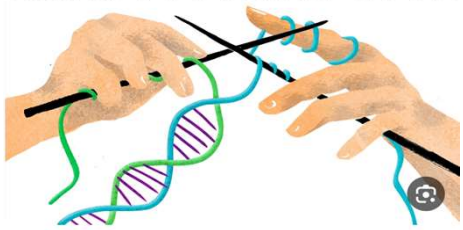
جامعة حماة
كلية الصيدلة
السنة الخامسة

البروتينات المأشوبة عالية القيمة

Recombinant Proteins of High Value



المحاضرة الثانية
الدكتورة ظلال محمد قطان

استعمالات البروتينات عالية القيمة

تعتبر البروتينات المستخدمة في تقانة الأنزيمات الصناعية غير متقنة الصنع، وعادة ما تكون في خلائط مع أنزيمات مختلفة. مثال: أنزيمات البروتياز التي تدخل في المنظفات، وأنزيمات المستعملة في الصناعات الغذائية.

بالمقابل، هناك عدد من الاستعمالات التجارية التي تحتاج إلى بروتينات عالية النقاوة وتكون بذات الوقت عالية القيمة من أمثلتها:

1- الأنزيمات التحليلية ومضادات الحيوية: المستخدمة في وسائل التشخيص الطبية، وتحليل الطعام، بالإضافة إلى التحليل الكيميائي الحيوي والبيولوجي الجزيئي.

2- الأنزيمات المستخدمة كأدوات في تقانة الهندسة الوراثية: أصبحت تقانة الجينات متاحة من خلال توفر أنزيمات عالية النقاوة تضم أنزيمات النيوكلياز الداخلية والخارجية، وأنزيمات البوليميراز الـ DNA و الـ RNA، الأنزيمات المعدلة.

و تستخدم أيضا أنزيمات الغلايكوهيدرولاز (أنزيم تحلل السكر) وترانسفراز الغلايكوزيل (ناقل الغلايكوزيل) بشكل متزايد في التقانة الحيوية الغليكوجينية و ذلك بغرض إجراء تعديلات على الأجزاء السكرية من البروتينات السكرية (Glycoproteins).

3- البروتينات العلاجية: تُستخدم عوامل النمو والمضادات الحيوية والأنزيمات بوصفها مكونات الدواء الفعالة لعلاج الأمراض.

إضافة إلى ذلك، هناك حاجة إلى البروتينات المرتبطة بيولوجياً، بآليات تطور الأمراض من أجل استخدامها كأهداف للبحث عن ربائط Ligand (ربائط تشاركية Agonists أو تضادية Antagonists) أو مثبطات.

و أيضاً من أجل تحليل بنيتها بواسطة الأشعة السينية أو الرنين المغناطيسي NMR(Nuclear Magnetic Resonance)

الأنزيمات التحليلية

الأنزيمات هي جزيئات عالية النوعية سواء في نوع التفاعل الذي تتولى تحفيزه أو في اختيار المادة الأولية.

لذلك لها أهمية كبيرة في اختبارات التحليل وخاصة في المجال الطبي والتحليل الغذائي. مثلا:

- **ممكن للمتفاعلات إذا كانت مواد أولية أن تتحول كيميائياً في وجود الأنزيمات.**
- **أو تعدل من الفعالية الأنزيمية بطريقة ترتبط بتركيزها في حال تعمل كمفعّلات أو مثبطات.**
- **و تقوم الأنزيمات بدور واسمات أيضاً في التفاعلات غير الأنزيمية**

مثل: - تفاعل الارتباط بين الجسم المضاد و المستضد.

- التهجين بين DNA و قليلات النيوكليوتيد.

يبين الجدول التالي في الأسفل الأنزيمات الهامة في الكواشف التشخيصية:

الأنزيم	المصدر (الأصل)	يستخدم لمعايرة
أوكسيداز البيروفات Pyruvate oxidase	*Pedicoccu sp.*	البيروفات؛ فعالية أنزيم الترانس أميناز
أوكسيداز السركوسين	*Pseudomonas sp., Bacillus sp*	الكرياتينين
أوكسيداز اليورات (Uricase)	*Arthrobacter protophormea*	حمض اليوريك
اليورياز (Urease)	*Klebsiella aerogenes*	اليوريا

الأنزيم	المصدر (الأصل)	يستخدم لمعايرة
أوكسيداز الكوليستيرول Cholesterol oxidase	*Nocardia erythropolis or Brevibacterium sp.*	الكوليستيرول
الكرياتيناز Creatinase	*Pseudomonas sp.*	الكرياتين، الكرياتينين
الكرياتينيناز Creatininase	*Pseudomonas sp.*	الكرياتينين
بيتا- غلاكتوزيداز β- glactosidase	بكتيريا الإشريكية القولونية *Escherichia coli*	أيونات الصوديوم، أنزيمات واسمة للمعايرات المناعية
أوكسيداز الغلوكوز Glucose oxidase	فطر العفن الأسود *Aspergillus niger*	الغلوكوز
ديهايدروجيناز الغلوكوز 6- فوسفات Glucose 6- phosphate dehydroginase	*Leuconostoc mesenteroides*	الغلوكوز (أنزيم مؤشر)
ألفا-غلوكوزيداز α-glucosidase	الخميرة أو أنواع بكتيريا *Bacillus*	فعالية أنزيم ألفا-أميلاز
أوكسيداز الغليسيرول فوسفات-3 Glycerol-3-phosphate oxidase	*Aerococcus, viridans*.	الغليسيريدات الثلاثية
الهيكزوكاياز Hexokinase	الخميرة *yeast*	الغلوكوز والسكريات السداسية الأخرى
البيروكسيداز (Peroxidase)	الجرجار[9] *horseradish*	أنزيم مؤشر وأنزيم واسم يستخدم في المعايرات المناعية

لقد أصبح ممكناً من خلال تقانة الـ DNA المأشوب (Recombinant) تنسيل أي جين ذي أهمية، بالإضافة للتلاعب بخلايا البكتريا أو الحشرات أو الفطريات أو الثدييات بغية الإفراط في إنتاج البروتين المرغوب.

لقد بينت الأبحاث والدراسات أنه تم التعبير عن العديد من الأنزيمات داخل الكائنات المجهرية المأشوبة بمستويات أعلى بـ 10 إلى 100 مرة من مستوى تعبيرها في خلايا العائل الطبيعي، مما أفسح المجال في تحقيق اقتصاديات أفضل لإنتاج الأنزيمات، بالإضافة إلى تخفيضات هامة في الأعباء البيئية.

حيث تم تحسين خصائص الأنزيمات المرتبطة بالاستعمالات التحليلية، مثل ثباتيتها تحت شروط المعايرة المستخدمة، أو الرقم الهيدروجيني الأمثل.

البروتينات العلاجية

تشكل البروتينات جزءاً من الأدوية التقليدية العديدة، كسُم الأفعى وسُم النحل والمستحضرات الأنزيمية، لكن في معظم الحالات تكون محتويات هذه الخلائط غير محددة. و لقد استخدم منذ زمن طويل البروتينات الطبيعية المأخوذة من الحيوانات أو النباتات أو الكائنات المجهرية أو كذلك من جسم الإنسان (من الدم، أو البول، أو المشيمة، أو الفص الأمامي للغدة النخامية) كمركبات دوائية. أمثلة على ذلك: الأنسولين المستخلص من الخنزير، عوامل تخثر الدم VIII و IX المأخوذة من دم الإنسان بعد فصل مكوناته،والبنكرياتين المساعد للهضم، وأنزيمات البروتييز: أنكرود و باتروكسوبين المأخوذين من سم الأفعى.

لكن....

- البروتينات الغريبة تعتبر مُستمنعات و التي بدورها تثير الاستجابة المناعية لدى الإنسان، مما قد يؤدي إلى تعطيل سريع لهذه البروتينات.
- أيضاً عزل البروتينات العلاجية من سوائل وأنسجة جسم الإنسان والحيوان يشكل خطراً لاحتمال التلوث الفيروسي وأمراض خطيرة أخرى.
- بالإضافة إلى أن تركيز البروتينات الفعالة وظيفيا في سوائل جسم الإنسان وأعضائه منخفض جداً، مما يحتم معالجة كمية كبيرة من المادة للحصول على كمية قليلة من المنتج الفعال.
- وكذلك التصنيع الكيميائي للبروتينات الذي من الممكن عمله، لكنه غير قابل للتطبيق اقتصادياً لإنتاج الأدوية البروتينية.

الخلاصة.....

لم يصبح بالإمكان إنتاج البروتينات البشرية بكميات كبيرة ونقاوة عالية إلا من خلال تكنولوجيا الجينات.

عن طريق تصنيع البروتينات المأشوبة، حالياً يُستخدم أكثر من 100 بروتين مأشوب في العلاج (انظر الجدول التاي الذي يوضح مجموعة مختارة من الأدوية البروتينية المأشوبة).

في حين مازال أكثر من 500 بروتين آخر مازالوا في مراحل تطوير مختلفة.

السيتوكينات ومضاداتها	الهرمونات والببتيدات	عوامل التخثر والمثبطات	الأنزيمات	اللقاحات	بروتنيات الاندماج
الإنترفيرون ألفا-a2	الإنسولين	إيبتاكوغ ألفا (Eptacog alpha)	التيبلاز -t) PA)	لقاح التهاب الكبد	**دينليوكين ديفتيتوكس** (Denileukin diftitox)
الإنترفيرون ألفا-b2	**إنسولين ليسبرو**	**عامل مضاد الناعور**	**ريتابلاز (ميوتين-t) PA**	لقاح داء لايم[c]	**إيتانيرسيبت** (Etanercept)
إنترفيرون ألفاكون-1	**أسبارت الإنسولين**	**موروكتوكوغ ألفا (FVIII- ميوتين)**	**تينيكتيبلاز (ميوتين-t) PA**	لقاح الدفتيريا/الكزاز / السعال الديكي	**أليفاسيبت** (Alfacept)
بيك إنترفيرون ألفا-a2	**إنسولين غلارجين**	نوناكوغ ألفا	**مونتيبلاس (ميوتين-t) PA**	لقاح الفيروسة العجلية[d]	
بيك إنترفيرون ألفا-b2	إيبويتين-ألفا	ديزيرودين	دورناز -ألفا (RNase)		
إنترفيرون بيتا- aI	إيبويتين-بيتا	**ليبيرودين**	**إميغلوسيراز**		
إنترفيرون بيتا- bI	إيبويتين-دلتا	دروتريكوجين -ألفا (مع تفعيل بروتين C)	أغالسيداز ألفا		

من بين الأدوية الأكثر نجاحاً والتي تُصنف ضمن أفضل 20 دواء على قائمة مبيعات المستحضرات الدوائية عالمياً:

بروتينات الإريثروبيوتين (EPO) (Erythropoietin) والأنسولين والسوماتروبين (Somatotropin) (هرمون النمو عند الإنسان) والعامل المحفز لتشكل الكريات البيض الحبيبية

(G-CSF) Stimulating Factor Granulocyte-Colony

والأنترفيرون – ألفا (α-Interferon) وعدد من الأجسام المضادة وحيدة النسيلة.

و لا تزال السوق العالمية للمستحضرات الدوائية القائمة على تكنولوجيا الجينات مستمرة في النمو، وبوتيرة سريعة.

<u>اختيار نظام التعبير Choise of expression system:</u>

البكتريا، والخميرة، وخلايا الحشرات والثدييات هي أكثر المضيفات استخداماً للتعبير عن البروتينات المختلفة الأصل.

سنقدم نظرة عامة ومختصرة حول ميزات ومساوئ الأنظمة المضيفة، وبشكل خاص حول تلك الأنظمة المستخدمة للتعبير عن البروتينات العلاجية.

<u>أولا- خلايا الثدييات Mammalian Cells:</u>

أول إثبات لإمكانية زرع خلايا الثدييات في الزجاج *In Vitro* كان عام 1949م عندما بيَّن أنديرز (J.F.Enders) أنه بالإمكان إنتاج الفيروس (Polio virus) المسبب لشلل الأطفال من خلايا الرئيسيات العصبية ونسيج الكلية.

في خمسينيات القرن الماضي أُنتجت مخبرياً لقاحات ضد فيروس الشلل من مزارع خلايا الكلية والخصية لدى القرد. فيما بعد وبشكل مباشر تم إنتاج لقاحات فيروسية أخرى منها: لقاح أبو كعب عام 1952، ولقاح الحصبة عام 1958، ولقاح فيروس الحمَّر الغديّة عام 1958، التي أُنتجت جميعها بواسطة مزارع خلوية لأنواع حيوانات شتى.

مزارع الثدييات الخلوية نشأت بشكل حقيقي في السبعينيات من القرن الماضي مع تطوير خطوط الخلايا الورمية الهجينة (Hybridoma) واكتشاف تقانات Recombinant DNA.

الخط الخلوي: هو مجتمع من الخلايا المتماثلة جينياً (كلونات Clones) المتَّحدرة من خلية أصل واحدة.

تستخدم أيضاً المزارع الثديية الخلوية في الاختبارات الدوائية، وفي أبحاث السُميّة، وتصنيع أنسجة الجلد، والغضاريف في الزجاج لأغراض جراحية.

عندما تُعزل خلايا محددة من إنسان أو حيوان ما وتوضع تحت شروط زرع مناسبة، فإن بعض خطوط هذه الخلايا سينقسم، وقسماً آخر سيحافظ على حيويته بدون انقسام، والقليل سيموت في الحال.

أكثر الخلايا الثديية الملائمة للنمو في مزارع خلوية نقية هي الخلايا التي تستمر في النموالانقسام داخل الكائن الأصل مثل الخلايا الظهارية Epithelial والخلايا الورمية النخاعية Myeloma، وخلايا الأورمات الليفية Fibroblast.

في عام 1975 أحدثت عزل الأجسام المضادة وحيدة النسيلة من الفأر (mAbs) من قبل العالمان كوهلر وميليستاين ثورة في استخدام خلايا الثدييات في التقانة الحيوية.

عن طريق: دمج لمفاويات بائية (B-lymphocytes) مُمَنَّعة (هي خلايا دم بيضاء تفرز أجسام مضادة من الفئران) مع خلايا ورمية نخاعية (خلايا النخاع العظمي السرطانية)، وذلك لابتكار أول خلية ورمية هجينة Hybridoma. وبهذا الانجاز العلمي استطاعوا الجمع بين مقدرة اللمفاويات البائية على إنتاج جسم مضاد نوعي ومقدرة النمو غير المحدودة للخلايا الورمية النخاعية في كينونة واحدة.

من ميزات الخلايا الهجينة التي تم الحصول عليها بهذه التقنية:

1- لديها القدرة على النمو والانقسام بشكل مستمر شريطة توفر شروط النمو الصحيحة.

2- قلة اعتمادها على عوامل النمو، وزيادة في معدلات نموها.

3- سهولة زراعتها حتى بوجود تقلبات في البيئة المجهرية التي تنمو فيها هذه الخلايا.

4- سمحت بإنتاج وأحياناً إفراز بروتينات فعالة حيوياً تحمل التعديلات الصحيحة في مرحلة ما بعد الترجمة، وبشكل خاص إضافة الغليكوزيل.

الميزة السلبية: امتلاك مثل هذه الخلايا لمعدلات أيض مرتفعة هذا يؤدي إلى ازدياد مصاحب في تشكل المنتجات الثانوية المثبطة.

لكن.....

قيمة تلك الأجسام المضادة وحيدة النسيلة كمركبات علاجية للإنسان كانت محدودة في البداية، وذلك بسبب فقد فعاليتها سريعاً بفعل الجهاز المناعي عند الإنسان، وبسبب رد الفعل التحسسي لهذه الأجسام من قبل المرضى.

- عام 1986 قدّم وينتر وزملائه تقنيات "لأنسنة" الأجسام المضادة الفأرية بحيث أصبحت تشابه الأجسام المضادة لدى الإنسان مما زاد من ملائمة وفعالية استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة المنتجة اصطناعياً كدواء للإنسان.

ثانياً- خلايا الإنسان Human cells:

إحدى الطرق التي تضمن تطابق هوية البروتين المنتج بالتأشيب مع بروتين الإنسان الأصلي هي استخدام خطوط خلوية من الإنسان كنظام تعبير جيني، وبدلاً من كلونة الجين أو تسلسل الـ DNA الذي يُشفر للبروتين المنشود داخل خلية المضيف، حيث يمكن التلاعب بمحضض الجين بدلاً من الجين نفسه. وذلك من أجل تفعيل التعبير عن جين الإنسان الموجود في الخلية أساساً.

في النهاية يمكن أن تغدو تكنولوجيا تفعيل الجين طريقة ذات ميزات تجارية من أجل إنتاج البروتينات العلاجية.

ثالثاً- خلايا الحشرات Insect cells:

من الممكن إدخال الجين المُشفر لبروتين مأشوب داخل جينوم الفيروس العَصَوي (Baculovirus)، الذي يصيب خلايا الحشرات بفعالية عالية ويستخدم آلية تصنيع البروتين لديها، من أجل إنتاج كميات كبيرة من البروتين.

يعتبر هذا النظام مناسباً جداً للحصول على كميات صغيرة من البروتين وبشكل سريع أجل استخدامها في دراسات قبل سريرية.

لكن بسبب اختلاف نظام معالجات ما بعد الترجمة في هذه الخلايا عمّا عند الثدييات، فإن هذا النظام غير مناسب لإنتاج كميات كبيرة من البروتينات.

رابعا- الخميرة Yeast:

الخميرة والفطور الأخرى هي كائنات مجهرية حقيقية النوى، يتم زرعها بشكل روتيني على مستوى ضخم.

عادة ما تكون البروتينات المأشوبة موجودة داخل خلية الخميرة، غير أنه يمكن أيضاً إضافة سلسلة مرشد (Leader) من أجل الحث على إفراز البروتين.

حالياً يوجد في السوق بروتين علاجي وحيد (الأنسولين) الذي يمكن إنتاجه بالخميرة.

خامساً- البكتريا Bacteria:

تقدم أنظمة المضيف البكتيري ميزات أساسية تضم التطور السريع، والفعالية العالية، والإنتاج المنخفض الثمن نسبياً، يمكن أن تتراكم البروتينات المأشوبة المنتجة داخل الخلايا، أو تفرز إما في المحيط البلازمي المجاور (بكتريا *E.Coli*) أو في وسط التخمير (أنواع بكتريا *Bacillus*). ولكن معالجات ما بعد الترجمة التي تحصل على بروتينات حقيقيات النوى المعقدة، مثل عمليات الارتباط بالغليكوزيل وتشكل رابطة ثنائية الكبريت، لا تحصل داخل الخلية البكتيرية. كذلك يمكن أن تختلف النهاية الأمينية للبروتينات التي يجري التعبير عنها داخل الخلية البكتيرية عن الشكل الطبيعي لها بحيث أنها يمكن أن تضم ثمالة فورميل ميثايونين.