

Production of Therapeutic Peptides & Proteins

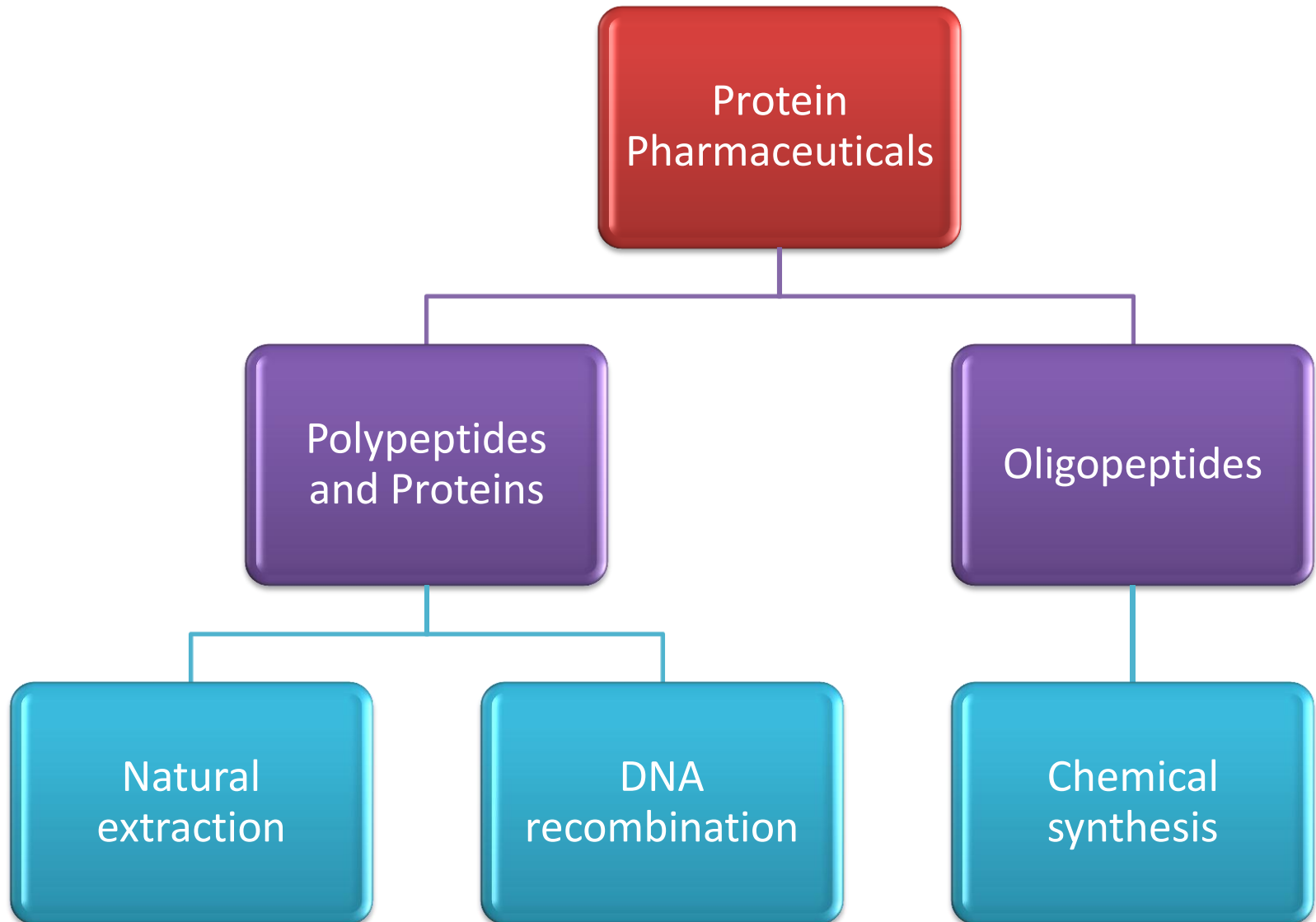
ترتبط تسمية الببتيد أو البروتين بوزنه الجزيئي

- Peptide الببتيد: consists of 2 or more amino acids
- Oligopeptide قليات 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



قليات الببتيد Oligopeptides

- يمكن إنتاج قليات 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.

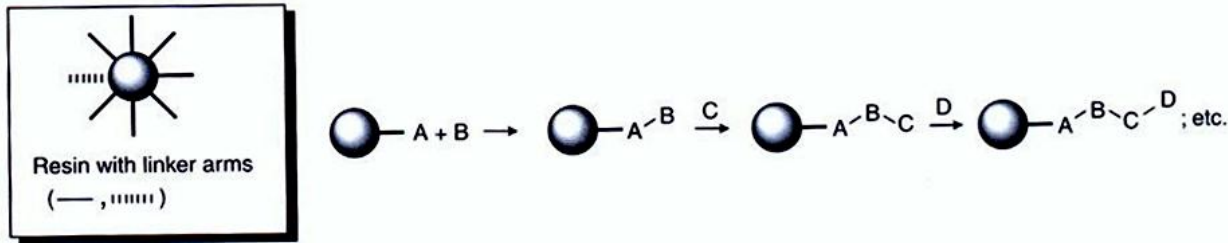
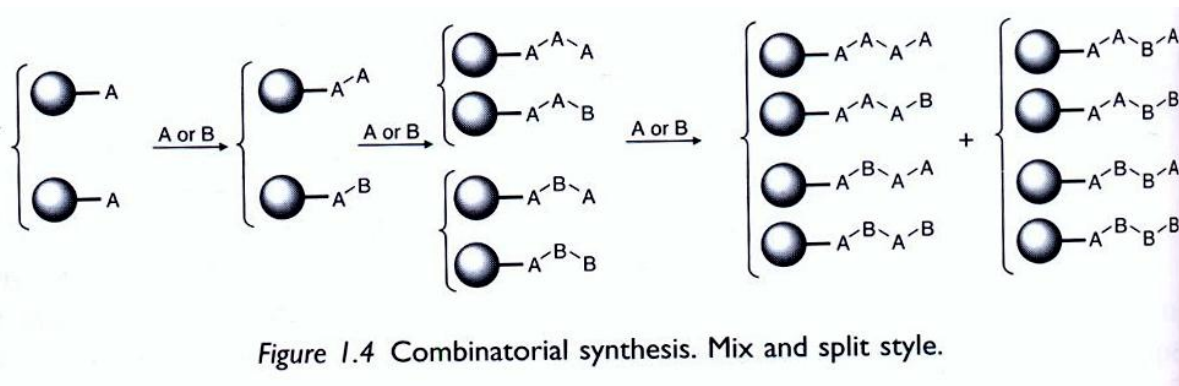


Figure 1.3 Single resin/single peptide (Merrifield style) methodology.

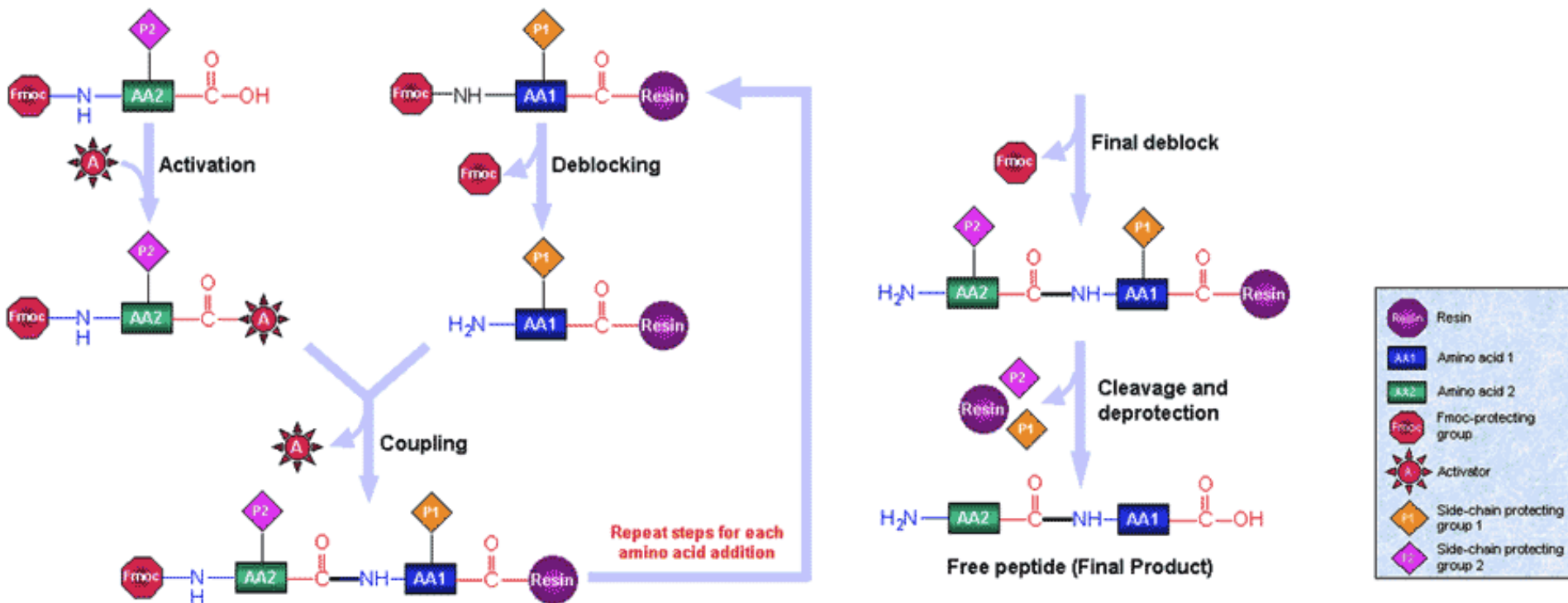
- تعتمد SPS على ربط حمض أميني ما براتين resin (جسم صلب حامل كيميائياً) ومن ثم فإن الحمض الأميني الأول يرتبط مع حمض أميني ثان وثالث وهكذا، إلى أن يكتمل العدد الكلي للحموض الأمينية التي يرغب بتضمينها في قليل الببتيد. وفي نهاية التفاعل، يتم فك الراتنج عن الببتيد ومقايضة الفعالية الوظيفية للببتيد المتشكل (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 متغايرة تغطي عدداً كبيراً من احتمالات الارتباط بين الحموض الأمينية المستخدمة في التفاعل.

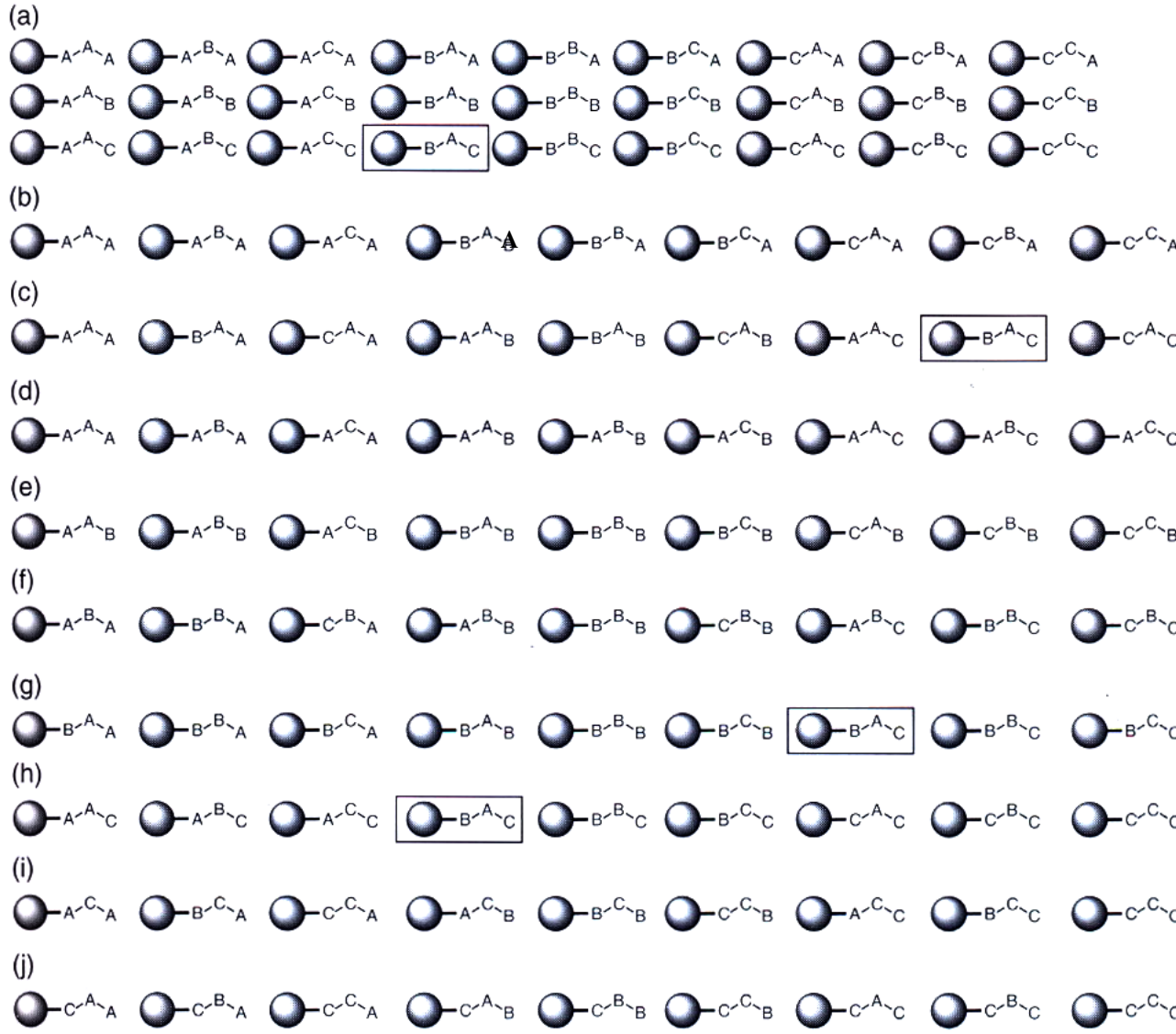


تصنيع الببتيدات على الطور الصلب

Solid Phase Peptide Synthesis

Solid Phase Peptide Synthesis Scheme





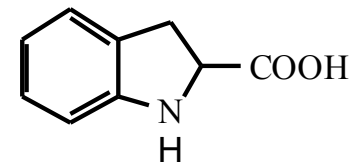
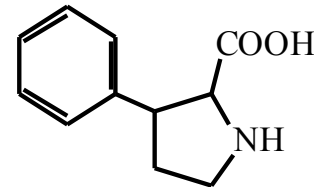
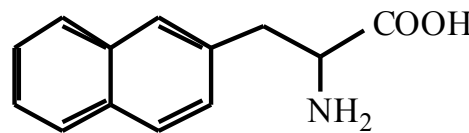
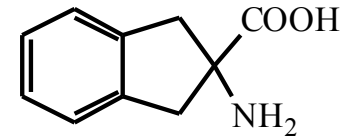
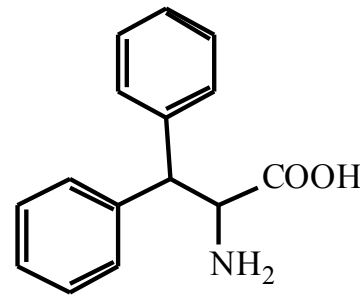
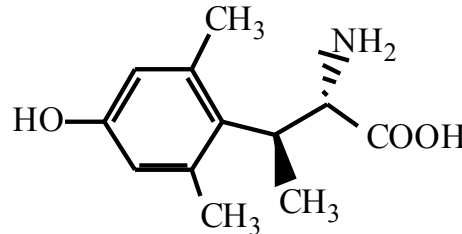
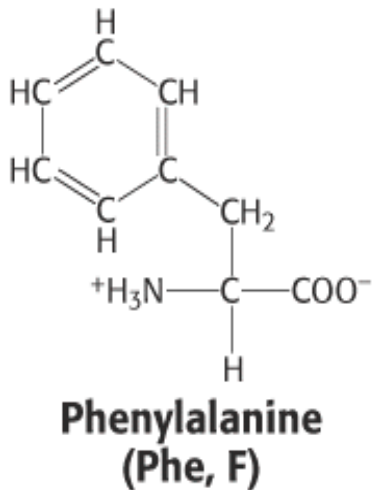
- تُمكن معرفة الببتيد الفعال دوائياً من خلال تقسيم الببتيدات الناتجة على مكتبات أصغر في أنابيب يحتوي كل منها على مجموعة من الببتيدات معروفة التالي الببتيدي لكل الببتيدات المكوّنة للمجموعة (المكتبة الصغيرة). وبعد اختبار جميع المجموعات، يمكن تحديد الببتيد الفعال بكونه القاسم المشترك بين جميع الببتيدات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



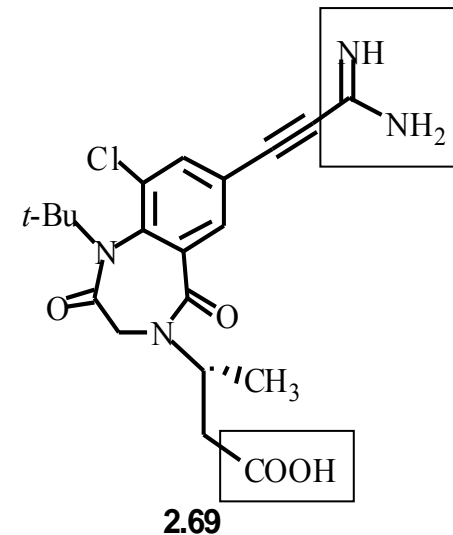
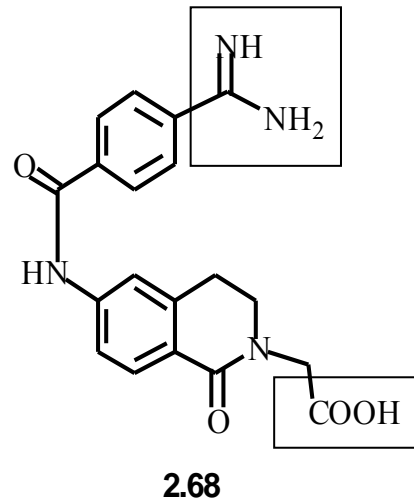
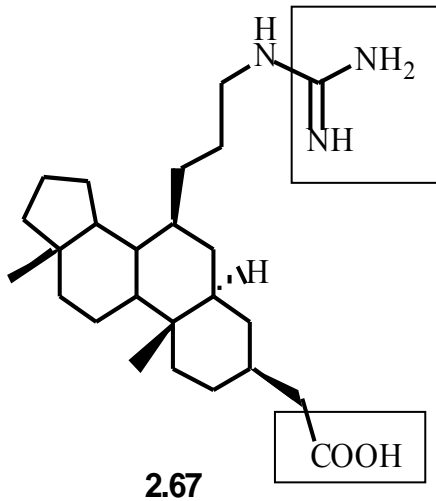
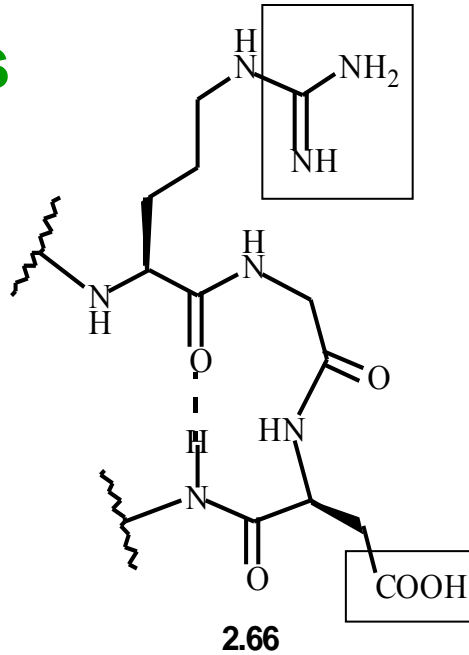
مثال 2: محاكيات الببتيد RGD

- نتيجة أبحاث عديدة لدراسة بنية مضادات التخثر في سم الثعابين، والتي تسبب نزفاً مميتاً أحياناً، تبين أنّ آلية تلك جزيئات تتعلّق بتداخلها مع ارتباط بروتين الفيبرينوجين/الفيبرين مع المستقبل GPIIb/IIIa على سطح الصفائح platelets، حيث تبين ان المنطقة الأهم في بروتين الفيبرينوجين والخاصّة بالارتباط إلى المستقبل تمتلك الببتيد الثلاثي (أرجينين، غليسين، أسبارتات) RGD. ويمكن للبتيدات 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 يشكّل 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

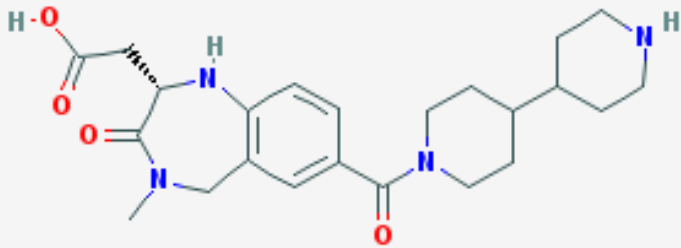
RGD peptidomimetics

Arg-Gly-Asp (RGD)

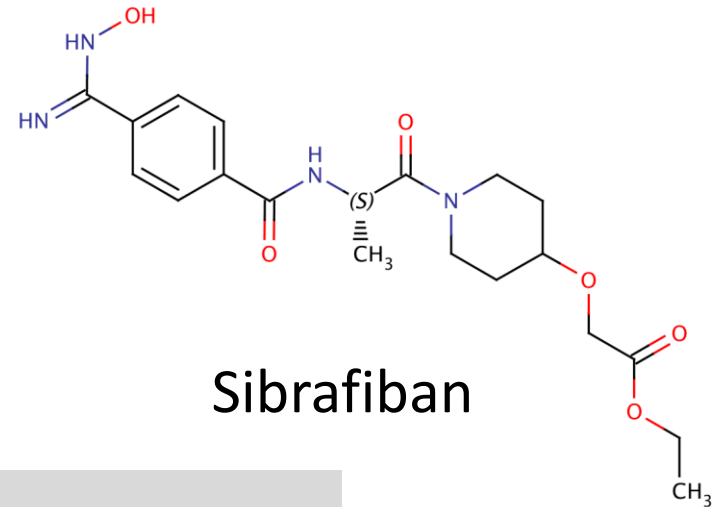
common β -turn motif that binds to GPIIb/IIIa receptors



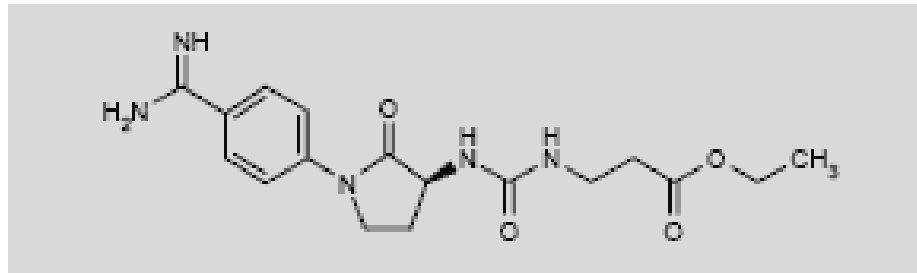
طوّرت عدة محاكيات لببتيد RGD وأدرج بعضها في التجارب السريرية ووصل بعضها
الطور الثالث إلا أن تلك التجارب أنهيت إما بسبب عدم إظهار الفعالية المنشودة أو بسبب
النزف الشديد الذي ترافق مع زيادة في معدل الوفيات بالمقارنة مع الدواء الغفل Placebo



Lotrafiban



Sibrafiban



Orbofiban