

التقانة الحيوية الصيدلانية والبروتينات الحيوية الصيدلانية

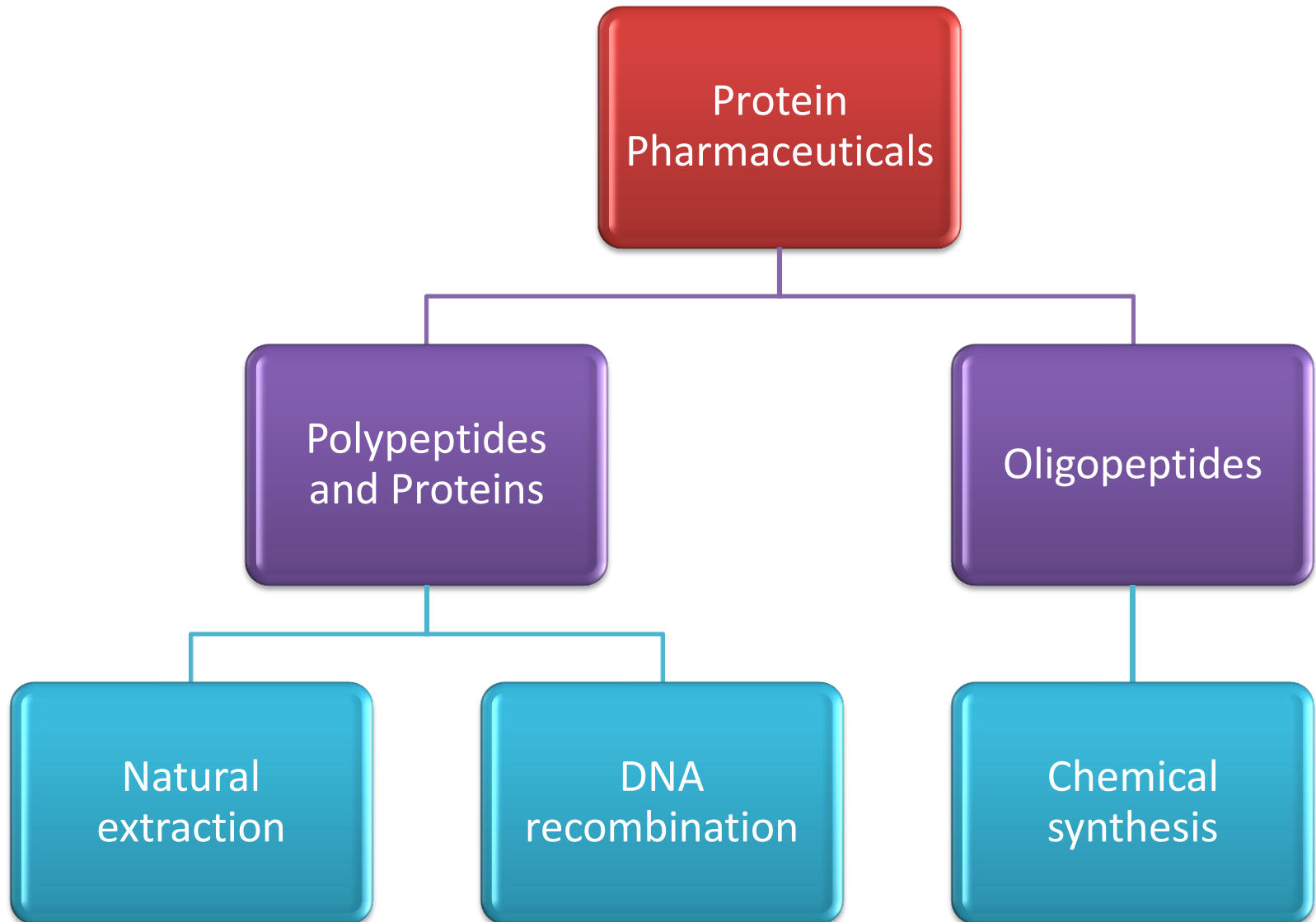
PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY & BIOPHARMACEUTICAL PROTEINS

Biopharmaceutical Proteins on the Market

Production of Pharmaceutical Proteins

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

إنتاج/اصطناع الأدوية الببتيدية والبروتينية



1. 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

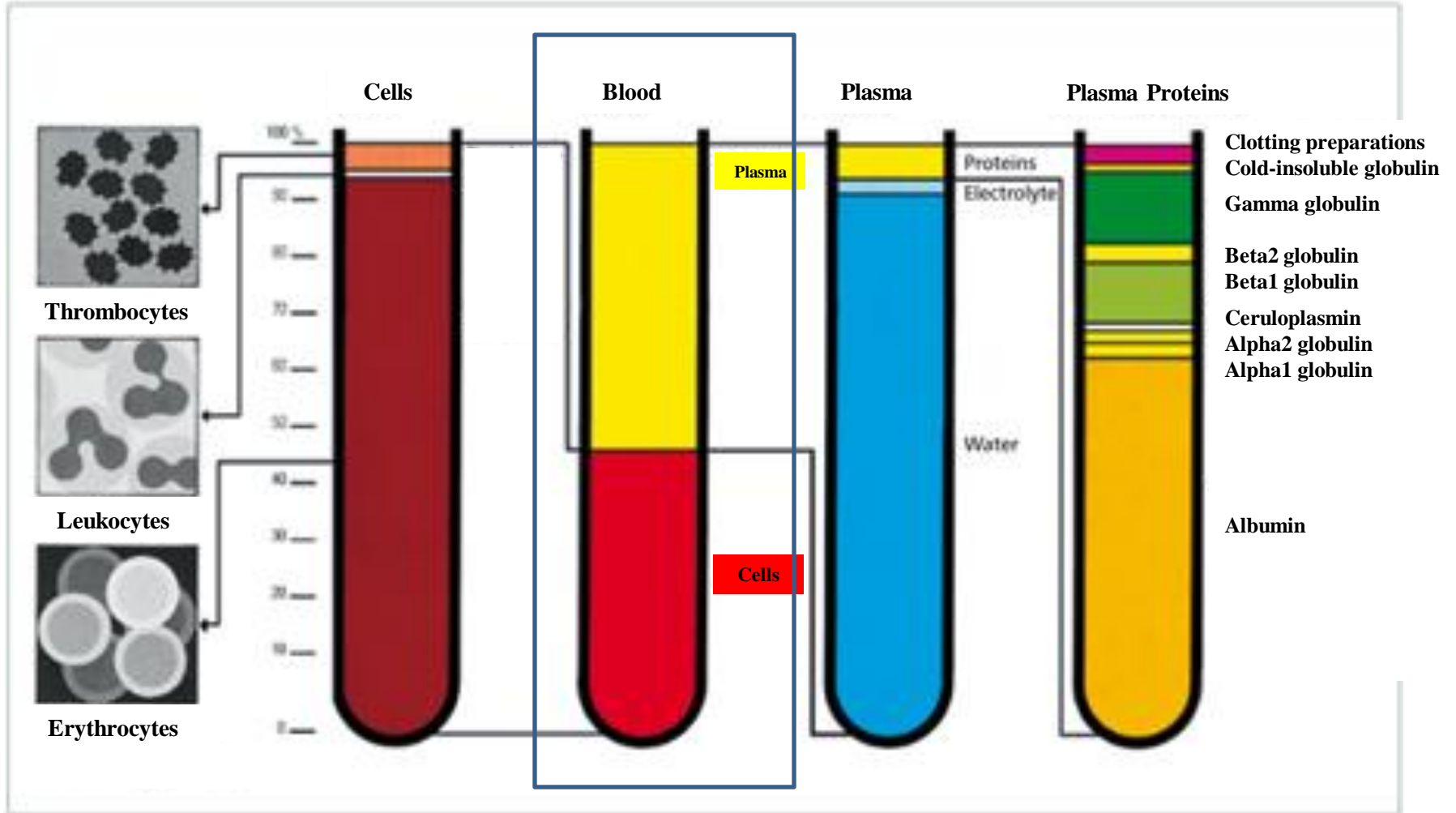


Table 1. Plasma proteins of current therapeutic interest; the wide concentration range is one of the challenges of designing process separation processes.

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

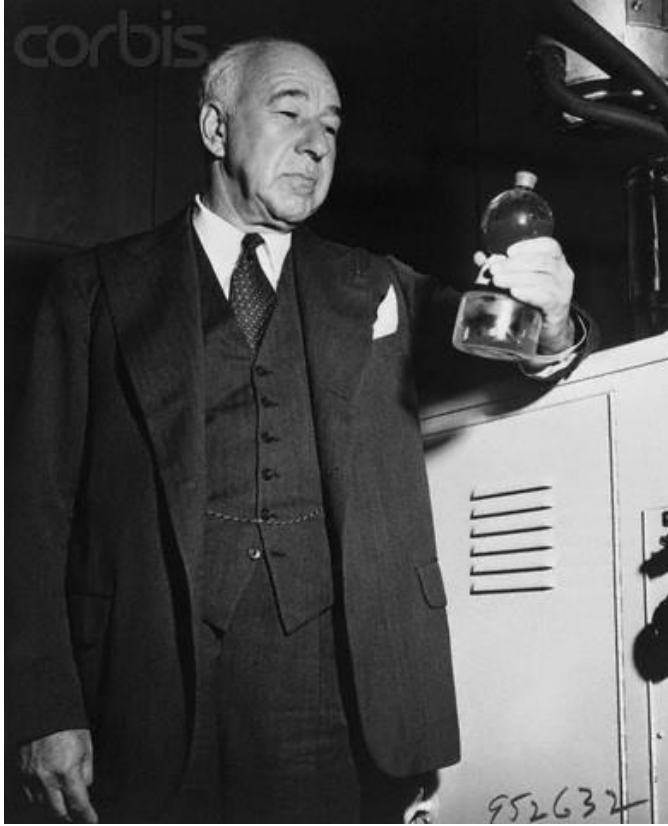
- تحتوي البلازما على 60 غ/لتر من البروتينات، يُستفاد من 57 غراماً منها لتحضير منتجات بروتينية علاجية!

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 ذلك، 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

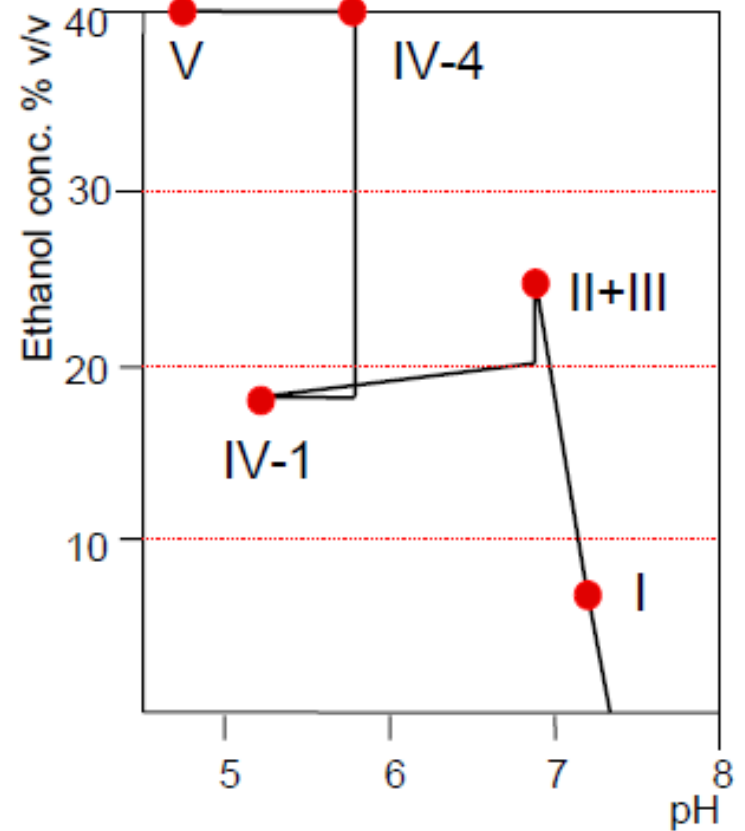
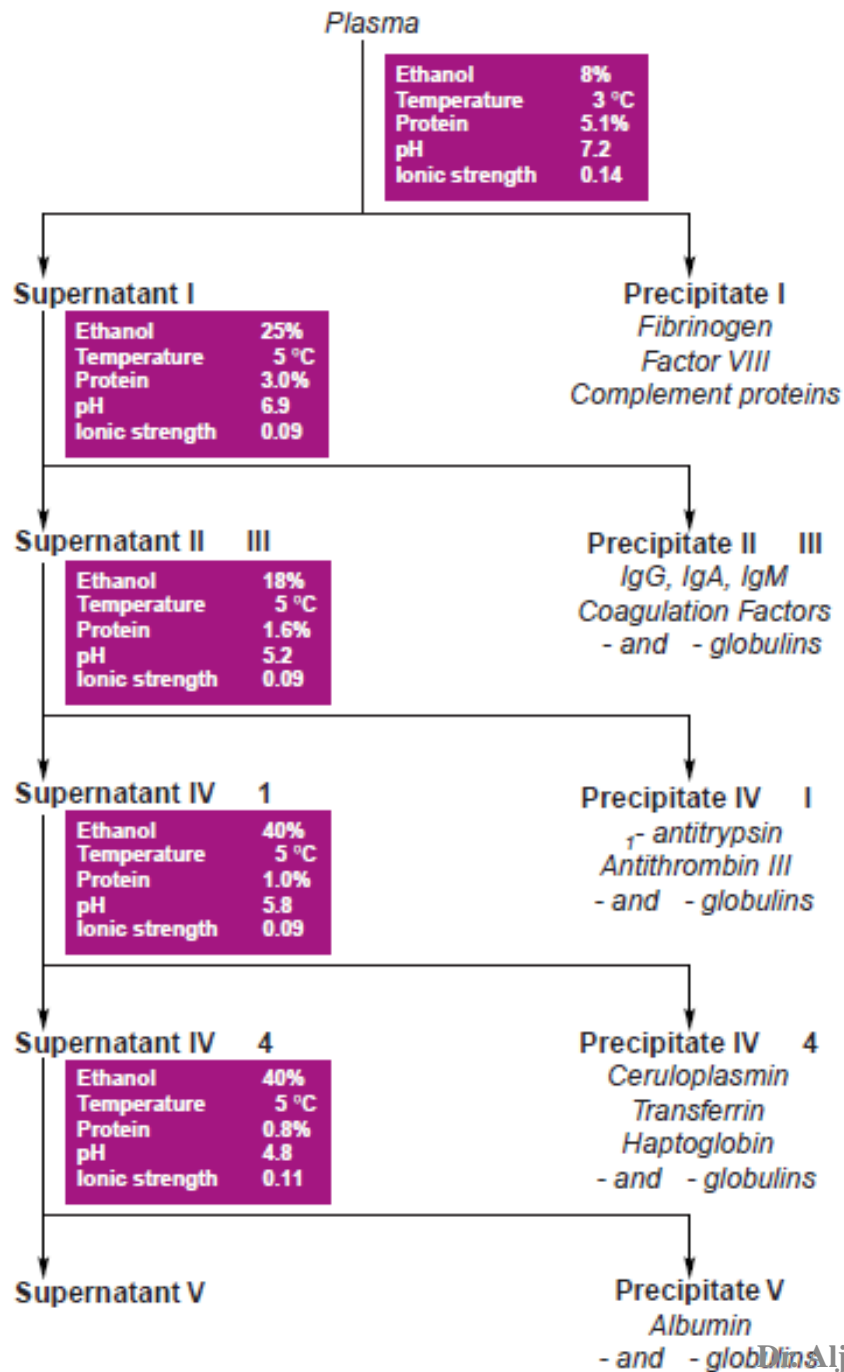
Helped hundreds of soldiers during WWII with proteins extracted from plasma. Nominated for Noble Prize 1950 in Physiology or Medicine

Fall 2019

1. 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 باهء وتراكيز إيثانول محددة.
- لا تزال هذه الطريقة تستخدم بشكل واسع لتحضير بروتين الألبومين

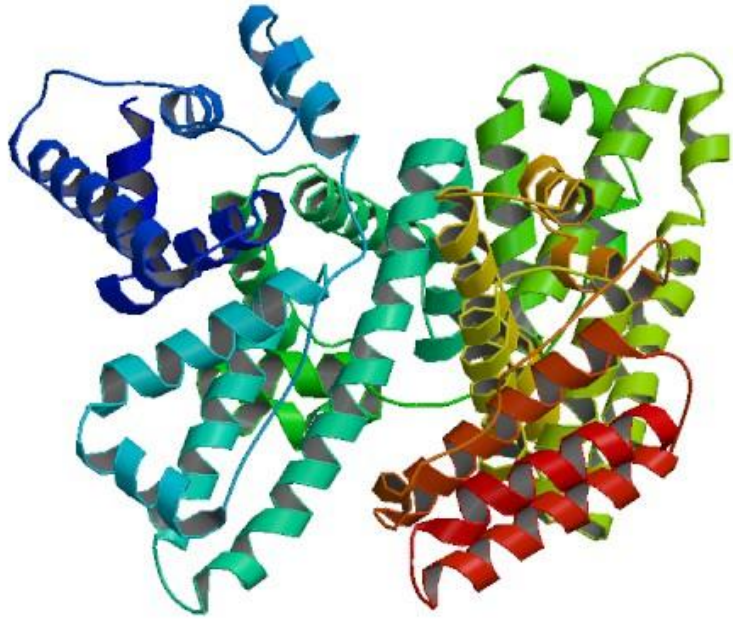
طريقة Cohn



توزع بروتينات البلازما باستخدام طريقة Cohn

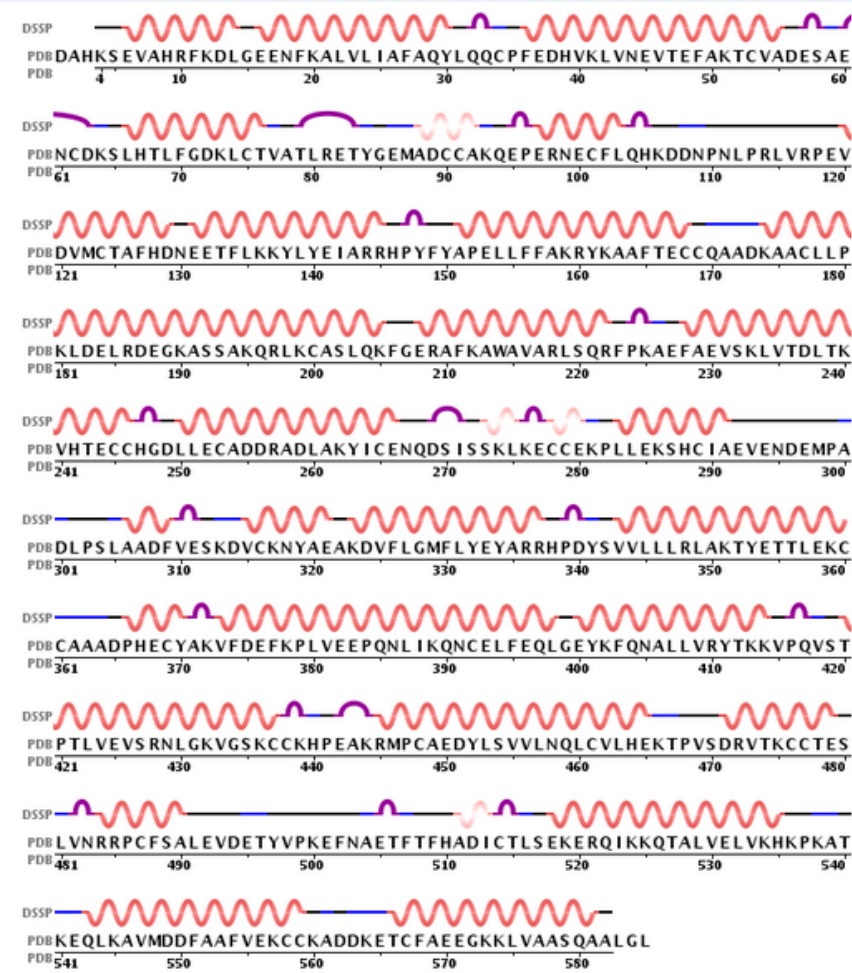
Fraction	Ethyl alcohol (%)	pH	Proteins
I	8-10	7.2	Fibrinogen, Factor VIII, Fibronectin, C1q, C1r, C1s
II + III	25	6.9	IgG, IgA, IgM, Factors II, Factor VII, Factor IX, Factor X and Globulins
IV - 1	18	5.2	α - and β -Globulins, AT-III, α_1 -Antitrypsin, IgM, Complement components
IV - 4	40	5.8	α - and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

II. طريقة الصدمة الحرارية Heat Shock

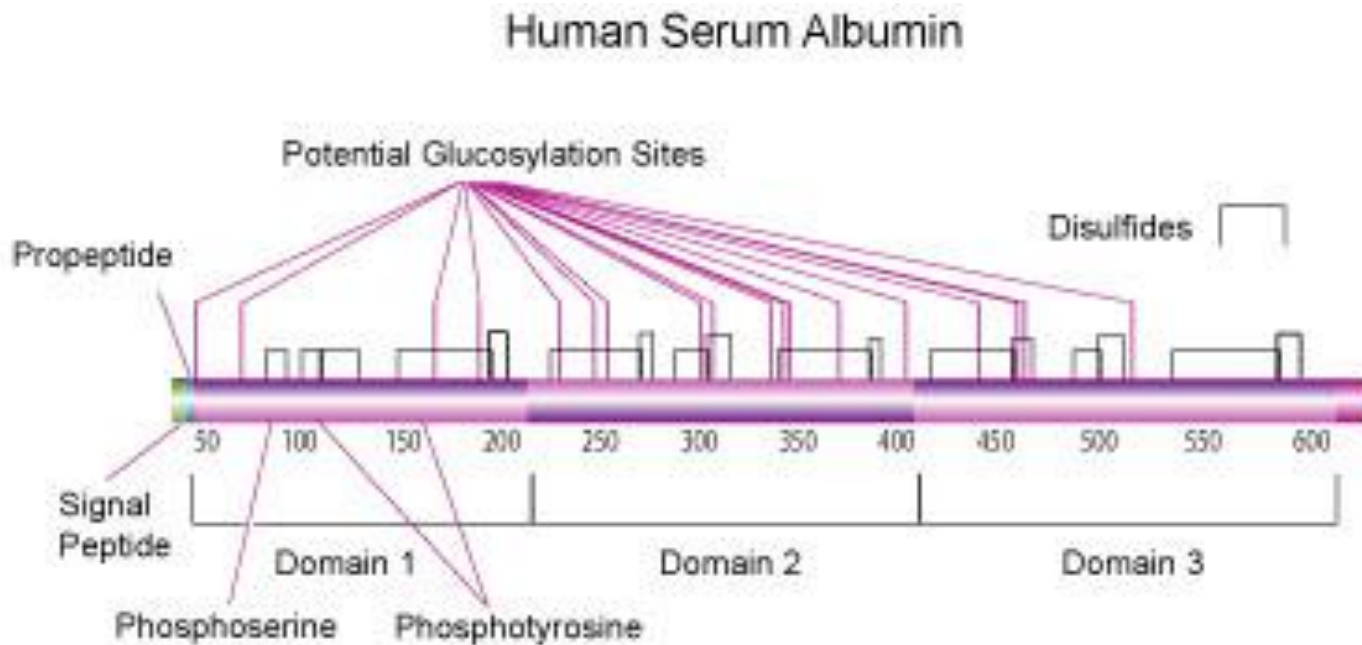


- تعتمد طريقة الصدمة الحرارية على الثباتية الحرارية للألبومين بالمقارنة مع معظم بروتينات البلازما الأخرى. فالألبومين لا يتمسخ بشكل تلقائي، ويمكن لمحاليل الألبومين أن تسخن للدرجة 60 مئوية لتنشيط العوامل المرضية.
- لدى استعمال حمض الكابريلي caprylic acid بتركيز 0.04 مول/ل، يمكن استخلاص الألبومين من المصل 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.



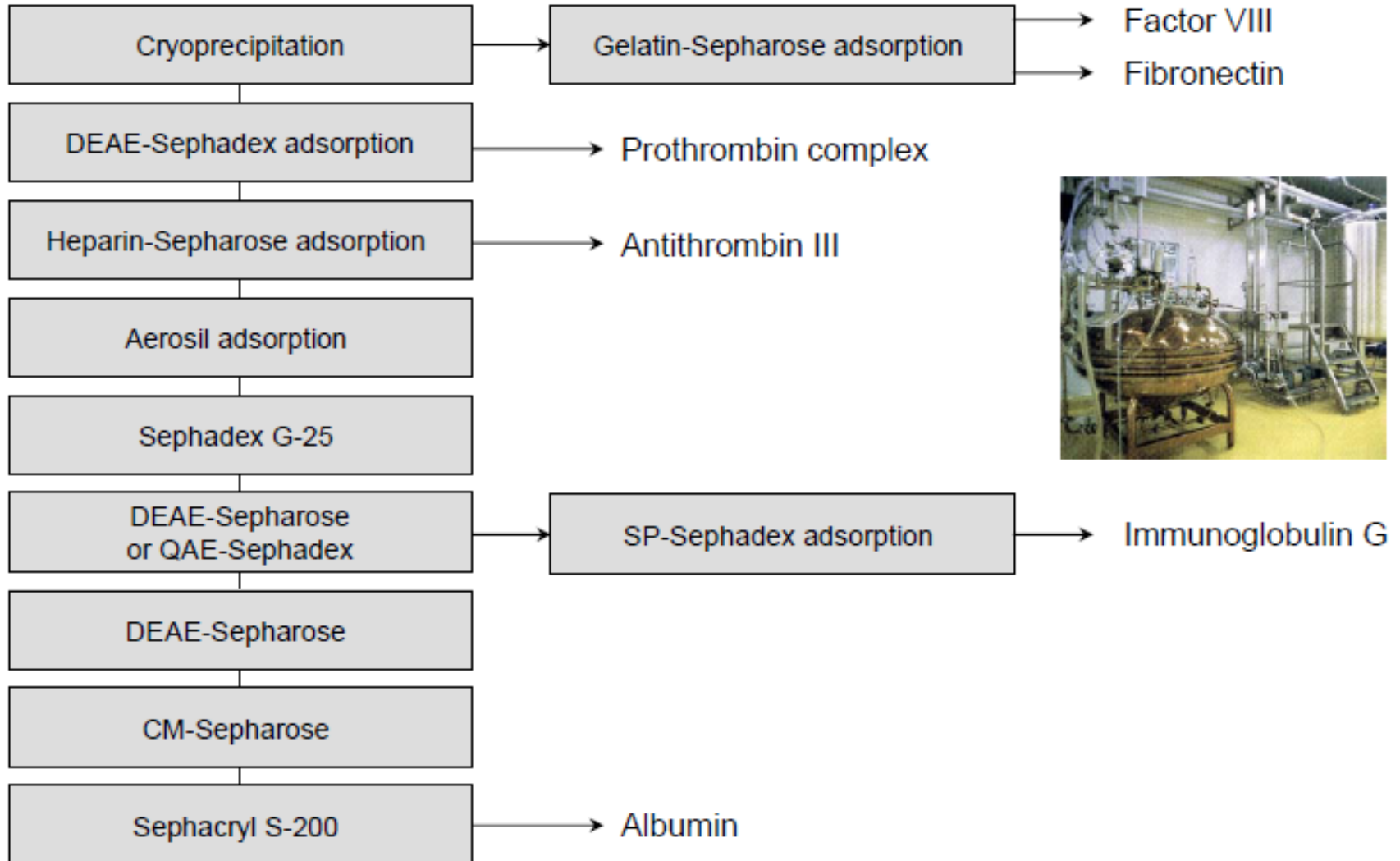
III. طريقة الاستشراب اللوني Chromatography process

- 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، كالقلبية والشحنة ودرجة الامصاص 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 تركزها الحموض الأمينية المشحونة charged amino acids في البروتين المعزول،
 - الاستشراب المعتمد على خصائص كيميائية معينة للبروتينات المعزولة
 - الاستشراب بالإلفة

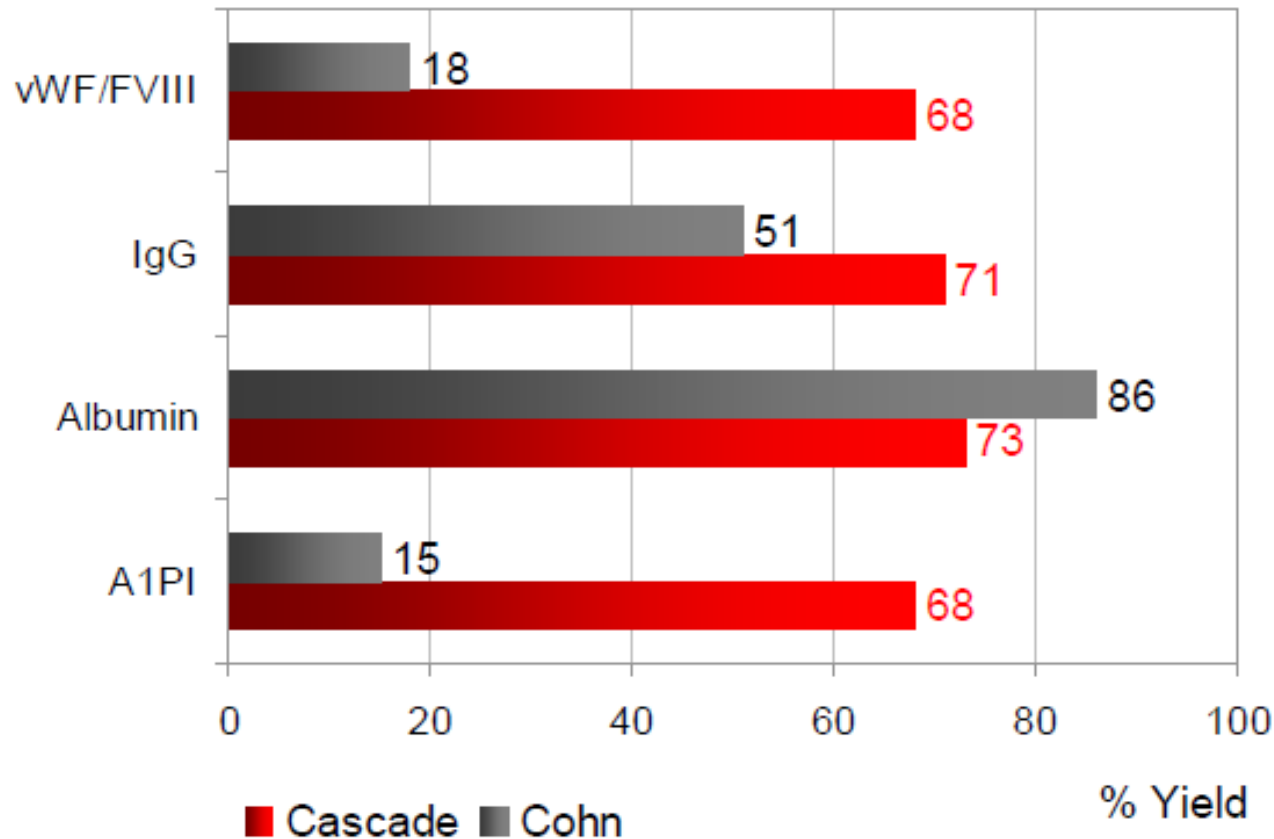
مقارنة بين أنماط مختلفة من طرق الاستشراب اللوني

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