



Udvikling af moderne slangemodgift

Andreas Hougaard Laustsen er blot 29 år og har allerede været med til at starte flere virksomheder. I øjeblikket arbejder han med at udvikle moderne slangemodgift. En kompliceret og udfordrende opgave - det er ikke uden grund, at man i dag stadig fremstiller modgifte baseret på en teknik fra 1895.

Af Katrine Meyn, km@techmedia.dk

Da Andreas Hougaard Laustsen påbegyndte arbejdet med at udvikle en modgift mod den sorte mambas gift i Brian Lohses laboratorium, kendte man på verdensplan kun til otte beskrevne toksiner i giften (der er over halvtreds i alt). Det var heller ikke engang beskrevet, hvor meget af de enkelte komponenter, der var til stede. Så det var umuligt at vide, om de var vitale for giftvirkningen.

- Vores første opgave var derfor at afdække, hvilke toksiner der skulle neutraliseres i en modgift, fortæller Anders Hougaard Laustsen og fortsætter:

- Det udgjorde første halvdel af min ph.d. Vi har beskrevet, hvad giften består af, og hvor meget der er af hver komponent (toksin). Og så har vi testet alle toksinerne for at se, hvor toksiske de er.

Til det udviklede Anders Hougaard Laustsen en simpel matematisk formel, der rangerer alle toksinerne efter, hvor

medicinsk relevante de er. Hvis der er meget af et toksin, og det er meget potent, så får det en høj score og omvendt. Vha. den metode kan man ret hurtigt evaluere en slangegift.

Alle giftanalyserne foregik sammen med professorerne José María Gutiérrez og Bruno Lomonte på Instituto Clodomiro Picado, University of Costa Rica, hvor de er eksperter i at analysere gifte. De er også gode til at lave modgift på den traditionelle metode vha. serum fra immuniserede heste.

Det lykkedes at afdække, hvilke toksiner (ca. seks-otte forskellige) der er essentielle at neutralisere i den sorte mambas gift. Nogle af toksinerne minder så meget om hinanden, at Andreas Hougaard Laustsen mener, at man med ét antistof formentligt vil kunne neutralisere to-tre toksiner samtidigt.

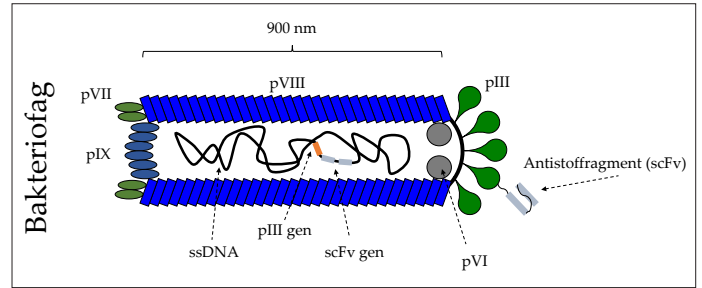
- Jeg tror, at man muligvis med 10-30 antistoffer vil kunne dække de farligste slangegiftoksiner i Afrika, fortæller han.

Hvor skal antistofferne findes?

Nu var målet at komme til Cambridge i England, hvor tidligere universitetsforsker John McCafferty har startet antistoffirmaet IONTAS. Han har opfundet Antibody Phage Display-teknologien, som har resulteret i mange succesrige lægemidler, heri-



Lige fra sin tidligste barndom har Anders Hougaard Laustsen været meget ude i naturen. Han har vandret meget og været med på en række spændende ferier i tropiske egne. Og altid var den der - den store forkærlighed for naturens dyr - især de farlige. At det senere var slangerne, han fokuserede på, skyldes bl.a. den oplevelse, han havde i Tanzania. Her så han to børn, der hhv. havde mistet en arm og et ben, fordi de var blevet bidt af slanger og ikke behandlet med slangemodgift. Det gjorde et meget stærkt indtryk på ham. Foto: Michael Barrett Boesen.



Figur 1.

blandt Humira, der er verdens mest sælgende lægemiddel. Ideen var vha. den metode at finde brugbare menneskelige antistoffer til modgiftene.

- Jeg var heldig at komme gennem nåleøjet og få gjort ham interesseret i projektet. Det betød, at jeg fik mulighed for at arbejde i hans laboratorie, hvor de har et af verdens bedste phage display antistof-biblioteker. Det indeholder mere end 10 mia. forskellige antistoffer, som man kan screene igennem på en uge. Alene fordi der er så mange, og det er så diverst, er sandsynligheden for, at man finder et antistof, der binder til et toksin næsten 100%. Dette lykkedes dog ikke under selve Andreas' ph.d.-ophold, men samarbejdet mellem Andreas og John (og Aneesh Karatt-Vellatt fra Johns firma) fortsatte efter ph.d.'en, hvor det lykkedes dem at finde interessante antistoffer vha. denne metode.

Phage display-teknologien

Anders Hougaard Laustsen medbragte toksiner i ren form fra kobraer og mambaer. Og så var det ellers bare at gå i gang. Phage display-teknologien er en laboratorieteknik til bl.a. at finde antistoffer, der kan binde til proteiner. Teknikken er særlig velegnet i modgiftsforskningen, da det er en forudsætning for toksin-neutraliserende antistoffer, at det kan binde stærkt til et toksin.

I phage display benytter man sig af bakteriofager, som indeholder genet for et antistoffragment, samtidig med at de fremviser (display'er) antistoffragmentet på ydersiden af deres kappe, se figur 1. På denne måde haves et link mellem genotype (antistoffgenet) og fænotype (antistoffragmentet), hvilket gør det muligt at udvælge antistoffragmentet baseret på fænotype og at DNA-sekventere det baseret på genotype. Ved at indsætte generne for millioner til milliarder af antistoffragmenter kan man således lave et antistofbibliotek, der kan bruges til screening for antistoffer mod alle mulige forskellige proteiner (inkl. slange-toksiner) vha. phage display-teknologien.

Pipetteservice

Akkrediteret kalibrering
Reparation • Vedligeholdelse

Gilson Center of Excellence • Certificerede teknikere • 20 års erfaring
• Alle førende fabrikater • Elektroniske certifikater • Serviceaftaler

**BIO
LAB**

Biolab A/S,
Sindalsvej 29, DK-8240 Risskov,
Tlf: 8621 2866 Fax: 8621 2301
E-mail: pipetteservice@biolab.dk
www.biolab.dk

DANAK
Cal. Reg. Nr. 482

Mange projekter

Inden Anders Hougaard Laustsen fandt ud af, at han ville arbejde med at udvikle slangemodgifte, satte han mange andre skibe i søen. Han var i Paris som udvekslingsstuderende, han var med til at starte biotekselskabet Biosyntia, der beskæftiger sig med fermentering af fødevaringredienser og er anerkendt som et af Europas mest innovative biotekstartups. Han var med til at starte en organisation for unge biotek-entreprenører, REBBLS, og i den forbindelse var han også med til at arrangere REBBLS Venture Cup Challenge. Her skulle deltagerne komme med en biotek-ideé, skrive en business-plan og prøve at afgøre, om der rent forretningsmæssigt var hold i den. En af Andreas' ideer var udvikling af slangemodgift baseret på humane antistoffer. Sammen med kollegaerne Mikael, Jens og Alexandra startede han også firmaet VenomAb.

I Andreas' forsøg fraktioneres giften i forskellige elementer (toksiner) vha. kromatografi. Disse toksiner bruges som "targets" i phage display, se figur 2.

1. Toksinet sættes fast i bunden af en brønd, antistofbiblioteket, bestående af bakteriofager, der både indeholder DNA for et givent antistoffragment, samtidig med at de fremviser fragmentet, bliver hældt udover.
2. Når bakteriofagerne hældes ud over toksinet, vil nogle binde til toksinet, mens andre ikke gør.
3. De bakteriofager, der ikke er bundet til noget toksin, vaskes væk. Nu er der kun dem, der binder, tilbage.
4. Bakteriofagerne, som binder til toksinet, elueres ved at bryde bindingen mellem bakteriofagen og toksinet.

5. Da der er tale om bakteriofager kan disse inficere *E. coli*, hvorved *E. coli*-cellerne begynder at producere flere bakteriofager (bakteriofagerne amplificeres). Hvis man ønsker, kan man køre en runde til og dermed finde frem til de bakteriofager, som indeholder de allerbedste antistoffragmenter, der binder stærkest til toksinet.
6. Ellers kan man analysere de forskellige bakteriofager, som er blevet selekteret i ens phage display-eksperiment.

I phage display-eksperimentet får antistoffragmenterne lov til at konkurrere med hinanden. De, der binder bedst, udvælges. Oprindeligt er der måske 10-20 mia. Efter runde et ryger man potentielt ned på 10-100 mio., hvilket stadig er lidt for mange at analysere i detaljer. I runde 2 kommer man videre ned på nogen hundrede tusinder. Og kører man en tredje runde, kommer man ned på nogen tusinde. Det tager tre dage at lave en runde og fem dage at lave tre runder.

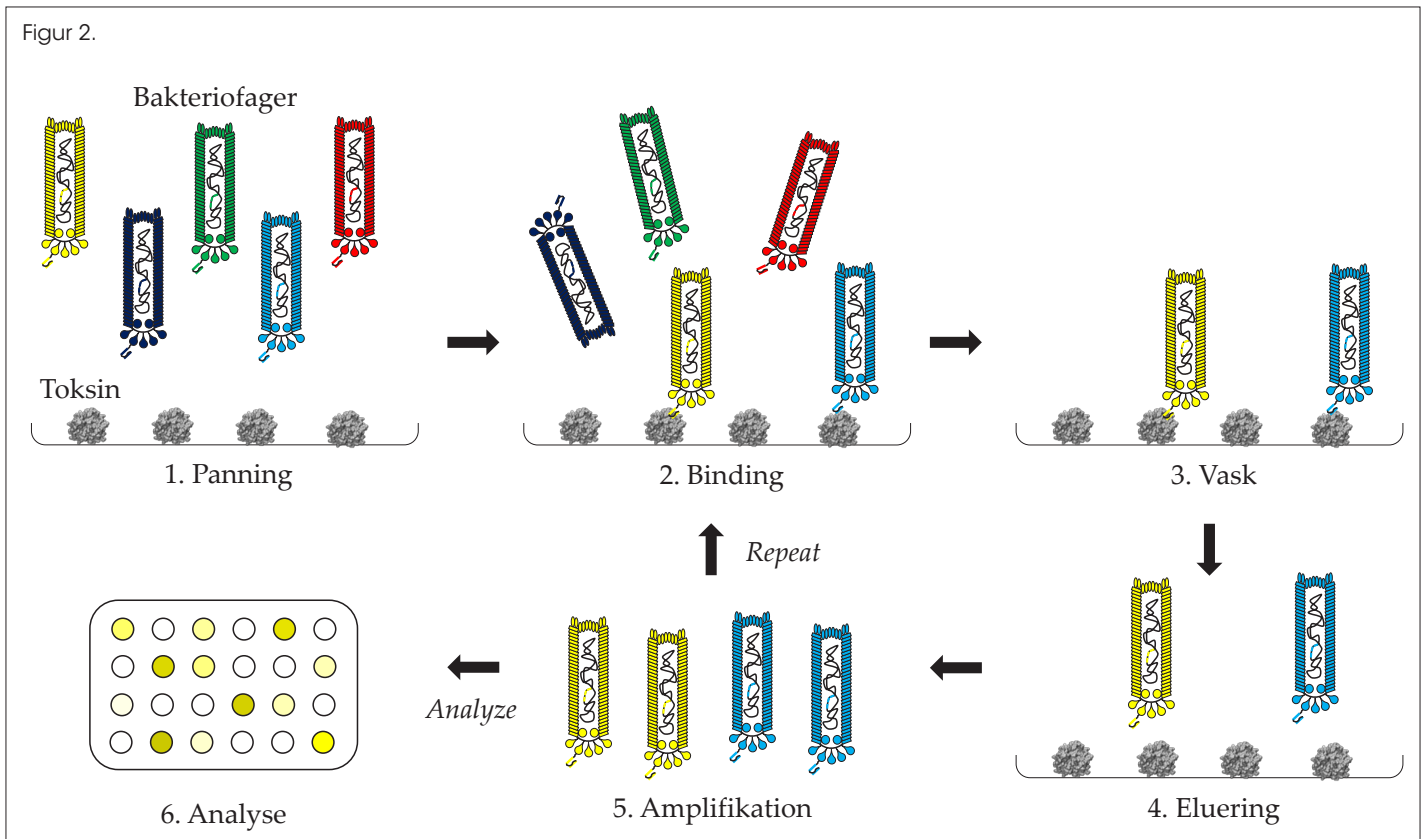
Herefter skal hvert enkelt antistof undersøges nærmere for at se, hvilket der er bedst? Hvilket er mest stabilt? Kan det krydsreagere med andre af de relevante toksiner? Hvis man har meget strikse kriterier, kan det betale sig at køre mange tusinder af antistoffragmenterne igennem.

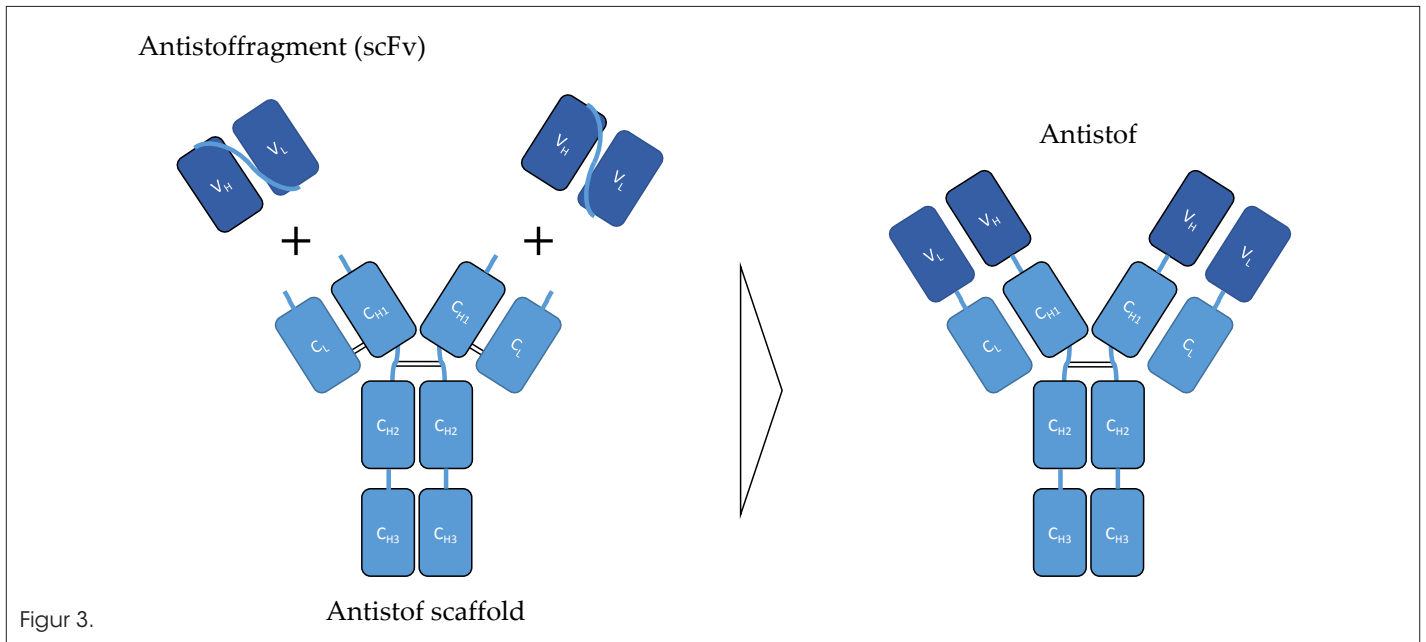
- Jeg ønsker generelt at få antistoffer, der kan binde bredt til

Hvordan opnår man et succesfuldt projekt?

"Gode ingeniører tænker ikke kun over små tekniske detaljer, men har øje for helheden. Hvad skal der til for at opnå et succesfuldt projekt? Det er essentielt, at man kommunikerer omkring sin forskning, og det er essentielt, at man kan samle passionerede samarbejdspartnere og studerende omkring sig, der har mod på at hjælpe med at lave en masse arbejde"

Figur 2.





den samme gruppe af toksiner. Til gengæld er vi begrænsede på økonomiske midler, så der er grænser for hvor meget screening, vi kan lave bagefter. Det varierer også fra eksperiment til eksperiment, forklarer Andreas og fortsætter:

- Det er kun spidsen af antistoffet (antistoffragmentet), vi screener i første omgang. Det gør det noget nemmere at arbejde med. Men når man skal producere et rigtigt humant antistof, vil man gerne have det som IgG-format, der er det naturlige, menneskelige format af et fuldt antistof, se figur 3.

Afprøvning af 1. generations antistoffer

De fundne antistoffer bliver testet i mus. Indtil videre ser det lovende ud.

- Vi har netop afprøvet 16 antistoffer målrettet mod toksiner i neurotoksiske slangers (kobraer, mambaer m.fl.) gifte. Her udviste flere af dem evnen til at neutralisere toksinerne. Det er meget spændende resultater, som vi nu skal arbejde videre med. Vi har dog en række udfordringer. 16x5 mg antistoffer kostede os ca. ½ mio. kr at producere, så det er virkelig dyrt. Derfor bruger vi de mest sensitive assays til at vurdere, hvilke antistoffer der er bedst. Det skal vi også have med i vores overvejelser, når vi bestemmer, hvilken vej vi nu skal gå.

Tror vi, at disse antistoffer er gode nok, eller skal vi bruge tid på at finde nogle, der er endnu bedre, inden vi bruger penge på at producere en ny batch? Eller skal vi vælge at udføre forskellige engineering-teknikker for at optimere dem inden? Det skal vi have diskuteret, når vi har nærstudert data.

■ Andreas Hougaard Laustsen

- Tog sin kandidatgrad som civilingeniør med et gennemsnit på 12.
- Brugte to år på sin ph.d.
- Blev i 2014 kåret som Danmarks sejeste ingeniør af Engineer the future.
- Blev i 2016 kåret som en af Europas top 10 biotekentreprenører under 30 år.
- Blev i 2017 kåret som en af Europas "30 under 30" af Forbes.

■ Den sorte mamba

Den sorte mamba er en af verdens farligste slanger. Dens gift er meget potent, og så er den i stand til at angribe lynhurtigt flere gange i træk, inden man kan nå at komme væk. Derudover er den sorte mamba en af verdens største giftslanger, hvilket betyder, at den kan sprøjte en stor mængde gift ind i sit offer.

Den sorte mambas gift er primært neurotoksisk. Udover en række proteiner og toksiner, som kun er til stede i meget små mængder, består den sorte mambas gift primært af tre komponenter:

- *Dendrotoksiner*: Findes kun i mambagifte. Giften påvirker kaliumkanaler, således at nerver og muskler overreagerer og man bevæger sig ukontrolleret og spjættende.
- *Alfa-neurotoksiner*: Blokerer acetylcholinreceptoren, så man ikke længere kan bevæge sine muskler. Det medfører, at man ikke kan holde sine øjne åbne, bevæge sine ben og arme, og at man til sidst dør, fordi man ikke kan trække vejret. Umiddelbart har de fleste neurotoksiske slanger (kobraer, mambaer, koralslanger, havslanger, etc.) alfa-neurotoksiner som en vigtig del af deres gift.
- *Adenosin*: Er et nucleosid (en byggesten i DNA), som i sig selv ikke er giftigt. Det får blodkarrene til at udvide sig, således at mere blod kan strømme igennem.

Retsch
Solutions in Milling & Sieving

The revolution in ultra-fine grinding:
The new Emax achieves finer and faster grinding results than any other ball mill!

SKANLAB
NEW!

part of **VERDER scientific**

Kvinderupvej 30 · 3550 Slangerup · Tlf: 4738 1014 · www.retsch.dk