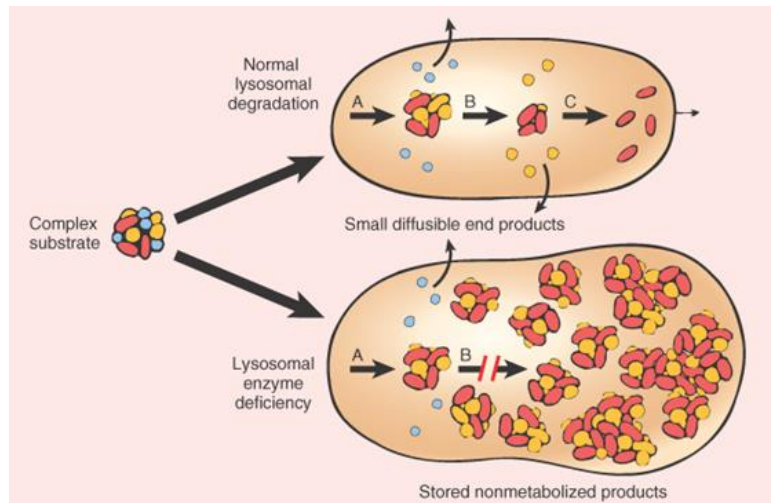


Enzymy 2

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

Lysosomální střešdavná onemocnění



Lysosom obsahuje enzymy zajišřující degradaci různých substrátů.

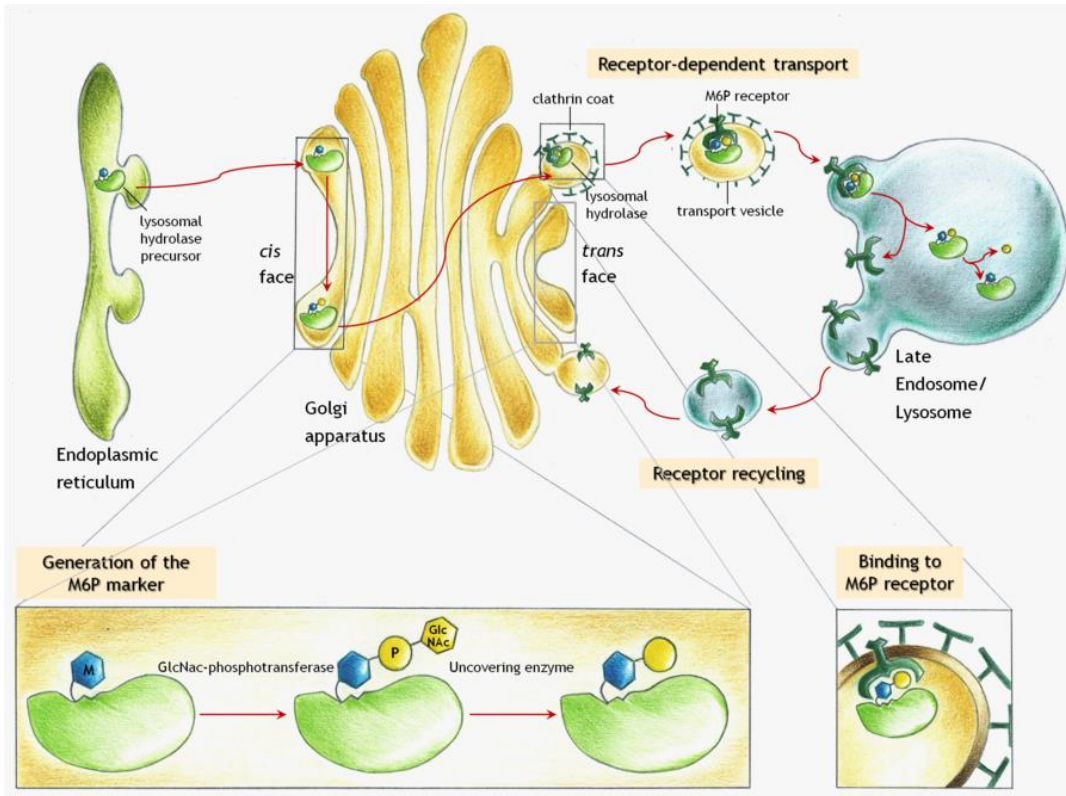
Mutace těchto enzymů mají za následek „lysosomální střešdavná onemocnění“.

Ne vše z mechanismu vzniku nemoci je v současné době jasné.

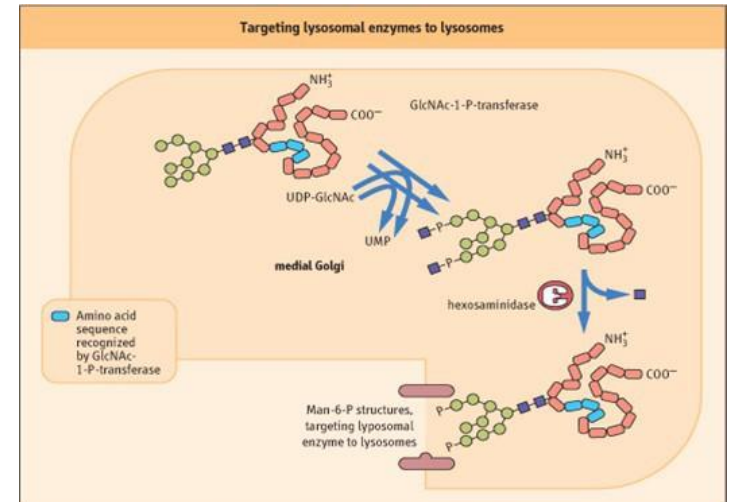
Více než 50 různých onemocnění. (Nejen poruchy lysosomálních hydrolas.)

http://4.bp.blogspot.com/-m18GIXRavbM/TV7JL0yQYgl/AAAAAAAACd8/W_qQk8-jDVY/s1600/lysosomal%2Bstorage%2Bdiseases.png (1-11-2017)

Mannosa 6-fosfátový receptor



Cílení do lysosomu je zajištěno mannosu 6-fosfátovým receptorem.
- K poruše může dojít již tady.



© Elsevier Ltd. Baynes & Dominiczak: Medical Biochemistry 2E www.studentconsult.com

<http://slideplayer.cz/slide/3341898/> (4-11-2017)

Gaucherova choroba

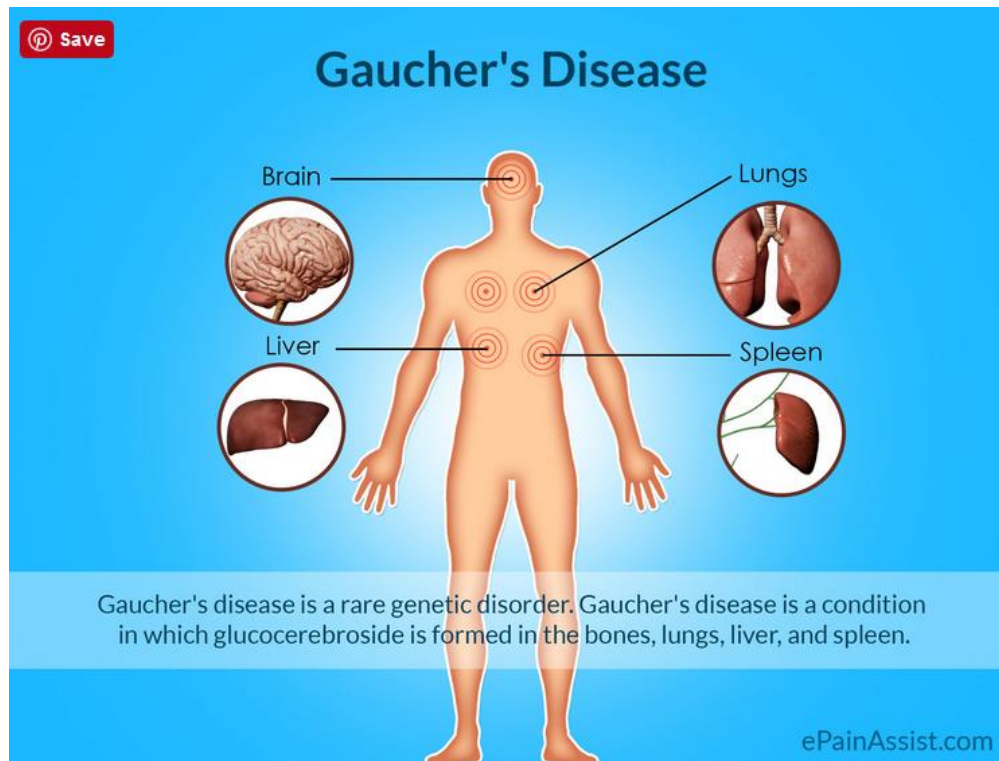
Autosomálně recesivní onemocnění

Nedostatek glukocerebrosidasy.

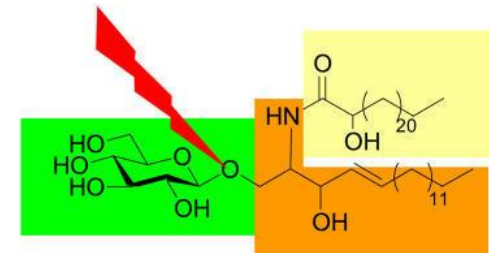
Porucha metabolismu lipidů, patří mezi sfingolipidosy

Hromadění glukocerebrosidů v makrofázích

Nejběžnější LSO – 5000 lidí celosvětově



GLUCOCEREBROSIDASE



SPHINGOSINE

FATTY ACID

β -GLUCOSE

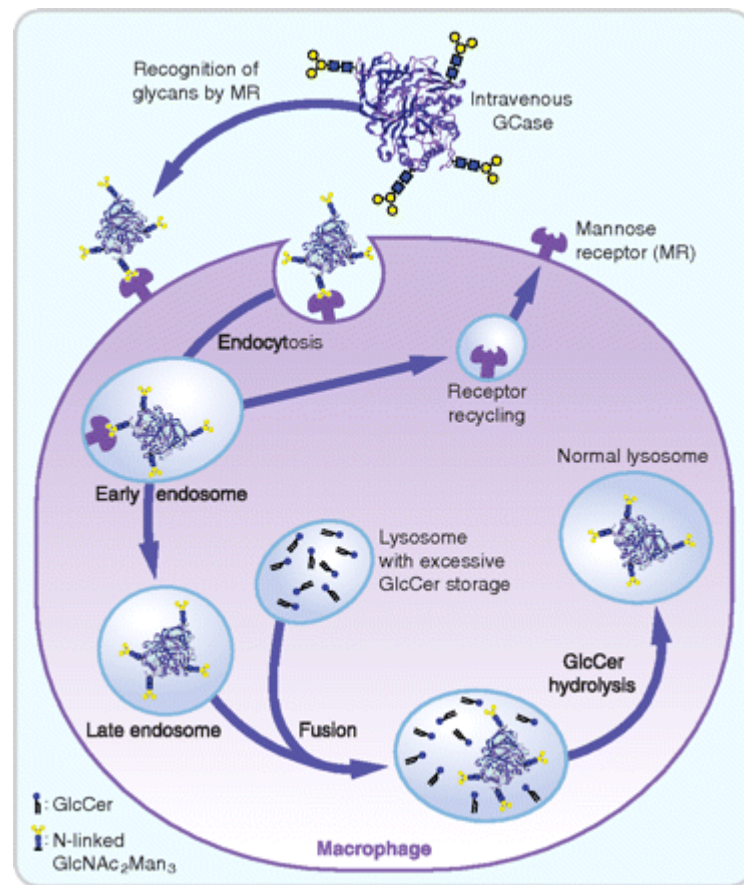
https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC529421_pmed.0010021.g001&req=4 (5-11-2017)

<https://www.epainassist.com/metabolic-disorders/gauchers-disease-or-glucoylceramidase-deficiency> (5-11-2017)

Předchůdce Cerezymu - Ceredase

Ceredase	
Generický název	Alglucerase
Látka	lidská β -glukocerebrosidasa s enzymovou modifikací glykosylace
Indikace	Gaucherova choroba
Výroba	izolace z lidské placenty s následnou enzymovou modifikací
Povolení	1991
Pozn.	<p>Po enzymové modifikaci glykosylace dochází, stejně jako u Cerezymu, k odkrytí více mannosových zbytků na povrchu enzymu, což zvyšuje správné zacílení léčiva do makrofágů, které nedostatečně odbourávají glukocerebrosidy.</p> <p>V současné době je Ceredase ve většině případů nahrazena Cerezymem.</p> <p>Ceredase se používá ve specifických případech, kdy dochází k alergické intoleranci rekombinantního produktu.</p>

Cerezyme	
Generický název	Imiglucerase
Látka	mutein (pozměněná forma) lidské β -glukocerebrosidasy – změna jedné aminokyseliny (histidin v pozici 495 za arginin) a následná posttranslační enzymová modifikace, která mění glykosylační profil
Indikace	Gaucherova choroba
Výroba	CHO buňky
Povolení	1994
Pozn.	Změna glykosylačního profilu rekombinantní cerebrosidasy (více mannosových zbytků) má za následek delší biologický poločas a lepší rozpoznání mannosovými receptory na povrchu makrofágových buněk, které způsobí správné zacílení enzymu do lysosomů. Pro léčbu Gaucherovy choroby, u které není dostatečná léčba Cerezymem se také používá léčivo Zavesca (miglustat) – inhibitor glukosylceramid syntetasy.



<http://www.pnas.org/content/107/24/10842/F2.expansion.html>
(4-11-2017)

VPRIV	
Generický název	velaglucerase α
Látka	rekombinantní β -glukocerebrosidasa
Indikace	Gaucherova choroba
Výroba	buněčná linie lidských fibroblastů (HT-1080) transfekovaná promotorem pro lidský gen β -glukocerebrosidasy
Povolení	2010
Pozn.	Rekombinantní β -glukocerebrosidasa v přípravku VPRIV má stejnou aminokyselinovou sekvenci i glykosylaci jako nativní lidský enzym.

Elelyso - Transgenní rostliny



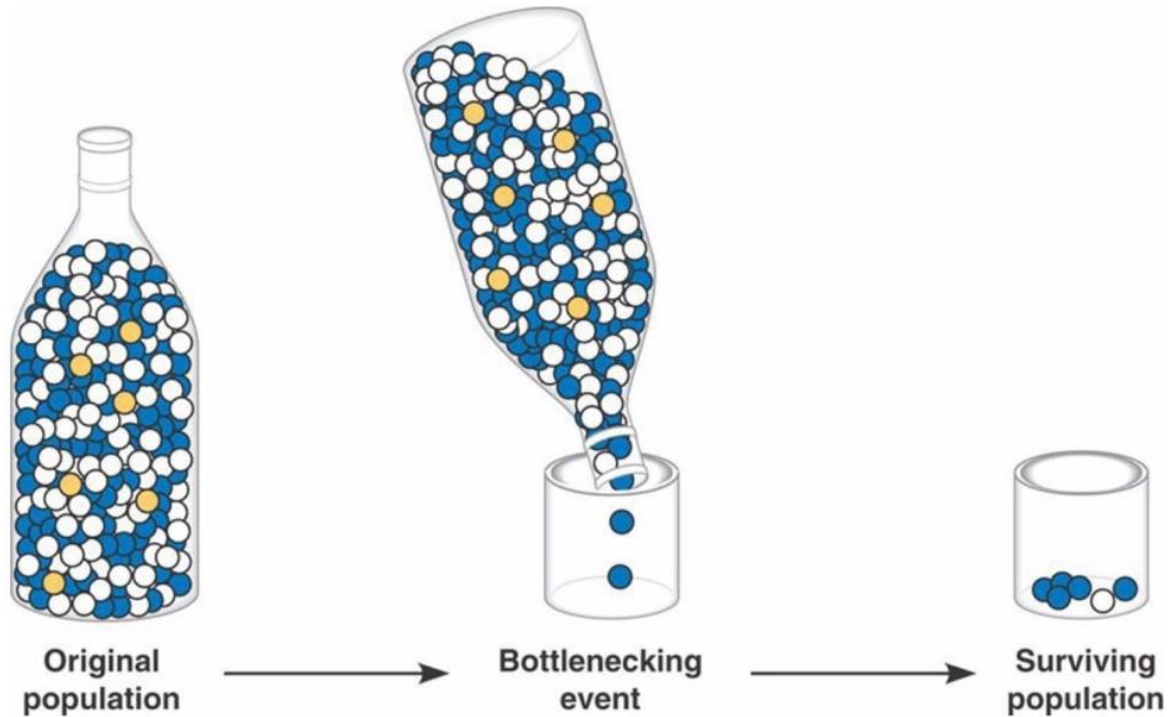
<http://protomag.com/articles/down-on-the-pharm>

(27-9-2017)

Elelyso/Uplyso	
Generický název	taliglucerase α
Látka	rekombinantí β -glukocerebrosidasa
Indikace	Gaucherova choroba
Výroba	buňky mrkve (<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>)
Povolení	2012
Pozn.	<p>β-Glukocerebrosidasa exprimovaná v buňkách mrkve již primárně obsahuje převahu mannosových zbytků na povrchu enzymu, tím odpadá následná enzymová úprava in vitro nutná u Cerezymu a Ceredasy. Důvodem jsou speciální vakuolární enzymy, které upravují glykosylační profil.</p> <p>Elelyso vykazuje stejnou účinnost, ale výrazně delší biologickou aktivitu než ostatní preparáty.</p> <p>Jedná se o vůbec první schválené léčivo produkované v GMO rostlinách.</p>

Aškenázové

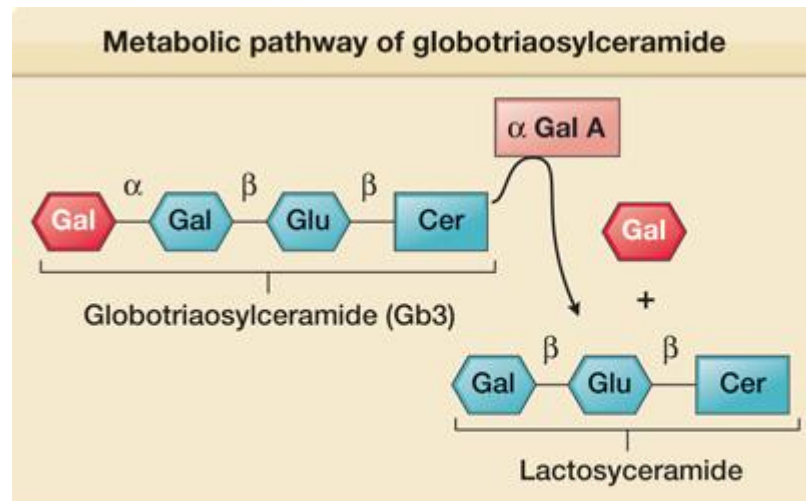
- Vysoké riziko genetického onemocnění
- Gaucherova choroba, cystická fibróza a další



<https://spark.adobe.com/page/l8wO3/> (4-11-2017)

Fabryho choroba

- Nedostatek alfa-galaktosidasy A – cca 70 mutací
- Porucha metabolismu lipidů, patří mezi sfingolipidosy
- Hromadění glykosfingolipidů
- Ovlivnění nervového systému, orgánů (játra, srdce, ledviny), cévních endotelií a očí



Source: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8th Edition*: www.accessmedicine.com

Fabrazyme	
Generický název	Agalsidase β
Látka	rekombinantní α -galaktosidasa A Má identickou aminokyselinovou sekvenci jako nativní enzym, je glykosylován na třech místech a ve finálním preparátu je ve formě homodimeru s relativní molekulovou hmotností 100 kDa.
Indikace	dlouhodobá léčba Fabryho choroby
Výroba	CHO buňky
Povolení	2003
Pozn.	Ačkoli u velkého procenta pacientů (88 %) dochází k tvorbě protilátek proti α -galaktosidase, nepůsobí to žádné závažné vedlejší účinky. Během purifikace využito pět chromatografických kroků.

Replagal	
Generický název	Agalsidase α
Látka	rekombinantní α -galaktosidasa
Indikace	Fabryho choroba
Výroba	lidské fibroblasty (HT-1080 buňky)
Povolení	2003
Pozn.	Nejedná se o rekombinantní buňky, nebo o transfekovaný exogenní gen pro lidskou α -galaktosidasu. Buňky jsou transfekovány specifickým promotorem a tím aktivovány pro zvýšenou expresi tohoto enzymu. Během purifikace je také využito pět chromatografických kroků.



<https://www.fabrazyme.com/patients/Treatment-with-Fabrazyme/How-Fabrazyme-is-Made.aspx> (5-11-2017)

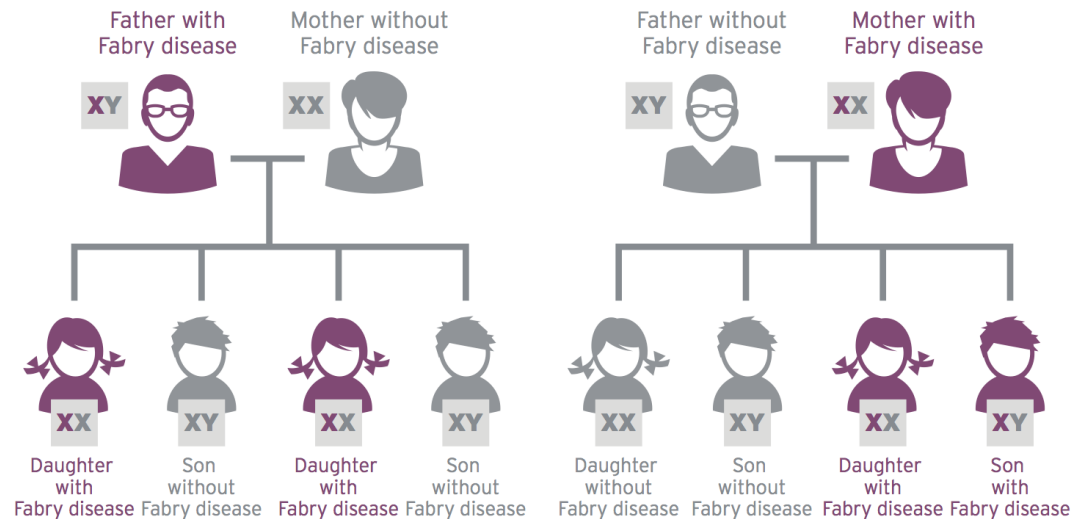
Dědičnost Fabryho choroby

HEREDITARY

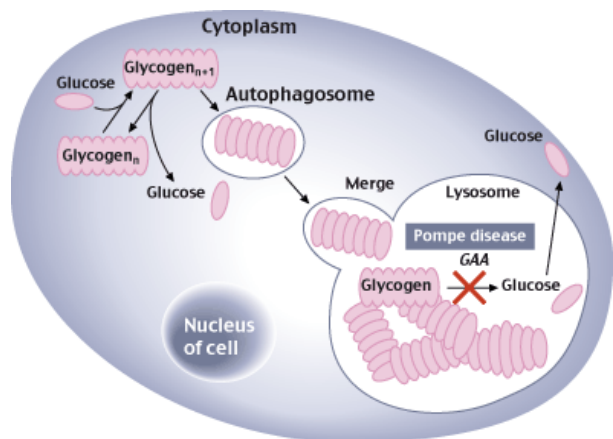
Depending on which parent contributes the X chromosome containing the genetic mutation, Fabry disease is passed to children differently.

An affected father (XY) will pass the mutation to all of his daughters, but none of his sons.

An affected mother (XX) will have a 50% chance of passing the mutation to any of her children.



Pompeho choroba



<http://www.socialstyrelsen.se/rarediseases/pompedisease> (4-11-2017)

Deficit alfa-D-glukosidasy
Hromadění nedegradovaného glykogenu
v lysosomech.

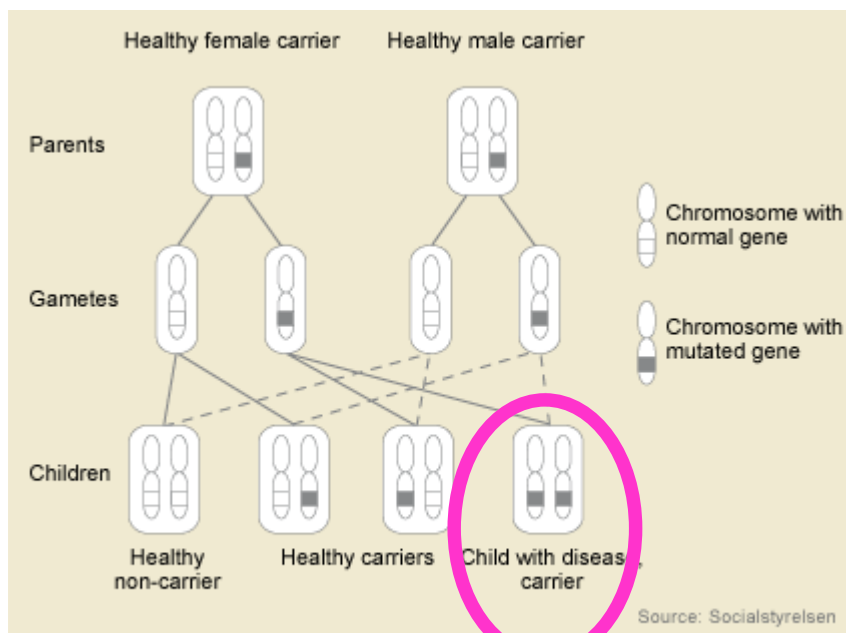
Autosomálně recesivní onemocnění.

Novorozenecká a dětská forma

- Selhání oběhového a dýchacího systému

Dospělá forma

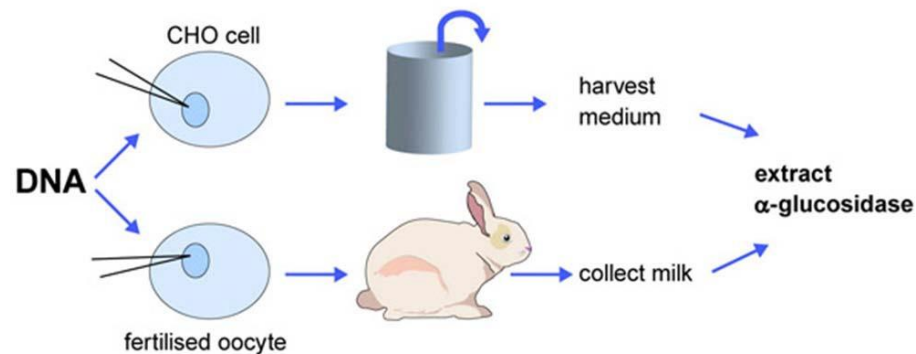
- Slábnutí kosterních a dýchacích svalů



<http://www.socialstyrelsen.se/rarediseases/pompedisease> (4-11-2017)

Figure: Autosomal recessive inheritance

Myozyme	
Generický název	alglucosidase α
Látka	rekombinantní glykosylovaná α -glukosidasa
Indikace	Pompeho choroba
Výroba	CHO buňky
Povolení	2006
Pozn.	<p>V CHO buňkách dochází ke správné glykosylaci, včetně označení terminálních sacharidových struktur manna-6-fosfátem, který je důležitý pro správné cílení do lysosomů.</p> <p>Vývojovým předchůdcem preparátu Myozyme byla látka Pompase, která obsahovala rekombinantní α-glukosidasu, která by byla exprimována do mléka transgenních králíků. Tento způsob výroby byl nejen ekonomicky náročnější a provázený nižším výtěžkem než produkce v CHO buňkách, ale navíc takto produkováný enzym vykazoval nižší enzymovou aktivitu než v přípravku Myozyme, který Pompasu zcela nahradil.</p>



<http://www.worldpompe.org/index.php/news/508-international-pompe-day-2014> (4-11-2017)

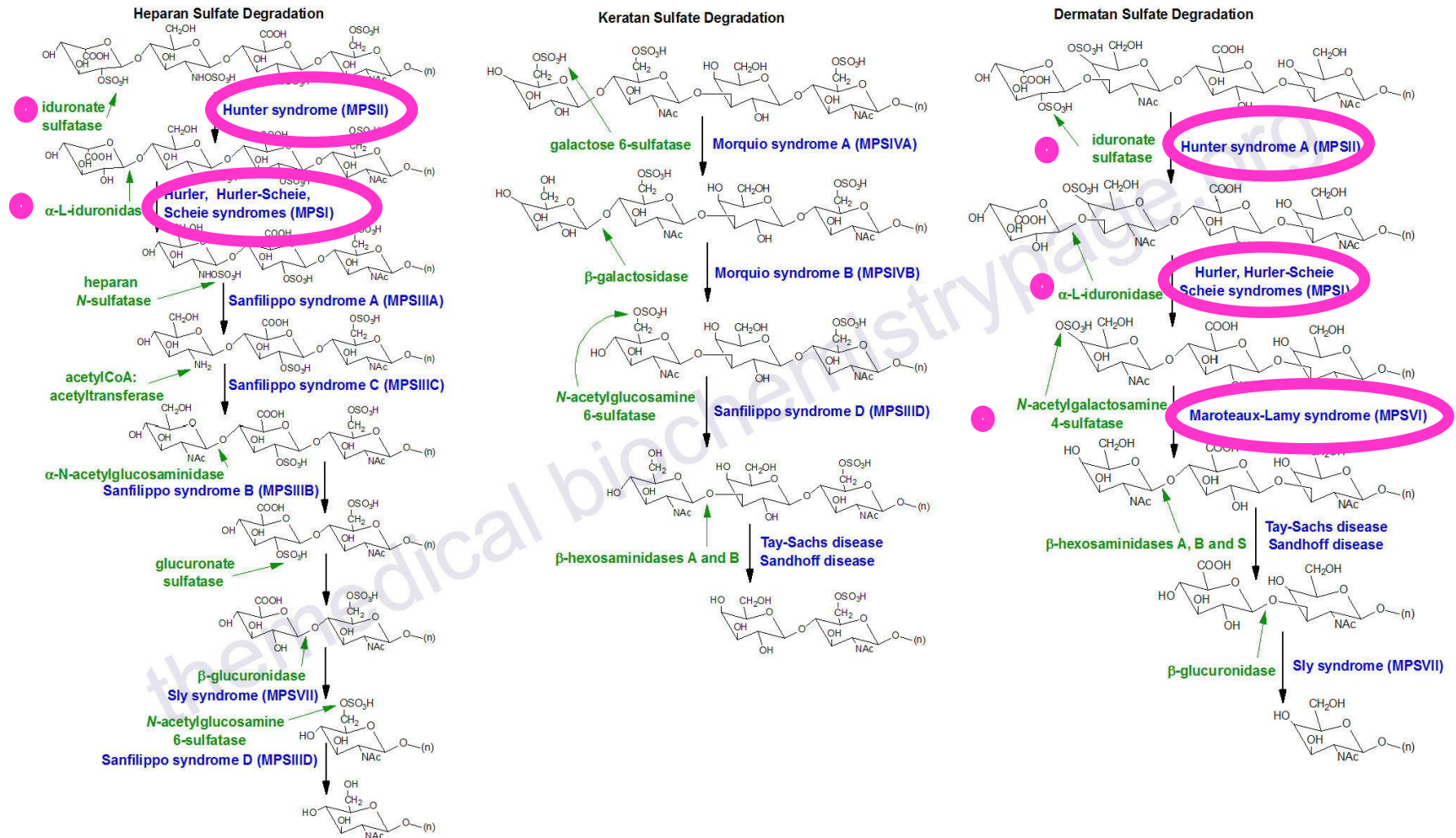
Lumizyme	
Generický název	alglucosidase α
Látka	rekombinantní glykosylovaná α -glukosidasa
Indikace	Pompeho choroba
Výroba	CHO buňky
Povolení	2010
Pozn.	<p>Lumizyme je velmi podobný preparátu Myozyme. Odlišuje se glykosylačním profilem z důvodu jiného výrobního postupu.</p>

Mukopolysacharidosy (MPS)

- Poruchy degradace glykosaminoglykanů (GAG) a jejich hromadění v různých orgánech.
- deficit některého z lysosomálních enzymů podílejících se na degradaci GAG.



Mukopolysacharidose (MPS)



MPS I autozomálně recesivní, deficit α -L-iduronidasy

Aldurazyme	
Generický název	Larodinase
Látka	fragment rekombinantní lidské α -L-iduronidasy
Indikace	mukopolysacharidosa I (MPS I)
Výroba	CHO buňky
Povolení	2003
Pozn.	Rekombinantní α -L-iduronidasa je při výrobě zkrácena o 25 AMK na N-konci, zbytek sekvence je identický k přirozeně se vyskytující α -L-iduronidase.

MPS II X vázaná dědičnost, deficit iduronát-2-sulfatasy

Elaprase	
Generický název	Idursulfase
Látka	rekombinantní iduronát-2-sulfatasa
Indikace	mukopolysacharidosa II
Výroba	lidské fibroblasty (HT-1080 buňky)
Povolení	2006
Pozn.	Idursulfase obsahuje dvě disulfidové vazby a osm glykosylačních míst. Pro biologickou aktivitu je dále důležitá modifikace cysteinu v pozici 59 na formylglycin.

MPS VI X autosomálně recesivní, deficit *N*-acetylgalaktosamin-4-sulfatasy

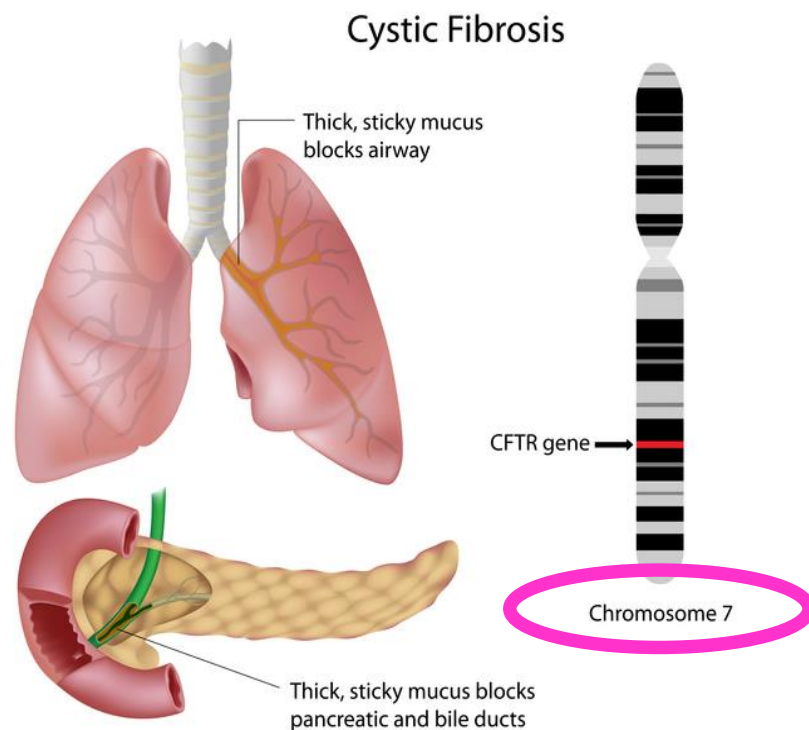
Naglazyme	
Generický název	Galsulfase
Látka	<i>N</i> -acetylgalaktosamin-4-sulfatasa (arylsulfatasa B)
Indikace	mukopolysacharidosa VI
Výroba	geneticky modifikované CHO buňky (CSL4S-342)
Povolení	2005
Pozn.	Glykoprotein obsahuje šest glykosylačních míst, z nichž čtyři nesou mannosu-6-fosfát. Posttranslační modifikace, nutné pro správnou biologickou aktivitu, zahrnují odštěpení signální sekvence a přeměnu Cys53 na formylglycin.

V současné době je v ČR enzymovou substituční terapií (ERT) léčeno celkem 31 z **33** diagnostikovaných pacientů s **Gaucherovou chorobou**. Devatenáct pacientů je na ERT imiglucerasou (preparát Cerezyme), šest na ERT velaglucerasou (Vpriv) a pět na ERT miglustatem (Zavesca). Dále je léčeno **devět** pacientů s diagnosou **Pompeho choroby** (alglukozidasa – Myozyme), 39 ze **108** diagnostikovaných pacientů s **Fabryho chorobou** (tři agalzidasou β – Fabrazym, 36 agalzidasou α – Replagal). **Tři** pacienti s diagnosou **mukopolysacharidosa I typ Hurler** byli přechodně léčeni laronidasou (Aldurazyme) a prodělali transplantaci kostní dřeně, nyní jsou ve stabilizovaném stavu. **Dva** pacienti s **mukopolysacharidosou I typu Hurley-Scheie** jsou dlouhodobě léčeni laronidasou (Aldurazyme). **Tři** pacienti s **mukopolysacharidosou II** jsou na ERT idursulfasou (Elaprase), **dva** pacienti s **mukopolysacharidosou VI** jsou léčeni galsulfasou (Naglazyme).

- Data z roku 2012

Cystická fibrosa

- Jedno z nejčastějších smrtelných dědičných onemocnění
- Autosomálně recesivní
- Postihuje hlavně dýchací a trávicí systém (multiorgánové onemocnění)
- Dále také slinivku, reprodukční orgány atd.
- Tvorba abnormálně hustého hlenu – postižení různých orgánů
- Z plic nemohou být řádně a rychle odstraněny prachové částice a bakterie (*Pseudomonas aeruginosa*) – dochází k opakovaným infekcím, tím k poškození plic, selhání plic a následné smrti



<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/cystic-fibrosis#synonyms> (4-11-2017)

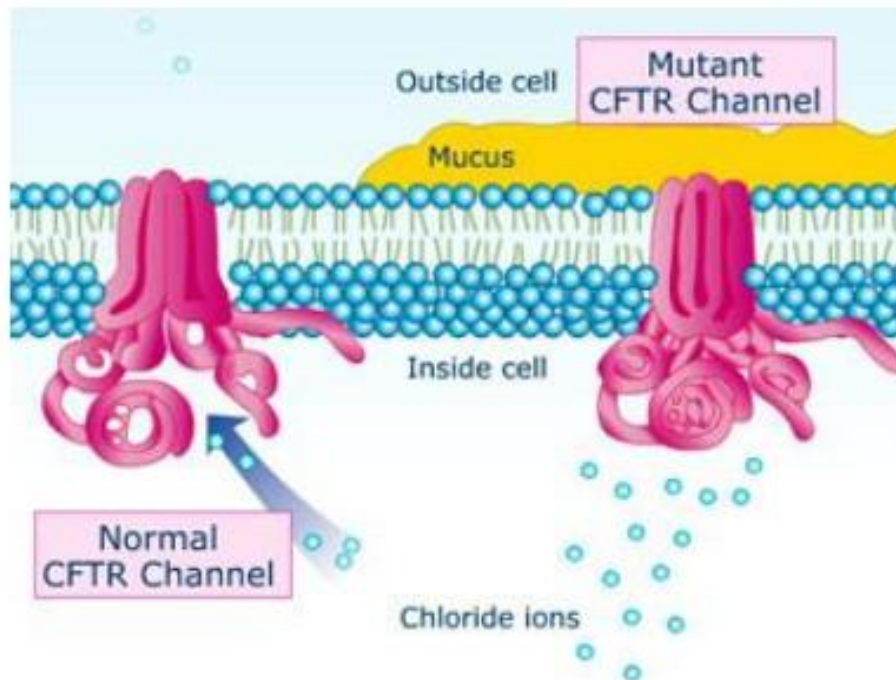
Cystická fibróza - příčina

Známo přes 1700 mutací vznikajících v CFTR genu.

Chloridový kanál Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator = CFTR

Porucha v transportu iontů chlóru, sodíku a vody

Změna fyzikálně – chemických vlastností hlenu na povrchu sliznic.



Sůl v potu – slané děti.

- Využíváno v diagnostice.
- Dále možnost genetického vyšetření.

Léčba

- léčitelná, ale nevléčitelná
- 1. péče o dobrou průchodnost dýchacích cest inhalacemi a následnou fyzioterapií
- 2. péče o dobrý stav výživy, tj. vysokokalorická strava a užívání trávicích enzymů v kapslích;
- 3. potlačení infekce a zánětu **agresivní** protizánětlivou antibiotickou léčbou (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*)
- 4. léčba komplikací.
- (transplantace plic)

Pulmozyme Inhalation Solution	
Generický název	Dornase α
Látka	rekombinantní lidská deoxyribonukleasa I
Indikace	cystická fibróza
Výroba	CHO buňky
Povolení	1993
Pozn.	Dornase α bylo první schválené léčivo pro inhalační použití.



<https://www.rxlist.com/pulmozyme-drug.htm> (5-11-2017)

Novorozenecký screening

<http://novorozeneckyscreening.cz/index.php?pg=lekari--informace-o-chorobach-vysetrovanych-v-cr>

- [kongenitální hypotyreóza - CH](#)
- [kongenitální adrenální hyperplazie - CAH](#)
- [fenylketonurie - PKU a hyperfenylalaninemie - HPA](#)
- [leucinóza, nemoc javorového sirupu - MSUD](#)
- [glutarová acidurie typ I - GA I](#)
- [izovalerová acidurie - IVA](#)
- [deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem - MCAD](#)
- [deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem - LCHAD](#)
- [deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem - VLCAD](#)
- [deficit karnitinpalmitoyltransferázy I - CPT I](#)
- [deficit karnitinpalmitoyltransferázy II - CPT II](#)
- [deficit karnitinacylkarnitintranslokázy - CACT](#)
- [cystická fibróza - CF](#)

Finanční náklady – cca 750 Kč na jednoho novorozence.

Rozšířený novorozenecký screening

<http://udmp.lf1.cuni.cz/pilotni-studie-2012>

Poruchy cyklu močoviny

Primární cílové choroby

Citrulinémie

Argininémie

Screening může zachytit nemoci

Argininjantarová acidurie

Deficit citrinu

Deficit pyruvát karboxylázy

Maternální citrulinémie

Poruchy v metabolismu sirných aminokyselin vč. poruch metabolismu vitamínu B12

Primární cílové choroby

Deficit cystationin beta-syntázy (pyridoxin non-responsivní forma, může být zachycena i pyridoxinsensitivní forma)

Deficit metylentetrahydrofolát reduktázy

Remetylační homocystinurie

typ cbIC

typ cbID

typ cbIE

typ cbIF

typ cbIG

typ cbIH

Deficit methioninadenosyltransferázy

Screening může zachytit nemoci

Deficit transkobalaminového receptor

Nedostatek vitamínu B12 u matky

Deficit methioninadenosyltransferázy u matky

Deficit biotinidázy

Tyrosinémie I. typu

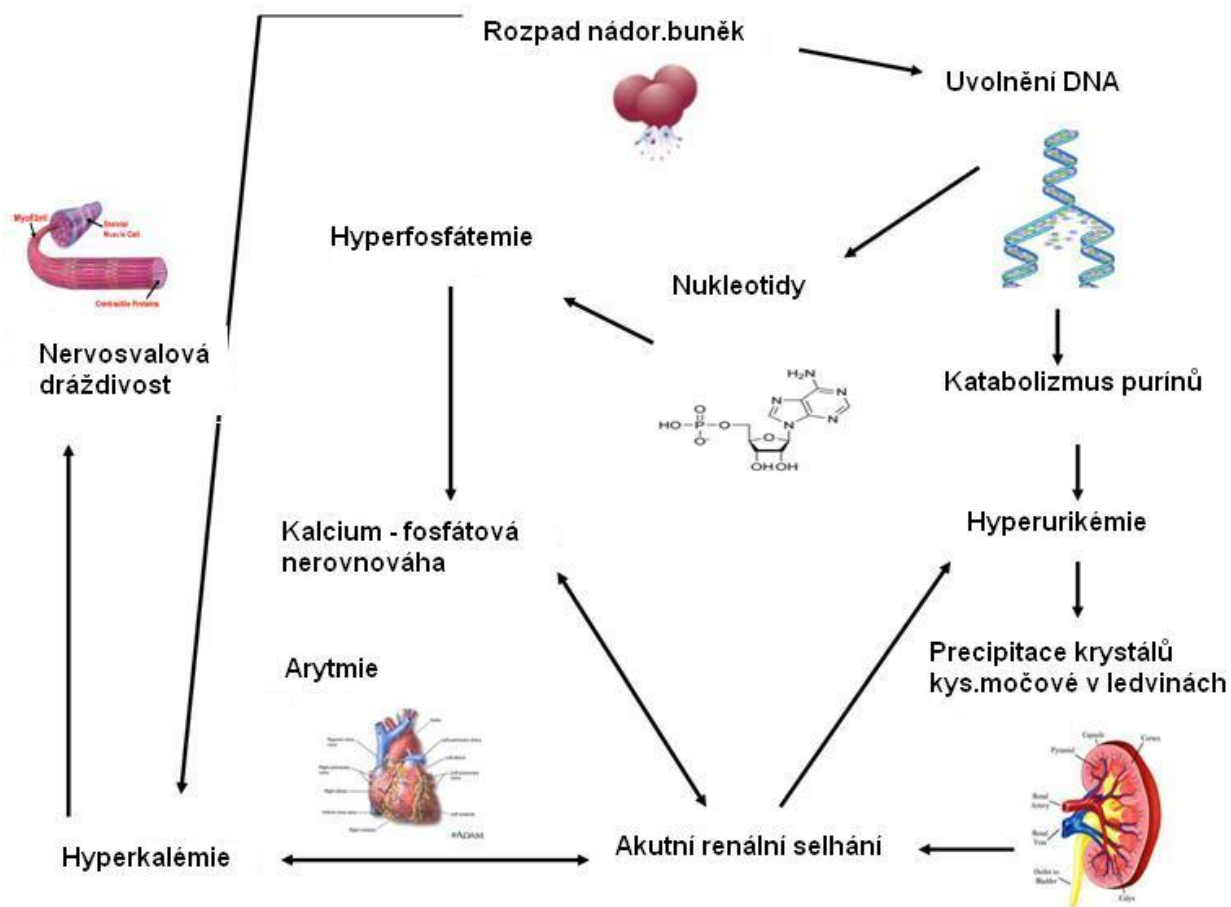
Predpoklady pro celoplošný novorozenecký screening

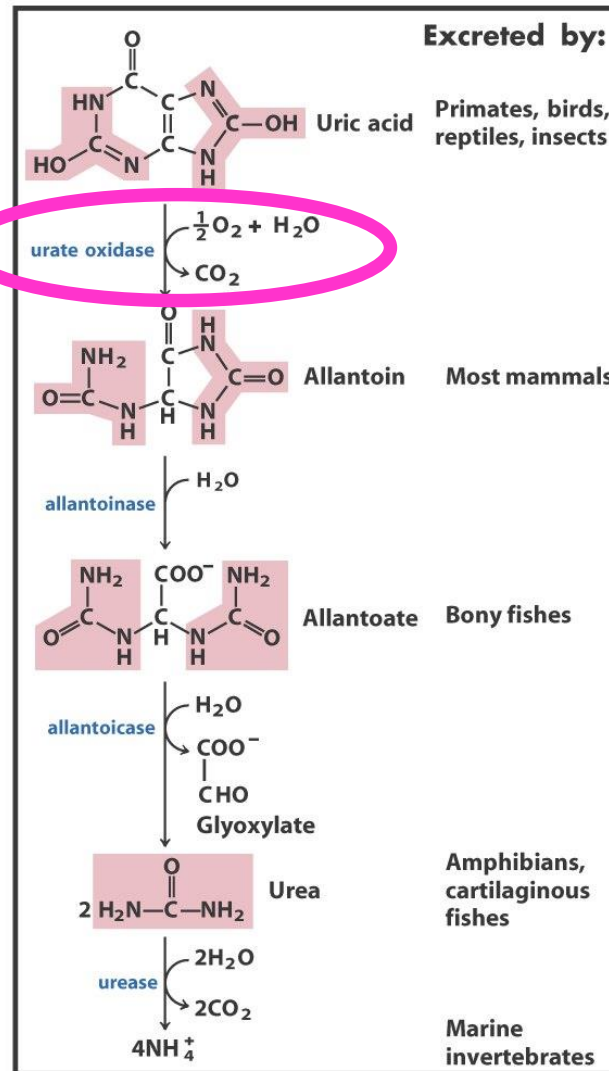
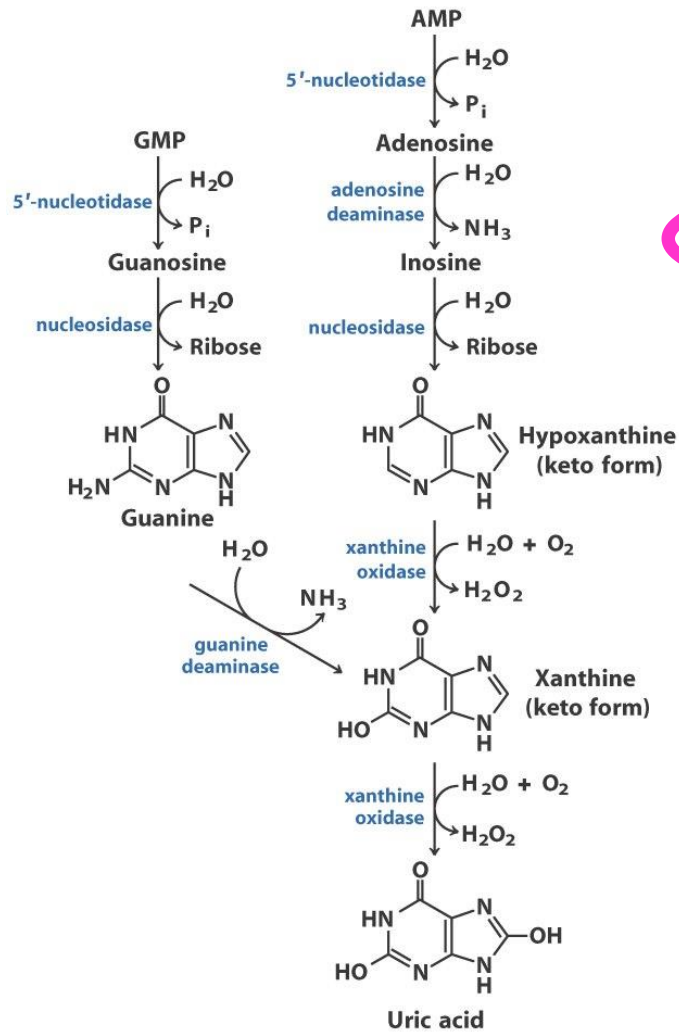
<http://novorozeneckyscreening.cz/index.php?pg=lekari>

- Choroba jasně definovaná
- Choroba představuje významný zdravotně sociální problém
- Choroba je častá - incidence 1:50 000 až 1: 100 000
- Zachycení choroby v časném presymptomatickém stadiu ovlivní její průběh
- Léčebná opatření musí být dostupná pro všechny pacienty
- Existuje screeningový test
- Schopnost společnosti zajistit test pro všechny novorozence

Syndrom akutní lýzy nádoru

Syndrom nádorového rozpadu





Léčba rekombinantními přípravky

Elitek	
Generický název	Rasburicase
Látka	rekombinantní urikasa ve formě homotetrameru (každá podjednotka má molekulovou hmotnost 34 kDa a je acetylovaná na N-konci)
Indikace	prevence problémů spojených s nárůstem koncentrace kyseliny močové u dětských i dospělých pacientů léčených chemoterapií
Výroba	<i>S. cerevisiae</i>
Povolení	2002
Pozn.	Gen pro urikasu pochází z plísně <i>Aspergillus flavus</i> .

Puricase /Krystexxa	
Generický název	Pegloticase, PEG-uricase
Látka	chimerická urikasa modifikovaná polyethylenglykolem (PEG)
Indikace	léčba zvýšené hladiny kyseliny močové v plasmě dna ←
Výroba	<i>E. coli</i>
Povolení	2010
Pozn.	Sekvence je primárně odvozena z prasečí urikasy s C-koncem odpovídajícím urikase paviana, každá podjednotka tetrameru je modifikována polyethylenglykolem (PEG). PEG-urikasa má stejnou účinnost jako urikasa v přípravku Rasburicas. Výhodou však je, že PEG-urikasa je neimunogenní, nemá vedlejší účinky a je biologicky aktivní po delší dobu.



<https://www.myheimat.de/t/hemen/pavian.html> (3-11-2017)



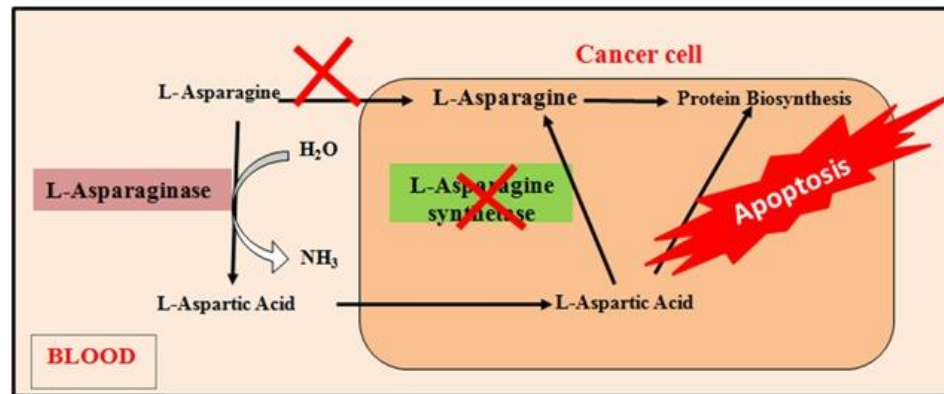
<http://utucnaka.blog.cz/1112/prase-domaci>

(3-11-2017)

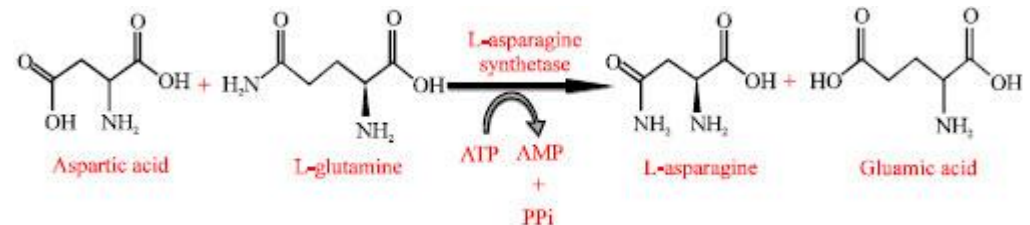
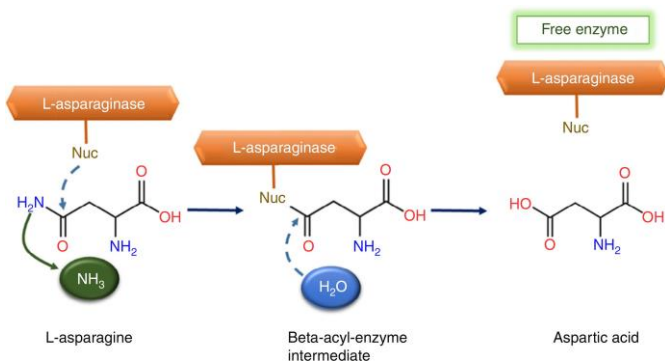
Asparaginasa

Léčba akutní myeloidní leukémie

Asparaginasa štěpí asparagin a inhibuje tím syntézu proteinů v nádorových buňkách, neboť leukemické buňky a některé další nádorové buňky nemají asparigin syntetasu.



<http://web.iitd.ac.in/~bkundu/Research%20area.html> (4-11-2017)



http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822016000500077 (5-11-2017)

<http://scialert.net/fulltext/?doi=ijp.2014.182.199> (5-11-2017)

Asparaginasa v léčbě leukémie

Elspar	
Generický název	L-Asparaginase, ASP
Látka	L-asparaginasa
Indikace	součást léčby pacientů s akutní myeloidní leukémií
Výroba	<i>E. coli</i>
Povolení	1978
Pozn.	Biosimilars: Colaspase

Erwinase	
Generický název	L-Asparaginase
Látka	L-asparaginasa
Indikace	součást léčby pacientů s akutní myeloidní leukémií
Výroba	bakterie <i>Erwinia chrysanthemi</i> ←
Povolení	2011
Pozn.	Léčivo se používá především u pacientů s alergií na L-asparaginasu vyrobenou v <i>E. coli</i> .

Kidrolase	
Generický název	L-Asparaginase
Látka	L-asparaginasa
Indikace	součást léčby pacientů s akutní myeloidní leukémií a některých non-Hodgkinovských lymfomů
Výroba	<i>E. coli</i>
Povolení	2006
Pozn.	Kidrolase je v plasmě biologicky aktivní delší dobu (8–30 hodin) v porovnání s přípravkem Erwinase (7–13 hodin).

Oncaspar	
Generický název	Pegaspargase, PEG-Asparaginase
Látka	PEG L-asparaginasa ←
Indikace	součást léčby pacientů s akutní myeloidní leukémií
Výroba	produkce enzymu v <i>E. coli</i> (stejně jako v preparátu Elspar) a následná kovalentní konjugace s PEG (5 kDa)
Povolení	1994
Pozn.	Díky pegylaci je prodloužena biologická aktivita léčiva a také klesla imunogenita.

Problémy: imunogenita, poškození jater, pankreatitida, nízká stabilita, krátký biologický poločas – hledání nových zdrojů