

Aplikace genového inženýrství – příprava farmakologicky nebo průmyslově významných látek

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

Gen pro inzulin

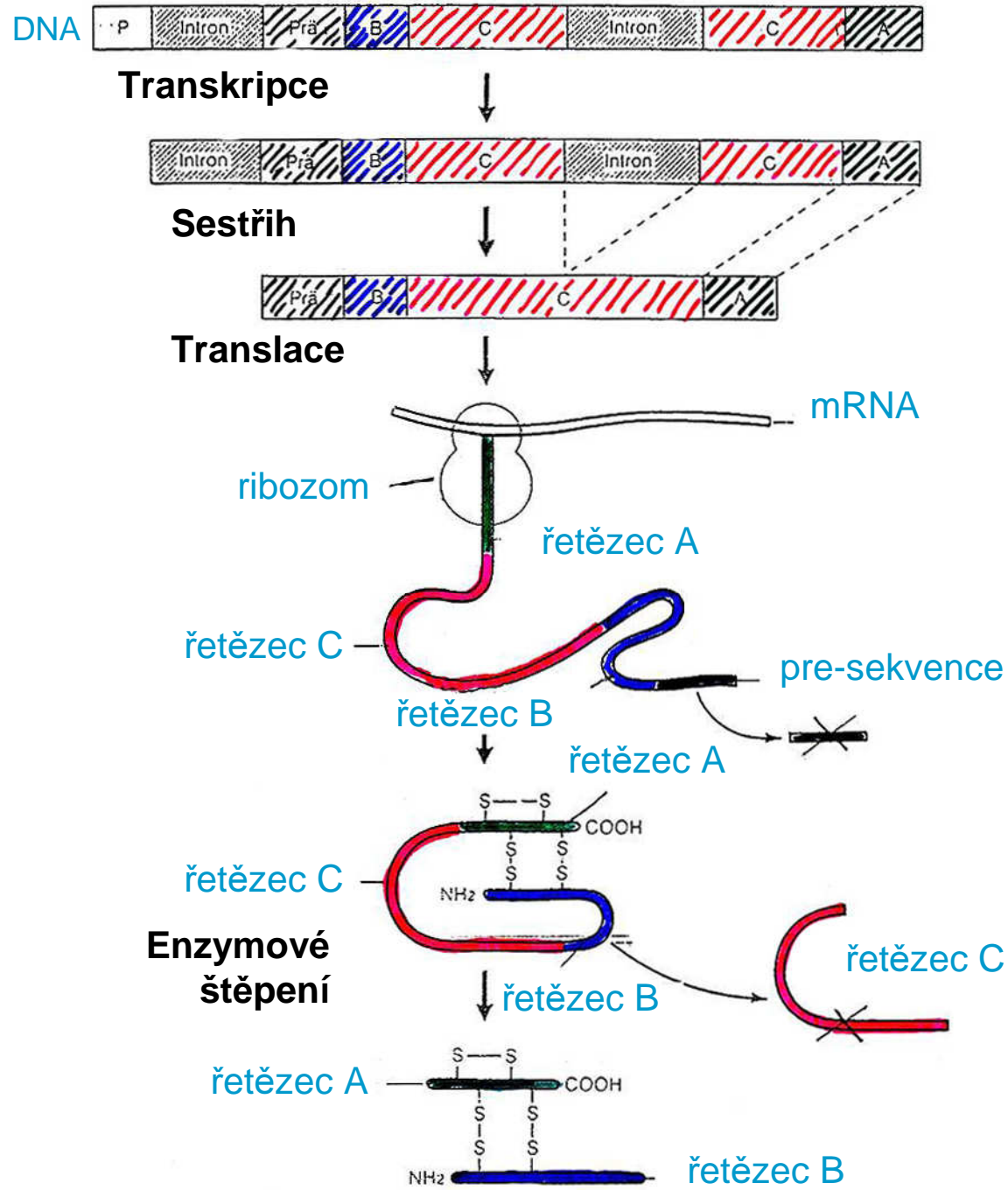
pre-mRNA

mRNA pro pre-proinzulin

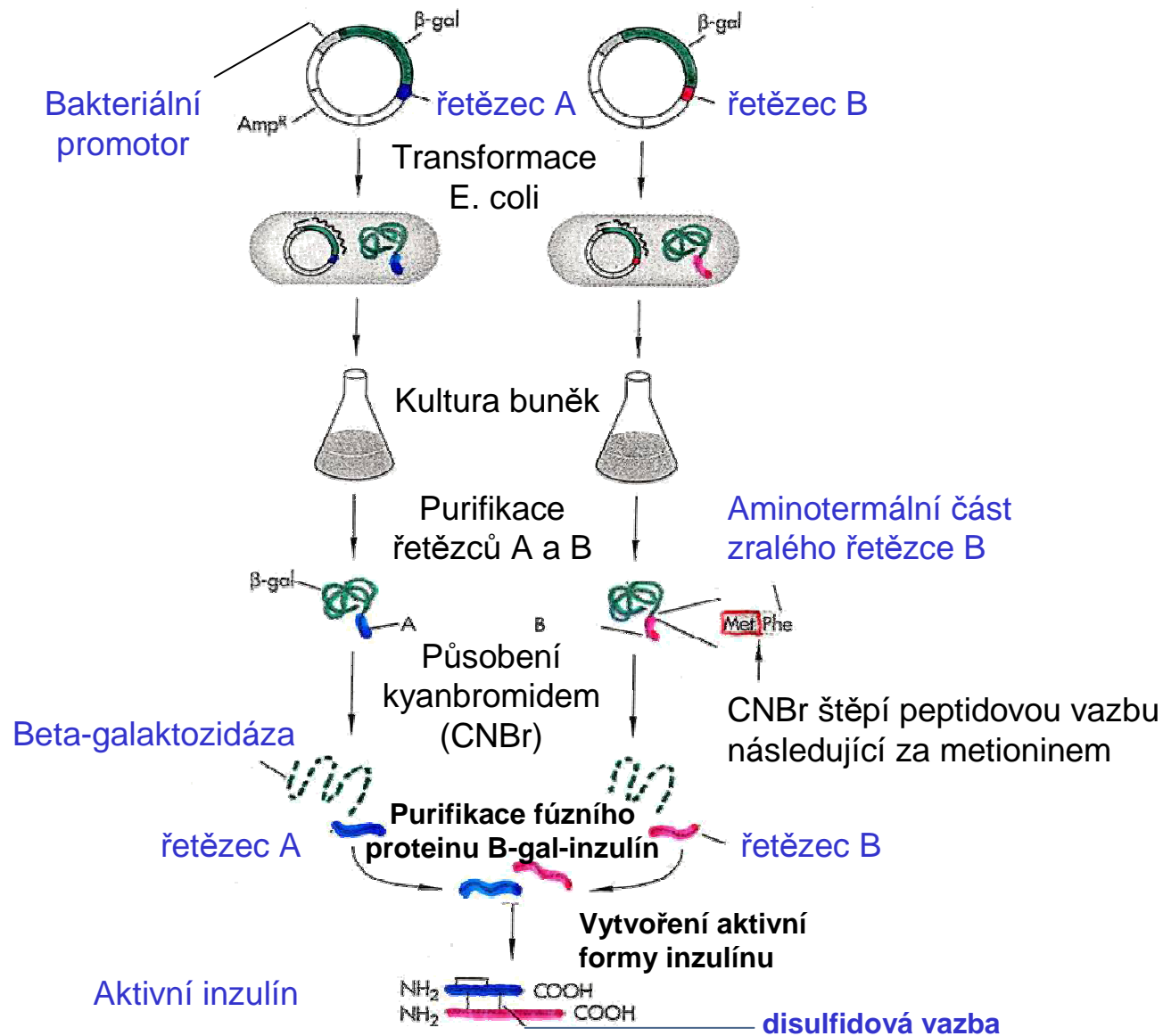
pre-proinzulin preprohormon

proinzulin prohormon

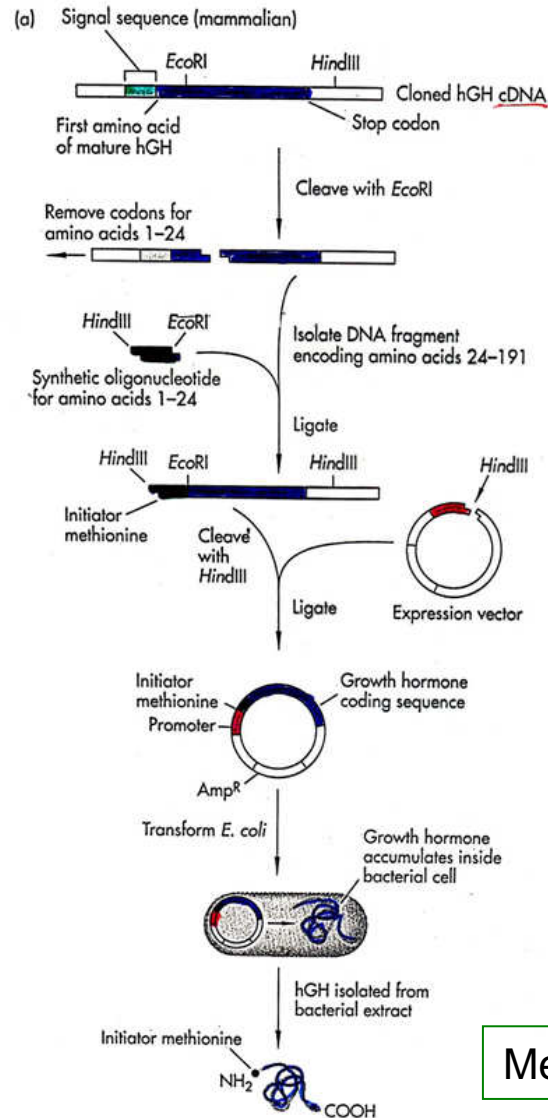
aktivní inzulin zralý hormon



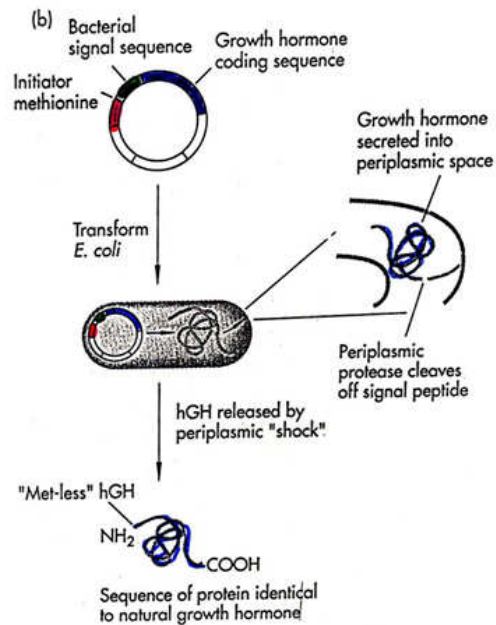
Příprava lidského inzulinu v bakteriálních buňkách



Příprava lidského růstového hormonu (hGH) v bakteriích

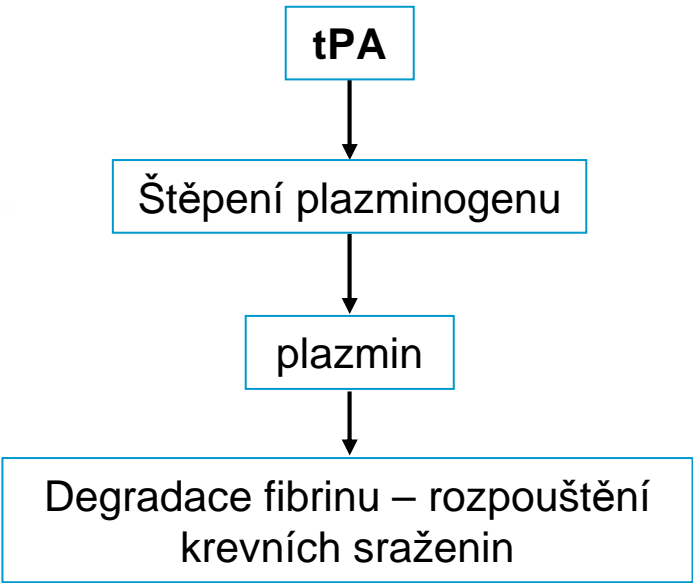
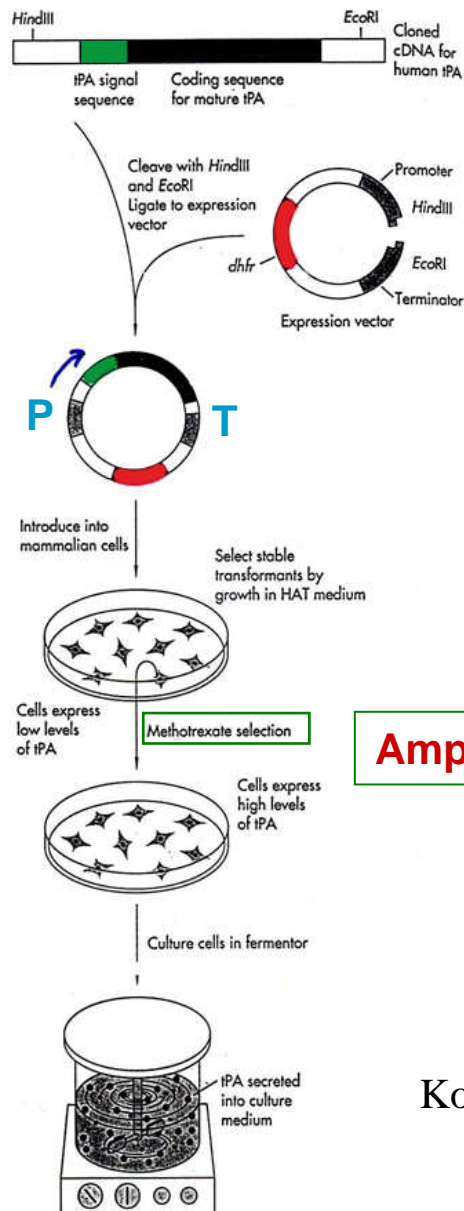


Příprava formy hGH sekretované v bakteriálních buňkách



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
 - atenuovaná
- inaktivovaná vakcína
 - celobuněčná
 - toxoidová
- subjednotková
 - s purifikovaným antigenem
 - se syntetickým antigenem
 - ribozomální

B. rekombinantní vakcíny: - subjednotková

- s deletovaným genem
- vektorová

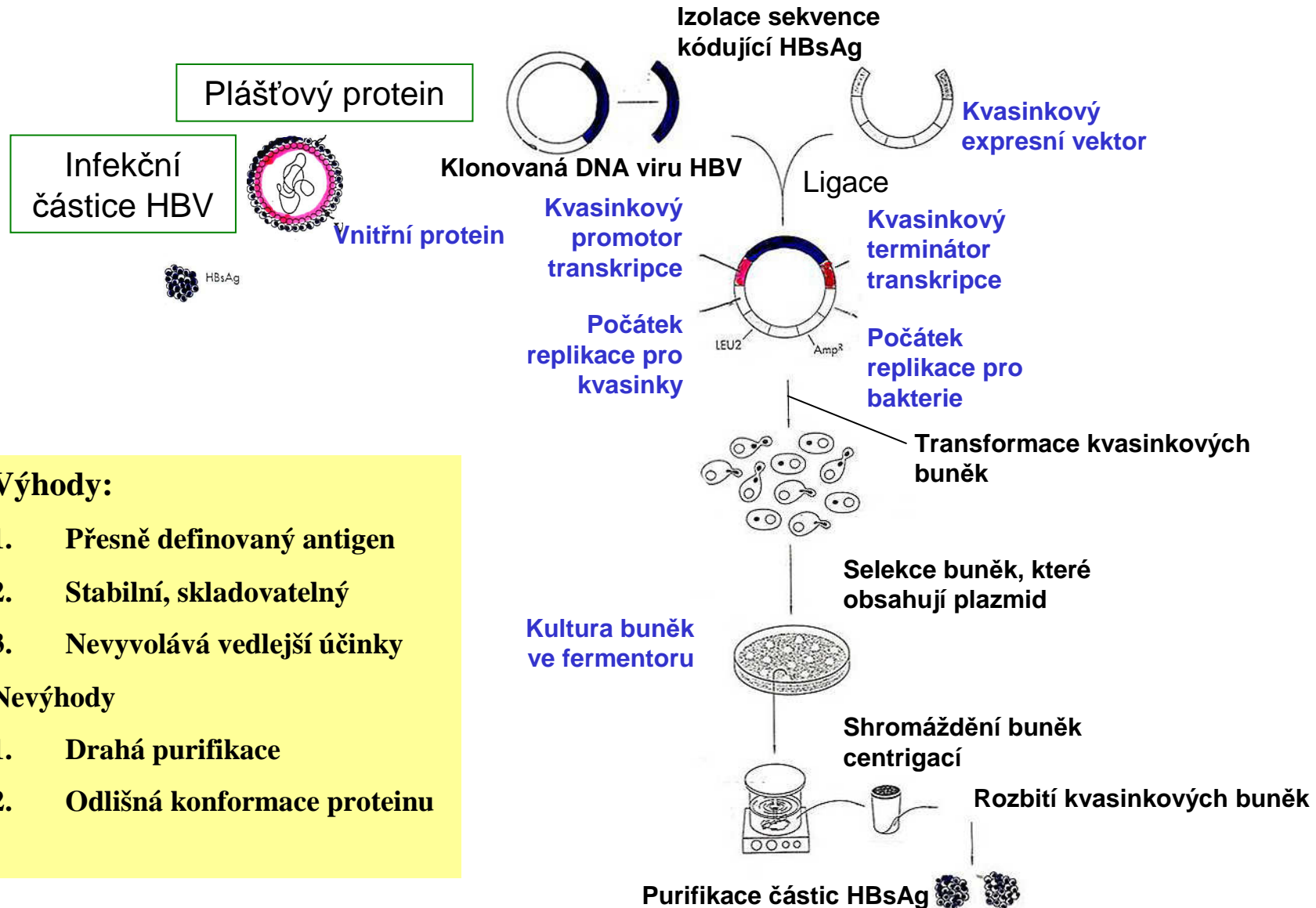
C. DNA vakcíny

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

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
- Vakcína proti meningitidě (MenB)

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

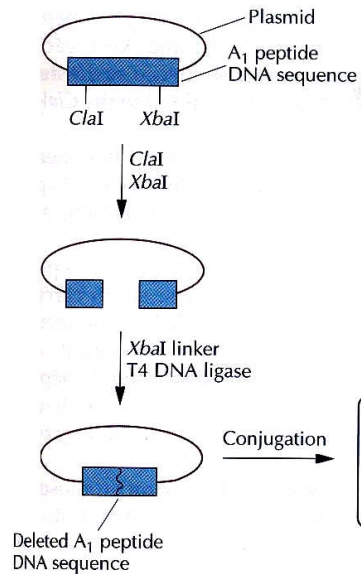
Table 11.1 Human disease agents for which recombinant vaccines are currently being developed

Pathogenic agent	Disease(s)
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

Příklady rekombinantních vakcín (vakcín obsahujících rekombinantní antigeny)

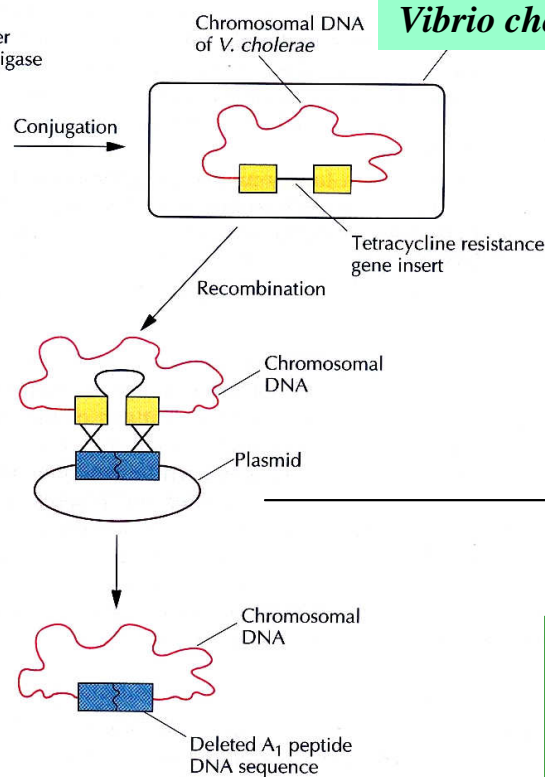
Product	Company	Therapeutic indication	Date approved
Recombinant vaccines			
<i>Hepatitis B</i>			
Ambirix (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	GlaxoSmithKline	Immunization against hepatitis A and B	2002 (EU)
Pediarix (combination vaccine containing 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 plasmidovém vektoru) – vyštěpí se ~ 90% aminokyselin)

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

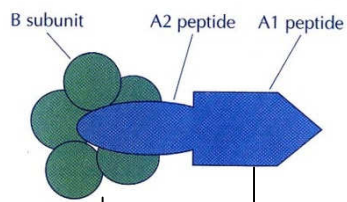


Přenos vektoru do kmene, v němž je uvnitř genu pro A1 začleněn gen pro rezistenci k tetracyklinu (A1 je inaktivován, buňky jsou TetR) – potenciální reverze A1 vyčleněním tetR – proto není vhodný jako vakcína

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

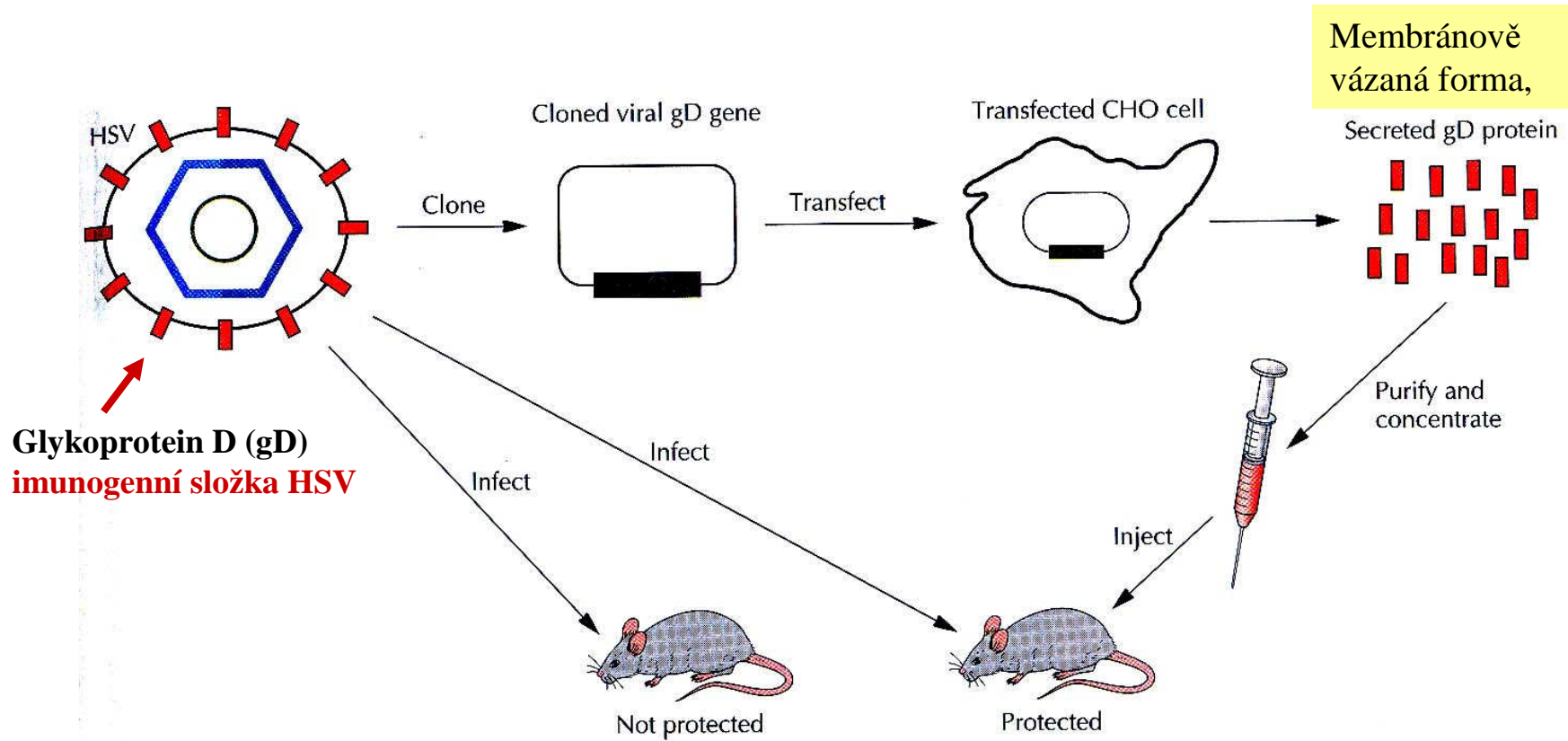
Struktura cholera toxinu



vlastní toxin

Vazba na receptory mukózy

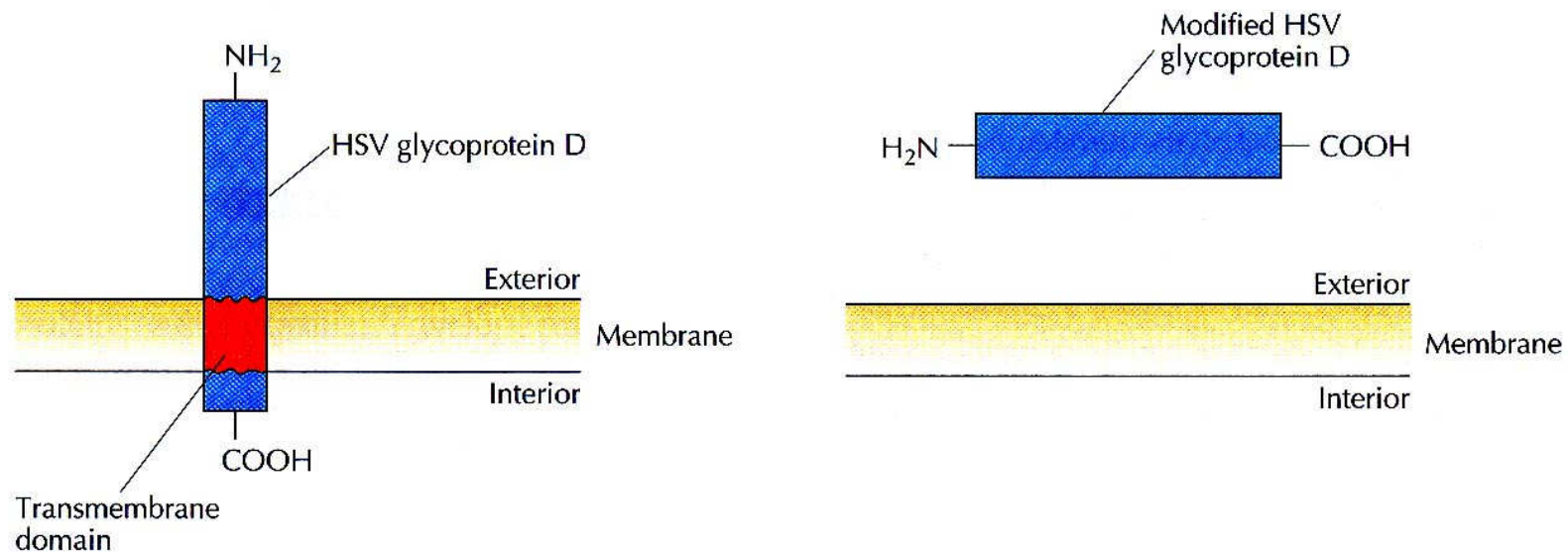
Příprava podjednotkové vakcíny proti HSV v buňkách CHO (chinese hamster ovary)



HSV – onkogenní virus, sexuálně přenosná onemocnění, encefalitida, infekce oka

Úprava genu pro plášťový glykoprotein (gD) HSV pro získání rozpustné formy gD

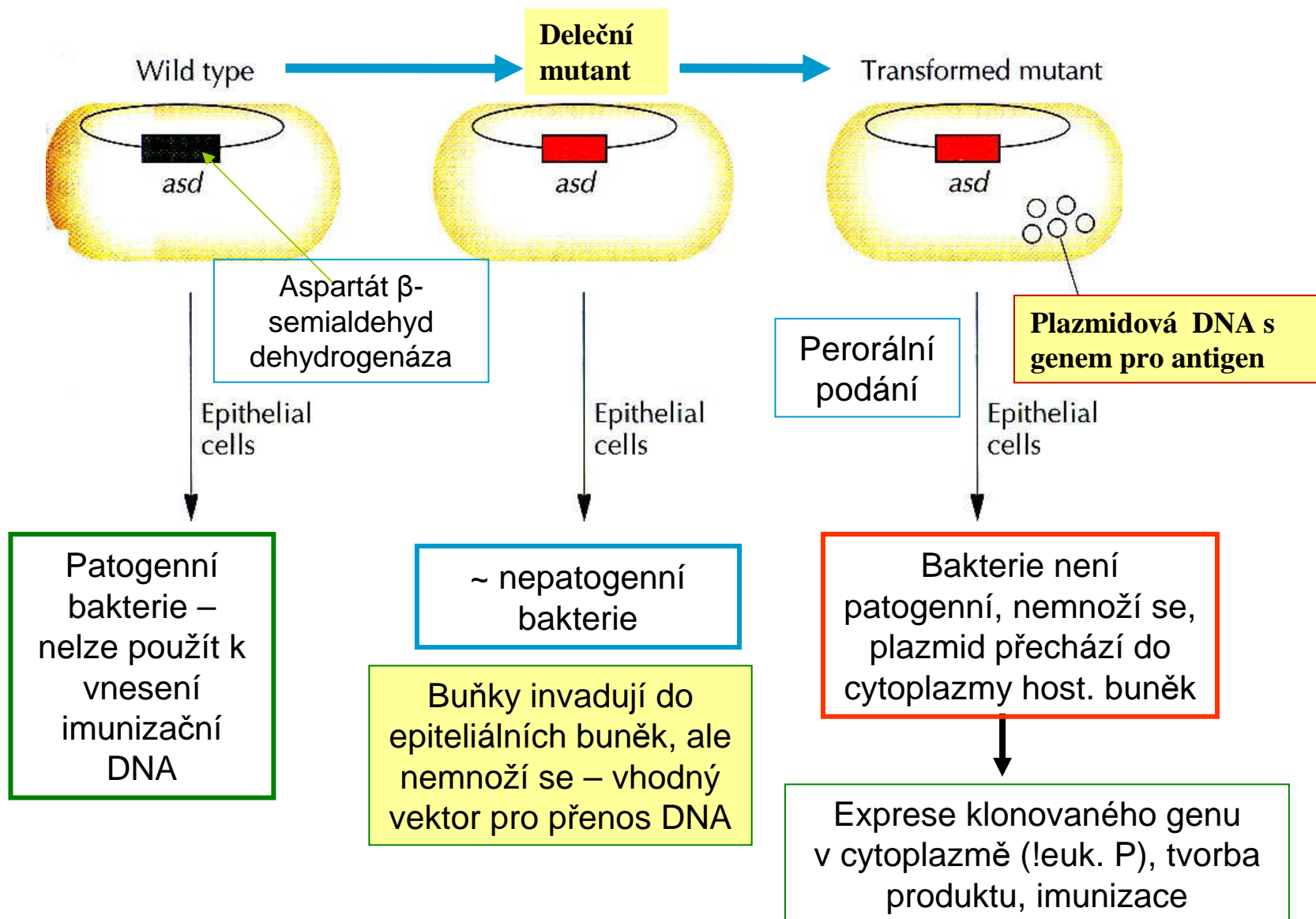
Klonování a exprese genu v savčích expresních systémech (CHO)



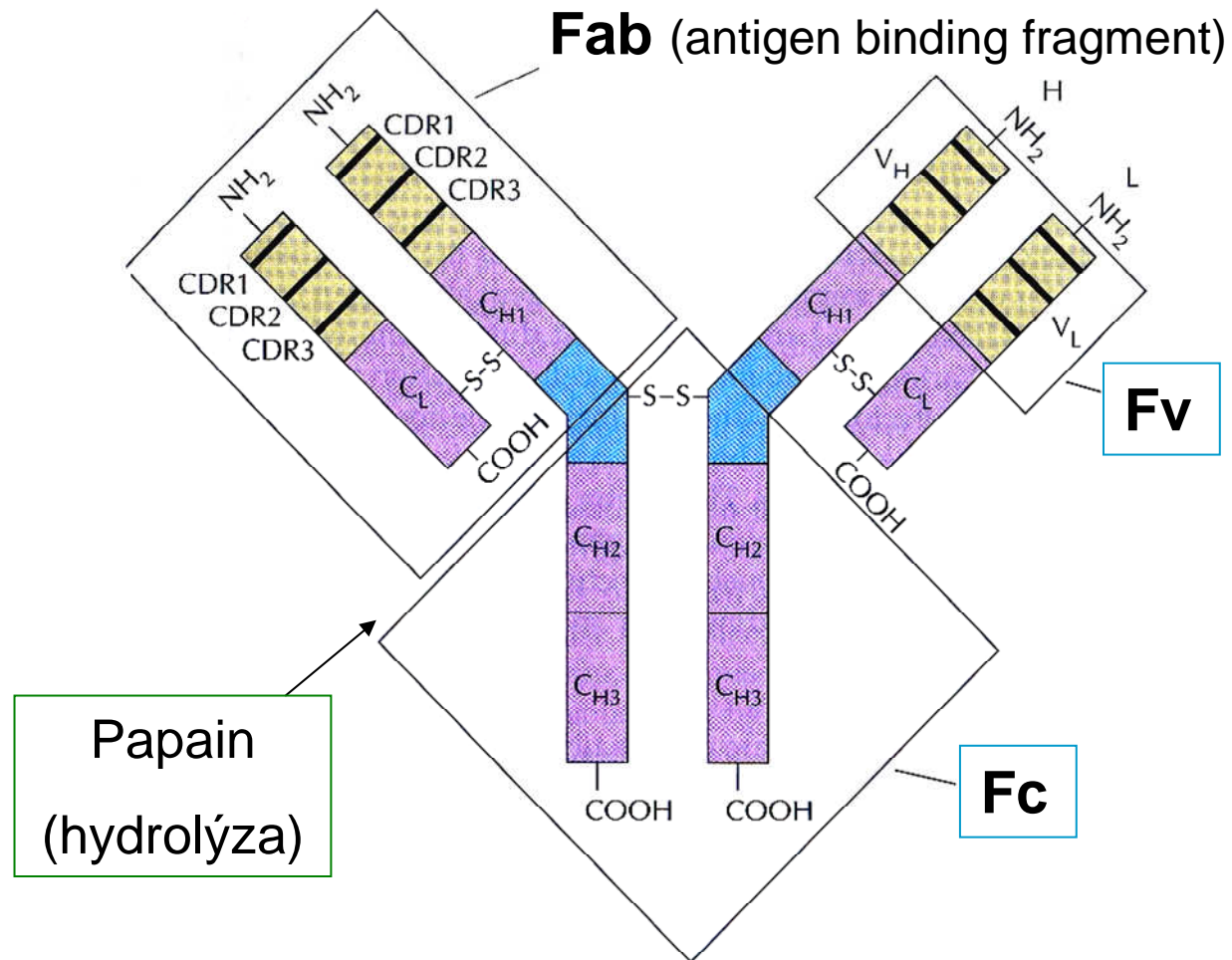
Kompletní gen pro gD obsahující C-terminální úsek kódující transmembránovou doménu – tato forma gD je obtížně purifikovatelná

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



Struktura protilátky



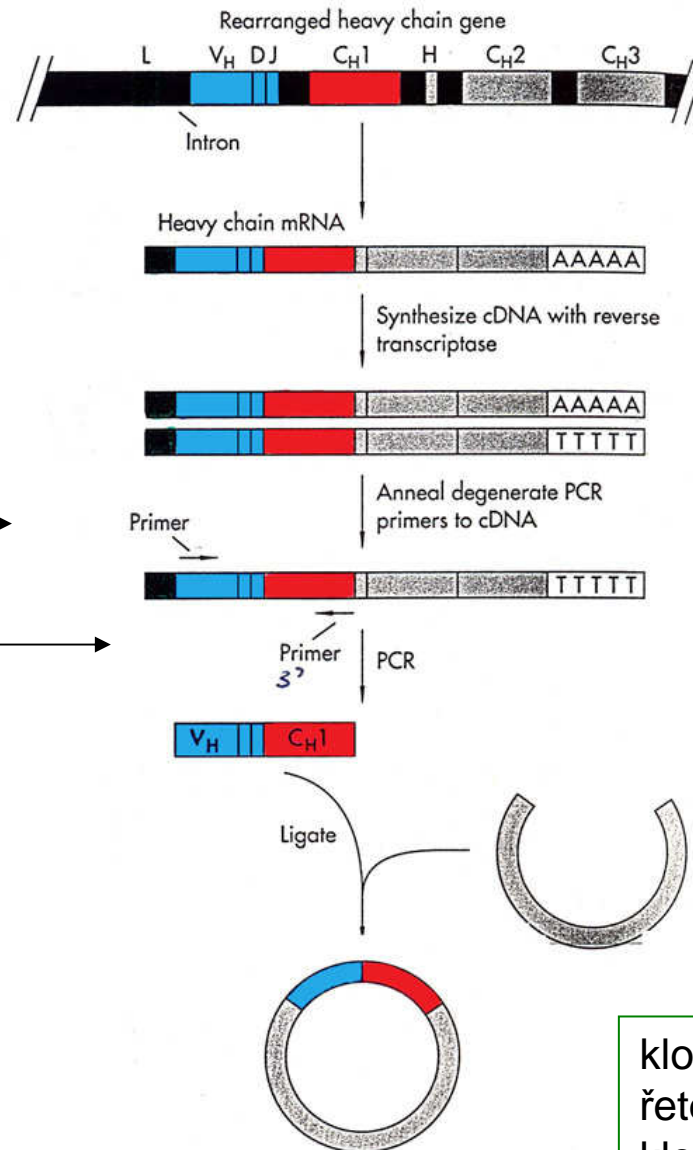
Klonování cDNA pro přípravu rekombinantních protilátek

Lymfocyty získané z imunizované myši (přeskupené geny)

Soubor degenerovaných 5'-primerů

Stejný primer pro všechny

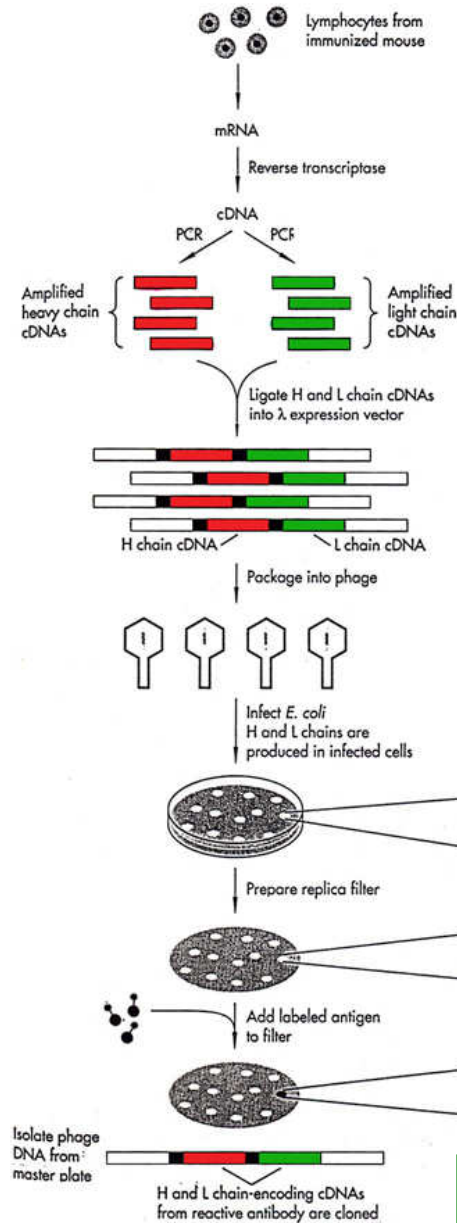
Soubor cDNA pro těžké řetězce



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

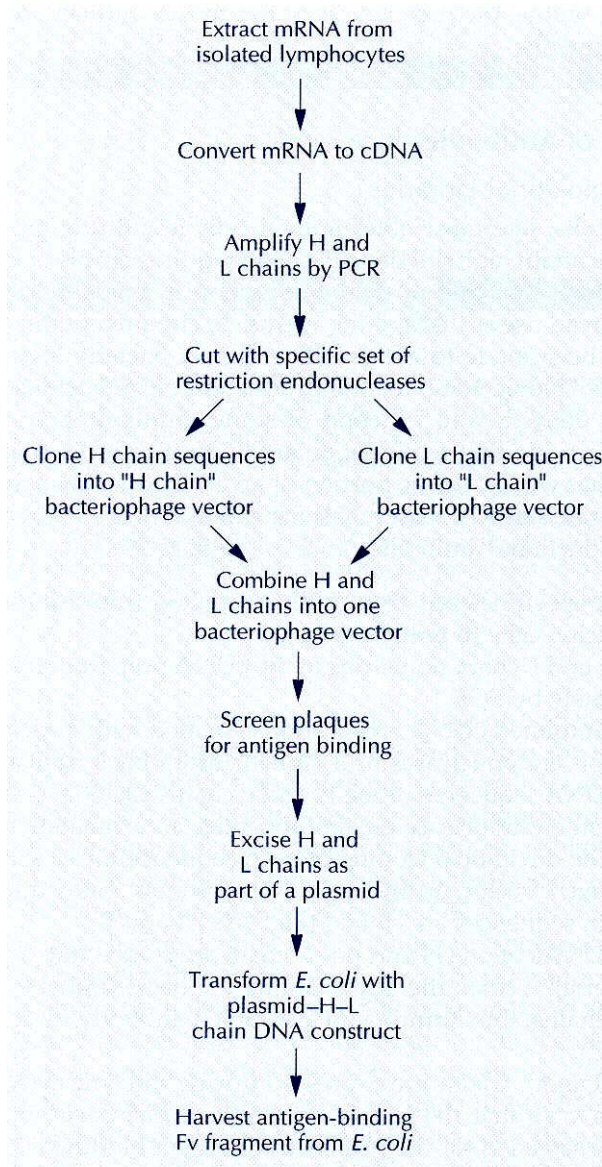
Každý fág obsahuje náhodnou kombinaci L a H

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

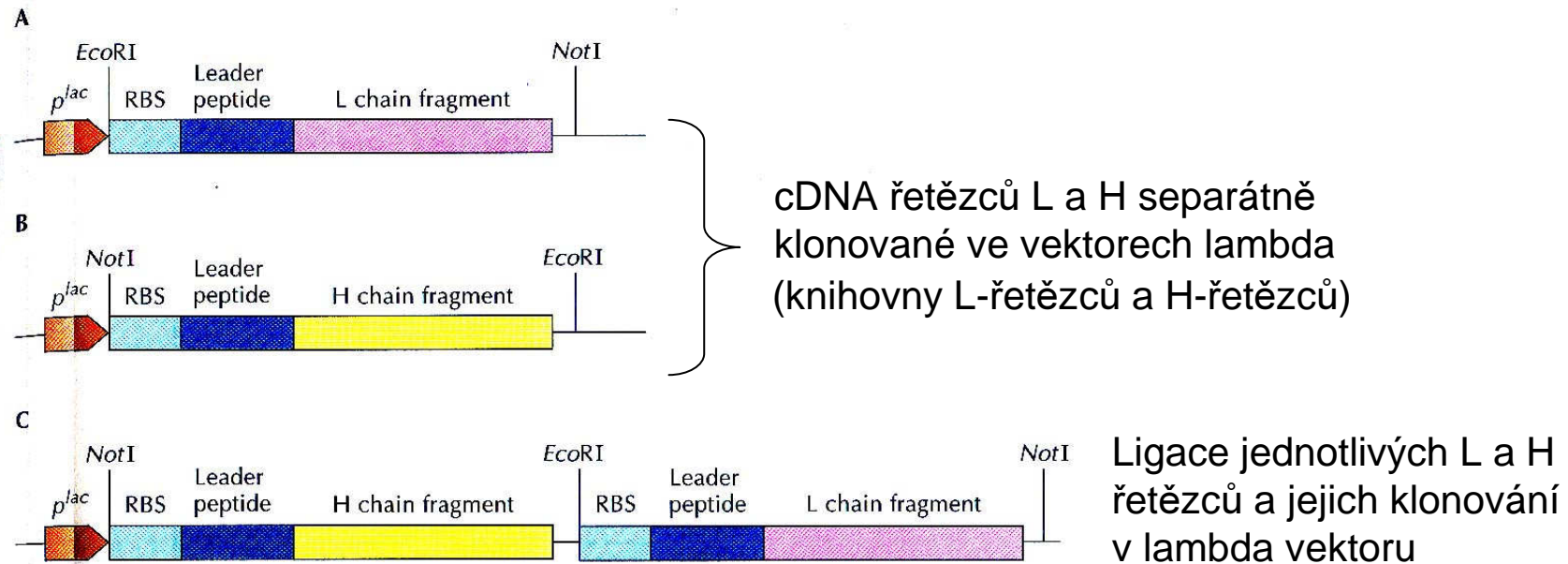
Mnoho různých kombinací – každý „kombinatorický vektor“ obsahuje jednu kombinaci.

selekce

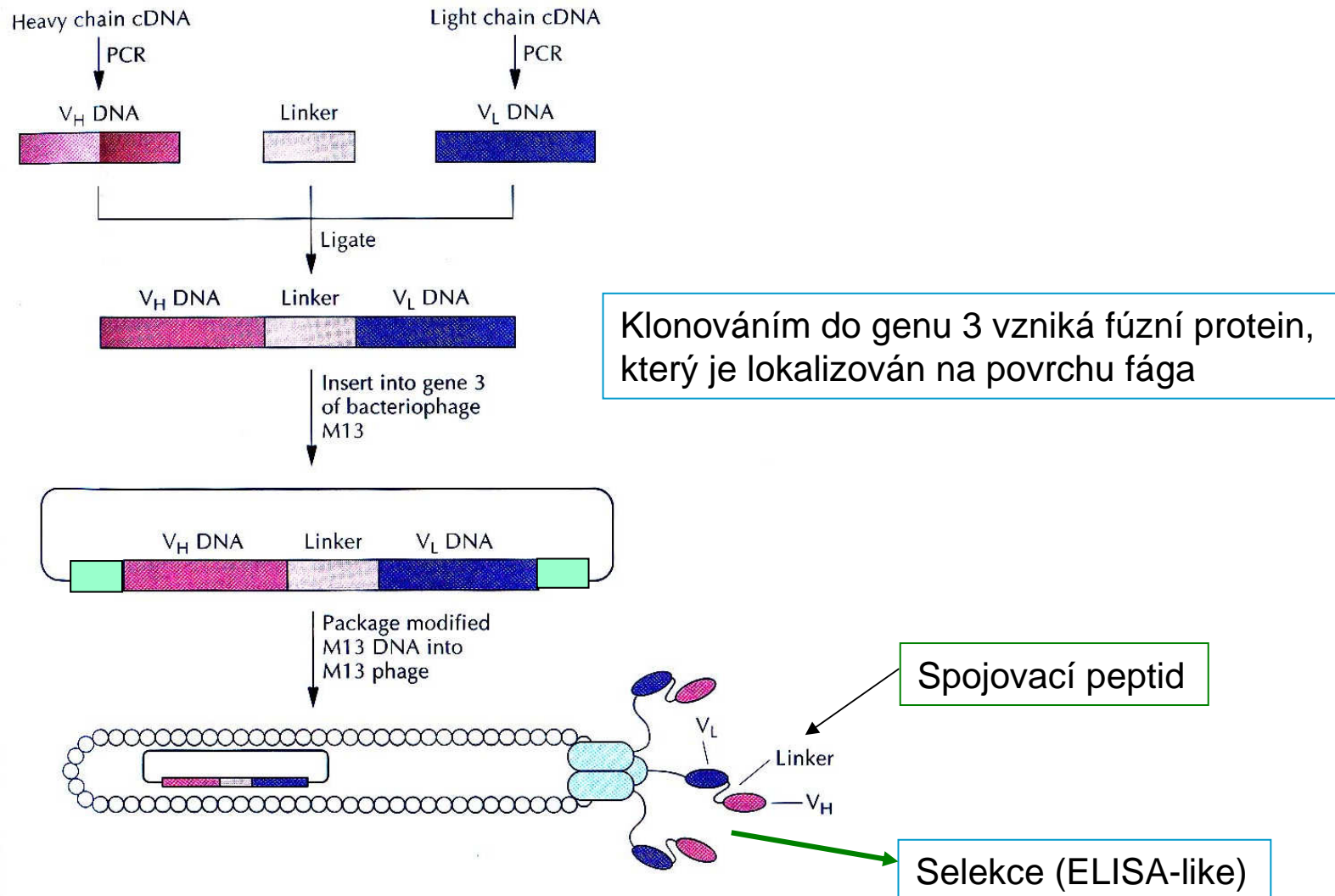
Překlonování vybraných kombinací do plasmidu (fág buňky lyzuje a není možné získat větší množství produktu)

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:

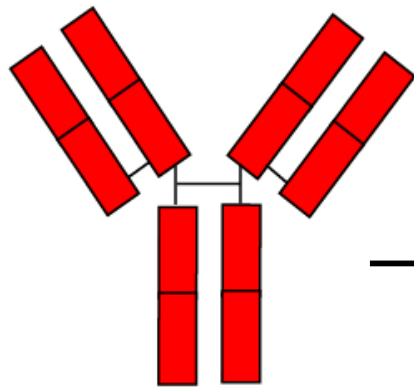
obtížná příprava lidských monoklonálních protilátek konvenční hybridomovou technologií

- 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)

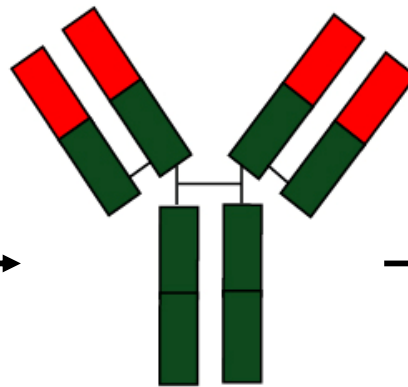
Příprava humanizovaných protilátek

Myší protilátka



Variabilní, konstantní a hypervariabilní oblasti jsou z protilátek myši

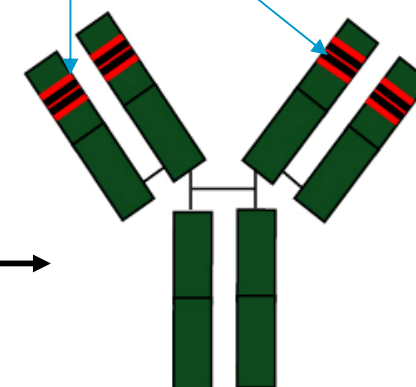
Chimerická protilátka



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

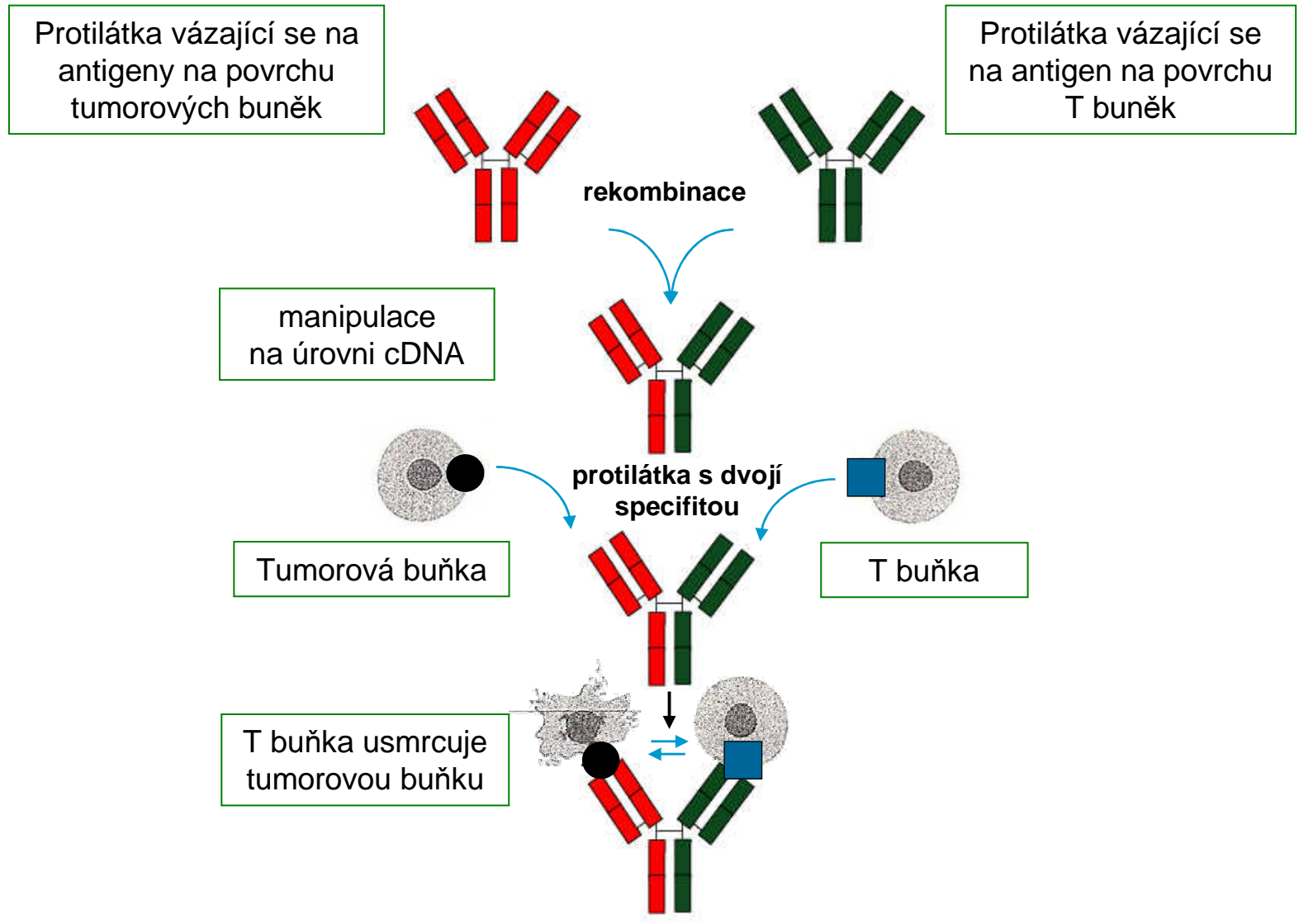
Humanizovaná protilátka

CDRs - complementarity determining regions

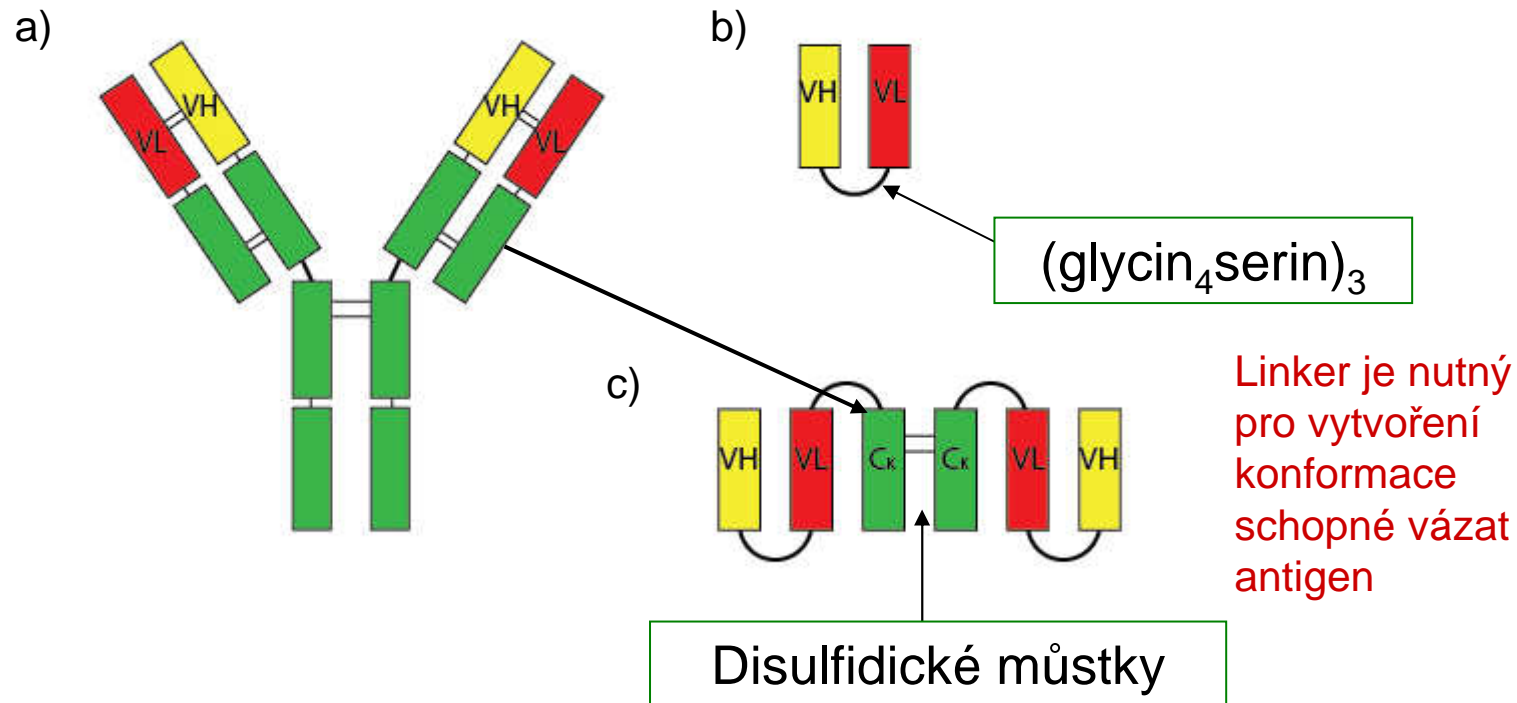


Hypervariabilní oblasti jsou z myších protilátek, ostatní jsou lidské

Protilátka s dvojí specifitou



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).

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

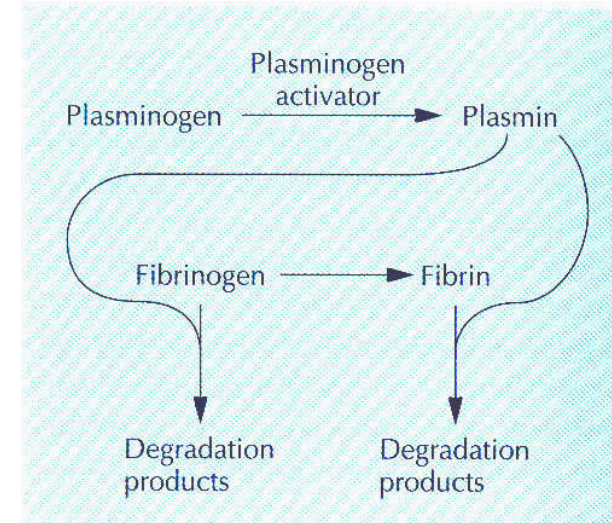
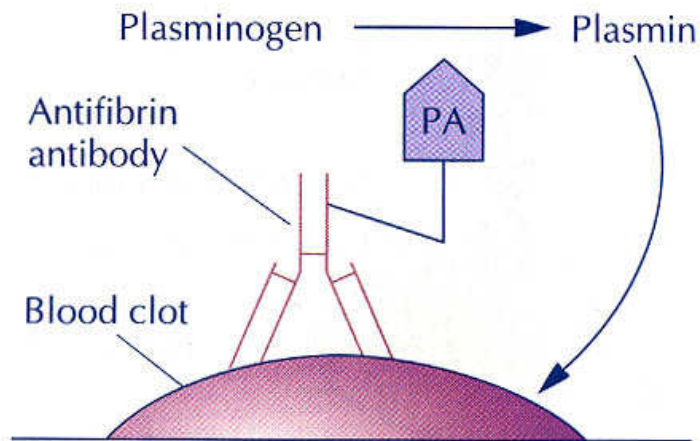
Date of approval	Type of antibody	Company	Therapeutic use
1986	Mouse	Ortho Biotech	Prevention of acute kidney transplant rejection
1994	Chimeric	Centocor	Prevention of blood clots
1997	Chimeric	Genentech, Idec Pharmaceuticals	Non-Hodgkin lymphoma
1997	Humanized	Protein Design Labs, Hoffmann-La Roche	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.

Imunotoxin = MAB s navázaným toxinem (ricin, difterický toxin aj)

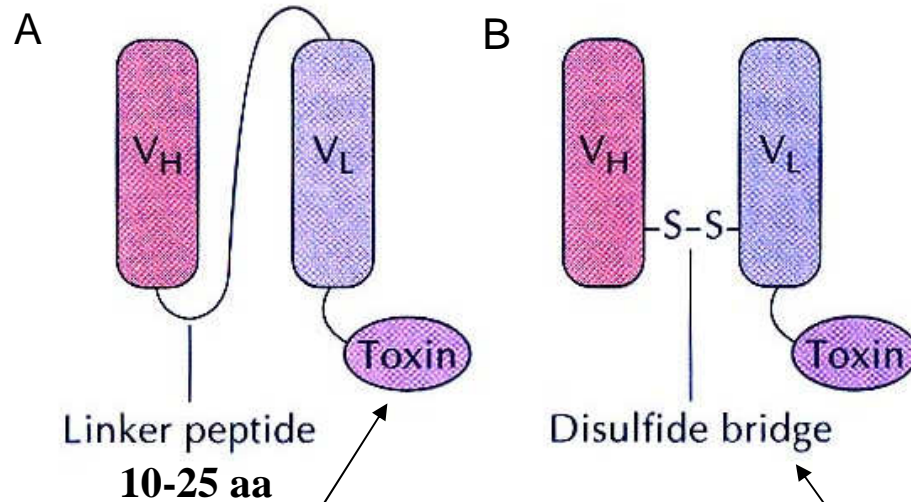
Terapeutické protilátky

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 akumulaci plazminu v blízkosti sraženiny. Plazmin (proteáza fibrinolyzin) pak degraduje krevní sraženinu.

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*

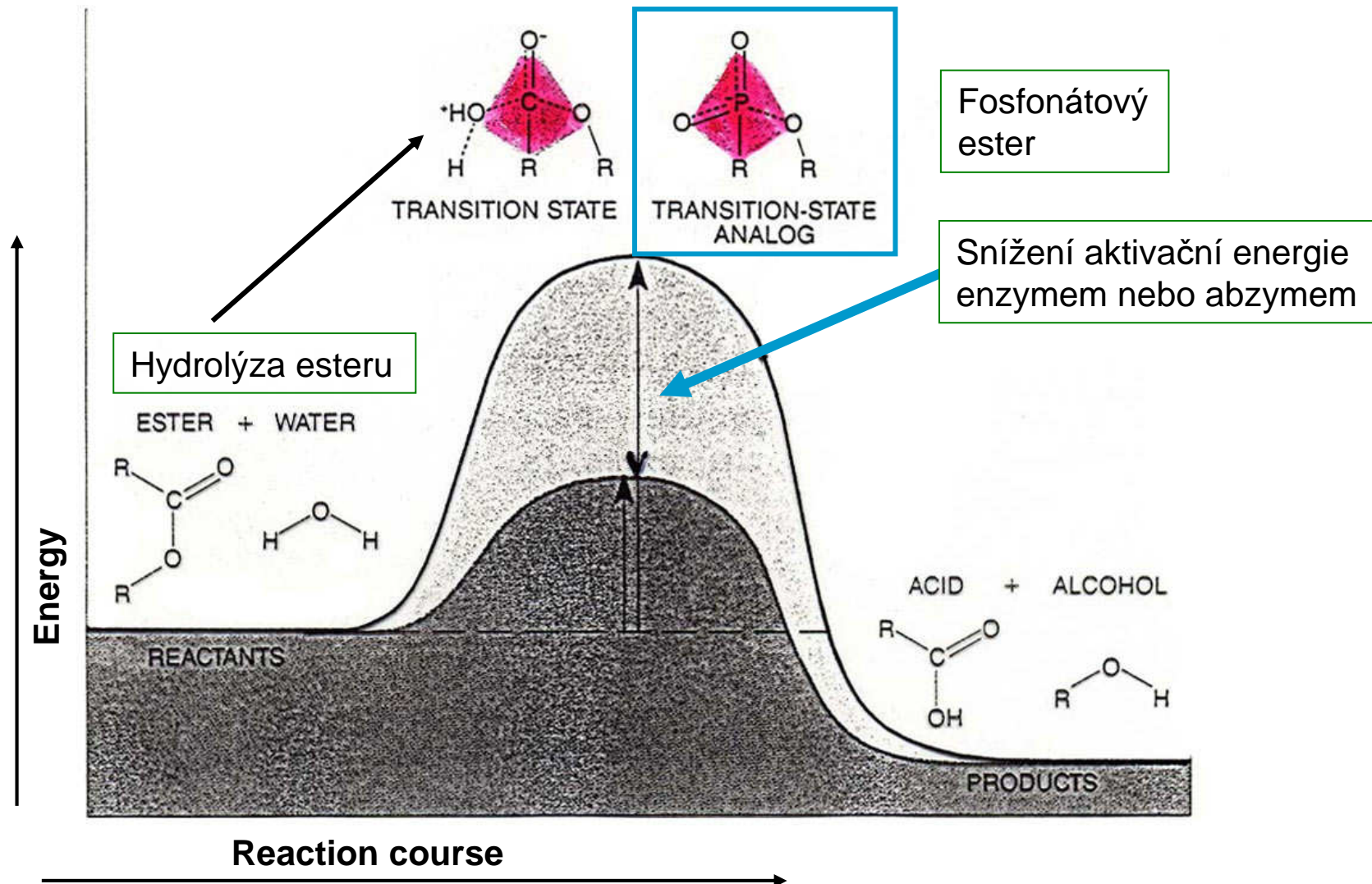
human epidermal growth factor receptor 2 -Approximately 30% of breast cancers have an amplification of the *HER2/neu* gene or overexpression of its protein product.

Pbs21 (plasmodium) + Shiva-1

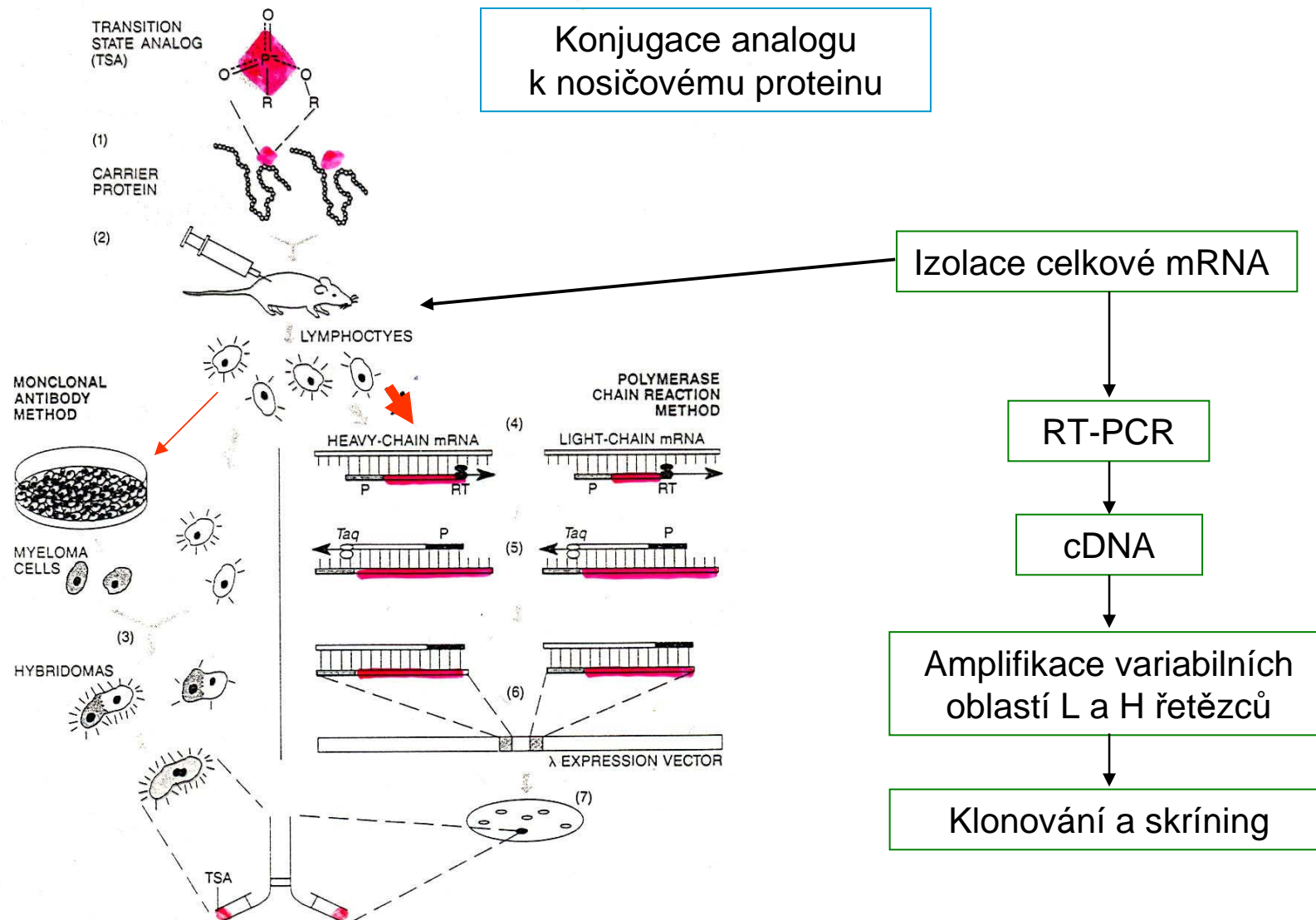
- An abzyme (from antibody and enzyme), also called catmab (from catalytic monoclonal antibody), is a monoclonal antibody with catalytic activity. Molecules which are modified to gain new catalytic activity are called synzymes. Abzymes are usually artificial constructs, but are also found in normal humans (anti-vasoactive intestinal peptide autoantibodies) and in patients with the autoimmune disease systemic lupus erythematosus, where they can bind and hydrolyze DNA. **Abzymes are potential tools in biotechnology, e.g., to perform specific actions on DNA.**
- Enzymes function by lowering the activation energy of the transition state, thereby catalyzing the formation of an otherwise-less-favorable molecular intermediate between reactants and products. **If an antibody is developed to a stable molecule that's similar to an unstable intermediate of another (potentially unrelated) reaction, the developed antibody will enzymatically bind to and stabilize the intermediate state, thus catalyzing the reaction.**

Abzym (Ab-enzym)

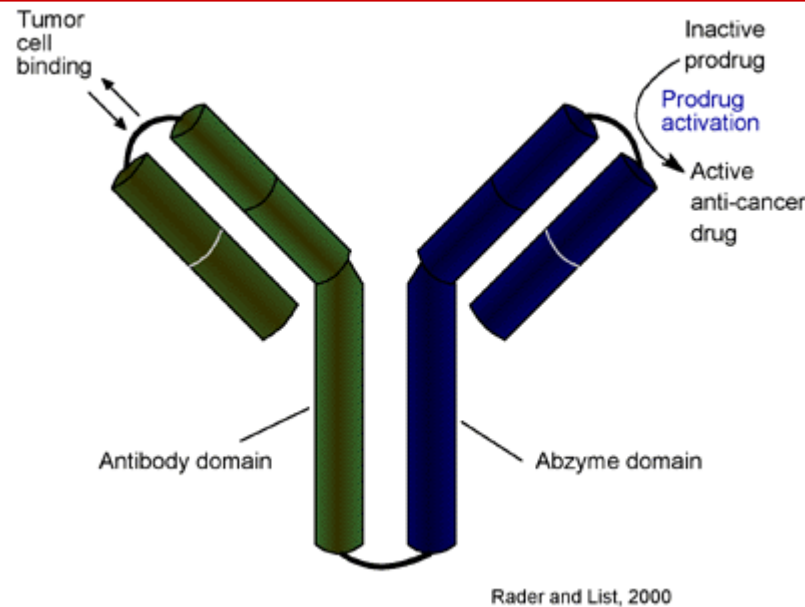
catmab (catalytic monoclonal antibody)



Příprava protilátky s enzymovou aktivitou (abzymu)



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.



Perhaps the most exciting application of abzyme technology is the specific targeting of cancer cells for destruction. Cancer cells contain unique determinants, called tumor cell antigens, on their surface that are lacking in normal cells. By utilizing antibodies that specifically bind these tumor cell antigens, cancer drugs can be delivered directly to the tumor. In the case of abzymes, scientists have envisioned antibodies with two distinct antigen binding sites (Figure 4): one site binds with high affinity to a tumor cell antigen, while the second site catalyzes the cleavage of a prodrug. The prodrug is a non-toxic precursor of a cytotoxic drug. First, the antibody is administered to patients, and it binds the tumor cells with high affinity. Secondly, the prodrug is introduced into the bloodstream, but only becomes activated in the vicinity of the targeted antibody. By this technique, tumors are selectively destroyed while healthy cells are spared from the toxic affect of cancer drugs.

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

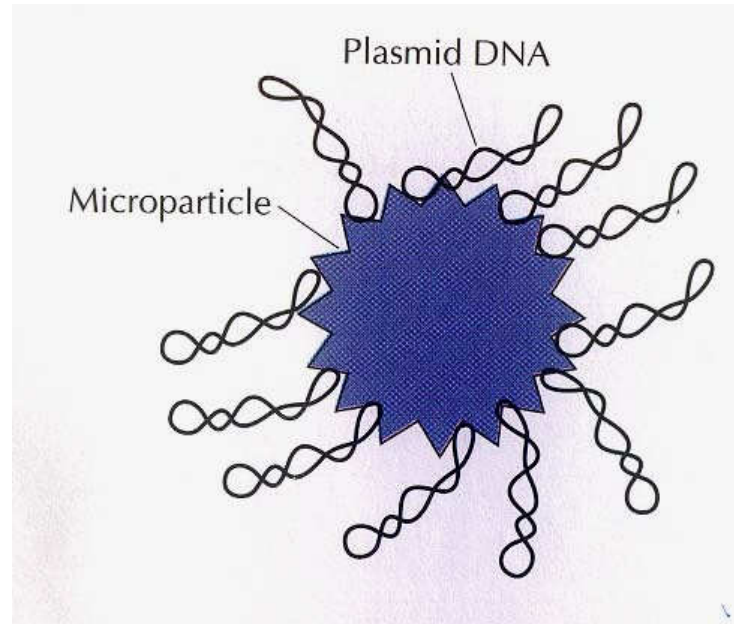
Nevýhoda:

- 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 mikročastic



Plazmidová DNA je navázána na biodegradovatelné mikročastice polymerů (0,3-1,5 μm), 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).

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 plazminogenový aktivátoru – 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".