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:

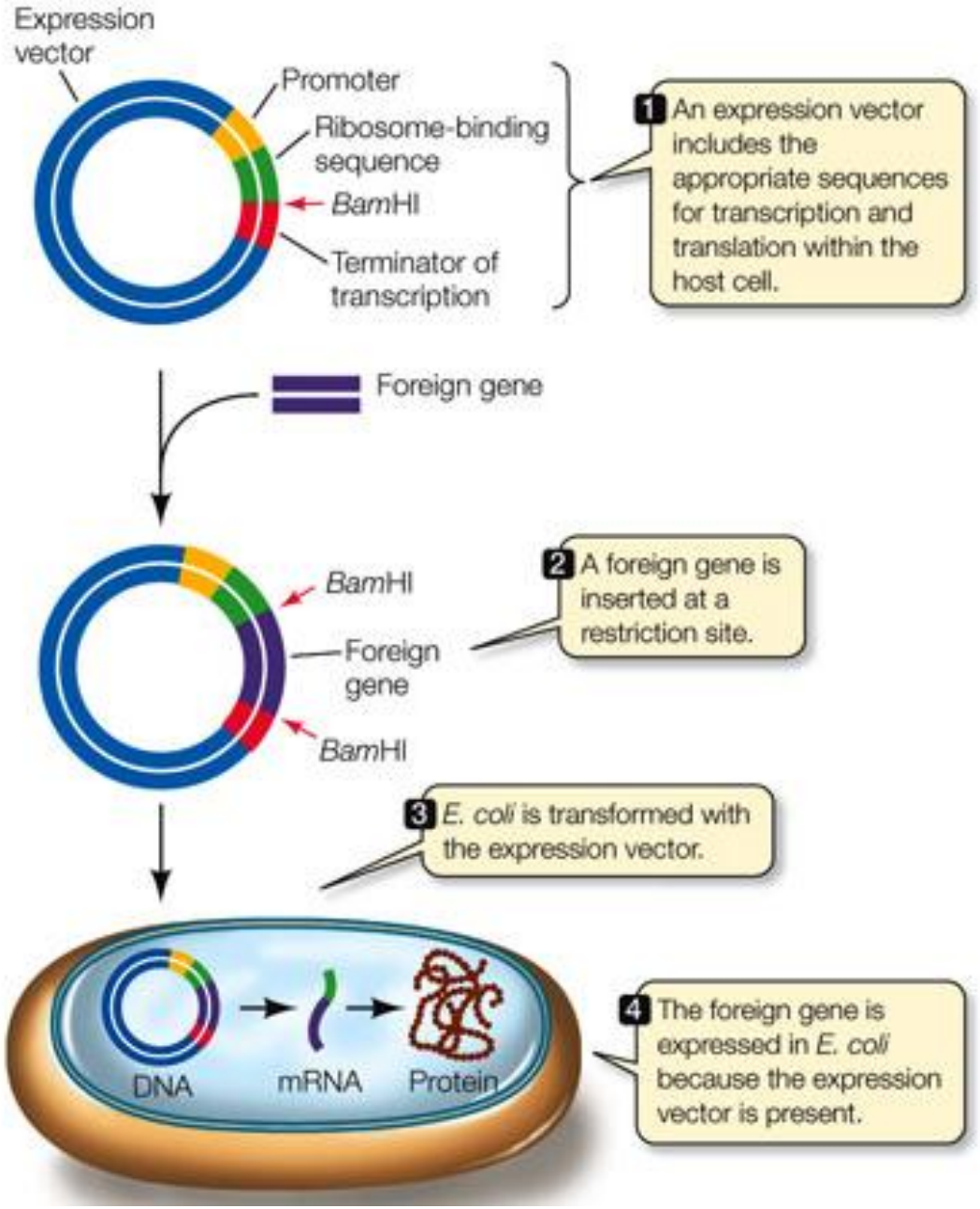
التعرّف على المنظومات المستخدمة للتعبير عن البروتينات protein expression systems لإنتاج البروتينات المأشوبة

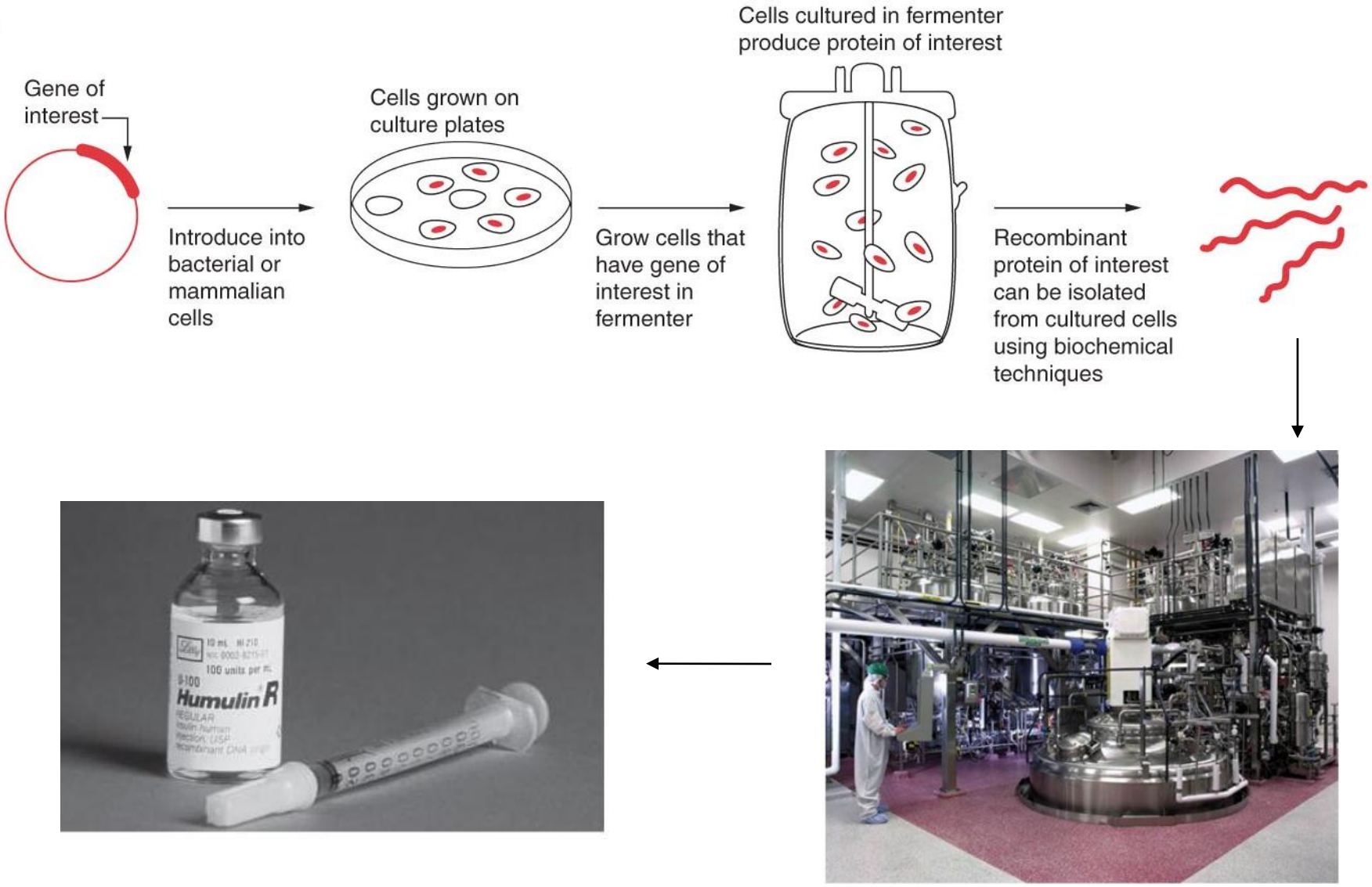
منظومات التعبير عن البروتينات المؤشبة

II. إنتاج البروتينات المأشوبة

- إن البروتينات المأشوبة هي أرخص وأكثر وفرة وأماناً من معظم البروتينات المستخلصة
- يتضمّن إنتاج البروتينات المأشوبة 6 خطوات هي:

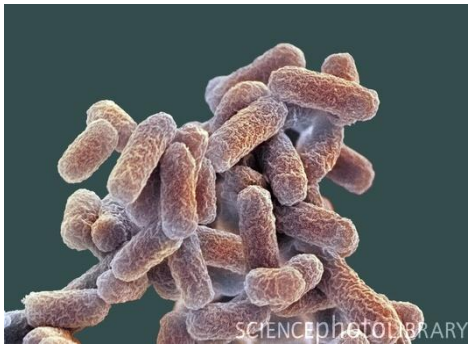
1. عزل المورثة الخاصة بالبروتين
2. غرس المورثة في ناقل (بلازميد) مناسب للتعبير الجيني
3. استحالة الجراثيم بالبلازميد
4. نمو الخلايا بطريقة التخمير Fermentation
5. عزل وتنقية البروتين المأشوب
6. صياغة الشكل الصيدلاني للبروتين الدوائي




Gene of interest
Introduce into bacterial or mammalian cells
Cells grown on culture plates
Grow cells that have gene of interest in fermenter
Cells cultured in fermenter produce protein of interest
Recombinant protein of interest can be isolated from cultured cells using biochemical techniques
Humulin R
100 units per mL

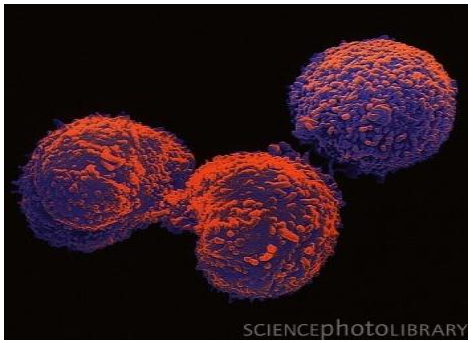
يمكن نظرياً تحضير البروتينات الدوائية في أي من الكائنات المعدّلة وراثياً

Bacteria



Yeast

Mammalian cells



- وتوجد عدة منظومات للتعبير الجيني هي:
- *Escherichia coli* and other bacteria
- *Pichia pastoris* and other yeasts
- Baculovirus (with insect cells)
- Mammalian cell culture
- Plants
- Animals
- Cell free

مقارنة منظومات التعبير الجيني الثلاث الأهم لإنتاج البروتينات المأشوبة

Protein Feature	Prokaryotic	Eukaryotic	Eukaryotic
	Bacteria	Yeast	Mammalian
Concentration	High	High	Low
Molecular weight	Low	High	High
Secretion	No	Yes/No	Yes
Folding	Incorrect	Correct	Correct
Glycosylation	No	Incorrect	Correct
Retrovirus	No	No	Possible
Contamination	Endotoxin	Low risk	Viruses
Production Quality	Low	Moderate	High
Scale-Up Capacity	High	High	Low

يجري اختيار منظومة التعبير الجيني وفقاً لحجم البروتين وخصائصه

- Choice depends on size and character of protein
  - Large proteins (>100 kD)? Choose eukaryote
  - Small proteins (<30 kD)? Choose prokaryote
  - Glycosylation essential? Choose baculovirus or mammalian cell culture
  - High yields, low cost? Choose *E. coli*
  - Post-translational modifications essential? Choose yeast, baculovirus or other eukaryotes

أمثلة على البروتينات الدوائية المنتجة في منظومات تعبير جيني مختلفة

Type	Examples	Comment
Bacteria	Insulins	No glycosylation Short cycle time
Yeast	Growth factors	Modified glycosylation
Mammalian cells	Antibodies	Mammalian glycosylation Long cycle time
Goats	AT III	Very long cycle time Cost effective at large scale.

تختلف طرائق الزرع وإكثار الخلايا حسب الغاية وكمية البروتين المرغوبة

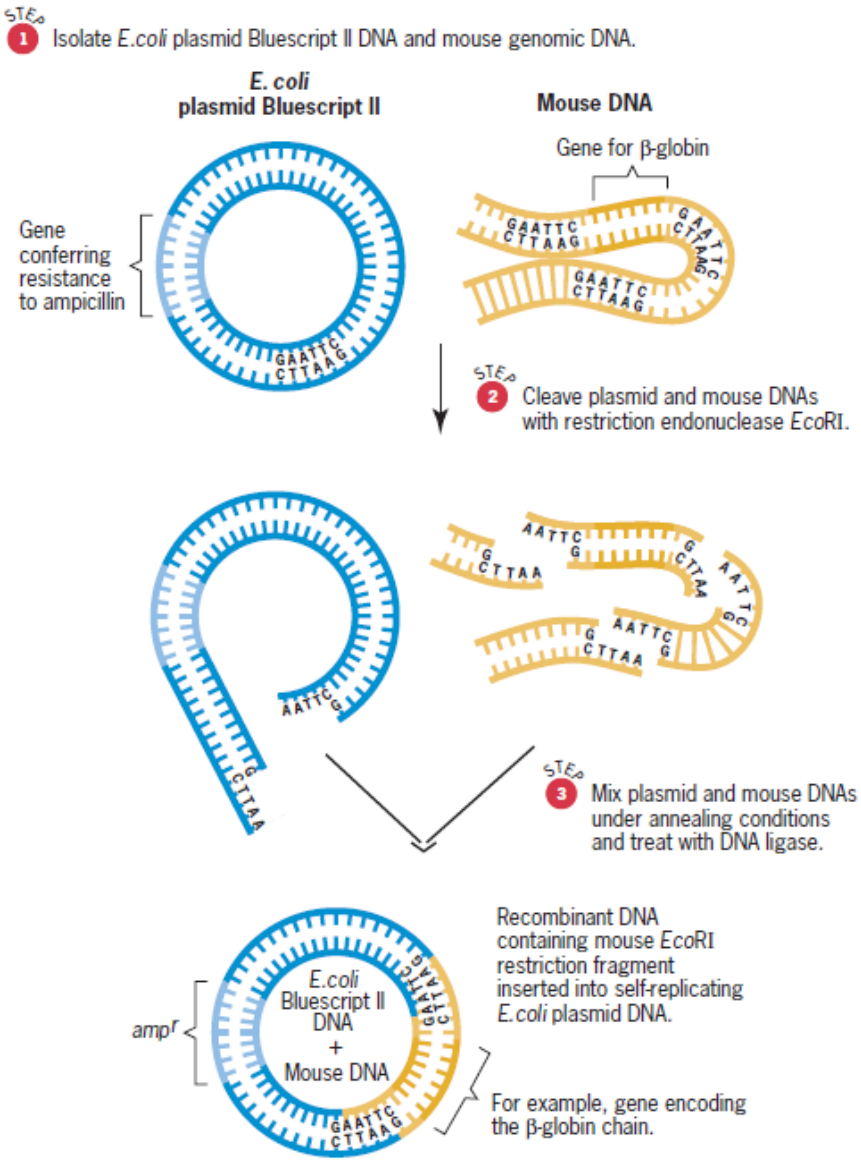
- ويكتفى عادة بإكثار الخلايا بفلاسكات الزرع للأغراض البحثية، بينما تستخدم المخمّرات Fermentors والمفاعلات الحيوية Bioreactors لإكثار الخلايا في أحجام أكبر والحصول على كميات متوسطة (المخمرات) أو كبيرة (المفاعلات الحيوية) من البروتينات.
- تستخدم أوساط عديدة يلائم كل منها نوعاً محدداً من الخلايا، مثال:
  - الجراثيم (Luria Broth, LB medium)
  - الخلايا الثديية (Dulbicco's Modified Eagle Medium, DMEM+ Fetal Bovine Serum, FBS)

الخطوات اللاحقة لاستحالة الجراثيم

- الغربلة بيضاء – زرقاء Blue-white screening
- انتقاء المستعمرات إيجابية التنسيل
- حل الخلايا الجرثومية في المستعمرات إيجابية التنسيل
- تطبيق تفاعل PCR مباشرة على محلول الخلايا الجرثومية (Colony PCR) وترحيل نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي للكشف على المستعمرات إيجابية التنسيل
- اختيار المستعمرات إيجابية تفاعل PCR وتكثير الخلايا وعزل البلاسميد منها ثم إجراء تفاعل قطع باستخدام إنزيمات التقييد للتأكد الأخير من وجود القطعة المنسلة.
- القيام بمقايسة التعبير عن البروتين المأشوب

غربلة المستعمرات الجرثومية

A



B

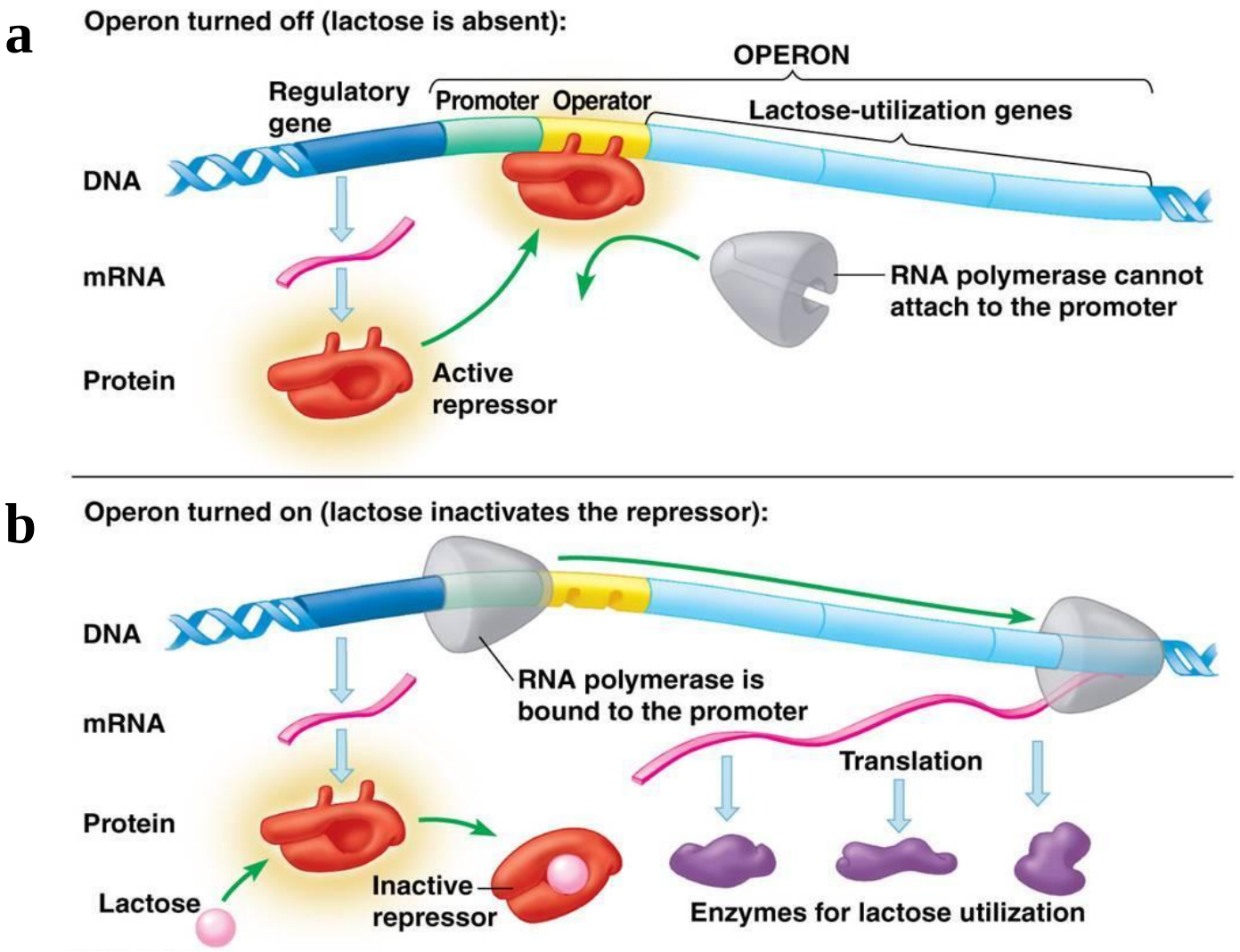
Antibiotic Resistance Screening

- Most cloning vectors carry an ampicillin resistance gene (ampr), and will confer ampicillin resistance to the E. coli cells if the transformation process was successful.
- This would mean that when the clones are plated out on ampicillin-containing medium, only cells containing a plasmid would be resistant to the antibiotic and, therefore, be able to grow.
- However, this does not show whether the cell contains the recombinant plasmid (with the inserted gene of interest) or only the re-ligated vector (without the inserted gene of interest).

Blue-White Screening

- This method also involves the insertional inactivation of a gene and uses the production of a blue compound as an indicator . The gene is ***lacZ***, which encodes the enzyme ß-galactosidase, and is under the control of the *lac* promoter.
- If the host *E. coli* strain is expressing the lac repressor, expression of a *lacZ* gene on the vector may be induced using IPTG (isopropyl- ß-D-thiogalactopyranoside), and the expressed enzyme can utilize the synthetic substrate X-gal (5-bromo-4-chlore-3-indolyl- ß-D-galactopyranoside) to yield a blue product.

Lac Operon


a
Operon turned off (lactose is absent):
OPERON
Regulatory gene
Promoter
Operator
Lactose-utilization genes
DNA
mRNA
Protein
Active repressor
RNA polymerase cannot attach to the promoter
b
Operon turned on (lactose inactivates the repressor):
DNA
mRNA
Protein
Lactose
Inactive repressor
RNA polymerase is bound to the promoter
Translation
Enzymes for lactose utilization

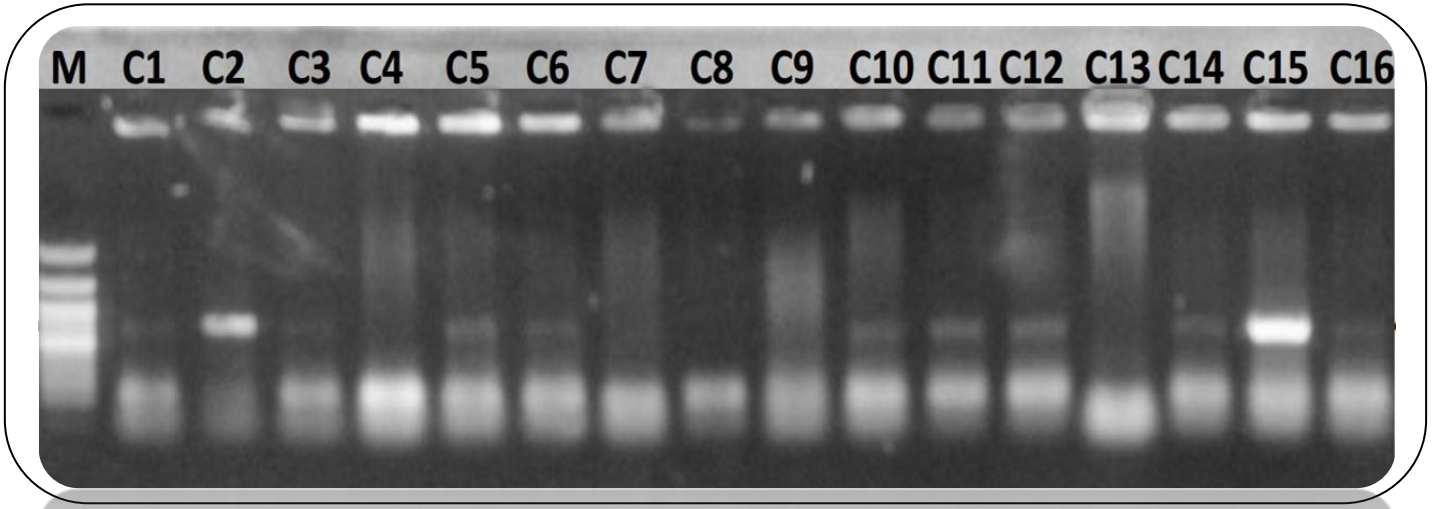
Blue-White Screening

- Insertion of a DNA fragment into the *lacZ* gene (insertional inactivation of *lacZ*) in the production of a recombinant plasmid would prevent the development of the blue colour.
- In this method, the transformed cells are spread onto a plate containing an antibiotic (to select for transformants in the usual way), IPTG and X-gal, to yield a mixture of blue and white colonies. The white colonies have no expressed ß-galactosidase and are hence likely to **contain the inserted target fragment**. The blue colonies probably contain religated vector.

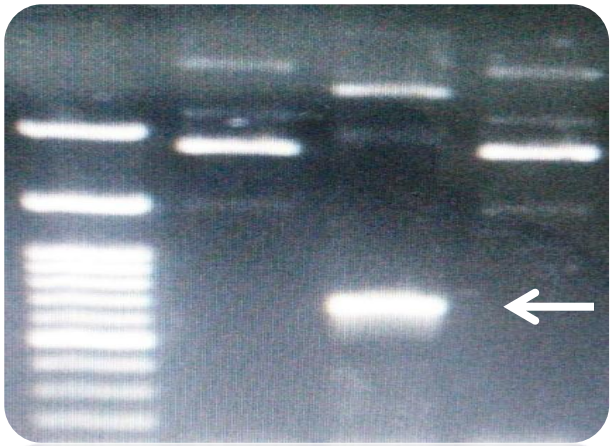
الخطوات اللاحقة للتنسيل

- الغربلة بيضاء – زرقاء Blue-white screening
- انتقاء المستعمرات البيضاء
- حل الخلايا الجرثومية
- تطبيق تفاعل PCR مباشرة على محلول الخلايا الجرثومية (Colony PCR) وترحيل نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي للكشف على المستعمرات إيجابية التنسيل
- اختيار المستعمرات إيجابية تفاعل PCR وتكثير الخلايا وعزل البلاسميد منها ثم إجراء تفاعل قطع باستخدام إنزيمات التقييد للتأكد الأخير من وجود القطعة المنسلة.
- القيام بمقايسة التعبير عن البروتين المأشوب

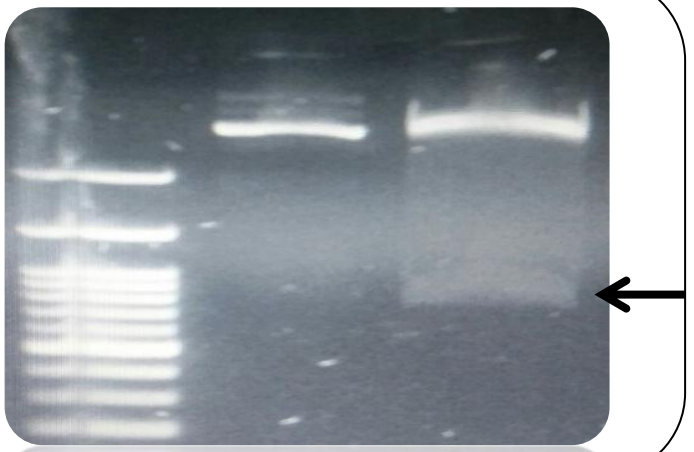
Colony PCR



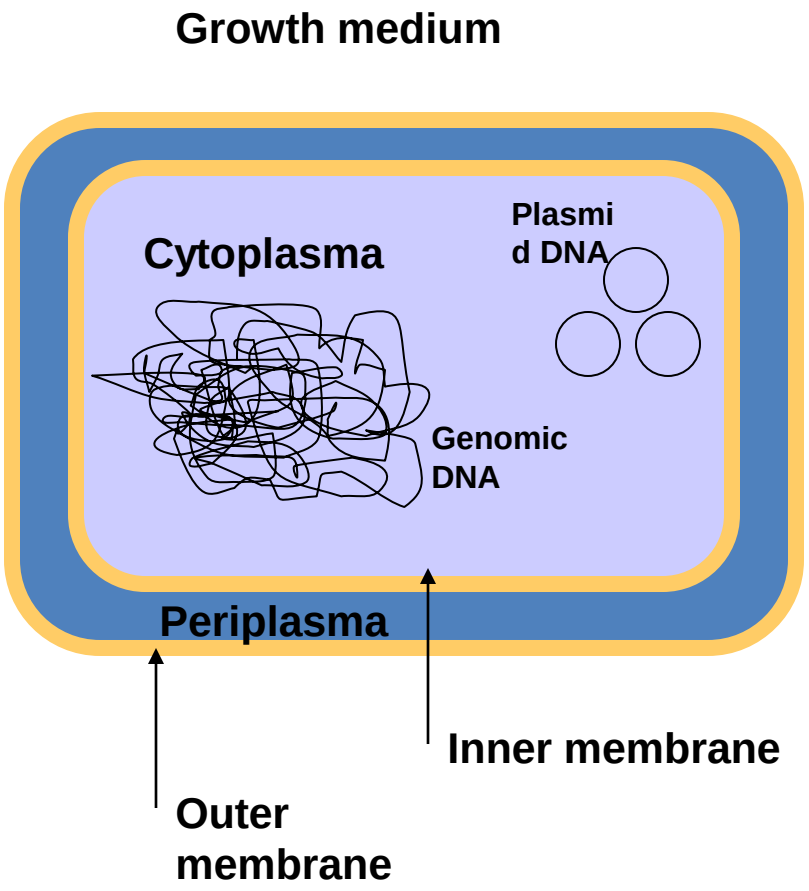
Plasmid PCR



Restriction



Protein expression in Bacteria (Choice of E.coli compartment)



Cytoplasmic expression

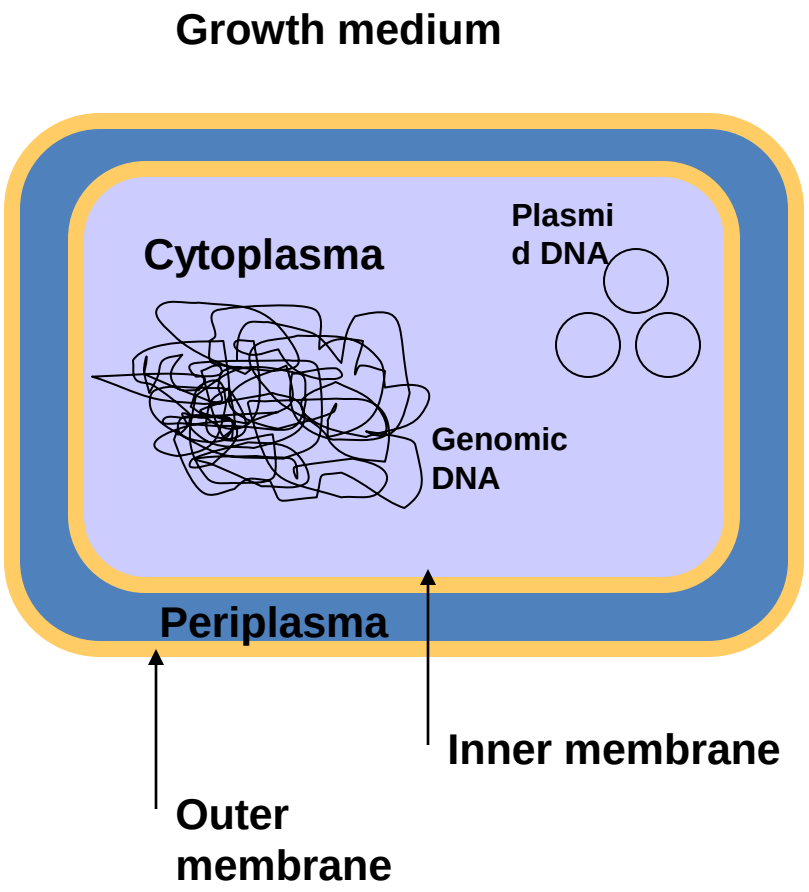
Advantages:

- **No need for signal sequences,**
- **High concentration of expressed proteins**

Disadvantages:

- **Formation of inclusion bodies**
- **(No disulfide bond formation) (reducing environment),**
- **Protein instability,**

Protein expression in Bacteria (Choice of E.coli compartment)



Periplasm

Advantages

- **Improved folding (no inclusion body formation)**
- **Disulfide bridge formation (oxidizing environment)**
- **Less protein degradation.**

Disadvantages.

- **Low protein concentration due to inefficient transport and small compartment**

يجب الانتباه إلى أن يستخلص البروتين المنتج من الخلايا في نهاية طور النمو الأسّي exponential وبداية الطور الثابت حيث يكون نمو الخلايا أعظمياً وإنتاج البروتين في حدّه الأعلى (عادةً عند الكثافة الضوئية OD 0.6 لمعلّق الخلايا)، بينما ينخفض الإنتاج بشكل هام في نهاية الطور الثابت لنمو الخلايا