كلية: الصيدلة	مقرر: التقانة الحيوية الصيدلانية
الرمز: PHR718	مدرس المقرر: د. رنا العجوري

المحاضرة الأولى

مقدمة في التقانة الحيوية Introduction in Biotechnology

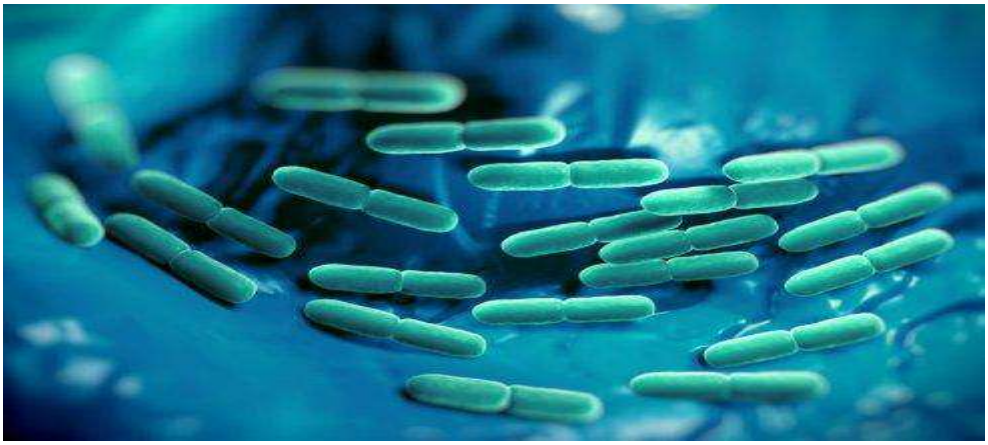
لكل علم من العلوم مراحل تطور متتالية عبر العصور ولعل الذي يثير الجدل من العلوم اليوم هو علم التقانة الحيوية Biotechnology والإسم الشائع له التكنولوجيا الحيوية، يظن الكثير بأنه علم حديث إلا أنه يرجع إلى العصور القديمة حيث استخدمه المصريون القدماء منذ حوالي 4000 سنة قبل الميلاد عندما استخدموا الخميرة في إنتاج الخبز، ومع ذلك ظهر مصطلح التقانة الحيوية لأول مرة في عام 1919 بواسطة المهندس المجري Karl Ekry والذي يشير إلى إنتاج المنتجات (غذاء،مشروبات،مواد كيماوية) من المواد الخام بمساعدة الكائنات الدقيقة وهو مايشار إليه الآن بالتقانة الحيوية التقليدية وبدخول الهندسة الوراثية بدأ عصر التقانة الحيوية الحديثة.

Biotechnology أو التقانة الحيوية بالتعريف هي" أي تطبيق تقاني يستخدم الكائنات الحية (جراثيم، فطور، خمائر ، نباتات، حيوانات) أو الأنظمة الحية (خلايا وأنسجة) أو الجزيئات البيولوجية (مثل الأنزيمات ،الأضداد....) لصنع منتجات جديدة أو تحويرها او إجراء عمليات محددة من أجل إستخدامات معينة مما يعود بالفائدة على الإنسان مثل إنتاج لقاحات لأمراض لم يكن لها علاج من قبل ، زيادة إنتاج الغذاء.... "

يتكون مصطلح Biotechnology من مقطعين الأول (-Bio) و هو مشتق من الكلمة اللاتينية "Bios" بمعنى الحياة أمّا الثاني Technology بمعنى الطريقة المنظمة لعمل الأشياء ولعل الذي أثار الجدل بين الكثيرين هو وجود كلمة Technology مدمجة مع كلمة Bio حيث أننا اعتدنا أن التكنولوجيا مدمجة ومرتبطة بالصناعات غير الحية لذلك سوف نفسر ذلك المصطلح من خلال المثال التالي:

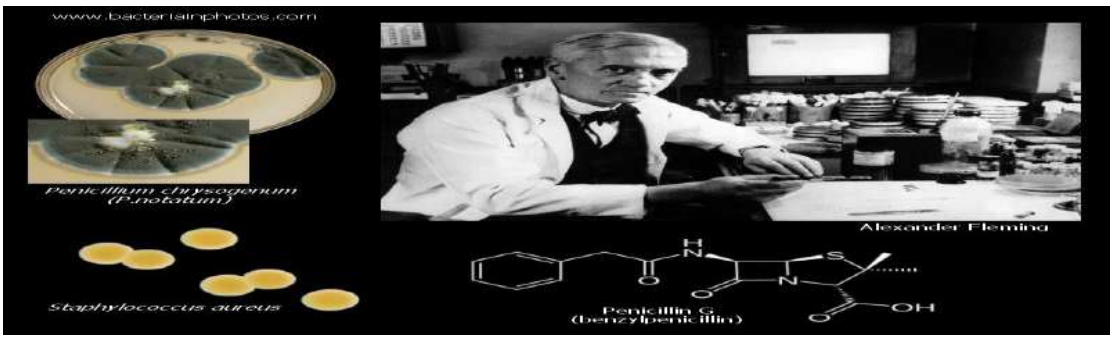
لنتصور أن لدينا مصنع لإنتاج السيارات وهذا نظام صناعي يحتاج إلى مدخلات كرقائق المعدن، الإطارات، أقمشة المقاعد، الزجاج، نظام كهربائي وغيرها ، ليعطينا المنتج النهائي وهو السيارة وكل هذا يحتاج إلى عمال فنيين لتجميع تلك الأدوات لتصنيع السيارة ، فماذا إذا استبدلنا مصنع السيارات بمصنع إنتاج السكر؟ سيكون نبات قصب السكرهو الأساس نفسه ولن يحتاج إلى مدخلات صناعية لإنتاج السكر بل إلى مدخلات طبيعية كضوء الشمس، الماء، غاز ثاني أكسيد الكربون، حيث يقوم النبات باستهلاك كل ذلك ليعطينا السكر و بالتالي هو عبارة عن مصنع بيولوجي (حيوي) ولا يقتصر إنتاجه على السكر فقط بل ويُستَخرج من بقايا قصب السكر بعد عصره التفل الذي يُستخدَم في صناعة الورق أو يتم كبسه وصناعة الخشب الحبيبي مما يعني إمكانية استخدام المنظومات الحية لاغراض غذائية، دوائية ، صناعية .....

لا يعني المثال السابق أن التقانة الحيوية تقتصر على استعمال الكائنات الكبيرة فقط ولكن يمكن أيضاً استعمال الكائنات الدقيقة Micro organism وكمثال على ذلك بكتريا حمض اللبن Lactic aid bacteria التي تفكك سكر اللاكتوز (الحليب) إلى سكر الغلوكوز وسكر الغالاكتوز وينتج حمض اللبن الذي يساهم في زيادة الحموضة ومن ثم حصول التخثر لبروتين الحليب (الكازين)، فيتحول الحليب من الشكل السائل إلى الشكل الهلامي



التقانة الحيوية قديماً وحديثاً – محطات مضيئة

استُخدم مفهوم التقانة الحيوية منذ آلاف السنين حين بدأ الإنسان يستشعر تجربة تلف الطعام نتيجة الإفساد الجرثومي ثم حَفظَه بالتجفيف أو التمليح أو إضافة السكر كما إستخدم الحيوانات والنباتات لإنتاج الغذاء والكساء والدواء ولقد توارثت مئات الأجيال مهارات إنتاج الأغذية مثل الخل واللبن والجبن وفي ذلك الوقت كانت طرق انتاج الأغذية مفهومة بشكل جيد لكن طريقة عمل الأحياء الدقيقة وميكانيكية التفاعلات الكيميائية الحيوية لم تكن معروفة، ولم يحصل اكتشاف دورالأحياء الدقيقة الإيجابي في تلك الصناعات إلا في القرن الثامن عشرعندما اكتشف العالم الفرنسي لويس باستور بكتريا حمض اللبن Lactic acid bacteria عام 1856 حيث اثبت أن التغيرات الكيميائية الحاصلة نتيجة عملية التخمر أثناء صناعة الأطعمة تقوم بها الكائنات الحية ، ومن المحطات المضيئة في تطور التقانة الحيوية عبر التاريخ هو اكتشاف العالم ألكسندر فلمنج عام 1928 فطر عفن البنسليوم Penicillium notatum والحصول منه على البنسلين



في عام 1940 تم إنتاج أول مستحضر نقي من هذا الصاد الحيوي باستعمال مزارع مسطحة لنموه ولكن من مساوئها أنها سهلة التلوث بأحياء مجهرية أخرى بالإضافة إلى حاجتها إلى جهد كبير للعناية مما دفع الباحثين إلى ايجاد ظروف معقمة للإنتاج وذلك بوضع وسط النمو في خزانات يسهل تحريك محتوياتها وضخ هواء معقم إلى الخزان وتوزيعه خلال وسط النمو من خلال التحريك المستمر لتزويدها بالأكسجين الضروري للنمو، حصل التطور الكبير في مفهوم التقانة الحيوية في الستينيات من القرن الماضي نتيجة اكتشاف المادة الوراثية DNA بتفاصيلها الدقيقة (الصبغيات ، المورثات، الأسس الآزوتية) و كيفية ترميز المورثات للبروتينات ، أما المحطة الأكثر أهمية للتقانة الحيوية بدأت مع تطور تقانات التعامل مع DNA ودخول العلوم الحيوية عصر تقانة DNA المأشوب recombinant DNA technology حيث تم استخدام بعض الكائنات الحية الدقيقة كمصانع حيوية لإنتاج البروتينات العلاجية مثل اصطناع الأنسولين بالاعتماد على الجراثيم وذلك عن طريق تأشيب بلاسميد الجرثوم بالمورثة البشرية المسؤولة عن اصطناع الأنسولين وبالتالي مع تضاعف بلاسميد الجرثوم وتعبيره عن هذه المورثة سنحصل في النهاية على الأنسولين.

مبدأ التقانة الحيوية

في التقانة الحيوية نحن بحاجة دوماً إلى:

كائن حي (هو أي كائن حي قادر على نقل أو مضاعفة المادة الوراثية مثل الجراثيم)

أو منظومة حيوية (سواء كانت الخلايا بمختلف انواعها أو مشتقاتها مثل بعض التراكيب الخلوية و منتجاتها مثل البروتينات والهرمونات والفيتامينات وغيرها....)

وتقانات تستخدم الكائنات الحية أو مشتقاتها في عمليات التصنيع لخلق منتجات جديدة أو تعديلها والتي تكون في النهاية ذات فائدة للإنسان

وبالتالي لنطلق على عملية ما أنها تقانة حيوية يجب توافر شرطين أساسيين

استخدام كائن حي أو منظومة حيوية +الحصول على منتج

التقانة الحيوية والعلوم الأخرى

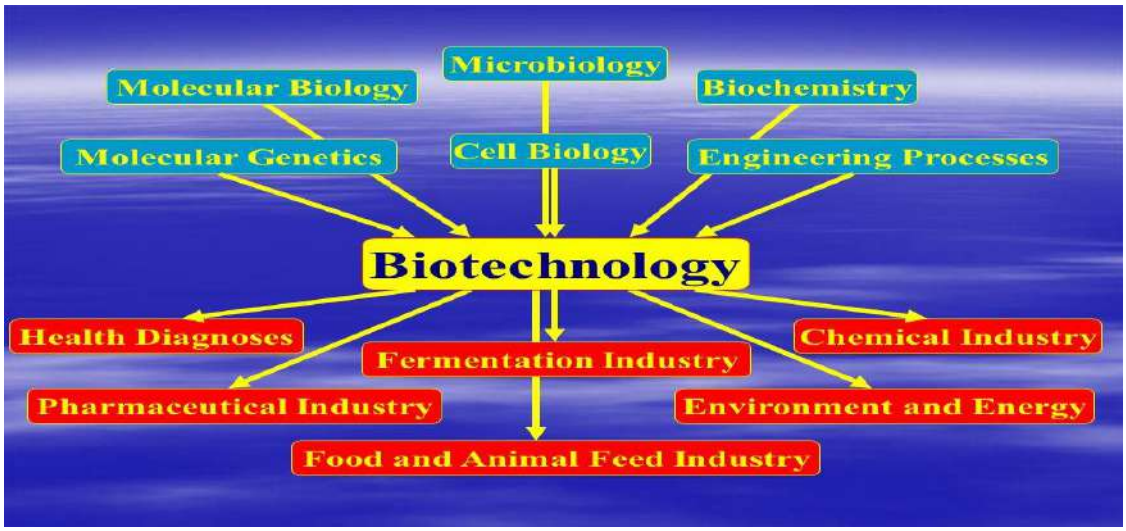
لأن التقانة الحيوية كانت دائماً علماً تطبيقياً فقد اتسع هذا العلم في أواخر القرن العشرين وبدايات القرن الحادي والعشرين ليشمل العلوم والمفاهيم الجديدة مثل الهندسة الوراثية والوراثة الجزيئية* وتطبيقاتهما: حيث تعتمد الهندسة الوراثية على التحكم بالمورثات بطريقة تسمح بظهور صفات جديدة مفضلة في الكائن الحي لم يكن يمتلكها من قبل أو أنها تزيل صفات غير مرغوبة كانت موجودة لدى الكائن الحي أصلاً أو تسمح بالإستفادة منها في إنتاج مواد أو توفير خدمات محددة،

حتى نستطيع استخدام التقانة الحيوية يجب أن نكون على معرفة واسعة بالعلوم الأخرى مثل الكيمياء الحيوية وبيولوجيا الخلية* وعلم الجنين و كذلك علم الجراثيم والفيروسات والتي تعد الركيزة الأساسية التي تعتمد عليها التقانة الحيوية، فمثلاً عند استخدام جرثوم ما لتصنيع بروتين معين نحتاج لأن نكون على معرفة واسعة بتسلسل مادته الوراثية وكيفية إدخال المورثة المرمزة للبروتين المطلوب إلى بلاسميده وأنزيمات التقييد المناسبة ، وكذلك معرفة ظروف تكاثره المثلى كالأوساط والمغذيات التي يحتاجها.

الوراثة الجزيئية* Molecular genetics : هو العلم الذي يدرس بنية المورثة وتركيبها ، وظيفتها، آلية تضاعفها والتعبير المورثي، تسلسل أسس الـDNA وكيفية حدوث الطفرات على المستوى الجزيئي.

بيولوجيا الخلية* Cell Biology: هو العلم الذي يُعنى بدراسة جميع مكونات الخلية الحية ووظائفها والتنسيق فيما بينها لتؤدي الخلية مهامها على أكمل وجه.

الأحياء الدقيقة* Microbiology : هو العلم الذي يدرس بنية ووظيفة الأحياء الدقيقة كالجراثيم والفيروسات.



أسباب تطور التقانة الحيوية

- إن العديد من الصناعات الكيماوية تُنتج مركبات غير مرغوب بها ونحن بحاجة إلى التخلص منها لتأثيرها السلبي على المنتَج وبالتالي تؤدي إلى زيادة كلفة العملية التصنيعية أما التفاعلات الحيوية هي تفاعلات متخصصة تجاه الهدف المطلوب ولاينتج عنها مركبات غير مرغوب بها في أغلب الاحيان، يضاف إلى ذلك أن الطاقة الكلية اللازمة لحدوث التفاعل الحيوي أقل من الطاقة االلازمة لحدوث التفاعل الكيميائي
- تكون المواد الناتجة عن التفاعلات الحيوية تقريباً نقية وتحتاج إلى عمليات استخلاص وتنقية بسيطة في حين أن عمليات الاستخلاص والتنقية تكون ذات كلفة عالية في التفاعلات الكيميائية بسبب إنتاج العديد من المركبات الوسطية والتي يكون البعض منها غير مرغوب فيه
- تكون المواد الاولية المستعمَلة في التصنيع الحيوي رخيصة وهي من المصادر المتجددة ويتم من خلال عمليات التصنيع الإستفادة من هذه المواد والتخلص من مشاكل تلويثها للبيئة

التقانة الحيوية وتطبيقاتها في مجالات الحياة

يمكن تقسيم تطبيقات التقانة الحيوية في أربعة مجالات رئيسية:

- المجال الزراعي والإنتاج الحيواني
- المجال الطبي
- المجال البيئي
- المجال الصناعي

أولاً في المجال الزراعي والإنتاج الحيواني:

في مجال تطوير المحاصيل الزراعية يتم استخدام التقانة الحيوية للحصول على نباتات محورة (معدلة) وراثياً والتي يمكن تعريفها بأنها تلك النباتات المطورة عن طريق إدخال مورثات غريبة إليها لتحسين صفاتها الوراثية مثل:

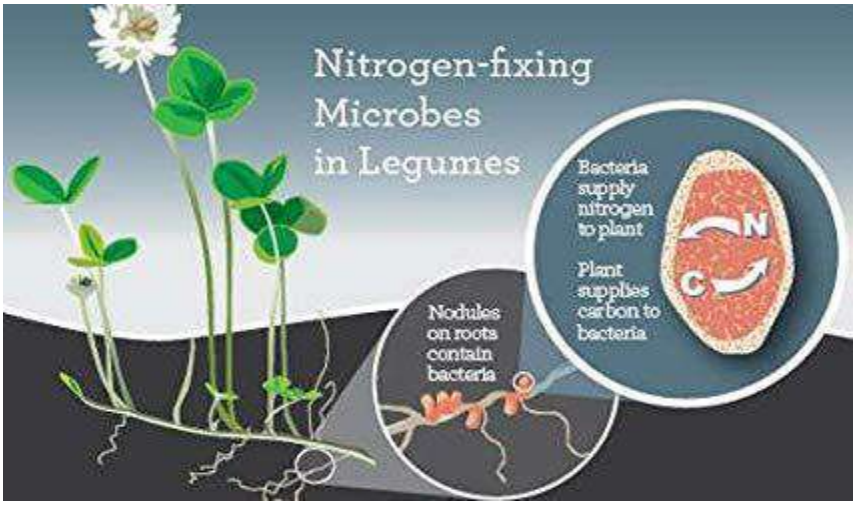
✓ إنتاج نباتات محورة وراثياً مقاومة للمبيدات العشبية حيث أن الأعشاب تنافس النباتات الإقتصادية على الماء والغذاء وضوء الشمس مما يجعل المحصول يقل عادةً بنسبة 70% كما إنها تشكل مأوى للأمراض والآفات بالإضافة إلى أن تواجد بذورها مع غلال المحاصيل الإقتصادية يقلل من قيمتها

ويزيد من تكاليف التنظيف والتنقية ، وقد مكنت المحاصيل المقاومة للمبيدات العشبية المزارعين بأن يقضوا بشكل انتقائيّ على الأعشاب الضارّة المجاورة دون التأثير على محاصيلهم وقد استخدمت نباتات مقاومة لمبيدات الحشائش أول مرّة عام 1998 حين تمّ استخدام نباتات فول صويا محوّرة وراثياً وهذه النباتات لا تتأثّر بالتراكيز العالية من المبيدات العشبيّة المستخدمَة ممّا يسمح بتطبيقها بكمّيّات كبيرة للتخلّص من الأعشاب الموجود في الحقل.

ماهي فكرة النباتات المقاومة للمبيدات العشبية؟

تعتمد فكرة هندسة نباتات مقاومة للمبيدات العشبية على زيادة قدرة النباتات على تحمُل مادة glyphosate وهي المادة الفعالة في مبيد الأعشاب المسمى الراوند اب الواسع الإنتشار في مقاومة الأعشاب عريضة الاوراق حيث تقوم المادة الفعالة بتثبيط عمل أنزيم ضروري لإنتاج الأحماض الأمينية العطرية التي تحتاجها النباتات في النمو وقد قام الباحثون بعزل مورثات تخليق أنزيم EPSP من الجراثيم ثم غرس تلك المورثات في فول الصويا والقطن وغيره من المحاصيل لتتمكن تلك النباتات من تحمل الراونداب وبنفس الوقت يتم التخلص من الاعشاب الضارة

- ✓ انتاج نباتات محورة وراثيا تتحمل الظروف البيئية القاسية حيث تعادل نسبة مساحات الأراضي الصالحة للزراعة 20% فقط من إجماليّ مساحة الأرض، إلا أنّه تم تطوير بعض النباتات لجعلها أكثر مقاومة للشروط القاسية كزيادة نسبة الملوحة في التربة، البرودة ، وقلة الماء.
- ✓ إنتاج نباتات محورة وراثيا ذات قيمة غذائية عالية حيث أمكن إنتاج نباتات تستطيع تثبيت الآزوت الجوي عن طريق نقل المورثات المسؤولة عن تثبيت الآزوت Nitrogen Fixation genes (nif) والموجودة في بكتريا Azetobacot التي تتطفل على جذور النباتات البقولية إلى نباتات الحبوب وغيرها من المحاصيل لزياد قيمتها الغذائية، كما سعى علماء الوراثة إلى إنتاج نباتات تتوفر فيها أحماض أمينية هامة لا يستطيع جسم الإنسان اصطناعها مثل الليسين والتربتوفان وذلك عن طريق عزل المورثات المسؤولة عن ترميز تلك الأحماض وغرسها في بعض النباتات



- ✓ إنتاج نباتات محورة وراثيا ذات جودة عالية مثل إنتاج ثمار الطماطم ذات اللون الأحمر المركز وذلك من خلال غرس المورثة High Pigment المسؤولة عن إنتاج الصبغات الملونة في الطماطم مثل صبغات الأنثوسيانين بكمية كبيرة بهدف زيادة تركيز الصبغة في الثمار وبالتالي يتم استخدام عدد أقل من الطماطم عند الطبخ

Detecting Genetically Modified Foods"

GMO Plants

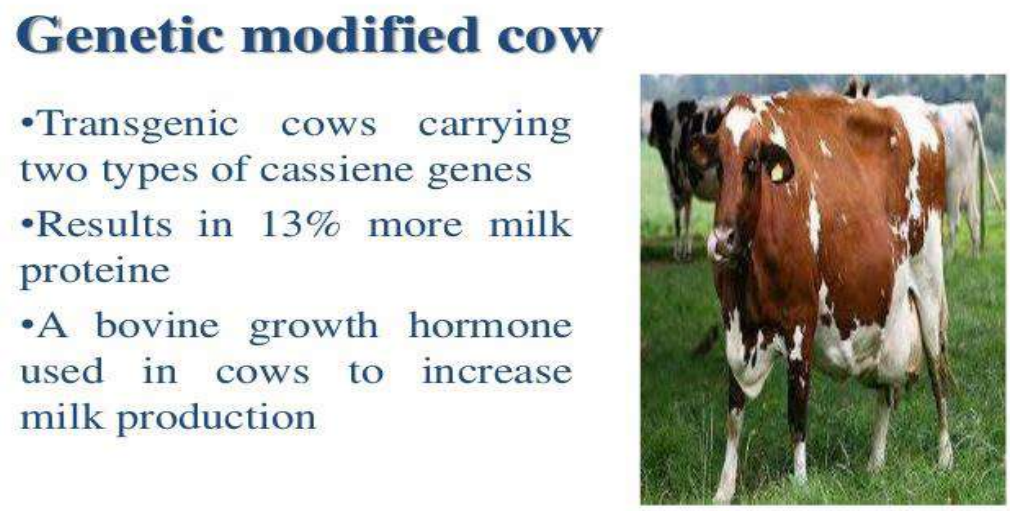
Flavr Savr tomato

- the first commercially grown genetically engineered food granted a license for human consumption
- Produced by the Californian company Calgene 1992
- Sold in 1994, and was only available for a few years before production ceased

- ✓ إنتاج نباتات محورة وراثيا مقاومة للأمراض والفيروسات والآفات وخاصة المحاصيل الاقتصادية مثل الأرز والذرة والقمح، وتعتمد فكرة هندسة النباتات المقاومة للفيروسات على الدراسات في مجال الوقاية بالتحصين والتي وجدت بأن عدوى النباتات بفيروسات ضعيفة تحصن النباتات إذا أصابتها السلالات الأكثر ضراوة وقد تم في عام 1990 نقل المورثة المسؤولة عن إنتاج الغلاف البروتيني لفيروس الدخان الموزاييكي في نبات الطماطم وقد عبرت هذه المورثة عن نفسها من خلال إنتاج بروتين الغلاف الفيروسي وقد قاومت النباتات الإصابة الفيروسية بشدة وبتلك التقانة أمكن هنسة أكثر من 12 ألف نبات مقاوم للفيروسات
- ✓ هناك تطبيقات إضافيّة للتقانة الحيويّة وهو تطبيق جماليّ بامتيازيتم فيه نقل المورثات المسؤولة في تحسين لون ورائحة وحجوم الأزهار بالإضافة إلى الكثير من الصفات الجمالية الأخرى.

في مجال الإنتاج الحيواني تتمثل أهمية التقانة الحيوية في:

- ✓ إنتاج حيوانات معدلة وراثياً ذات قدرة على مقاومة الأمراض وخاصة الفيروسية مثل الأبقار والأغنام والدجاج والأسماك
- ✓ المعالجة الجينية للحيوانات لزيادة سرعة نموها وذلك من خلال تزويدها بالمورثة الخاصة بهرمون النمو السريع وكذلك لزيادة قدرتها على إنتاج اللحم وتحسين خواصه وزيادة القدرة على إدرار الحليب
- ✓ إنتاج أغنام ذات صوف عالي الجودة
- ✓ زيادة الناتج من الثروة الحيوانية وذلك من خلال تقسيم جنين الماشية والحصول على توائم ثنائية وثلاثية ورباعية



ثانياً في المجال الطبي

ثمّة تطبيقات عديدة مهمة للتقانة الحيويّة في الطبّ انطلاقاً من ان المجال الطبي يلامس مباشرةً حياة الإنسان وخصوصاً في ميدان اكتشاف وإنتاج الأدوية الجديدة وفي تقنيّات علم الصيدلة الجيني وفي المعالجة الجينية.

- ✓ إن التطور في مجال الصناعات الدوائية له أبعاده الاقتصادية الكبيرة من حيث تطوير أنواع جديدة من الأدوية والمستحضرات الطبية اعتماداً على التقانة الحيوية وهندسة الجينات فمثلاً إنتاج الأنسولين البشري عام 1982 عن طريق الكائنات الدقيقة بعد إدخال جين الانسولين إلى داخلها أحدَثَ ثورة

كبيرة في علاج الداء السكري، وباستخدام التقانة نفسها أمكن إنتاج علاجات لكثير من الأمراض المستعصية والخطيرة التي كان يصعب علاجها

قامت شركة Genentech عام 1978 بتطوير إنتاج الأنسولين البشريّ من خلال إدخال جين الأنسولين ضمن بلاسميد ناقل ومن ثمّ إدخاله إلى جراثيم الإيشريكيا القولونيّة E-coli، في حين كان الأنسولين المستخدم بشكل واسع لعلاج الداء السكري يستخلص سابقاً من بنكرياس الأبقار والخنازير، وبذلك تمكّنت الجراثيم المحوّرة جينياً الناتجة من إنتاج كمّيّات كبيرة من الأنسولين البشريّ الصنعيّ بأسعار منخفضة نسبيّاً.

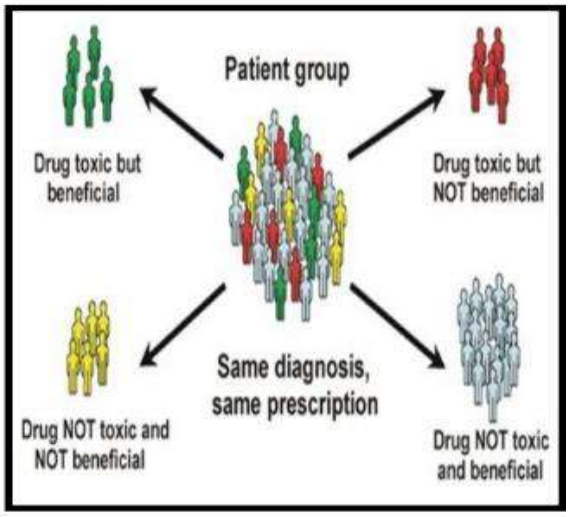
✓ علم الصيدلة الجيني pharmacogenomics

هو العلم الذي يقَيّم تأثير الإختلاف الجيني للمرضى على استجابتهم للأدوية وذلك من خلال دراسة الارتباط بين تغير النكليوتيد في موقع محدد من جهة (التعدد الشكلي وحيد النيكليوتيد SNP*) و بين فعاليّة أو سمّيّة الدواء من جهة أخرى مما يمكن من اقتراح أساليب منطقيّة من أجل تحسين نوعية المعالجة الدوائية للمريض بالنظر إلى النمط الجينيّ الخاص به، وكمثال على ارتباط علم الصيدلة الجيني مع الـ SNP قد نجد شخصين يعانيان من ارتفاع ضغط الدم بنفس النسبة وهما بنفس العمر والوزن ويتعالجان بنفس الدواء ولكن نلاحظ أن الشخص الاول يستجيب للدواء والثاني لا يستجيب وعند القيام بسَلسَلة نيكليوتدات المورثة المرمزة لمستقبلات هذا الدواء في الشخصين نجد أن الشخص الذي لا يستجيب لديه تغير في نكليوتيد واحد في المورثة أدى إلى تغير في حمض أميني واحد أثر على مستقبلات الدواء مما يستدعي تغيير الدواء أو زيادة الجرعة بشكل أكبر.

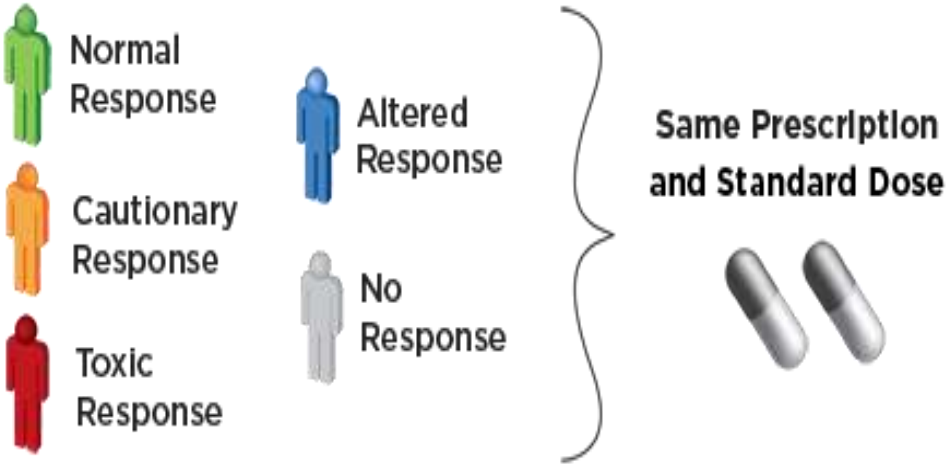
* التعدد الشكلي وحيد النيكليوتيد SNP* هو تغير في نكليوتيد محدد في الـ DNA و نسبة تواتره أكثر من 1% في السكان ولا يؤدي بالضرورة إلى مرض.

Anticipated benefits of pharmacogenomics

- Pharmacogenomics has the potential to provide tailored drug therapy based on genetically determined variation in effectiveness and side effects.
- More powerful medicines
- Better, safer drugs the first time
- More accurate methods of determining appropriate drug dosages



TRADITIONAL TREATMENT:



ا

- ✓ المعالجة الجينية Gene therapy تعتمد على مبدأ إدخال جين معينة إلى خلية معينة لتبدأ بعدها بإنتاج البروتين المطلوب وقد أُجريت أول تجربة معالجة جينية عام 1990 على طفلة تعاني من عوز موروث في أنزيم الأدينوزين دي أميناز ADA ويكون الأطفال في هذه الحالة معزولين بغرف عقيمة بسبب عدم قدرة الجهاز المناعي على القيام بوظيفته في حماية الجسم من الإنتانات الفيروسية والجرثومية ويدعى الأطفال المصابين بهذا العوز بأطفال الفقاعة buble boys وقد تمت المعالجة الجينية بنقل جين الأنزيم إلى الطفلة وحقنه في خلايا نخاع العظم الأم Stem cells بعد تحميله على الحامض النووي لنوع من الفيروسات غير الضارة وبذلك أنتتج الجهاز المناعي هذا الأنزيم وعاد إلى العمل مرة أخرى

ADA deficiency: The First clinical Trial

- September 14, 1990 @ NIH, French Anderson and R. Michael Blaese perform the first gene therapy trial.
- Ashanti (4 year old girl)

Her lymphocytes were gene-altered (~10⁹) ex vivo → used as a vehicle for gene introduction using a retrovirus vector to carry ADA gene (billions of retroviruses used).

- Cynthia (9 year old girl) treated in same year
- Problem: WBC are short-lived, therefore treatment must be repeated regularly.

Ashanti DaSilva

Effective method: treatment of stem cells from umbilical cord blood in infants

Culver, Anderson, and Blaese with gene therapy patients.

Andrew Gobea

- ✓ إنتاج لقاحات ضد الأمراض فى الإنسان مثل لقاح التهاب الكبد الفيروسي B
- ✓ تمكن العلماء من تكوين بكتريا تحتوي عل جينات الإنترفيرونات البشرية والإنترفيرونات هي بروتينات تعمل على وقف تضاعف الفيروسات المسببة لشلل الأطفال و الإنفلونزا وهي تُنتَخ داخل جسم الإنسان وتنطلق لمهاجمة الفيروسات وهي قد تكون مفيدة في علاج الإيدز والسرطان

<u>في مجال التداخل مابين العلاج والصحة كان للتقانة الحيوية دوراً كبيراً في:</u>

- إمكانية الحصول على إنتاج بيض ذو محتوى منخفض من الكوليسترول
- إمكانية إنتاج حليب به نسبة عالية من الكالسيوم
- إمكانية إنتاج زيوت نباتية غنية بالأحماض الدسمة غير المشبعة

إمكانية تخليق أطعمة محوّرة وراثيّاً تحمل عوامل مغذّية معروفة بأنّها تحارب أو تقلل الأمراض ومن الأمثلة على ذلك محصول الرزّ الذهبيّ الذي يحتوي على البيتا كاروتين وهو طليعة اصطناع الفيتامين A في جسم الأنسان مما يساعد الأشخاص الذين يتناولون هذا الرزّ على اصطناع المزيد من الفيتامين A

ثالثاً في المجال البيئي

تقوم بعض السلالات المحورة وراثياً من الكائنات الدقيقة بتحليل المواد السامة وغيرها من المواد الملوثة للتربة مثل البترول ومشتقاته مما يساهم في تقليل التلوث البيئي حيث يتم وضعها ضمن الوسط الملوث وبشروط مناسبة لتكاثرها فتقوم بدورها بتفكيك المواد الملوثة، والمفيد في الأمر أن الكائنات المحورة المستخدَمة لهذا الغرض يمكن أن تترك للعيش بشكل طبيعي في البيئة خاصة أماكن الملوثات وتقوم بدورها دون أي ضرر، تُستخدَم هذه الطريقة أيضاً في معالجة مياه الصرف الصحي أو فضلات المصانع الكيميائية قبل طرحها إلى البيئة كما تستخدم هذه التقنية في حال تسرب النفط إلى البحار أو المحيطات الأمر الذي يؤدي إلى تلوث المياه والقضاء على الحياة البحرية مكان التسرب، ويتم التخلص من بقع النفط المتسربة بعضويات دقيقة كالجراثيم القادرة على تفكيك النفط وبالتالي الوقاية من التلوث الحاصل.

رابعاً في المجال الصناعي

تحول إنتاج العديد من من المواد الكيميائية من التصنيع الكيميائي إلى التصنيع الحيوي مثل الأسيتون وحمض الستريك وحمض الخليك وغيرها، كما تم انتاج الكثير من المحفزات الحيوية كالأنزيمات وكذلك تحوير الأنزيمات الحالية لتكون أكثر فعالية مثل:

-الأنزيم المفكك للكربوهيدرات carbohydrases

-الأنزيمات المحللة للبروتينات proteases

-الأنزيمات المحللة للبيبتيدات

كما تم استخدام التقانة الحيوية في عملية التصفية الحيوية Bio Leaching وهي عملية يتم فيها استخدام الأحياء الدقيقة في عمليات استخلاص المعادن الخام كالذهب وذلك بشكل حجر حاوي على المعدن المراد استخلاصه بالإضافة للعديد من الشوائب وتعد هذه الطريقة أفضل وأكثر قدرة على التخلص من الشوائب من الطرق الأخرى.

التقانة الحيوية والطاقة

تتمثل مصادر الطاقة غير المتجددة على الأرض بالبترول الذي سوف ينضب بعد فترة من الزمن لذلك كان لا بد من ايجاد حلول بديلة تمثلت بالوقود الحيوي Bio Fuels وهو الوقود المنتَج بالاعتماد على كائنات حية لذلك سمي بالحيوي ويتم انتاجه في محطات خاصة وذلك بالاعتماد على المخلفات العضوية ووجود جراثيم خاصة بشروط معينة حيث يتم تفكيك المواد العضوية والحصول في النهاية على الإيثانول وغاز الميتان اللذان يستخدمان كمصدر مهم للطاقة

تصنيف التقانة الحيوية

تبعاً للمجالات التي تُطبَق فيها التقانة الحيوية فقد تم تصنيفها كمايلي:

- التقانة الحيوية الحمراء Red Biotechnology
- التقانة الحيوية الخضراء Green Biotechnology
- التقانة الحيوية البيضاء White Biotechnology
- التقانة الحيوية الزرقاء Blue Biotechnology
- **التقانة الحيوية الحمراء**

تشمل التطبيقات في المجال الطبي ومن الأمثلة عليها: استخدام الهندسة الوراثية لمعالجة الأمراض (العلاج الجيني) و إنتاج الصادات الحيوية من قبل الأحياء المجهرية وكذلك إمكانية إنتاج أدوية خاصة بالمحتوى الجيني لفرد ما

- **التقانة الحيوية الخضراء**

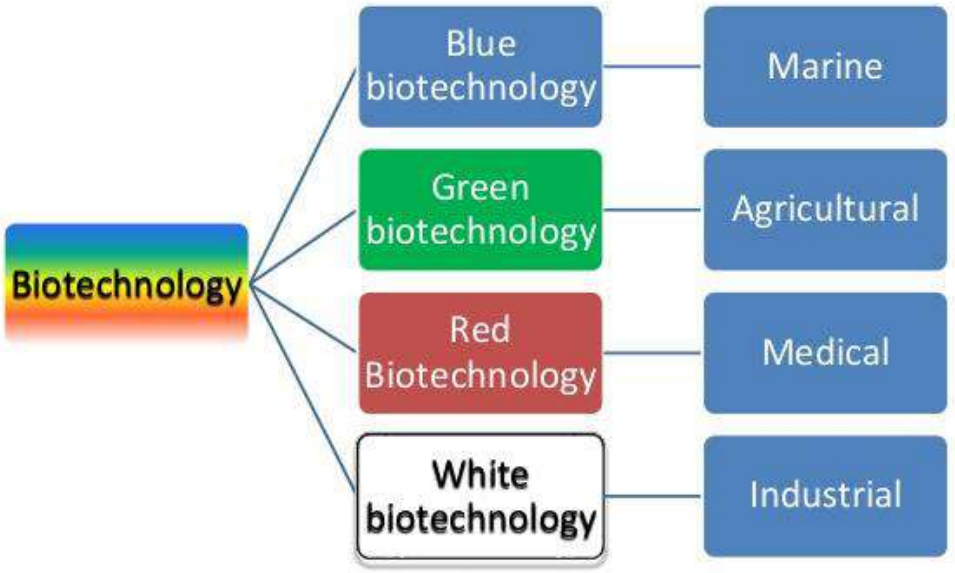
يستخدم هذا المصطلح لوصف التقانة الحيويّة المُطبّقة في مجال الزراعة و يطلق عليها أحياناً التقانة الحيويّة النباتيّة ومن أمثلتها: إنتاج النباتات المعدلة وراثياً ذات الفوائد العدة مما يسهم في تحسين الثروة النباتيّة وإنتاج أصناف جديدة.

- **التقانة الحيوية البيضاء**

وتُعرَف أيضًا بالتقانة الحيوية الصناعية وهي من أكثر المجالات انتشاراً وقد ادخلت العديد من التعديلات على صناعات قديمة كالورق والبلاستيك و من أمثلتها استخدام الكائنات الحية لإنتاج مواد كيميائية مطلوبة للاستخدام التجاري حيويًا بدلاً من إنتاجها صناعيًا وتشمل أيضاً إنتاج البلاستيك القابل للتحلل العضوي

- **التقانة الحيوية الزرقاء**

يشمل تطبيقات التقانة الحيوية في عالم البحار والكائنات البحرية، وليس في هذا الفرع الوليد تطبيقات رائدة تُذكر حتى الآن



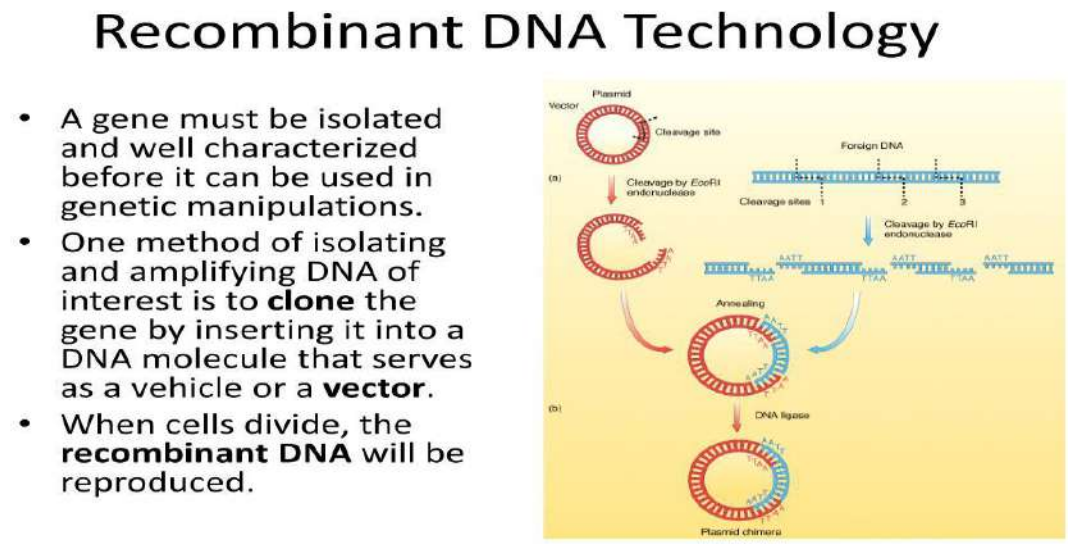
انتهت المحاضرة الأولى

المحاضرة الثانية

تقانة الـDNA المأشوب Recombinant DNA Technology

تعد تقانة الـDNA المأشوب حجر الزاوية في التقانة الحيوية والـ DNA المأشوب بالتعريف هو الـDNA الذي يتم تخليقه اصطناعياً اعتباراً من جزيئتي DNA أو أكثر كلّ منهما من مصدر بيولوجي مختلف لتكوين جزيئة واحدة مأشوبة مثل DNA بكتيري (بلاسميد*) مغروس ضمنه جزء من DNA بشري وهذا الشكل الجديد غير موجود في الحالة الطبيعية في المتعضيات الحية.

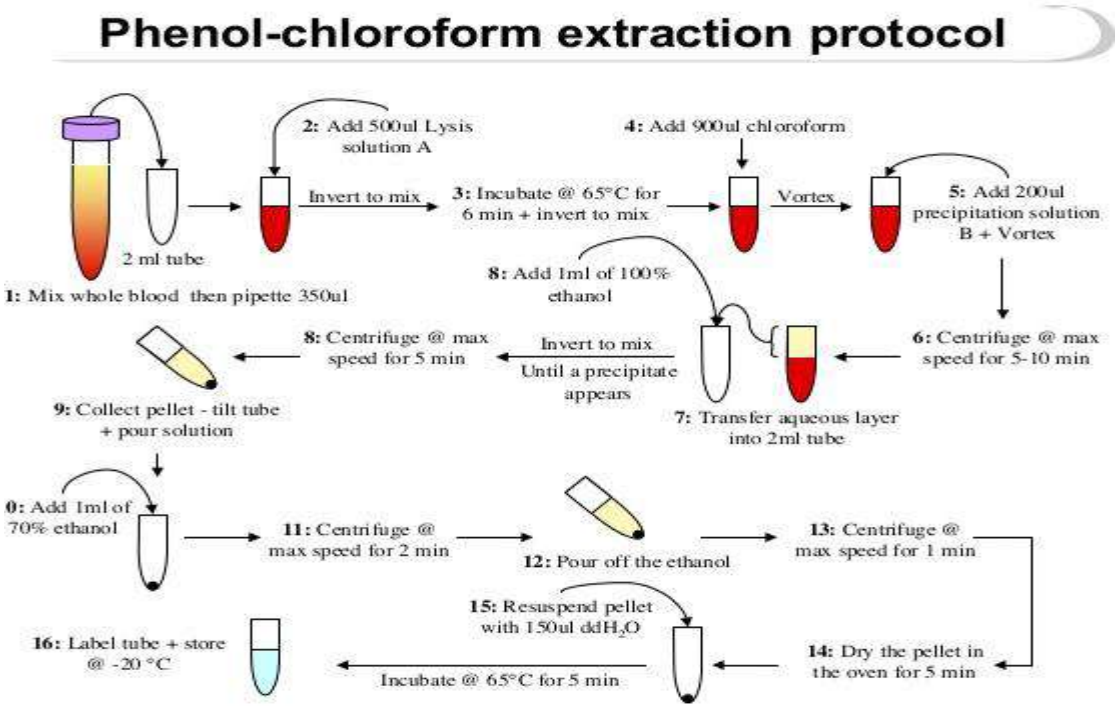
إن مصطلح تأشيب Recombinant يعني حرفياً ربط قطعتين من الـDNA من نوعين مختلفين وفي الحقيقة لقد قام الإنسان نوعاً ما بهذه العملية منذ عقود وذلك من خلال محاولته المزاوجة بين أنواع مختلفة من النباتات أو الحيوانات للحصول على سلالات ذات إنتاجية أفضل، في عام 1972 تمكن بول بيرغ من إنتاج أول جزيئة DNA مأشوب تجمع بين DNA الفيروس القردي SV40 و DNA فيروس اللمدا على اعتبار أن جزيئات DNA في جميع الكائنات الحية تتشارك بالبنية الكيميائية وبالتالي يمكن جمعها معاً.



البلاسميد* هو حلقة صغيرة من DNA يوجد في بعض الخلايا البكتيرية وبشكل مستقل عن الـDNA الصبغي ويمنحها صفات إضافية مثل مقاومة المضادات الحيوية.

كيف نحصل على الـDNA الجينومي؟

يتم عزل الـDNA الجينومي إما من الدم أو من الأنسجة باستخدام طاقم جاهزمثل : (QIAGEN, Hilden, Germany)) وتتم خطوات العمل فقاً لتعليمات الشركة الصانعة، أويتم العزل باستخدام الطريقة التقليدية مثل طريقة الفينول – كلوروفورم (phenol – chloroform) التي تُستخدَم لعزل الـ DNA من الدم المحيطي كما هو موضح في الشكل التالي، من ميزات طريقة العزل باستخدام طاقم جاهز هي الحصول على الـ DNA خلال وقت قصير وبنقاوة عالية مقارنة بالطريقة التقليدية التي تتميز بالحصول على كمية أكبر من DNA



مصطلح الجينوم **Genome** هو مصطلح في علم الوراثة يجمع بين جزئي كلمتين هما **Gen** وهي الاحرف الثلاثة الأولى من كلمة **Gene** وتعني مورثة والجزء الثاني **ome** هي الأحرف الثلاثة الأخيرة من كلمة **Chromosome** وتعني الصبغي .

يُعرَف الجينوم بأنه مجموع المورثات والـ DNA في نواة كل خلية من خلايا الكائن الحي بالإضافة إلى DNA الجسيمات الكوندرية وكذلك DNA الصانعات الخضراء في النبات، يعد الجينوم البشري من الجينومات الكبيرة حيث يتكون من 6.4×10^9 bp أي تقريباً من 6 مليارات زوج أساس يكون معظمها عبارة عن تسلسلات غير مرمزة للبروتينات أو لجزيئات RNAS وتدعى بالمناطق بين الجينية وهي تشكل نحو 95% من الجينوم أما مجموع الجينات فإنه لايشكل أكثر من 5% من مجمل الجينوم .

ساهم اكتشاف العديد من الأنزيمات الجرثومية المتنوعة كأنزيمات التقييد في قطع جزيء الـDNA الكبير إلى جزيئات أصغر يتراوح حجمها بين100 bp- 2K bp وإنّ تطبيق هذه الأنزيمات في تحوير الـDNA هو ما أدى إلى خلق تقنية الـDNA المأشوب

ماهي أنزيمات التقييد Restriction enzymes

أنزيمات التقييد Restriction enzymes هي أنزيمات تقطع جزئ الـDNA عندما تتعرف على تتابع أزواج نكليوتيدات محددة ولكل أنزيم قطع تتابع محدد وموقع محدد للقطع.

What are restriction enzymes?

- **Molecular scissors that cut double stranded DNA molecules at specific points.**
- **Found naturally in a wide variety of prokaryotes**
- **An important tool for manipulating DNA.**

تم التعرف على هذه الأنزيمات منذ عام 1962 عندما تم البحث عن ظاهرة المناعة التي تتمتع بها جراثيم الإيشيريكية القولونية E.colie في مواجهة أكلات الجراثيم أو مايسمى بالفاجات وذلك عن طريق تحطيم وتخريب المادة الوراثية لهذه الآكلات، وتأتي هذه الظاهرة نتيجة نشاط عدد كبير من الأنزيمات القادرة على تحطيم الـDNA أما سبب عدم تأثر الحمض النووي للجراثيم بهذه الإنزيمات فيعود إلى إجراء تحوير يتمثل بإضافة مجموعة متيل لبعض الأسس في مواقع القطع وتتم هذه العملية في مرحلة تالية لعملية تضاعف جزيءالـ DNA من أجل حمايته، وبالتالي تعمل أنزيمات التقييد على منح مناعة للجراثيم وقد تم معرفة آلية عملها لأول مرة عام 1970 وتم الكشف عن عدد كبير منها وصل إلى حوالي 900 أنزيم لقد تم تقسيم هذه الأنزيمات وفقاً لقدرتها على القطع وللمتطلبات الكيميائية اللازمة لعملها إلى ثلاثة أنماط:

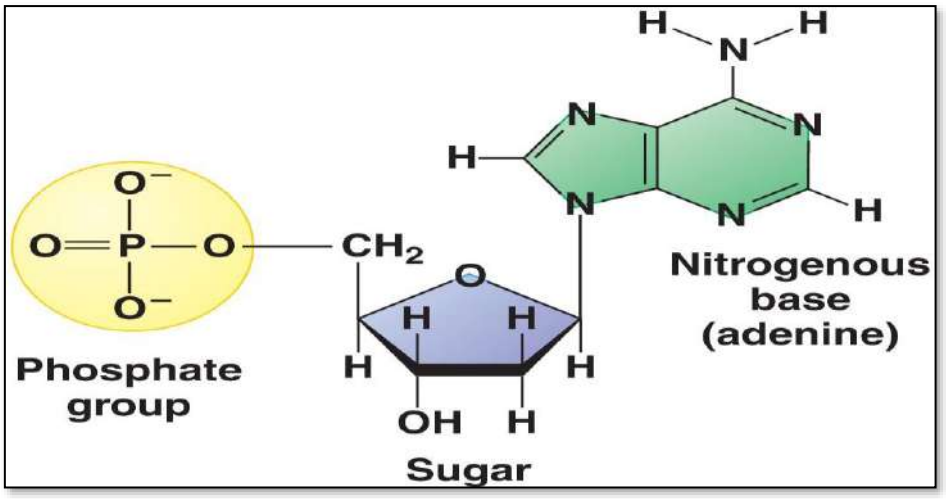
- **النمط الأول :** تضم الأنزيمات التي تقوم بالقطع عشوائياً لجزي الـDNA حيث ترتبط هذه الأنزيمات في مواقع القطع ثم تقوم بهدم السلاسل المزدوجة في اتجاه واحد لمسافة تتراوح بين 1000-5000 نيكليوتيد تبدأ بعدها بتحطيم سلسلة واحدة لمسافة أخرى ثم تتوقف عن العمل.
- **النمط الثاني :** هي أنزيمات تقطع في مواقع محددة Restrictions Sites بحيث تؤدي إلى عدد محدد من القطع لكل نمط من أنماط الـDNA عند الأحياء، يقوم أنزيم القطع بعمله في كل المواقع التي يتعرف عليها والتي تتمثل بتتالي محدد لعدد من النيكليوتيدات ويتباين عدد هذه المواقع التي يتم التعرف عليها من أنزيم قطع إلى آخر ومن نمط DNA إلى آخر
- **النمط الثالث:** هي أنزيمات تمتلك صفات النمطين السابقين

ماهو مبدأ عمل أنزيمات التقييد ؟

يعد النكليوتيد منقوص الأكسجين الوحدة الأساسية في بناء جزيء الـ DNA ويتألف من ثلاثة مكونات:

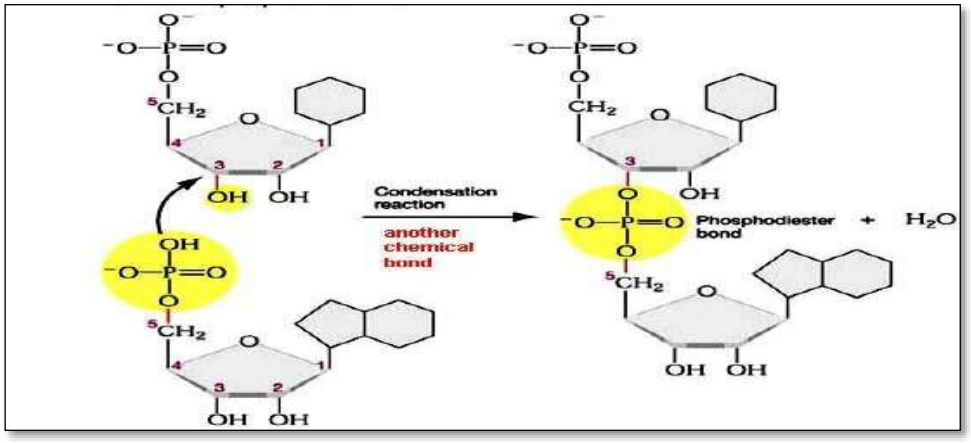
- سكر خماسي الكربون هوالريبوز منقوص الأكسجين
- مجموعة فوسفات
- أساس آزوتي

يرتبط كل أساس آزوتي إلى جزيئة سكر التي ترتبط بدورها إلى مجموعة فوسفات ليشكل الجميع سوية جزيئة تدعى بالنيكليوتيد Nucleotide كما هو موضح في الشكل التالي:



بنية نكليوتيد الأدينوزين أحادي الفوسفات منقوص الأكسجين

ترتبط النكليوتيدات المكونة لسلسلة الـ DNA مع بعضها البعض بروابط فوسفاتية ثنائية الإسترتتشكل بين زمرة الهيدروكسيل المرتبطة مع ذرة الكربون َ3 للسكر في النيكليوتيد الأول وبين الفوسفور المرتبط مع ذرة الكربون َ5 للنيكليوتيد الثاني كما هوموضح في الشكل التالي:

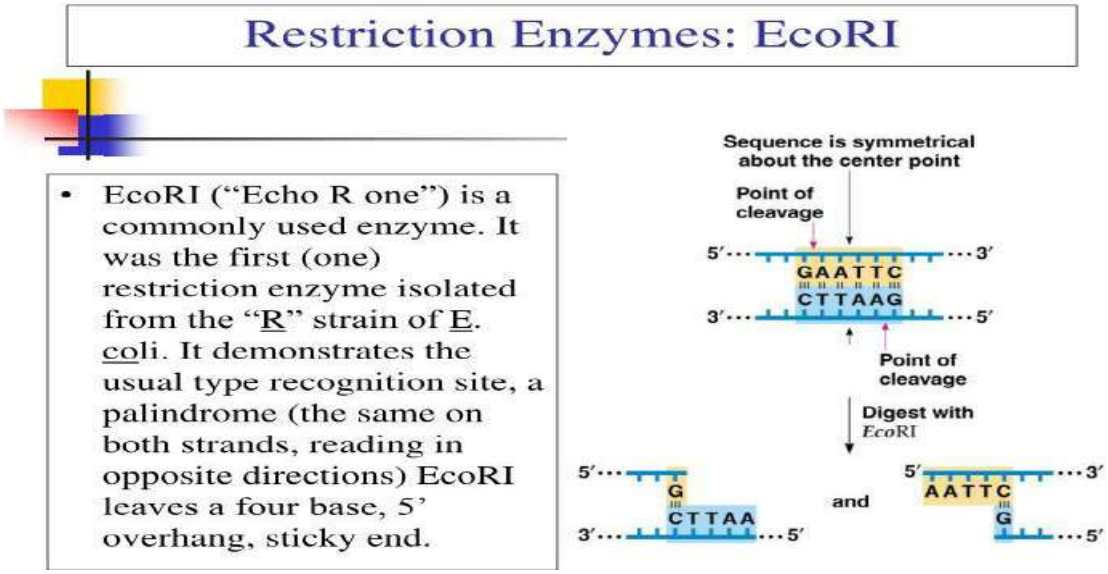


إذاً مبدأ عمل أنزيمات التقييد هو تحطيم الرابطة الفوسفاتية ثنائية الإستر بين النيكليوتيدات

كيف يتعرف أنزيم التقييد على المكان المفترض أن يحدث القطع فيه في جزيء الـDNA؟

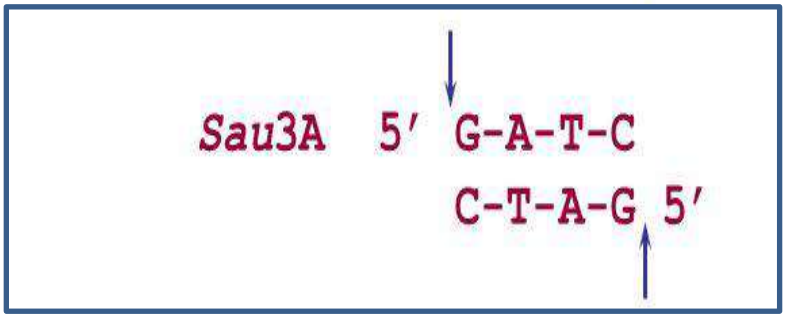
كل أنزيم تقييد هو عبارة عن مقص خاص لقطع الـDNA في نقطة محددة و يتعرف الأنزيم على مكان القطع حسب تسلسل الـDNA للقطعة حيث أن كل أنزيم يقطع في تسلسل محدد، فمثلا أنزيم التقييد (Hpa I) يقطع عندما يجد التسلسل التالي من الأسس الآزوتية (GTTAAC) بينما أنزيم التقييد (Eco RI) يقطع عندما يجد 6 من الأسس الآزوتية وفق هذا التسلسل (GAATTC) و للعلم فإن أنزيم التقييد (Hpa I) سمي بهذا الاسم لأنه يوجد في بكتيريا (Hemophilus parainfluenza) و هذا الإنزيم

يعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل رأسي مستقيم.بينما اسم انزيم (Eco RI) فهو مأخوذ من بكتيريا (Escherichia coli)، ويعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل متعرج.



تتباين أنزيمات التقييد في عدد نيكليوتيدات الموقع الذي تتعرف عليه:

✓ بعض الأنزيمات تميز مواقع مؤلفة من أربعة نيكليوتيدات وتقطع قبلها أو بعدها أو خلالها



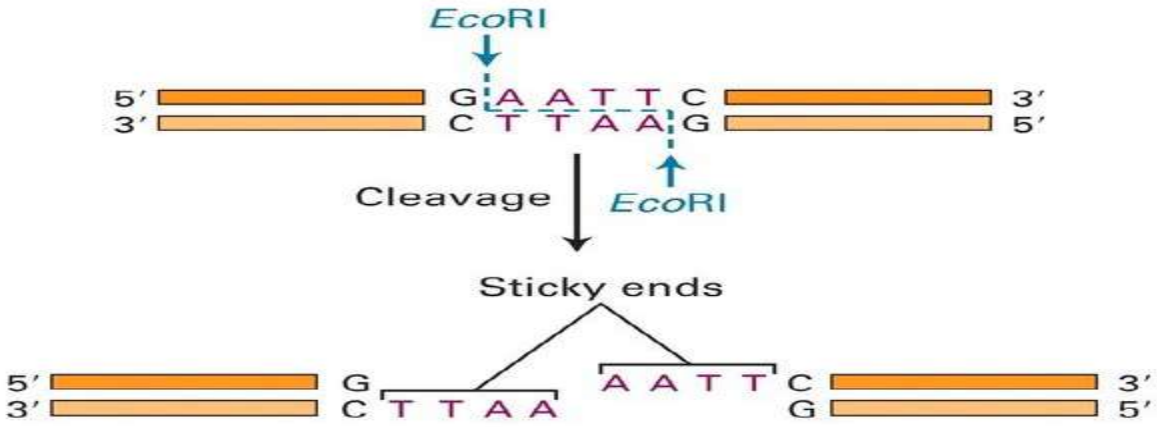
✓ بعضها الآخر تميز مواقع محددة بخمسة نيكليوتيدات

✓ الأنزيمات التي تميز مواقع محددة بمتتاليات لستة نيكليوتيدات هي الأكثر انتشاراً وتقوم بالتعرف على الموقع ومن ثم القطع بعد عدد من النيكليوتيدات

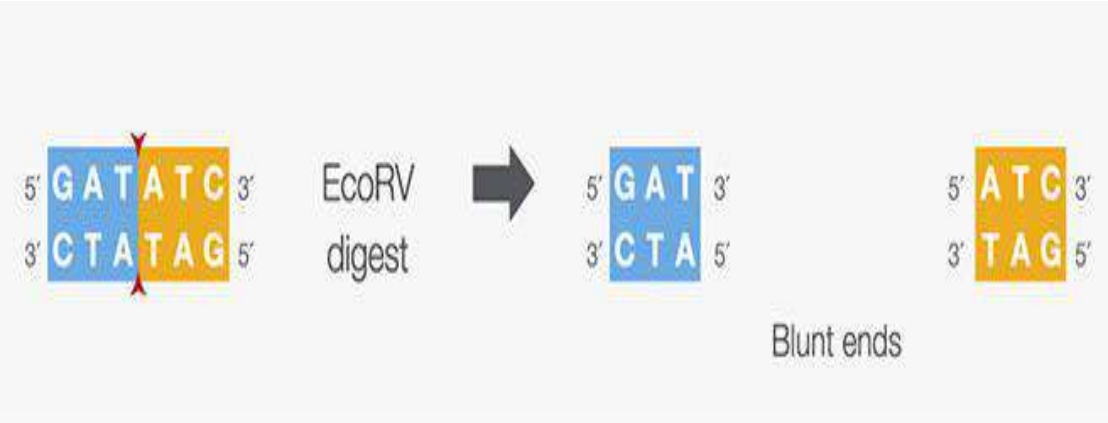
مالمقصود بالنهايات اللزجة Stick ends والنهايات العمياء Blunt ends

تعد أنزيمات التقييد من النمط الثاني الأكثر استعمالاً في مجال الهندسة الوراثية وهي تقوم بالقطع في مواقع محددة من جزيءالـ DNA ولكنها تتباين في طبيعة موقع القطع ومكانه ونواتجه ومن هذه التباينات:

➢ تؤدي بعض هذه الانزيمات إلى الحصول على نهايات لزجة Stick ends أي نهايات غير متساوية والسبب لأن موقع القطع في سلسلتي الـDNA يكون غير متناظر أي إنها تقطع بشكل متعرج



يؤدي البعض الآخر من هذه الأنزيمات إلى الحصول على نهايات عمياء Blunt ends أي نهايات متساوية أي إنها تقطع بشكل رأسي



تسمح القطع الناتجة في حالة النهايات اللزجة بالالتصاق مرة أخرى وبعبارة أخرى إمكانية وصلها مع قطع أخرى أما القطع الناتجة في حالة النهايات العمياء فيجب إجراء تعديلات عليها للتمكن من وصلها مع قطع أخرى

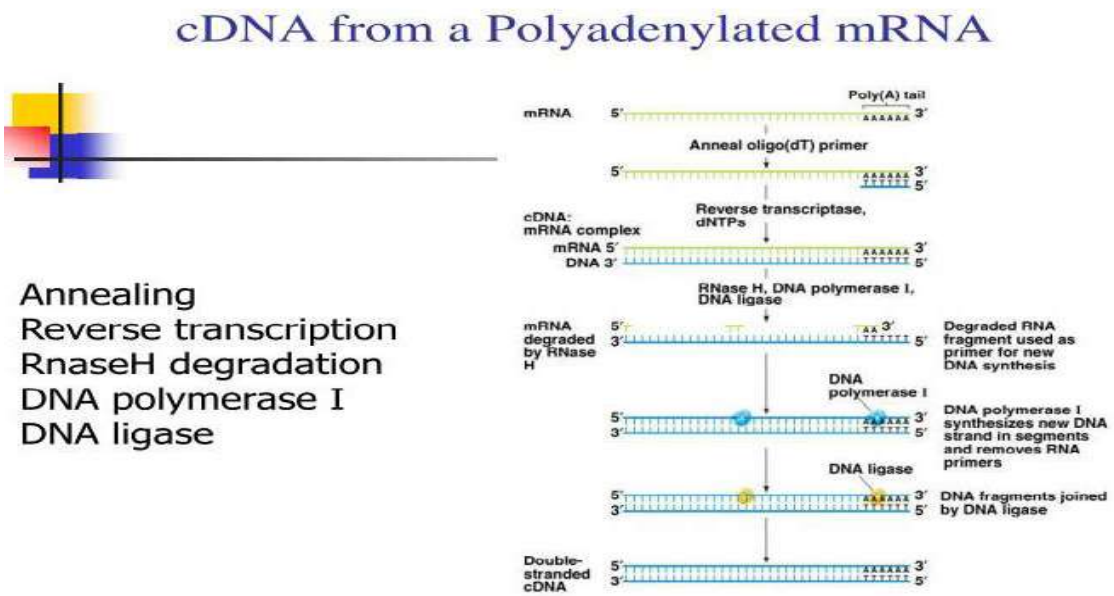
خريطة القطع المحددة

لقد أنشاء العلماء خريطة تسمى خريطة القطع المحددة لكثير من الكائنات الحية و تم إنجاز هذه الخريطة عن طريق تقطيع جميع الكروموسومات بإضافة أنواع مختلفة من الإنزيمات القاطعة ثم رتبت هذه القطع بشكل منتظم ، وتعد الخرائط التي تحدد مواقع عمل أنزيمات التقييد من الأمور الهامة حيث أن كل أنزيم يقوم بإعطاء عدد محدد ومعروف من قطع الـDNA لكل نوع وبالتالي تُمكِن معرفة مواقع عمل هذه الأنزيمات من التعرف على مواقع الجينات وكذلك في اختيار الانزيمات المناسبة لعملية العزل للجينات المرغوبة.

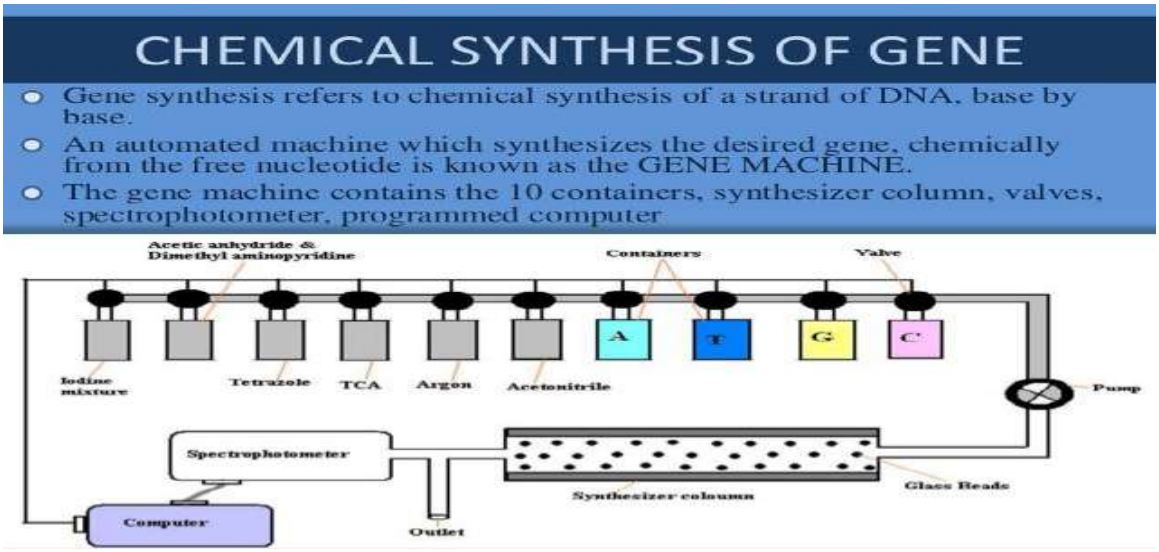
ماهي بالجين الهدف Target gene وكيف يتم عزلها ؟

الجين الهدف Target gene هي الجين التي سيتم ربطها ضمن بلاسميد مناسب لتشكيل جزيء DNA مأشوب بهدف الحصول على البروتين الذي ترمزه أو إجراء تعديل عليها أو معرفة تسلسل النكليوتيدات فيها

- يمكن الحصول على الجين الهدف من خلال عملية العزل لـDNA الجينومي ثم استخدام أنزيمات التقيد المناسبة للحصول على الجين الهدف
- من الممكن عزل mRNA الجين الهدف من الخلايا التي يتم فيها التعبير عن هذه الجين وإجراء عملية نسخ عكسي لتصنيع cDNA (Complementary DNA) الذي يمثّل الجين المطلوبة.



- في الوقت الحاضر أصبح من الممكن معرفة تسلسل أي جين لأي كائن حي وذلك بالرجوع إلى قاعدة البيانات NCBI (www.ncbi.nih.gov) مما سمح بإمكانية تصنيع الجين كيميائياً بواسطة جهاز يدعى الماكنة صانعة الجينات Gene machine synthesizer والتي تقوم باصطناع الجينات بمجرّد إدخال تسلسل الجينة المطلوبة إلى الكمبيوتر، ومن ثم تقوم هذه الأجهزة المؤتمتة بالكامل والمتصلة بالكواشف الضرورية للتفاعل بتصنيع الجينات من خلال ضمّ النكليوتيدات واحداً واحداً مع بعضها إلى أن يتم الحصول على الجين المطلوبة.



- يمكن الحصول على الجين الهدف مباشرةً بواسطة تفاعل البوليميراز التسلسلي في حال كان تسلسل النكليوتيدات فيها معروفاً

تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR (Polymerase Chain Reaction)

الـPCR هو إكثارالـ DNA في المخبر In vitro خارج النظام الحيوي (الخلية) In vivo

قبل عملية الانقسام الخلوي تقوم الخلية بمضاعفة المادة الوراثية الـDNA بشكل تلقائي و سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى 1000 أساس آزوتي بالثانية، و مع التطور في مجال التقانة الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الـ DNA بشكل أساسي استدعى ذلك العلماء أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الـDNA ، إلى أن توصل العالم كارى موليس Dr. Kerry Mullis في عام 1985 (حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993) إلى تقنية تعتمد على استخدام أنزيم بلمرة مأخوذ من بكتريا Escherichia coli وإجراء عمليات تضاعف للـDNA في أنبوب ، ومن أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي (أي الخلية) و التحكم بكمية الـ DNA والسرعة في الإنتاج.

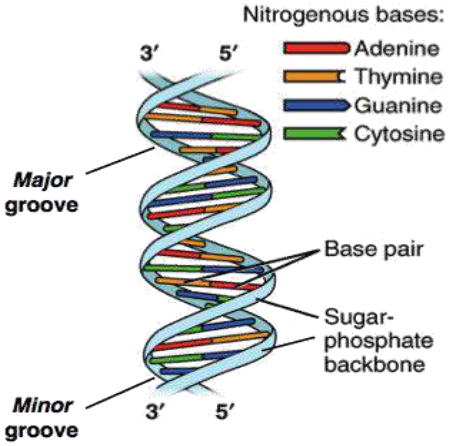
يمكن تعريف تفاعل الـPCR بأنه تضخيم Amplification لمنطقة محددة من الـDNA لا يكون طولها كبير جداً بحدود 500 زوج أساس ويدعى الناتج عن التفاعل بمنتَج PCR (PCR product)

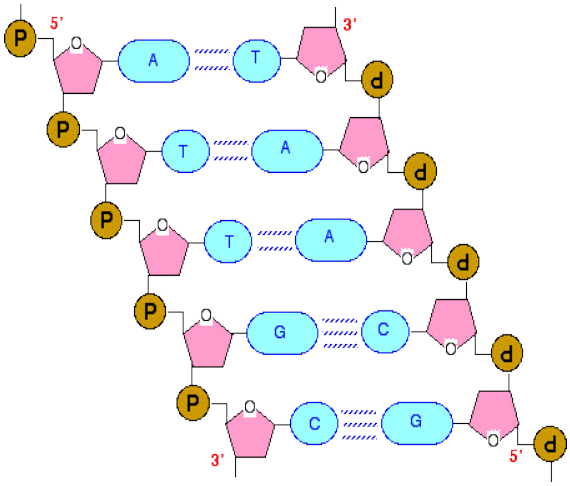
متطلبات تفاعل الـPCR

- Primer I (reverse)
- Primer II (forward)
- DNA template
- Taq DNA polymerase
- MgCl2
- Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)
- PCR buffer
- Deionized water

- قالب الـDNA (DNA templete) الذي يحتوي على المنطقة المطلوب تضخيمها
- البادئات (المشرعات، المرئسات) Primers: وهي عبارة عن تسلسلات قليلة النيكليوتيد Oligonucleotides قادرة على الارتباط مع الأسس الآزوتية في بداية ونهاية المنطقة المراد تضخيمها، ونحتاج إلى بادئين أحدهما أمامي Forward والآخر عكسي Reverse يرتبط كل منهما بشكل متقابل ومتعاكس على أطراف سلسلتي المنطقة المطلوبة.

يتألف جزيء الـ DNA من سلسلتين ملتفتين بشكل حلزوني مضاعف حول محور واحد ترتبطان ببعضهما عبر جسور أو روابط هيدروجينية تصل بين الاسس الآزوتية المتقابلة، فيرتبط الأدنين مع التايمين برابطتين هيدروجينيتن (A=T) بينما يرتبط الغوانين مع السيتوزين بثلاث روابط هيدروجينية (G ≡C)، وتكون سلسلتي الـ DNA متوازيتين بشكل متعاكس أي النهاية الطرفية 5´ لإحدى السلسلتين تكون مقابلة للنهاية الطرفية 3´ للسلسلة الأخرى ، كما تكون السلسلتين متممتين لبعضهما البعض بمعنى أن ترتيب النكليوتيدات في إحدى السلسلتين يحدد ترتيب النكليوتيدات في السلسلة المقابلة.





وبناءاً على ماسبق يجب أن تتميز البادئات بصفات معينة:

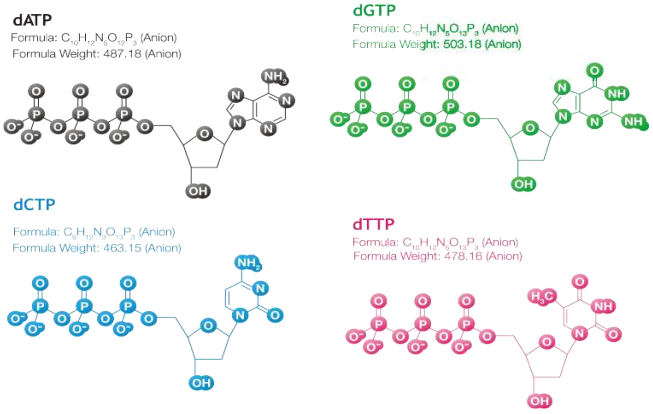
- ✓ يجب أن لا يقل محتواها من الأسس الآزوتية الغوانين و السيتوزين عن 50 ٪ من إجمالي الأسس الداخلة في تركيبها وذلك حتي يكون ارتباطها أقوى مع الأسس المتممة لها في سلسلتي الـDNA كون الغوانين يرتبط مع السيتوزين بثلاث روابط هيدروجينية كما أشرنا سابقاً
- ✓ يجب أن لا تكون البادئات قصيرة جداً بحيث تفقد نوعيتها ،البادئة المكونة من ثلاث أسس فقط ACC مثلاً سيكون إحتمال تصادفها مع مكملها في الجينوم كبير جداً، كما يجب أن لا تكون البادئات طويلة جداً كي لا تنطوى على ذاتها أو فيما بينها مشكلةً مثنويات، ومن جهة أخرى كلما زادت الأسس الآزوتية في سلسلة البادئة كلما قل إحتمال مصادفة السلسة المكملة لها في الجينوم، تتكون البادئات عادةً من 15-40 أساس آزوتي وهي تُصنع تجارياً ويمكن ترتيبها لتماثل أي من سلاسل الـDNA

PCR primers are short, single stranded DNA molecules (15-40 bp), They are manufactured commercially and can be ordered to match any DNA sequence

- أنزيم البلمرة polymerase : هوالأنزيم الذي ينسخ المنطقة المطلوب تضخيمها عن طريق إضافة الأسس الآزوتية وبناء السلسلة المتممة ويجب أن يكون قادر على العمل في درجات الحرارة المرتفعة

إن تفاعل الـPCR يتضمن درجات حرارة مرتفعة لذلك من الضروري استخدام إنزيم له خاصية الاستقرار الحراري، معظم إنزيمات polymerase تتمسخ في درجات الحرارة العالية وبالتالي تصبح عديمة الفائدة في التفاعل ، أنزيم Taq polymerase استُخلَص عام 1976 من جراثيم الينابيع الحارة aquaticus Thermus وهو مستقر حرارياً يكون في قمة نشاطه في درجة حرارة 75–80 مئوية وينخفض نشاطه عندما تنخفض درجة الحرارة

- النيكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأكسجين d NTP ، ليتمكن الإنزيم من ترتيبها في مواقعها أثناء عملية نسخ المنطقة المطلوبة من الـDNA.



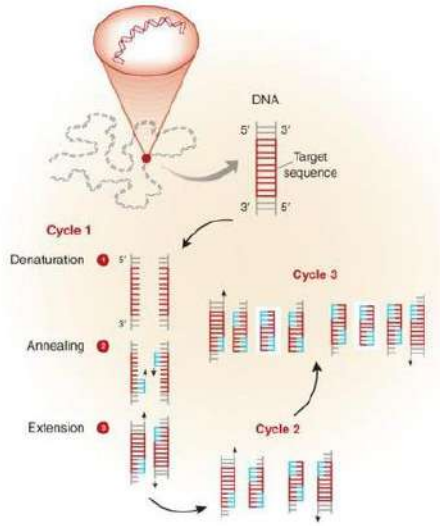
- المحلول الواقي (Buffer) الذي يؤمن البيئة المناسبة لحدوث عملية البلمرة
- كلوريد المغنزيوم $MgCl_2$ وهو عامل متمم Cofactor لأنزيم polymerase

في أنبوب صغير يتم مزج قالب الـDNA مع البادئات مع أنزيم Taq polymerase مع النيكليوتيدات منقوصة الأكسجين d NTP و Buffer و$MgCl_2$ بنسب وتراكيز معينة، ويتم إجراء تفاعل الـPCR باستخدام **جهاز مدور حراري Thermocycler**: وهو عبارة عن جهاز يتحكم بدرجات حرارة التفاعل بشكل دقيق حيث يقوم برفع وخفض درجة الحرارة بشكل أوتوماتيكي بفواصل زمنية محددة لآن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة تفاعل الـPCR

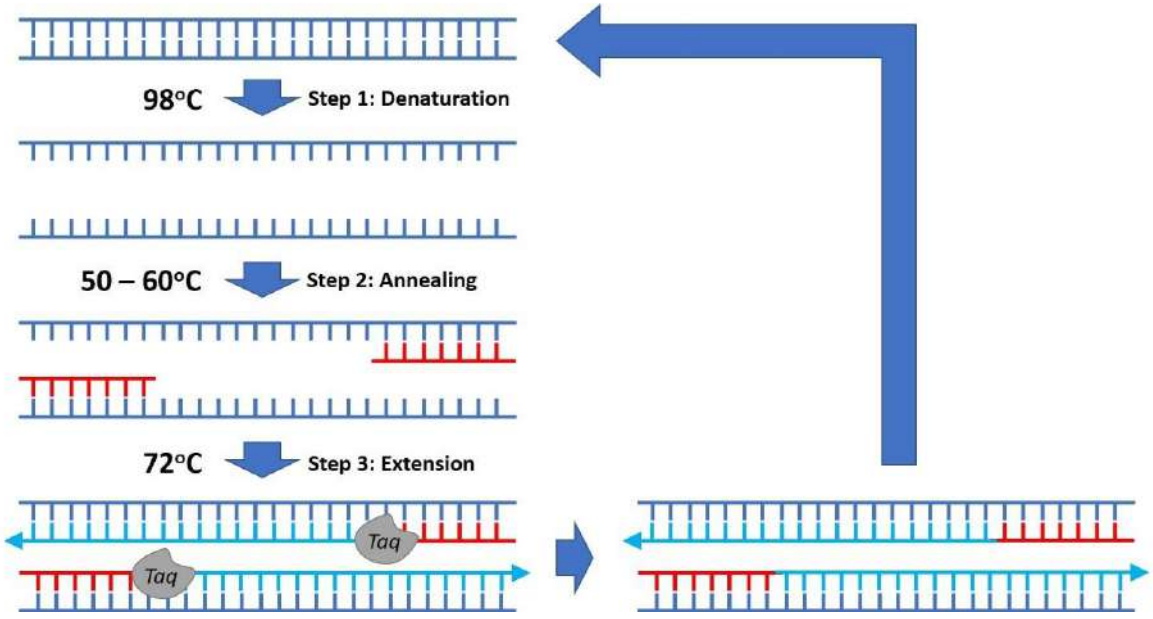
دورة تفاعل الـ PCR

تتضمن الدورة الواحدة ثلاث مراحل هي:

- التمسخ Denaturation : تتم برفع درجة الحرارة إلى95 مئوية ويتم خلالها تحطيم الروابط الهيدروجينية بين سلسلتي الـ DNA و تحويل البنية الثانوية للحمض النووي (سلسلة مضاعفة) إلى البنية الأولية (سلاسل مفردة) .
- البنـاء Annealing : تتم بدرجة حرارة بين 50-60 مئوية ، و يتم فيها توضع البادءات في أماكنها النوعية على سلسلتي الـ DNA وارتباطها مع الأسس المتتمة لها .
- الإستطالة Elongation : تتم بدرجة حرارة 72 مئوية و يتم فيها نسخ سلسلتي الـ DNA المفردتين حيث يقوم أنزيم Taq polymerase بإضافة النيكليوتيدات المناسبة بالإتجاه 5َ-3َ

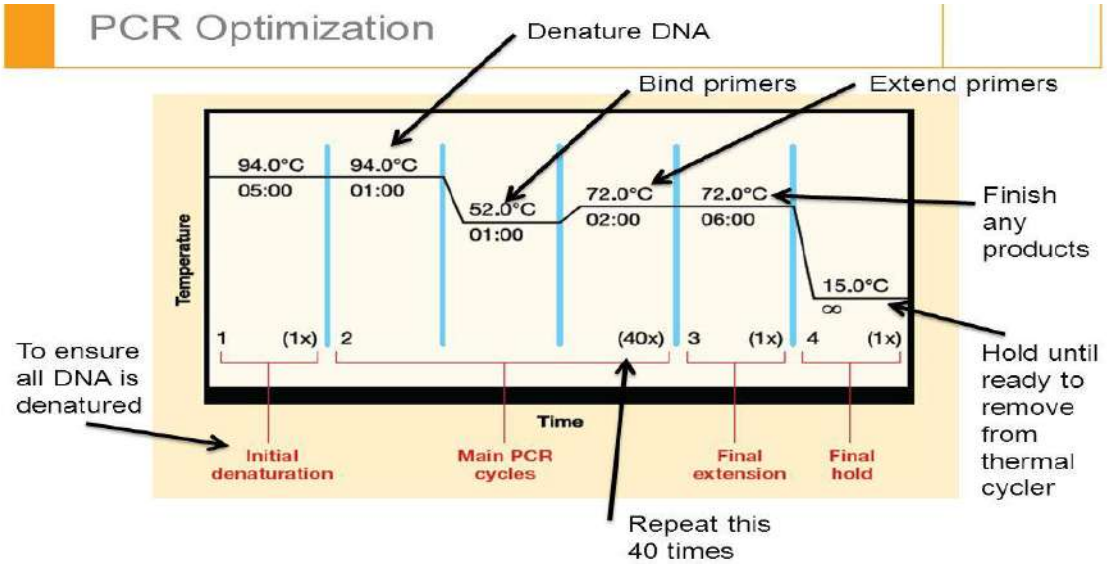


1. Denaturation: Heated above the melting point of the two complementary strands of the template DNA, which allows the strands to separate.
2. Annealing: The temperature is lowered which allows the primers to bind to the specific and complementary DNA sequence to be amplified.
3. Extension: The DNA polymerase is able to extend the primers by adding nucleotides to the developing DNA strand.

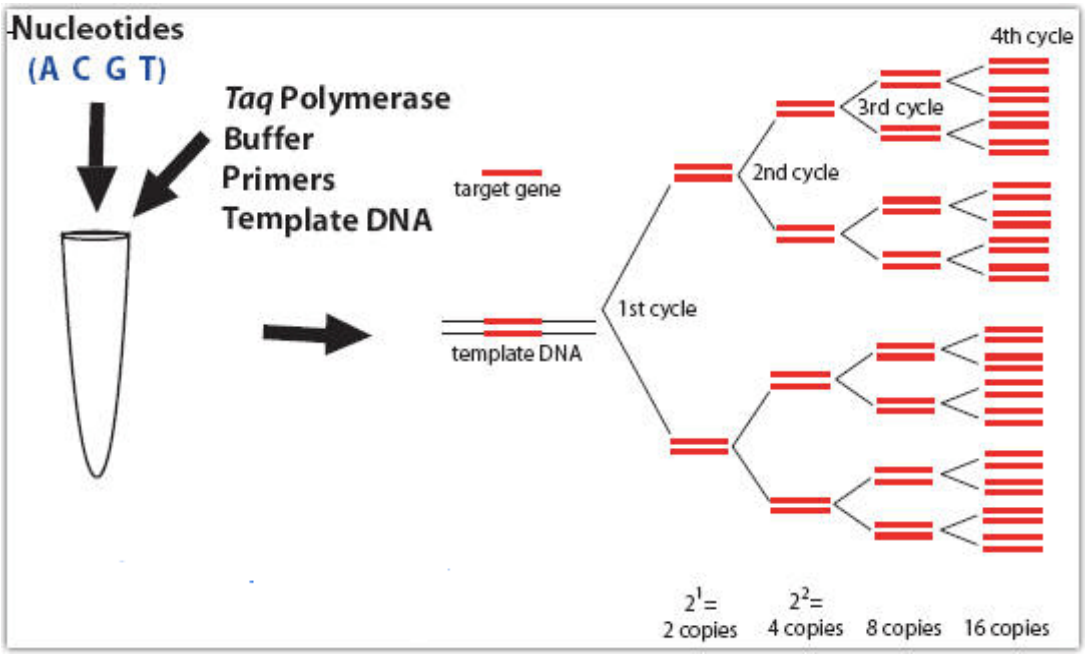


لا يوجد درجة حرارة محددة تماماً لمرحلتي التمسخ و البناء لأنها ترتبط بمحتوى سلسلتي الـDNA من الأسس الآزوتية الغوانين والسيتوزين، ويوجد برامج يتم من خلالها تحديد درجة الحرارة المناسبة عن طريق إدخال تسلسل المنطقة المطلوب تضخيمها وتسلسل البادئات المستخدمة وبشكل عام مرحلة البناء Annealing تتم بدرجة حرارة تتراوح بين 50-60 مئوية

- تكرر المراحل السابقة بين 25 -40 دورة بهدف الحصول على كمية كافية من نسخ الـ DNA

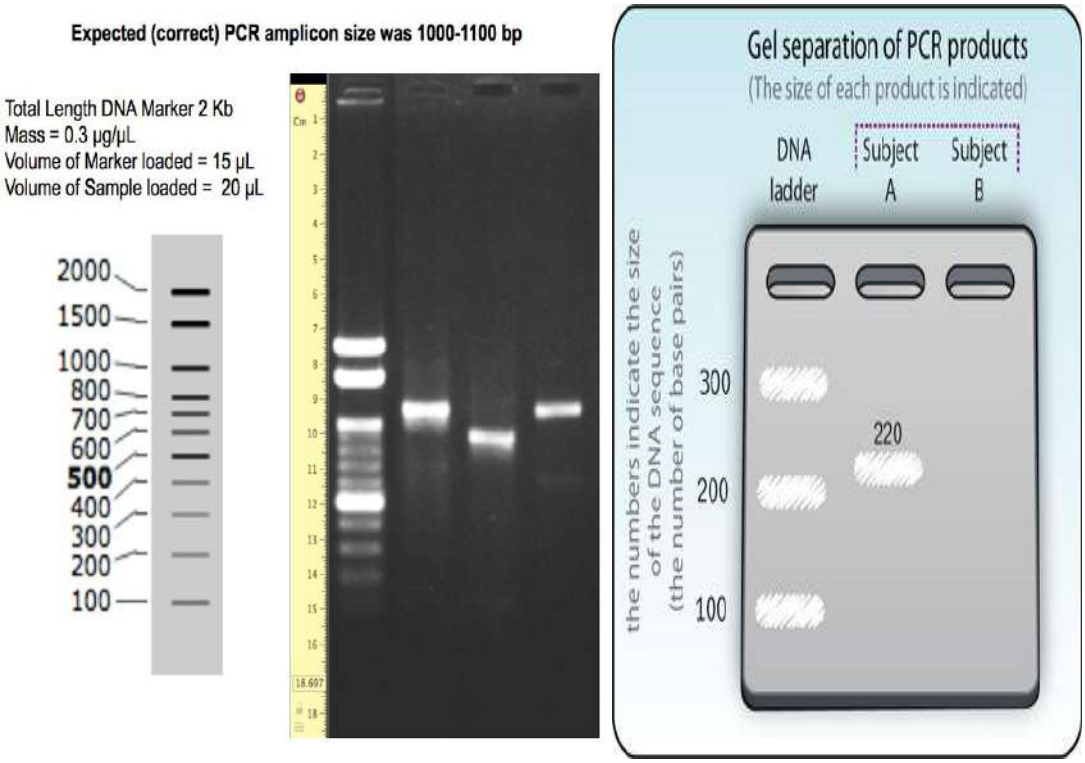


يتم **تضخيم المنطقة المنطقة المطلوبة من الـDNA عددياً بمقدار 2 أُس كل دورة تفاعل PCR مثلاً في الدورة الرابعة من التفاعل ستكون النتيجة النهائية هي 2^4 أي 16 نسخة من الـDNA وفي الدورة 32 يكون الناتج 2^{32}** أي 4 مليارات نسخة وفي الدورة 40 يكون الناتج 2^{40} نسخة من الـDNA، ولا يكون التضخيم في الدورات الأولى نوعياً بشكل تام ولكن في الدورة الثالثة وما بعد يصبح التفاعل شبه نوعي للمنطقة المطلوبة.



أنواع الـPCR

- **PCR العادي :** وهو ما تم شرحه والتطرق اليه سابقاً
- **RT PCR**: وهو اختصار لـ Real Time PCR و يقوم هذا النوع على نفس المبدأ السابق ولكن الاختلاف هو أن جهاز المدور الحراري يكون مرتبط بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدء التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA) ويعتمد ذلك على وجود أسس آزوتية حرة مشعة لتحديد ذلك ، مما يسهل على الباحثين الوقت لتحدد وجود الجين المطلوب أو لا وكمية الجين بدون الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة، و تعطي طريقة RT PCR نتائج رقمية بينما الـ PCR العادي يعطي نتائج كمية تقاس على قوة الباندات التي تظهر على الهلام نتيجة الرحلان الكهربائي لمنتجات الـ PCR كما هو موضح في الشكل التالي



أهم تطبيقات الـ PCR

لتقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي DNA و الوراثة ومنها:

- تحديد تتابع الأسس الآزوتية في الحمض النووي
- استخدامه في تغير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع
- معرفة طول الحمض النووي DNA
- الكشف عن الفيروسات وهذه الطريقة هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته
- في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ).
- الكشف عن الأمراض الوراثية كمعرفة الحاملين والمصابين بها قبل ظهور الاعراض والعلامات وكذلك الكشف عنها عند الجنين أثناء الحمل
- التقنية الأهم في عملية تأشيب الـDNA حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخالها ضمن البلاسيمد أو الحمض النووي (DNA) المضيف

كيف يتم ربط الجين ضمن البلاسميد للحصول على الـ DNA المأشوب

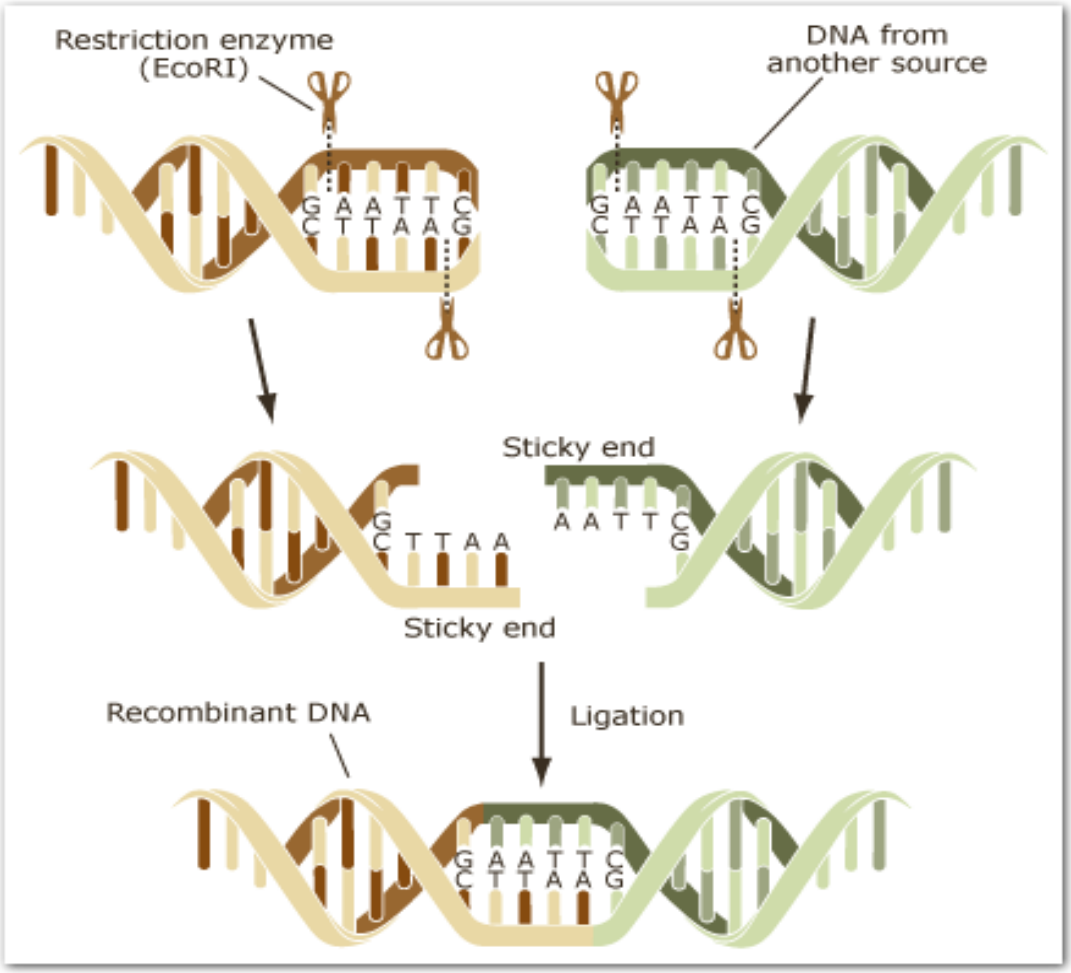
يجب أن يتم قطع الجين والبلاسميد بنفس أنزيم التقييد كي ترتبط النهايات اللزجة للجين مع النهايات اللزجة للبلاسميد وفق قاعدة الأسس المتتامة (الأدنين يرتبط مع التيمين والسيتوزين يرتبط مع الغوانين) ، وتتم عملية الربط بين قطع الـDNA عن طريق إعادة تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الإستر بين نيكليوتيدين متجاورين بواسطة أنزيمات الربط Ligases التي تم تمييز نمطين منها:

النمط الأول يتميز بقدرته على ربط قطع الـDNA ذات النهايات اللزجة والقطع ذات النهايات العمياء

النمط الثاني يعمل على إعادة ارتباط قطع الـDNA ذات النهايات اللزجة فقط

المبدأ العام في تقانة الـDNA المأشوب

- **قطع جزيئين مختلفين من الـDNA بواسطة أنزيم تقييد واحد**
- **تشكل قطع ذات حواف لزجة**
- **ربط القطع المتتامة بواسطة انزيم ربط**



انتهت المحاضرة الثانية

المحاضرة الثالثة

تنسيل الـDNA DNA Cloning

يشير مصطلح تنسيل الـDNA DNA Cloning أو التنسيل الجزيئي Molecular Cloning إلى إدخال قطعة من الـDNA ضمن ناقل حتى يتم نسخها (تكثيرها) أو التعبير عنها داخل الكائن المضيف

ومن أهم المصطلحات العلمية في تقنية تنسيل الـDNA :

- **الـDNA المقحَم Insert DNA:** هو قطعة محددة من الـDNA يتم إدخالها (إقحامها) ضمن ناقل عن طريق تقانة الـDNA المأشوب مما يسمح بنسخها (تكثيرها) أو تحديدها أو إجراء تحوير عليها أو التعبير عنها في الكائن الضيف
- **الناقل vector :** هو جزي من الـDNA يستطيع أن يحمل قطعة الـDNA الغريب وينقلها إلى الخلية المضيفة وهو قادر على التضاعف بشكل منفصل عن الـDNA الكروموسومي للكائن المضيف ، ويوجد أربعة أنواع رئيسية من النواقل هي البلاسميدات ، الناقلات الفيروسية ، الكوزميدات ، الكروموسومات الصناعية
- **الـDNA المأشوب Recombinant DNA** : هو الـDNA الذي يتم تخليقه اصطناعياً اعتباراً من جزيئتي DNA أو أكثرمختلفتي المصدر يتم ربطهما لتكوين جزيئة واحدة مأشوبة (الـDNA المقحم +الناقل vector) وهي ستتضاعف في الكائن المضيف معطية نسخ (نسائل Clones)
- **التحوير Transformation :** هي عملية إدخال البلاسميد المأشوب إلى خلايا مضيفة Host cells مناسبة والتي تكون عادة أحد أنواع الخلايا الجرثومية مثل E.coli، وبالتالي يستطيع أن يتناسل في داخلها بشكل طبيعي حيث أن كل تضاعف للخلية الجرثومية يقابله تضاعف للبلاسميد المأشوب

تنسيل الجين Gene cloning

يدعى أيضاً كلونة الجين ويُعرَف على انه عملية تصنيع نسخ كثيرة من نفس الجين وبالتالي الحصول على كمية اكبر من المنتج لايمكن ان نحصل عليها في الحالة الطبيعية وهو يتضمن الخطوات التالية:

عزل الجين المرغوب تنسيلها

↓

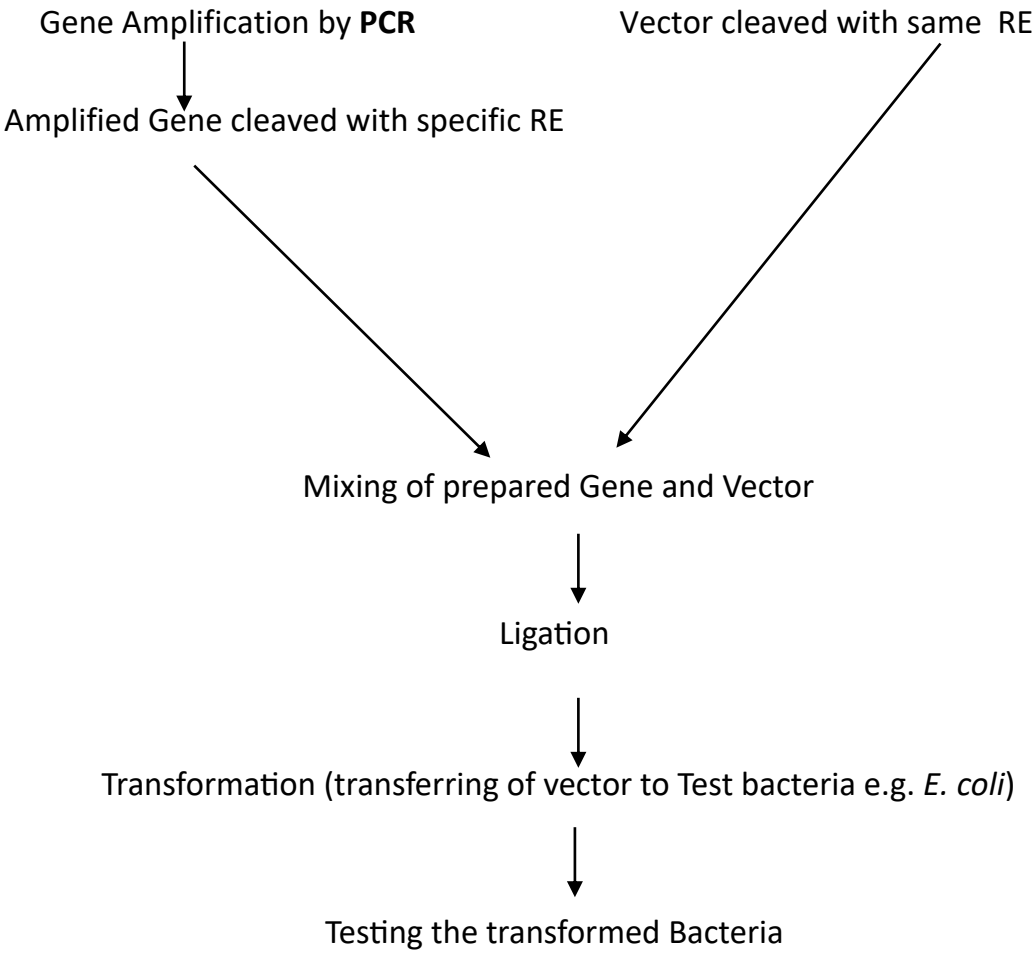
ربط الجين ضمن ناقل مناسب (بلاسميد مثلاً) لتخليق جزيئة DNA مأشوب

↓

إدخال البلاسميد المأشوب ضمن المضيف بعملية التحوير transformation

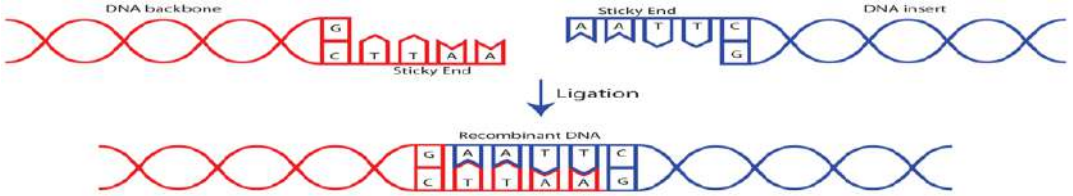
↓

تقصي دخول البلاسميد المأشوب إلى المضيف



- **عزل الجين المرغوب تنسيلها**

الخطوة الأولى في عملية تنسيل الجين هي عزل الـDNA الذي يحتوي على الجين المرغوبة من الكائن الحي وفي حال كان تسلسل الجين معروفاً يتم تضخيمها بواسطة تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR باستخدام بادئات نوعية ويجب أن تتضمن هذه البادئات تسلسل التعرف على أنزيمات التقييد التي تم اختيارها من منطقة التنسيل المتعدد* multiple cloning site للبلاسميد المستخدَم ، في خطوة تالية يتم اقتطاع الجين عن التسلسل المحيط بها بواسطة أنزيم تقييد* مناسب Restriction enzyme من نمط Restriction endonucleases بحيث يكون القطع بشكل مائل للحصول على نهايات لزجة Stick ends وهذه النهايات هي عبارة عن تسلسل من النكليوتيدات أحادي الطاق قادر على الارتباط مع DNAآخر تمّ تقطيعه بنفس أنزيم التقييد

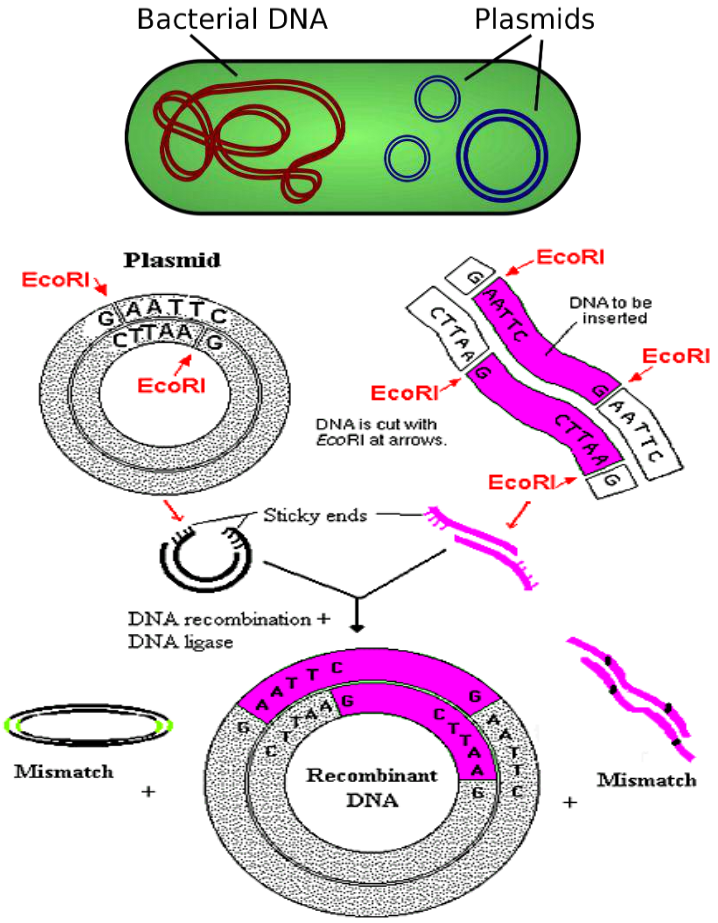


منطقة التنسيل المتعدد* MCS multiple cloning site
وهي عبارة عن تسلسل قصيرمن النيكليوتيدات تم تصنيعه بطرق الهندسة الجينية بربط عدة تسلسلات لمواقع تقييد Restriction sites خاصة بعدد من أنزيمات التقييد مجاورة لبعضها البعض مما يسمح لهذه الأنزيمات أن تتعرف على هذه المواقع وتقطع ضمنها، مما يسهل عملية التنسيل لأي شدفة مدخلة

أنزيمات التقييد* Restriction enzymes
هي أنزيمات تستطيع قطع الـDNA في مواقع محددة تتألف عادةً من 4 أو6 أو8 نيكليوتيدات وتنتجها أنواع كثيرة من الجراثيم كوسيلة للدفاع عن نفسها ضد الهجمات الفيروسية مثل أنزيم التقييد EcoR I الذي يقطع بعد أن يتعرف على التسلسل GAATTC

- **<u>ربط الجين ضمن ناقل مناسب (بلاسميد مثلاً) لتخليق جزيئة DNA مأشوب</u>**

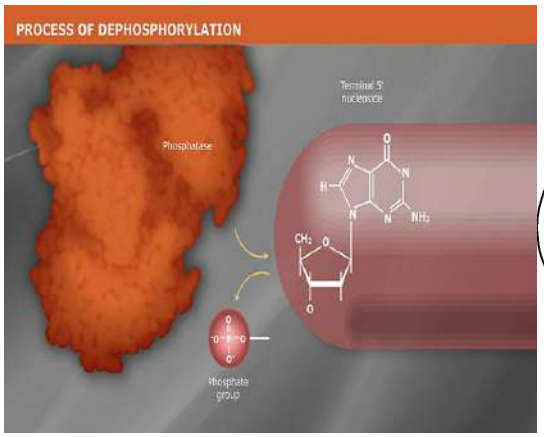
يتم استخدام نفس أنزيم التقييد لاقتطاع الجين والبلاسميد للحصول على نفس النهايات اللزجة و يتم ربط كل من الجين المقحمة (المدخَلة) insert والبلاسميد بواسطة أنزيم ربط Ligase الذي يقوم بربط النهايات المتتامة اللزجة مع بعضها من خلال تشكيل روابط فوسفاتية ثنائية الإستر لنحصل على بلاسميد مأشوب Recombinant Plasmid ، يجب أن يحتوي البلاسميد المستخدم في عملية تنسيل الجين على موقع تعرّف واحد لأنزيم التقييد المستخدم حتى يدخل قطعة واحدة فقط من الـ DNA الذي عزلناه فإذا قُطِع البلاسميد بأكثر من موقع سوف يأخذ أكثر من قطعة من الـDNA

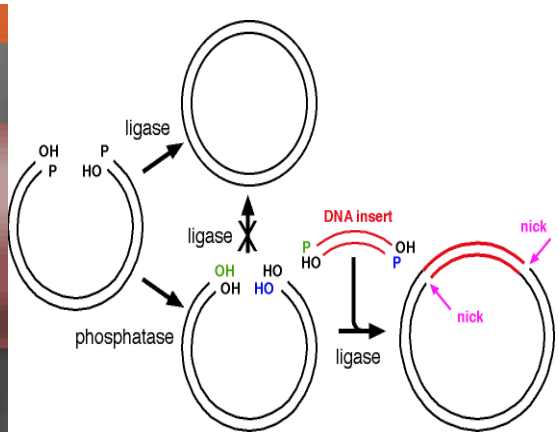


Inserting a DNA Sample into a Plasmid

كيف يمكن تحسين كفاءة إدخال الجين المرغوبة إلى البلاسميد؟

يؤدي قطع البلاسميد بواسطة أحد أنزيمات التقييد إلى تحوله من الشكل الدائري إلى الشكل الخطي، و يسمح قطع الجين المراد تنسيلها بنفس أنزيم التقييد الذي قُطع به البلاسميد بحدوث الارتباط بين الجين و البلاسميد لكن لا يصل احتمال الحصول على بلاسميد مأشوب دوماً إلى نسبة 100 %، وذلك نتيجة إمكانية التحام البلاسميد بنفسه وعودته إلى الشكل الدائري، ولتقليل هذا الاحتمال يتم استخدام أنزيم الفوسفاتاز القلوية الذي يقوم بشطر مجموعة الفوسفات من النهاية 5´ للبلاسميد بعد قطعة بأنزيم التقييد مما يمنع إعادة ارتباط البلاسميد الخطي بنفسه، أو يتم قطع البلاسميد باستخدام أنزيمي تقييد مختلفين (وكذلك الجين بنفس الأنزيمين) لتوليد نهايتين غير متتامتين و بالتالي نمنع إعادة الإلتحام الذاتي للبلاسميد





النواقل Vectors

النواقل هي قطع صغيره من الـ DNA لها القدره على البقاء ثابته عند ربطها مع قطعة الـ DNA الغريب Forigin DNA كما تبقى ثابته عند ادخالها الى خلايا المضيف (لاتتعرف عليها انزيمات الـ endonuclease) ، تتصف بقدرتها على التضاعف الذاتي وهي تمثل قطع من بلاسميد ، فيروس ، او جزء من كروموسومات الكائنات متعدده الخلايا (خميره، نبات ، حيوان وانسان) **وتقسم النواقل إلى :**

أولاً البلاسميدات Plasmids

البلاسميدات هي حلقات صغيرة من الـDNA خارج الكروموسومات Extra chromosomic ذاتية التضاعف توجد بشكل طبيعي في كثير من السلالات البكتيرية وفي بعض حقيقيات النوى وحيدات الخلية مثل بعض الخمائر، هي غير ضرورية لحياة البكتيريا وتكاثرها لكنها تمنحها صفات إضافية تمكنها من العيش في ظروف استثنائية مثل مقاومة الصادات الحيوية ، تتراوح أطوالها بين 5kb – 35 kb ، تعد البلاسميدات من اكثر النواقل شيوعا وهي قادرة على ربط قطعة DNA تصل الى 15kb حسب نوع البلاسميد وتزداد كفاءة عملية التنسيل كلما قل حجم (طول) البلاسميد والعكس صحيح، تُستَخدَم في الهندسة الوراثية بشكل كبير لأغراض عدة منها حمل الجينات من كائن لآخر ، اصطناع نسخ عديدة من جينات محددة ، نقل الجينات إلى موقع العلاج الجيني..... و تتميز البلاسميدات باحتوائها على مايلي:

- **أصل التضاعف** origin of replication **وتعرف بـ Ori:** تتألف من تسلسل معين من النيكليوتيدات يتعرف عليها معقد بروتيني لتبدء عملية التضاعف وهي تجعل البلاسميد قادر على التضاعف الذاتي self-replication

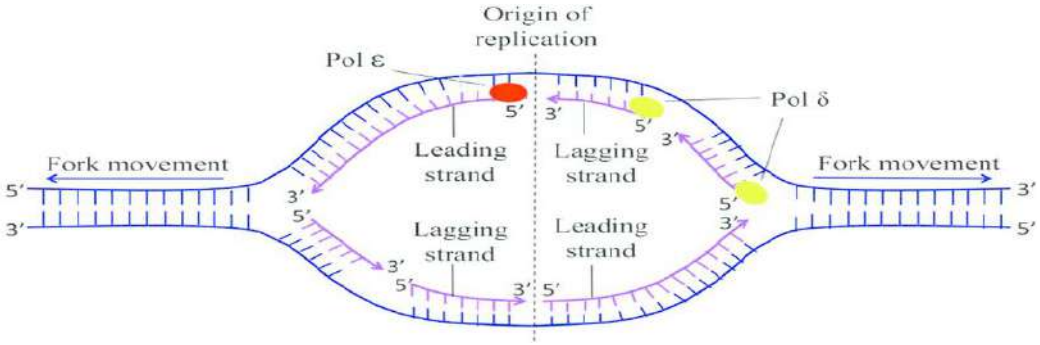
What is the origin of replication?

It (also called the replication origin) is a particular sequence in a genome at which replication is initiated.

What happens first at each origin of replication?

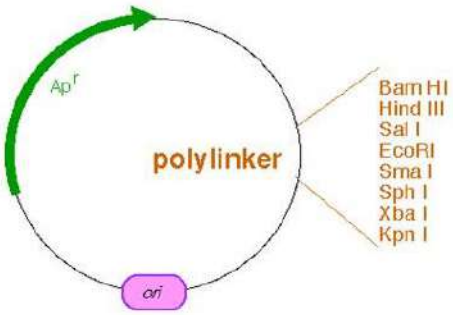
DNA replication may proceed from this point bidirectional or unidirectional.

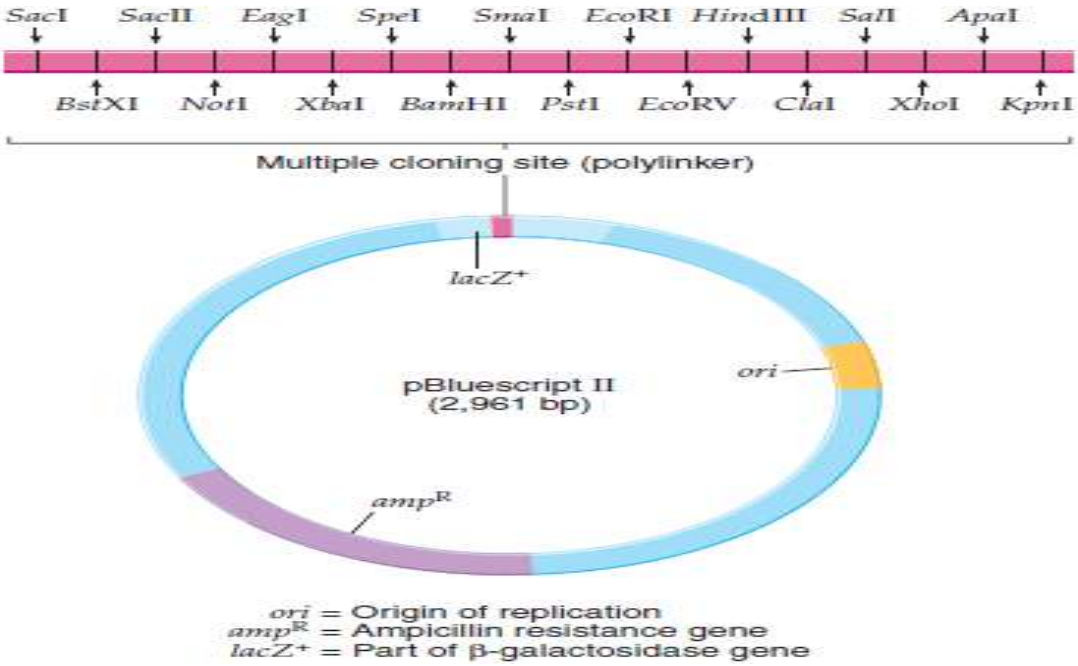
the specific structure of the replication origin varies somewhat from species to species, but all share some common characteristics such as high AT content. The replication origin binds the pre-replication complex, a protein complex that recognizes, unwinds and begins to copy DNA.



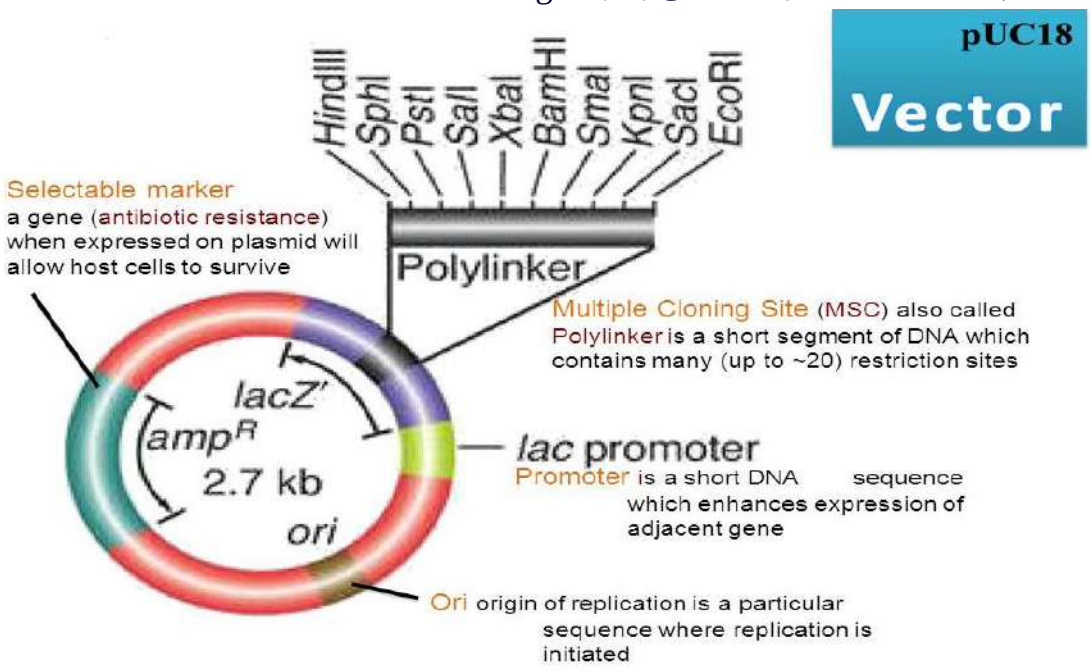
- **موقع التنسيل المتعدد Multiple Cloning Site :** هو تسلسل مميز تم تصنيعه وربطه ضمن البلاسميد ليتم التعرف عليه من قبل عدة أنواع من أنزيمات التقييد يحتوي على مناطق قطع restriction or cleavage site للعديد من أنزيمات التقييد ويسمى هذه الموقع MCS (multiple) cloning sites أو Polyliker وفي هذا الموقع سيتم إدخال الجين المرغوبة ضمنه مما يسهل عملية التنسيل لأي جين مدخلة Insert

- Many cloning vectors contain a **multiple cloning site** or **polylinker**: a DNA segment with several unique sites for restriction endo- nucleases located next to each other
- Restriction sites of the polylinker are not present anywhere else in the plasmid.
- Cutting plasmids with one of the restriction enzymes that recognize a site in the polylinker does not disrupt any of the essential features of the vector

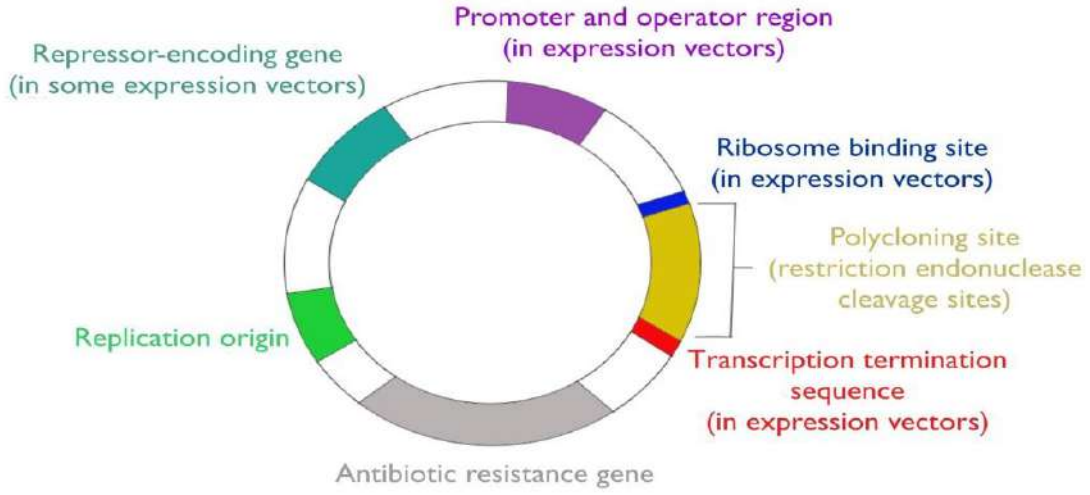




- **المعلمات الانتقائية Selectable Marker** : وتمثل هذه جينات مقاومة لبعض الصادات الحيوية مثل جين مقاومة الامبسيلين ويرمز لها AmpR وجين مقاومة التتراسايكيلين TetR وهي تسمح بانتقاء المستعمرات المحورة بزراعتها على وسط مغذي انتقائي يحوي الأمبسيلين أو التتراسايكيلين
- **منطقة الجين الدليل Reporter gene**: وهي جين مميزة يمكن من خلالها معرفة نجاح او فشل التنسيل مثل جين lacZ وهي أحد جينات أوبيرون اللاكتوزو التي ترمز البروتين الأنزيمي بيتا غالاكتوزيداز الذي يعمل على استقلاب ركازة تدعى Xgal وهي تعطي نتيجة التفاعل الأنزيمي رسابة زرقاء تلون بها الخلايا التي تحويها وبالتالي المستعمرة مما يسمح بانتقاء المستعمرات الحاوية على البلاسميد المأشوب وذلك عند زرع الخلايا في وسط حاوي على Xgal ، أما الخلايا التي لم يدخل إليها البلاسميد المأشوب فستبقى ركازة Xgal بيضاء.



- **منطقة المحضض Promoter region** : هي منطقة توجد فقط في نواقل التعبير الجيني وهذه المنطقة تقع عادةً الى الأمام Upstream من multiple cloning sites (MCS) وهي ضرورية لربط أنزيم RNA بوليميراز لنسخ وترجمة الجين التي نقلت بواسطة البلاسميد
- **موقع ارتباط الريبوزوم ribosomal binding site:** موجود في نواقل التعبير الجيني يفيد في بدء عملية الترجمة
- تسلسلات إشارية **Transcription termination sequence** : توجد في نواقل التعبير الجيني لإنهاء عملية الانتساخ
- التسلسل المستهدف **Targeting sequence**: يوجد في نواقل التعبير الجيني الحديثة وهو تسلسل إشاري صغير يوجه البروتين المأشوب المنتَّج إلى مكان محدد من الخلية المضيفة أو إلى خارج الخلية أي يصبح البروتين مفرَز
- **منطقة تسلسلات عديد الهيستيدين Polyhistidine sequence :** هي منطقة اوتسلسل اختياري من الـDNA موجودة في نواقل التعبير الجيني الحديثة ترمِز ببيتيدات قصيرة تكون جزء من البروتين المأشوب المنتَج بهدف تسهيل عملية تنقيته ، حيث يتميز البروتين المنتَج بأنه يحتوي على منطقه قصيرة تتألف من حوالي 6 ثمالات من الحمض الأميني الهيستيدين مما يسمح باستخلاصه بسهوله باستخدام أعمدة فصل النيكل التي يتحد معها البروتين بسبب الألفة العالية بين ثمالات الهيستيدين وشوارد النيكل وبالتالي نكون قد حصلنا على البروتين المطلوب بخطوه واحده



تقسم النواقل البلاسميدية بشكل عام الى:

➢ **نواقل تعبيرية Expression vectors**

ويقصد بها ان الناقل يحتوي على المحضض promoter وبالتالي يتم نسخ الجين المنقولة إلى mRNA والتعبير عنها لإنتاج كميات كبيرة البروتين المأشوب (المنتَج الهدف)

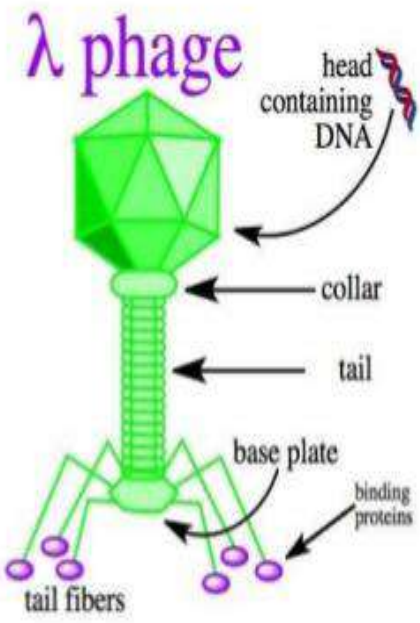
➢ **نواقل تنسيل Cloning vectors**

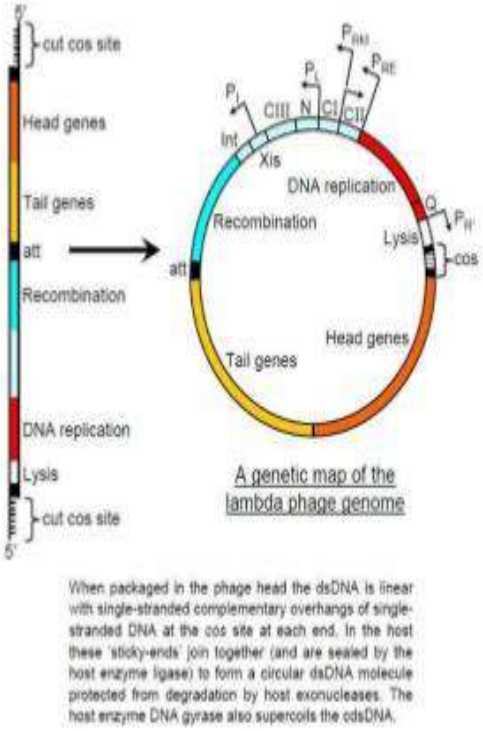
مثل الناقل pBR322 حيث يتم إقحام القطعة المراد تنسيلها ضمن منطقة lacZ بهدف تكثيرها

ثانياً الفاجات آكلات الجراثيم Bacteriophage

هي فيروسات تصيب جراثيم E.coli وتحقن مادتها الوراثية ضمنها ومن اشهرها الفاج M13 (Bacteriophage M13)و الفاجλ (Bacteriophage λ) ، وهي تستخدم بكثرة

كناقل للتنسيل ومن أهم ميزاتها هو قدرتها على حمل قطعة من الـDNA يتراوح حجمها بين 15 kb - 25 kb ، سرعة تضاعفها وامتلاكها لموقع وحيد لعدد من أنزيمات التقييد ، قادرة على إحداث العدوى بسهولة بفضل قدرتها على التطفل على الجراثيم

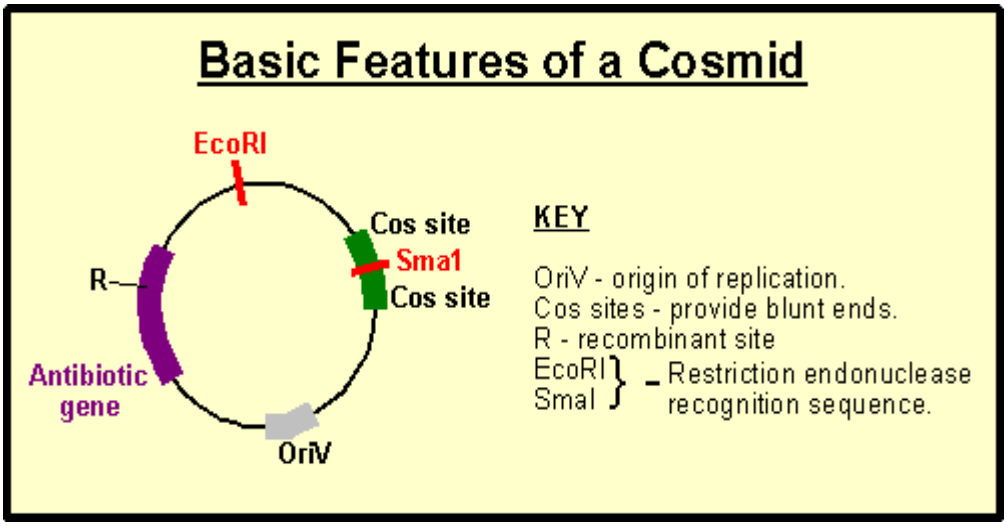




When packaged in the phage head the dsDNA is linear with single-stranded complementary overhangs of single-stranded DNA at the cos site at each end. In the host these 'sticky-ends' join together (and are sealed by the host enzyme ligase) to form a circular dsDNA molecule protected from degradation by host exonucleases. The host enzyme DNA gyrase also supercoils the cdsDNA.

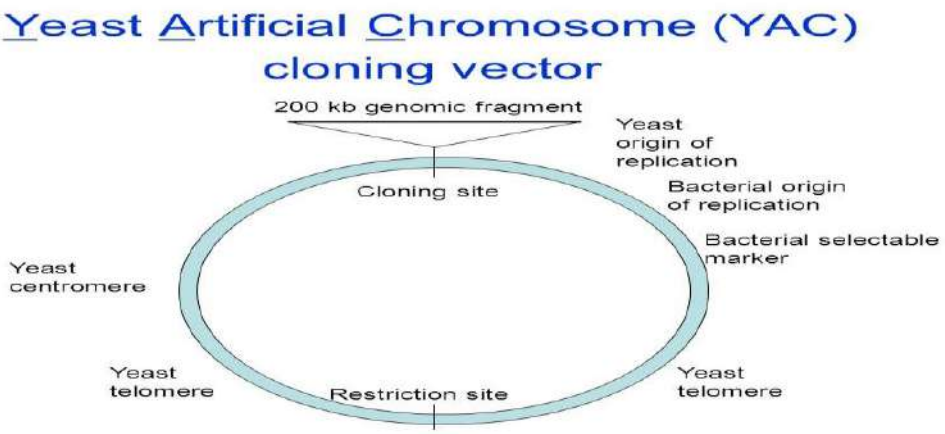
- **ثالثاً الكوزميد Cosmid**

الكوزميد عباره عن بلاسميد صنعي يحوي الموقع cos (cohesive sit) المأخوذ من DNA الفاج λ وهذا الموقع يحتوي على الجينات الخاصه لتعبئة DNA ضمن الغلاف البروتيني للفاج λ، هذا النوع من النواقل له القدره على حمل قطعه DNA كبيرة يصل حجمها إلى 50- 53 kb) (kbوهويسلك سلوك البلاسميد عند دخوله إلى الخلية الجرثومية وتكون كفاءة الكوزميد ضعف كفاءة التنسيل عند استخدام الناقل λ.



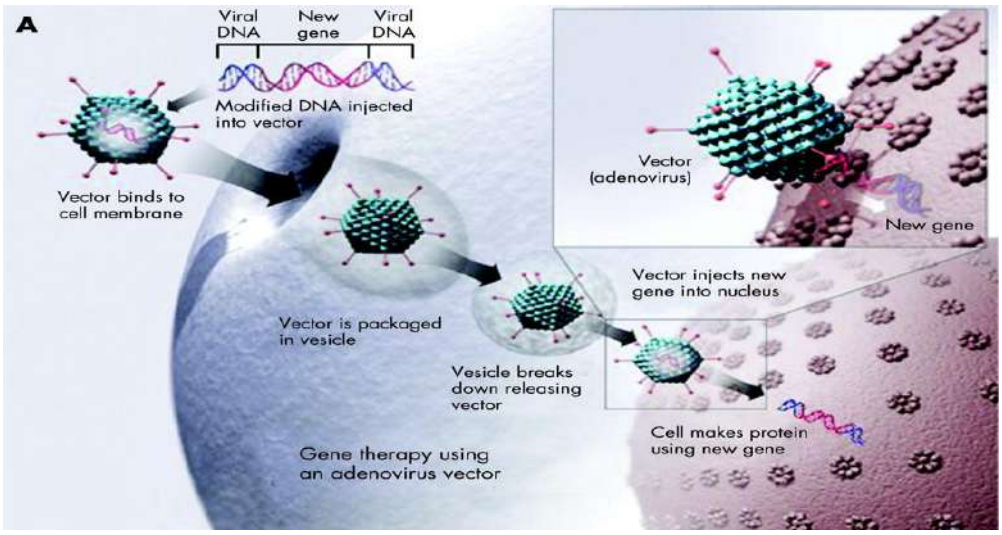
- **رابعاً الكروموسومات الصناعية Artificial Chromosomes**

نظرا للحاجة إلى نقل أحجام كبيرة من الـDNA فقد قام بعض العلماء بتحوير بعض الناقلات الطبيعية لكي تقوم بهذه المهمة و يوجد حاليا ناقلات على شكل كروموسوم فيها القطع الأساسية لكي تعمل على شكل كروموسوم و من هذه الأنواع كروموسوم الخميرة الصناعي Yeast artificial chromosome (YAC) و هوعباره عن كروموسوم محور يحتوي على الـ Telomer و منشأ التضاعف ori وسنترومير بالاضافه الى جينات تشفر لصفات انتقائيه يمكن ملاحظتها في خلايا الخميره، هذه النواقل يمكنها حمل قطع DNA بحجم (1000 kb -100kb) و من الأمثلة كذلك كروموسوم البكتريا الصناعي Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) وهو تحوير للبلاسميد المعروف ببلاسميد تناسل بكتيريا الايكولي (E.coli fertility plasmid-factor) و الذي يستطيع حمل قطعة من الـDNA يصل حجمها حتى 150 kb



- **خامساً الفيروسات Virus**

النواقل الفيروسية عادةً ماتكون فيروسات معدلة وراثياً تحمل الحمض النووي الفيروسي DNA أو RNA الذي تم تعديله ليصبح غير ممرض (لا عدواني) noninfectious مثل الفيروسات العصوية Baculovirus التي تتطفل على الحشرات، والفيروسات الرجعية Retrovirus وهي من أفضل النواقل الفيروسية وتملك ميزة حشر الـDNA ضمن الكروموسوم، تعد الفيروسات أقل الكائنات الدقيقة استخداماً كنواقل بسبب التعقيدات التي تتصف بها مادتها الوراثية و الأخطار التي يمكن أن تنتج من إجراء تحويرات وراثية عليها



بعد أن تعرفنا على النواقل وأنواعها في الفقرة السابقة
نتابع الآن مراحل تنسيل الجين وكنا قد تحدثنا عن المرحلة الأولى والثانية وهما:

عزل الجين المرغوب تنسيلها

↓

ربط الجين ضمن ناقل مناسب (بلاسميد مثلاً) لتخليق جزيئة DNA مأشوب

↓

المرحلة الثالثة التي سنتحدث عنها هي:

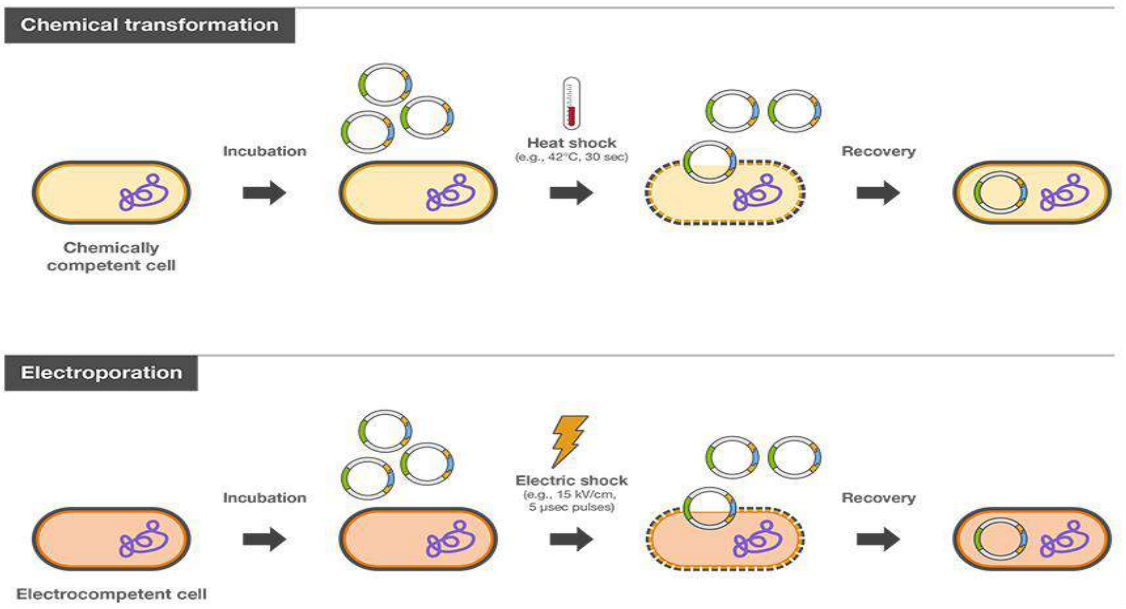
↓

إدخال البلاسميد المأشوب ضمن المضيف بعملية التحوير transformation

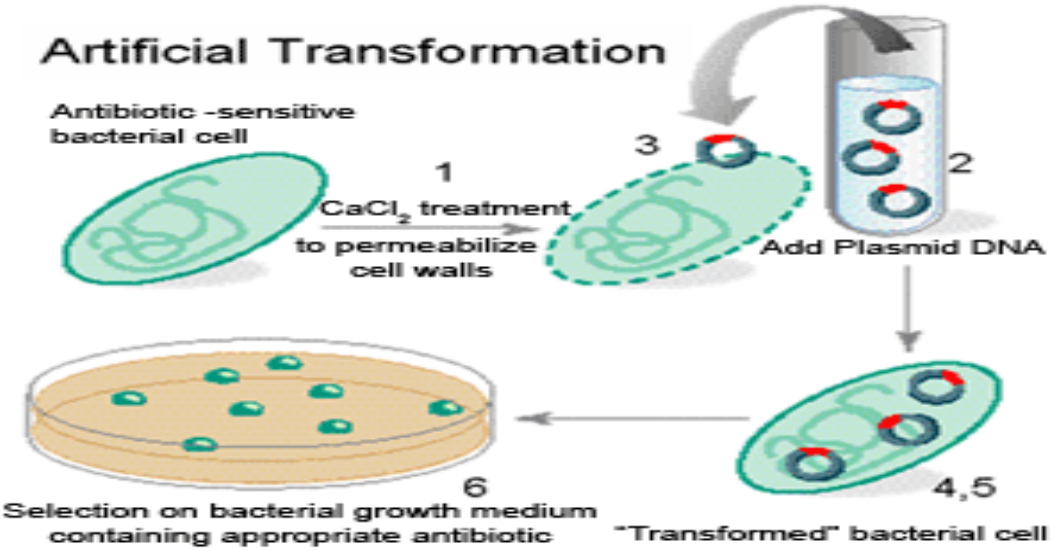
- **إدخال البلاسميد المأشوب ضمن المضيف بعملية التحوير transformation**

التحوير transformation هي عملية إدخال جزيئة البلاسميد المأشوب إلى المضيف المناسب والذي عادة يكون أحد أنواع الخلايا الجرثومية وتتم بإحدى الطريقتين التاليتين :

- التحريض بوجود شرجبات أحادية التكافؤ: وهي الطريقة التقليدية لتحضير الخلايا الجرثومية المؤهلة لعملية االتحوير وتتم بحضن الجراثيم في محلول مركز من أملاح الكالسيوم calcium chloride في وسط محاط بالثلج لمدة نصف ساعة تقريباً وذلك لتعديل الشحنة السالبة لغشاء الخلية الجرثومية وجعله موجب ثم تتم إضافة جزيئات البلاسميد المأشوب المشحونة سلبياً إليهم وبالتالي تنجذب إلى غشاء الخلية الجرثومية و هي مبدأ عملية التحوير ثم يتم تطبيق صدمة حرارية heat shock مما يسمح بدخول البلاسميد المأشوب خلال فترة الصدمة الحرارية بسهولة ضمن الجراثيم
- التثقيب الكهربائي electroporation : يتم فيها إخضاع الجراثيم إلى تيار كهربائي مما يؤدي إلى تشكّل ثقوب يتسرّب منها جزيء البلاسميد المؤشب إلى داخل الخلية الجرثومية



من الجراثيم المستعملة في عملية التحوير جراثيم E.coli DH5α و E.coli Top 10
بعد عملية التحوير تتضاعف جزيئة البلاسميد المأشوب ضمن الخلية الجرثومية و كل تضاعف للخلية يقابله تضاعف لهذا البلاسميد ، ويؤدي زرع الخلايا على وسط أغار إلى تكاثرها للحصول على مستعمرات ليتم في مرحلة تالية انتقاء المستعمرات الحاوية على البلاسميد المأشوب



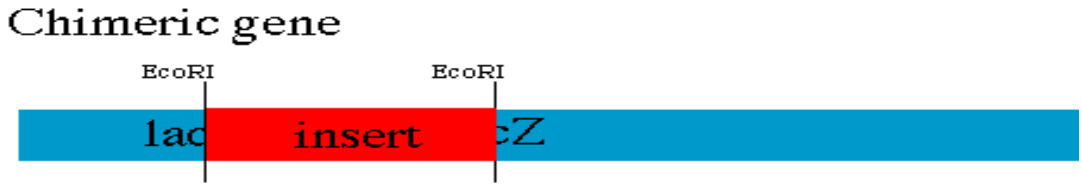
- **تقصي دخول البلاسميد المأشوب إلى المضيف - الإنتقاء Selection**

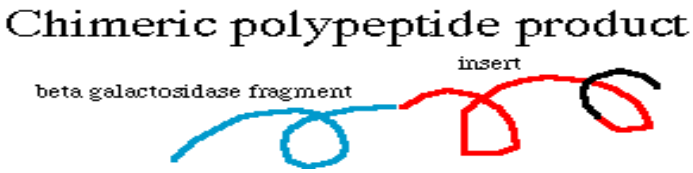
لتجنب نمو الخلايا التي لم تنجح فيها عملية التحوير يتم تصميم البلاسميدات المعدّة كنواقل لتحتوي على واسم اصطفائي وهوجين يسمح باصطفاء الخلايا التي تحمل هذا الناقل مثل جين مقاوم لأحد الصادات الحيوية مثل أمبيسيلين، تتراسكلين وهذه الصفة هي الواسم المميز للبلاسميد بحيث أنّ الوسط الذي تزرع فيه الجراثيم التي تمت عليها عملية التحويريحتوي على هذا الصاد الحيوي، وبالتالي فإن الجراثيم التي تلقت البلاسميد فقط هي التي تنمو في هذا الوسط بسبب احتوائه على جين مقاوم لهذا الصاد، بالنسبة للجراثيم التي نجحت معها عملية التحوير وأدخلت البلاسميد نكون أمام احتمالين :

- ✓ **إما أن تكون قد تلقت جزي البلاسميد المأشوب أي الناقل مع الجين المطلوبة**
- ✓ **أو أن تكون تلقت جزيء البلاسميد غير المأشوب أي الناقل بدون الجين المطلوبة**
- ✓ **يضاف إلى ذلك وجود جراثيم لم تنجح فيها عملية التحوير أي لم يدخل البلاسميد إليها**

من الطرق المستخدمة لتمييزالجراثيم التي تحتوي على البلاسميد المأشوب، طريقة تقصي المستعمرات البيضاء / الزرقاء ، حيث تزرع الجراثيم و تنمى على أطباق بتري تحتوي على وسط مناسب لنموالجرثوم المستخدم وتحتوي على صاد حيوي مثل أمبيسيلين و ركيزة X-gal* .

تتمتع البلاسميدات التي يمكن استخدامها في هذه الطريقة بوجود موقع MCS وهو موقع تعرف لأنزيم التقييد المستخدم و الموقع الذي سيتم إدخال الجين المرغوب تنسيلها ضمنه ويكون هذا الموقع ضمن جينة lac– Z المرمّزة لإنزيم β-galactosidase الذي يشطر رابطة β-glycosidic في جزيئة D- lactose ، وعلى اعتبار أن جز يئة X-gal تحاكي D- lactose وبالتالي فإن إنزيم-β galactosidase يشطرها لينتج معقداً ذو لون أزرق، يؤدي الربط الناجح للجين بالبلاسميد إلى تمزيق جين lac Z و بالتالي لن يتم إنتاج إنزيم β-galactosidase و سينتج لدينا مستعمرات جرثومية بيضاء تدل على وجود البلاسميد المأشوب ضمنها.

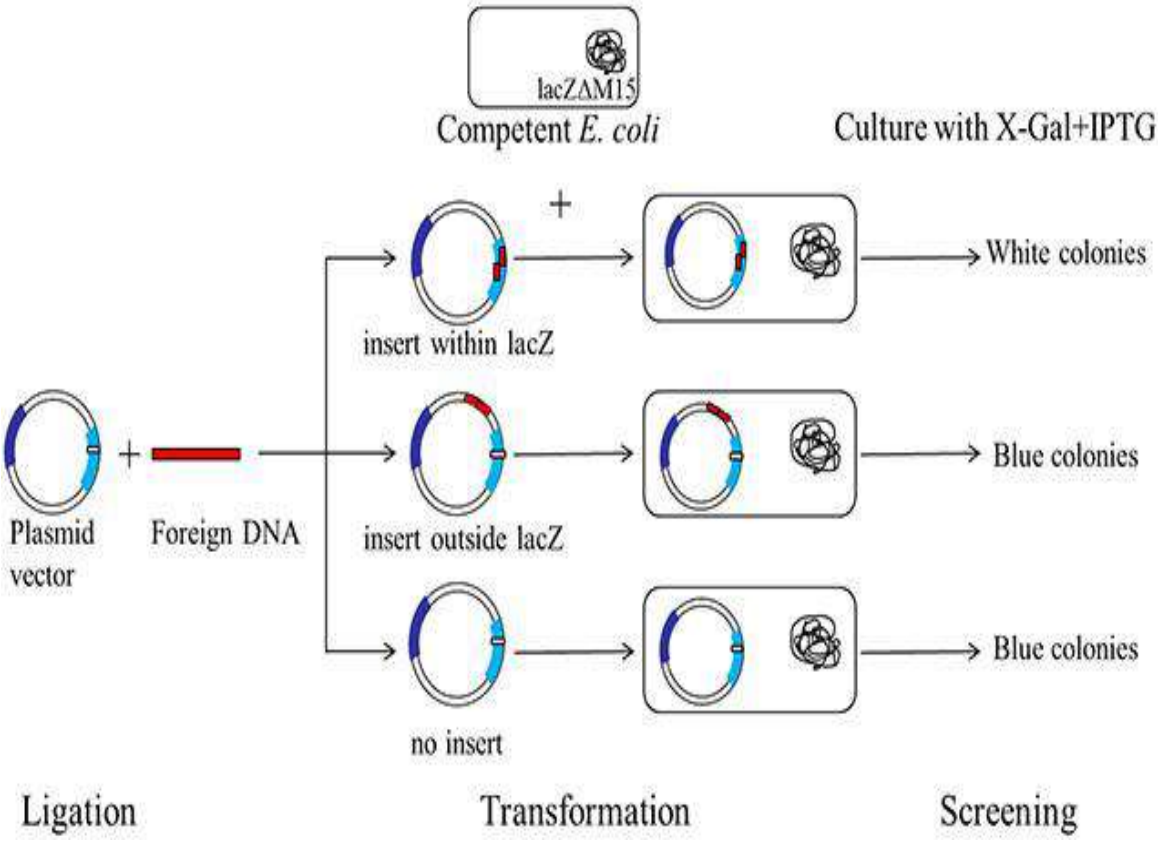


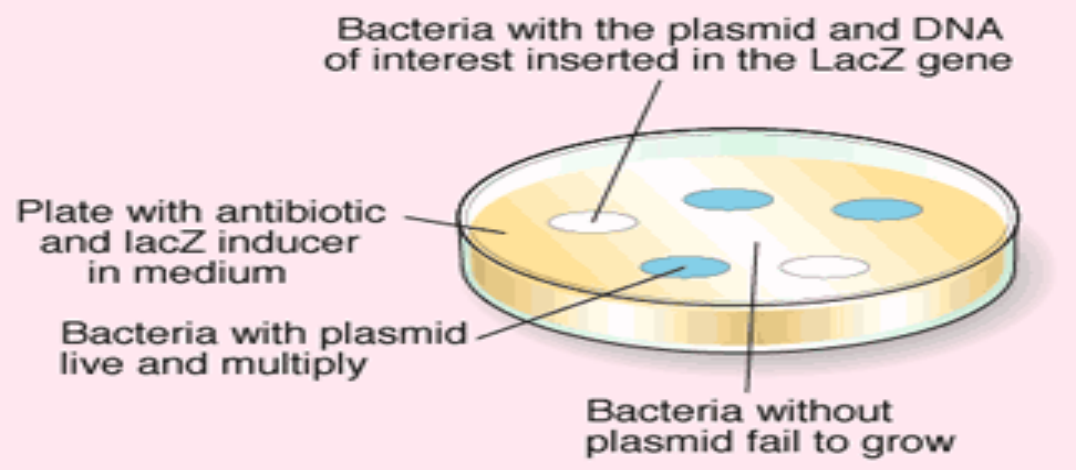


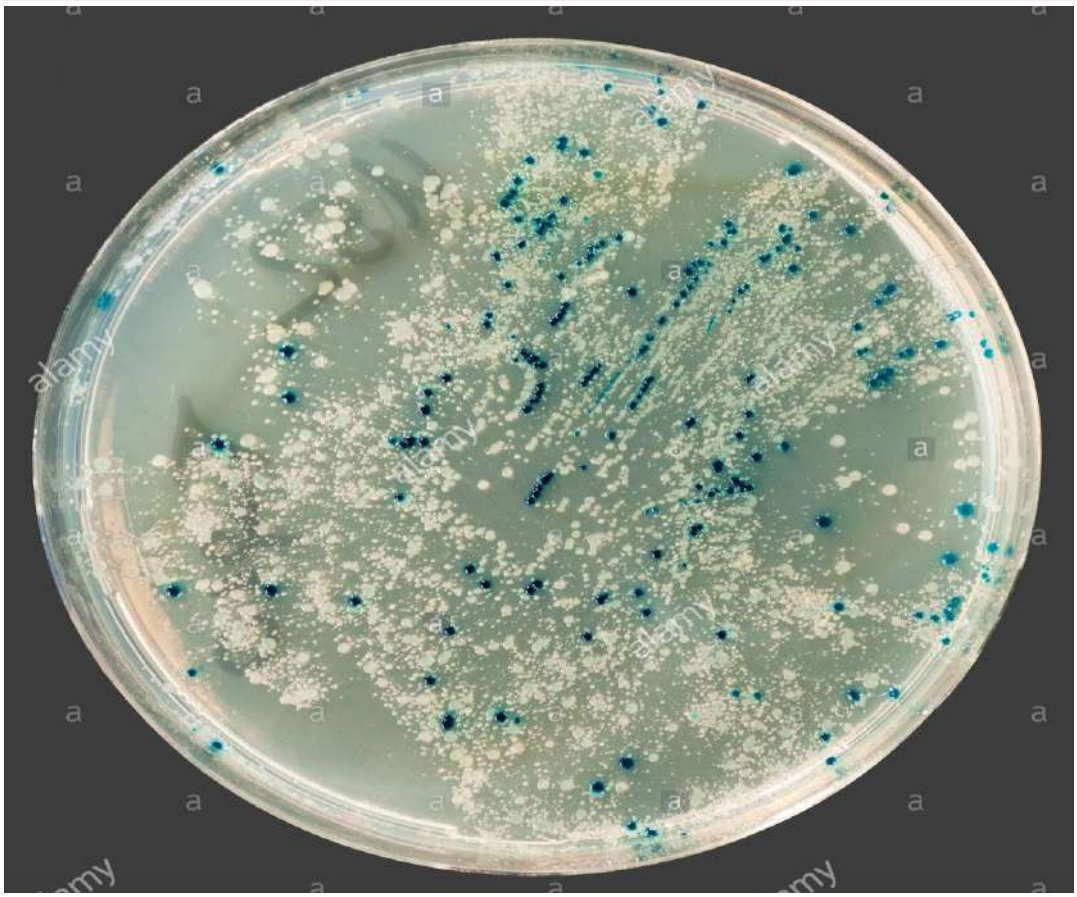
- إن موقع إدخال الجين المطلوبة يتم ضمن الجين lac– Z و في حال إدخال الجين بشكل صحيح للناقل ستتعطل معها الجين lac– Z ولن يتم التعبير عن أنزيم β-galactosidase
- أما في حال لم تدخل الجين المطلوبة ضمن البلاسميد لن تتعطل الجين lac– Z وبما أن الوسط يحتوي على X-gal سيتم العبير عن إنزيم β-galactosidase الذي يقوم باستقلاب X-gal لتنتج المستعمرات الجرثومية الزرقاء
- أما الخلايا الجرثومية التي لم تحصل عليها عملية التحوير أي لم يدخل الناقل إليها ستموت ضمن الوسط الحاوي صاد حيوي وذلك لأنها لم تدخل الناقل وبالتالي لم تحمل صفة المقاومة للصادات الحيوية.

ركيزة X-gal* : تتألف من IPTG وهي مادة شبيهة باللاكتوز و X-gal هو ملون فقط

وبهذه الطريقة نتمكن من انتقاء النسائل التي أدخل إليها البلاسميد المأشوب





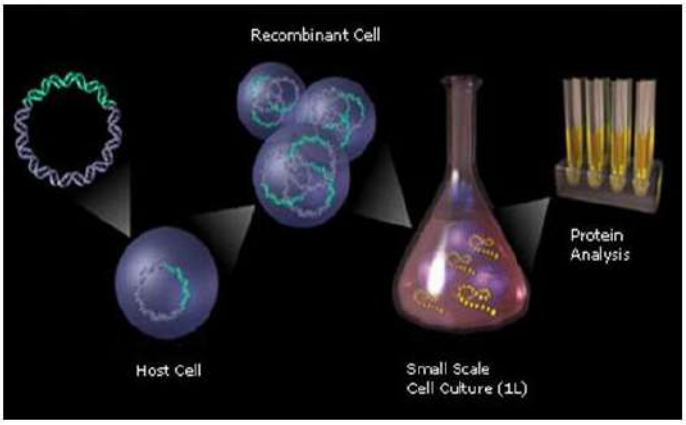


انتهت المحاضرة الثالثة

المحاضرة الرابعة
إنتاج البروتينات الدوائية المأشوبة (I)
recombinant Pharmaceutical protein production

معظم الأدوية البروتينية في الوقت الحاضر هي منتجات مأشوبة تتميز بكونها رخيصة الثمن وأكثر أماناً بالإضافة إلى سهولة الإنتاج الوفير من البروتينات والببتيدات المأشوب

- Most protein pharmaceuticals today are recombinant products
  - Cheaper, safer, abundant supply



تقسم عملية إنتاج البروتين المأشوب إلى ثلاثة مراحل أوأطوار :

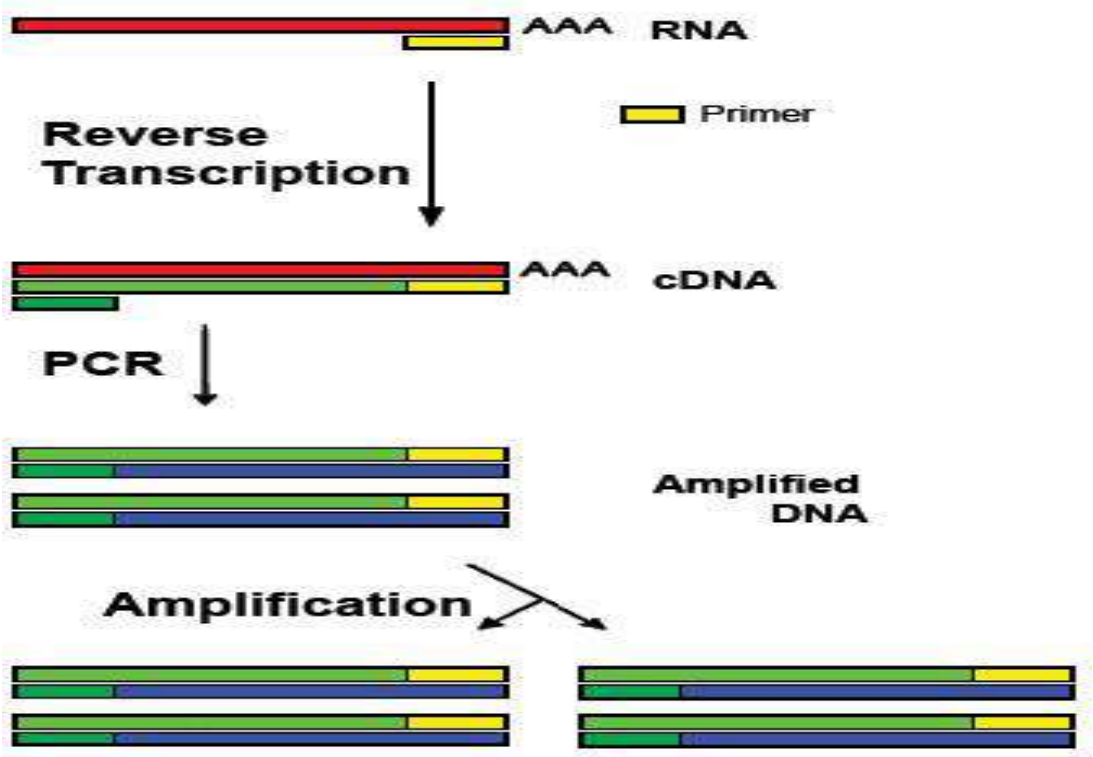
- **المرحلة التحضيرية**
- **مرحلة المعالجة الاولية Upstream processing**
- **مرحلة المعالجة النهائية Downstream processing**

أولاً : المرحلة التحضيرية

تضم هذه المرحلة جميع العمليات التحضيرية للبنى الأولية المنتجة للبروتين بدءاً من دراسة الناقل المستخَدم وكذلك دراسة خصائص الخلية المضيفة وقدرتها على إنتاج البروتين المطلوب و استخدام تقانة الـDNA المأشوب لتحضير الناقل الماشوب الذي غُرِس ضمنه الجين التي تُرمِز البروتين الدوائي وكذلك تحوير الخلايا المضيفة و زرعها في أوساط خلوية مصغرة وضبط شروط الزراعة (دراسة الشروط الملائمة لنمو النظام الحي المستخدَم)

تتألف الجين عند الإنسان **من إكسونات** وهي المناطق التي تُرمِز الحموض الأمينية في سلسلة عديد الببتيد **ومن إنترونات** وهي مناطق غير مرمزة تتوضع بين الإكسونات ومن المعروف أنه بعد عملية انتساخ المورثة وتَشكُل mRNA الطليعي يخضع بدوره إلى مجموعة من التعدبلات تتمثل بإزالة الإنترونات وربط الإكسونات في عملية تدعى التضفير وSplicing وكذلك يتم إضافة ذيل من الأدنيل في النهاية 3 وقبعة من الغوانين في النهاية 5 ليتشكل mRNA الناضج الذي يغادر النواة إلى السيتوبلاسما ليرتبط مع الجسيمات الريبية كي تبدأ عملية الترجمة واصطناع البروتين الذي ترمزه الجين ، إن جميع المراحل السابقة لا تتم في خلايا بدائيات النوى (البكتريا) لأن الجينات فيها تتألف من إكسونات فقط وبالتالي لا تستطيع هذه الخلايا معالجة mRNA الطليعي.

✓ **يتم تحضير الجين الهدف عند الإنسان** (عندما تكون الخلايا المضيفة من بدائيات النوى) بدءاً من mRNA الناضج الخاص بالجين المطلوبة والموجود في الخلايا التي تنتج البروتين المطلوب مثلاً نريد إنتاج هرمون الإنسولين البشري المأشوب لذلك نبدأ من الخلايا التي تنتجه و تفرزه بشكل طبيعي وهي خلايا بيتا في جزر لانغرهانس في البنكرياس، وباستخدام تفاعل RT-PCR يتم تحويل mRNA إلى cDNA (Complementary DNA) باستخدام أنزيم النسخ العكسي و بادئة عكسية فنحصل على هجين cDNA/RNA ، ويتم الحصول على cDNA ثنائي الشريط باستخدام بادئات نوعية (Forward وReverse) و أنزيم DNA بوليمراز وذلك بعد التخلص من RNA بوساطة إحدى أنزيمات RNase فنحصل على مليارات من النسخ من cDNA ، في خطوة تالية يتم قطع نهايات الشدفة المضخمة (cDNA) باستخدام أنزيمات تقييد مناسبة حيث تحتوي نهاية كل بادئة على تسلسل خاص يدعى Adapter يتعرف عليه أنزيم التقييد المناسب ويقطعه



✓ **يتم إدخال موجَّه للشدفة المطلوبة ضمن ناقل التعبير الجيني** من خلال قطع الناقل بأنزيمي تقييد مختلفين يقطعان ضمن منطقة التعرف عليهما MCS وهما نفس الأنزيمين المستخدَمَين لقطع طرفي الشدفة التي يتم ربطها بالناقل بواسطة أنزيم ربط Ligase لنحصل على ناقل مأشوب والذي تتم سلسلته للتأكد من عدم وجود أخطاء أثناء غرس الشدفة ضمن الناقل (انزياح مجال القراءة ORF) أو أثناء تفاعل PCR والتي قد تؤدي إلى تغير في بنية البروتين الناتج

يعتمد اختيار الناقل المناسب على حجم الشدفة المدخَلة وعلى الخلايا التي ستُستخدَم لإنتاج البروتين وبالتالي لدينا ناقل يعمل في البكتيريا أو ناقل يعمل في حقيقيات النوى لكن ماهو الفرق بينهما؟

إن الفرق الرئيسي بينهما هو طبيعة المحضض promoter ووجود تسلسل مرمز لذيل عديد الأدنيل في حال النواقل المستعملة لإنتاج البروتينات في الخلايا حقيقيات النوى

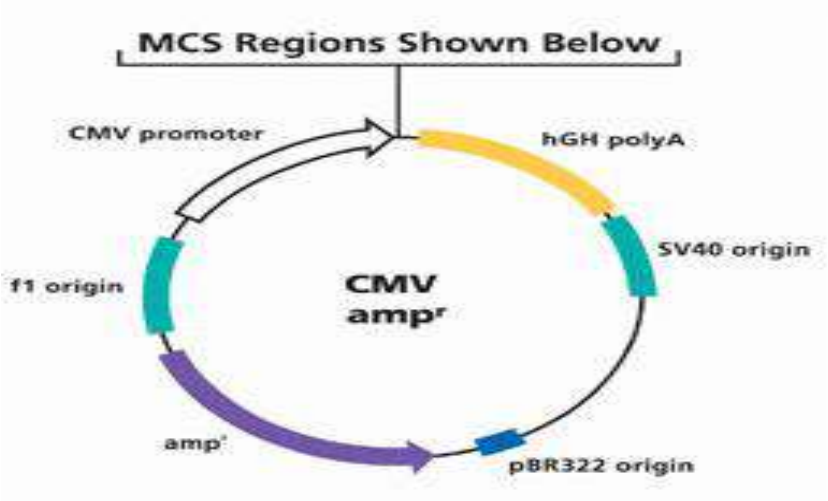
المحضض promoter هو عبارة عن تسلسلات نيكليوتيدية موجودة قبل الجين مثل صندوق TATA (TATA box) تكون مسؤولة عن الإنتساح الفعال للجين

تكون المحضضات التي تعمل في الخلايا إما :

- فيروسية (محضضات لمورثات تحملها فيروسات تصيب هذه الأنماط الخلوية)
- أو محضضات لمورثات خلوية

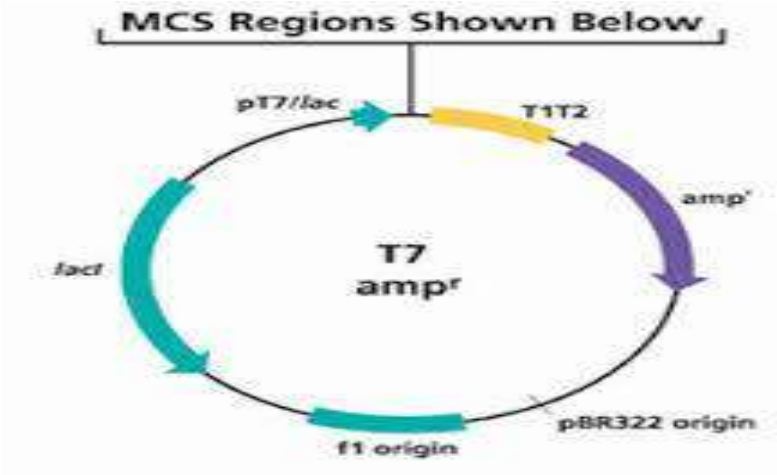
من المحضضات التي تعمل في الخلايا حقيقيات النوى:

- محضضSV40 وهو محضض فيروسي محضر من الفيروس المسبب للأورام Simian virus 40
- محضضCMV وهو محضض فيروسي محضر من الفيروس Cytomegalovirus
- محضض EF-1α (Elongation Factor-1α) وهو محضض غير فيروسي



من المحضضات التي تعمل في البكتيريا:

- محضض أوبيرون اللاكتوز Lac operon promoter
- محضضات الفاجات (bacteriophage) T7و T3



✓ **<u>يتم إدخال الناقل المأشوب في الخلية المضيفة بعملية تدعى التحوير</u>** Transformation باستخدام إحدى الطرق التالية : الصدمة الحرارية أو التثقيب الكهربائي (تُستخدَم في الخلايا البكتيرية) ، استخدام مواد تندمج مع الغشاء السيتوبلاسمي أو التثقيب الكهربائي (تُستخدَم في خلايا الثدييات) وفي خطوة تالية يتم زرع الخلايا في أطباق تحوي وسطٍ مغذٍ انتقائي يحتوي على ركازة X-gal وصاد حيوي لتشكيل مستعمرات حيث تنمو فقط الخلايا التي أخذت الناقل ثم تتم عملية انتقاء Selection للمستعمرات التي تحوي الناقل المأشوب ومن أبسط الطرق لعملية الانتقاء غربلة

المستعمرات Colonies screening وتدعى الغربلة بيضاء – زرقاء Blue-white screening التي تمكننا من التمييز بين المستعمرات المأشوبة التي تحوي الناقل المأشوب (المستعمرات البيضاء) والمستعمرات التي تحوي الناقل الفارغ (المستعمرات الزرقاء) .

- المورثة Lac-Z هي واحدة من مورثات Lac Operons وهي ترمز أنزيم B-galactosidase الذي يستقلب سكر اللاكتوز، إن مواقع تعرف MCS أنزيمات التقييد هي ضمن المورثة Lac-Z وعند تعطيل هذه المورثة نتيجة قطعها فإنها لا تعبر عن أنزيم B-galactosidase وبالتالي تبقي الركازة X-gal بيضاء نتيجة عدم استقلابها وتكون المستعمرات بيضاء مما يدل أن هذه الخلايا أخذت الناقل المأشوب
- X-gal وهي ركازة صنعية لونها أبيض تعطي عندما يستقلبها أنزيم B-galactosidase الذي ترمَزه المورثة Lac-Z صباغ غير منحل لونه ازرق

الخلايا المضيفة Host Cells

يتم استخدام الخلايا المضيفة كمصانع حيوية لإنتاج البروتينات المأشوبة وهي تعد الجزء الاساسي من أنظمة التعبير االمأشوبة ويتم اختيارها وفقاً لحجم البروتين الدوائي المطلوب وخصائصه مثلاً: يوجد بروتينات تحتاج لعملية تعديل بعد الترجمة كي تصبح فعالة وظيفياً، كما يوجد بروتينات يتم إفرازها خارج الخلية وأخرى تبقى داخل الخلية، تضم الخلايا المضيفة الأنماط التالية :

- البكتيريا
- الخميرة
- خلايا الحشرات
- خلايا الثدييات
- الحيوانات والنباتات المحورة وراثياً
- بكتريا الإيشيريكية القولونية E.coli وخلايا بكتيرية أخرى

➢ تقدم أنظمة المضيف البكتيري ميزات أساسية تتضمن التكاثر السريع ضمن أوساط زرع ذات تركيب بسيط ورخيصة الثمن ، المستوى العالية في التعبير الجيني نتيجة استخدام النواقل الحديثة ذات المحضضات القوية وبالتالي يمكن أن يصل مردود إنتاج البروتين المؤشب إلى 30% من مجمل بروتينات الخلية

ولكن من جهة أخرى يوجد مساوئ لاستعمال الخلايا البكتيرية ومن أهمها:

➢ البكتريا غير قادرة على القيام بتعديلات بعد الترجمة post-translational modifications مثل تشكيل رابطة ثنائية الكبريت أو إضافة مجموعات سكرية (الغلكزة) glycosylation يكون لها دور كبير في فعالية بعض البروتينات ،مثلاً تحتاج الأضداد وحيدة النسيلة لعمليات الغلكزة حيث تسهم السكاكر المضافة في التعرف على المستضد وبالمقابل لا يؤثر فقدان السكاكر على فعالية البروتينات المنتجة مثل البروتين IL-2 حيث للشكل غير المضاف إليه السكر unglycosylated form نفس الفعالية الوظيفية للبروتين الطبيعي

➢ البكتريا من بدائيات النوى فهي لا تمتلك آليات لإفراز البروتين Exocytosis إلى خارج الخلية نتيجة عدم وجود الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية وبالتالي تتجمع البروتينات المنتَجة بصورة غير منحلة في بنى داخل خلوية تدعى الأجسام الضمنية Inclusion bodies ولكي نستخلص البروتينات يجب تحطيم الخلايا البكتيرية والقيام بالكثير من عمليات التثفيل والفلترة لتنقية البروتين الناتج الذي يكون ملوث ببروتينات أخرى توجد داخل البكتريا

- الخميرة Yeast

إن الخميرة مثل: Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris والفطور 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 الحثّ على إفراز البروتين ، الخميرة قادرة على القيام بالتعديلات بعد الترجمة لذلك تُطوى بروتينات الإنسان التي جرى التعبير عنها في الخميرة بشكل صحيح مع احتوائها على جسر ثنائي الكبريت ولكن عملية الارتباط بالمجموعة السكرية تختلف بشكل كبير عن نموذج مثيلتها عند الإنسان

- خلايا الحشرات Insect cells

من الممكن إدخال الجين المرمِز لبروتين دوائي مأشوب داخل جينوم الفيروس العصوي Baculovirus الذي يصيب خلايا الحشرات بفعالية عالية وبالتالي يتم استخدام آلية تصنيع البروتين لديها من أجل إنتاج البروتين المطلوب ، لذلك يعد نظام التعبير الجيني هذا مناسبًا جدًا للحصول وبسرعة على كميات صغيرة من البروتين من أجل استخدامها في الدراسات قبل السريرية

✓ خلايا الثدييات Mammalian cells

يمكن في خلايا الثدييات المضيفة إحراز مستوى عالي من التعبير عن بروتينات مأشوبة مثل استخدام:

✓ خلايا مبيض الهمستر الصيني Chinese hamster ovary cells (CHO)

✓ خلايا كلى طفل الهمستر Baby hamster kidney (BHK)

✓ خلايا الفأر السرطانية (مثل خلايا NS 0، SP/0)

تفرَز البروتينات عادةً في وسط التخمير مطوية (ملتفة) بالشكل الصحيح وفعالة وفي معظم الحالات يجري عليها عمليات إضافة المجموعة السكرية Glycosylation وتعديلات ما بعد الترجمة الأخرى، "بطريقة مشابهة نوعًا ما لما يجري عند الإنسان"، مع وجود فروقات طفيفة يمكن أن تؤثر في استمناع البروتين المتشكل، و قد يتطلب تطوير خط مستقر من الخلايا الثدية التي تعبر بمستوى عالي عن بروتين علاجي عدة دورات من التضخيم والتي تأخذ أشهرًا بسبب نموها البطيء كما يتطلب أوساط زرع تتألف من مجموعة مواد مرتفعة الثمن مما ينعكس على زيادة ثمن المنتج (كلفة تصنيع مرتفعة)، تُستخدَم تقانة التخمير مع خلايا ثدييات مضيفة من أجل إنتاج الجزء الأكبر من المستحضرات الدوائية الحيوية المرخصة كما أنها النظام الأمثل لإنتاج البروتينات المعدلة والبروتينات العلاجية على مستوى ضخم خاصة إذا كان إجراء التعديل الصحيح للبروتين أساسي لامتلاك هذا البروتين تأثيره العلاجي

✓ الحيوانات والنباتات المحورة وراثيًا Transgenic animals and plants

يعني التلاعب الجيني إدخال جين من نوع ما من الكائنات وهو ما يسمى بالجين المنقول في الخلايا الجنسية لنوع آخر إما نبات أو حيوان بحيث تقوم كل الذرية الناتجة من الحيوان أو النبات المحور بصناعة البروتين الجديد الذي تُشفر له هذه الجين، ومن أهم البروتينات التي تُنتج ضمن الحيوانات هرمون النمو الذي يُنتج ضمن الماعز المحورة وراثياً حيث يتم جمع البروتين من الحليب ويخضع لعمليات تنقية بعد ذلك، تمثل تقانة التحوير الوراثي للنبات تحديًا حقيقيًا للتقانة الحيوية الاقتصادية فهي تقدم ميزات انخفاض كلفة تنمية النباتات على مساحات شاسعة، كما توفر أعضاء طبيعية لتخزين البروتين أما المساوىء الحالية لهذا النظام فتتمثل في انخفاض الكميات المتراكمة من البروتينات المأشوبة و عدم توفر معلومات كافية حول عمليات التعديل بعد الترجمة التي تجري على البروتينات في النبات

✓ عندما تكون البروتينات كبيرة الحجم أكبر من 100 KD فهي تحتاج إلى تعديلات بعد الترجمة كما تكون عملية تطوي البروتين معقدة ، لذلك يتم اختيار خلايا حقيقيات النوى كمنظومة تعبيرجيني

✓ اما البروتينات صغيرة الحجم اقل من 30 KD والتي لا تحتاج إلى تعديلات بعد الترجمة يتم اختيار خلايا بدائيات النوى كمنظومة تعبير جيني مثلاً يتم اختيار E.coli للحصول على مردود كبير وبسرعة وبكلفة بسيطة لإنتاج هرمون الأنسولين

Choice of Expression System 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 eukaryote

Not every type of protein can be produced by any cell type

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

✓ **إنتقاء المستعمرات المأشوبة التي تُنتَج البروتين الدوائي الهدف بشكل أكبر و افضل**

يتم استنبات مجموعة من المستعمرات الماشوبة (كل مستعمرة بمفردها) ضمن حجوم صغيرة من أوساط زرع مناسبة و يتم في هذه المرحلة تحديد وسط الزرع الأمثل وضبط شروط الزرع التي تؤمن النمو الأفضل للمستعمرات المأشوبة

- يتم استنبات الخلايا البكتيرية على أوساط مغذية سائلة تحوي أملاح وحموض أمينية مثل:

Luria Broth و LB Medium

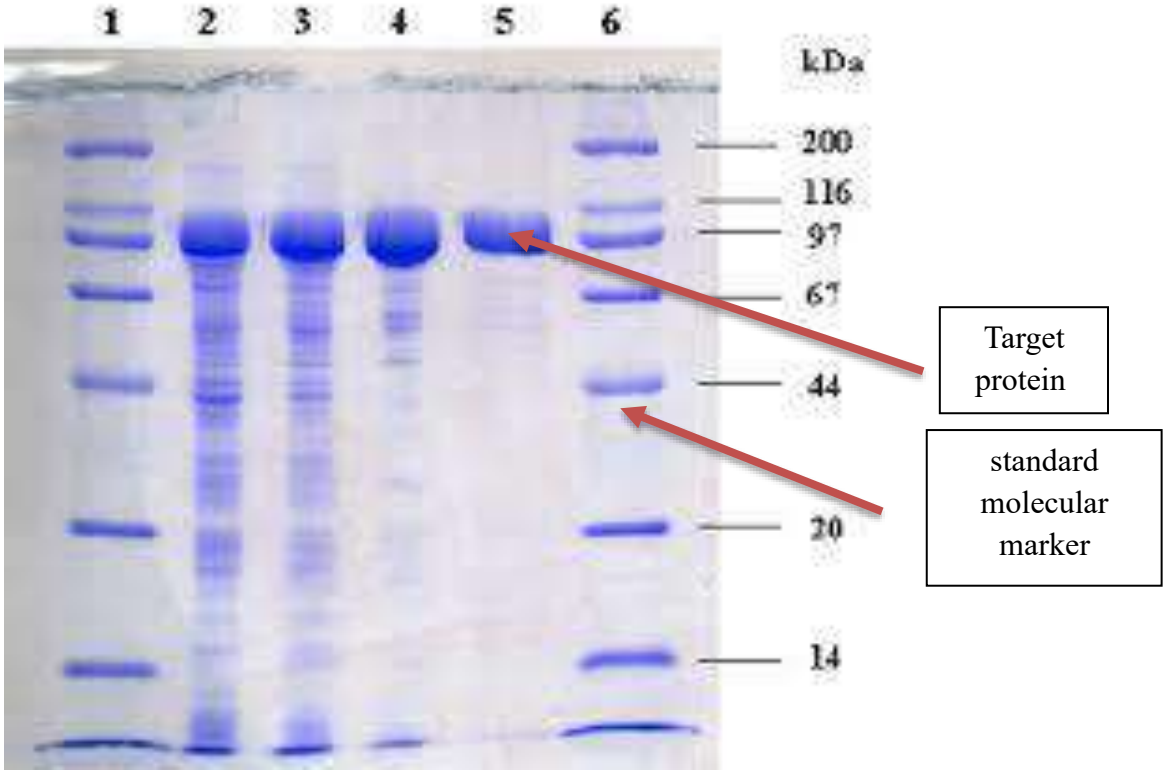
- يتم استنبات الخلايا حقيقة النوى على أطباق زرع خاصة في أوساط زرع مناسبة بحسب الخط الخلوي مثل:
  - FBS (Fetal Bovine Surum) مصل الجنين البقري والذي يكون غني بالكثير من عوامل النمو الضرورية لبقاء الخطوط الخلوية حية وتحفيز نموها
  - DMEM (Dulbico s Modified Eagle Meduim) وهو من الأوساط الشهيرة التي تعيش فيها خلايا الثديات
  - RPMI و IMDM

بعد استنبات المستعمرات المأشوبة ضمن وسط الزرع المناسب يجب التأكد من أن الخلايا المحورة تقوم بإنتاج البروتين المأشوب الهدف لذلك يتم أخذ عدد من المستعمرات (من 10-20 مستعمرة) ومن ثم حل الخلايا باستعمال دارئة حل مناسبة وتحضير خلاصة بروتينية في حال كان البروتين غير مفرَز وفي حال كان البروتين مفرَز يتم أخذ وسط الزرع، ثم ترحيل الناتج بالرحلان الكهربائي على هلامة من Polyacrylamide للتأكد من وجود البروتين الهدف الذي يظهر على شكل عصابة ضخمة عند الوزن الجزيئي الموافق له

الرحلان الكهربائي Electrophoresis

يُعرَف الرحلان الكهربائي Electrophoresis بأنه حركة الأيونات والجزيئات العملاقة المشحونة charged macromolecules (DNA, RNA, proteins) خلال وسط معين (هلام الأغاروز أو هلام متعدد الأكريلاميد) عند تسليط تيار كهربائي ويُستخدَم للكشف عن هذه الجزيئات وفصلها حسب وزنها الجزيئي .

إذا كان للجزيئة محصلة شحنة سالبة أو موجبة فإنها سوف تهاجر في المجال الكهربائي حيث أن الجزيئة ذات الشحنة السالبة تهاجر وتنجذب إلى القطب الموجب، والجزيئات ذات الشحنة الموجبة سوف تهاجر وتنجذب نحو القطب السالب، يتم الترحيل في هلام يتكون من ثقوب مجهرية دقيقة microscopic pores ، ويقوم هذا الهلام بإعاقة حركة الجزيئات المختلفة من خلال التأثير المنخلي لثقوبه الدقيقة حيث إن الجزيئات الصغيرة تهاجر بشكل أسرع خلال الهلام من الجزيئات الأكبر، لذا تستخدم تقنية الرحلان الكهربائي بشكل واسع في مخابر الوراثة الجزيئية لفصل الجزيئات الكبيرة العملاقة، و يمكن معرفة حجم هذه الجزيئات المفصولة على الهلام من خلال مقارنتها بواسمات جزيئية قياسية standard molecular markers والتي ترحل بموازاة العينة خلال الترحيل الكهربائي في الهلام، تحمل جزيئات الـ DNA والـ RNA شحنة سالبة بسبب عمودها الفقري المحتوي على الفوسفات، أما البروتينات فإنها تحمل شحنات مختلفة على سطحها باختلاف شحنات الأحماض الأمينية الموجودة فيها ولهذا وبالنسبة للبروتينات فقط فان محصلة شحنة الجزيئات تلعب دورا مهما في حركتها في الهلام.



ماهي المواد و الأدوات الواجب توفرها للقيام بالرحلان الكهربائي ؟

✓ Gel أو الهلام حيث يوجد نوعان من الهلام هما :

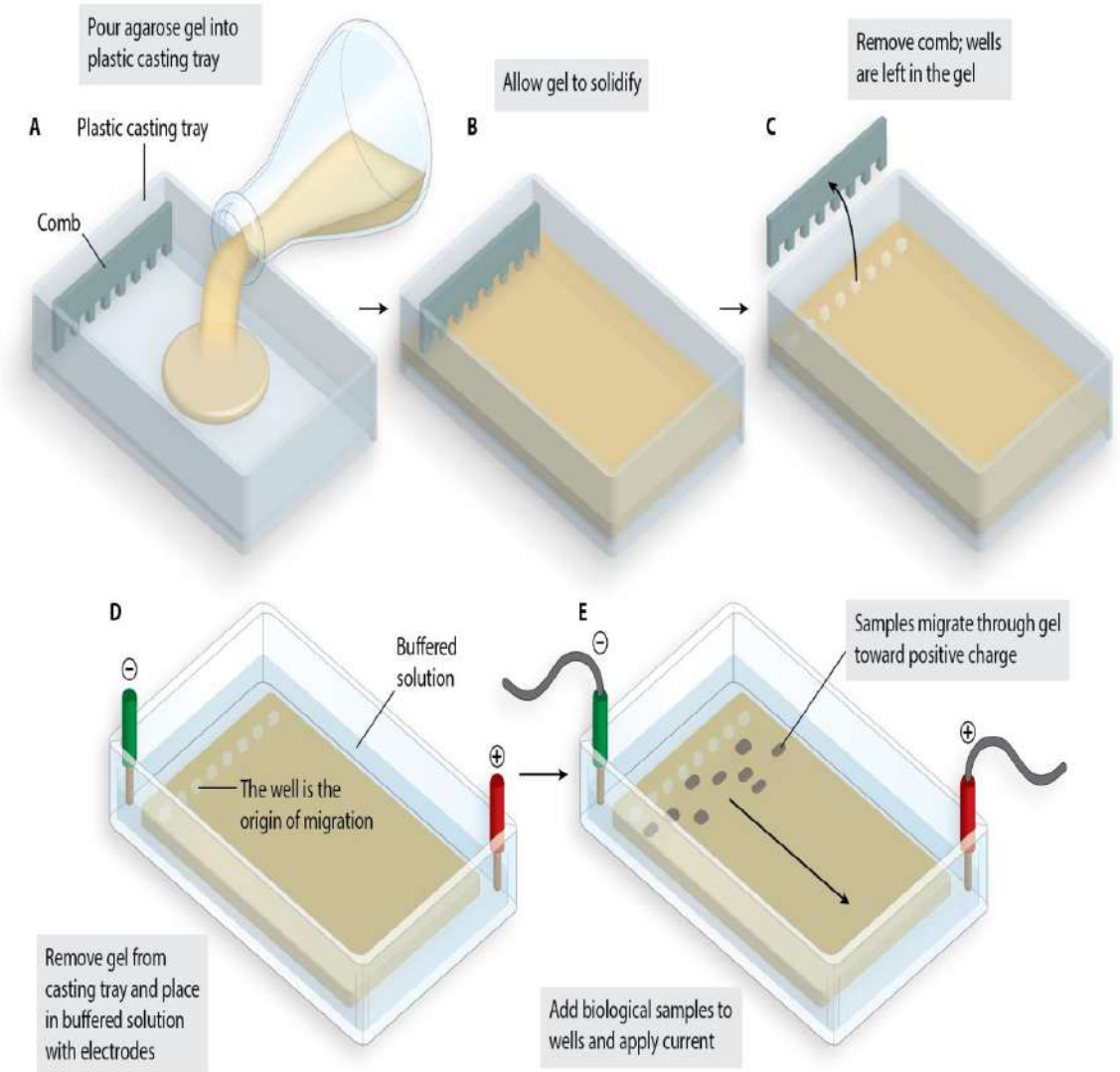
- الأغاروزAgarose : سلسلة متشابكة من السكريات المكونة من الغالاكتوز galactose والمرتبطة مع بعضها بروابط هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة ، ويستخدم الأغاروز للكشف عن قطع الـDNA ذات الوزن الجزيئي الكبير 20 Kb - 200 bp
- بولي اكريلاميد polyacrylamide : ينتج من ارتباط مادة acrylamide+bisacrylamide لتكوين شبكة معقده ذات ثقوب اصغر قطرا من تلك الموجودة في الأغاروز ، يستخدم هلام الأكريلاميد المتعدد للكشف عن قطع الـDNA ذات الوزن الجزيئي الصغير1 bp-200 bp وعن جزيئات البروتين

ملاحظة : ان كفائة الفصل تعتمد على تركيز الهلام كلما كان التركيز عالي كلما كانت قابليه الفصل اكفأ لأن الثقوب في الهلام تكون أصغر مما يتيح الفرصة لجزيئات الـDNA والبروتينات ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة بالانفصال والتي تهاجر أسرع في الهلام من الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة.

- وعاء صب الهلام gel casting tray والذي يتوفر بحجوم متعددة ويتألف من بلاستك نفاذ للأشعة فوق البنفسجية UV
- المشط comb والتي يتصلب الهلام حوله والذي عند رفعه يشكل ما يعرف بالآبار وهي تمثل الأماكن التي توضع بها عينات الـ DNA أو البروتين المراد ترحيلها كهربائيا.
- دارئ الترحيل الكهربائي electrophoresis buffer وهو الوسط الذي بنقل التيار الكهربائي بين القطب الموجب والقطب السالب لوحدة الترحيل الكهربائي
- دارئ التحميل loading buffer والذي يتألف من مكون أساسي كثيف (كالغليسرول glycerol) لكي يسمح للعينة بأن تسقط بالبئر المراد ترحيلها منه ويتألف داريء الترحيل كذلك من صبغة

للتعقب tracking dyes والتي تهاجر في الهلام مع العينة وتسمح بالمراقبة العينية للمسافة التي قطعتها العينات أثناء ترحيلها كهربائياً في الهلام وهذا بدوره يسهل لنا معرفة توقيت الانتهاء من الترحيل

- صبغة بروميد الايثيديوم ethidium bromide يتم معرفة مواقع جزيئات الـDNA التي تم ترحيلها من خلال صبغة بروميد الايثيديوم ethidium bromide ولا يمكن رؤية الصبغة بالعين المجردة (صبغة مفلورة) لذلك يستخدم جهاز الـ UV transluminator والذي يعرف أيضاً بصندوق ضوء الأشعة فوق البنفسجية UV lightbox ويستعمل فيه الطول الموجي 300 – 360 nm والذي يبعث أو يشع الضوء في المنطقة الحمراء – البرتقالية للطيف الضوئي و يستخدم هذا الجهاز لرؤية جزيئات الـDNA المصبوغة بصبغة بروميد الايثيديوم في الهلام
- ملاحظة: إن صبغة بروميد الايثيديوم هي مادة مطفرة معروفة ويجب أن تعامل كمادة كيمياوية خطرة لذا يجب لبس القفازات عند التعامل مع هذه المادة، كما يجب استعمال واقيات للعين عند مشاهدة الجزيئات بهذا الجهاز وذلك لحماية العينين من الأشعة فوق البنفسجية.
- جهاز UV transluminator والذي يعرف أيضاً بصندوق ضوء الأشعة فوق البنفسجية UV lightbox

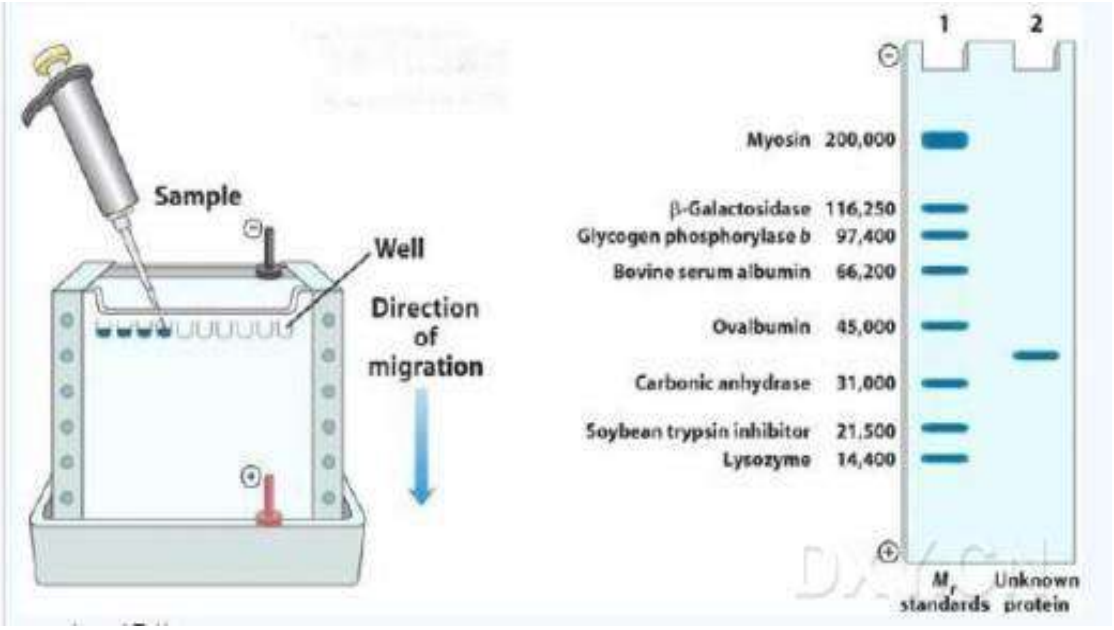


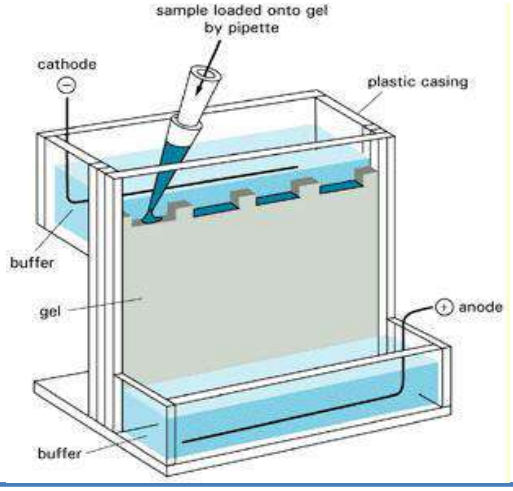
الرحلان الكهربائي العمودي للبروتين على هلام بولي إكريلاميد PAGE

Polyacrylamide gel electrophoresis

يفصل الرحلان الكهربائي العمودي باستخدام هلامة بولي إكريلاميد البروتينات حسب وزنها الجزيئي (حجمها) حيث ترحل البروتينات الصغيرة بسرعة أكبر من البروتينات ذات الوزن الجزيئي الكبير ، ولكي تتم عملية الرحلان للبروتين من القطب السالب إلى القطب الموجب يتم عادةً استخدام مادة SDS التي تضفي شحنة سالبة على البروتين نتيجة ارتباطها بشكل نوعي بالحموض الأمينية مما يجعله يهاجر نحو القطب الموجب، ينتج من ارتباط مادة acrylamide+bisacrylamide وسط هلامي بهيئة شبكة ذا فتحات تختلف باختلاف تركيز الاكريلاميد وهذا الهلام لا يتصلب بدرجة حرارة الغرفة لذا تضاف مادة مصلبة تعرف بـ Ammonium per sulfate وتمتاز مادة الاكريلاميد قبل بلمرتها بكونها سامة -عصبيا- لذلك يجب الحذر عند التعامل معها وارتداء الكفوف وعدم استنشاقها .

وحدة الترحيل تكون عمودية ويصب الجل بين صفيحتين زجاجيتين او في انابيب خاصة مع خزانين علوي وسفلي يوضع فيهما البفر (المحلول المنظم) ويستعمل هلام متعدد الأكريلاميد في فصل البروتينات المختلفة لمعرفة كفاءة التقنيات المستخدمة في الاستخلاص والتنقية اولتحديد الوزن الجزيئي ويتم الكشف البروتينات بعد اكتمال الترحيل بواسطة أصبغة ترتبط مع البروتينات وتكشف عنها مثل صبغة زرقة الكومازي Coomassie Blue والتي تعطي الحزم البروتينية لوناً ازرقاً





Gel Electrophoresis

- A common technique in a molecular genetics lab is gel electrophoresis. Several types of gel can be used (agarose and acrylamide are the most common). All work similarly: a gel matrix is formed, the DNA is loaded into a "well" or slot in the gel. The gel is put between the electrodes of a power supply, the DNA moves through the gel toward the positive electrode (since the phosphates are negatively charged). Small fragments of DNA move faster (and farther) than large fragments.

انتهت المحاضرة الرابعة

المحاضرة الخامسة
إنتاج البروتينات الدوائية المأشوبة (II)
recombinant Pharmaceutical protein production

مرحلة المعالجة الأولية Upstream processing

تضم هذه المرحلة الاصطناع الحيوي للمنتَج بعملية تدعى التخمير fermentation التي ينتج عنها الجيل الاول للمنتَج وذلك عندما يكون الكائن الحي المستخدم كمصنع حيوي من بدائيات النوى (الجراثيم) ويدعى الوعاء الذي يحتوي على الكائن الحي بالمُخمِر fermenter أما عندما يكون الكائن الحي المستخدَم كمصنع حيوي من حقيقيات النوى تدعى عملية الاصطناع الحيوي للمنتَج بالعملية الحيوية Bio process ويدعى الوعاء بالمفاعل الحيوي Bioreactor

➢ **تصميم المُخمِر fermenter / المفاعل الحيوي Bioreactor وأقسامه الرئيسية**

تجري عمليات التقانة الحيوية داخل المخمرات أو المفاعلات الحيوية والتي يمكن تعريفها بأنها وعاء يتم فيه العمليات الحيوية من قبل الكائنات الحية للحصول على المنتَج المطلوب وهذا الوعاء عبارة عن نظام مغلق تماماً باستثناء فتحات معينة، مُصمَم كي يؤمن البيئة الملائمة لنمو الخلايا الحية ونشاطها الاستقلابي كدرجة الحرارة ، المواد الغذائية التي يحتاجها الكائن الحي وتراكيزها ، درجة الحموضة الـPH ، معدل ضخ الأكسجين وتركيز الأوكسجين المنحل في الوسط الحاوي على هذا الكائن الحي (التهوية) , التحريك المستمر حتى لا تلتصق الكائنات الحية على جدار الوعاء .

يجب عند تصميم المخمر أو المفاعل الحيوي مراعاة الامور التالية:

- أن يُصَمَم المخمر كي يعمل بأقل ما يمكن من الطاقة
- ان يُصَمَم المخمر بحيث تكون عمليات التنظيف سهلة مثل أن تكون السطوح الداخلية ملساء مع تجنب وجود الحافات الحادة بهدف تسهيل التنظيف
- تحتاج عمليات التخمير إلى التعقيم لذلك يجب استخدام آليات تعقيم صارمة عند نقاط الوصل وعند السدادات الميكانيكية التي تكون عرضة للتحرك نتيجة الاهتزازات أو عمليات التمدد أو التقلص بالحرارة أو الضغط
- يجب أن يُصَمَم المخمر بحيث يكون أكبر من العملية الإنتاجية وذلك لترك فراغ رئيسي يصل لحدود 20% لتلافي حدوث الرغوة وخروج محتويات المخمر إلى الخارج أو غلق بعض الفتحات المهمة
- تحتاج عمليات التخمير إلى ضبط العديد من المؤشرات والعوامل ويتم ذلك بربط مسابر probes خاصة مع مراعاة أن تكون مربوطة بشكل صحيح كي لا تشكل نقاط تلوث

يتألف المخمر من الأقسام الرئيسية التالية:

✓ **الهيكل Body of fermenter**

ويكون مصنوع من مادة Stainless steal في المخمرات ذات الحجوم الكبيرة التي يتم استخدامها على المستوى الصناعي بينما المخمرات التي يتم استخدامها على المستوى المخبري يكون الهيكل فيها مصنوع من زجاج قادر على تحمل الحرارة والضغط بهدف سهولة ملاحظة نمو الكائنات الحية من الخارج ، ، إن المواد المستعملة في صنع المخمرات يجب ان تكون قوية ومتينة وتستطيع مقاومة الضغط الناتج من وزن السوائل دون ان يحدث لها تشوه أو تهشم وأن تكون ملائمة لعمليات التعقيم بالضغط والحرارة المتكررة والاستخدام لفترات مستمرة وطويلة، كما يجب أن تكون السطوح الملامسة لأوساط التخمير والمحاليل والكائنات الحية ملساء لتجنب حدوث الجيوب الموضعية وأن تكون مقاومة للتآكل منعاً لحدوث التلوث

- ✓ **غلاف التبريد الخارجي Cooling jacket**

للمحافظة على درجة حرارة المخمر يكون الهيكل مضاعف أي يتكون من جدارين خارجي وداخلي بينهما فراغ يتم ضخ الماء فيه لتنظيم الحرارة

- ✓ **نظام التهوية Aeriation system**

وهو جهاز يزود الكائن الحي الموجود في المخمر بالأكسجين الضروري للقيام بالعمليات الحيوية

- ✓ **أنظمة التحريك Agitation systems**

وهي ضرورية لبقاء الخلايا معلقة في الوسط المغذي وعدم التصاقها على جدران الوعاء وذلك من خلال التحريك بشكل أفقي لجعل الوسط متجانس قدر الإمكان

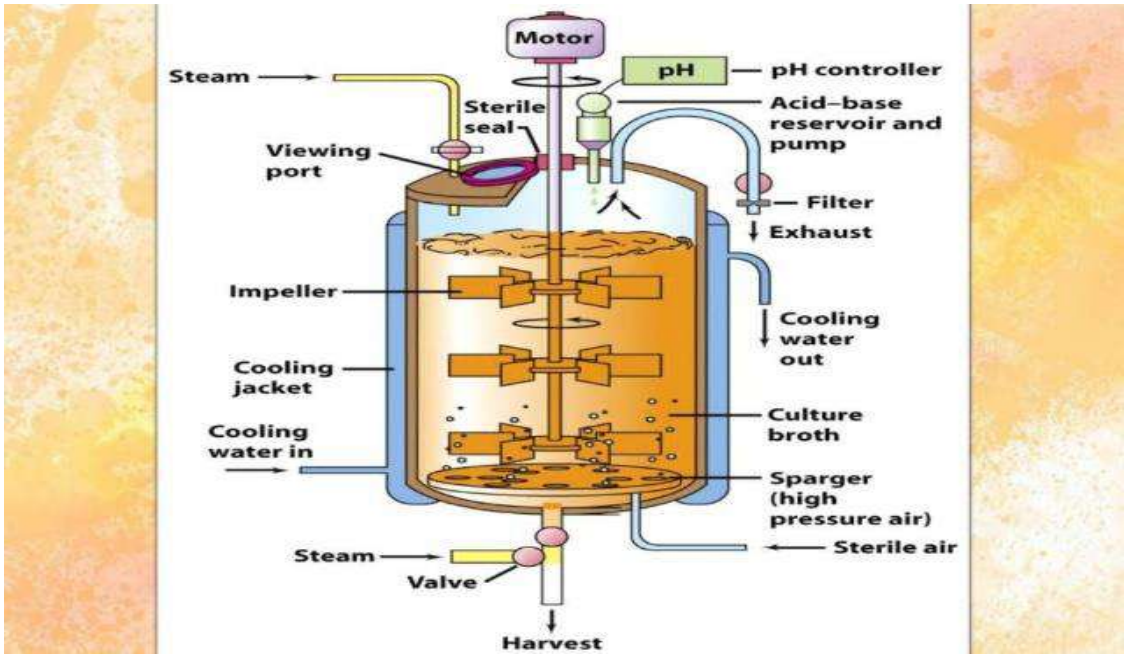
- ✓ **فتحات الدخول إلى المخمر وفتحات الخروج من المخمر وتتضمن :**
  - فتحة يتم من خلالها إدخال الكائن الحي الذي يحمل الناقل المأشوب بهدف إنتاج البروتين المطلوب
  - Nutrient Input فتحة يتم من خلالها إضافة المواد المغذية العقيمة للكائن الحي
  - فتحة لدخول الهواء وفتحة لخروج الهواء
  - Water Inlet فتحة في أسفل المخمر يتم من خلالها إدخال الماء المبرد وWater Outlet فتحة في أعلى المخمر كي يخرج الماء منها
  - Harvesting Pipe فتحة يتم من خلالها إخراج محتويات المخمر بعد انتهاء عملية التخمير وتدعى فتحة أنبوب الحصاد
  - Steam Input فتحة يتم من خلالها ضخ البخار لتعقيم المخمر وذلك عند نهاية عملية التخميرمن أجل البدء بعملية تخمير أخرى
  - فتحات يتم من خلالها إدخال مسابر (مشعرات) إلى داخل المخمر لقياس درجة PH الوسط ودرجة الحرارة وقياس نسبة الأكسجين المنحل في الوسط (التهوية) ، كما يتم إدخال كاشف يتوضع فوق سطح الوسط المغذي كي يتحسس الرغوة الناتجة عن عمليات التحريك المستمرة وعن المركبات العضوية الموجودة في وسط التخمير، ترتبط المسابر السابقة والكاشف مع جهاز كمبيوتر لقياس وضبط الشروط المثلى لعملية التخمير وبالتالي عندما يتحسس المسبار الخاص بأي تغير مثلاً: انخفاض تركيز الأكسجين المنحل في الوسط فإنه يرسل إشارة إلى لوحة التحكم الآلية في جهاز الكمبيوتر التي ترسل بدورها إشارة إلى مضخة الهواء لضخ الهواء داخل المخمر ، وكمثال آخر عند ما تصل الرغوة إلى حد معين يرسل كاشف الرغوة إشارة إلى لوحة التحكم التي ترسل بدورها إشارة إلى المستودع لضخ مضاد الرغوة

- ✓ **المصدات Baffles**

تؤدي عملية التحريك المستمرة في المخمر إلى نشوء دوامة في مركز السائل المغذي تدفع الخلايا إلى المحيط مما يساعد على التصاق الخلايا بالجدار الداخلي للمخمر وهذا يؤثر على عملية إنتاج البروتين الدوائي لذلك تقوم المصدات بالحد من تشكل الدوامة

- ✓ **العوازل Sealings**

تحافظ على شروط إحكام إغلاق الفتحات والعقامة للمخمر وهي توجد في الفتحات التي تدخل منها بعض الأجزاء إلى المخمر



تتضمن المرحلة التحضيرية التي تحدثنا عنها في المحاضرة السابقة إجراءات تحضير الكائن الحي (المصنع الحيوي للبروتين الدوائي المأشوب) وضبط الشروط الأمثل لنمو المستعمرات المأشوبة و التأكد من إنتاج البروتين المطلوب وتحديد تركيزه وقياس فعاليتة البيولوجية

يتم في مرحلة المعالجة الأولية اختيار المستعمرة التي انتجت أفضل كمية من البروتين المأشوب بالجودة المطلوبة (من المستعمرات المدروسة في المرحلة السابقة) لتتم عملية إعادة زرعها ضمن كمية أكبر من وسط الزرع وتدعى الخلايا الناتجة بالخط الخلوي المُنتِج للمُنتَج product-producing cell line والتي يتم حفظ قسم منها في عدة أنابيب توضع في الآزوت السائل (يؤدي وضع الأنابيب في الآزوت السائل إلى الحفاظ على سلالة الخلايا المنتجة للبروتين المطلوب لفترات طويلة) ، تشكل هذه الأنابيب المحفوظة بالتبريد مايدعى بنظام البنك الخلوي cell bank system وعند الحاجة يتم فك تجميد أنبوب وإعادة زرع الخلايا بنفس الشروط لتنمو وتتكاثر وتُنتِج البروتين المطلوب.

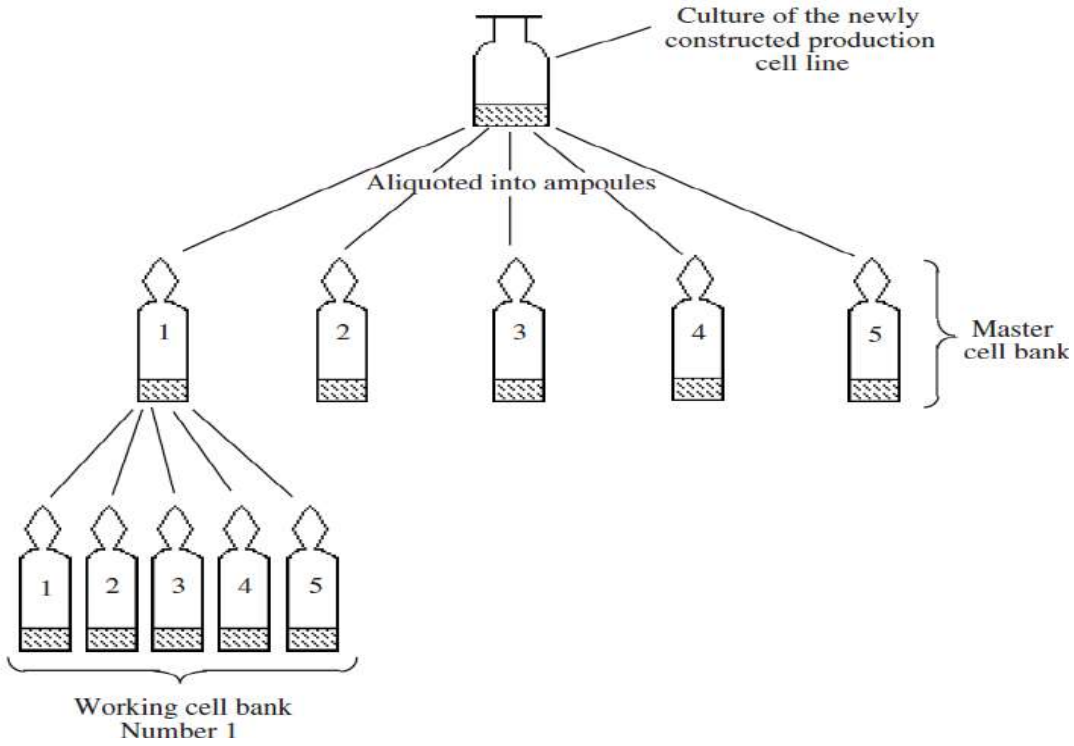
في العادة يتم إنشاء بنك خلوي على مستويين:

بنك خلوي رئيسي Master cell bank وبنك العمل Working cell bank وذلك لضمان إنتاج الدواء الحيوي من نفس الخط الخلوي طوال فترة إنتاج الدواء

يتم تحضير البنك الخلوي الرئيسي أولاً ومباشرةً من الخط الخلوي الذي تم إنشاؤه حديثاً (الخط الخلوي المُنتِج للمُنتَج) ويمكن أن يتكون من عدة مئات من الأنابيب المخزنة كل على حدة

يتم تحضير بنك العمل (البنك الثانوي) عن طريق فك تجميد أنبوب واحد من البنك الخلوي الرئيسي وإعادة زرع الخلايا ومن ثم تقسيمها على عدة أنابيب ليتم إعادة تجميدها من جديد مشكلةً بنك العمل الأول وعند الحاجة يتم فك تجميد أنبوب واحد من بنك العمل وزرع الخلايا لإنتاج البروتين المطلوب ، عندما يتم استخدام جميع انابيب بنك العمل الأول يتم فك تجميد أنبوب ثاني من البنك الرئيسي لتحضير بنك العمل الثاني وهكذا

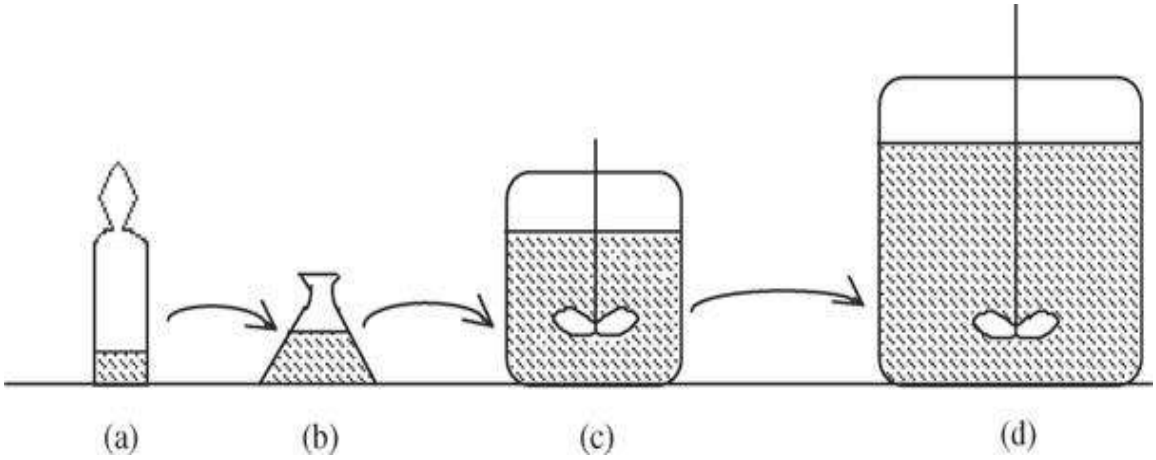
ملاحظة يتم تطبيق الخطوات السابقة (تحضير البنك الخلوي) على كل من الخلايا المنتجة للأدوية الحيوية سواء كانت بدائية النواة أوحقيقية النواة



<u>تتضمن الخطوة الثانية في مرحلة Upstream processing لإنتاج البروتين الدوائي المأشوب مايلي:</u>

يتم فك تجميد أنبوب واحد من البنك الثانوي وإعادة زرع الخلايا في حجم صغير من وسط الزرع المناسب لا يتجاوز 1 ليتر (بضع مئات من المليليترات) وتترك لتنمو بشكل جيد في حواضن ملائمة ضمن الشروط المثالية (ملاحظة إن وسط الزرع المناسب وشروط التخمير اللازمة لتحفيز النمو الأمثل للخلايا وإنتاج المنتَج قد تم تحديدها أثناء تطوير المنتج الأولي في المرحلة التحضيرية) ، بعد النمو يتم استخدام هذه الزراعة والتي تدعى الزراعة البادئة على المستوى المخبري laboratory-scale starter culture لتطعيم زراعة بحجم عدة ليترات /عشرات الليترات ضمن مفاعل حيوي صغير وتترك لتنمو وتدعى الزراعة البادئة على مستوى الإنتاج production-scale starter culture و التي بدورها يتم استخدامها لتطعيم زراعة على مستوى الإنتاج ضمن مفاعل حيوي أكبر production-scale bioreactor يحتوي على عدة آلاف من الليترات/عشرات الآلاف من الليترات من وسط الزرع ، تنطبق

هذه المراحل على الخطوط الخلوية المنتجة للبروتين الدوائي المأشوب سواءً كانت من بدائيات النوى أو من حقيقيات النوى، مع مراعاة الإختلاف بينهما في تصميم المفاعل الحيوي وشروط الزرع



This process Outline of the upstream processing stages involved in the production of a single batch of product.
Initially, the contents of a single ampoule of the working cell bank **(a)** are used to inoculate a few hundred milliliters of media **(b).**
After growth, this laboratory-scale starter culture is used to inoculate several litres/tens of litres of media present in a small bioreactor **(c).**
This production-scale starter culture is used to inoculate the production-scale bioreactor **(d)**.
which often contains several thousands/tens of thousands liters of media.
This process is equally applicable to prokaryotic or eukaryotic-based producer cell lines, although the bioreactor design, conditions of growth, etc., will differ in these two instant

laboratory-scale starter culture → **production-scale starter culture**

inoculation

production-scale bioreactor

بعد تطعيم الزراعة البادئة على مستوى الإنتاج ضمن مفاعل حيوي ضخم تستمر عملية التخمير لعدة أيام وخلال هذه العملية تتراكم الكتلة الحيوية biomass (كتلة الخلايا cell mass) ، وفي معظم الحالات يتراكم المُنتَج (البروتين الحيوي) داخل الخلايا ويتم حصاد الخلايا عندما تصبح حصيلة الكتلة الحيوية في الحد الأعظم، يعد منهج الدفعة المغذاة feed batch هوالمنهج المُتبَع عادةً أثناء تصنيع الأدوية الحيوية حيث يتم إضافة وسط زرع مغذي جديد بشكل مستمر و يتم أخذ جزء من وسط الزرع مع الكتلة الحيوية ومعالجتها باستمرار

Fermentation follows for several days subsequent to inoculation with the production-scale starter culture. During this process, biomass (i.e. cell mass) accumulates. In most cases, product accumulates intracellularly and cells are harvested when maximum biomass yields are achieved.

This ‘feed batch’ approach is the one normally taken during biopharmaceutical manufacture, where fresh nutrient media is continually added and a fraction of the media/biomass continually removed and processed

أثناء عملية التخمير يتم ضخ الهواء المعقم بالفلترة للمحافظة على تزويد الخلايا بالأوكسجين ، كما يتم المحافظة على درجة الحرارة المناسبة لنمو الخلايا الأمثل (عادة ما بين 25 و 37 درجة مئوية) حسب النمط الخلوي المنتَج للبروتين الحيوي وذلك إما بالتسخين وفي معظم الأحيان بالتبريد ، ينتج عن عملية التخمير على نطاق واسع في المخمرات الضخمة كمية كبيرة من الحرارة بسبب عمليات الإستقلاب في الخلايا الحية والنشاط الآلي مثل عملية التقليب وتتم عملية التبريد عن طريق تمرير الماء البارد أو الغليكول ضمن نظام دوران خاص لخفض درجة الحرارة

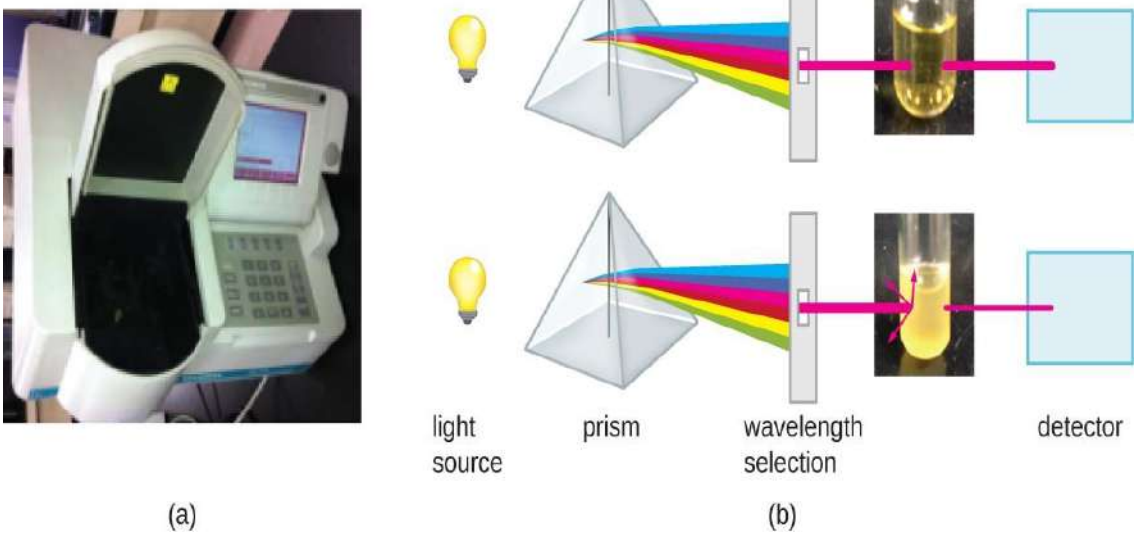
حركيات النمو في الخلايا البكتيرية

أكثر من نصف الأدوية الحيوية الحالية يتم إنتاجها بشكل مأشوب في E. coli أو S. cerevisiae بينما يتم إنتاج معظم الأدوية الحيوية المتبقية الأخرى بشكل مأشوب في الخلايا الحيوانية مثل (BHK or CHO cells) ، ومن الملاحظ أن تخمر الخلايا البكتيرية له تاريخ طويل من الاستخدام لإنتاج منتجات حيوية مختلفة ذات أهمية تجارية مثل الإيتانول والأحماض الأمينية والانزيمات وغيرها كما هو موضح في الجدول التالي:

Table 5.10 Various products (non-biopharmaceutical) of commercial significance manufactured industrially using microbial fermentation systems

Product type	Example	Example producer
Simple organic molecules	Ethanol	*S. cerevisiae*
		Pachysolen tannophilus
	Butanol	Some clostridia
		Clostridium acetobutylicum
		Clostridium saccharoacetobutylicum
	Acetone	*C. acetobutylicum*
		C. saccharoacetobutylicum
	Acetic acid	Various acetic acid bacteria
	Lactic acid	Lactobacilli
Amino acids	Lysine	*Corynebacterium glutamicum*
	Glutamic acid	*C. glutamicum*
Enzymes	Proteases	Various bacilli, e.g. *Bacillus licheniformis*
	Amylases	*Bacillus subtilis*
		Aspergillus oryzae
	Cellulases	*Trichoderma viride*
		Penicillium pinophilum
Antibiotics	Penicillin	*Penicillium chrysogenum*
	Bacitracin	*Bacillus licheniformis*

إن البكتريا هي من الكائنات المجهرية الدقيقة تتكاثر عن طريق الانقسام الخلوي ويمكن رصد تزايد عددها باستمرار من خلال قياس العكر (الكثافة الضوئية عند طول موجة 600 نانو متر)



تمر البكتريا خلال نموها بالمراحل (الأطوار) التالية:

- طور التلكؤ Lag phase

لا يزداد عدد الخلايا البكتيرية في هذا الطور ومع ذلك تنمو الخلايا بشكل أكبر وتكون نشطة استقلابياً وتقوم بتصنيع البروتينات اللازمة للنمو داخل الوسط كما تتحضر لعملية الانقسام ، ويستمر هذا الطور من ساعة إلى ساعتين

- طور النمو الأسي Expontial growth phase أو Log phase

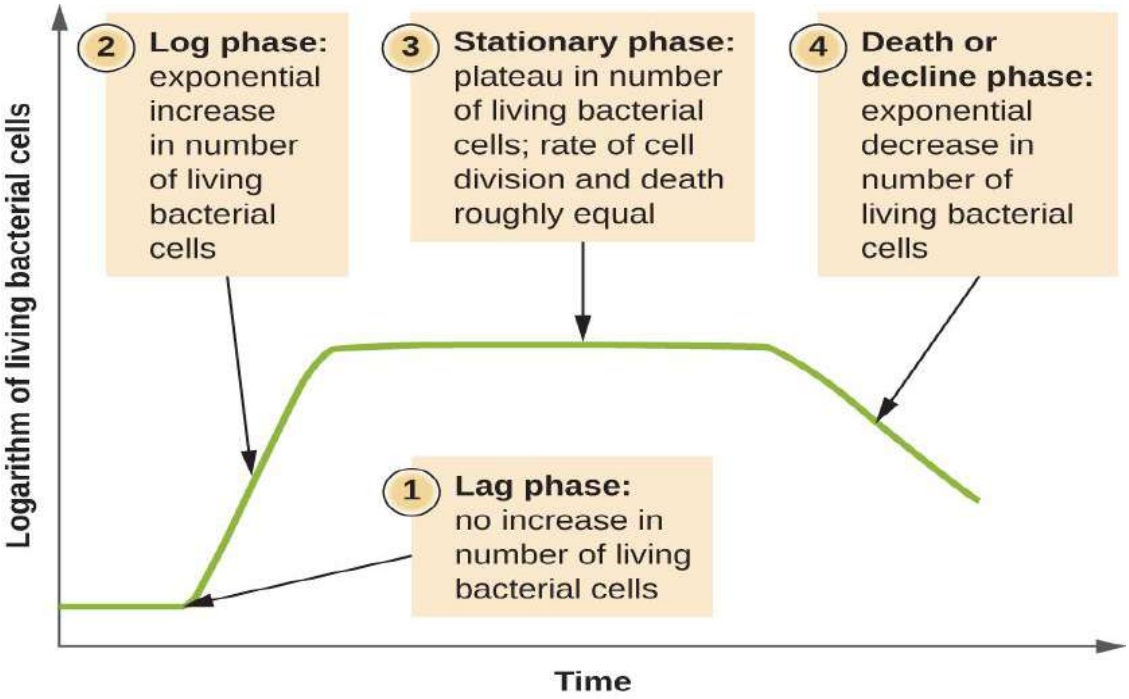
في هذا الطور تنقسم الخلايا بنشاط بواسطة الانشطار الثنائي ويزيد عددها بشكل كبير ويتم تصنيع البروتين الحيوي المطلوب في هذا الطور

- طور السكون Stationary phase

حيث تؤدي محدودية المركبات الأولية او كثافة الخلايا الزائدة أو نقل الأكسجين المحدود أو تراكم المنتجات السامة إلى توقف عملية الإنقسام وفي هذا الطور تحافظ الخلايا على عيوشتها دون القدرة على الانقسام والتضاعف ، **يتم جمع البروتين الحيوي المطلوب في نهاية طور النمو الأسي وبداية طور السكون**

- طور الموت Death phase

يتناقص عدد الخلايا في هذا الطور نتيجة تراكم الفضلات وموت الخلايا مما يسبب انخفاض العكر



أنظمة زراعة خلايا الثديات Mammalian cell culture systems

تعد زراعة خلايا الثديات أكثر تعقيداً من الناحية التقنية وأكثرتكلفةً من الخلايا البكتيرية و عادةً ما يتم استخدام زراعة خلايا الثديات بشكل تفضيلي لتصنيع بروتينات علاجية تحتوي على عدد من الجسور ثنائية الكبريت التي تكون فعالة فقط بعد تعديلات مابعد الترجمة أو بروتينات تؤدي إلى حدوث استجابة مناعية بعد تناولها بسبب خطأ في عملية الغلكزة glycosylation والتي تعد في هذه الحالة أساسية للنشاط الحيوي للبروتين ، تختلف زراعة الخلايا الحيوانية عن زراعة الخلايا البكتيرية في العديد من الأمور مثل:

- تتطلب أوساط زرع اكثر تعقيداً
- تتطلب مدة طويلة من التخمير بسبب النمو البطيء للخلايا الحيوانية
- الخلايا الحيوانية أكثر هشاشة من الخلايا البكتيرية بسبب عدم وجود الجدار الخلوي
- بشكل عام تتألف أوساط الزرع الاساسية للخلايا الحيوانية مثل الوسط

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

- most -amino acids
- many/most vitamins
- salts (e.g. NaCl, KCl, CaCl2)
- carbon source (often glucose)

يضاف إلى وسط الزرع

- antibiotics (e.g. penicillin or streptomycin)
- supplemental serum

تعد الصادات الحيوية ضرورية لمنع نمو البكتريا الناتجة عن التلوث البكتيري العرضي
المصل الإضافي فهو ضروري كمصدر لعوامل النمو (غالباً مصل جنين البقر، مصل عجول البقر ، أو مصل صناعي يتألف من مزيج يضم هرمونات والبومين مصل البقر)
من مساوئ استخدام المصول السابقة هي زيادة احتمالية التلوث بالفيروسات لذلك يتم حالياً إجراء تجارب للحصول على مكونات أخرى تحوي عوامل نمو للتخلص من مشكلة التلوث مثل Human HPL platelet Lysate وهو أحد عوامل النمو المشتق من الصفيحات الدموية البشرية.

تتميز الأنماط الخلوية المختلفة بخصائص مختلفة ترتبط بطرق الزراعة الناجحة حيث يوجد:

- خطوط خلوية مستمرة continuous cell lines

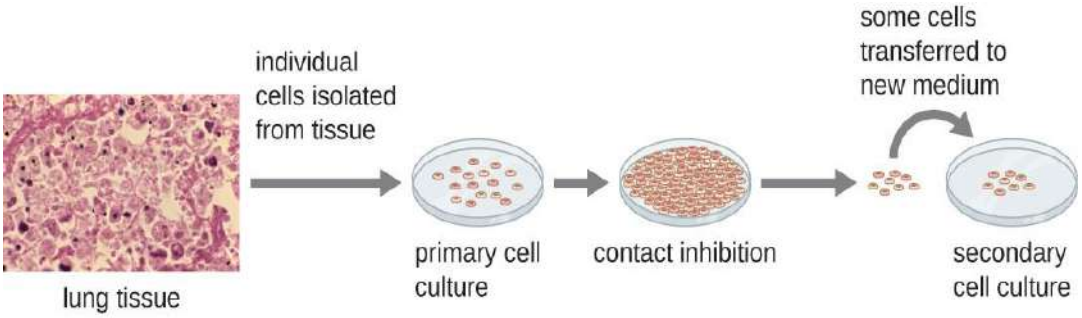
تتكون من نوع واحد من الخلايا التي يكون لها القدرة على التكاثر والانقسام الى ما لانهاية وتنشأ من الخلايا السرطانية ، يتم استخدام هذه الخطوط بهدف الإنتاج الصناعي للبروتينات الحيوية المأشوبة في مصانع حيوية Bioreactor تشبه المخمرات Fermenter حيث تنمو الخلايا فيها معلقة في وسط الزرع .
لقد تم إنشاء خطوط خلوية مستمرة تكون فيها الخلايا قادرة على الانقسام بشكل لانهائي إمّا من خلال وجود طفرة عشوائية بشكل طبيعي أو من خلال إحداث طفرة بشكل معتمد ، ويعد خط Hela واحد من

أقدم واشهر الخطوط الخلوية البشرية الخالدة وهو خط ورمي مشتق من سرطان عنق الرحم تم عزله من السيدة Henrietta Lacks التي توفيت متاثرة بهذا المرض عام 1951 ومازال هذا الخط مستخدماً حتى الآن وقد أثار مشكلة أخلاقية لأنه لم يتم استئذان المريضة أو أحد أقاربها عندما تم عزل هذه الخلايا مما اضطر المسؤولين عن ذلك إلى دفع مبالغ خيالية لابنة المريضة

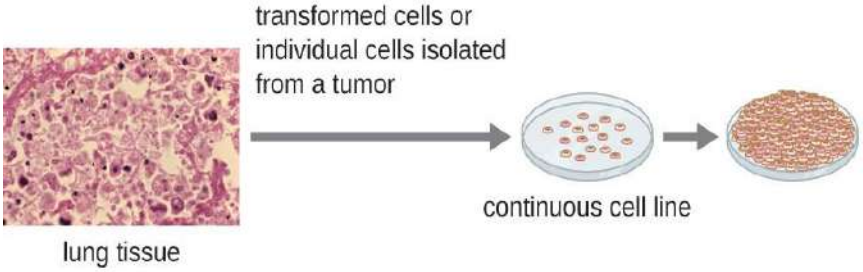
- خطوط خلوية غير مستمرة non-continuous cell lines

يتم استخدام هذه الخطوط لأغراض بحثية أو اختبارات السمية في مصانع حيوية خاصة تدعى بالمصانع الحيوية الصفائحية ويعتمد نموها على الإرتباط حيث تنمو ملتصقة إلى طبق الزرع وبشكل طبقة خلوية واحدة فقط لأنها تعاني من التثبيط بالاتصال contact inhibition مما يؤدي إلى توقفها عن النمو عندما تملأ سطح طبق الزرع

تتميز مزارع الخلايا الأولية بعمرها المحدود والذي لا يتجاوز35-40 يوما حيث تموت الخلايا الأولية بعد عدة انقسامات (من 50-100 انقسام خلوي) وتُخَزن الخلايا المشتقة من الخلايا الأولية في عبوات صغيرة في النيتروجين السائل وعند الحاجة تُستَخدَم لعمل مزارع خلوية



(a)



(b)

يشير مصطلح المزرعة الخلوية cell culture إلى زرع الخلايا وتنميتها (سواء كانت من حقيقيات النوى أو من بدائيات النوى) خارج بيئتها الطبيعية تحت شروط يتم التحكم بها مسبقاً

يشير مصطلح الخط الخلوي cell line إلى مجموعة الخلايا المنحدرة من خلية واحدة

يشير مصطلح الخلايا الأولية Primary cells إلى الخلايا المعزولة مباشرةً من نسيج ما

انتهت المحاضرة الخامسة

المحاضرة السادسة
إنتاج البروتينات الدوائية المأشوبة (III)
recombinant Pharmaceutical protein production (III)

مرحلة المعالجة النهائية Downstream processing

تتضمن مرحلة المعالجة النهائية Downstream processing الخطوات التالية:

- **عزل البروتين الحيوي من الخلايا المنتجة له عند الانتهاء من مرحلة المعالجة الأولية**
- **تركيز المنتَج الأولي**
- **تنقية المنتَج الأولي**
- **صياغة الشكل الصيدلاني للمُنتَج (تحضير المنتَج النهائي)**

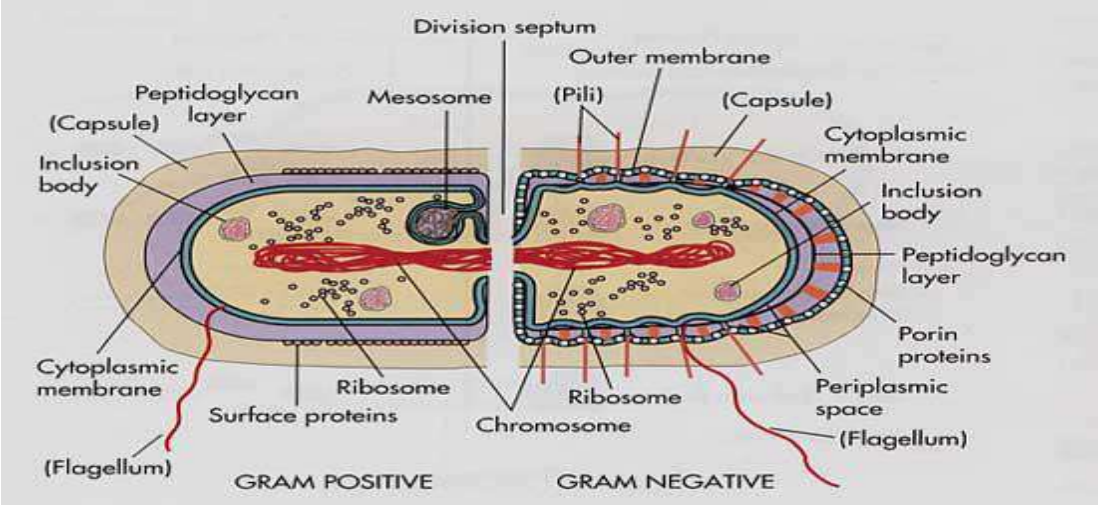
إن تفاصيل خطوات مرحلة المعالجة النهائية لأي بروتين دوائي مأشوب عادة ما تبقى سرية من قبل الشركة المُصنِعة للمنُتَج ونادراً ماتكون متاحة علناً ، تتم خطوات هذه المرحلة في شروط الغرفة النظيفة من أجل حماية المنتَج من أي ملوثات بيئية ، يضاف إلى ذلك أن الماء المُستخدَم كمذيب خلال هذه المرحلة هو ماء للحقن WFI (water for injection) وهو ماء ذو نقاوة عالية خالي من الأحياء الدقيقة كالجراثيم ومن المواد المذابة والتي من الممكن أن تؤثر على المنتج البروتيني أو على صحة المريض

clean-room conditions

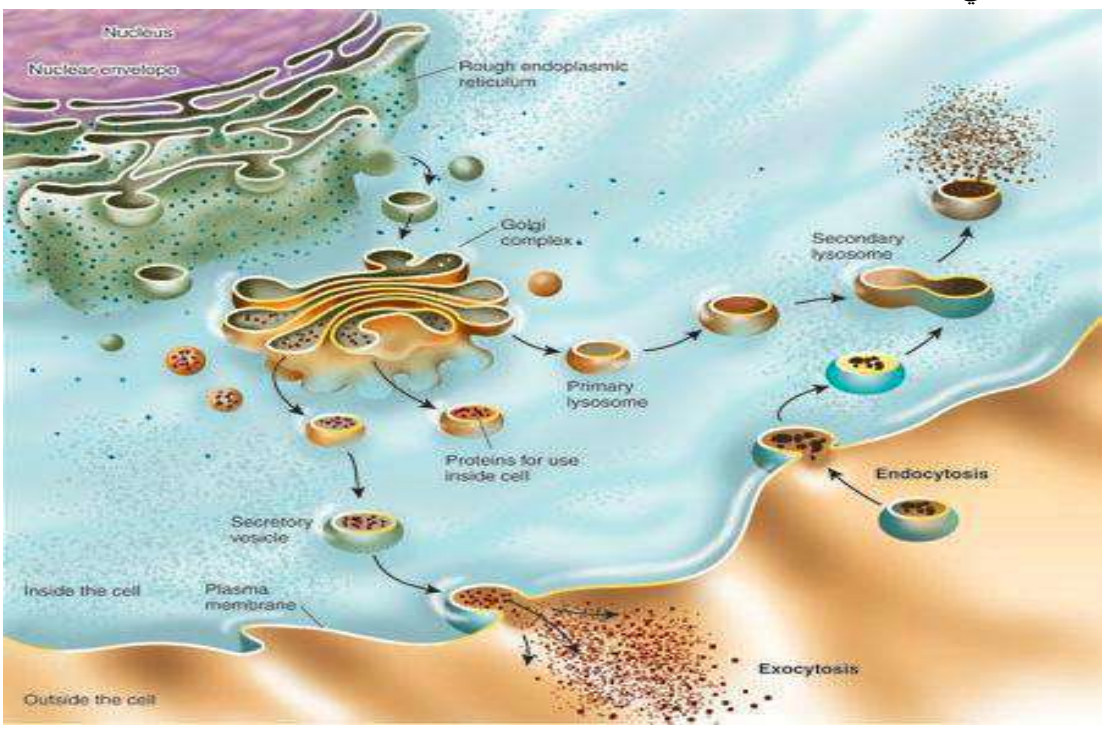
- **عزل البروتين الحيوي من الخلايا المنتجة له**

تتضمن الخطوة الأولى في مرحلة المعالجة النهائية الحصول على البروتين الدوائي المأشوب من مصدره أي من الخلايا المنتجة له ، وبشكل عام يتراكم البروتين داخل الخلايا (غير مفرَز) في حال استخدام الخلايا بدائية النواة كمنتِج للبروتين (الخلايا البكتيرية) وهنا يتوضع البروتين:

- إما في السيتوبلاسما في الجسيمات الخازنة Inclusion bodies
- أو في الفراغ ما بين الغشاء السيتوبلاسمي والجدار الخلوي Periplasmic space



كما يمكن إفراز البروتين الحيوي خارج الخلايا في وسط الزرع في حال استخدام الخلايا الثدية كمنتِج للبروتين وهنا لاحاجة لتحطيم الخلايا بل يتم أخذ وسط الزرع ثم القيام بعملية التثفيل وجمع البروتين من السائل الطافي



يتم عزل البروتين الدوائي المأشوب من الخلية المنتجة له على الشكل التالي:

<u>أولاً حصاد (جمع) الخلايا المنتجة للبروتين مع وسط الزرع</u> ثم القيام بعملية التثفيل بهدف فصل الخلايا عن الوسط وفي حال كان **البروتين مفرَز** يتم التخلص من الرسابة الخلوية وأخذ وسط الزرع أما في حال كان **البروتين غير مفرَز** يتم التخلص من وسط الزرع وأخذ الرسابة الخلوية لتحطيم الخلايا

<u>ثانياً تحطيم الخلايا Cell disruption</u> يتم الحصول على محتوى الخلايا عن طريق تحطيم الخلايا ثم يتم فصل مكونات الخلايا بعملية التثفيل التفاضلي بسرعة معينة وزمن معين للحصول على السيتوبلاسما التي تحتوي على البروتين المطلوب و يوجد عدة طرق لتحطيم الخلايا مثل:

- ✓ **الطرق البيولوجية Biological methods** وذلك باستخدام أنزيمات حالة

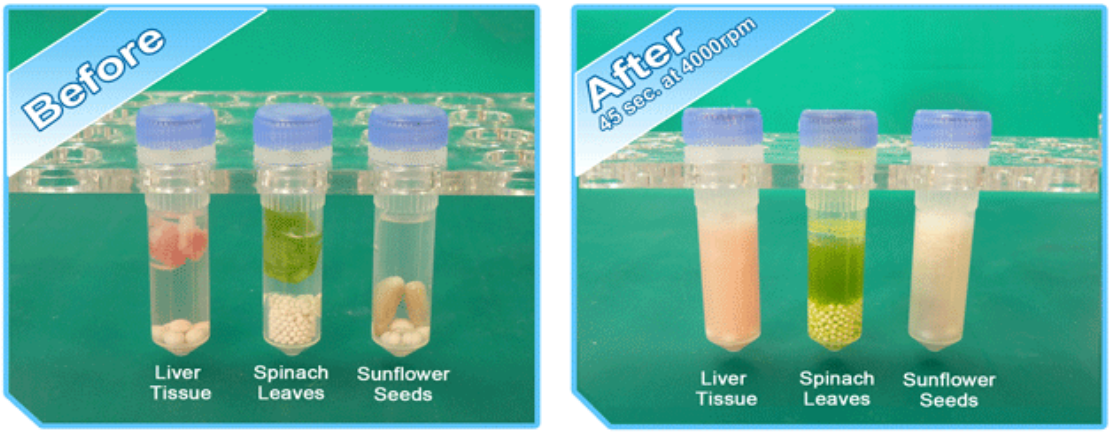
✓ **الطرق الفيزيائية Physical methods** مثل :

- استخدام الأمواج فوق الصوتية (sonication) حيث يتم تعريض الخلايا للأمواج فوق الصوتية أو عالية التردد وتقسم الأمواج الصوتية إلى: أمواج صوتية مسموعة والأمواج فوق الصوتية و الأمواج الفائقة ، تكون الأمواج الصوتية ضمن المدى المسموع غير مؤثرة على خلايا الأحياء المجهرية بينما تؤثر الأمواج فوق الصوتية أو الأمواج الفائقة على خلايا الأحياء المجهرية إذ تتسبب في تلف بعض الجزيئات الكبيرة فيها مثل الأحماض النووية ويؤدي استمرار هذه الأمواج لحدوث اهتزازات عنيفة لمكونات الخلية مما يدمر عضيات الخلية ويؤدي إلى موتها، يطلق على الجهاز المستخدم لتحطيم الخلايا Sonicator يتألف من مسبر Probe وهو عمود معدني يرتبط بمحرك كهربائي ويغمر المسبر داخل معلق الخلايا الموجود في زجاجة ثنائية الجدار للسماح بتبريد المعلق أثناء تشغيل الجهاز بسبب الحرارة العالية المتولدة عن الإهتزازات، ولا يجوز إطلاق الامواج إلا لفترة 2-4 ثانية ثم التوقف للتبريد لفترة معينة
- من الطرق الفيزيائية التجميد والإذابة حيث يؤدي تجميد الخلايا واذابتها بسرعة لمرتين على الأقل إلى تحطيم الخلايا

تقتصر هذه الطرق على المستوي المخبري إما بسبب تكاليفها المرتفعة أو لكون التجهيزات محدودة

✓ **الطرق الميكانيكية Mechanical methods** مثل:

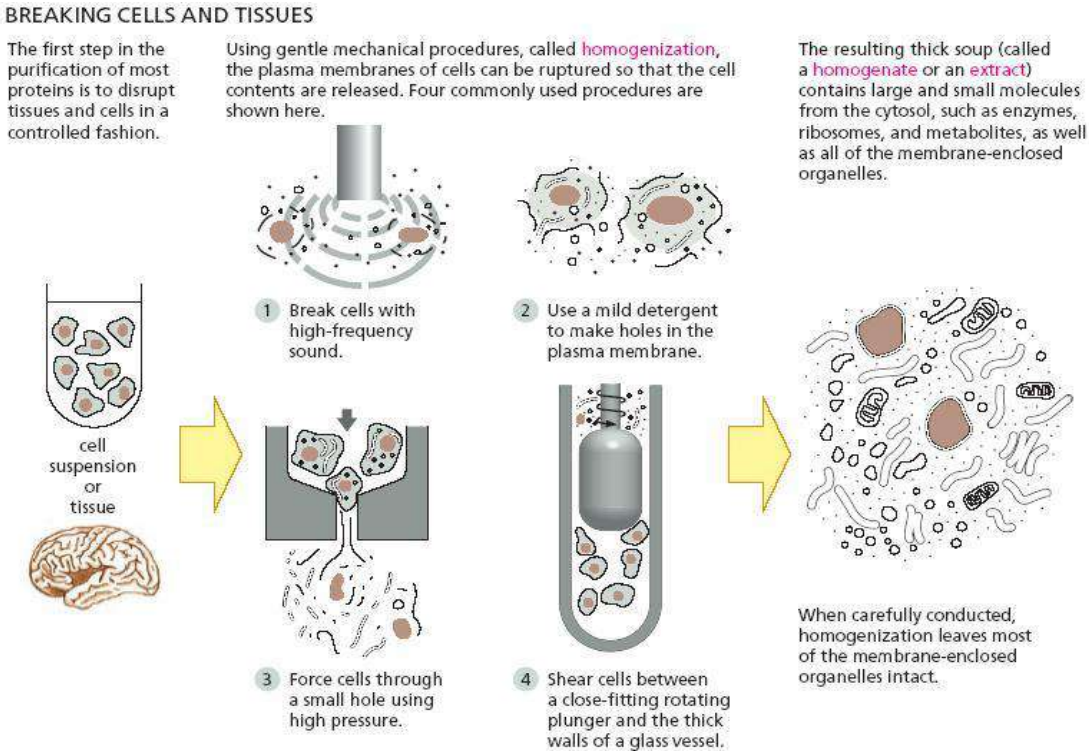
- تحطيم الخلايا بالتجانس homogenization وتعتمد على تمرير الخلايا عبر مسامات دقيقة تحت ضغط عالي مثل المكبس مما يؤدي إلى تمزقها، تتم طريقة التجانس باستخدام نظام تبريد فعال بهدف حماية البروتينات من التمسخ نتيجة الكمية الكبيرة من الحرارة التي تنتج أثناء هذه الطريقة، وهي تتميز بالقدرة على معالجة كميات كبيرة من المعلق الخلوي تصل إلى عدة آلاف من الليترات في الساعة الواحدة وبكفاءة.
- يوجد طريقة أخرى لتحطيم الخلايا بالتجانس تعتمد على وضع الخلايا مع خرزات زجاجية (glass beads) ثم هز هذ الخليط بقوة مما يؤدي إلى تحطيم الخلايا نتيجة التصادم القوي مع الخرزات، يمكن من خلال هذه الطريقة معالجة أكثر من 1000 ليتر من المعلق الخلوي في الساعة .



يتم استخدام طريقة تحطيم الخلايا بالتجانس على المستوى الصناعي

✓ **الطرق الكيميائية Chemical methods** مثل:

استخدام المنظفات Detergents يمكن تعريف المنظفات على أنها مركبات ذات نهايتين محبة للماء ونهاية كارهة للماء تتداخل مع مكونات أغشية الخلية Lipoprotein وتخترقها وتؤدي الى تدميرها وبالتالي الى النفاذية الكاملة لغشاء الخلية وخروج مكوناتها



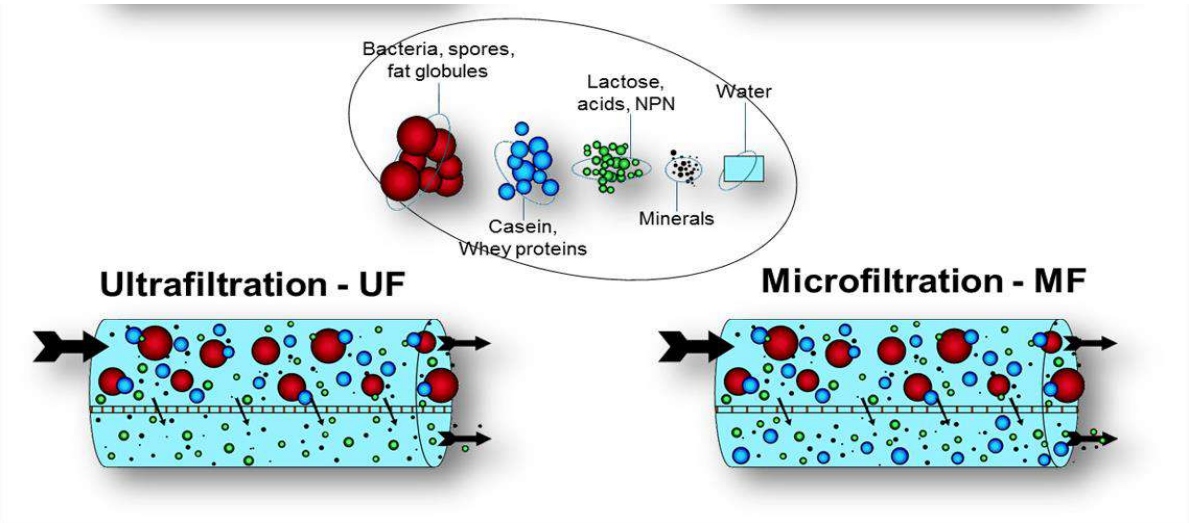
ثالثاً إزالة الحموض النووية Removal of nucleic acid

يجب إزالة الحموض النووية قبل عمليات التنقية اللاحقة للبروتين وخاصة على المستوي الصناعي لأنها تزيد لزوجة الجناسة الخلوية بشكل كبيروهذا يتطلب زيادة في قوة التثفيل ولفترة زمنية أطول للتخلص من الحطام الخلوي ، و في حال استخدام نظام الترشيح لإزالة الحطام الخلوي سوف تؤثر اللزوجة بشكل سلبي على معدل التدفق وأداء المرشح، يتم إزالة الحموض النووية عن طريق الترسيب أو عن طريق استخدام أنزيمات nucleases ويعد البولي ايتيلين أمين polyethylenimine وهو بوليمير طويل السلسلة مشحون بشحنة موجبة المادة المرسِبة الاكثر استخداماً لترسيب جزيئات الـDNA و الـRNA المشحونة بشحنة سالبة (نتيجة وجود مجموعات الفوسفات فيها) ، يجب التخلص بشكل كامل وفعال من polyethylenimine خلال المراحل اللاحقة لعملية الترسيب لأن بقاء كميات ولو صغيرة منه أو من المونوميرات المكونة له قد تكون مسرطنة وخاصة في حال استخدامه خلال تنقية البروتينات العلاجية، من جهة أخرى تعد أنزيمات nucleases الأكثر استخداماً للتخلص من الحموض النووية حيث تحفز هدم هذه الجزيئات الحيوية من خلال تحطيم الرابطة الفوسفاتية ثنائية الإستر phosphodiester بين النيكليوتيدات المتجاورة ، يتميز استخدام أنزيمات nucleases بأنه فعال وغير مكلف على عكس العديد من المرسبات الكيميائية المستخدَمة وهو أكثر أماناً على المُنتَج البروتيني النهائي

رابعاً إزالة الحطام الخلوي Removal of cellular debris

يتم استخدام تقنية الترشيح الدقيق microfiltration بشكل فعال لإزالة الخلايا الكاملة أو حطام الخلية وتتميز أغشية الفلاتر المستخدَمة باحتوائها على مسام تتراوح أ قطارها بين 0.1-10 مايكرومتر وتسمح هذه المسام بالإحتفاظ بالخلايا الكاملة وحطامها والجسيمات الكبيرة في حين تسمح بمرور الجزيئات الكبرية مثل البروتينات، من جهة أخرى يمكن التخلص من الحطام الخلوي وإزالته عن طريق الترسيب بعملية التثفيل التفاضلي (Differential Centrifugation) والتي تعتمد على فصل العضيات والمكونات الأخرى للخلية على أساس الإختلاف في سرعة وزمن التثفيل والتي تعكس الإختلاف في الكثافة و الحجم والكتلة ، تتم هذه العملية باستخدام قوة طرد مركزي فتترسب العضيات الكبيرة في الأزمنة القليلة

والسرعات المنخفضة وبزيادة السرعة والزمن تترسب العضيات الأصغر وهكذا ، ويعد تثفيل الخلايا البكتيرية أسهل من تثفيل الخلايا الثدية والنباتية لأنها لا تحتوي على عضيات



Differential Centrifugation

- **تركيز المنتَج الأولي Initial product concentration**

يتم تركيز البروتين الخام المنتَج بهدف الحصول على حجوم أصغر من المنتَج يسهل التعامل معها وتنقيتها في الخطوات اللاحقة بسرعة أكبر ، يتم التركيز إما باستخدام الأملاح أو مذيبات عضوية أو بواسطة الترشيح

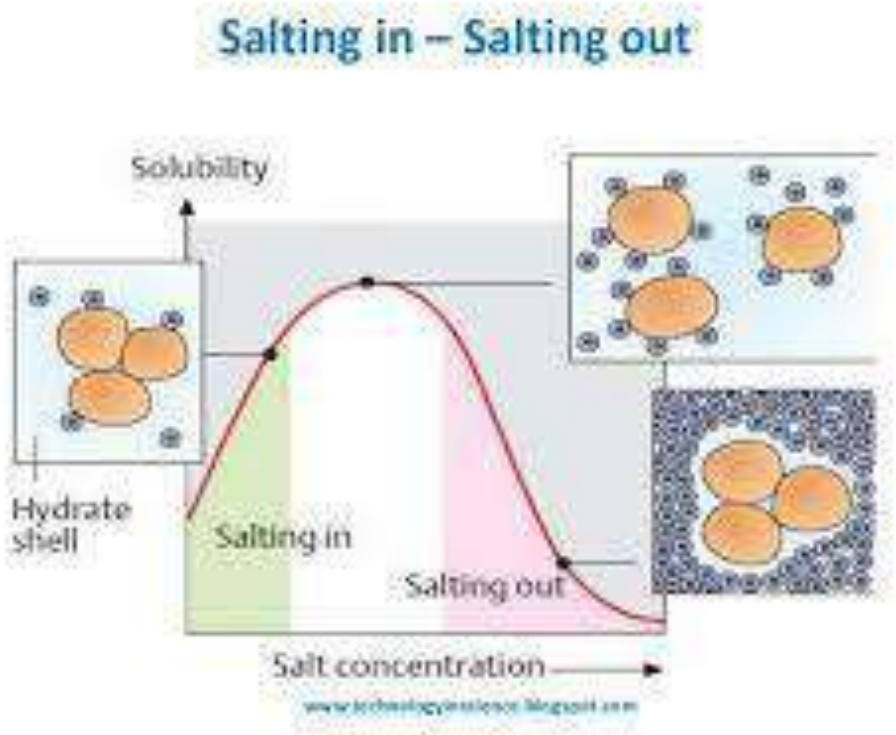
✓ **التركيز باستخدام الأملاح أو الترسيب بالملح Salting out**

يتم استخدام انواع مختلفة من الاملاح في عملية تركيز المنتَج البروتيني مثل سلفات الامونيوم ammonium sulfate ويمكن تركيز البروتينات ايضا باضافة المواد الساحبة للماء كمادة (PEG) poly ethylene glycol ، يتم تحضر محاليل الأملاح في الماء بتراكيز مشبعة مثلاً محلول مشبع من سلفات الامونيوم يُحضَر باذابة الملح الى درجة الاشباع في الماء المقطر وغالبا ما نحصل على درجة الاشباع بإذابة 700 غرام ملح الى 1000مل ماء مقطر، ويعد ملح سلفات الأمونيوم من أكثر الأملاح استخداماً بسبب:

- الإنحلالية العالية لسلفات الامونيوم التي تبلغ 706 غرام / 1000 مل ماء مقارنة بالاملاح الاخرى مثل كلوريد الصوديوم الذي تبلغ انحلاليته 250 غرام كلوريد الصوديوم / 1000 مل من الماء عند درجة حرارة صفر مئوية
- انعدام او قلة تاثير سلفات الامونيوم على تركيب البروتين بصورة عامة

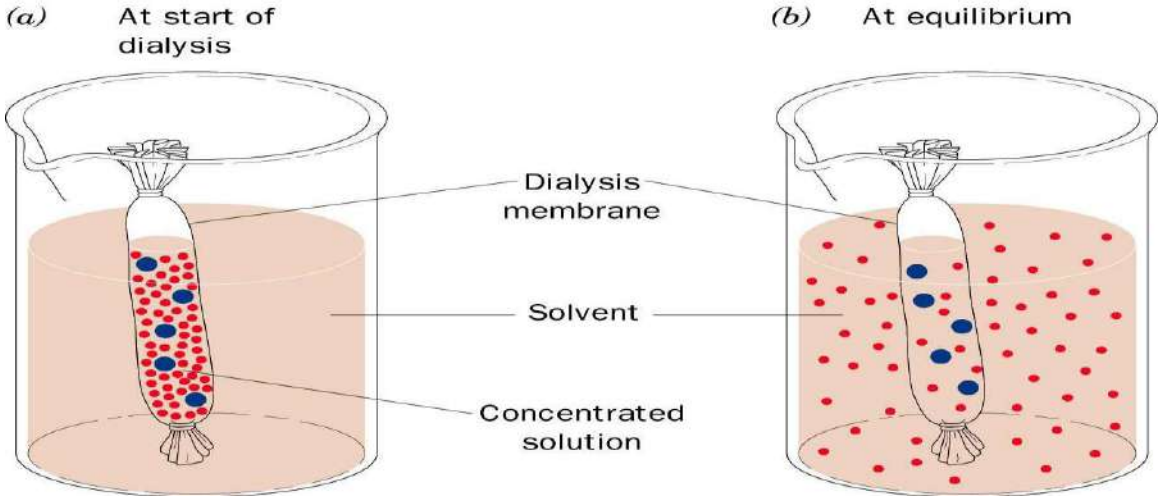
يتم ترسيب المنتج البروتيني في السائل الطافي باستخدام طريقة الترسيب بالملح مع التبريد لمنع تمسخ* البروتينات وتعتمد هذه الطريقة على إضافة تركيز مرتفع من الملح بشكل تدريجي لترسيب البروتين ، يحدث الترسيب بملح سلفات الامونيوم بسبب العرقلة Disruption التي تحدثها الايونات الملحية بطبقة جزيئات الماء المحيطة بالبروتين أي خفض درجة الإنحلالية (تتحد أيونات سلفات الامونيوم مع الماء مما يقلل من كمية المحلول المتوافرة لذوبان البروتينات الموجودة) ، تبدا عملية الترسيب عند ظهور عكرة للبروتين المرسَب حيث تؤدي إضافة تركيز عالي جداً من الملح وبشكل تدريجي إلى تحول البروتين من الشكل المنحل إلى الشكل غير المنحل (المتَرَسِب)، يجب أن تكون شحنة البروتين الهدف و البروتينات الاخرى معروفة مسبقاً وكذلك تركيز الملح الذي يترسب عنده البروتين الهدف وذلك كي نتمكن من فصله عن باقي البروتينات المنحلة التي نرسبها أولاً وذلك من خلال خفض تركيز الملح إلى القيمة التي تسبق التركيز الذي يترسب عنده البروتين الهدف ثم نتخلص من هذه البروتينات عن طريق الترشيح أو التثفيل التفاضلي ومن ثم نرسب البروتين الهدف عن طريق زيادة تركيز الملح إلى القيمة المطلوبة، ، في خطوة تالية يتم جمع الرسابة ويعاد حلها في كمية أصغر من الدارئة المناسبة ، تعد هذه الطريقة خطوة أولى عند تنقية كميات كبيرة من البروتين الهدف وهي الأرخص تكلفةً

- تمسخ البروتين* هي عملية تغيير تنظيم البروتين وبالتالي لا يستطيع البروتين القيام بوظيفته البيولوجية



✓ **الديلزة Dialysis**

الديلزة هي عملية تتضمن ازالة الأملاح عموما عن محاليلها وغالبا ما يتم استخدام الديلزة لإزالة الأملاح عن البروتينات بعد عملية الترسيب بهذه الأملاح وكذلك لإزالة البروتينات ذات الوزن الجزيئي الصغير حيث تستعمل أنابيب خاصة لهذا الغرض تسمى (tubes Dialysis) وهي انابيب رقيقة تشبه أوراق السلفين مصممة لتحتوي على ثقوب تقاس أقطارها بالأنغستروم تختلف أقطار الثقوب في انابيب الديلزة وهذا يؤهلها لتستعمل في حجز البروتينات اعتمادا على أوزانها الجزيئية كما تسمح تلك الثقوب بمرور جزيئات الاملاح من محلول (البروتين- الملح) إلى الخارج وبذلك تتم إزالة جزيئات الاملاح نهائيا من البروتين، مبدأ عملية الديلزة هو الحلول Osmosis حيث تنتقل جزيئات وأيونات الملح من التركيز الأعلى إلى التركيز الأدنى عبر طرفي غشاء نصف نفوذ



✓ **الترسيب باستخدام المذيبات العضوية**

تعتمد هذه الطريقة على استخدام مذيبات عضوية مثل الكحول الايتيلي أو الاسيتون ذات ثابت فصل كهربائي اقل بكثير من الماء مما يؤدي الى انخفاض كبير في قيمة هذا الثابت بالنسبة للماء وارتفاع في قيمة القوة التي تجذب الجزيئات الى بعضها البعض مما يؤدي إلى تشكل كتل تترسب في المحلول

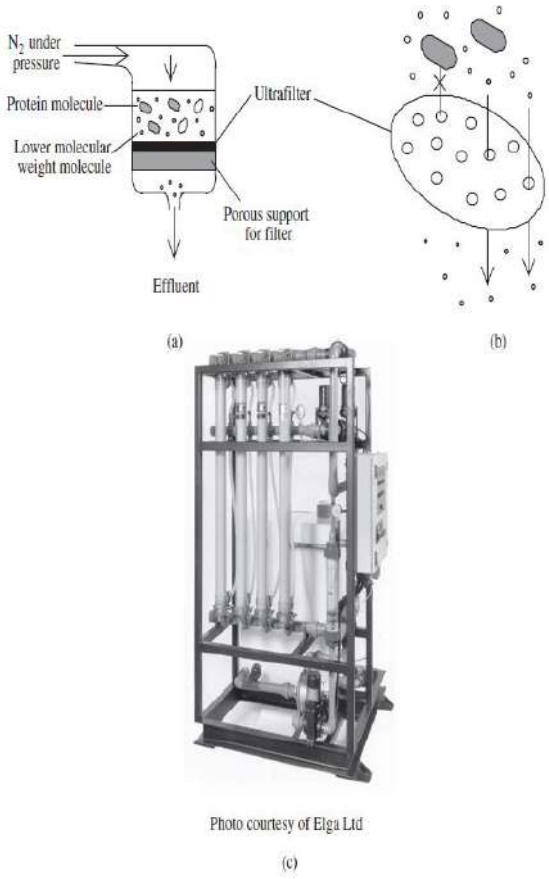
✓ **الترشيح الفائق Ultrafiltration**

يعد الترشيح الفائق التقنية الأكثر شيوعًا المستخدمة الآن بهدف تركيز المنتَج الأولي والتي تفصل الجزيئات اعتماداً على الحجم والشكل حيث يتم استخدام أغشية مرشحات تحتوي على مسام صغيرة تتراوح أقطارها بين 1-20 نانومتر تحتفظ بالبروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض وتسمح بمرور الماء والشوارد ، بشكل تقليدي يتم تصنيع المرشحات الفائقة من cellulose acetate or cellulose nitrate بينما الآن يتم استخدام العديد من المواد في صناعة الغشاء مثل polyvinyl chloride and polycarbonate

لقد أصبحت طريقة الترشيح الفائق الأكثر استخداماً بهدف تركيز البروتين للأسباب التالية :

- ✓ تتميز هذه الطريقة بقلة الآثار الجانبية بشكل كبير على الفعالية البيولوجية لجزيئات البروتين
- ✓ كمية البروتين المعاد جمعه عالية تتجاوز 99%
- ✓ لا تحتاج إلى زمن معالجة طويل عند المقارنة مع الطرق البديلة لتركيز البروتين الخام المنتَج
- ✓ تحتاج إلى القليل من التجهيزات الملحقة

على الرغم من الميزات الكثيرة لاستخدام هذه الطريقة إلا أنه من الممكن أن يحدث انسداد سريع لمسامات أغشية المرشحات



Ultrafiltration separates molecules based on size and shape

(a) Diagrammatic representation of a typical laboratory-scale ultrafiltration system.

The sample (e.g. crude protein solution) is placed in the ultrafiltration chamber, where it sits directly above the ultrafilter membrane. The membrane, in turn, sits on a macroporous support to provide it with mechanical strength. Pressure is then applied (usually in the form of an inert gas), as shown. Molecules larger than the pore diameter (e.g. large proteins) are retained on the upstream side of the ultrafi lter membrane. However, smaller molecules (particularly water molecules) are easily forced through the pores, thus effectively concentrating the protein solution (see also (b)).

Membranes that display different pore sizes, i.e. have different molecular mass cut-off points, can be manufactured. (c)

سادساً التنقية بالكروماتوغرافيا (الإستشراب اللوني) Chromatographic purification

تُعرَف التنقية بانها مجموعة متسلسلة من الخطوات يتحقق من خلالها مجتمعة تنقية البروتين او الأنزيم أو المنتجات الحيوية الأخرى بصورة سريعة وكفوءة واقتصادية ، عندما يتم إنتاج البروتين الدوائي المأشوب ضمن منظومة حية يتم في نفس الوقت إنتاج العديد من البروتينات الضرورية للقيام بكافة العمليات الحيوية وبقاء الكائن الحي على قيد الحياة والتي قد تلوث البروتين المطلوب، كما يمكن أن

ترتبط إحدى هذه البروتينات بالبروتين المطلوب نتيجة وجود ألفة بينهما وبالتالي ستكون عملية فصل البروتينات المرتبطة عن بعضها البعض صعبة ومكلفة ، ومن جهة أخرى قد يتلوث البروتين المطلوب بملوثات خاصة بالخلايا المضيفة مثل التلوث بالفيروسات عند استخدام خلايا الثدييات و التلوث بنفس البكتريا عند استخدام البكتريا كخلايا مضيفة ومن المعروف أن الخلايا البكتيرية غير قادرة على إفراز البروتين لذلك يتم تحطيمها فتخرج كل مكوناتها ومنها الـDNA الذي يمكن أن يلوث البروتين ويضاف إلى ذلك عند إنتاج البروتينات المأشوبة في منظومة حية يتم استخدام مصل جنين البقر وهو يحتوي على عوامل نمو Growth factors وبروتينات والتي تعد أيضاً من الملوثات للمنتج البروتيني المطلوب ، مما سبق نلاحظ أن عملية تنقية البروتينات هي عملية صعبة تحتاج قبل البدء بها إلى معلومات كاملة عن البروتين المرغوب بتنقيته و ماهي البروتينات التي من الممكن أن تشوبه و ذلك لفصله وتنقيته بشكل جيد مع الحفاظ على بنيته وفعاليته البيولوجية.

إذاً بعد الإنتهاء من جمع البروتين الحيوي من الخلايا المنتجة له وتركيزه يجب القيام بتنقية البروتين كي يصبح متجانس وذلك من خلال التخلص من كل البروتينات الملوثة له وغيرها من الملوثات الأخرى التي قد يؤثر على البروتين من الناحية العلاجية، و تعد الكروماتوغرافيا الطريقة الأكثر شيوعا والأفضل لتنقية

كميات كبيرة من البروتينات وتتميز بمايلي:

- تحقق أعلى مستوى من النقاوة
- تتطلب جهد منخفض
- انخفاض احتمالية تمسخ المنتج البروتيني
- الطريقة المعيارية للتنقية في الصناعة الدوائية

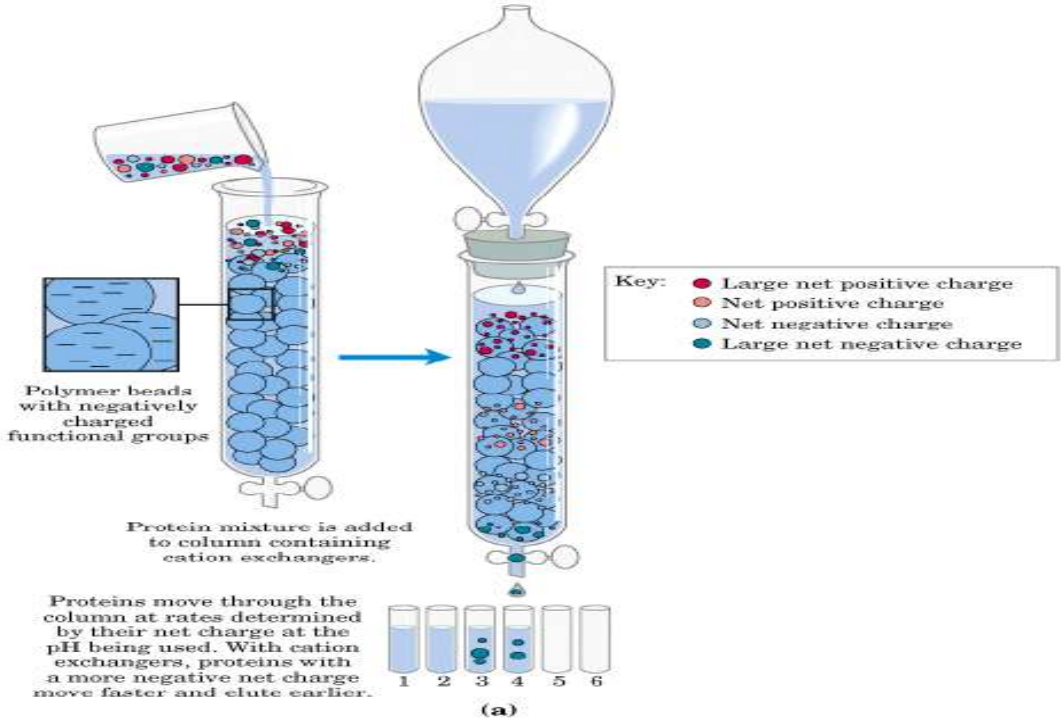
يشير مصطلح column chromatography (الإستشراب على العمود) إلى فصل الأنواع المختلفة من البروتينات عن بعضها البعض على شكل مجموعات بين طورين : طور صلب solid phase يمثل خرزات beads تكون معبأة عادةً في عمود اسطواني الشكل يدعى عمود الفصل وطور متحرك mobile phase عادةً يكون buffer وتتم عملية فصل البروتينات اعتماداً على خصائصها الفيزيائية والكيميائية وخاصةً مدى استقطابها ويمكن الحصول على جميع المعلومات المتعلقة بالبروتين من الموقع Protein Data.Bank-PDB

من أجل تنقية البروتين الهدف بشكل كامل يتم عادة إجراء خطوات تنقية متتابعة بعدة طرق من الكروماتوغرافيا ومن هذه الطرق :

1. كروماتوغرافيا التبادل الايوني Ion-Exchange Chromatography (IEC)

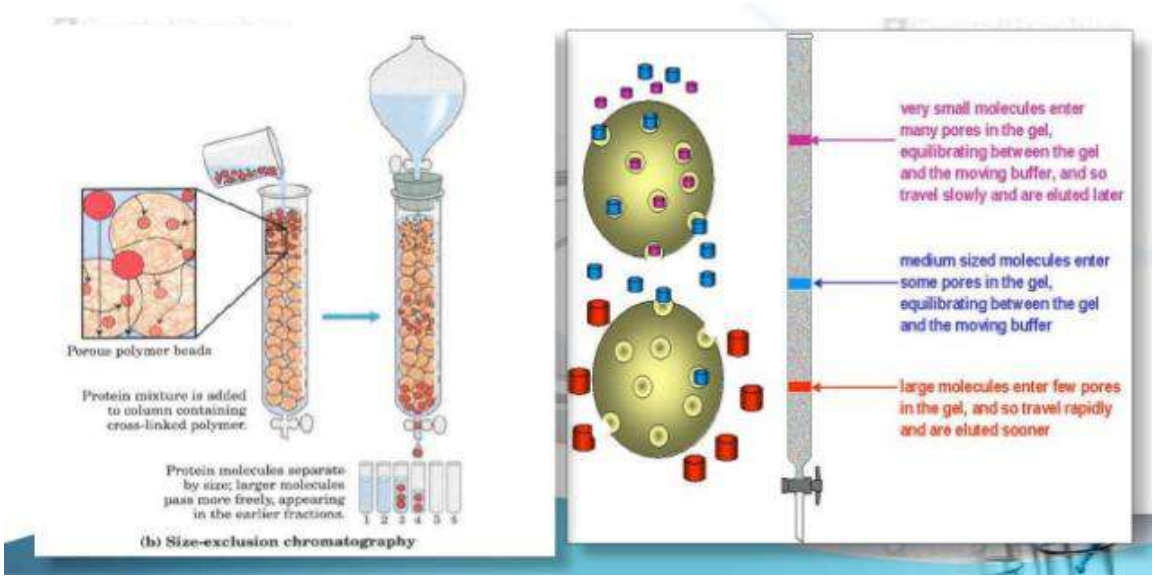
يعتمد الفصل بطريقة IEC على شحنة البروتينات حيث ترتبط البروتينات المشحونة مع الركازة التي تمتلك شحنة معاكسة لشحنة البروتين في درجة PH معينة وذلك بعد اضافة المستخلص في عمود المبادل الايوني أو عمود الفصل (يتألف العمود من ركازات تحمل شحنات سالبة أوموجبة) ، يتم غسل العمود الذي يحتوي على البروتين المرتبط بوساطة buffer المستعمل في الفصل لازالة جزيئات المواد غير المرتبطة والملوثة للبروتين وفيما بعد يتم الحصول على البروتين المرتبط بالركازة باستعمال buffer اخر في درجة PH مختلفة

- يمكن فصل البروتينات الحامضية (المحملة بشحنة سالبة) على مواد تبادل ايوني قاعدية مثل ثنائي ايتيل امينو ايتيل سيللوز DEAE– cellulose
- يمكن فصل البروتينات القاعدية (المحملة بشحنة موجبة) على أعمدة تحتوي على مواد تبادل ايوني سالبة الشحنة مثل كربوكسي ميتيل السيللوز CM - cellulose



2. كروماتوغرافيا الإقصاء الحجمي Size Exclusion Chromatography (SEC)

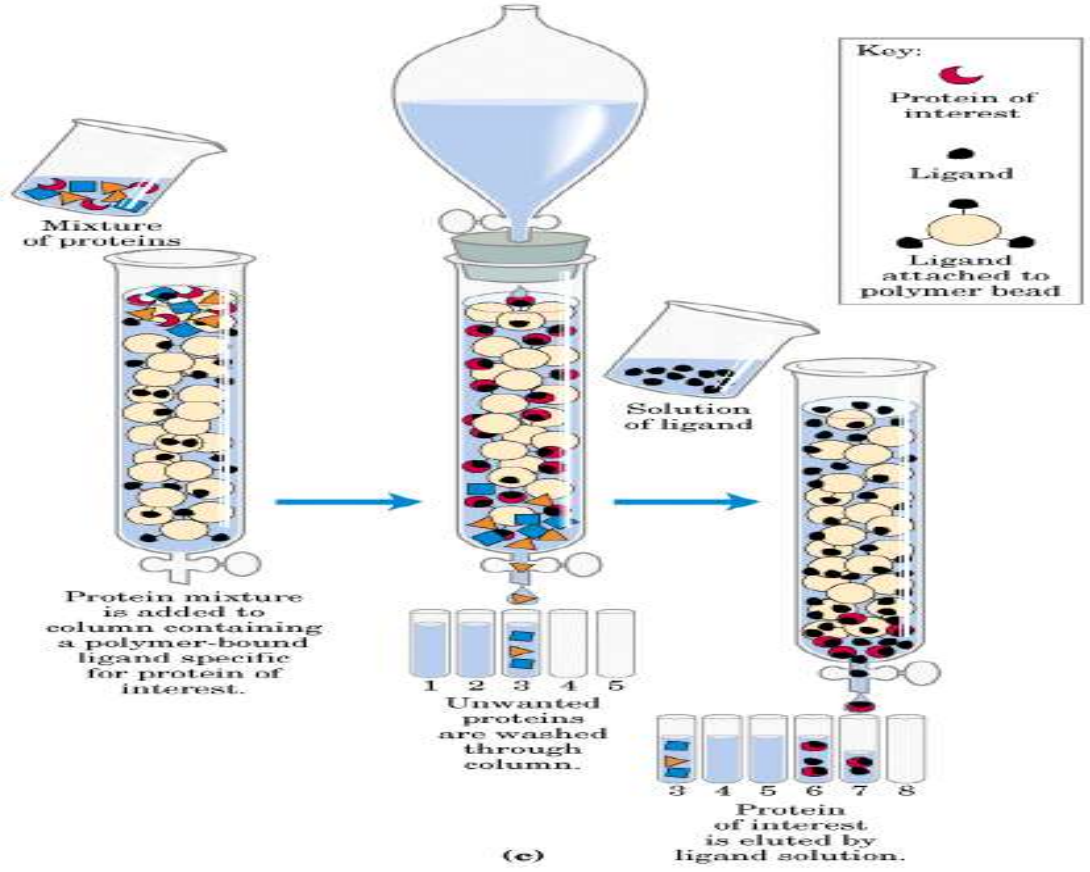
تعتمد طريقة SEC على فصل البروتينات حسب حجمها أو وزنها الجزيئي ومن المواد الشائعة لتعبئة الاعمدة غرويات الدكستران dextran gels وغرويات عديد الاكريلاميد polyacrylamide وهي مواد هلامية بشكل خرزات (حبيبات دقيقة) تحتوي على شبكة من المسامات مختلفة الأحجام تحتجز البروتينات ضمنها بدون أن تتفاعل معها ، أولاً يتم إضافة محلول البروتينات (ذات الأوزان الجزيئية المختلفة) على العمود الذي يحتوي الحبيبات الدقيقة وبإضافة دارئة الغسل buffer elution تنفصل جزيئات البروتين حسب حجمها حيث تخرج أولاً البروتينات الأكبر حجماً ثم الأصغرمن العمود إلى أنابيب يتم تجميعها فيها مع ملاحظة أن البروتينات ذات الاحجام المختلفة تحتاج إلى كميات مختلفة من دارئة الغسل لتخرج من عمود الإستشراب إلى الأنابيب فكلما كان حجم البروتين أصغر احتاج كمية أكبر من دارئة الغسل



3. كروماتوغرافيا الألفة Affinity chromatography

تعتمد هذه الطريقة على قدرة معظم البروتينات على الإرتباط بشكل نوعي مع مركبات أخرى تدعى ligands و ligand بالتعريف هي أي مادة تكون مرتبطًة بشكل تساهمي بدعامة صلبة (خرزات) وتستطيع الارتباط بألفة عالية مع البروتينات المُراد تنقيتها من العينة ليتم نتيجة لذلك احتجاز هذه البروتينات في عمود الفصل حين مرورها فيه ، في حالة أخرى قد يكون الإرتباط النوعي مع أضداد نوعية موجهة للبروتين الهدف (ضد - مستضد) ، عادةً يحتوي البروتين الهدف على واسمة tag (هي تسلسل معين من الـ DNA يتم ربطه مع cDNA البروتين الهدف خلال المرحلة التحضيرية) لترتبط بألفة مع ligand أو الضد ومن من هذه الواسمات:

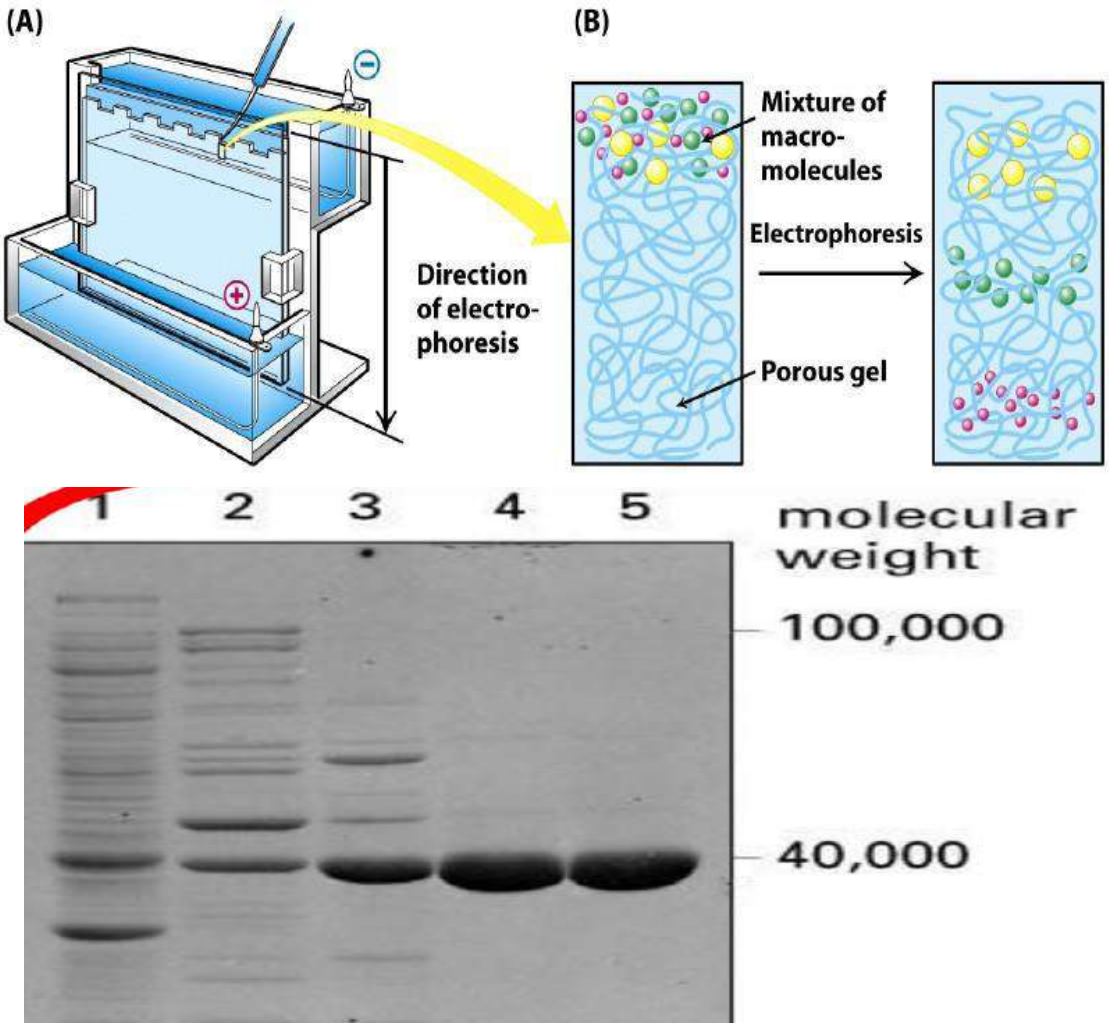
- واسمة من عديد الهيستيدين X6 HIS or HIS Tag (6 ثمالات من الحمض الأميني الهيستيدين) في البروتين الهدف مما يسمح باستخلاصه بسهوله باستخدام عمود من معدن النيكل أو الكوبالت (يمثل الركيزة) والذي يملك ألفة عالية للـ HIS Tag ويرتبط معها وبهذا يتم فصل البروتين الهدف عن البروتينات الأخرى ويتم الغسل باستخدام الإيميدازول الذي يملك بنية مشابهة للحمض الأميني الهيستسدين ويدعى هذا النمط بكروماتوغرافيا الألفة للمعادن
- واسمة Flag تسمح بالكشف عن بروتين منتَج في الخلايا بطريقة الألفة المناعية ، بدايةً يتم تحطيم الخلايا التي تحتوي على البروتين الحاوي على الواسمة ثم تتم عملية التثفيل للحصول على السائل الطافي الذي يتم تمريره على أعمدة الاستشراب بالألفة التي تحوي على خرزات مثبت عليها أضداد موجهة ضد الواسمة مما يؤدي إلى ارتباط الأضداد بالواسمة والكشف عن البروتين الهدف ، لا تُستخدم طريقة الترسيب المناعي لفصل كميات كبيرة من البروتينات لانها مكلفة جداً ولكن تُستخدَم في الأغراض البحثية



يمكن عن طريق كروماتوغرافيا الألفة تنقية البروتين الهدف بخطوة واحدة فقط و بدرجة نقاوة عالية أكثر بـ1000 مرة من الطرق الأخرى و هذا بدوره ، يؤدي إلى توفير الوقت والتكاليف بشكل كبير

الترسيب المناعي Immuno precipitation (IP) هي تقنية ترسيب مستضد بروتين من محلول باستخدام جسم مضاد (ضد) الذي يرتبط على وجه التحديد ببروتين معين يمكن استخدام هذه التقنية لعزل و تركيز بروتين معين من عينة تحتوي على عدة آلاف من البروتينات المختلفة ويتطلب الترسيب المناعي أن تقترن الأجسام المضادة إلى ركيزة صلبة في بعض خطوات التجربة

إذا قمنا بمقارنة طرق التنقية المختلفة (التي ذكرناها سابقاً) للبروتين الهدف عن طريق إجراء الرحلان الكهربائي على هلام Polyacrylamide وذلك بوضع نفس الكمية من البروتين في كل بئر فسوف نجد أن:



- طريقة الترسيب بالملح تخلصنا من الكثير من البروتينات وزادت كمية البروتين االهدف أما البروتينات التي بقيت هي تلك التي تملك شحنات مشابهة لشحنة البروتين الهدف (البئر الثاني)
- طريقة Ion-Exchange Chromatography زادت فيها كمية البروتين الهدف بشكل أكبر وأيضاً خلصتنا من كثير من البروتينات (البئر الثالث)
- طريقة Size Exclusion Chromatography تخلصنا أيضاً من كثير من البروتينات وازدادت فيها كمية البروتين الهدف بشكل أكبر نسبة للبروتينات الأخرى (البئر الرابع)
- طريقة affinity chromatography حصلنا تقريبا على البروتين الهدف فقط (البئر الخامس)

- مع الإشارة إلى أن البئر الأول يحتوي على مزيج البروتينات المستخلصة دون تنقيتها ، وبفرض أن البروتين الهدف ذو وزن الجزيئي 40000 دالتون

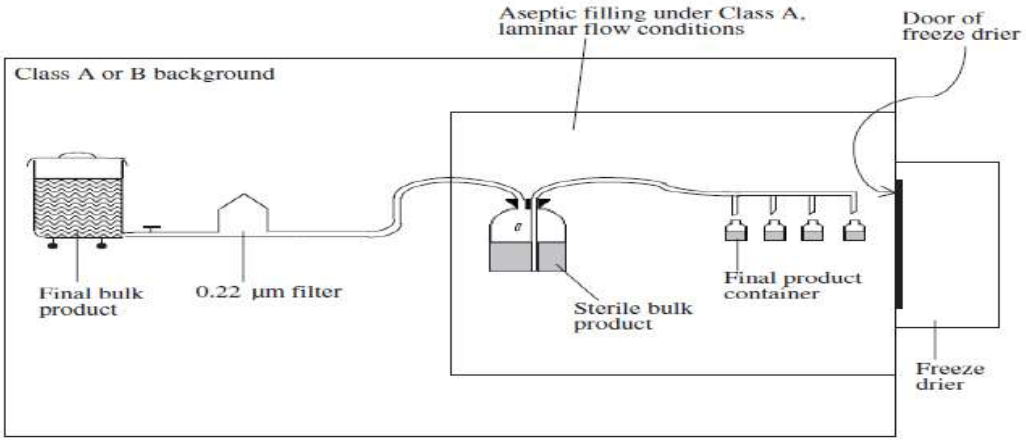
- **صياغة الشكل الصيدلاني للمُنتَج (تحضير المنتَج النهائي) Final product formulation**

بعد الإنتهاء من مراحل التنقية باستخدام طريقة الكروماتوغرافيا نحصل على البروتين الهدف بدرجة نقاوة تصل إلى 98-99% وتكون الخطوة التالية في مرحلة المعالجة النهائية هي صياغة الشكل النهائي للمنتَج والتي تتضمن بشكل عام:

- ✓ إضافة سواغات مختلفة وهي مواد غير المكون الفعال تعمل على استقرارالمنتج النهائي أو تعزز خصائص المنتج النهائي
- ✓ ترشيح المنتج النهائي من خلال مرشحات 0.22 µm من أجل الحصول على منتج عقيم ليتم وضعه في عبوات المنتج النهائي
- ✓ التجفيف بالتبريد (التجفيد lyophilization) في حال كان المنتَج النهائي سيتم تسويقه على شكل بودرة

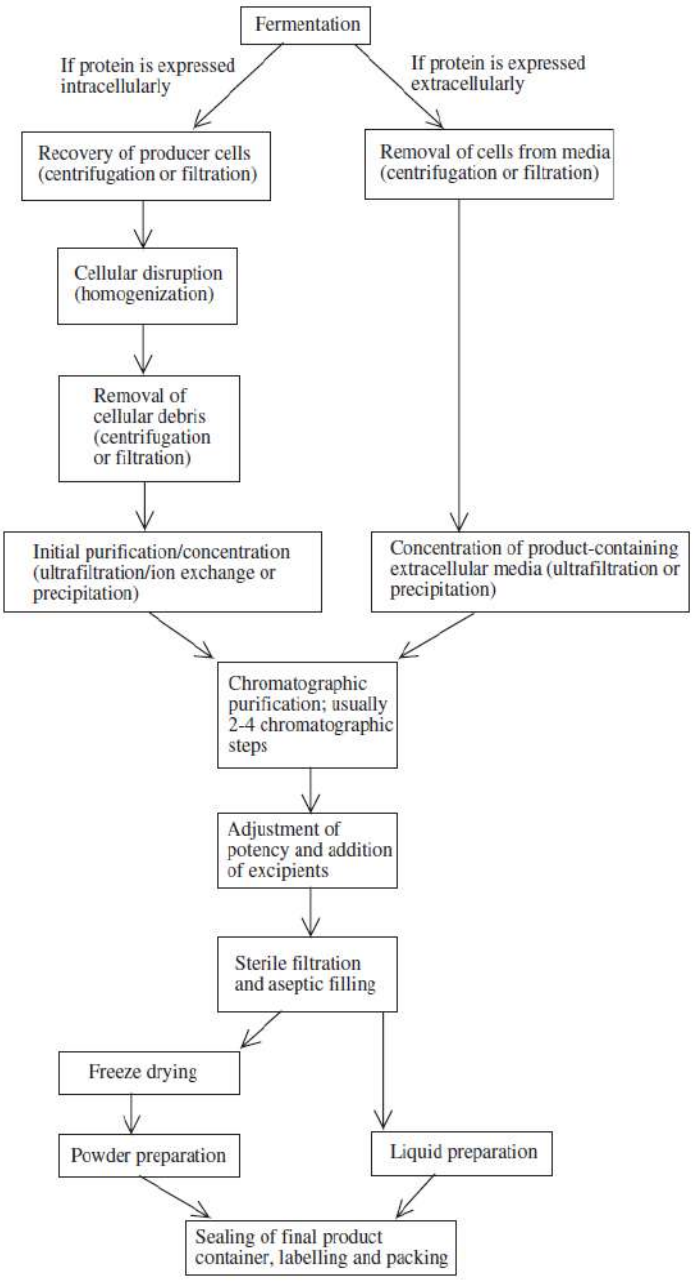
إن قرار تسويق المنتج بشكل سائل أو بودرة (مسحوق) يرتبط باستقرار البروتين في محلول والذي يتم تحديده بشكل تجريبي في المرحلة التحضيرية (مقارنة استقرار البروتين بشكل محلول مع الشكل الجاف) بعض البروتينات تبقى مستقرة في محلول لعدة أشهر أو لعدة سنوات خاصةً إذا تمت إضافة سواغات تساعد على استقرار البروتين ثم تم حفظ المحلول بشكل مبرَد ، بينما بروتينات أخرى وخاصةً عند تنقيتها تبقى فعالة بيولوجياً لعدة ساعات فقط أو عدة أيام في محلول مائي وهنا يجب تجفيد هذه البروتينات أثناء مرحلة التطوير الاولي للمنتَج يتم إجراء دراسة تجريبية لتحديد أكثر أنواع السواغات فعاليةً لتعزيز استقرار البروتين وفعاليته البيولوجية ومن السواغات Serum albumin والذي تؤدي إضافته إلى تثبيت أنواع مختلفة من عديدات الببتيد وغالبًا ما يستخدم في حالة الأدوية الحيوية المخصصة للإعطاء عن طريق الحقن

يتم تعبئة المنتج النهائي في عبوات كما هو موضح في المخطط التالي



Final product filling

The final bulk product (after addition of excipients and final product QCtesting), is filter sterilized by passing through a 0.22 µm filter. The sterile product is aseptically filled into (pre-sterile) final product containers under grade A laminar flow conditions. Much of the filling operation uses highly automated filling equipment. After filling, the product container is either sealed (by an automated aseptic sealing system), or freeze-dried first, followed by sealing



خطوات مرحلة التجهيز النهائي Downstream processing للمنتج البروتيني الدوائي

انتهت المحاضرة السادسة

المحاضرة السابعة

الأدوية الحيوية biopharmaceuticals (I)

الهرمونات العلاجية – الأنسولين Therapeutic hormones- Insulin

الدواء الحيوي biopharmaceutical أو عقاقير التقانة الحيوية biotech drugs بحسب تعريف المعهد الوطني للسرطان هو المادة التي تُصنَّع من كائن حيّ أو من منتجاته وتُستخدم للوقاية أو التشخيص أو تُستخدم لعلاج السرطان والأمراض الأُخرى ، وقد استُعمل مصطلح الدواء الحيوي لأول مرة في الثمانينات من القرن الماضي وكان يشير إلى مجموعة من البروتينات العلاجية التي تم إنتاجها بواسطة التقانات الحيوية الحديثة وخصوصاً بواسطة الهندسة الوراثية أو بواسطة تقانة الخلايا الورمية الهجينة في حالة الأضداد وحيدة النسيلة

إن اكتشاف وتصنيع أدوية جديدة هي مسألة مهمة للإستراتيجية التجارية للعديد من شركات الأدوية الكبيرة ومن المعروف أن براءات الاختراع توفر حماية قانونية لضمان بيع دواء فعال جديد بأسعار عالية ولفترة زمنية معينة تحددها براءة الاختراع التي تمنع الآخرين في نفس الوقت من صناعة وبيع هذا الدواء بأسعار منافسة أو منخفضة وحالما تنتهي فترة الحماية المحددة في براءة الاختراع يصبح بالإمكان تصنيع الدواء على شكل منتوج عام ، مع العلم أن أقصى فترة حماية لاتزيد على 20 عام و أن الزمن المحدد لها في الولايات المتحدة الأميركية هو 17 عام ، وهذا يعني أنه يجب على المخترع الأصلي اختراع دواء جديد كل فترة زمنية معينة إذا كان يريد الربح الكبير و المحافظة على اسم الشركة العريق ولكن هذا الأمر فيه كثير من الصعوبات والمشاكل ومنها: اكتشاف دواء جديد يحتاج إلى كثير من الوقت والمراحل تتدرج من الأبحاث إلى الدراسات قبل السريرية إلى الدراسات السريرية إلى مراقبة الدواء قبل طرحه في السوق و يُقدر أن دواء واحد فقط من أصل 13 دواء مكتَشَف وصلوا إلى مرحلة الدراسات قبل السريرية سوف يصل إلى مرحلة الإطلاق في الأسواق بالإضافة إلى ذلك فإن تكاليف التطوير قد زادت بشكل كبير فحسب إحصائية لمركز Tufits لدراسة تكاليف تطوير الأدوية في عام 1987 بلغت هذه التكاليف 231 مليون دولار وعند إجراء نفس الدراسة في عام 2001 بلغت التكاليف 802 مليون دولار وهذا يعني أن الصناعة الصيدلانية تنفق أموال طائلة على الأبحاث وتطوير الدواء لذلك فإن شركات الأدوية العالمية مستعدة لدفع مبالغ كبيرة إلى شركات التقانة الحيوية التي يمكنها تزويدهم بمعلومات علمية أو تقنيات تعمل على تحسين المعرفة بالمرض وزيادة كفاءة عملية الإكتشاف أو التطوير

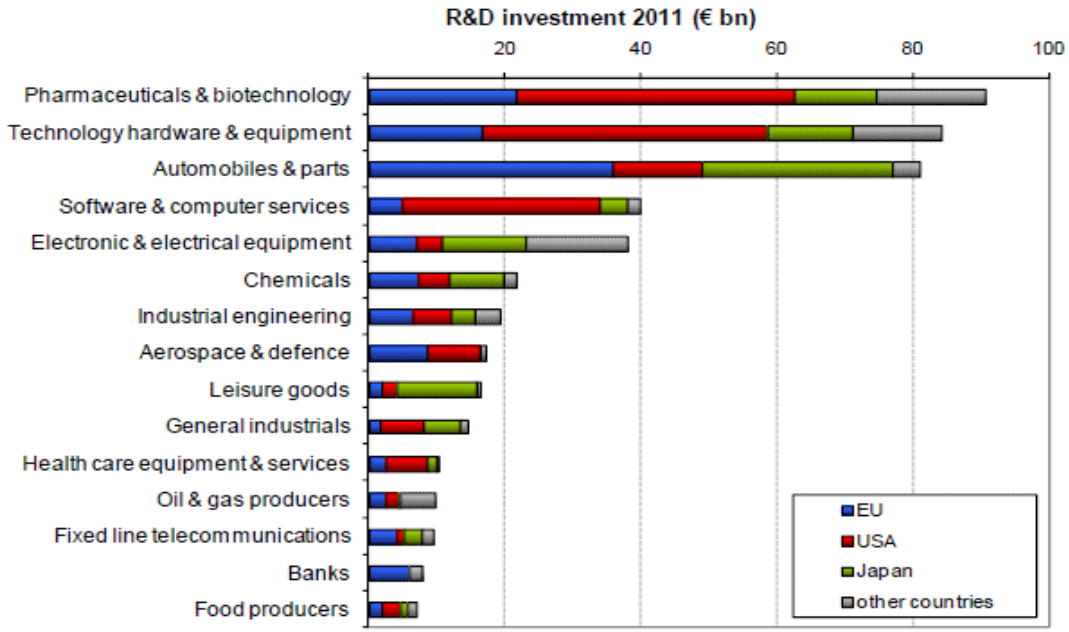
إن صناعة الدواء باستعمال التقانة الحيوية تدعى بالتقانة الحيوية الصيدلانية

Pharmaceutical biotechnology

لقد أدى دمج قدرة التقانة الحيوية مع الخبرة الصيدلانية إلى تسريع تطور قطاع الأدوية الحيوية و من أهم شركات الأدوية العالمية التي اعتمدت هذا النهج شركة Eli Lilly وهي شركة أدوية عريقة تعاقدت مع مركز Genentech للتقانة الحيوية الذي أنتج بروتين الأنسولين البشري المأشوب والذي سوقته شركة Eli Lilly فيما بعد تحت اسم تجاري Humulin ، وأيضاً من الشركات الرائدة عالمياً في تطوير الأدوية الحيوية نذكر Amgen (Applied Molecular Genetics) تأسست عام 1980 مقرها الرئيسي كاليفورنيا وتهتم بتطوير البروتينات العلاجية التي تستخدم لعلاج الأورام وأمراض العظم والأمراض العصبية وأمراض الكلى ، Biogen تأسست عام 1978 مقرها الرئيسي كامبريدج .

أصبح قطاع الصناعة الدوائية والتقانة الحيوية يحتل المركز الأول من حيث الاهتمام والدعم والإنفاق المالي عليه في الدول المتقدمة كما هو موضح في الشكل التالي

The pharmaceutical is the sector with the highest R&D intensity



وحسب التقديرات فإن واحد من كل أربعة أدوية جديدة يتم طرحها في السوق هو دواء حيوي ، وكذلك سبعة أدوية من أصل عشرة أدوية أكثر مبيعاً على مستوى العالم هي من منتجات التقانة الحيوية في عام 2014 مقارنة بخمسة أدوية عام 2008 و دواء واحد فقط عام 2000 ، ويعد **دواء Avastin الاول عالمياً** من حيث نسبة المبيعات وهو يُستخدَم لعلاج عدة أنواع من السرطان

تشكل البروتينات جزءاً من الأدوية التقليدية العديدة ومنذ زمن طويل تم استخدام البروتينات الطبيعية المستخلصة من الحيوانات أو النباتات أو الإنسان كمركبات دوائية مثل: الأنسولين المستَخلص من بنكرياس الخنزير وهرمون FSH المستخلص من بول النساء و هرمون الحمل hCG المستخلص أيضاً من بول النساء الحوامل وعوامل تخثر الدم VIII و IX المستخلصة من دم الإنسان وأنزيمات البروتييز أنكرودAncrod وباتروكسوبين Batroxobin المستخلصين من سم الأفعى، الكينين Quinine الذي يستخلص من جذور نبات Cinchona genus ويستخدم لعلاج الملاريا ، إلا أن هذه البروتينات الغريبة هي مستمنعات (تثير الاستجابة المناعية) لدى الإنسان مما قد يؤدي إلى تعطيل سريع لهذه البروتينات ، كما أن عزل البروتينات العلاجية من سوائل وأنسجة جسم الإنسان والحيوان يشكل مصدر خطراً لاحتمال التلوث الفيروسي الذي قد يسبب إصابة المريض بأمراض اخرى مثل الإصابة

بالتهاب الكبد الوبائي من نمط B أو C أو بفيروس مرض نقص المناعة المكتسب HIV وذلك عند استخدام منتجات الدم الملوثة كأدوية ، يضاف إلى ذلك أن تركيز البروتينات الفعالة وظيفياً في سوائل جسم الإنسان وأعضائه منخفضة مما يحتم ضرورة معالجة كمية كبيرة من المادة للحصول على كمية قليلة من المنتج الفعال ، لذلك فإن صناعة الأدوية باستخدام التقانة الحيوية جعلت من الممكن:

- إنتاج أي بروتين بالكميات المطلوبة مهما كانت كبيرة
- إنتاج بروتينات علاجية مهندسة تتمتع بخصائص تفوق البروتين الطبيعي من حيث القدرة العلاجية
- التغلب على مشكلة سلامة المنتَج من خلال إنتاج بروتين خارج الجسم بشكل آمن وغير ملوث بأي عامل ممرض
- توفير البديل عن المصادر غير المرغوبة للحصول على الأدوية (البول مثلاً) أو المصادر الخطرة (الدم والأفاعي)

تُقسم الأدوية الحيوية إلى المجموعات التالية:

- البروتينات العلاجية therapeutic proteins وتضم

1. Hematopoietic Growth Factors
2. Monoclonal Antibodies
3. Vaccines
4. Thrombolytic Agent
5. Interferon
6. Hormones
7. Blood Factor

- الحموض النووية وتضم:
  - شدف من DNA يتم استخدامها في المعالجة الجينية gene therapy
  - عديدات النكليوتيدات مضادة المعنى antisense oligonucleotides

يتم استخدام الأدوية الحيوية في الكثير من الحالات المرضية مثل:

- حالات العلاج البديل عندما تكون بروتينات ضرورية للمريض مفقودة أو غير فعالة مثل : عوز أنزيم الأدينوزين دي أميناز (ADA) ، عوز عوامل التخثر(مرض الناعور)، الإنسولين (مرض السكري) ، هرمون النمو (القزامة) وتشكل هذه الادوية الجيل الأول من الحيوية
- حالة الأمراض التي تشكل خطراً على حياة الإنسان مثل السرطان والإصابات الفيروسية ، ومن الأدوية المستخدَمة والتي تشكل الجيل الثاني والثالث من الادوية الحيوية : الإنترفيرون – ألفا الذي يُستخدَم لعلاج التهاب الكبد من النمط C وأنواع عديدة من السرطان ، الإنترفيرون - بيتا الذي يُستخدَم في علاج التصلب اللويحي ويوجد له 3 أشكال تجارية مرخصة يتم إنتاج اثنين منها في خطوط خلوية من مبيض الهامستر الصيني ويُنتَج الثالث في E.coli

ماهي أهم الفروقات بين الأدوية الحيوية (البروتينات العلاجية) والأدوية صغيرة الوزن الجزيئي

- الأدوية الحيوية ذات وزن جزيئي كبير لأن صيغتها الكيميائية ضخمة مقارنةً بالأدوية صغيرة الوزن الجزيئي ذات الصيغة الكيميائية البسيطة
- لا تستطيع البروتينات العلاجية عبور الغشاء السيتوبلاسمي للخلية لأنها جزيئات ضخمة ولذلك ترتبط بمستقبلات خاصة على سطح الخلية وبالتالي موقع التأثير الدوائي خارج الخلية مقارنةً بالأدوية

منخفضة الوزن الجزيئي الذي يكون داخل الخلية بشكل رئيسي لأنها تستطيع عبور الغشاء السيتوبلاسمي

- الشكل الصيدلاني للأدوية الحيوية غالباً محاليل مائية والماء وسط ملائم لنمو الجراثيم مما يجعل عملية الحفظ صعبة لإمكانية تعرضها للجراثيم ومن الممكن أن يكون الشكل الصيدلاني مجفد بينما الأدوية منخفضة الوزن الجزيئي تكون صلبة غالباً
- يطرأ على بعض البروتينات بعد اصطناعها في الجسيمات الريبية تعديلات كي تصبح وظيفية مثل إضافة مجموعة سكرية أو ليبيدية والتي تتم في الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية الملساء و جهاز غولجي مما يجعل الادوية الحيوية ذات درجة تعقيد عالية لغناها بالأحماض الأمينية السيرين والأسبارجين التي تعد مكان إجراء التعديلات وبالتالي جزيئات البروتين الناتجة لا تكون متطابقة دائماً ، أما الأدوية منخفضة الوزن الجزيئي تكون ذات درجة تعقيد منخفضة وتكون تكرارية التصنيع لها سهلة أي عملية تصنيع نفس الدواء سهلة مقارنةً بالأدوية الحيوية
- يتم إعطاء الأدوية الحيوية عن طريق التسريب الوريدي أما الأدوية منخفضة الوزن الجزيئي غالباً يتم إعطاؤها عن الطريق الفموي

الهرمونات العلاجية – الأنسولين Insulin - therapeutic hormones

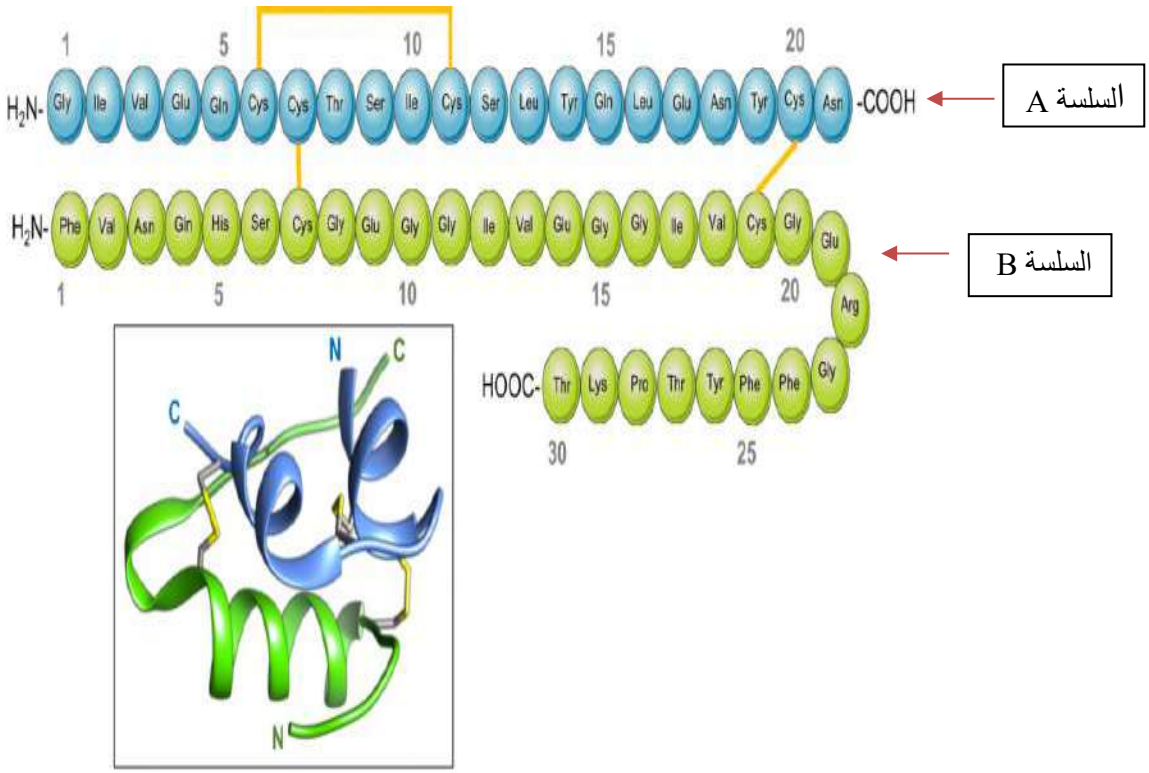
تشكل الهرمونات العلاجية جزء من البروتينات العلاجية وتضم الهرمونات التالية :

- Insulin
- Glucagon
- Human growth hormone
- The gonadotrophins

هرمون الأنسولين هو هرمون عديد ببتيدي ينظم مستوى سكر الغلوكوز في دم الإنسان وهو دواء مفتاحي في علاج داء السكري diabetes mellitus أو فرط سكر الدم ، حتى عام 1985 كان الأنسولين يُحضر بالاستخلاص المباشر من غدة بنكرياس الحيوانات المذبوحة وبعد ذلك أصبح إنتاج الأنسولين البشري المأشوب هو تقانة الإنتاج المسيطرة ، يبلغ حجم إنتاج السوق الإجمالي حوالي 8 طن سنوياً مع قيمة 1 بليون دولار أميركي في السنة تقريباً ، يتصف داء السكري بعجز في تصنيع أو تحرير الأنسولين، في الحالة الأكثر شيوعاً المعروفة بالنمط الثاني لداء السكري (داء سكري البالغين) يمكن في أغلب الأحيان تنشيط إنتاج الأنسولين من البنكرياس بالأدوية ، بينما في النمط الأول لداء السكري (داء السكري الشبابي) أو داء السكري المعتمد على الأنسولين IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) لا يُنتَج الجسم الأنسولين ويعود السبب غالباً إلى تخريب الخلايا بيتا في البنكرياس المنتجة للأنسولين بمهاجمتها من قبل الجهاز المناعي بواسطة الخلايا التائية في آلية من آليات المناعة الذاتية تعرف بالتخريب المناعي الذاتي بتواسط الخلايا التائية، ونتيجة لذلك يجب في هذا النوع ضبط مستوى الغلوكوز في الدم بالتزود الثابت بالأنسولين من خلال الحقن عبر الجلد أو داخل العضل ، يوجد حوالي 140 مليون شخص في العالم يعانون من داء السكري 60 مليون منهم مصابون بداء السكري من النمط الأول. يعد هرمون الأنسولين من الهرمونات التي تنتمي إلى مجموعة البروتينات، وهو لا يفيد مريض السكري إذا تم استعماله عن طريق الفم (وإن كانت هناك محاولات لإنتاج أنسولين يؤخذ عن طريق الفم)، لأنه لا يصل إلى الدم عن طريق الجهاز الهضمي، حيث يتعرض لعملية هضم بواسطة العصارات والإنزيمات الهضمية، حتى الجزء الذي لا يهضم من الأنسولين لا يمتص من خلال الأغشية المخاطية للجهاز الهضمي، ولذلك فإن الوسيلة الوحيدة لاستعمال الأنسولين حتى الآن هي الحقن ويفضل حقن الأنسولين تحت الجلد في معظم حالات علاج مرض السكر، ويحقن الأنسولين في الوريد في الحالات الحرجة، مثل غيبوبة ارتفاع سكر الدم المصحوبة بتكوين المواد الكيتونية.

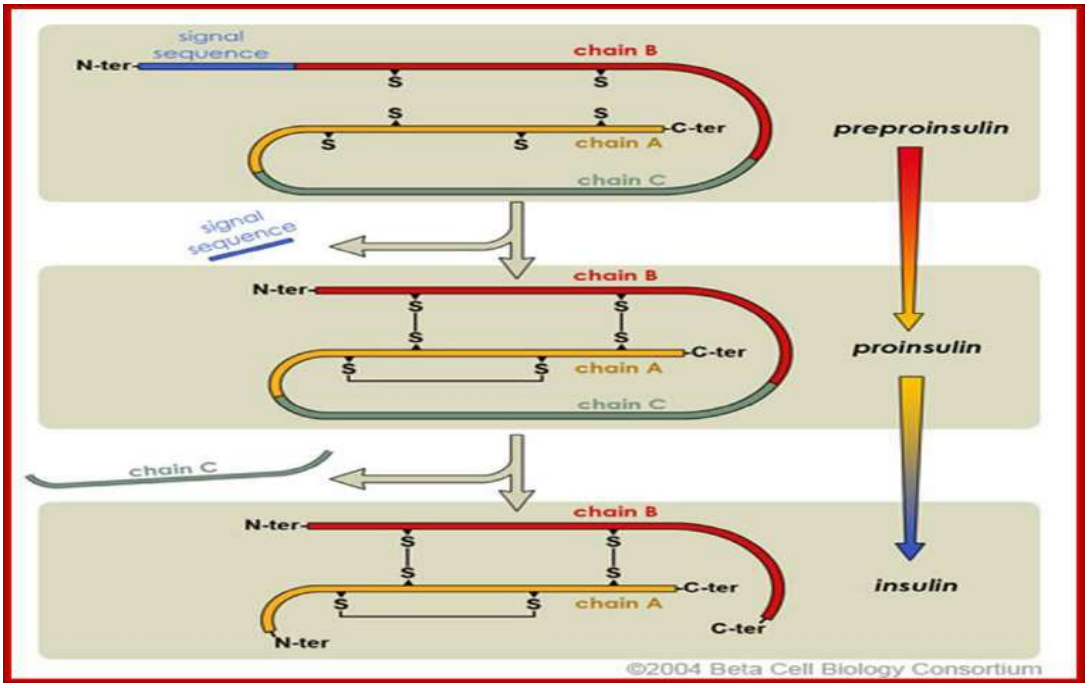
بنية جزئ الأنسولين والتصنيع الحيوي

يتألف الأنسولين الناضج من 51 ثمالة حمض أميني تنتظم في سلسلتين ببتيديتين A وB ترتبطان معاً برابطتين كبريتيتين (جسور ثنائية الكبريت) تتألف السلسة A من إحدى وعشرين ثمالة حمض أميني و تتألف السلسة B من ثلاثين ثمالة حمض أميني.



بدايةً يُصنع الانسولين من قبل خلايا بيتا في جزر لانغرهانس في البنكرياس على شكل عديد ببتيد طويل يعرف بالطليعة الأولية للأنسولين preproinsulin يتألف من 110 ثمالة حمض أميني، يقوم التسلسل الإشاري الموجود في النهاية الأمينية والذي يتألف من 23 ثمالة حمض أميني بتوجيه preproinsulin ضمن أغشية الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية حيث يتم إزالة التسلسل الإشاري بوساطة أنزيم ببتيداز خاص لإعطاء طليعة الأنسولين proinsulin الذي يتم تعبئته في حويصلات انتقالية تتبرعم من أغشية الشبكة السيتوبلاسمية وتندمج مع جهاز غولجي لتطرأ على proinsulin تعديلات بعد الترجمة تتمثل بشطر وتخريب السلسلة C بواسطة أنزيمات البروتياز وربط السلسلتين A و B برابطتين كبريتيتين، يتم تخزين الأنسولين ضمن حويصلات إفرازية بشكل بشكل معقد سداسي قسيم zinc–insulin hexamerيتألف من 6 جزيئات من الانسولين مستقرة بوجود ذرتين من الزنك ، تخرج الحويصلات الإفرازية من جهاز غولجي بهدف تخزين الأنسولين في الخلايا بيتا في البنكرياس لاستعماله عند الحاجة وعند التحريض بآلية معقدة تتضمن ارتفاع سكر الدم تندمج الحويصلات الإفرازية مع الغشاء الخلوي ليتم إفراز الأنسولين في الدم بآلية الإخراج الخلوي.

ملاحظة : يتألف الطليعة الأولية للأنسولين preproinsulin من ثلاث سلاسل ببتيدية وهي بدءاً من النهاية الأمينية: B و C و A كما يتألف من تسلسل إشاري



A

B

Figure 1: Progression of Insulin-like structures. A. The signal peptide of pre-proinsulin is cleaved, forming proinsulin. B) Proinsulin is folded in the ER, then transported to the Golgi apparatus where the C-peptide is cleaved using type I and type II endoproteases to form free C peptide and mature insulin.

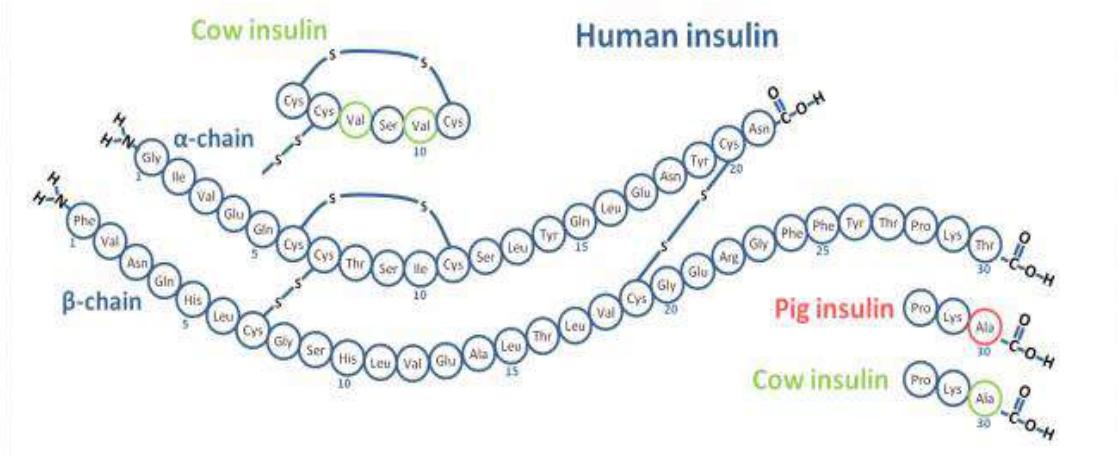
تذكر

الأنسولين بروتين لا يصطنع في جسم الإنسان بالشكل الناضج مباشرةً حيث تطرأ عليه تعديلات بعد عملية الترجمة وتتم هذه التعديلات في الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية وجهاز غولجي لينتج في النهاية الأنسولين الناضج

إنتاج الإنسولين

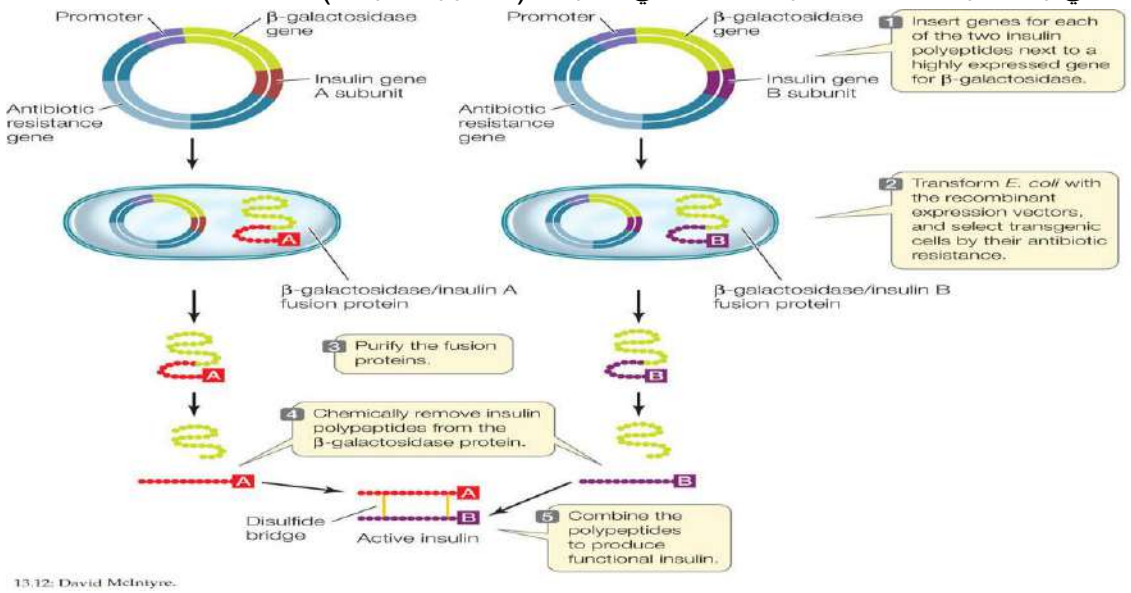
عام 1928 تم إدخال العلاج بالإنسولين حيز التنفيذ ، تجري عملية إنتاج هذا الهرمون تقليدياً بالإستخلاص المباشر من بنكرياس البقر و الخنازير ومعالجته بمحلول بوتانول -1 ثم ترسيبه بشكل ملح الزنك الذي يمكن بلورته بسهولة ، وبعد ذلك تتم تنقيته بواسطة الكروماتوغرافيا ، تغطي كمية الأنسولين الممكن تحضيرها من بنكرياس خنزير واحد حاجة مريض داء السكري لثلاثة أيام ، وتلك الكمية المحضرة من بنكرياس البقر تغطي حاجته لعشرة أيام ، بالإضافة إلى ذلك يختلف الأنسولين البشري عن إنسولين الخنزير بحمض أميني واحد (في الموقع 30 من السلسلة B توجد ثمالة التريونين في الإنسان وثمالة الألانين في الخنزير) كما يختلف عن الإنسولين البقري بثلاثة حموض أمينية (في الموقع 30 من السلسلة B توجد ثمالة التريونين في الإنسان وثمالة الألانين في الأبقار وفي الموقع 8 من السلسة A توجد ثمالة التريونين في الإنسان وثمالة الفالين في الأبقار وفي الموقع 10 من السلسة A توجد ثمالة الإيزولوسين في الإنسان وثمالة الفالين في الأبقار) وقد يؤدي ذلك إلى توليد استجابة مناعية ذات أثار جانبية تظهر بعد فترة من المعالجة وتتمثل بمقاومة الأنسولين نتيجة تشكل أضداد موجهة ضد الأنسولين البقري تزداد كميتها تدريجياً في جسم المريض وتحيد عمل الأنسولين ، من جهة أخرى يوجد اختلاف كبير في طليعة الأنسولين بين هذه الأنواع (الإنسان والأبقار والخنازير) نتيجة الاختلاف في الحموض الأمينية المكونة للسلسلة C وبالتالي وجود آثار من طليعة الأنسولين ذو المنشأ الحيواني مع الأنسولين المستخلص من هذه الحيوانات قد يحرض استجابة مناعية عند الإنسان ، في عام 1975 تم إيجاد حل

مؤقت لمشكلة الإستمناعية الناتجة عن الإستخدام المستمر للإنسولين الحيواني من قبل شركة Novo Nordisk الدانماركية من خلال إنتاج إنسولين مطابق لجزيء الإنسولين البشري وذلك باستبدال ثمالة الألانين في الموقع 30 من السلسلة B من إنسولين الخنزير بثمالة التريونين وذلك بواسطة عملية شبه تصنيعية محفزة بأنزيمات البروتياز ، ولكن بسبب العدد المتنامي من المرضى الذين يحتاجون الإنسولين (حوالي 170 مليون شخص يعانون من مرض السكري في جميع أنحاء العالم ويتوقع مضاعفة هذا العدد عام 2030) كان هناك قلق من محدودية التزويد بإنسولين الخنزير والابقار إلى أن تم استبدالهما بالإنتاج المأشوب للأنسولين البشري



إنتاج الإنسولين البشري المأشوب

لقدُ طورت عدة استراتيجيات لإنتاج الأنسولين المأشوب وهو أول دواء حيوي مُنتَج بتقانة االـDNA المأشوب تمت المصادقة عليه عام 1982 للإستخدام العلاجي لدى البشر، **ففي الطريقة الأولية** كما وُصِفت من قبل الشركة المنتجة (Genentech Inc) وقد دعي الأنسولين المحضر بهذه الطريقة بـ human insulin crb كان يتم غرس المورثة المرمزة للسلسلة A ضمن حامل تعبير جيني و المورثة المرمزة للسلسلة B ضمن حامل تعبير جيني آخر ثم يُعبر عن السلسلتين A و B بشكل منفصل داخل مجموعتين من خلايا سلالة واحدة من بكتيريا E.coli ومن ثم الإستنبات ضمن مخمرات ضخمة و استخلاص السلاسل الببتيدية وتنقيتها بالكروماتوغرافيا ثم يتم ربط السلسلتين الببتيديتين كيميائياً بحضنهما معاً في وسط مؤكسد لتتشكل الرابطتين ثنائيتي الكبريت (الجسور الكبريتية) بينهما.

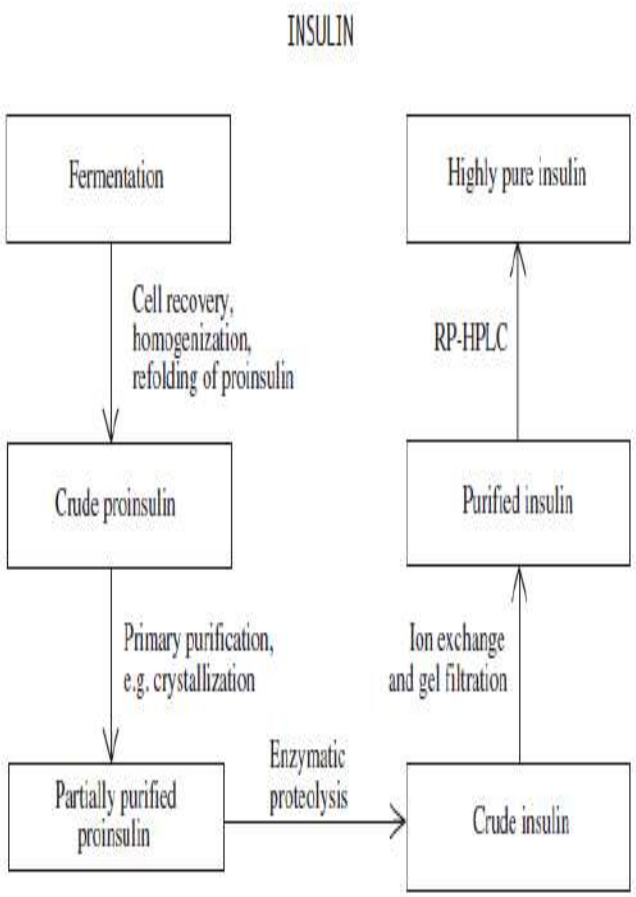


طريقة ثانية لإنتاج الإنسولين : يدعى الأنسولين المحضر بهذه الطريقة بـ human insulin prb حيث يتم إنتاج طليعة الإنسولين في خلايا بكتريا E.coli وبعد استخلاصه وتنقيته باستخدام الكروماتوغرافيا يتم شطر السلسلة C في الزجاج بوساطة أنزيم خاص ، لقد أصبحت هذه الطريقة أكثر استعمالاً الآن بسبب حاجتها إلى خطوة تخمر واحدة وتنقية لاحقة وقد تم تطويرها ضمن مخابر شركة Eli Lilly وسوّقت المنتج تحت اسم Humulin و في عام 1991 قامت شركة Novo Nordisk باصطناع الإنسولين المأشوب في خميرة Saccharomyces cerevisiae وسوقت منتجها تحت اسم Novolin

تذكر

الخميرة Saccharomyces cerevisiae هي من وحيدات الخلية حقيقيات النوى Eukaryotic فهي تحتوي على نواة وعضيات سيتوبلاسمية وبالتالي تطرأ تعديلات بعد الترجمة على الأنسولين تتمثل بربط السلسلتين الببتديتين A وB وقطع السلسلة الببتيدية C ولكن تتميز الخمائر بأن سرعة تكاثرها أقل من سرعة تكاثر البكتيريا

إن إنتاج الأنسولين المأشوب بأي من الطريقتين السابقتين يتطلب تنقية صارمة للتخلص من الملوثات الجرثومية لكونها شديدة الإستمناعية وتتم عملية التنقية باستعمال خطوات متلاحقة من الكروماتوغرافيا تتضمن الترشيح بالهلام ثم التبادل الشاردي ثم كروماتوغرافيا عالية الأداء معكوسة الطور لنحصل في النهاية على منتج نهائي ذو درجة نقاوة عالية تزيد عن 99% ومستوى منخفض جداً من الشوائب أقل من 1% غير قادرة على تحريض أي استجابة مناعية للمريض ويوضح الشكل التالي خطوات التنقية بالكروماتوغرافيا مع ملاحظة أن كروماتوغرافيا عالية الأداء معكوسة الطور هي المسؤولة عن النقاوة العالية للمنتج النهائي



HPLC column. Photograph courtesy of NovaSep

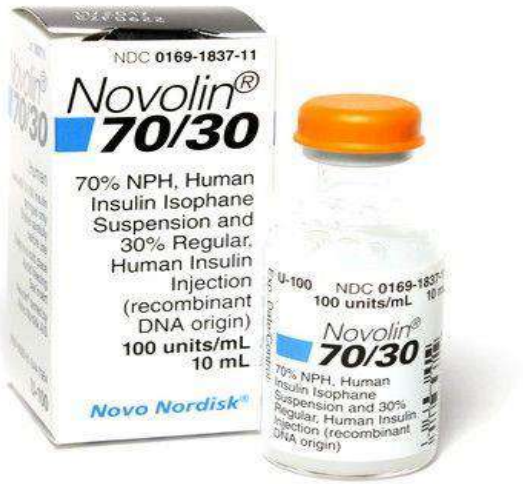
A likely purification scheme for human insulin prb.
A final RP-HPLC polishing step yields a highly pure product

المعالجة التقليدية بالأنسولين

في الإنسان الطبيعي يفرز الأنسولين بمستوى منخفض في الدم ويزداد مستوى الإفراز بشكل سريع ليصل إلى تركيزه الأعظمي بعد ساعة من تناول الطعام نتيجة ارتفاع سكر الدم ويعود إلى مستواه الأساسي بعد مرور ساعتين ، تعتمد المعالجة التقليدية بالأنسولين على إعطاء المريض مزيج من شكلين مختلفين من الأنسولين لمحاكاة تغيرات الأنسولين في الجسم :

- الأول سريع الفعل Fast-acting insulin يكون بشكل جزيئات مفردة monomer يرتفع تركيزه بالدم بسرعة بعد إعطاءه للمريض بسبب الامتصاص السريع له من مكان الحقن
- الثاني بطئ الفعل Slow-acting insulin والذي يدخل ببطء إلى الدم اعتباراً من مكان حقنه ويتم تحضيره إما عن طريق :
- إضافة الزنك إلى الأنسولين النقي مما يجعله يتبلور بشكل معقد سداسي قسيم zinc–insulin hexamer، هذا الشكل من الأنسولين يتطلب مدة زمنية طويلة كي يتفكك وليصل إلى مجرى الدم من مكان الحقن (فعل مديد مع التفكك التدريجي للمعقد).
- إضافة بروتين مثل البروتامين protamine يرتبط معه الأنسولين بشكل معقد ويتحرر منه الأنسولين ببطء بعد الحقن مما يزيد مدة التأثير، ويمكن أن يضاف إلى هذا المعقد الزنك مما يزيد من تعقيد البنية و

يزيد من فترة تحرر الأنسولين، يكون عمر النصف بحدود 20-25 ساعة في المعقد بروتامين-زنك-أنسولين وذلك بسبب تحرر الأنسولين البطيء من هذا المعقد في مجرى الدم
يدعى الأنسولين المحضر بهذه الطريقة NPH insulin والاسم التجاري له: Humulin أو Novolin بحسب الشركة المصنعة



يمكن أن تتم معالجة المريض أيضاً من خلال إعطائه الأنسولين النظامي Regular human insulin ويكون الأنسولين بشكل جزئيات مفردة وثنائية ومتعددة وبالتالي تختلف سرعة امتصاص كل منها بحسب حجمها ، يصل تركيز الأنسولين إلى أعلى مستوى في الدم بعد حوالي 2-3 ساعات من الحقن ويستمر مفعوله لمدة 3-6 ساعات

الأنسولينات المُهندَسة – مماثلات الأنسولين

يحتوي الأنسولين حموض أمينية كارهة للماء يؤدي ارتباطها مع بعضها إلى تكدس جزيئات الأنسولين و تتفكك هذه الجزيئات المتكدسة ضمن بلاسما الدم ولكن بشكل بطيء مما يؤدي إلى تحرر الدواء بشكل بطيء لذلك يجب إعطاء المريض الحقنة قبل 30 دقيقة من تناول وجبة الطعام وبعد حوالي الساعة من الطعام سوف يتحرَّر الأنسولين بشكل أسرع ويزداد تركيزه أكثر مما هو مطلوب وظيفياً، لذلك هناك خطر من زيادة مستوى الإنسولين في الدم والتي ربما تصل لحدود أعلى من الطبيعي ما يسبب اختلاطات لمريض السكري ولذلك كانت فكرة تصنيع الأنسولين المهندس وراثياً الذي يملك ميل منخفض للتكدس وبالتالي يملك تأثيراً سريعاً يشبه بذلك حركية الأنسولين المُفرز بشكل طبيعي، وقد مكنت التعديلات في تتالي بعض الحموض الأمينية باستخدام تقانة التطفير الموجه للموقع من إنتاج عدد كبير من مماثلات الإنسولين الفعالة حيوياً (أنماط معدلة من الأنسولين) مثل :

مماثلات الأنسولين سريعة الفعل

- الأنسولين lispro - Insulin lispro
- الأنسولين aspart - Insulin aspart

مماثلات الأنسولين بطيئة الفعل

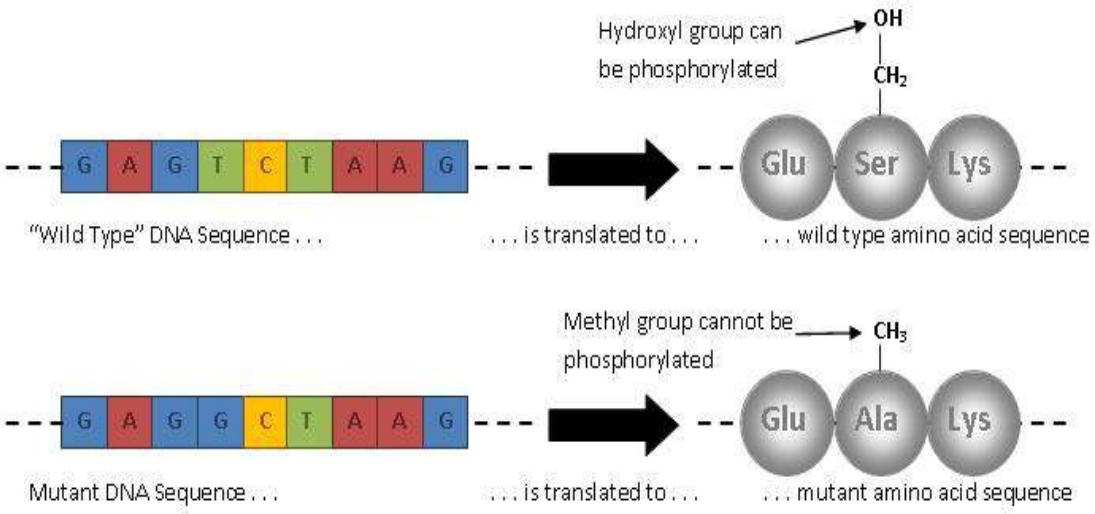
- الأنسولين glargine - Insulin glargine
- الأنسولين Levemir - Insulin levemir

وبالتالي يمكن تلخيص الأهداف الرئيسية لتصنيع مماثلات الأنسولين بمايلي:

- تغيير الخصائص الحركية الدوائية للأنسولين، وبالتالي تحضير الأشكال سريعة التأثير وبطيئة التأثير
- إنتاج أشكال من الأنسولين فائقة الألفة للمستقبل مما يقلل كمية الأنسولين المعطاة بالجرعة العلاجية

مبدأ تقانة التطفير الموجه للموقع site-directed mutagenesis

تقانة التطفير الموجه للموقع يتم من خلالها استبدال كودون مرمِز لحمض أميني معين بكودون مرمِز لحمض أميني آخر وتتم غالباً من خلال استبدال نيكليوتيد واحد في الشيفرة الثلاثية (الكودون) في تسلسل الموروثة المستهدفة cDNA مما يؤدي إلى تغير الحمض الأميني الموافق والحصول على أنسولين يحمل صفات جديدة



site-directed mutagenesis

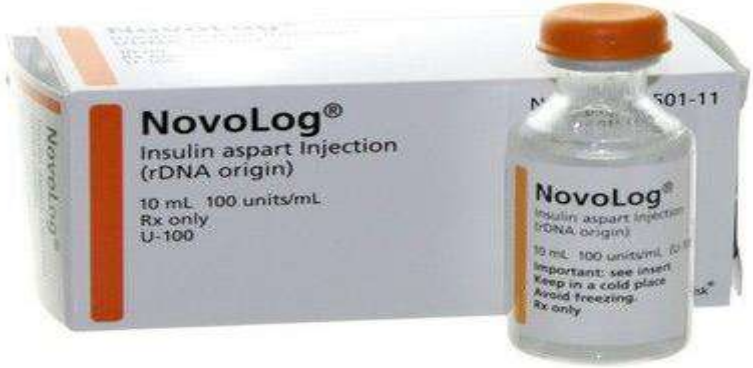
- **الانسولين ليسبرو - Insulin lispro الاسم التجاري Humalog**

أنسولين سريع الفعل و هوالشكل الأول من الأنسولين المعدل الذي طُرح في الأسواق في أواخر التسعينات و تم إنتاجه في بكتريا E.coli و يحتوي نفس الحموض الأمينية الموجودة في الأنسولين البشري الطبيعي مع تبديل في ترتيب ثمالات الاحماض الأمينية في المواقع 28 و 29 في السلسلة B حيث تم استبدال البرولين←الليزين و الليزين←البرولين ، إن وجود ثمالة البرولين في الموقع B28 في الانسولين البشري غير المعدل يؤدي إلى تشكيل وحدات مثنوية من البروتين عند التخزين بتراكيز الجرعة العلاجية، ويؤدي عكس موقعي الحمضين الأمينيين البرولين والليزين في الأنسولين lispro إلى خفض الميل لتشكيل وحدات مثنوية لأن تغير مواقع الحموض الأمينية يعطل القدرة على تشكل روابط كارهة للماء

ضرورية للارتباط الذاتي و تكون قدرة الأنسولين lispro على الديمرة أقل بـ 300 مرة من قدرة الأنسولين البشري غير المعدل ، يبدأ عمل الأنسولين lispro بعد 15 دقيقة تقريباً من حقنه ويصل تركيزه إلى أعلى مستوى في الدم بعد حوالي 30-90 دقيقة من الحقن مقارنةً بالأنسولين البشري المأشوب غير المعدل الذي يصل تركيزه إلى أعلى مستوى في الدم بعد حوالي 50-120 دقيقة من الحقن ويستمر مفعول الأنسولين lispro لمدة ساعتين إلى أربع ساعات مما يجعل من الممكن حقنه مع موعد تناول وجبة الطعام، تم تطوير المنتج وتسويقه بواسطة شركة Eli Lilly

- **الانسولين Insulin aspart - aspart الإسم التجاري Novolog**

أنسولين سريع الفعل تم فيه استبدال ثمالة البرولين في الموقع B28 بثمالة الاسبارتيك aspartic مما يخفض من ميل الجزيئات الفردية للتكدس وأن تبدأ بدخول مجرى الدم فوراً عند حقنه، تم إنتاجه في الخميرة



- **الأنسولين Insulin glargine - glargine الاسم التجاري Lantus أو Optisulin**

انسولين بطيء الفعل مديد التأثير تم إنتاجه في في بكتريا E.coli يختلف عن الانسولين المأشوب غير المعدل باستبدال ثمالة الاسبارجين Aspargine في الموقع 21 من السلسلة A بثمالة الغلايسين Glycine و إضافة ثمالتين من الأرجنين Arginine في النهاية الكربوكسلية للسلسلة B، إن هذه التعديلات جعلت الأنسولين منحل في الأوساط الحامضية عند pH يساوي 5 تقريباً ومترسب عند اقتراب pH الوسط من القيمة 7 (في الأوساط المعتدلة)، يعطى هذا الأنسولين بشكل منحل في وسط حامضي ويحقن في النسيج تحت الجلد حيث الوسط معتدل مما يؤدي إلى ترسبه ومن ثم يعاد انحلاله في مكانه

ببطء شديد مما يؤدي إلى زيادة مدة تحرره في مجرى الدم بشكل كبير ، **هذا يجعل حقنة يومية واحدة كافية للمحافظة على مستوى أساسي ثابت من الأنسولين في الدم وقريب من المستوى الطبيعي بمعنى حقنة كل 24 ساعة**

- **الأنسولين Insulin determir - determir الاسم التجاري levemir**

أنسولين بطيء الفعل مديد التأثير يختلف levemir عن الأنسولين الطبيعي بخلوه من ثمالة التريونين في الموقع 30 من السلسلة B واحتواءه على حمض دسم مؤلف من 14 ذرة كربون يرتبط مع ثمالة الليزين في الموقع 29 من السلسلة B برابطة مشتركة لسلسلة الجانبية لثمالة B29 يسمح هذا الشكل المعدل للأنسولين بالارتباط العكوس إلى الألبومين في المصل وفي مكان حقنه (لاحتواء الألبومين على 3 مواقع ربط للحموض الدسمة)، مما يؤمن تحرر مستمر وثابت للأنسولين على مدى 24 ساعة وبالتالي فعل ثابت طويل الأمد حتى 24 ساعة، مما **يعني الاكتفاء بجرعة يومية واحدة فقط**

يوضح الجدول أنواع الأنسولين البشري المأشوب والانسولين البشري المأشوب المهندَس مع الإنتباه إلى المصانع الحيوية المُسخدمة لإنتاج الأنسولين المأشوب والمأشوب المهندَس

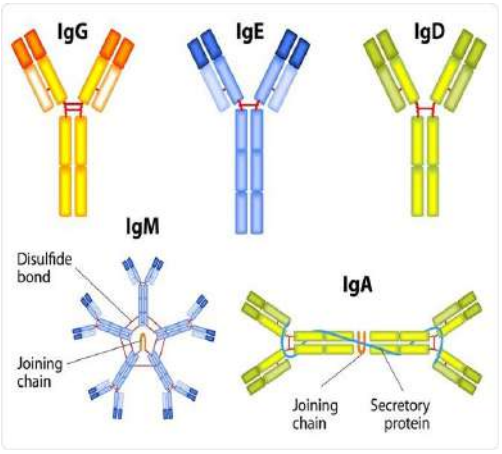
Product	Description	Structure	Company	Approved
Recombinant products of native human insulin sequence				
Humulin	Recombinant human insulin produced in *E. coli*	Identical to native human insulin	Eli Lilly	1982 (USA)
Novolin	Recombinant human insulin produced in *S. cerevisiae*	Identical to native human insulin	Novo Nordisk	1991 (USA)
Engineered insulins				
Humalog (Insulin lispro)	Recombinant short-acting human insulin analogue produced in *E. coli*	Engineered: inversion of native B28–B29 proline–lysine sequence	Eli Lilly	1996 (USA and EU)
Novolog (Insulin Aspart)	Recombinant short-acting human insulin analogue produced in *S. cerevisiae*	Engineered: B28 proline replaced by aspartic acid	Novo Nordisk	2001 (USA)
Levemir (Insulin detemir)	Recombinant long-acting human insulin analogue produced in *S. cerevisiae*	Engineered: devoid of B30 threonine and a C14 fatty acid is covalently attached to B29 lysine	Novo Nordisk	2004 (EU)
Lantus (Insulin glargine; optisulin)	Recombinant long-acting human insulin analogue produced in *E. coli*	Engineered: A 21 asparagine replaced by glycine and B chain elongated by two arginines	Aventis pharmaceuticals	2000 (USA and EU)

انتهت المحاضرة السابعة

المحاضرة الثامنة
مقدمة عن الجهاز المناعي

الأضداد (الأجسام المضادة) Antibodies

هي عبارة عن بروتينات سكرية دفاعية نوعية تجول في دم ولمف الكائنات الحية الفقارية تُفرَز بشكل طبيعي من قبل الخلايا اللمفاوية البائية B-Lymphocytes عند تعرض الجسم للممرضات والاجسام الغريبة (المستضدات) كما توجد على سطح هذه الخلايا، ترتبط الأضداد بنوعية مع المستضدات وترسبها على شكل معقد مناعي بهدف تحييدها والتخلص منها ، يمكن انتاج الأضداد أيضا عن طريق تحفيز الجهاز المناعي للكائن الحي بحقنه بمركبات مرتفعة الوزن الجزيئي ومحتوية على epitope (والذي يمثل احد اجزاء العامل الممرض) ، تشكل الأضداد الغلوبولينات المناعية Ig (Immunoglobulins) وهي مجموعة ضئيلة من مجموع بروتينات مصل الدم ويتراوح تركيزها في المصل بين 8 -15 100ml /mg تُصنَف الأضداد عند الإنسان في خمسة أنواع (IgD, IgE, IgA, IgM, IgG ويتراوح الوزن الجزيئي لها بين (150 kDa – 900 kDa) وهي تؤدي أدوار مختلفة في الدفاع المناعي ويعد IgG الضد المسيطر في مصل الدم .



	# of Y units	Antigen binding sites	Molecular weight (Daltons)
IgG	1 (monomer)	2	150,000
IgM	5 (pentamer)	10	900,000
IgA	1 or 2 (mono or dimer)	2 or 4	170,000-375,000
IgE	1 (monomer)	2	200,000
IgD	1 (monomer)	2	180,000

Click anywhere to continue

المستضدات antigenes

تدعى أيضاً المستمنعات Immunogenes_وهي كل مادة غريبة إذا دخلت جسم الكائن الحي أو حُقنت به أدت إلى توليد أضداد نوعية (تثير الإستجابة المناعية) ويرتبط كل ضد بمستضد معين بشكل نوعي وألفة عالية عن طريق تفاعل مشابه للتطابق بين القِفل والمفتاح للقضاء على المستضد بهدف التخلص منه وحماية الجسم، قد تكون المستضدات عوامل ممرضة دخلت إلى الجسم مثل (فيروسات ، جراثيم ، طفيليات، فطور،...) أو بروتينات غريبة يزيد وزنها الجزيئي عن 10.000 دالتون أو سكريات معقدة أو بروتينات لبيدية

تتصف المستضدات بمايلي:

- القدرة على توليد المناعة immunogenicity

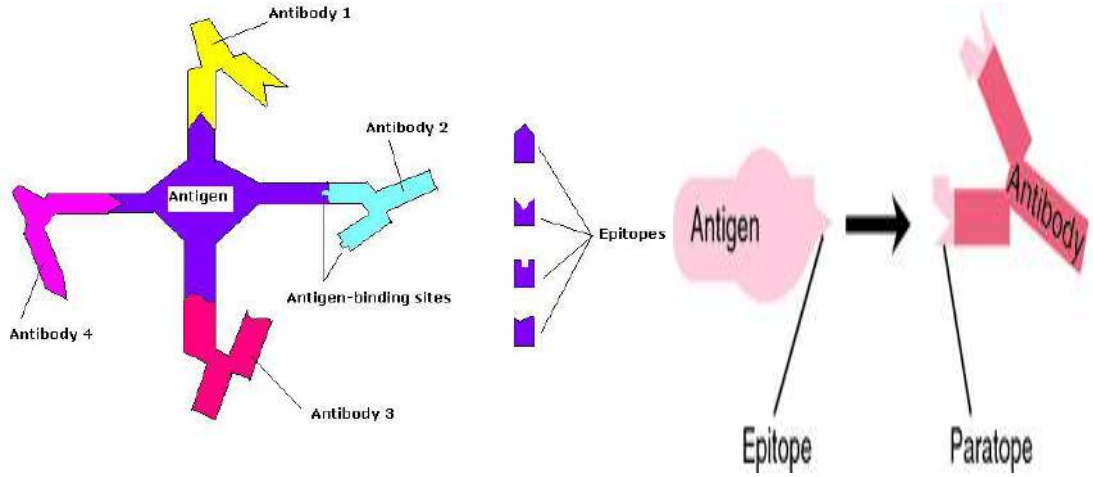
أي القدرة على تنبيه الجهاز المناعي لإحداث استجابة مناعية

- القدرة المستضدية antigenicity

أي القدرة على التفاعل نوعياً مع نواتج الاستجابة المناعية والمتمثلة بالأضداد

الموقع المستضدي epitope

ويدعى أيضاً المعينة المستضدية Antigenic determinant وهو كل جزء من المستضد يتم تمييزه من قبل المستقبلات المناعية الموجودة على سطوح اللمفاويات (يثير الاستجابة المناعية) وعادةً لا يرتبط الضد بكامل المستضد بل بأجزاء صغيرة محددة منه تدعى epitope تتكون من سلسلة من 5-10 أحماض أمينية أو جزيئات سكرية موجودة في موقع سطحي للمستضد ويوجد أكثر من epitope في المستضد الواحد يرتبط مع أضداد مختلفة كما هو موضح في الشكل التالي



Antigens contain antigenic determinants **(epitopes)**
Antibodies contain antibody combining sites **(paratopes)**

بنية الأضداد Antibodies structure

يوجد للأضداد أنواع مختلفة وهي تأخذ شكل حرف Y يتألف الضد IgG من أربعة سلاسل ببتيدية وتُصَنف هذه السلاسل إلى:

- سلسلتين خفيفتين متماثلتين تدعى L(Light chains)
- سلسلتين ثقيلتين متماثلتين تدعى H (Heavy chains)

ترتبط السلاسل الخفيفة بالسلاسل الثقيلة بواسطة جسور كبريتية وترتبط السلسلتان الثقيلتان ببعضهما البعض في منطقة تدعى المفصلة أو العنق hinge region ، وبحسب تسلسل الأحماض الامينية في السلاسل الثقيلة و الخفيفة قسمت كل سلسلة إلى منطقتين:

- منطقة متغيرة Variable region

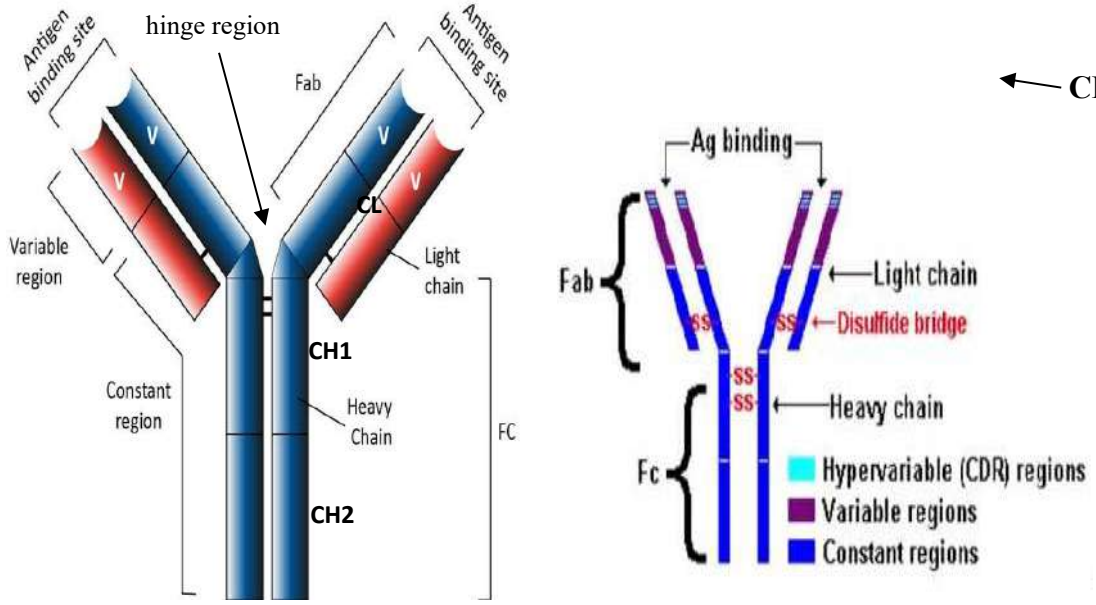
تقع في الطرف الأميني للسلسلة الببتيدية N-terminal و تتألف من حوالي 110 أحماض أمينية يختلف تسلسلها بدرجة هائلة بين الأضداد ويتم ارتباط الضد مع المستضد في مستوى المناطق المتغيرة وتحديداً في جزء منها يدعى مناطق محددة التتامية CDR (Complementarity determining region) و يتكون كل CDR من حوالي 20 حمضاً أمينياً

- منطقة ثابتة Constant region

تقع في الطرف الكربوكسيلي للسلسلة الببتيدية C-terminal ويكون فيها تسلسل الأحماض الامينية تقريباً ثابت بين الأضداد وهذه المنطقة هي التي تحدد ماهي المهام الأخرى (غير الإرتباط بالمستضد) التي يستطيع هذا الضد أن يقوم بها مثل القدرة على تنشيط الجهاز المتمم، أو زيادة قدرة الخلايا البالعة على ابتلاع الأجسام الغريبة وغيرها من الوظائف الأخرى للضد

الشدفة Fab (**f**ragment **a**ntigen **b**inding) أو شدفة ربط المستضد : هي الموقع الذي يرتبط به الضد بالمستضد ويتكون من منطقتين منطقة متغيرة ومنطقة ثابتة

الشدفة Fc (fragment crystallizable) أو الشدفة المتبلورة : هي الموقع الذي يرتبط به الضد بالمستقبلات الموجودة على سطح الخليّة أو بالبروتينات في الجهاز المتمم
ملاحظة: تضم كل سلسلة من السلسلتين الثقيلتين ثلاثة مناطق ثابتة (CH1،CH2، CH3) ومنطقة واحدة متغيرة (VH) ، بينما تضم كل سلسلة من السلسلتين الخفيفتين منطقة ثابتة واحدة CL ومنطقة متغيرة واحدة VL ، ترتبط المجموعة السكرية مع السلسلة الثقيلة (عادةً في المنطقة CH2) برابطة غليكوزيدية



IMMUNOGLOBULIN MOLECULE STRUCTURE - IgG

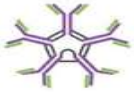
أنواع الأضداد Types of antibodies

طبقاً لتسلسل الأحماض الأمينية في المنطقة الثابتة للسلسلة الثقيلة وعدد القسيمات وبكون الأضداد مفرَزة أو مرتبطة بسطح اللمفاويات قسمت الأضداد إلى خمسة أنواع هي: IgD, IgE, IgA, IgM, IgG
ويمثل **الضد IgG** أكثر الأنواع انتشاراً في مصل الدم حيث تقارب كميته 80% من مجموع الأضداد ويكون بشكل جزئ أحادي (monomer) نوع السلسلة الثقيلة غاما (γ) ويوجد منه اربعة أنماط هي IgG4، IgG3، IgG2،IgG1 تختلف عن بعضها بطول المفصلة وعدد الجسور الكبريتية ،تنتج الأضداد IgG بشكل أساسي من الخلايا البلاسمية الناتجة من تنشيط خلايا الذاكرة البائية وتلعب دور أساسي في حماية الجسم فهي تقوم بعدة وظائف مثل :

- ✓ الإرتباط بالسموم ومعادلتها وإبطال مفعولها
- ✓ الإرتباط بالجراثيم أو الفيروسات ومنعهم من الإلتصاق أو دخول خلايا الجسم
- ✓ عبور خلايا المشيمة وإعطاء الجنين حماية ضد الجراثيم
- ✓ زيادة قدرة الخلايا البالعة على ابتلاع الجراثيم ومساعدة الخلايا القاتلة الطبيعية على قتل الخلايا المصابة

الضد IgA يأتي في المرتبة الثانية من حيث كميته في مصل الدم والتي تقارب 13% من مجموع الأضداد نوع السلسلة الثقيلة ألفا (α) يوجد في مصل الدم و في إفرازات الجسم مثل الدموع ،العرق ، إفرازات القنوات الهضمية والتناسلية والتنفسية كما يوجد في حليب الأم مما يوفر للطفل مناعة ضدد العديد من الأمراض أثناء مراحل تطوره الأولى ، يكون بشكل جزئ مفرد monomer في مصل الدم وبشكل dimer في إفرازات الجسم ، أما **الضد IgM** يكون بشكل pentamer (خمس جزيئات مفردة مرتبطة

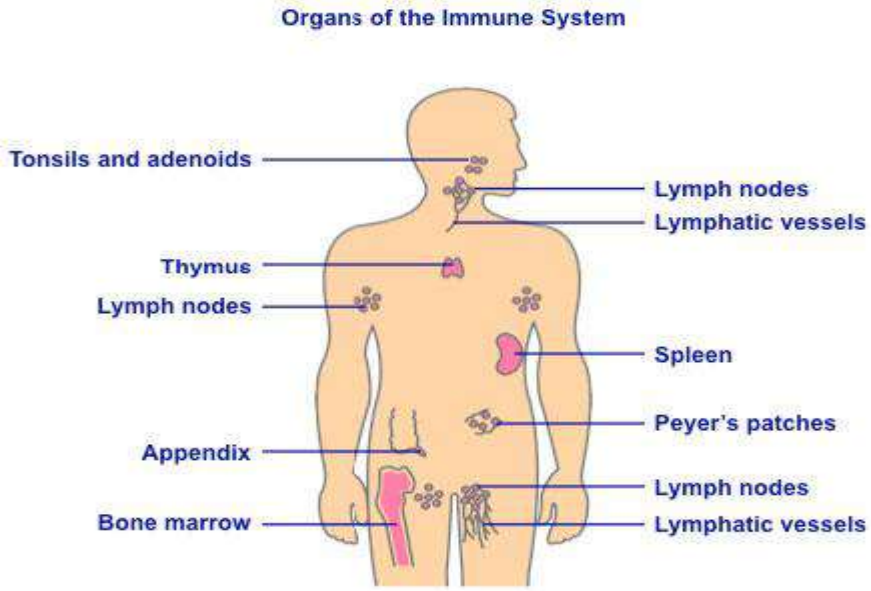
مع بعضها) وهو أضخم الأضداد حجماً ، نوع السلسلة الثقيلة ميو (μ) يوجد بشكل رئيسي في مصل الدم ويأتي في المرتبة الثالثة من حيث كميته 6% من مجموع الأضداد، **الضد IgE** نوع السلسلة الثقيلة إبسيلون (ε) وهو أقل الأضداد في الدم 0.002% ، **الضد IgD** نوع السلسلة الثقيلة دلتا (ς) يشكل ما يقارب 0.1% من الأضداد في مصل الدم ولكن يوجد بتركيز كبير على سطح اللمفاويات البائية



	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
Heavy Chain	μ (mu)	γ (gamma)	α (alpha)	ε (epsilon)	δ (delta)
MW (Da)	900k	150k	385k	200k	180k
% of total antibody in serum	6%	80%	13%	0.002%	1%
Function	Primary response, fixes complement. Monomer serves as B-cell receptor	Main blood antibody, neutralizes toxins, opsonization	Secreted into mucus, tears, saliva	Antibody of allergy and anti-parasitic activity	B cell Receptor

الجهاز المناعي immune system

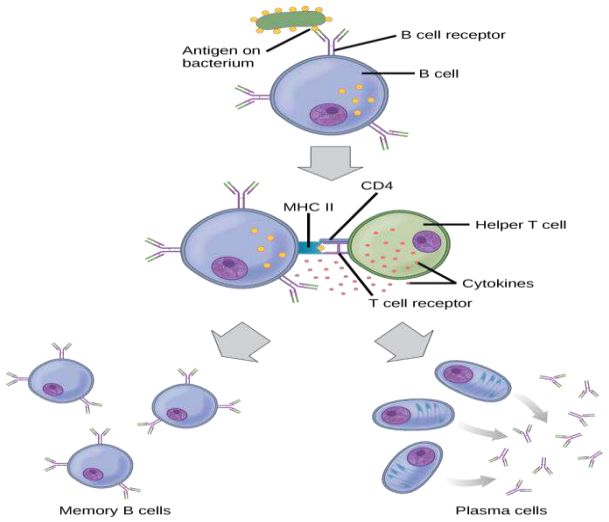
يحمي الجهاز المناعي الجسم من الإصابة بالأمراض ويدافع عنه ضد كل هو غريب مثل الفيروسات والجراثيم والفطور والطفيليات وغيرها حيث يقوم بتمييز العوامل الغازية الممرضة ومهاجمتها والقضاء عليها ومعادلة السموم التي تفرزها كما يقوم بالتخلص من الخلايا الهرمة أو الميتة وتدمير الخلايا الورمية وبالتالي يستطيع الجهاز المناعي أن يميز فيما إذا كانت خلية ما أو مادة معينة تعود إلى الجسم (الذات self) أو لا تعود إلى الجسم (اللاذات nonself) ليقوم بالتخلص من اللاذات ، يتألف الجهاز المناعي من أعضاء وخلايا وآليات متخصصة ويشكل نقي العظم والتايموس الأعضاء اللمفاوية المركزية أما الأعضاء اللمفاوية المحيطية تضم الطحال والعقد اللمفاوية ويعد الطحال مرشحاً مناعياً لتصفية الدم حيث يقوم بحجر المستضدات من الدم للتخلص منها أما العقد اللمفاوية فهي توجد جميع أنحاء الجسم و هي بمثابة محطات تصفية مناعية لسوائل الجسم المعروفة باسم اللمف حيث تقوم العقد بحجر المستضدات من اللمف فيها قبل عودته إلى الدورة الدموية

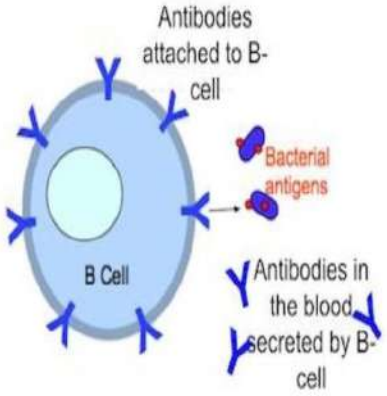


يتم اشتقاق كل خلايا الجهاز المناعي في البداية من نقي العظام Bon marrow من خلال عملية تسمى تكون الدم وخلال هذه العملية تعطي الخلية الجذعية متعددة القدرات (الخلية الجذعية قادرة على التمايز إلى أي نمط خلوي) أرومة نقوية وأرومة لمفية ،تعطي الأرومة النقوية في النهاية كريات دم حمراء وصفيحات دموية و كريات الدم البيضاء (العدلات ، الحامضات، الأسسات، الوحيدات) أما الأرومة اللمفية فتعطي في النهاية لمفاويات بائية ولمفاويات تائية ، يتم نمو ونضج (تمايز) اللمفاويات البائية في نقي العظم لتهاجر بعد ذلك نحو الدم والطحال والعقد اللمفاوية واللوزتين ، أما اللمفاويات التائية يتم نموها في نقي العظم لتهاجر بعد ذلك إلى الغدة الصعترية (التايموس Thymus) كي تنضج ثم يتم طرحها في مجرى الدم ، أثناء عملية النضج تتعلم اللمفاويات كيف تتعرف على الخلايا التي تنتمي للجسم ذاته (الذات) حتى لا تدمرها بعنى أنها تتعلم كيف تقرأ بروتين معقد التوافق النسيجي الكبير للخلية قبل أن تحاربها كما تتعلم كيف تتعرف على الجسم الغريب (اللاذات) حيث تتعلم اللمفاويات البائية كيف تقرأ المستضد على سطح الجسم الغريب أما اللمفاويات التائية تتعلم كيف تقرأ المستضد على الخلايا المصابة والخلايا السرطانية وخلايا الأنسجة المزروعة

خلايا الجهاز المناعي وتتضمن :

- اللمفاويات البائية أو الخلايا البائية B-cell تشكل مايقاب 10-15% من الخلايا اللمفاوية في الدم دعيت كذلك لتمايزها في نقي العظم **B**on marrow تتميز بوجود مستقبلات (أضداد) على سطحها تدعى BCR (B cell receptor) تتعرف من خلالها على المستضدات لتتمايز إلى خلايا بلاسمية منتجة للأضداد وإلى خلايا ذاكرة



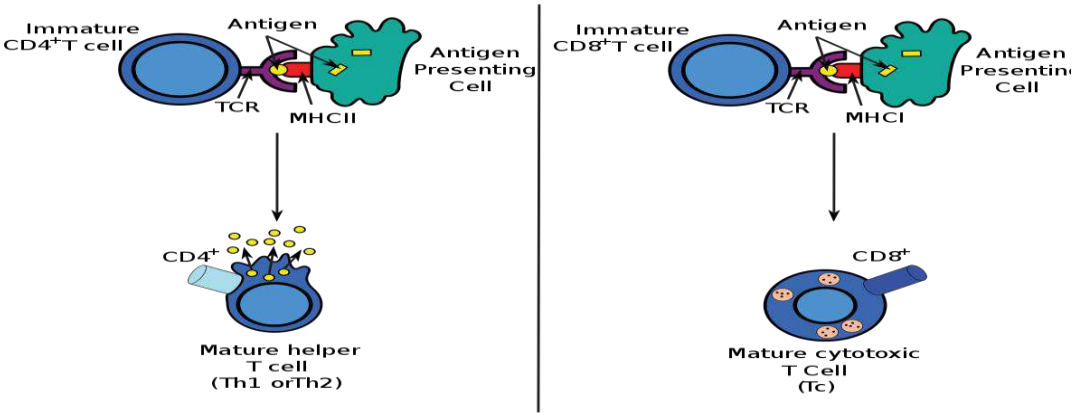


- اللمفاويات التائية أو الخلايا التائية T-cell دعيت كذلك لتمايزها في التايموس **T**hymus تتميز بوجود مستقبلات على سطحها تدعى TCR (T cell receptor) وتنقسم إلى ثلاثة مجموعات رئيسية:

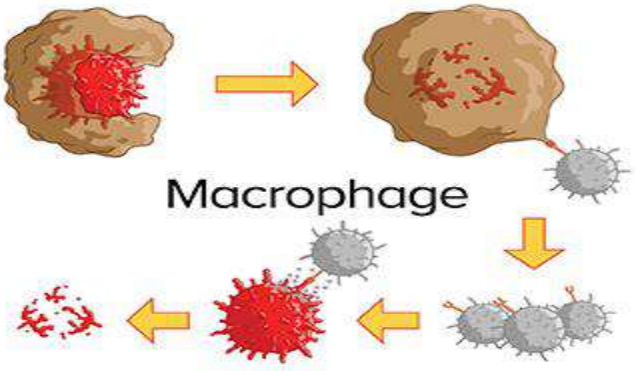
- الخلايا التائية المساعدة Helper T Cells: تدعى أيضاً $CD4^+$ T cells تقوم بتحفيز الاستجابات المناعية من خلال إفراز مواد بروتينية تعرف بمحفزات الخلايا مثل الإنترلوكين والإنترفيرون التي تساعد على انقسام ونمو وتكاثر الخلايا المناعية وتنشيطها للمشاركة في عملية الدفاع عن الجسم.
- الخلايا التائية القاتلة أوالسامة Cytoxic T cells - Killer T Cells : تدعى أيضاً T^+ cells CD8 وهي تقوم بقتل الخلايا السرطانية مباشرة والخلايا المصابة بالفيروسات وخلايا الأنسجة المزروعة

- الخلايا التائية الكابحة أو المثبطة Suppressor T Cells: تنظم هذه الخلايا الإستجابة المناعية عن طريق كبح نشاط الخلايا القاتلة والخلايا المساعدة بعد انتهاء المعركة مع الأجسام الغريبة وذلك بإفراز عدد من المواد المثبطة التي تؤثر عليها وتحولها من الحالة الفعالة أو النشطة إلى الحالة الطبيعية الخامة

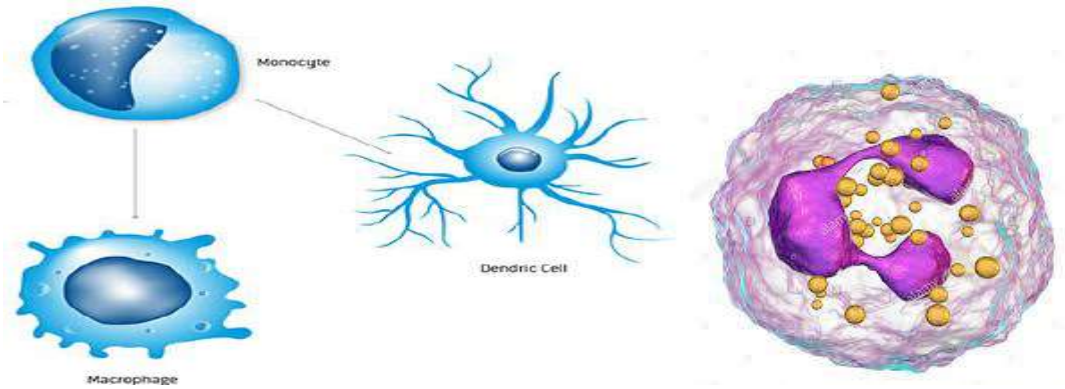
معلومة: السيتوكينات cytokines: عبارة عن بروتينات إشارة تطلقها الخلايا المناعية لتتواصل فيما بينها ولتحفيز اطلاق استجابة مناعية مناسبة، كما تعمل بعض السيتوكينات كعوامل نمو تتوسط لنمو وتمايز الخلايا المناعية وتشمل السيتوكينات كل من الانترفيرونات والانترلوكينات



- الخلايا القاتلة الطبيعية NK (Natural Killer Cells) هي لمفاويات كبيرة تفتقر لمستقبلات الخلايا اللمفاوية تلعب دور محوري في التخلص من خلايا الأورام مثل melanoma، و lymphoma والخلايا المصابة بالفيروسات ، وتميل خلايا الأورام وبعض الفيروسات إلى تثبيط عرض معقدات التوافق النسيجي MHC I حتى تتخفى عن الخلايا التائية القاتلة والتي لا تتعرف على المستضدات مالم تكن مرتبطة بمعقد التوافق النسيجي الكبير MHC وهنا يأتي دور الخلايا القاتلة الطبيعية في التخلص من أي خلية سرطانية أو موبوءة تهرب من قبضة الخلايا التائية القاتلة
- البالعات الكبيرة Macgrophages تمثل الخلايا وحيدات النوى مايقارب 10% من كريات الدم البيضاء الموجودة في الدم ويكون وجودها في الدم مؤقتاً حيث تغادر إلى الأنسجة وتتمايز إلى بالعات كبيرة تقوم ببلعمة الجراثيم ، بلعمة حطام خلايا الجسم الميتة ، كما تقوم البالعات الكبيرة بعد بلعمة المستضد بعرض الموقع المستضدي epitopes على أسطحها مرتبط بمعقد التوافق النسيجي الكبير كي تتعرف عليه اللمفاويات التائية المساعدة

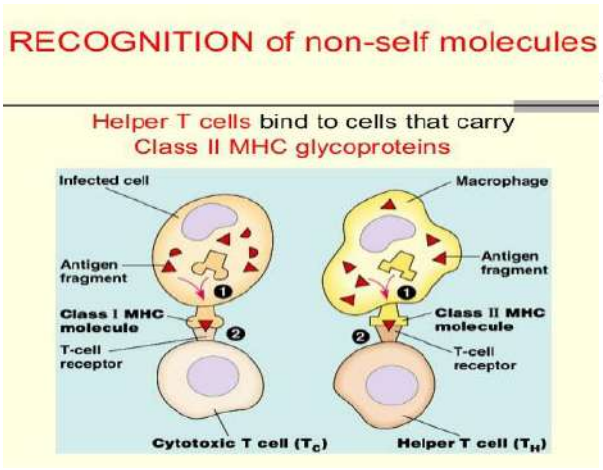


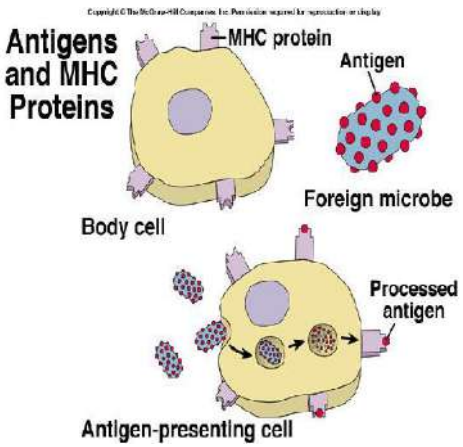
- الخلايا العدلة (العدلات) Neutrophil تشكل القسم الأكبر من كريات الدم البيضاء وهي أول الخلايا التي تستجيب عند حدوث التهاب حيث تصل بسرعة إلى منطقة الإصابة ويعد ارتفاع معدل العدلات في الدم أهم علامة على وجود التهاب حاد في الجسم
- الخلايا المتغصنة dendritic cells تدعى أيضاً بخلايا مقدمة للمستضد APC (Antigen presenting cell) وهي تقوم بعرض أجزاء المستضد على سطحها عن طريق ربطها بمستقبل يدعى معقد التوافق النسيجي الكبير MHC-11



معقد التوافق النسيجي الكبيرMHC (Major histocompatibility complex) يسمح بتمييز ماهو ذاتي وماهو غريب (اللاذات) وهو مجموعة منوعة من البروتينات الخلوية الغشائية يوجد منه نوعان 1 MHC-تنتجه جميع خلايا الجسم المنواة ماعدا كريات الدم الحمراء و MHC-11 تنتجه الخلايا مقدمة للمستضد

النظام المتمم Complement System يدعى أيضاً جملة المتممة وهو أحد مكونات الجهاز المناعي الفطري يتألف من مجموعة من البروتينات (حوالي35 بروتين) توجد في مصل الدم وسوائل الجسم الاخرى ودعي بالمتمم لأنه يتمم ويكمل عمل مكونات أخرى من الجهاز المناعي مثل الاضداد



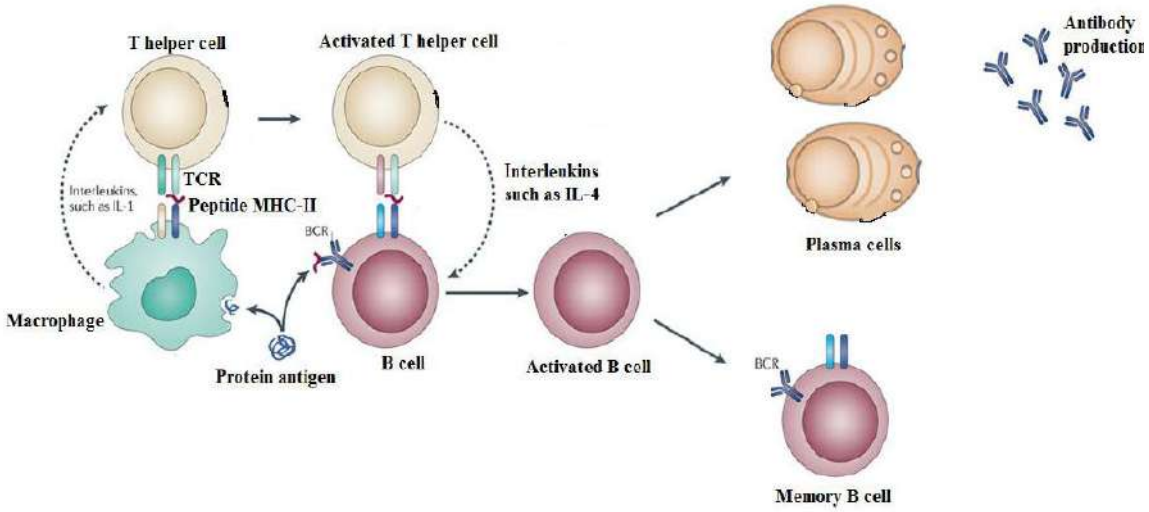


أنواع المناعة

- مناعة فطرية Innate immunity : هي المناعة العامة غير المختصة بنوع معين من الجراثيم وتوجد لدى كل الأشخاص ويبدأ عملها في مقاومة غزو الأجسام الغريبة والعوامل الممرضة منذ الولادة فهي تمد الجسم بدفاع سريع وفوري ضد أي جرثوم قد يدخل الجسم، من خصائص المناعة الطبيعية أنها لا تحتاج للتعرف الدقيق علي نوع الجسم الغريب (لا تتخصص خلاياها بمستضد معين) وليس لها ذاكرة مناعية ولا تتحسن استجابتها مع تكرار الإصابة ، وتلعب دورا هاما في تحفيز وتنشيط المناعة المكتسبة

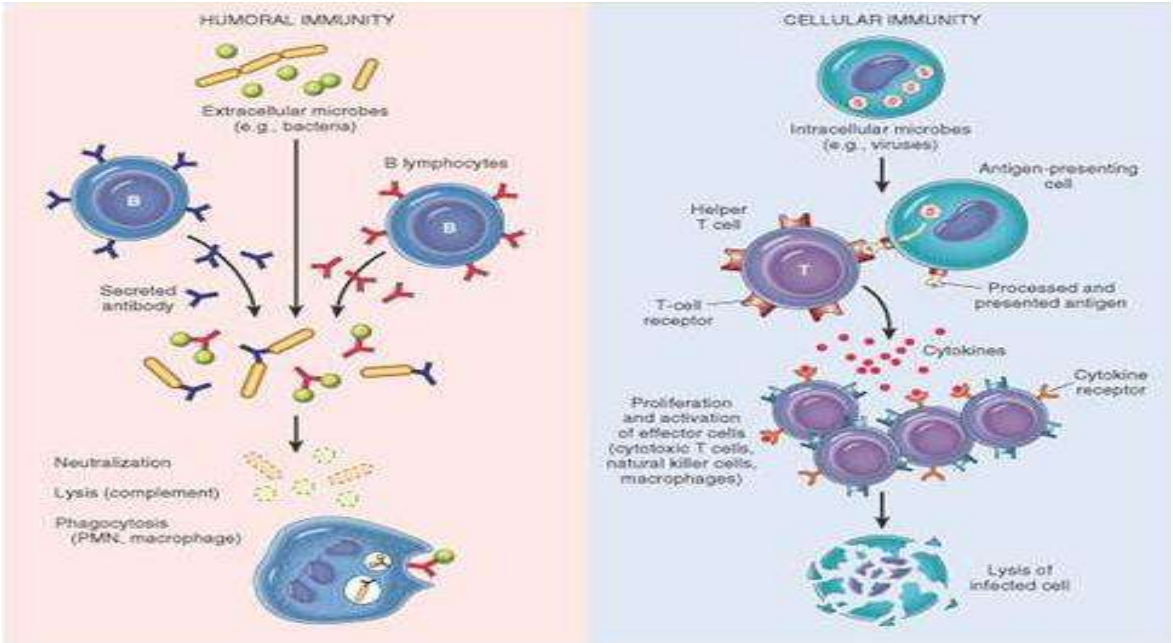
- مناعة مكتسبة Adaptive immunity: وهي المناعة التي يكتسبها الجسم تجاه نوع معين من المستضدات (ممرضات محددة) من خلال تشكيل أضداد نوعية في الجسم تتحد مع المستضدات الداخلة إليه وتبطل عملها وتتميز بانها نوعية وتتطور الإستجابة فيها مع تكرار الإصابة ولها ذاكرة مناعية ، تقوم المناعة المكتسبة بشكل أساسي على الخلايا اللمفاوية وبمشاركة البالعات الكبيرة والخلايا المتغصنة يوجد شكلان للإستجابة المناعية المكتسبة هما الخلطية والخلوية
- الإستجابة المناعية الخلطية Humoral immunity

تتم بإنتاج الغلوبولينات المناعية أو الأضداد نتيجة لدخول أجسام غريبة أخلاط الجسم (دم + لمف) ويتم إنتاج الأضداد من قبل اللمفاويات البائية ويشارك في المناعة الخلطية البالعات الكبيرة والخلايا المتغصنة والخلايا التائية المساعدة كما هو موضح في الشكل التالي



- الإستجابة خلوية الوساطة Cell mediated immunity

تقوم بها الخلايا البالعة و الخلايا القاتلة الطبيعية و الخلايا التائية السامة التي تدمر الخلايا السرطانية و الخلايا المخموجة بعامل ممرض وخلايا الأنسجة المزروعة



المحاضرة التاسعة

الأدوية الحيوية biopharmaceuticals (ll)

الأضداد وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies

أهمية الاضداد

تم استخدام الأضداد منذ وقت طويل في علاج الأمراض المعدية والسموم بالتمنيع المنفعل (passive immunity) وذلك عن طريق حقن الفرد بأمصال ممنّعة تحوي أضداد نوعية جاهزة تم الحصول عليها من كائن حي آخر مثل مثل أمصال الكزاز و الدفتريا والأمصال تجاه سموم الأفاعي والعقارب والعناكب وغيرها، على سبيل المثال قبل قيام الأشخاص برحلة إلى منطقة يكثر فيها نوع معين من الأفاعي وبهدف الوقاية من التعرض للدغات السامة يمكن حقن هؤلاء الأشخاص بجرعة من الأضداد وحيدة النسيلة الموجهة ضد سم هذه النوع من الأفاعي والتي تقوم في حال اللدغ بالارتباط بجزيئات السم وإبطال مفعوله عن طريق ترسيبه على شكل معقدات مناعية قبل أن يؤثر على الجسم بشكل سلبي ، من جهة أخرى يمكن حقن الأضداد المضادة للسم بعد لدغة الافعى مباشرةً بهدف المعالجة.

في الوقت الحالي أصبحت الأضداد أدوات تحليلية مهمة يتم استخدامها على نطاق واسع في مجال البيولوجيا الجزيئية والخلوية كما يتم استخدامها بشكل رئيسي كأدوية حيوية لتشخيص وعلاج الأمراض البشرية وفي المجال الصناعي يتم استخدامها في تنقية بعض البروتينات المأشوبة (تفاعل ضد - مستضد) بطريقة الكروماتوغرافيا المناعية

من الناحية العملية يتم تحضير نوعين من الأضداد:

- الأضداد وحيدة النسيلة Monoclonal Antibodies
- الأضداد متعددة النسائل Polyclonal Antibodies

أولاً الأضداد وحيدة النسيلة Monoclonal Antibodies (mAbs) :

هي أضداد متماثلة من حيث البنية والوظيفة يتم إنتاجها من قبل نسيلة واحدة من الخلايا البائية البلاسمية لتهاجم هدف نوعي واحد (معينة مستضدية واحدة فقط) .

النسيلة Clone: هي مجموعة من الخلايا المتماثلة التي تنشأ من انقسام خلية واحدة (خلية أم) وتكون هذه الخلايا متماثلة ومماثلة للخلية الأم بالشكل والبنية والوظيفة

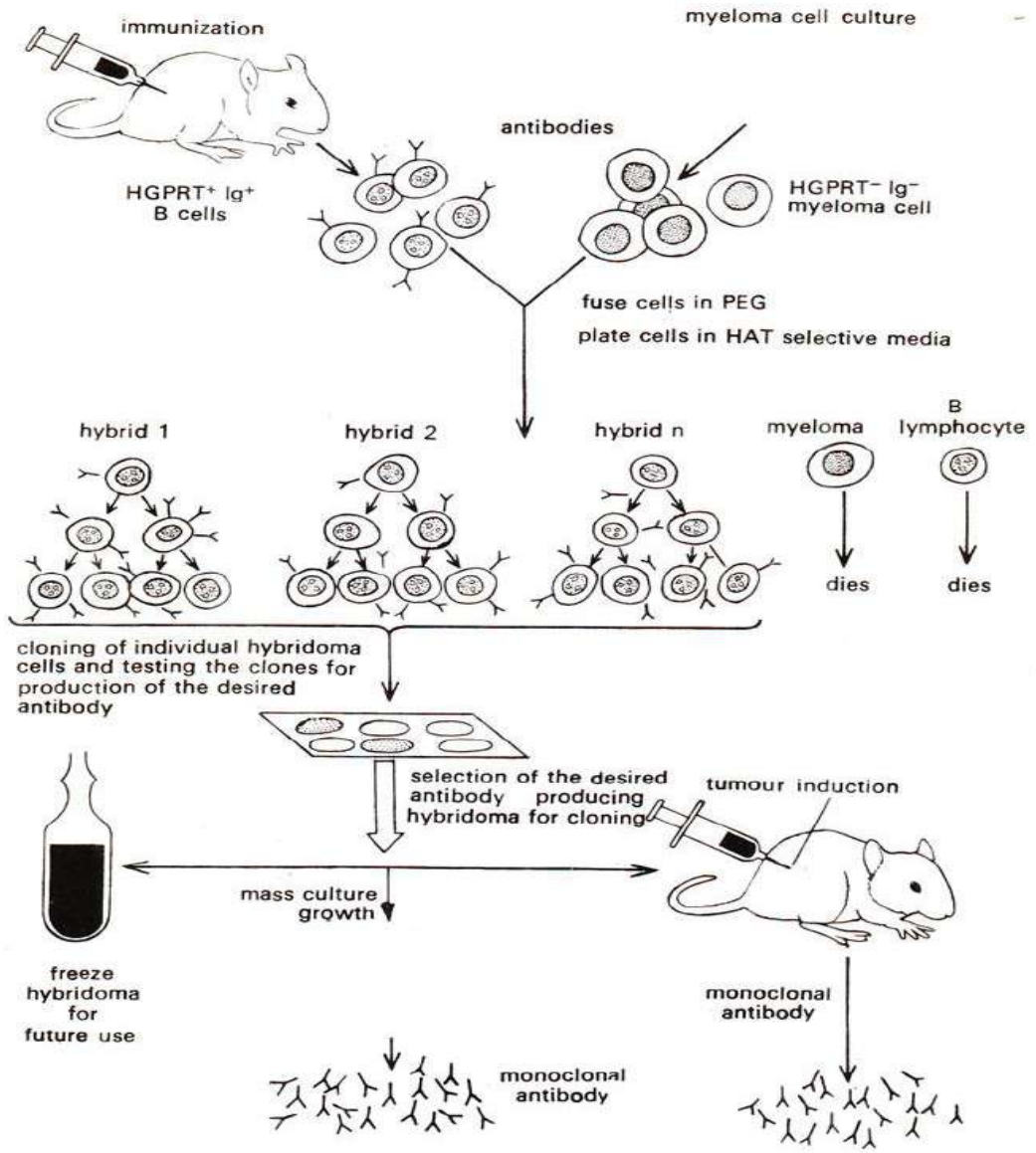
طرق إنتاج الأضداد وحيدة النسيلة

يتم إنتاج الأضداد بشكل طبيعي وتلقائي عند تعرض الجسم للعوامل الممرضة أو الأجسام الغريبة التي تحرض استجابة مناعية خلطية تؤدي إلى إنتاج الأضداد، كما يمكن إنتاجها في المختبر بكميات كبيرة وبشكل مستمر وفق عدة تقنيات مثل:

- **تقنية الخلايا الهجينة hybridoma cells technique**

عام 1975 ابتكر العالمان Kohler , Milstein تقنية إنتاج الأضداد وحيدة النسيلة وفي عام 1984 تشاركا جائزة نوبل في الطب والفيزيولوجيا لابتكارهما هذه التقنية (مختبر البيولوجيا الجزيئية لمجلس البحوث الطبية في كمبريدج – انكلترا)، تعتمد هذه الطريقة على حقن حيوان التجربة (عادةً الفأر وأحياناً الجرذ) بالمستضد المراد الحصول على أضداد تجاهه (مستضد واحد يتكون من معينة مستضدية واحدة) على مدى عدة أسابيع مما يحرض لاستجابة مناعية تتمثل بإنتاج أضداد نوعية واحدة موجهة تجاه هذه المعينة المستضدية ثم يتم قتل الفأر وعزل اللمفاويات البائية من الطحال (اللمفاوية البائية الواحدة تُنتِج نوع واحد من الأضداد) ، لكن المشكلة تكمن أن الخلايا المنتجة لهذه الأضداد لها عمر محدد أي تنقسم وتموت خلال زمن قصير نسبياً والحل يكون من خلال القيام بعملية دمج (In vitro) اللمفاويات البائية المعزولة مع خلايا بائية سرطانية هي خلايا الورم النقوي myeloma (الخلايا الورمية ليس لها عمر محدد أي لها صفة الخلود) على وسط استنبات يحوي مركب الغليكول عديد الإيتيلين PEG (polyethylene glycol) الذي يساعد على دمج الخلايا من خلال صهر الأغشية الخلوية **لنحصل على خلايا تدعى بالورم الهجين hybridoma** تتميز بصفتين : لها القدرة على إنتاج كميات كبيرة من ضد وحيد النسلة نوعي كما تتميز بصفة الخلود أي تتميز خلايا الورم الهجين بالقدرة على إنتاج الضد النوعي بشكل دائم ومستمر

بعد عملية الإندماج سيكون لدينا ثلاثة أنواع من الخلايا : خلايا بائية هجينة، خلايا بائية غير مندمجة ، خلايا ورمية غير مندمجة ، يتم انتقاء الخلايا البائية الهجينة عن طريق الإستنبات على وسط انتقائي يدعى HAT (**H**ypoxanthine **a**minopterine- **t**hymidine) لحوالي 10-14 يوم و الذي يسمح بنمو الخلايا البائية الهجينة فقط ، مسبقاً يتم انتقاء خلايا الورم النقوي (المطفرة) التي تفتقر لجين HGPRT التي ترمز أنزيم ضروري لاصطناع النيكليوتيدات وبالتالي تموت الخلايا الورمية عند استنباتها على الوسط الإنتقائي HAT بسبب أن العقار أمينوبترين يمنع السبيل الخلوي لتخليق النيكليوتيدات مما يجعل الخلايا تعتمد على سبيل آخر(سبيل الإنقاذ) لتخليق النيكليوتيدات يحتاج إلى إنزيم HGPRT والغائب في خلايا myeloma مما يؤدي إلى موتها ، كما تموت الخلايا البائية غير المندمجة لقصر مدة حياتها (تفتقر إلى خاصة الخلود المميزة للخلايا الورمية) وفي النهاية لا يبقى سوى الخلايا البائية الهجينة التي تنقسم وتصبح خالدة وتُنتج كميات كبيرة من الأضداد ، من المعروف أن كل نوع من الأضداد يتم إنتاجه من قبل خلية بائية بلاسمية خاصة لذلك يتم انتقاء الخلايا البائية الهجينة المرغوبة (النسيلة المرغوبة) بمفاعلتها مع مستضد موافق لها يميّزها عن النسائل الأخرى ثم يتم زراعتها على أوساط استنبات أكبر لإنتاج الأضداد أحادية النسيلة النوعية بكميات كبيرة، يمكن تجميد النسائل الأكثر إنتاجاً للأضداد النوعية تحت درجات حرارة منخفضة تجعلها محفوظة لعدة سنوات



يمكن تلخيص خطوات تقنية الخلايا الهجينة كما يلي:

- تمنيع الفأر
- عزل الخلايا البائية من الطحال
- زرع خلايا الورم النقوي
- دمج خلايا الورم النقوي مع الخلايا البائية
- فصل الخطوط الخلوية
- انتقاء الخط الخلوي المناسب
- المضاعفة في الزجاج أو في الكائن الحي
- الحصول على الضد وحيد النسيلة المرغوب

هل يوجد استمناعية للأضداد وحيدة النسيلة الفأرية ؟

إن الأضداد وحيدة النسيلة الفأرية تحمل خطر إثارة الإستجابة المناعية لدى استخدامها في العلاج أو التشخيص داخل جسم الإنسان، حيث أظهر 50-80 % من المرضى اللذين حقنوا بأضداد وحيدة النسيلة فأرية مايعرف باستجابة هاما HAMA أي توليد أضداد بشرية ضد الأضداد الفأرية Human anti-

mouse antibodies والتي تزيد كميتها في مصل المريض مع تكرار عملية الحقن ، تتميز استجابة هانا بانتفاح المفاصل وقصور كلوي مما يشكل خطر على حياة المريض بالإضافة إلى أن هذه الإستجابة تؤدي إلى مهاجمة وتخريب الأضداد وحيدة النسيلة الفأرية التي يتم إعطاؤها بعد ذلك ، ومن هنا كانت الحاجة لإنتاج أضدد وحيد النسيلة بشرية لتجنب استجابة هاما وتجنب التخريب المبكر للأضداد وحيدة النسيلة الفأرية من قبل الجهاز المناعي للمريض ولكن يوجد صعوبات كثيرة ومن أهمها:

- تمنيع الإنسان (حقن الإنسان بمستضد للحصول على الضد الموافق له) غير أخلاقي كما قد تؤثر بعض هذه المستضدات على صحته وتهدد حياته
- على الرغم من إمكانية الحصول على الخلايا البائية من الدم المحيطي إلا أن معظمها غير مُفعّل والحصول عليها من الطحال غير ممكن من الناحية العملية

لذلك كان الإتجاه نحو استخدام تقانات الهندسة الوراثية لإنتاج أضداد وحيدة النسيلة تحافظ على شكل ونوعية الضد الناتج تجاه المستضد المطلوب وتخفف من استمناعيتها إلى حد كبير وتم ذلك من خلال:

- **تقنية الـDNA المأشوب لإنتاج أضداد وحيدة النسيلة**

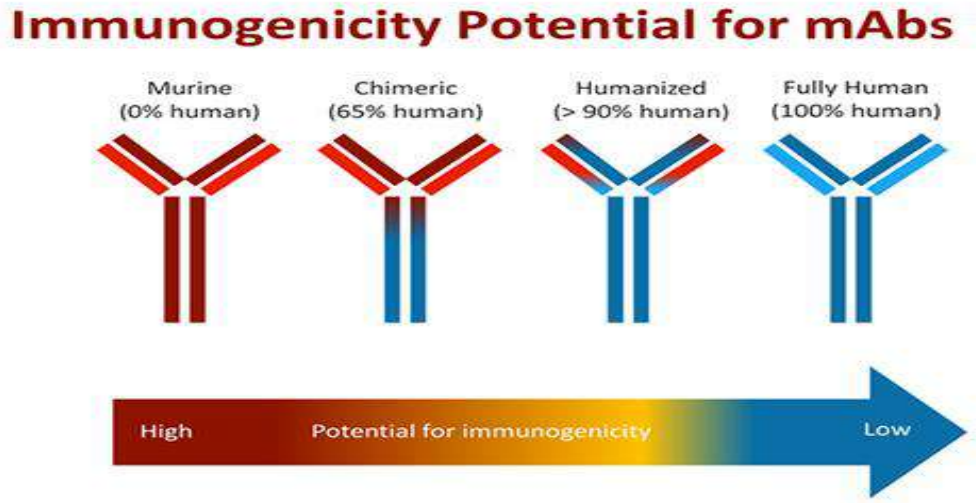
تم استخدام تقانة الـDNA المأشوب لإنتاج أضداد وحيدة النسيلة تتميز بالإستمناعية المنخفضة جداً عند الحقن في المريض وزيادة كبيرة في العمر النصفي لها ضمن المصل ، تم إنتاج شكلين من هذه الأضداد هما: الأضداد الخيمرية والأضداد المؤنسنة

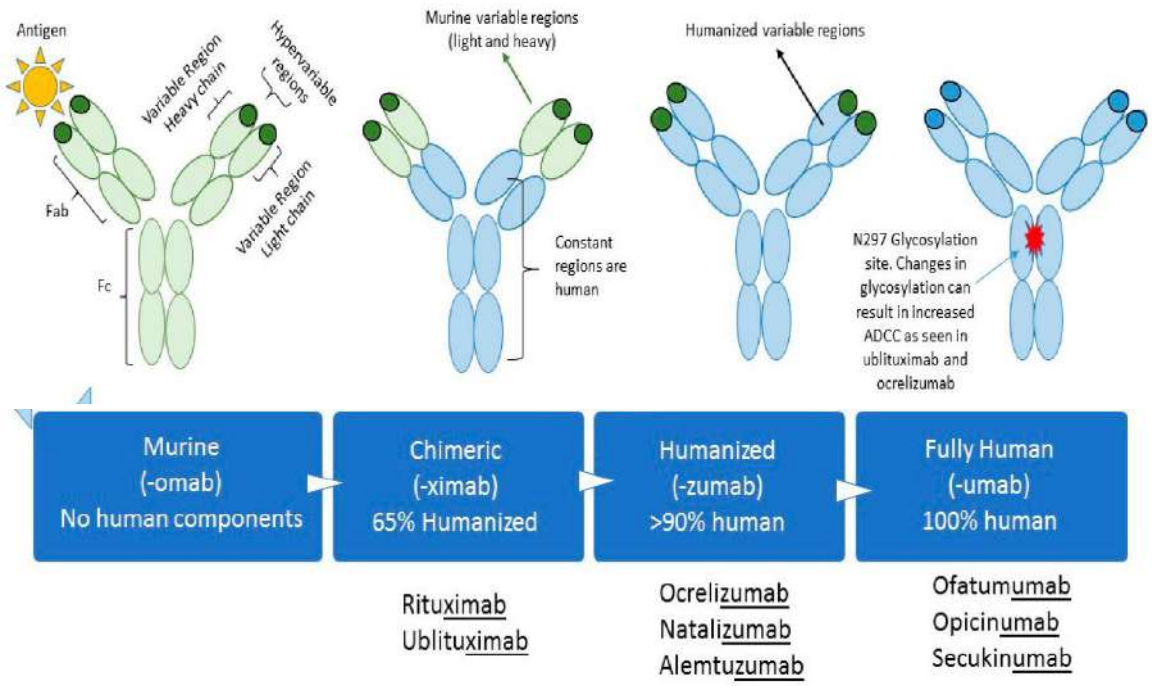
➢ الأضداد الخيمرية Chimeric antibodies:

تتميزبأن قرابة 60-70% من تسلسل الاحماض الأمينية فيها مشابه للأضداد البشرية، يتم إنتاجها بالجمع بين DNA فأري مرمَز لمناطق الإرتباط بالمستضد (المناطق المتغيرة من الضد الفأري) وDNA بشري مرمَز للمناطق الثابتة من الضد ويتم التعبير عن هذه الاضداد في خلايا بشرية وبالتالي أصبحت جميع تسلسلات الحموض الامينية في الضد الخيمري بشرية ماعدا تسلسلات الحموض الأمينية في المناطق المتغيرة بقيت فارية

➢ الأضداد المؤنسنة Humanized antibodies:

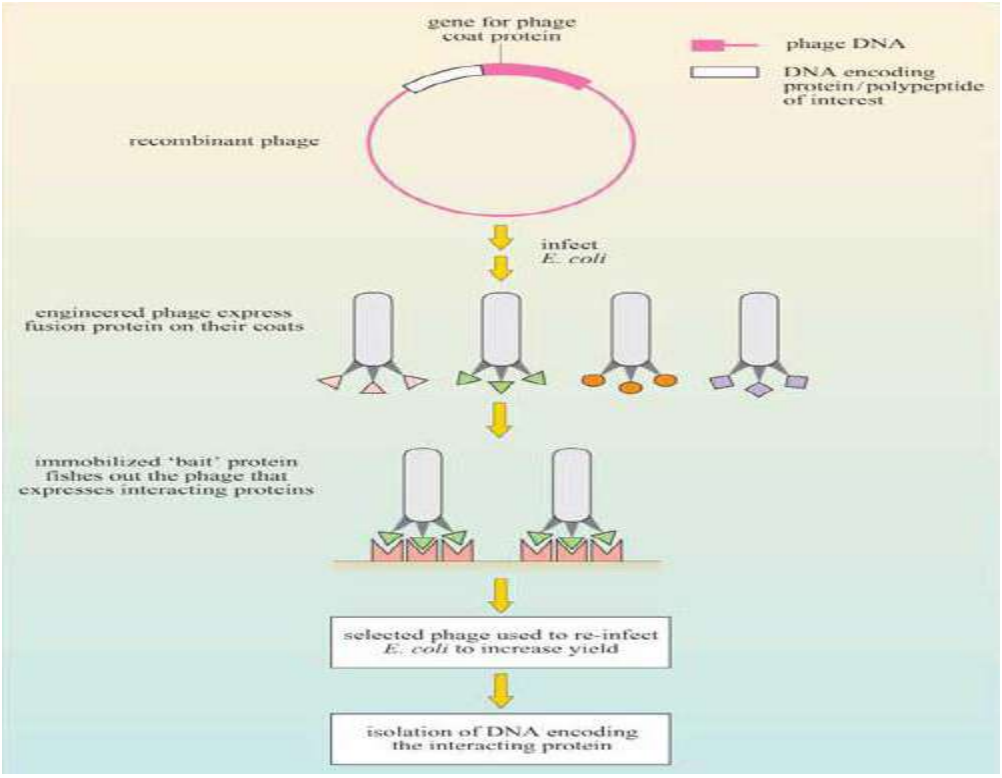
تتميزبأن قرابة 90-95% من تسلسل الاحماض الأمينية فيها مشابه للأضداد البشرية فهي أضداد بشرية نوعاً ما تم فيها المحافظة فقط على المناطق محددة التتامية الفأرية CDR و باقي المناطق من الضد أصبحت بشرية بشكل كامل

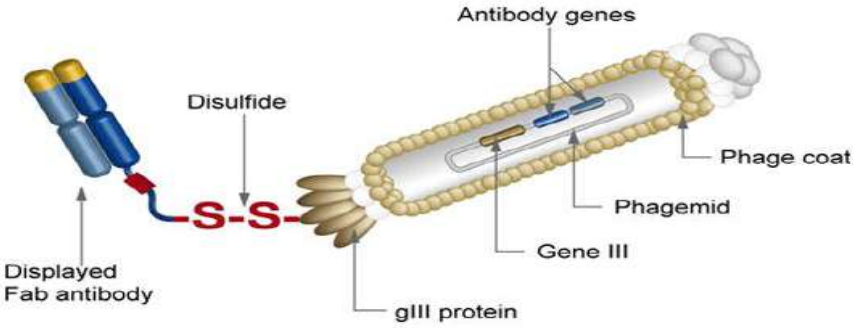




- **تقنية العاثيات العارضة phage display technique**

تسمح هذه التقنية بإنتاج الأضداد وعزلها كما تسمح بتحديد الضد القادر على ربط المستضد الهدف بشكل نوعي ولقد أصبحت هذه التقنية تُستخدَم بشكل كبير في تحديد الأضداد المناسبة للتطبيق للسريري، تعتمد هذه التقنية على استخدام العاثيات (فيروسات تعدي الجراثيم bacteriophage) ، حيث يتم اولاً عزل mRNA من اللمفاويات البائية البشرية ثم يتم تحويله إلى cDNA باستخدام أنزيم النسخ العكسي في تقانة RT-PCR ثم يتم تضخيم cDNA باستخدام تقانة PCR ليتم دمجه مع جين ترمز إحدى بروتينات الكبسولة البروتينية للعاثية بعد ذلك تقوم العاثيات بإعداء الجراثيم E.coli وكجزء من عملية تضاعفها تقوم بصنع البروتينات (الأضداد) التي يرمزها cDNA البشري ثم تقوم العاثيات الجديدة بعرض هذه البروتينات على سطحها مشكلةً بذلك ما يدعى مكتبة العاثيات العارضة، يتم استخدام المستضد الهدف لترتبط به العاثيات التي تحوي الجين الخاص بالضد النوعي المطلوب ، يمكن عزل cDNA الذي يرمز الضد المطلوب من العاثيات وإدراجه في نظام تعبير مناسب (جراثيم، حيوانات محورة جينياً) بهدف إنتاج كميات كبيرة من الأضداد





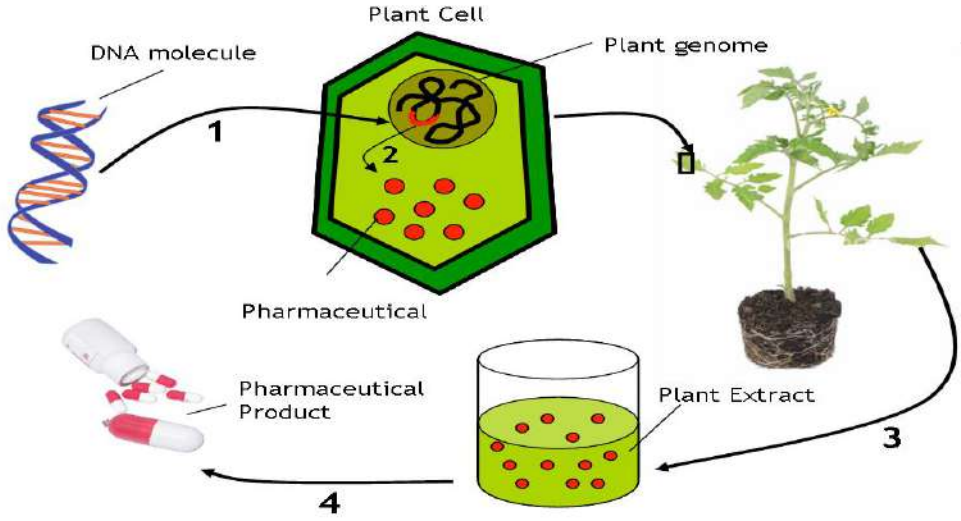
Phage Display Advantages

- More efficient than hybridoma system.
- Cheaper to produce recombinant antibodies using bacteria, rather than mammalian cell line.
- Easier to maintain and grow bacterial cultures for recombinant antibody production.
- Producing the combinatorial library of functional antibodies to generate a larger repertoire of antibodies than those available through conventional hybridoma technology.

- **Plantibodies**

"plantibodies" are antibodies produced by genetically-engineered corps e.g. corn, potatoes and tobacco plant

"plantibodies" are cheaper and arguably safer than mammalian mAb



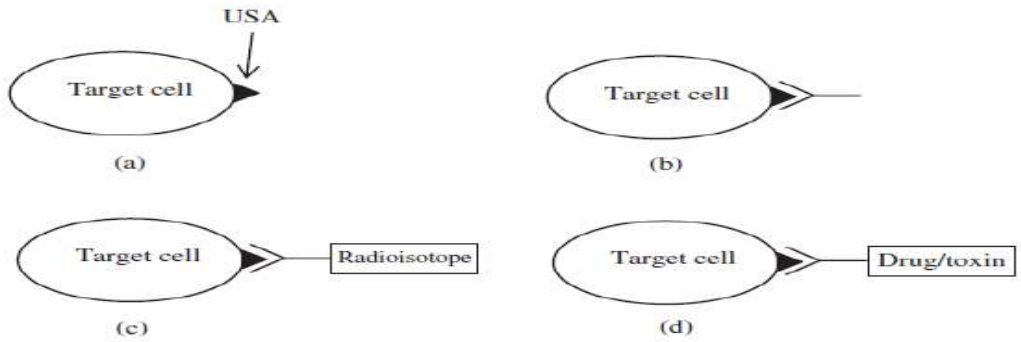
استخدامات الأضداد وحيدة النسيلة

تعد الأضداد وحيدة النسيلة أدوات علاجية مهمة للعديد من الأمراض وخصوصاً في مجال الأورام بسبب النوعية العالية والألفة المرتفغة التي تبديها تجاه المستضدات من جهة وإمكانية إنتاجها بسهولة وباستمرارمن جهة أخرى ، لقد غيرت هذه الأضداد من حياة الكثير من المرضى بعد أن أصبحت بدائل علاجية جديدة للأمراض التي كانت خيارات العلاج الطبي لها محدودة للغاية أو غير موجودة قبل ظهورها ، حالياً تشكل الأضداد وحيدة النسيلة مجموعة كبيرة من الأدوية الحيوية المتوافرة في الأسواق يضاف إلى ذلك أن عدة مئات منها تخضع حالياً لاختبارات قبل السريرية وسريرية ، يتم استخدام الأضداد وحيدة النسيلة في:

- العلاج : معالجة الأورام على سبيل المثال الليمفوما (لوكيميا الخلايا B) ، سرطان الثدي ، كما يتم استخدامها لتثبيط الجهاز المناعي خاصةً في عمليات اغتراس الأعضاء كي لا يتم رفض الطعم ، في علاج بعض امراض المناعة الذاتية مثل حالات السكري من النمط الأول بهدف تثبيط تخريب الخلايا بيتا في جزر لانغرهانس وفي الامراض الإلتهابية المناعية مثل التهاب المفاصل الرثياني
- التشخيص : يتم استخدام الأضداد وحيدة النسيلة في الكشف المبكر عن بعض الأورام من خلال معايرة المستضدات الخاصة ببعض أنواع الأورام ، كما يتم تحديد مكانها وذلك بوسم الأضداد بمواد مشعة والتشخيص داحل الكائن الحي (التصوير التشخيصي)، الكشف عن الحمل

المبدأ الذي تعتمد عليه جميع التطبيقات التشخيصية / العلاجية في الجسم الحي باستخدام الأضداد هو الإرتباط الانتقائي بين الضد وحيد النسيلة ونمط خلوي معين نوعي في الجسم (مثل خلية سرطانية)

لذلك قبل تحضير وإنتاج الأضداد وحيدة النسيلة يجب تحديد المستضد السطحي النوعي الفريد (**u**nique surface **a**ntigen)USA للنمط الخلوي الهدف ثم إنتاج الضدالموجه تجاه USA وعند حقن هذا الضد في الجسم يجب أن يرتبط بشكل انتقائي بسطح الخلية الهدف فقط ويمكن أن يُربط الضد بمواد مشعة أو دواء أو مادة سامة حسب الهدف من استخدامه



Underlying principle/approaches taken during the development and use of antibody-mediated target cell detection/destruction.

A prerequisite for adoption of this strategy is the identification and characterization of a surface antigen unique to the target cell type ('unique surface antigen', USA).

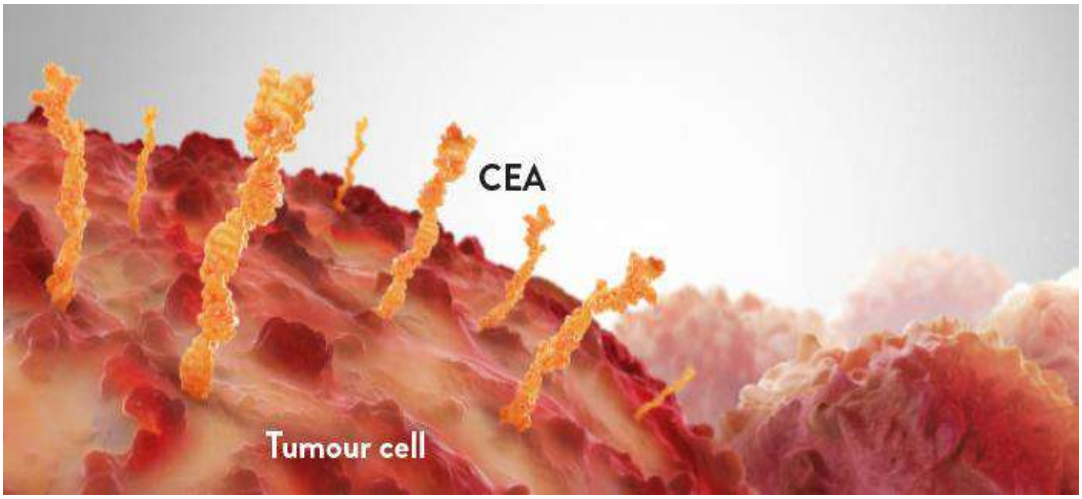
Antibodies raised against the USA should selectively interact with the target cell (b).

In some instances the antibody is chemically coupled to a radioactive tag (c), a drug or a toxin (d)

المستضدات المرتبطة بالأورام Tumour-associated antigens

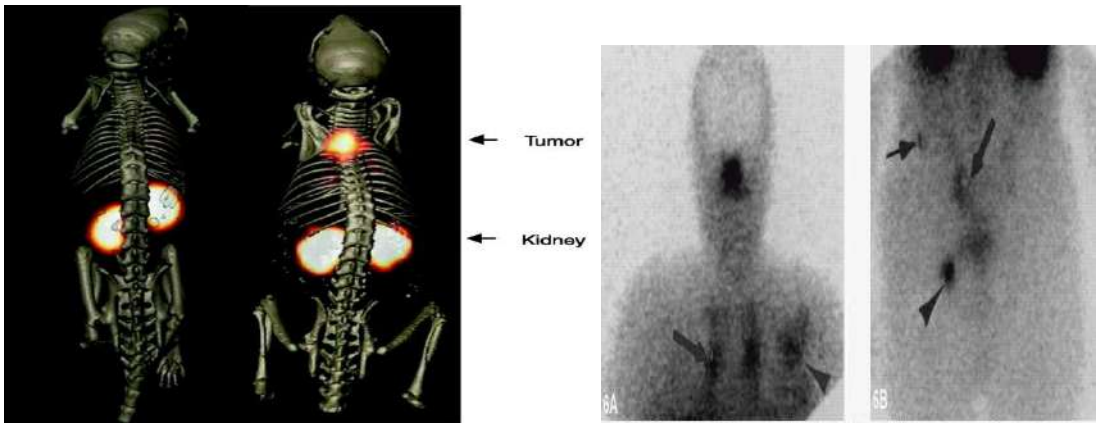
يمثل مصطلح "المستضد المرتبط بالورم" أي مستضد مرتبط بسطح الخلية السرطانية بغض النظر عن العامل أو العوامل التي ساهمت في الأصل بعملية التحول الخلوي و عادةً ما يرتبط تحول الخلية الطبيعية إلى خلية سرطانية بزيادة في تعبير المستضدات السطحية والتي تدعى المستضدات الورمية والتي لا تعبر عنها الخلايا الطبيعية أبداً أو قد تعبر عنها ولكن بمستويات منخفضة جداً لا تثير استجابة مناعية ، هذه المستضدات الورمية على سطح الخلايا السرطانية تجعل الجهاز المناعي قادراً على التعرف على الخلايا المتحولة وتخريبها وهذا مايدعى بالمراقبة المناعية وفي حال حدوث خلل في الجهاز المناعي تنقسم هذه الخلايا بشكل مستمر وتشكل السرطان، يوجد نمط من المستضدات الورمية يدعى المستضدات الورمية الجنينية oncofoetalantigens وهي بروتينات يتم التعبير عنها عادة خلال مراحل معينة من تطور الجنين ليتوقف التعبير عنها في نهاية مراحل تطور الجنين و/أو في مرحلة البلوغ (عادةً تختفي هذه المستضدات بعد الولادة) و من سمات بعض أنواع السرطانات إعادة التعبير عن هذه المستضدات الورمية الجنينية التي يبقى بعضها مرتبطاً بسطح الخلية السرطانية والبعض الآخر يتم إفرازه إلى مصل الدم وهذه المستضدات لا يتم التخلص منها لأن الجهاز المناعي لا يتعرف عليها كأجسام غريبة (مستضدات غريبة) مما يجعلها واسمات تشخيصية مهمة ومن الأمثلة عليها:

- **CEA (carcinoembryonic antigen):** مستضد ورمي جنيني يتم استخدامه كواسمة تشخيصية لسرطان الكولون والمستقيم عند وجوده بمستويات مرتفعة في مصل الدم عند الإنسان ، وهو عبارة عن بروتين سكري منغرس في غشاء الخلية وزنه الجزيئي 180 kDa يتم التعبير عنه بشكل طبيعي في القناة الهضمية والكبد والبنكرياس خلال الستة أشهر الأولى من نمو الجنين ويعد وجود بروتين CEA بمستويات مرتفعة في المصل مؤشرعلى سرطانات الجهاز الهضمي



- **AFP (alpha - fetoprotein)** : بروتين سكري وزنه الجزيئي 70 kDa يتم إنتاجه في الكبد وإفرازه في الدم في المرحلة الجنينية ، تنخفض كمية هذا البروتين بشكل كبير جداً في مصل الاشخاص البالغين حيث يتم استبداله بالألبومين ، ترتبط المستويات المرتفعة من بروتين AFP في مصل الأشخاص البالغين بأنواع مختلفة من سرطانات الكبد
- **CA125 (cancer antigen 125):** بروتين جنيني يتم التعبير عنه في 90 % من سرطانات المبيض ويتم إفرازجزء منه من قبل الورم في الدورة الدموية وتعد المستويات المرتفعة من CA125 في مصل الدم إشارة إلى الإصابة بسرطان المبيض .

يمكن تشخيص الإصابة بالسرطان عن طريق الكشف عن هذه المستضدات الجائلة في الدم ومعايرتها من خلال ارتباطها بشكل نوعي بأضداد وحيدة النسيلة موجهة ضد هذه المستضدات الورمية ، كما يمكن تصوير الورم باستخدام ضد موسوم بنظير مشع موجه ضد المستضد الورمي يرتبط به بشكل نوعي مثل الضد Indimacis-125 الذي تم طرحه في الاسواق عام 1996 لأهداف تشخيصية وهذا المنتج عبارة عن ^{111}In-labelled F(ab)$_2$ تم تحضيره في خط خلوي ورمي هجين فأري وقد أثبت فعاليته في تصوير الأورام السرطانية في المبيض إلى أن تم سحبه من الأسواق الاوروبية عام 2009 بسبب الإستجابة المناعية ضد الأضداد الفأرية التي ظهرت عند العديد من الأشخاص. قيَمَت العديد من التجارب السريرية (وماتزال تُقيم) الأضداد وحيدة النسيلة التي تم ربطها بواسمة مشعة والتي عادة يتم استخدامها لتصوير الورم مثل نظائر اليود المشع (^{125}I ،^{131} I) والرينيوم المشع (^{186}Re ^{188} Re) و الإرتيريوم المشع (^{90}Y) ، ينبعث من هذه النظائر المشعة نشاط إشعاعي متوسط على سطح الورم مما يعزز تشعيع عدة طبقات من الخلايا السرطانية مما يسمح بتصوير الورم .

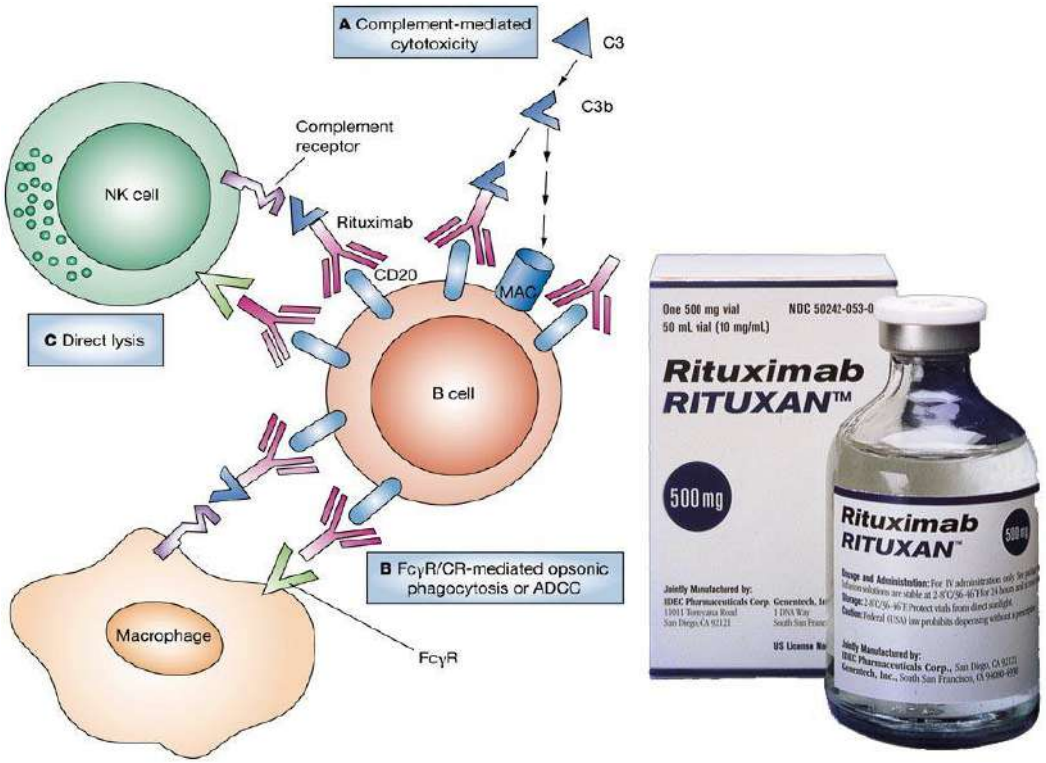


طريقة عمل عقاقير الأضداد وحيدة النسيلة في كشف و/ أو معالجة الأورام السرطانية

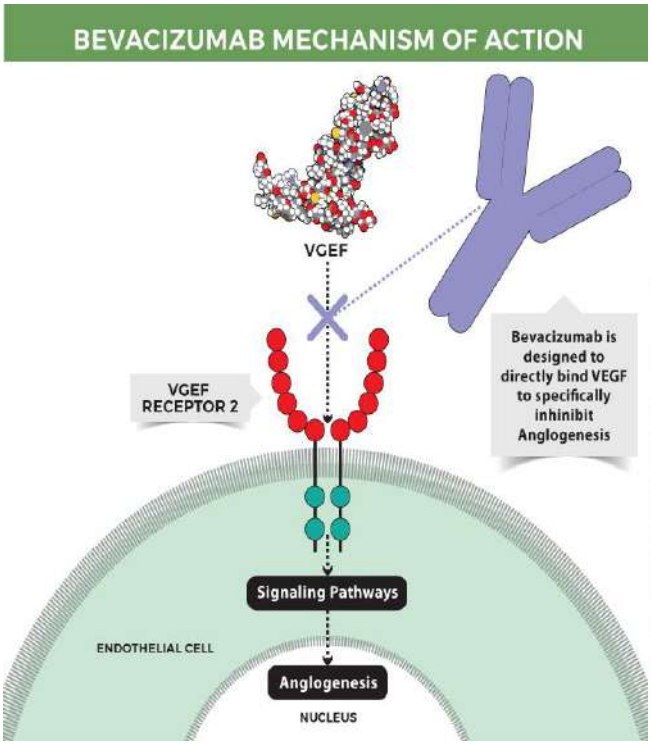
في عام 2006 تم طرح 29 منتج دوائي من الأضداد وحيدة النسيلة في الأسواق و أكثر من نصف هذه المنتجات كانت تهدف إلى اكتشاف و/ أو علاج أنواع مختلفة من السرطان (يعد السرطان أهم مؤشر منتجات الأضداد وحيدة النسيلة في التجارب السريرية)، تم تصميم عقاقير الأضداد وحيدة النسيلة لتحقق تأثيرها العلاجي من خلال آليات مختلفة ومن هذه العقاقير:

- **Rituxan (الإسم العلمي Rituximab)**: يتم استخدام هذا العقار لمعالجة اللمفوما وهو ضد وحيد النسيلة خيميري موجه ضد المستضد CD20 الذي يتم التعبير عنه بكثرة على سطح الخلايا البائية الورمية B-cell lymphoma ، يؤدي الارتباط النوعي بين Rituximab والمستضد CD20 إلى تحفز البروتين C1q (من بروتينات الجملة المتممة) الذي يرتبط مع الشدفة Fc من الضد مما يؤدي تفعيل سلسلة من البروتينات وعوامل أخرى في الجملة المتممة ليتشكل في النهاية معقد يدعى MAC (membrane attack complex) الذي يندخل في غشاء الخلية الهدف ويسبب اضطراب في الضغط الحلولى للغشاء مما يؤدي في النهاية إلى تحلل وموت الخلية ، تدعى هذه الآلية بالسمية الخلوية المعتمدة على المتممةCDC (Complement-Dependent Cytotoxicity).

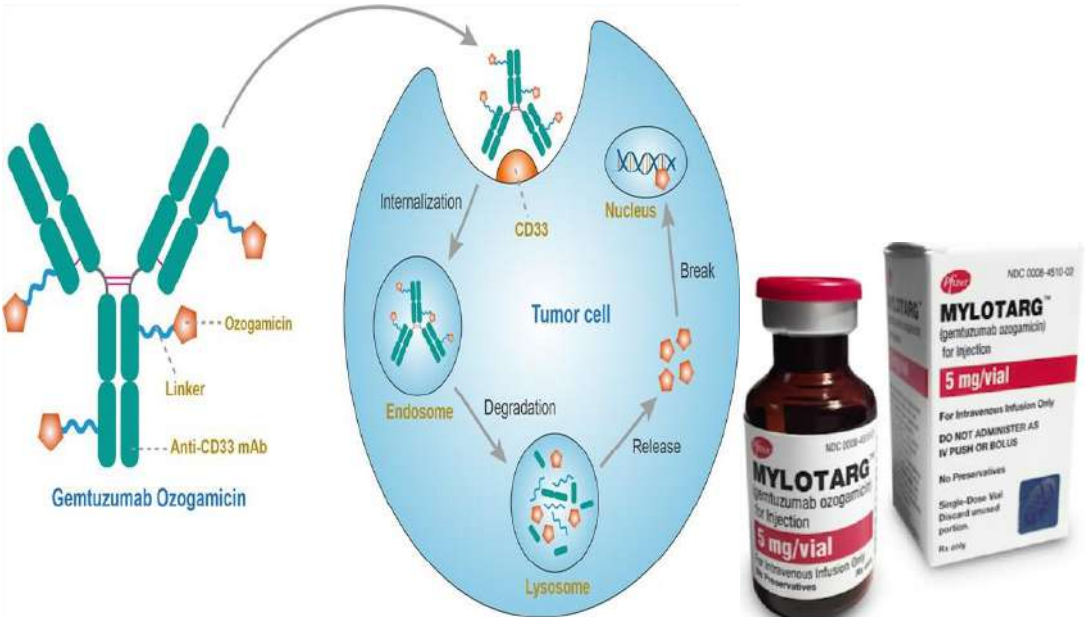
يوجد آلية أخرى لعمل هذا العقار تدعى السمية الخلوية المعتمدة على الأضداد ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) حيث يؤدي الارتباط النوعي بين الضد Rituximab و المستضد CD20 (الذي يتم التعبير عنه بشكل كبير على سطح الخلايا البائية الورمية) إلى تحريض البالعات الكبيرة Macrophage والخلايا NK (Natural killer) وارتباط مستقبلات نوعية موجودة على سطحهم مع الشدفة Fc من الضد ، ثم تفرز الخلايا NK السيتوكينات وحبيبات سامة مثل (perforin and granzyme) التي تدخل إلى الخلية الهدف مسببةً موتها كما تقوم البالعات الكبيرة ببلعمة الضد مع الخلية البائية الورمية .



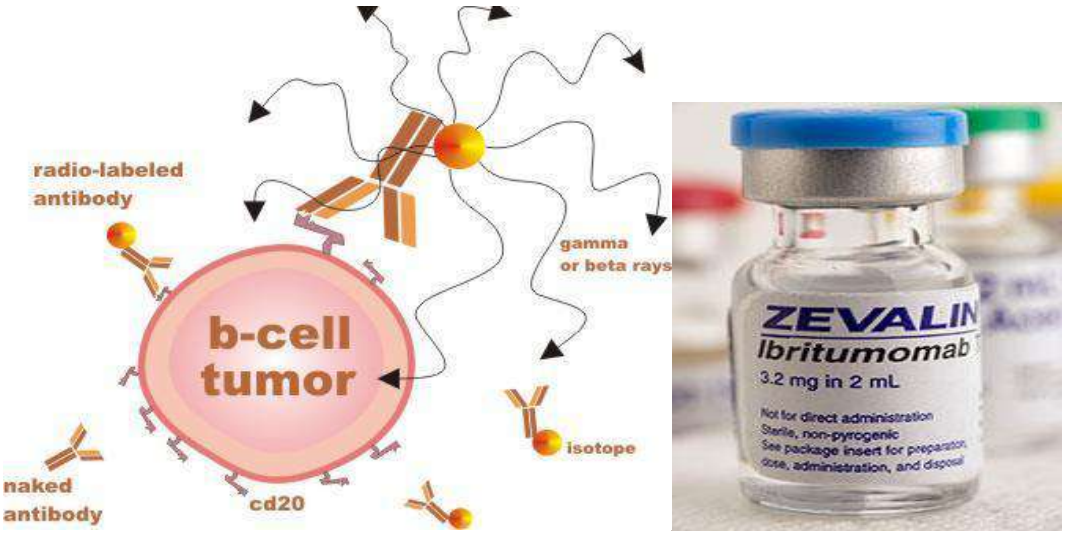
- **Avastin (الإسم العلمي bevacizumab):** يتم استخدام هذا العقار بشكل أساسي لمعالجة سرطان الكولون والمستقيم (يوجد له استخدامات أخرى مثل علاج التوعية الدموية الحديثة في الشبكية والمشيمية في حالات وذمة اللطخة الكيسية لدى مرضى السكري) تمت المصادقة على Avastin عام 2004 من إنتاج Genentech وهو ضد وحيد النسيلة مأشوب مؤنسن من نمط IgG1 وزنه الجزيئي 149 kDa يتم إنتاجه في خط خلوي من مبيض الهامستر الصيني ويتم تنقية المنتج البروتيني الدوائي بواسطة كروماتوغرافيا الألفة ليصاغ بشكل محلول معقم في قوارير تحتوي 100 ملغ أو 400 ملغ من المادة الفعالة ويتضمن السواغ دارئة فوسفاتية و trehalose و polysorbate 20، الجرعة الموصى بها هي : 5 ملغ لكل كيلو غرام يتم إعطاؤها للمريض بمعدل مرة واحدة كل اسبوعين (متوسط عمر النصف في المصل حوالي 20 يوم) ، تتلخص آلية عمل Avastin بتثبيط تَشكُل الأوعية الدموية الجديدة الضرورية لنمو الورم السرطاني حيث يرتبط Avastin مع عامل نمو البطانة الوعائية VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) مانعاً إياه من الإرتباط بمستقبله الموجود على سطح الخلية البطانية للوعاء الدموي لينتج عن ذلك ثبيط تشكل أوعية دموية جديدة مما يسبب عدم نمو الورم السرطاني وانعدام قدرته على تشكيل النقائل



- **Mylotarg (الإسم العلمي Gemtuzumab) :** يتم استخدامه لمعالجة ابيضاض الدم leukemia تمت المصادقة عليه عام 2000 وهو ضد وحيد النسيلة مؤنسن مرتبط بـ calicheamicin (دواء سام خلوي مضاد للأورام) ، يرتبط Mylotarg بشكل نوعي بالمستضد CD33 الذي هو عبارة عن بروتين يوجد على سطح كريات الدم البيضاء يتم التعبير عنه في أكثر من 80% من المرضى الذين يعانون من leukemia مما يؤدي إلى موت الخلايا السرطانية نتيجة دخول الدواء إلى داخل الخلايا وارتباطه بالـDNA وتحطيمه



- **Zevalin (الإسم العلمي ibritumomab) :** هو ضد وحيد النسيلة فأري يتم استخدامه لمعالجة بعض أنواع سرطان الغدد الليمفاوية، يحمل هذا الضد جرعة محددة من نظير مشع يعمل على ايصالها بشكل نوعي للخلايا السرطانية مسبباً قتلها وتتم المعالجة به بجرعة واحدة و أحيانا اثنتين خوفاً من الاستجابة المناعية التي قد يبديها الجسم تجاهه

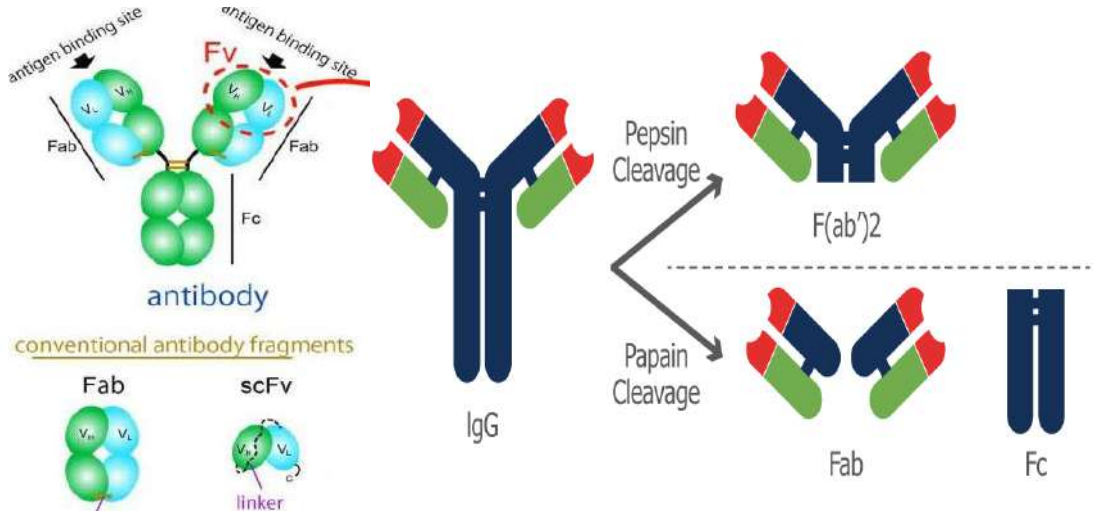


- **الشدف الضدية Antibody fragments:** من أهم المعوقات عند استعمال الأضداد لعلاج الأورام الصلبة هو انخفاض قدرة الأضداد على اختراق كتلة خلايا الورم ومن المحتمل أن الوزن الجزيئي الكبير للأضداد الكاملة يعيقها أو يمنعها من اختراق الكتلة الورمية الصلبة ، نتيجة لذلك تم استخدام الشدف الضدية (أجزاء من الضد) التي ترتبط بالمستضد مثل الشدف F(ab) ، F(ab)2 ، Fv والتي تتميز بوزنها الجزيئي المنخفض مما يمكنها من اختراق الكتلة الورمية الصلبة بسهولة أكبر، يتم إنتاج هذه الشدف عبر تقنية الـDNA المأشوب وقد تم تسميتها بالواسمات المشعة radioactive tags لكونها تُستخدَم لأغراض تشخيصية أكثر منها علاجية بسبب نصف العمر القصير لها في المصل وعدم قدرتها على استثارة الوظائف المستفعلة نتيجة لغياب الشدفة Fc ، نذكر كمثال على هذه الشدف الضدية المستخدمة كواسمات تشخيصية:

- **Anti-myosin monoclonal antibody fragments (Fab) labelled with ^{111}In:**

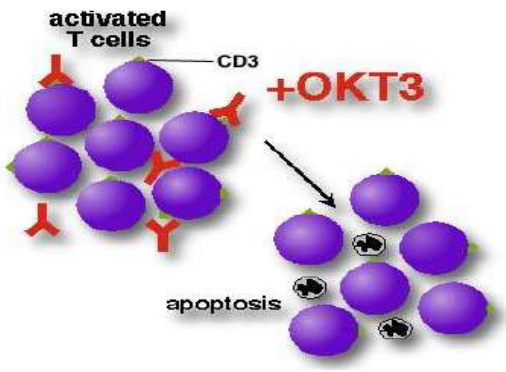
يتم استخدامها بهدف تصوير أنسجة العضلة القلبية بعد حدوث احتشاء في القلب

يمكن تشديف الضد IgG بواسطة الهضم الانزيمي حيث يؤدي الهضم بأنزيم pepsin إلى حلمهة الضد بعد الجسرين الكبريتيين والحصول على شدف ثنائية التكافؤ F(ab)2 ، بينما يؤدي الهضم بواسطة أنزيم papain إلى حلمهة الضد قبل الجسرين الكبريتيين والحصول على شدف أحادية التكافؤF(ab)



بالإضافة إلى استخدام الأضداد وحيدة النسيلة و الشدف الضدية في معالجة و/أو تشخيص الأورام السرطانية إلا أنه يوجد الكثير من التطبيقات العلاجية الأخرى لها مثل اكتشاف وعلاج أمراض القلب والأوعية الدموية، اكتشاف العوامل المعدية والعديد من الحالات الأخرى ومن هذه العقاقير نذكر :

- **Orthoclone OKT3:** أول ضد وحيد النسيلة تم استخدامه كمثبط للمناعة في عمليات اغتراس الأعضاء كي لا يتم رفض الطعم ، وتعتمد آلية تاثير Orthoclone OKT3 على ارتباطه بشكل نوعي مع المستضد CD3 (بروتين يوجد على سطح معظم اللمفاويات التائية) مما يثبط من نشاط اللمفاويات التائية كي لا تهاجم الخلايا الغريبة (الطعم) وتدمرها



ملاحظة هامة : ينتهي اسم الضد دائماً باللاحقة **mab** المشتقة من monoclonal antibody

في الأضداد المؤنسنة يتم إضافة المقطع **zu** قبل اللاحقة **mab** مثال : bevaci**zumab**

في الأضداد الخيمرية يتم إضافة المقطع **xi** قبل اللاحقة **mab** مثال : Ritu**ximab**

في الأضداد الفأرية يتم إضافة المقطع **mo** قبل اللاحقة **mab** مثال : ibritu**momab**

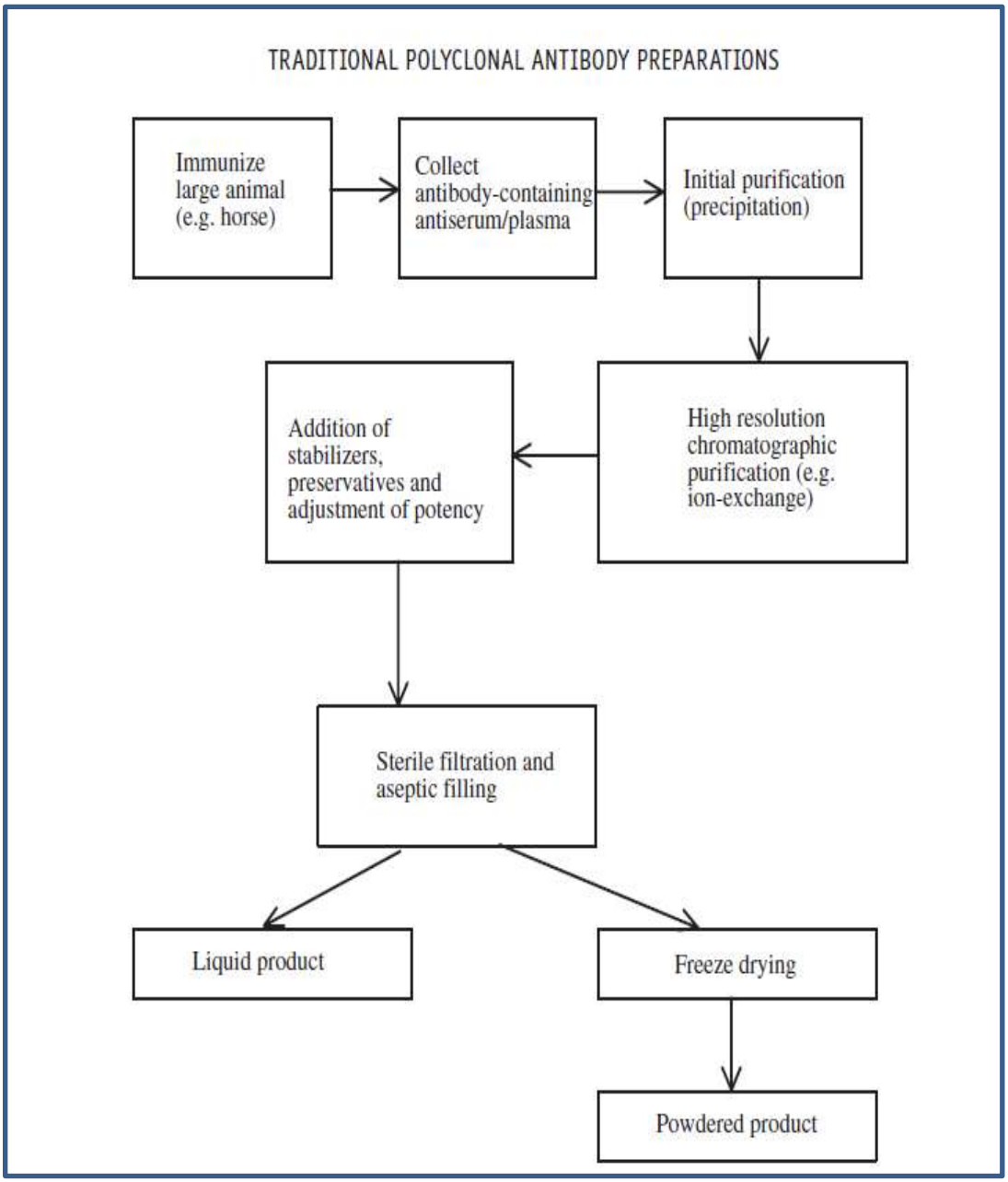
انتهت المحاضرة التاسعة

المحاضرة العاشرة والحادية عشرة
الأضداد متعددة النسائل Polyclonal Antibodies

الأضداد متعددة النسائل Polyclonal Antibodies

يتم إنتاجها من قبل عدة نسائل من الخلايا البائية البلازمية وهي عبارة عن مجموعة من الأضداد غير المتماثلة يرتبط كل منها بشكل نوعي مع معينة مستضدية واحدة موجودة على سطح نفس المستضد
يمكن الحصول على الأضداد متعددة النسائل من مصدر حيواني أوبشري وعموماً تدعى الأضداد التي يتم تحضيرها من مصدر حيواني بالمصل المضاد antisera بينما التي يتم تحضيرها من مصدر بشري تدعى الغلوبولينات المناعية immunoglobulin وفي كلتا الحالتين يكون نمط الضد السائد هو IgG ،
يتم تحضير المصل المضاد antisera وفق الخطوات التالية:

- تمنيع الحيوانات (الحصان ، الماعز، الخروف) وذلك بحقنها بمستضد يحمل أكثر من معينة مستضدية على سطحه
- سحب عينات صغيرة من الدم من الحيوان و بشكل متكرر ويتم تحليل كمية الأضداد الموجودة في المصل باستخدام تقانة ELISA، في حال استخدام الحصان يمكن سحب مابين 1-2 ليتر من الدم كل 10-14 يوم وعادةً يتم الحفاظ على مستويات الأضداد بتكرار حقن المستضد بجرعات داعمة ومعززة
- بعد جمع الدم في عبوات معقمة يتم تركه ليتخثر ثم يتم جمع المصل serum الحاوي على الضد بواسطة التثفيل التفاضلي
- يمكن أيضاً جمع الدم بوجود الهيبارين أو مضاد تخثر آخر مناسب ثم يتم التخلص من العناصر الدموية بالتثفيل التفاضلي وفي هذه الحالة يدعى السائل الذي يحتوي على الضد بالبلاسما plasma
- يتم استخدام الإيتانول أو سلفات الأمونيوم كمرسبات لترسيب الضد وتركيزه من المصل أومن البلاسما
- بهدف التنقية يتم استخدام كروماتوغرافيا التبادل الشاردي وكروماتوغرافيا الالفة مثل كروماتوغرافيا الالفة للبروتين A الذي يربط بشكل انتقائي IgG
- بعد التنقية العالية الدقة تتم معايرة الضد ثم يتم إضافة مواد داعمة للإستقرار مثل كلور الصوديوم 0.9% أو الغلايسين 2-3 %
- تعد إضافة المواد الحافظة مهمة بشكل خاص إذا تم تعبئة المنتج لاحقًا في عبوات متعددة الجرعات ويتم استخدام الفينول بتركيز أقل من 0.25%.
- يتم تعقيم المنتج بواسطة الفلترة ويعبأ في عبوات عقيمة في جو من النتروجين الخالي من الأوكسجين لتفادي تحطم المنتج بالأكسدة أثناء التخزين اللاحق ، وإذا تم تخزين المنتج بدرجة حرارة بين 2-8 مئوية تصل مدة الصلاحية إلى 5 سنوات



Overview of the production of antisera for therapeutic use to induce passive immunization

على الرغم من أن هذه الأمصال المضادة تعد مهمة و قيّمة في علاج الكثير من الحالات الطبية لكن لها آثار جانبية تتمثل بقدرتها على استثارة تفاعلات تحسسية والتي غالباً تكون غير حادة ولا تؤثر على حياة الإنسان بينما عند البعض الآخر يمكن ان تكون الحساسية مفرطة مهددة للحياة لذلك يتم استخدام الغلوبولينات المناعية البشرية المستمدة من دم إنسان معطي قد يكون تعافى من إصابة سببها المستضد الهدف أو تم تمنيعه بالمستضد الهدف ، وسواء تم تحضير الغلوبولينات المناعية من مصل أو بلاسما دم إنسان معطي يتم تنقيتها بطرق مماثلة لتلك المستخدمة في تنقية الأضداد المستمدة من الحيوانات ، وتكون غنية بأضداد قادرة على ربط مستضد نوعي عادةً مايكون بكتريا أو فيروس

يمكن تصنيف الأضداد متعددة النسائل المستخدمة في العلاج وفق الجدول التالي

Table 13.1 Polyclonal antibody preparations of human or animal origin used to induce passive immunity against specific biological agents

Antibody	Source	Specificity
Anti-D immunoglobulin	Human	Specificity against rhesus D antigen.
Botulism antitoxin	Horse	Specificity against toxins of type A, B or E *Clostridium botulinum*
Cytomegalovirus immunoglobulin	Human	Antibodies exhibiting specificity for cytomegalovirus
Diphtheria antitoxin	Horse	Antibodies raised against diphtheria toxoid
Diphtheria immunoglobulin	Human	Antibodies exhibiting specificity for diphtheria toxoid
Endotoxin antibodies	Horse	Antibodies raised against gram negative bacterial LPS
Gas gangrene antitoxins	Horse	Antibodies raised against a-toxin of *Clostridum novyi*, *Clostridum perfringens* and *Clostridum septicum*
H. influenzae immunoglobulins	Human	Antibodies raised against surface capsular polysaccharide of *H. influenzae*
Hepatitis A immunoglobulin	Human	Specificity against hepatitis A surface antigen
Hepatitis B immunoglobulin	Human	Specificity against hepatitis B surface antigen
Leptospira antisera	Animal	Antibodies raised against *Leptospira icterohaemorrhagiae* (used to treat Weil's disease)
Measles immunoglobulin	Human	Specificity against measles virus
Normal immunoglobulin	Human	Specificities against variety of infectious and other biological agents prevalent in general population
Rabies immunoglobulin	Human	Specificity against rabies virus
Scorpion venom antisera	Horse	Specificity against venom of one or more species of scorpion
Snake venom antisera	Horse	Antibodies raised against venom of various poisonous snakes
Spider antivenins	Horse	Antibodies raised against venom of various spiders
Tetanus antitoxin	Horse	Specificity against toxin of *Clostridium tetani*
Tetanus immunoglobulin	Human	Specificity against toxin of *C. tetani*
Tick-borne encephalitis immunoglobulin	Human	Antibodies against tick-borne encephalitis virus
Varicella-zoster immunoglobulin	Human	Specificity for causative agent of chicken pox

لتعزيز الإستجابة المناعية الخلوية و/أو الخلطية للمستضد يتم مزج مواد مع المستضد لزيادة الإستضدادية تدعى **المساعدات Adjuvant** ويتم استخدامها مع اللقاحات، يسمح استخدام المساعدات بالتحرر البطئ للمستضد من مكان الحقن مما يطيل من مدة الإستجابة المناعية كما يسمح بإعطاء جرعات منخفضة من المستضد لتحقيق استجابة مناعية كافية مما يحقق وفرة اقتصادية ، من الأمثلة على المساعدات نذكر فوسفات الألمنيوم وهيدروكسيد الألمنيوم وهي مساعدات غير عضوية Inorganic adjuvants يتم استخدامها في اللقاحات البشرية ، مساعد فروند التام (FCA) Freund's complete adjuvant الذي

يتألف من الزيت المعدني (زيت البارافين) و مسحوق الميكوبتيريوم (المتفطرات السلية) المقتولة بالحرارة و مساعد فروند الناقص Freund's incomplete adjuvant (FIA) الذي يتألف من الزيت المعدني وهما مساعدات عضوية Organic adjuvants يتم استخدامهما في اللقاحات البيطرية

ماهي تقانة ELISA

تعد تقانةELISA أداة تشخيصية في الطب وعلم أمراض النبات وضابط جودة في صناعات مختلفة وهي من التقانات المخبرية التشخيصية الواسعة الاستخدام في معظم مخابر التحليلات المرضية و خاصة في تشخيص الفيروسات، تضم الخطوات التالية: تثبت الأضداد او المستضدات في حفر صفيحة بلاستيكية تدعى Microtiter plate توضع عينات مصل المرضى وعينات السيطرة في الحفر فيحدث ارتباط بين الاضداد و المستضدات و بعد ساعة من الحضانة في درجة حرارة الغرفة، تغسل الصفيحة بواسطة محلول غسل خاص لازالة المواد غير المرتبطة بعد ذلك يضاف انزيم مرتبط بجزيئة الضد Enzyme conjugateو يحضن لمدة نصف ساعة وبعد خطة غسل اخرى يتم اضافة المادة الاساس Substrate وتحضن الصفيحة لمدة 20 دقيقة ، حيث يظهر لون (أزرق عادة) في الحفر ثم يضاف بعد ذلك محلول Stop solutionحيث يتغير اللون من الازرق الى الاصفر. تقاس شدة اللون باستخدام جهاز المطياف بطول موجي 450 nm يتناسب تركيز الضد او المستضد المراد قياسه مع شدة اللون تناسبا طرديا.

العلاج الجيني Gene therapy

تعريف العلاج الجيني

هو احد تطبيقات الهندسة الوراثية وقد يساهم بشفاء الكثير من الأمراض الوراثية مثل الناعور (نزف الدم الوارثي Hemophilia) والتليف الكيسي (Cystic Fibrosis) والأمراض المزمنة كالسرطان والأمراض المعدية كالايدز AIDS والتهاب الكبد Hepatitis

ويُعَرَّف العلاج الجيني بأنه :

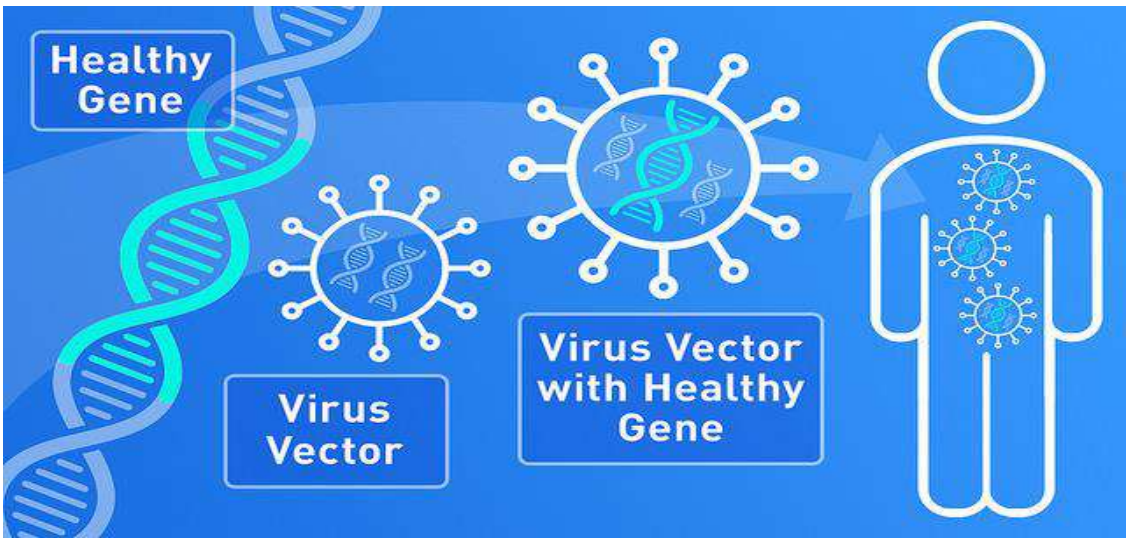
علاج احد الأمراض عن طريق استبدال الجين المعطوب بآخر سليم Gene replacement

أو إمداد خلايا المريض بالجين المرمزة للبروتين الناقص Gene transfer تقوم هذه الجين بالعمل اللازم وتعويض المريض عن العوز (النقص) في عمل الجين المعطوبة

أو إدخال جين سليمة تحمل معلومات وراثية مرغوب فيها إلى داخل الخلية

أو إسكات (منع) جينات معينة من التعبير عن البروتينات المعيبة المرمزة لها Gene Silencing

مما سبق نلاحظ أن الجين يعد في هذه الحالة كدواء حيث يقدم العلاج بالجينات إمكانية تزويد جسم الإنسان نفسه بالقدرة على تخليق بعض المواد أو منع تخليقها مع إمكانية استقرار العلاج مدى الحياة



ترجع أول تجربة لاستخدام العلاج الجيني إلى عام 1990 عندما قام طبيبان بمحاولة علاج طفلة مصابة بعوز مناعي مترافق وشديد SCID أو مايعرف بمتلازمة طفل الفقاعة Bubble boy syndrome والذي ينجم عن عوز أنزيم ADA (Adenosine Deaminase) وهو أنزيم ضروري لعملية نضج اللمفاويات البائية في نقي العظم واللمفاويات التائية في الغدة الصعترية ويسبب هذا العوز غياب فعالية الجملة المناعية مما يؤدي إلى سهولة تعرض المريضض لإنتانات جرثومية وفيروسية تكون قاتلة في معظم الأحيان ، تم علاج المريضة عن طريق إدخال جين سليمة مرمزة لأنزيم ADA في جينوم أحد الفيروسات القهقرية Retrovirus وتم إعداء المريضة بالفيروس المعدل جينياً وقد نتج عن ذلك تحسن في الإستجابة المناعية للمريضة تجاه العوامل الممرضة ، لاقت التجربة نجاح جزئي حيث استطاع العلاج تقوية الجهاز المناعي للمريضة بنسبة 40%

مازالت الجهود مستمرة لاستخدام العلاج الجيني في علاج الكثير من الأمراض ولذلك فإن عدد الشركات المهتمة بأبحاث العلاج بالجينات في تزايد مستمر حول العالم ، ظهر أول منتج لعلاج السرطان بالجينات في الصين عام 2004 تحت اسم Gndicine وهو عبارة عن جين (P53) الذي يثبط تكوين الأورام محمول على ناقل فيروسي معدل وعند حقن هذا الدواء في الورم يقوم الفيروس بإدخال الجين إلى داخل الخلايا السرطانية والذي يحث الخلية على قتل نفسها، تم اختبار Gndicine على حالات متأخرة من ورم الخلايا الحرشفية بالعنق بعد استمرار العلاج لمدة 8 أسابيع بواقع حقنة واحدة اسبوعياً وقد أظهرت النتائج أن عدد كبير من المرضى تم شفاؤهم و32 % من المرضى اظهروا انحسار جزئي للمرض وإذا تم استخدام Gndicine مع العلاج الكيمياوي أو العلاج الإشعاعي فأن كفاءة العلاج تزداد إلى ثلاثة أضعاف

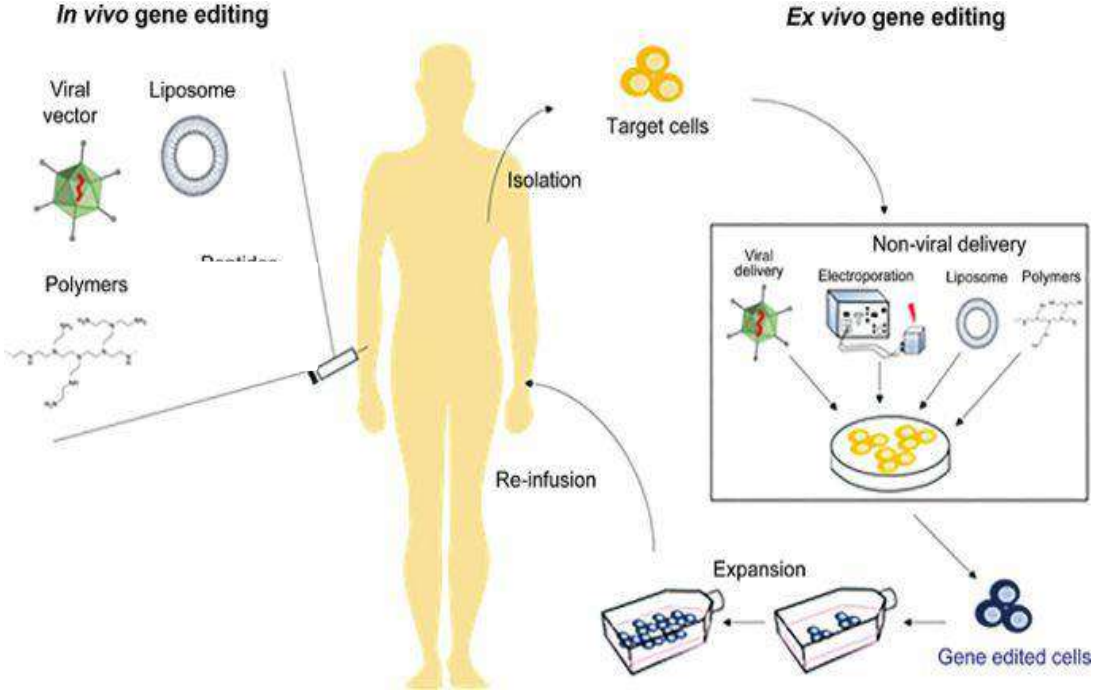
استخدامات العلاج الجيني في علاج الأمراض الخطيرة

يُستخَدم العلاج الجيني خارج الجسم الحي أو داخل الجسم الحي

- العلاج الجيني خارج الجسم الحي Ex vivo: يتم استخدامه لعلاج أمراض تؤثر على خلايا الدم مثل الثلاسيميا thalassemia ومرض فقر الدم المنجلي sickle cell anemia ومرض سرطان الدم leukemia ومرض الهيموفيليا hemophilia

تتضمن الطريقة إخراج خلايا محددة من المريض وإكثارها في المختبر ثم إعداءها بالفيروس المعدل جينياً ومن ثم إعادة الخلايا المعدلة جينياً إلى المريض حيث تقوم بالتعبير عن الجين المدخلة داخل جسم المريض

- العلاج الجيني داخل الجسم الحي In vivo: يتم استخدامه لعلاج الأمراض التي يصعب الحصول على خلاياها أو التي لا تنقسم خلاياها كثيراً مثل مرض تليف الرئة الكيسي lung cystic fibrosis ،مرض السرطان ، نقص المناعة المكتسبة، أمراض الأوعية الدموية الطرفية و التضيق الشرياني وبعض الأمراض العصبية مثل الزهايمر، تتضمن الطريقة إيصال الجين السليمة المحمولة مباشرة إلى الأنسجة المتأثرة عن طريق الحقن المباشر للفيروس المعدل جينياً ضمن الكائن الحي الذي يعدي الخلايا بشكل مباشر ويتم التعبير عن الجين المنقولة ضمن الخلايا المستهدفة بالفيروس



مبدأ العلاج الجيني

تقوم فكرة العلاج الجيني على إدخال جين فعالة وظيفيا إلى الخلايا عن طريق تحميل الجين على ناقل اذ يقوم الناقل بعدها بإعداء الخلايا المستهدفة وادخال الجين الهدف إلى الخلية وبالتالي إعادة إنتاج البروتين المفقود ، يمكن إعداء الخلايا المستهدفة أما عن طريق استخلاص الخلايا وزرعها وإعدائها خارج الجسم الحي ومن ثم إعادة زرعها في جسم المريض أو مباشرة داخل الجسم الحي

أساسيات العلاج الجيني

- التعرف على الموقع الجيني المعطوب والذي يراد التعويض عنه بالإضافة gene transfer أو الإستبدال Gene replacement
- ضرورة توفير الجين العلاجية المراد إعطائها للمريض وتوجد الآن الجينات المطلوبة محمولة على ناقلات Vectors ومنسلة Cloned بفضل التقدم العلمي في تقنيات تأشب الـDNA
- توفير آلية لإيصال الجين إلى الخلايا المستهدفة
- ضرورة أن لا يتسبب العلاج الجيني في حصول طفرة جينية جديدة نتيجة لدخول الجين العلاجية ينتج عنها تعطيل جين فعال أو تنشيط لطليعة الجين الورمي roto-oncogene ليصبح جين ورمي أو يتسبب في تعطيل الجين المثبط للورم Tumor suppressor gene ، بالإضافة إلى ذلك إمكانية أن تعمل الجين العلاجية في خلايا اخرى غير الخلايا المستهدفة مما ينجم عن ذلك آثار سيئة
- أن ينتج عن العلاج الجيني تَحَسُن في حالة المريض وان تصل الجين العلاجية إلى عدد من الخلايا المستهدفة وان تستقر فيها وتعبر عن البروتين المطلوب أي أن تعطى نتيجة

النواقل المستخدمة في العلاج الجيني

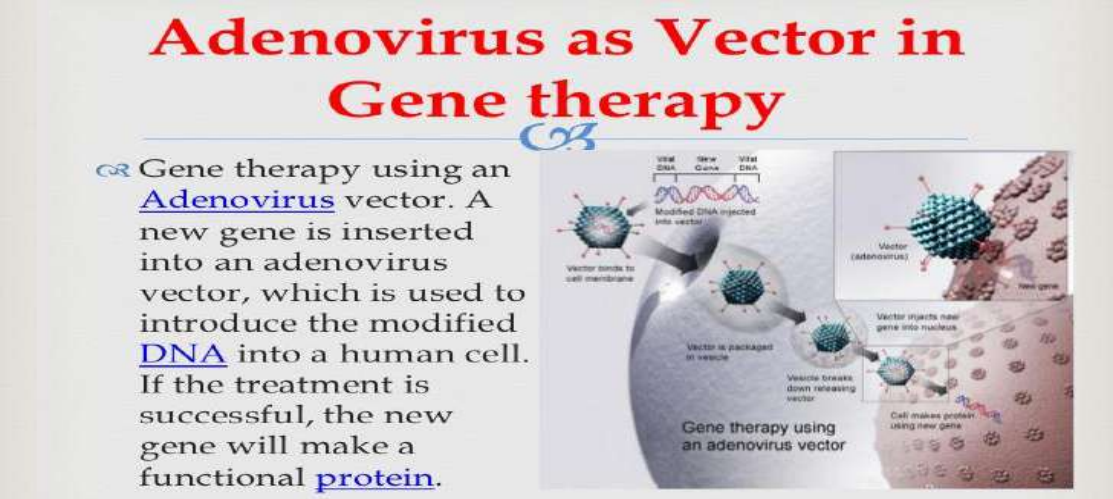
لا يمكن بشكل عام إدخال الجينات العلاجية Therapeutic gene مباشرة في DNA خلايا الأشخاص المرضى وإنما يجب إيصال هذه الجينات إلى الخلايا المستهدفة باستخدام نواقل أو ما يعرف بالـ Vectors إن نواقل الجينات الأكثر استخداماً في المعالجة الجينية هي عبارة عن فيروسات معدلة جينياً لتحمل الـ DNA البشري السوي وهي تملك قدرة على التعرف على خلايا معينة ومن ثم إدخال المادة الوراثية الخاصة بها إلى تلك الخلايا، بشكل عام تقسم النواقل إلى نواقل فيروسية ونواقل غير فيروسية

Vectors used in gene therapy	
Viral Vector	**Non-viral Vectors**
Adenovirus	Lipid complex
Retrovirus	Liposomes
Adeno- Associated Virus	Peptide/protien
Lentivirus	Polymers
Vaccinia virus	
Herpes simplex virus	

➢ **النواقل الفيروسية Viral vectors**

معظم الفيروسات تنقل المحتوى الوراثي لها للخلية المستهدفة كجزء من دورة حياتها ولهذا استخدم العلماء فيروسات معدلة جينياً كوسيلة لنقل الجين إلى الخلايا المستهدفة ومن الفيروسات التي استخدمت كنواقل:

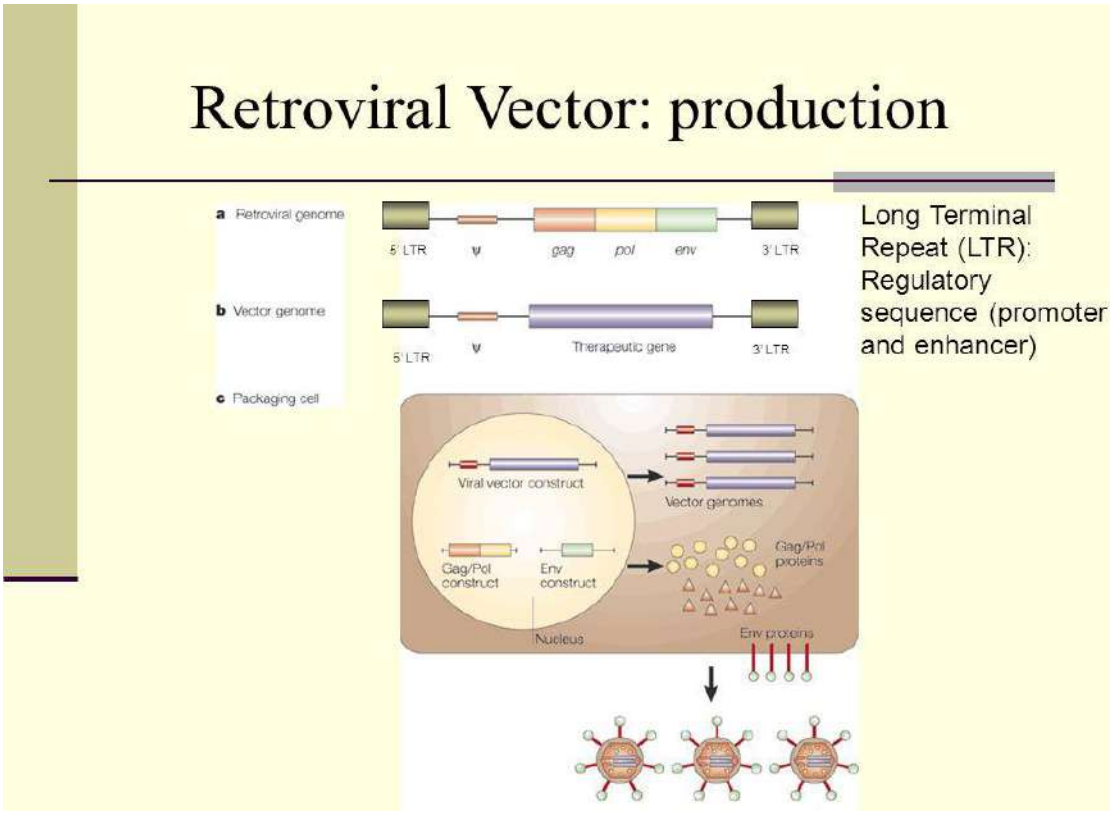
- الفيروسات الغدية Adenoviruses: المادة الوراثية فيها هي DNA مضاعف الطاق وتعد الفيروسات المسببة للزكام الشائع Common cold أحد أنواع الفيروسات الغدية، في هذه الطريقة يتم غرز الجين العلاجية في الناقل المستخدم لإدخالها إلى الخلية البشرية و إذا كانت المعالجة ناجحة فان الجين سوف تقوم بترميز اصطناع البروتين



- الفيروسات القهقرية (الراجعة) Retroviruses : المادة الوراثية فيها هي RNA وتتميز هذه الفيروسات بأنها قادرة على حمل قطعة من الـDNA أو جين يصل حجمها بين kb7.5-7 ، تتميز الفيروسات الراجعة بكبر حجمها وهي تملك ثلاث جينات مهمة للتضاعف هي (gag-pal-env) ولكي يتم استخدامها كنواقل يجب تحوير وتعديل الفيروسات الراجعة كي تفقد القدرة على التضاعف و تصبح غير ممرضة وذلك بحذف اغلب الجينوم الفيروسي واستبداله بالجين العلاجية المراد استخدامها في العلاج الجيني مع العناصر التنظيمية الخاصة بهذه الجين ويتم ذلك باستخدام تقانة الـDNA المأشوب ، ثم يتم حضن الفيروسات المعدلة جينياً مع خلايا خط خلوي معدل جينياً مثل CHO (التعديل الجيني للخط الخلوي يشمل إضافة الجينات الثلاثة التي تم حذفها من الجينوم الفيروسي إلى جينوم الخلايا) وبذلك يتضاعف الفيروس بالإعتماد على الجينات المضافة إلى جينوم الخلايا وبنفس الوقت تتضاعف الجين العلاجية التي ينقلها، في خطوة تالية يتم حضن الفيروسات المعدلة مع الخلايا الجسمية للمريض مثل الخلايا الجذعية لنخاع العظم لتقوم الفيروسات بحشر ودمج مادتها الوراثية وبضمنها الجين التي تنقلها مع DNA الخلايا الجسمية
- الفيروسات المرتبطة بالغدية Adeno-associated viruses : صنف من الفيروسات الصغيرة المادة الوراثية فيها هي DNA وحيد الطاق، تملك هذه الفيروسات القدرة على غرز مادتها الوراثية في موقع نوعي من الصبغي التاسع عشر

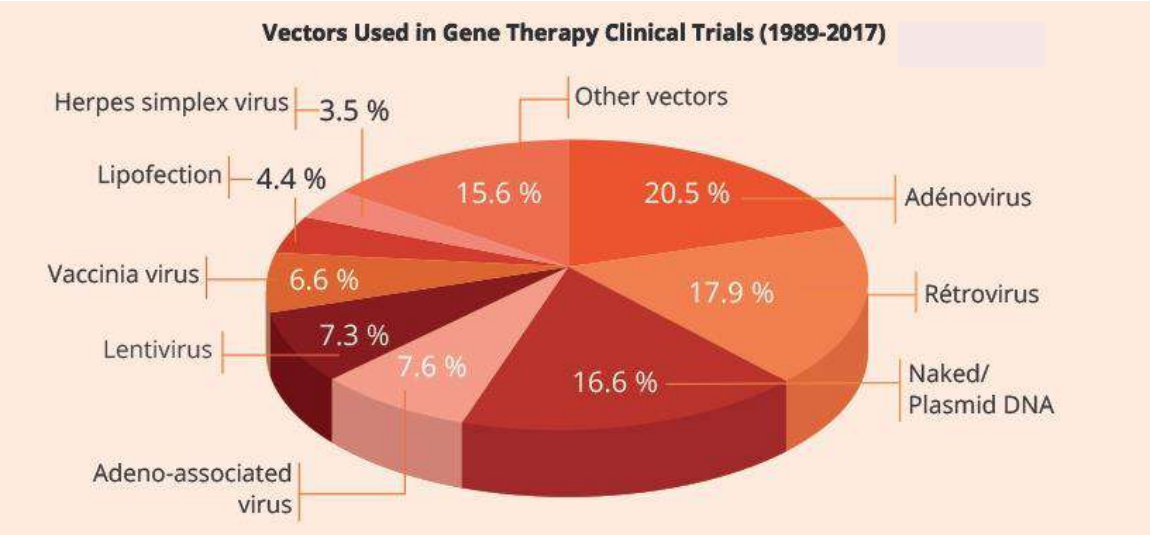
ماهي الفيروسات القهقرية Retroviruses

هي فيروسات مادتها الوراثية RNA من الممكن أن تصيب الإنسان والحيوانات وتتسبب بالعديد من الامراض وهي قادرة على دمج مادتها الوراثية الـRNA مع المادة الوراثية DNA للخلية المصابة بها ويساعدها في ذلك أنزيم خاص تحتويه يدعى بالناسخ العكسي ومهمته تحويل مادتها الوراثية من RNA إلى DNA



➢ **النواقل غير الفيروسية Non-viral vectors**

- الجسيمات الشحمية Liposomes : هي جزيئات من طبيعة شحمية ذات لب مائي قادرة على إدخال الجين المطلوب من خلال غشاء الخلية الهدف
- Naked/plasmid DNA: Naked DNA (DNA عاري) وهو حمض نووي بدون بروتينات مرتبطة به يتم استخدامه لنقل الجينات
- يمكن إيصال الجين المطلوبة إلى الخلايا الهدف من خلال ربط الجين إلى جزيئات يمكن لها الارتباط بمستقبلات نوعية على سطح الخلايا بحيث يجري بعدها عملية ابتلاع الجين من خلال غشاء الخلية وبالتالي تمر إلى داخل الخلية الهدف



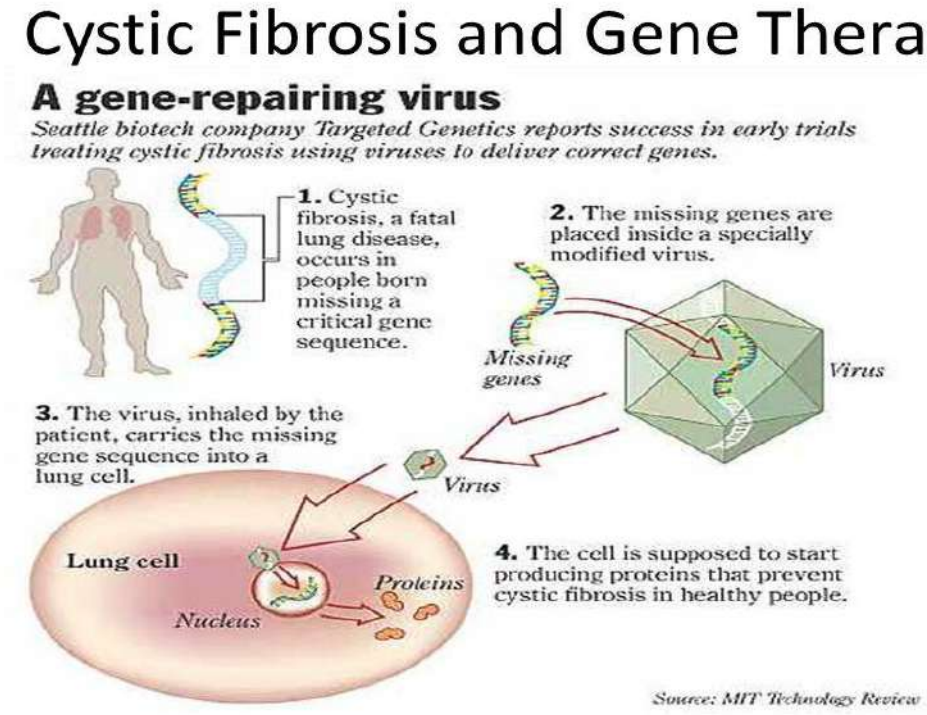
أهم صفات الناقل الفيروسي ؟

- القدرة على حمل قطعة الـDNA أو الجين العلاجية والتي تتالف من إكسونات فقط
- إمكانية تكثير الفيروس والحصول على كمية كبيرة منه للوصول إلى جرعة فعالة عند العلاج الجيني
- القدرة على تنبيغ الخلايا المنقسمة والخلايا غير المنقسمة والتنبيغ Transduce هو إدخال DNA غريب إلى داخل الخلايا باستخدام الفيروسات كناقل
- القدرة على دمج الجين العلاجية مع DNA الخلية المضيفة في موقع محدد
- القدرة على استهداف الخلايا المرغوبة دون غيرها أي التوجه نحو النسيج المستهدف ويتم ذلك عن طريق ربط الجين العلاجية بـPromoter نوعي للنسيج المستهدف وبالتالي لن يتم التعبير عن البروتين الذي ترمزه المورثة العلاجية إلا في النسيج المطلوب، يمكن أيضاً استخدام أضداد تساعد الفيروسات على التوجُّه نحو النسيج المستهدف
- عدم احتواء الفيروس على عناصر تسبب استثارة الجهاز المناعي

بعض الامراض التي يمكن علاجها بالجينات

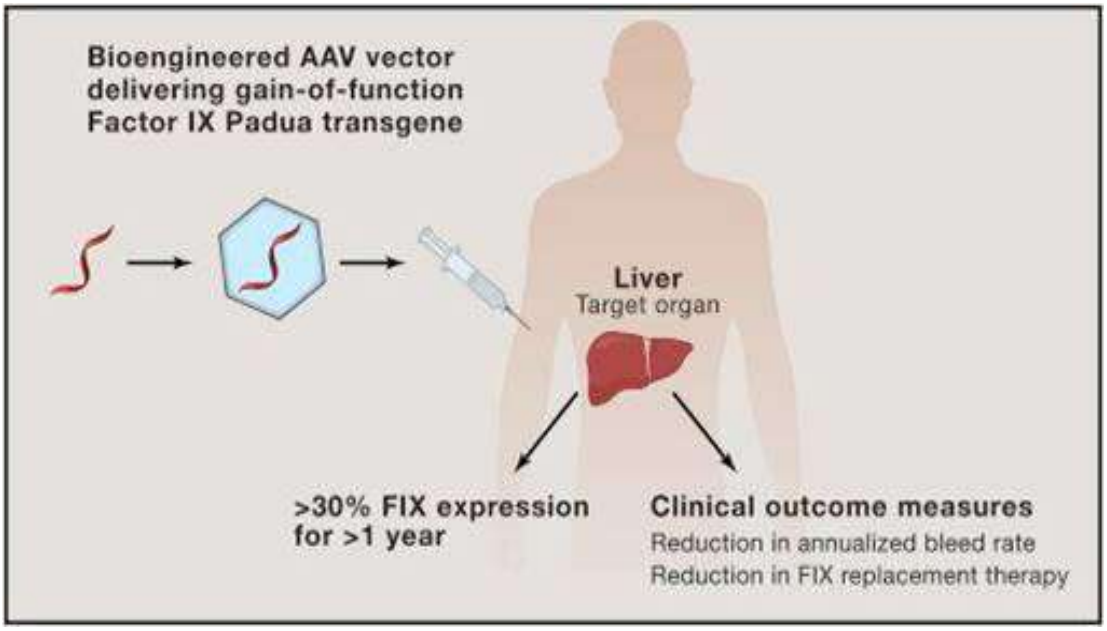
- مرض التليف الكيسي Cystic fibrosis

التليف الكيسي هو أحد أكثر الأمراض الوراثية شيوعًا في العالم وينشا نتيجة طفرة في الجين (CFTR) المحمولة على الصبغي الجسمي السابع والتي ترمز بروتين مسؤول عن حركة الماء و شوارد الكلور خلال أغشية الخلايا مما يسبب مشاكل في الرئتين على وجه الخصوص حيث يعاني المريض من إفراز مخاط كثيف لزج يتسبب في فقدان القدرة على التنفس ويؤمن بيئة مناسبة لتكاثر الجراثيم الضارة، يتم العلاج الجيني باستخدام الجسيمات الشحمية لنقل الجين السليمة إلى الخلايا داخل الرئة عن طريق الاستنشاق



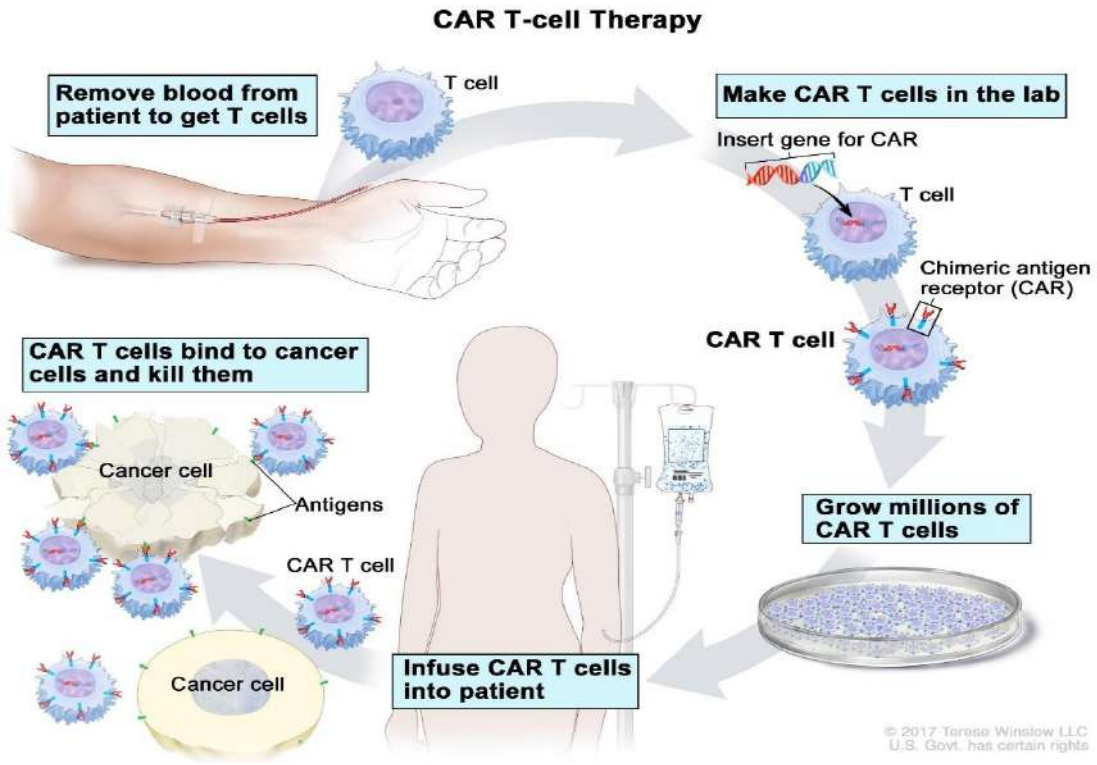
- الناعور Hemophilia

الناعور هو مرض وراثي يصيب الذكور بينما تكون الإناث حاملات وناقلات لهذا المرض، يفتقر فيه المريض إلى أنواع من البروتينات تدعى عوامل التخثر والتي تعمل مع الصفيحات الدموية لوقف النزيف في مكان الإصابة حيث لايتخثر دم المريض بشكل سليم مما يجعله ينزف لمدة أطول (عادةً يحتاج النزف الناجم عن الجروح بين 2-6 دقائق كي يتخثرويتوقف في الانسان السليم) كما يكون عرضة للنزيف الداخلي ينشأ المرض نتيجة طفرة في إحدى الجينات المحمولة على الصبغي الجنسي X والتي ترمز عامل التخثر F8 (الناعور من النمط A) أو F9 (الناعور من النمط B)، يتم العلاج الجيني لهذا المرض عن طرق إعطاء المريض جرعات من فيروسات تحمل المورثة العلاجية التي ترمز عامل التخثر الناقص والتي تستهدف الخلايا الكبدية (مكان اصطناع أنزيمات التخثر)

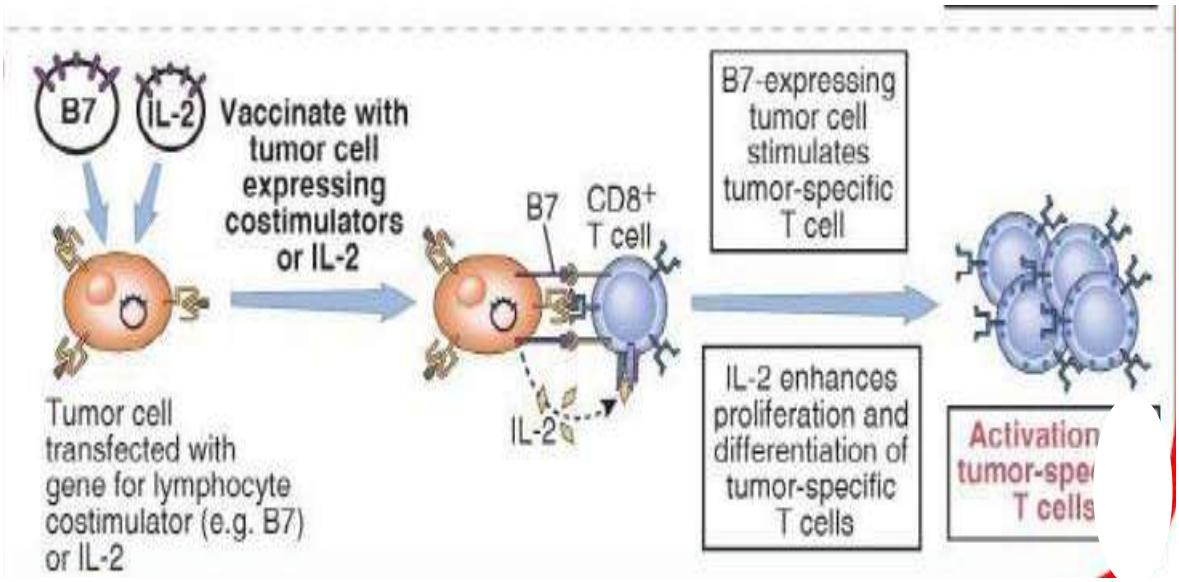


العلاج الجيني للسرطان Cancer Gene Therapy

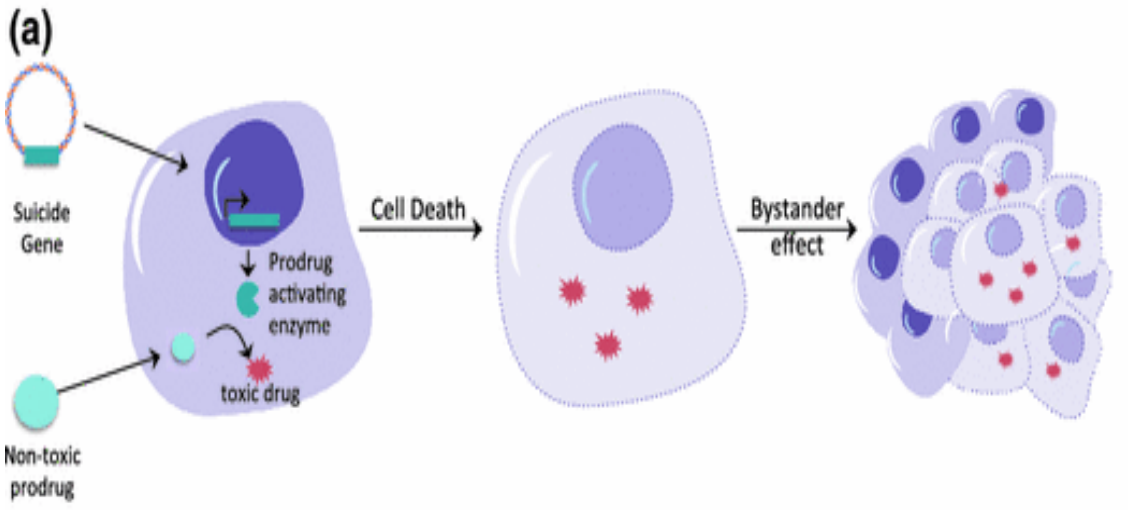
يعد السرطان من الأمراض الخطيرة والمنتشرة التي تهدد حياة الإنسان في كل أنحاء العالم وتتميز العلاجات التقليدية الكيمياوية والإشعاعية بتأثيرها السُمي على الخلايا كافةً فلا تميز بين الخلايا السليمة و الخلايا السرطانية مما يسبب العديد من الآثار الجانبية التي يعاني منها المريض ، لذلك اتجهت الكثير من تجارب العلاج الجيني نحو معالجة السرطان ويُقدَر أن 54% من طرق العلاج الجيني للسرطان تعتمد على دعم و تنشيط الجهاز المناعي للمريض كي يتعرف على الخلايا السرطانية ويدمرها ، مثلاً يتم العلاج الجيني لسرطان الدم (سرطان الدم الليمفاوي الحاد Acute lymphoblastic lymphoma) عن طريق إعادة برمجة الخلايا التائية وفق الطريقة التالية : يتم أخذ كمية من دم المريض و عزل الخلايا التائية منها ثم تعديلها جينياً بإضافة جين ترمز مستقبل على سطحها يُمَكنها من التعرف على بروتين يدعى CD 19 والذي يوجد فقط على سطح الخلايا البائية السرطانية ، ثم تتم عملية تكثير الخلايا التائية لتصل إلى ملايين الخلايا ثم يتم حقنها وريدياً في جسم المريض لتتعرف الخلايا التائية المعدلة جينياً على الخلايا السرطانية في داخل الجسم وتقوم بمحاربتها.



أيضاً يمكن العلاج الجيني لسرطان الدم وفق الطريقة التالية: يتم عزل الخلايا السرطانية من دم المريض و إضافة جين معينة لها مثل الجين IL-2 التي ترمز عامل نمو يحرض انقسام وتمايز الخلايا التائية التي تهاجم الأورام السرطانية أو يتم إضافة الجين B7 التي ترمز عامل نمو يحفز الخلايا التائية الخاصة بالأورام ثم يتم إعادة الخلايا السرطانية إلى المريض لتبدأ الجين المضافة بالتعبيرين البروتين الذي ترمزه وبالتالي تقوم الخلايا السرطانية نفسها بتفعيل الخلايا التائية التي تهاجمها وتحفز انقسامها مما يقوي الاستجابة المناعية ضد خلايا الورم السرطاني

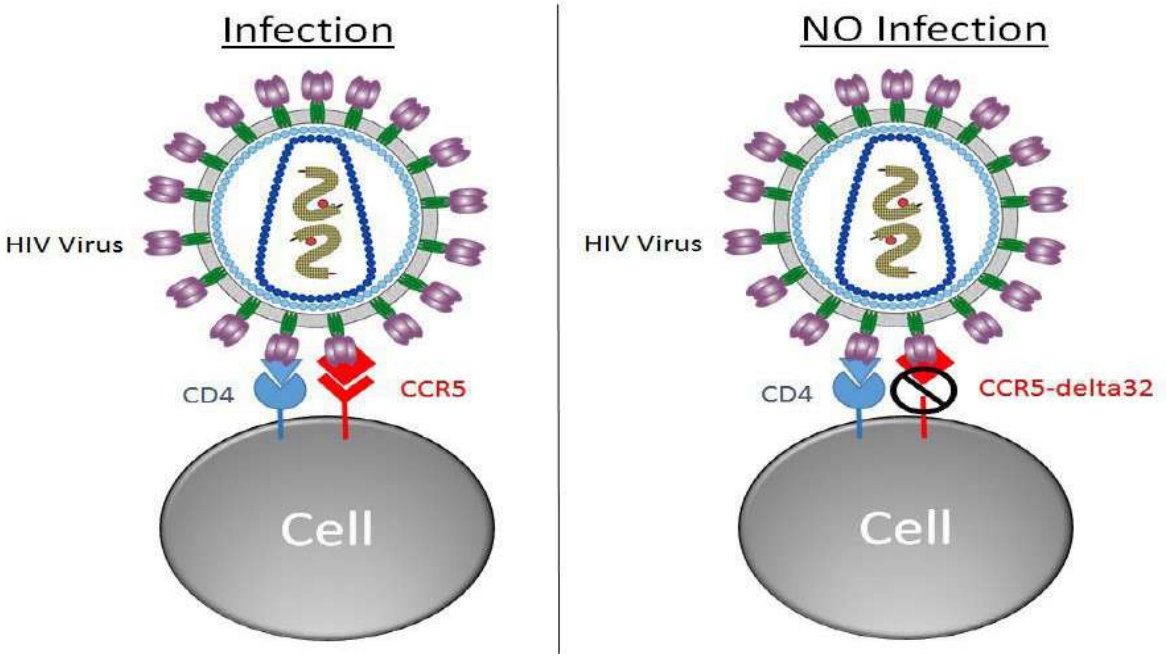


من الممكن أن يتم العلاج الجيني للسرطان عن طريق إعطاء المريض suicide gene محمولة على ناقل وموجهة نحو الخلايا السرطانية المستهدفة (يتم إضافة Promoter للجين متوافق مع عوامل الانتساخ الموجودة فقط في الخلايا السرطانية) ، هذه الجينة المضافة ترمز أنزيم يحول الدواء المستخدم لمعالجة السرطان من الشكل الطليعي غير الفعال إلى الشكل الفعال



العلاج الجيني لمرض نقص المناعة المكتسبة الإيدز AIDS Gene Therapy

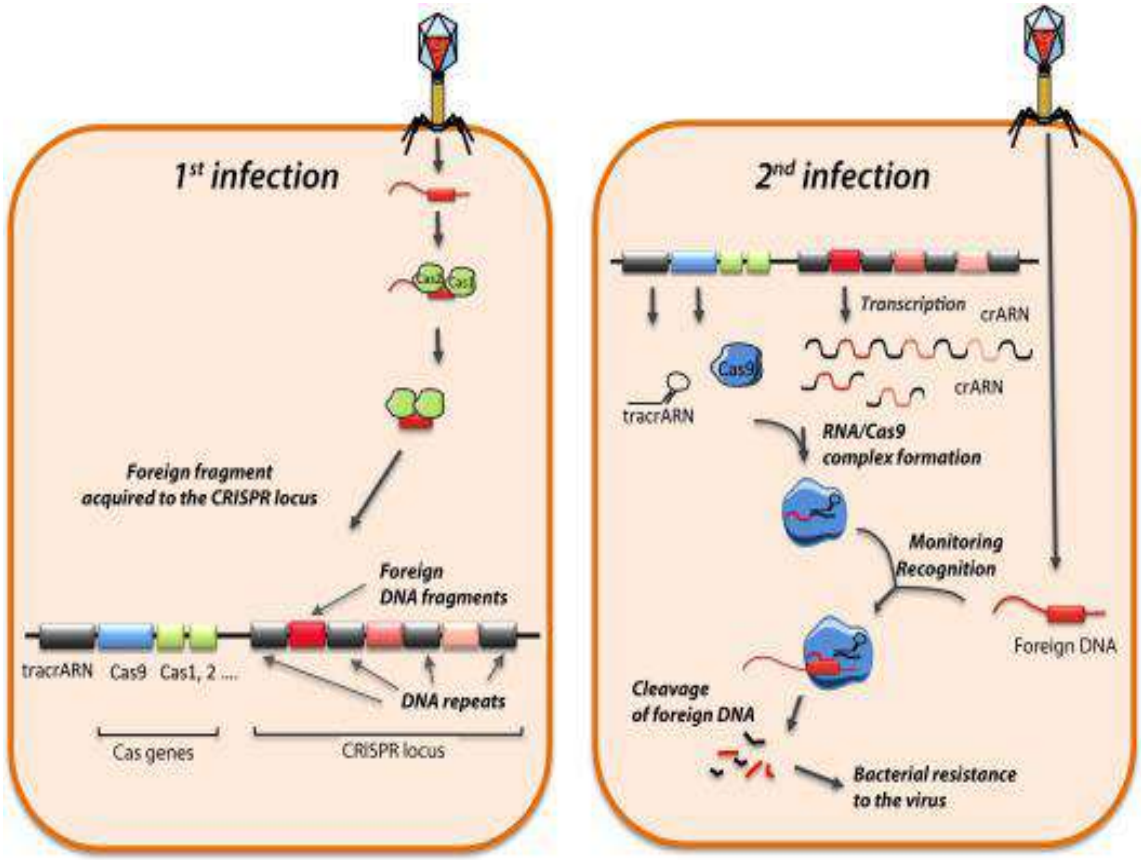
يهاجم فيروس HIV جهاز المناعة بالجسم ويعطل عمله مما يجعل الإنسان ضعيفاً ودون أي قوة دفاعية ضد أي مرض وهكذا يتعرض للإصابة بأنواع كثيرة وخطيرة من الأمراض والسرطانات، يستهدف هذا الفيروس الخلايا التائية المساعدة و يرتبط بها بواسطة المستقبل CCR5 الموجود على سطح الخلايا التائية ويدخل إليها مسبباً دمارها ، تعتمد فكرة العلاج الجيني للإيدز على حذف الجين المرمزة للمستقبل CCR5 والذي لا يؤثر غيابه على وظيفة الخلايا التائية المساعدة وبالتالي لا يستطيع الفيروس الإرتباط بهذه الخلايا وبذلك يدخل المريض في مرحلة السكون والتي لا تعني علاجًا نهائيًا بالمعنى الحقيقي ولكنها تعني فقط أن أعراض المرض وعلاماته التي تظهر في التحليلات الطبية قد انخفضت بحيث تخطت المستوى الذي يمكن رصدها فيه

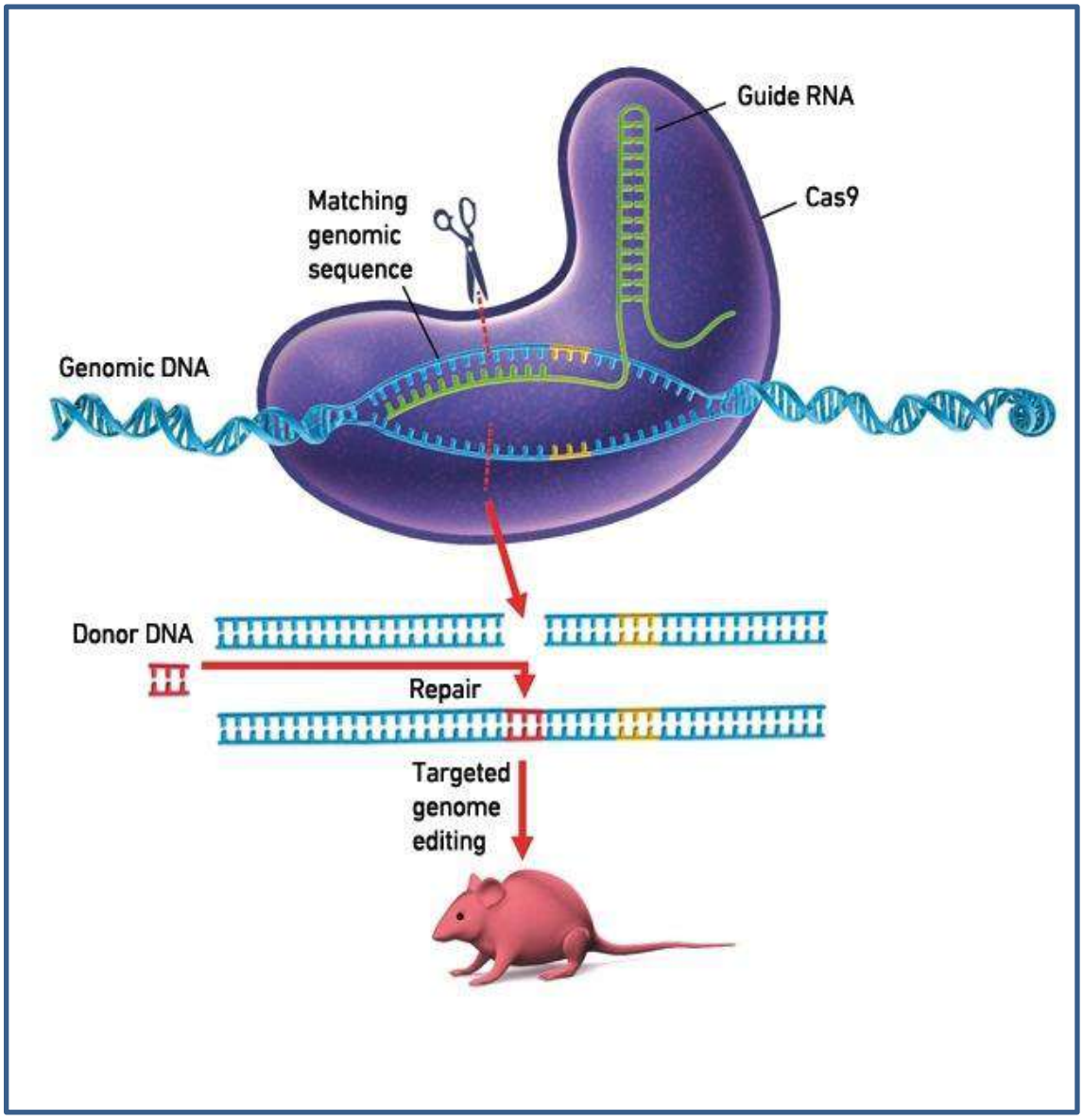


التطور الكبير في مجال العلاج الجيني - تقنية CRISPR - Cas9

خلال السنوات القليلة الماضية حصل تطور كبير في مجال العلاج الجيني باستخدام تقنية تدعى CRISPR Cas9 / وهذه التقنية تتيح للباحثين تغيير الحمض النووي لأيّ كائن حي بسرعة فائقة بما في ذلك البشر أي إمكانية قص الجين المعطوبة واستبدالها بجين سليمة ضمن الموقع الجيني ذاته داخل أو خارج الجسم ، عام 1987 اكتشف العلماء تكرارات منظّمة من الـDNA في البكتريا دعيت اختصاراً CRISPR وفي عام 2005 تم اكتشاف تسلسلات من الـDNA أصلها فيروسي تتخلّل قطع CRISPR و في نفس العام تمّ اكتشاف بروتين تنتجه البكتريا يرتبط بذات القطع الجينيّة الفيروسيّة المتخلّلة لـ CRISPR دعيت هذه البروتينات اختصاراً بـCas ، وجد العُلماء أنّ نظام CRISPR-Cas هو نظام مناعيّ في البكتريا يقوم باستهداف الجينوم الفيروسي (Bacterophage) عندما يصيب البكتريا ثمّ يقوم بتقطيعه حتّى لا يتمكن الفيروس من التكاثر داخل الخليّة البكتيرية، يحتوي البروتين Cas على شرائط من الـRNA المُتمّمة للـ DNA أو الـ RNA الفيروسيّ، ترتبط شرائط الـ RNA هذه بتسلسل الحمض النوويّ المُستهدف (الفيروس) ويقوم البروتين بدوره بقطع الحمض النوويّ في هذا المكان، عام2011 تمّ اكتشاف أحد أنواع البروتين Cas وهو Cas 9 والّذي وُجد أنّه يحتوي على تسلسلين من الـ RNA تجعلان فعاليّة هذا البروتين في استهداف الـDNA وقطعه في أماكن محدّدة عالية جداً.

أصبح بالإمكان استخدام تقنية CRISPR/ Cas9 لاستهداف أي موقع على شريط الـ DNA من أجل قصّه (كالمقصّ) لتعطيل جين معيّنة أو لإقحام جين مُعدّلة أو سليمة مكان جين معطوبة لعلاج الكائن الحيّ

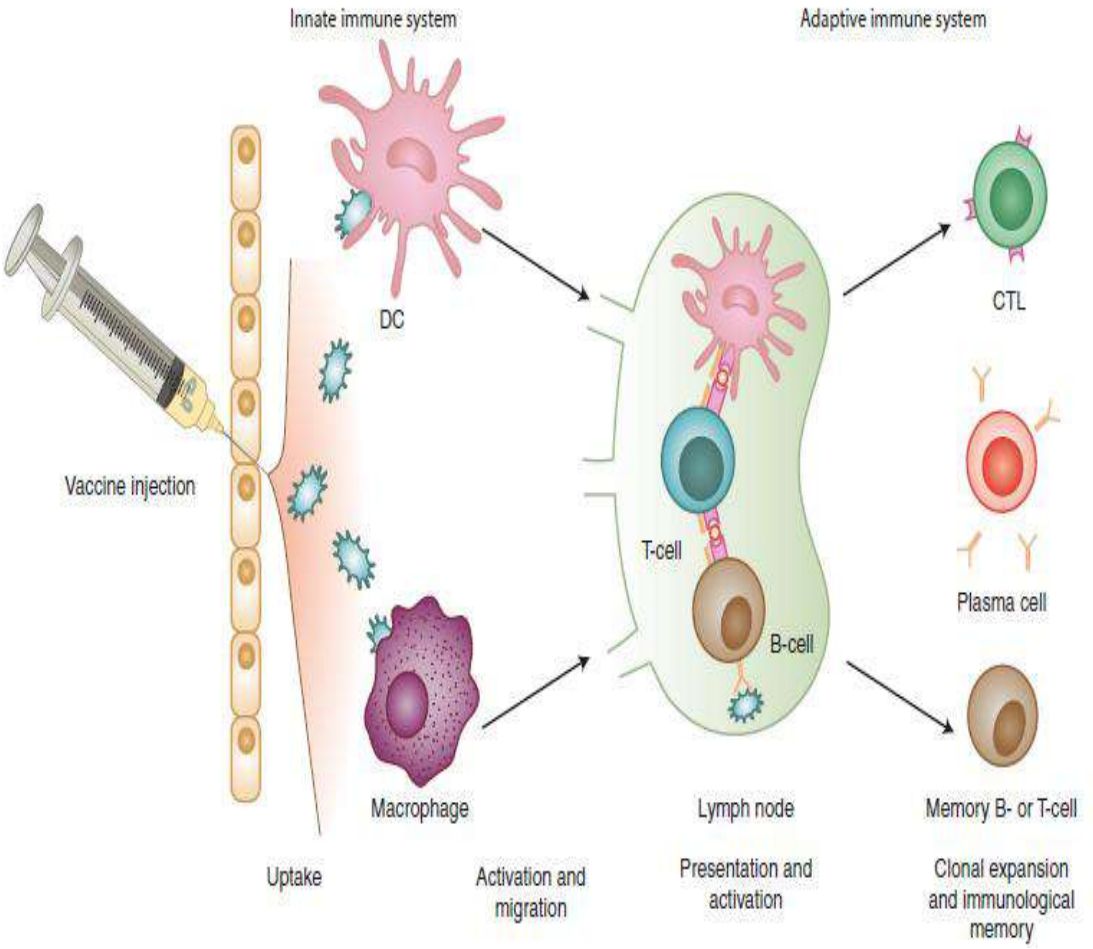




انتهت المحاضرة العاشرة والحادية عشرة

المحاضرة الثانية عشرة

Vaccines



Vaccines اللقاحات

منذ أن تم توثيق التطعيم ضد الجدري عام 1798 من قبل الطبيب الإنكليزي Edward Jenner أصبحت اللقاحات الوسيلة الأكثر نجاحًا للوقاية من الأمراض المعدية وإنقاذ حياة الملايين من الناس كل عام ، حاليًا لا يقتصر تطبيق اللقاحات على الوقاية من الأمراض المعدية فحسب بل نجد استخدامها في كثير من المجالات مثل اللقاحات العلاجية ضد الحساسية والسرطان ومرض الزهايمر وغيرها، أدى التقدم السريع والمتلاحق في علوم biotechnology، proteomics، bioinformatics إلى تطوير لقاحات فعالة وآمنة، و على الرغم من أن اللقاحات تشبه الأدوية الحيوية الأخرى مثل البروتينات العلاجية في بعض الجوانب إلا أن هناك العديد من الاختلافات المهمة والتي تُشَكل السمات الفريدة للقاحات مثل الجرعة المنخفضة و التواتر (الجدول 1) كما أن المجموعة المستهدفة هي ليست فقط المرضى ولكن كل إنسان ، وهذه الاختلافات لها تأثير كبير على متطلبات دخول اللقاح في لسوق وإطلاق دفعات اللقاح، ووضع متطلبات السلامة على قدم المساواة مع الفعالية.

Characteristic	Vaccines	Other biopharmaceuticals
Dose	Low (microgram range)	High (usually milligram range)
Frequency	Low (months – decades)	High (days – weeks)
Product group	Heterogeneous	Less heterogeneous
Characteristics	Sometimes ill-defined,	Mostly well-defined
Type of formulation	Usually a suspension or emulsion (liquid or lyophilized)	Usually a solution (liquid or lyophilized)
Indication	Mostly prophylactic	Therapeutic
Target group	Every human being	Patients
Number of active ingredients	>1 (antigen (s) and adjuvant(s))	1

Table 1 ■ Exemplary differences between vaccines and most other biopharmaceuticals

- **IMMUNOLOGICAL PRINCIPLES**

يحمي الجهاز المناعي الجسم من الإصابة بالأمراض ويدافع عنه ضد غزو الكائنات الدقيقة من فيروسات، جراثيم، وفطريات، وطفيليات، وغيرها حيث يقوم الجهاز المناعي بتمييز العوامل الممرضة pathogens ومهاجمتها والقضاء عليها ومعادلة السموم التي تفرزها، كما يقوم الجهاز المناعي أيضا بالتخلص من خلايا الأورام tumor cells والخلايا الهرمة أو الميتة، يطلق الجهاز المناعي كرد فعل على العدوى سلسلة من الاستجابات المناعية بهدف القضاء على العامل الممرض pathogen وتعد المناعة الفطرية Innate Immunity أو المناعة غير المتخصصة non-specific immunity، خط الدفاع الاول عن الجسم ضد pathogens و تعتبر غير متخصصة نظرا لعدم قدرتها على التعرف النوعي على pathogen الغازي أو احداث استجابة مناعية نوعية مخصصة له، فعلى سبيل المثال تقوم الخلايا العدلة neutrophils بمهاجمة أنواع عديدة من البكتريا بالطريقة نفسها من خلال phagocytosis and/or lysis

تتكون المناعة الفطرية من حواجز واقية وخلايا مناعية ومكونات خلطية.

1. تتضمن الحواجز الواقية : الحواجز الميكانيكية و الحواجز الكيميائية والحاجز الحيوي
   - الحواجز الميكانيكية : تعيق دخول pathogens إلى الجسم وتعتبر خط دفاع أولي، وتشمل الجلد السليم و الأغشية المخاطية التي تبطن أجزاء الجسم التي لها اتصال مع البيئة الخارجية.
   - الحواجز الكيميائية: وتتضمن حمض كلور الماء والانزيمات الحالة و حمض اللبن lactic acid والأحماض الدهنية الموجودة في العرق والتي تثبط نمو أغلب البكتريا ، اللاكتوفرين والترانسفرين lactoferrin and transferrin وهما يرتبطان بالحديد الضروري لنمو البكتريا .
   - الحاجز الحيوي: تمنع normal flora تكاثر البكتريا الممرضة في الجلد والقناة الهضمية، عن طريق منافستها على الحيز والطعام، كما تقوم بعضها بافراز lactic acid الذي يكبح نمو أغلب البكتريا الضارة،
2. المكونات الخلوية (الخلايا المناعة): وتشمل الخلايا الحبيبية granulocytes ، والخلايا القاتلة الطبيعية nature killer cells والخلايا المتغصنة dendritic cells، ووحيدات النوى/البالعات الكبيرة monocytes/macrophages .
3. المكونات الخلطية (جزيئات ذائبة في المصل) وتتضمن :
   - السيتوكينات cytokines وهي عبارة عن بروتينات اشارة تطلقها الخلايا المناعية لتتواصل فيما بينها ولتحفيز اطلاق استجابة مناعية مناسبة، كما تعمل بعض السيتوكينات كعوامل نمو growth factors تتوسط لنمو وتمايز الخلايا المناعية، وتشمل السيتوكينات كل من الانترفيرونات interferons، و الانترليوكينات interleukins التي تتكون من 12 بروتين IL1 – IL12 تنتجها الخلايا المناعية و تعتبر صلة التواصل الرئيسية بينها.
   - الجملة المتممة : تتكون من 20 بروتين تُفعل بشكل شلال تنتهي بتشكيل معقد مهاجمة الغشاء الذي يقوم بتحطيم الجدار الخلوي للبكتريا وبالتالي تحلله.
   - ديفينسين defensin : ببتيدات إيجابية الشحنة تفرز في القناة الهضمية والمجاري التنفسية السفلى، وفي بعض افرازات الجسم الأخرى مثل حليب الأم، وتحدث الديفينسينات ثقوبا في الغشاء الخلوي للبكتيريا والفطريات مما يؤدي إلى تحللها.

تكون المواجهة الأولية للـ pathogen مع المناعة الفطرية، إلّا أنه في كثير من الأحيان لا تكون قادرة على القضاء الكلي عليه وبالتالي تلعب المناعة الفطرية دورا مهما في تنشيط وتفعيل المناعة المكتسبة

Acquired Immunity والتي تتميز بالاستجابة المناعية المتخصصة، وبوجود ذاكرة مناعية تحسِّن الاستجابة المناعية مع تكرار الإصابة .

تضم المناعة المكتسبة آليات دفاعية متخصصة وهي:

- مكونات خلوية: الخلايا اللمفاوية البائية والتائية B and T lymphocytes وخلايا البلازما
- مكونات خلطية: الأضداد Antibodies

الأضداد (الغلوبولينات المناعية) : هي عبارة عن بروتينات سكرية يتم إنتاجها من قبل اللمفاويات البائية المنشطة وتضم (IgM IgG, IgA, IgE, IgD) كما هو موضح في (الجدول 2) ولها قدرة عالية على التفاعل بصورة نوعية مع المستضد antigen والذي هو عبارة عن مادة غريبة قادرة عند دخولها الجسم على احداث استجابة مناعية، وقد يكون المستضد إفرازات البكتريا أو جزيئة مكونة لها مثل الجدار الخلوي ، الأسواط ، أو قد يكون البروتينات السكرية الموجودة في غلاف الفيروسات أو أي مادة غريبة عن الجسم .

Immune response	Immune product	Accessory factors	Infectious agents
Humoral	IgG	Complement, neutrophils	Bacteria and viruses
	IgA	Alternative complement pathway	Microorganisms causing respiratory and enteric infections
	IgM	Complement, macrophages	(Encapsulated) bacteria
	IgE	Mast cells	Extracellular parasites
Cell mediated	CTL	Cytolytic proteins	Viruses, mycobacteria, intracellular parasites
	Th1	Macrophages	Mycobacteria, treponema (syphilis), fungi

Table 2 Important immune products protecting against infectious diseases

يؤدي ارتباط الضد مع المستضد النوعي إلى التخلص من المستضد من خلال تفعيل آليات معينة ويوضح الشكل -1 تمثيل تخطيطي للاستجابات المناعية المعتمدة على المستضد.

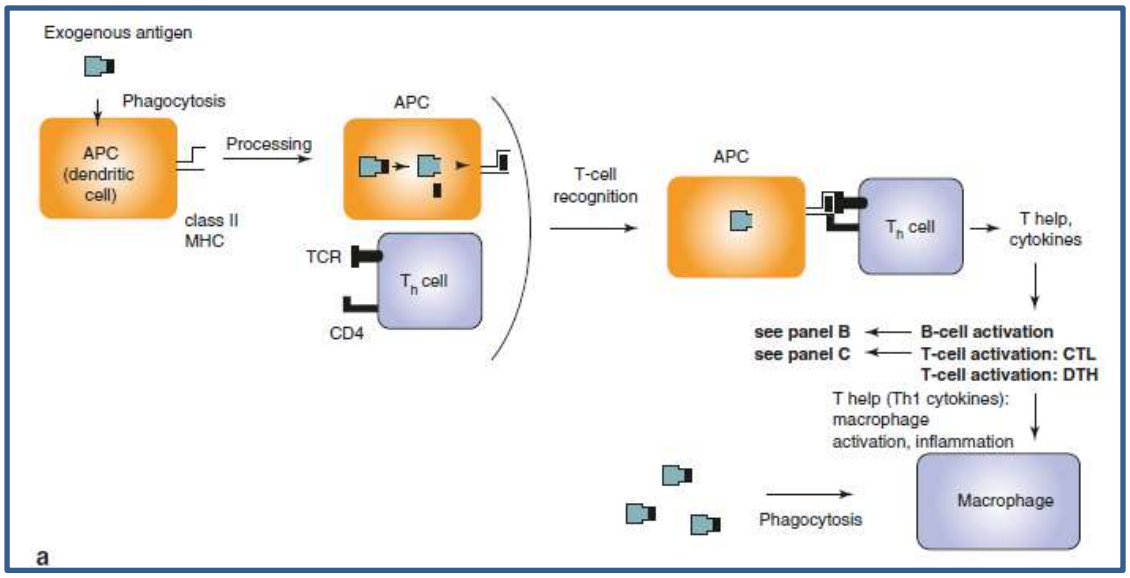
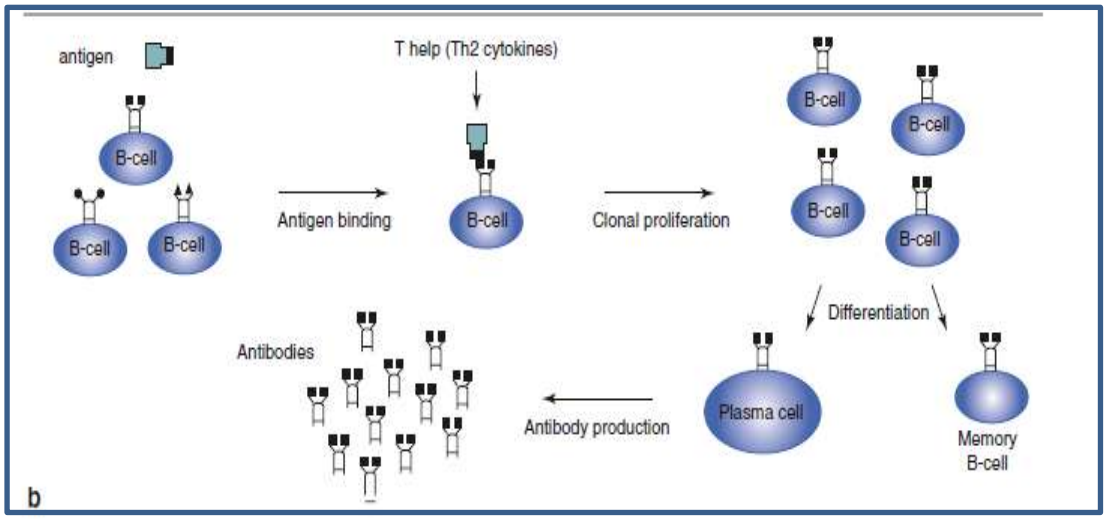
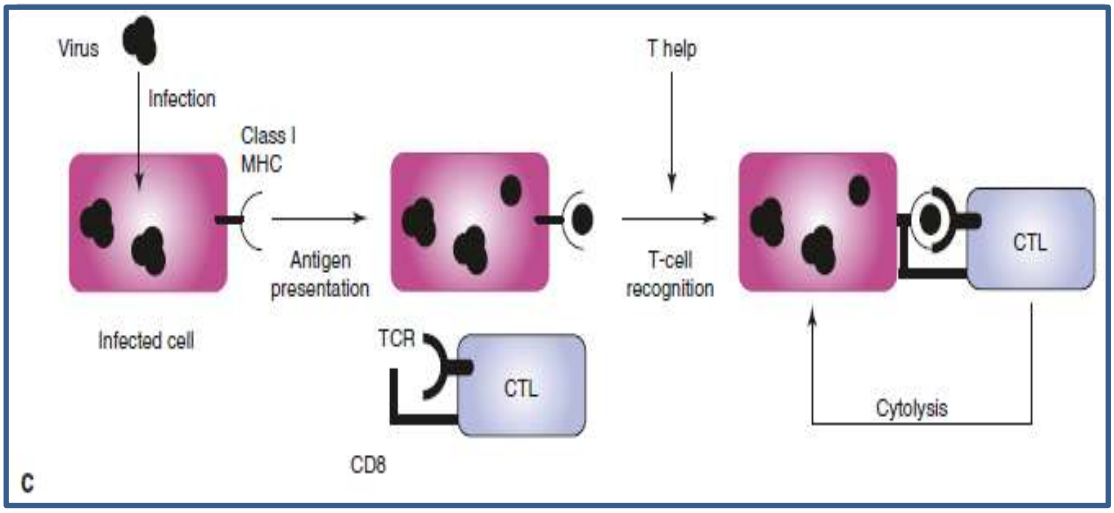


Figure 1 ■ Schematic representation of antigen-dependent immune responses.

(a) Activation of T-helper cells (Th-cells). An antigen-presenting cell (APC), e.g., a dendritic cell, phagocytoses exogenous antigens (bacteria or soluble antigens) and degrades them partially. Antigen fragments are presented by MHC class II molecules to a CD4-positive Th-cell; the MHC-antigen complex on the APC is recognized by the T-cell receptor (TCR) and CD4 molecules on the Th-cell. The APC-Th-cell interaction leads to activation of the Th-cell. The activated Th-cell produces cytokines, resulting in the activation of macrophages (Th1 help), B cells (Th2 help; panel **b**), or cytotoxic T cells (panel **c**).



(b) Antibody production. The presence of antigen and Th2-type cytokines causes proliferation and differentiation of B cells. Only B cells specific for the antigen become activated. The B cells, now called plasma cells, produce and secrete large amounts of antibody. Some B cells differentiate into memory cells.



(c) Activation of cytotoxic T lymphocytes (CTLs). CTLs recognize no self antigens expressed by MHC class I molecules on the surface of virally infected cells or tumor cells. Cytolytic pro- teins are produced by the CTL upon interaction with the target cell.

على عكس الاستجابة الفطرية تكون الاستجابة المناعية المكتسبة خاصة جدا لغزو مسببات الأمراض بسبب وجود الخلايا البائية والخلايا التائية اللتان تتميزان بالخصوصية نتيجة التراكيب الخاصة بهم : مستقبل الخلايا البائية B-cell receptor (BCR) ومستقبل الخلايا التائية T-cell receptor (TCR)، خلال الإصابة يوجه الجهاز المناعي الفطري الخلايا البائية والتائية التي تحتوي على BCRsو TCRsخاصة بها للعامل الممرض الغازي لتتكاثر وتقوم بمهامها وفي نهاية الإصابة معظم هذه الخلايا ستموت نتيجة تفعيل مسار الموت الخلوي المبرمج apoptosis ومع ذلك، فإن الاضداد التي تنتجها الخلايا البائية يمكن أن تستمر لفترة طويلة من الزمن علاوة على ذلك، فإن بعض الخلايا البائية والتائية تقاوم موت الخلايا المبرمج وتحافظ على نفسها لسنوات طويلة كخلايا ذاكرة memory B- and T-cells والتي يتم تنشيطها وانقسامها بسرعة عند تكرار نفس الإصابة .

يعتمد مبدأ اللقاح على محاكاة الإصابة بطريقة تجعل آلية الدفاع الطبيعية للمضيف ضد العامل الممرض يتم تنشيطها وتأسيس الذاكرة المناعية بدون أن يصاب المضيف بالمرض ، ويتم ذلك عن طريق إعطاء المكونات المستضدية التي تتكون منها أو تُشتَق منها أو ترتبط بها العوامل الممرضة، تكون الاستجابة المناعية محددة للغاية حيث إنها لا تميز بين أنواع مسببات الأمراض فحسب، بل أيضًا في كثير من الأحيان بين سلالات مختلفة داخل النوع الواحد على سبيل المثال سلالات المكورات السحائية، وفيروس شلل الأطفال، فيروس والأنفلونزا ، تسمح هذه الخصوصية العالية للجهاز المناعي بتوازن مثالي تقريبًا بين الاستجابة لـ المستضدات الغريبة والتسامح مع المستضدات الذاتية الشكل 2.

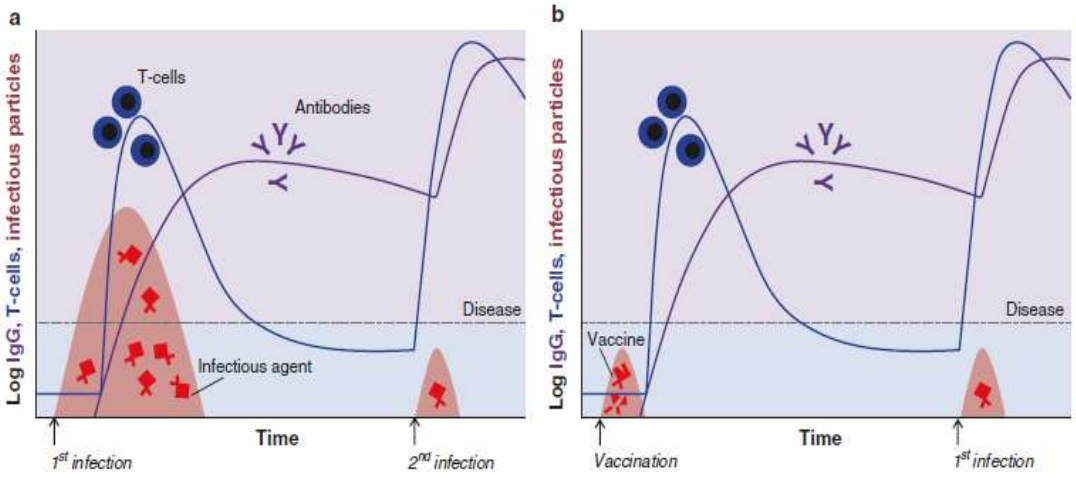


Figure 2 ■ **Principle of adaptive immune responses following infection and vaccination.** (**a**) Schematic representation of adaptive immune responses upon primary and secondary infection. Upon primary infection T- and B-cell responses take time to develop, allow- ing pathogens to proliferate and cause disease. Upon secondary infection, circulating antibodies and memory T-cells quickly respond, preventing proliferation and dissemination of the pathogen. (**b**) Application of a vaccine that induces an adaptive immune response like a natural infection, but without associated disease.

Activation of the Innate Immune System تنشيط المناعة الفطرية

كل رد فعل مناعي ضد العامل الممرض أو اللقاح يبدأ بتنشيط جهاز المناعة الفطري و على الرغم من أن تنشيط الاستجابة الفطرية نفسها لا تؤدي للذاكرة المناعية، فهي مفيدة في تنشيط وتعليم جهاز المناعة المكتسبة.، من المكونات المهمة لجهاز المناعة الفطري الخلايا مقدمة المستضد-antigen presenting cells (APCs)مثل البالعات الكبيرة macrophages والخلايا المتغصنة dendritic cells (DCs) التي تتواجد في الأنسجة، تحتوي APCs على pattern recognition receptors (PRRs) التي تسمح بالكشف عن البكتريا والفيروسات المحفوظة والتي تدعى الأنماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ومن الأمثلة على PAMPs : RNA الفيروسي ، مكونات جدار الخلية البكتيرية مثل lipopolysaccharide ، السوط وغيرها كما هو موضح في (الجدول 3) ، نظرًا لأن العوامل الممرضة تشغل خلايا مختلفة يمكن العثور على PRRs إما على سطح الخلية و endosomes (بالنسبة للبكتريا) أو في السيتوبلاسما (بالنسبة للفيروسات) ، يؤدي تنشيط PRR إلى قيام الخلايا مقدمة المستضد بعرض المستضد على سطحها من خلال آليات جزيئية تتضمن التعبير عن جزيئات (MHCII،MHCI) التي تزيد من قدرة APCs على تقديم المستضد إلى اللمفاويات التائية، أيضاً التعبير عن مستقبلات الكيموكين chemokine receptors التي تسمح للمفاويات التائية بالهجرة إليها من الأنسجة اللمفاوية الثانوية، اخيراً تحفيز السيتوكينات التي تشكل جزئيات اشارية تحفز اللمفاويات التائية أثناء عرض المستضد.

PRR	PRR location	PAMPb	Source
TLR1–TLR2	Cell surface	Triacyl lipopeptides	Bacteria
TLR2–TLR6	Cell surface	Diacyl lipopeptides	Bacteria
		Zymosan	Fungus
TLR3	Endosome	dsRNA	Virus
TLR4	Cell surface	LPS	Bacteria
TLR5	Cell surface	Flagellin	Bacteria
TLR7	Endosome	Single stranded (ss) RNA	RNA viruses
TLR8	Endosome	ssRNA	RNA viruses
TLR9	Endosome	CpG DNA	Bacteria
RIG-I	Cytosol	ssRNA and short double stranded RNA	Viruses
MDA5	Cytosol	Long dsRNA	Viruses
LGP2 (helicase)	Cytosol	RNA	Viruses
NOD1/ NLRC1	Cytosol	iE-DAP	Bacteria
NOD2/ NLRC2	Cytosol	MDP	Bacteria
		ATP	Bacteria/ host
		Uric acid, CPPD, amyloid-β	Host
NALP1/ NLRP1	Cytosol	Anthrax lethal toxin	Bacteria
IPAF/NLRC4	Cytosol	Flagellin	Bacteria
NAIP5	Cytosol	Flagellin	Bacteria

Table 3 ■ Examples of pattern recognition receptors (PRRs), their ligands (PAMPs) and source

تقديم المستضد Antigen Presentation

تشكل الأعضاء اللمفاوية المحيطية مكان الالتقاء الأولي بين الخلايا المناعية الفطرية وخلايا المناعة المكتسبة (الخلايا التائية والخلايا البائية)، و في حين تتوزع الخلايا مقدمة المستضد في جميع أنحاء الأنسجة المحيطية، توجد الخلايا التائية والبائية بشكل أساسي في الأعضاء اللمفاوية الثانوية مثل العقد اللمفاوية والطحال وPeyer's patches ، تستطيع اللمفاويات البائية التعرف على المستضدات في مكان وجودها الأصلي نتيجة وجود المستقبل BCR الذي يسمح لها بالتفاعل المباشر مع المستضد، وبالمقابل تكون اللمفاويات التائية غير قادرة على التفاعل مباشرة مع المستضد وهي بحاجة إلى وجود APCs لمعالجة المستضدات وتحويلها إلى شدف ببتيدية

(T-cell epitopes) وتقديمها إلى اللمفاويات التائية.

تنشيط اللمفاويات التائية واللمفاويات البائية B-cell and T-cell Activation

بالإضافة إلى تحفيز مستقبل الخلايا التائية TCR من خلال الببتيد المرتبط بجزيئات MHCI أو MHCII(الإشارة الأولى) تحتاج الخلايا التائية إلى الإشارة الثانية وهي التحفيز المساعد من خلال التفاعل بين accessory و co-stimulatory molecules الموجودة على الخلايا مقدمة المستضد بدون تلك الإشارة المساعدة لن تتكاثر اللمفاويات التائية الخاصة بمستضد معين، قبل و أثناء clonal expansion تتلقى اللمفاويات التائية إشارات السيتوكينات التي تحدد مصيرها (الإشارة الثالثة) من خلال تعزيز تكاثر اللمفاويات التائية و التأثير على وظيفة effector (الشكل 3)

تقوم مجموعة معينة من الخلايا التائية تدعى T-follicular helper cells (Tfhs) بتقديم المساعدة للمفاويات البائية تحت تأثير IL-6 and IL-21 وذلك من خلال تنظيم جزيئات C-X-C chemokine receptor type 5 (CXCR5)، مما يسمح لها بالهجرة إلى مناطق تواجد اللمفاويات البائية وهناك تتفاعل Tfhs مع اللمفاويات البائية التي تحمل المستضد المشابه للموجود على جزيئات MHCII، فقط اللمفاويات البائية التي تتلقى الإشارات التحفيزية المساعدة من Tfhs سوف تكون قادرة على توليد الأضداد IgG عالية الألفة أو تنضج وتشكل اللمفاويات البائية الذاكرة.

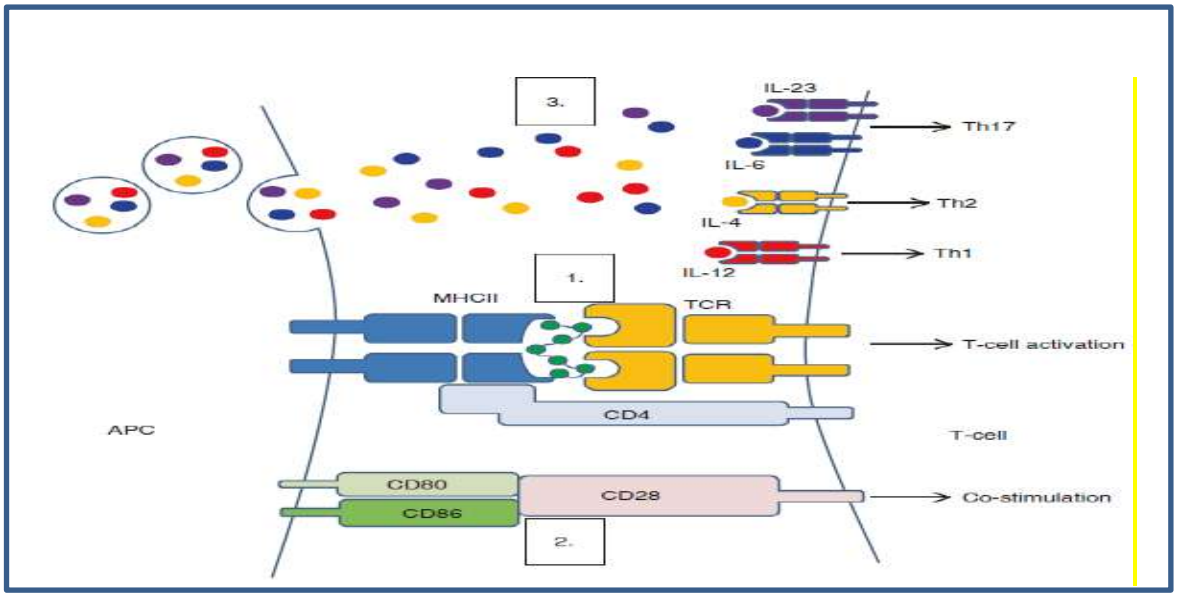


Figure 3 the 3 signals of T-helper cell activation

Antigen presentation. Peptides derived from a vaccine are loaded on MHCII 1 molecules by the APC and presented to the T-cell receptor (TCR) on T-cells. **2**. Co-stimulation. Activated APCs express co-stimulatory molecules, such as CD80/86 which support T-cell activation through interaction with CD28 on T-cells. **3**. Cytokines. APCs can produce different cytokines depending on the type of PAMP that has activated the APC. These cytokines provide a third signal to the T-cell by engaging their cognate receptors on the T-cell surface. Whereas IL-12 (red) signaling leads to Th1 polarization of the CD4+ T-cell, IL-4 (yellow) signaling induces Th2 polarization and IL-6/IL23 (blue/purple) signaling provides a pathway towards Th17 CD4+ T-cells

- **فئات اللقاحات VACCINE CATEGORIES**

يمكن تصنيف اللقاحات وفقاً للهدف من استخدامها إذا كان وقاية (لقاحات وقائية) أوعلاج (لقاحات علاجية) للأمراض، نوع المرض المراد علاجه (الأمراض المعدية، الحساسية، أمراض المناعة الذاتية، السرطان، وما إلى ذلك) ، مصدر المستضد الْمُستخدَم للتطعيم (على سبيل المثال العامل الممرض الكامل، الوحدات الفرعية، الببتيدات، الأحماض النووية) كما هو موضح في (الشكل 4) .

Classification Based on Antigen Source

تنشأ اللقاحات التقليدية من الفيروسات أو البكتيريا ويمكن تقسيمها إلى لقاحات مكونة من العوامل الممرضة الحية المُضعَفة و لقاحات مكونة من العوامل الممرضة غير الحية (المعطلة)، ولقاحات مكونة من المستضدات التي يمكنها إثارة استجابة مناعية وهي عبارة عن وحدات فرعية محددة معروفة مشتقة من العامل الممرض مثل البروتينات أو عديد السكاريد ، في الوقت الحاضر مثل هذه اللقاحات المكونة من وحدة فرعية يمكن تصنيعها بشكل مؤتلف (في حالة البروتينات)، أو عن طريق الاقتران الكيميائي مع بروتين حامل (في حالة عديد السكاريد) لتعزيز الاستجابة المناعية للمكونات المستضدية.

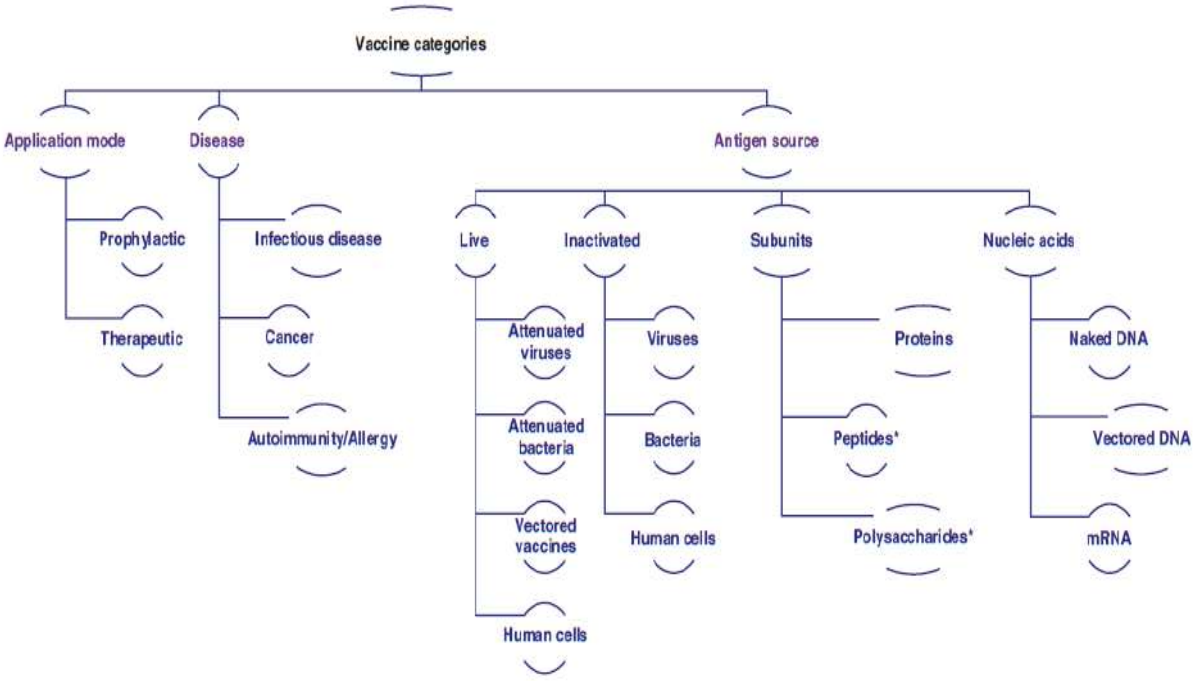


Figure 4 ■ Vaccine categories based on type of treatment, type of disease and antigen source

✓ Live Attenuated Vaccines

قبل دخول عصر الحمض النووي المأشوب او المؤتلف recombinant DNA (rDNA) كان يتم تصنيع اللقاحات الحية عن طريق التوهين attenuation للكائنات الحية الدقيقة الضارة واختيار السلالات الطافرة ذات الفوعة أو السمية المنخفضة، ومن الأمثلة على ذلك سلالات اللقاحات للقاحات الحالية مثل لقاح شلل الأطفال ، الحصبة، النكاف، الحصبة الألمانية، يوجد نهج آخر تم استخدامه وهو التطفير الكيميائي على سبيل المثال معالجة Salmonella typhi بـ nitrosoguanidine للحصول على سلالة طافرة تفتقر إلى بعض الأنزيمات المسؤولة عن الفوعة، بالرغم من أهمية اللقاحات المضعفة الحية إلا أن لها بعض العيوب مثلاً تطعيم الأطفال الذين يعانون من نقص المناعة أو البالغين الذين يعانون من نقص المناعة بهذه اللقاحات يمكن أن يؤدي إلى مضاعفات خطيرة، وبالمثل فإن المرضى الذين يستخدمون بعض الأدوية المثبطة للمناعة مثل cyclosporin, methotrexate لا ينبغي تطعيمهم بهذه اللقاحات.

Genetically Attenuated Live Vaccines

يتم الحصول على هذه اللقاحات الحية المضغفة وراثياً عن طريق الهندسة الوراثية التي مكنت من التلاعب بدورة حياة وفوعة العوامل الممرضة ومثال عليها لقاح Vaxchora للكوليرا الذي يحفز استجابة مناعية خلطية موضعية في الجسم تمنع غزو بكتريا الكوليرا لظهارة الأمعاء وحدوث الإسهال الحاد، وقد أظهرت التجارب الأولية باستخدام ذيفان الكوليرا المطفرة حدوث اسهال خفيف كان يُعتقد أنه ناجم عن التعبيرعن accessory toxins ، ثم تم عزل سلالة طافرة طبيعية كانت سلبية لهذه السموم و تمت إزالة السموم بواسطة تقانة الحمض النووي المأشوب (rDNA) للحصول على سلالة اللقاح الناتجة CVD 103 والتي كانت جيدة التحمل وأظهر المتطوعون البالغون الحماية المطلوبة

Live Vectored Vaccines

بهدف تحسين فعالية اللقاح يتم استخدام البكتيريا المضعفة أو عديمة الفوعة أو الفيروسات الحية المضعفة كناقل للتعبير عن المستضدات الهدف ويتم تعديل هذه اللقاحات الناقلة الحية عن طريق استبدال واحدة أو أكثرمن مورثات الكائن الحي الناقل بواحدة أو أكثر من المورثات الواقية من العامل الممرض باستخدام طرق الهندسة الوراثية وتعطي مثل هذه اللقاحات الحية نتائج في التعبير الفعال وطويل الأمد عن المورثات التي تُرمِز المستضدات والمورثات الواقية من العامل الممرض، يتميزاللقاح الفيروسي كناقل بعدة مزايا مثل سهولة الإنتاج، مقاومته للحرارة النسبية، وتعد الفيروسات الغدية Adenoviruses من أشيع هذه اللقاحات استخداماً.

✓ Inactivated Vaccines

النهج المعتمد لإعداد هذه اللقاحات هو تعطيل البكتيريا أو الفيروسات بأكملها وذلك باستخدام مواد كيميائية مثل glutaraldehyde (β-propriolactone,formaldehyde) أو الحرارة، من أمثلة اللقاحات المعطلة السعال الديكي ، حمى التيفوئيد، نظراً لأن هذه اللقاحات لا تتكاثر في الجسم الحي غالبًا ما يكون هناك حاجة إلى جرعة أعلى للحث على الحماية وذلك بالمقارنة مع اللقاحات المضعفة مما يعكس الزيادة في سعرها

✓ Subunit Vaccines

نظراً للتعقيد والتباين من دفعة إلى أخرى في اللقاحات التي تتكون من العوامل الممرضة الكاملة المعطلة كان النهج الأفضل استخدام وحدات فرعية مستضدية محددة من العوامل الممرضة ، مثل البروتينات وعديدات السكاريد التي يمكن الحصول عليها مباشرة بتنقيتها من العوامل الممرضة أو الحصول عليها بشكل مأشوب بالنسبة لمستضدات البروتينات، من الأمثلة على هذ اللقاحات نذكر Diphtheria Toxoid and Tetanus Toxoid Vaccines حيث تقوم بعض البكتريا مثل:

Clostridium tetani and Corynebacterium diphtheriae بتشكيل السموم عند إصابة الجسم والتي تسبب استجابة الجهاز المناعي عن طريق إنتاج الأضداد النوعية وهذه السموم عبارة عن بروتينات يتم تعطيلها بواسطة formaldehyde لإدراجها في اللقاحات، إن الاستجابة المناعية لمثل هذه السموم منخفضة نسبياً و يتم تحسينها عن طريق إضافة aluminum salts و هذا المزيج من المستضد والعوامل المساعدة لايزال يُستخدَم في اللقاحات المركبة

- Recombinant Subunit Vaccines

لتحسين المردود، وتسهيل الإنتاج و/أو تحسين سلامة اللقاحات البروتينية يتم إنتاج المستضدات في الوقت الحاضر بشكل متكرر، أي يتم التعبير عنها بواسطة الخلايا المضيفة الآمنة في التعامل معها والتي تسمح بمستويات عالية من التعبير، مثل البكتريا والخمائر وخلايا الحشرات و النباتات وخطوط خلايا الثدييات، وعلى سبيل المثال المستضد Hepatitis B surface antigen (HBsAg) الذي تم الحصول عليه سابقاً من مصل الأشخاص المصابين حالياً يتم التعبير عنه في خلايا الخميرة Saccharomyces cerevisiae وفي خلايا الثدييات، مثل خلايا مبيض الهامستر الصيني عن طريق تحوير الخلية المضيفة ببلاسميد يحتوي على المورثة التي ترمز المستضد HBsAg ، ينتج عن كلا نظامي التعبير الجيني 22nm HBsAg particles والتي تتطابق هيكليًا مع الفيروس الأصلي، لقد أصبح اللقاح المشتق من الخميرة متاحًا في جميع أنحاء العالم وهو آمن وفعال مثل اللقاح الكلاسيكي المشتق من المصل.

- ✓ Nucleic Acid Vaccines

التطعيم بلقاحات الحمض النووي يشمل إعطاء المادة الوراثية (الحمض النووي للبلاسميد أو الحمض النووي الريبي الرسول (mRNA) الذي يرمز المستضد الهدف والذي يتم التعبيرعنه في الخلايا المضيفة) وبعد ذلك حدوث استجابة مناعية ضد المستضد المعبر عنه ، توفر لقاحات الحمض النووي سلامة لقاحات الوحدة الفرعية و مزايا اللقاحات المؤتلفة الحية حيث يمكنهم تحفيز استجابات قوية ضد المستضدات المرغوبة ويوضح (الجدول 4) النقاط الإيجابية والسلبية في لقاحات الحمض النووي.

Advantages	Disadvantages
Low intrinsic immunogenicity	Effects of long-term expression unknown
Induction of long-term immune responses	Formation of antinucleic acid antibodies possible
Induction of both humoral and cellular immune responses	Possible integration of the vaccine DNA into the host genome
Possibility of constructing multiple epitope plasmids	Concept restricted to peptide and protein antigens
Heat stability	Poor delivery
Ease of large-scale production	Poorly immunogenic in man

Table 4 ■ Advantages and disadvantages of nucleic acid vaccines

mRNA Vaccines

لاقت لقاحات الحمض النووي الريبي في السنوات الأخيرة الاهتمام الكبير بسبب سلامتها ، تعزيز المناعة مقارنة بلقاحات DNA البلاسميدي، استخدام لقاحات mRNA مثالي في الأورام للتعبير عن المستضدات الورمية . في البداية لاقى التعامل مع لقاحات تعتمد على الحمض النووي الريبي مشاكل في الاستقرار ، سوء التعبير ، تعزيز المناعة ،إطالة أمد التعبير البروتيني، إلى أن تم تعديل mRNAs: إما كيميائيا (تشمل كل من تعديلات العمود الفقري للحمض النووي الريبي و النيوكليوزيد والتسلسل) ، أو صياغتها في جزيئات نانوية nanocarriers مثل (protamine nanoparticles) والتي سمحت بالتمسخ البطئ لـ mRNA، أظهرت لقاحات mRNA المعدلة استجابات مناعية قوية في النماذج الحيوانية ويتم اختبارها حاليًا في التجارب السريرية، على سبيل المثال لعلاج سرطان البروستات وسرطان الرئة من نمط non-small cell lung carcinoma، وقد أثبتت وجود استجابات مناعية نوعية ضد المستضد عند معظم المرضى، أحد عيوب اللقاحات المعتمدة على mRNA هو طبيعتها العابرة أي غالبًا ما تؤدي إلى التعبير عن المستضد لفترة قصيرة وبالتالي غير مناسبة لتنشيط المناعة بشكل سليم، تم التغلب على ذلك عن طريق الاستفادة من التضخيم الذاتي للـ RNAs بالاعتماد على أليات تكاثر alphavirus، أربعة مورثات من فيروس alphavirus مسؤولة عن تكرار الحمض النووي الريبي (RNA) تشارك في التعبير مع المورثة التي ترمز المستضد المطلوب ويؤدي إعداء الخلايا بـ single RNA إلى تعبير طويل الأمد للمستضد وأكثر بما يعادل 10-50 ضعف كما هو موضح في (الشكل 5).

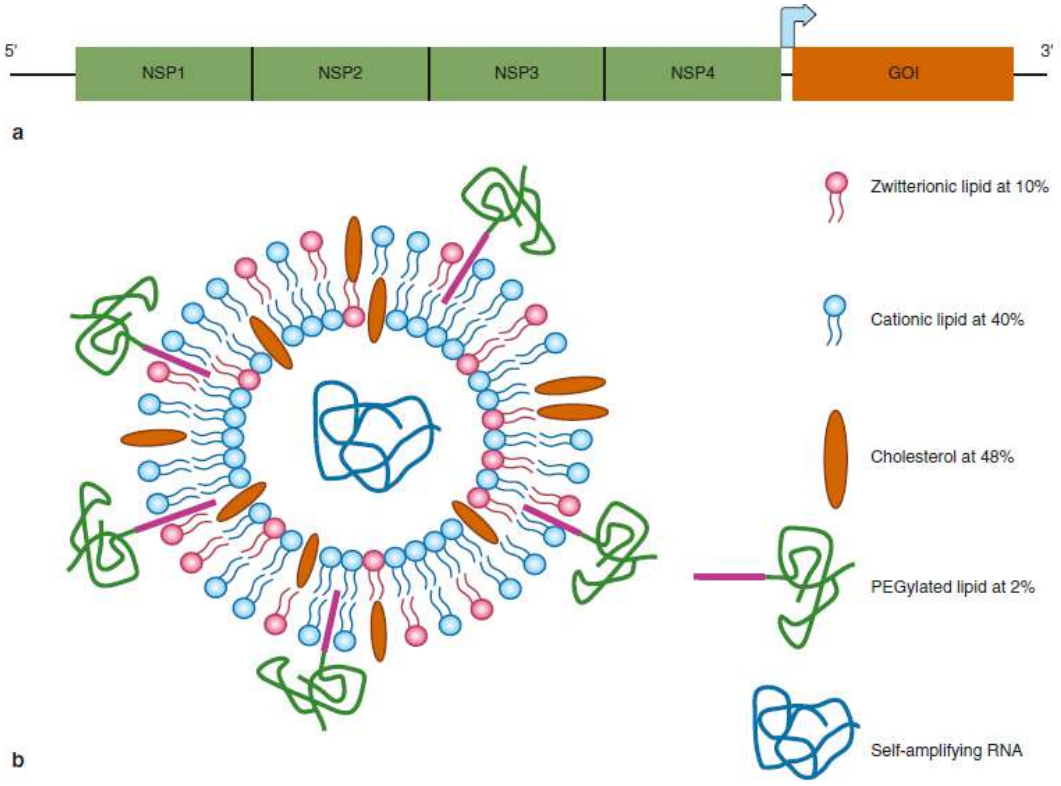


Figure 5 ■ Schematic illustration of an exemplary RNA vaccine.
(**a**) Schematic illustration of an RNA construct encoding alphavirus-derived self-amplifying RNA. The RNA contains a 5′ cap, nonstructural genes for RNA replication (NSP1–4), a 26S subgenomic promoter (blue arrow), the gene of interest (GOI), and a 3′ polyadenylated tail. (**b**) Schematic illustration of a lipid nanoparticle encapsulating self-amplifying RNA, with the molar percentages of lipid components as indicated.

Delivery of Nucleic Acid Vaccines

نظرًا لأن الأحماض النووية لا تدخل الخلايا بسهولة ولكنها تتطلب ناقل لإيصالها لداخل الخلايا في شكلها السليم بما يضمن فعاليتها، وبالتالي التطبيق العلاجي لهذه الجزيئات الحيوية يتطلب أساليب أو أنظمة توصيل متطورة، تعد naked nucleic acids وسيلة جيدة لأغراض التطعيم في البشر و الحيوانات عن طريق الحقن العضلي حيث يتم التعبير عن البروتين الهدف على سطح الخلايا المضيفة ويمكن أن يستمر التعبير لأكثر من عام بعد حقنة واحدة ، كما يمكن استخدام الطرق الفيزيائية لإيصال الحمض النووي مثل

- using a gene gun to inject DNA-coated gold nanoparticles into the epidermis
- jet-injectors, electroporation and DNA tattooing

أيضاً يمكن إيصال الأحماض النووية عن طريق lipidic or polymeric nanocarriers وتتميز بأنها تنشط المناعة وتحمي الأحماض النووية من التدرك المبكر وتعزز cellular uptake، إلى جانب الناقلات النانوية يمكن استخدام الفيروسات كناقل لعدة أسباب منها: القدرة على استيعاب كميات كبيرة من الحمض النووي في الجينوم الخاص بها بنجاح، التاريخ السابق للاستخدام واسع النطاق والناجح كعامل تطعيم ، القدرة على الحصول على مناعة طويلة الأمد، سهولة الإنتاج وانخفاض تكاليف الإنتاج، استقرار منتج اللقاح النهائي المجفف بالتجميد، من الأمثلة على النواقل الفيروسية نذكر فيروسات الجدري مثل fowl pox and canarypox viruses التي يمكن أن تصيب خلايا الثدييات ، الفيروسات الغدية Adenoviruses، الفيروسات الغدية المأشوبة التي تحتوي على جين المستضد السطحي لالتهاب الكبد B، يوضح (الشكل 6) النهج المتبع لدمج مورثة تعبر عن مستضد نوعي في العامل الممرض مع جينوم الفيروس لإيصاله إلى الخلية .

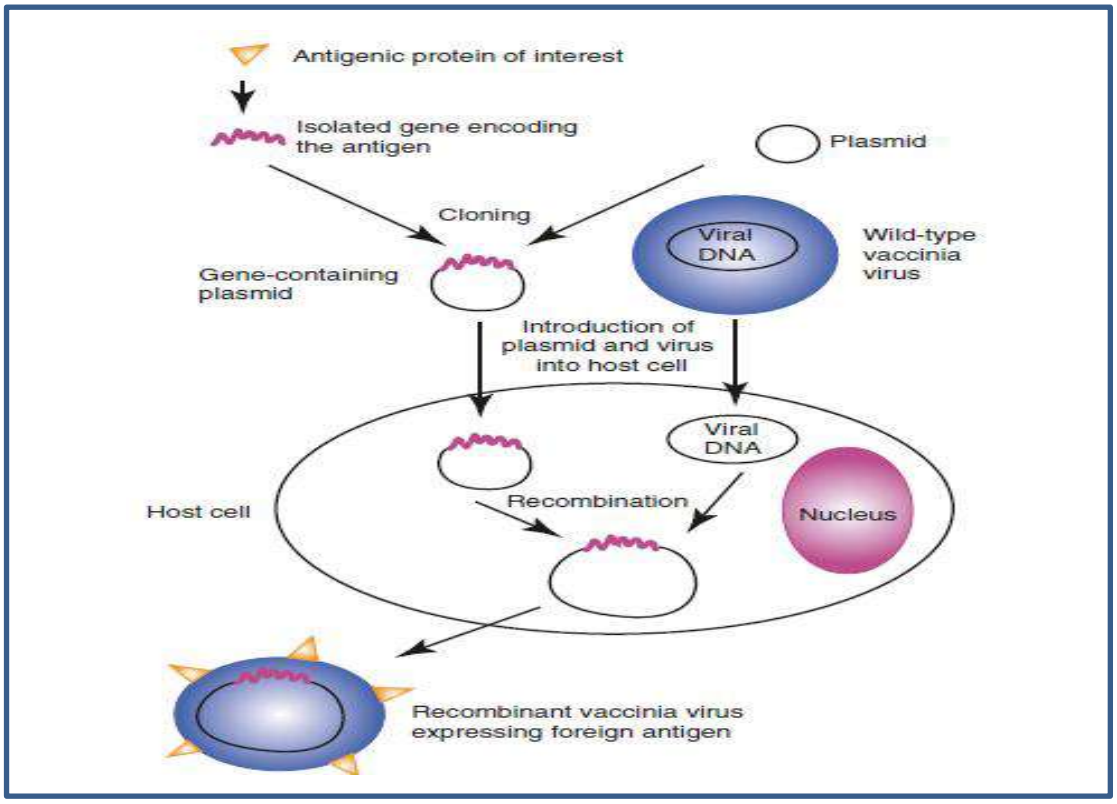


Figure 6 ■ Construction of recombinant vaccinia virus as a vector of foreign protein antigens. The gene of interest encoding an immunogenic protein is inserted into a plasmid. The plasmid containing the protein gene and wild-type vaccinia virus are then simultaneously introduced into a host cell line to undergo recombination of viral and plasmid DNA, after which the foreign protein is expressed by the recombinant virus

Therapeutic Vaccines

معظم تطبيقات اللقاحات الكلاسيكية وقائية أي أنها تمنع تطور مرض معد، إلى جانب التطبيقات الوقائية يتم استخدام اللقاحات لعلاج الأمراض مثل الأمراض المعدية والسرطان والاضطرابات الالتهابية وغيرها، على الرغم من أن تطوير اللقاحات العلاجية لا يزال في بدايته خاصة في مجال لقاحات السرطان إلا أن الأفكار و الأبحاث تتقدم بسرعة وسيتم تسليط الضوء على بعض الأمثلة.

✓ Cancer Vaccines

السرطان عبارة عن انقسام غير منضبط للخلايا مع إمكانية الغزو والانتقال إلى أجزاء أخرى من الجسم، قد يحدث نتيجة عوامل وراثية متل الطفرات ، عوامل بيئية ، التآثر بين العوامل الوراثية والبيئية، عوامل فيزيائية، عوامل كيميائية وغيرها، قد تؤدي الطفرات إلى تغييرات طفيفة في المستضدات للخلايا السرطانية (تدعى بالمستضدات الورمية) بالمقارنة مع الخلايا السليمة وهذا هو الأساس لتطوير لقاحات السرطان العلاجية التي تهدف إلى تحفيز استجابات مناعية خلوية محددة وتضم هذه اللقاحات:

- Tumor-Associated Antigen Vaccines

ركزت التجارب السريرية على لقاحات السرطان في البداية على استخدام مستضد واحد مرتبط بالورم مثل (melanoma-associated antigen-1, prostate-specific antigen)، ثم خليط من مستضدات غير محددة من حُلالة خلية الورم بأكملها، أو الخلايا الورمية بأكملها والتي قد تكون autologous tumor cells معزولة مباشرة من المرضى أو allogeneic tumor cells تم تعديلها وراثياً لتعبر عن السيتوكينات أو غيرها من الجزيئات المحفزة للمناعة، ميزة استخدام الخلايا الورمية بأكملها وجود مجموعة واسعة من المستضدات الخاصة للورم والتي يمكن أن تؤدي إلى استجابات مناعية نوعية للورم .

- Neoantigen Vaccines

تعد Neoantigen مفضلة للاستخدام في لقاحات السرطان، لأنها تسلسلات بروتينية غريبة غير موجودة في الأنسجة السليمة، ونظراً لأن معظم Neoantigen فريدة بالنسبة للورم لدى الفرد، فإن التطعيم بها يتطلب نهجًا شخصيًا حيث يتم تعديل تركيبة اللقاح وفقًا لاحتياجات المريض وهذا إجراء مكلف ويجب تنفيذه بسرعة لأن المريض ينتظر العلاج، تم تطبيق هذه اللقاحات لعلاج سرطان عنق الرحم و سرطان الجلد.

✓ Vaccines Against Alzheimer's Disease

مرض الزهايمر هو مرض تنكسي عصبي يتميز بتكوين amyloid plaque في الدماغ ، اللقاحات التي تحفز تشكل الاضداد ضد the aggregated form of amyloid-β أو ضد protein tau المرتبطة بالأنيبيبات الدقيقة تم اختبارها في التجارب السريرية ، عانت التجارب الأولية من خطورة الآثار الجانبية الناجمة عن تنشيط الخلايا التائية ولكن تم تدارك هذه المشكلة في التجارب اللاحقة والتي أظهرت ملامح سلامة جيدة، على الرغم من أن الأضداد تلعب دوراً في تباطؤ تطور المرض إلا أن مرض الزهايمر هو مرض معقد ومن الصعب للغاية عكس الضرر الناتج عن تجمع في amyloid plaque بواسطة التطعيم وبالتالي يعد التشخيص المبكر في غاية الأهمية.

- **PHARMACEUTICAL ASPECTS**

1. Production

باستثناء البيتيدات الاصطناعية، يتم اشتقاق المكونات المستضدية في اللقاحات من الكائنات الحية الدقيقة أو الخلايا الحيوانية ، والتي يمكن تعديلها وراثياً للتعبير الأمثل عن مكون / مكونات اللقاح المطلوبة ، يتم استخدام الخلايا الحيوانية لزراعة الفيروسات وإنتاج بعض مكونات لقاح الوحدة الفرعية وتتميز هذه الخلايا بإفراز مكونات اللقاح في وسط الزرع، مع ذلك تسبب بعض الفيروسات تحلل الخلايا وبالتالي وسط الزرع سوف يحتوي على تركيزات عالية من بروتينات الخلية المضيفة و الحمض النووي للخلية المضيفة مما يتطلب خطوات تنقية واسعة، يمكن تمييز ثلاث مراحل في تصنيع اللقاحات المشتقة من الخلايا:

- cultivation or upstream processing
- purification or downstream processing
- formulation

2. Formulation

Adjuvants: Immune Potentiators and Delivery Systems

تعد صياغة اللقاح واحدة من أهم العوامل التي تؤثر على نوع الاستجابة المناعية التي يتم تحفيزها لأنها تحدد نوع co-stimulatory molecules وأيضاً السيتوكينات التي سيتم التعبير عنها من قبل الخلايا التائية بعد قيام الخلايا مقدمة المستضد APCs بعرض المستضد على سطحها في الأعضاء اللمفاوية المحيطية ، والتالي تكون APCs قادرة إلى حد ما على "استشعار" نوع اللقاح الذي تتم مواجهته، على سبيل المثال العوامل الممرضة أو اللقاحات التي تحتوي على lipoproteins or peptidoglycans سوف تؤدي إلى تحفيز DCs بواسطة TLR-2، الذي يسبب في الغالب استجابة T-helper 2، في حين تحفيز DCs من خلال TLR-3 أو TLR-9 سوف يسبب استجابات قوية لـ T-helper 1 و Cytotoxic T lymphocyte ، لذلك ينبغي صياغة اللقاحات بطريقة تحفز استجابة الخلايا التائية المناسبة ، ومن الممكن القيام بذلك عن طريق تقديم المستضد بشكله الطبيعي، كما هو الحال بالنسبة للقاحات الحية المضعفة أو عن طريق صياغة المستضد الأصلي مع المواد المساعدة التي تحفز الاستجابة المطلوبة.

يعد توصيل المستضد إلى الخلايا مقدمة المستضد والخلايا البائية أمرًا بالغ الأهمية وتدعى Immune stimulatory molecules and systems delivery بالمساعدات adjuvants والتي يمكن تعريفها على أنها أي مادة يمكن أن تزيد أو تعدل الاستجابة المناعية ضد المستضد وتستطيع المساعدات أن تحفز الجهاز المناعي بعدة طرق:

- a depot effect leading to slow antigen release and prolonged antigen presentation.
- attraction and stimulation of APCs by some local tissue damage and binding to PRRs present on or in APCs
- delivery of the antigen to regional lymph nodes by improved antigen uptake, transport, and presentation by APCs.

يتم استخدام Colloidal aluminum salts (hydroxide, phosphate) بشكل كبير كمساعدات في العديد من تركيبات اللقاحات الكلاسيكية، من المساعدات الأخرى التي تم طرحها في بعض اللقاحات نذكر monophosphoryl lipid A في لقاح HPV و oil-in-water emulsions في لقاحات influenza ، يوضح (الجدول 5) بعض الأمثلة عن المساعدات المعروفة.

Immune potentiators	Examples	Characteristics
Bacterial origin		
Triacyl lipopeptides	Pam3Cys; Pam3CSK4	TLR1–TLR2 agonists
Diacyl lipopeptides	Pam2Cys; MALP2	TLR2–TLR6 agonists
LPS analogs	MPL; RC-529	Endotoxins; TLR4 agonists
Cell wall components	Peptidoglycan; muramyl peptides	TLR2–TLR4 agonists
Flagellin		TLR5 agonist
CpG DNA		TLR9 agonist
Toxins	Cholera toxin B subunit; heat labile enterotoxin subunit B	
Viral origin		
Double stranded RNA	Poly(I:C); poly(rA:rU)	TLR3 agonists
Guanoside analogs	Imiquimod; resiquimod	TLR7–TLR8 agonists

Table 5 ■ Examples of adjuvants used in vaccine formulations

- Combination Vaccines

كان نهج مزج اللقاحات الفردية من أجل الحد من عدد الحقن شائعاً منذ عقود عديدة ، حاليًا تتوفر لقاحات تحتوي على ما يصل إلى ستة مستضدات ليست ذات صلة مثل لقاحات:

influenzae type b polio-Hemophilus-diphtheria-tetanus-pertussis-hepatitis B vaccine

لقاح MMR قد يكون بمفرده أو مجتمعًا مع لقاح varicella

أما لقاح Pneumococcal conjugate vaccine 13 (PCV13) يحتوي هذا اللقاح على polysaccharides من 13 سلالة من المكورات الرئوية مترافقة مع carrier protein لتوفير التعرف على الخلايا التائية المساعدة، و النتيجة، تحفيز الذاكرة المناعية.

يؤدي الجمع بين مكونات اللقاح في بعض الأحيان إلى مشاكل دوائية ومناعية، على سبيل المثال المكونات التي تحتوي على formaldehyde قد تتفاعل كيميائيا مع المكونات الأخرى، قد يحتاج المستضد غير المستقر إلى التجفيف بالتجميد بينما لا ينبغي تجميد المستضدات الأخرى، في بعض الأحيان يمكن خلط المكونات غير المتوافقة قبل الحقن إذا لم يكن هناك عدم توافق على المدى القصير ولهذه الغاية تم تطوير cartridges ذات حجرة مزدوجة.

3. Characterization

يجب أن تستوفي اللقاحات الحديثة معايير مماثلة مثل عقاقير التقانة الحيوية الأخرى، ولقد اصبح استخدام أحدث التقنيات التحليلية لتصميم وإطلاق لقاحات جديدة يكتسب أهمية متزايدة، حالياً هناك ضرورة لتجارب على الحيوانات لمراقبة جودة العديد من اللقاحات ولكن التقنيات التحليلية في المختبر قد تفعل ذلك في النهاية (جزئيًا) كاختبارات بديلة في الجسم الحي، يتم استخدام العديد من التقنيات التي توفر معلومات حول نقاء، الوزن الجزيئي، الخواص الفيزيائية الكيميائية للمستضدات مثل الكروماتوغرافيا Column chromatographic (HPLC) ، تقانة الرحلان الكهربائي التي تضم الرحلان الكهربائي الشعري capillary electrophoresis والرحلان الكهربائي على الهلام gel electrophoresis ، تشمل المقايسات الفيزيائية الكيميائية mass spectrometry and spectroscopy، كما تعتبر Immunochemical assays مثل enzyme linked immunoassays من الطرق القوية للقياس الكمي للمستضد (المستضدات) وباستخدام الاضداد وحيدة النسيلة يمكن الحصول على معلومات حول شكل وإمكانية الوصول إلى epitope التي يتم توجيه الاضداد إليها، بالإضافة إلى ذلك فإن استخدام biosensors يجعل من الممكن قياس تفاعلات الضد - المستضد اللحظي مما يسمح بتحديد دقيق لـ affinity constants and binding kinetics .

4. Storage

بالاعتماد على خصائصها المحددة، يتم تخزين اللقاحات كمحلول أو كتركيب مجفف بالتجميد عادة عند 8-2 درجة مئوية، تعتمد مدة صلاحيتها على التركيب والخصائص الفيزيائية والكيميائية لتركيبة اللقاح وعلى ظروف التخزين وعادة ما تكون في حدود عدة سنوات، يمكن أن تؤثر جودة the primary container على المدى الطويل على استقرار اللقاحات، على سبيل المثال من خلال الامتزاز أو تغيرات الرقم الهيدروجيني pH الناتجة عن ملامسة جدار القارورة أو سدادة قارورة.، استخدام مؤشرات الرقم الهيدروجيني أو درجة الحرارة أو الملصقات الحساسة للوقت ("vial vaccine monitors," التي تغير لونها عندما تتعرض لفترة طويلة لارتفاع شديد في درجة الحرارة) يمكن أن تجنب بعض الآثار غير المقصودة من لقاح مخزن بشكل غير مناسب.

انتهت المحاضرة الثانية عشرة