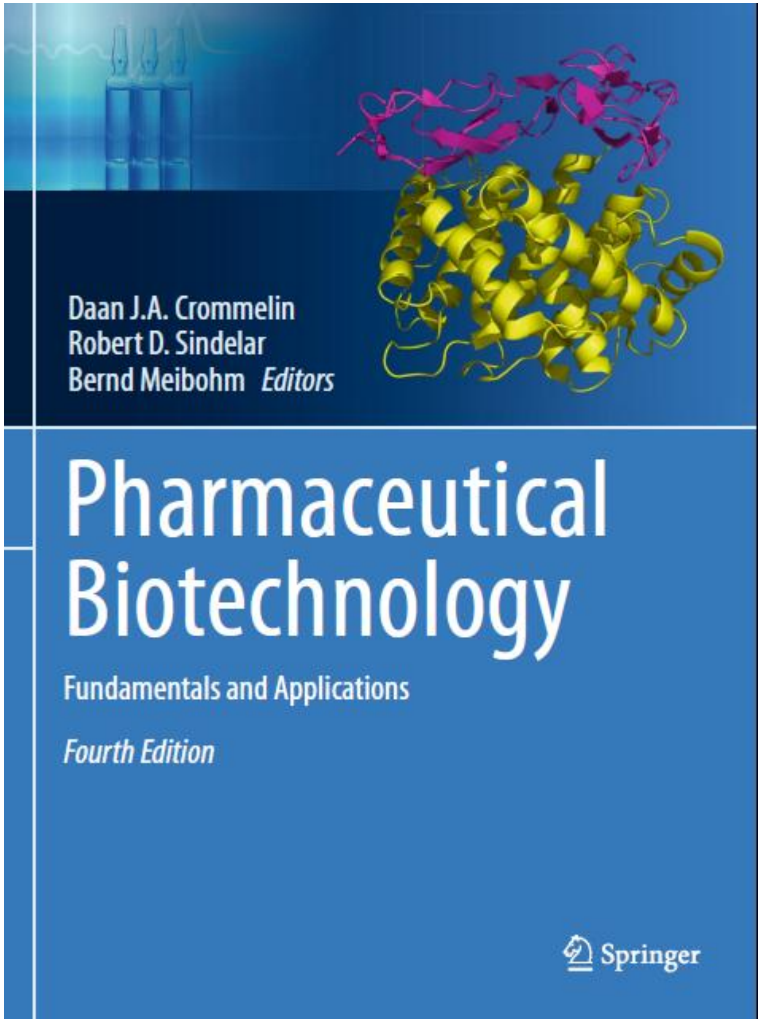
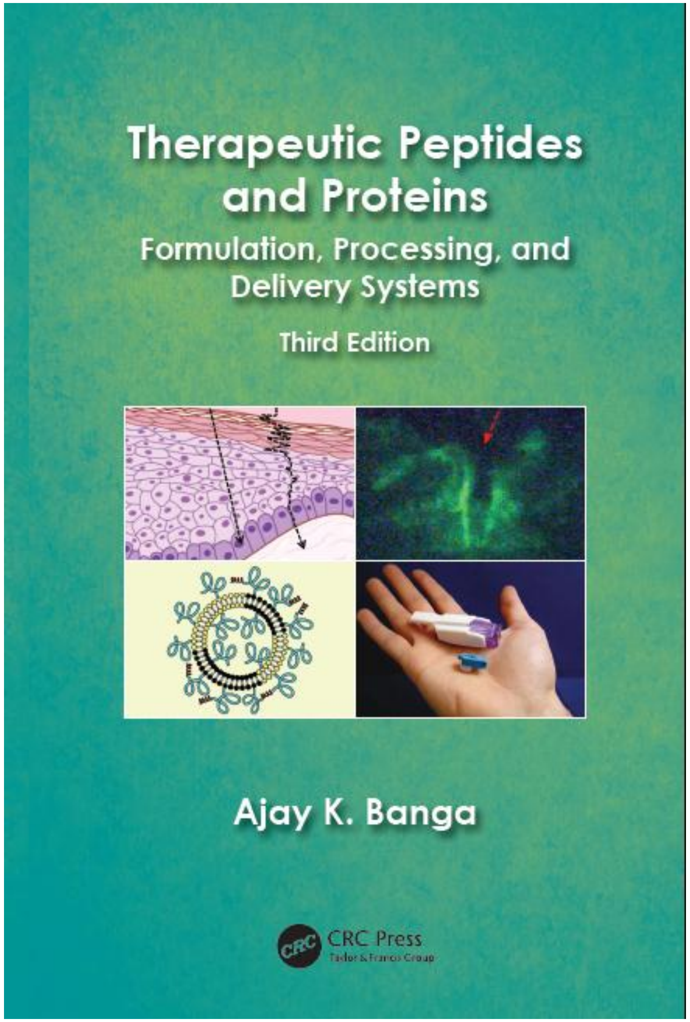
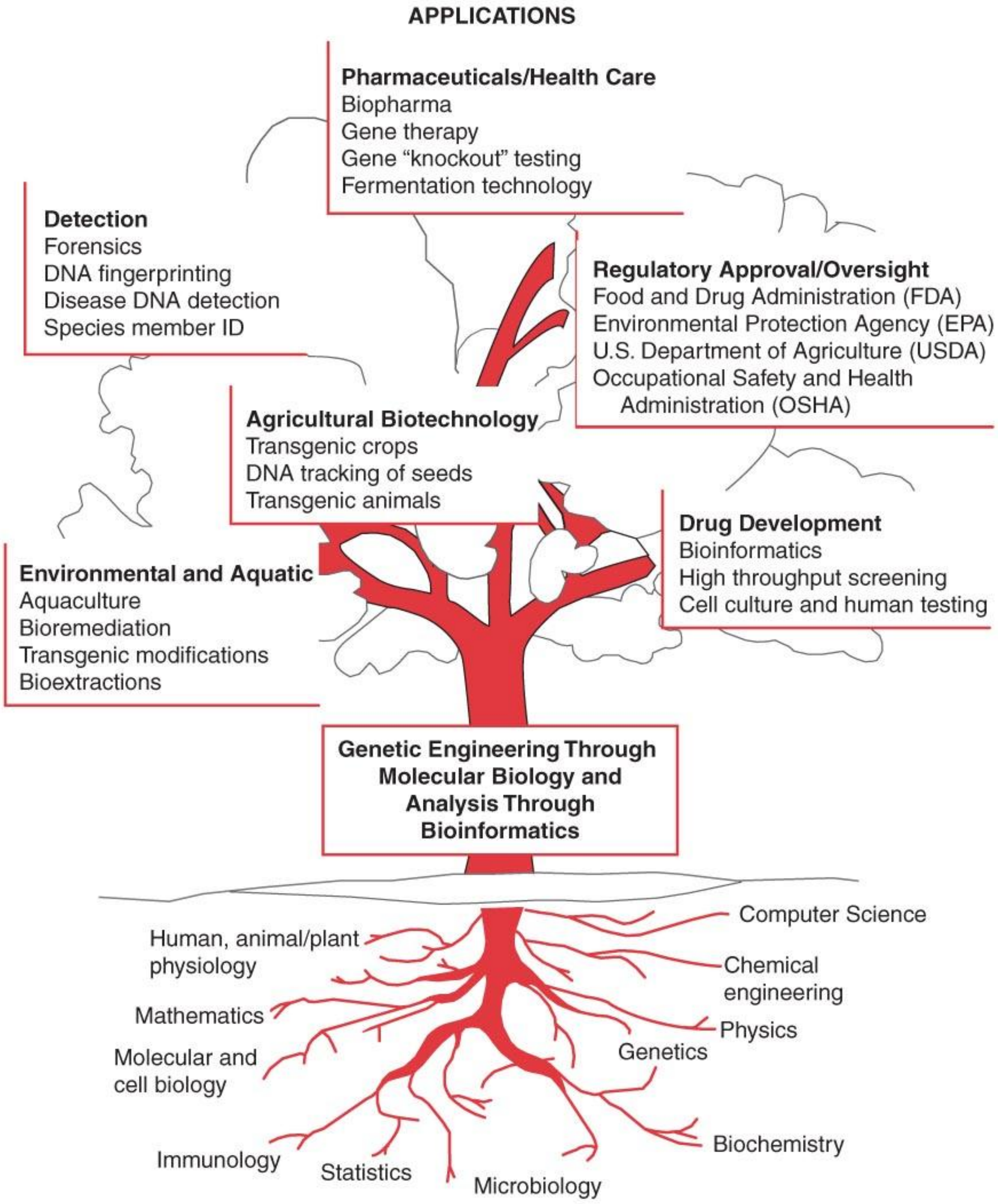
التقانة الحيوية الصيدلانية و(البروتينات الصيدلانية)
PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY & PHARMACEUTICAL PROTEINS

التقانة الحيوية: هي أي طريقة أو تقانة تستخدم متعضّيات حيّة أو مواد من تلك المتعضّيات لتصنيع أو تعديل منتج ما أو كائن حي (حيوان أو نبات أو جراثيم ...)

References


Daan J.A. Crommelin
Robert D. Sindelar
Bernd Meibohm Editors
Pharmaceutical Biotechnology
Fundamentals and Applications
Fourth Edition
Springer


Therapeutic Peptides and Proteins
Formulation, Processing, and Delivery Systems
Third Edition
Ajay K. Banga
CRC Press



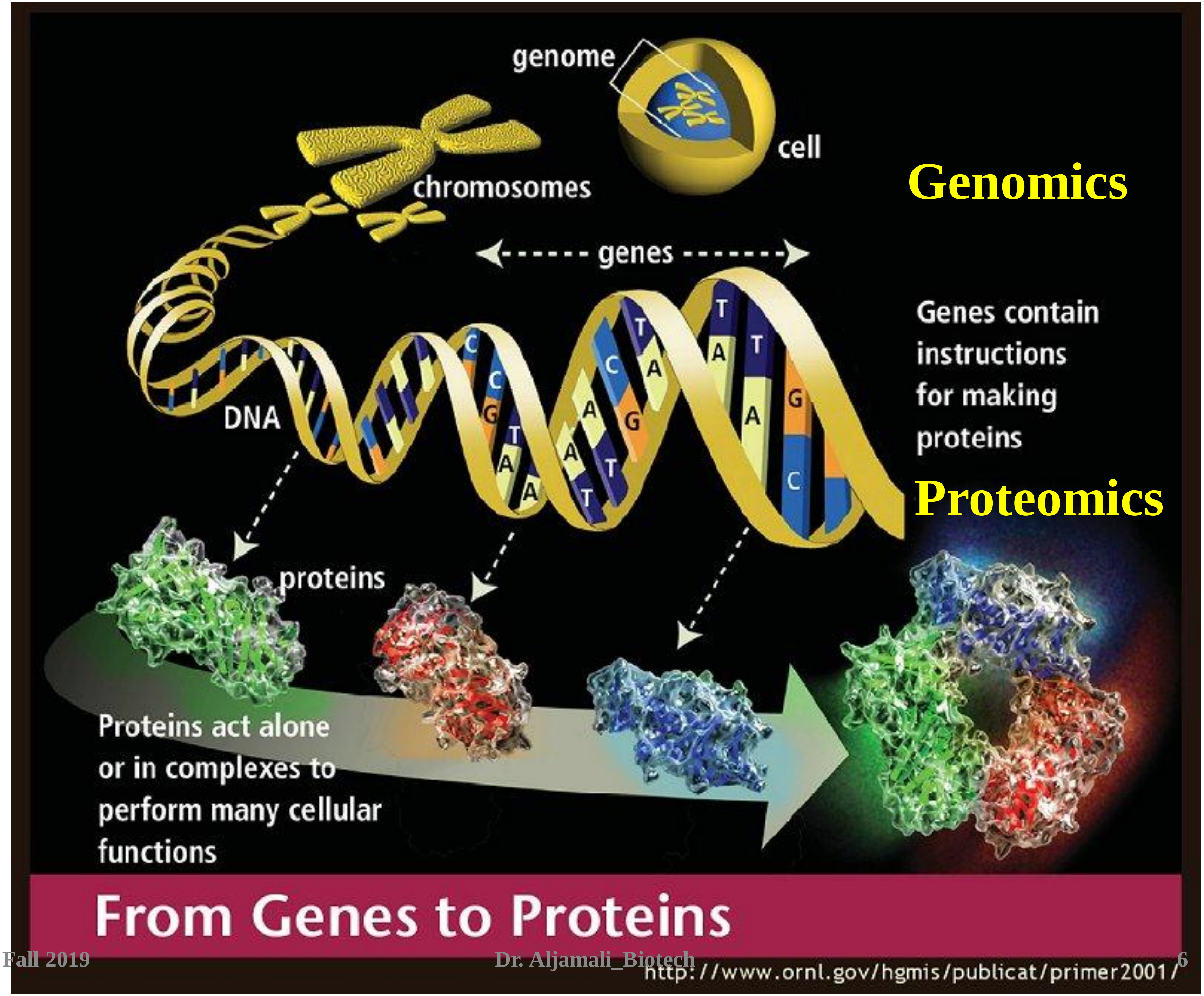
يستفيد علم التقانة الحيوية والهندسة الوراثية Genetic Engineering من العديد من العلوم الأخرى، ويُعدّ تطبيقاً مباشراً لبعضها.

لمحة تاريخية
ومضات مهمّة في تاريخ تطور التقانة الحيوية

- Pre- 1800: Early applications and speculation (fermentation)
- 1800-1900: significant advances in basic understanding of heredity
- 1900-1953: advancement in genetics
- 1953- 1976: DNA research, science explodes
- 1977- present: Modern biotechnology
  - 1977: Genentech, Inc., reports the production of the first human protein manufactured in a bacteria: the hormone somatostatin
  - 1978: recombinant insulin produced, Genentech, Inc, California, USA
  - 1980: patents for genetically engineered products started
  - 1982: first recombinant insulin marketed
  - 1982: possibility of changing proteins by site directed mutagenesis
  - 1983: Kary Mullis invented the PCR

لمحة تاريخية
ومضات مهمّة في تاريخ تطور التقانة الحيوية

- 1977- present: Modern biotechnology (continued)
  - 1985: genetic fingerprinting entered court rooms
  - 1985: genetically engineered plants were tested
  - 1986: FDA approved first recombinant hepatitis vaccine
  - 1988: first patent for genetically modified mouse
  - 1990: first gene therapy took place for ADA-deficient SCID children
  - 1990: Human Genome Project (HGP) was launched
  - 1997: sheep Dolly was cloned
  - 1998: first successful trial to grow embryonic stem cells
  - 1999: a rough draft for human genome map was produced showing that the genome contains about 30,000 genes
  - 2000-Present: developing numerous technologies for measuring structural and functional genomics


genome
cell
chromosomes
Genomics
genes
DNA
Genes contain instructions for making proteins
Proteomics
proteins
Proteins act alone or in complexes to perform many cellular functions
From Genes to Proteins
http://www.ornl.gov/hgmis/publicat/primer2001/

Omics era مقدّمة: مرحلة الأوميكس

- Ome (is the Latin for "entire")
- What is a genome?
  - The word genome describes the entire DNA sequence of an organism.
- Lots of terms followed the genome; proteome, transcriptosome, metobolome, interactome, etc.
  - **Transcriptosome**: the entire mRNA species in a cell (or groups of cells) or a tissue…
  - **Proteome**: the entire protein species in a cell (or groups of cells) or a tissue…
  - **Metabolome**: the entire metabolic pathways in a cell (or groups of cells) or a tissue…
  - **Interactome**: the entire events and reactions controlling the interaction between two organisms (such as a parasite and a host)

Human Genome Project مشروع المجين (الجينوم) البشري

- Initiated in 1990.
- HGP showed in 1999 that the 23 pairs of chromosomes forming human genome consists of 3.4 billion base pair (3 X 10^9 bp). Final draft published 2003.
- Estimated number of genes about 30,000.
- Only 2% of the human genome “codes”, meaning coding for mRNAs and proteins
- Average gene size 4000 base pairs
- Largest gene dystrophin 2.4 million base pairs
- More than 50% in repeat elements or so called “junk DNA”
- The DNA sequence of any two people is 99.9 percent identical.
- Sites in the DNA sequence where individuals differ at a single DNA base are called single nucleotide polymorphisms (SNPs).
- The SNPs may greatly affect an individual's disease risk

التقانة الحيوية الصيدلانية والبروتينات الحيوية الصيدلانية
PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY & BIOPHARMACEUTICAL PROTEINS

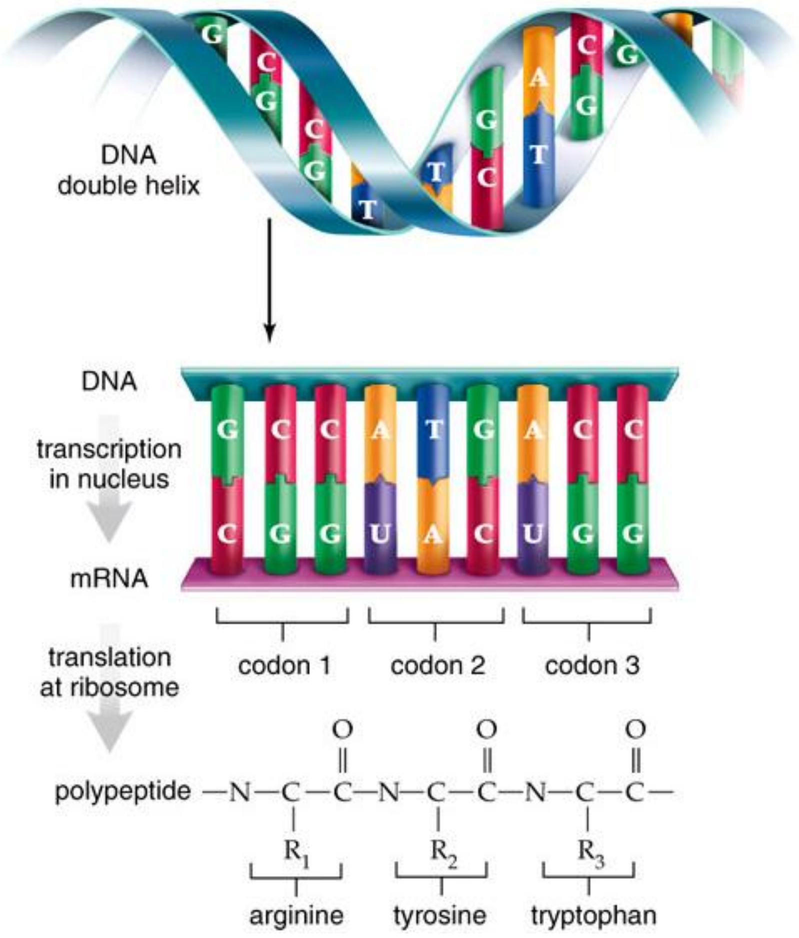
Protein Structure-based Studies

1. *Applications in Drug Design*
2. *Applications in Personalized Medicine*

في نهاية هذه المحاضرة ستكونون قادرين على:

1. استذكار البنى الأربع للبروتينات
2. فهم أسس توقّع البنية الثالثية للبروتينات باستخدام وسائل المعلوماتية الحيوية
3. الاطلاع على طرق قياس البنية الثالثية للبروتينات واستخدام بعض البرمجيات التي تختص بإظهار البنية الثالثية
4. الاطلاع على بعض الأمثلة التي تظهر تطبيقات دراسة بنية البروتينات وتأثير الاختلافات فيها على تأثير الأدوية

المسلّمة الأساسية لعلم البيولوجيا الجزيئية
Central Dogma for Molecular Biology



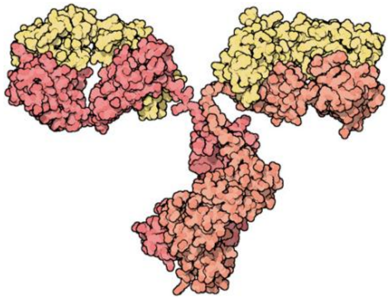
- تمكن معرفة تسلسل الحموض الأمينية لأي بروتين من خلال معرفة تسلسل الدنا DNA للمورثة المعبّرة عن البروتين أو تسلسل الرنا المرسال الناضج mature mRNA الناتج عن انتساخ المورثة

Functions of Proteins

Structural

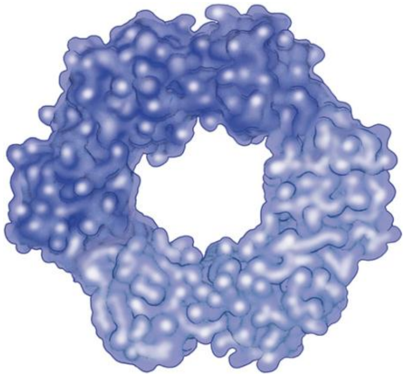
collagen

Immune



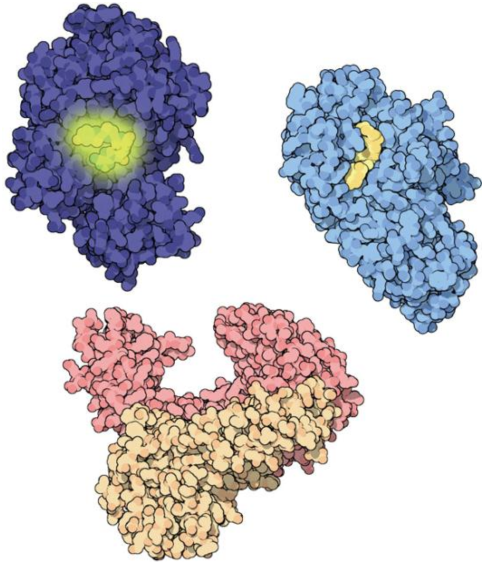
antibodies

DNA Regulation



DNA polymerase III

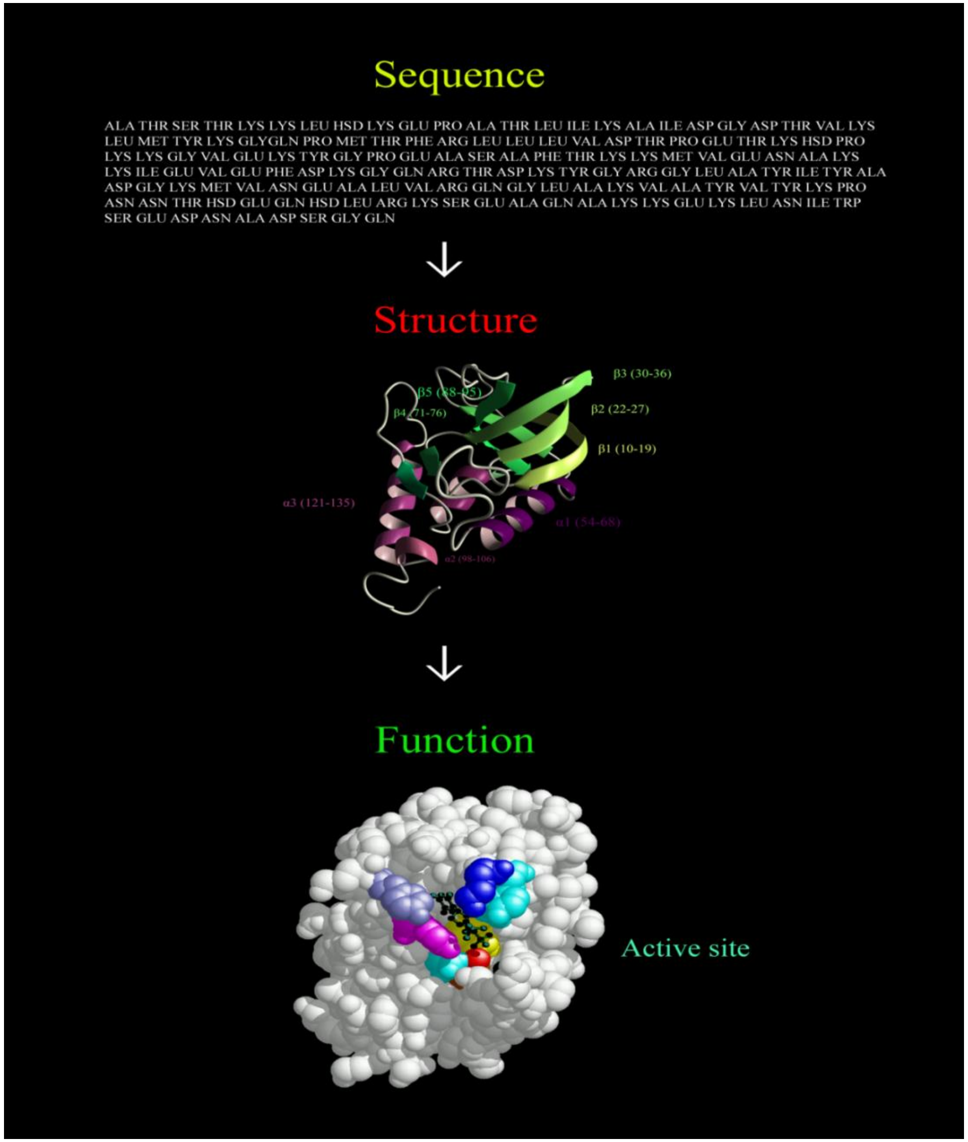
Enzymes



luciferase

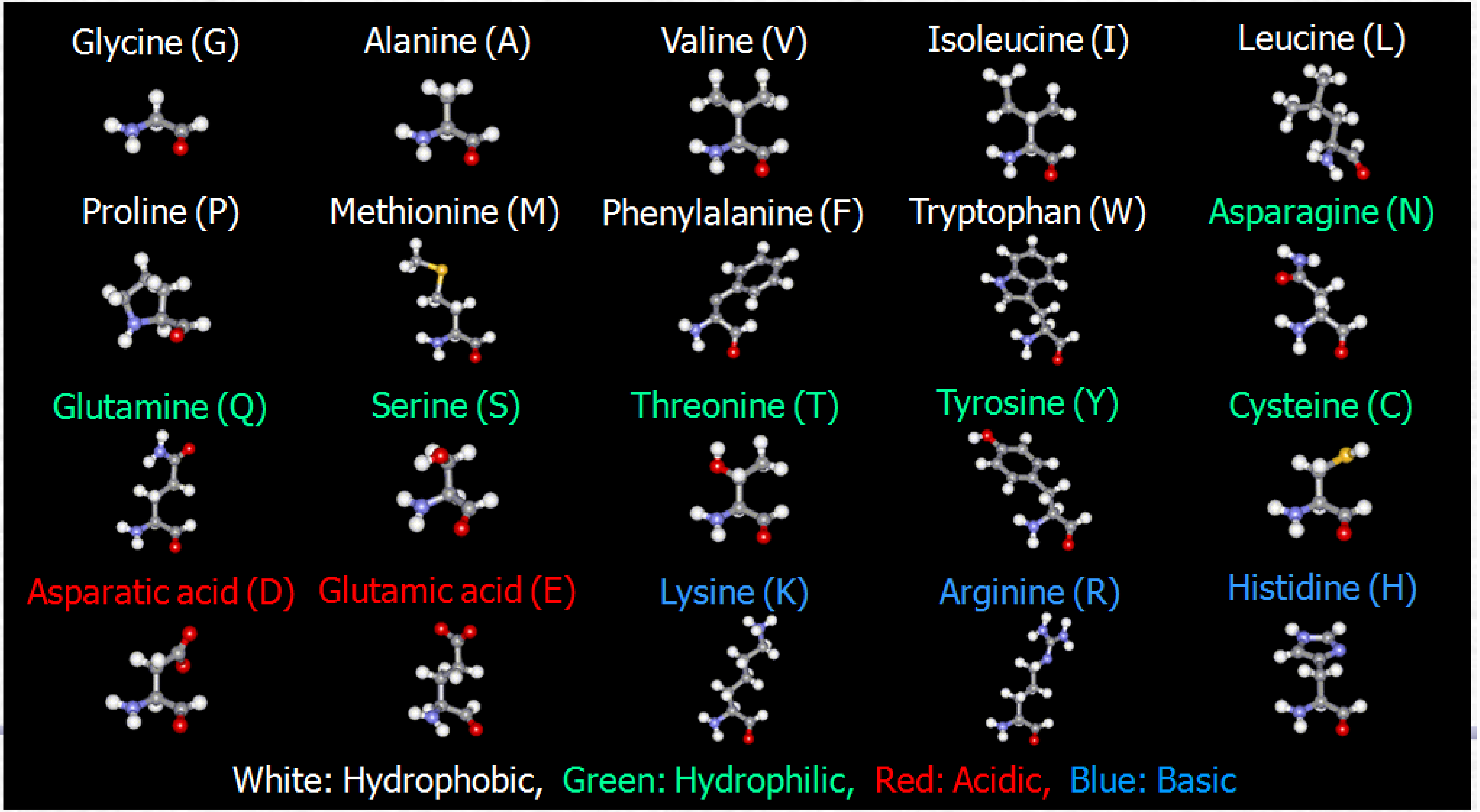
amylase

reverse transcriptase



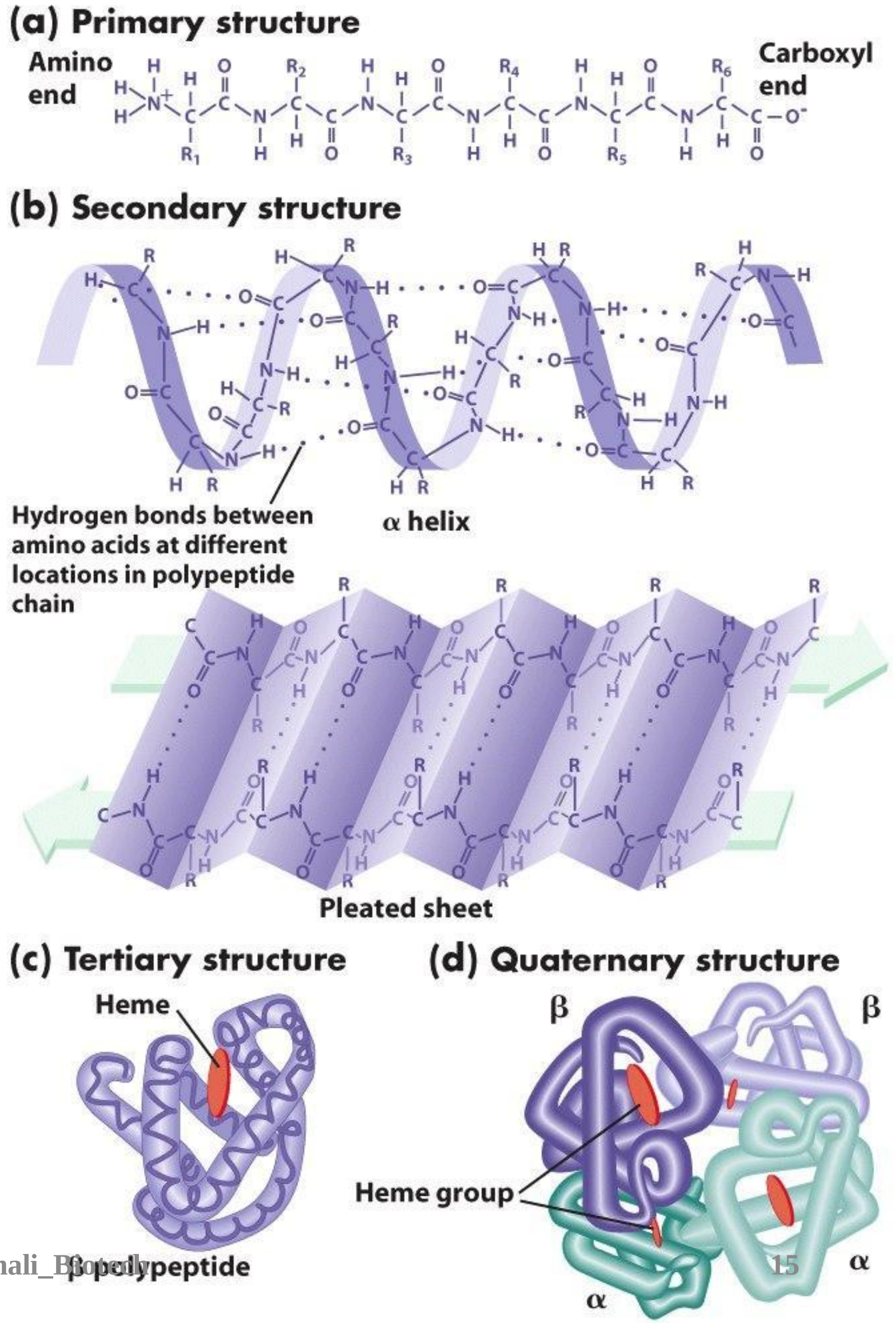
ترتبط وظيفة البروتينات بشكل وثيق مع البنية الفراغية التي يكرّسها تسلسل الحموض الأمينية للبروتين، وهو ما يعتمد عليه بشكل رئيسي حقل المعلوماتية الحيوية Bioinformatics حيث تمكن ملاحظة التشابه البنيوي بين بروتينات مختلفة واستنباط وظائف محتملة لبعضها، إضافة إلى اكتشاف الطفرات في البروتينات ودراسة مسار التطوّر للكائنات الحية اعتماداً على التغيرات في بينية البروتينات

أنواع الحموض الأمينية

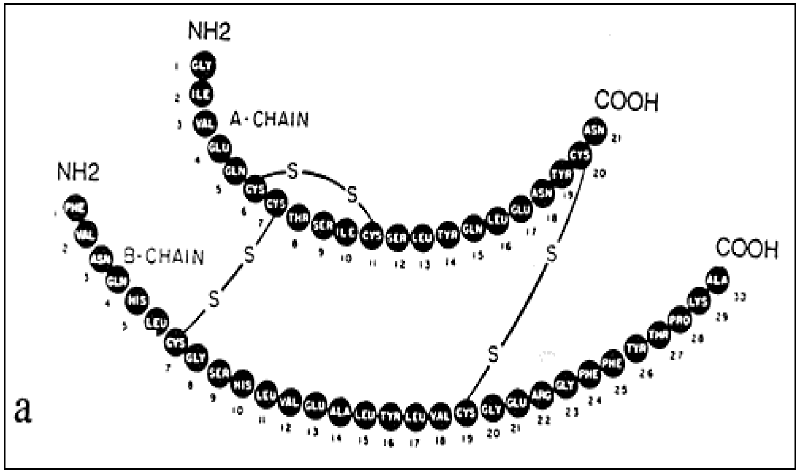


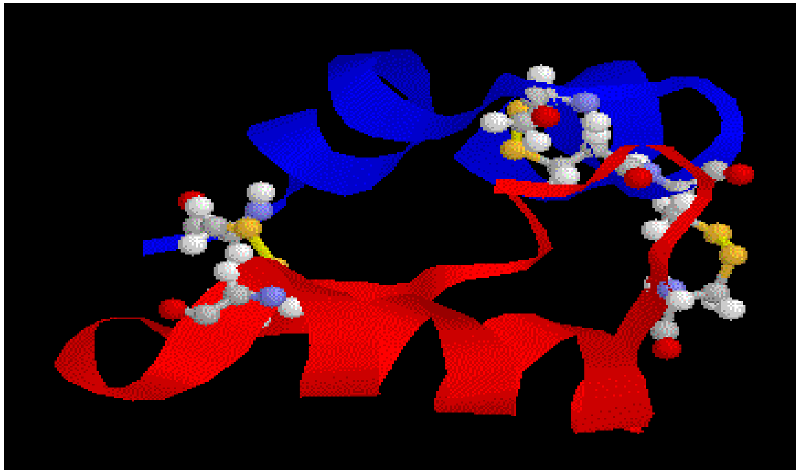
Protein Structure

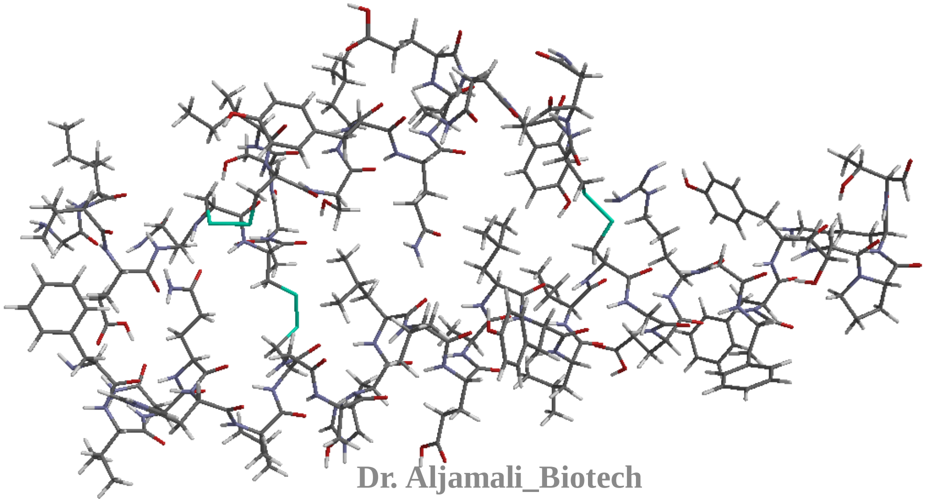
- إن البنية الثالثية للبروتين أساسية للقيام بوظيفته
- يتم تمكين البنية الثالثية للبروتين عبر عدد من الروابط بين جزيئاته وأهمها:
  - الروابط ثنائية الكبريت Disulfide bonds بين جزيئات الحمض الأميني السيستئين
  - الروابط الشاردية Ionic bonds
  - الروابط الهيدروجينية H bonds
  - الروابط الكارهة للماء Hydrophobic bonds



يملك هرمون الإنسولين البنى الأربع: الأولية والثانوية والثالثية والرابعية، بينما يكون للعديد من البروتينات بنية ثالثية فقط دون بنية رابعية بسبب كونها تتألف من سلسلة ببتيدية واحدة فقط







Prediction of Secondary structure توقّع البنية الثانوية

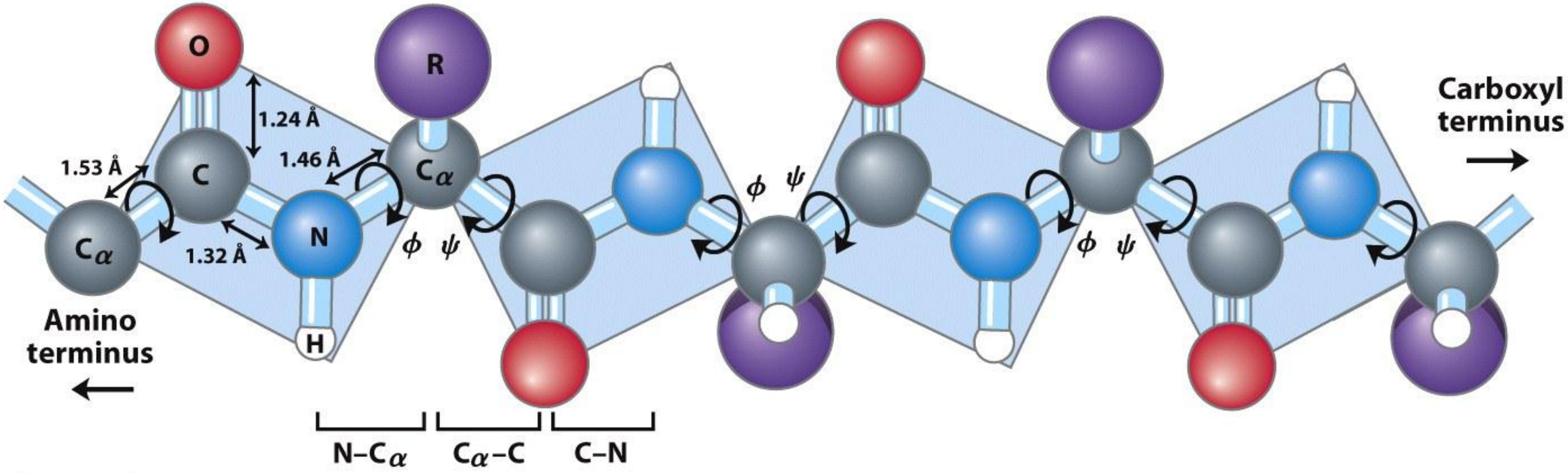


Figure 4-2b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Prediction of Secondary structure توقّع البنية الثانوية

- يمكن توقّع البنية الثانوية للبروتين اعتماداً على البنية الأولية له. وكما أشرت هناك ثلاثة احتمالات للبنية الثانوية: إما بنية الحلزون/النابض helix أو الصفيحة strand أو الالتفاف turn، وتقيس برامج المعلوماتية المختصة بتوقّع البنية الثانوية احتمالية likelihood انتماء ثمالة حمض أميني معيّنة amino acid residue إلى إحدى البنى الثلاث السابقة اعتماداً على موقع تلك الثمالة في البنية الأولية. بمعنى آخر، يختلف اتجاه زوايا دوران الحموض الأمينية بالنسبة لبعضها البعض نسبة للمجموعات الجانبية side chains للحموض الأمينية المجاورة. مثلاً يسمح الهيدروجين (المجموعة الجانبية) في الحمض الأميني الغليسين Gly بدوران أكبر للحمض الأميني السابق أو التالي له حول الرابطة الببتيدية في البنية الثانوية من الحلقة العطرية (المجموعة الجانبية) في الحمض الأميني تيروزين Tyr.
- عادةً، لا تتجاوز دقة توقع البنية الثانوية لهذه البرامج عادة 80%.

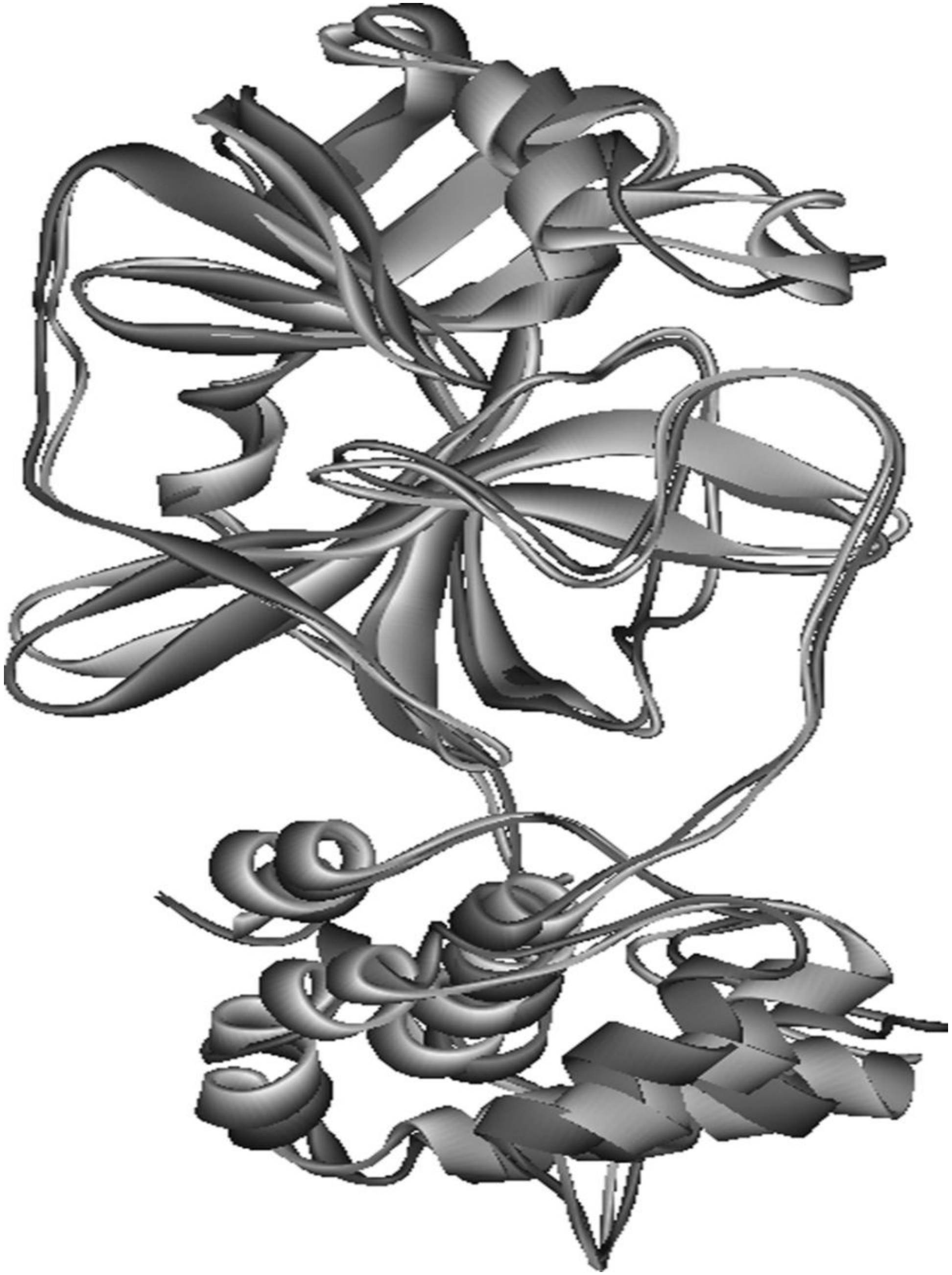
Prediction of 3D structure توقّع البنية الثالثية

- بالنسبة للبنية الثالثية، يعتمد التوقع على خصائص الحموض الأمينية المتضمَّنة في البنية الأولية. ويرتبط ذلك بعملية طي البروتين protein folding التي تتم في الشبكة الإندوبلازمية الداخلية ER بعد ترجمة البروتين مباشرة، حيث يتم طي البروتين (وتشكّل البنية الثالثية للبروتين) بشكل يحقق به الشكل الأكثر ثباتاً ثرموديناميكياً most thermodynamically stable form. أي بالشكل الذي يخفض به الطاقة الحرة بين جزيئات الحموض الأمينية إلى مستوياتها الدنيا بحيث تحقق استقراراً في البنية الثالثية للبروتين. ومن الواضح أن ذلك مرتبط بشكل وثيق بنوع الحموض الأمينية. فإذا كانت البنية الأولية لبروتينين متشابهة فهذا يؤدي إلى توقّع بنية ثالثية أيضاً متشابهة.

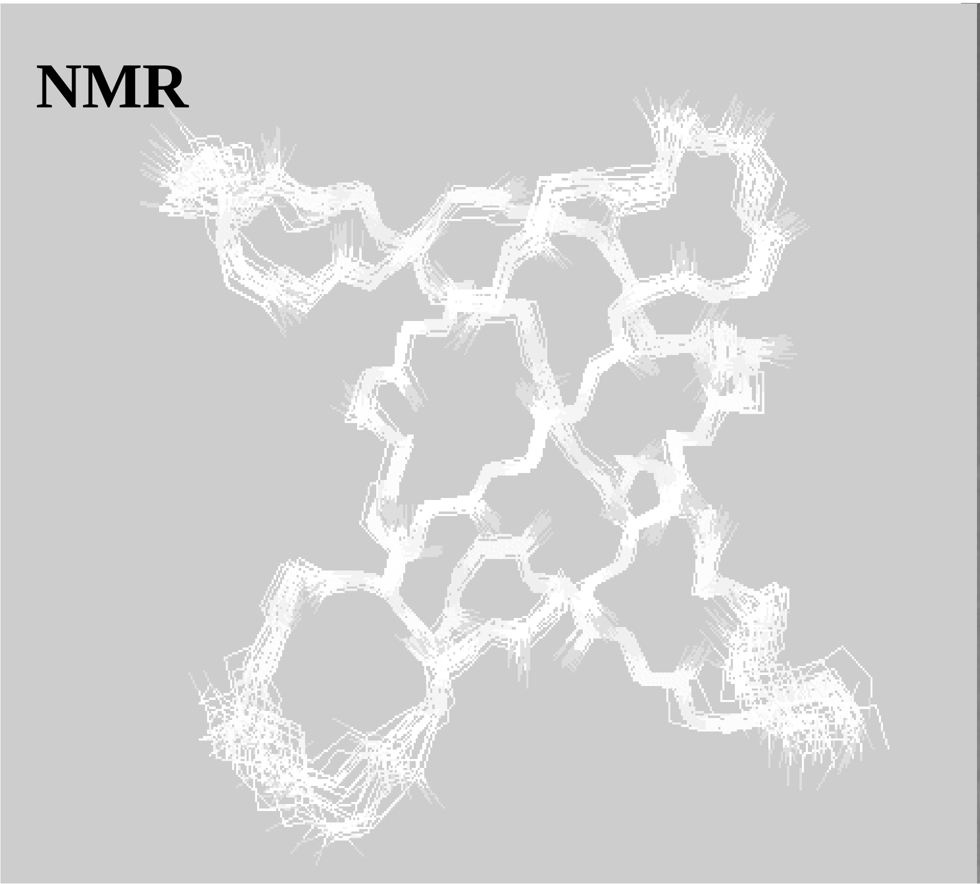
Show video

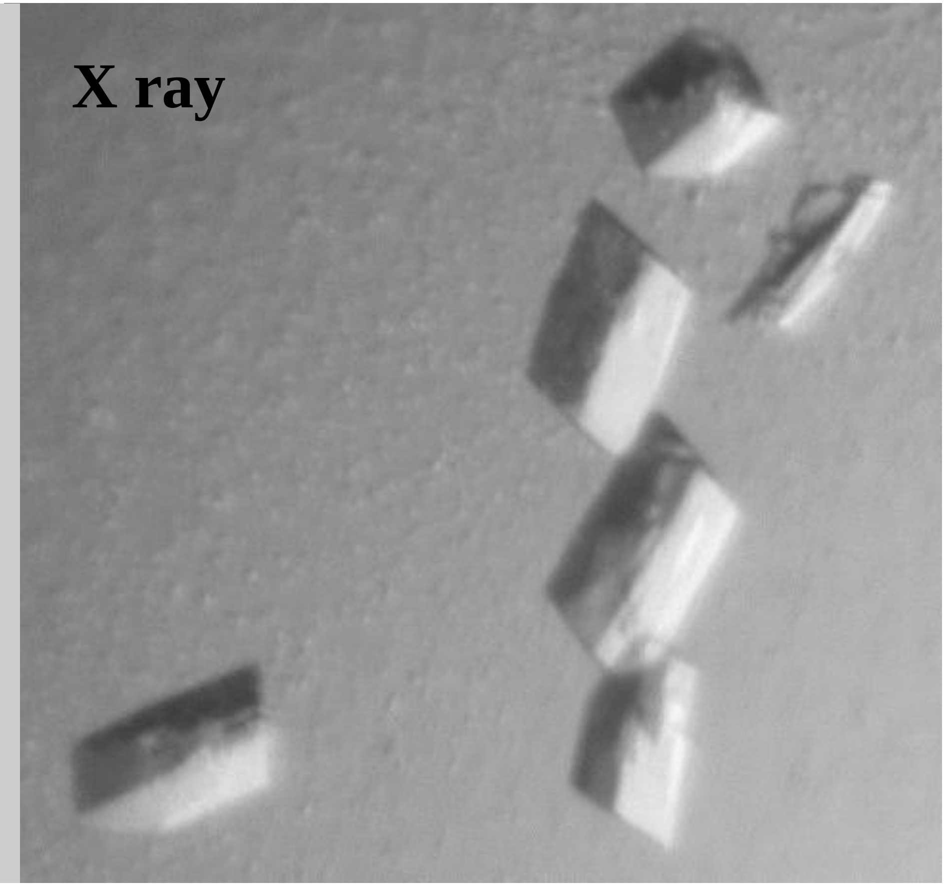
- وتعتمد النمذجة المقارنة comparative modeling على توقع البنية الثالثية لبروتين نسبة لبروتين آخر له بنية ثالثية معروفة ويشبه البروتين الأول لدرجة ما في بنيته الأولية. نحصل على نماذج معقولة نوعاً ما إذا كان التطابق في البنية الأولية أكبر من 40% بين البروتينين، ونحصل على نماذج جيّدة إذا كان التطابق أكبر من 70%.

- Superimposed structures of a protease protein obtained from crystallography (light), and a homology model (dark). This is typical of a good homology model, in that the largest errors are in loops, while a-helices and b-sheets are reproduced most accurately.



Measuring 3D Structure قياس البنية الثالثية للبروتينات

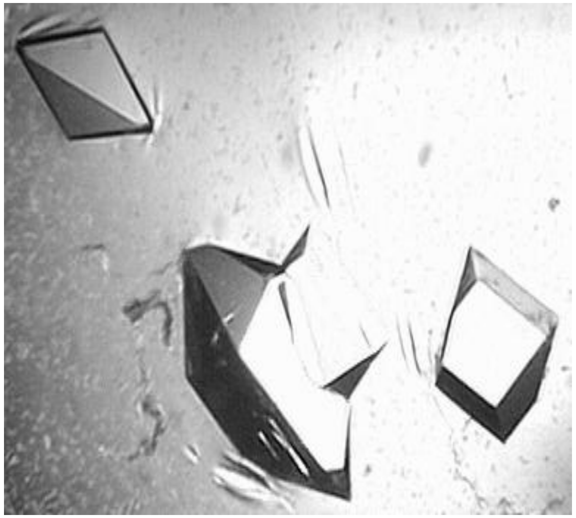


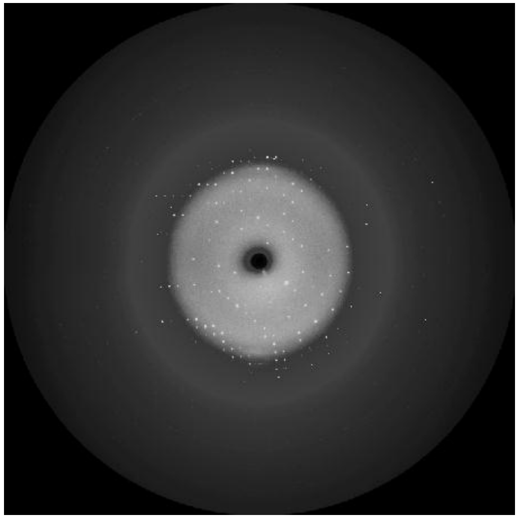


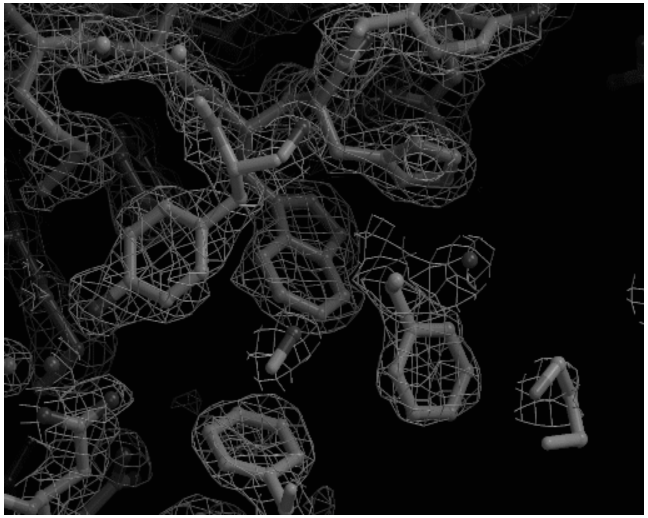
هنالك طريقتان أساسيتان لقياس البنية الثالثية للبروتينات

- *X-ray crystallography* قياس البلورة بالأشعة إكس
  - Beams of x-rays are passed through a crystal of protein.
  - Atoms in the protein crystal scatter (diffract) the x-rays, which produce a diffraction pattern on a photographic film
  - Protein must be crystallizable
- *NMR spectroscopy* مقياس طيف الرنين النووي المغناطيسي
  - A solution of protein is placed in a magnetic field and the effects of different radio frequencies (caused by the surrounding amino acid side chains) on the resonance of different atoms in a protein are measured
  - Protein must be small (~120 residues)
  - Protein must be soluble
- Both methods are expensive, slow, and cannot be applied for all proteins

ميزات وسيئات قياس البلورة بالأشعة إكس



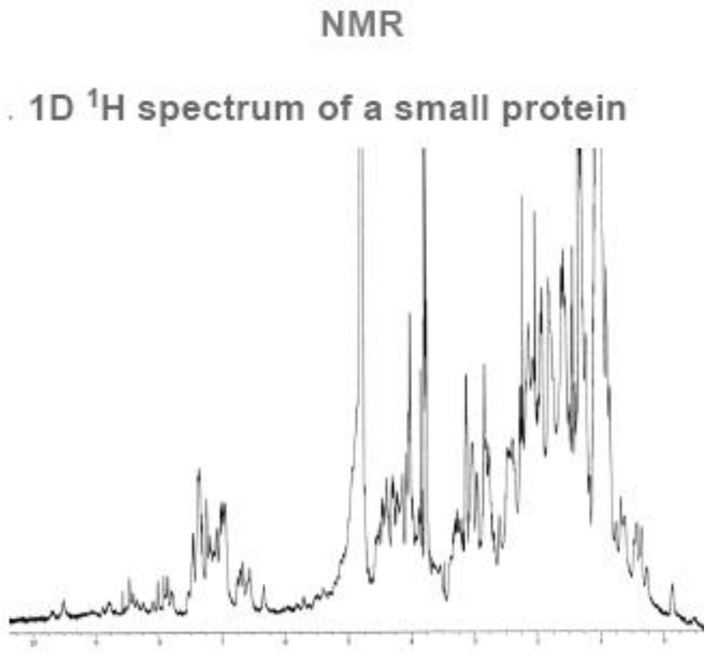


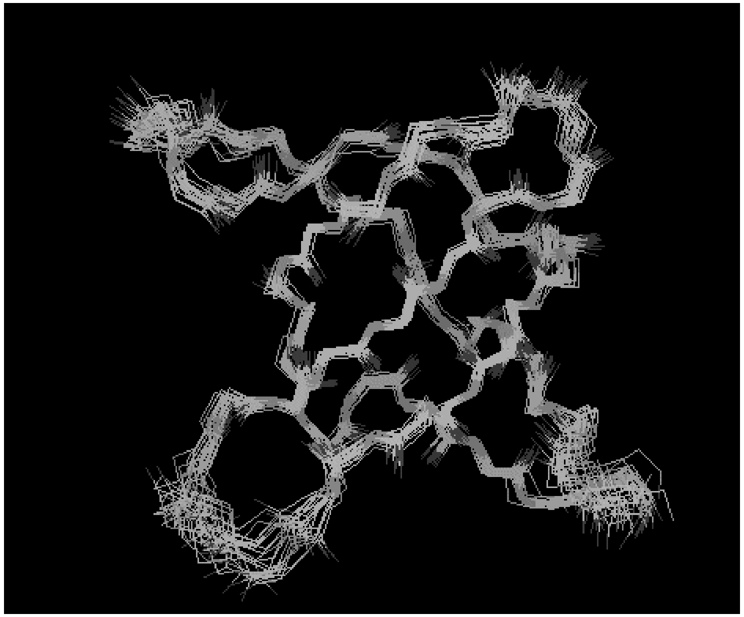


- *Advantage:*
  - High resolution image of all atoms in your protein
  - No size limitations (up to virus particles!)
  - Very easy to study mutants/complexes

- *Disadvantage:*
  - We need a crystal
  - Protein is not in solution but packed in a crystal (non-physiological conditions)

ميزات وسيئات قياس طيف NMR

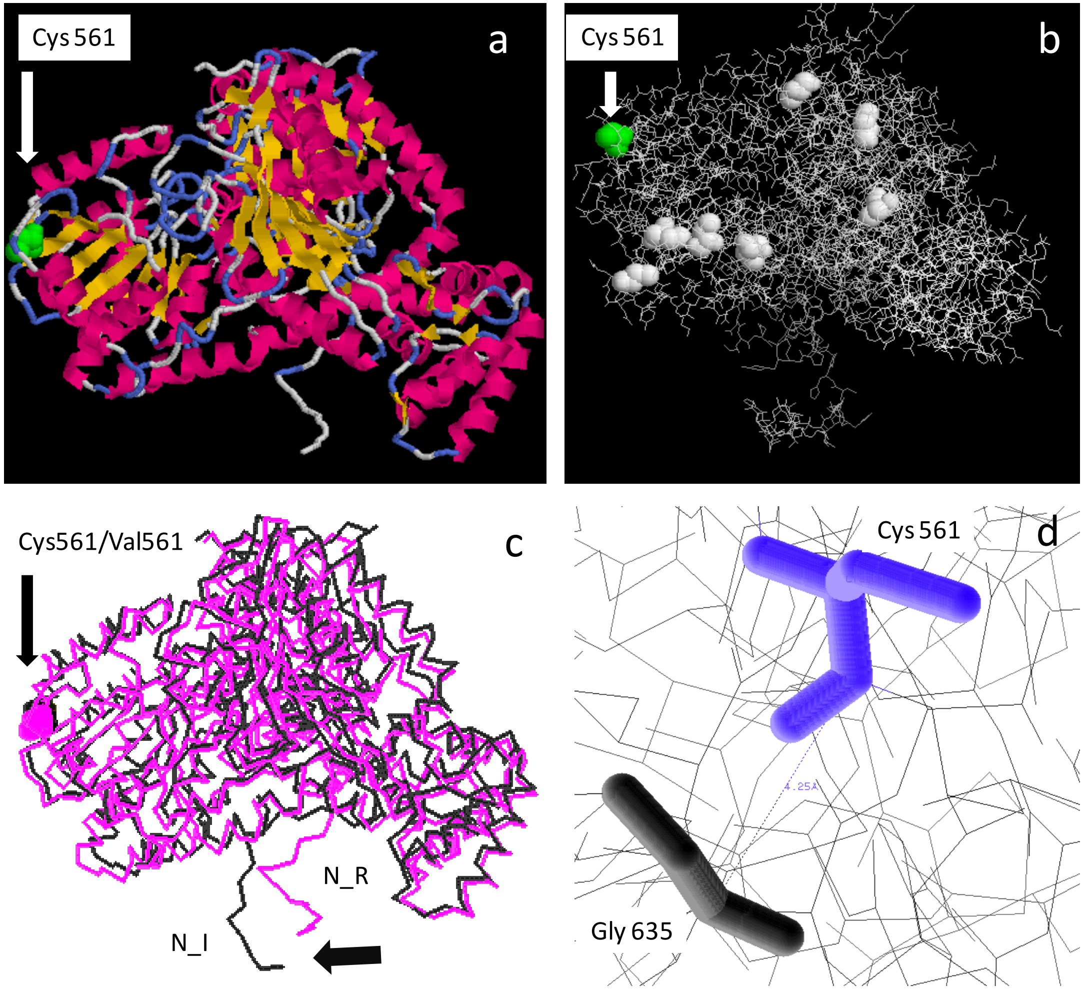




- *Advantages:*
  - Protein in its natural environment
  - Information about dynamics/folding
- *Disadvantages:*
  - Size limitation (about 30 kD)
  - Structure not completely defined (low resolution)
  - Require exotic nuclei

- لقد تم قياس البنية الثالثية للعديد من البروتينات المرتبطة باللجينات ligand الخاصة بها أو غير المرتبطة بتلك اللجينات وحفظ المعلومات المتعلقة بذلك في عدد من قواعد البيانات من أهمها Protein Data Bank (PDB).

- كما صُمّمت العديد من البرامج software التي تُعنى بدراسة البنية الثالثية للبروتينات ذات الاهتمام والاستفادة من ذلك في تصميم بعض الأدوية
- من تلك البرامج المتوفرة مجاناً برنامج Rasmol.



I. APPLICATION OF PROTEIN STRUCTURE IN DRUG DESIGN

Drug Design Based on Receptor Structure

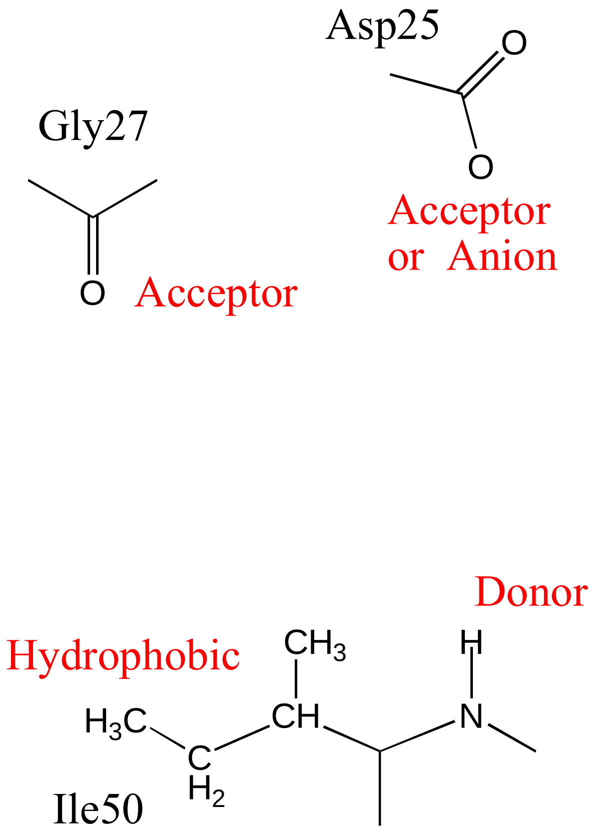
- We need a high-resolution (crystal or solution) structure of a receptor with or without a ligand bound.

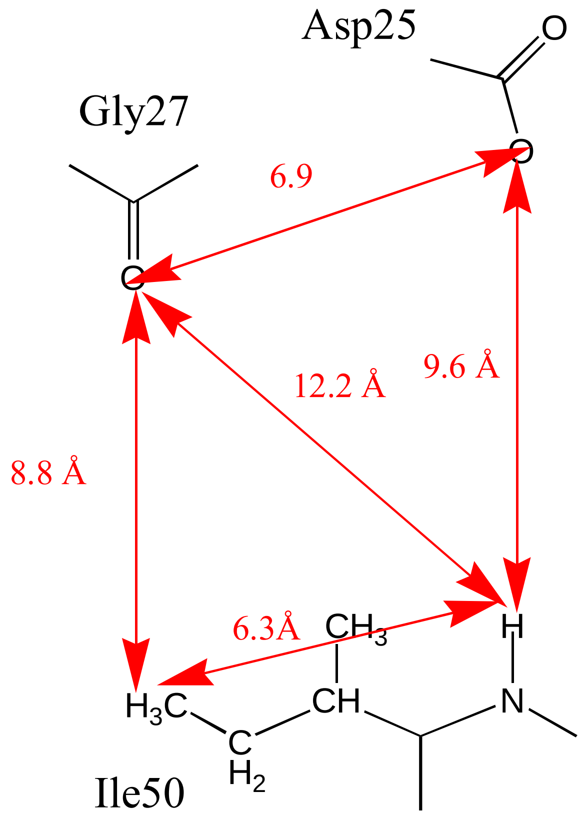
- In the absence of a structure of receptor bound to a ligand لجين (unliganded receptor المستقبل غير المرتبط باللجين); molecular graphics will help identifying the molecular structure of a possible pocket, where a ligand can fit (define the pharmacophore)

- In the presence of a structure of receptor bound to a ligand (liganded receptor المستقبل المرتبط باللجين); the ligand be removed graphically to expose the receptor binding site. Other molecules are docked into the binding site
  - Advantage; when a ligand binds to a receptor, it can change the receptor conformation. If we use the unliganded crystal structure, we could be docking compounds into the wrong binding site conformation. The liganded structure also gives us an idea of which interactions are important.

Designing a pharmacophore تصميم الجزء الفعال
Example: HIV protease active site

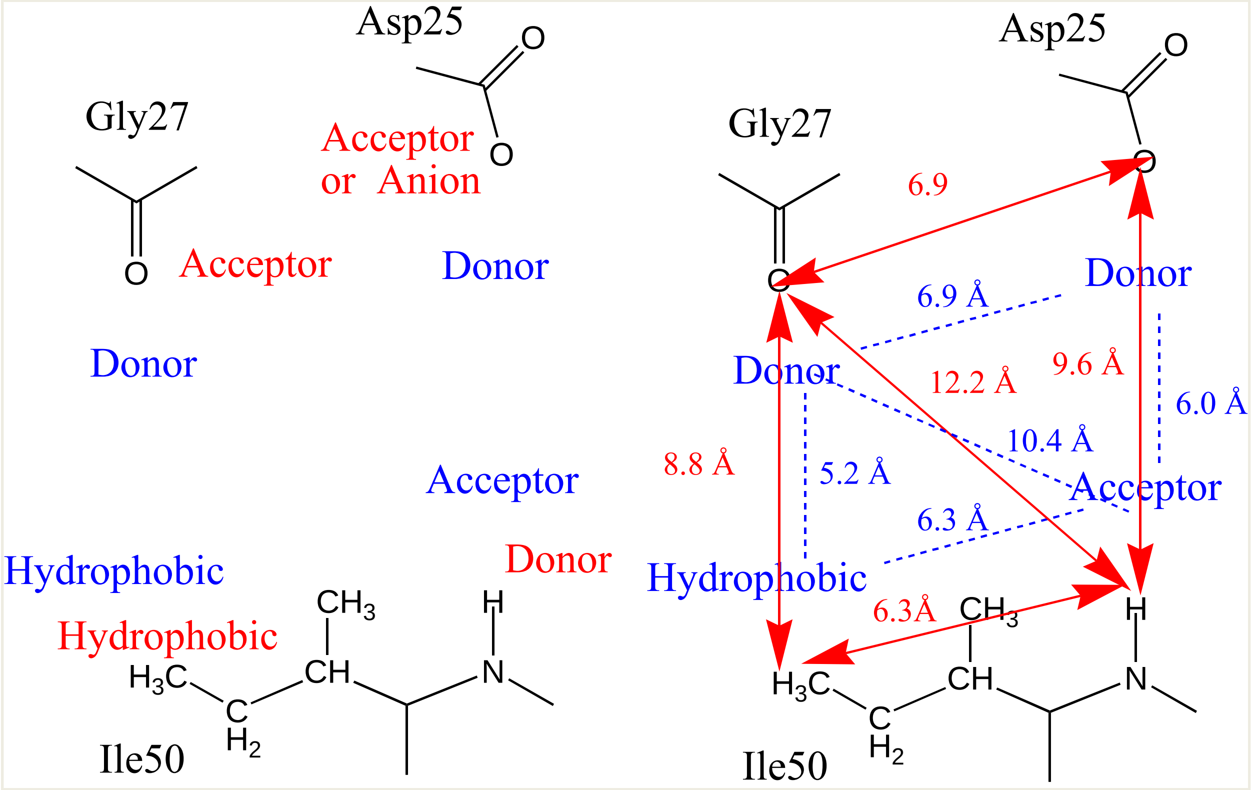
The crystal structure identified two H-bond acceptors (Gly27 and Asp25), one H-bond donor (Ile50) and one hydrophobic region (Ile50)





Designing a Pharmacophore example HIV protease active site

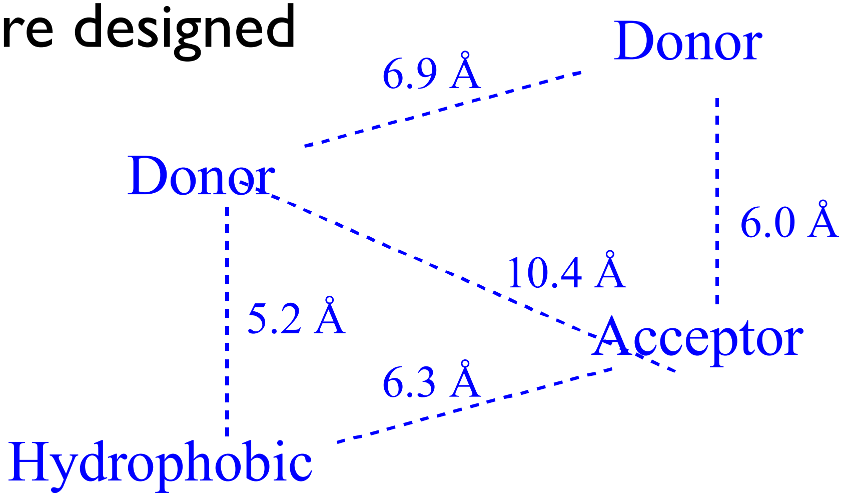
- Geometric arrangement of types of functional groups that are required for "activity" to the active site of HIV protease
  - Identify the functional group Red: active site, Blue: pharmacophore
  - Determine distances
    - Van der Waals and H-bond distances about 1.5-2 Aº (10^{-7}m)



Final Pharmacophore

- Screen the chemical structure database for molecules that could fulfill the resulting pharmacophore for binding HIV protease.
- Various databases are available. For example:
  - Cambridge Structural database (CSD)
  - Fine Chemicals Directory (FCD)
  - Available Chemicals Directory (ACD)

  - Several drugs like Ritonavir were designed



Liganded receptor المستقبل المرتبط باللجين

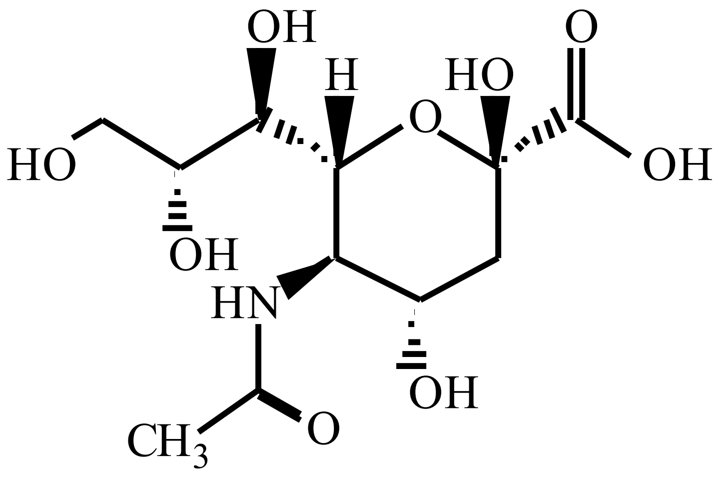
- Identify a structure (crystal or solution) of a liganded receptor
- Remove the ligand (*in silico*)
- Dock a new ligand (e.g. inhibitor) that fits into the same pocket.
- It is common to proceed with iterative متكرر (cyclic) approach. This means to identify the crystal structure of the receptor with the new ligand, remove the ligand and dock a second ligand with better fit, then determine the structure of the new complex. Repeat this until we obtain the best fit (and effect) of the final drug.

Example: Discovery of antiviral (anti influenza drug zanamivir, Relenza)

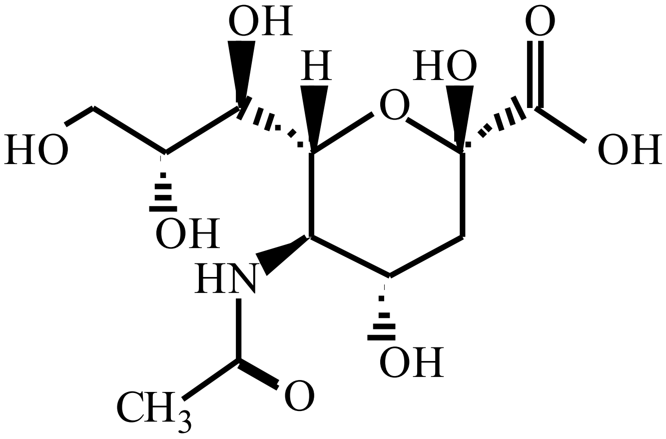
- Background: Newly replicated influenza viral particles stick to the surface of the infected cells before they spread to other cells. The virus binds to its receptors on the host cell surface containing Sialic acid (2.94) through its protein Hemagglutinin.

- Neuraminidase is the enzyme that cleaves sialic acid residues from the cell surface, which releases the virus particles to spread.

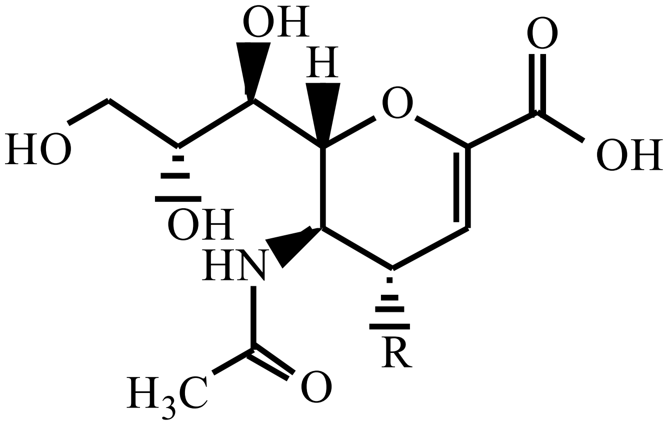
- Inhibition of neuraminidase would prevent the release and spread of virus particles.



2.94



2.94

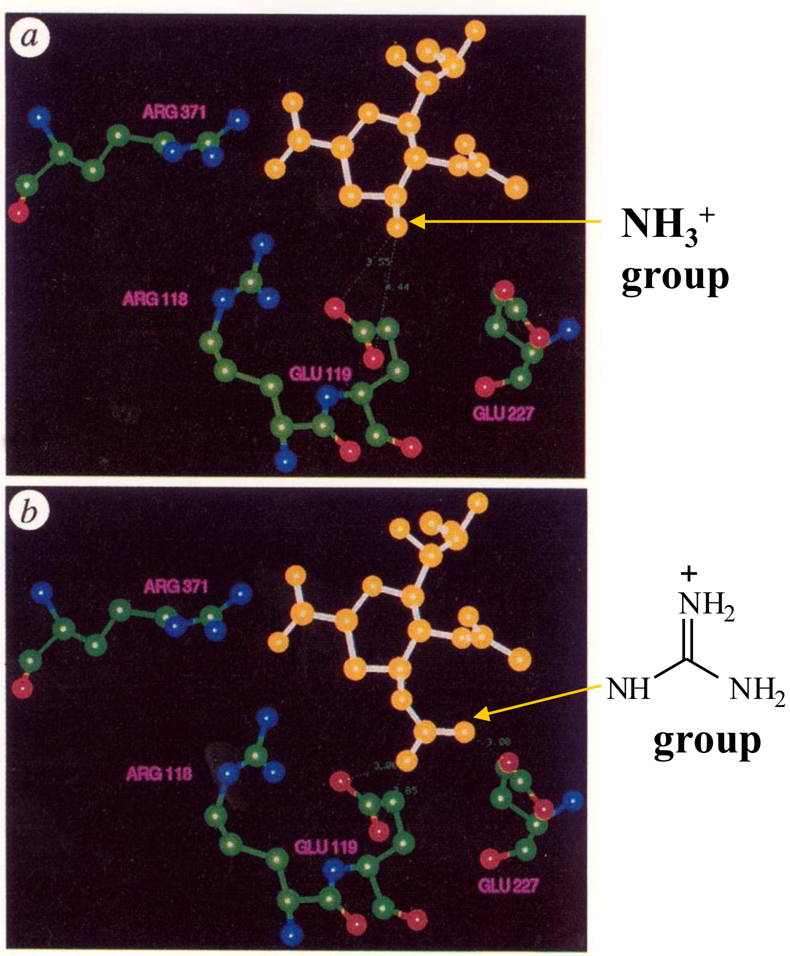


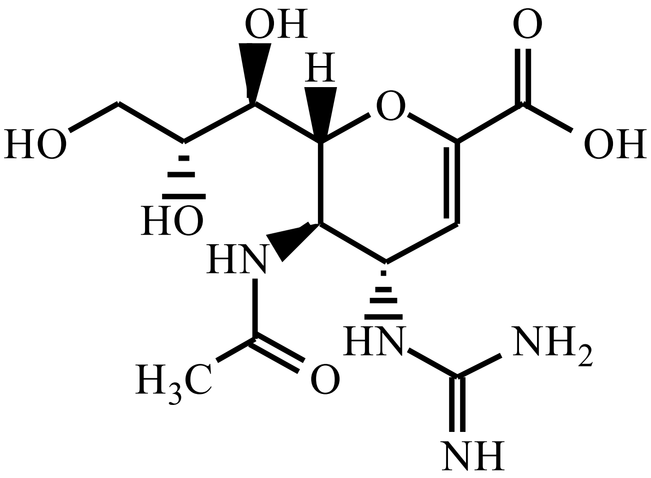
2.95

Crystal structure of influenza A neuraminidase with inhibitor bound was obtained.

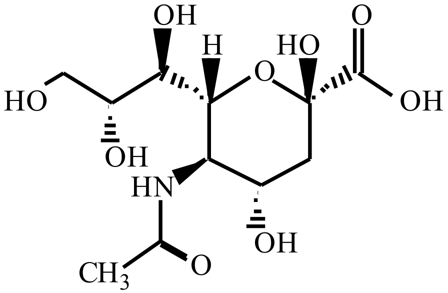
Computation suggested 4-OH should be replaced by 4-NH_2, which when protonated would interact with Glu-119

Further, the crystal structure suggested that the extension of 4-ammonium with 4-guanidinium (2.93, Zanamivir) would extend binding to Glu-227 as well.

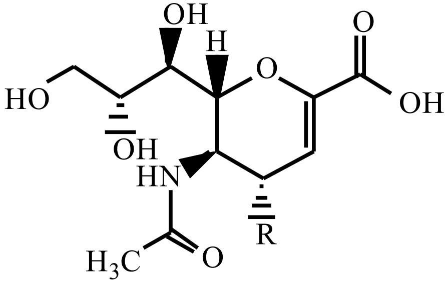




zanamivir
2.93



2.94



2.95