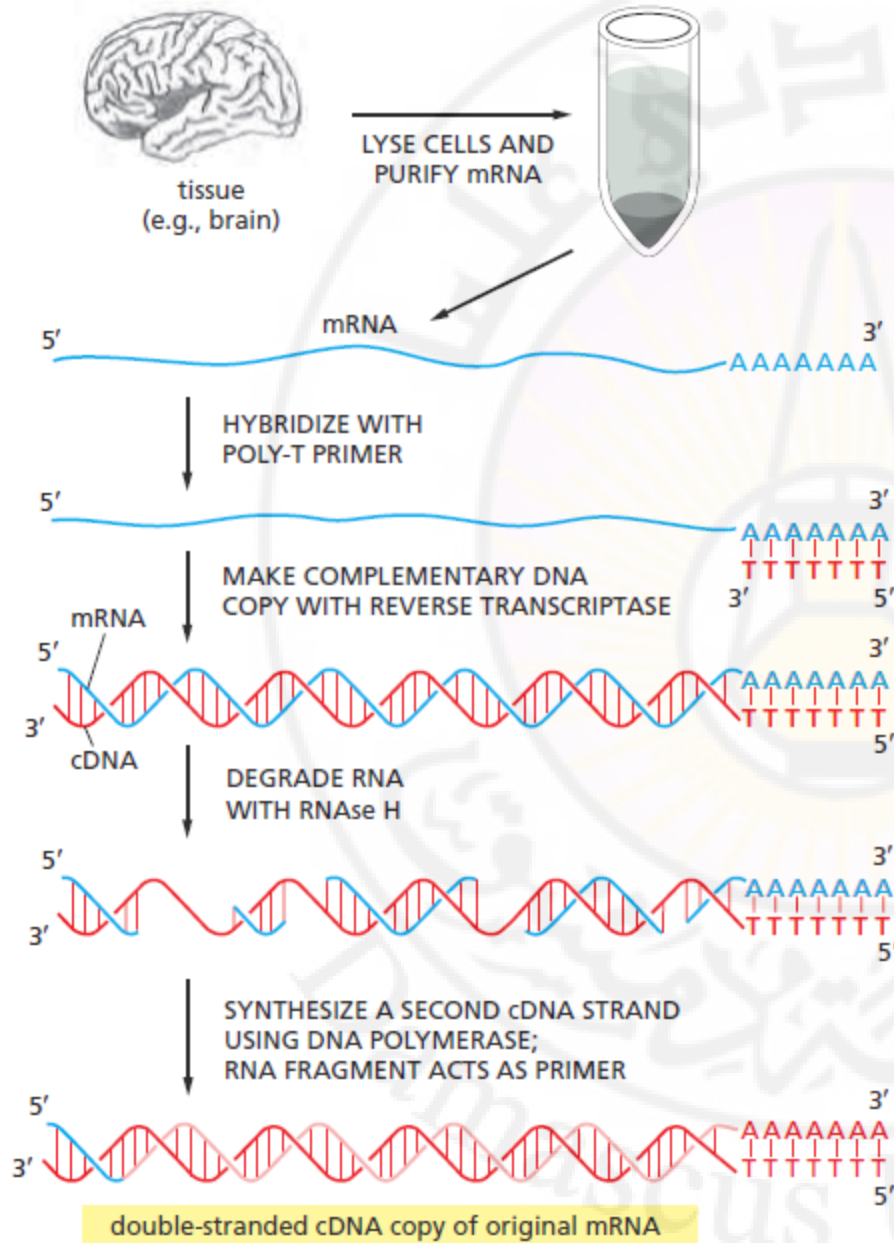
A



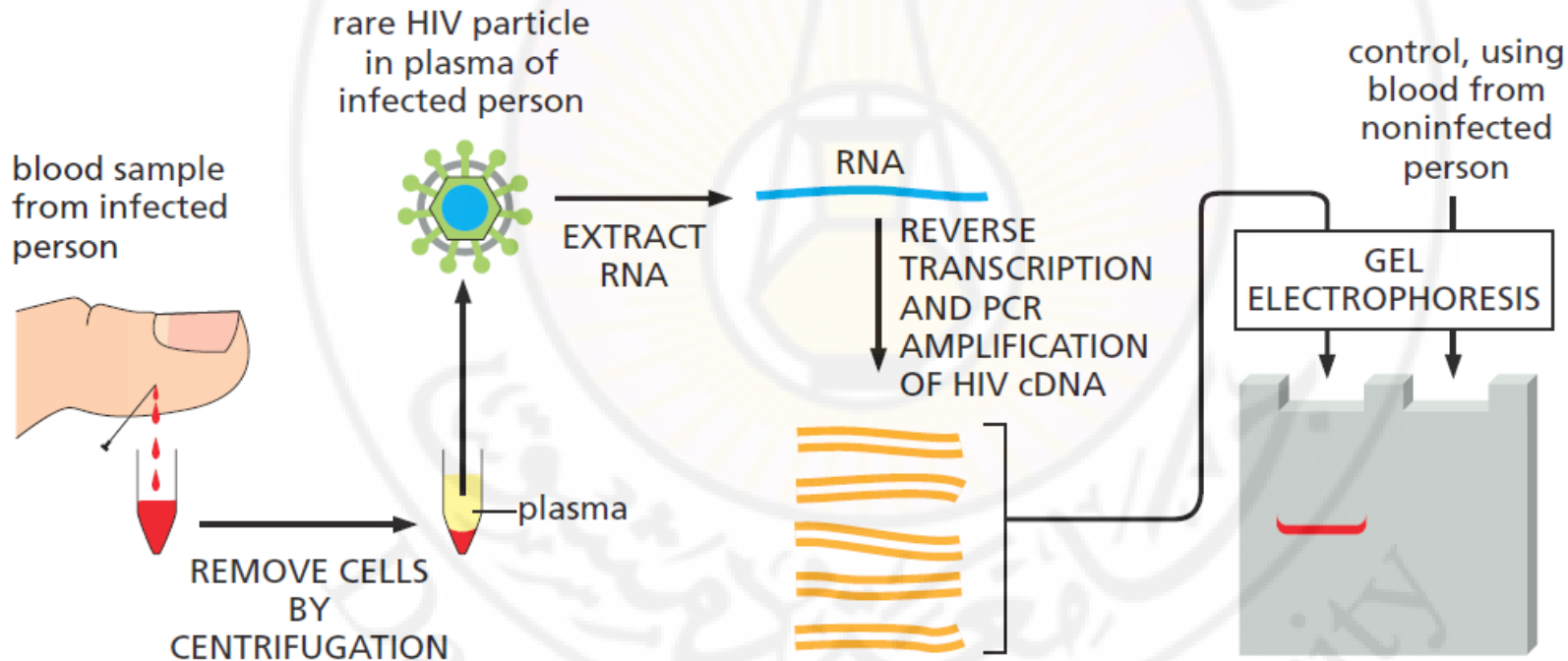
B



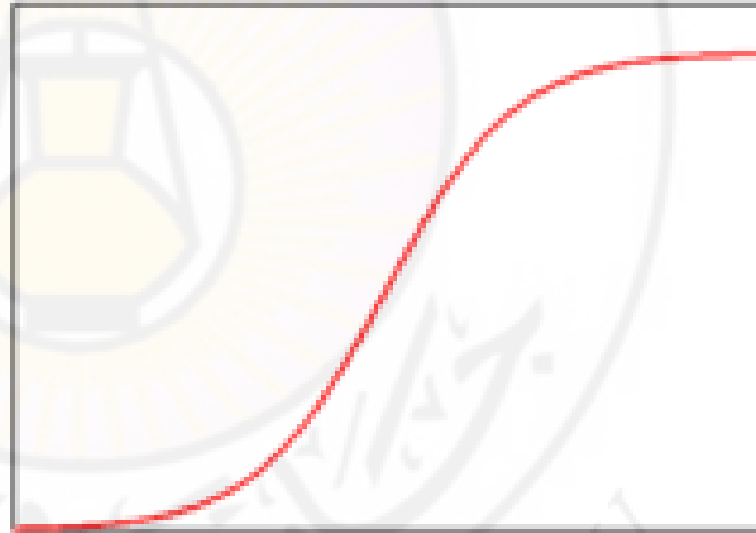
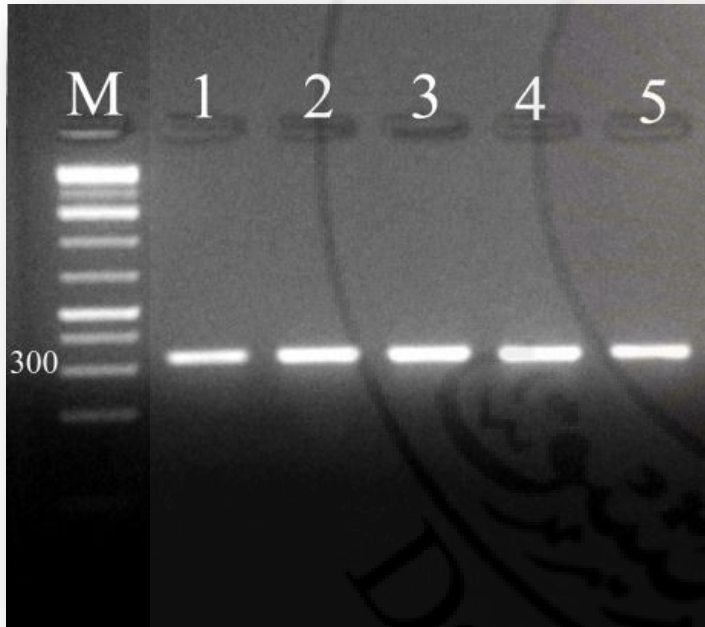
تضخيم الرنا بتفاعل البوليميراز بالنسخة العكسية



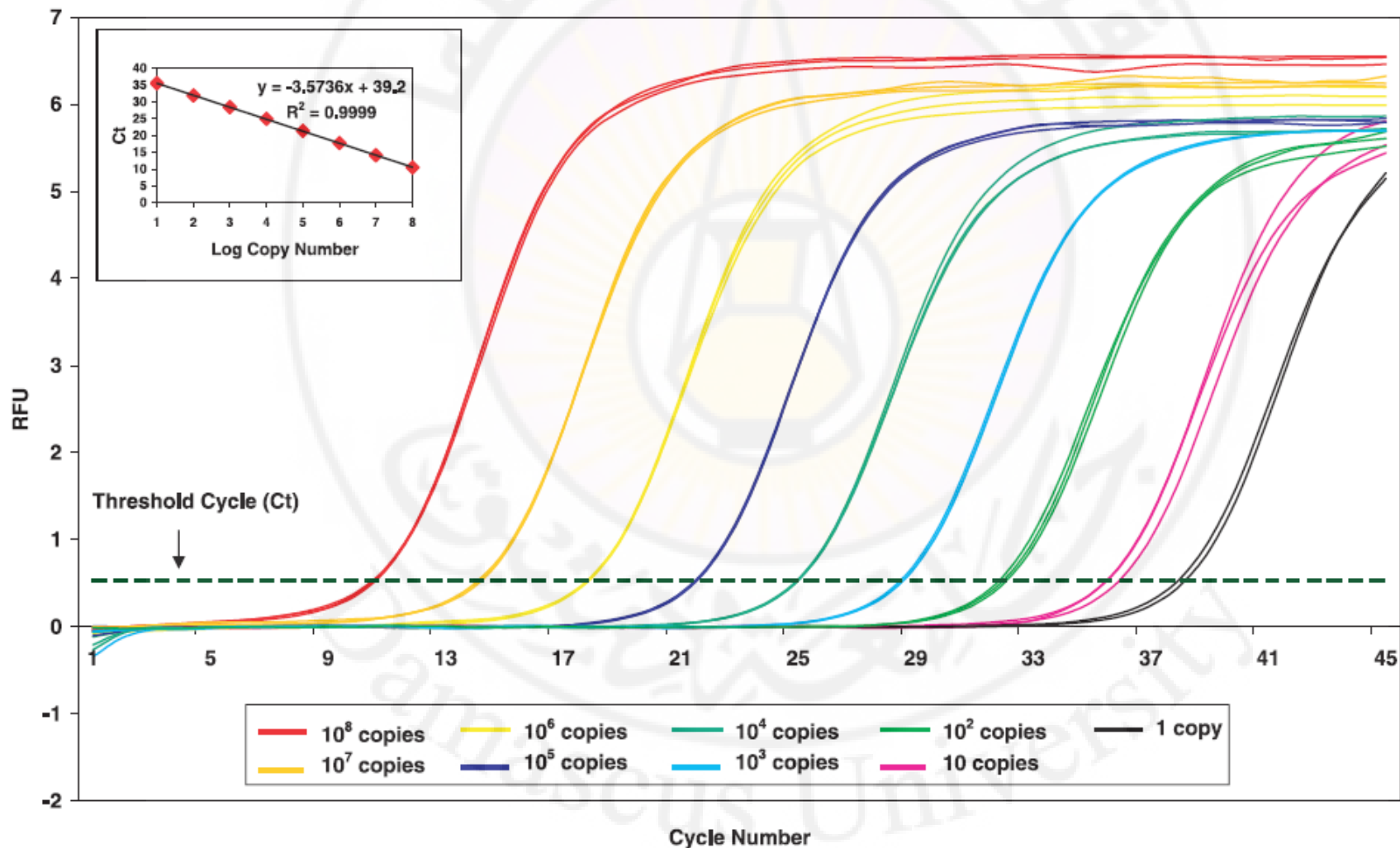
تطبيق: قياس التعبير عن إحدى جينات فيروس الإيدز للكشف عن الإصابة ومدى الإصابة



تفاعل البوليميراز التسلسلي اللحظي والكمي

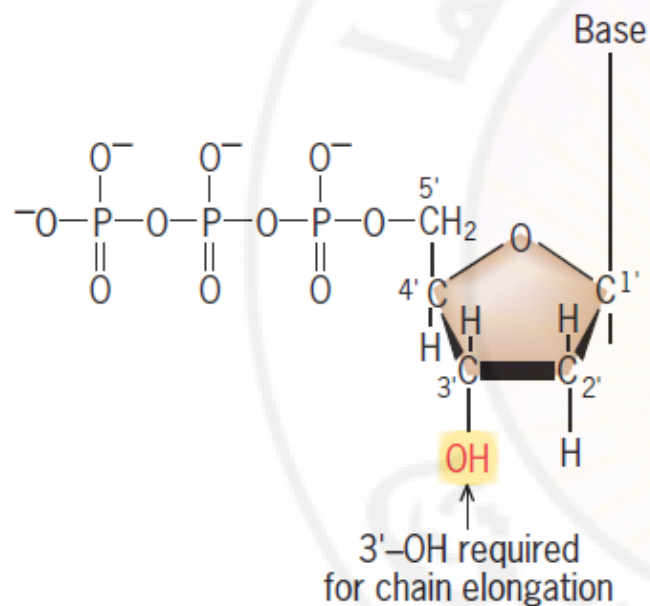


تفاعل البوليميراز التسلسلي اللحظي والكمي

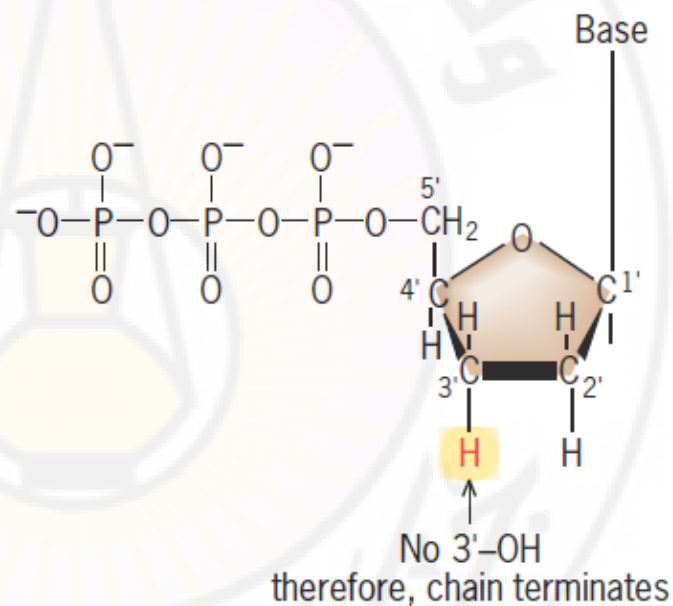


The background of the slide features a large, faint watermark of the Damascus University logo. The logo is circular, with Arabic calligraphy at the top and bottom, and a central emblem depicting a stylized sun or starburst.

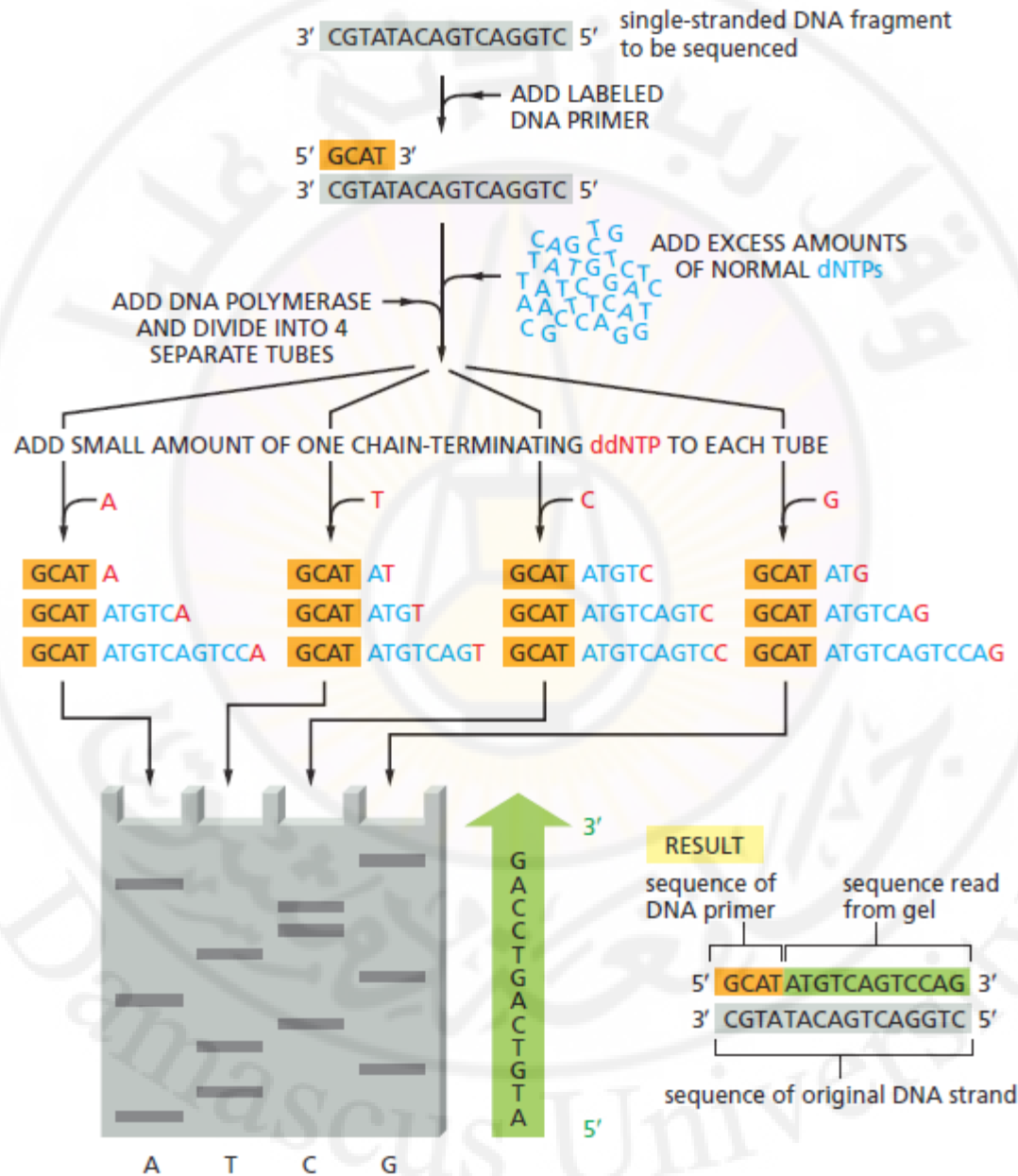
سلسلة الدنا DNA SEQUENCING

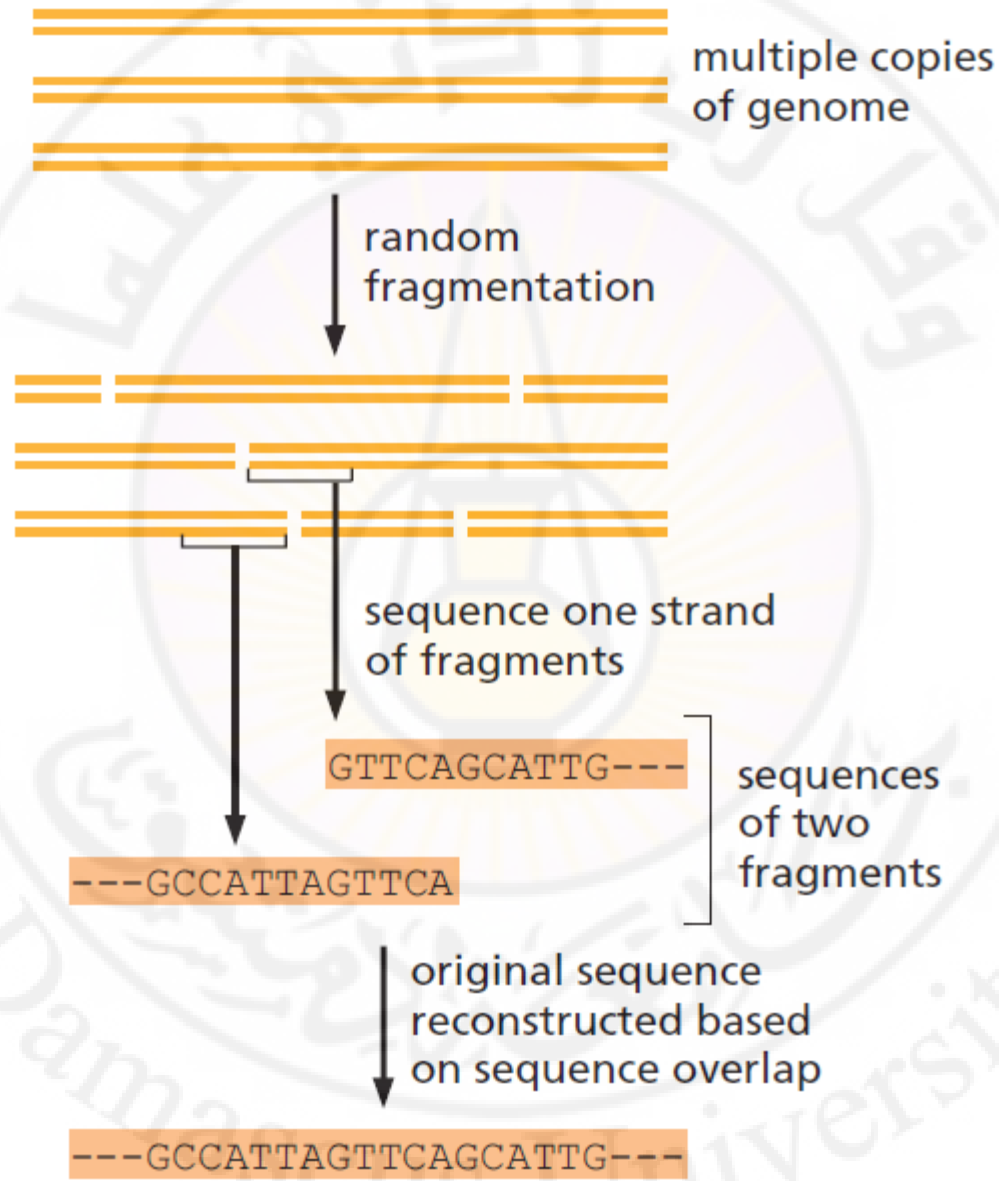


Normal DNA precursor
2'-deoxyribonucleoside triphosphate



Chain-termination precursor
2',3'-dideoxynucleoside triphosphate





التقانة الرابعة

تقانات التهجين

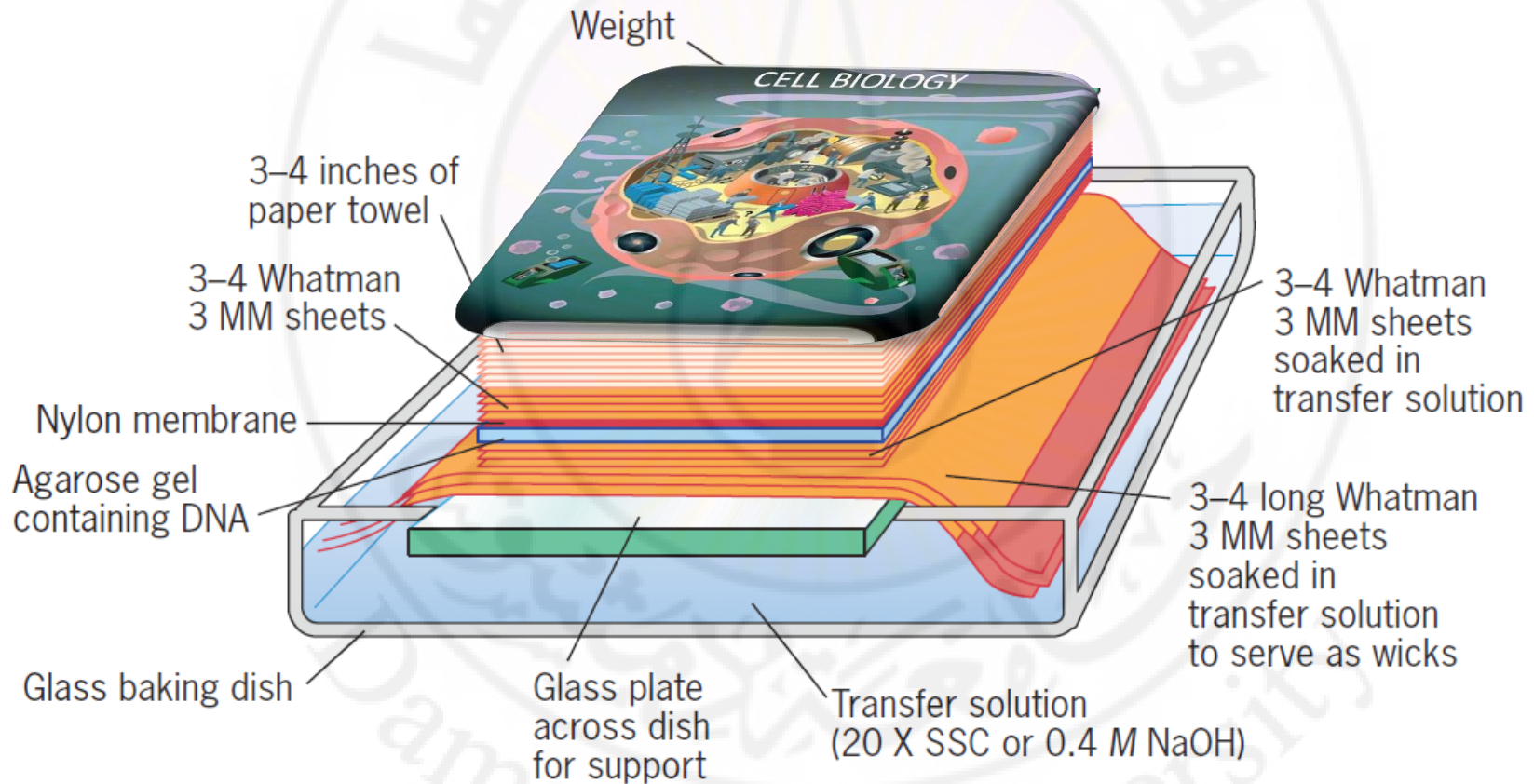
HYBRIDIZATION TECHNIQUES

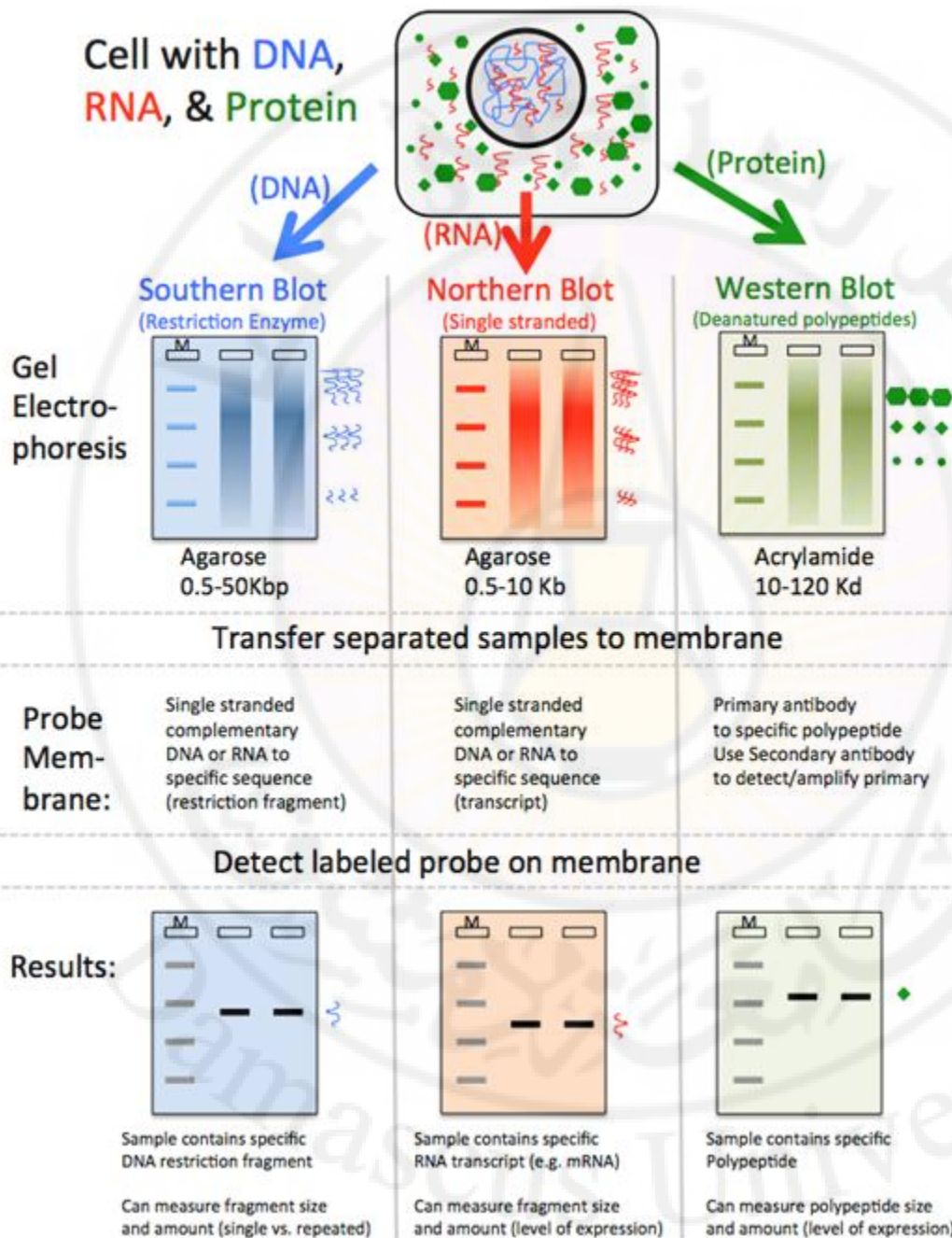
تقانات التوقيع Blotting Technologies

التهجين التآلقي في الموضع FISH

مصفوفات الدنا الصغيرة DNA Microarrays

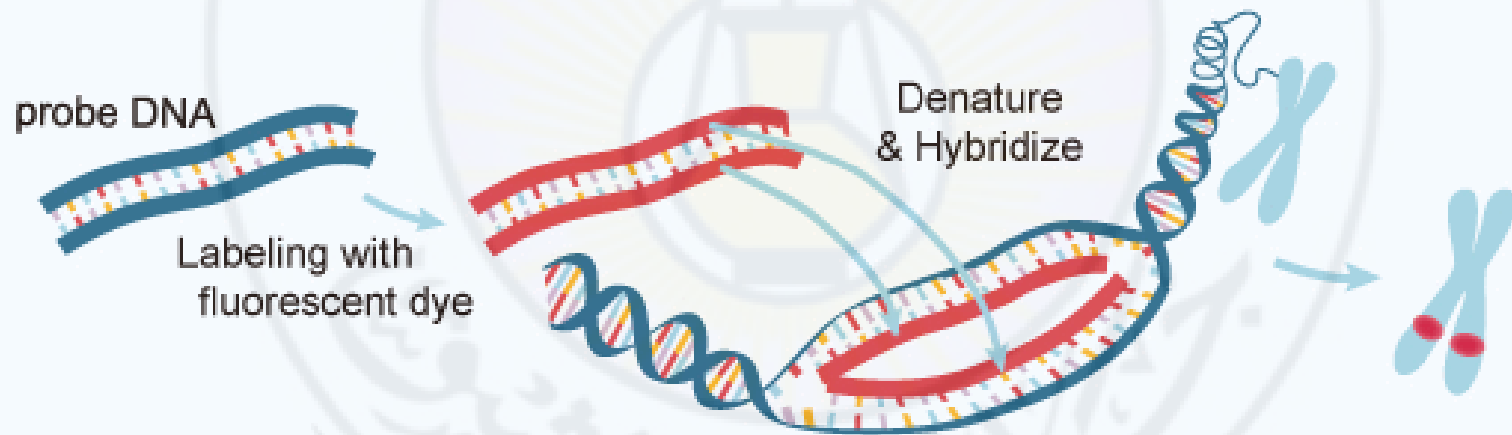
منظومة التبقيع Blotting System





التجهين التآلقي في الموضوع

Fluorescence In Situ Hybridization

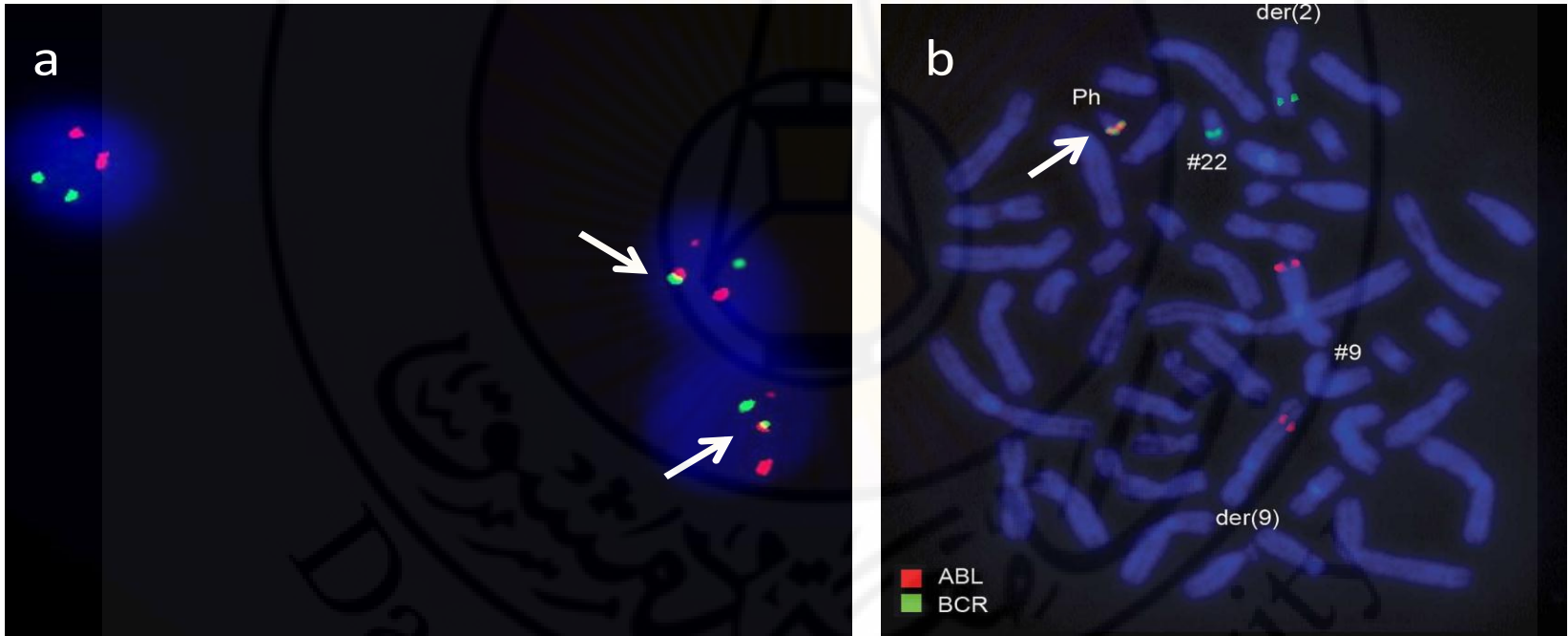


صِبْغِي فيلادلفيا Philadelphia Chromosome



- (يمين) يحدث انتقال (إزفاء) لقطعة من الصِبْغِي 9 إلى الصِبْغِي 22 فتلتقي جرّاء ذلك قطعة من الصِبْغِي 22 (باللون الأصفر) وقطعة منتقلة من الصِبْغِي 9 (باللون الأحمر)، بحيث تتكامل هاتان القطعتان وتؤدّيان إلى تفعيل جين ورمية Oncogene، والتي تتسبّب في الانقسام العشوائي لأرومات الدم عند مرضى ابيضاض الدم Leukemia. (يسار) صِبْغِي فيلادلفيا مركّب Complex مكوّن من إزفاءين من الصِبْغيين 8 و 22 إلى الصِبْغِي 9. وتمكن ملاحظة ذلك بسهولة عند استخدام تلوين نوعي لكل من الصِبْغيات، إذ يوضّح اللون مصدر القطعتين المضافتين للصِبْغِي 9 في هذه الحال.

التهجين التآلقي في الموضع لكشف صبغي فيلادلفيا t(9,22)



أنواع مسابير FISH

تتوافر ثلاثة أنماط رئيسية من مسابير الـ FISH:

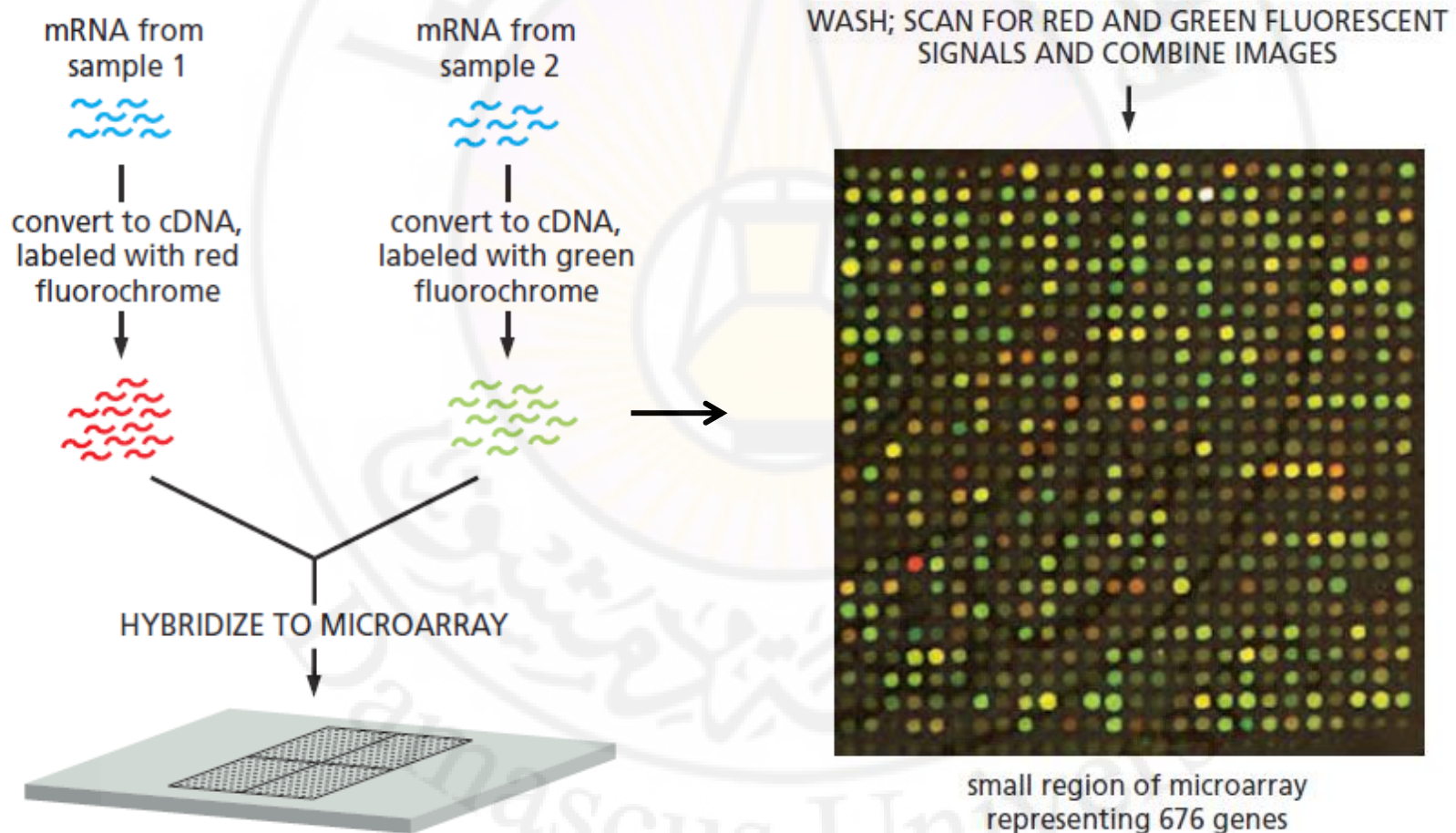
- **المسابير الساتلة Satellites Probes**، وترتبط بتسلسلات الدنا عالية التكرار قرب منطقة القسيم المركزي Centromere للصبغي.
- **مسابير التتاليات النوعية Unique-Sequence Probes**، وتحرّى تتاليات نوعية من الدنا في أي موضع على طول الصبغيات وتترافق مع بعض الأمراض.
- **مسابير الرسم Painting Probes**، وترتبط مع سلاسل كبيرة من التتاليات الموجودة في صبغي محدّد بحيث تصبغ صبغي معيّن بلون فلورة خاص يميّز هذا الصبغي عن الصبغيات الأخرى.



Copyright © 2007 F.A. Davis Company

www.fadavis.com

مصفوفة الدنا الصّغرية DNA Microarray



التقانة الخامسة

التشخيص الجزيئي للأمراض الوراثية

تفاعل PCR وإنزيمات الاقتطاع

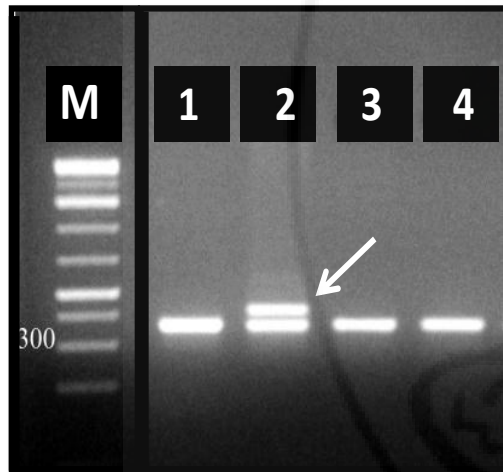
استخدام إنزيم النكلياز

الاستشراب اللوني السائل رفيع الإنجاز الممسح

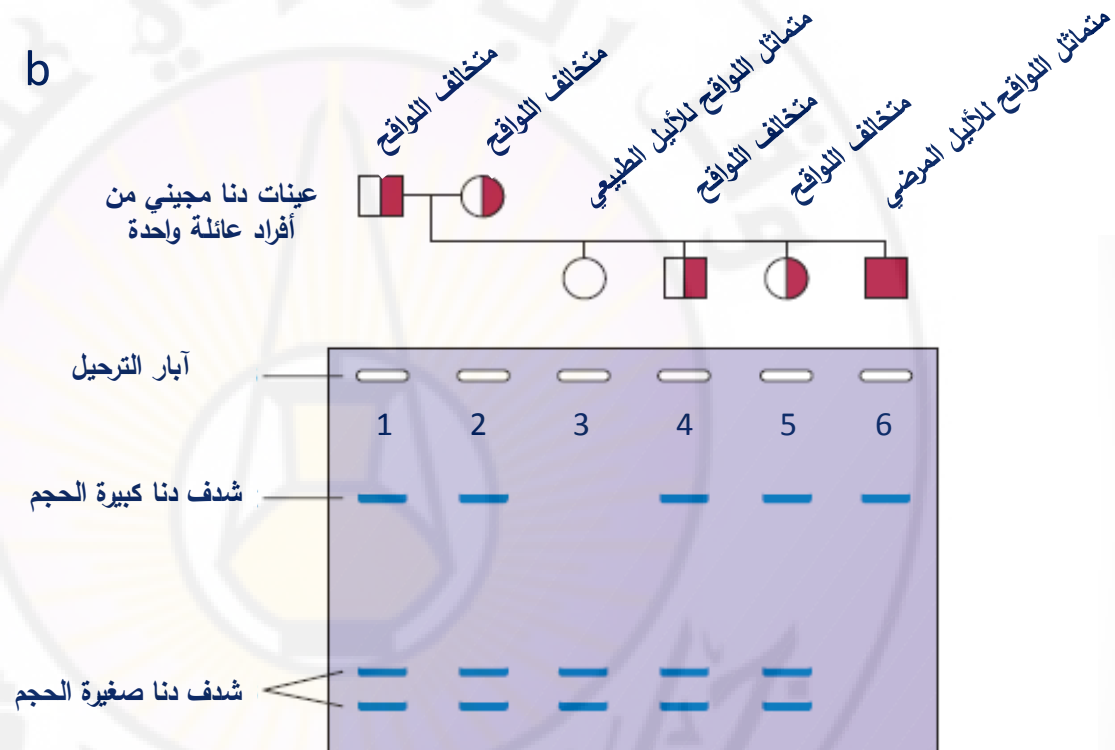
تحليل منحني الانصهار

كشف الطفرات بتفاعل PCR مباشر أو بعد الهضم بإنزيمات الاقتطاع

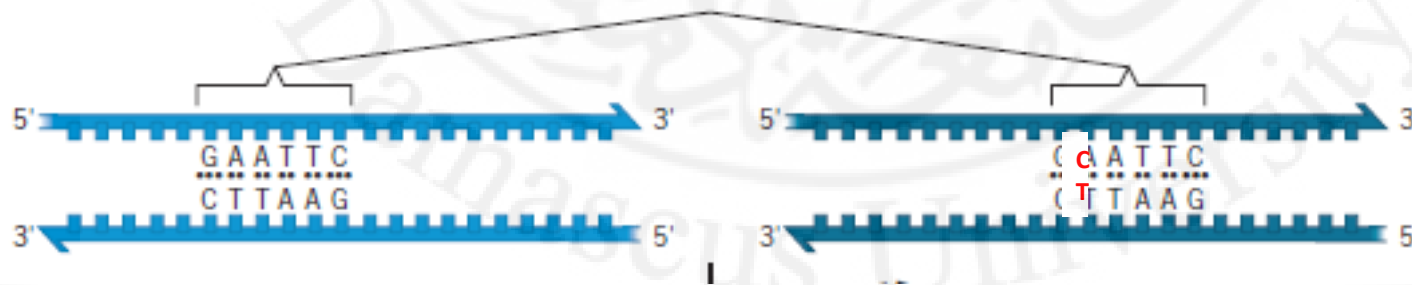
a

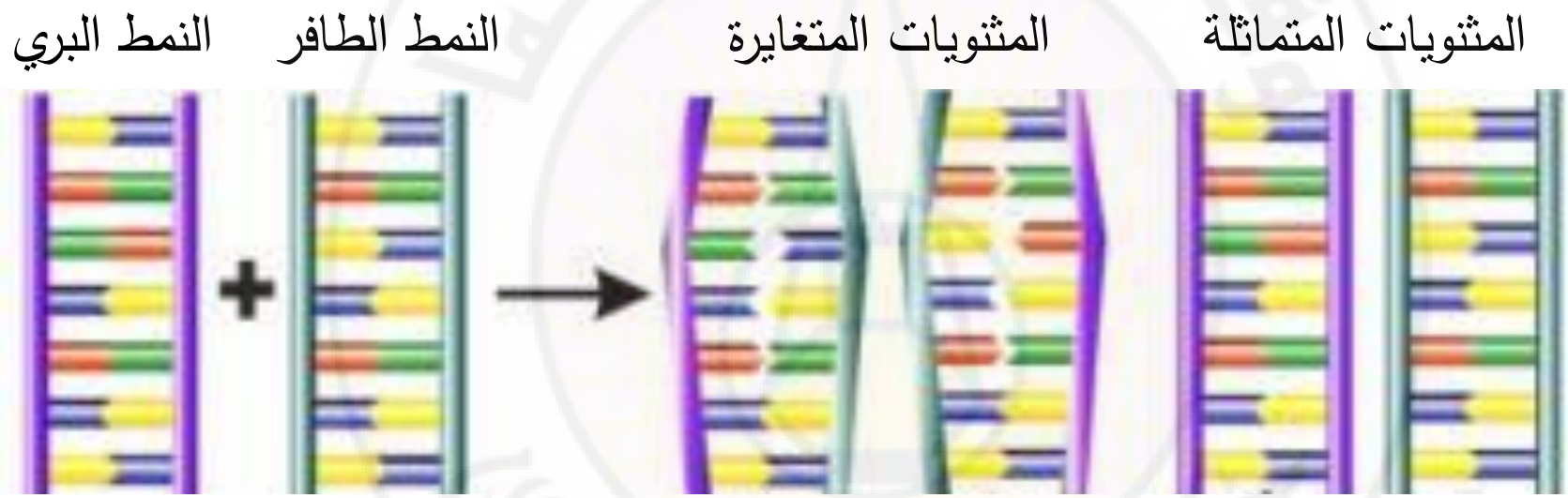


b

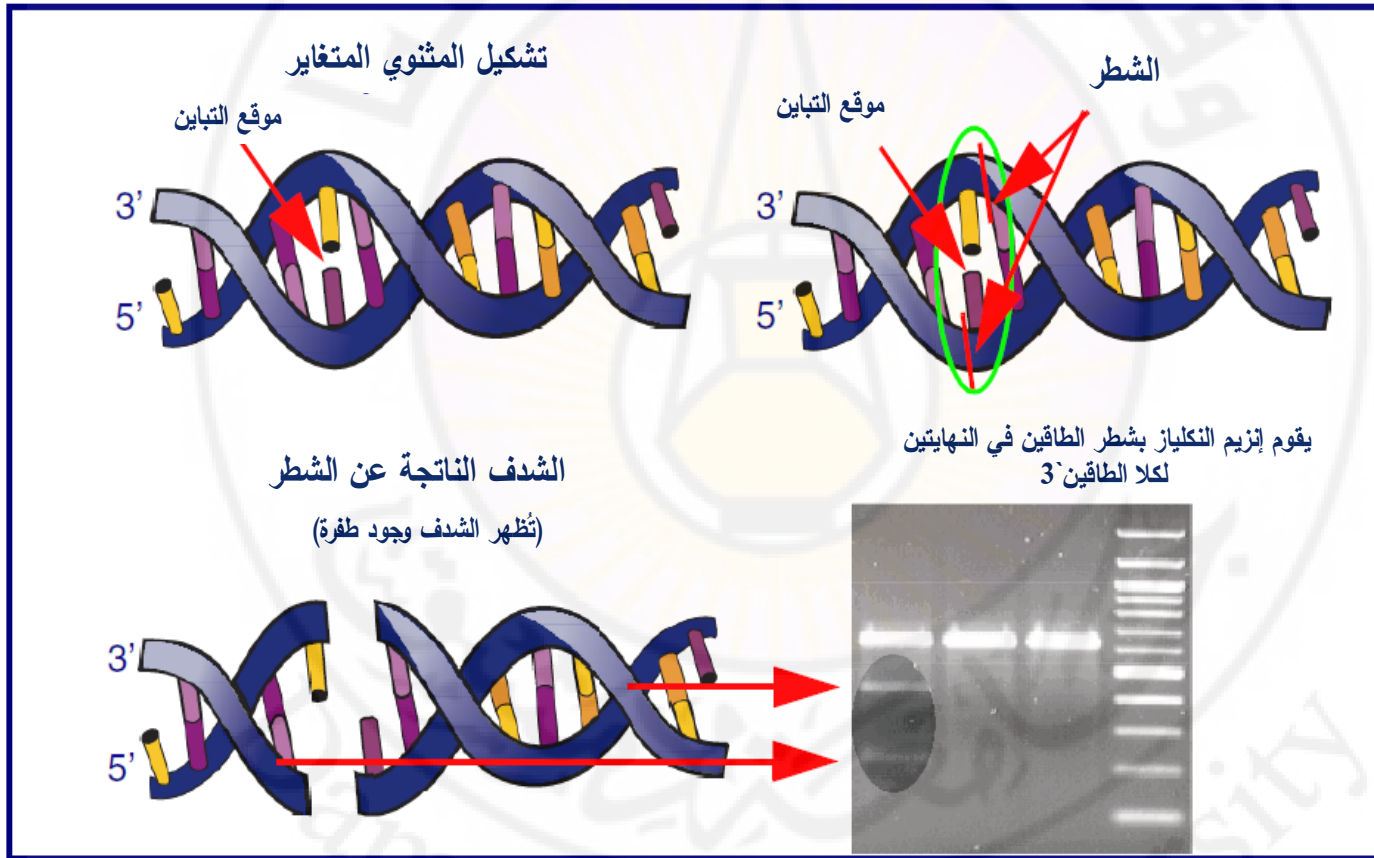


EcoRI cleavage sites

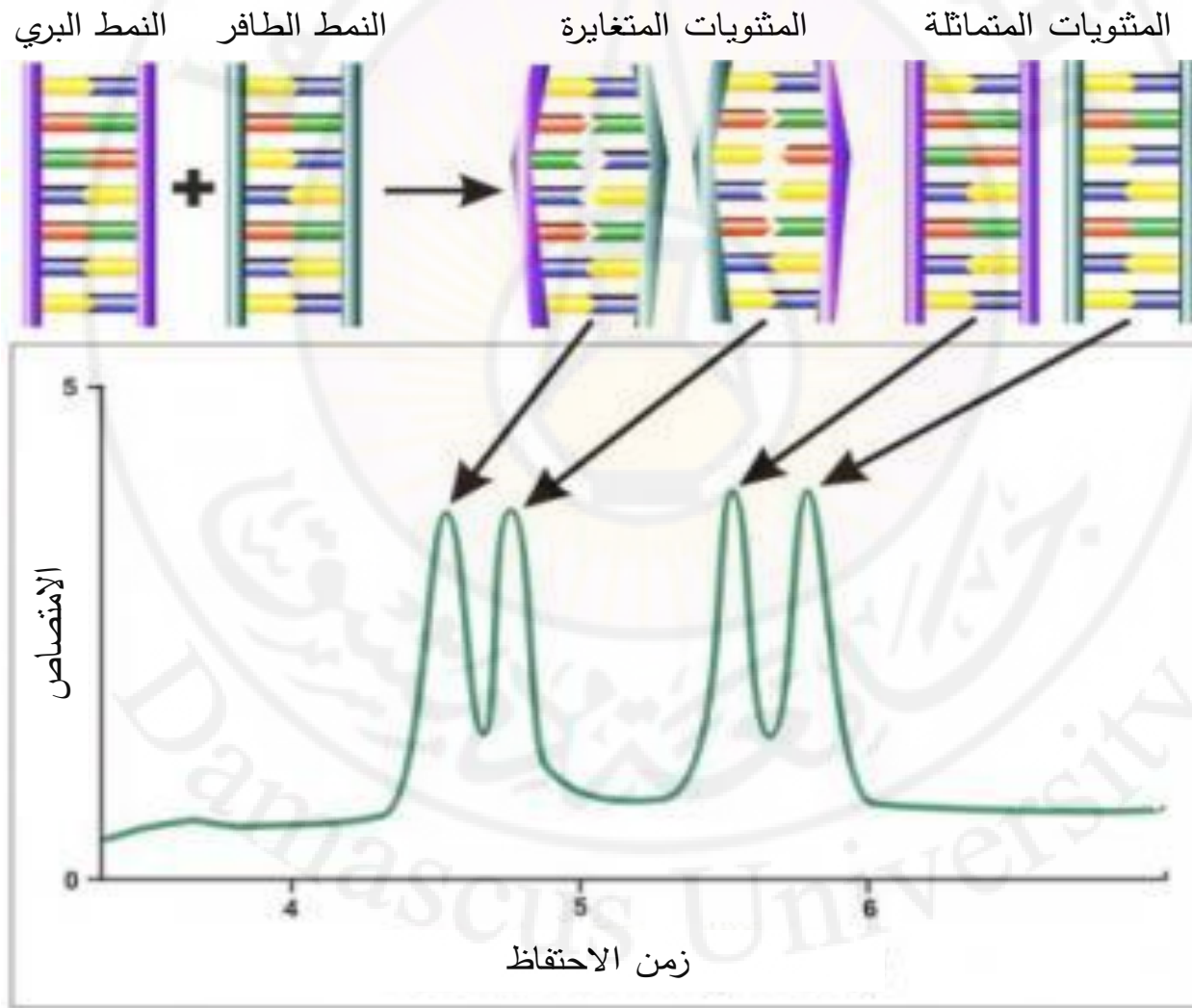




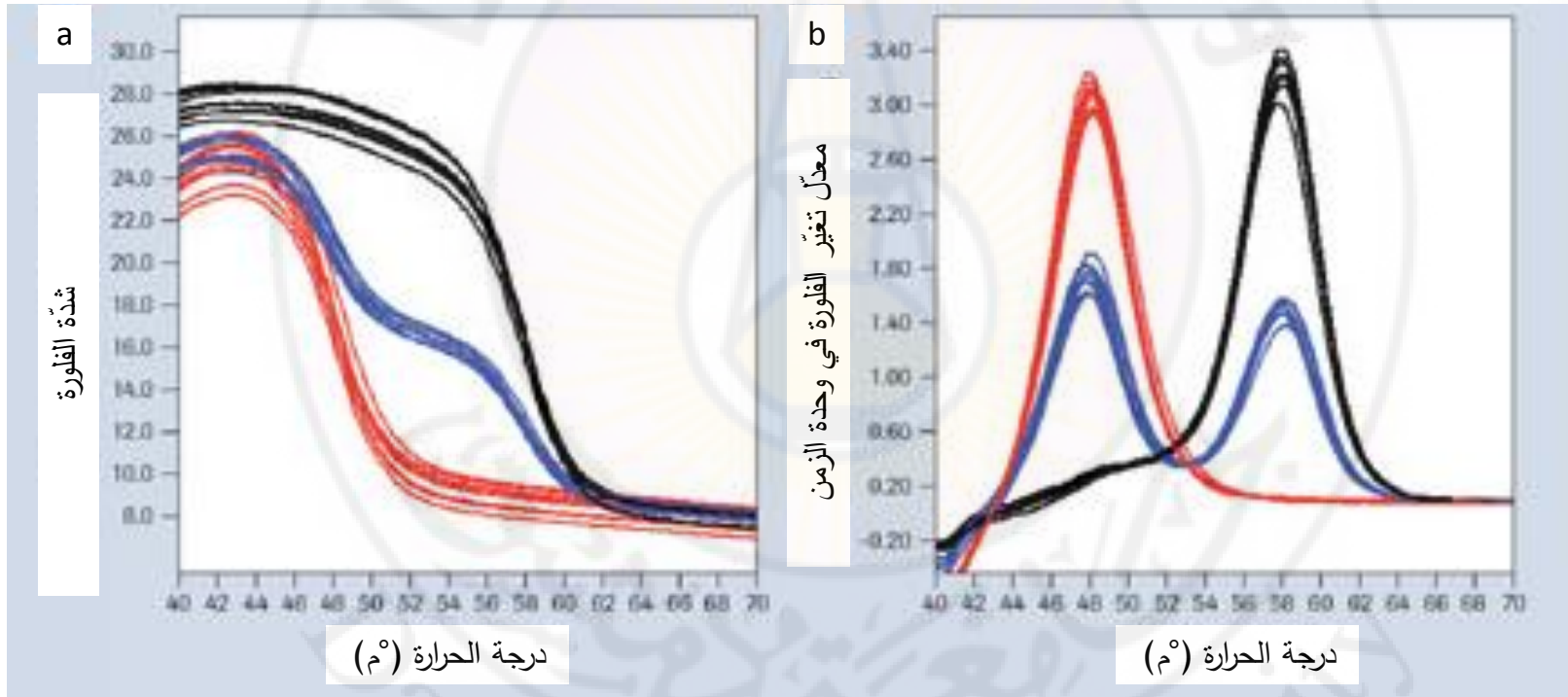
كشف تغاير الألائل بالهضم بإنزيم النكلياز



الاستشراب اللوني السائل رفيع الإنجاز الممسّخ dHPLC دون إنزيم النكلياز



تحليل منحنى الانصهار



— متماثل اللواقح للنمط البري — متماثل اللواقح للنمط الطافر — متغاير اللواقح