

Rekombinantní DNA v medicíně a průmyslu

Po prvních úspěšných klonovacích experimentech v roce 1973 se začaly nové technologie rychle aplikovat. Význam možnosti získávat velká množství lidských proteinů normálně dostupných v mikrokvantech (pokud vůbec) byl centrem pozornosti nejen vědců a lékařů, ale i obchodníků. V roce 1976 se poprvé podařilo spojit metodologicky klonování DNA, syntézu oligonukleotidů a expresi genů a z rekombinantní DNA byl poprvé získán lidský protein - somatostatin, 14 aminokyselinový peptid s funkcí neurotransmiteru. Gen kódující somatostatin nebyl přirozený gen, ale byl syntetizován chemicky a klonován v plazmidovém vektoru v *E. coli*, kde se rovněž exprimoval. Brzy poté následovala úspěšná exprese lidského inzulinu, prvního komerčního biotechnologického produktu. Namísto extrakce inzulinu z prasat a krav bylo možné diabetikům podávat inzulin identický s normálním, lidským.

Pokrok byl podmíněn úspěchy ve všech oblastech mol. biologie, tj. syntézou oligonukleotidů, izolací enzymů, které jsou schopny štěpit a spojovat DNA, charakterizací plazmidů jako vektorů, a poznáním zákonitostí týkajících se exprese genů. Znamenaly nejen revoluci v biologickém výzkumu, ale daly základ novému průmyslu, založeném na klonování a produkci proteinů významných v medicíně a průmyslu. V současné době jsou proteiny připravené tímto způsobem používány při léčbě různých nemocí, jako je rakovina, alergie, autoimunitní nemoci, neurologické případy, infarkt, krevní nemoci, infekce, poranění, a genetické nemoci, ale i v méně prozaických případech v průmyslu při přípravě detergentů a potravin. Velký význam má příprava nových léků změnou přirozených proteinů k zlepšení jejich funkcí (pomocí drobných změn).

Expresní systémy pro tvorbu rekombinantních proteinů

Klonování genu nebo cDNA kódujícího určitý protein je pouze jedním z mnoha kroků potřebných k produkci rekombinantního proteinu pro lékařské nebo průmyslové potřeby. Dalším krokem je vložení genu do hostitelské buňky, kde dojde k jeho expresi. Vývoj expresních systémů je předmětem výzkumu jak průmyslových tak vědeckých laboratoří. Nejpopulárnější jsou *E. coli* a *B. subtilis*, kvasinky, kultury hmyzu a savčí buňky. Výběr buněk je dán cílem projektu a vlastnostmi produkovaného proteinu.

Bakteriální buňky nabízejí svou jednoduchost, krátkou generační dobu a velký výtěžek produktu za nízkou cenu. Zvláště u *B. subtilis* mohou být buňky indukovány k sekreci produktu do prostředí, což výrazně usnadní purifikaci. Exprese v prokaryotických buňkách má však své nevýhody. I když je řada proteinů produkována s vysokým výtěžkem (vyšším jak 10% hmoty bakteriálních proteinů), často se nesprávně uspořádávají a jsou ve formě nerozpustných inkluzních tělísek. Proteiny extrahované z těchto tělísek jsou často biologicky neaktivní. Malé proteiny lze někdy vrátit do jejich aktivní formy, ale větší proteiny obvykle ne. Další problém je ten, že cizí proteiny jsou někdy pro bakterie toxické, takže buněčné kultury nedosahují vysoké hustoty. Tento problém lze někdy obejít použitím inducibilního promotoru, kterým se gen indukuje až po nárůstu kultury do vyšší hustoty. Třetí problém spočívá v tom, že bakteriální buňky postrádají enzymy nutné k posttranskripční modifikaci, jako jsou fosforylace a glykozylace proteinu. Tyto modifikace jsou často nezbytné k funkčnosti proteinu. Tento problém lze řešit tak, že se z eukaryotických buněk izolují proteiny, které tyto modifikace provádějí, a jimi se působí na bakteriální produkt.

Kvasinky byly po staletí používány ve sladařství a pekařství. Jsou to eukaryota podobající se savcím buňkám v mnoha ohledech, ale mohou rychle růst a stejně levně jako bakterie. Provádějí řadu posttranskripčních úprav, ale lze je přimět k sekreci proteinů. Nevýhodou je přítomnost řady

proteáz, které snižují výtěžek proteinů. Problém lze obejít použitím kmenů, které tyto proteázy postrádají.

Expres heterologních proteinů v buňkách hmyzu pomocí bakulovirových vektorů je relativně nový přístup. Hlavní výhodou je exprese s vysokou hladinou, správné smotání proteinu a posttranskripční modifikace podobné v savčích buňkách. Vakcína pro HIV byla připravena produkcí jednoho HIV-glykoproteinu v takovémto systému. Cena na kultivaci hmyzích buněk je vyšší než u bakteriálních nebo kvasinkových kultur, ale nižší než u savčích.

Bez ohledu na významné výhody produkce lidských proteinů v heterologních hostitelských buňkách, je v některých případech nejlepší produkovat savčí proteiny v savčích buňkách. Velké zlepšení bylo dosaženo při konstrukci vektorů, promotorů a transformačních protokolů u různých hostitelských buněčných systémů. Tranzientní exprese v savčích buňkách je často používána k testování funkce nově klonovaného genu a jako rychlá metoda pro stanovení funkce rekombinantních proteinů.

Inzulín je prvním rekombinantním léčivem s licenci pro použití u člověka

Jde o důležitý hormon, který reguluje metabolismus cukrů, je produkován malými buňkami pankreatu a sekretován do krevního řečiště. Neschopnost produkovat inzulín má za následek cukrovku, ale denní injekce inzulínu může její projevy potlačit. Dříve byl inzulín získáván z prasat a krav. I když je u člověka zvířecí inzulín biologicky aktivní, není (co se týká aminokyselinového složení) identický s lidským. Proto někteří pacienti produkují proti zvířecím inzulínům protilátky, což vede vážným imunitním reakcím. Jelikož rekombinantní inzulín je identický s lidským, tyto problémy nenastávají.

U savců je inzulín exprimován jako jediný řetězec pre-pro-inzulínu, který je sekretován přes plasmatickou membránu. Preproinzulín obsahuje několik aminokyselin navíc, které nejsou přítomny v hotovém inzulínu. Aminoterminální aminokyseliny tvoří pre-sekvenci a cíl pro sekreci exprimovaného proteinu. Pro-sekvence je úsek aminokyselin uprostřed hormonu, která je důležitá pro skládání polypeptidového řetězce do správné struktury. Během sekrece jsou tyto aminokyseliny preprotohormonu vyštěpeny celulárními proteázami za uvolnění zralého proteinu, složeného ze dvou krátkých polypeptidových řetězců, A a B, které jsou vázány dvěma disulfidovými vazbami. Cílem rekombinantních technik bylo připravit takto složený inzulín, tedy ve zralé formě. Původní cíl byl zkonstruovat syntetické geny z oligonukleotidů, které separátně kódují řetězce A a B. Tyto byly jednotlivě inzertovány do genu *E. coli* kódujícího β -galaktozidázu, takže bakterie produkovaly velká množství fúzního proteinu, kde byla inzulínová sekvence napojena na konec enzymu galaktozidázy. Tyto velké proteiny byly purifikovány z bakteriálních extraktů a inzulínové řetězce byly uvolněny působením kyanbromidem, chemikálií, která štěpí peptidové vazby následující za metioninem. Jelikož metioninový kodon byl umístěn na hranici mezi B-galaktozidázovým a inzulínovým řetězcem, vznikl intaktní řetězec inzulínu. Oba řetězce byly purifikovány, spojeny do aktivní inzulínové molekuly. Podobně se postupuje dosud.

Rekombinantní lidský růstový hormon je produkován bakteriemi pomocí dvou metod

Růstový hormon je protein složený z 191 aminokyselin. Je produkován pituitární žlázou (hypofýzou); reguluje růst a vývoj. Děti narozené s deficiencí růstového hormonu (hypopituitary dwarfs) nemají nikdy normální postavu (vzrůst). Pravidelné injekce růstového hormonu stimulují růst těchto dětí, takže mohou dosáhnout téměř normální výšky. Na rozdíl od situace u inzulínu jsou hormony získané od zvířat neúčinné. Účinný je pouze lidský hormon (protein) a řadu let byl

získávan usilovně ze žláz zemřelých. Následkem toho byla však infekce mnoha dětí fatálními viry z jedné z mrtvol. Tvorba rekombinantního lidského růstového hormonu (hGH) by představovala spolehlivý a bezpečný zdroj této látky.

Počáteční tvorba hGH byla dosažena konstrukcí hybridního genu z přirozené hGH cDNA a syntetických oligonukleotidů, které kódují aminokonec zralé formy proteinu. Tato kódující sekvence byla připojena k plazmidu vedle bakteriálního promotoru. Podobně jako inzulin je hGH normálně produkován jako velký prekurzorový protein obsahující aminoterminální signální sekvenci. Jelikož tato sekvence není rozpoznávána bakteriální sekreční mašinerií, je 5'konec cDNA inženýrsky upraven syntetickou sekvencí DNA, která umožňuje, aby bakterie produkovaly téměř normální verzi zralého lidského proteinu.

První hGH expresní vektory navozovaly produkci proteinu uvnitř buňky. Purifikace vyžadovala řadu kroků k separaci hGH od tisíce různých intracelulárních proteinů v baktériích. Dalším způsobem je produkovat protein v baktériích tak, aby byl sekretován. To lze učinit vazbou kódující sekvence žádaného proteinu k signální sekvenci ze sekretovaného bakteriálního proteinu, čímž se pak tvoří prehormon. Lidský růstový hormon je tvořen bakteriemi a pak sekretován za následného odstranění signálního peptidu bakteriální proteázou. Sekrece do periplazmy, kde je méně proteinů než uvnitř buňky, činí purifikaci jednodušší. Jediným rozdílem mezi sekretovaným hGH a hGH produkováným intracelulárně je přítomnost aminoterminálního metioninu na intracelulárně exprimované molekule. Jelikož sekretovaná forma postrádá tento metionin, nazývá se met-less hGH. Bakteriálně exprimovaný hGH byl úspěšně podáván tisícům postižených dětí.

Vakcína viru hepatitidy B je produkována v kvasinkách expresí virového povrchového antigenu

Jedním z úspěchů moderní medicíny je příprava vakcín proti infekčním chorobám. Před příchodem techniky rekombinantní DNA byly používány dva typy vakcín.

1. Inaktivované vakcíny jsou chemicky usmrcené deriváty skutečných infekčních agens.
2. Atenuované vakcíny jsou živé viry nebo bakterie změněné tak, že se nemohou pomnožovat v hostitelském organismu do kterého byly injikovány.

Oba typy fungují tak, že představují povrchové proteiny (antigeny) pro B a T lymfocyty, které jsou podněceny k reakci jako by byly infikovány opravdovými patogeny, přičemž zneškodní tyto vakcinační kmeny dříve, než dojde k jakémukoliv poškození organismu (kap. 16). Avšak tyto typy vakcín jsou potenciálně nebezpečné, neboť mohou být kontaminovány skutečnými patogeny. Např. určitý počet dětí každoročně dostane obrnu po očkování polio vakcínou. Proto jedna z nadějných cest rekombinantních technik je příprava podjednotkových (subunit) vakcín, sestávajících výhradně z povrchového proteinu, na nějž odpovídá imunitní systém. Tyto vakcíny nepředstavují žádné riziko.

První podjednotková vakcína byla připravena proti viru hepatitidy B (HBV), který infikuje játra a způsobuje jejich poškození a v některých případech rakovinu. Virová částice je kryta povrchovým antigenem, HBsAg, a infikovaní pacienti mají velké agregáty tohoto proteinu ve své krvi. Dřívější experimenty naznačily, že tyto agregáty mohou představovat potentní vakcínu, bylo však třeba najít způsob, jak je lze produkovat v množstvích schopných vakcinovat velké populace proti HBV.

Komplexní lidské proteiny jsou tvořeny ve velkém měřítku v savcích buněčných kulturách.

Dosud diskutované proteiny jsou malé a svou strukturou a funkcí jednoduché. Jiné lékařsky významné proteiny jsou však mnohem komplikovanější a lze je jen obtížně izolovat z baktérií

nebo kvasinek. V těchto případech přicházejí v úvahu savčí tkáňové kultury, které jsou drahé, ale mohou tvořit plně aktivní proteiny. Proto řada firem připravuje fermentory pro velkokapacitní produkci kultur savčích buněk.

První látka produkovaná komerčně v savčích buněčných kulturách byl **tkáňový aktivátor plasminogenu, tPA, který je podáván při srdečním ataku u obětí**. Tkáňový plasminogen-aktivátor je proteáza, enzym který štěpí jiné proteiny. Působí tak, že štěpí plasminogen, inaktivní prekurzorový protein, za tvorby plazminu, jenž je sám o sobě silnou proteázou, která degraduje fibrin, protein, který tvoří krevní sraženinu. Rychlá aplikace aktivátoru po infarktu rozpouští sraženinu, která vede k ireverzibilnímu poškození srdečního svalu. Tkáňový aktivátor je komerčně produkován ze savčích buněk nesoucích stabilně integrovaný, vysoce amplifikovaný expresní vektor.

Další protein, který je produkován savčími buňkami v kulturách je **faktor VIII**, protein vyžadovaný pro normální srážení krve. Genetický defekt ve faktoru VIII je zodpovědný za hemofilii. Po transfúzi krve řada hemofiliků dostala AIDS. cDNA faktoru VIII byla klonována ještě předtím, než vědci zjistili, že krevní konzervy byly infikovány virem AIDS. Poznání bezpečnějšího zdroje faktoru VIII zvýšilo úsilí vytvořit tento protein rekombinantními technikami. Podobně jako tPA, je i faktor VIII velký a složitý protein a lze ho efektivně tvořit jen v savčích buňkách. Dostupnost rekombinantních proteinů ušetří příští generace hemofiliků před infekčním agens, které kontaminuje krevní konzervy.

Monoklonální protilátky

Hlavním omezením v terapeutickém použití protilátek je tvorba použitelné protilátky ve velkém kvantu. Původně byly zkoumány myelomy, což jsou tumory sekretující protilátky. Nebyl však znám způsob, jak přimět myelomy k produkci specifické protilátky. Tato situace se dramaticky změnila s vývojem technologie **monoklonálních protilátek**. Postup při tvorbě monoklonálních protilátek, neboli MABs, je na obr. Nejdříve je myš nebo krysa inokulována antigenem, vůči němuž je žádána protilátka. Jakmile začne zvíře imunologicky odpovídat, odebere se slezina, kde se nacházejí buňky tvořící protilátky (B-lymfocyty), a tyto slezinné buňky se zřuzují se specializovanými liniemi buněk myelomů (nádorové plazmatické buňky), které netvoří vlastní protilátky (nebo tvoří jednu nespecifickou – Hořejší). Výsledkem jsou hybridní buňky, hybridomy, které si uchovávají vlastnosti obou rodičů. Rostou rychle a trvale v kultuře jako myelomové buňky a tvoří protilátky specifikované lymfocyty ze zvířete, které bylo imunizováno. Z jednoho fúzního experimentu lze izolovat řadu hybridomů, které jsou pak skrínovány a hledají se ty, které tvoří velká množství hledané protilátky. Jakmile je jednou identifikován tento klon, je daná protilátka k dispozici v neomezeném množství. Monoklonální protilátky jsou již používány v širokém měřítku k diagnóze infekcí a rakoviny a pro monitorování léčby tumorů po radioterapii. Jsou rovněž zkoumány možnosti jejich využití k přímému působení na **nádory, záněty a imunitní poruchy**.

Abzymy

Jednou z nových aplikací technologie monoklonálních protilátek je tvorba **abzymů**, protilátek, které se chovají podobně jako enzymy a katalyzují chemické reakce. Enzymy katalyzují reakce **stabilizováním chemické struktury intermediátů mezi substrátem a produktem**, který se nazývá **transition state** (přechodný stav). Pokud je možné připravit monoklonální protilátky proti analogu transientního stavu - tj. molekuly podobající se transientnímu stavu chemické

reakce - pak mohou mít některé z těchto protilátek katalytickou aktivitu. Schopnost produkovat katalyzátory na míru může být značně prospěšná, zvláště pro chemický a farmaceutický průmysl. Důvod pro přípravu abzymů byla myšlenka, že pokud se připraví **protilátka proti intermediátu v transientním stavu**, měla by mít tentýž efekt jako enzym. Přirozeně se vyskytující enzymy mají omezený okruh specifity (substrátů), ale imunitní systém by měl být teoreticky schopný vytvoření abzymů s neomezenou specifitou. Hlavní překážka je to, že transientní stav je tak nestabilní, že prakticky neexistuje jako diskretní molekula. Proto byla identifikována stabilní molekula (fosfonátový ester), která imituje transientní stav esterové hydrolýzy. Tento analog transientního stavu je příliš malá molekula, než aby fungovala jako silný antigen; proto byl navázán - konjugován na nosičový protein. Konjugát byl pak injikován do laboratorní myši. Slezinné buňky z imunizovaných myši byly zřizovány s myelomovými buňkami za tvorby klonů (hybridomů) produkujících protilátky.

Protilátky z izolovaných klonů byly testovány na jejich schopnost vázat analog transientního stavu. Některé z protilátek, které se vázaly na analog transientního stavu, katalyzovaly hydrolýzu esterů asi 1000x rychleji než v nekatalyzované reakci.

Rostliny exprimující virový plášťový protein jsou rezistentní k infekcím

Rostlinné viry jsou vážným problémem pro většinu plodin. Dochází k snížení výnosů, růstové rychlosti a kvality. Skrze standardní genetický trik, zvaný cross-protection, infekce rostliny virem, který má jen mírný vliv na rostlinu, se rostlina chrání před infekcí mnohem agresivnějším kmenům. I když není mechanismus křížové protekce úplně znám, zdá se že za ochranu odpovídá určitý virem kódovaný protein. Klonování cDNA tohoto proteinu dává možnost bližšího poznání tohoto jevu.

První pokus byl proveden s tabákem. VTM je RNA virus asi 6,5 kb. Klonováním cDNA viru bylo zjištěno, že genom kóduje 4 polypeptidy: dvě replikázové podjednotky, plášťový protein a protein nutný pro přenos z buňky do buňky. Transgenní rostliny exprimující plášťový protein VTM (coat pr CP) byly připraveny pomocí *A. tumefaciens* genového přenosu. Vyrostlé rostliny exprimovaly virový CP a byly rezistentní k infekci. Zatímco kontrolní rostliny získaly symptomy za 3-4 dny, transgenní CP-exprimující rostliny byly k infekci rezistentní až 30 dní. Avšak oddálení symptomů bylo kratší při aplikaci většího množství superinfikujících virů (větší doze). Podobné chování bylo pozorováno u přirozené cross-protektce. Schopnost rostliny odolávat infekci se zdá být v korelaci s hladinou CP exprese. Protekčním agens se ukázal sám CP spíše jak virová RNA. V některých případech se ukázalo, že produkce CP jedním virem má za následek rezistenci k příbuzným virům. Nověji se ukázalo, že účinná ochrana plodin jako je rajče, alfalfa a brambor může být dosažena expresí CP.

Transgenní exprese cDNA u tabáku kódující replikázový protein VTM dává vznik rovněž rezistentním rostlinám. Překvapivě se zdá, že ochrana je způsobena transkribovanými RNA molekulami a ne proteinem. Další přístupy jsou exprese ribozymů a štěpících virových RNAs a transgenní exprese antisense RNA.

Ochrana rostlin před hmyzem - rostliny exprimující bakteriální toxin

Ochrana rostlin před hmyzem stojí miliardy. Nejčastější ochranou jsou chemické insekticidy. Ty jsou však často jedovaté a ničí užitečný hmyz. Přírodní mikrobiální pesticidy, jako jsou určité druhy *Bacillus thuringiensis* (Bt) byly v omezeném množství používány po 30 let. Po sporulaci tyto bakterie produkují krystalický protein, který je toxický pro larvy řady hmyzů. Toxinový protein neškodí necilivým hmyzům a nepůsobí na obratlovce. Naneštěstí je produkce bakteriálních spor pro komerční využití nesnadná a ochranný účinek je krátkodobý.

Znalost tohoto přirozeného systému vedla k vývoji rostlin, které exprimují Bt toxin uvnitř jejich buněk. Krystalický protein je normálně exprimován jako velký, inaktivní pro-toxin asi 1200 aa dlouhý. Proteázy ve střevě hmyzu štěpí protein na aktivní 68000 D fragment. Toxin působí vazbou na receptory na povrchu buněk středního střeva a blokuje funkci těchto buněk. Tabák a rajče exprimující Bt toxin usmrcovaly larvy tabacco hornworms. Avšak díky nízké expresi nepůsobil toxin na jiný škodlivý hmyz, jako je cotton bollworm. V současné době jsou bavlníky chráněny použitím silného promotoru ke zvýšení exprese mRNA pro Bt a modifikací části sekvence kódující Bt toxin, takže je účinně translatována v rostlinách. Tyto rezistentní bavlníkové rostliny mají komerční využití, pokud prošly testem na zkušebních polích. V současné době je snaha změnit toxický protein tak, aby byl účinný na širší spektrum hmyzích škůdců (toxiny z různých kmenů bacilů, mutageneze in vitro)..

Transgenní rostliny tolerující herbicidy

Přítomnost plevelu na polích s plodinami snižuje výtěžek až o 10%. Jelikož plevel není nic jiného než nežádoucí rostlina, je obtížné zahubit jej bez ovlivnění plodiny. Herbicidy - ničitelé plevelů, nejsou příliš selektivní, takže se používají buď před výsevem plodin nebo na základě rozdílného příjmu herbicidu plevelem a plodinou. Se schopností zavést do DNA rostliny je snaha vytvořit rostliny tolerantní k herbicidům třemi strategiemi: zvýšením hladiny cílového enzymu pro určitý herbicid, expresí mutantního enzymu, který není ovlivněn herbicidem, nebo expresí enzymu který detoxikuje herbicid. Z velkého počtu herbicidů dnes používaných bylo charakterizováno jen několik buněčných cílů, na které tyto působí. Herbicid glyfosát (v Roundapu), zabíjí rostliny inhibicí 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntetázy (EPSPS), chloroplastového enzymu v dráze poro biosyntézu esenciální aromatické aa. Roundap je dnes velmi využíván, protože působí v malých koncentracích, má široké spektrum na plevely a je rozkládán půdními mikroorganismy. Je rovněž mnohem bezpečnější pro životní prostředí než dřívější herbicidy - je rozkládán. Přenos klonované cDNA kódující EPSPS z petúnie do rostlin zvyšuje hladinu enzymové aktivity na asi 20 násobek ve srovnání s netransgenními rostlinami. Nadprodukce enzymu dovoluje transgenním petúniím růst za přítomnosti čtyřnásobné hladiny herbicidu než rostliny divokého typu. Bohužel rychlost růstu transgenních rostlin je však po působení herbicidu nižší.

Další strategií pro tvorbu herbicid-tolerantních rostlin používá mutantních forem bakteriálního EPSPS enzymů obsahujících aminokyselinové substituce, které je činí méně citlivé k inhibici glyfosátem (obr. 24-3). Geny kódující tyto mutantní enzymy byly klonovány z glyfozát-rezistentních bakterií a exprimovány v rostlinách. V laboratorních studiích tyto transgenní rostliny vykazovaly toleranci k hladinám glyfozátu, která usmrcovala rostliny divokého typu. Rostlinný EPSPS enzym je syntetizován v cytoplazmě a je translokován do chloroplastů proteiny, které rozpoznávají a vážou aminoterminální sekvenci aminokyselin, zvanou transit sekvence. Aby se zavedl bakteriální enzym do chloroplastů transgenních rostlin, genový segment kódující rostlinnou transit sekvenci byl fúzován ke kódující sekvenci bakteriálního enzymu. Biochemická

analýza bakteriálních enzymů ukázala, že mutace, které zprostředkují toleranci k glyfozátu, redukují aktivitu EPSPS.

Texty k vybraným obrázkům

Produkce subjednotkové vakcíny v kvasince. Virus hepatitidy B (HBV) obsahuje genom o velikosti 3,2 kb, který byl klonován a sekvencován. V krvi pacientů se objevují jak celé viry, tak i menší částice tvořené z povrchových antigenů (HBSAg). K přípravě vakcíny proti HBV, kterou bylo obtížné připravit ve tkáňové kultuře, byl gen kódující HBS-Ag klonován do expresního vektoru *Sacch. cerevisiae*. Transkripce probíhala ze silného promotoru genu pro alkoholdehydrogenázu I. Terminátor transkripce byl umístěn za klonovaný gen. Vektor obsahoval počátek replikace a markery jak pro bakterie, tak pro kvasinky. Kultura kvasinek byla inkubována ve fermentoru do vysoké hustoty za současné produkce vysokého množství HGSAg, který po purifikaci agregoval do částic o velikosti asi 20 nm, podobajících se částicích nacházených v krvi pacientů.

Tvorba tkáňového plasminogenového aktivátoru (tPA). cDNA lidského tPA byla ligována do expresního vektoru obsahujícího silný promotor a terminátor. Vektor byl stabilně transfektován do savčí buněčné linie. Původní transfektanti (transformanti) sekretovali tPA do media, ale sekrece byla slabá. Buňky exprimující tPA ve vysoké hladině byly získány po působení metotrexátu, který selektuje buňky a amplifikovaným genem dhfr umístěným ve vektoru společně s expresní kazetou tPA (gen dhfr zodpovídá za rezistenci k metotrexátu). Linie buněk exprimující velká kvanta tPA byly inkubovány ve fermentoru a tPA byl izolován z media purifikací.

Tvorba monoklonální protilátky (MAb). Myš je inokulována antigenem (Ag), proti němuž má být připravena monoklonální protilátka. Antigen stimuluje proliferaci lymfocytů vytvářejících protilátky vůči danému antigenu. Lymfocyty jsou odebrány ze sleziny a in vitro fúzovány s myelomovými buňkami působením PEGu. Hybridní buňky jsou selektovány na HAT mediu. Jelikož myelomové buňky postrádají enzym HPRT a proto v tomto mediu hynou, pokud nefúzují s lymfocyty, které tento enzym exprimují. Nezfúzované lymfocyty postupně odumírají, neboť nemají schopnost stabilně ve tkáňové kultuře růst. Jednotlivé hybridní buňky (hybridomy) jsou přeneseny do jamek v destičce a kultivovány několik dní. V jamkách se pak stanoví titer protilátek vázajících se na daný antigen. Pozitivní buňky se pěstují ve tkáňových kulturách, kde produkují žádanou monoklonální protilátku.

Přímé klonování cDNA protilátek pomocí PCR. K přípravě protilátek metodami genového inženýrství je třeba stanovit sekvence variabilních domén Ig. To lze provést buď stanovením aminokyselinové sekvence z řetězců H a L, jednodušší je však stanovení sekvence cDNA dané oblasti. V minulosti byla cDNA knihovna připravena z mRNA hybridomů produkujících monoklonální protilátku a skríníngem probou připravené z konstantní oblasti genů H a L. Později byla vyvinuta metoda využívající PCR. Srovnáním velkého počtu protilátek byly identifikovány aminokyseliny často se vyskytující na aminoterminálních koncích protilátek. Na základě této informace byl připraven soubor degenerovaných primerů odpovídajících všem možným sekvencím v této oblasti. Jelikož aminokyselinové složení konstantních oblastí různých protilátek je téměř identické, je pro 3' konec zapotřebí jen jeden PCR-primer, jak pro H tak pro L řetězec.

Pro přímé klonování protilátkové cDNA se tato cDNA připraví reverzní transkripcí mRNA z hybridomových buněk, pak se smíchá s dvojicemi primerů a podrobí se PCR (na obr. je uvedena amplifikace H řetězce). Jestliže není známa sekvence jeho aminoterminálního konce, založí se PCR s každým z různých 5' primerů, dokud není získán příslušný amplifikovaný fragment. To lze obejít tak, že se stanoví sekvence prvních šesti až sedmi aminokyselin protilátky - to postačuje k syntéze jedinečného 5' primeru, který se pak použije pro PCR.

Vytvoření kombinatorické knihovny protilátek exprimujících se v *E. coli*.

Ze sleziny imunizovaného zvířete se odeberou lymfocyty, izoluje se mRNA a reverzní transkripcí se připraví cDNA. Řetězce H a L se odděleně amplifikují PCR podle schematu a ligují do lambda vektoru. Připraví se dvě knihovny, jedna obsahující geny pro H řetězce a druhá pro L řetězce (tento krok je na obrázku vynechán). Z každé knihovny je izolována fágová DNA, a H a L sekvence jsou vzájemně ligovány a naklonovány do kombinatorické knihovny. Každý fág nyní obsahuje náhodné páry H a L řetězců (ve formě cDNA) a po infekci *E. coli* exprimuje oba řetězce. Jelikož sekvence H obsahuje pouze variabilní oblast a první konstantní oblast, je tvořená protilátka označena jako Fab (antigen binding fragment). Váže se k antigenu stejně účinně jako úplná protilátka, ale postrádá efektorovou oblast. K identifikaci protilátky, která rozpoznává určitý antigen, je knihovna vyseta na plotny a po lyzi buněk jsou protilátky přeneseny na nitrocelulózový filtr. Filtry jsou inkubovány se značenými antigeny a pak promyty. Radioaktivní skvrny pak identifikují plaky, které obsahují fágy vytvářející protilátky vázající se na daný antigen. V současné době se používá fágový displej.

Genové inženýrství protilátek. Základní struktura myší monoklonální protilátky (MAB) se podobá lidské. Existuje zde však řada rozdílů v aminokyselinových sekvencích protilátek myši a člověka. Tyto sekvencní rozdíly zodpovídají za imunogenitu myších Mab u člověka. Chimerní MAB se konstruuje ligací fragmentu cDNA kódujícího myší V_L a V_H domény na fragment kódující C doménu lidské protilátky. Jelikož se C domény neúčastní na vazbě s antigenem, udrží si chimerní protilátka svou antigenní specifitu jako původní myší MAB, ale podobá se svou sekvencí více lidské protilátce. Chimerní MAB sice obsahuje ještě určité sekvence z myši, může však přesto být imunogenní (tj. navozovat v člověku tvorbu protilátek proti této MAB). Humanizované MAB obsahují pouze ty aminokyseliny myších protilátek, které jsou nezbytné pro rozpoznání antigenu. Takové protilátky jsou připravovány tak, že se do lidských protilátek zabudují pouze ty úseky z myších protilátek, zodpovídajících za vazbu k antigenu (CDR = complementarity determining regions).

Protilátky s dvojitou specifitou. Použitím rekombinantních technik lze ze dvou cDNA, připravených z genů pro dvě různé protilátky vázajících dva různé antigeny, vytvořit protilátku, v níž každé z ramen rozpoznává různý antigen. Tak je možné rekombinovat protilátky např. k povrchovému antigenu na tumorových buňkách a k proteinu nacházejícímu se na cytotoxických T-buňkách - tím se vytvoří protilátka s dvojitou specifitou, která pak váže každým ramenem jinou buňku a usnadňuje usmrcování tumorových buněk.