



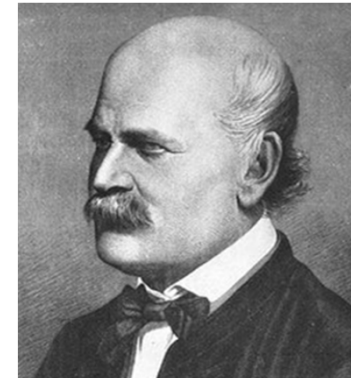
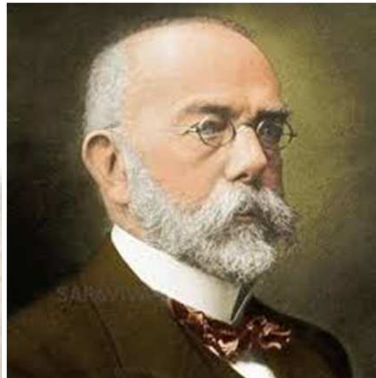
# Enzybiotika v léčbě stafylokokových infekcí

Lubomír Janda

# Infekční choroby před 200 lety

- Děti narozené před rokem 1850 mohly očekávat, že budou žít 35 let

## ➤ Vakcinace



- Děti narozené před rokem 1925 mohly očekávat, že budou žít 60 let

## ➤ Antibiotika

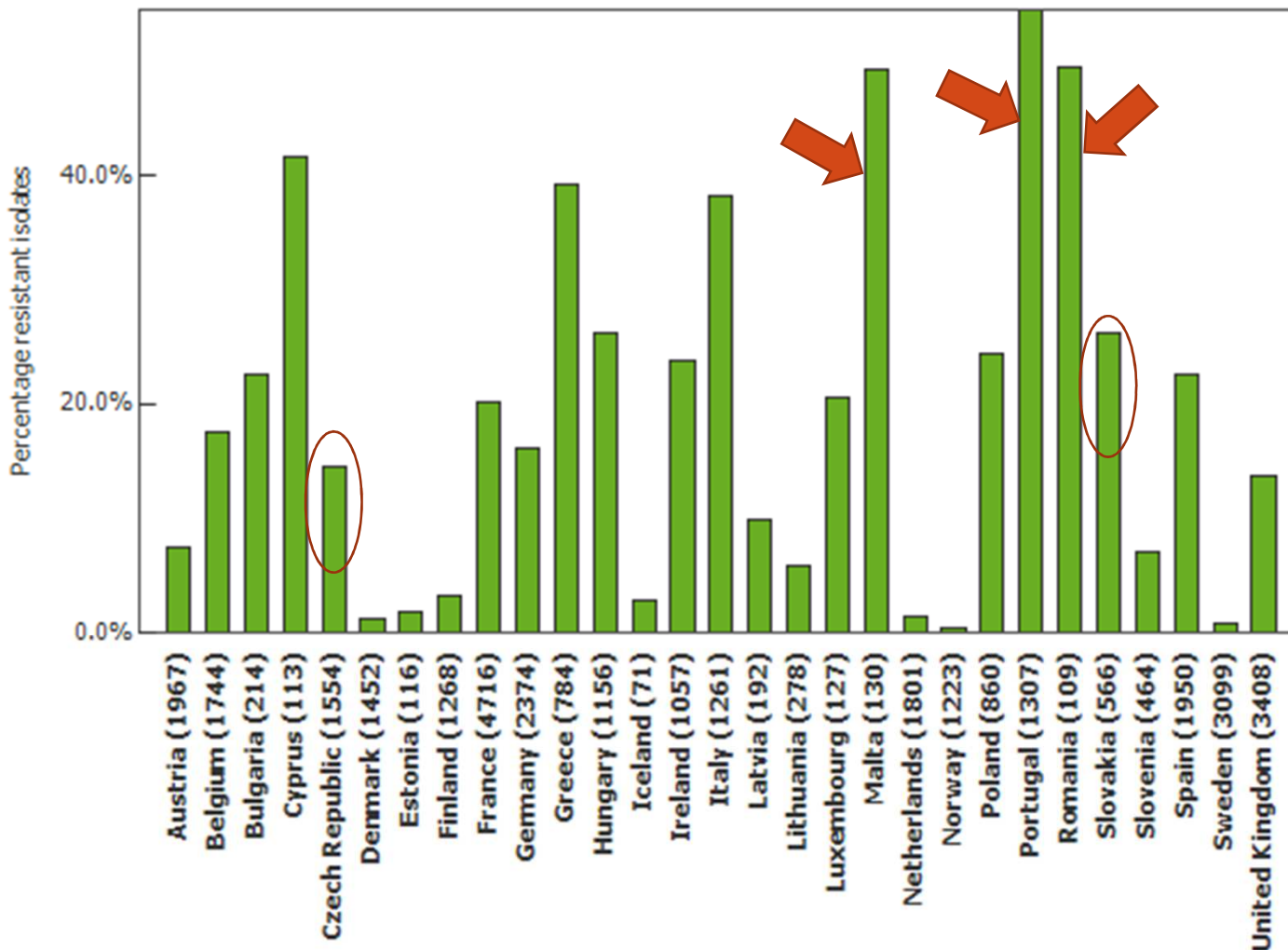


„Congratulations!  
He hasn't got MRSA

- Děti narozené před rokem 1980 mohly očekávat, že budou žít 80 let
- Děti narozené dnes: „Jak dlouho mohou očekávat že budou žít?“

# Rezistence na antibiotika

Podíl izolátů rezistentních na methicilin *Staphylococcus aureus* (MRSA) v zúčastněných zemích.

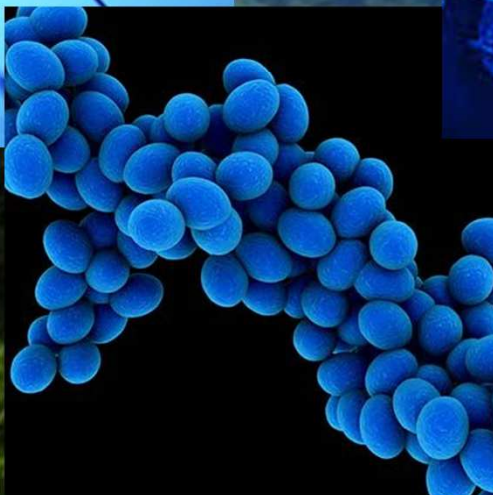
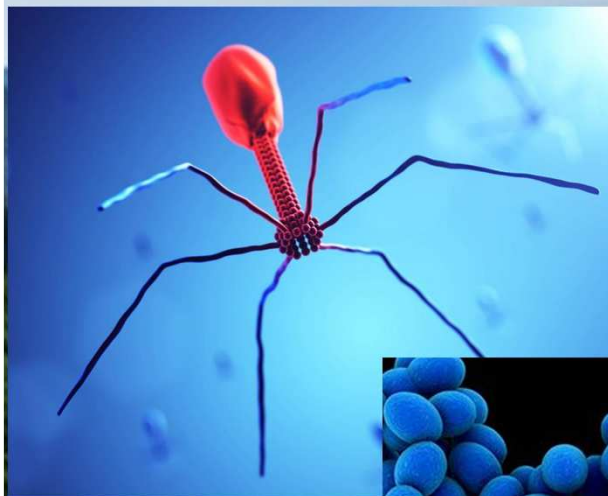




# Příroda je obrovským zdrojem inspirace

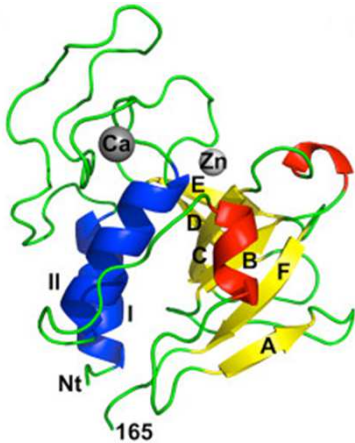
Kromě – antibiotik využívá příroda ke kompetici s bakteriemi enzymy a peptidy

- Na světě je 350 tisíc chemických látek ( $3,5 \times 10^5$ )
  - 4 kDa peptid s 37 amk ( $15,9 \times 10^9$ )
  - 20 kDa protein se 180 amk ( $1,8 \times 10^{26}$ )

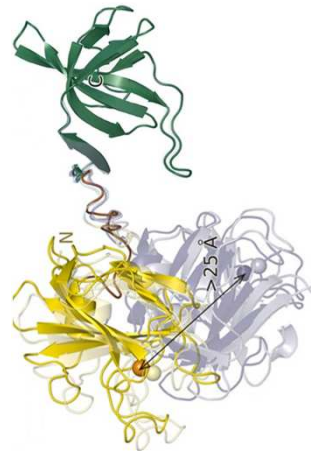


# Enzybiotika v léčbě stafylokokových infekcí

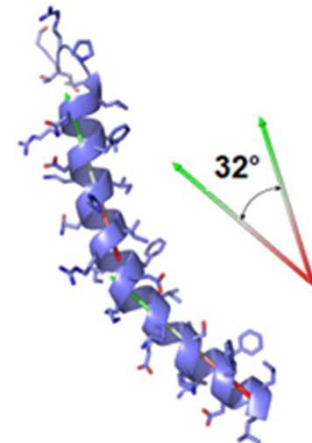
Endolysin



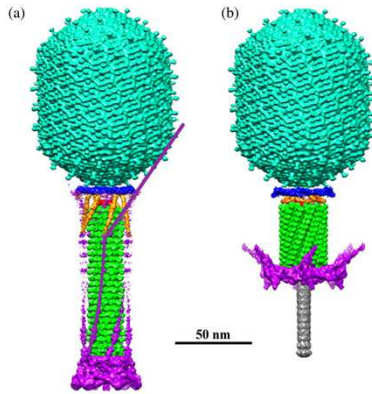
Lysostaphin



Lidský catelicidin LL-37



Bakteriofág  $\Phi$ 812



*S. simulans*



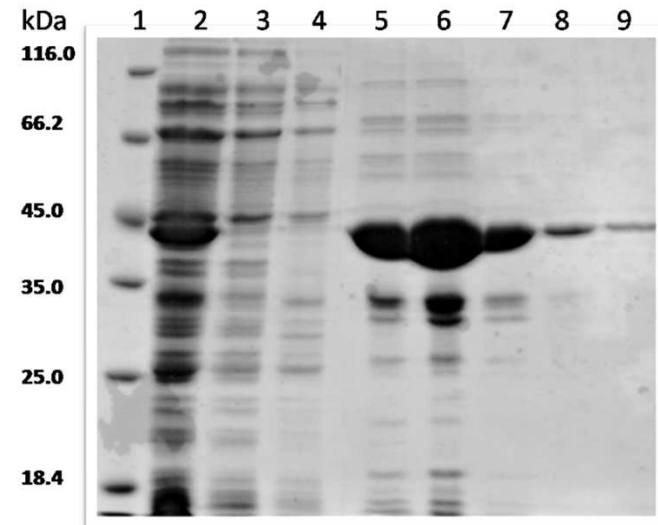
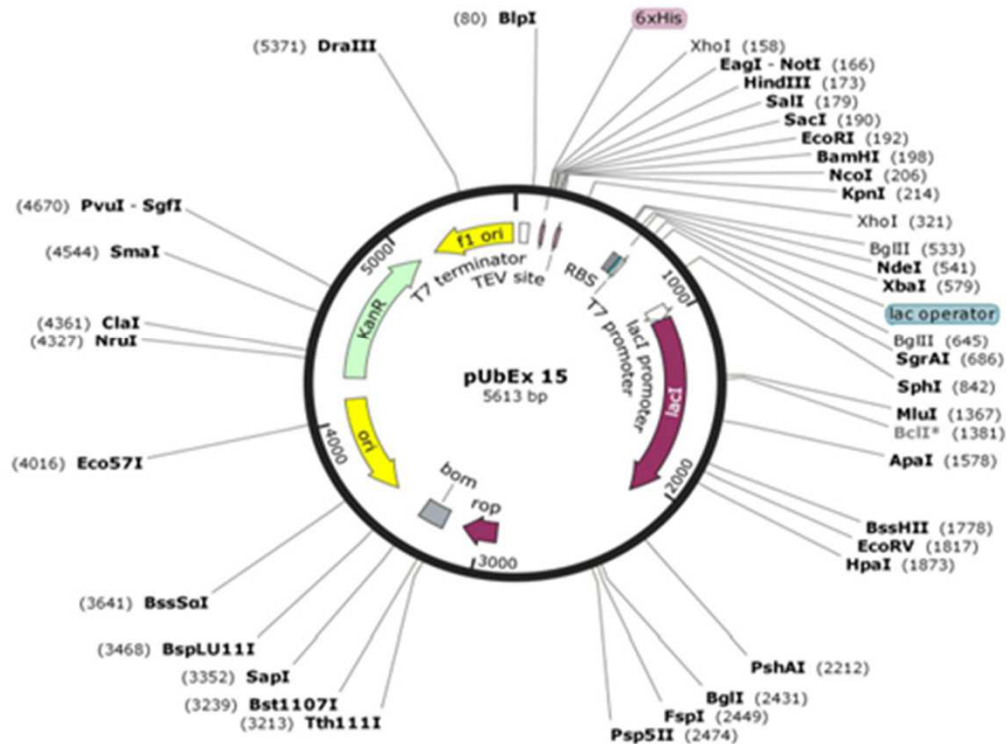
*H. sapiens*



# Rekombinantní technologie – heterologní exprese

## Vlastní expresní systém

- optimalizovaný pro hostitelský kmen (počet kopií na buňku)
- bez licenčních poplatků (vlastní replikační počátek)



Výtěžek:

Endolysin F1: 150-170 mg/L

Lysostaphin: 110-130 mg/L

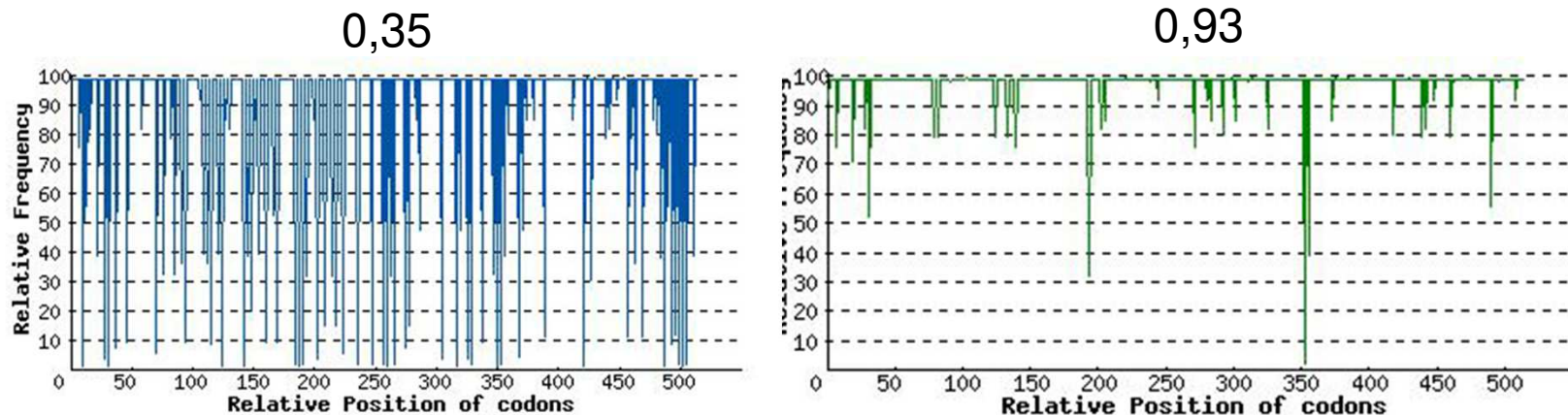


# Rekombinantní technologie – heterologní exprese

Optimalizace genů

- frekvence kodonů (optimalizováno pro *E. coli*)

Gen pro lidský catelicidin LL-37 před a po úpravě frekvence kodonů



Distribuce frekvence využití kodonu po délce genové sekvence. CAI 1,0 je považován za dokonalý v požadovaném expresním organismu a  $CAI > 0,8$  je považován za dobrý z hlediska vysoké úrovně genové exprese.

# Rekombinantní technologie – heterologní exprese

## Optimalizace genů

- frekvence kodonů (optimalizováno pro *E. coli*)
- funkčních domén (snížení počtu domén, nahrazení novými)

## Lidský catelicidin LL-37 před a po úpravě frekvence kodonů

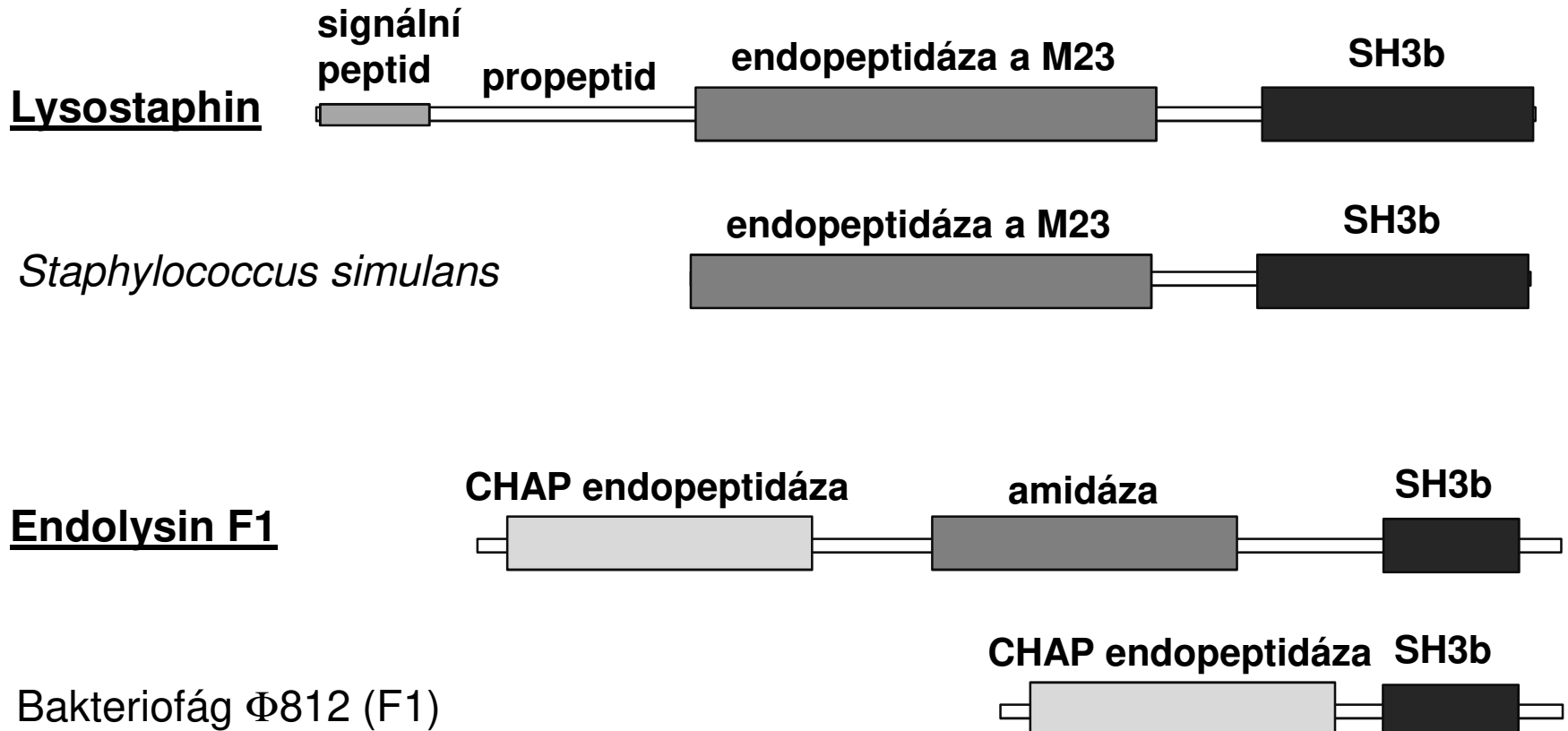
Optimized	6	GAAACCCAA <b>CGTAACGGT</b> CATAGCCTGGG <b>CCGCTGGAGC</b> CTGGTG <b>CTGCTGCTGCTGGT</b>
Original	6	GAGACCCAAAGGAATGGCCACTCCCTGGGGCGGTGGTCACTGGTGCTCCTGCTGCTGGG
Optimized	66	CTGGTGATG <b>CCGCTG</b> CGGATTATT <b>GCGCAGGTTCTG</b> AGCTACA <b>AAAGAGGCGGTGCTG</b> CGT
Original	66	CTGGTGATGCCTCTGGCCATCATTGCCAGGTCCCTCAGCTACAAGGAAGCTGTCCCTCGT
Optimized	126	CGGATTGACGGTATT <b>AACCAACGTAGCAGCGACGCGAACCTGTACCGTCTGCTG</b> SACCTG
Original	126	GCTATAGATGGCATCAACCAGCGGTCCCTCGGATGCTAACCTCTACCGCCTCCTGSAACCTG
Optimized	186	GAC <b>CCGCGTCCG</b> ACGATG <b>GACGGCGATCCG</b> GAC <b>ACCCCGAAACCGGTGAGCTTACCGTT</b>
Original	186	GACCCAGGCCACGATGGATGGGGACCCAGACACGCCAAAGCCTGTGAGCTTACAGTG
Optimized	246	AAG <b>GAAACCGTGTGC</b> CGCGTACCACCCAG <b>CAAAGCCCGGAAGATTGCGACTTTAAGAAA</b>
Original	246	AAGGAGACAGTGTGCCCCAGGACGACACAGCAGTACCAGAGGATTGTGACTTCAAGAAG
Optimized	306	GATGGTCTGGTT <b>AAACGTTGCATG</b> GGCACCGTGACCC <b>CTGAACCAGGCGCGTGGATCCTTC</b>
Original	306	GACGGGCTGGTGAAGCGGTGTATGGGGACAGTGACCCCTCAACCAGGCCAGGGGATCCTTT
Optimized	366	GACATCAGCTGCGAT <b>AAAGACAACAACCGT</b> GGTACCGACCCGCTGCTGGGT <b>GACTTCTTT</b>
Original	366	GACATCAGTTGTGATAAGGATAACAAGAGAGGTACCGACCCGCTGCTGGGTGATTTCTTC
Optimized	426	CGT <b>AAAGAGCA</b> AGAGAAGATTGGCA <b>AAGGAATTC</b> AAGCGTATT <b>GTT</b> CAGCGTAT <b>CAAAGAC</b>
Original	426	CGGAAATCTAAAGAGAAGATTGGCAAAGAATTCAAAAGAATTTGTCCAGAGAATCAAGGAT
Optimized	486	<b>TTCTGCGTAATCTGGTTCCGCGTACCGAAAGC</b>
Original	486	TTTTTGCGGAATCTGTACCCAGGACAGAGTCC



# Rekombinantní technologie – heterologní exprese

Optimalizace genů

- frekvence kodonů (optimalizováno pro *E. coli*)
- funkčních domén (snížení počtu domén, nahrazení novými)

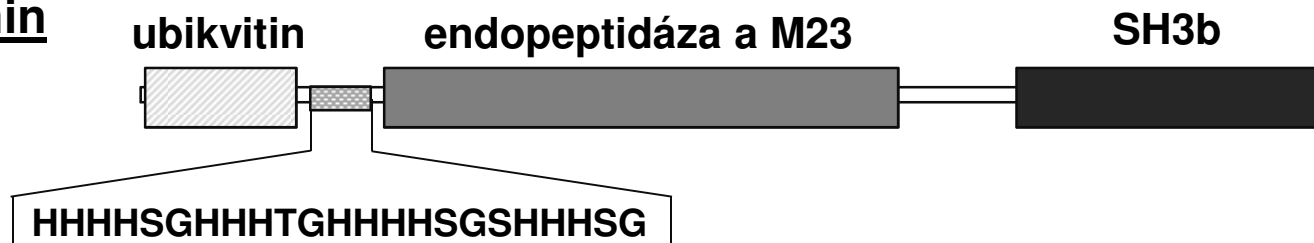


# Rekombinantní technologie – heterologní exprese

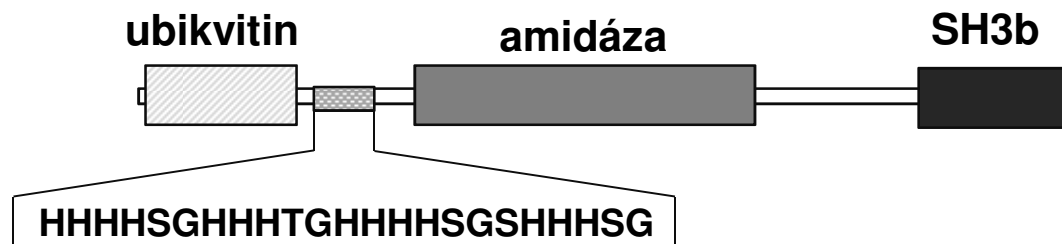
Návrh fúzních tagů

- zvýšení exprese (ubikvitin odstiňující hydrofobní epitopy)
- zlepšení čištění proteinů (His6 nahrazen His14)

## Lysostaphin



## Endolysin F1

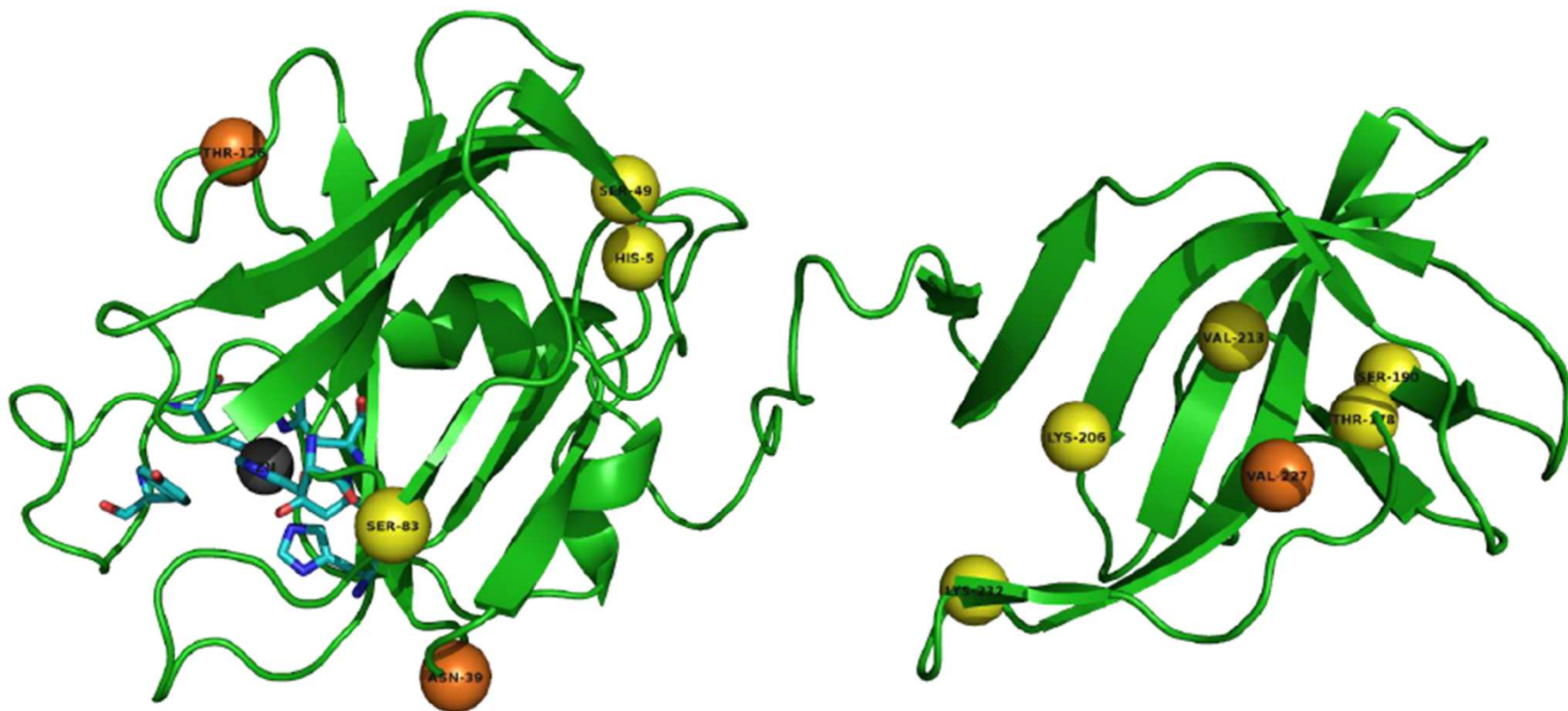


# Biobetter – zlepšené vlastnosti proteinu



Enantis

Teplotní stabilita - vliv i na trvanlivost enzymů



**Identifikované potenciálně stabilizující mutace znázorněny ve struktuře lysostaphinu.**

Žlutě jsou vyznačeny mutace znázorněny ve struktuře lysostaphinu. Žlutě jsou vyznačeny mutace vybrané na základě energetického přístupu, oranžové mutace vybrané na základě evolučního přístupu. tyrkysově je vyznačeno aktivní místo enzymu a šedě je znázorněn zinečnatý iont.

# Biobetter – zlepšené vlastnosti proteinu

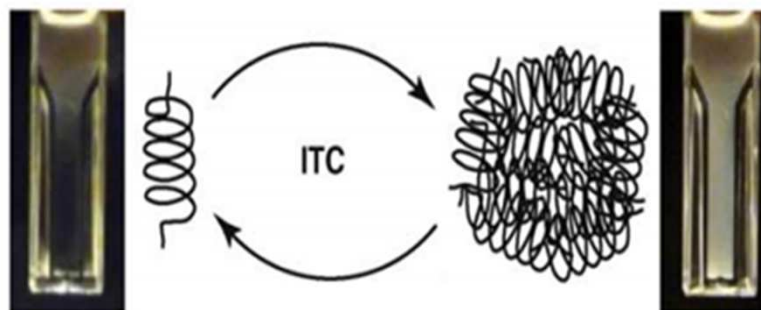
Změna stavu/rozpuštnosti – vliv na skladování

ELP-elastinový protein

endopeptidáza a M23

SH3b

elastin (100 x V-P-G-V-G)



$T_t$  - teplota pod bodem  
přechodu fází

$T_t$  - teplota nad bodem  
přechodu fází

Protein fúzovaný s ELP při teplotě nižší než  $T_t$

monomerní a rozpustný

Protein fúzovaný s ELP při teplotě vyšší než  $T_t$

začne agregovat -nerozpustný



# Biobetter – zlepšené vlastnosti proteinu

Změna stavu/rozpustnosti – vliv na skladování

ELP-elastinový protein

endopeptidáza a M23

SH3b

elastin (100 x V-P-G-V-G)



Fúzovaný protein:

- reverzibilní fázový přechod závislý na teplotě, koncentraci solí
- vysoce biokompatibilní
- stabilnější
- zatím pouze v rostlinném vektoru



Protein fúzovaný s ELP při teplotě nižší než  $T_t$

monomerní a rozpustný

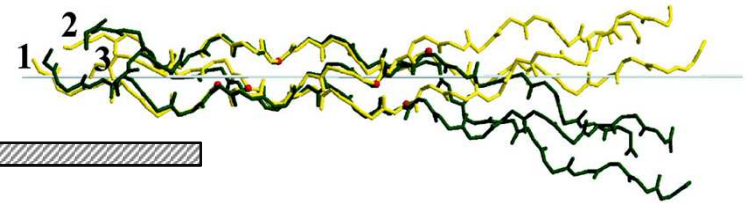
Protein fúzovaný s ELP při teplotě vyšší než  $T_t$

začne agregovat -nerozpustný

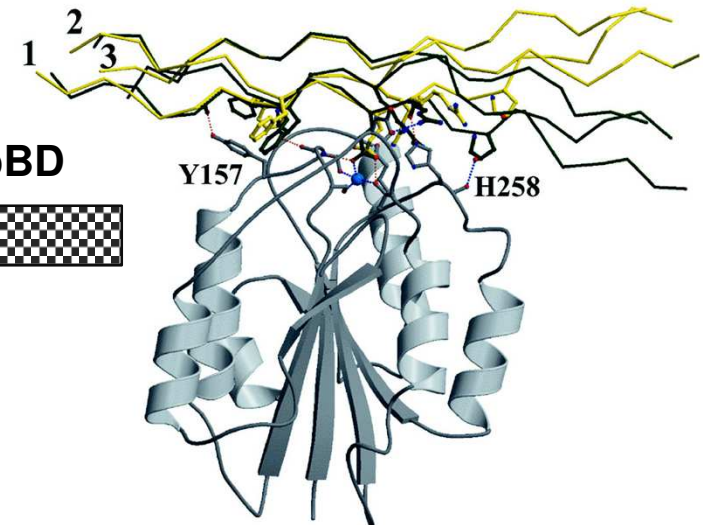
# Biobetter – zlepšené vlastnosti proteinu

Zabudování do kolagenového krytu - vliv na trvanlivost enzymů

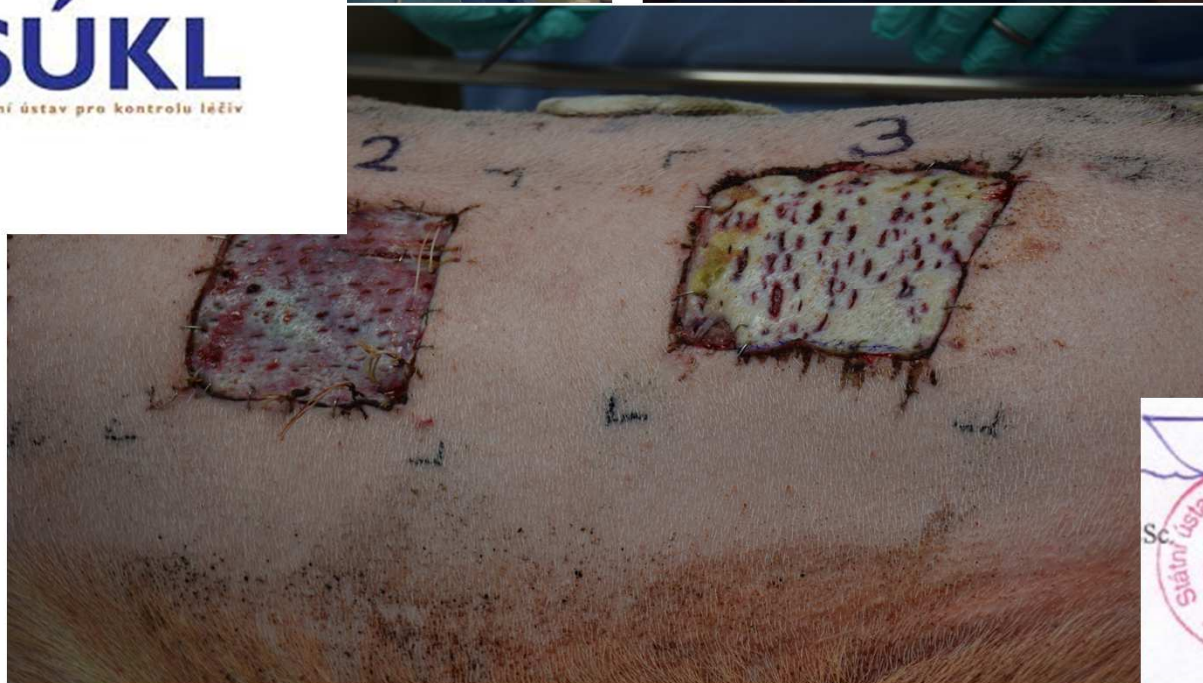
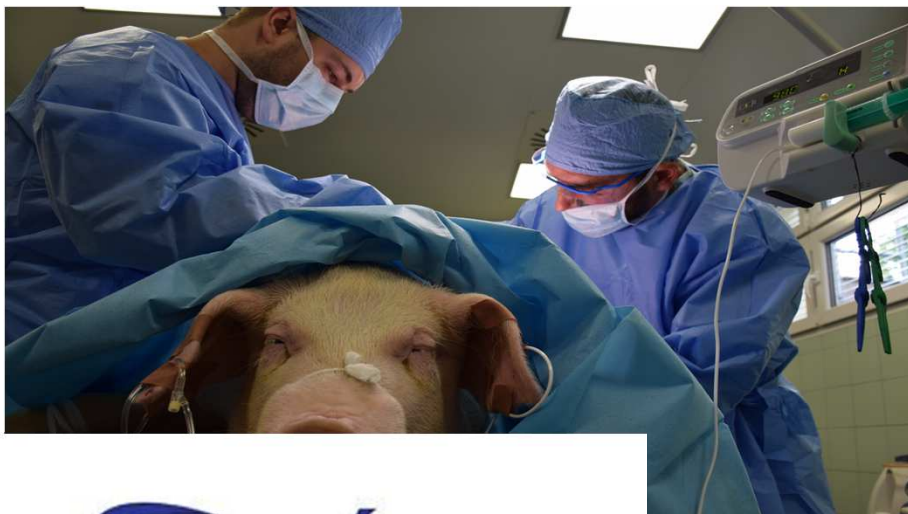
## Lysostaphin – Kolagenový peptid (21 amk)



## Lysostaphin – Kolagen vázající doména



# Riziko schválení





# Extracelulární enzymové extrakty

## BiomCare s.r.o. Dobříš

- Česká firma postavená na mezinárodních vědeckých objevech
- Patentovaný kombinovaný přípravek na problematickou kůži
- Obsahuje kombinaci čistících enzymů a zklidňujících prebiotik
- Obnovuje a posiluje přirozenou mikrobiologickou ochranu kůže



Prakticky vyzkoušeno:

**DermaFerm**  
KOMPLET

UNIKÁTNÍ SADA MIKRO-EMULZÍ POSKYTLJE PŘIROZENÉ HYDRATAČNÍ LÁTKY OBOHACENÉ O ČISTÍCÍ ENZYMOVÝ KOMPLEX A ZKLIDŇUJÍCÍ PREBIOTIKA

 PV 2019-75

Vhodné u pokožky náchylné ke svědění, zarudnutí, pigmentaci, zvýšené suchosti, pálení, tvorbě puchýřků a dalším projevům narušení přirozené kožní mikroflóry, zejména při:

- ▶ plísňové nebo kvasinkové infekci
- ▶ popálení, odření nebo zapaření
- ▶ akné, lupénce a atopické dermatitidě

Prakticky vyzkoušeno:

- Lupénka
- Akné
- Atopické dermatitidy
- Svědění kůže
- Úporná plísňová onemocnění kůže
- Úporná plísňová onemocnění nehtů
- Porušená kůže diabetiků

**DermaFerm**  
AKUT

UNIKÁTNÍ MIKRO-EMULZE POSKYTLJE PŘIROZENÉ HYDRATAČNÍ LÁTKY OBOHACENÉ O ČISTÍCÍ ENZYMOVÝ KOMPLEX

 PV 2019-75

Vhodné u pokožky náchylné ke svědění, zarudnutí, pigmentaci, zvýšené suchosti, pálení, tvorbě puchýřků a dalším projevům narušení přirozené kožní mikroflóry, zejména při:

- ▶ plísňové nebo kvasinkové infekci
- ▶ popálení, odření nebo zapaření
- ▶ akné, lupénce a atopické dermatitidě

- Popáleniny
- Popraskaná kůže
- Drobná poranění
- Opruzeniny
- Namáhaná kůže sportovců
- Napomáhá při hojení všech drobnějších poranění

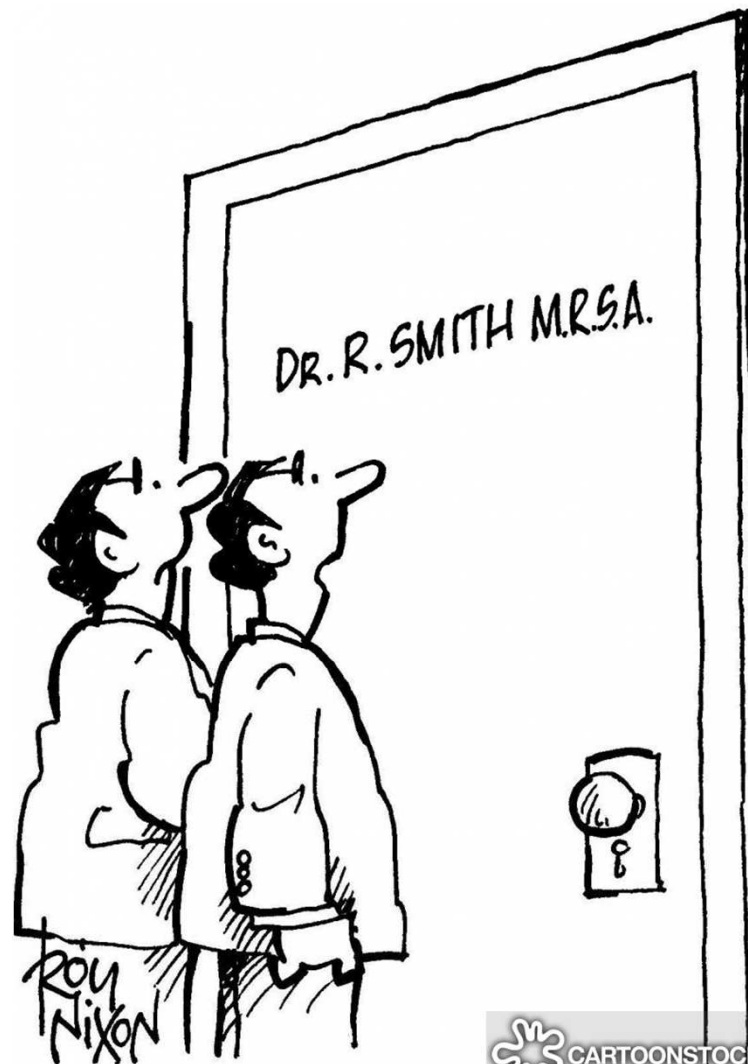
Vyvinuto ve spolupráci s akademickým partnerem

**VUVeL**  VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v. v. i.

Více informací a objednávky: [kosmbiom@post.cz](mailto:kosmbiom@post.cz) V ČR chráněno užitným vzorem CZ 32750 U1



**Děkuji  
Vám za  
pozornost**



 CARTOONSTOCK

Search ID: rmin444

"ARE YOU SURE THAT'S A MEDICAL  
DEGREE?"