فريق الكريات الحمراء التطوعي

5

112

32

21/10/2018

RBS Pharmac

كلية الصيدلة

السنة الخامسة

إنتاج الببتيدات والبروتينات العلاجية 2

د. مجد الجمالي

تقانة حيوية | نظري

ومنرجع لمحاضرتنا الخامسة مع مادتنا الخفيفة والنضيفة.....ومع الدكتور الرائع جداً جداً مجد الجمالي.....لا تنسو القهوة والنسكافيه والشوكولا....لننطلق....

فهرس المحاضرة:

- تجزيء البلازما 3
- طرق إنتاج البروتينات المشتقة من البلازما 7
- طريقة Cohn 8
- طريقة الصدمة الحرارية 13
- الاستشراب اللوني 18
- أمثلة عن البروتينات العلاجية المشتقة من البلازما 24

- الشرط الأساسي لاستخلاص أي بروتين من البلازما أن يكون تركيز البروتين ضمن البلازما مرتفع وذلك حتى تكون طريقة الاستخلاص مجدية اقتصادياً، فالبلازما تحوي مئات الآلاف من البروتينات.
- ذكرنا في السابق أنه عند بدء دراسة الجينوم قال الباحثون بأن الإنسان يملك 30000 مورثة، ثم اكتشفوا بعدها أن **ليست كل المورثات التي تم اكتشافها يمكن أن نسميها مورثة فبعضها لا ينطبق عليه المواصفات الأساسية للمورثة،** لذلك بدأ هذا العدد بالتناقص وآخر تحديث كان أننا نملك 19500[1] مورثة.

منطقياً: 19500 مورثة تعطي 19500 بروتين، لكن، نتيجة لعمليات التعديل بعد الترجمة أصبح لدينا مئات الآلاف من البروتينات أيضاً.....

مثال: في جملة المناعة هنالك حوالي مليار خلية بائية وأكثر من مليار خلية تائية، تختلف عن بعضها بالمستقبلات (تحديداً نوعيّة المستقبل الذي تمسك المستضد به)، وبالتالي لدينا 13 أو 14 مليار بروتين جميعها نتجت عن عمليات التعديل.

خلايا جملة المناعة هي الوحيدة التي تقوم بعملية تأشيب recombination، أي تأخذ قطعة من مورثة ما وقطعة من مورثة أُخرى، لتحصل على مورثة جديدة على مستوى الدنا وتقوم بالتعبير عنها.

خلاصة الحديث: ***لدينا العديد من البروتينات والتي يفوق عددها عدد المورثات وذلك بسبب عمليات التعديل.***

- بالعودة للاستخلاص: بعض البروتينات تركيزها قليل جداً وبالتالي عملية الاستخلاص من البلازما لهذه البروتينات غير مجدية، ومن جهة أُخرى، بعض البروتينات التي تملك تركيز مرتفع يكون استخلاصها مجدي أكثر من تصنيعها بواسطة الدنا المأشوب أو عمليات أُخرى.

معظم البروتينات الصيدلانية يتم إنتاجها بعملية recombinant DNA technology والبعض فقط يستخلص.

[1] هذا الرقم غير ثابت.

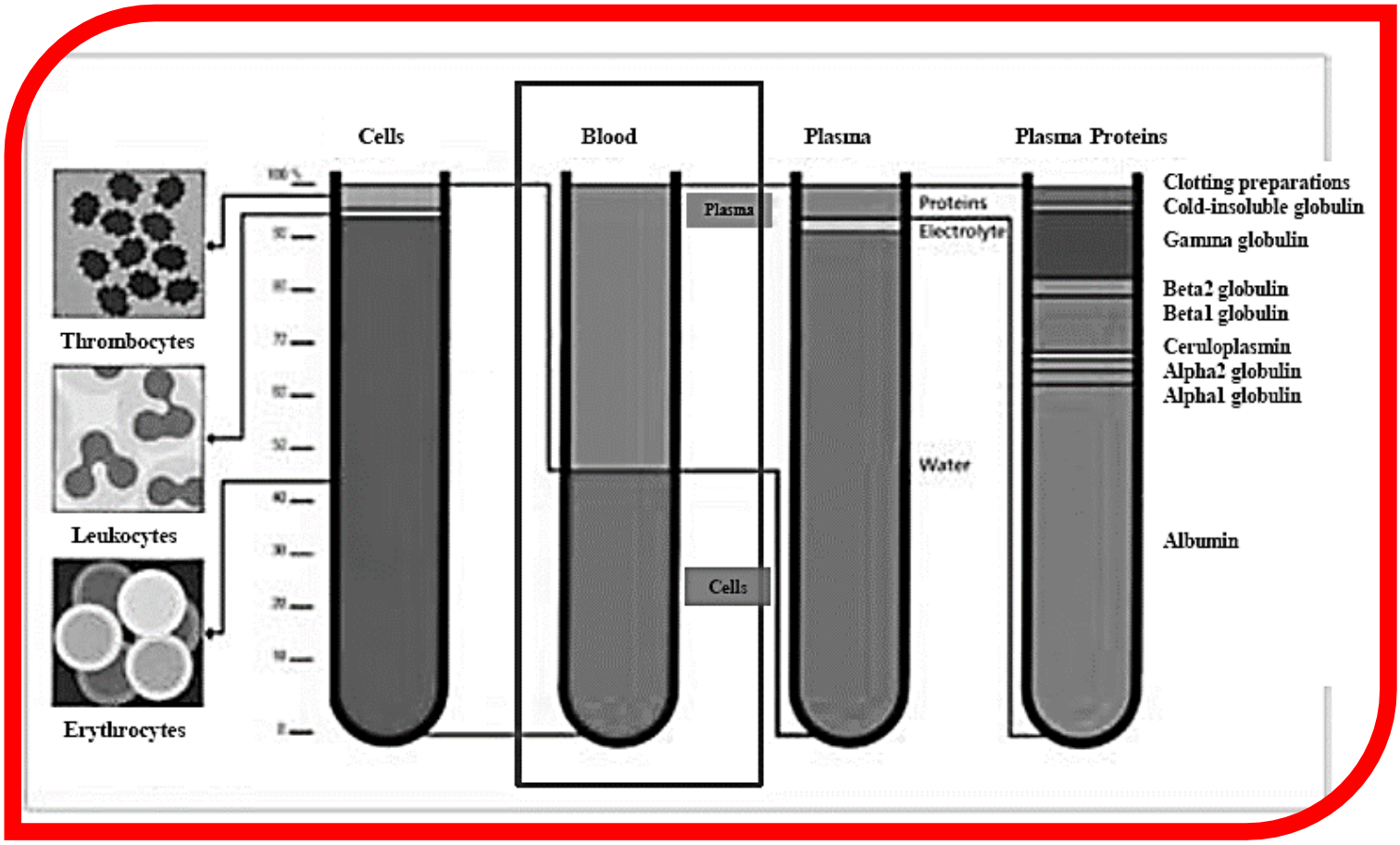
Plasma fractionation
تجزيء البلازما

- يتم استخلاص البروتينات من البلازما عبر تقنية تجزيء البلازما plasma fractionation أي:

تجزيء الدم إلى مكوناته.

- عادةً عند سحب الدم في بنك الدم يتم تجزئته لعدة محضَّرات (محضَّرات بلازما-محضَّرات كريات حمراء...إلخ) ولكن هذه المحضَّرات تبقى لفترة معينة ثم تصبح تالفة.

بالنسبة لمحضَّر البلازما فأنه حتى لو تَلف فإن بعض البروتينات الموجودة ضمنه لا زالت مفيدة.



الصورة السابقة توضح النسبة المئوية لكل مكون من مكونات الدم:

من اليسار لليمين:

الأنبوب الأول: الخلايا الموجودة في عينة الدم:

كريات الدم الحمراء تشكل تقريباً 91% من الخلايا.

البيضاء حوالي 2-1%

الصفيحات حوالي 6-7%.

تذكر: كل 1 مل دم يحوي حوالي:

5000 كرية بيضاء (WBCs) – 5 ملايين كرية حمراء (RBCs) – 150 ألف صفيحة (plates).

الأنبوب الثاني: عينة دم مع مضاد تخثر بعد التثفيل، ونلاحظ أن:

الخلايا تشكل 45-40% من حجم الدم الكلي

والبلازما تشكل 60-55% من حجم الدم الكلي.

الأنبوب الثالث: يحوي البلازما فقط ونلاحظ أنها مكونة من:

90٪ ماء – 1-2٪ كريات حمراء (لم تتثفل) – 8[2]-9٪ بروتينات.

الأنبوب الرابع: يحوي بروتينات فقط:

60% بروتين الألبومين

نشاهد أن غلوبولين غاما يشكل النسبة الأكبر من الغلوبولينات المناعية، وأيضاً غلوبولين β_1 يتواجد بنسبة كبيرة (وهي عائلة كبيرة من الغلوبولينات)، ولكن هنالك أنواع أُخرى كثيرة منها α_1 globulin و α_2 ceruloplasming globulin و β_2 globulin ليست لها استخدامات علاجية كثيرة.

عوامل التخثر لها أهمية علاجية كبيرة خاصةً عند الأشخاص الذين لديهم عوز بأحد هذه العوامل.

[2] ذكر الدكتور أن النسبة من 6 لـ7 % أو 7-8%.

ملاحظة:

☒ تذكّروا أن: المصل يكون في عينة الدم التي لا يضاف لها مضاد تخثر وبالتالي ستتخثر وتشكل علقة، أما البلازما تكون في عينة الدم التي أضيف لها مضاد تخثر.

إذاً، الفارق الأساسي بين المصل والبلازما هو أن البلازما تحوي عوامل التخثر أما المصل لا يحوي عوامل التخثر.

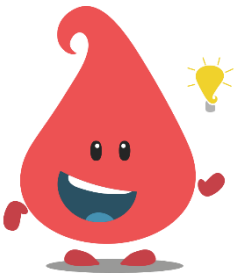
☒ هنالك نوع من الغلوبولينات هي الغاما غلوبولين أو الغلوبولينات المناعية، وهي الأضداد وتندرج تحت المناعة الفاعلة Passive Immunity فإذا كان المريض مصاب بعوز مناعي (مثل مرضى الإيدز) نحن بحاجة إلى إعطاء هذه الأضداد لمحاربة أي إصابة فيروسية أو جرثومية (لأن جهازه المناعي معطَّل وغير قادر على تصنيع هذه البروتينات) أو مثل مرضى الـSCID الذين لا يملكون خلايا بائية وتائية.

هناك الكثير من الأمراض الوراثية التي تنقص فيها بعض عوامل التخثر مثل الناعور A (عوز العامل الثامن)، الناعور B (عوز العامل التاسع)، أيضاً هناك أمراض أقل شيوعاً ينقص فيها العامل السابع أو الـ12 أو الـ13...

هناك ما يعرف بالأضداد النوعية حيث نستخلص الأضداد من بلاسما شخص شفي من مرض ما حديثاً ونعطيها لشخص آخر لتصبح لديه مناعة، وعلى الرغم من أن هذه الطريقة قد تنتقل خلالها بعض الفيروسات إلا أنها مفيدة للعديد من المرضى وخاصة مرضى الناعور ومرضى الإيدز.

بقي العلاج بالمنتجات الدموية ((طريقة الأضداد النوعية)) منذ 50 سنة

شوية أرقام وإحصائيات



تحتوي البلازما على 60 غ/ل من البروتينات، يُستفاد من 57 غراماً منها لتحضير منتجات بروتينية علاجية.

يعدّ تجزيء البروتينات protein fractionation الصناعة الأضخم لإنتاج البروتينات العلاجية، حيث ينتج 500طن من ألبومين المصل البشري human serum albumin (HAS) و40 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.

تعو خدو فكرة صغيرة جداً جداً عن البروتينات الموجودة بالبلازما مع تراكيزها ((ما تخافو مو للحفظ))

ble 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

[a]Titers (antibody concentrations) vary in µg/mL ranges. [b]As prothrombin

تنتج خمس شركات فقط أكثر من 70٪ من هذه البروتينات العلاجية المشتقة من البلازما وهي:

- Alpha Therapeutics (لا يروح بالكن عألفا يلي عنا هي غير وحدة)
- Bayer Biological Products
- Baxter Bioscience
- Aventis Behring
- CSL/ZLB Biopharma

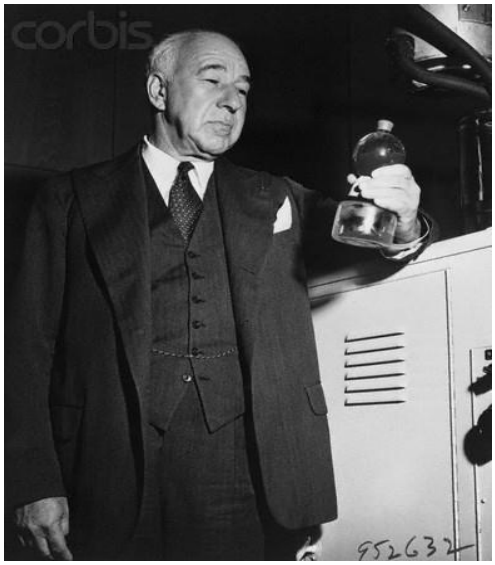
ولا تفي كمية المنتجات المتوفرة حاجة السوق الدوائية من هذه الأدوية البيولوجية، حيث يغطّي المنتَج منها فقط عُشر حاجة السوق، وهي بالكاد تكفي مُجتمعةً سوق الولايات المتحدة والدول الأوربية فقط.

طرق إنتاج البروتينات المشتقة من البلازما

اليوم، يمكن إنتاج البروتينات المشتقة من البلازما بإحدى الطرائق الثلاث:

- طريقة cohn
- طريقة الصدمة الحرارية Heat shock
- طريقة الاستشراب اللوني chromatography.

أولاً: طريقة Cohn



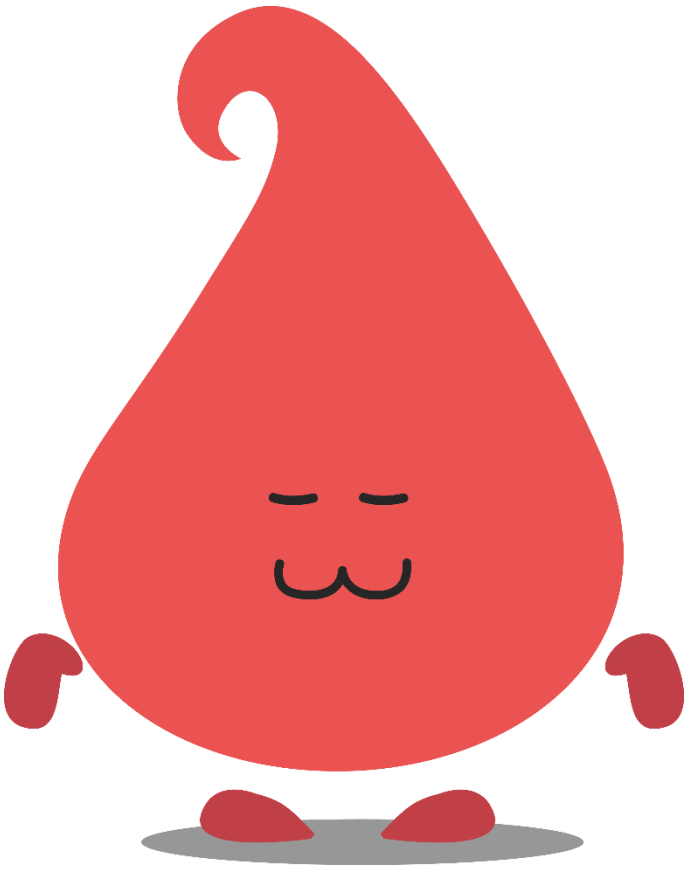
- أسس العالم Edwin J. Cohn من خلال عمله قبل وخلال الحرب العالمية الثانية لصناعة تجزيء البروتينات المشتقة من البلازما Plasma-derived protein fractionation.
- ونتيجة عمله الدؤوب ذاك:
- ترخيص أول مستحضر للألبومين البشري في آب 1941(أي ضمن الحرب العالميّة الثانية).
- ومستحضر IgG المعدّ للحقن العضلي في أيلول 1943.
- وأول مستحضر لـIVIG في أيلول 1981.

لنتحدَّث قليلاً عنه:

- Edwin Cohn (1892-1953): ساعد المئات من الجنود خلال الحروب العالمية الثانية بواسطة البروتينات المستخلصة من البلازما، وترشح (بس ما أخدها) لجائزة نوبل للطب أو الفيزيولوجيا لسنة 1950.
- عمد صديقنا Cohn إلى:

تغيير الشروط المحيطة بالبروتينات دون تعريضها لشروط قاسية تسبب تمسخها.

- أجرى التغييرات بشكل تدريجي، ليش؟؟؟ لكي لا تتعرَّض البروتينات لتغييرات مفاجئة تسبب **تمسُّخها**.



مبدؤها

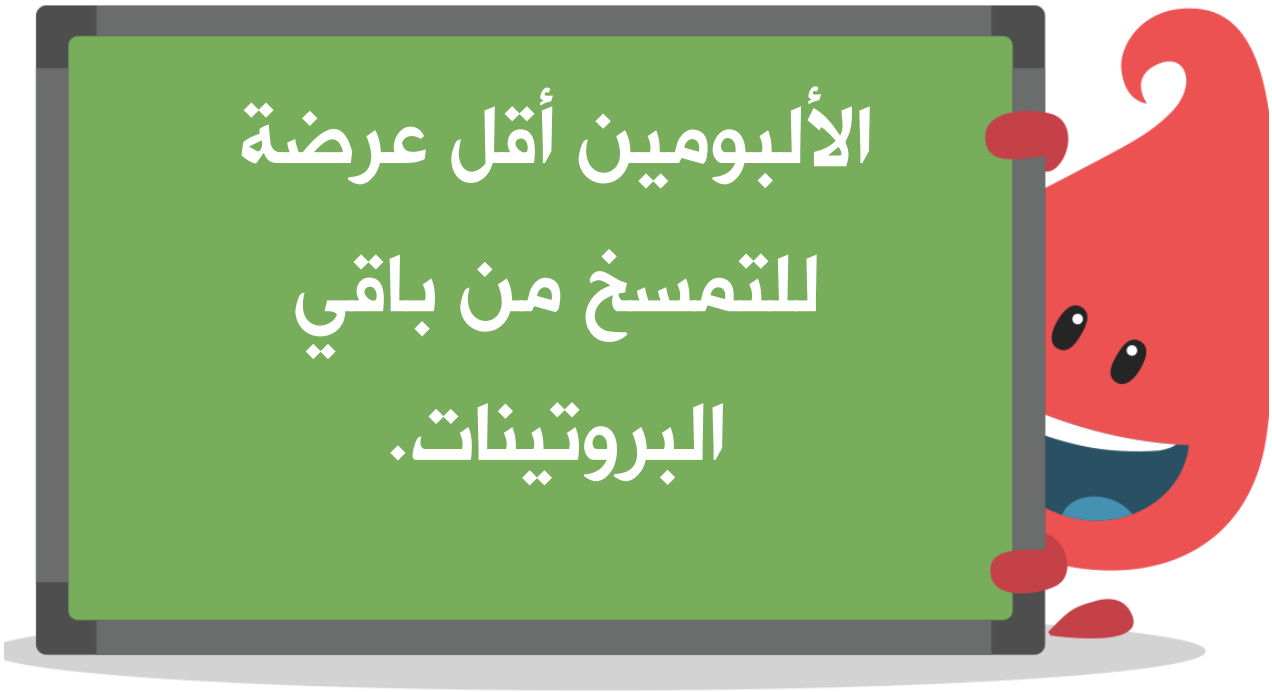
تعتمد طريقة "كون" على استخلاص وترسيب البروتينات عبر:

1. **تغيير تراكيز الكحول الإيتيلي ودرجات الباهاء Ph في مستخلصات بلازما الدم.**
2. **إضافةً إلى التبريد.**

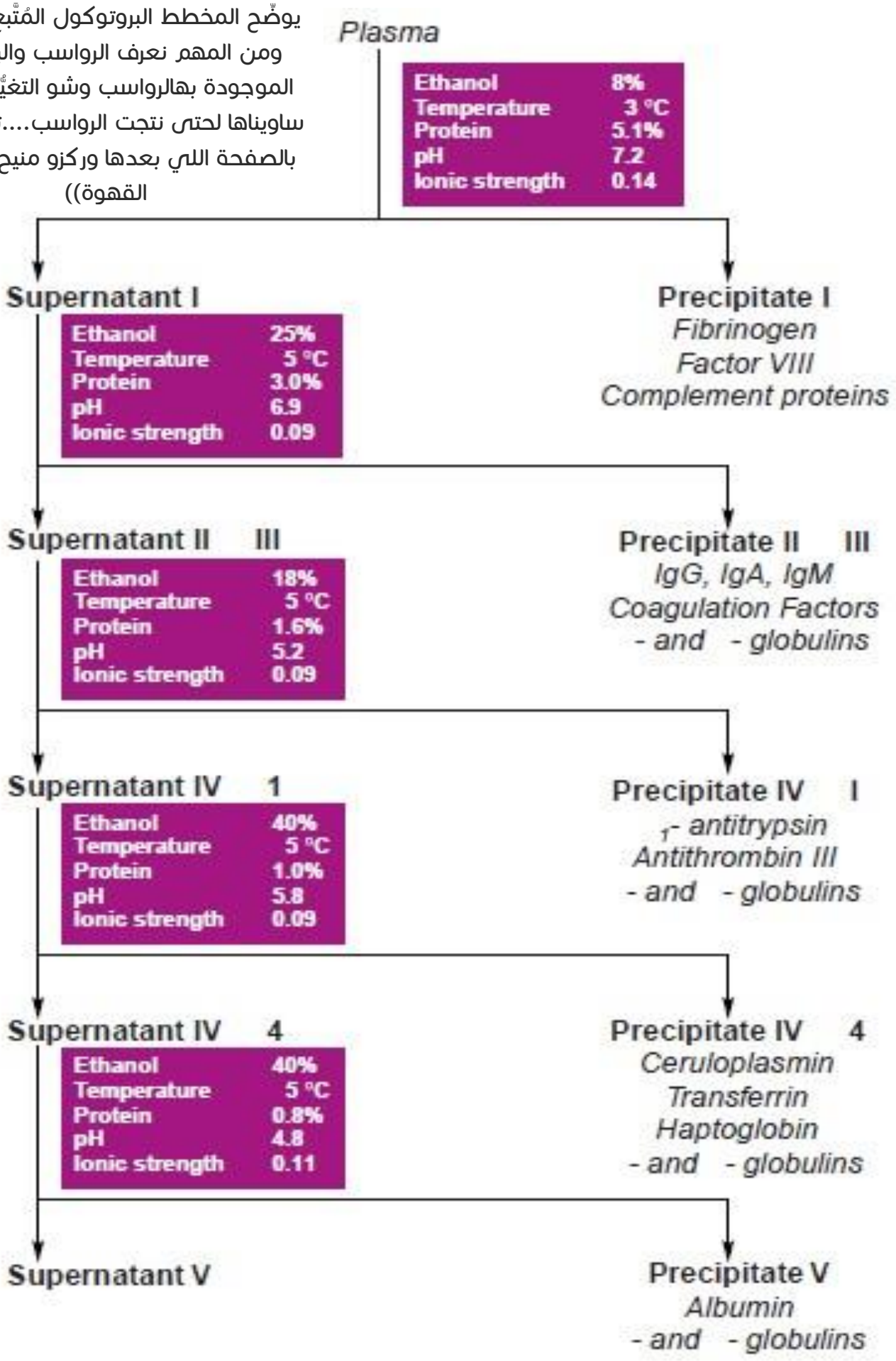
حيث أن رفع تراكيز الإيتانول وتخفيض درجة الباهاء بشكل تدريجي لا يؤدي إلى تخرُّب البروتينات.

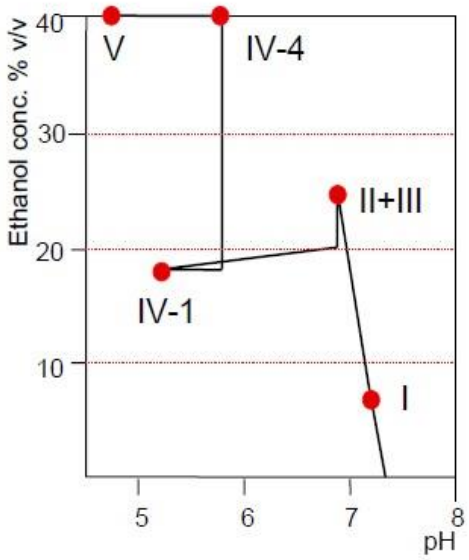
- **ينتج عن طريقة Cohn خمسة رواسب تضم عدة أنواع من البروتينات التي تترسب بدرجة باهاء وتراكيز إيتانول محددة.**

وما تزال هذه الطريقة تستخدم بشكل واسع لتحضير بروتين الألبومين.



يوضّح المخطط البروتوكول المُتّبع ((هام)) ومن المهم نعرف الرواسب والبروتينات الموجودة بهالرواسب وشو التغيُّرات اللي ساويناها لحتى نتجت الرواسب....تابعو معنا بالصفحة اللي بعدها وركزو منيح ((جددوا القهوة))





تابعوا عنا في المخطط السابق والصورة الآتية:

بالبداية كان تركيز الإيتانول 0٪ والـPh كانت 7.4٪ وبالتبريد ((يعني بالدرجة C^0 4-)..ثم قام بالخطوات التالية:

أولاً: إضافة الإيتانول حتى 8٪ وخفض الـPH قليلاً حتى 7.2 تقريباً فيتشكل الراسب الأول I المؤلَّف من:

Fibrinogen
Factor VIII[3]
Complement Proteins

ثانياً: إضافة الإيتانول تدريجياً حتى الوصول لتركيز 25٪ وخفض الـPH قليلاً حتى 6.9-6.8 فينتج الراسبان II +III[4].

حقيقةً، هما راسب واحد ولكنه سماهما II +III تبعاً لمكونات الراسب:

- I: Immunoglobuline (IgA – IgG – IgM)
- III: Coagulation factors and globulins

ثالثاً: ***بداية***، نُخفض تركيز الإيتانول حتى 18٪ بشكل تدريجي ثم نخفض الـPH لحدود 5.2 (بالترتيبببببببببببببب)فنحصل على الراسب IV-1:

Antitrypsin ← Antithrombin III ← Globulins

لماذا خفضنا تركيز الإيتانول ثم غيرنا الـPH؟

ببساطة وُجِد بالتجارب أن الانتقال من PH: 9.6 إلى PH: 5.2 بوجود تركيز مرتفع من الإيتانول يؤدي إلى تمسخ البروتينات.

[3] العامل الثامن.
[4] حقيقة هما راسب واحد ولكن نحن نلتزم بالتسمية التي فرضها III+II.

رابعاً: نرفع الـPH قليلاً حتى 5.8 ثم نرفع تركيز الإيتانول لـ 40٪ (كمااان بالترتيب)

فنحصل على الراسب IV-4:

Ceruloplasmin ← Transferrin ← Haptoglobin ← Globulins

خامساً: نخفض الـPH حتى 4.8 مع الحفاظ على تركيز الإيتانول 40٪ كما هو

فنحصل على الراسب V:

Albumin and globulins

نلاحظ ترسب الألبومين عند خفض الـPH وأعلى تركيز للإيتانول.

ملاحظات:

ترسب البروتينات أي أنها توضعت أسفل الأنبوب ولم تعد منحلَّة، ولا يعني أنها تمسَّخت.

البروتوكول الذي اعتمد عليه "كون" على الرغم من كونه *بسيط* ويمكن القيام به خلال *فترة زمنية قصيرة (يوم أو أقل)*، إلا أنه احتاج إلى العديد من السنوات والكثير من التجارب حتى حصلنا عليه بشكله النهائي وما زال مستخدم حتى يومنا هذا.

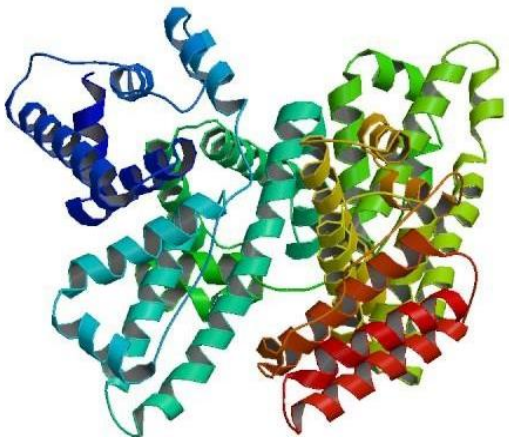
سؤال طرحه أحد زملائنا: لماذا لم نطبق مباشرة تركيز 40٪من الإيتانول وPH=4.8؟

لأنه في هذه الحال ستترسب جميع البروتينات مع بعضها ونحن نهدف لفصل البروتينات وليس فقط ترسيبها، بالإضافة إلى أن بعض البروتينات ستتمسخ مما قد يعيق التجربة.

هذا الجدول يُبسِّط ويختصر طريقة كون ((مطلوب مع الأسف الشديد جداً....بس ما تخافوا إذا حفظتو الشرح السابق معناها الجدول صار مجرَّد ترتيب وتثبيت أفكار)).

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

ثانياً: طريقة الصدمة الحرارية



- طريقة سهلة جداً ولكنها تُستخدم للألبومين فقط.
- تعتمد طريقة الصدمة الحرارية على الثباتية الحرارية للألبومين بالمقارنة مع معظم بروتينات البلازما الأُخرى، فالألبومين لا يتمسّخ بشكل تلقائي، ويمكن لمحاليل الألبومين أن تُسخّن للدرجة 60 مئوية لتثبيط العوامل المُمرضة والتخلُّص منها (تتمسَّخ وتتثبَّط).

طُورت الطريقة، حيث يُمكن لدى استعمال الحمض الكابريلي caprylic acid بتركيز 0.04 مول/ل استخلاص الألبومين من المصل في الدرجة 60 مئوية و PH=5، بينما تتمسخ بقية بروتينات البلازما وتصبح غير منحلة في الشروط نفسها أما الألبومين فيبقى منحل.

- يُمكن تركيز الألبومين المستخلص إما عبر الترشيح الفائق ultrafiltration أو بالترسيب حيث *نطبق مباشرةً إيتانول 40٪ و PH=4.8*.

تبلغ نقاوة الألبومين المستخلص بهذه الطريقة أعلى من 98%.

الألبومين Albumin:

- 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 **maintainance** of blood tonic pressure and pH.

- هو بروتين كروي، وهو البروتين الرئيسي في البلازما يُشكل 60٪ من بروتينات البلازما.
- يرتبط بالعديد من الأدوية مغيِّراً حركيَّتها والمواد الأُخرى كالهرمونات والحموض الدسمة بمختلف أشكالها ومحبتها للماء أو للدسم، حمضيةً كانت أم قلوية، وذلك بسبب المجموعات الوظيفيّة الكثيرة التي يمتلكها، فمثلاً:
  - ✓ ثمالات حمض الأسبارتيك سالبة الشحنة تربط المواد المشحونة إيجاباً.
  - ✓ ثمالات اللايزين المشحونة إيجاباً تربط المواد المشحونة سلباً.
  - ✓ بالإضافة للحموض الأمينية الكارهة للماء ترتبط مع المواد غير المشحونة.

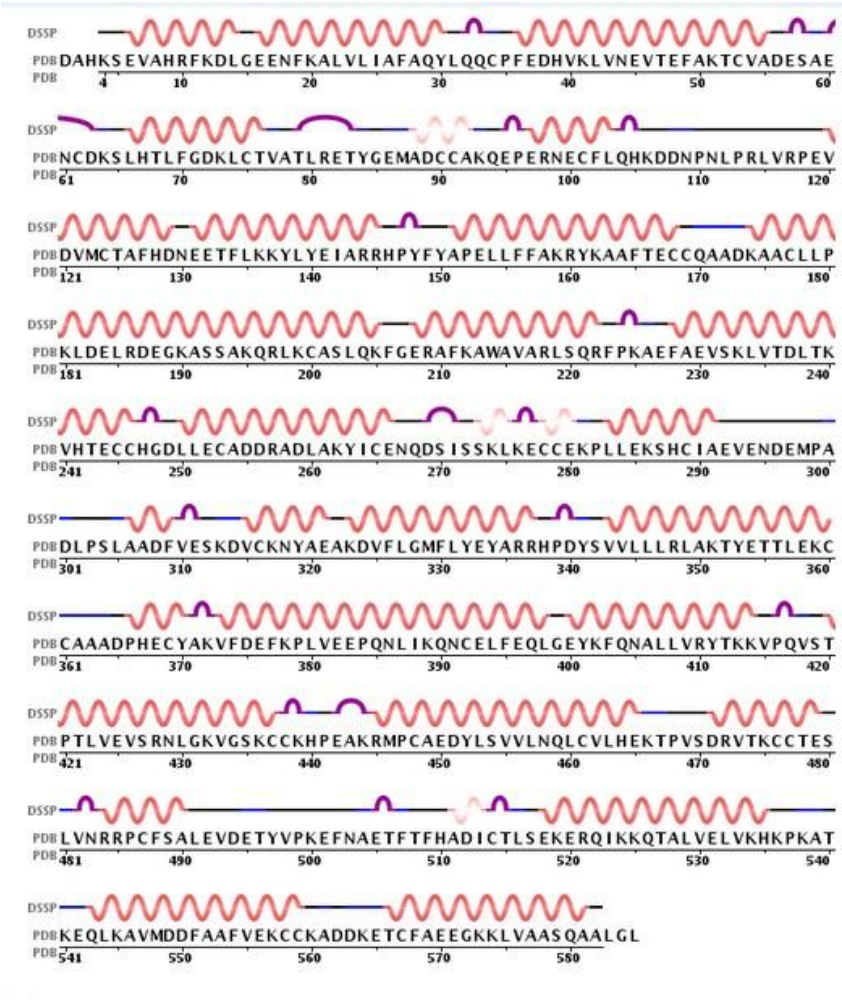
فهو يحمي الجسم كثيراً في حالات تقلبات الـPh "تحمضن أو قلونة الدم" حيث يبقى ثابتاً ويعمل كوقاء، كما يحافظ على ضغط الدم ويحافظ على ارتباطه مع المواد ويؤثر في حركيتها الدوائية (يربط كل ما في الدم تقريباً).

لذلك فإن المصابين بأمراض كبدية يواجهون الكثير من المشاكل بسبب نقص الألبومين.

ما هو السر وراء ثباتية الألبومين في كلا الطريقتين السابقتين (كون والصدمة الحرارية)؟؟

الألبومين مكون من سلسلة عديد ببتيد واحدة تتألف من 585 حمض أميني (والذي يشكِّل 60٪ من بروتينات البلازما)، فهو بروتين كبير ← ونحن نعلم أن البروتينات الكبيرة أقل عرضة للتمسُّخ فهي تحوي العديد من الروابط والجسور بين الحموض الأمينية التي تزيد الثباتية.

☒ **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.



ألبومين المصل البشري (HSA) يُطلق عليه بروتين البلازما الناقل متعدد الوظائف بسبب قدرته على تشكيل روابط مع طيف واسع من المواد كالمواد العضوية وغير العضوية سواءً كانت كاتيونات أو أنيونات والعقاقير المختلفة والأحماض الأمينية، والأهم قدرته على الارتباط بالجزيئات الكارهة للماء كالأحماض الدسمة والبيليروبين.

☒ 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.

لنلاحظ بُنى الألبومين:

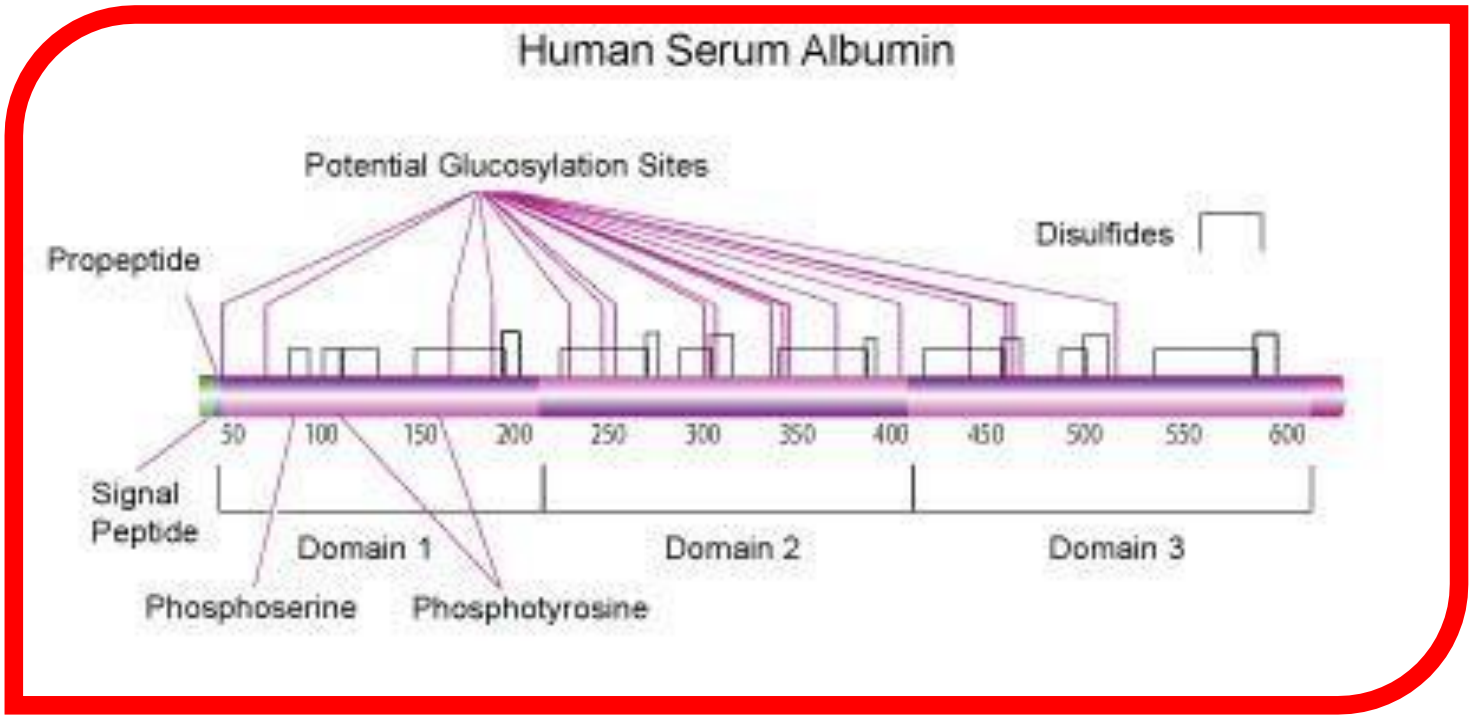
تتميز البنية *الأولية* للألبومين بـ:

- محتوى منخفض من التريبتوفان Tryptophan.
- محتوى عالي من السيستئين الذي يساهم في ثباتية سلسة من العُروات الرئيسيَّة Main loops بسبب احتوائه على مجموعات SH والتي تشكل مع بعضها في ظروف مؤكسِدة روابط تشاركية قوية S-S.
- حموض أمينية مشحونة مثل الأسبارتات aspartic acid والغلوتامات glutamic acid والليزين lysine والأرجنين arginine مما يعطي جسور ملحية "شاردية" تُثبت أيضاً بنية البروتين.

تبيّن البنية التكرارية للألبومين (المكونة من عُروات loops كبيرة وصغيرة وقطع رابطة) أن الألبومين نتج عن سلسلة من عمليات التضاعف لجينة ما gene duplicantion.

- أما البنية الثانوية للألبومين، فهي مكونة من 67٪ من الحلزونات α-Helix التي تمتلك 6 التفافات turns و17 رابطة ثنائية الكبريت disulfide bridge لأنه غني بالسيستئين أي حوالي 34 ثمالة سيستئين على الأقل.
- البنية الثالثية تتكون من ثلاث مجالات (domains): I, II, III.

لا يوجد بنية رابعية ولو وجدت لأصبح التمسخ أسهل



تنويه أول:

استخلاص الألبومين مرغوب أكثر من استحصاله بشكل recombinant DNA لأنه يحوي العديد من مواقع الغلكزة التي تخضع لتعديلات ما بعد الترجمة.

تنويه ثاني:

استخلاص الألبومين *ليس مُكلِف* ولكن سبب ارتفاع سعره هو ما يعرف بـ (KnowHow) أي عدم معرفة طريقة استخلاص أو عدم القدرة على القيام بها، مما يجعل الشركات المصنعة تستغل حاجة السوق إليه وعدم وجود العديد من المصنعين له.

ثالثاً: الاستشراب اللوني Chromatography process

- يعدّ الاستشراب اللوني أهم الطرق للتقليل من عدم تجانس الألبومين، وتستخدم العديد من التقنيات لتنقية الألبومين
- كما يعدً من أهم الطرائق المستخدمة في استخلاص البروتينات، وتستخدم أيضاً لتنقية البروتينات المستخلصة بطرق أُخرى.
- هناك أربع طرائق أساسية للاستشراب اللّوني التي تعتمد على الخصائص المميّزة للبروتينات المرغوب فصلها:

- الاستشراب اللوني الكاره للماء
- الاستشراب اللوني المبادل للأيونات
- الاستشراب بالألفة
- الاستشراب المعتمد على خصائص كيميائية معينة للبروتينات المعزولة.

ما يربط هذه الطرائق جميعها هو استخدام أعمدة راتنج (resins) وهذه الأعمدة تكون خاملة كيميائياً وذات خصائص متغايرة.

- يتم التحكُّم بالخصائص الفيزيائية والكيميائية للراتينات (كالقطبية والشحنة ودرجة الادمصاص Adsorption والنفوذية) بناءً على نوع البروتين المراد استخلاصه، فنحصل على أعمدة راتنجية نوعية لهذا البروتين، مثال: البروتين المطلوب يحمل شحنة موجبة ← نستخدم راتنج يحمل شحنة سالبة.

توضيح صغير:

- الرانتج لا يحمل شحنة حقيقية وعندما نقول رانتج يحمل شحنة، فالمقصود أن هناك مجموعات وظيفية مشحونة قد تُم ربطها بالرانتج.
- قبل أن نبدأ باستخلاص أي بروتين يجب معرفة عدة معلوماتٍ عنه ومعرفة خصائصه جميعها، هل هو كاره أو محب للماء؟؟سلبي أم إيجابي الشحنة؟؟

يتم الحصول على جميع المعلومات المتعلقة بالبروتين من Protein Data Bank - PDB.

أولاً: الاستشراب اللوني الكاره للماء Hydrophobic chromatography

يعتمد على فصل البروتينات الكارهة للماء وذلك باستخدام أعمدة مكونة من مواد لها خواص كارهة للماء، حيث تُوضع البروتينات في محلول حاوي على تركيز ملح محدد (بحيث يقلِّل من انحلال البروتين) وتخرج عندها الحموض الأمينية الكارهة للماء من داخل بنية البروتين (حيث في حال كان الانحلال كاملاً تكون بمعزل عن الماء) لسطح البروتين ← ترتبط بالعمود بروابط كارهة للماء.

وطبعاً في هذه الحالة يجب أن يكون البروتين المراد فصله يملك خواص كارهة للماء بمقارنته مع البروتينات الأخرى.

ثانياً: الاستشراب اللوني المبادل للأيونات Ion exchange

ويعتمد على شحنة البروتينات التي تكرسها الحموض الأمينية المشحونة charged amino acid في البروتين المعزول.

ثالثاً: الاستشراب المعتمد على خصائص كيميائية معينة للبروتينات المعزولة

ويعتمد على أعمدة مكونة من مواد مشحونة.

رابعاً: الاستشراب بالألفة Affinity chromatography

من أهم الطرق المستخدمة في تنقية البروتينات ويعتمد على:

الارتباط النوعي للجزيئات

ويكون الارتباط النوعي:

← إما بواسطة أضداد نوعية تستخدم في التقاط capture البروتينات النوعية لها.

← أو باستخدام لجينات ligands تلتقط البروتينات الرابطة لها.

حيث يكون العمود حاوي على أضداد نوعية للبروتين المطلوب أو ركائز أو مجموعات وظيفية معينة يرتبط بها البروتين المطلوب.

مثال: لنفرض لدينا محلول يحوي أنزيم السيكلو أوكسيجناز ← نُمرر هذا المحلول على عمود استشراب يحوي لجين Ligand أو ركازة substrate هو حمض الأراشيدونيك اسيد لهذا الأنزيم ليرتبط معه، فنكون بذلك عزلنا هذا الأنزيم لوحده (تنقية)، ثم نأخذ اللجينات المرتبطة مع الأنزيم ← نقوم بغسلها ← نفكُّ الارتباط ← نحصل على الأنزيم النقي.

يمكن أيضاً أن نأتي بعمود كاره للماء نحمِّله بأضداد لبروتينات معيَّنة.

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
Selecticity	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

نلاحظ بالسطر الأول وجود طريقة تُدعَى Group specific

وهي تُستَخدم للبروتينات المُدمَجة[5] وكما نعلم أن البروتينات المدمجة لا تتواجد بشكل طبيعي عند الإنسان، وبالتالي:

هذه الطريقة لا تُستخدم لاستخلاص البروتينات[6] من المصل كباقي الطرق.

Adsorption Capacity

يُقصد بها قدرة الادمصاص (أو امتزاز)، ونلاحظ أنها منخفضة بالنسبة للـ Affinity وذلك لأن *الأضداد المستخدمة يكون عددها قليل بسبب سعرها المرتفع*.

أما باقي الطرق (Hydrophobic and ion-exchange) نلاحظ أن قدرتها مرتفعة[7] لأنها تعتمد إما على الشحنة أو الخاصية الكارهة للماء لبعض الحموض الأمينية.

الانتقائية Selectivity

نلاحظ أن الـAffinity هي الأعلى انتقائية، وذلك بسبب النوعية العالية التي تتمتع بها الأضداد، أما بالنسبة لـ Hydrophobic and ion-exchange فهي Low to Medium.

المردود Recovery

كمية البروتينات التي تمكّنا من استخلاصها من العينة والحصول عليها بعد ارتباطها بالعمود.

- **ليست كل البروتينات التي تثبتها الرانتج يمكن استعادتها فبعضها يبقى متمسكاً بالرانتج ولا يمكن إزالته بسهولة أي أنها قد تمسَّخ عند نزعها، وبالتالي قدرة الادمصاص العالية لا تعني أن المردود سيكون كبير بالضرورة ← يكون المردود بالـ Affinity منخفضاً Low.**
- **نلاحظ أن طريقة Ion exchange تملك أكبر مردود وذلك بسبب سهولة فصل البروتينات عن الرانتج، *حيث نضيف مواد ذات شحنة مماثلة لشحنة البروتينات المُستخلصة، ولكن ألفتها للارتباط بالمجموعات الوظيفية المُحمَّلة على الرانتج أكبر*، فتتنافس تلك المواد البروتين على الارتباط بالرانتج.**
- **بالنسبة للـــHydrophobic فهو Medium.**

---

[5] كالبروتينات العلاجيّة، وهنا نقوم بدمج بروتين مؤشَّب Recombinant Protein مع بروتين آخر(أو بعض الحموض الأمينيّة) بهدف تنقيته أما باقي الطرق فنستدمها لاستخلاص بروتينات بلازميّة أو مؤشَّبة.

[6] لأن البروتينات المُستخلصة عبارة عن بروتينات طبيعيّة لذلك لا نستطيع أن نضيف عليها أي شيء.

[7] وخاصة الـ ion-exchange، وبال Hydrophobic نقول أنها متوسطة لمرتفعة.

Loading condition

شروط التحميل على العمود (نوع المحل- الـPH-الحرارة.....) **وأصعب شروط تحميل في حال طريقة الـ** Hydrophobic[8] والسبب أنه في هذه الطريقة يجب استخدام محلات العضوية، وكما نعلم العديد من المحلات العضوية تسبب تمسُّخ البروتينات، لذلك يجب البحث جيداً عن محل مناسب وإيجاد التركيز المناسب أيضاً حتى لا تتمسخ البروتينات.

الهواء بالنسبة للبروتينات هو Hydrophobic phase، فعند حل البروتينات[9] ((التي تأتي بشكل مسحوق مجفَّد Lyophilized مع محل مناسب لها أو نحلُّها بالماء)) يقوم البروتين بتشكيل روابط هيدروجينيّة مثلاً مع الماء، وعند وجود فقاعة هواء مثلاً ← قد تمسِّخ جزء من البروتين في حال مسَّته، ولذلك عند حل البروتينات بالماء يوصى بعدم الرجّ خوفاً من تشكّل فقاعات الهواء أي سنخلق بذلك طور Hydrophobic للدواء أو البروتين سيخرِّبه....وكذلك فإنَّ الزجاج المُستخدم لحفظ الأدوية البيولوجية كبروتينات يكون من نوع خاص لأنه Hydrophobic phase بالنسبة للبروتين.

Elution condition شروط الغسل

شروط شطف العمود للحصول على البروتينات وهو Mild في جميع الطرق أما بطريقة الـAffinity فهو Harsh بسبب قوة الادمصاص.

Regeneration إعادة تفعيل العمود

أي إمكانية إعادة استخدامه عدة مرات، وذلك يتعلَّق بصعوبة نزع كامل كمية البروتين العالقة بالعمود، فحتى يستخدم مرة أُخرى يجب ألا يكون هنالك أي بروتين في العمود التي لا يؤثر على عملية الاستخلاص التالية.

- ✓ بالنسبة لطريقتي الـ Affinity والـ Hydrophobic فهو أمرٌ صعب (Incomplete).
- ✓ أما بالنسبة لطريقتي Group-Specific و Ion-Exchange فيكون الأمر أسهل (Complete).

[8] نصنّفها بأنها sometimes harsh أما بالنسبة لباقي الطرق فهي mild.
[9] حساسة للغاية وقابلة للتمسُّخ بسهولة.

السعر Cost

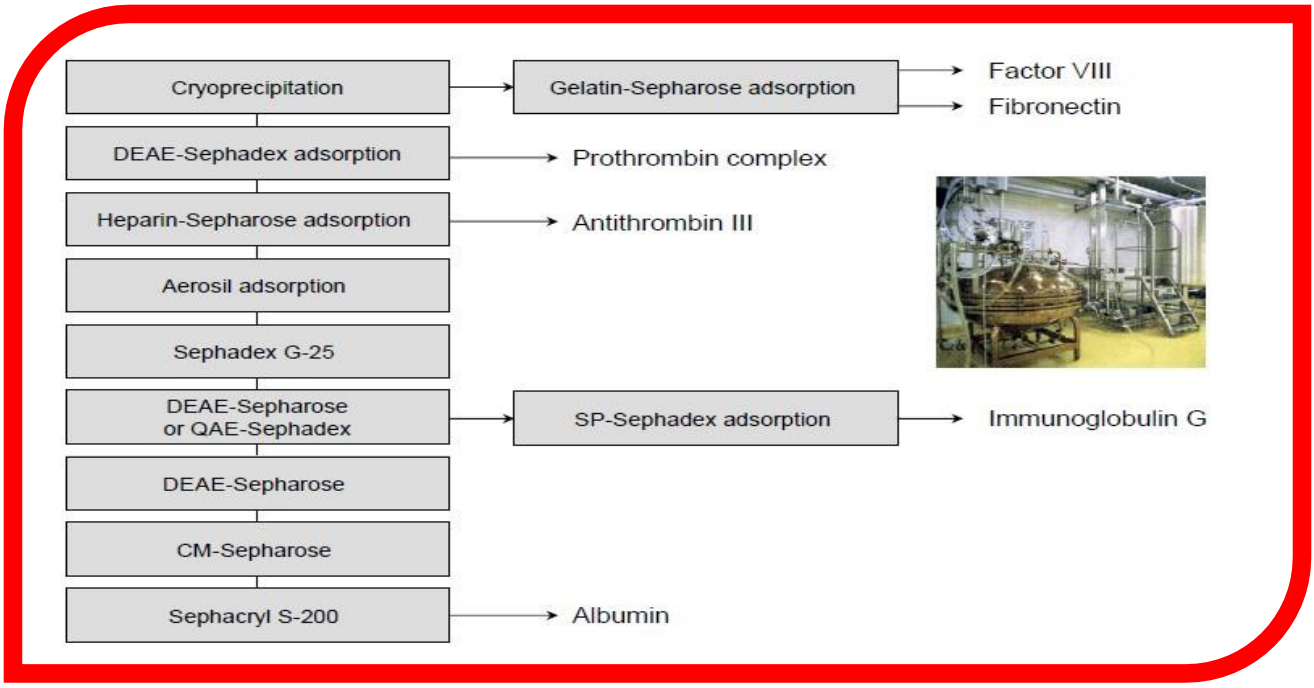
يعتمد السعر على *نوع المواد المستخدمة*، فكما نعلم الأضداد أسعارها مرتفعة جداً، وبالتالي الـAffinity سيكون الأعلى سعراً.

كلما كانت الألفة للارتباط بالراتنج أعلى ← كان استرداد البروتينات أصعب ← المردود منخفض.

نجد من بنية البروتين أن الحموض الأمينية المحبة للدسم موجودة في الداخل والمحبة للماء في الخارج، فعند استخدام الاستشراب المحب للدسم (الكاره للماء) ستخرج هذه الحموض الأمينية المحبة للدسم لترتبط مع العمود المحب للدسم ← تخرُّب **جزء** من بنية البروتين، ولهذا السبب قلنا أن مردود هذه الطريقة متوسط، وبنفس الآلية تتمسَّخ بالبروتينات عند إضافة محل عضوي.

يوجد في المصانع التي تقوم بتصنيع الأدوية البيولوجية مختصين يقومون بإجراء أبحاث لوضع بروتوكولات جيدة.

مثال عن تجزيء البلازما باستخدام شلال cascade من طرق متغايرة للاستشراب اللوني، و تطبَّق هذه الطرق لاستخلاص العديد من بربروتينات البلازما وخاصّة عوامل التخثّر ((الشلال للاطلاع))



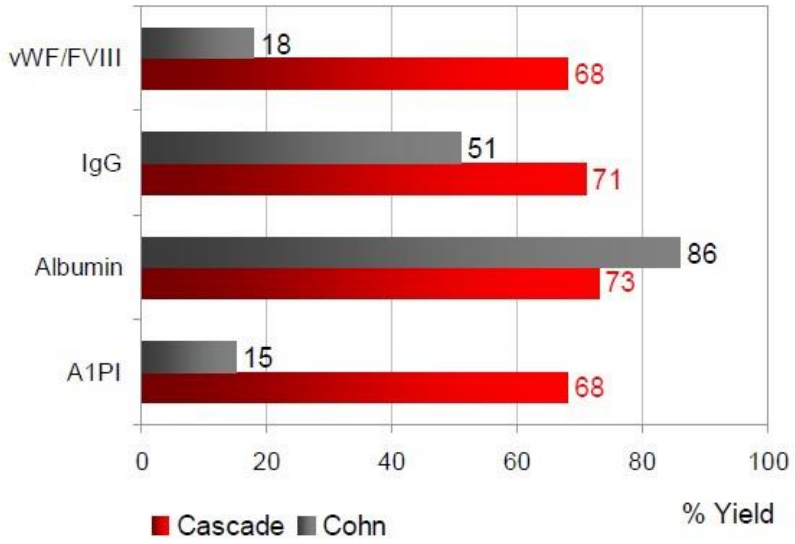
((من الأرشيف))

نلاحظ من المستطيل الثالث أننا استخدمنا طريقة الاستشراب بالإلفة، فالهيبارين المستخدم بالعمود الأول يرتبط بالأنتي ترومبين III وهي آلية عمل الهيبارين حيث يرتبط مع الأنتي ترومبين III ويقوي فعاليته، بالتالي نتيجة هذا الارتباط سينفصل الأنتي ترومبين عن بقية بروتينات البلازما.

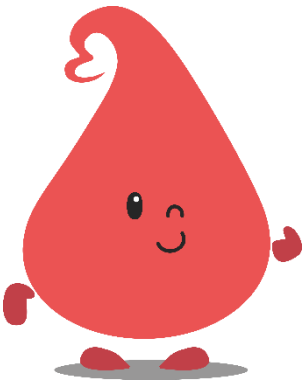
- نلاحظ ايضاً أن الألبومين هو المنتج النهائي (كطريقة كون).

لا يُحضَّر الألبومين بهذه الطريقة بسبب تعدُّد مراحلها وكلفتها العالية، لذلك يُحضَّر بطريقة كون والصدمة الحرارية بشكل رئيسي.

يوضح الشكل التالي مردود استخلاص بعض البروتينات من البلازما بطريقتيّ Cohn أو شلال Cascade من الاستشراب اللوني المتغاير (غير المتجانس):



- يبدو مردود استخلاص الألبومين أفضل بطريقة Cohn (لذلك فهي أكثر ما تستخدم لاستخلاص الألبومين)، بينما مردود معظم بروتينات البلازما الأُخرى أفضل بطريقة الاستشراب اللوني.
- الخط الأعلى: طريقة كون
- الخط الأسفل: شلال الاستشراب اللوني المتغاير.



أمثلة عن بعض المنتجات البروتينية العلاجية المشتقّة من البلازما

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

أحبائي.....إن الجدول غير مطلوب للحفظ وإنما هو فقط يوضح عدد الشركات المنتجة لهذا الأدوية.

أولاً Buminate

لشركة Baxter

- هو عبارة عن ألبومين، ويوجد العديد من الشركات الأُخرى المصنعة للألبومين.
- يتم تحضيره بالترسيب بطريقة كون (الترسيب بالبرودة) Cohn Cryoprecipitation.

- يوجد منه نوعان:

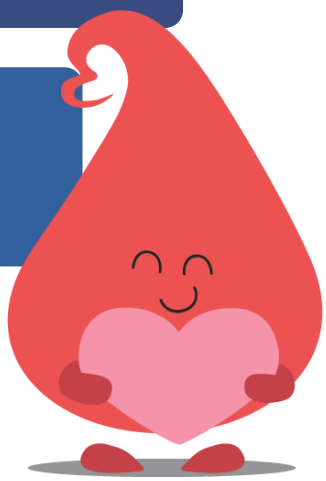
1. Buminate 5% Albumin (human), USP:

محلول بتركيز 5٪ يستخدم لمعالجة:

قبل أو خلال عمليات القلب المفتوح والمجازات القلبية الرئوية cardiopulmonary bypass surgery (أو العمليات الجراحية بشكل عام).

انخفاض حجم الدم Hypovolemia.

انخفاض تركيز الألبومين Hypoalbuminemia الناتج عن عدة أسباب أهمها الحروق.



2. Buminate 25% Albumin (human):

محلول بتركيز 25٪ يستخدم لمعالجة:

- **انخفاض حجم الدم** Hypovolemia.
- **انخفاض تركيز الألبومين** Hypoalbuminemia **الناتج عن عدة أسباب أهمها الحروق**
- **متلازمة الشدة التنفسية عند البالغين** Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS).
- **في الكلاء** nephrosis **(حيث يحدث خسارة كمية كبيرة من البروتينات عن طريق الكلية)، وفي أمراض القلب.**
- **قبل أو خلال عمليات القلب المفتوح والمجازات القلبية الرئوية** cardiopulmonary bypass surgery.
- **في حالة انحلال الدم الولادي** hemolytic disease of the newborn (HDN).

ثانياً Carimune NF:

لشركة CSL Behring هو عبارة عن غلوبولين مناعي Immune Globulin (human).

يُحضر باستخدام الاستشراب اللوني chromatography والمراشح النانوية[10] Nano Filtration (NF)[11].

يستخدم الـ Carimune NF في معالجة :

1. العوز المناعي الأولي Primary Immune Deficiencies (PID) مثل:

- Common variable immunodeficiency (عوز خلقي).
- X-linked agammaglobulinemia (مرض وراثي مرتبط بالجنس)
- Severe combined immunodeficiency[12] SCID.
- أمراض نقص المناعة، كما قد يستخدم لمرضى الإيدز.

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.

مُفضل للمستحضرات العضليّة من الغلوبولينات المناعية لعلاج المرضى المحتاجين لزيادة سريعة وكبيرة في مستويات الغلوبولينات المناعية الوعائية.

[10] مراشح ذات مسام أبعاد أقطارها من رتبة النانومتر وتكون قادرة على احتجاز البروتينات، وهذه المراشح غالية جداً.
[11] فلترة للبروتينات بعد الحصول عليه، حيث نقوم بتجميعه بمراشح نانويّة بدلاً من ترسيبه وجمعه.
12 ليس لديهم خلايا تائيّة أو بائية، أي ليس لديهم أضداد أبداً، لذلك عند العلاج نحقنهم بالأضداد.

الجدول *للاطلاع فقط* لكن نلاحظ فيه أن الغلوبولينات لا تحضر بطريقة واحدة، فمثلاً طريقة كون لا نحصل بها على غلوبولين نقي لذلك تشارك أكثر من طريقة في التحضير، أما الألبومين تكفي طريقة كون لوحدها في التحضير.

كما نلاحظ أن السعر عند وجود Affinity chromatography سيكون مكلفاً للغاية.

Brand	Carimune NF	Flebogamma 5% DIF	Gammagard S/D
Manufacturer	CSL Behring	Grifols	Baxter
Viral Inactivation/ Removal	Kistler Nitschmann fractionation, pH 4 treatment, trace pepsin, nanofiltration	Cold alcohol fractionation, pasteurization, solvent detergent treatment, nanofiltration, fraction precipitation, PEG precipitation, pH4 treatment	Cohn-Oncley fractionation, ultra-filtration, ion exchange chromatography, solvent/ detergent treatment
Dosage Form	Lyophilized	5% Liquid	Lyophilized
IgG (%)	≥96	≥97	≥90
Indications	PID, ITP	PID	PID, ITP, CLL, Kawasaki Syndrome
Shelf Life and Storage (intact vials)	36 months Room Temperature	24 months Room Temperature	24 months Room Temperature
Price	6 g $492	10 g $382	

ثالثاً Optivate

من شركة Bio Product Laboratories (BPL).

وهو عبارة عن Human Factor VIII and Von Willebrand Factor (VWF)، حيث

يقوم عامل فون ويلبراند بحماية العامل الثامن وإطالة العمر النصفي (تثبيت العامل الثامن).

- **يتم تحضيره بالاستشراب بالإلفة** Affinity Chromatography.

Treatment and prophylaxis of bleeding in patients with haemophilia A (congenital factor VIII deficiency).

- **يستخدم للعلاج والوقاية من النزيف عند مرضى الناعور A** (hemophilia A)، **الذين يعانون من نقص العامل الثامن** VIII.

يتوفر البطل Optivate بشكل مسحوق ومحل لتحضير محلول حقني حاوي على IU (250, 500, 1000) من عامل التخثر الثامن في الفيال.

مساوئ البروتينات المشتقة من البلازما:

1. لا تتوفر المصادر الطبيعية بشكل كبير (صعوبة تامين كميات كبيرة من البلازما والدم).
2. من الصعب أن تحقق اكتفاء حاجة السوق.
3. طريقة الاستخلاص صعبة ومتطلبة (لايمكن استخلاص أي بروتين)
4. يمكن أن يؤدي إلى تفاعلات مناعية (لأنها قد تحوي على شوائب تحرض المناعة).
5. يمكن أن تحتوي مستحضراتها جراثيم وفيروسات ممرضة (لذلك أصلح هناك مراشح نوعية للجراثيم والفيروسات).

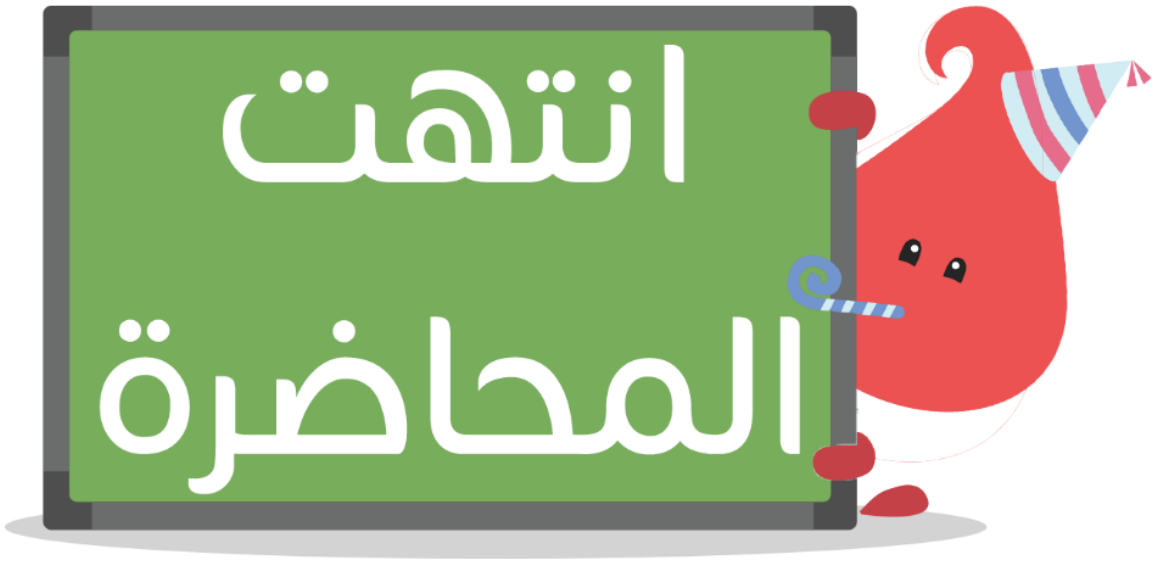
لهذا كلّه، يبرز دور البروتينات المحضَّرة بطريقة الدنا المأشوب DNA recombination **كبديل مهم وناجع للبروتينات المستخلصة من البلازما.**

وهذا ما سنتحدث عنه في المحاضرة القادمة.

أعزائي....الآن نترككم مع فقرة الكريات البيضاء لبلعمة الأخطاء :

المحاضرة	الصفحة	السطر	الخطأ	الصواب
2	4	-		مشار للصورة الثالثة بأسماء الأنزيمات، بس حطو فواصل بيناتهن..يعني بصيرو هيك Luciferase, amylase, reverse transcriptase
	15	6 من الأسفل	حيز الـX-ray لا يتجاوز (1-1.2)	ميز الـX-ray لا يتجاوز الـ (1.2).
	15	4 من الأسفل	حيز	ميز
3	3	12	—	((مهم))الاسم التجاري للـzanamivir هو Relenza®
	3	4 من الأسفل	—	يتمّ ارتباط الفيروس بالمستقبلات بروتين Haemagglutinin
	4	1	دراسة بنية الـSialic acid	دراسة بنية الـ Neuroamidinas (NA) حيث تمت دراسة بنيته الثالثيّة، وانطلقت الدراسة بدءاً من ركازته وهي حمض السياليك

				من خلال Structure Activity Relationship ((علاقة البنية بالتأثير))
	4	2	يحتوي السياليك أسيد	يحتوي النيوروأميديناز
	4	3	اشطبوا السطر كلو	يصبح كالتالي: بعد دراسة بنية النيوروأميديناز تم التوصل لمركبات قادرة على منافسته للارتباط مع السياليك أسيد.
	45	2 من الأسفل	تفرو	تفرز
	46	المستطيل الكبير بالسمارت أرت	كما أن *البروتينات* من الصعب عليها...	البكتيريا
	47	3 من الأسفل	زات	زادت
	60	الأخير	البائية	التائية
	62	المستطيل الأخير	غالباً ماتُحثّن	*تُحقّن*
4	5	7 من الأسفل	التائية	البائية



أضف ملاحظاتك :

لإرسال ملاحظاتكم:
goo.gl/forms/Hl8slZEmLSZvySq92

لتحميل محاضراتنا:
www.Rbcsteam.org/lectures

للاستفسار عن هذه المحاضرة على غروب الفريق على الفيس بوك:
RBCs Pharmacy 2019 www.facebook.com/groups/rbcs2019