

# Aplikace genového inženýrství – příprava farmakologicky nebo průmyslově významných látek

- Hormony,
- Růstové faktory
- Vakcíny,
- DNA-vakcíny
- Protilátky,
- Abzomy,
- Imunotoxiny
- Další biologicky aktivní látky (interferon, krevní srážecí faktory aj)

Gen pro inzulin

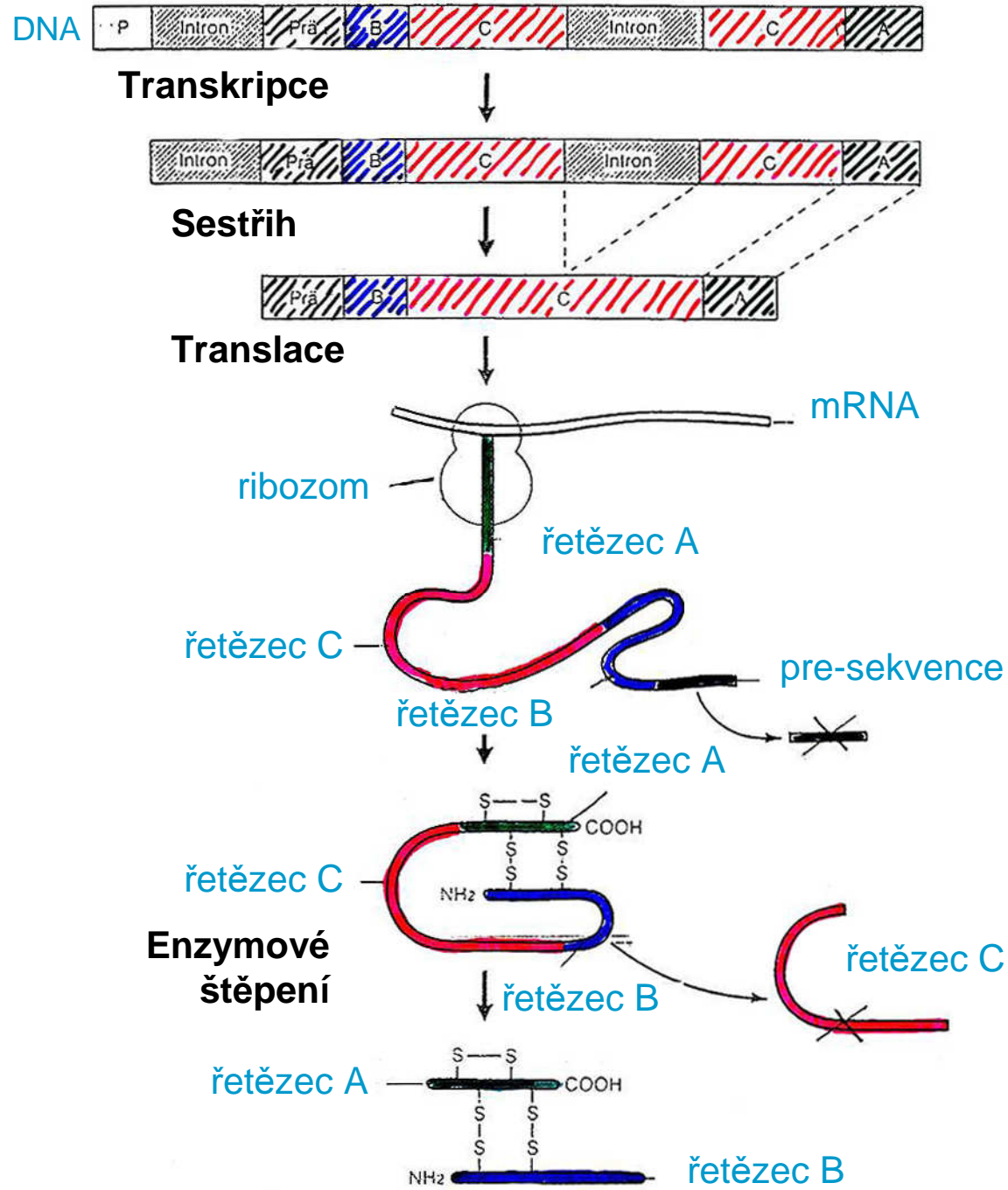
pre-mRNA

mRNA pro pre-proinzulin

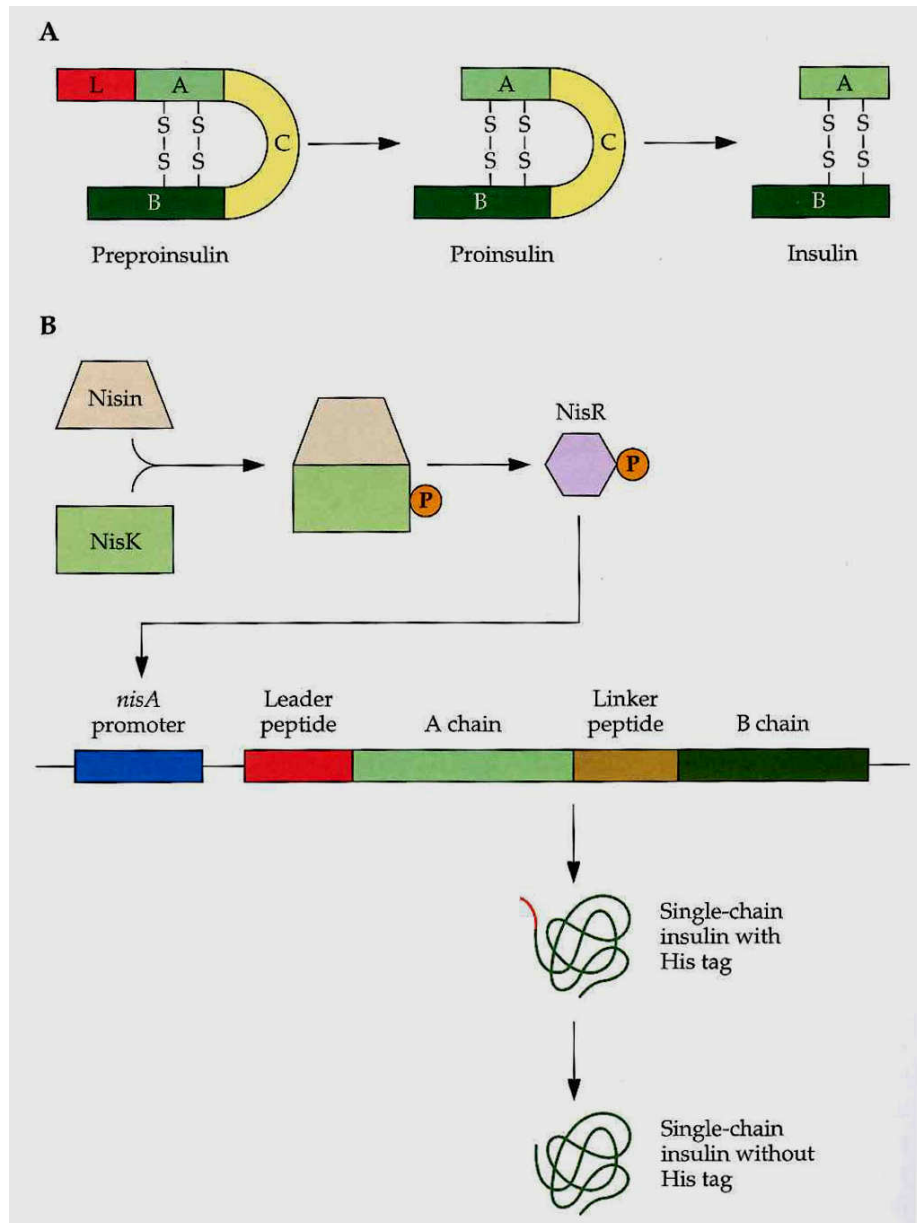
pre-proinzulin preprohormon

proinzulin prohormon

aktivní inzulin zralý hormon



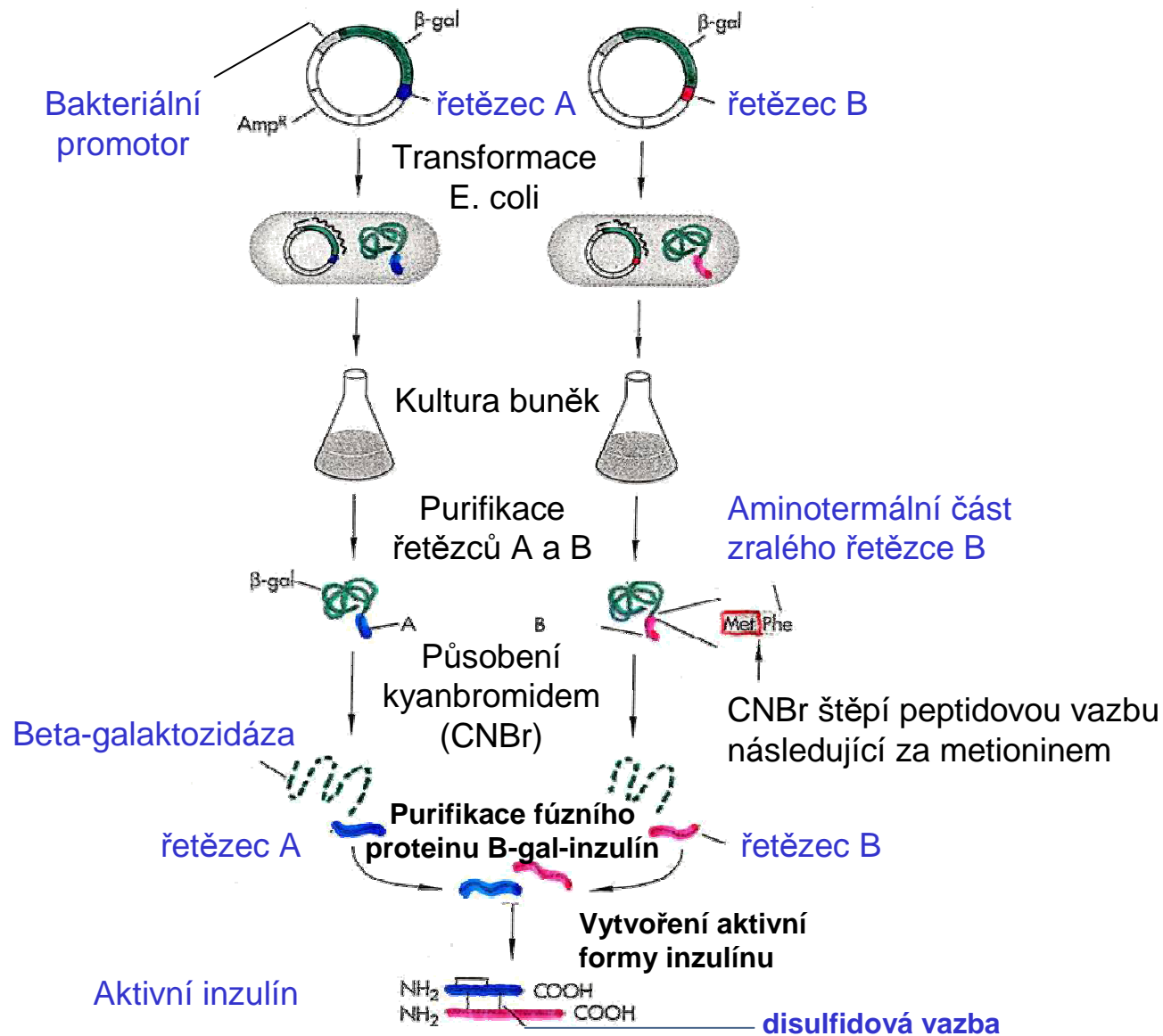
## Příprava jednořetězcové formy inzulinu v *Lactococcus lactis*



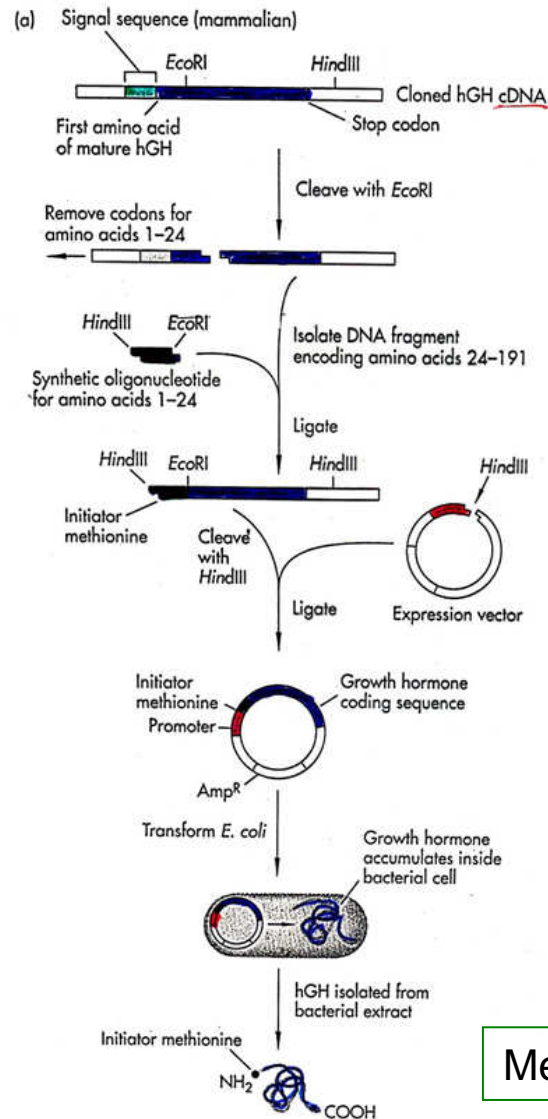
Vytváření aktivního inzulinu z prekurzorů působením proteáz (v eukaryotických buňkách)

Vytváření jednořetězcového inzulinu v *L. lactis*. Řetězce A a B jsou spojeny krátkým 6 amk linkerem a některé aminokyseliny byly zaměněny pro dosažení vyšší stability v gastrointestinálním traktu. Exprese se dosáhne přidáním nisinu

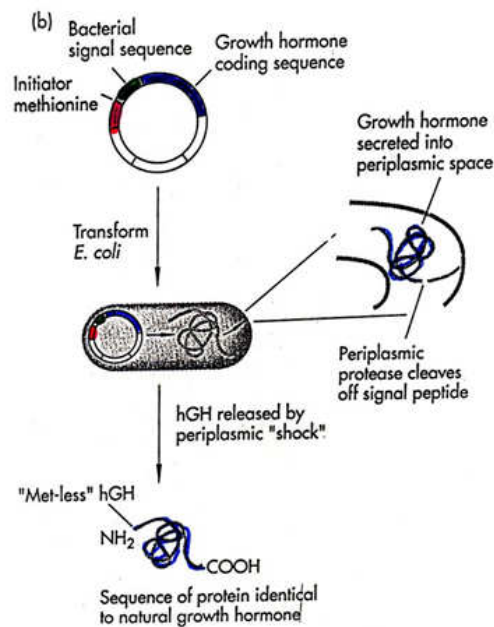
# Příprava lidského inzulinu v bakteriálních buňkách



# Příprava lidského růstového hormonu (hGH) v bakteriích

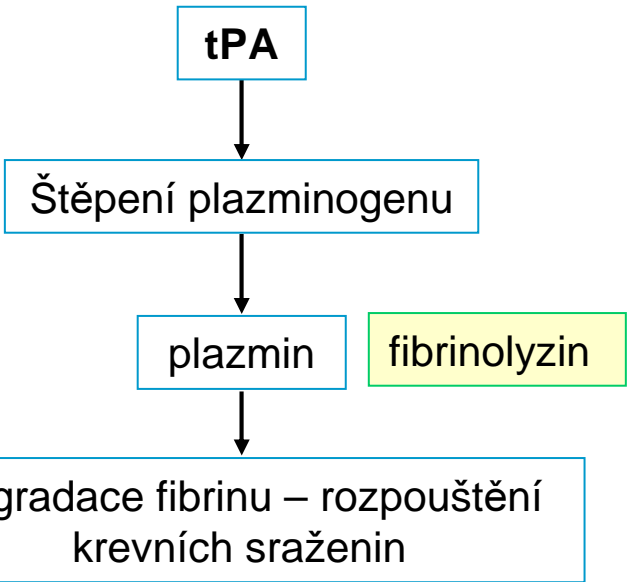
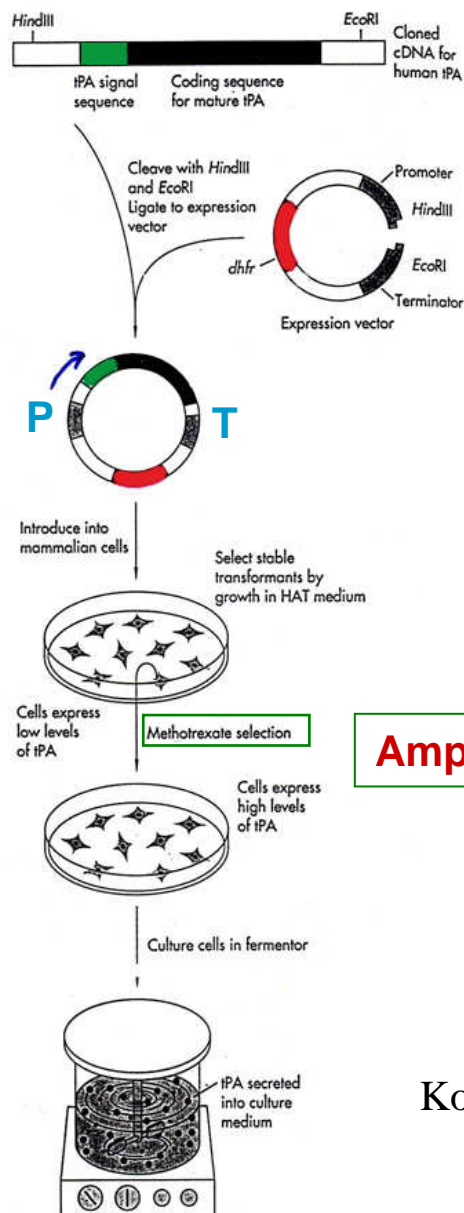


Příprava formy hGH sekretované v bakteriálních buňkách



Met není u přirozeného hGH

# Příprava tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA)



**Amplifikace genů tPA**

Komerční výroba

# 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

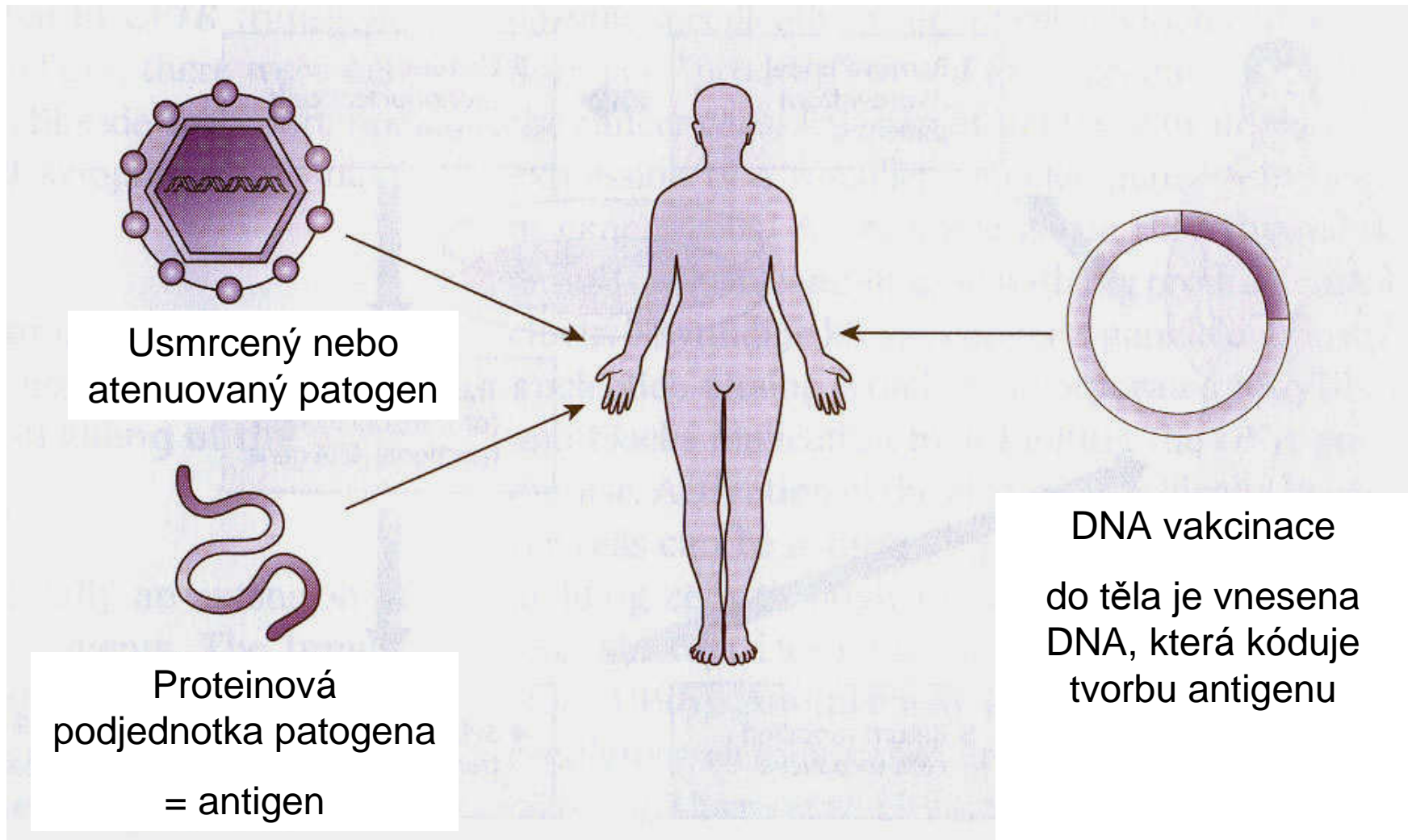
## B. rekombinantní vakcíny: - subjednotková

- s deletovaným genem
- vektorová

## C. DNA vakcíny

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

# Konvenční způsoby vakcinace a DNA-vakcinace

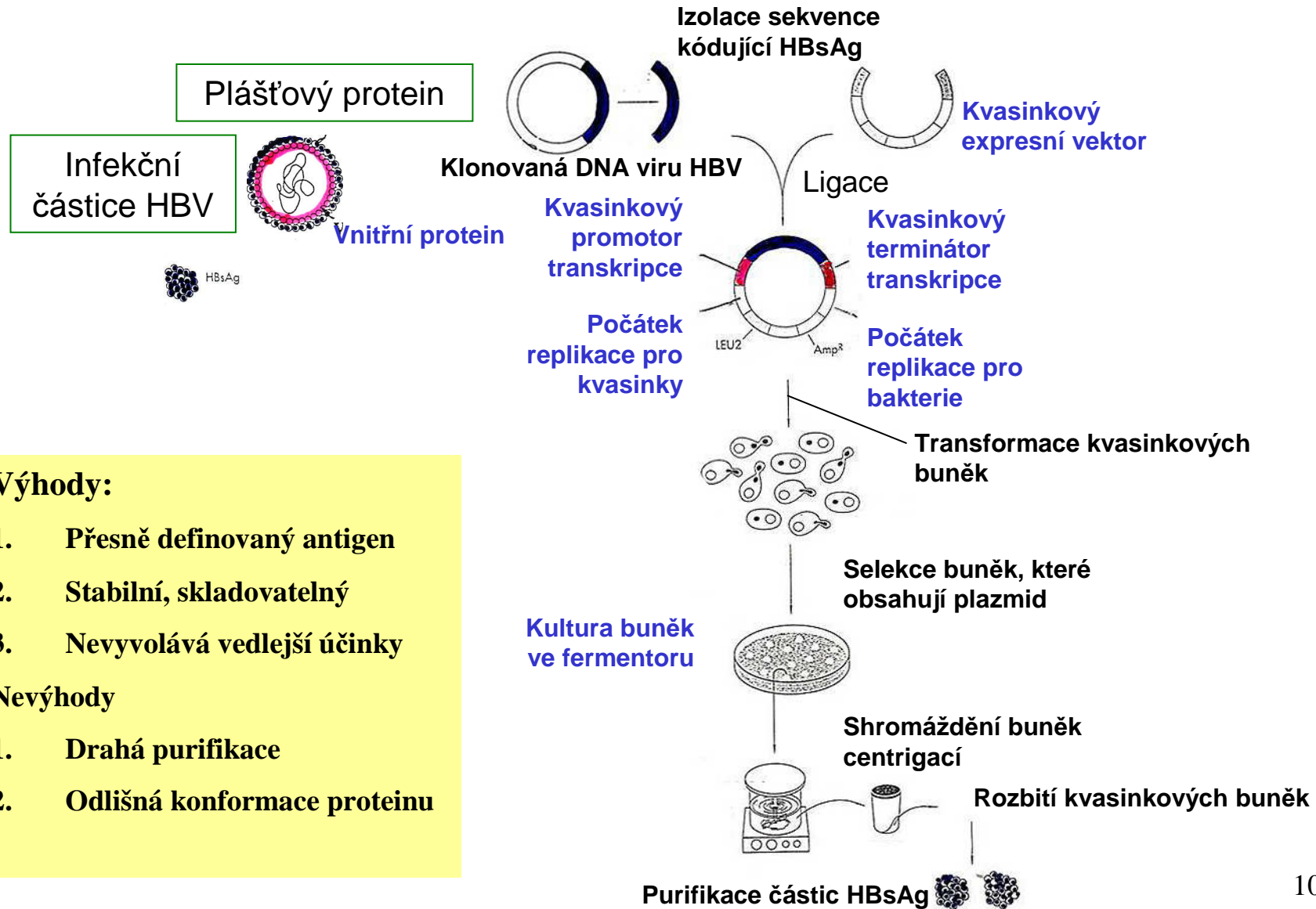




# Reverzní vakcinologie

- 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 a jejich testování jako antigenů
  
- Vakcína proti meningitidě (MenB) – 570 ORF - potenciálních antigenů
- Streptococcus pneumoniae
- Staphylococcus aureus
- Chlamydia pneumoniae (Chlamydophila pneumoniae)

# Příprava podjednotkové vakcíny viru HBV v kvasinkách



## Výhody:

1. Přesně definovaný antigen
2. Stabilní, skladovatelný
3. Nevylučuje 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

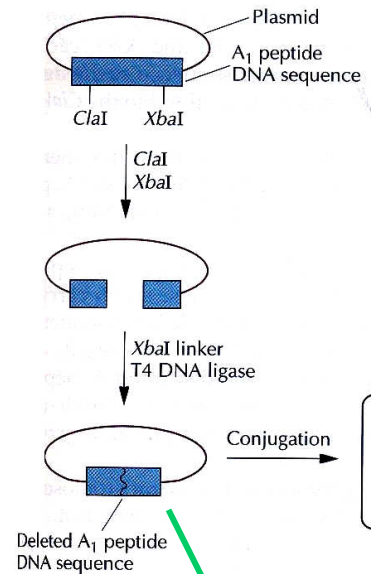
**Table 11.1** Human disease agents for which recombinant vaccines are currently being developed

Pathogenic agent	Disease(s)
<b>Viruses</b>	
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
<b>Bacteria</b>	
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera
<i>E. coli</i> enterotoxin strains	Diarrheal disease
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorrhoea
<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
<b>Parasites</b>	
<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

## Příklady rekombinantních vakcín (vakcín obsahujících rekombinantní antigeny)

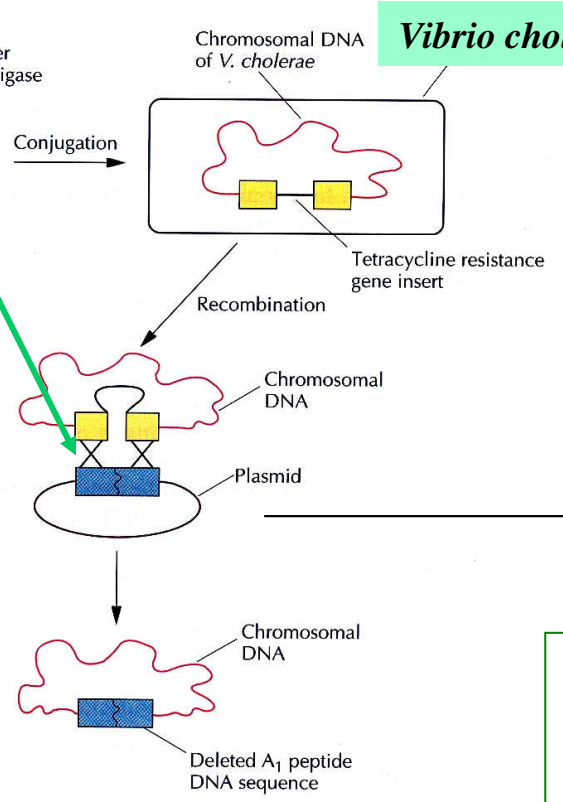
Product	Company	Therapeutic indication	Date approved
<b>Recombinant vaccines</b>			
<i>Hepatitis B</i>			
Ambirix (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	GlaxoSmithKline	Immunization against hepatitis A and B	2002 (EU)
Pediarix (combination vaccine 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 HBsAg 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)

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



Vyštěpení části sekvence kódující peptid A1 (klonované v plazmidovém vektoru) – vyštěpí se ~ 90% aminokyselin)

Cirkularizace vektoru (připojení XbaI-linkeru, štěpení XbaI, ligace)

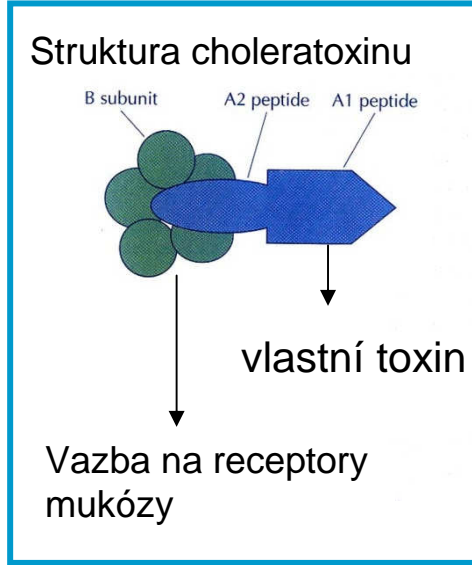


*Vibrio cholerae*

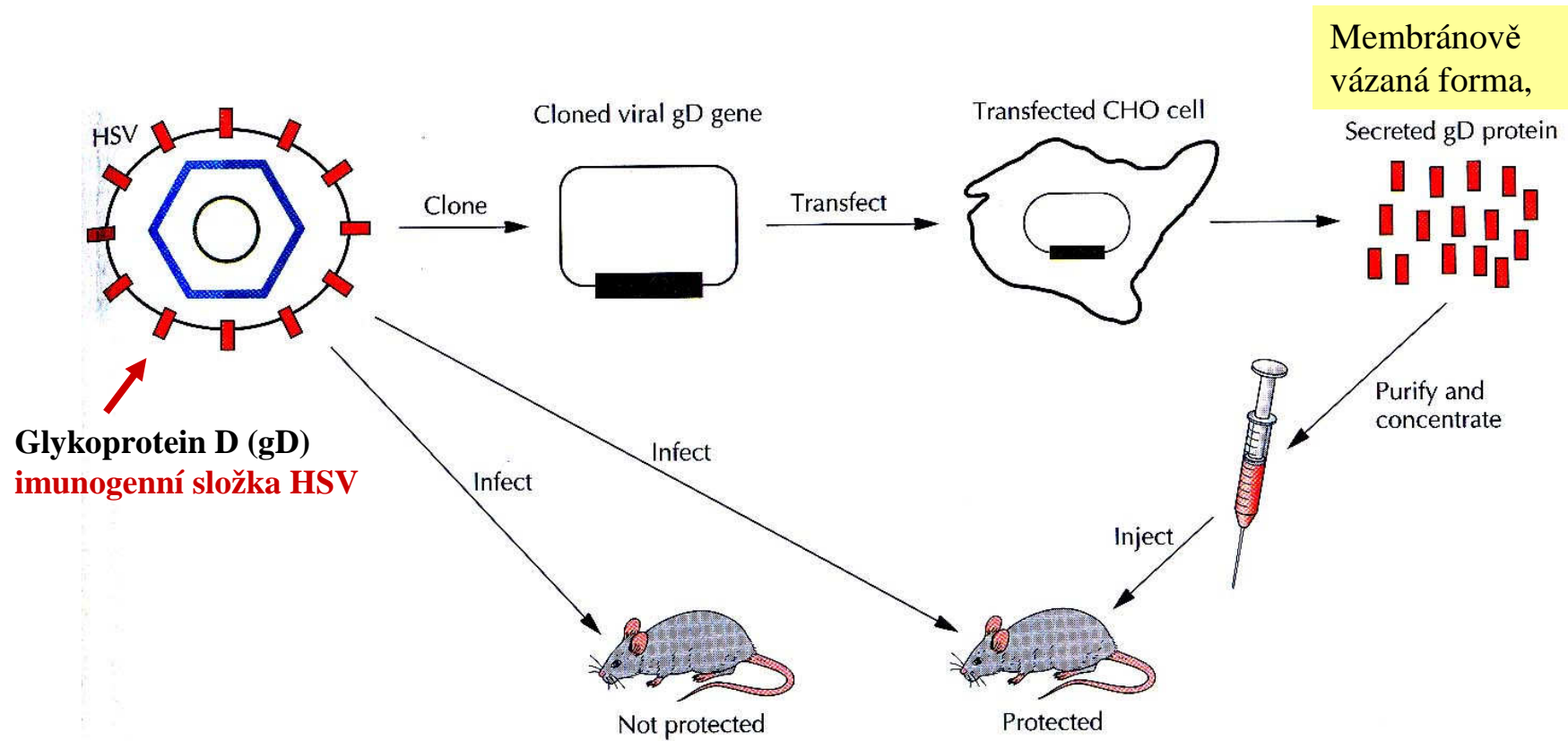
Přenos vektoru do kmene, v němž je uvnitř genu pro A1 začleněn gen pro rezistenci k tetracyklinu (A1 je inaktivován, buňky jsou TetR) – potenciální reverze A1 vyčleněním tetR – proto není vhodný jako vakcína

Vektor se po několika generacích spontánně vyřadí

Selekce buněk TetS, obsahujících deletovanou formu A1 – tyto buňky tvoří složku A2 a B, a jsou proto imunogenní – reverze není možná



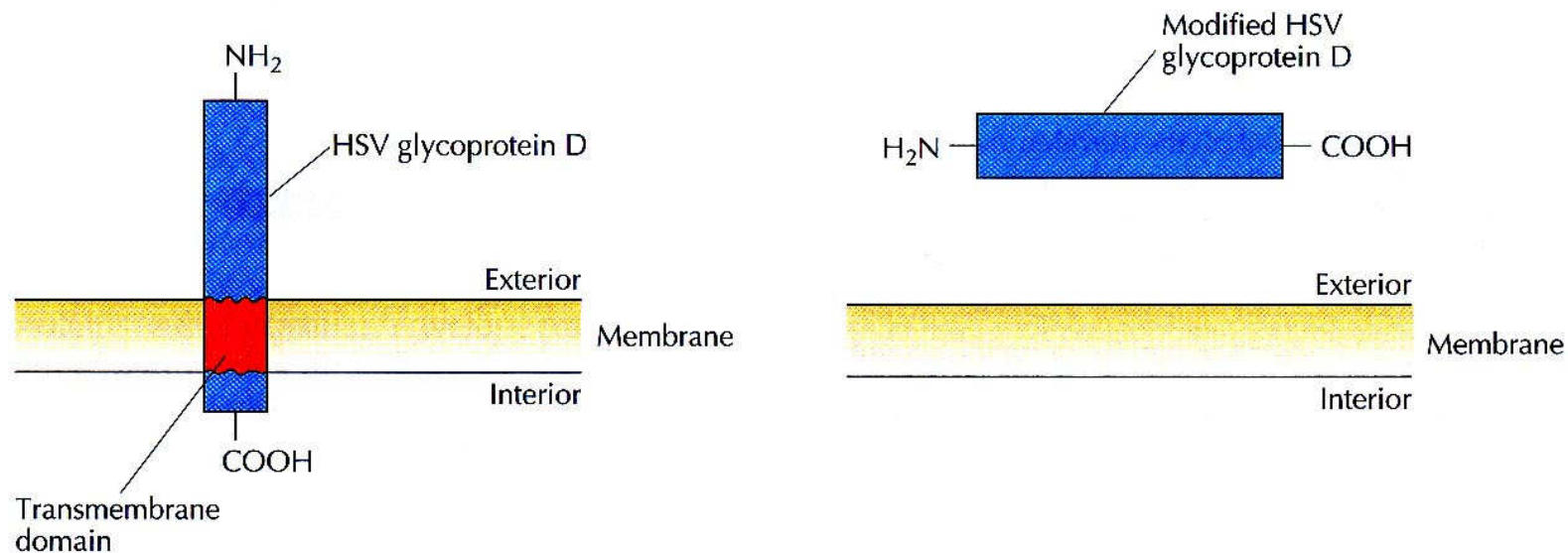
# Příprava podjednotkové vakcíny proti HSV v buňkách CHO (chinese hamster ovary)



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)

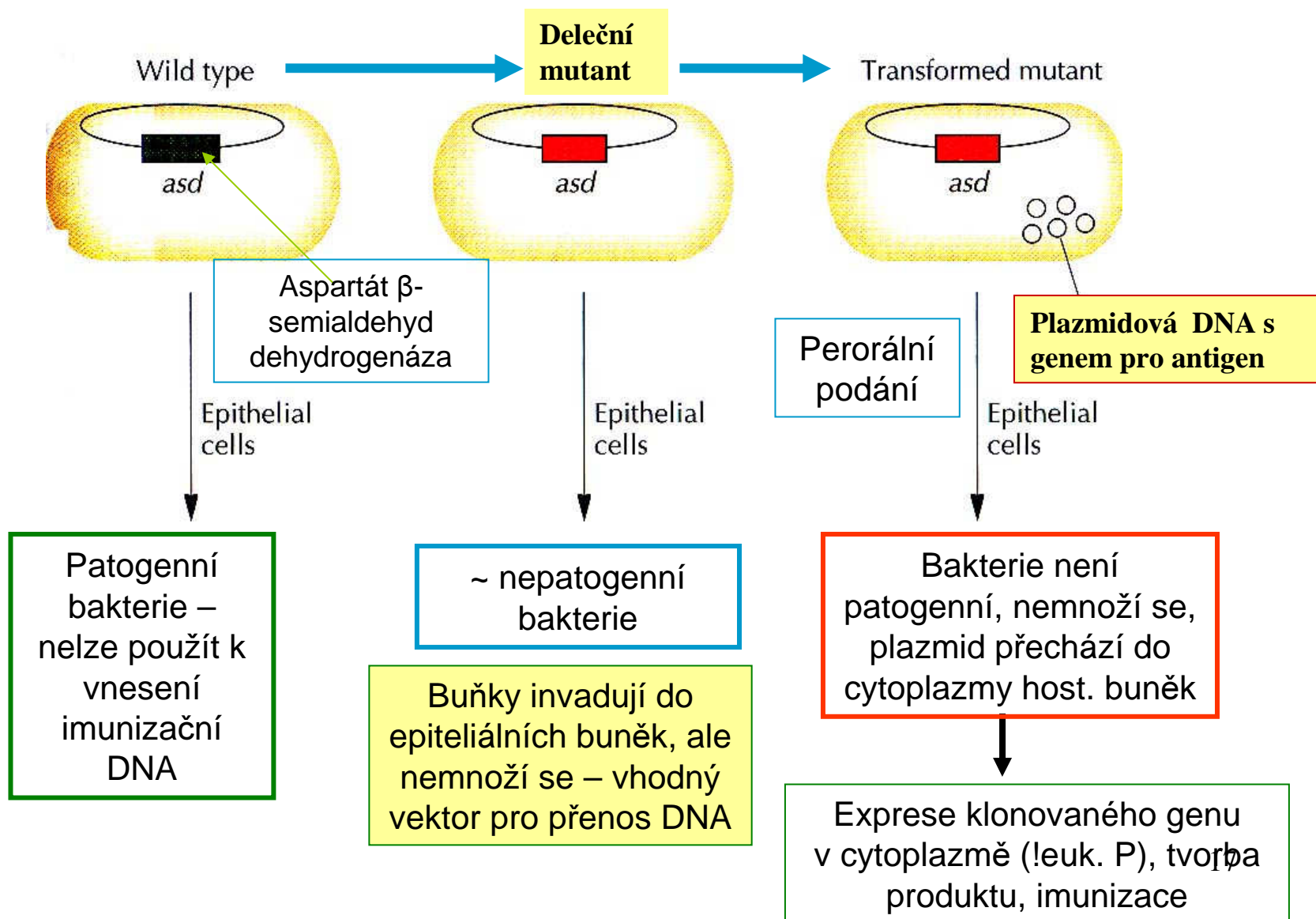


Kompletní gen pro gD obsahující C-terminální úsek kódující transmembránovou doménu – tato forma gD je obtížně purifikovatelná

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



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



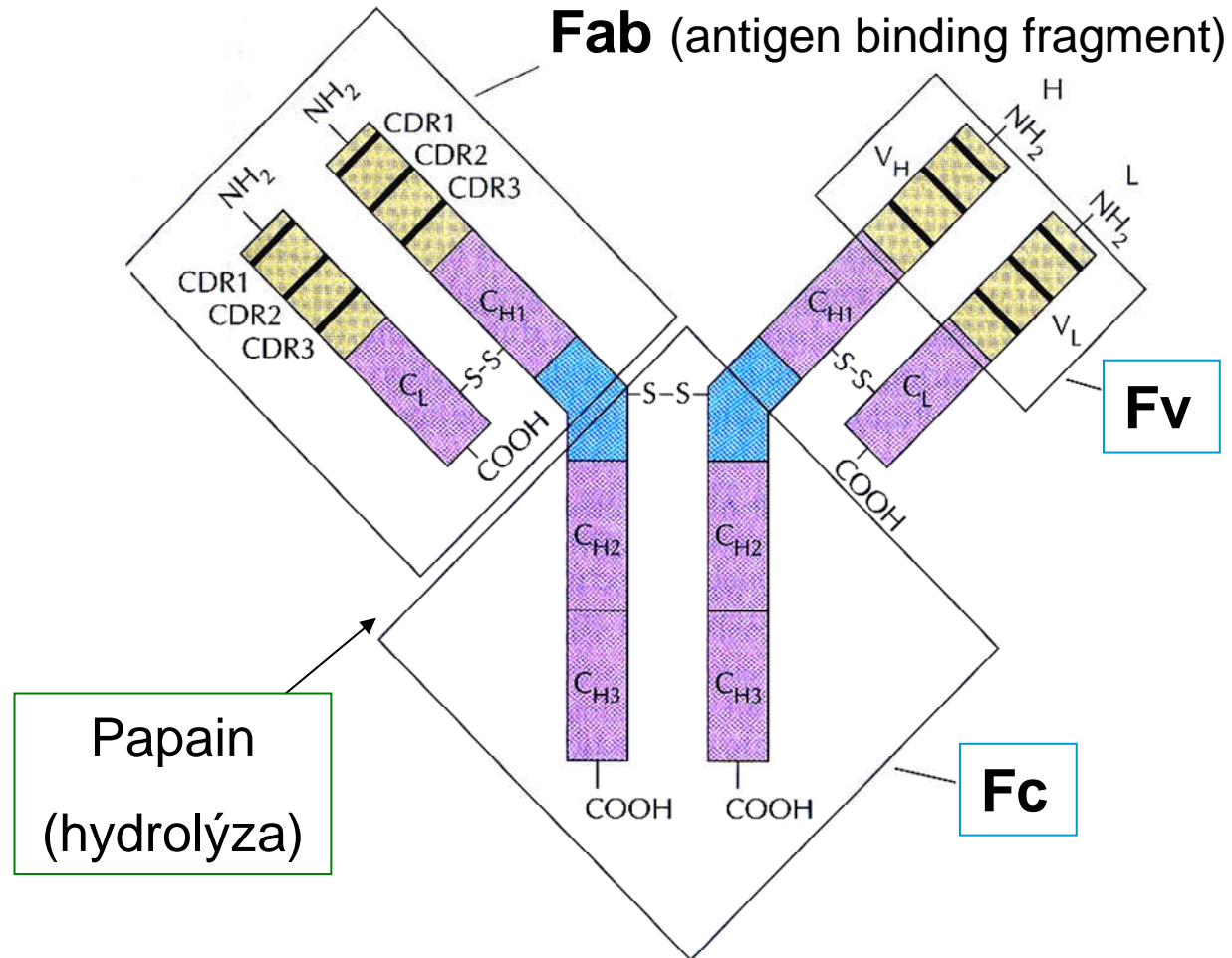
# Rekombinantní protilátky

## A. Terapeutické účely

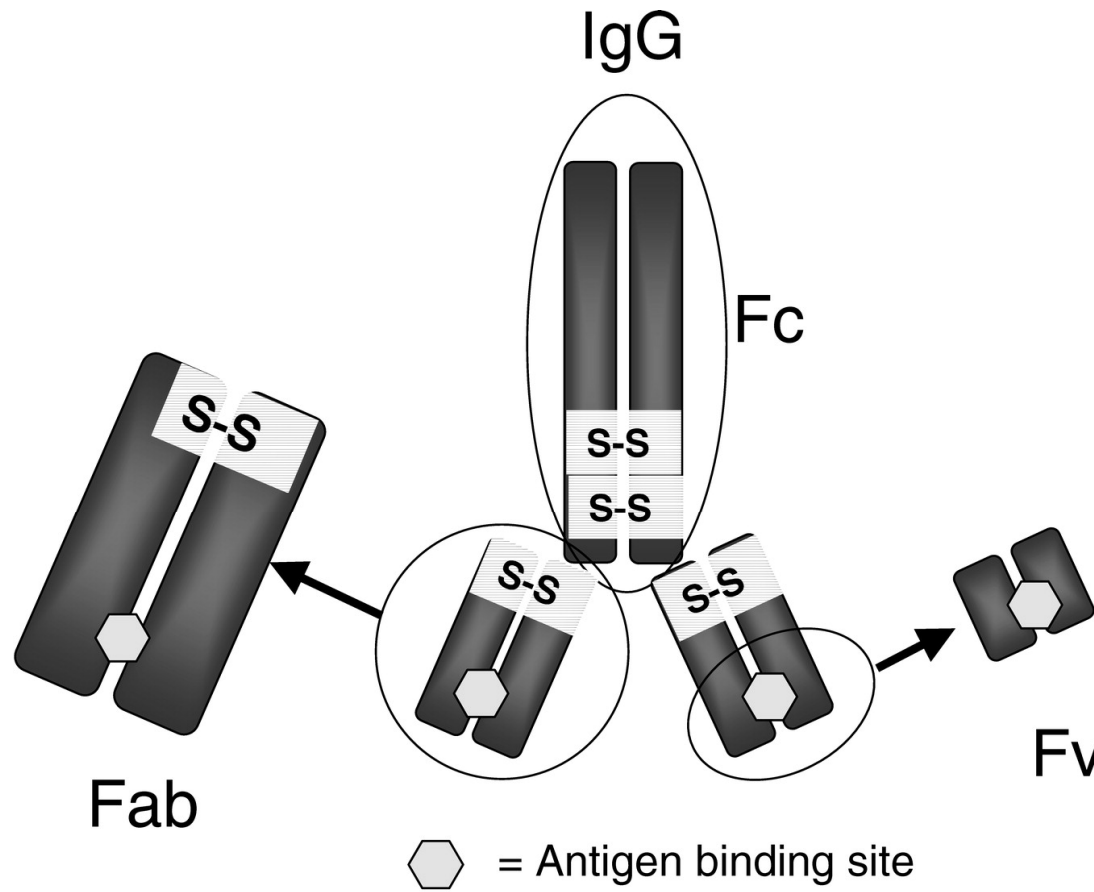
- pasivní imunizace
- cílené dopravování léčiv – terapeutické protilátky
- protinádorová léčiva – **biologická léčba**

## B. Diagnostické účely imunologické analýzy

# Struktura protilátky



# Funkční části protilátky

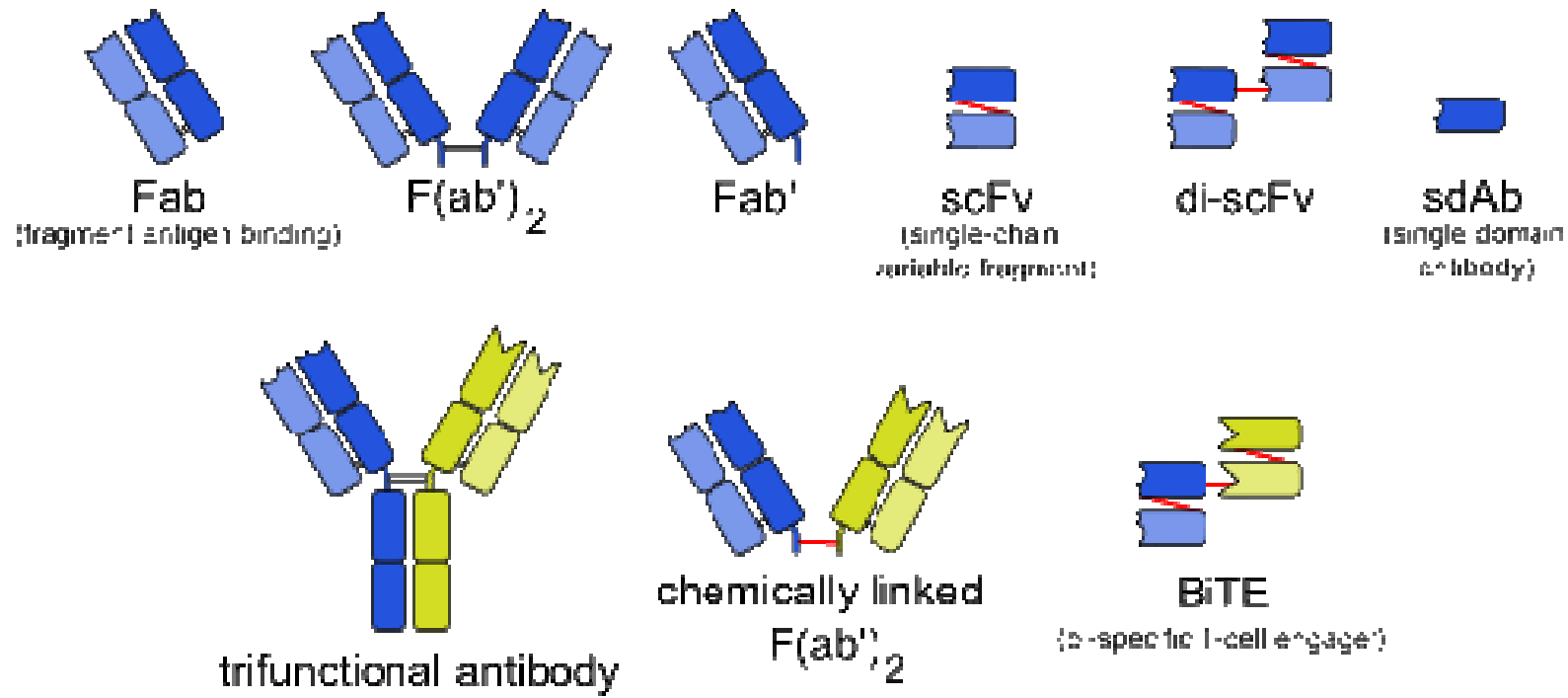


## Části IgG

**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**



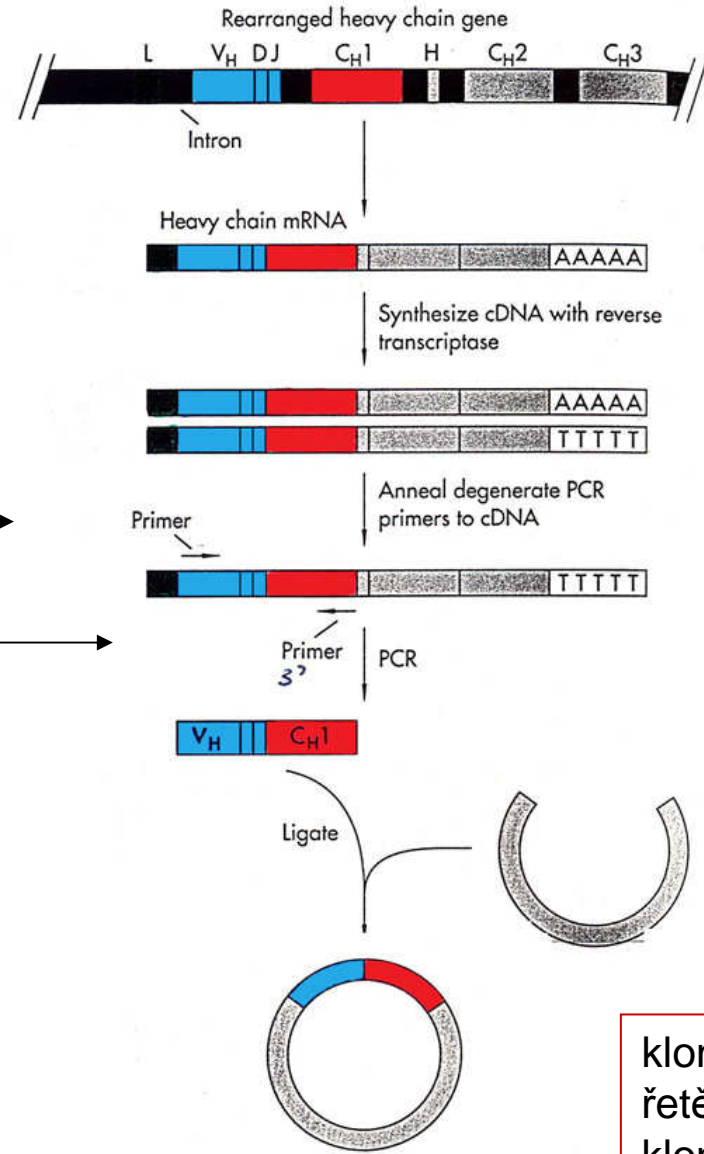
# Klonování cDNA pro přípravu rekombinantních protilátek

Lymfocyty získané z imunizované myši (přeskupené geny)

Soubor degenerovaných 5'-primerů

Stejný primer pro všechny

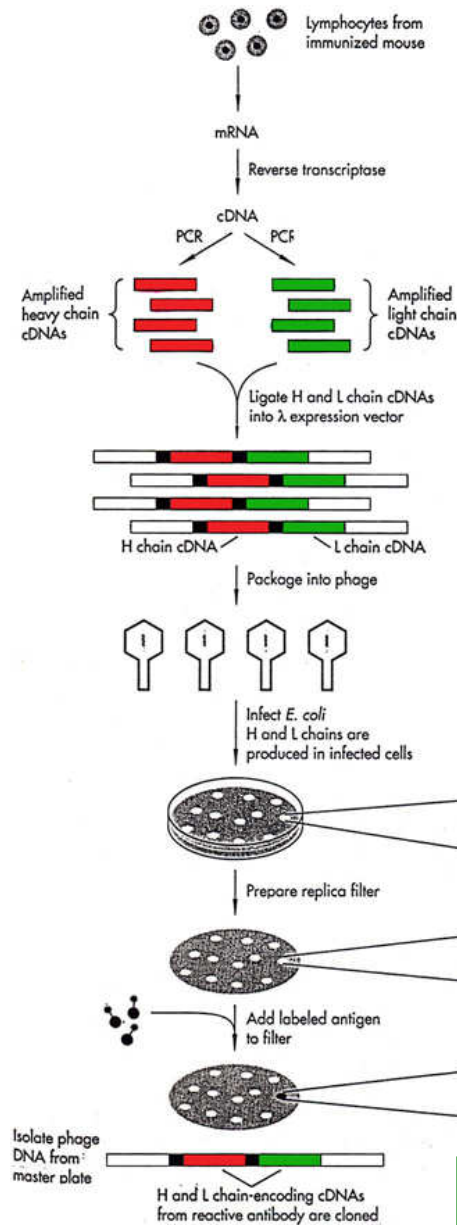
Soubor cDNA pro těžké řetězce



Kombinace milionů klonů pro těžké a pro lehké řetězce

klonovaná cDNA pro těžký řetězec, stejným způsobem se klonuje cDNA pro lehký řetězec

# Příprava specifické protilátky



Příprava milionů cDNA nesoucích informaci pro L a H řetězce

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

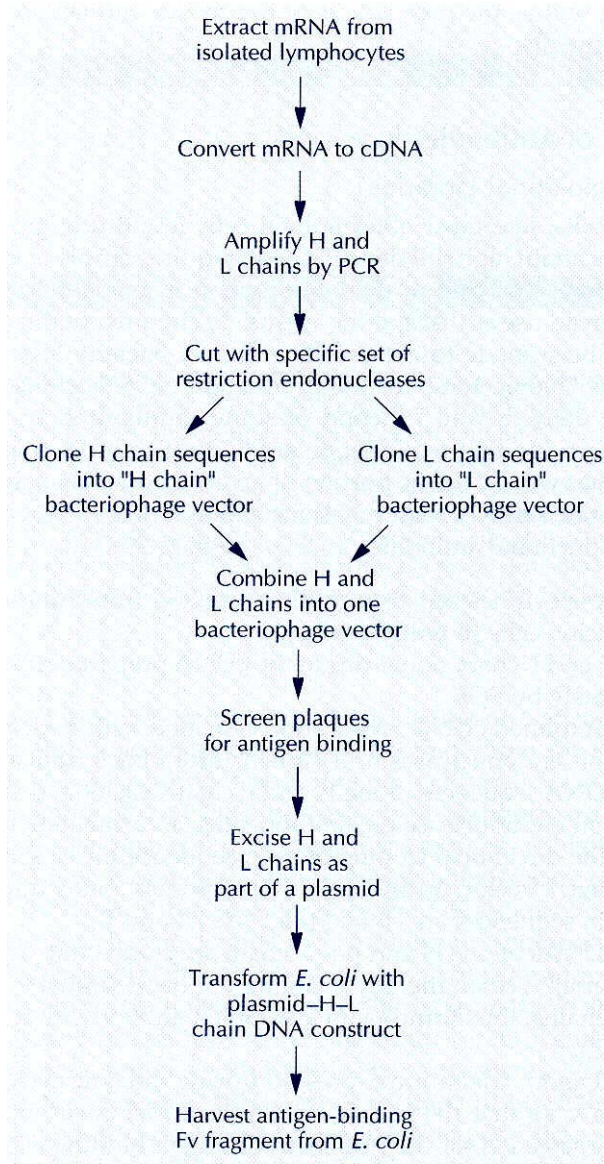
Každý fág obsahuje náhodnou kombinaci L a H

Soubor fágů představující kombinatorickou fágovou knihovnu

Miliony „monoklonálních“ protilátek

Překlonování do expresního savčího nebo bakteriálního vektoru

# Příprava kombinatorické knihovny $V_L$ - a $V_H$ - oblastí protilátek v *E. coli* ve vektoru lambda



Lidské B-lymfocyty

PCR

cDNA H a L řetězců mají odlišná místa pro různé RE, což umožňuje jejich oddělené klonování

Mnoho různých kombinací – každý „kombinatorický vektor“ obsahuje jednu kombinaci.

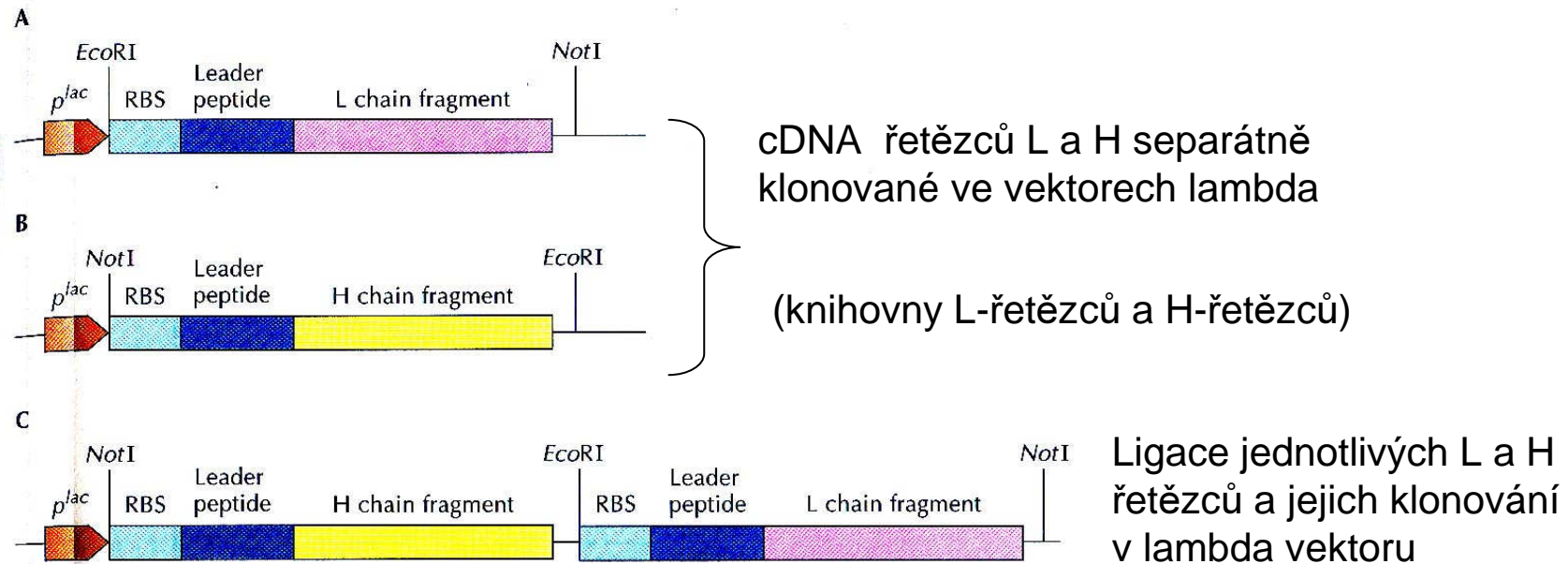
selekce

Překlonování vybraných kombinací do plasmidu (fág buňky lyzuje a není možné získat větší množství produktu)

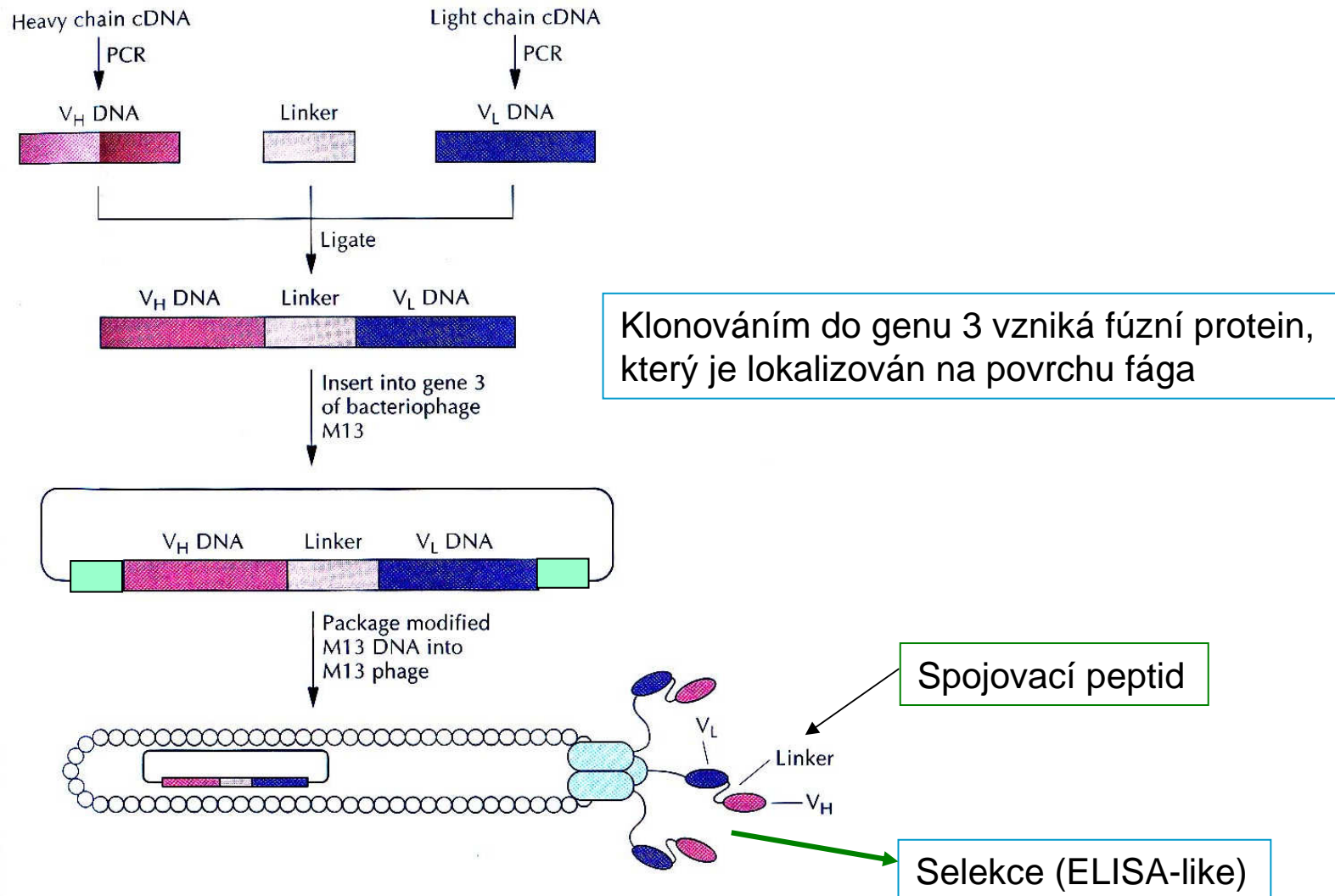
Využití v diagnostice/terapii



# Konstrukce kombinatorické knihovny Fv ve vektoru bakteriofága lambda



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



# Důvod pro přípravu humanizovaných protilátek:

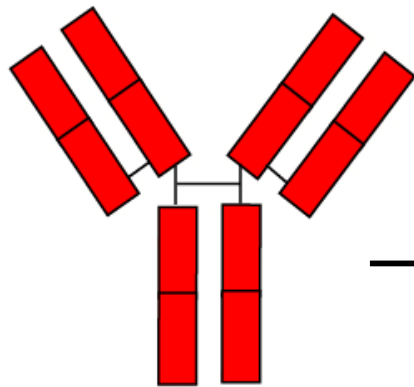
obtížná příprava lidských monoklonálních protilátek konvenční hybridomovou technologií

- 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)

**Transgenní myši s geny pro lidské imunoglobuliny v YAC (jejich vlastní geny pro Ig knokautovány, pak imunizace, např. tetanotoxinem – tvoří lidské protilátky)**

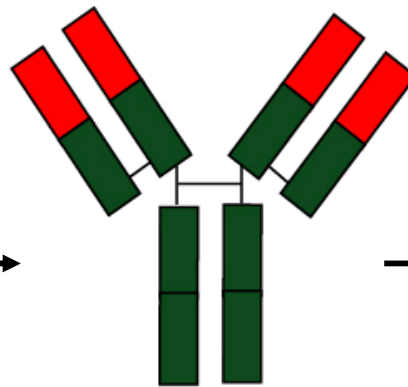
# Příprava humanizovaných protilátek

Myší protilátka



Variabilní, konstantní a hypervariabilní oblasti jsou z protilátek myši

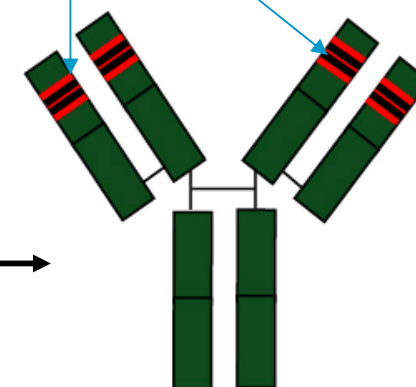
Chimerická protilátka



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

Humanizovaná protilátka

CDRs - complementarity determining regions



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

65% lidské

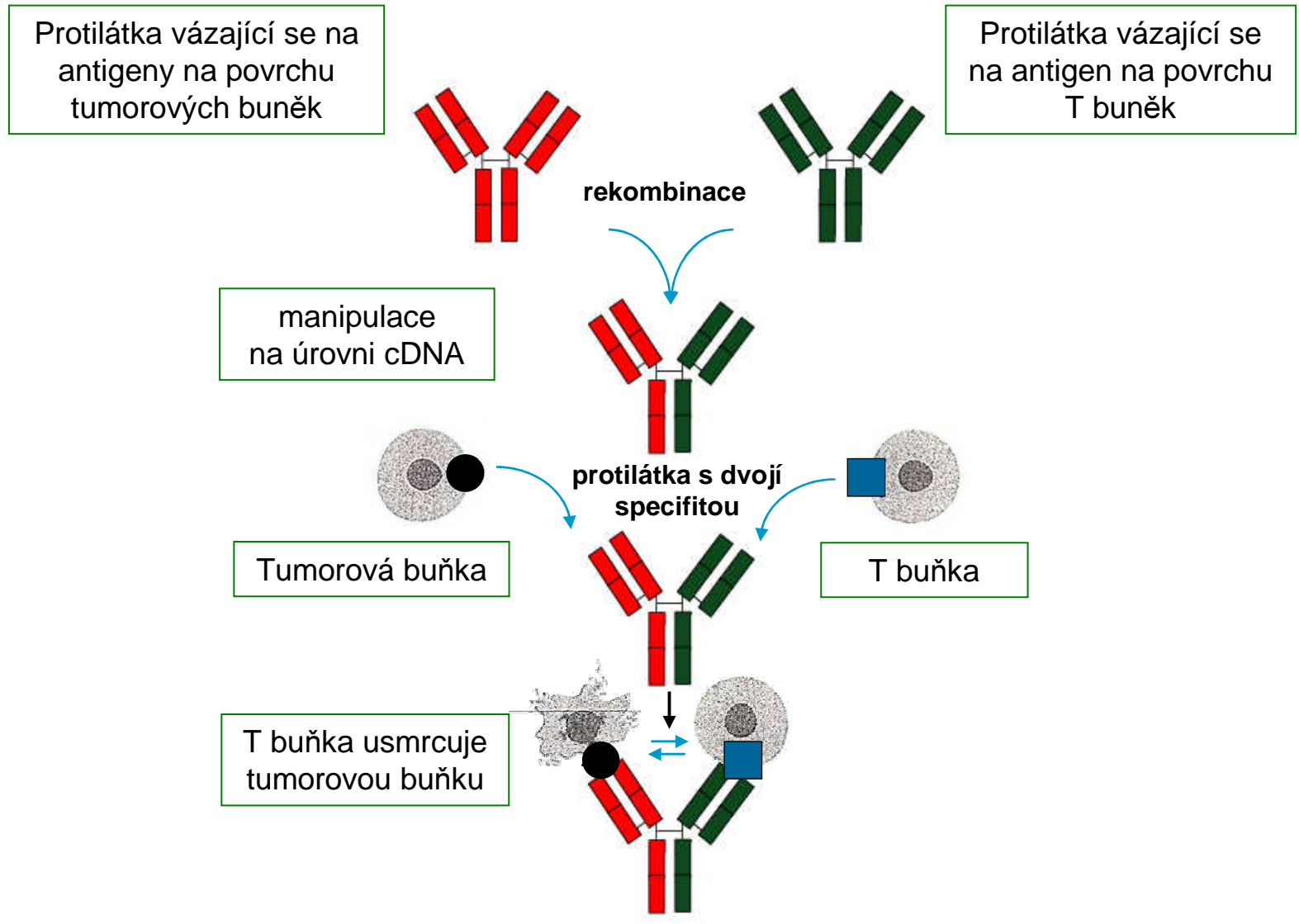
95% lidské

## **Lidské protilátky**

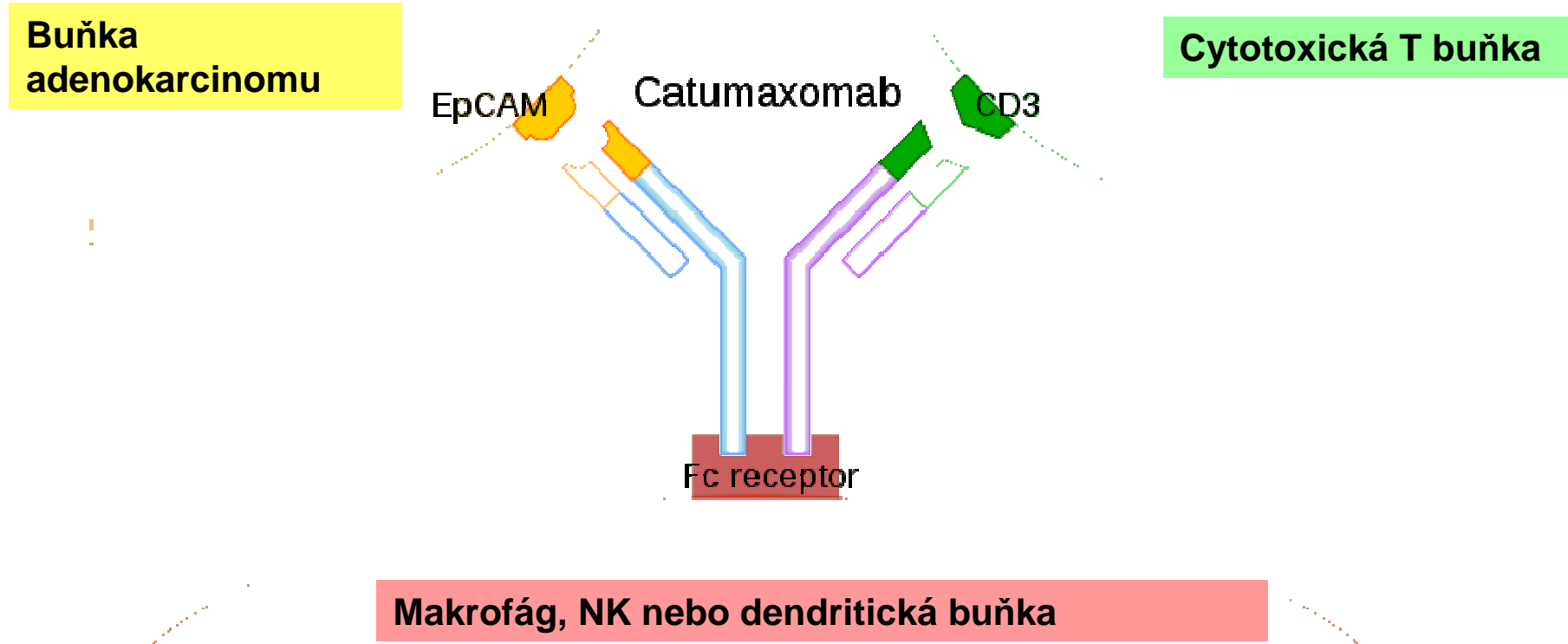
### **Human monoclonal antibodies (*umab*)**

**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.**

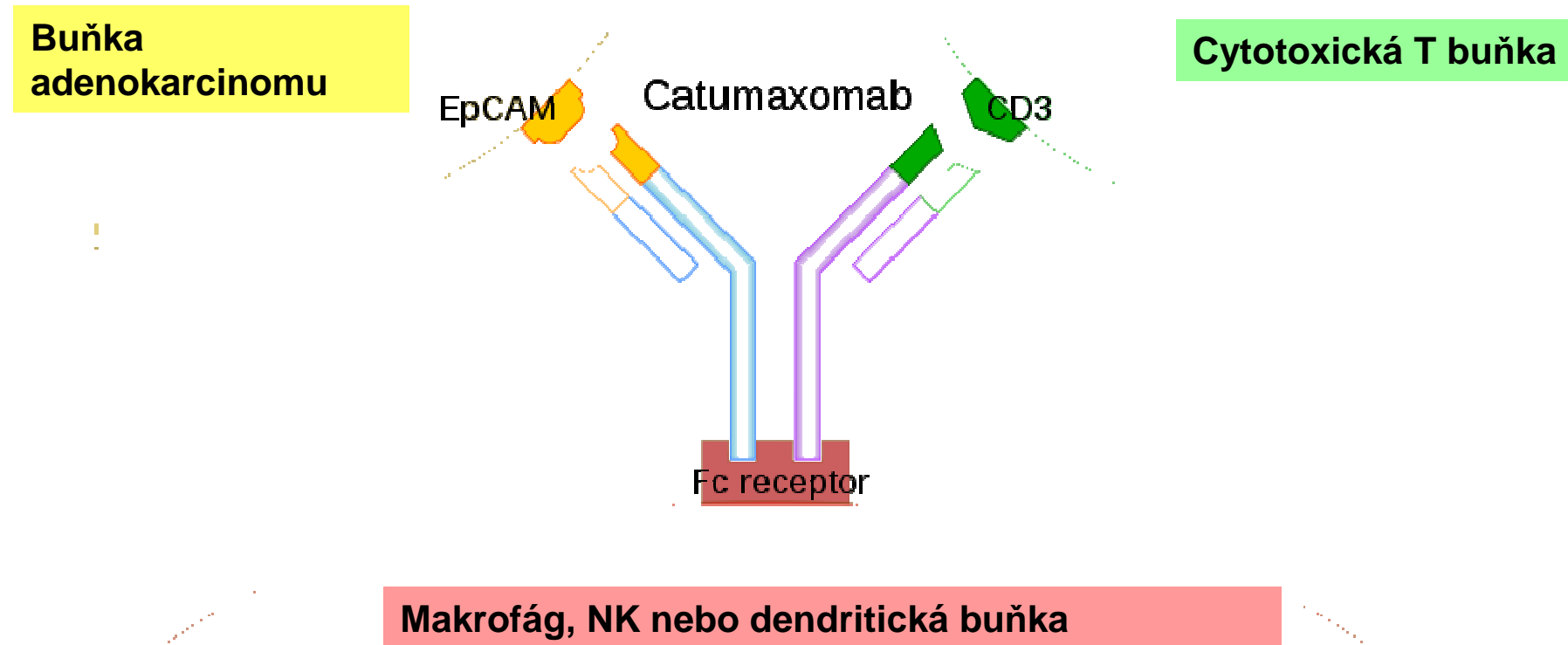
# Protilátka s dvojí specifitou



# Mechanismus působení bispecifické monoklonální protilátky

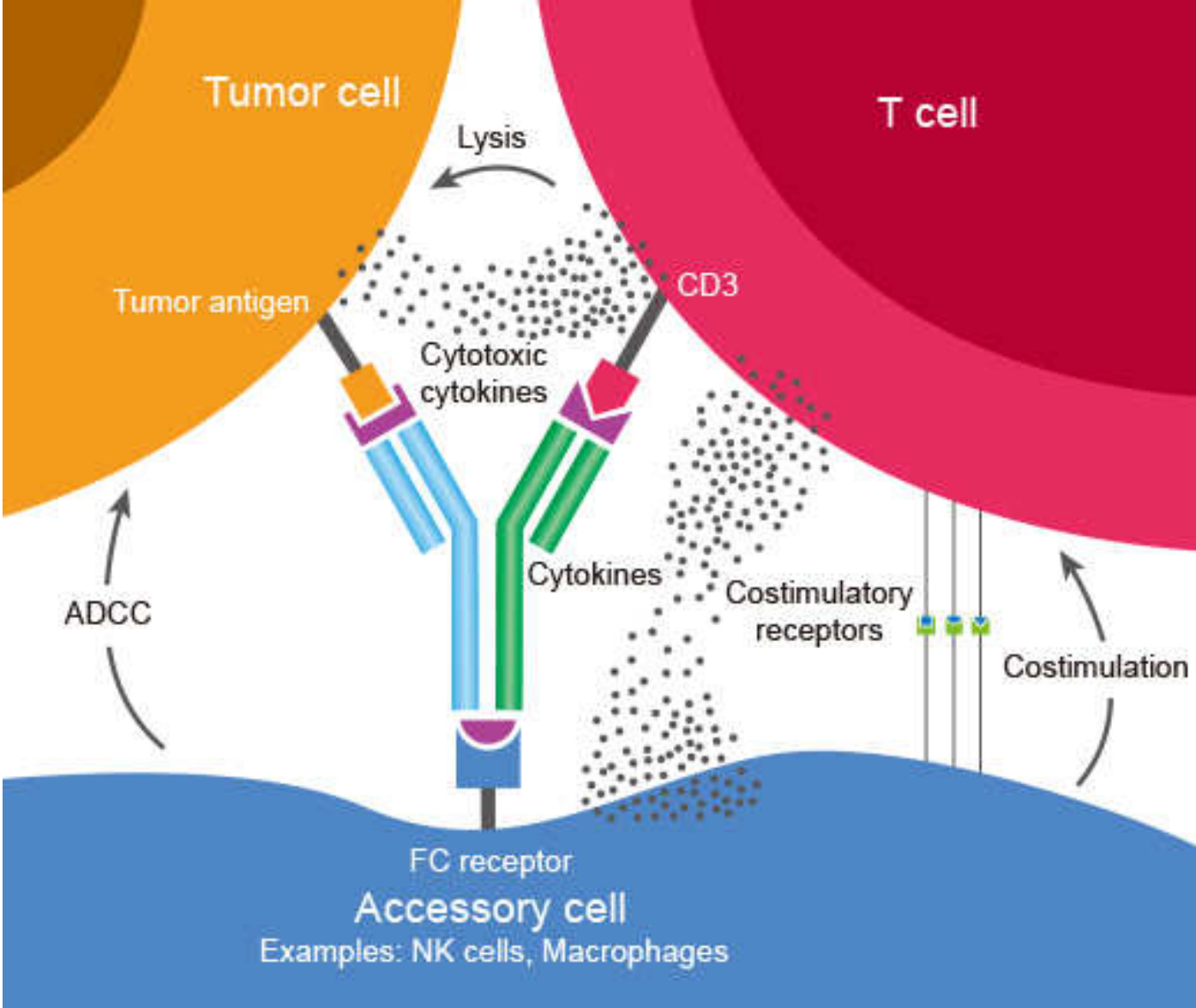


## Mechanismus působení bispecifické monoklonální protilátky

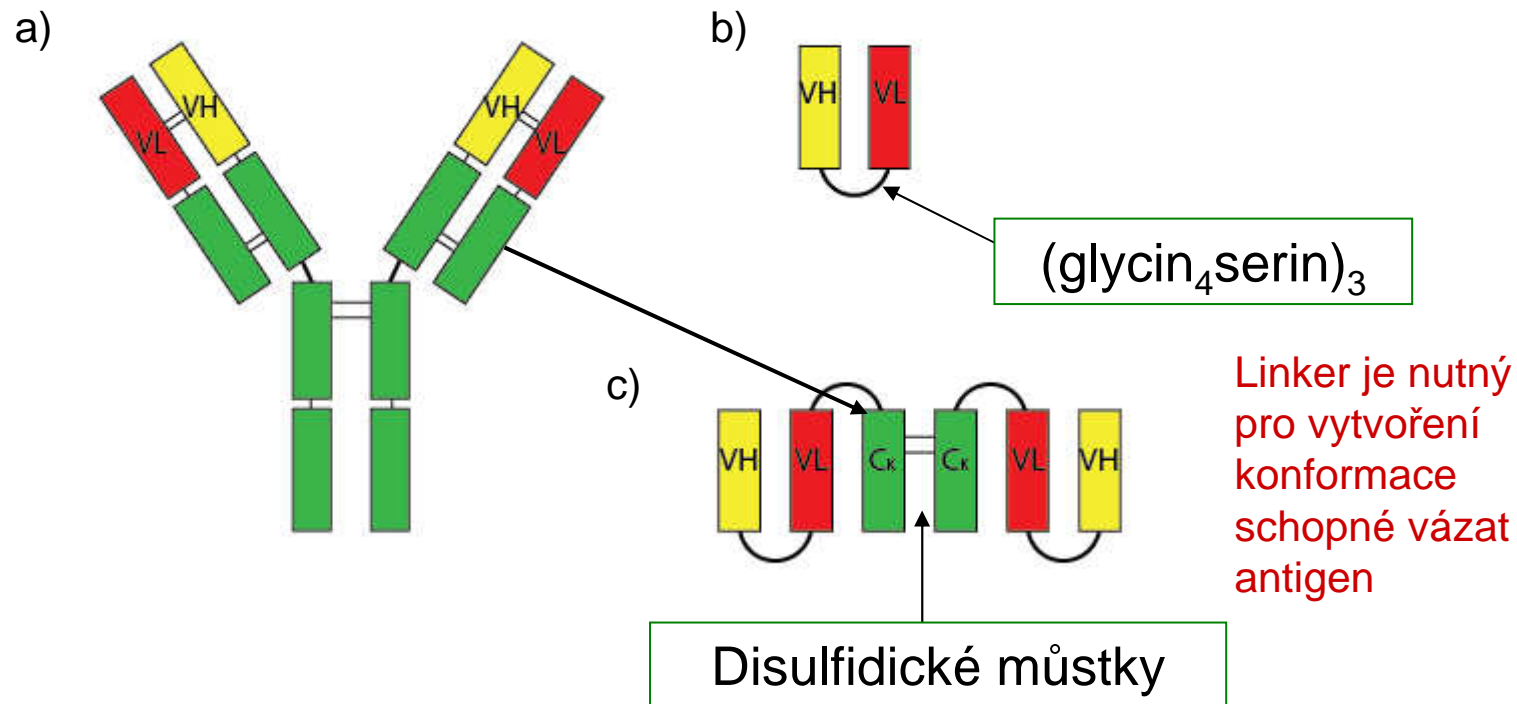


Catumaxomab (obchodní označení Removab) je hybridní monoklonální protilátka používaná k léčbě maligního ascitu u pacientů s metastázujícími nádory. Váže se na antigeny CD3 přítomné na cytotoxických T-buňkách a současně na antigeny EpCAM na nádorových buňkách. Je používána v EU a klinicky testována v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



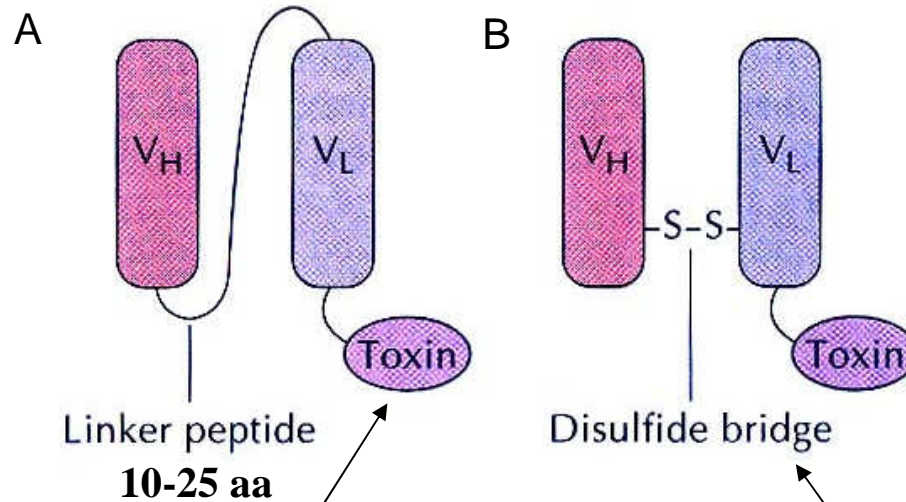


# scFv - single chain antibody variable region fragments (SCA)



**scFv – 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“ Fv imunotoxinů (scFv)



- exotoxin A *Pseudomonas*
- difterický toxin
- ricin

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

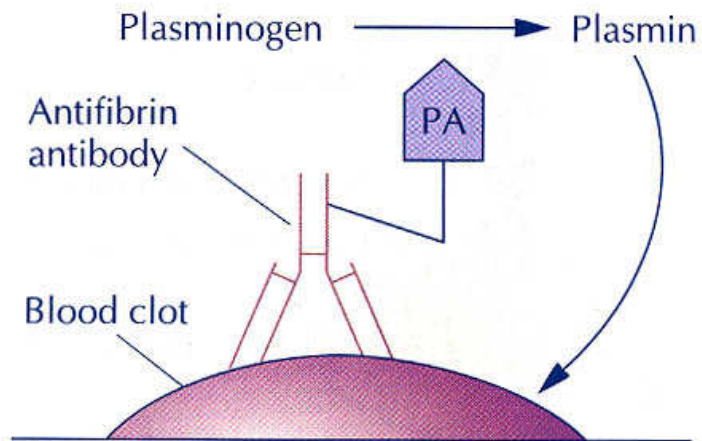
Záměna peptidového linkeru za disulfidický můstek několikanásobně zvyšuje stabilitu scFv a tím zlepšuje jeho terapeutické využití

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

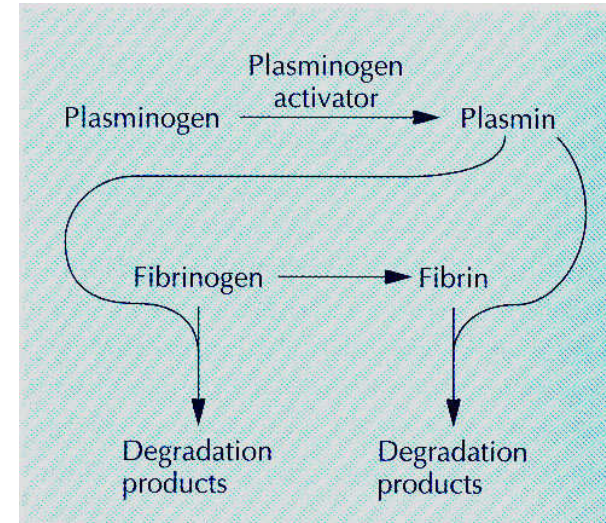
human epidermal growth factor receptor 2 -Approximately 30% of breast cancers have an amplification of the *HER2/neu* gene or overexpression of its protein product.

Pbs21 (plasmodium) + Shiva-1

# 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.**

## Some therapeutic monoclonal antibodies that have been approved for human use in either the United States or European Union

Date of approval	Type of antibody	Company	Therapeutic use
1986	Mouse	Ortho Biotech	Prevention of acute kidney transplant rejection
1994	Chimeric	Centocor	Prevention of blood clots
1997	Chimeric	Genentech, Idec Pharmaceuticals	Non-Hodgkin lymphoma
1997	Humanized	Protein Design Labs, Hoffmann-La Roche	Prevention of acute kidney transplant rejection
1998	Chimeric	Centocor, Schering-Plough	Crohn disease and rheumatoid arthritis
1998	Chimeric	Novartis	Prevention of acute kidney transplant rejection
1998	Humanized	Genentech	HER2-positive breast cancers
1998	Humanized	Medimmune	Respiratory syncytial virus infection in children
1998	Chimeric	Hoffmann-La Roche	Non-Hodgkin lymphoma
2000	Humanized	American Home Products, Celltech	Relapsed acute myeloid leukemia
2001	Humanized	Millennium Pharmaceuticals, Schering	Chronic lymphocytic leukemia
2001 pending	Humanized	Genentech, Novartis, Tanox	Asthma

In addition to the antibodies listed here, 11 have been approved for diagnostic purposes.

## 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-<math>\alpha</math></u> signaling	Several <u>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-2R<math>\alpha</math></u> receptor ( <u>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>

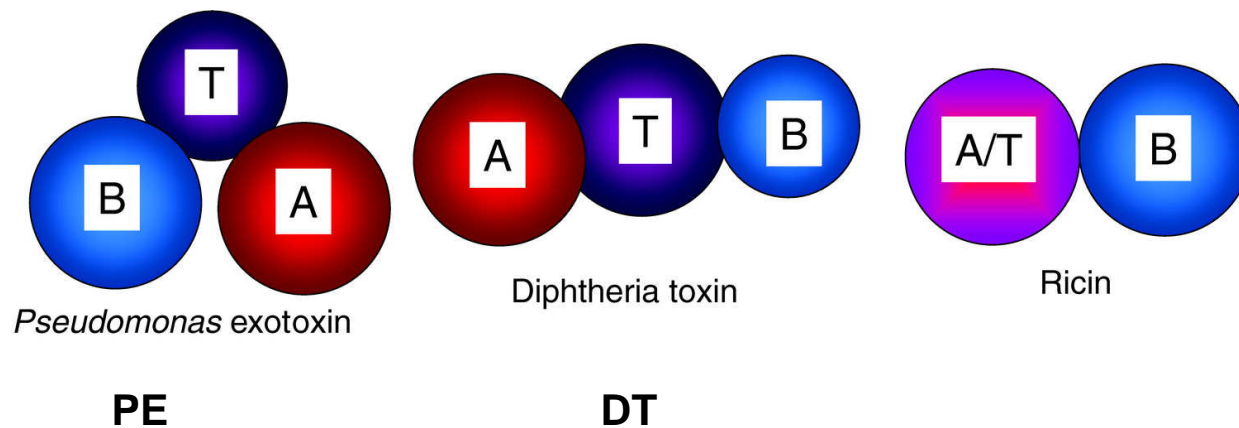
**-omab = myší; -ximab, -zumab = chimerická, humanizovaná; -umab = humánní**

**Table 5.4** Some therapeutic monoclonal antibodies that have been approved for human use in either the United States or the European Union

Approval date	Antibody	Drug name	Antibody type	Therapeutic use
1986	Muromomab	Orthoclone	Murine	Prevention of acute kidney transplant rejection
1994	Abciximab	ReoPro	Chimeric	Prevention of blood clots
1997	Daclizumab	Zenapax	Humanized	Prevention of acute kidney transplant rejection
1998	Rituximab	Rituxan	Chimeric	Treatment of non-Hodgkin lymphoma
1998	Infliximab	Remicade	Chimeric	Treatment of Crohn disease, psoriasis, rheumatoid arthritis
1998	Basiliximab	Simulect	Chimeric	Prevention of transplantation rejection
1998	Palivizumab	Synagis	Humanized	Treatment of viral infections in children
1998	Trastuzumab	Herceptin	Humanized	Treatment of metastatic breast cancer
2000	Gemtuzumab	Mylotarg	Humanized	Treatment of acute myeloid leukemia
2001	Alemtuzumab	Leukosite	Humanized	Treatment of chronic lymphocytic leukemia
2002	Adalimumab	Humira	Human	Treatment of rheumatoid arthritis
2002	Ibritumomab	Zevalin	Chimeric	Treatment of non-Hodgkin lymphoma
2003	Efalzumab	Raptiva	Humanized	Treatment of severe plaque psoriasis
2003	Omalizumab	Xolair	Humanized	Treatment of severe persistent asthma
2003	Tositumomab	Bexxar	Murine + iodine-131	Treatment of non-Hodgkin lymphoma
2004	Cetuximab	Erbix	Chimeric	Treatment of various cancers
2004	Natalizumab	Tysabri	Humanized	Treatment of multiple sclerosis
2004	Bevacizumab	Avastin	Humanized	Treatment of various cancers
2006	Panitumumab	Vectibix	Human	Treatment of colorectal cancer
2009	Ofatumumab	Azerra	Human	Treatment of chronic
2010	Denosumab	Proliga	Human	Treatment of osteoporosis
2010	Denosumab	Xgeva	Human	Treatment of bone cancer
2011	Bellimumab	Benlysta	Human	Treatment of systemic lupus erythematosus
2011	Ipilimumab	Yervoy	Human	Treatment of late stage melanoma
2011	Brentuximab vedotin	Adcetris	Chimeric	Treatment of Hodgkin lymphoma
2012	Pertuzumab	Perjeta	Humanized	Treatment of HER2-positive metastatic breast cancer
2013	Obinutuzumab	Gazyvaro	Humanized	Treatment of chronic lymphoid leukemia
2014	Pembrolizumab	Keytruda	Humanized	Treatment of late stage melanoma
2014	Ramucirumab	Cyramza	Human	Treatment of solid tumors
2014	Siltuximab	Sylvant	Chimeric	Treatment of various cancers
2014	Blinatumomab	Blinicyto	Bispecific/Humanized	Treatment of Philadelphia chromosome-negative relapsed or refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia
2015	Dinutuximab	Unituxin	Chimeric	Treatment of high-risk pediatric neuroblastoma

In addition to the monoclonal antibodies listed here, a number of monoclonal antibodies have been approved for diagnostic and imaging purposes.

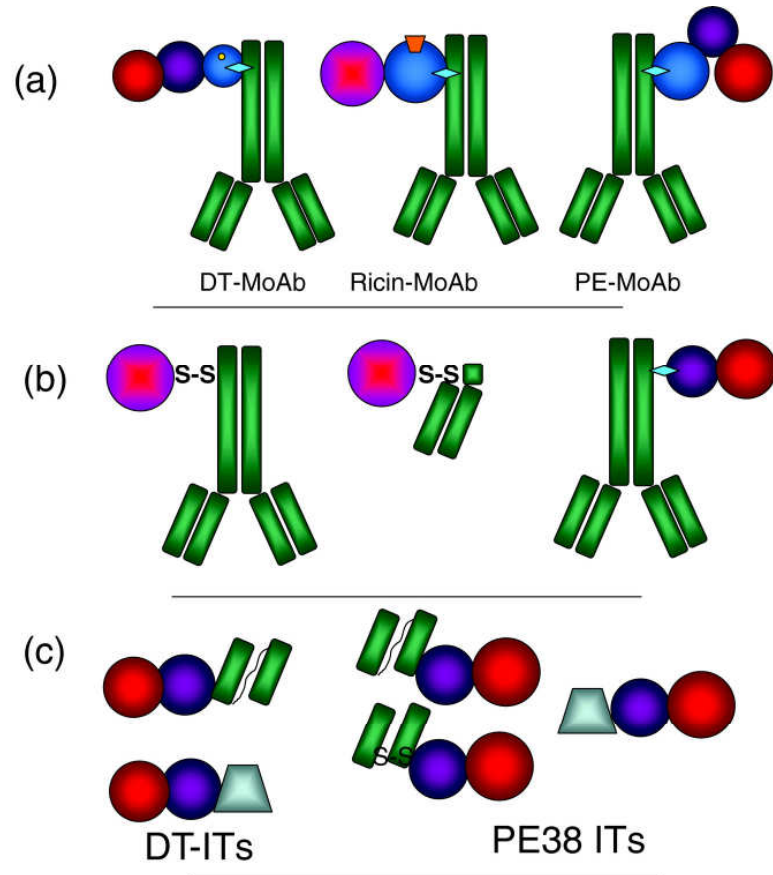
## Toxiny používané pro přípravi imunotoxinů



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



## Etapy vývoje imunotoxinů



1. generace: toxin připojen chemicky disulfidickými vazbami

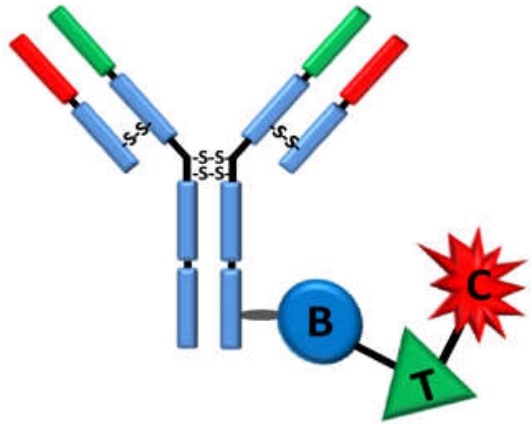
2. Generace: toxiny zbaveny domény pro vazbu na normální endoteliální buňky

3. Generace: Rekombinantní imunotoxiny. scFv.

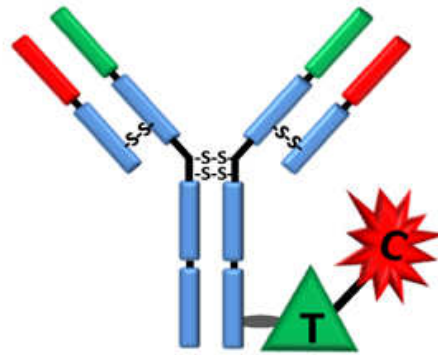
Vzhledem k aktivitě toxinu na eukaryotické buňky musí být připravovány v bakteriích (*E. coli*)

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

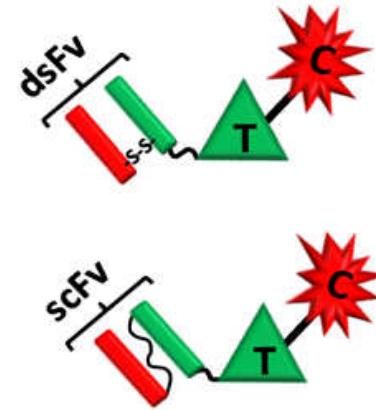
# Generace imunotoxinů



First generation



Second generation



Third generation

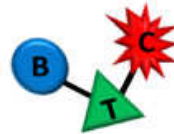
Legend:



Variable fragment  
of antibody light chain



Variable fragment  
of antibody heavy chain

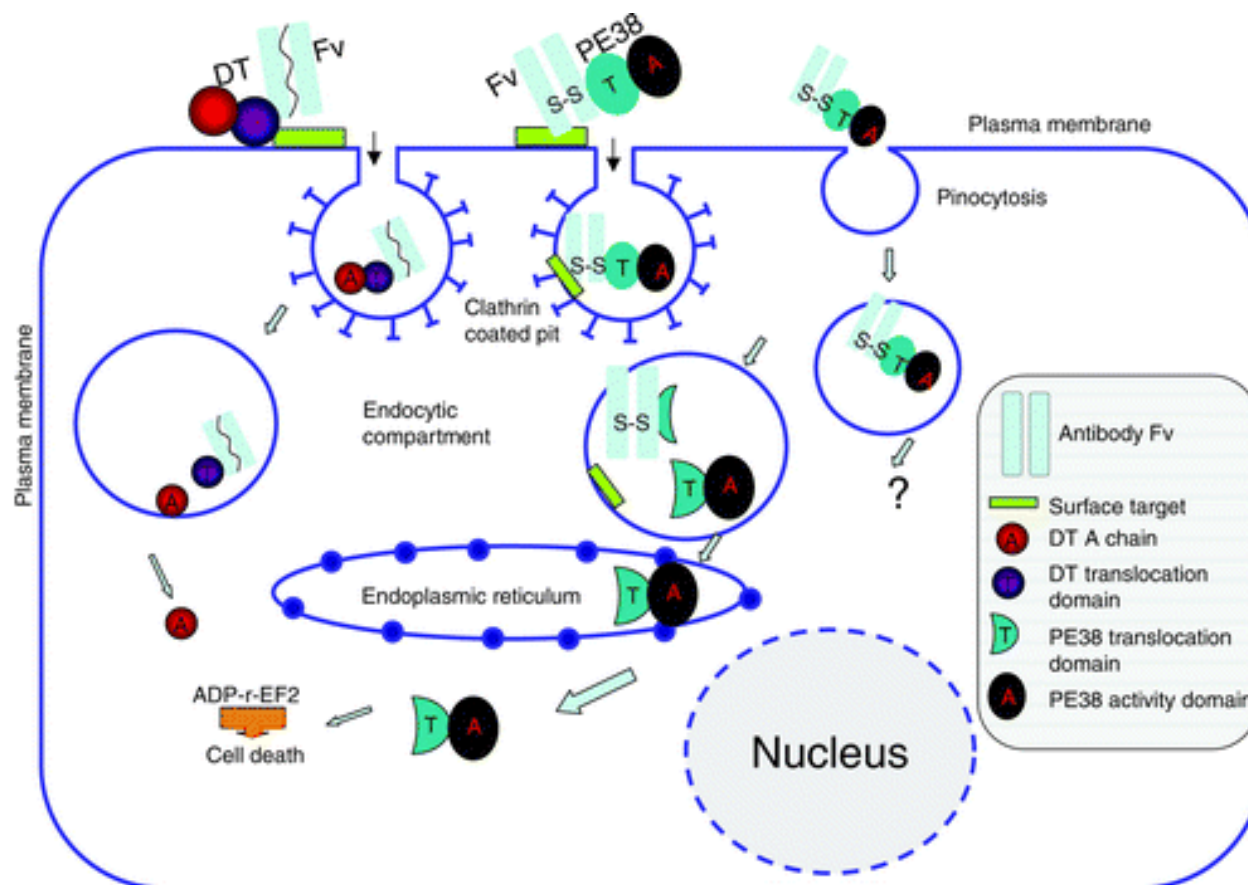


Hypothetical toxin which composed  
of binding (B), translocation (T) and  
catalytic (C) domains



Reducible or non-reducible  
chemical linker

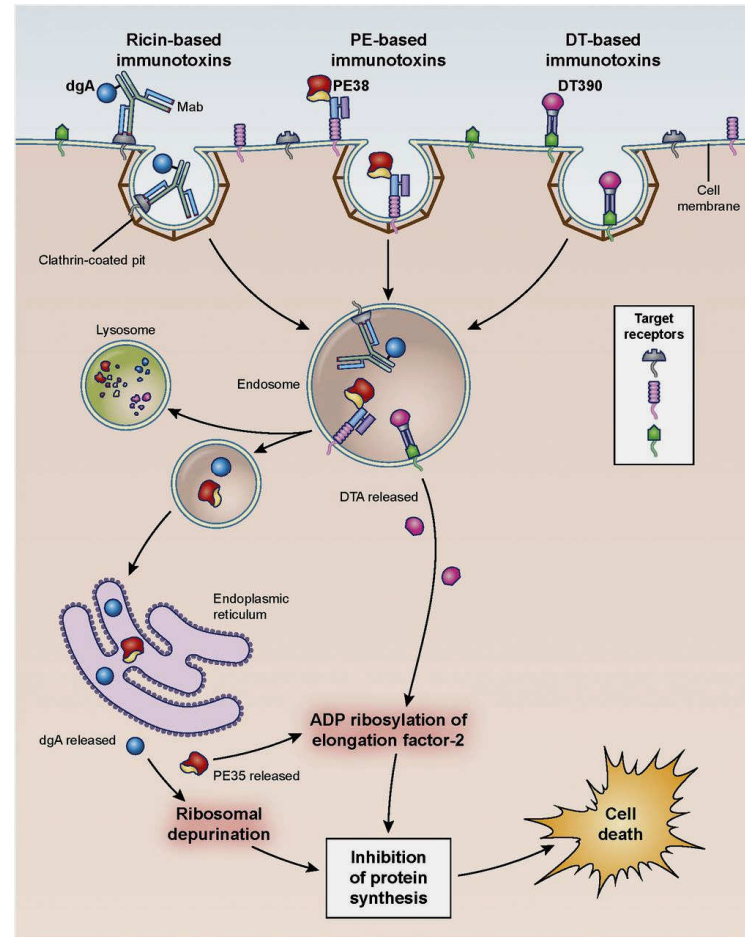
## Endocytóza imunotoxinu a jeho působení na nádorové buňky



AR Pastan I, et al. 2007.  
Annu. Rev. Med. 58:221–37

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

**Pathways of binding, internalization, and processing by immunotoxins leading to the killing of target cells. Shown are ricin-, *Pseudomonas*- and diphtheria-based immunotoxins. Immunotoxins bind the target antigen, are internalized via clathrin-coated pits, and are processed within endosomal compartments. Ricin and *Pseudomonas* toxin derivatives must traffic through the endoplasmic reticulum to the cytosol where they enzymatically inactivate protein synthesis. *Pseudomonas* exotoxin A ADP-ribosylates EF2, while ricin depurinates ribosomal RNA. Diphtheria-based toxins are internalized to endosomes where the A chain of the toxin translocates directly to the cytosol and ADP-ribosylates EF2. Cell death follows inhibition of protein synthesis. dgA: deglycosylated ricin A chain; EF2: elongation factor 2.**



## Abzomy – monoklonální protilátky s katalytickou aktivitou

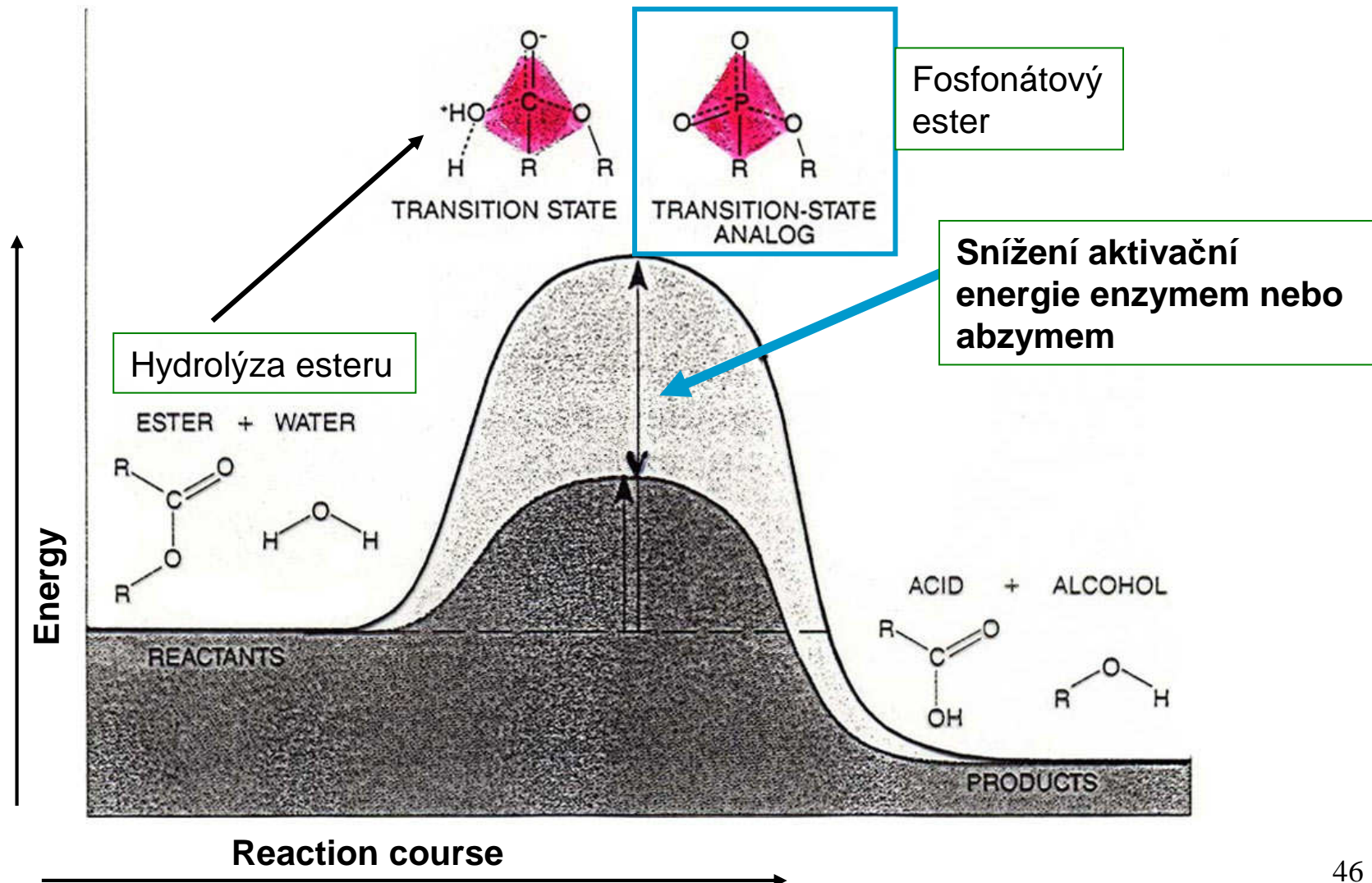
**Abzym** (odvozeno z antibody a enzyme) nazývaný také jako **catmab** (catalytic monoclonal antibody) je monoklonální protilátka vyznačující se katalytickou aktivitou. Abzomy jsou uměle vytvářené konstrukty, nacházejí se ale také přirozeně např. u člověka (anti-vasoactive intestinal peptide autoantibodies), 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 **snížují 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.

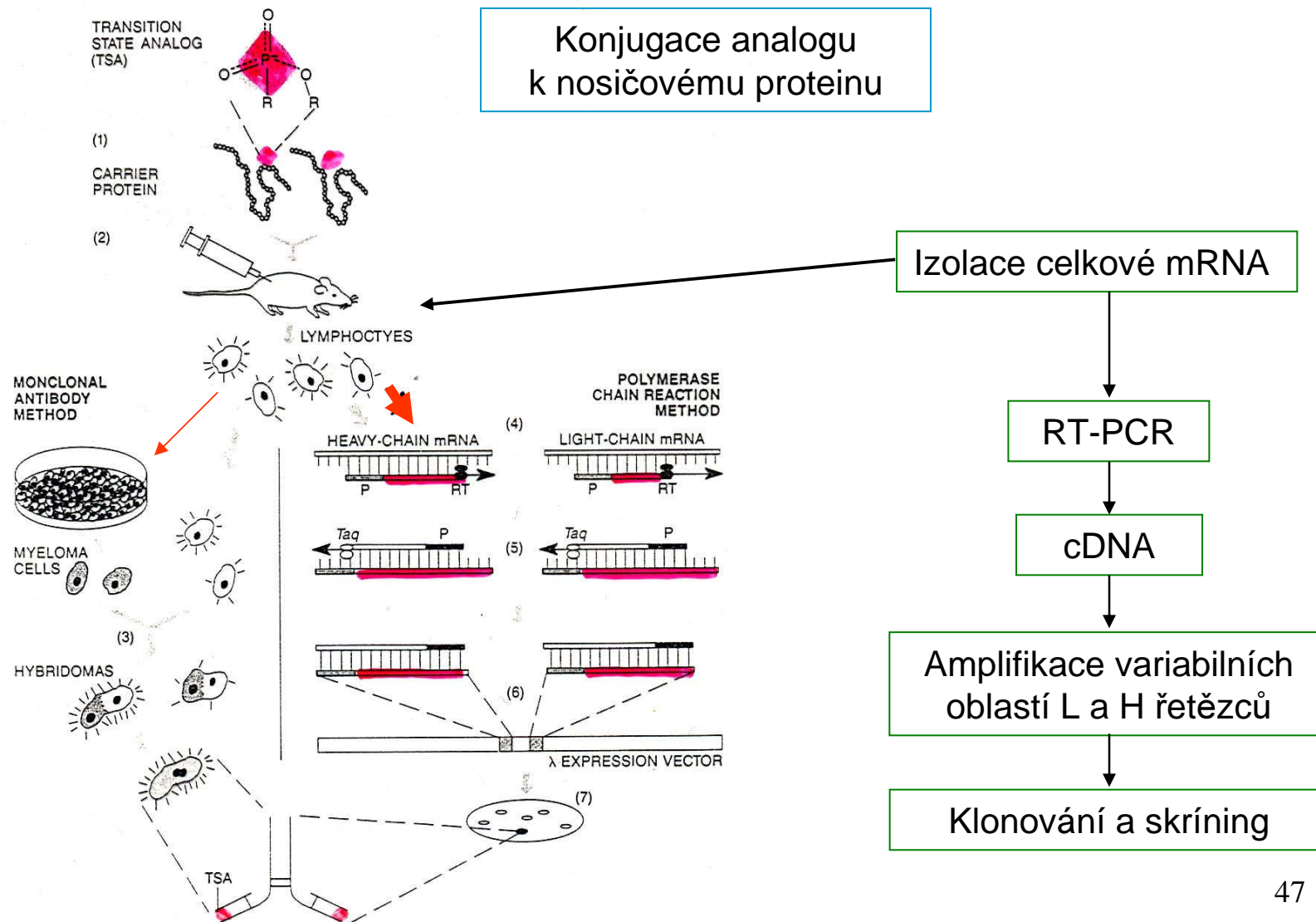
Molekuly, které jsou modifikovány tak, aby se vyznačovaly novými katalytickými aktivitami se nazývají SynZymy.

# Abzym (Ab-enzym)

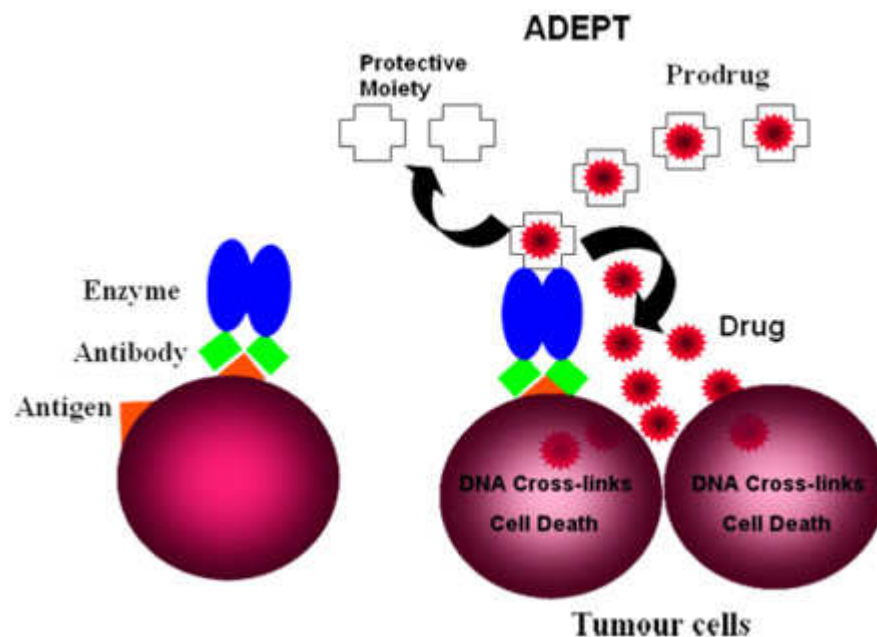
catmab (catalytic monoclonal antibody)



# Příprava protilátky s enzymovou aktivitou (abzymu)



## Princip Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy (ADEPT)

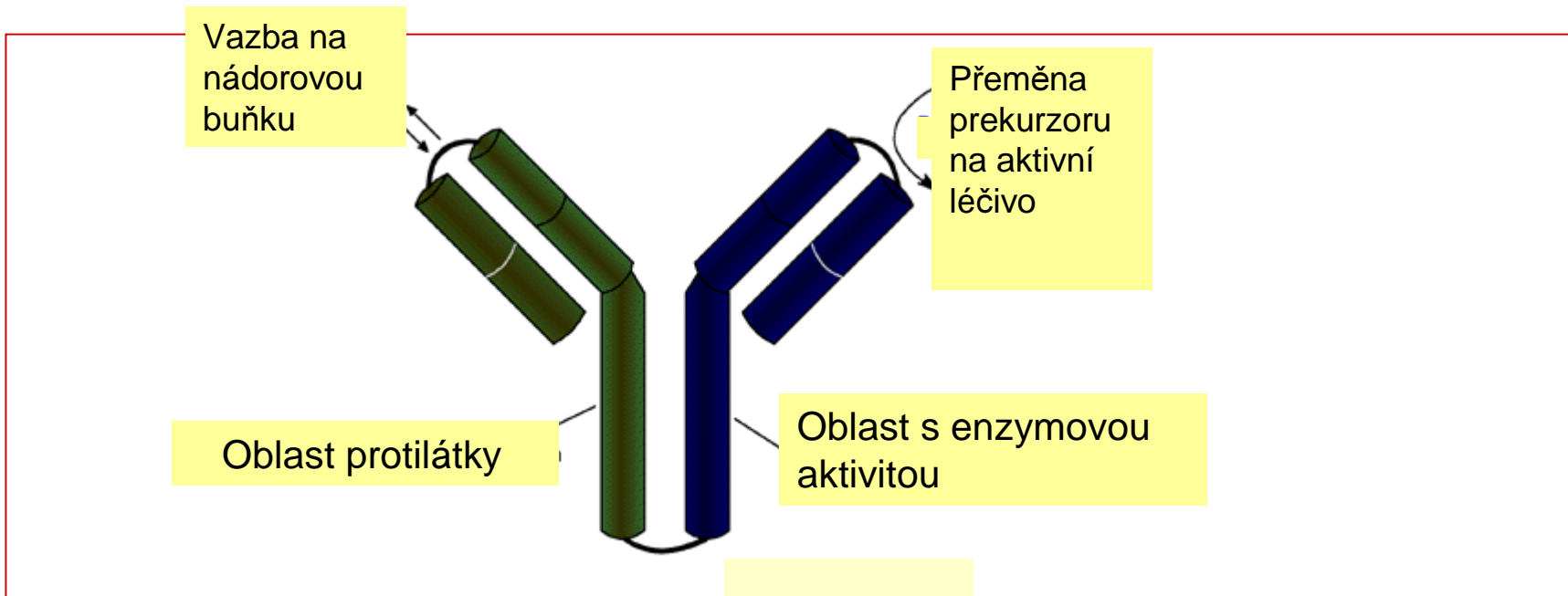


Protilátka (abzym) dopraví enzym k receptorům na nádorových buňkách, kde enzym konvertuje netoxický prekurzor (prodrug) na látku, která účinně nádorové buňky usmrcuje. Tím je omezen toxický účinek na normální buňky.

The use of abzymes at industrial scale for specific synthesis of molecules is still at the laboratory step, even if some firms like Novartis (Switzerland) or Bristol-Myer Squibb (USA) have shown their interest for using the aldolase abzyme, produced in the Lerner's group, for synthesis of Epothilone A, a new anti-cancer compound.

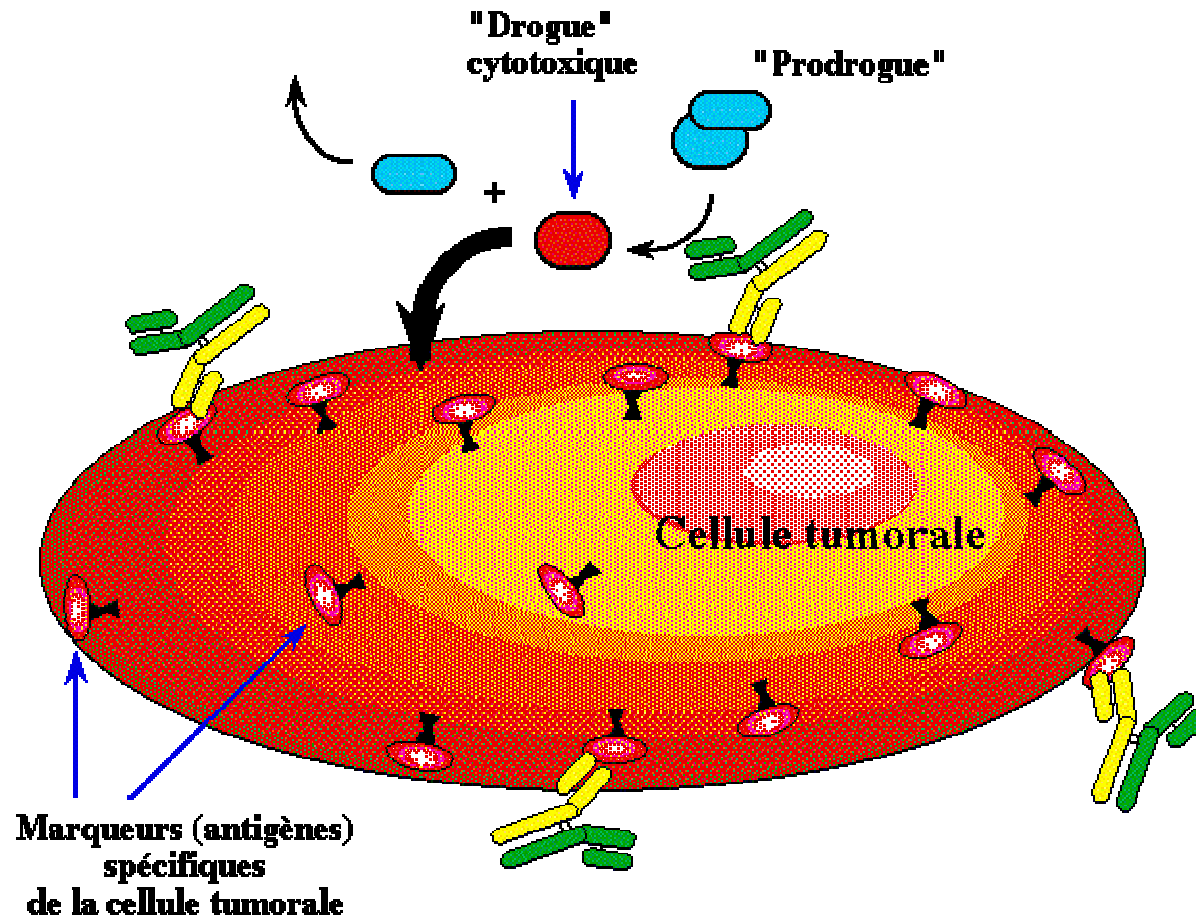


# Struktura abzymu pro destrukci nádorových buněk



**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.

**Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy (ADEPT) – enzymová aktivita abzymu aktivuje prekurzor léčivé látky 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)**

## **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.**

Another example of medical application concerns antibodies that specifically hydrolyze cocaine. A commercialization agreement between Columbia University and Ixsys Inc. could allow to use abzymes for treating cocaine overdose and addiction.

Cocaine abuse remains a major public health problem despite ongoing research aimed at developing therapies to counter its harmful effects. Immunopharmacotherapy is one proposed therapy which would block cocaine in the blood stream before it reaches the central nervous system. Cocaine-binding antibodies seem likely candidates for soaking up drugs in the blood stream, but their only binding abilities are not sufficient to withstand high concentrations of the drug. What is needed is a monoclonal antibody with high binding characteristics and sufficient catalytic ability to metabolize cocaine. The Wilson and Janda groups at The Scripps Research Institute are hopeful that they have found these properties in 7A1, a catalytic monoclonal antibody that has the ability to regenerate after each new dose of the drug. Aided by x-ray crystallography, their research has revealed for the first time the complete reaction cycle of a 7A1 Fab' antigen binding fragment. The high resolution crystal structures revealed the conformational changes that occur during the antibody's complete catalytic cycle and provided a molecular basis for catalysis. Understanding these significant structural changes of the antibody is a promising step towards the development of a treatment for cocaine addiction.

To create a vaccine, the body has to be convinced to generate antibodies against cocaine when it circulates through the bloodstream. Because cocaine is a small molecule, humans do not naturally generate these antibodies. Researchers have had success in generating an antibody response by conjugating a minor metabolite of cocaine (nor-cocaine) to a non-toxic subunit of cholera toxin (subunit B) - which is the protein secreted from the cholera bacteria. Once in the body, this compound is able to generate a very powerful immune response that causes the body to create antibodies quickly and in high levels.

Vaccination therefore results in the production of IgG antibodies against cocaine that can rapidly neutralize cocaine as it enters the bloodstream.

## **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)**

# Genetická imunizace - DNA vakcíny

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

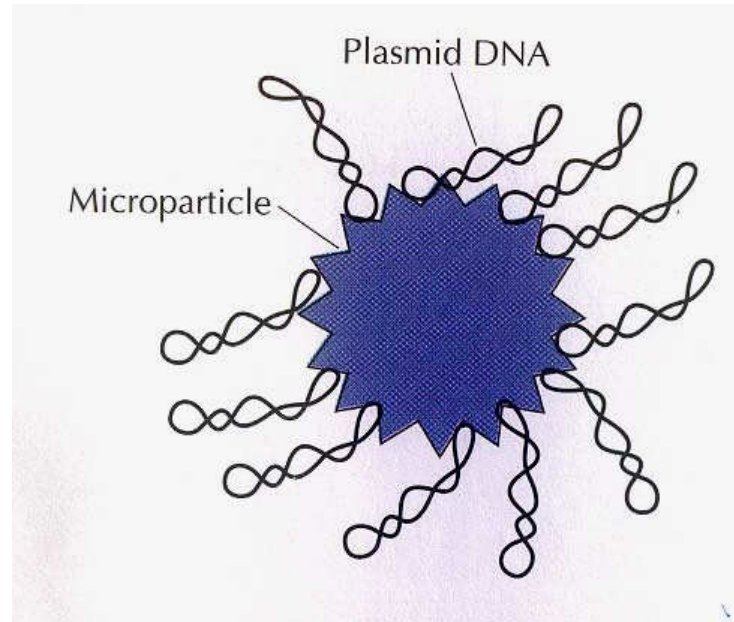
## Nevýhoda:

- 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  $\mu\text{m}$ ), 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).



## **Aptamery**

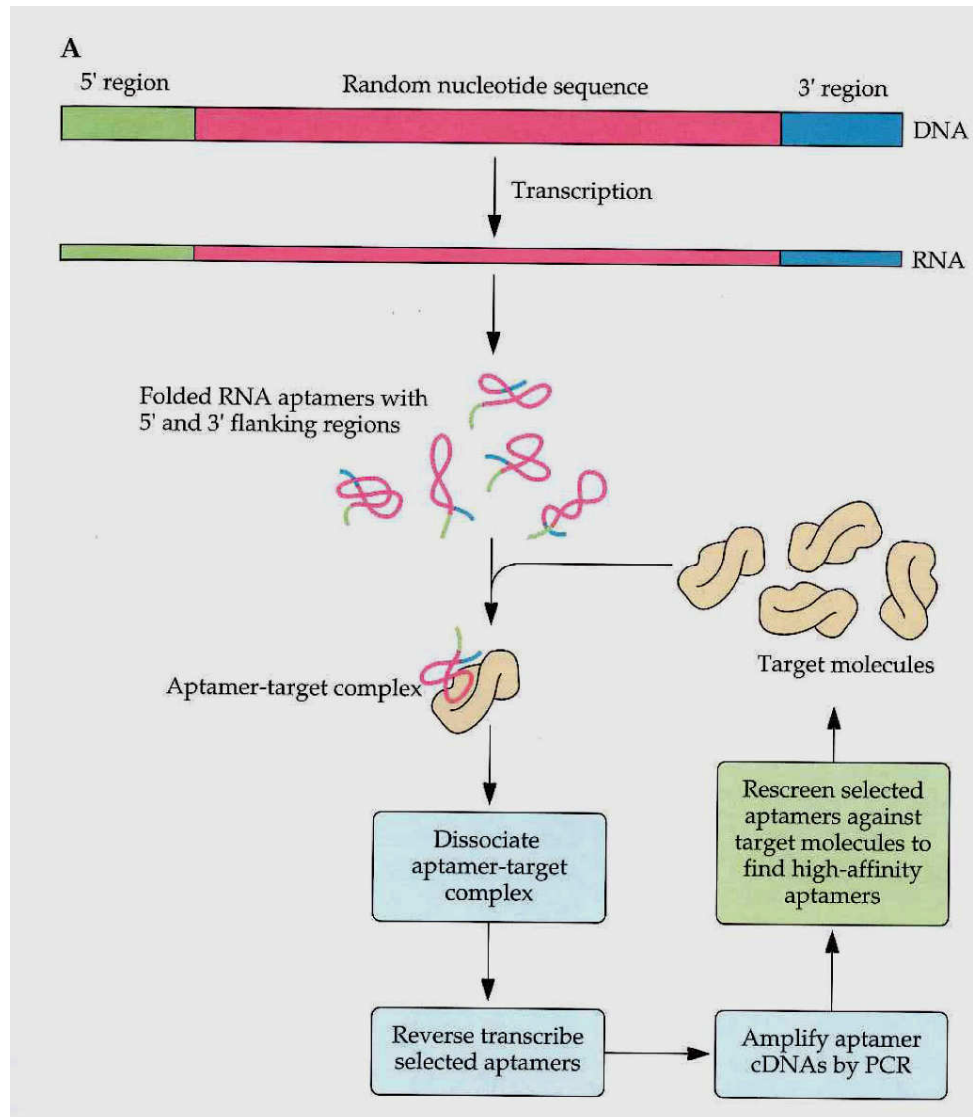
**= sekvence nukleových kyselin (RNA nebo DNA) o délce 10-50 nts, které se silně vážou k některým oblastem proteinů, aminokyselinám, léčivům a jiným molekulám. Vyznačují se vysoce organizovanou sekundární nebo terciární strukturou.**

**Vážou se na cílové molekuly, čímž je inhibují, a nebo mohou doručovat různé inhibitory k cílovým buňkám.**

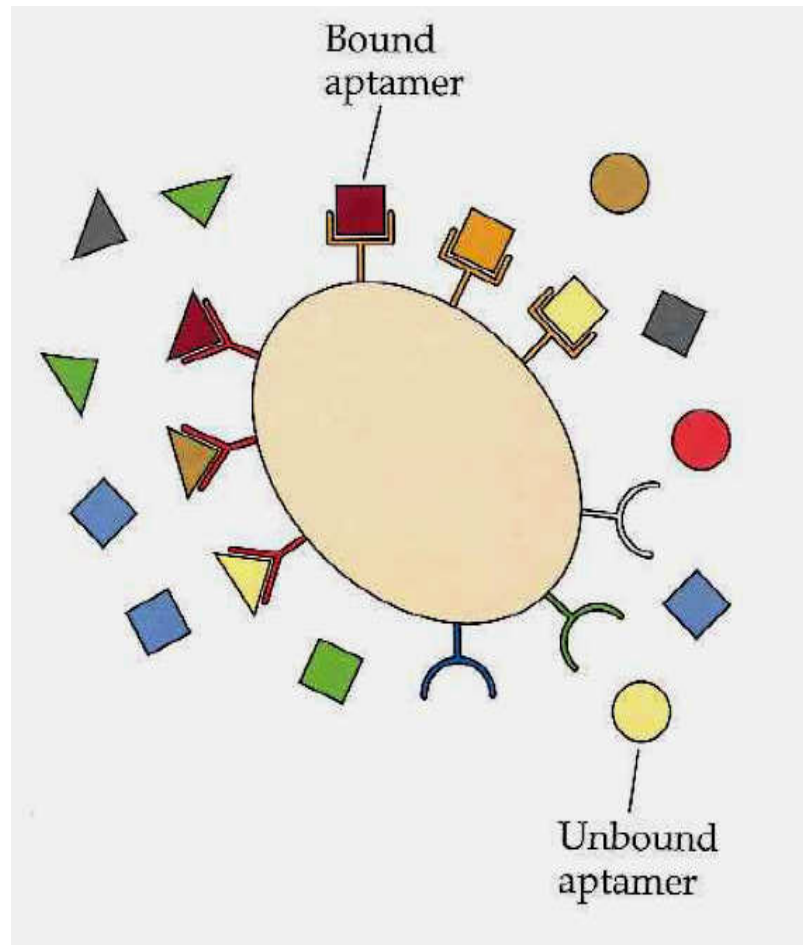
**Dosahují stejné specifity vazby k cílovým molekulám jako terapeutické protilátky, ale na rozdíl od nich nejsou imunogenní a snadněji se připravují.**

# Metoda SELEX

(systematic evolution of ligands by experimental enrichment)



## Vazba některých aptamerů na povrch cílové molekuly (ostatní se nevážou)



## Příklady proteinů, vůči nimž byly aptamery připraveny a síla jejich vazby

Protein	$K_d$ (nM)	Protein	$K_d$ (nM)
Keratinocyte growth factor	0.0003	HIV gp120	5.0
HIV-1 reverse transcriptase	0.02	Tenascin C	5.0
Transforming growth factor $\beta$ 1	0.03	Bovine prion protein	6.8
P-selectin	0.04	Integrin	8.0
VEGF receptor	0.05	Hepatitis C virus NS3 protease	10.0
Platelet-derived growth factor	0.09	HIV-1 integrase	10.0
Immunoglobulin E	0.1	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	10.0
Mucin 1	0.135	NS3 protease	10.0
Extracellular signal-regulated kinase	0.2	Factor VIIa	11.0
Fibroblast growth factor 2, basic	0.35	E2F transcription factor	15.0
CD4 antigen	0.5	<i>Yersinia pestis</i> tyrosine phosphatase	18.0
HIV-1 RNase H	0.5	Protein tyrosine phosphatase	18.0
Factor IXa	0.58	Anti-insulin receptor antibody MA20	30.0
Angiogenin	0.7	Epidermal growth factor receptor variant III	33.0
Complement factor 5	1.0	Ghrelin	35.0
Transforming growth factor $\beta$ 2	1.0	Receptor tyrosine kinase RETC634Y	35.0
Nuclear factor $\kappa$ B	1.0	Substance P	40.0
Neurotensin 1	1.5	Respiratory syncytial virus	40.0
Secretory phospholipase A2	2.0	HER3	45.0
Thrombin	2.0	Gonadotropin-releasing hormone 1	50.0
Acetylcholine receptor	2.0	Acetylcholine-specific auto-antibodies	60.0
$\alpha$ v $\beta$ 3 integrin	2.0	Nociceptin	110.0
Prostate-specific membrane antigen	2.1	Activated protein C	110.0
Angiopoietin 2	2.2	Cytohesion 2	115.0
$\gamma$ -interferon	2.7	<i>Trypanosoma cruzi</i> cell adhesion receptor	172
L-selectin	3.0	<i>Staphylococcus enterotoxin B</i>	420.0
Calcitonin gene-related peptide	3.0	Lymphocyte function-associated antigen 1	500.0
Amylin	3.0		
U1A	4.5		
Human neutrophil elastase	5.0		
Cytohesion 1	5.0		

# Proteinové inženýrství

Navrhování, vyvíjení a příprava proteinů s vylepšenými charakteristikami (pozměněné nebo zcela nové proteiny)

## A. Využití mutagenese *in vitro* pro záměnu klíčových aminokyselin (bodové mutace)

- zvýšení termostability proteinů (lysozym aj)
- rezistence proteinů k oxidativnímu stresu
- zvýšení bioaktivity proteinů

druhá generace farmak s vylepšenou farmakokinetikou, strukturou, stabilitou a biologickou dostupností

(inzulin – zvýšení schopnosti absorpce, tkáňový plazminogenný aktivátor – zvýšení poločasu oběhu)

**Příklad: Subtilizin – hydrolýza proteinů, např. v detergentech**

prakticky každá vlastnost této serinové proteázy byla pozměněna/optimalizována:

- rychlost katalýzy,
- substrátová specifita,
- tolerance k pH,
- tolerance k oxidačním látkám,
- termostabilita.
- zvýšená stabilita v org. rozpouštědlech (změna konformace proteinu)

## B. Makromodifikace proteinů

Část genu se eliminuje vyštěpením restričního fragmentu nebo nahradí chemickou syntézou části genu.

- Klenowův fragment DNA polymerázy, který postrádá 3'-5' exonukleázovou aktivitu.
- Přidání aminokyselin = stabilizace cizích proteinů v *E. coli*.
- Zvýšení afinity proteinů k iontům kovů vložením sekvence His-X3-His do alfa-helixu – zvýšení rezistence k denaturaci.
- Jeden gen je fúzován s druhým za vzniku kompletně nového proteinu. Varianty protilátek – jednořetězcové protilátky (SCA – single chain antibodies) jsou umělé protilátky složené z vazebných oblastí těžkého a lehkého řetězce, které jsou spojeny chemicky a vytvářeny v mikroorganismech pomocí expresních vektorů.
- Příprava purifikovaných imunogenních složek v prokaryotických nebo eukaryotických systémech (vakcína proti hepatitidě B ve kvasinkách, vakcína proti *Salmonella typhimurium* – oslabení kmene vnesením mutace do genomu)
- Nepatogenní mikroorganismy použité jako vektory pro expresi cizích genů zodpovědných za imunogenicitu (rekombinantní vakcíny, které stabilně exprimují cizí geny: u *Vibrio cholerae* byl připraven kmen s delecí v genu pro cholerový toxin – mutace byla vnesena rekombinací do standardního kmene. Výsledný kmen produkoval imunogenní, avšak netoxický „toxin“ (netoxickou B podjednotku toxinu).
- viry jako vektory pro expresi imunologicky aktivních proteinů (virus vakcinie – rekombinantní vakcíny proti vzteklině)

- Genetickou úpravou lze připravit bakterii, která by produkovala modré barvivo používané na džínovinu. Výroba barviva by byla mnohem ekologičtější nežli současná chemická syntéza, která ročně produkuje asi 16 000 tun tohoto barviva.
- Podle evropské legislativy budou muset být takové džíny na viditelném místě označeny nápisem: "Vyrobeno z geneticky modifikovaných organismů".

