

Molekulární biotechnologie č.12. Očkovací látky

Využití poznatků molekulární biotechnologie - pokračování

Využití molekulární biotechnologie – v mnoha oblastech

- Molekulární diagnostika
- Bioremediace a využití biomasy
- Využití škrobu a sacharidů, utilizace celulózy
- Mikrobiální insekticidy
- Baktérie stimulující růst rostlin
- Vakcíny a terapeutické proteiny.
- Příprava a využití transgenních rostlin. Nové potraviny.
- Příprava a využití transgenních zvířat.
- Genová terapie lidských somatických buněk.

Vakcíny, očkovací látky

- Očkování vede k ochraně před patogeny tím, že si organismus vytvoří imunologickou odolnost vůči infekci
- V očkovaném organismu se indukuje tvorba protilátek, které zabrání proliferaci agens a vzniku choroby
- Očkovací látky bývají buď inaktivované nebo atenuované infekční agens (baktérie, viry) s nezměněnou schopností indukovat tvorbu protilátek

Překážky při klasické přípravě očkovacích látek

- Ne všechny patogenní organismy mohou být kultivovány *in vitro* nebo v dostatečně velkých objemech tak, aby mohly být použity pro přípravu očkovacích látek.
- Při kultivaci patogenních organismů ve velkém je třeba dodržovat velmi přísná bezpečnostní pravidla.
- Atenuované (oslabené) kmeny mohou revertovat na infekční formy
- Inaktivace může být neúplná.
- Životnost vakcín často závisí na způsobu uchovávání (zmrazování), to komplikuje jejich použití např. v tropech.
- Kultivace na tkáňových kulturách (u virů) bývají drahé.
- Proti všem chorobám očkovací látky nemáme a navíc vznikají choroby nové.

Nové strategie při přípravě očkovacích látek

- Využívají technologie rekombinantní DNA.
- Tab. Přehled lidských patogenních agens , proti nimž jsou k dispozici rekombinantní vakcíny

Rekombinantní vakcíny

Table 9.1 Human disease agents for which recombinant vaccines may be available by the year 2000.

Pathogenic agent	Disease: Major clinical features
Viruses	
Varicella-zoster	Chickenpox: mild internal and external lesions
Cytomegalovirus	Infection in infants and immunocompromised patients
Dengue	Hemorrhagic fever
Hepatitis A	High fever, liver damage, low fatality
Hepatitis B	Long-term liver damage, high fatality
Herpes simplex type 2	Genital ulcers
Influenza A and B	Acute respiratory disease
Japanese encephalitis	Encephalitis
Parainfluenza	Inflammation of the upper respiratory tract
Rabies	Encephalitis
Respiratory syncytial	Upper and lower respiratory tract lesions
Rotavirus	Acute infantile gastroenteritis
Yellow fever	Lesions of heart, kidney, and liver
Human immunodeficiency (HIV)	Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)
Bacteria	
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera
<i>E. coli</i> enterotoxin strains	Diarrheal disease
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorrhea: sexually transmitted disease
<i>Haemophilus influenzae</i>	Meningitis and septicemic conditions
<i>Mycobacterium leprae</i>	Leprosy: loss of peripheral nerve sensation and disfigurement
<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningitis: brain and spinal fluid infection
<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: muscle spasms of jaw and neck
<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: dysentery and liver damage
<i>Trypanosoma</i> spp.	Sleeping sickness
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Filariasis: inflammation of lymph vessels and glands

Rozlišujeme

- Subjednotkové vakciny
- Peptidové vakciny
- Živé rekombinantní vakcíny
- Živé rekombinantní vektorové vakciny
- Atenuované vakcíny
- Antiidiopové vakcíny

Příprava virových subjednotkových vakcin

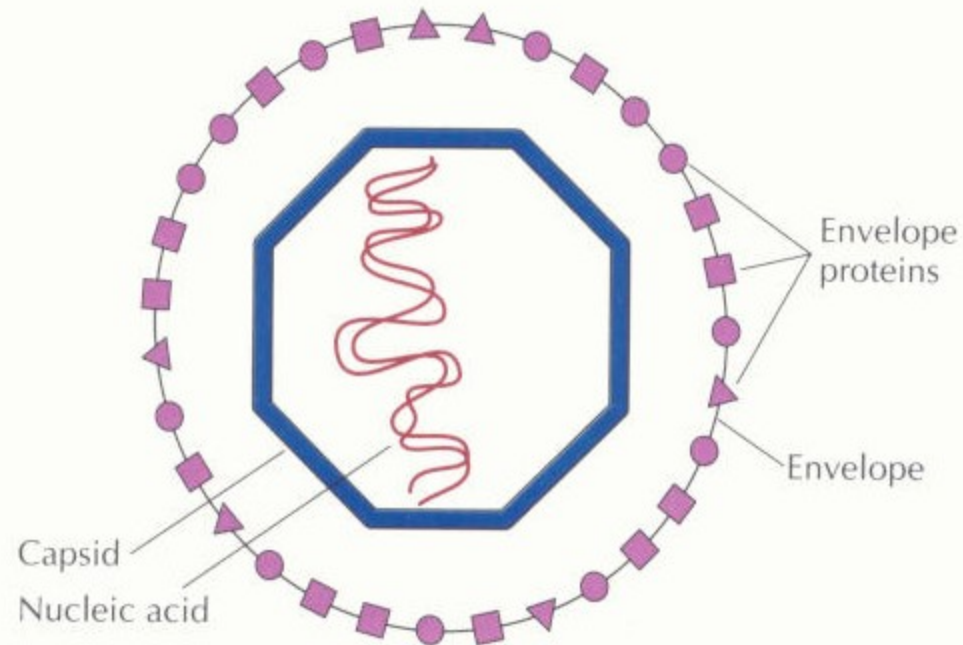
- Geny, které kódují antigenní determinanty patogenních virů jsou klonovány do expresních vektorů
- A exprimovány v bakteriálních buňkách (*E. coli*, *S. cerevisiae*)
- Klonovaný genový produkt je purifikován a použit pro očkování.
- Příklad: gen kódující obálkový glykoprotein D virusu herpes simplex. Gen byl upraven tak, aby se syntetizoval protein bez transmembránové domény a byl transportovaný do růstového média. Obr.
- Subjednotková vakcina byla připravena také vůči kulhavce a slintavce

Příklad

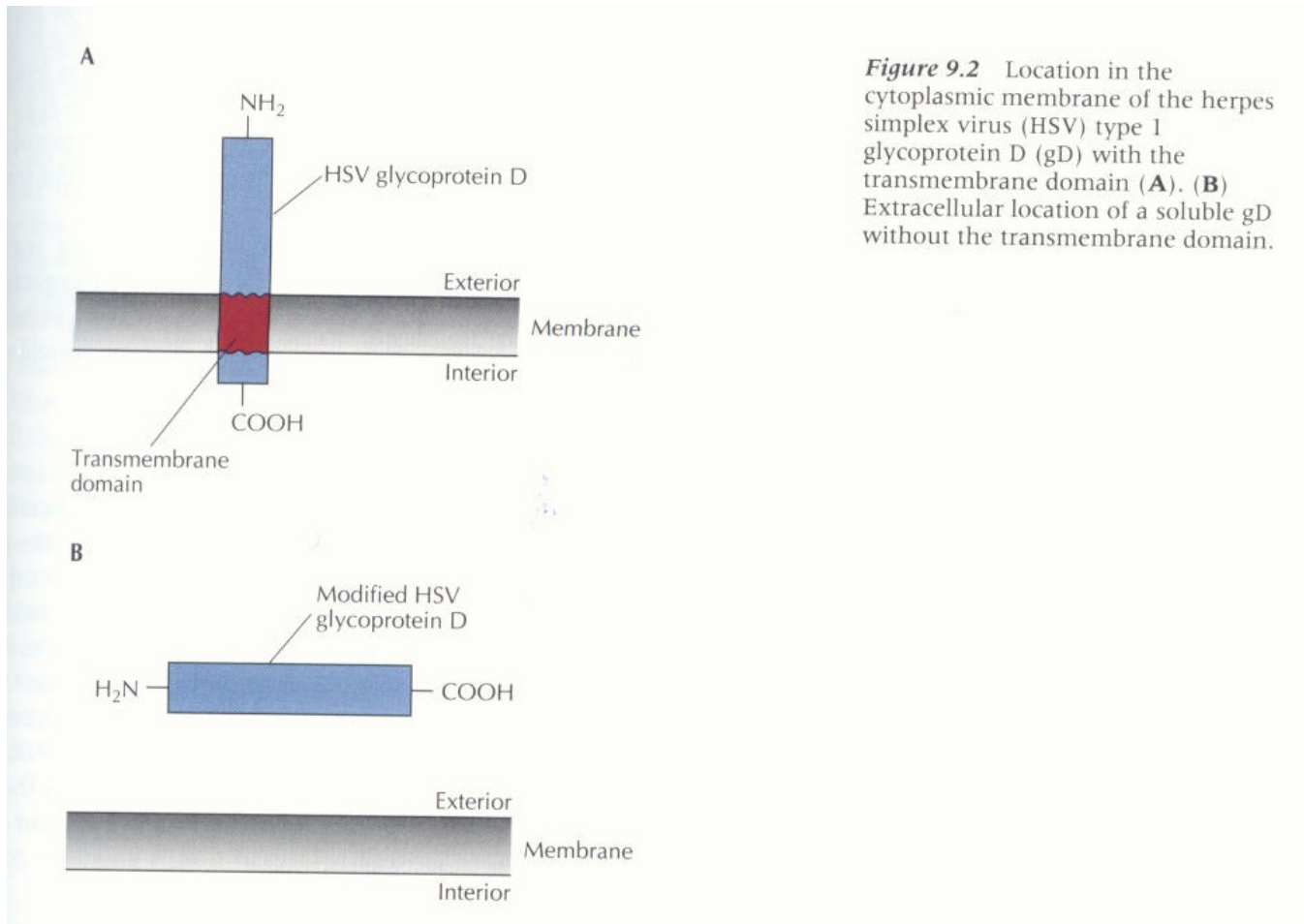
- Gen kódující obálkový glykoprotein D virusu herpes simplex.
- Gen byl upraven tak, aby se syntetizoval protein bez transmembránové domény a byl transportovaný do růstového média.
Obr.

Schéma živočišného viru

Figure 9.1 Schematic representation of an animal virus. Viruses generally consist of a relatively small nucleic acid genome (3 to 200 kb of either double- or single-stranded DNA or RNA) within a viral protein capsid that is sometimes, depending on the virus, surrounded by a protein-containing viral envelope (membrane).



Lokalizace glykoproteinu D



Subjednotková vakcína

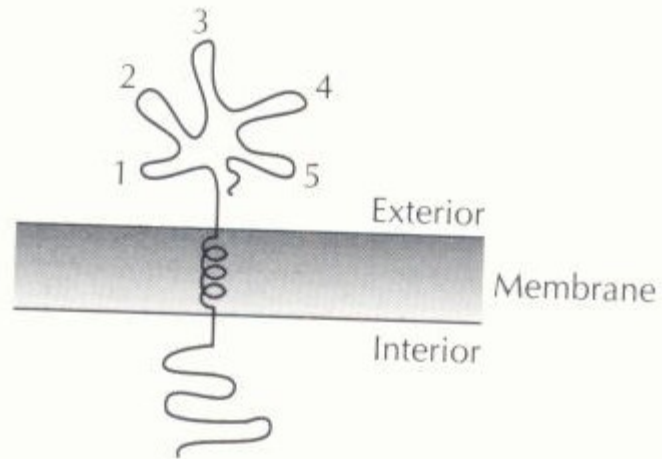
- byla připravena také vůči kulhavce a slintavce

Peptidové virové vakcíny

- Klonujeme-li hlavní antigenní determinantu (jen část genu) získáme peptidovou vakcínu
- Využívá se poznatku, že pouze ty části proteinu, které jsou lokalizovány na povrchu virusu a které jsou dostupné protilátce jsou imunologicky významné.

Obálkový protein s 6 epitopy

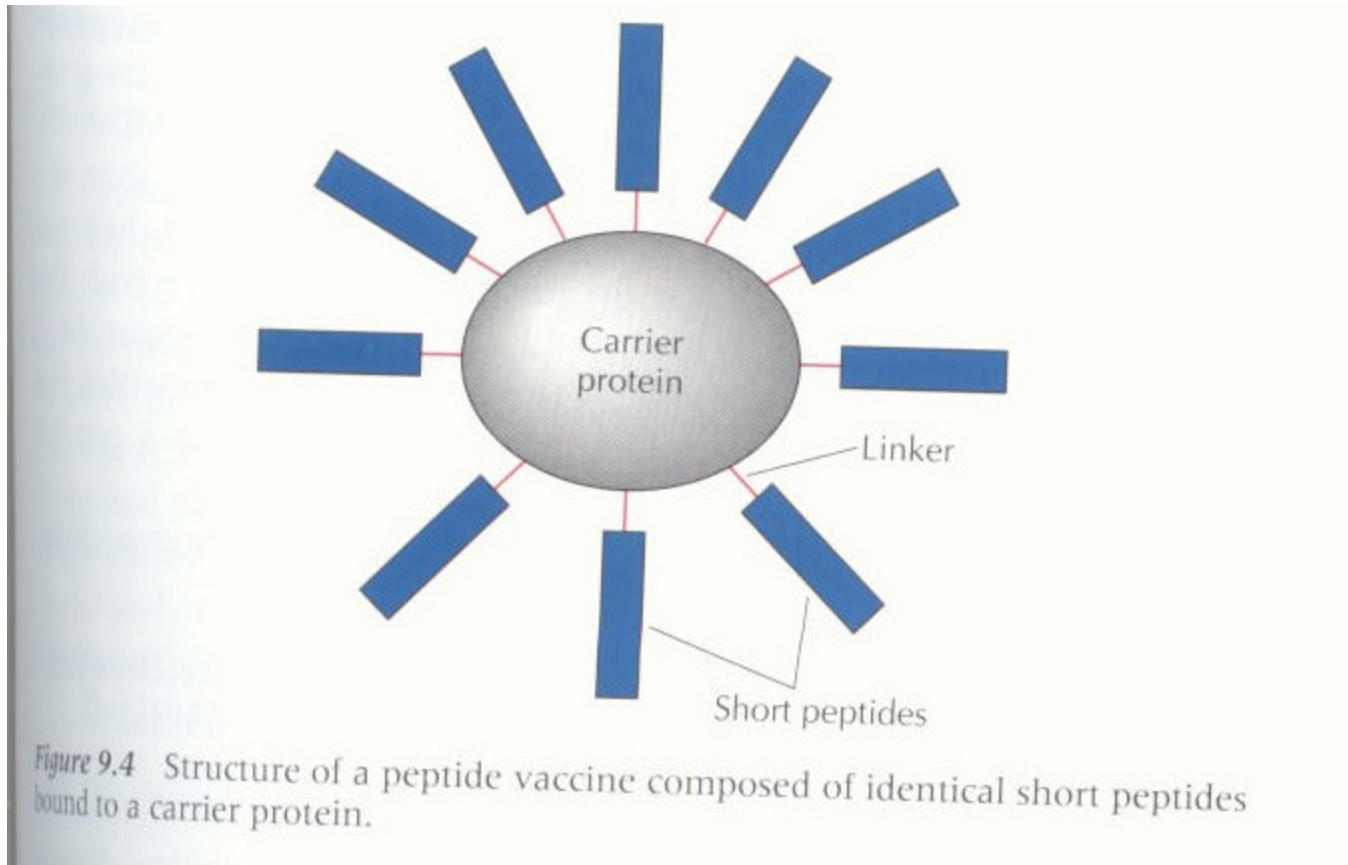
Figure 9.3 Generalized envelope-bound protein with external epitopes (1 to 5) that might elicit an immune response.



Peptidové vakcíny lze připravit také chemickou cestou

- peptid VP1 obsahující AK 141-160 virusu, Obr.
- Příklad: peptidová vakcína vůči virusu slintavky.

Struktura peptidové vakciny



Peptidová vakcína

- byla připravena i jako fuzní protein (DNA kódující peptid byla fúzována s DNA kódující povrchový protein virusu hepatitidy B – fuzní protein byl vysoce imunogenní a vytvářel částice 27 nm)

Nevýhody subjednotkových a peptidových vakcin

- Jediný epitop nemusí být dostatečně imunogenní
- Peptid musí být ve stejné konfiguraci jako epitop intaktní virové částice

Živé rekombinantní vakcíny - atenuované

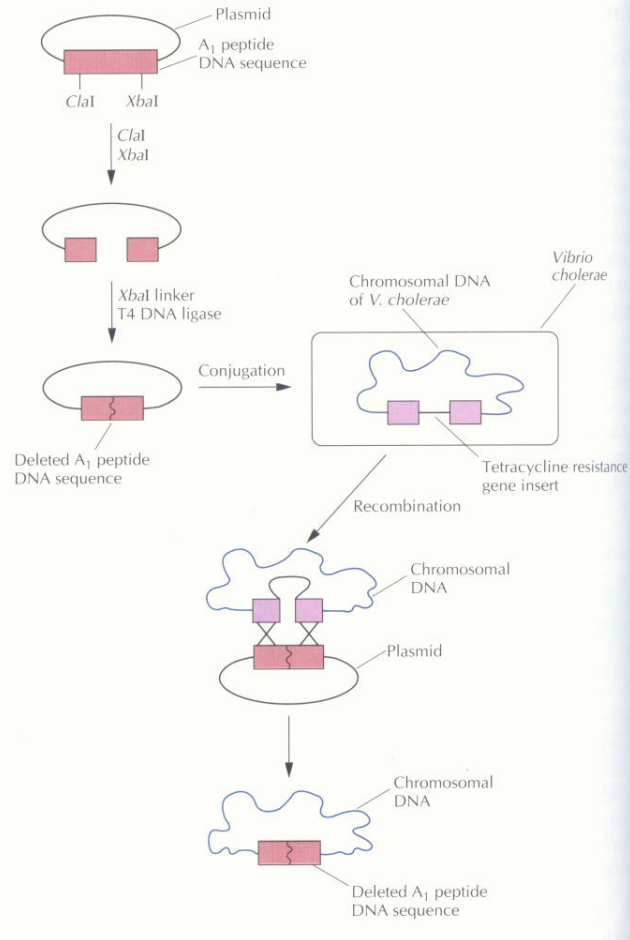
- Immunologicky aktivní, neinfekční agens lze připravit delecí genů kódujících virulentní faktory.
- Obsahuje-li organismus tuto delecii, nemůže revertovat na infekční formu.
- Bývají účinnější než subjednotkové vakcíny.
- Vakcíny lze podávat per orálně

Atenuovaná vakcína vůči *Vibrio cholerae*

- deletována byla část DNA kódující protein A1 (enterotoxin). Obr.

Delece genu kódujícího toxin

Figure 9.5 Strategy for deleting part of the cholera toxin A₁ peptide DNA sequence from a strain of *Vibrio cholerae*.



Atenuovaná vakcína vůči bakteriím rodu *Salmonella*

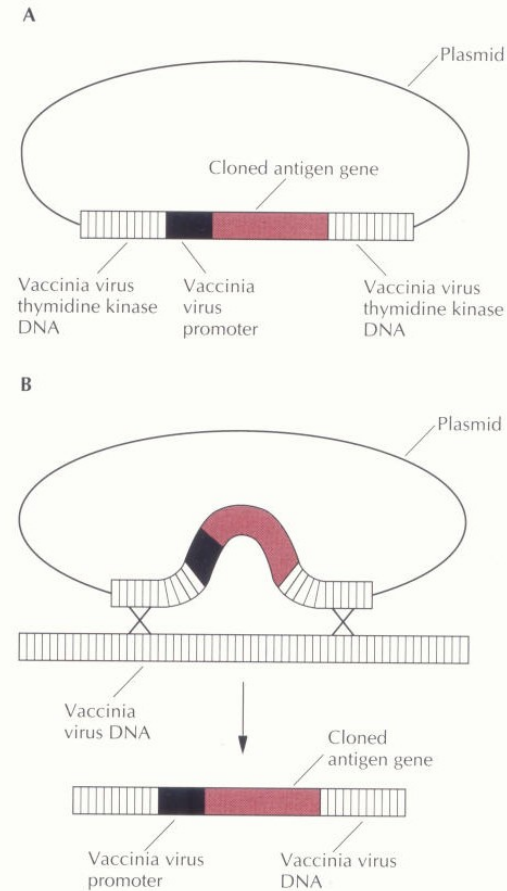
- původce 85% všech alimentárních infekcí.
- Kmen nese delece 2 genů, což výrazně snižuje pravděpodobnost reverze (gen *aro* pro biosyntézu aromatických sloučenin, gen *pur* pro metabolismus purinů).
- Virulence kmene s delecemi je milionkrát nižší než virulence původního kmene.

Živé rekombinantní vakcíny – vektorové vůči virovým infekcím

- Jedná se o nepatogenní virus s včleněnou antigenní determinantou (genem) patogenního viru.
- Výhoda: patogenní virové částice nejsou v očkovací látce vůbec přítomny
- Vektorové vakcíny nesou např. následující antigeny: G protein virusu vztekliny, povrchový antigen viru hepatitidy B, Sinbisova virusu, NP a HA proteiny chřipkového virusu, N a G protein virusu vesikulární stomatitidy, glykoproteiny virusu herpes simplex.

Integrace genu kódujícího virový antigen do vektoru

Figure 9.6 Method for the integration into vaccinia virus of a gene whose protein product, generally a viral antigen, elicits an immunological response. **A.** Structure of a plasmid carrying a cloned expressible antigen gene. **B.** A double cross-over event results in the integration of the antigen gene into vaccinia virus DNA.



Živé rekombinantní vakcíny – vektorové vůči bakteriálním infekcím

- Jedná se o nepatogenní organismus s včleněnou antigenní determinantou (genem) patogenní bakterie.
- Výhoda: patogenní částice nejsou v očkovací látce vůbec přítomny.

Používají se bičíkaté nepatogenní bakterie

- Bičíky jsou imunogenní
- jsou tvořeny proteinem flagelinem
- bičík nepatogenní bakterie může nést až 3 různé epitopy patogenních bakterií
- Tak lze připravit multivalentní bakteriální vakcínu.
- Tato strategie byla použita při přípravě očkovací látky vůči *Vibrio cholerae* a *Mycobacterium tuberculosis*.

Proč vakciny vůči bakteriálním infekcím

- Ne všechny bakteriální infekce se dají léčit ATB
- Rozsáhlé používání ATB vedlo k rozšíření bakteriálních kmenů rezistentních na ATB
- ATB nemusí být pacient vyléčen úplně
- S ATB se hůře manipuluje v tropech.

Anti-idiotypové vakcíny

- Jedná se o neobvyklé biochemické „mimikry“
- Anti-idiotypové vakcíny: Protilátky připravené vůči jiným protilátkám mohou vykazovat imunologické vlastnosti původního antigenu tj. napodobují specifický antigen.
- Lze je použít tehdy, když
- Se antigenní materiál nese snadno získává
- je cílová molekula (organismus) slabě imunogenní
- Je velmi nebezpečné nebo obtížné patogenní organismus kultivovat
- Když antigen není protein.

Anti-idiotypové protilátky

- byly jako vakciny připraveny vůči původci spavé nemoci myší (*Trypanosoma rhodesiense*) a vůči původci kokcidiózy u kuřat (*Eimeria tenella*).

Vakcinace pomocí DNA – genetická imunizace

- představuje novou strategii použití vakcin
- Klonovaný gen (DNA) kódující antigen je vnesen do buněk organismu (zvíře, člověk)
- U myši se ve více než 75% případů gen inkorporoval do chromosomální DNA. Poté docházelo k syntéze proteinu (antigenu), který aktivoval tvorbu protilátek.

Genetickou imunizací

- lze obejít časově a ekonomicky náročnou proceduru purifikace antigenu či konstrukce jiného typu vakcíny.
- Postup byl ověřován při získávání protilátek vůči virusu hepatitidy B, rabies virusu, různým patogenním bakteriím a parazitům.
- Obr. Výhody genetické imunizace, přežívání myší, částice s navázanou DNA

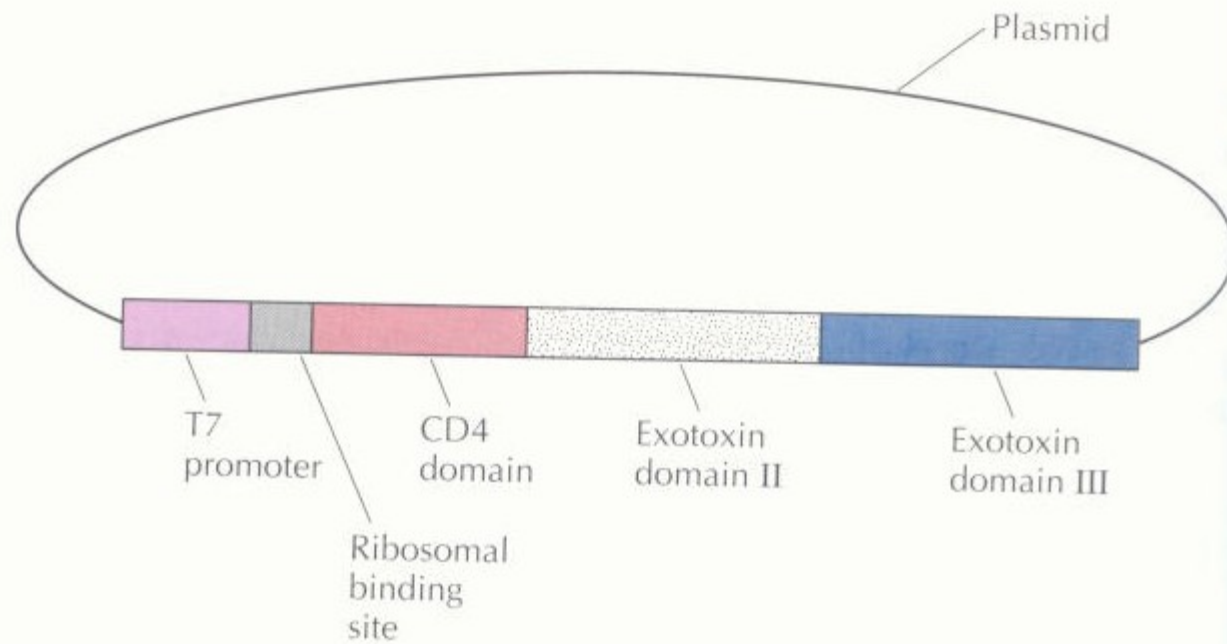


Figure 9.12 Genetic construction of a CD4-*Pseudomonas* exotoxin A fusion protein. The T7 promoter is from the *E. coli* bacteriophage T7.

Nukleové kyseliny jako terapeutická agens

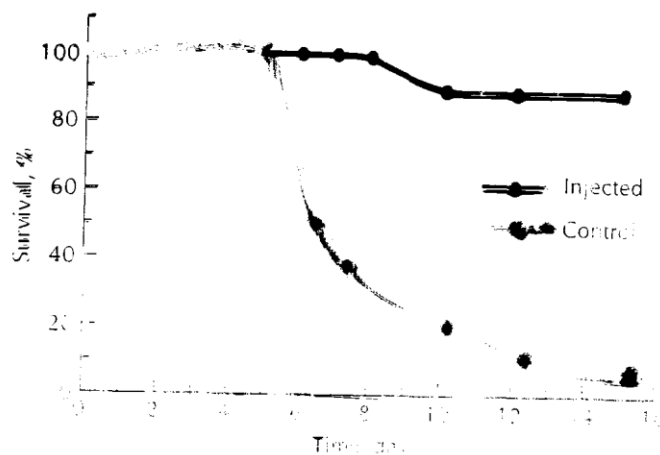
- Antisens RNA
- Antisens oligonukleotidy
- Ribozymy – přirozeně se vyskytující katalytické RNA molekuly (RNA metalloenzymy)
- Deoxyribozymy (DNA s katalytickou aktivitou nebyla v přírodě objevena, avšak lze ji připravit chemicky)
- Aptamery – potenciální terapeutické agens, 15 až 40 nukleotidů dlouhé molekuly DNA nebo RNA, které se pevně vážou k cílovým molekulám
- Interferující RNA (iRNA) – pro „gene silencing“

Table 11.3 Deleted genes and their function in the development of attenuated strains of *Salmonella* spp.

Deleted gene	Gene function
<i>galE</i>	Synthesis of lipopolysaccharide; decreases toxicity from galactose
<i>aroA</i> , <i>aroC</i> , or <i>aroD</i>	Synthesis of chorismate, an aromatic amino acid, and PABA precursor. PABA is involved in the synthesis of iron chelators.
<i>purA</i> or <i>purE</i>	Synthesis of purines
<i>asd</i>	Peptidoglycan and lysine biosynthesis
<i>phoP</i> and <i>phoQ</i>	Regulation of acid phosphatases and genes necessary for survival in the microphage
<i>cya</i>	Encodes adenylate cyclase, which is involved in cAMP synthesis
<i>crp</i>	Encodes cAMP receptor. Regulates expression of proteins involved in transport and breakdown of carbohydrates and amino acids.
<i>cdt</i>	Involved in tissue colonization by the bacterium
<i>dam</i>	Encodes DNA methylase. Appears to be a master switch for 20–40 different virulence genes.
<i>htrA</i>	Encodes a stress-induced polypeptide. Results in significantly reduced persistence in human tissues.

cAMP, cyclic AMP; PABA, *p*-aminobenzoic acid.

Figure 11.8 Survival of DNA-immunized mice. Injected mice were immunized with DNA that contained the influenza A virus nucleoprotein gene under the control of the Rous sarcoma virus promoter on an *E. coli* plasmid. The control mice were injected with plasmid DNA only. The x axis represents the number of days after the animals were challenged with the live influenza virus.



ve kombinovanu
plasmid *E. coli*.

gen kodující nukleoprotein virusu chríp
pod kontrolou promotoru viru Rousova

Figure 11.10 Schematic representation of the binding of plasmid DNA to the cationic surface of a polymeric microparticle.

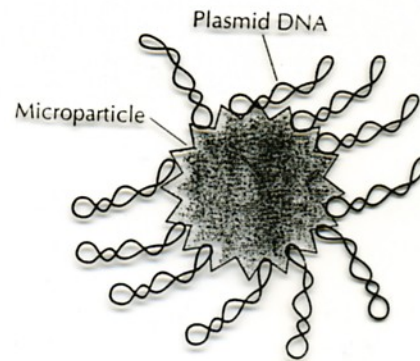
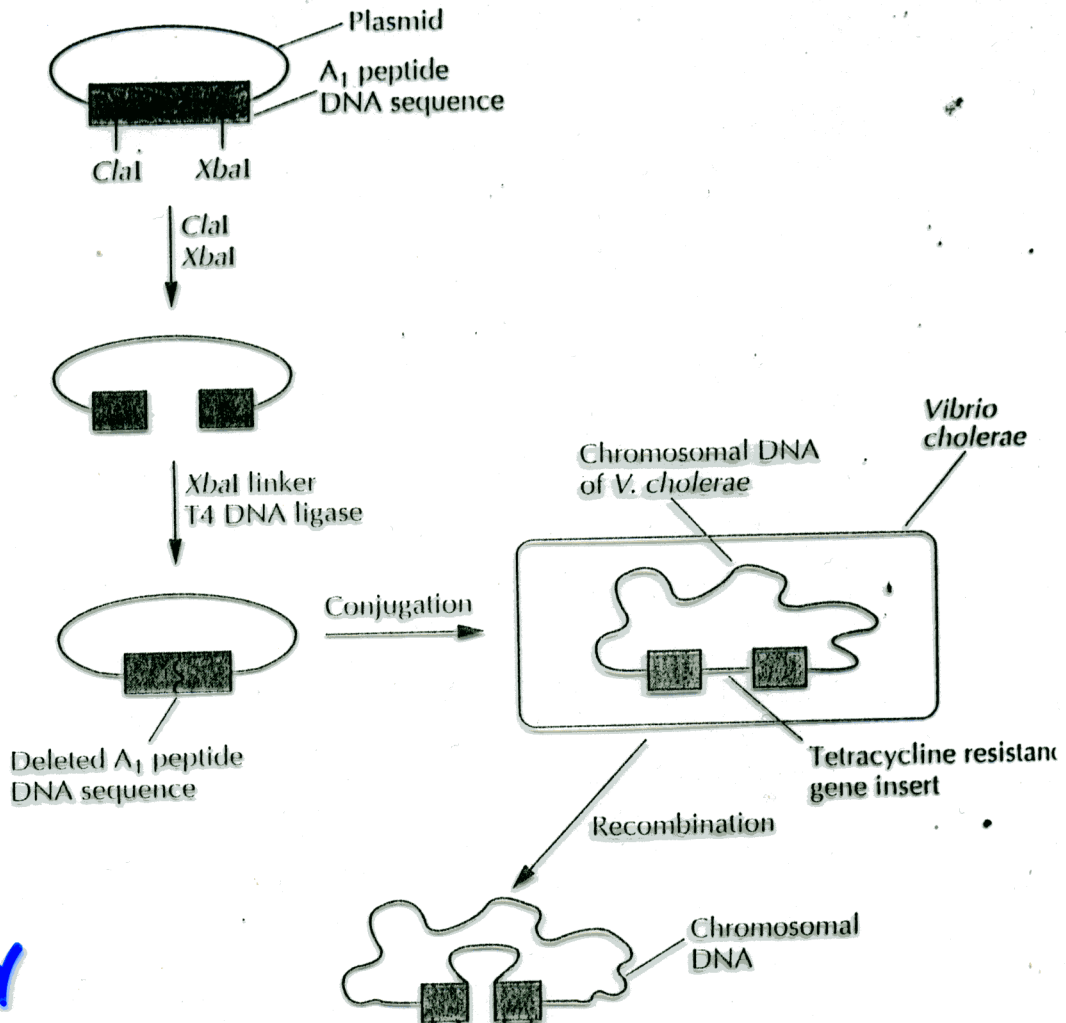


Table 11.2 Advantages of genetic immunization over conventional vaccines

- Cultivation of dangerous infectious agents is not required.
 - Since genetic immunization does not utilize any viral or bacterial strains, there is no chance that an attenuated strain will revert to virulence.
 - Since no organisms are used, attenuated organisms that may cause disease in young or immunocompromised animals will not be a problem.
 - Approach is independent of whether the microorganism is difficult to grow or attenuate.
 - Production is inexpensive because protein does not need to be produced or purified.
 - Storage is inexpensive because of the stability of DNA.
 - One plasmid could encode several antigens/vaccines, or several plasmids could be mixed together and administered at the same time.
-



A₁ peptide