

Enzymy

Ing. Eva Benešová, Ph. D.
Eva.Benesova@vscht.cz

Význam enzymů v organismu

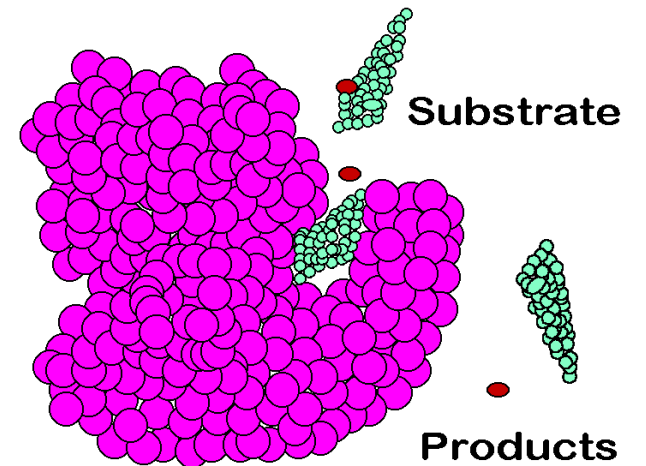
Jsou kritické pro funkci většiny buněčných systémů.

Vzhledem k důležitosti enzymů je problém v mutacích, chybné produkci apod.

TABLE 6-3 International Classification of Enzymes

No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

Note: Most enzymes catalyze the transfer of electrons, atoms, or functional groups. They are therefore classified, given code numbers, and assigned names according to the type of transfer reaction, the group donor, and the group acceptor.



ENZYME

Aktivní centrum

Katalytické AMK

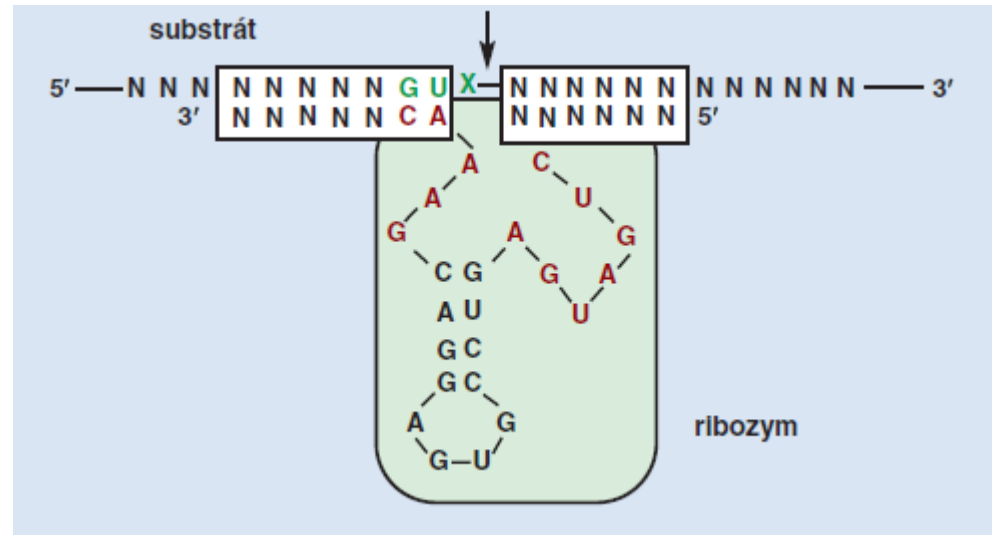
Vazebné AMK

Většinou se jedná o hydrolasy

- Proteinasy
- Glykosidasy
- DNasa

Ribozymy

- T.R.Cech a S. Altmann – 1989 Nobelova cena za chemii
- struktury obsahující sekvenci vážící mRNA a katalytickou doménu (tj. katalyticky aktivní molekuly RNA – RNA enzymy)
- velikost od 40 do stovek nukleotidů
- výskyt mnoha typů:
 - hammerhead
 - vlásenkový ribozym
 - RNase P
 - některé typy intronů
 - ribozomy
 - řada dalších



Terapeutické využití

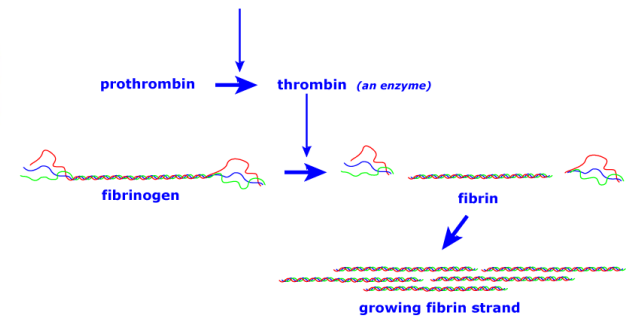
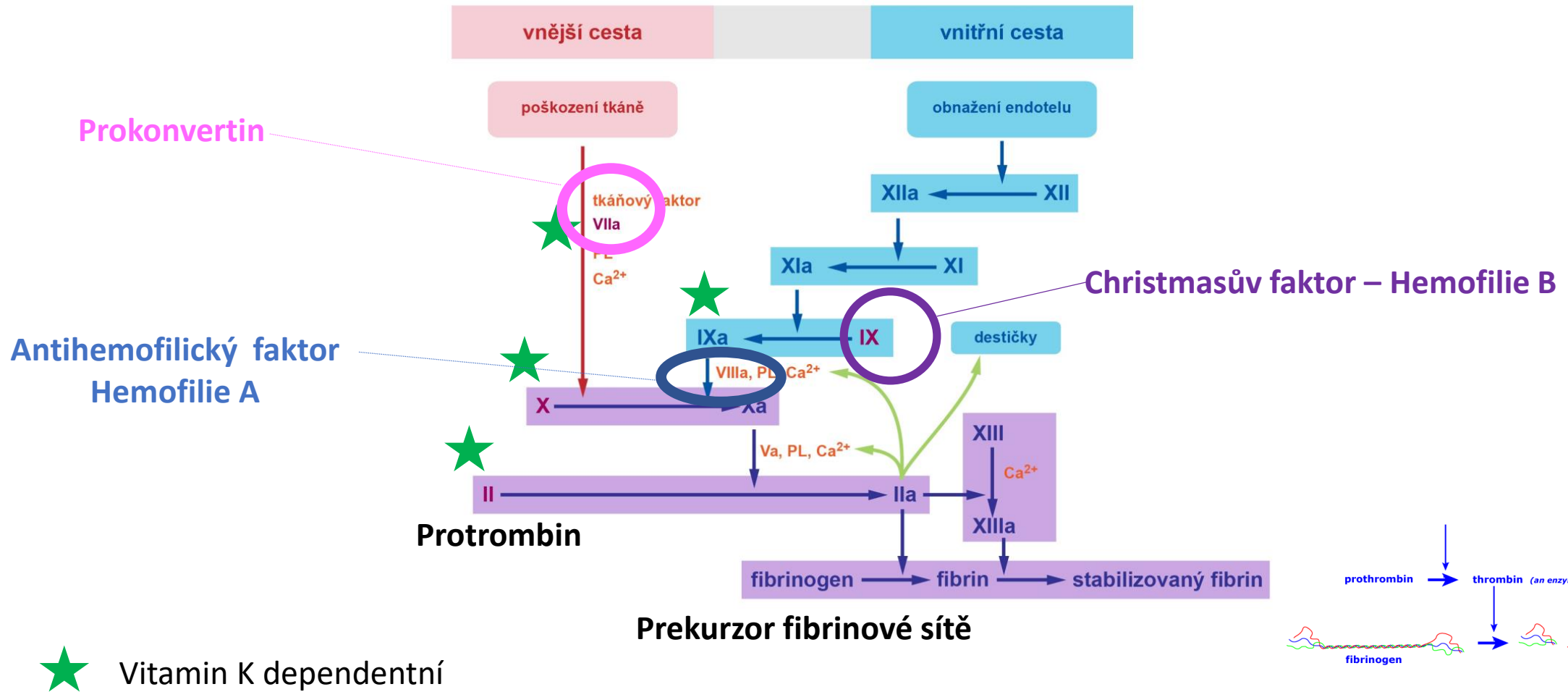
- Infekční onemocnění
- Nádorová onemocnění (mRNA pro receptor pro VEGF – potlačení angiogeneze)

Morávková A., Forstová J.: Ribonukleové kyseliny jako katalyzátory biochemických reakcí, Živa 2/2008. www.ziva.avcr.cz

2 přístupy k enzymové terapii

- A) enzymová substituční terapie
 - - ERT (enzyme replacement therapy)
 - - odáváme enzym se stejným účinkem
 - - hemofilie, lysosomální střádavá onemocnění
- B) odstranění projevů nemoci a akutní terapeutické použití
 - - cystická fibrosa, akutní hyperurikémie, infarkt myokardu apod.

Koagulační kaskáda



representation is schematic

<http://fbt.cz/skripta/v-krev-a-organy-imunitního-systemu/4-hemostaza/> (23-10-2017)

<https://courses.washington.edu/conj/bloodcells/platelets.htm> (24-10-2017)

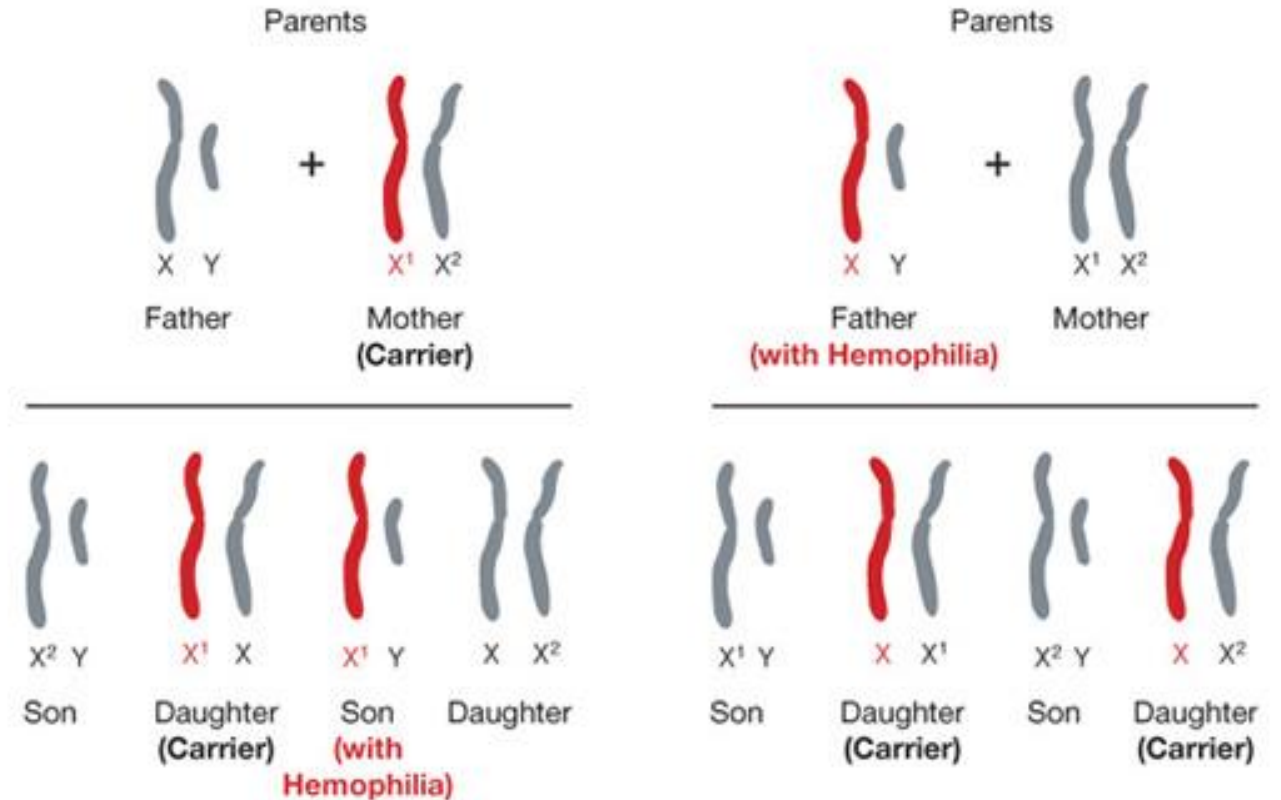
Úloha jednotlivých faktorů v koagulační kaskádě

Faktor	Název	Systém, kterého se účastní	Funkce
I	Fibrinogen	Oba	Po naštěpení poskytuje fibrin – samotnou sraženinu.
II	Protrombin	Oba	Prekursor trombinu, který aktivuje faktory I, V, VII, VIII a XIII.
III	Tkáňový faktor Tromboplastin	Exogenní	Tkáňový protein, který spouští exogenní srážecí kaskádu
IV	Ca ²⁺ ionty	Oba	Nutný pro aktivaci faktoru XIII a stabilizující pro další faktory.
V	Proakcelerin	Oba	Protein, který zrychluje aktivaci faktoru X.
VII	Prokonvertin	Exogenní	Prekursor konvertinu. Enzymu, který aktivuje faktor X.
VIII	Anti-hemofilní faktor	endogenní	Zvyšuje aktivitu faktoru X.
IX	Christmas faktor	endogenní	Aktivovaný IX přímo aktivuje X.
X	Stuartův faktor	Oba	Aktivovaná forma X tvoří z protrombinu trombin.
XI	Prekursor plasmatického tromboplastinu	endogenní	Aktivovaná forma XI aktivuje IX.
XII	Hagemanův faktor	endogenní	Je aktivován kontaktem s povrchy a nebo kallikreninovým systémem. Aktivovaný pomáhá rozeběhnout endogenní systém.
XIII	Faktor stabilizující fibrin	Oba	Aktivovaný XIII zesiluje fibrin, a vytvoří tak sraženinu.

Hemofilie

- Většinou jde o dědičné onemocnění (existuje ale i získaná hemofilie)
- Poruchy srážlivosti krve
- Vzhledem ke spojení s chromozomem X jsou drtivou většinou pacientů muži

Hemophilia



Typy hemofilie

Nedostatek srážecího faktoru VIII – **typ A** – nejčastější, „klasická hemofilie“
– cca 1 z 5000 až 10 000 mužů
- mírná, středně těžká, těžká

Nedostatek srážecího faktoru IX – **typ B** – cca 1 z 25 000 mužů (Christmas disease)

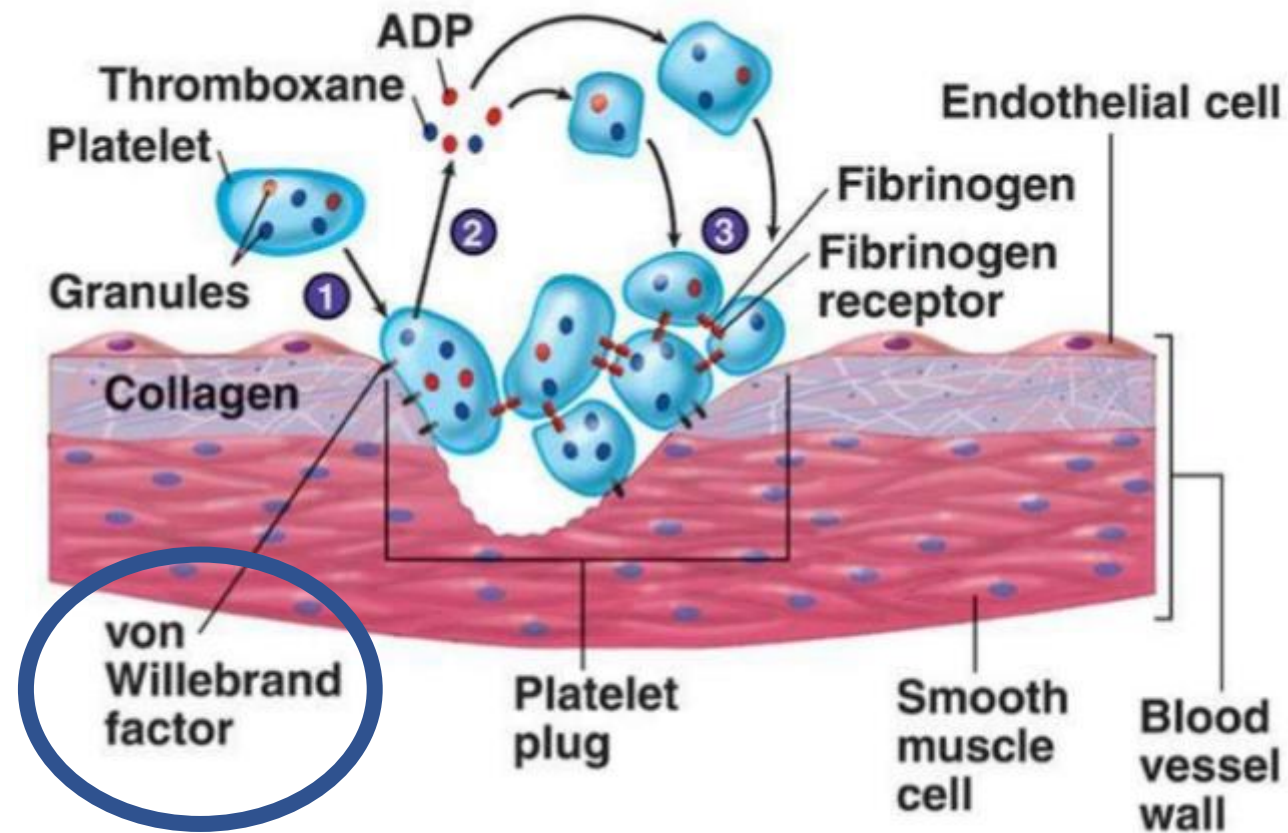
Související choroby

Hemofilie C je onemocnění zapříčiněné defektem faktoru XI.

Krvácivá onemocnění způsobená nedostatkem jiných srážecích faktorů (V, VII, X a XI nebo nedostatkem protrombinu a fibrinogenu).

Získaná hemofilie – produkce protilátek proti srážecím faktorům

Von Willebrandova choroba – nejčastější vrozené krvácivé onemocnění

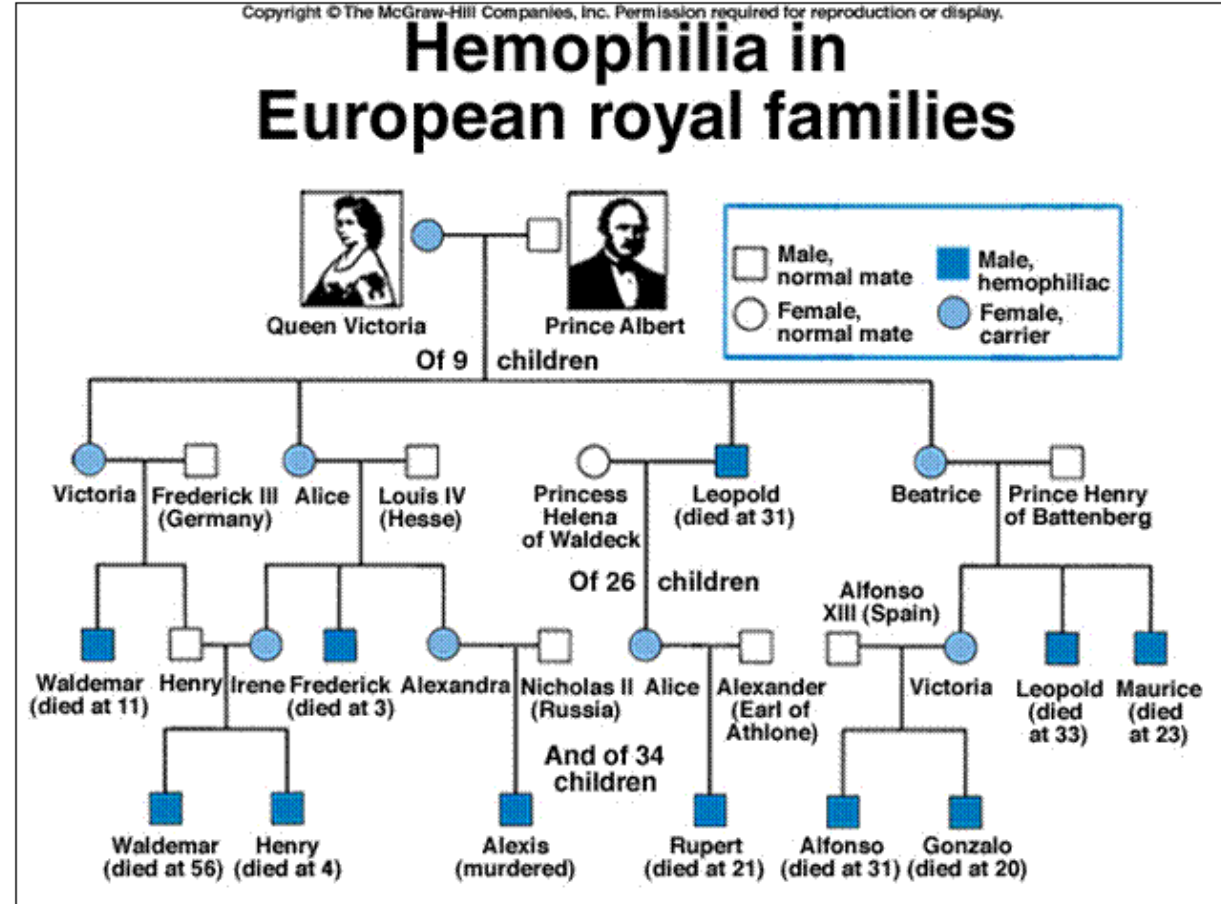


Královské onemocnění



Královna Viktorie

https://cs.wikipedia.org/wiki/Hemofilie#/media/File:Queen_Victoria,_Prince_Albert,_and_children_by_Franz_Xaver_Winterhalter.jpg (20-10-2017)



http://nemoc-pomoc.cz/?page_id=42 (20-10-2017)

Rasputin



https://cs.wikiquote.org/wiki/Grigorij_Jefimovi%C4%8D_Rasputin (21-10-2017)



<http://aroundmovies.com/celebs/alan-rickman-roles-in-movies-to-1988> (21-10-2017)

Léčba

- V ČR v současné době registrováno celkově asi 1000 osob
- Náhrada chybějícího či nefunkčního faktoru
- Izolované z krve x rekombinantní
- Budoucnost – genové terapie

Hemofilie není jen krvácení z ran po úrazech!!

- Krvácení do kloubů, svalů – poškození kloubů, bolesti atd.
- Nitrolebeční krvácení

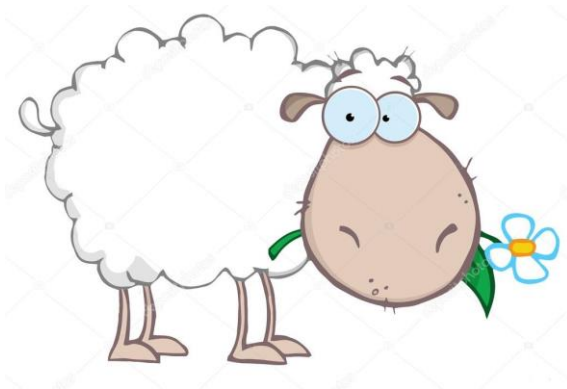
Zvířecí modely pro studium hemofilie



<https://speakingofresearch.com/2015/12/04/faseb-hosts-briefing-on-canine-research/> (28-10-2017)



<https://www.acheta.cz/mys-laboratorni-mus-musculus-var-alba-100ks-id668.html> (28-10-2017)



<https://cz.depositphotos.com/61066451/s-tock-illustration-white-sheep-cartoon-character.html> (28-10-2017)

Bioléčiva – faktor VIII

Recombinate	
Generický název	Octocog α
Látka	rekombinantní koagulační faktor VIII Stejná aminokyselinová sekvence a posttranslační modifikace srovnatelné s nativním faktorem VIII izolovaným z krevní plasmy.
Indikace	hemofilie A
Výroba	CHO buňky
Povolení	1992
Pozn.	Recombinate byl první přípravek obsahující rekombinantní faktor VIII uvedený na trh. Při výrobě se připravuje nejdříve nekovalentní komplex faktoru VIII a von Willebrandova faktoru, které se společně exprimují v transformovaných CHO buňkách. Koexprese s von Willebrandovým faktorem je použita pro zvýšení stability faktoru VIII během sekrece z buněk a v médiu. Komplex je izolován a von Willebrandův faktor je poté odstraněn pomocí imunoafinitní chromatografie. Biosimilars: Bioclatale

Advate	
Generický název	Octocog α
Látka	rekombinantní koagulační faktor VIII
Indikace	hemofilie A
Výroba	CHO buňky
Povolení	2003
Pozn.	"Blockbuster"

ReFacto/Xyntha	
Generický název	Moroctocog α
Látka	mutein koagulačního faktoru VIII
Indikace	hemofilie A
Výroba	CHO buňky
Povolení	2000
Pozn.	Tento mutovaný faktor VIII má odstraněnu podstatnou část B domény. Tato část neovlivňuje jeho aktivitu při krevním srážení, a proto tento preparát s molekulovou hmotností cca 170 kDa má téměř dvojnásobnou specifickou aktivitu. To dovoluje použití menšího množství a zároveň to odstraňuje nutnost přidávání stabilizátoru. Další generací přípravku ReFacto je Xyntha (povolení 2008). Rozdíl je ve výrobním postupu.

Kogenate FS	
Generický název	Octocog α
Látka	rekombinantní koagulační faktor VIII stabilizovaný sacharosou
Indikace	hemofilie A
Výroba	BHK (baby hamster kidney) buňky
Povolení	1993
Pozn.	Přípravek Kogenate FS obsahuje faktor VIII v nejvyšší koncentraci, což umožňuje zkrácení času intravenózní aplikace. Pro stabilizaci je místo albuminu použita sacharosa. „Blockbuster“ Biosimilars: Helixate FS

Bioléčiva – faktor IX

BeneFIX	
Generický název	nonacog α
Látka	rekombinantní lidský koagulační faktor IX
Indikace	hemofilie B
Výroba	CHO buňky
Povolení	1997
Pozn.	BeneFIX je první rekombinantní faktor IX na trhu.

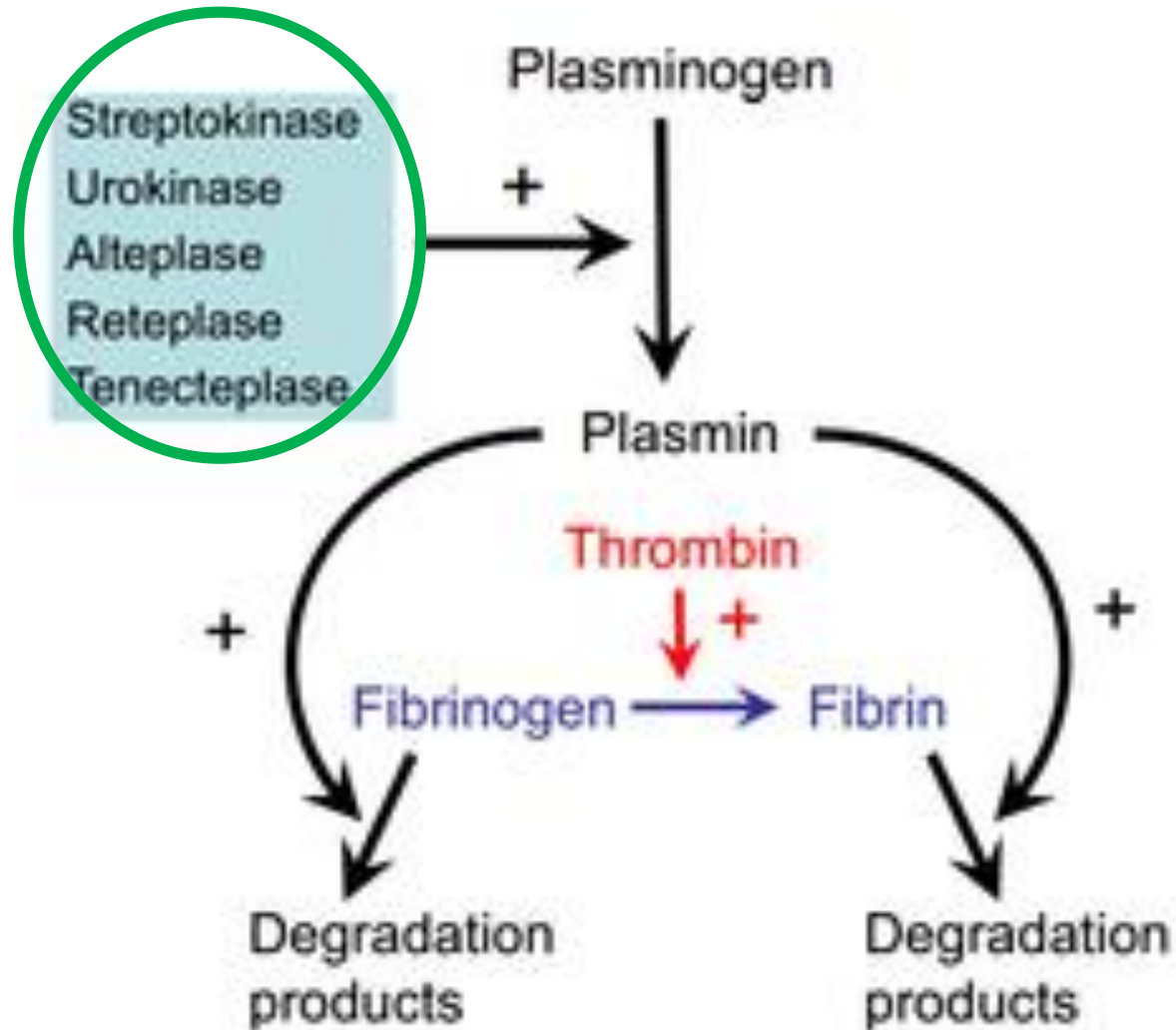
IB1001/Rixubis	
Generický název	nonacog α
Látka	rekombinantní lidský koagulační faktor IX
Indikace	hemofilie B
Výroba	CHO buňky
Povolení	2013
Pozn.	Podobný přípravku BeneFIX

Bioléčiva – faktor VII

- Mimo jiné řešení problému vzniku protilátek proti faktorům VIII a IX.

NovoSeven	
Generický název	eptakog α
Látka	rekombinantní faktor VIIa
Indikace	vrozená i získaná hemofilie A a B – deficit faktoru VII či u pacientů s inhibitory faktoru VIII či IX
Výroba	BHK buňky
Povolení	1999
Pozn.	Posttranslační modifikace rekombinantního faktoru VII v preparátu NovoSeven je mírně odlišná od nativního faktoru VII. Tyto rozdíly v glykosylaci ale neovlivňují jeho proteolytickou a biologickou účinnost. Rekombinantní faktor VII je vyráběn jako zymogen, k autoaktivaci dochází během purifikace. „Blockbuster“

Fibrinolýza



Antikoagulancia

Léčiva snižující srážlivost krve.

- Infarkt myokardu
- Mrtvice
- Embolie

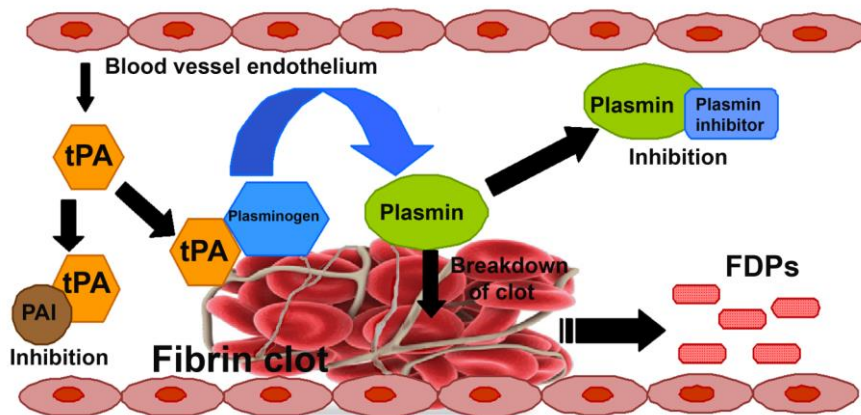
Tkáňový aktivátor plasminogenu

- Nejdůležitější fyziologický aktivátor plasminogenu

Retavase/ Rapilysin	
Generický název	Retepláza
Látka	mutein lidského t-PA (delece mezi AMK 3-176)
Indikace	akutní infarkt myokardu
Výroba	E. coli (kmen K12)
Povolení	1996
Pozn.	Je nazýván také třetí generací trombolytických preparátů. Retavase obsahuje pouze 355 z 527 AMK, které tvoří nativní lidský t-Pa. To má za následek urychlené vylučování, což umožňuje rychlé použití dvou terapeutických dávek za sebou. Druhým efektem rozsáhlé delece je to, že se méně váže na fibrin a snáze proniká dovnitř krevních trombů a samotná proteolýza probíhá rychleji. <ul style="list-style-type: none"> - Produkce ve formě inkluzních tělísek - Produkce v neglykosylované podobě.

Activase/ Cathflo Activase/Actilyse/Activacin/Actiplas	
Generický název	Altepláza
Látka	t-Pa typ I
Indikace	zmírnění následků po akutním infarktu myokardu a mozkové mrtvici štěpení plicních sraženin čištění katetrů
Výroba	CHO buňky
Povolení	1987
Pozn.	Preparát se podává infuzí v několika dávkách s velmi pomalou aplikací léčiva.

TNKase/Metalyse	
Generický název	Tenectepláza
Látka	mutein lidského t-Pa (mutace 6 AMK)
Indikace	akutní infarkt myokardu
Výroba	CHO buňky
Povolení	2000
Pozn.	TNKase je novou generací Aktivasy. Mutace zvyšují afinitu pro fibrin a také rezistenci vůči přirozeně se vyskytujícím inhibitorům t-PA. Zároveň dochází k prodloužení biologické aktivity. Další specitou je fakt, že Activase může být podána velmi rychle (5 s) a pouze v jedné dávce.



Hirudin

Váže trombin a tím ho inhibuje.

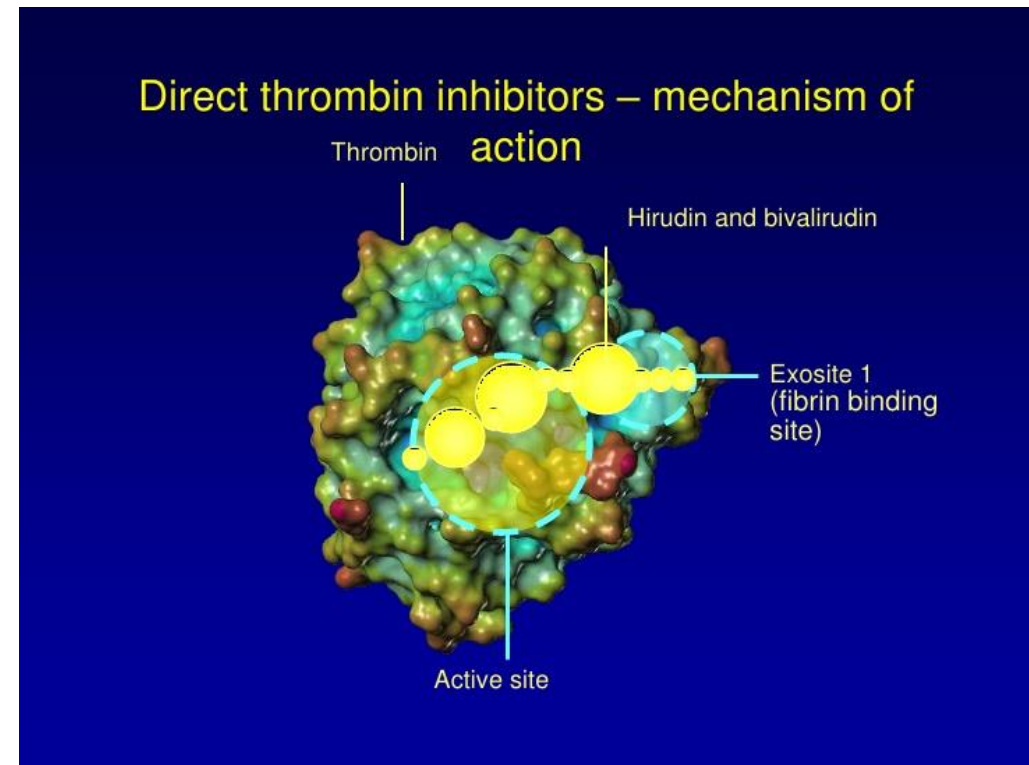
Pijavka lékařská.



<http://www.lecivepijavice.cz/historie.html> (27-10-2017)



<http://syladys.com/cs/pages/323217> (27-10-2017)



<https://www.slideshare.net/aravazhi/newer-anticoagulants> (28-10-2017)

Preparáty na trhu

Refludan	
Generický název	Lepirudin
Látka	mutein hirudinu typu 1
Indikace	antikoagulace u pacientů s heparinem indukovanou trombocytopenií a souvisejícími tromboembolickými chorobami jako prevence dalších komplikací.
Výroba	S. cerevisiae
Povolení	1998
Pozn.	Tento rekombinantní polypeptid má na rozdíl od přírodního materiálu dvě strukturální odlišnosti – nedochází k sulfataci hydroxy skupiny Tyr63 a N-koncový isoleucin je vyměněn za leucin.

Iprivask	
Generický název	Desirudin
Látka	rekombinantní hirudin typ 1
Indikace	prevence vzniku trombózy hlubokých tepen u pacientů, kteří podstupují operaci náhrady kyčelního kloubu
Výroba	S. cerevisiae
Povolení	2003
Pozn.	Desirudin má, kromě nepřítomnosti sulfatované OH skupiny na Tyr63, shodnou sekvenci s nativním hirudinem.

- **Angiomax (Hirulog/Efludan)**
- Bivalirudin
- syntetický antikoagulační peptid obsahující 20 AMK sekvenci hirudinu
- specifický inhibitor trombinu
- na trhu od 2000
- !nejde o rekombinantní protein!

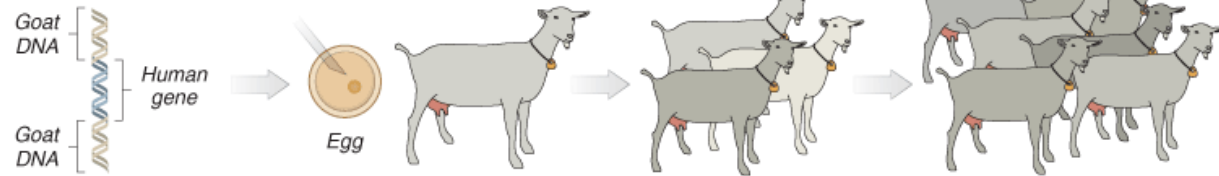
Transgenní kozy – ATryn

Schválila EMA 2006 i FDA 2009

- Izolace antitrombinu – inhibitor koagulačních reakcí

Bioengineering on the Farm

The Food and Drug Administration has approved the first drug produced in the milk of genetically engineered animals.



MODIFYING THE DNA

A human gene that produces the blood protein antithrombin is inserted into a short strand of goat DNA.

Sources: GTC Biotherapeutics

IMPLANTING THE DNA

The modified DNA is injected into the nucleus of a fertilized goat egg, which is then implanted into a female.

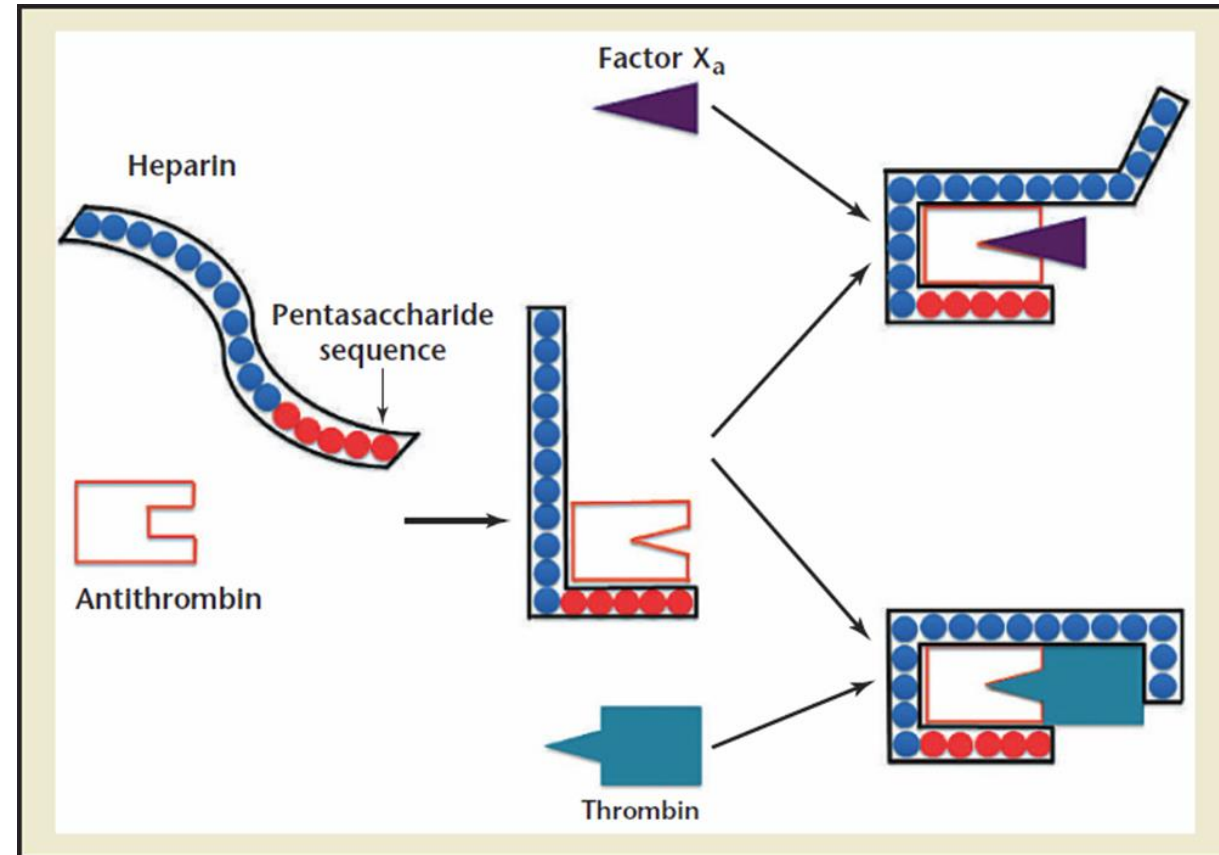
TESTING THE OFFSPRING

Kids born from the modified eggs are tested for the presence of antithrombin in their milk. Promising kids are bred normally to create a herd of modified goats.

EXTRACTING THE PROTEIN

Milk from the herd is filtered and purified. Annually, each goat can produce as much antithrombin as 90,000 human blood donations.

<https://pilejordinieto.wordpress.com/genetic-engineering/> (27-9-2017)

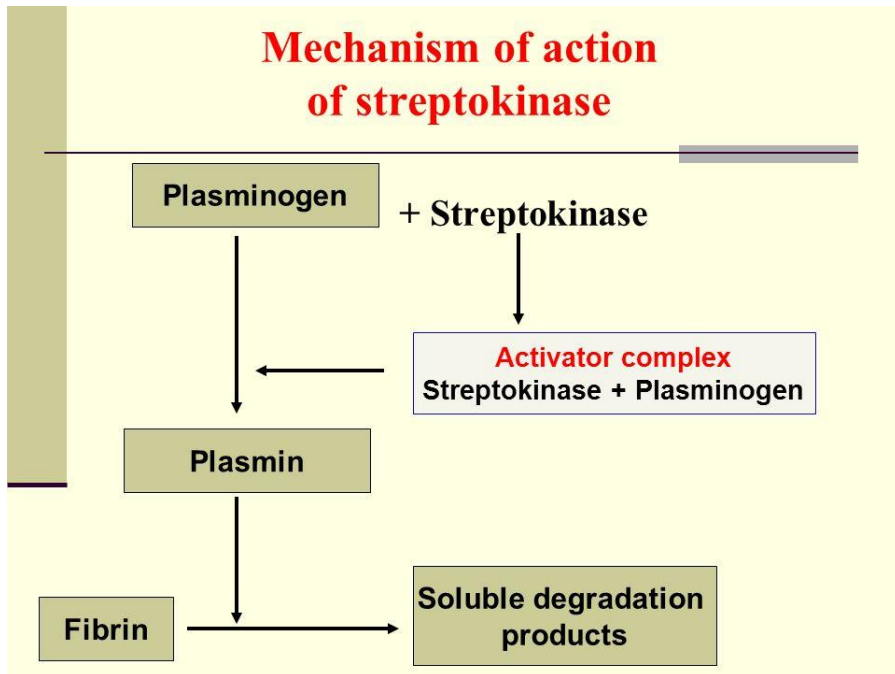


http://read.nxtbook.com/medreviews/reviewcardiovascularmedicine/volume16no3/drugreview_heparin.html (28-10-2017)

Streptokinasa

Nejde o rekombinantní protein !!!!

Streptococcus haemolyticus skupina C



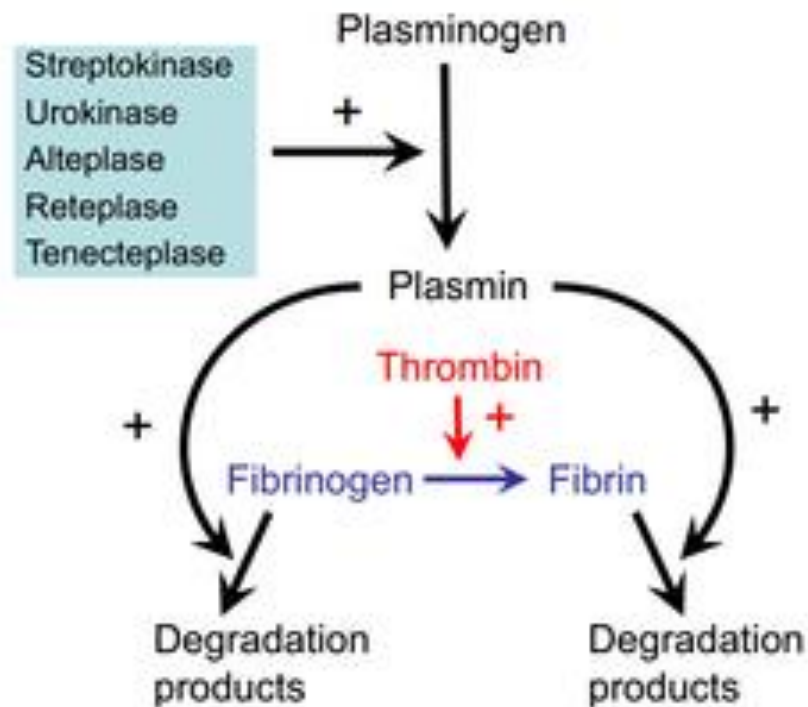
Streptase	
Generický název	Streptokinasa
Látka	streptokinasa
Indikace	akutní infarkt myokardu štěpení trombů
Výroba	C β-hemolytické bakterie Streptococcus
Povolení	1977
Pozn.	V tomto případě se nejedná o rekombinantní protein, ale protein přirozeně se vyskytující v příslušné bakterii. Vzhledem k tomu, že jde o biotechnologickou výrobu, uvádíme jej zde ve stejném formátu jako další léčiva. Streptokinasa vytváří s plasminogenem nekovalentní komplex a plasminogen se při tom aktivuje a může štěpit fibrin a krevní sraženiny.

Kabikinase	
Generický název	Streptokinasa
Látka	streptokinasa
Indikace	akutní infarkt myokardu
Výroba	C β-hemolytické bakterie Streptococcus
Povolení	1959
Pozn.	Kabikinase je postupně nahrazena novějšími produkty

Eminase	
Generický název	Anistreplase, Lys-plasminogen-streptokinase activator complex
Látka	komplex Lys-plasminogenu a streptokinasy
Indikace	akutní infarkt myokardu
Výroba	p-anisolvový derivát komplexu streptokinasy (produkce v bakteriích C β-Streptococcus) a Lys-plasminogenu (z lidské plasmy)
Povolení	1989
Pozn.	Anistreplase je zymogen komplexu, k aktivaci dochází hydrolýzou in vivo. V současné době již nahrazena modernějšími přípravky.

Urokinasa

Abbokinase	
Generický název	Urokinasa
Látka	Urokinasa
Indikace	masivní plicní embolie u dospělých pacientů
Výroba	izolace z primárních tkáňových kultur lidských neonatálních ledvinových buněk
Povolení	1978
Pozn.	<p>Pro výrobu primárních tkáňových kultur neonatálních ledvinových buněk jsou odebírány ledvinové buňky novorozenců, kteří zemřeli z jiných důvodů než na infekční onemocnění. Dárce i matka jsou důkladně testovány na přítomnost infekčních onemocnění. Z kultivovaných buněk se následně izoluje urokinasa.</p> <p>Urokinasa – isoforma s nižší molekulovou hmotností (v moči lze nalézt dvě isoformy urokinasy endogenně produkované ledvinami, které se liší molekulovou hmotností).</p> <p>Urokinasa je neimunogenní, neindukuje tvorbu protilátek, lze tedy použít opakovaně. V současné době je ale preparát nahrazován modernějšími léčivy na bázi t-PA.</p>



<https://www.studyblue.com/notes/n/pharm-coagulation/deck/10961526> (28-10-2017)

Co ještě?

protilátka **ReoPro** - prevenci tvorby krevních sraženin

protilátka **Nplate** - léčba chronické trombocytopenické purpury

2001–2011 – **Xigris** - aktivovaný rekombinantní lidský protein C. Stažen z trhu na základě dlouhodobé studie - nedostatečné prokázání účinku - nyní jsou na trhu preparáty s proteinem C izolovaným z krevní plasmy (Ceprotin, Octaplex).



Desmoteplase – pouze v klinických testech - aktivátor plasminogenu izolovaný ze slin netopýra *Desmodus rotundus*. V roce 2014 byl vývoj pozastaven z důvodů neprůkazných léčivých účinků.

https://en.wikipedia.org/wiki/Common_vampire_bat#/media/File:Desmodus.jpg (28-10-2017)

