

Nové typy farmak připravovaných metodami genového inženýrství

Jiří Doškař

6. 9. 2017

XIX. Ročník kurzu pro učitele středních škol

Farmakologicky významné látky připravované metodami genového inženýrství

- Hormony (inzulin)
- Růstové faktory (somatotropin)
- **Vakcíny**
- **Protilátky**
- **Abzymy**
- Další biologicky aktivní látky (interferon, krevní srážecí faktory aj)

Přehled hlavních typů vakcín

A. vakcíny vyrobené tradiční technologií:

- živá vakcína
 - virulentní (dnes se již nepoužívá)
 - heterologní (příbuzný patogen)
 - atenuovaná
- inaktivovaná vakcína
 - celobuněčná
 - toxoidová (toxin zbavený toxicity)
- subjednotková
 - s purifikovaným antigenem
 - se syntetickým antigenem
 - ribozomální

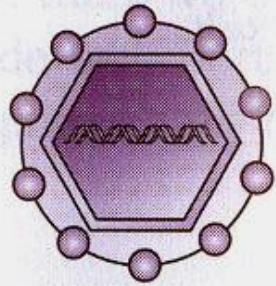
B. rekombinantní vakcíny

- subjednotková
 - s deletovaným genem pro virulenci
 - vektorová

C. DNA vakcíny

D. antiidiotypové vakcíny - Vakcína připravená z protilátek, které považují jiné protilátky za antigen a naváží se na ně. Antiidiotypové vakcíny mohou stimulovat organismus k vytváření protilátky proti nádorovým buňkám

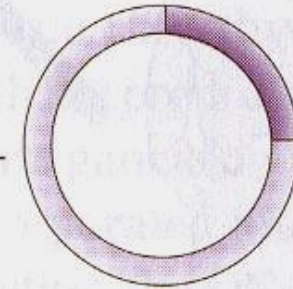
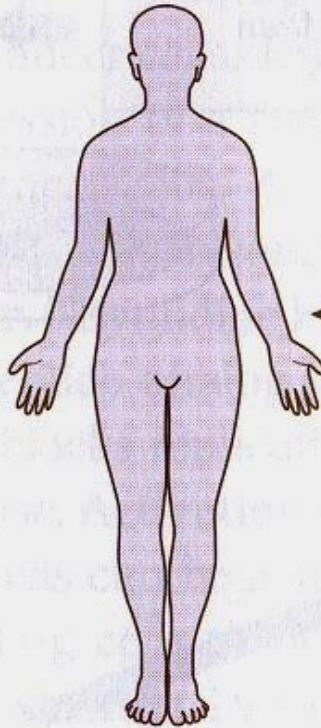
Konvenční způsoby vakcinace a DNA-vakcinace



Usmrcený nebo
atenuovaný patogen

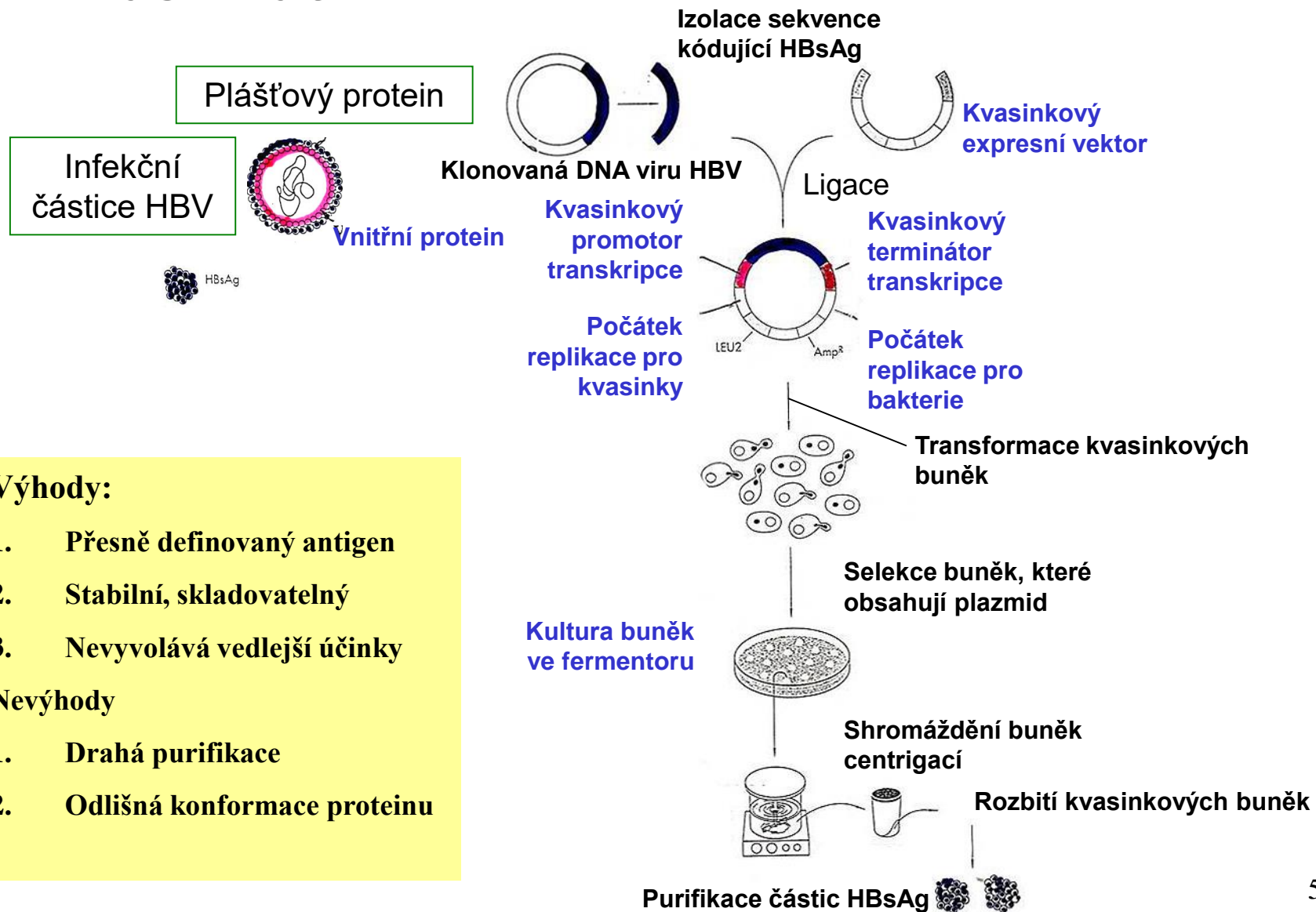


Proteinová
podjednotka patogena
= antigen



DNA vakcinace
do těla je vnesena
DNA, která kóduje
tvorbu antigenu

Příprava podjednotkové vakcíny viru HBV v kvasinkách



Výhody:

1. Přesně definovaný antigen
2. Stabilní, skladovatelný
3. Nevyvolává vedlejší účinky

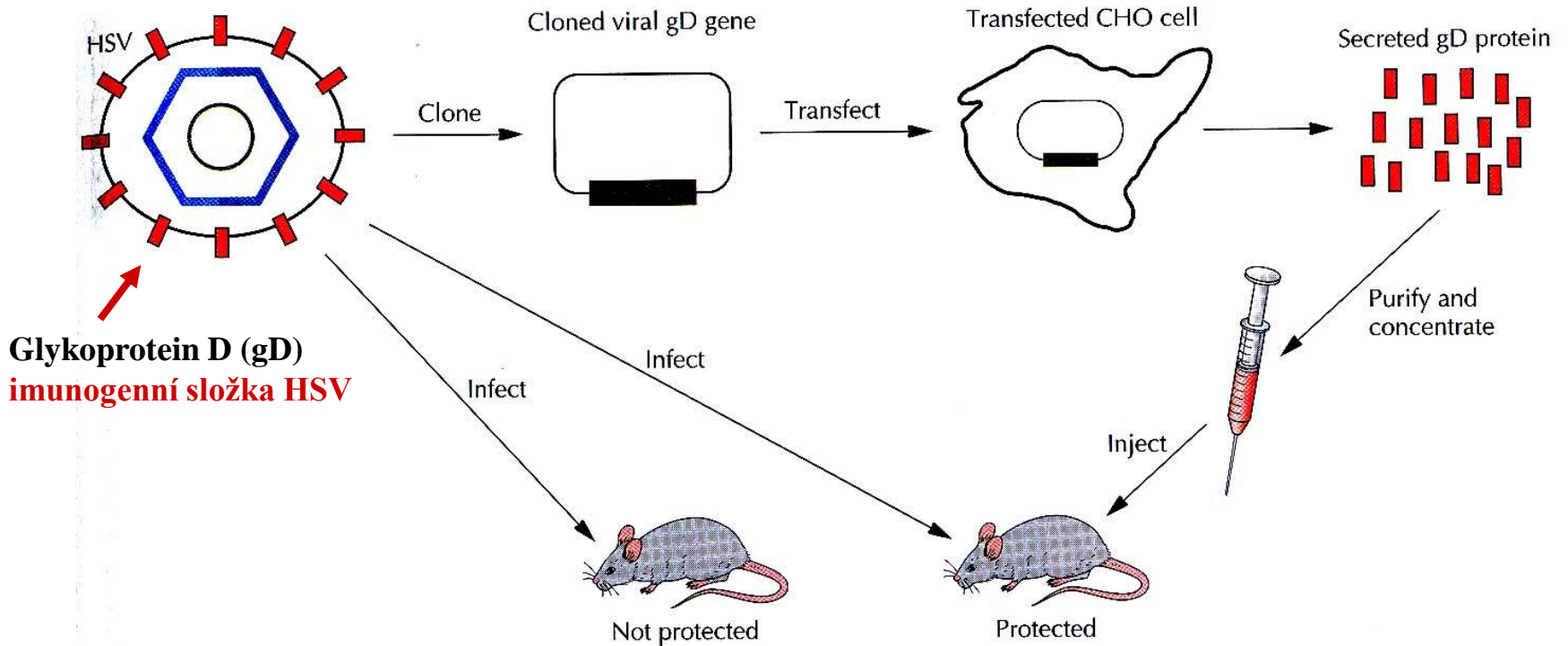
Nevýhody

1. Drahá purifikace
2. Odlišná konformace proteinu

Patogeny vyvolávající lidská onemocnění vůči nimž jsou připravovány rekombinantní vakcíny

Viruses	
Varicella-zoster virus	Chicken pox
Cytomegalovirus	Infection in infants and immunocompromised patients
Dengue virus	Hemorrhagic fever
Hepatitis A virus	High fever, liver damage
Hepatitis B virus	Long-term liver damage
Herpes simplex virus type 2	Genital ulcers
Influenza A and B viruses	Acute respiratory disease
Japanese encephalitis virus	Encephalitis
Parainfluenza virus	Inflammation of the upper respiratory tract
Rabies virus	Encephalitis
Respiratory syncytial virus	Upper and lower respiratory tract lesions
Rotavirus	Acute infantile gastroenteritis
Yellow fever virus	Lesions of heart, kidney, and liver
Human immunodeficiency virus	AIDS
Bacteria	
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera
<i>E. coli</i> enterotoxin strains	Diarrheal disease
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorrhea
<i>Haemophilus influenzae</i>	Meningitis, septicemic conditions
<i>Mycobacterium leprae</i>	Leprosy
<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningitis
<i>Bordetella pertussis</i>	Whooping cough
<i>Shigella</i> strains	Dysentery
<i>Streptococcus</i> group A	Scarlet fever, rheumatic fever, throat infection
<i>Streptococcus</i> group B	Sepsis, urogenital tract infection
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumonia, meningitis
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanus
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis
<i>Salmonella typhi</i>	Typhoid fever
Parasites	
<i>Onchocerca volvulus</i>	River blindness
<i>Leishmania</i> spp.	Internal and external lesions
<i>Plasmodium</i> spp.	Malaria
<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomiasis
<i>Trypanosoma</i> spp.	Sleeping sickness
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Filariasis

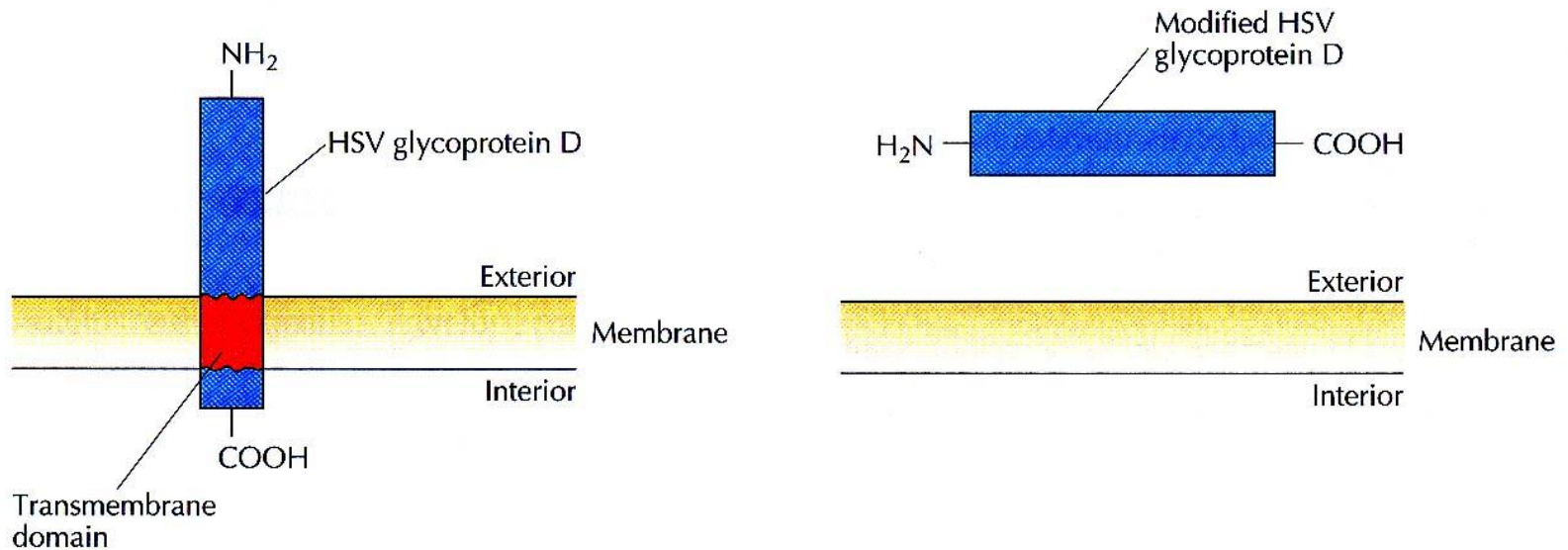
Příprava podjednotkové vakcíny proti viru herpes simplex (HSV) v buňkách CHO (chinese hamster ovary)



HSV – onkogenní virus, sexuálně přenosná onemocnění, encefalitida, infekce oka

Úprava genu pro plášťový glykoprotein (gD) HSV pro získání rozpustné formy gD

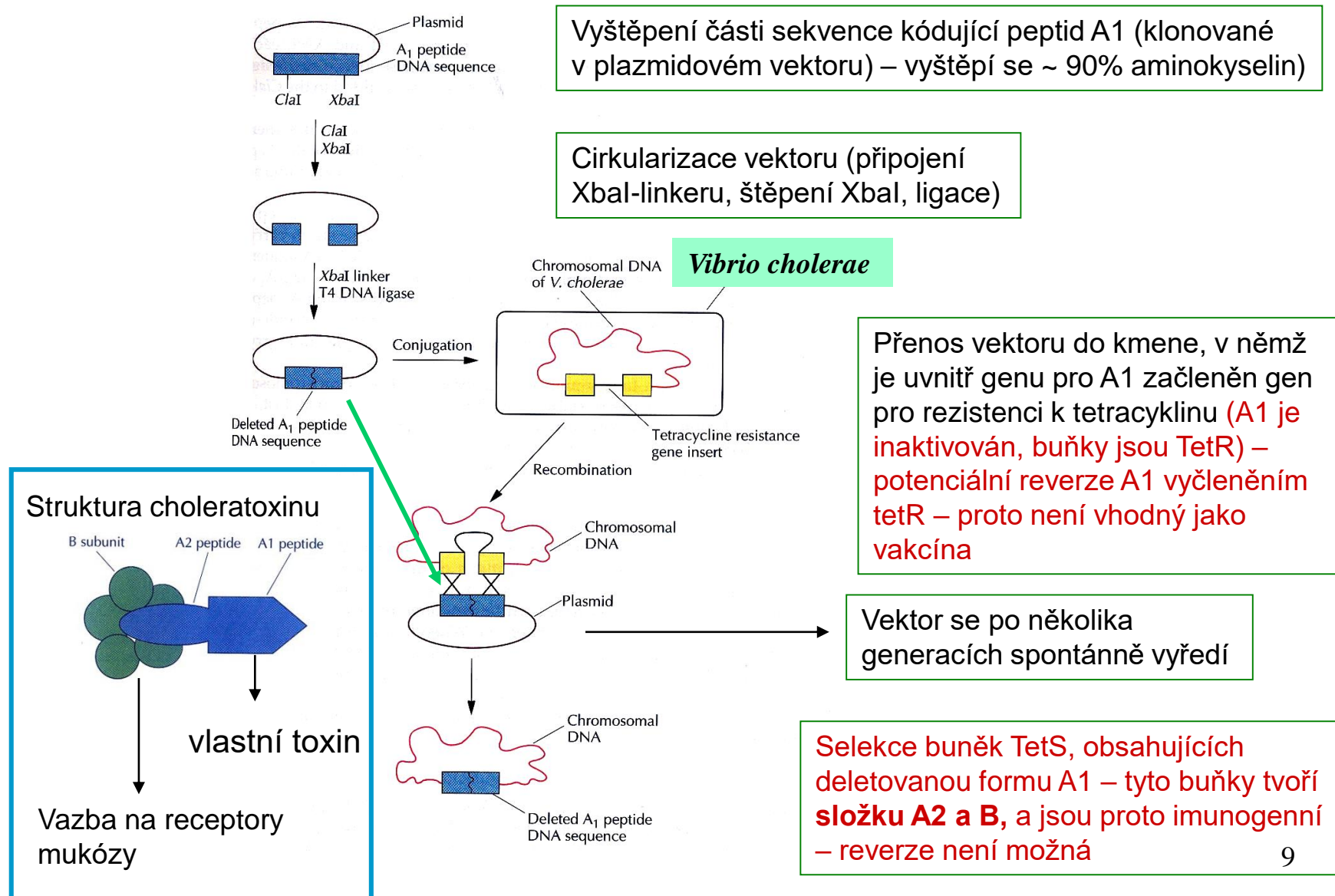
Klonování a exprese genu v savčích expresních systémech (CHO)



Kompletní gen pro gD obsahující C-terminální úsek kódující transmembránovou doménu – tato forma gD je obtížně purifikovatelná

V genu pro gD byla oblast kódující transmembránovou doménu deletována, výsledný produkt je rozpustný a lze jej snáze purifikovat

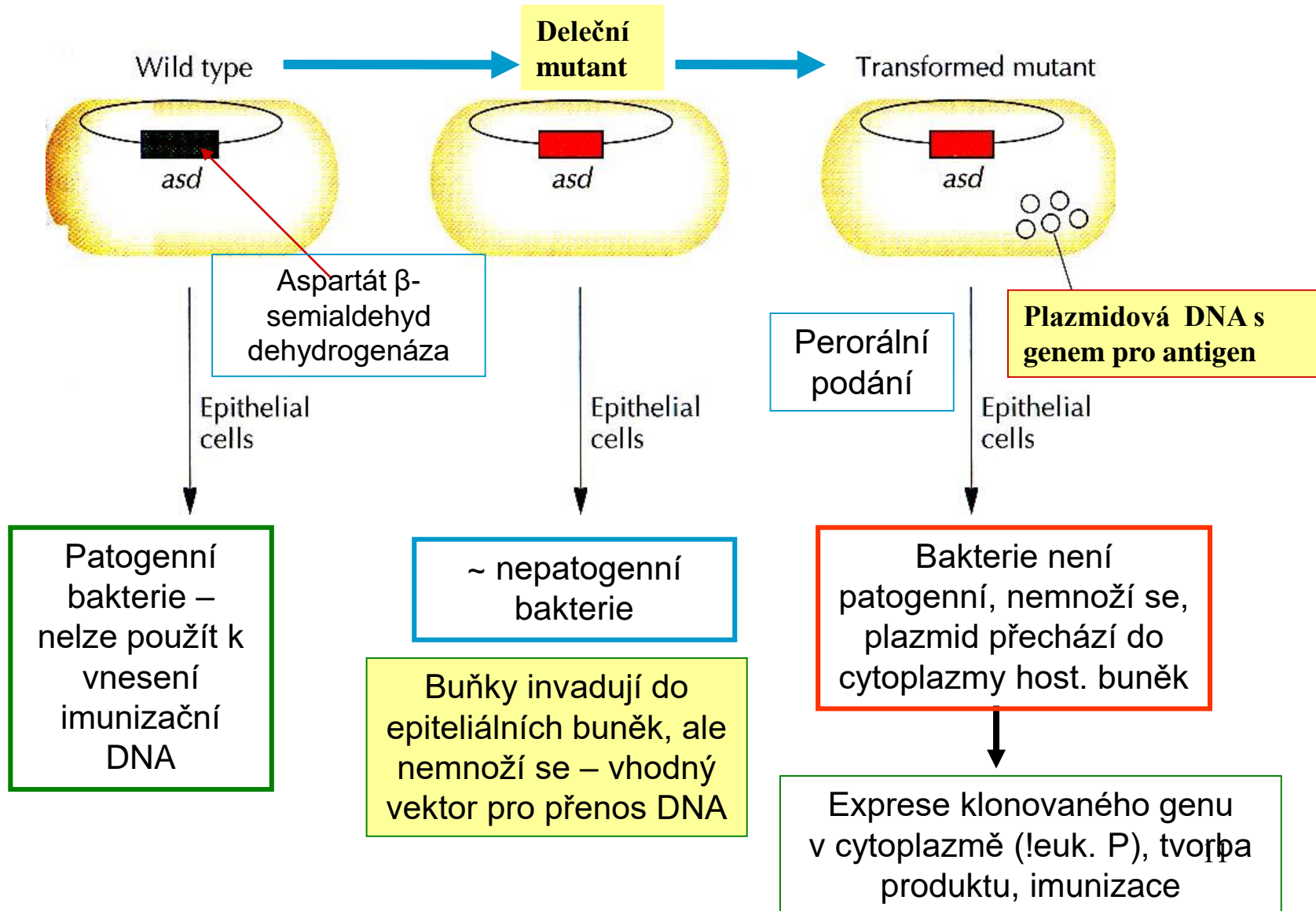
Strategie pro vytvoření delece části peptidu A1 cholera toxinu – příprava kandidátního vakcinačního kmene



Příklady komerčně vyráběných rekombinantních vakcín

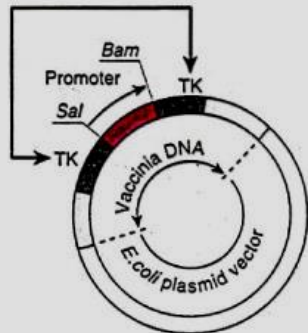
Product	Company	Therapeutic indication	Date approved
Recombinant vaccines			
<u>Hepatitis B</u>			
Ambirix (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	GlaxoSmithKline	Immunization against hepatitis A and B	2002 (EU)
Pediarix (combination vaccine containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization of children against various conditions inducing hepatitis B	2002 (US)
HBVAXPRO (r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i>)	Aventis Pharma	Immunization of children & adolescents against hepatitis B	2001 (EU)
Twinrix (adult & pediatric forms in EU. Combination vaccine containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham (EU); GlaxoSmithKline (US)	Immunization against hepatitis A and B	1996 (EU) (adult), 1997 (EU) (pediatric), 2001 (US)
Infanrix-Hexa (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis, <i>Haemophilus influenzae</i> type b, hepatitis B and polio	2000 (EU)
Infanrix – Penta (combination vaccine, containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis, polio and hepatitis B	2000 (EU)
Hepacare (r S, pre-S & pre-S2 HBsAgS produced in a mammalian (murine) cell line)	Medeva Pharma	Immunization against hepatitis B	2000 (EU)
Hexavac (combination vaccine, containing rHBsAG produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	Aventis Pasteur	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B, polio and <i>H. influenzae</i> type B	2000 (EU)
Procomvax (combination vaccine, containing r HBsAg as one component)	Aventis Pasteur	Immunization against <i>H. influenzae</i> type B and hepatitis B	1999 (EU)
Primavax (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	Aventis Pasteur	Immunization against diphtheria, tetanus, and hepatitis B	1998 (EU)
Infanrix Hep B (combination vaccine containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis and hepatitis B	1997 (EU)
Twinrix (adult and pediatric forms; combination (pediatric) vaccine containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against hepatitis A and B	1996 (EU) (adult), 1997 (EU)
Comvax (combination vaccine, containing HbsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> , as one component)	Merck	Vaccination of infants against <i>H. influenzae</i> type B and hepatitis B	1996 (US)

Využití patogenního druhu *Shigella flexneri* jako živého vektoru k přenosu DNA pro **genetickou imunizaci** do savčích epiteliálních buněk

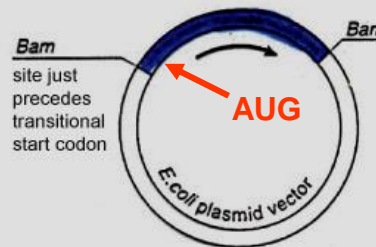


Příprava rekombinantních vakcibií virů

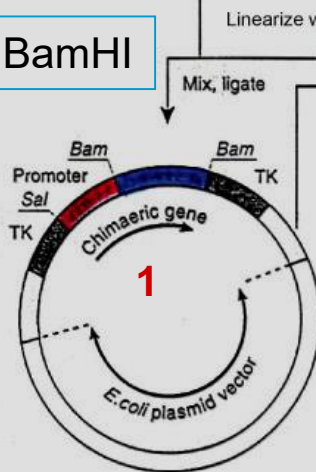
Vaccinia TK gene inactivated by insertion of vaccinia DNA fragment carrying an early gene promoter



Klonovaný gen pro hemagglutinin viru chřipky



Klonování do BamHI



Linearize with Bam

Mix, ligate

(1) Bam digest
(2) Isolate haemagglutinin gene fragment

Calcium phosphate transfection

"Wild type" vaccinia virus 2

Simultaneous infection and transfection 1 + 2

Homologous recombination replaces tk+ gene in virus with inactive tk region

Monkey cell line

BUDR selects TK- vaccinia virus

selekce

Recombinant (TK-) vaccinia virus with haemagglutinin gene



Vaccinate hamsters

Animals immune to infection with influenza virus

Živé vakcíny

- ### Virus vakcinie
- 187 – 300 kb
 - izolovaná virová DNA je neinfekční
 - vlastní aparát regulace transkripce
 - replikace a transkripce DNA v cytoplasmě
 - vnášení cizích genů homologní rekombinací *in vivo*

Používání a výhody vakcinia viru

- je možné vakcinovat proti několika infekcím současně – do vektoru se umístí geny pro různé antigeny pod kontrolou různých vakciniových nebo jiných virových promotorů (aby nedocházelo k homologní rekombinaci a ztrátě genů), a výběrem promotorů lze časovat expresi genů (časné x pozdní – ovlivňuje míru exprese).

Živá vakcína má tyto výhody oproti usmrceným virům nebo podjednotkovým vakcínám:

- virus exprimuje autentický antigen způsobem, který se podobá přirozenému
- virus se replikuje, antigenu přibývá, aktivují se B a T buňky.

Nevýhoda: u imunosuprimovaných pacientů může vakcinace navodit problémy, do viru lze ale přidat gen pro interleukin 2, který zesiluje činnost T-buněk a tak snižuje množení viru.

Již klonované antigeny: vzteklna, hepatitida B, chřipka, HSV, virus stomatitidy.

Reverzní vakcinologie

- Stanovení kompletní sekvence genomu patogena
- Vyhledání genů kódujících potenciální antigeny pomocí bioinformatických nástrojů – proteiny s mimobuněčnou lokalizací, signální peptidy, epitopy B-buněk
- Příprava produktů těchto genů v heterologních systémech a jejich testování jako antigenů
- Vakcína proti meningitidě (MenB) – 570 ORF (genů) jako potenciálních antigenů
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Chlamydia pneumoniae* (*Chlamydophila pneumoniae*)

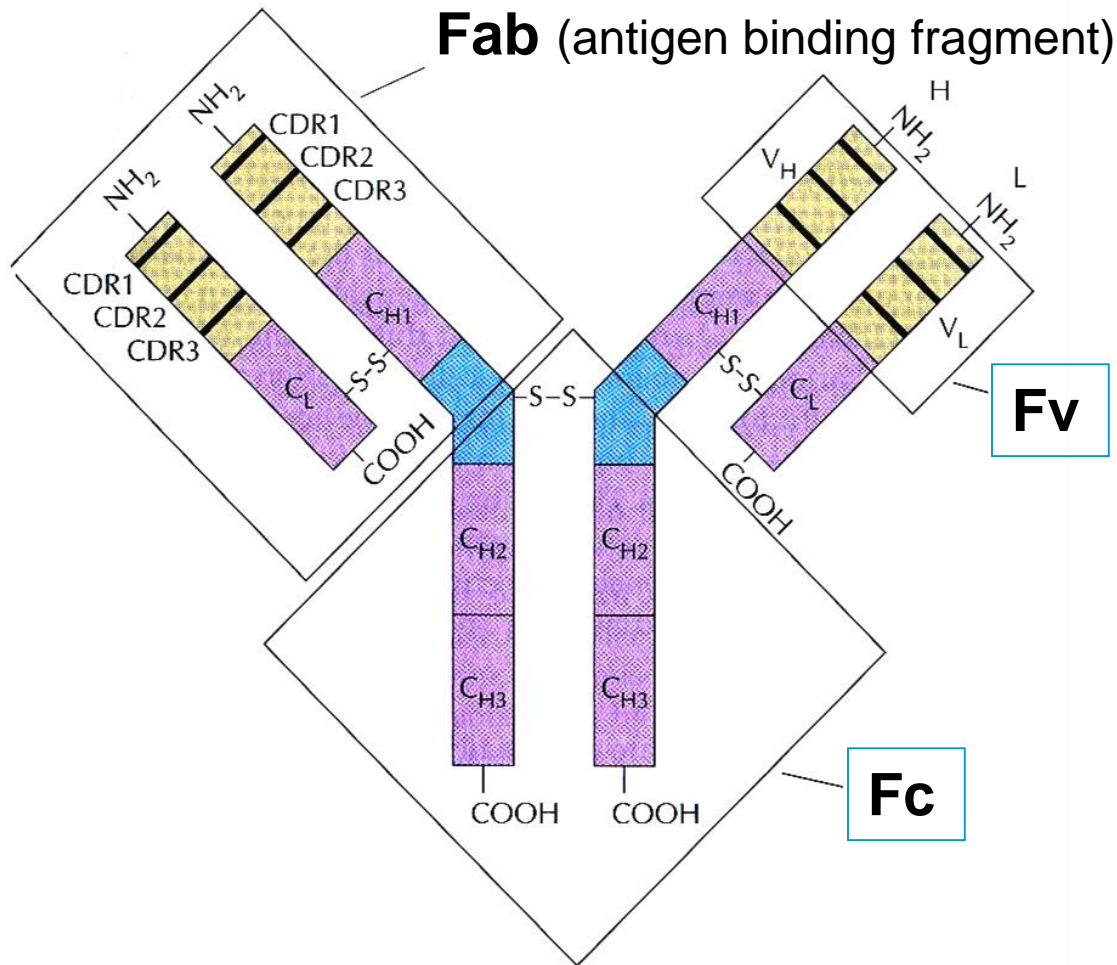
Rekombinantní protilátky

A. Terapeutické účely

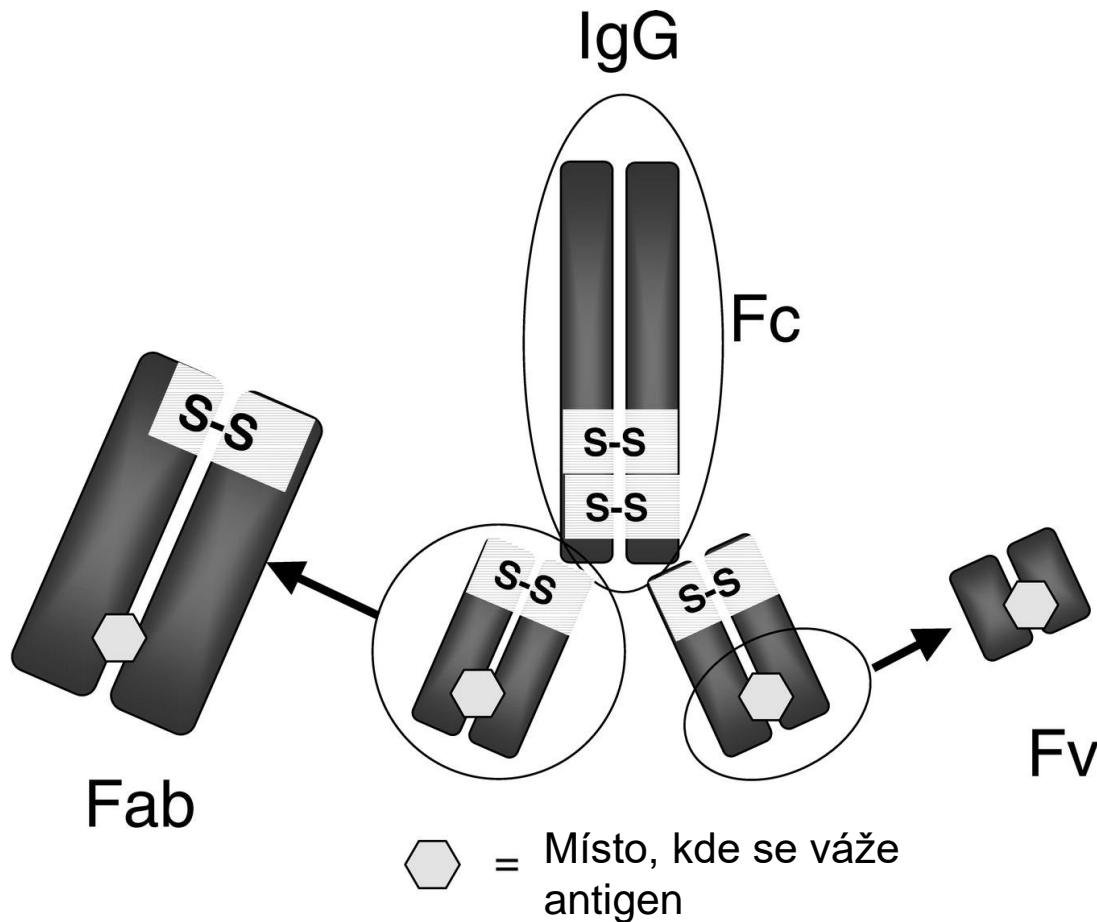
- pasivní imunizace
- cílené dopravování léčiv – terapeutické protilátky
- protinádorová léčiva – **biologická léčba**

B. Diagnostické účely imunologické analýzy

Struktura protilátky (imunoglobulinu)



Funkční části protilátky



Části IgG

Fc = interakce s buněčnými receptory a komplementem

Fab = obsahuje vazebné místo pro Ag. Řetězce jsou spojeny disulfidickými můstky

Fv = část Fab, váže antigen. Řetězce jsou spojeny flexibilním peptidovým linkerem nebo nově vytvořenou disulfidickou vazbou

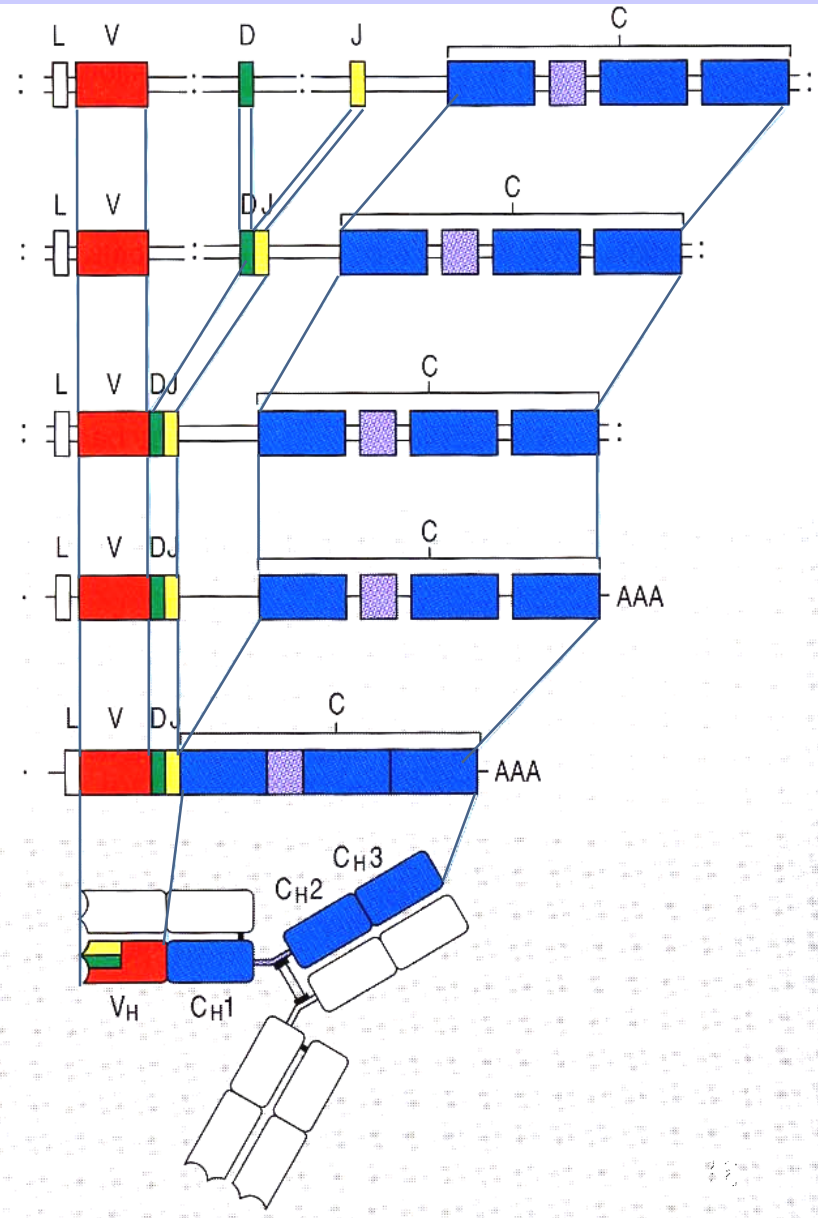
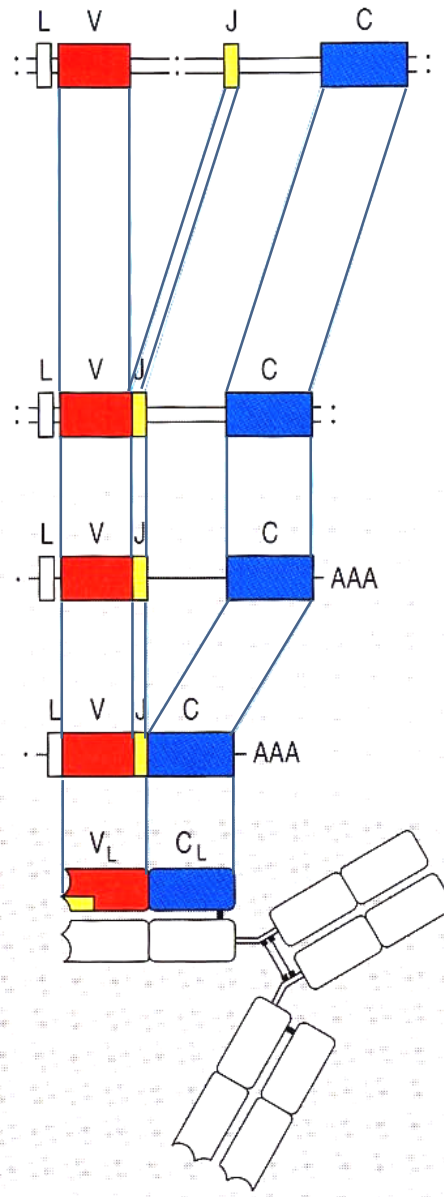
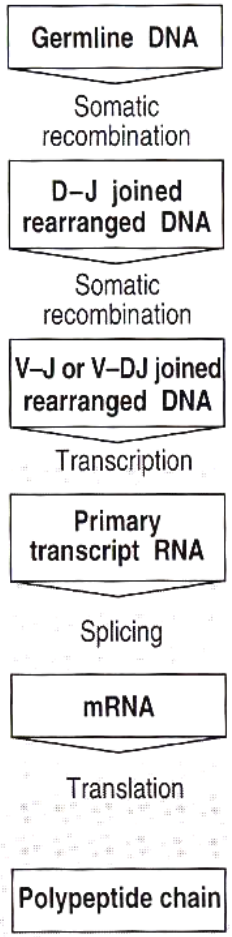
Lehký řetězec

Těžký řetězec

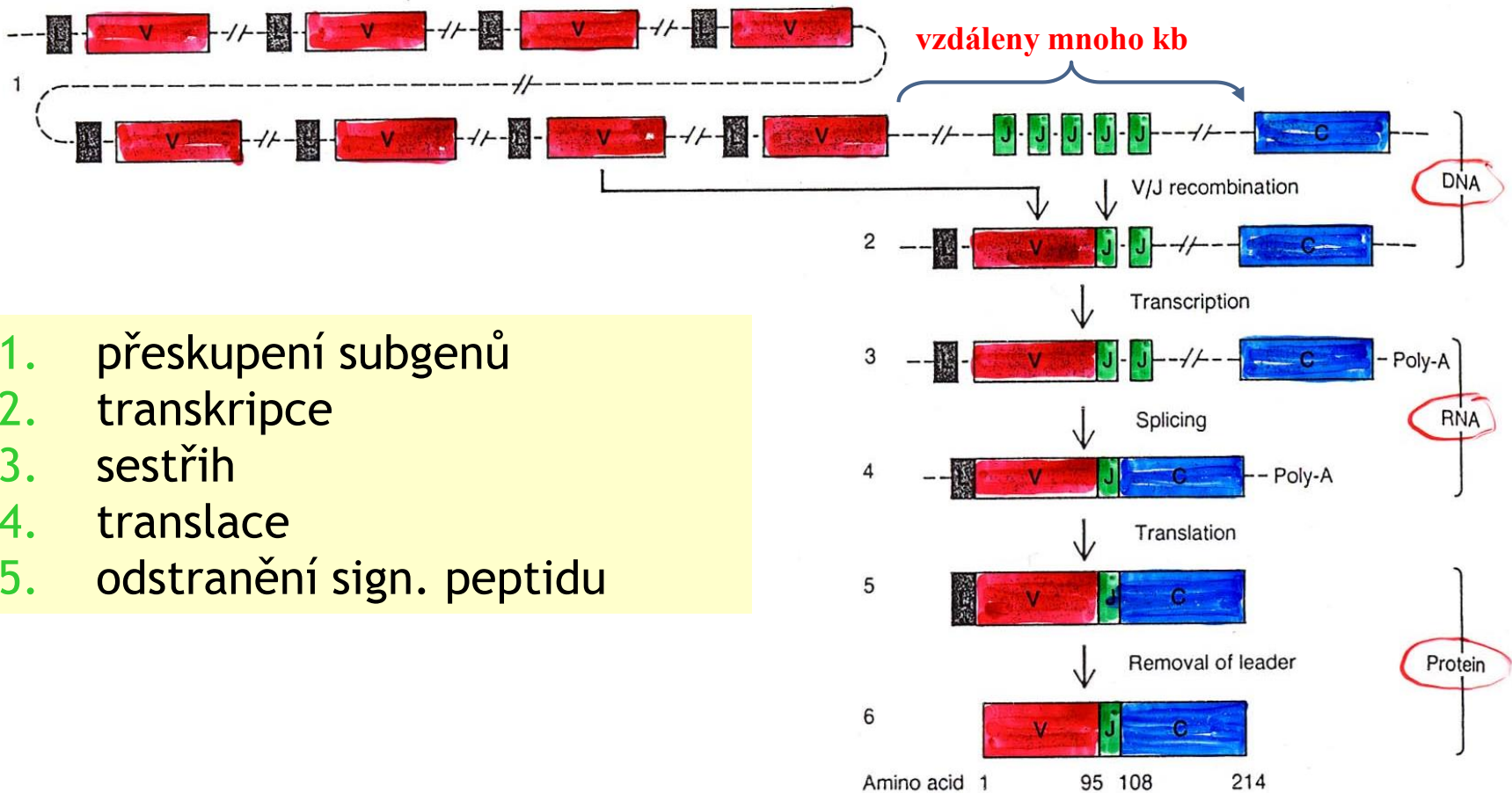
DNA

RNA

Protein

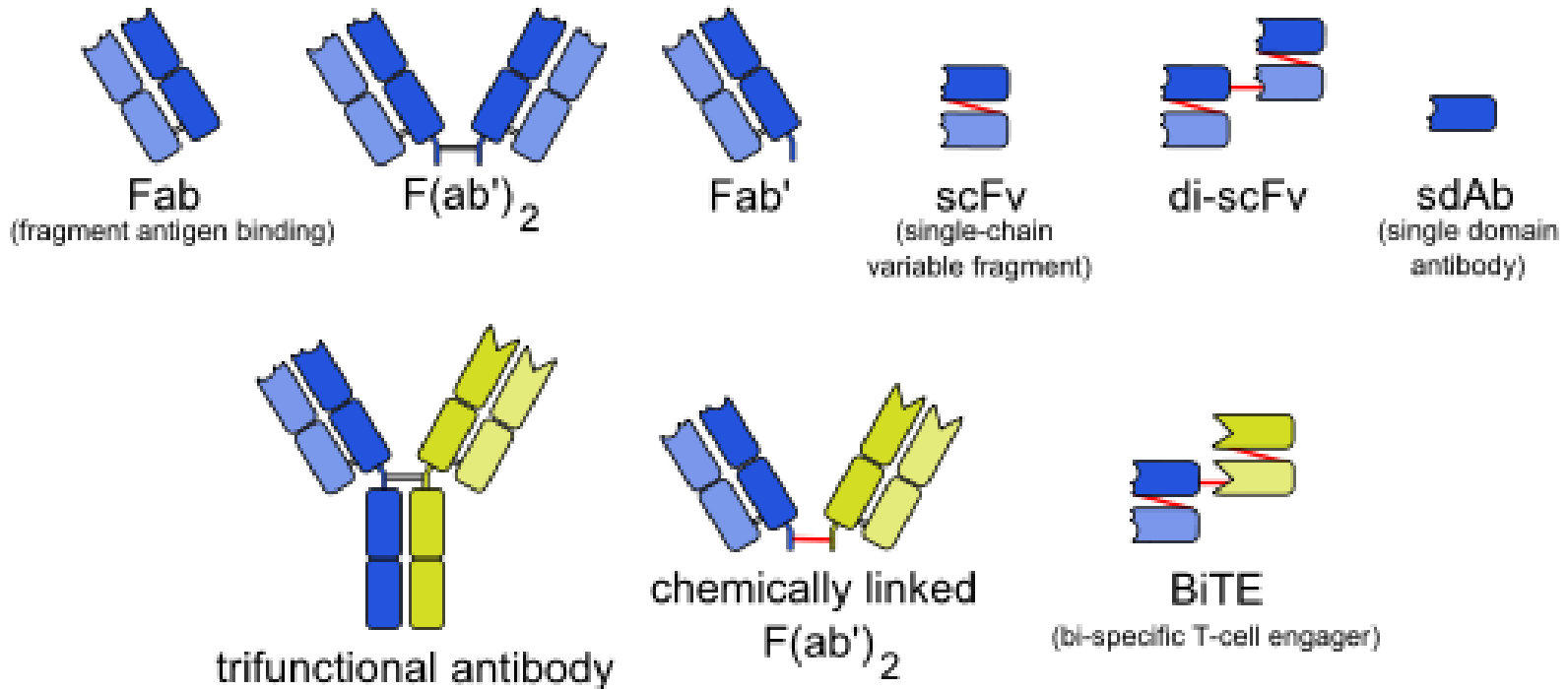


Expresce genu pro lehký imunoglobulinový řetězec



1. přeskupení subgenů
2. transkripce
3. sestřih
4. translace
5. odstranění sign. peptidu

Typy rekombinantních protilátek



Nanoprotiátky – „Heavy-chain antibodies” (HcAbs) – obsahují pouze části těžkých řetězců schopných vázat antigen

Příprava monoklonálních protilátek z hybridomů

Imunizovaná myš

Aplikace antigenu



Odebrání buněk sleziny



B-lymfocyty –
tvoří protilátky



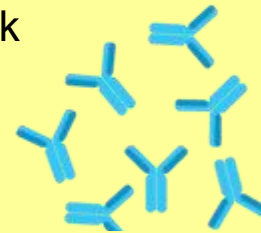
Nesmrtelné nádorové
buňky

Myelomové buňky

Fúze buněk

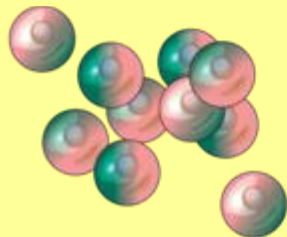


hybridomy



Monoklonální
protilátky

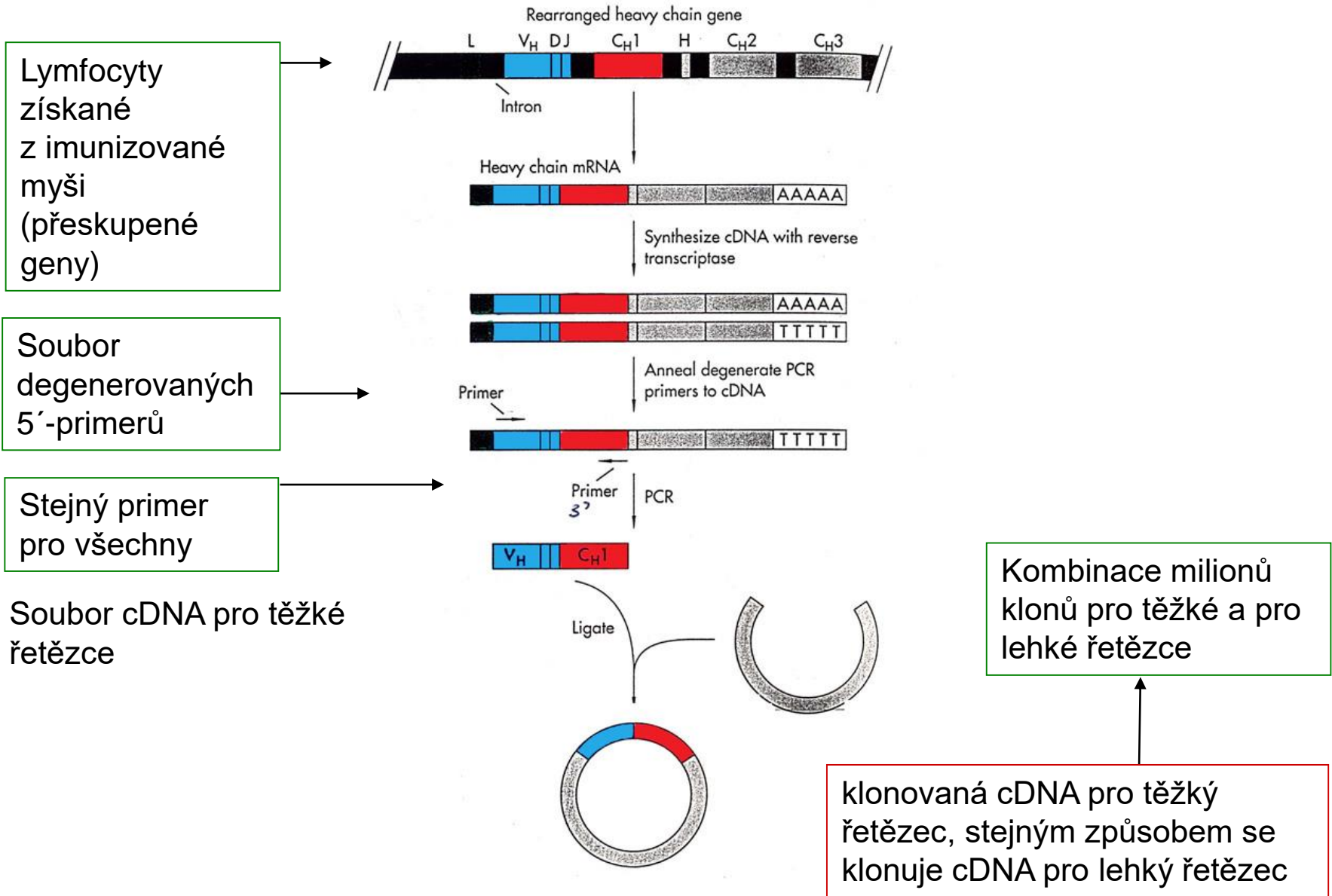
Kultivace a selekce



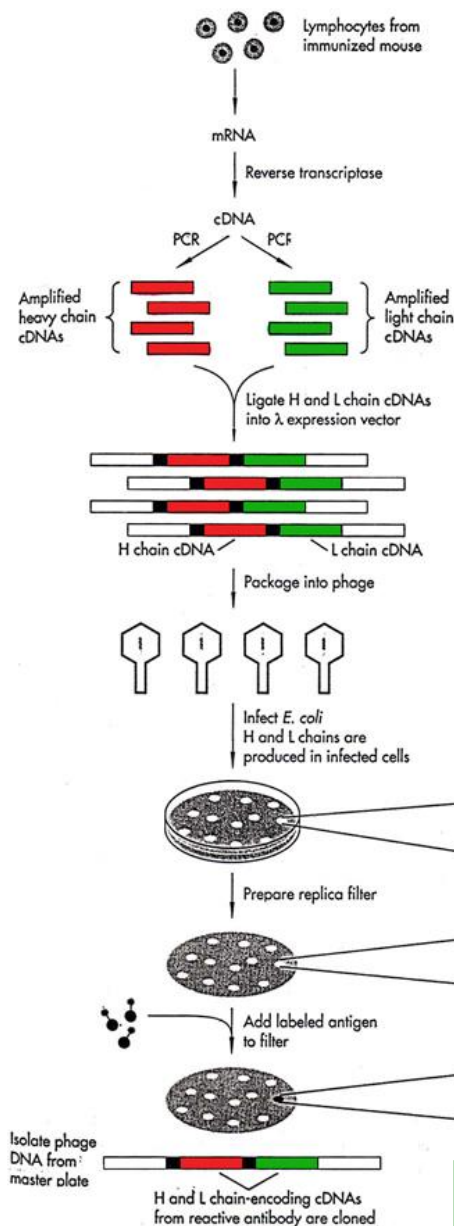
Tisíce klonů, z nichž
každý tvoří odlišný
typ protilátky

Výběr protilátky s vysokou
specifitou vůči antigenu

Příprava rekombinantních protilátek s využitím metody PCR



Příprava specifické protilátky ve formě Fab



Příprava milionů cDNA nesoucích informaci pro L a H řetězce

Amplifikace genů pro L a H řetězce pomocí PCR, klonování do fágového vektoru

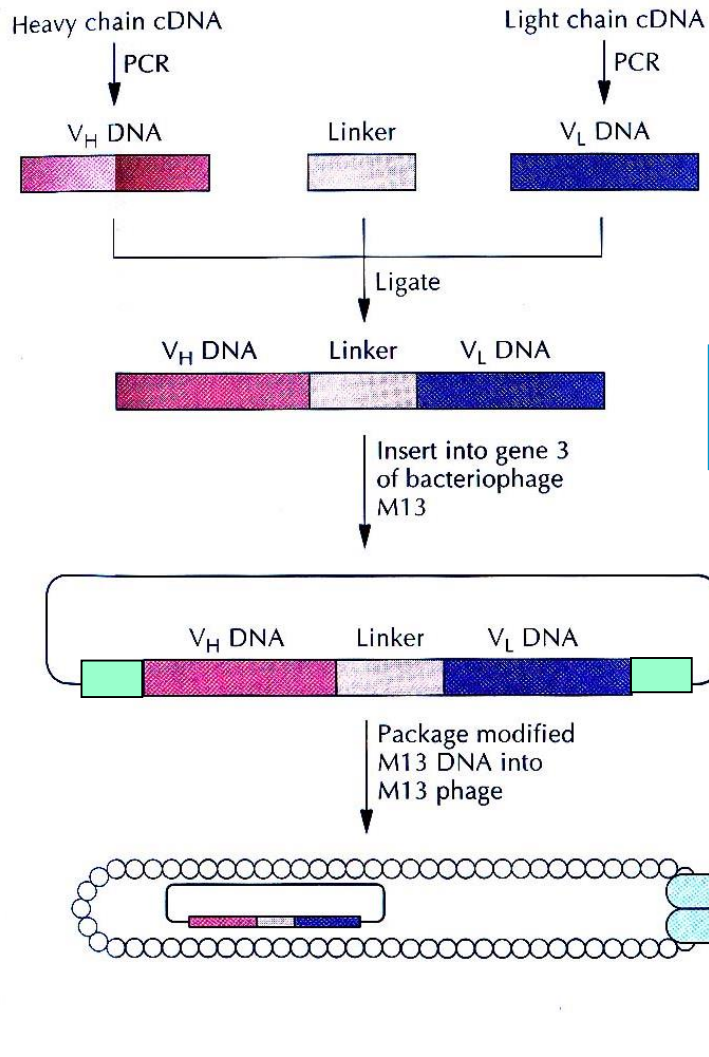
Každý fág obsahuje náhodnou kombinaci L a H

Soubor fágů představující kombinatorickou fágovou knihovnu

Milióny „monoklonálních“ protilátek

Překlonování do expresního savčího nebo bakteriálního vektoru

Vytvoření kombinatorické knihovny Fv protilátek ve vektoru fága M13 (fágemidech)



Klonováním do genu 3 vzniká fúzní protein, který je lokalizován na povrchu fága

Spojovací peptid

Selekce (ELISA-like)

Důvod pro přípravu humanizovaných protilátek:

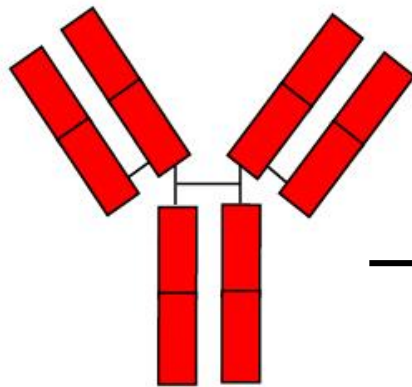
obtížná příprava lidských monoklonálních protilátek konvenční hybridomovou technologií

- Lidské chromozomy v hybridomech vytvořených po fúzi lidských lymfocytů s myšími myelomovými buňkami jsou nestabilní, takže se takové hybridomy produkující monoklonální protilátky vytvářejí jen vzácně
- Nejsou k dispozici linie lidských myelomových buněk, které by mohly nahradit myší myelomové buňky při tvorbě hybridomů
- I kdyby bylo možné vytvářet lidské hybridomové buněčné linie, bylo by to proti lékařským etickým zásadám (injikování specifických antigenů do člověka za účelem jiným než terapeutickým, a odběr části sleziny pro získání lymfocytů)

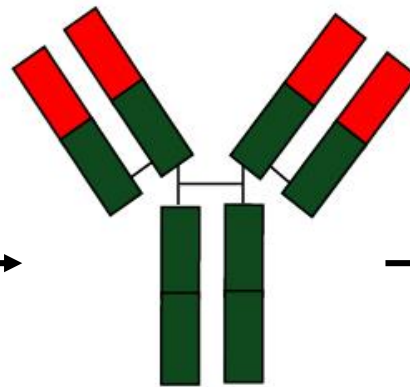
Řešení: příprava transgenních myší s geny pro lidské imunoglobuliny – viz obr. 24

Příprava humanizovaných protilátek

Myší protilátka

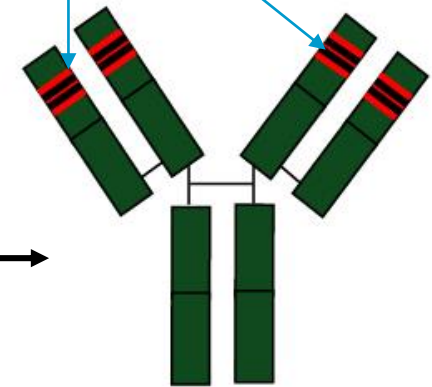


Chimerická protilátka



Humanizovaná protilátka

CDRs - complementarity determining regions



Variabilní, konstantní a hypervariabilní oblasti jsou z protilátek myši

Konstantní oblast je z lidské protilátky, variabilní a hypervariabilní oblasti jsou z myši

Hypervariabilní oblasti jsou z myších protilátek, ostatní jsou lidské – **zvýšení specifity mutacemi CDR**

65% lidské 95% lidské

Lidské protilátky

Human monoclonal antibodies (umab)

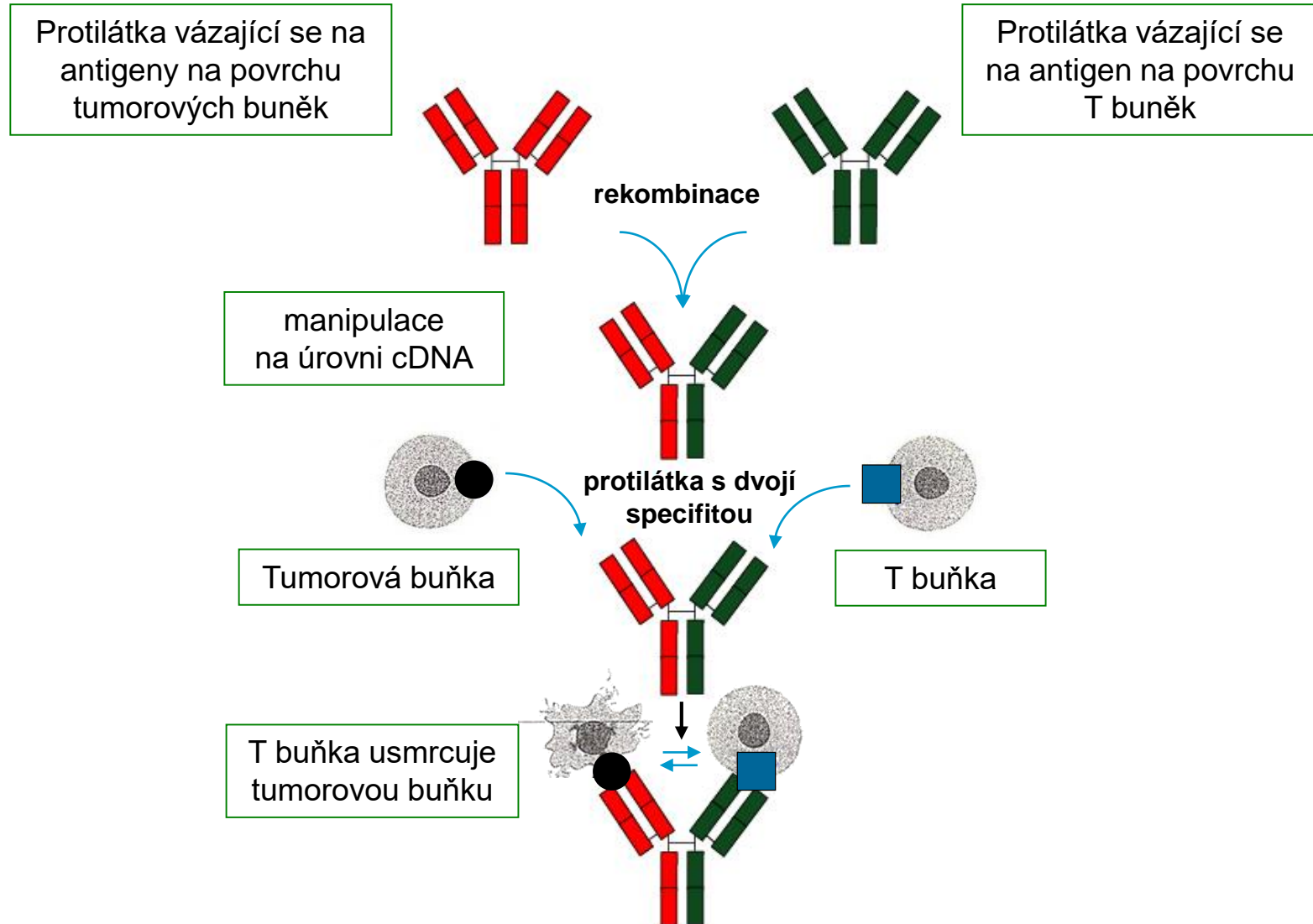
Jsou připravovány z transgenních myší, do jejichž genomu jsou přeneseny lidské geny pro imunoglobuliny. Tyto myši jsou následně imunizovány požadovaným antigenem a produkují pak monoklonální protilátky. Ty jsou pak *in vitro* použity k přípravě plně humánních protilátek.

-omab = myší;

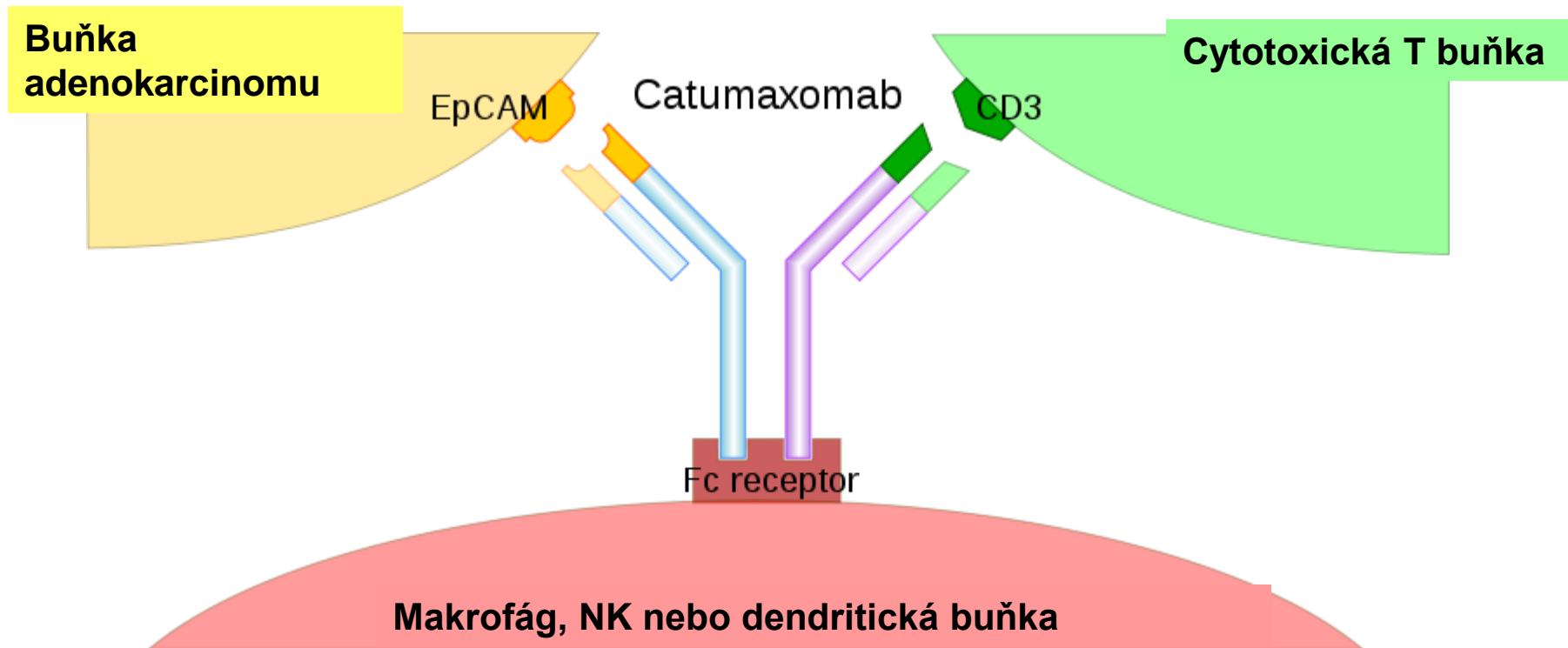
-ximab, -zumab = chimerická, humanizovaná;

-umab = humánní

Protilátka s dvojí specifitou

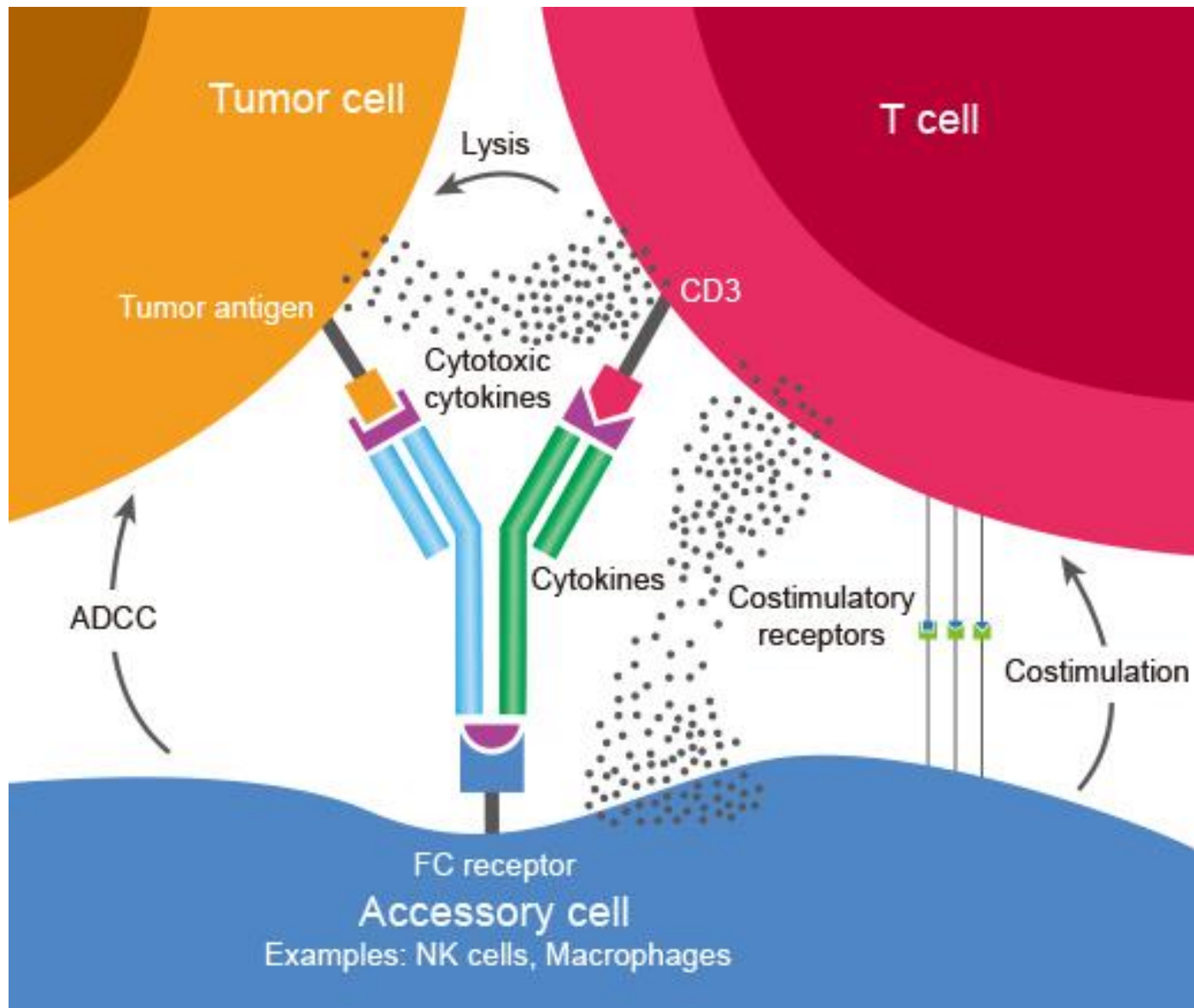


Mechanismus působení bispecifické monoklonální protilátky

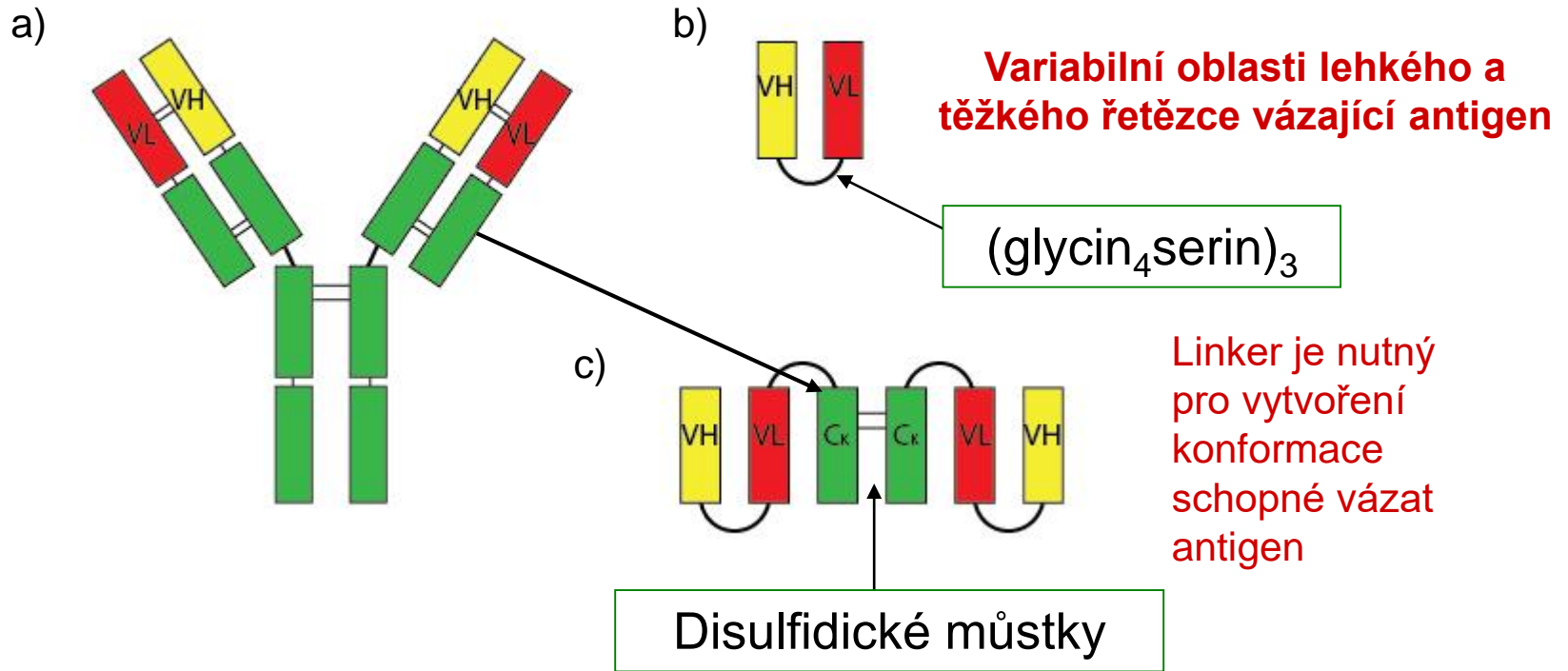


Catumaxomab (obchodní označení Removab) je hybridní monoklonální protilátka používaná k léčbě maligního ascitu u pacientů s metastázujícími nádory. Váže se na antigeny CD3 přítomné na cytotoxických T-buňkách a současně na antigeny EpCAM na nádorových buňkách. Je používána v EU a klinicky testována v USA.

Působení protilátek s dvojí specifitou

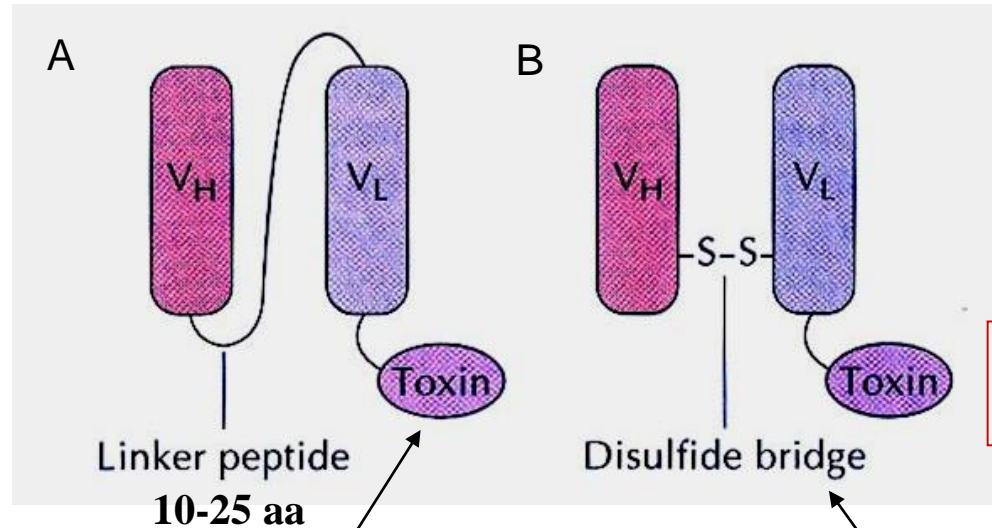


Jednořetězcové protilátky scFv (single chain antibody - **SCA**) (variable region fragments)



scFv jako terapeutické agents – nové vazebné schopnosti, nižší imunogenicita v důsledku chybění Fc domény, snadnější penetrace do cílového místa (pevné nádory atp).

Schematické znázornění struktury „single-chain“ imunotoxinů



n. radioaktivní izotop,
n. cytostatikum

-exotoxin A *Pseudomonas*
- difterický toxin
- ricin

Protinádorové působení (vazba
na receptory a povrchové proteiny
nádorových buněk)

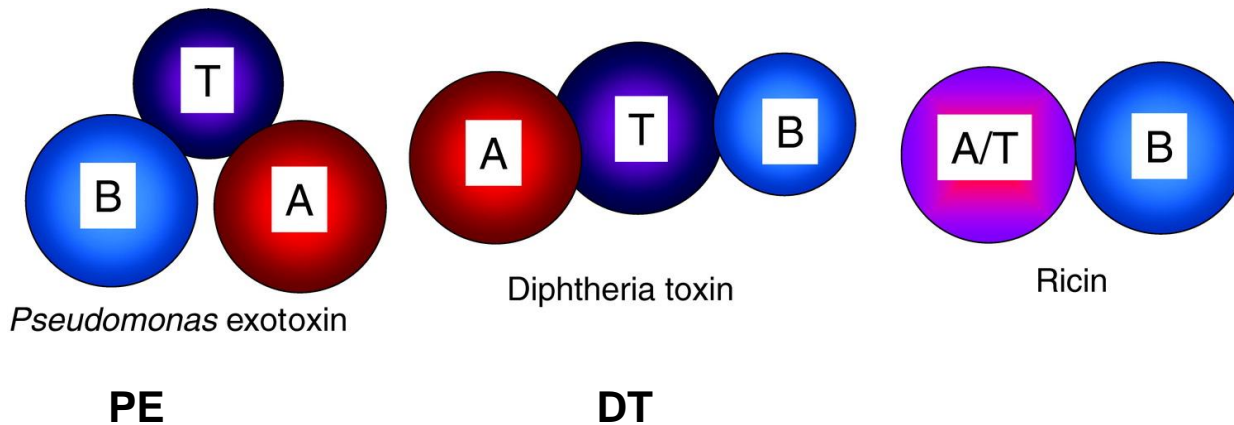
Záměna peptidového linkeru za disulfidický
můstek několikanásobně zvyšuje stabilitu
scFv a tím zlepšuje jeho terapeutické využití

Např. fúzní protein
HER2-Ig + exotoxin *Pseudomonas*

human epidermal growth factor receptor 2 -Approximately 30% of
breast cancers have an amplification of the *HER2/neu* gene or
overexpression of its protein product.

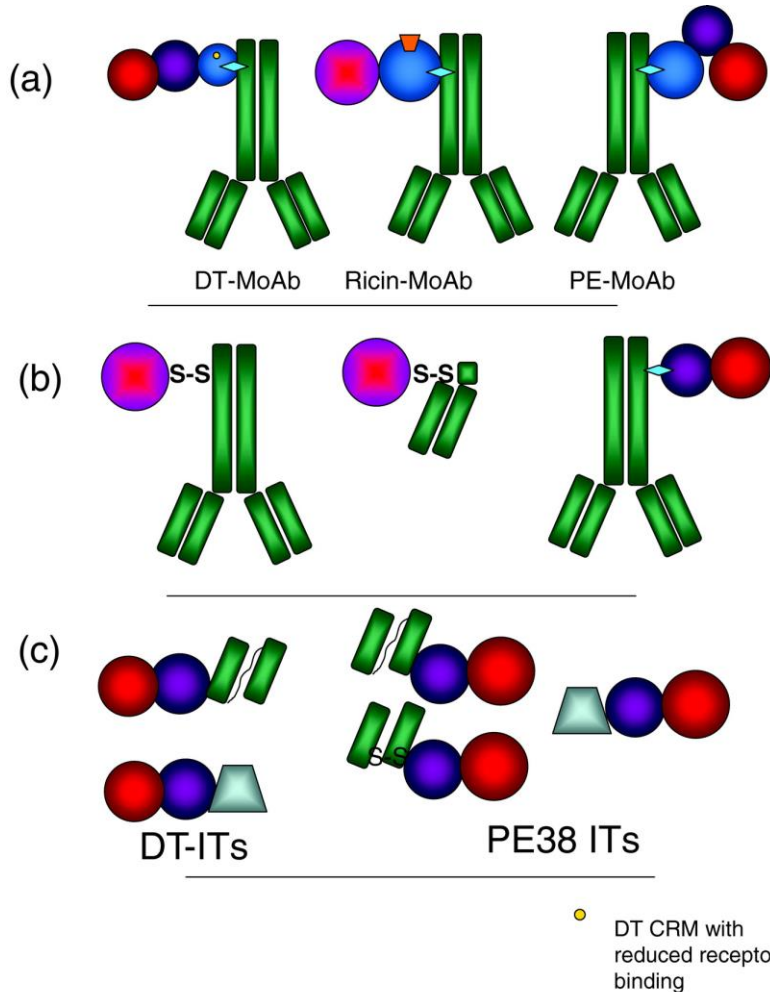
Pbs21 (plasmodium) + Shiva-1

Toxiny používané pro přípravu imunotoxinů



B = vazebná doména; T = translokační doména; A = doména s aktivitou

Etapy vývoje imunotoxinů



1. generace: toxin připojen chemicky disulfidickými vazbami

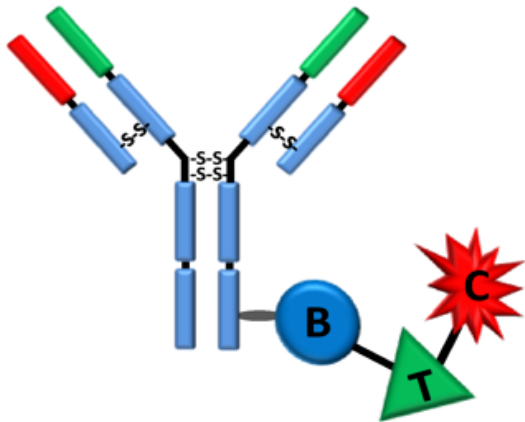
2. Generace: toxiny zbaveny domény pro vazbu na normální endoteliální buňky

3. Generace: Rekombinantní jednořetězcové imunotoxiny (scFv)

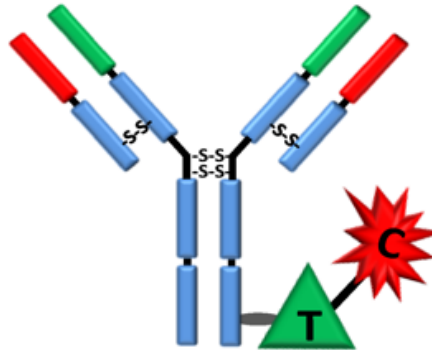
Vzhledem k působení toxinu na eukaryotické buňky musí být připravovány v bakteriích (*E. coli*)

CRM (cross-reacting material) – mutantní forma DT s nízkou afinitou k receptorům – vazbu k cílové buňce zajišťuje protilátka

Generace imunotoxinů



First generation



Second generation



Third generation

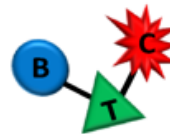
Legend:



Variable fragment
of antibody light chain



Variable fragment
of antibody heavy chain

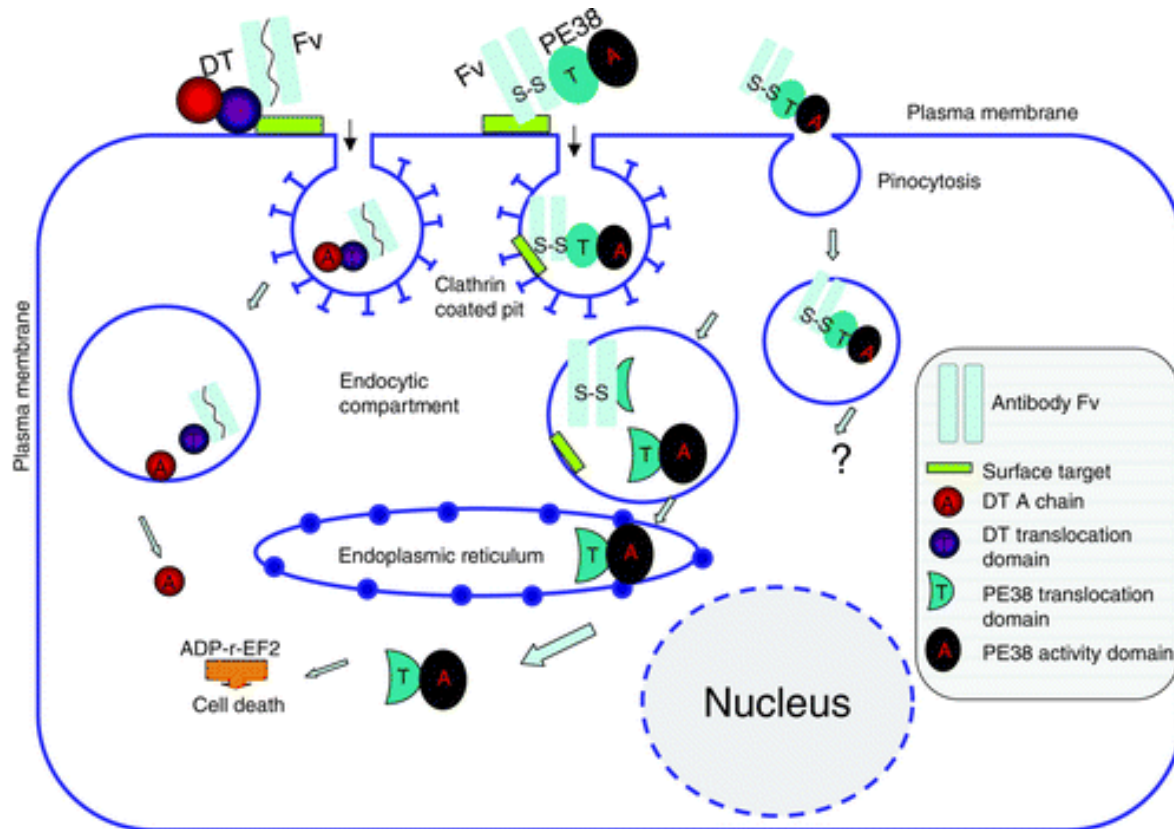


Hypothetical toxin which composed
of binding (B), translocation (T) and
catalytic (C) domains



Reducible or non-reducible
chemical linker

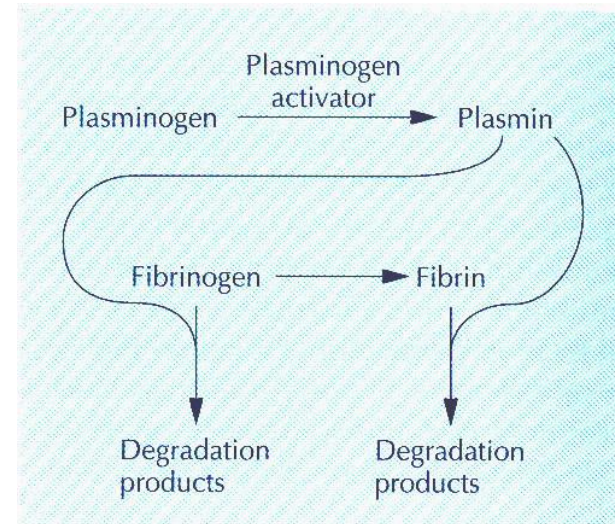
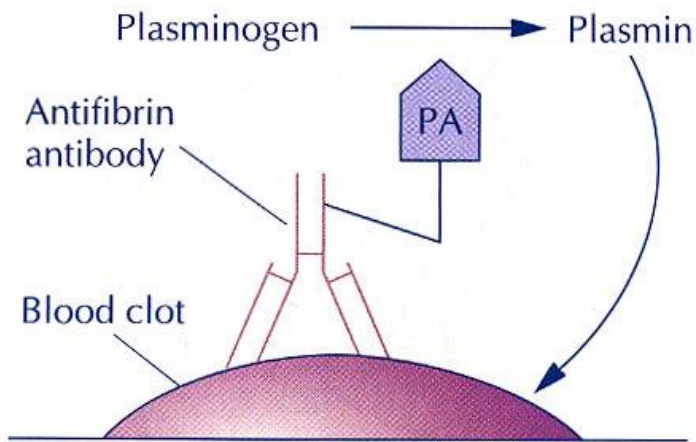
Působení imunotoxinu na nádorové buňky



Rekombinantní imunotoxin se váže na antigeny na povrchu nádorové buňky, endocytózou se dostává dovnitř, kde toxin zasáhne životně důležité funkce.

Terapeutické protilátky

Aktivace plazminogenu na plazmin, degradace fibrinu



Struktura imunoterapeutické trombolytické protilátky. Antifibrinová protilátka (monoklonální protilátka specifická pro fibrin, který se nachází v krevní sraženině) je vázána s aktivátorem plazminogenu (PA). Když se protilátka naváže na fibrin, PA vede k tvorbě a akumulaci plazminu v blízkosti sraženiny. Plazmin (proteáza/ fibrinolyzin) pak degraduje krevní sraženinu.

Příklady schválených terapeutických monoklonálních protilátek

Antibody	Brand name	Company	Approval date	Type	Target	Indication (Targeted disease)
<u>Abciximab</u>	ReoPro	<u>Eli Lilly</u>	1994	chimeric	inhibition of <u>glycoprotein IIb/IIIa</u>	<u>Cardiovascular disease</u>
<u>Adalimumab</u>	Humira	<u>Abbott Laboratories</u>	2002	human	inhibition of <u>TNF-α signaling</u>	<u>Several auto-immune disorders</u>
<u>Alemtuzumab</u>	Campath	<u>Genzyme</u>	2001	humanized	<u>CD52</u>	<u>Chronic lymphocytic leukemia</u>
<u>Basiliximab</u>	Simulect	<u>Novartis</u>	1998	chimeric	<u>IL-2Rα receptor (CD25)</u>	<u>Transplant rejection</u>
<u>Belimumab</u>	Benlysta	<u>GlaxoSmithKline</u>	2011	human	<u>inhibition of B-cell activating factor</u>	<u>Systemic lupus erythematosus</u>

-omab = myší; -ximab, -zumab = chimerická, humanizovaná; -umab = humánní

Tab. 1. Přehled terapeutických protilátek využívaných v terapii onkologických onemocnění schválených FDA. Převzato z [14,15].

Název protilátky	Obchodní název	Antigen	Indikace	Formát protilátky	Rok schválení
dinutuximab	Unituxin™	GD2	neuroblastom	chimérická, IgG1	2015
nivolumab	Opdivo®	PD1	melanom	lidská, IgG4	2014
blinatumomab	Blincyto®	CD19, CD3	akutní lymfatická leukémie	myší bispecifický tandemový fragment scFv	2014
pembrolizumab	Keytruda®	PD1	melanom	humanizovaná, IgG4	2014
ramucirumab	Cyramza®	VEGFR2	rakovina žaludku	lidská, IgG1	2014
siltuximab	Sylvant™	IL-6	Castlemanova choroba	chimérická, IgG1	2014
obinutuzumab	Gazyva®	CD20	chronická lymfocytární leukémie	humanizovaná, IgG1, modifikovaná glykosylace	2013
ado-trastuzumab emtanzin	Kadcyla®	HER2	karcinom prsu	humanizovaná, IgG1, imunokonjugát toxinu	2013
pertuzumab	Perjeta®	HER2	karcinom prsu	humanizovaná, IgG1	2012
brentuximab vedotin	Adcetris®	CD30	Hodgkinův lymfom, anaplastický velkobuněčný lymfom	chimérická, IgG1, imunokonjugát toxinu	2011
ipilimumab	Yervoy®	CTLA-4	metastatický melanom	lidská, IgG1	2011
ofatumumab	Arzerra®	CD20	chronická lymfocytární leukémie	lidská, IgG1	2009
panitumumab	Vectibix®	EGFR	kolorektální karcinom	lidská, IgG2	2006
bevacizumab	Avastin®	VEGF	kolorektální karcinom	humanizovaná, IgG1	2004
cetuximab	Erbix®	EGFR	kolorektální karcinom	chimérická, IgG1	2004
ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	CD20	nehodgkinské lymfomy	myší, IgG1, imunokonjugát radioizotopu	2002
alemtuzumab	MabCampath®, Campath-1H® Lemtrada®	CD52	chronická myeloidní leukémie*	humanizovaná, IgG1	2001*
			roztroušená skleróza		2014
trastuzumab	Herceptin®	HER2	karcinom prsu	humanizovaná, IgG1	1998
rituximab	MabThera®, Rituxan®	CD20	nehodgkinské lymfomy	chimérická, IgG1	1997

*MabCampath® pro indikaci CML stažen z trhu a distribuován jako Lemtrada® pro léčbu roztroušené sklerózy.

Abzomy – monoklonální protilátky s katalytickou aktivitou

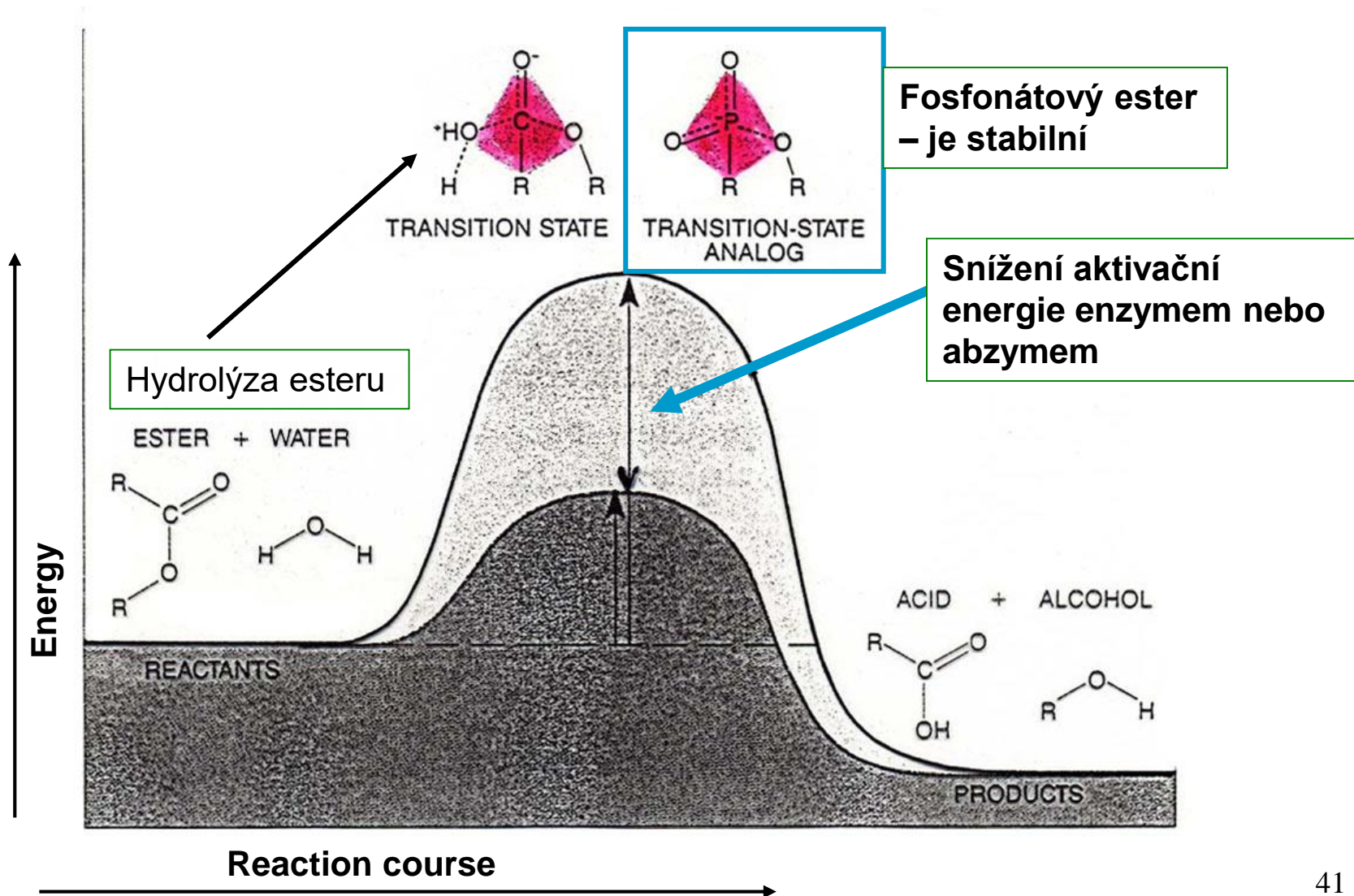
Abzym (odvozeno z **Antibody** a **enzyme**) nazývaný také jako **catmab** (catalytic monoclonal antibody) je monoklonální protilátka vyznačující se katalytickou aktivitou. Abzomy jsou uměle vytvářené konstrukty, nacházejí se ale také přirozeně např. u člověka (anti-vasoactive intestinal peptide autoantibodies), a u pacientů s autoimunitní nemocí lupus erythematosus, u nichž mohou vázat a hydrolyzovat DNA. Abzomy jsou potenciální nástroje pro biotechnologie, např. Pro specifické reakce u DNA.

Enzymy fungují tak, že **snižují aktivační energii transičního stavu interagujících látek, čímž katalyzují vytváření jinak méně-výhodných molekulárních intermediátů mezi reaktanty a produkty**. Pokud se připraví protilátka vůči nějaké stabilní molekule, která se podobá nestabilnímu intermediátu nějaké jiné (případně nepříbuzné) reakce, bude se tato protilátka (abzym) enzymaticky vázat a stabilizovat intermediátový stav a tím katalyzovat reakci.

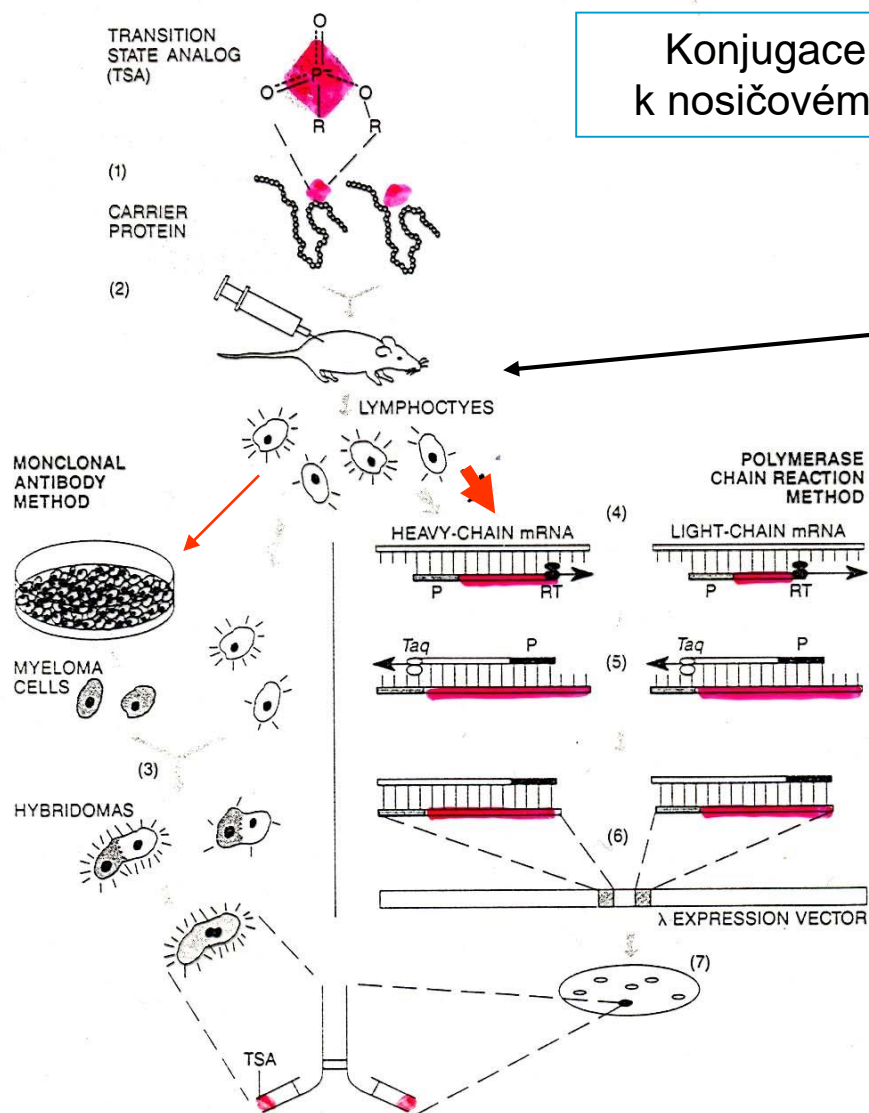
Molekuly, které jsou modifikovány tak, aby se vyznačovaly novými katalytickými aktivitami se nazývají SynZymy.

Abzym (Ab-enzym)

catmab (catalytic monoclonal antibody)



Příprava protilátky s enzymovou aktivitou (abzymu)



Konjugace analogu k nosičovému proteinu

Izolace celkové mRNA

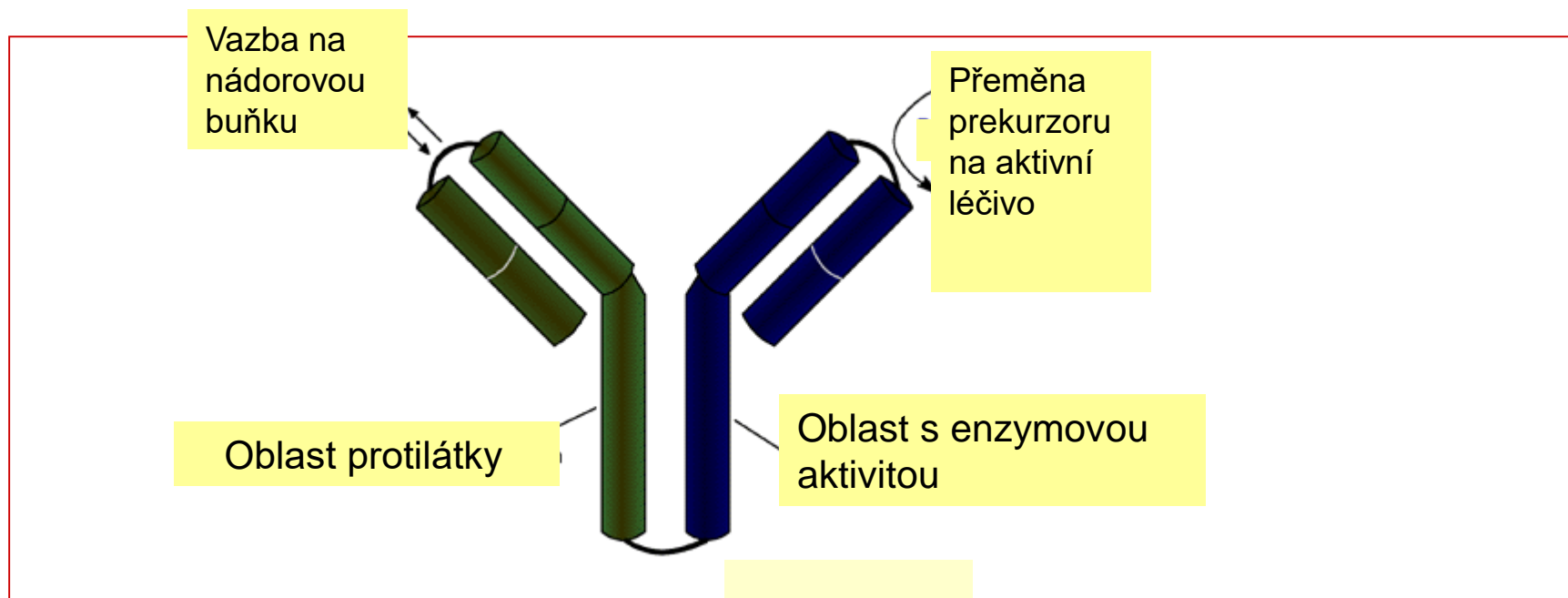
RT-PCR

cDNA

Amplifikace variabilních oblastí L a H řetězců

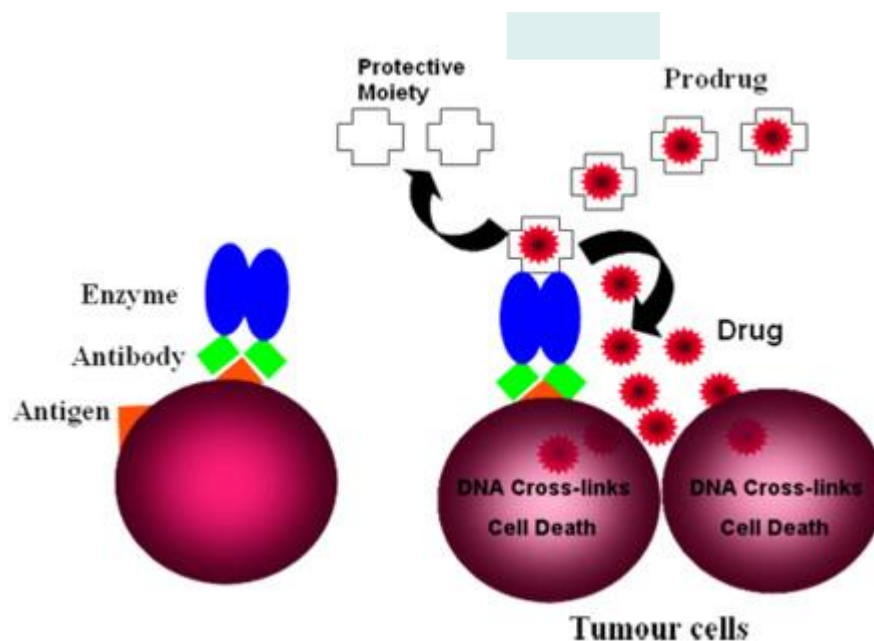
Klonování a skrínig

Struktura abzymu pro destrukci nádorových buněk



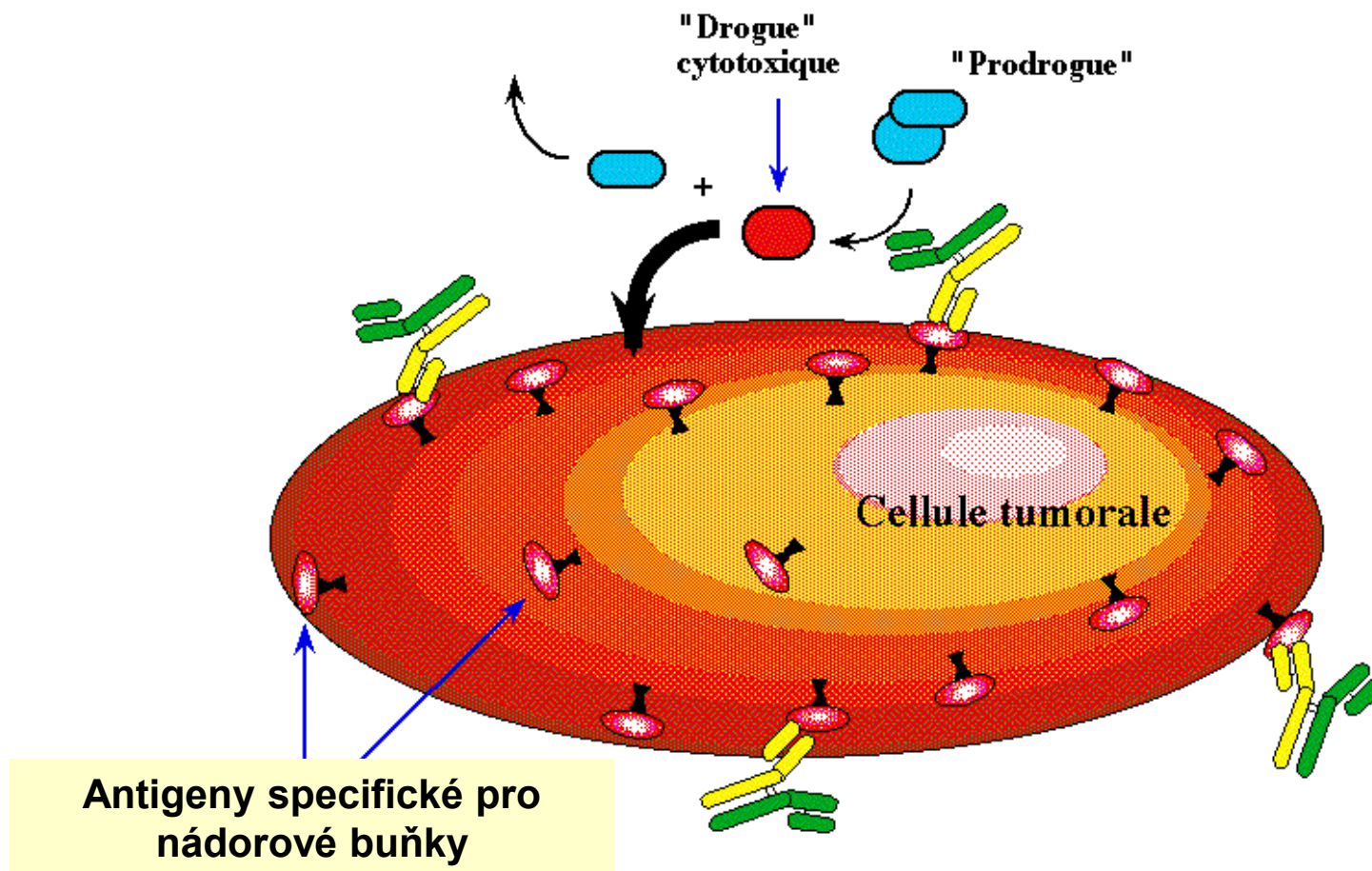
Aplikace: abzym je injikován do pacienta, kde se svou protilátkovou oblastí váže na nádorové buňky. Následně je do krevního řečiště vpraven prekurzor léčiva, který je enzymovou aktivitou abzymu konvertován na aktivní léčivo. To působí jen na nádorovou buňku, na níž je abzym navázán. Tím jsou selektivně destruovány jen nádorové buňky a nikoliv normální buňky, na něž se abzym neváže.

Princip „Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy“ (ADEPT)



Protilátka (abzym) dopraví enzym k receptorům na nádorových buňkách, kde enzym konvertuje netoxický prekurzor (prodrug) na látku, která účinně nádorové buňky usmrcuje. Tím je omezen toxický účinek na normální buňky.

Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy (ADEPT) – enzymová aktivita abzymu konvertuje prekurzor léčivé látky (prodrogue) na cytotoxickou látku a tu pak dopravují do blízkosti nádorové buňky



Potenciální léčba AIDS pomocí abzymu

Byl připraven abzym degradující vazebnou oblast proteinu gp120 viru HIV. Tato oblast je jediná část viru HIV, která se u jednotlivých kmenů nemění, neboť je nezbytná pro vazbu viru na T-lymfocyty.

Abzym působí opakovaně, po inaktivaci jedné virové částice destruuje další (může zničit až tisíce virů)

DNA vakcíny - genetická imunizace

Gen kódující antigen je vnesen do buněk zvířete, v nichž je pak tento antigen produkován a zvíře vytváří protilátky.

Přenos DNA:

- biolistická metoda: rekombinantní plazmid (E. coli) nesoucí gen pro antigen pod kontrolou virového promotoru je vnesen např. do boltce myši
- injekce velkých množství DNA (100 mg rek. plazmidu) přímo do svalů zvířat – účinnost přenosu až 70%
- elektroporace

Výhody:

- Nehrozí reverze: není použit živý nebo oslabený patogen
- antigen je správně posttranslačně upraven a není třeba jej purifikovat
- na jednom plazmidu mohou být v jednom kroku přeneseny geny pro více antigenů
- Snadné skladování, stabilita DNA

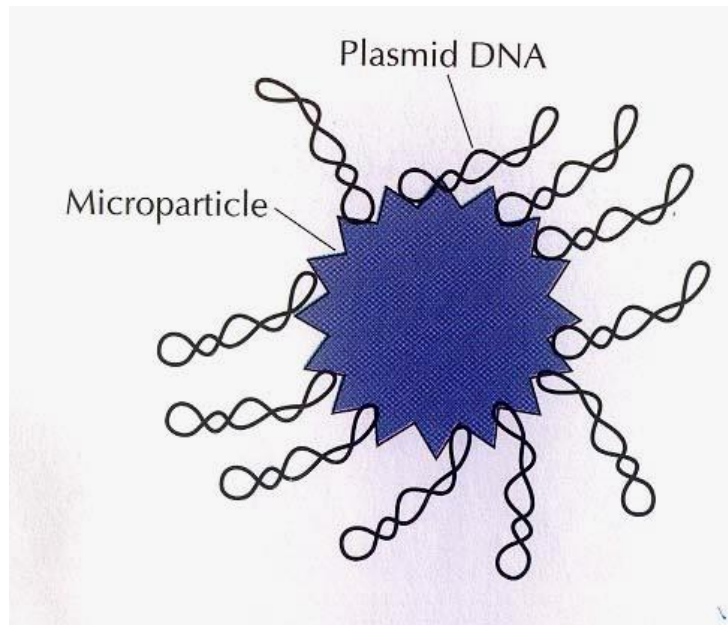
Nevýhoda:

- neznalost osudu přenesené DNA v buňkách, začlenění do genomu hostitele a přerušení genů – proto je výhodnější transientní exprese (extrachromozomální stav)

Příklady virových antigenů: chřipka, HIV, bovinní HV, vzteklna, HBV, rotavirus, slintavka a kulhavka, aj.

Bakteriální antigeny: Clostridium tetani, Mycobacterium tuberculosis,

Navázání plazmidové DNA na kationty povrchu polymerových mikročásteček



Plazmidová DNA je navázána na biodegradovatelné mikročástečky polymerů (0,3-1,5 μm), z nichž se postupně uvolňuje (1. den 35%, 14. den 75%). Průběžně dochází k expresi antigenu – účinnost je vyšší než při injekci volné DNA, stačí zhruba 250x méně DNA).

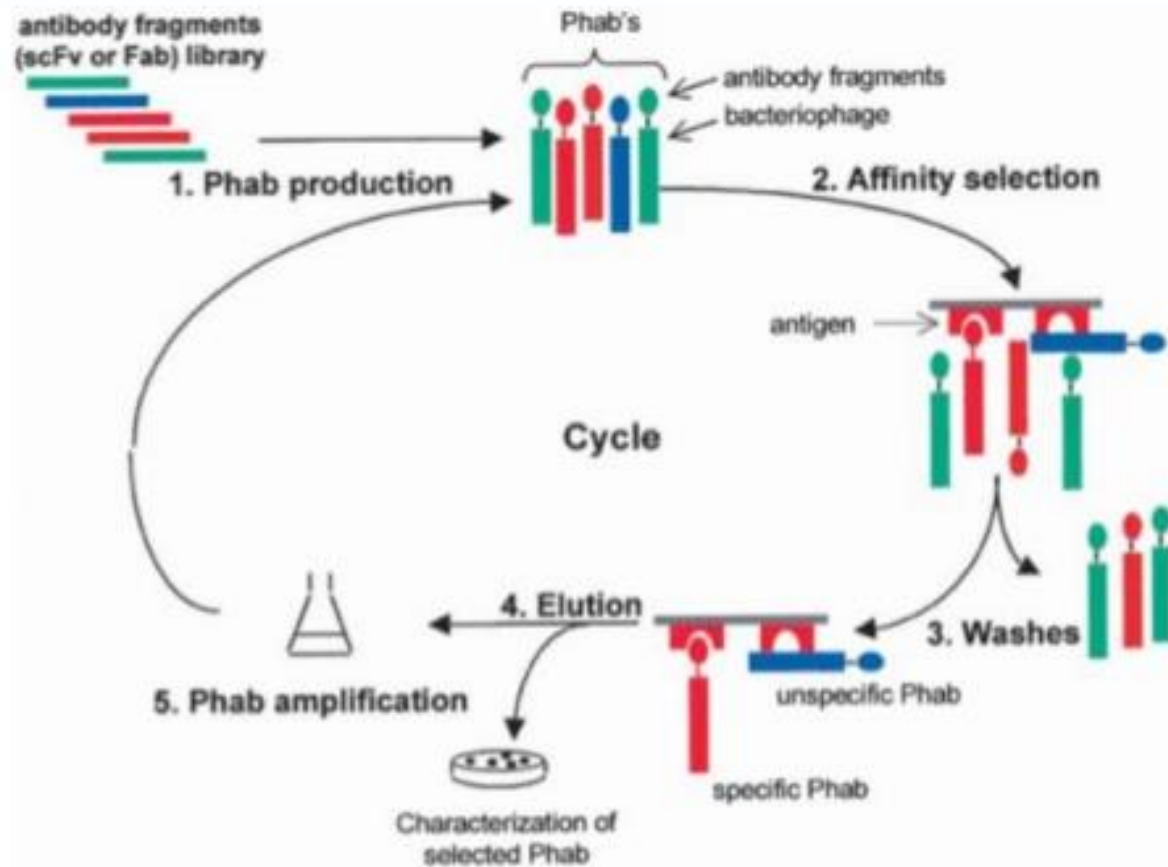
Abzym hydrolyzující kokain (imunofarmakoterapie)

Je určen k léčbě při předávkování kokainem nebo pro léčbu závislosti

Kokain je malá molekula, vůči níž lidské tělo nevytváří protilátky. Pro vytvoření protilátky vázající kokain byl metabolit kokainu (nor-kokain) konjugován k netoxické podjednotce cholerového toxinu (podjednotka B). Tento komplex je schopný navodit v těle silnou imunitní odpověď, která vede k rychlé tvorbě vysokého množství protilátek. Při aplikaci této protilátky do krevního řečiště pak rychle dochází k její vazbě na kokain a jeho neutralizaci, takže se nedostává do CNS.

Podobné protilátky proti heroinu, nikotinu atp.

Phage Display



Antibody engineering

