



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Předmět: Biofarmaceutika

Kurz: Bioléčiva – biofarmaceutika

4. rok studia

Enzymy jako léčiva

doc. PharmDr. Oldřich Farsa, Ph.D.

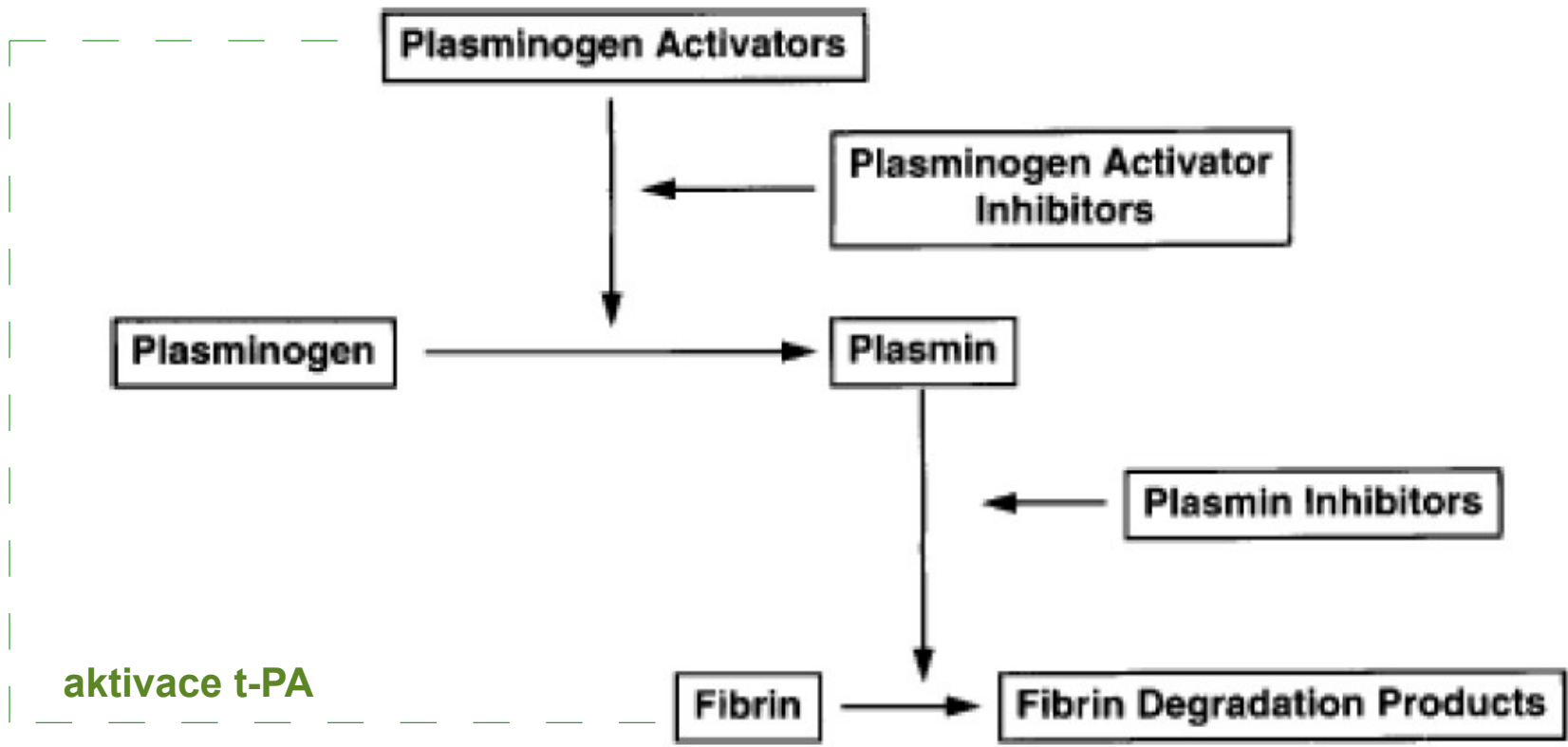
Hydrolasy

Petidasy

Fibrinolytika

Aktivátory plasminogenogenu

- katalyzují štěpení endogenního plasminogenu za vzniku plasminu, nespecifické proteinasy, která degraduje fibrinovou hmotu trombu

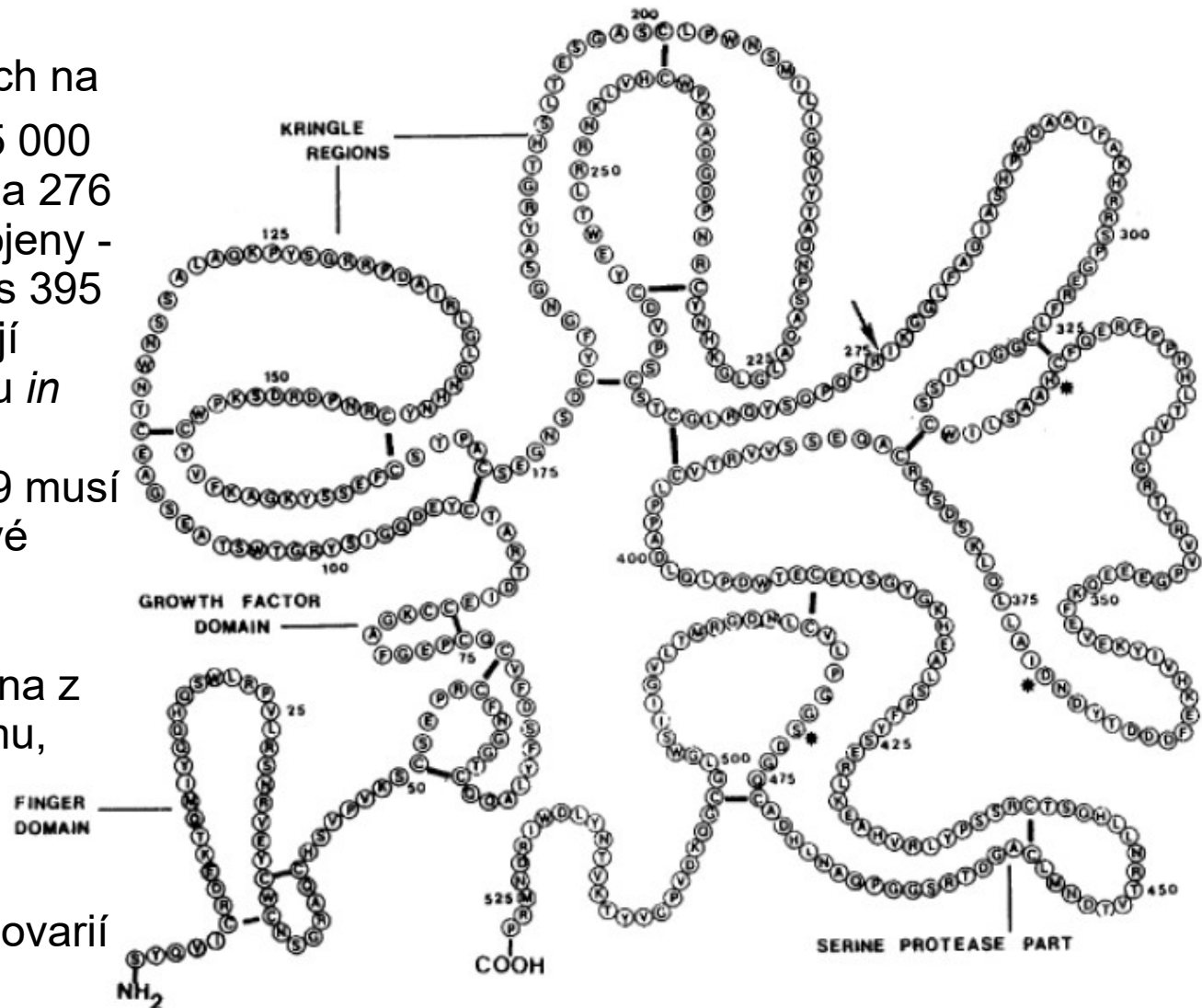


aktivace t-PA

Alteplasa

- fibrinolytikum – tkáňový aktivátor plasminogenu (syn. tPA)
- serinová proteasa tvořená buňkami endotelu jako jedno- nebo dvořetězcová molekula
- váže se na fibrinová vlákna prostřednictvím vazebných míst na Lys a navázaná aktivuje plasminogen k rozpouštění fibrinu několiksetkrát rychleji, než volná v krevním řečišti
- 572 AK
- glykoprotein

- M_r: 59 050 bez sacharidů vázaných na Asn 117, 184 a 448, s cukry asi 65 000
- štěpena plasminem mezi AK 275 a 276 na řetězce A a B, jež zůstávají spojeny - S-S- můstkem mezi Cys 264 a Cys 395
- jedno- i dvouřetězcová forma mají srovnatelnou fibrinolytickou aktivitu *in vitro*
- Alteplasm ad iniectabile* ČL 2009 musí obsahovat min. 60 % dvořetězcové formy
- pI = 7 – 8
- příprava/výroba: původně izolována z buněčné kultury lidského melanomu, vyráběna biotechnologicky na rekombinantních buňkách; enzym produkováný na savčích bb. má optimální glykosylaci; na buňkách ovarii čínského křečka vzniká převážně jednořetězcová



Terapeutické využití

Actilyse[®] lyofilizát pro přípravu infuz. roztoku

• $T_{1/2} = 5 \text{ min}$

- trombolytická léčba akutního infarktu myokardu
- trombolytická léčba akutní masivní plicní embolie doprovázené hemodynamickou nestabilitou
- fibrinolytická léčba akutních ischemických cévních mozkových příhod

Reteplasa

- rekombinantní, produkovaná na *E. coli*
- kratší úsek t-PA z 355 AK (1 – 3 a 176 – 527)
- $M_r \sim 39\ 000$
- odstraněny 3 významné domény: N-terminální „prstová“, jež je spoluzodpovědná za vysokou afinitu k fibrinu, doména homologická s epidermální růstovým faktorem a doména „kringle 1“
- toto + snížení glykosylace \Rightarrow očekávány odlišné (vhodnější) farmakodyn. a farmakokin. charakteristiky
- $T_{1/2} = 14$ min
- vyšší fibrinolytická účinnost
- účinnost ve zprůchodňování koron. cév a snižování úmrtnosti na infarkt myokardu ale srovnatelná s alteplasou

Rapilysin[®] prášek pro přípravu roztoku nebo předplněná stříkačka

Terapeutické indikace

- trombolytická terapie suspektního akutního infarktu myokardu s přetrvávající elevací ST nebo nedávným blokem levého raménka během 12ti hodin od nástupu symptomů akutního infarktu myokardu

Tenekteplasa

- glykoprotein vyráběný rekombinantní technikou na kulturách buněk ovarií čínského křečka
- (T = Thr, N = Asn, K = Lys; analog alteplasy, kde Thr103 byl zaměněn za Asn, čímž vzniklo nové místo glykosylace, Asn117 byl zaměněn za Gln, čímž zaniklo mannosové místo, sekvence Lys296-His-Arg-Arg299 byla zaměněna za 4 Ala, čímž vzrostla aktivita a rezistence vůči inhibitoru plasminového aktivátoru 1 (PAI-1)

• $T_{1/2} = 20 - 24$ min

Metalyse[®] prášek pro přípr. inj. roztoku 6, 8, 10 .10³ m.j.

Terapeutické indikace

- trombolytická léčba suspektního infarktu myokardu s přetrvávající elevací ST nebo nově vzniklým blokem levého raménka v průběhu 6 hodin od začátku příznaků akutního infarktu myokardu (AMI)
- podání jako jednorázový intravenózní bolus přibližně během 10 sekund

Desmoteplasa

- syn. bat. PA, vPA, DSPA_{α1}
- sliny netopýra *Desmodus rotundus* obsahují 4 aktivátory plasminogenu (desmodus salivary plasminogen activators = DPSAs)
- nejvýznamnější DSPA_{α1} = desmoteplasa; nejdelší, největší (85%) homologie s lidským t-PA
- 477 AK
- prstová doména, doména EGF a jedna kringle, nemá druhou ani místo štěpení nezbytné pro přeměnu na dvouřetězcový PA ⇒ jediný PA, který existuje výhradně jako jednořetězcová molekula s plnou katalytickou aktivitou
- $T_{1/2} = 2,8$ h
- připravována rekombinantně
- 3. fáze klinického zkoušení

Streptokinasa

Streptokinasi solutio concentrata ČL 2009

- z filtrátu kultury β -hemolytických streptokoků skup. C
- jednořetězcový polypeptid, 414 AK, $M_r \sim 47\ 000$
- po spojení s lidským plasminogenem (komplex 1 : 1) tvoří aktivátor plasminogenu
- $T_{1/2} = 23$ min
- nyní používána hlavně rekombinantní, produkována na *E. coli*
- maximum aktivity při pH 7,5; pI = 4,7
- rozpouští též fibrinózní část exsudátu
- v Evropě nejpoužívanější

Terapeutické indikace

Streptase®

Celkové podání

- akutní transmurální infarkt myokardu (ne starší 12 hodin) s přetrvávajícím ST-zvýšením segmentu nebo současný blok levého raménka
- hluboká žilní trombóza, (ne starší než 14 dní)
- akutní, masivní plicní embolie,
- akutní nebo subakutní trombóza periferních tepen
- chronické okluzivní tepenné choroby (ne starší než 6 týdnů),

Lokální podání

- akutní infarkt myokardu k re-kanalizaci koronárních cév (ne starší než 12 hodin)
- akutní, subakutní a chronická trombóza; embolie periferních žil a periferních tepen

Anistreplasa

- syn. APSAC (Acylated plasminogen – streptokinase activator complex)
- komplex streptokinasy a aktivního místa humánního lyzinového plazminogenu, v němž byla aktivní proteolytická místa inaktivována acylací – zavedením zbytků kys. anisové
- $M_r \sim 131\ 000$
- k účinnosti nepotřebuje cirkulující plazminogen
- po injekci jsou acylové skupiny pomalu hydrolyzou odstraňovány, čímž se uvolňuje aktivátor, jenž převádí plasminogen na plasmin \Rightarrow fibrinolysa
- $T_{1/2} = 40 - 90$ min
- je-li léčba zahájena během 3 hodin, LČ ochrání tkáň myokardu a funkci levé komory a zvýší účinnost koronární tepny

Urokinasa

EC 3.4.21.73

Urokinasum ČL 2009

- enzym získaný z lidské moči, který aktivuje plasminogen
- směs nízkomolekulárních (Mr 33 000) a vysokomolekulárních (Mr 54 000) forem, přičemž vysokomolekulární forma převažuje v urokinase izolované z ledvin, zatímco nízkomolekulární u enzymu z tkáňových kultur buněk ledvin
- též rekombinantní, plně glykosylovaná, odvozená z myších nádorových buněk
- účinnost min. 70 000 m.j./mg bílkoviny
- $T_{1/2} = 16$ min

Rheotromb[®] lyofilizát pro přípravu infuzního roztoku, 500 000 m.j.: registrace ukončena

Terapeutické indikace

a) U dospělých:

Systemová fibrinolýza

- arteriální trombóza
- masivní embolizace pulmonálních artérií
- hluboká venózní trombóza

Lokální fibrinolýza

- arteriální trombóza
- uzávěr arteriovenózní píštěle

b) U novorozenců a dětí do 14 let:

- Arteriální uzávěr: primární nebo sekundární okluze arterie, centrální trombóza jako např.: trombóza aorty, femorální arterie, kompletní obstrukce plicní arterie, periferní trombóza.
- Venózní trombóza : např. trombóza ledvinné žíly, trombóza horní duté žíly, trombus předsíní, nitrocévní tromby vyvolané katetrem, jako manžetové fibrinové tromby, tromby na stěnách anebo tromby ucpávající žíly.
- Ucpané katetry

Ankrod

EC 3.4.21.74, dříve EC 3.4.21.28

syn. venombin A

- proteasa získaná z jedu malajského hada *Agkistrodon rhodostoma*
- glykoprotein
- selektivně štěpí vazby Arg
- 258 AK, $M_r = 29\ 145$
- schopen aktivovat přeměnu fibrinogenu na fibrin (prosrážlivý efekt), ale i degradaci fibrinu (fibrinolytický), výsledný efekt závisí na druhu (příjemce)
- v klinických studiích 3. fáze se účinnost na zlepšení přežívání po AIM statisticky nelišila od placeba

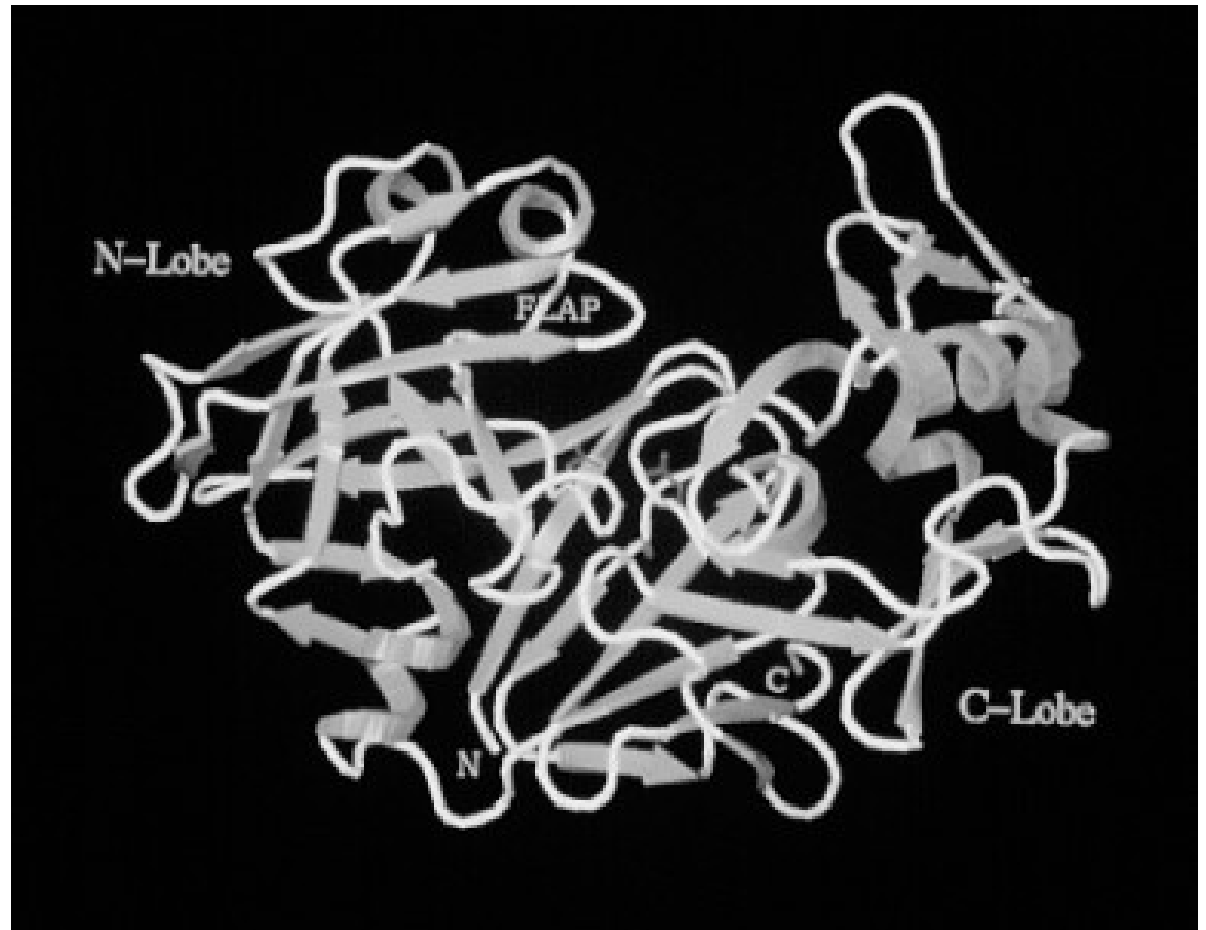
Peptidasy zažívacího traktu

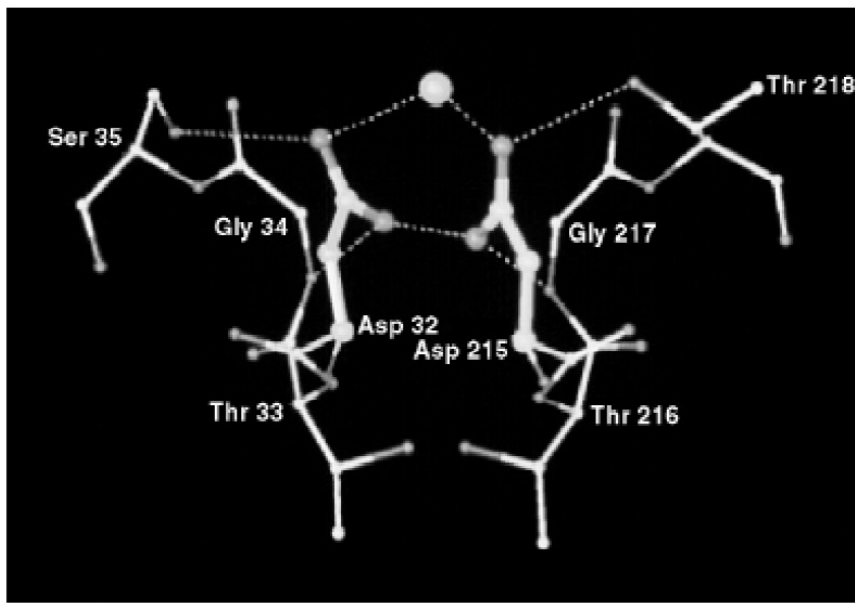
Pepsin

EC 3.4.23.1

- základní kyselá proteasa žaludku
- endopeptidasa se širokou substrátovou specifitou
- první objevený enzym – 18. stol., pojmenoval T. Schwann 1825; druhý enzym získaný v krystalické formě (po urease – Northrop 1930)
- pro odlišení od minoritních žaludečních proteas: **pepsin A** (× pepsin B; pepsin C = gastricsin)
- 1 řetězec, 326 AK, $M_r \sim 34\,600$, akt. místo tvořeno Asp32 a Asp215 (prasečí)
- katalyzuje hydrolýzu v rozsahu pH 1 – 6, optimum aktivity při pH asi 3,5
- pK_a v aktivním místě 1,57 a 5,02

Kvarterní struktura prasečího pepsinu s vyznačením N- a C-koncového loby; „náhodné cívky“ jsou vyznačeny tenkou čarou; mezi loby vyznačen štěpený substrát





A

A: uspořádání aktivního místa pepsinu; atomy O vyznačeny většími kuličkami, H-můstky čárkovaně, největší kuličkou molekula vody, jež se podílí na nukleofilním ataku (resp. její O)

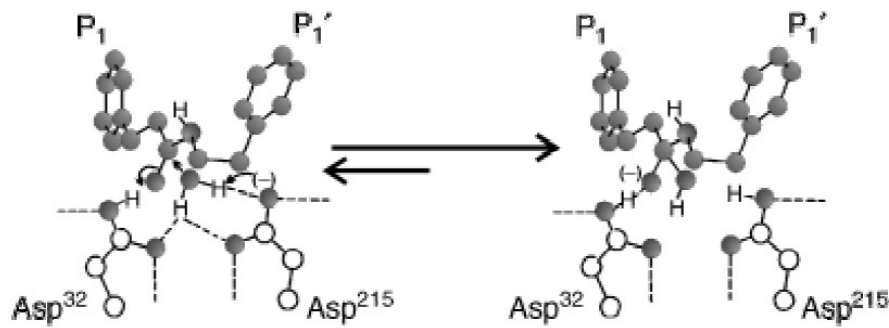
B: předpokládaný katal. mechanismus pepsinu a dalších aspartátových proteas: substrát (horní molekula) je k aktivnímu místu natočena úsekem Phe-Phe.

(a) -COOH Asp32 je částečně protonován, -COOH Asp215 je částečně disociován

(b) Molekula H₂O navázána na (původně) C=O P₁ – meziproductu hydrolýzy s sp³ uhlíkem

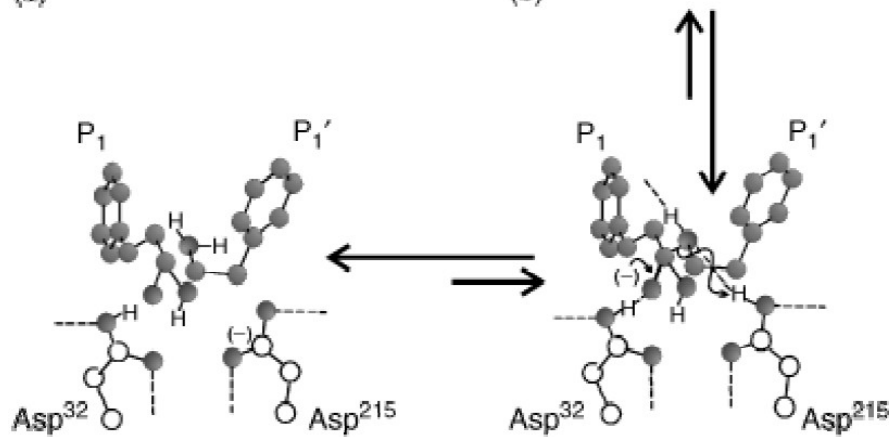
(c) Asp215 dodává H⁺ na N substrátu

(d) rozštěpení peptidové vazby



(a)

(b)



(d)

(c)

- pepsin je schopen štěpit i vazbu Phe-Pro
- klasické stanovení (obsahu/aktivity pepsinu v dané bílkovině – Anson 1938): hydrolýza hovězího hemoglobinu při pH 2, přidání trichloroctové kys., filtrace, měření absorbance při 280 nm (v ČL 2009 modifikováno)
- škrkavka *Ascaris suum* tvoří peptidický inhibitor pepsinu (149 AK)
- Pepsini pulvis* ČL 2009: ze žaludeční sliznice prasat, skotu nebo ovcí

Pankreatická peptidasa

- směs peptidas užívaná v LP k podpoře trávení – substituci endogenních peptidas : Gastrix[®], Kreon[®], Panzytrat[®] ...
- součást *Pancreatinum* = pancreatine [USAN] – směsi trávicích enzymů získávané z vepřových slinivek (+ lipasa, amylasa)

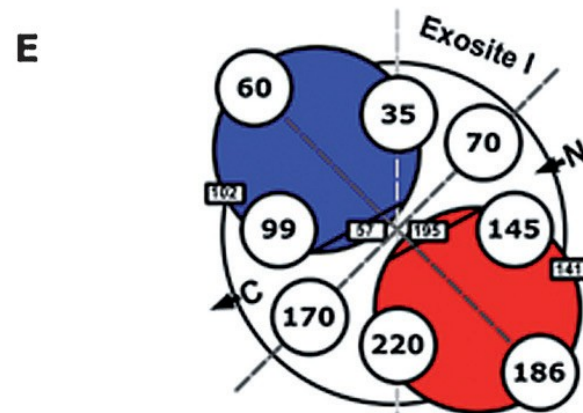
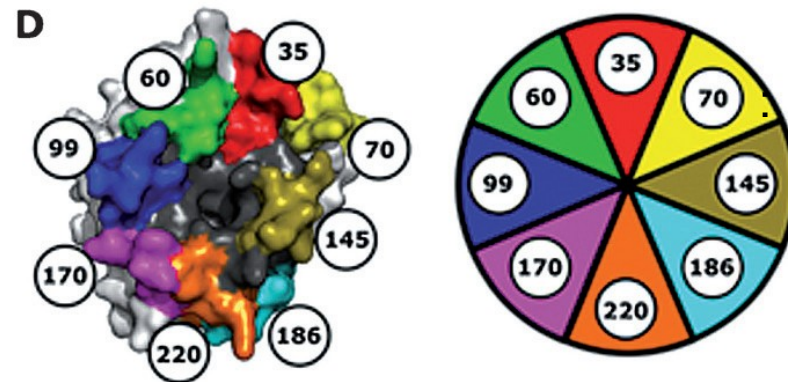
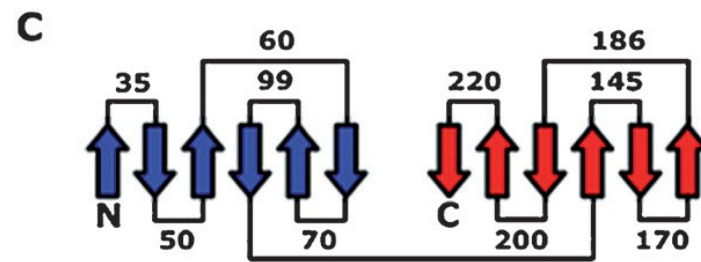
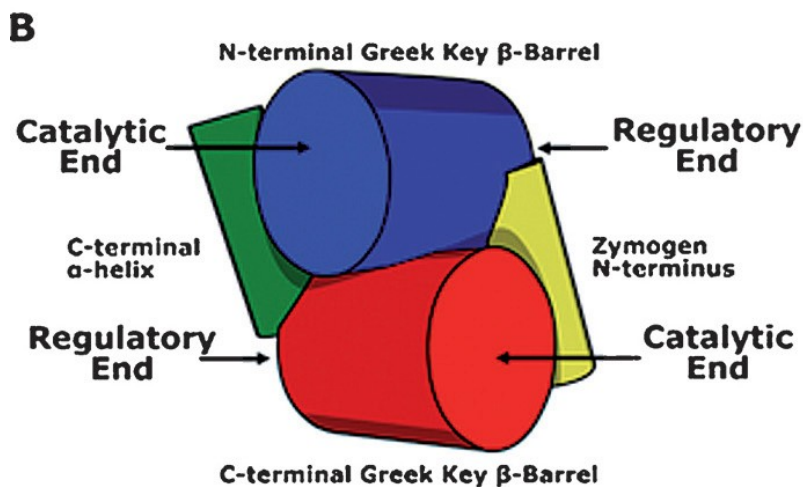
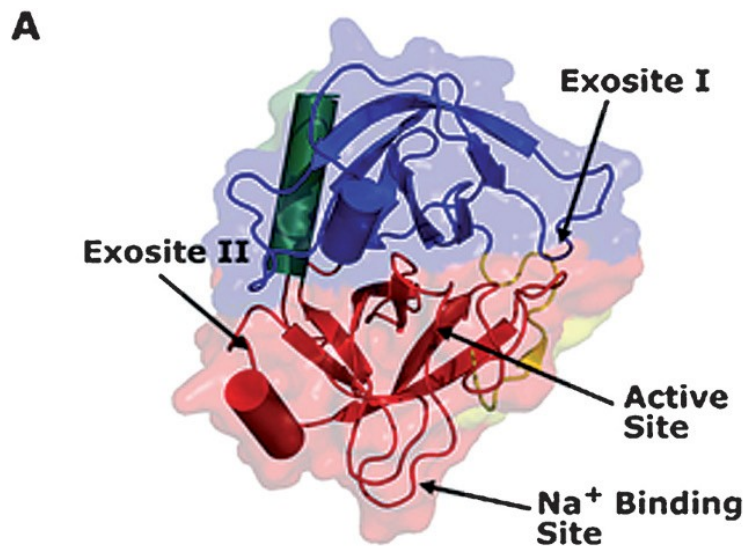
Trypsin

EC 3.4.21.4

- poprvé popsal Kühne 1876 jako proteolytickou aktivitu výměšku slinivky; odlišil aktivitu od pepsinu vyšším optimálním pH
- název trypsin později spojován se štěpením vazby LysCO-NH- , ArgCO-NH-
- krystalický získán 1931
- vylučován jako trypsinogen, aktivace
- vazby na Lys a Arg štěpeny 10⁵krát ochotněji než na jiné přirozené AK, na Arg 2 – 5krát ochotněji než na Lys
- některé AK ve specif. pozicích mohou inhibovat aktivitu: Arg, Leu, Ile, Lys, Phe na P2 inhibuje aktivitu 2 – 16krát, Pro na P3 snižuje aktivitu 3 – 9krát
- stabilní jako lyofilizovaný prášek nebo v roztoku při pH 3, kdy je inaktivní
- primární struktura se značně liší dle druhu, terciární velmi podobná
- jednořetězcový peptid, v němž jsou katalyticky účinné zbytky AK spojené úseky β-šroubovice („β-barrel“)

Chymotrypsin EC 3.4.21.1

- minoritní složka pankreatické peptidasy
- z < 50 % homologický s trypsinem
- jiná substrátová specifita: hydrofobní AK zbytky: PheCO-NH-, TrpCO-NH-, TyrCO-NH-
- „katalytická triáda“: His57, Asp102 a Ser195
- vylučován jako chymotrypsinogen, aktivace
- A a B, 80% homologie
- příprava: kyselá extrakce, precipitace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, krystalizace (1955); precipitace acetonem, chromatografie na iontoměničích – lze oddělit i A a B (1970); afinitní chromatografie (1996); přenos genu do kvasinky, klonování, produkce rekombinantního potkaního chymotrypsinogenu (1996)



Terciární struktura chymotrypsinu. A: N-terminální β -šroubovice (modrá) leží nad C-terminální β -šroubovicí (červená), mezi nimi aktivní místo. Zymogen-aktivační peptid (žlutý) a C-koncový α -helix (zelený) stabilizují celkovou strukturu a aktivní místa. Vnější místa, aktivní místa a místo pro vazbu Na⁺ jsou rozprostřena po celém povrchu a nejsou spolu v přímém kontaktu. B: Schematické znázornění terciární struktury. C: Topologie struktury chymotrypsinu. D: Na modelu enzymu akt. místem směrem k pozorovateli patrné 8 smyček, potenciálních míst interakce s makromol. substráty a inhibitory. E: Symetrie terc. struktury. Konec každého β -helixu vytváří 3 smyčky na straně aktiv. místa a dalšími dvěma obtáčí zadní část molekuly.

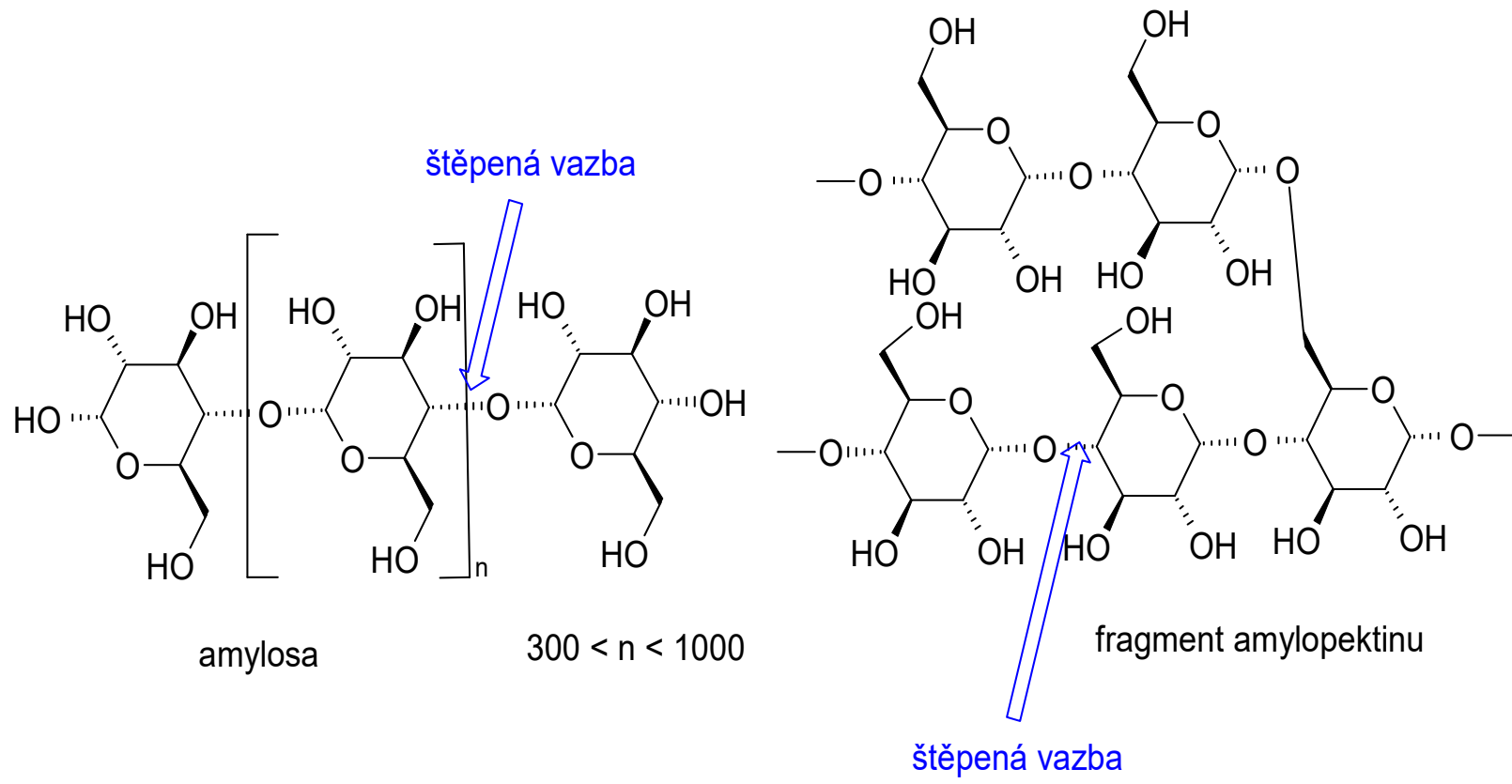
Glykosylasy

Glykosidasy, tj. enzymy hydrolyzující O- nebo S-glykosidy

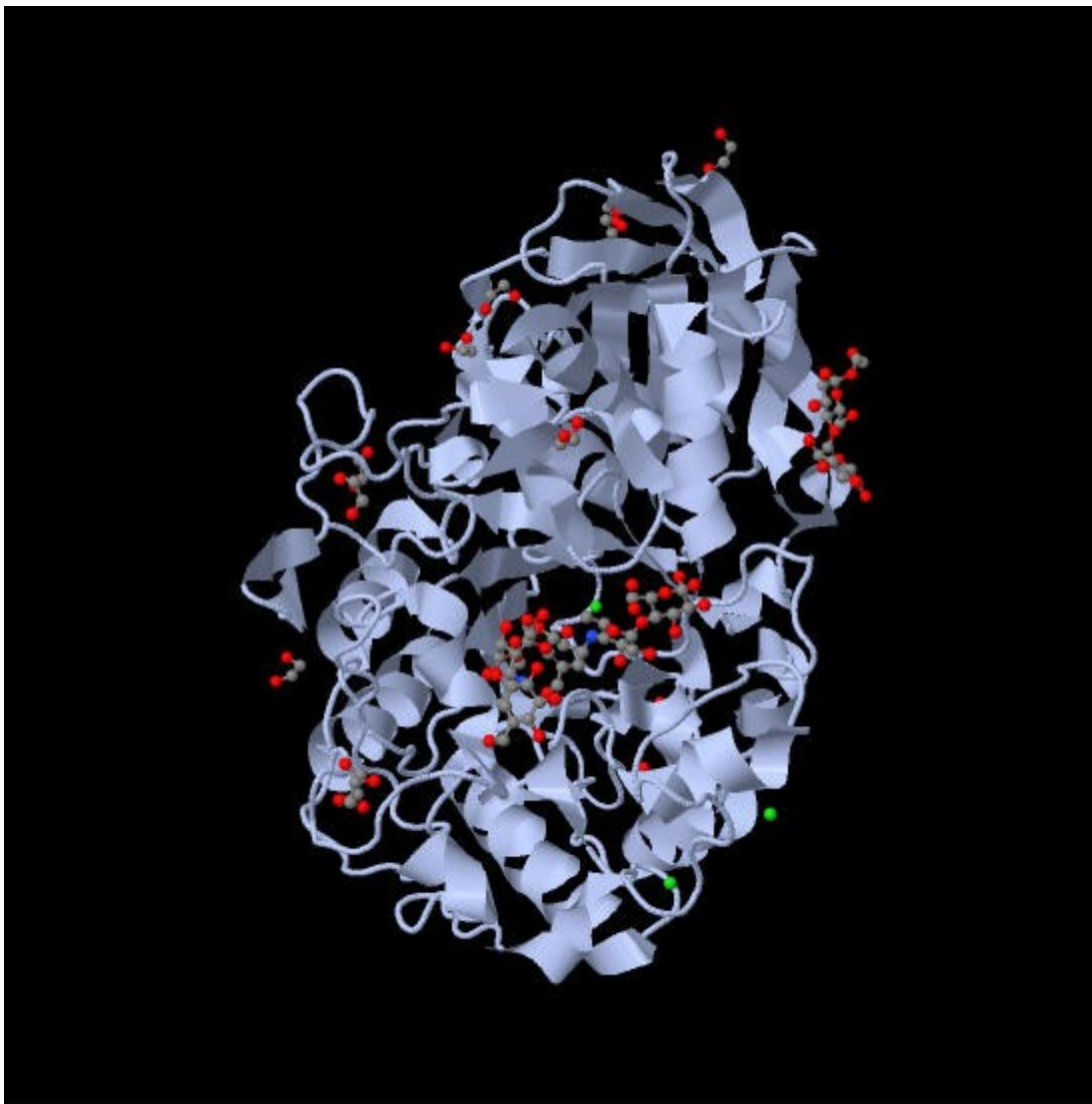
α -Amylasy

syn. α -1,4-glukan-4-glukanohydrolasa, EC 3.2.1.1

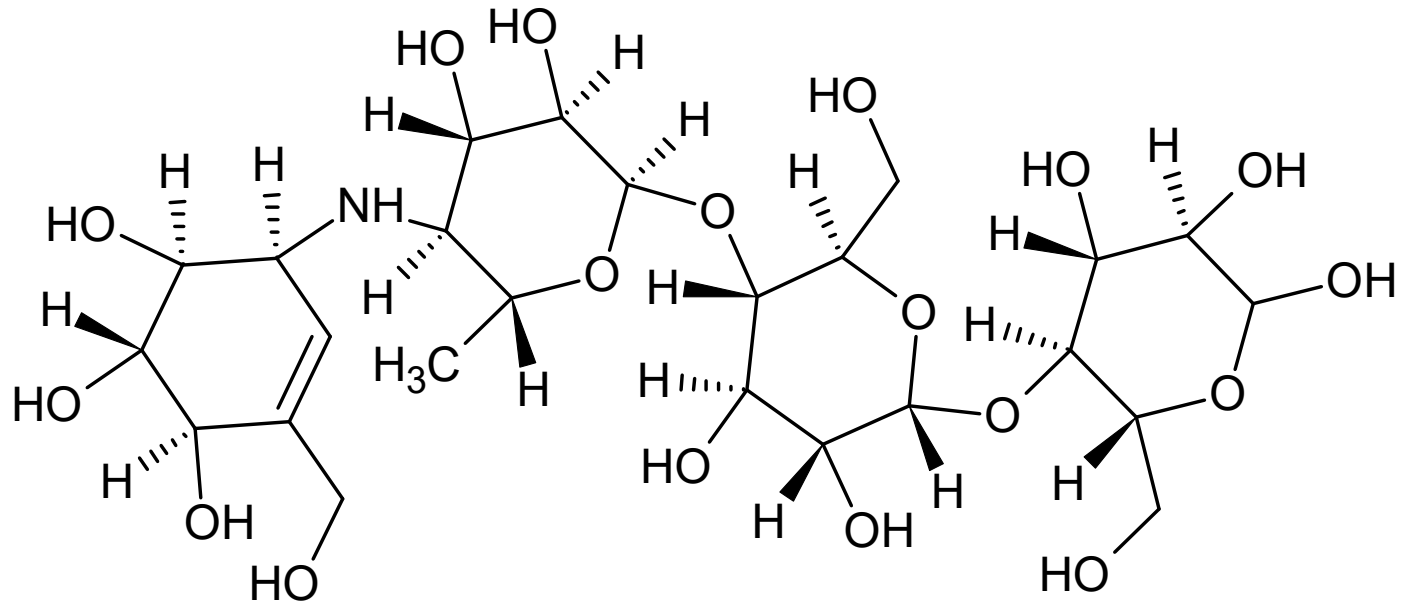
- katalyzuje hydrolýzu α -(1,4)-glykosidických vazeb složek škrobu, glykogenu a různých oligosacharidů
- u savců vylučována ve výměšcích slinných žláz a pankreatu
- terciární struktura a schopnost interakce se sacharidy a inhibitory typu proteinů jsou u lidské a prasečí amylasy velmi podobné
- *endo*-amylasa: hydrolyzuje vnitřní α -(1,4)-glykosidické vazby amylosy a amylopektinu, což vede k postupné degradaci substrátu až k neredukujícímu konci
- terciární struktura obsahuje 3 domény: katalytickou „srdcovou“ doménu složenou z $(\beta/\alpha)_8$ šroubovice, jež obsahuje rozšířenou smyčku vloženou mezi třetí β -řetězec a třetí α -helix (zvanou doména B, zbytky 100 – 169) a C-koncovou osmišroubovicovou doménu s β -šroubovicovým uspořádáním (doména C, rezidua 405 – 496)
- části z domén A a B jsou zapojeny do architektury tří funkčně nejvýznamnějších míst: aktivního místa, místa vážícího Ca^{2+} a místa vážícího Cl^-



α -(1,4)-glykosidická vazba štěpená α -amylasou



Terciární struktura α -amylasy s „pseudotetrasacharidovým“ inhibitorem akarbosou



O-4,6-Dideoxy-4-(((1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyklohexen-1-yl)amino)- α -D-glukopyranosyl-(1-4)-O- α -D-glukopyranosyl-(1-4)-D-glukosa

akarbosa

Glucobay[®]

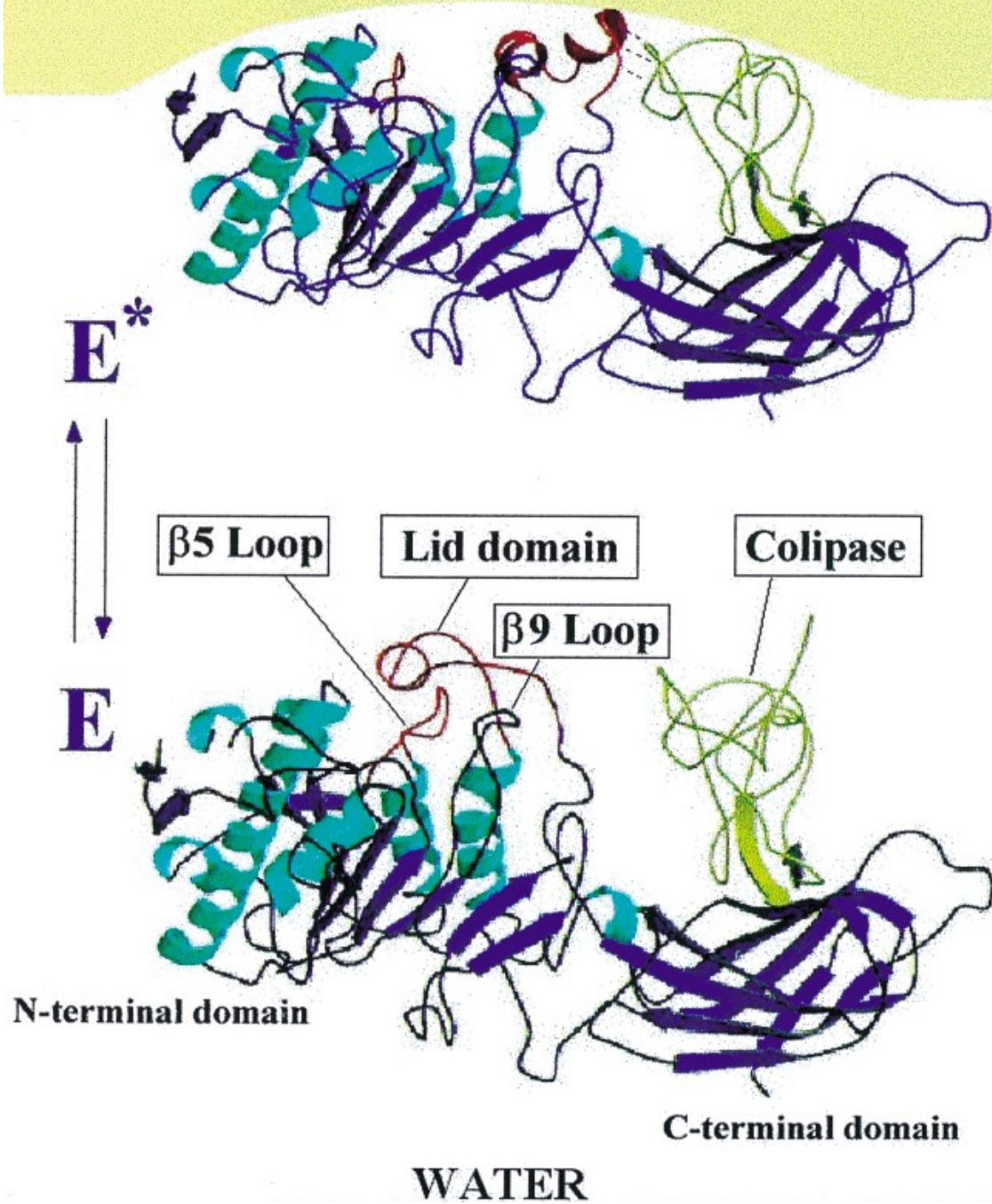
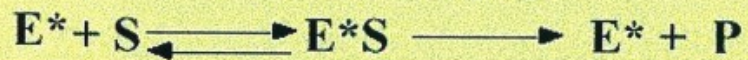
•inhibitor α -amylasy – léčivo diabetu

Esterhydrolasy

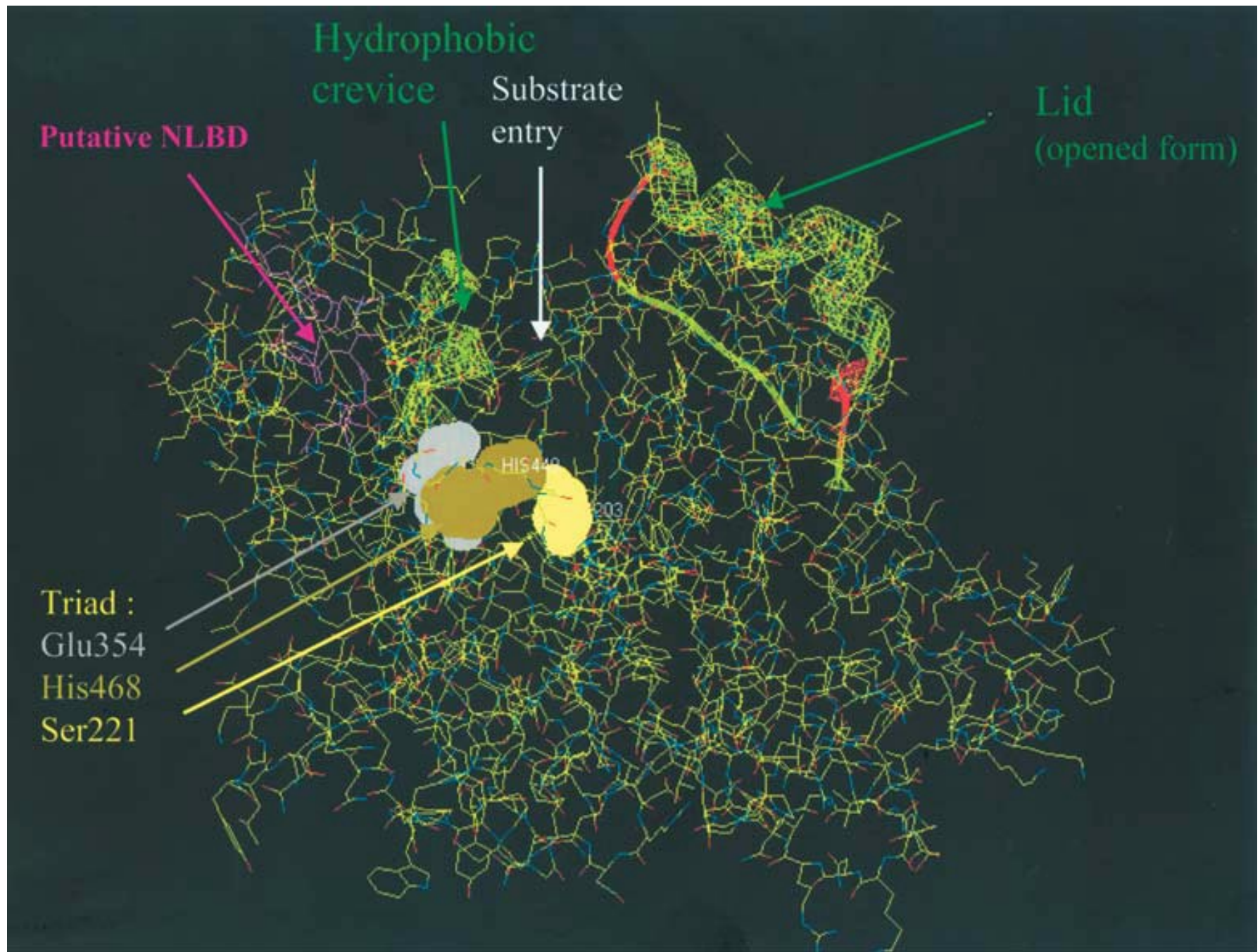
Triacylglycerollipasa, syn. triacylglycerolhydrolasa, EC 3.1.1.3

- humánní gastrická lipasa: 379 zbytků AK, $M_r \sim 45\ 000$
- humánní pankreatická lipasa**: 449 zbytků AK, $M_r \sim 50\ 000$
- na Asn166 navázán oligosacharidový řetězec s vysokým zastoupením mannosy nebo složitější
- mezidruhová variabilita, ale vysoká homologie – myši z 92 % a potkaní z 93 % shodná s lidskou z hlediska sekvence
- vyučována v „hotové“ formě, ne jako proenzym
- funkční při pH 4,5 – 9, optimální pH 7,0
- aktivní místo není přístupné v roztoku \Rightarrow hydrolýza probíhá na rozhraní voda – lipidická fáze
- k funkci nutné navázání kolipasy, proteinu o $M_r \sim 10\ 000$, rovněž vylučovaného pankreatem; lipidy jsou emulgovány solemi žlučových kyselin, což brání enzymu v adsorpci na jejich povrch, navázání kolipasy usnadňuje adsorpci na povrch na rozhraní voda – lipidy, pokryté solemi žlučových kyselin (vylučuje se jako prokolipasa, peptid z 95 AK, aktivována trypsinem ve střevě)
- struktura: 2 základní domény: velká N-koncová (1 - 336) a malá C-koncová (337 – 449); velká patří k α/β -hydrolasovým strukturám a obsahuje aktivní místo; povrchová smyčka zvaná víčková (lid) doména zakrývá aktivní místo v „uzavřené“ konformaci lipasy; kolipasa se váže na C-terminální doménu a vytlačuje hydrofobní „cípy“ jejích „prstů“ na opačnou stranu domény, tím dochází k otevření víčka; kolipasa zároveň vytváří rozsáhlou hydrofobní plochu, která interaguje s fázovými rozhraními voda-lipid
- „katalytická triáda“: Glu354, His468, Ser221
- vepřová: rovněž $M_r \sim 50\ 000$ (přesně 50 084), 450 zbytků AK, glykosylace

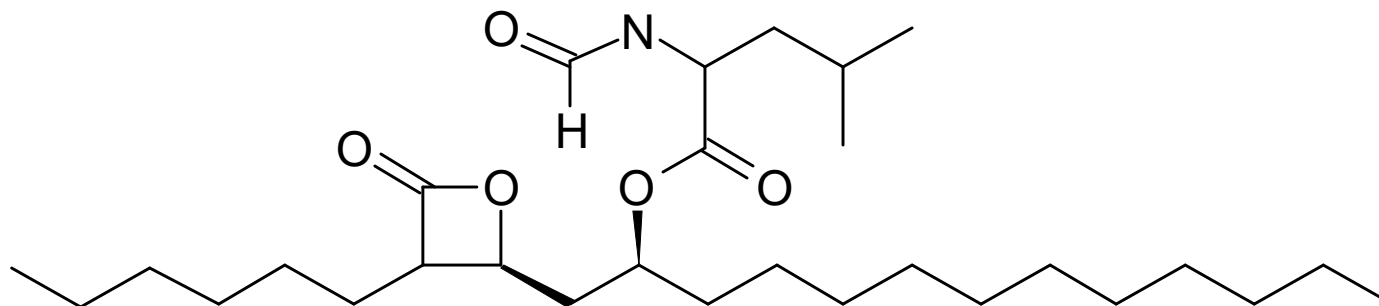
LIPID(S)



„Uzavřená“ (E*) a „otevřená“ (E)
konformace lipasy



Kvarterní struktura lipasy. Putative NLBD = předpokládaná doména vazby neutrálních lipidů



1-[(3S,4S)-3-hexyl-2-oxooxetan-4-yl]-2-(2S)tridecyl-N-formyl-2-amino-4-methylbutanoát

orlistat

Xenical®

inhibitor pankreatické lipasy – periferně působící anobezikum