
B I PROSPECT

Osmnáctý ročník
Číslo 3/2008

Adresa společnosti: VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka.Pokorna@vscht.cz, IČO 00570397, číslo účtu: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

**zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)**

a

**člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)**

Redakční rada

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor in Chief)

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Doc. Ing. Alena Čejková, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Milan Fránek, DrSc.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70, 621 32 Brno

Ing. Petra Lipovová, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Vladimír Vala
Ivax, Ostravská 29, 747 70 Opava

BIOPROSPECT

18th Volume
No. 3/2008

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both

research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech and Slovak Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech and Slovak biotechnologists.

For more information contact the editorial board or directly:

Ladislav Fukal, Ph.D. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 445 137

e-mail: fukall@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

po krátkém odechu při dovolených během ne příliš dlouhého léta jsme zase všichni ve víru mnoha povinností. Přesto doufám, že si najdete chvíli při které si přečtete náš Bioprospect. Jako obvykle bych Vám rád připomenul některé nedávné události i některé akce, které se budou v blízké budoucnosti odehrávat. Významnou událostí jistě bylo završení výstavby moderní budovy Ústavu molekulární genetiky AV ČR slavnostní otevřením nádherného velkého přednáškového sálu mezinárodní konferencí konané dne 26. 9. 2008. Jako přednášející byla pozvána řada významných vědců ze zahraničí. Současnou nabídku přednášek a seminářů lze nalézt na webové stránce ústavu (viz www.img.cas.cz). Z dalších významných domácích událostí bychom se rádi zmínili o snaze založit **klastr biochemických podniků** a institucí zaměřených na biotechnologie. V současné době se diskutuje forma, cíle a obecné zaměření takového klastru. Předpokládáme, že v příštím čísle Vám přinesem podrobnější informace o této iniciativě. Nemůžeme se také nezmínit o iniciativě CzechInvestu (www.czechinvest.org), který pořádá dne 6. 11. 2008 v Kolíně nad Rýnem **biotechnologický seminář**, jehož účelem je prohloubení česko-německých obchodních vztahů a získání znalostí o tomto sektoru. Dle našeho názoru je to výborná příležitost k získání kontaktů pro Vaše firmy. Účast na semináři je zcela zdarma, stejně jako možnost přinést prezentační materiály firmy či smlouvené schůzek. Ve dnech 14. – 17. 10. 2008 navštívila naši zemi tajvanská delegace a ve dnech 3. – 5. 11. 2008 budou uspořádány konference v Praze a Brně. Dále si Vás dovoluujeme informovat o konání v rámci jedinečné biotechnologické události ve střední Evropě BIOTEC 2008. Konference Gate2Biotech se uskuteční na brněnském výstavišti 22. října 2008 jako součást doprovodného programu mezinárodního veletrhu zdravotnické techniky, rehabilitace a zdraví – Medical Fair Brno. Další zajímavé akce domácí i zahraniční jsou prezentovány na portálu www.gate2biotech.cz. V současnosti lze také najít na webové stránce evropského biochemického kongresu (Praha 4. – 9. 7. 2009, www.FEBS2009.org) již kompletní program všech symposií. Významnou událostí pořádanou německými kolegy (Frei University Berlin) je „**Proteomic Forum**“, které se uskuteční ve dnech 29. 3. – 2. 4. 2009 v Berlíně (www.ctw-congress.de/ProteomicForum2009). Další zajímavou událostí v příštím roce je „**2nd Annual World Congress of Industrial Biotechnology 2009**“, který se proběhne ve dnech 5. – 7. 4. 2009 v Seulu v Jižní Koreji. Hlavním tématem kongresu je „**Innovative Biotechnology for**

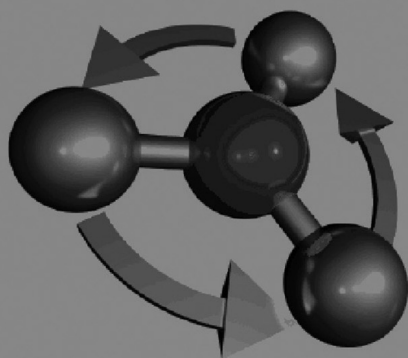
Sustainable Bio-economy“ (<http://www.bit-ibio.com>). V souvislosti s IBS 2008 v čínském Dalianu bylo oznámeno konání příštího IBS 2010 (tedy již za 2 roky) v italském Rimini v průběhu září ve spolupráci s Univerzitou v Bologni. Mluvíme-li o výhledu pak je jistě vhodné připomenout, že 5. česko-švýcarské biotechnologické symposium plánujeme na září 2011 ve spolupráci s ÚMG AV ČR s využitím jejich excelentních kongresových podmínek.

Jistě Vás bude zajímat, že „European Life Scientist Organization“ (ELSO) a European Molecular Biology Organisation (EMBO) oznámili na zářijovém mezinárodním kongresu v Nice, že se chtějí spojit v jednu organizaci, a to již do konce letošního roku. Vytváří se tak konkurence European Federation for Biochemistry and Molecular Biology (FEBS) a International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBM). Pokud se zajímáte o lipidomiku pak Vám doporučuji nahlédnout na webové stránky www.lipidomicnet.org, které jsou provozovány nositeli evropského projektu (21 výzkumných skupin a 5 SMEs) na toto téma. Časopis „New Biotechnoly“, vydávaný nakladatelstvím Elsevier, se stal oficiálním časopisem Evropské federace biotechnologie (EFB). Doporučujeme se o něj zajímat. Nemůžeme zapomenout ani na problematiku GMO. Podle tiskové zprávy Ministerstva zemědělství České republiky v r. 2008 pěstovalo již 171 pěstitelů geneticky modifikovanou Bt-kukuřici na 8 380 ha. Důvodem pro nárůst ploch s Bt kukuřicí jsou přetrvávající problémy našich pěstitelů se škůdcem zavíječem kukuřičným, proti kterému je Bt kukuřice odolná. Důležitým argumentem jsou i pozitivní tříleté zkušenosti českých pěstitelů. Tato kukuřice se používá výhradně ke krmným účelům a není tedy používána jako potrava. (<http://www.mze.cz/Index.aspx?ch=270&typ=1&val=42124&ids=0>).

Bt-kukuřice stále zůstává jedinou u nás komerčně pěstovanou GM-plodinou. Přes pozitivní zkušenosti se stále proti pěstování této plodiny v EU brojí. Naproti tomu v USA již byla předložena pravidla pro využití geneticky modifikovaných hospodářských zvířat pro potravinářské účely. Návrh je nyní ve stadiu diskusí a zdá se, že prvním povoleným živočichem k lidské výživě bude losos.

Jako vždy jsme pro Vás připravili několik zajímavých přehledných článků, které se Vám jistě budou líbit. Těšíme se na Vaše příspěvky do prosincového čísla.

Se srdečnými pozdravy
Váš Jan Káš



34th FEBS Congress

July 4 - 9, 2009

Prague, Czech Republic



Life's Molecular Interactions

- Molecular Interactions
- Social Life of the Cell
- Organism, the Network of Interactions



Federation of European
Biochemical Societies



Czech Society for Biochemistry
and Molecular Biology

Latest information available on www.febs2009.org

TERAPEUTICKÁ A PATOLOGICKÁ FÚZE NÁDOROVÝCH BUNĚK S IMUNITNÍMI BUŇKAMI – NÁDOROVÉ VAKCÍNY VERSUS NÁDOROVÉ HYBRIDY

Monika Holubová¹, Ján Strnádel¹, Dušan Usvald¹, Jiří Klaudy¹, Daniela Plánská¹, Luca Vannucci³, Petr Váňa¹, Hana Reisnerová², František Jílek², Vratislav Horák¹

¹Laboratoř biologie nádorů, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v.v.i. Liběchov

²Česká zemědělská univerzita v Praze

³Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Praha

Úvod

Nádorové vakcíny se v posledním období díky stále se zvětšujícímu objemu poznatků z oblasti imunologie nádorů stávají nadějnou zbraní proti rakovině. I když je nádorové vakcíny prozatím možné s částečným úspěchem použít jen při léčbě imunogenních typů nádorů (představují relativně malou skupinu), do stádia klinického testování se už dostalo velké množství různě designovaných nádorových vakcín. Tyto vakcíny jsou založené na aplikaci celkového nádorového lyzátu, izolovaných nádor – asociovaných (TAA) a specifických nádorových antigenů (TSA)^{1,2}, konjugátů chaperonových HSP-proteinů s navázanými antigenovými peptidy, radiačně inaktivovaných nádorových buněk transfekovaných virem³, fúzních hybridů nádorových a dendritických buněk⁴ a podobně. Cílem léčby pomocí nádorových vakcín je stimulace specifické protinádorové imunitní odpovědi. Terapie pomocí vakcín bývá kombinovaná s podpůrnou léčbou. Velkou úlohu v doplňkové léčbě hrají malé signální proteiny – cytokiny, resp. jejich inhibitory. Cytokiny mohou být součástí tzv. druhého signálu, potřebného k aktivaci cytotoxických CD8+ T-lymfocytů. Nádorová tkáň je ve své podstatě schopná vyvolat imunitní odpověď, a to hlavně u imunogenních nádorů (např. u melanomu). V důsledku schopnosti nádorových buněk produkovat imunosupresivní faktory však dochází k potlačování imunitní odezvy, což má za následek progresi nádoru.

Imunitní odpověď je tedy nutné „restartovat“ případně zesílit vhodně zvoleným vakcinačním přístupem. Vakcíny, jejichž základem je fúze vlastní nádorové a „dárcovské“ dendritické buňky, se nazývají fúzní nádorové vakcíny.

Fyziologická a experimentální fúze buněk

Fúzí buněk označujeme proces, při kterém dochází k splynutí dvou případně více buněk za vzniku hybridního fuzantu. Pokud tento hybrid vznikl fúzí různých buněk, vyznačuje se přítomností většího počtu jader a expresí povrchových znaků charakteristických pro fúzující buňky. Fúze buněk je jev, probíhající také v normálních fyziologických procesech. Typickým příkladem je diferenciací kmenových buněk, vývoj svalových buněk, reparační procesy a podobně.

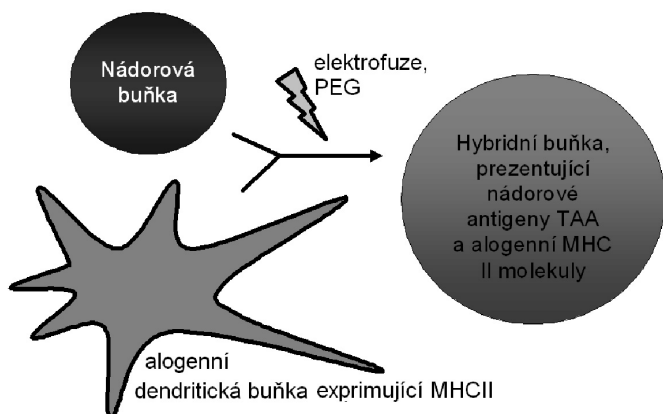
Experimentálně je možné fúzi buněk navodit několika způsoby: **fyzikálně** (působením elektrického pole), **chemicky** pomocí polyetylen glykolu PEG (Obr. 1.) (proces používaný při tvorbě hybridomových linií při produkci monoklonálních protilátek) nebo pomocí **virů** (viry mohou indukovat vznik nádorových fúzních hybridů). Podstatou fúze pro terapeutické účely je využití vlastností obou rodičovských buněk na navození protinádorové imunitní odpovědi. Fúzním partnerem pro nádorovou buňku mohou být makrofágy (Tab.1), do popředí zájmu se však dostávají právě dendritické buňky.

Tab. 1. Makrofágy jako fúzní partneři při přípravě nádorových vakcín

typ nádoru	zdroj makrofágů	antigen	aplikace vakcíny	tumor antigen specifická imunitní odpověď	objektivní klinické výsledky
melanom	monocyty	MelanA gp100 tyrosináza Lyzát nádoru	intranodálně	ano	ano
melanom	monocyty	MelanA gp100 tyrosináza	intravenózně	ne	ano
melanom	monocyty	MelanA gp100	intravenózně	ano	ano
melanom	monocyty	MAGE-3	intranodálně intravenózně	ano	ne
melanom	CD34	MelanA gp100 tyrosináza	intravenózně	ano	ne

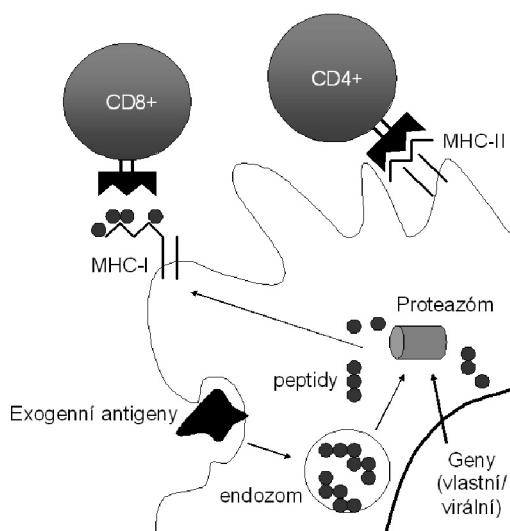
Fúzní nádorové vakcíny a dendritické buňky

Dendritické buňky jsou hlavními antigen prezentujícími buňkami. Tyto důležité modulatory imunitního systému vznikají z hemopoetických předchůdců v kostní dřeni. Vyznačují se schopností pohlcovat (fagocytovat) cizorodé antigeny. Po jejich opracování v endosomech a následném navázání na MHC molekuly II. třídy stimulují v lymfatických orgánech nezralé T lymfocyty a určují povahu následné imunitní odezvy (Th1 nebo Th2). Byly objevené r. 1868 Langerhansem, který je původně považoval za nervové buňky kůže.



Obr. 1. Vznik fúzního hybridu⁴

Dendritické buňky už našly uplatnění v imunoterapii při přípravě tzv. pulzních vakcín, u nichž dochází k jejich saturaci nádorovými antigeny. Zájem o využití dendritických buněk na přípravu fúzních vakcín zvýšil objev tzv. „cross-presentation“ nádorových antigenů dendritickými buňkami přímo na molekulách MHC I. třídy. Antigeny pocházející z nekrotických anebo apoptických nádorových buněk mohou být prezentované dendritickou buňkou jak CD4+ „helper“ T-lymfocytům (na MHC II), tak i CD8+ cytotoxickým lymfocytům (pomocí MHC I)^{5,6} (Obr. 2). Fúzí nádorových buněk s dendritickými buňkami schopnými prezentovat nádorové antigeny je možné stimulovat protinádorovou imunitní odpověď. Pokusy na nádorových modelech ukázaly, že specifickou protinádorovou imunitní odpov-



Obr. 2. Prezentace antigenů dendritickou buňkou⁵

věď nevyvolává směs izolovaných nádorových a dendritických buněk, ale jen jejich fúzní hybridy.⁷ Pokusy na nádorových liniích dokázaly, že k fúzi buněk dochází také spontánně – mnohé patofyziologické defekty nalezené v nádorových buňkách (např. polyploidita) je možné vysvětlit právě fúzí dvou nádorových buněk v různém stádiu diferenciaci⁸.

Existuje mnoho postupů, jak navrhnout a vytvořit protinádorovou vakcínu. Vakcinace pomocí cíleně vytvořených hybridů nádorových buněk s buňkami dendritickými představuje jeden z postupů, který může vést k širokému uplatnění v léčbě některých druhů nádorů. Izolace a následná fúze nádorových buněk pacienta s darcovskými dendritickými buňkami je proces, který je technicky zvládnutelný a díky rychlému rozvoji izolačních postupů (např. magnetické separace buněk pomocí protilátek značených magnetickými částicemi) je izolace dendritických buněk lehce realizovatelná na jakémkoli pracovišti.

Samotný protokol přípravy fúzních vakcín se tedy skládá z fúze autologní nádorové buňky exprimující nádorové antigeny a alogenní dendritické buňky exprimující kostimulační molekuly nevyhnutelné k aktivaci efektorových T-lymfocytů. Přítomné MHC molekuly II. třídy zároveň aktivují pomocné (help) CD4+ lymfocyty, které podporují protinádorovou imunitní odpověď. K aktivní spolupráci CD4+ a CD8+ lymfocytů je totiž nezbytné, aby antigeny byly prezentované stejnou antigen-prezentující buňkou.

(Pato)fyzilogické hybridy

Spontánní tvorba hybridů nádorových buněk s některými buňkami imunitního systému (např. s makrofágy) byla popsána u lidí a na několika živočišných nádorových modelech. Takto vzniknuté hybridy mohou mít vlastnosti obou rodičovských buněk – po nádorové buňce mají schopnost neomezené proliferační schopnosti, po makrofázích schopnost pronikat do nejrůznějších tkání organismu. Tento fakt má velký význam při studiu základní biologické povahy metastatického procesu⁹. Na druhé straně, hybrid vzniknutý fúzí nádorové buňky a makrofágu může představovat objekt se zvýšenou antigenicitou v důsledku fenotypové antigenní kombinace. To může vést k zviditelnění nádorového ložiska s jeho následným odhojením v procesu známém jako **spontánní regrese** nádorů.

Nádorové vakcíny jako způsob odhalení skrytého potenciálu imunitního systému

Nádorové vakcíny prožívají renesanci po několika desetiletích. Zvyšující se zájem o jejich studium a aplikaci je způsoben stále narůstajícím množstvím poznatků z oblasti nádorové imunologie. I když je nepravděpodobné, že nádorové vakcíny v blízké budoucnosti nahradí klasické terapeutické postupy jako chemoterapii či radioterapii, jejich potenciál a význam bude kontinuálně narůstat. Nespornou výhodou terapie pomocí nádorových vakcín je fakt, že jde o terapii „šitou na míru“ pro každého pacienta s využitím autologních antigenních profilů. Paradoxně, relativní malé procento úspěšnosti léčby pomocí nádorových vakcín je možné částečně vysvětlit tzv. **klonální selekcí** – vznikem klonů

nádorových buněk s odlišným antigenním fenotypem (odpověď na selekční tlak během imunoterapeutického přístupu).

Závěr

Výzvou pro onko-imunology do budoucna tedy zůstává pochopení složitých regulačních interakcí v systému nádor-imunitní systém a jejich aplikace do strategie přípravy protinádorových vakcín. V Laboratoři biologie nádorů na Ústavě živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v.v.i. jsou k dispozici dva různé živočišné nádorové modely – outbrední model melanomu, reprezentovaný miniprasetem linie MeLiM (Melanoma-

bearing Libechov Minipig) a inbrední sarkom nesoucí potkan linie Lewis. Přítomnost obou nádorových modelů spolu s technickým vybavením umožní studovat účinky fúzních nádorových vakcín, stejně jako biologickou podstatu fúzních hybridů a jejich úlohu v progresi a spontánní regresi nádorů.

Práce vznikla s podporou těchto grantových projektů: Výzkumného záměru ÚŽFG AV ČR, v.v.i. č. AV0Z50450515, IRC č. AV0Z50200510, MSM 604 607 0901 a MŠMT NPVII 2B08063 (nákup odborné literatury).

Literatura

1. Missailidis S: Anticancer Therapeutics, 2008, ISBN:978-0-470-72303-6
2. MacKensen A, et al.: Int J Cancer. 86, 385 (2000).
3. Reeves ME, et al: Cancer Res. 56, 5672 (1996).
4. Trefzer U, et al: Vaccine 23, 2367 (2005).
5. Russo V, et al: Proc Natl Acad Sci USA. 97, 2185 (2000).

6. Heath WR, et al: Nat Rev Immunol. 1, 126 (2001).
7. Brossart P, et al: Exp Hematom. 29, 1247 (2001).
8. Vignery A: Med Sci (Paris) 21, 1070 (2005).
9. Nestle FO: Oncogene 19, 6673 (2000).

ČERVENÉ BIOTECHNOLOGIE – HISTORIE A SOUČASNOST

Vendula Rusňáková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Biotechnologie patří vedle IT technologií mezi nejrychleji se rozvíjející obory. Hlavní místo mezi nimi zaujímají tzv. červené biotechnologie neboli medicínské biotechnologie. Patří mezi ně výroba biofarmaceutik, vakcín, genových testů, buněčné a genové terapie, genové inženýrství, aj. Jejich historie sahá do roku 1928, kdy byl objeven Alexandrem Flemingem penicilin. Počátky biofarmaceutického průmyslu se datují od roku 1971. V roce 1975 byla připravena první monoklonální protilátka. V dalším roce byl exprimován první lidský gen v bakteriích. Rok 1978 byl přelomový, byl připraven insulin a růstový hormon. V roce 1986 se začala vyrábět první rekombinantní vakcína proti hepatiditě B¹. Mezi první produkční organismy biofarmaceutik patřily *E. coli*, následovaly *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou schopny sekretované proteiny glykosylovat. Obecně se eukaryotické organismy jeví jako vhodnější producenti pro svojí schopnost dalších potranslačních modifikací, jako je např. fosforylace tyrosinu, threoninu a serinu, přidání mastné kyseliny atd. Mezi další nižší produkční organismy se řadí *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* a *Aspergillus sp.* Savčích buněk se začalo využívat v počátcích 80. let, kdy bylo potřeba připravit glykosylovaný erythropoetin, což nebylo v *E. coli* možné. Jako první produkční linie byly použity oocyty křečka čínské. V 90. letech se začali používat transgenní živočichové, kteří produkovali požadované látky ve svém mateřském mléce např. hemoglobin v prasatech, α -antitrypsin a fibrinogen v ovcích. Uvažuje se o produkci biofarmaceutik v moči zvířat. Výhodou obou postupů je snadná izolace již posttranslačně modifiko-

vaných proteinů². V posledních letech bylo zahájeno ověřování možnosti léčby za pomoci genových terapií³.

Diabetes mellitus a insulin

V roce 1922 byl poprvé podán insulin čtrnáctiletému pacientovi a ten přežil kritický stav. O rok později už je insulin produkován komerčně firmou Eli Lilly & Comp¹. Než byl objeven a izolován insulin, lidé umírali krátce po diagnostikování diabetes mellitus. Od roku 1926 byl insulin vyráběn už i v Čechách⁴. Insulin je produkován v β -buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Je nezbytný pro metabolismus glukosy. Poruchy spojené s jeho nedostatkem a nedostatkem receptorů pro insulin se nazývají Diabetes mellitus prvního a druhého typu. Insulin může být získáván z živočišných tkání (nejčastěji z vepřových pankreatů) nebo jako rekombinantní. Ten má stejné aminokyselinové složení jako lidský. Mezi nejčastější produkční organismy patří *E. coli* a *Saccharomyces cerevisiae*, které byly geneticky modifikovány. Insuliny dělíme podle doby účinku na krátkodobé, střednědobé a dlouhodobé^{5,6}. Stejně jako u jiných nemocí i zde se hledá řešení pomocí buněčných terapií. Byly provedeny pokusy vnášet již plně diferencované buňky schopné produkovat insulin přímo do organismu. Ale ty byly zatím neúspěšné. Řešením by mohly být kmenové buňky, které se po implantaci do slinivky přemění na β buňky Langerhansových ostrůvků.

Hemofilie a koagulační faktory

Hemofilie – nemoc králů. Hemofilie patří mezi recesivní dědičné onemocnění projevující se poruchou srážlivosti krve. Postižený trpí krvácením do kloubů,

neschopností zastavit krvácející ránu a tvorbou modřin. Touto nemocí trpí jeden člověk z 5000. Nejvážněji nemocní mají méně než jedno procento chybějícího faktoru a musí dostávat intravenózně rekombinantní srážecí faktor několikrát týdně.

Rozlišujeme dva základní typy hemofilie. Typ A se projevuje nedostatkem koagulačního faktoru VIII, zatímco hemofilie typu B je nedostatek koagulačního faktoru IX. Od roku 1978 je možné toto onemocnění léčit pomocí rekombinantně připravených látek¹. Gen pro faktor VIII byl úspěšně vložen do ledvinových křeččích buněk a je exprimován jako jeden řetězec, který je následně autokatalyticky rozštěpen na výsledný protein. Čistý protein je smíchán s lidským sérovým albuminem pro zvýšení stability. Obdobným způsobem se dá připravit i srážecí faktor IX. Ten je produkován v oocytech křečka čínské. Oba faktory se prodávají v lyofilizované formě^{7,8}. Nyní se objevují i první pokusy léčit hemofilii pomocí genových terapií. Byl připraven virový vektor, který obsahuje gen pro faktor IX a ten byl úspěšně vnesen do lidského organismu⁹. Tato léčba je zatím ve stadiu výzkumu. Pro faktor VIII se používá jiná metoda, izolují se kožní buňky, do nich je vložen gen pro daný faktor a buňky jsou implantovány do břicha. Po čtyřech měsících se množství faktoru VIII v krvi pacienta zvýší nad kritické jedno procento⁷.

Vakcíny

Počátky očkování spadají na začátek 18. století, kdy bylo v Anglii zavedeno očkování proti pravým neštovicím pomocí kravských neštovic. Toto očkování bylo účinné z 50 %, přesto se velmi rychle ujalo. Ještě před dvaceti lety byly podstatou všech vakcín buď inaktivní nebo neškodné virové částice. Po vnesení do lidského těla byly produkovány příslušné protilátky. Nyní se začínají vakcíny připravovat pomocí genového inženýrství. Jednotlivé virové proteiny jsou produkovány pomocí mikroorganismů a následně přečištěny a vnášeny do lidského organismu. První takto připravenou vakcínou byla vakcína proti hepatitidě B. Již v blízké budoucnosti bude možno produkovat vakcíny v transgenních rostlinách. Nedávno byly připraveny transgenní rajčata, která obsahují vakcínu proti hepatitidě B^{3,7}. Velké naděje jsou vkládány do možnosti přípravy vakcín v transgenních banánech. Tyto vakcíny budou použitelné hlavně v zemích třetího světa.

Genová terapie

Největší potenciál biotechnologií leží v oblasti genových terapií. Vnášení genů do buněk, změna genetické informace nebo „vypnutí některých“ genů může zabránit rozvinutí nemoci, případně ji začít léčit kauzálně nebo alespoň zmírňovat její rozvoj. Jednu z variant jak vypnout přepis genů je navržen nukleové kyseliny s komplementární sekvencí k danému genu a inhibovat tak transkripci. Další variantou je navržen ribozym schopného degradovat mRNA. Nejpoužívanější metoda je přímé vnesení nukleové kyseliny do buňky. Nukleová kyselina může kódovat gen, případně jeho část nebo to může být pouze několik oligonukleotidů, případně RNA. Cíl genových terapií záleží na nemoci, kterou mají léčit, zda je nutné, aby byl protein exprimován celý

život (případ hemofilie) nebo zda stačí jeho přítomnost po kratší čas (chemoprotektivní proteiny při léčbě rakoviny ve zdravých buňkách). Podle místa, kde dochází ke změně genetické informace, můžeme dělit genové terapie na *ex vivo* a *in vivo*. Při *ex vivo* přístupu se buňky vyjmou z těla, pozmění se a navrátí zpět. Výhodou je možnost kontroly přenosu genu do buňky, nevýhodou je, že tento přístup je možný jen pro několik typů tkání a musí být pro každého pacienta zvlášť upravovány jeho buňky, což se nedá dělat ve velkém měřítku. Pozornost se proto upírá k *in vivo* technologiím. Prozatím bylo zjištěno, že pro lidský organismus je podání genu intravenózně neúčinné. Aby mohla být DNA doručena do buňky, musí překonat humorální a imunologickou bariéru. Jako nositelé genové informace se používají virové, především retrovirové, i neviróvé částice. Většina retrovirů vyžaduje k inkorporaci své DNA do DNA hostitele buňky ve stadiu dělení. Jedinou výjimku tvoří lentiviry. Jedním z hlavních problémů tohoto postupu je, že se DNA vkládá do genomu nespecificky a může dojít k rozvinutí rakoviny. Dalším je silná imunitní odpověď organismu. Při použití nevirálních metod se nejvíce osvědčily liposomy obsahující uvnitř požadovanou nukleovou kyselinu³. Bohužel tyto lipo-nukleové komplexy se nedají cílit specificky⁷.

Jako nejslibnější se jeví zatím genové terapie pro léčbu rakoviny a leukémie. Existuje tzv. „Multiple Drug Resistance“-gen, který kóduje chemoprotektivní protein, schopný odstranit cizí chemické složky z buněk. Pokud se tento gen vloží do kostní dřeně pacienta s pokročilou rakovinou, může tam bránit toxickým efektům chemoprevence^{10,11}. Vnášení genů do buněk a přímá regulace lidského genomu je zatím v počátcích.

Buněčné terapie

Buněčná terapie je umělá náhrada poškozených nebo zničených buněk buňkami novými. Jsou pro ni ideální kmenové buňky, což jsou nespecializované buňky, které se za jistých okolností mohou vyvinout v jakékoliv specializované typy buněk, které právě potřebujeme k náhradě poškozené tkáně. Z kmenových buněk tak můžeme získat například mozkové buňky (neurony, gliové buňky), buňky svalů, kostí, chrupavky, kůže, jater, sítnice apod. Kmenové buňky můžeme rozdělit do dvou hlavních kategorií a to na embryonální, odvozené z blastocysty embrya a dospělé kmenové buňky, které se v malém množství nachází ve všech tkáních¹². Poprvé byly genové terapie použity v roce 1968, kdy byla úspěšně transplantována kostní dřev mezi dvojčaty¹³. V roce 1981 byly poprvé izolovány myší kmenové buňky. V roce 2007 bylo zaznamenáno mnoho úspěšných pokusů o přeměnu již diferencovaných buněk ve kmenové. Doposud se kmenové buňky využívají pouze při léčbě akutních leukemií, kdy se transplantuje kostní dřev, která obsahuje homeopoteické buňky schopné diferenciovat se na červené a bílé krvinky. V budoucnosti se uvažuje o použití kmenových buněk pro léčbu rakoviny děložního čípku, rakoviny prsu, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby¹⁴, infarktu¹⁵, mozkové mrtvice, zánětu kloubů, plešatosti, zrakových nedostatečností a mnoha dalších.

Většina z takových aplikací již prošla preklinickým testováním a čeká se na výsledky klinických testů. Velkému rozvoji buněčných terapií zatím brání etické spory o získávání kmenových buněk.

Genové testy

Genové testování se definuje jako analýza lidské DNA, RNA, chromosomů, proteinů a metabolitů k určení dědičných nemocí, karyotypu, genotypových a fenotypových mutací. Genové testy patří už dnes k běžnému vybavení klinických laboratoří. Používají se k určení nemocí, vážných genetických vad a pohlaví u lidského plodu, identifikaci osob atd. Počátky genového testování spadají do 60. let, kdy byly izolovány chromosomy a byla objevena příčina Downova syndromu¹⁶. Pro diagnostiku onemocnění způsobených špatným počtem chromosomů (Downův syndrom, Turnerův syndrom, Klinefelterův syndrom, superžena, supermuž) se používá pruhovací technika barvení chromosomů a metoda FISH („Fluorescent In Situ Hybridization“), kdy jsou na části chromosomů navázány fluorescenční sondy. Stejná metoda se používá pro zjištění onemocnění, způsobených delecemi jednotlivých genů nebo jejich mutacemi. Pro určení otcovství, případně identifikaci osob se porovnávají jednotlivé DNA. DNA ze slin, z kůže, krve, z vlasů nebo osobních věcí je extrahována, namnožena pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR). Dále může být takto získaná DNA sekvenována, analyzována metodou RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) atd. Porovnává se 16 specifických míst na různých chromosomech v CODIS loci

(„Combined DNA Index Systém“), což jsou DNA oblasti používané jako standard pro ukládání genetických profilů osob.

Tkáňové inženýrství

Mezi další oblasti červených biotechnologií patří výroba a vývoj náhradních tkání pro lidský organismus. Zatímco transplantace dárcovských orgánů jsou běžné, možnosti připravovat orgány na míru jsou jen omezené. Jednou z vizí blízké budoucnosti je výroba orgánů přímo z kmenových buněk. Tím by se zabránilo imunitní odpovědi organismu. Metodami tkáňového inženýrství lze připravit umělé chrupavky¹⁷ nebo kůži. Na polymerní biodegradabilní trojrozměrnou matici se nanosou buňky z lidské tkáně, které jsou následně kultivovány a pak implantovány do organismu. Mezi používané polymery patří kolagen, heparin, laminin, fibrin aj. Fibrinogen se odebere přímo ze séra pacienta, pomocí thrombinu se indukuje tvorba fibrinové sítě, ve které pak mohou být ukotveny buňky. Ve stadiu výzkumu se nyní nachází výroba umělých cév, kdy se elektrospínáním vyrobí tenká vlákna z polydioxanu, která pak tvoří základ cévy¹⁸.

Závěr

Za posledních 100 let učinilo lidstvo v oblasti medicíny velké pokroky. Byla objevena antibiotika, nemocní cukrovkou dostali šanci žít, byly vymýceny neštovice, atd. Nyní stojíme před dobou, kdy bude možné vyrábět lidem léky na míru. Genové a buněčné terapie nám dávají široké pole působnosti.

Literatura:

1. Johnson C: The history of biotechnology. The Boston Globe, 2007.
2. Demain A: J Industr Microbiol Biotech 27, 352 (2001).
3. Steinberg FM, Raso J: J Pharm Pharm Sci 1, 48 (1998).
4. King KM: Br J Nurs 12, 1137 (2003).
5. Black WJ: Am J Hosp Pharm 46, 1834 (1989).
6. Walsh G: Appl Microbiol Biotechnol 67, 151 (2005).
7. Rodney JY, Gibaldi M: Biotechnology and Biopharmaceuticals: Transforming Proteins and Genes, John Wiley & Sons, 2004.
8. Sieff CA: J Clin Invest 79, 1549 (1987).
9. Kay MA, et al: Nat Genet 24, 257 (2000).
10. Bronte V: Curr Gene Ther 1, 53 (2001).
11. Cunliffe V, Thatcher D, Craig R: Curr Opin Biotechnol 6, 709 (1995).
12. Soukup T, Karbanová J, Mokřý J, Suchomel P: *Neurologie pro praxi* 64-68 (2005).
13. Chapman AR, Frankel MS, Garfinkel MS: Cell Research and Applications. Monitoring the Frontiers of Biomedical Research, 1999.
14. Goya RL, Kuan WL, Barker RA: Expert Opin Biol Ther 7, 1487 (2007).
15. Gulati R, Simari RD: Med Clin North Am 91, 769 (2007).
16. McPherson E: Clin Med Res 4, 123 (2006).
17. Kolacna L, et al: Physiol Res (2007).
18. Stankus JJ, et al: Biomaterials 28, 2738 (2007).

ZLEPŠENÍ KVALITY MANGA BIOTECHNOLOGICKÝMI POSTUPY

Jana Dolejšová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Mango se pěstuje jako kultivovaná rostlina v tropických a subtropických oblastech (zvláště v Asii). Původem mangovníku indického je Indie. Je to stále zelený strom vysoký 10 – 40 metrů, ve špičce stromu může dosáhnout šířky až 10 metrů. Listy mangovníku jsou úzké, ale až 40 cm dlouhé, v mládí načervenalé. Má malé bílé až růžově zbarvené květy ve tvaru vzpřímené laty. Plody jsou velké, oválné peckovice, zelené, oranžové až načervenalé barvy. Obsahují velkou, plochou kožovitou pecku s jedlým jádrem. Mají pikantní, chutnou, vláknitou, šťavnatou dužninu, žlutavé nebo oranžové barvy. Mango můžeme jíst syrové nebo v salátech, dá se použít i v teplé kuchyni, suší se a používá jako koření. Díky své oblíbenosti v tropickém světě si mango vysloužilo označení „král plodů“.

Pěstování manga ovlivňuje hodně problémů. Zahrnují dvouletý habitus, velikost stromu, náchylnost k nemocím a škodlivému hmyzu, krátký posklizňový život a poruchy jako deformace a houbovitá tkáň. Téměř všechny varianty vznikly přirozeným cizosprášením, což nezaručuje dokonalou rostlinnou reprodukci a v případě monoembryogenního rozmnožování způsobuje i dlouhou juvenilní fázi. Produkce anthracnosy *Colletotrichum sp.* je považována za jeden z nejvýznamnějších posklizňových problémů.

Ideální druh manga by měl mít trpasličí fenotyp se střední velikostí ovoce 250 – 300 g. Měl by být odolný vůči houbovým a bakteriálním onemocněním. Plody by měly mít stabilní příjemnou chuť v kombinaci s dobrou trvanlivostí. Toho ovšem není možné dosáhnout tradičními metodami pěstování. Proto by zahrnutí biotechnologie v programu pěstování urychlilo vývoj požadovaných kultivarů.

Rozmnožování manga *in vitro* se nesetkalo s komerčním úspěchem jako jiné ovocné plodiny (ananas, banán a jahody), jelikož jsou s ním spojeny problémy jako latentní mikrobiální infekce, nadměrná exudace fenolu, krátká životnost explantátů, atd. Biotechnologie by mohly vyřešit některé z těchto problémů. Navíc molekulární metody jsou vhodné pro taxonomickou charakterizaci, pro pochopení regulace a exprese důležitých vlastností (genů).

Problémy s mikropropagací manga

Problémy spojené s kulturou manga *in vitro* jsou exudace fenolu, odbarvování média, hnědnutí explantátů, kontaminace a nepoddajnost („rekalcitrance“) tkání.

Exudace fenolu: Použitím listů a stonkových explantátů dochází k vysoké exudaci fenolu během excize rostlin, hnědnutí explantátů, kontaminaci, odbarvování a pomalé růstové reakci.

Latentní systémová kontaminace: Je jedním z limitujících faktorů pro používání vegetativních částí rostlin. Mezi skryté plísňové infekce manga patří *Alternaria*

alternata (napadá všechny rostlinné části v každém růstovém stadiu, symptomy jsou nejvíce viditelné na listech a zralých plodech), *Fusarium subglutinans* (patogen způsobující deformace květenství a vegetativní deformace manga), dále *Colletotrichum spp.* a *Dothiorella spp.* Mohou být distribuované v intra- a intercelulárních částech pletiva rostlin jako je kortex, floém, xylém a v parenchymálních dužninových buňkách. Způsobují klesání propustnosti membrány a zvýšení propouštění rozpustných živin, stimulují tvorbu apresoria nebo rychlý růst a vývoj subkutikulárně přítomných hyf nebo dalších infekčních struktur uvnitř hostitelských tkání. Redukce nákazy je možná častou sterilizací, specifickými antibiotiky nebo aplikací spršek imidazolu na vzrostlý vrchol rostliny.

Nepoddajnost („rekalcitrance“): Rekalcitrance je neschopnost rostlinných buněk, tkáně a orgánů tvořit tkáňovou kulturu. Tkáňové kultury ovlivňují tři faktory „celá rostlina“ fyziologie donoru, manipulace *in vitro* a fyziologie stresu *in vitro*. Nodální části sezónních výhonků jsou lepší pro přežívání, menší exudaci fenolu a růstové reakce, také složky média (anorganické, organické, aminokyseliny, enzymy, fytohormony, zdroj uhlíku) pomáhají zmírnit rekalcitranci. Jednou z možností pro zlepšení je nalézt vhodné podmínky pro režim regulátorů růstu rostlin. Kombinace auxinu a cytokininu v médiu podporují růst výhonků manga z kalusu zralého listu.

Propagace in vitro

Somatická embryogeneze: jedná se o tradiční způsob vegetativního množení rostlin. Jde o rychlý regenerační proces, důležitý pro genetickou transformaci. Základem embrya jsou buňky somatické. Jde o nepřímou somatickou embryogenezi, kdy se z buněk nejprve vytváří kalus (příp. buněčná kultura) a z nich poté embryo. Indukce embryogenních kultur manga je závislá na morfogenetickém potenciálu nucelu a mateřské tkáni.

Indukce embryogenních kultur: Pro indukci somatických embryogenních kultur jsou vhodná monoembryogenní vajíčka 30 – 60 dnů stará, sklizená po opylení z nucelu a asepticky přenesená na médium. Nucelus se odstraní z kultivovaných vajíček 1 – 3 týdnů po kultivaci, a přenese na stejné médium, aby se zabránilo hnědnutí.

Udržování růstu a vývoje embryogenní kultury: Trvalá proliferace embryogenních kultur většiny kultivarů je možná na indukčním médiu. Tmavnutí kultur je pomalejší v kapalině než na pevném médiu. Cytokinin a auxin jsou potřebné pro proliferaci a uchování globulárního embrya manga. Ačkoli, cytokinin není esenciální pro indukci embrií, ale důležitý pro stimulaci a organizaci apikálního meristému v průběhu zrání.

Dozrávání (maturace) somatických embryí: Problémy spojené s normálním vývojem somatických embryí jsou předčasné klíčení, sekundární embryogeneze, z hypokotyl zralých embryí a nepřítomnost bipolarity. Zrání je řízený proces, aplikace regulátorů růstu (auxinu a cytokininu) pomáhá při tomto procesu.

Klíčení a převedení rostlinek do substrátu: Sušená somatická embrya mohou být po dobu několika měsíců uložena bez poklesu jejich klíčivosti (u manga částečně dehydrovaná nezralá somatická embrya, 4 – 7 mm dlouhá, zůstala životaschopná 32 dnů bez maturačního média). Zralá somatická embrya mohou vyklíčit do vyvinutých sazenic a mohou být přemístěna do půdy.

Organogeneze

Indukce kalusu z asepticky vyklíčených embryí je možná z různých explantátů jako jsou epikotyl, listový řapík a výhonky. Problémy spojené s polními výhonky (jako je latentní systémová kontaminace) mohou být odstraněny využitím *in vitro* vyrostlých výhonků, které jsou více citlivé na kultivační podmínky.

Embryogenní kultury

Plody manga jsou náchylné k padavosti, a proto by embryogenní kultury mohly zlepšit jeho pěstování. Padání plodů ovlivňuje nedostatečná výživa, vlhkost, hormonální nevyváženost, klimatologické faktory (vysoká teplota, deště během kvetení, krupobití, rychlost větru), další různé faktory (nedostatek fertilizace, napadení nemocemi a škodlivým hmyzem). Změny v poměrech hydrolytických enzymů a etylenu mohou být způsobeny změnami v mRNA řízenou excizí specifických genů. Transgenní rostliny mají antisense verze různých genů, které kódují enzymy spojené s degradací buněčné stěny, střední lamely a syntézy etylenu, tyto faktory souvisí s padavostí plodů. Rostliny by mohli produkovat nízkou úroveň hydrolytických enzymů a enzymy spojené s biosyntesou etylenu, to by mělo následkem menší padavost plodů. Další možností je transformace rostlin s mutanty *Arabidopsis thaliana* *etr1* (etylen rezistentní) a *ein 2* (etylen insensitivní), které jsou odolné etylenu, což umožňuje snížit padání plodů.

Molekulová biologie

Molekulové metody jsou vhodné pro charakterizaci genetické diverzity (příbuznosti mezi různými kultivary nebo druhů manga), pro identifikaci genů komerčního zájmu, zlepšení pomocí přenosu genů, vytvoření změn existujících kultivarů *in vitro*, atd.

Identifikace kultivarů: Použití molekulárních značek zahrnujících izoenzym a DNA značky může být využito pro identifikaci kultivarů. Další aplikací by mohla být Marker Aided Selection (MAS) pro urychlené pěstování. Při studiu polymorfismu a segregačního vzorce pomocí AFLP značek v F1 potomstvech odvozených křížením kultivarů manga Keitt a Tommy prokázali vysokou polymorfii v F1 potomstvech, průměr segregace byl 37,16%. Použití izoenzymů poukázalo na genetickou změnu kultivarů manga. Při studiích různých enzymů (např. isocitrátdehydrogenasy, fosfoglukomu-

tasy, leucinaminopeptidasy a dalších) bylo identifikováno šest lokusů se 17 alelami ve 41 kultivarech manga vzniklých samoopylením a volným opylováním stromů. To umožňuje najít rozdíly mezi původem mnoha kultivarů.

Kromě identifikace a charakterizace diverzity manga mohou být moderní biotechnologické metody využity pro určení původu a vzniku nemocí, které by mohly ohrozit jeho kultivaci. Jednou z takových nemocí je malformace manga. Bylo prokázáno, že *F. subglutinans* je původce malformace manga, transformací „wild“ izolátů patogenu s GUS reportérem (beta glukuronidasou) a hygromycin rezistentním genem následovalo jejich naočkování do vegetativních a reprodukčních pupenů zdravého manga (kultivar Kent). Po 6 – 8 týdnech inokulace, byly pozorované typické symptomy malformace. Přítomnost GUS – zbarveného mycelia patogenu uvnitř rostlinných orgánů bylo dalším potvrzujícím důkazem.

Byla také sledována genetická diverzita mezi 74 izoláty malformovaného manga z různých oblastí (Brazílie, Egypt, Florida, Indie, atd.), které se podobaly *F. subglutinans*. Bylo zjištěno, že skupiny izolátů nesouvisí se zeměpisným původem nebo kultivarem manga, ze kterého byly izolovány. Některé infekce pocházely z geograficky vzdálených míst, což poukazuje na možnost nákazu rostlin před přepravou na místo pěstování.

Dále byla provedena charakterizace toxinu produkovaného *Pseudomonas*. Byla nalezena produkce antimetabolitu toxinu (pojmenován jako mangotoxin) druhu *Pseudomonas syringae* patogenního pro mango.

DNA značky

Přítomnost nízké úrovně polymorfismu je vhodná pro použití DNA značek. Pro studium monogenních a polygenních vlastností manga byly použity různé DNA značky. Izolace genomových DNA pro použití v PCR je náročná kvůli přítomnosti inhibitorů jako polysacharidy nebo fenoly. Používají se následující značky:

Variable Number Tandem Repeat Sequence (VNTRS)
Single Sequence Repeats (SSRs)
Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
RAPD a RFLP
Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)

Značky slouží ke studiu variability diverzity populací, používají se také k identifikaci jedinců a určení příslušnosti jedinců k populacím.

Klonování genů

Přenos genů v přírodě je nejednoznačný proces, rozsah rekombinací v rámci druhů je závislý na sexuální kompatibilitě, což omezuje přenos genů mezi různými druhy. Biotechnologie umožňují vznik nových druhů pomocí cílené manipulace genetického materiálu. Byla izolována cDNA pro alternativní oxidasu (36.6 kDa) z mesokarpu zralého manga. Gen měl velikost peptidů stejnou jako *Arabidopsis thaliana* s 68 % homologií. Dále byly pozorovány změny v expresi genu během dozrávání plodu manga. Výsledky vedly k závěru, že zrání manga je spojené s expresí specifických

genů. Později byla izolována exopolygalacturonasa ze zralého manga a bylo navrženo, že exo-PG také souvisí se zráním manga. Tyto proteiny jsou tedy regulačními elementy/ signály, které jsou zapojené při zrání plodů a mohou být spojeny s regulací dalších genů přímo propojených s dozráváním ovoce.

Transformace

Způsob modifikace jednotlivých vlastností u víceletých kultivarů rostlin beze změn jejich fenotypu a cílení vlastností specifickými geny vypovídají o schopnosti připravit stromy z buněčných a tkáňových kultur. Integrita klonu zůstává nezměněná s výjimkou změněné vlastnosti. Úspěchu bylo dosaženo získáním geneticky

transformovaného manga z embryogenní kultury použitím *Agrobacterium tumefaciens*.

Závěr a budoucnost

Molekulární metody jsou vhodné pro taxonomickou charakterizaci, pro pochopení regulace a exprese důležitých vlastností (genů) atd. Zahnutí biotechnologií v programu pěstování by urychlilo vývoj kultivarů s požadovanými vlastnostmi. Zlepšení genetických znaků by mohlo pomoci při jeho pěstování. Techniky tkáňových kultur mohou být využity pro pěstování homozygotních linií manga. Budoucnost výzkumu musí být zaměřena na přeměnu somatických embryí v normální rostliny a regeneraci rostlin z nadzemních částí.

Literatura:

1. Krishna H, Singh SK: Biotechnol Adv 25, 223 (2007).
2. <http://www.apsnet.org/online/Archive/1999/IW00012.htm>.

3. <http://www.oisat.org/pests/diseases/fungal/anthracnose.html>.
4. http://www.sblog.cz/jirka_bn/2007/01/09/276.

APTAMERY – MOŽNOSTI JEJICH PŘÍPRAVY A APLIKACE

Lenka Hašlerová

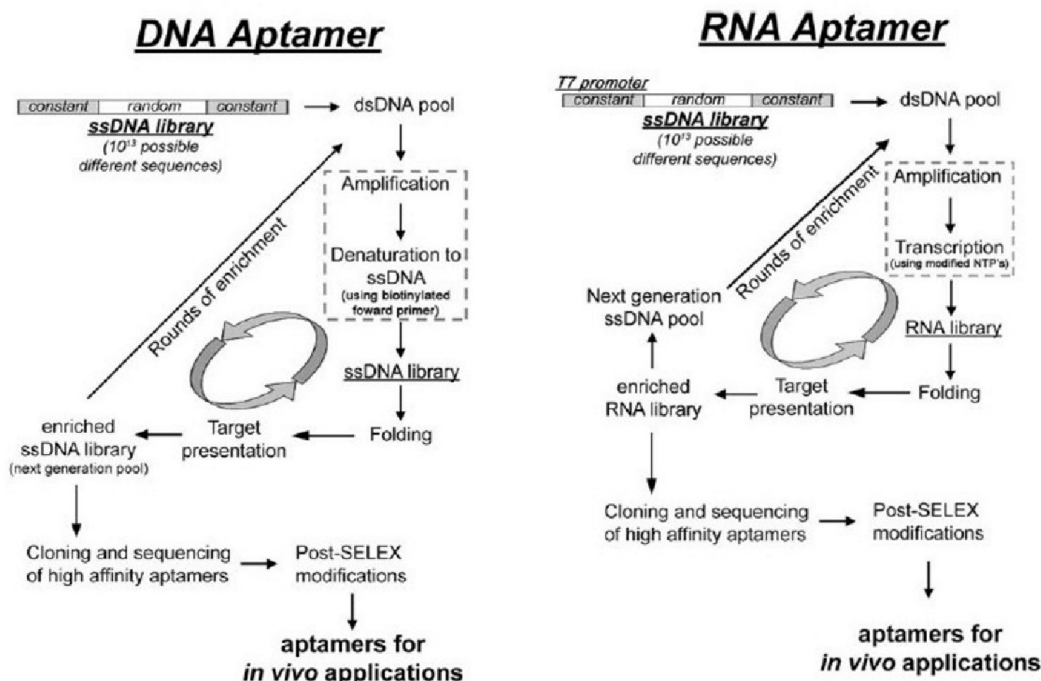
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Aptamery

Aptamery jsou definovány jako malé molekuly, které se váží na specifický ligand. Tuto vlastnost jim poskytuje jejich terciální struktura. Ligandem mohou být různé malé molekuly, nukleové kyseliny, proteiny, ale i tkáň a dokonce celé buňky. Afinita interakce aptamerů s ligandy je srovnatelná s interakcí protilátky s antigenem, ale jejich výhodou je, že je lze chemicky modifikovat, zlepšovat jejich vlastnosti a ve většině případů nejsou imunogenní.

Rozeznáváme dva typy aptamerů: DNA a RNA aptamery a peptidové aptamery. DNA a RNA aptamery jsou většinou krátké oligonukleotidy, liší se pouze typem nuk-

leotidů. Peptidové aptamery mají podobu variabilní domény – deseti až dvaceti aminokyselin zakotvených na proteinové kostře. V současné době se nejčastěji jako kostra používá bakteriální thioredoxin A¹. Peptidové aptamery mají také schopnost inhibovat aktivitu vázaného proteinu, což jim dává velký terapeutický potenciál. Aptamery jsou připravovány uměle, ale domény s podobnými vlastnostmi můžeme najít i v přirozených systémech. Příkladem jsou tzv. „riboswitch molecules“ – molekuly RNA regulující funkce genů důležitých pro chod základních metabolických procesů. Součástí jejich funkce je vyhledání a navázání malé cílové molekuly, tedy vlastnost připisovaná aptamerům.²



Obr. 1. Princip metody SELEX

Příprava nukleotidových aptamerů

Metody přípravy nukleotidových aptamerů mají zajímavou historii. V srpnu roku 1990 dvě laboratoře nezávisle na sobě publikovaly v časopisech *Nature* a *Science* články popisující novou metodu přípravy oligonukleotidů se specifickou afinitou k určitým ligandům. Skupina L. Golda pomocí metody, kterou pojmenovali SELEX („Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment“, Obr. 1) hledala molekuly specifické k DNA polymerase bakteriofága T4.³ V laboratoři J. W. Szostaka jako ligandy používali organická barviva a svou metodu nazývají selekce *in vitro*. Molekuly, které takto připravili nazývali aptamery od latinského *aptus*, což znamená připojený, nebo vhodný. Obě metody jsou si velice podobné a často i v odborných publikacích splývají. Název SELEX se u odborníků ujal a selekce *in vitro* je mnohdy označována jako jeho alternativa.

Výchozím bodem metody SELEX je knihovna syntetických DNA fragmentů. Každý fragment se skládá z 16 – 75 nukleotidů, které jsou za sebou řazeny náhodně, a konstantních úseků na 5'- a 3'-koncích. Proti těmto konstantním úsekům jsou navrženy primery pro následnou amplifikaci vybraných sekvencí. Úseky mohou také obsahovat restriční místa pro endonukleasy, umožňující inserci sekvencí aptamerů do vhodného vektoru. Pokud se vyrábí RNA aptamery, musí jeden konstantní úsek obsahovat T7-promotor a také musí před vystavením ligandu dojít k transkripci na RNA. Následně je knihovna DNA (RNA) inkubována s ligandem, proti kterému se hledá příslušný aptamer. Navázané oligonukleotidy jsou poté separovány několika možnými metodami – adsorpcí na nitrocelulosu, dělením v gelu, afinitní chromatografií, navázáním na magnetické kuličky. Takto separované molekuly jsou potom eluovány a amplifikovány polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) nebo v případě RNA pomocí PCR s reverzní transkripcí (RT-PCR). Získané úseky podstupují znovu cyklus inkubace s ligandem a selekce. Vysoce afinitní aptamery je možno získat po 5 – 12 cyklech. Následně mohou být aptamery upraveny pro použití *in vivo* chemickými modifikacemi nebo připojením signálních skupin, hydrofobních linkerů⁵.

Příprava peptidových aptamerů

Při přípravě peptidových aptamerů se používá několik modifikací kvasinkového dvojhybridního systému. Návnadou („bait“) je cílový protein, pro který chceme najít aptamer, který je spojen s DNA vazebnou doménou kvasinkového transkripčního faktoru. Geny pro potenciální aptamery, což je většinou cDNA knihovna krátkých peptidů o cca 20 aminokyselinách, jsou exprimovány ve fúzi s aktivační doménou. Vzájemná interakce proteinů vede ke zkompletování transkripčního faktoru a tím ke spuštění transkripce genu důležitého pro život buňky, který je pod kontrolou daného transkripčního faktoru. Vektor kódující interagující protein poté může být z testovacích buněk izolován, jeho sekvence přečtena a lze jej snadno zaklonovat do bakteriálních nebo kvasinkových expresních systémů. Velikou výhodou dvojhybridního systému je, že probíhá

intracelulárně *in vivo* za téměř přirozených podmínek. Tímto se hned z prvopočátku eliminují potenciální aptamery, které nejsou intracelulárně stabilní, což je velice důležité při výzkumu a selekci aptamerů pro jejich následné použití jako léčiv⁶.

Aplikace aptamerů v medicíně

První aptamer schválený FDA jako léčivo byla sloučenina s názvem pegaptanib, resp. její sodná sůl. Dostupná je pod obchodním názvem *Macugen*. Jedná se o 29-ti nukleotidový RNA aptamer s modifikovanou RNA kostrou pro zvýšení rezistence proti nukleasám a 5'-koncem, na který je připojen polyethylenglykol pro snížení „clearance“ z tělního oběhu. Tato sloučenina inhibuje cévní endoteliální růstový faktor (VEGF₁₆₅). Isoforma VEGF₁₆₅ se podílí na vzniku zrakového onemocnění „věkem podmíněné makulární degenerace“⁷, tedy degenerace sítnice v oblasti žluté skvrny, kdy je značně porušeno pacientovo vidění v centrálním zorném poli. Ve vyspělých zemích postihuje 10 – 15 % populace osob starších 60 let⁸. První aptamery proti VEGF₁₆₅ byly izolovány v roce 1990 pomocí metody SELEX a trvalo více než 10 let, než byly vyhotoveny všechny zkoušky potřebné k uznání za léčivý preparát. Pegaptanib se velice osvědčil a představuje průlom v oblasti léčebného využití aptamerů.

Dalším velice nadějným aptamerem tentokrát na poli boje s rakovinou je látka *AS1411*, dříve známá pod názvem AGRO100. Je to nemodifikovaný 26-mer bohatý na guanosin. Zvláštností je, že nebyl objeven metodou SELEX, ale spíše náhodou při studiu oligonukleotidů bohatých na guanosin. Bylo známo, že tyto oligonukleotidy zpomalují proliferaci rakovinných buněk *in vitro* bez uplatnění „antisense“ mechanismu. Dlouho se hledal cíl působení těchto molekul a jeho mechanismus. Hledání ukončil návrh, že cílem by mohl být nukleolin – jaderný protein, který je velice důležitý při přežití a buněčné proliferaci. V současné době probíhá první fáze klinických testů s dobrými výsledky a AS1411 by mohl obohatit řady terapeutik pro boj s rakovinou.

Uplatnění aptamerů v analýze

Vzhledem k uvedeným vlastnostem aptamerů se jejich využití v analytických metodách přímo nabízí. V současnosti jsou využívány zejména v chromatografii, kapilární elektroforese, hmotnostní spektrometrii. Molekuly aptamerů byly také použity jako specifické bioreceptory při konstrukci některých biosensorů.

Aptamery našly místo jako chirální stacionární fáze v HPLC tam, kde použití speciálních polymerů a protilátke přinášelo problémy. Jejich schopnost vázat pouze jeden enantiomer je téměř 100% a není ovlivněna ani výkyvy teploty nebo pH. Modifikovaná aptamerová stacionární fáze byla dokonce použita pro monitorování hladiny adenosinu v mozku živých krys. Po nutné optimalizaci se ukázala být plnohodnotnou náhradou dražších systémů HPLC-MS.

Při kvantitativní analýze proteinů lze aptamery použít k separaci molekul na základě kapilární elektroforesy, protože komplex aptamer-protein má jiné elektrofore-

tické vlastnosti a velikost než volné částice a navíc lze aptamery jednoduše fluorescenčně značit, což separaci ještě více usnadňuje. Na základě tohoto principu byly vytvořeny protokoly např. pro separaci reverzní transkriptasy HIV-1.

Zajímavé je použití aptamerů v biosensorech. Zde opět mají řadu výhod na rozdíl od protilátek. Jsou stálejší, po regeneraci znovu použitelné a díky možností značení umožňují použití jiných detekčních metod. Ovšem uplatní se i při metodách bez značení, např. při detekci povrchovou plasmonovou resonancí. V současné době se biosensory s aptamery jako rozpoznávacím činidlem používají pro detekci thrombinu, nebo při multiplexní analýze proteinů souvisejících s výskytem rakoviny¹⁰.

Literatura:

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Aptamer>, (19.1. 2008).
2. <http://en.wikipedia.org/wiki/Riboswitch>, (19.1.2008).
3. Tuerk C, Gold L: Science 249, 505 (1990).
4. Ellington AD, Szostak JW: Nature 346, 8182 (1990).
5. Ulrich H, et al: Comb Chem High Throughput Screen 9, 619 (2006).
6. Hoppe-Seyler F: J Steroid Biochem Mol Biol 78, 105 (2001).

Závěr

Aptamery jsou molekuly oligonukleotidového či peptidového charakteru s vysokou afinitou k nejrůznějším ligandům. Oproti protilátkám mají řadu výhod při zachování velmi podobné specifity. Jsou stálejší, modifikovatelné a lze je vyrábět „na míru“. Nukleotidové a peptidové aptamery se v přípravě liší. Peptidové aptamery mají navíc tu vlastnost, že mohou inhibovat aktivitu proteinu, který slouží jako ligand. V současné době probíhá mnoho výzkumných aktivit, jejichž výsledkem by mohlo být širší využití aptamerů v medicíně, a to především jako terapeutik. Vazebné vlastnosti aptamerů přímo vybízí k využití těchto látek v analýze a i zde se osvědčují v mnohých případech lépe, než doposud používané protilátky.

7. Shukla D, Namperumalsamy P, et al: Indian J Ophthalmol 55, 427 (2007).
8. http://www.sanquis.cz/clanek.php?id_clanek=413, (20.1. 2008).
9. Ireson CR, Kelland LR: Mol Cancer Ther 5, 2957 (2006).
10. Tombelli S, Minunni M, Mascini M: Biosens Bioelectron 20, 2424, (2005).

MODRÉ BIOTECHNOLOGIE

Radovan Pospíšilík

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Mořské (neboli modré) biotechnologie zahrnují aplikace biotechnologických nástrojů na mořské zdroje. Modré biotechnologie se v současné době nachází na počátku svého rozvoje, přesto se očekává bouřlivý rozvoj nových objevů a nalezení řešení mnoha problémů v takových odvětvích jako je výživa, farmacie a technologie potravin. To je umožněno především díky skutečnosti, že mořské zdroje byly zkoumány mnohem méně než suchozemské. Oceány a moře pokrývají 70 % povrchu Země a žije v nich přibližně 80 % všech organismů. Dosud však bylo popsáno pouze 1 % z nich. Proto jsou možnosti modrých biotechnologií obrovské. Velké množství dosud neprozkoumaných organismů nabízí příležitosti k objevení nových látek a biochemických procesů, zvláště protože jsou tyto formy života přizpůsobené rozmanitým podmínkám jako je různá intenzita světla, chlad, horko, vysoký tlak, nedostatek kyslíku, působení různých toxických látek a různých vzájemných vztahů mezi organismy. Tyto podmínky vedou k vývoji různorodých látek a biochemických procesů. Oceány a moře přitáhly pozornost lidstva poté, co se staly přístupnější díky technologickému pokroku, který představuje vývoj akvalungu, hlubokomořských ponorek, sonarů, satelitů, laserů, kamer a technik molekulární biologie. Většina běžně používa-

ných definic říká, že biotechnologie je obor využívající přírodních a inženýrských věd k aplikaci organismů, buněk, jejich částí a molekulárních analog k výrobě produktů a služeb a získávání znalostí. V případě mořských biotechnologií se jedná o živé organismy z mořských zdrojů. Mořská biotechnologie může zahrnovat techniky jako bioprocessing, izolaci produktů, screening, remediace, používání bioreaktorů, akvakulturu, rybolov, genetické, proteinové a další molekulární techniky. Aplikace mohou zahrnovat péči o zdraví, potraviny, kosmetiku, akvakulturu, zemědělství, rybolov, výrobu, nápravu poškození životního prostředí, biofilmy, biomateriály aj. Mořské biotechnologie mohou obsáhnout rozsáhlou oblast velmi odlišných aplikací ve všech odvětvích. V porovnání s „obvyklou“ charakterizací biotechnologií jako je červená (oblast péče o zdraví), zelená (oblast zemědělství, potravin a životního prostředí) a bílá (průmyslová oblast) může být modrá biotechnologie využita ve všech těchto ostatních biotechnologiích.

Komerční využití se zaměřuje na 5 hlavních oblastí:

- Bioprospecting
- Šlechtění a ochrana mořských organismů
- Produkce nových látek (krmivo, potraviny, léčiva)
- Diagnostika a biosenzory
- Akvakultura

Bioprospecting

Jedná se o vysoce účinné hledání nových látek, zvláště léčiv, potravních doplňků, lepidel, barviv, kosmetiky, látek pro remediace a výzkum. Zahrnuje použití biotechnologií v celém procesu vývoje léků od screeningu přes identifikaci, testování účinku, bezpečnosti až po výrobu. Mořské prostředí nabízí lepší příležitosti k získání vhodných kandidátů z hlediska obrovské biodiverzity a přítomnosti extrémních prostředí. Příkladem komerčního úspěchu jsou látky Ara-A (protivirová látka působící na opary) a Ara-C (pro leukemii), které byly objeveny v 50. letech minulého století v mořských houbách. Jejich odhadovaná roční hodnota je mezi 50 a 100 miliony dolarů. Dalším dobrým příkladem je Vent-DNA polymerasa, která se používá v PCR. Bioprospecting je využíván u všech živočišných a rostlinných kmenů žijících v mělkém i hlubokém moři. Všeobecně se míní, že rychlost získávání nových druhů a látek potenciálně použitelných ve farmakologii je vyšší u mořských a mikrobiálních organismů. Velmi atraktivní jsou organismy v Antarktidě, kde má již 18 společností své patenty. Celkově bylo podáno přes 500 patentů využívajících bioprospecting, 10 sloučenin je v preklinických a 3 v klinických zkouškách. Také všechny velké farmaceutické firmy mají oddělení mořské biologie.

Šlechtění a ochrana mořských organismů

Nejslibnější rozvíjejícím se směrem v tomto oboru je vývoj a produkce léčiv pro ryby, vývoj rybích vakcín a molekulární diagnostiky rybích chorob. Mezinárodní obchod s rybími vakcínami je ohodnocen na 60 milionů dolarů. Dalším cílem je vyvinout nové druhy ryb pro akvakulturu, které budou mít lepší odolnost proti chorobám, lepší krmnou efektivitu a poskytovat kvalitnější produkty. K vyhledávání požadovaných genů pro šlechtění lze využít molekulární a transgenní techniky.

Produkce nových látek

Nové potraviny, léky, potravní doplňky, kosmetika, hnojiva a biomateriály se získávají sběrem nebo kultivací v bioreaktorech. 50 % prodávaných léků je extrahováno z přírodních zdrojů nebo syntetizováno podle přírodního vzoru. Vědci do roku 2004 isolovali přibližně 7000 přírodních látek z nichž 25 % pochází z řas, 33 % z mořských hub, 18 % z kmene coelenterate a 24 % ze zástupců kmene sumek, měkkýšů, ostnokožců a mechovců. Rychlost hledání nových léčiv roste o 10 % ročně. Výzkumníci se zaměřují na pomalu se pohybující nebo citlivé kmene bezobratlých, kteří mají měkká těla a chybí jim pevná schránka. U takovýchto organismů se předpokládá mechanismus chemické obrany a tedy přítomnost potenciálně účinných látek. Jako často uváděný příklad úspěchu je americký „Sea Grant Programme“, který s malými investicemi vyvinul 5 léků s obchodním potenciálem 2 miliardy dolarů za rok. Dalším příkladem může být produkce docosahexanové a arachidonové kyseliny mořskými řasami. Tyto mastné kyseliny, které působí na rozvoj šedé mozkové hmoty se také vyskytují ve vysokých koncentracích v mateřském mléce. Jsou tedy důležitým potravním doplňkem kojenců.

Jsou vyhledávány látky mající protinádorové, antifungální, antimikrobiální, antivirové, antiparazitární, antituberkulosní a analgetické účinky.

Akvakultura

Akvakulturou rozumíme chov vodních organismů včetně ryb, měkkýšů, koryšů a pěstování vodních rostlin. To v sobě zahrnuje některé formy zásahů do chovného procesu zaměřené na zvýšení produkce, jako např. pravidelné nasazování, krmení a ochrana před dravci. Chov také zahrnuje individuální nebo korporativní vlastnictví chovaných živočichů a pěstovaných rostlin nebo práva k nim vyplývající z dohod. Vodní organismy, které jsou vyloveny fyzickou nebo právní osobou, jež je vlastnila po dobu jejich odchovu, patří pro statistické účely do akvakultury, zatímco vodní organismy, které jsou jako zdroj ve společném vlastnictví využívány veřejností, ať už na základě licencí nebo bez příslušných licencí, jsou výnosem v odvětví rybolovu.

Od roku 1950 došlo ve spotřebě rybích produktů na hlavu ke 100 % nárůstu. Je naděje, že se světová populace stabilizuje na 10–11 miliardách okolo roku 2050. Bude tedy třeba do roku 2025 zdvojnásobit produkci potravin a do roku 2050 ztrojnásobit. V případě „vodních“ potravin bude třeba sedminásobného zvýšení produkce do roku 2020. UNFAO předpovídá, že v tomto století vzroste spotřeba proteinů z vodního prostředí na 150–160 milionů tun a tradiční rybolov je schopen dodat maximálně 100 milionů tun. Proto je důležitý rozvoj akvakultury. Mnoho zemí s ní má velmi dobré výsledky. Očekává se, že se stane hlavní hybnou silou pro zvýšení světové produkce potravin. Často se mluví o modré revoluci, která je srovnávaná se zemědělskou revolucí, kdy člověk přešel od sběračství k obdělávání půdy. Stejně tak se chování mořských živočichů na farmách dá srovnat s chovem hospodářských zvířat a drůbeže. S expanzí akvakultury se ovšem objevují obavy z náročnosti na energii a působení znečištění, poškozování ekosystémů, hrozícího zavlečení invazivních druhů, chorob a možnosti genetického oslabení divokých druhů.

V akvakultuře se využívá chov asijských kaprů, atlantického lososa, barramundi, sumců, lososů, tuňáků, tresek, garnátů, krevet, pěstování mořských řas a chaluh a dalších druhů. Akvakultura zahrnuje několik složek jako péči o zdraví ryb, optimalizaci vsádek, získávání cenných látek z vodních organismů a bioremediace poškozeného ekosystému. Využívají se různé molekulární technologie jako exprese proteinů, mikrosatelity, RFLP a QTL analýzy, genové mapování, genomika, DNA vakcíny, DNA čipy, proteomika. Vytvářejí se transgenní choroby odolné, chladuvzdorné a rychle rostoucí ryby, které dosahují dříve jateční hmotnosti a mohou se chovat ve vyšších zeměpisných šířkách. Transgenní techniky vedou k manipulaci s pohlavím a umělému vyvolání sterility, což je velmi výhodné při farmaření transgenních ryb. Tyto ryby se nemohou křížit s divokými druhy.

Dalším důležitým odvětvím je produkce mořských řas, která nyní dosahuje 4 milionů tun. Řasy mají větší růstovou rychlost než suchozemské plodiny a nemusí

splňovat požadavky na potraviny, proto se mohou využít k výrobě biopaliv. Zajímavá je také možnost produkce vodíku řasami. Bylo zjištěno, že některé zelené řasy v prostředí chudém na živiny (nedostatek síry) a nepřítomnosti kyslíku přepnou metabolismus na produkci vodíku. Produkce vodíku je zatím malá, pro průmyslové využití je třeba jeho stonásobné zvýšení. Řasy se také využívají při výrobě alginátů, karageenanů a agaru.

Literatura:

1. ec.europa.eu/maritimeaffairs/pdf/SEC(2006)_689%20_10.pdf.
2. Hew CL, Fletcher GL: Aquaculture 197, 191 (2001).
3. Pomponi SA: Oceanography 14, 78 (2001).
4. Kijjoa A, Sawangwong P: Mar Drugs 2, 73 (2004).
5. Donia M, Hamann MT: Lancet Infect Dis 3, 338 (2003).
6. Melis A, Happe T: Plant Physiol 127, 740 (2001).
7. Grommen R, Verstraete W: J Biotechnol 98, 113 (2002).

Závěr

Mořské biotechnologie jsou jedny s nejvíce se rozvíjejících technologických odvětví s průměrným ročním odhadem růstu 3,8 % v letech 2005-2009 a celkovým růstem 24 %. Celosvětový obchod (mimo USA) s modrými biotechnologiemi je odhadován na více jak 2,6 miliard euro za rok 2009. Zpráva Spojeného království předpokládá v této oblasti roční 10% růst v letech 2003-2006.

8. [http://www.icnet.ic.gc.ca/base/bioeconomy/Innovation/Reference/Marine/\(2000,ConleyD\)-Aqua_&_Aquatic_Biotechnology.doc](http://www.icnet.ic.gc.ca/base/bioeconomy/Innovation/Reference/Marine/(2000,ConleyD)-Aqua_&_Aquatic_Biotechnology.doc).
9. Lam TJ: Genetics & Biotechnology in Aquaculture: Status, Promises & Issues (http://www.aquachallenge.org/workshop_materials/tom_lam.pdf).
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/Aquaculture>.
11. http://en.wikipedia.org/wiki/Algae_culture.

DEHYDROEPIANDROSTERON JAKO BIOLOGICKÝ MARKER K DETEKCI ALZHEIMEROVY CHOROBY

Silvie Rimpelová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění mozku, při kterém dochází k postupné demenci. V současné době není dostatek informací o příčině vzniku AD, z neuropatologických nálezů je však znám pravděpodobný průběh nemoci. Toto onemocnění je charakterizováno mozkovými plakami obsahujícími beta-amyloidní peptidy a spletené struktury neuronů, často nazývané spleti anebo také košíčky, skládající se z mikrotubulárně asociovaných tau-proteinů. Je nezpochybnitelné, že hlavním iniciátorem vzniku plaků jsou beta-amyloidy. Hlavní úsilí při vývoji nových léků je tedy zaměřeno na prevenci tvorby agregátů těchto proteinů. V současné době bohužel neexistuje žádný účinný způsob léčby AD.

V roce 1906 popsal německý lékař Alois Alzheimer určitou formu progresivní stařecké demence, která po něm byla o několik let později pojmenována. Objev Alzheimerovy choroby napomohl poznání, že postupná ztráta paměti a schopnosti učit se není přirozenou součástí stárnutí, ale že je způsobena určitými patologickými procesy. Alois Alzheimer popsal dva charakteristické patologické nálezy v mozku, které jsou dosud stále považovány za určující pro diagnosu nemoci. Jsou jimi extracelulární mozkové plakky a intracelulární neurofibrilární košíčky. Mozkové plakky jsou velmi husté a jejich středy jsou tvořeny bílkovinami obsahujícími beta-amyloidy (beta-A), ty jsou navíc obklopeny poškozenými a odumřelými neurony. Beta-A vznikají štěpením amyloidního proteinového prekurzoru apolipoproteinu (APP) enzymem beta-sekretasou (EC 3.4.23.46)¹.

Neurofibrilární spleti vyskytující se uvnitř neuronů a neuronových výběžků jsou složeny převážně z vláknité hyperfosforylované formy mikrotubulárně asociovaných tau-proteinů^{2,3}. Mezi další makroskopicky patrné změny mozku patří zúžení mozkových závitů, protažení mozkových komor, kortikální i subkortikální atrofie některých mozkových struktur, především však temporálních laloků. Díky vůbec prvnímu popisu této choroby A. Alzheimerem vyvstaly dvě důležité otázky a to, zda jsou plakky a košíčky pouhými znaky této choroby anebo zda jsou prapříčinou jejího vzniku. Z výsledků dlouhodobě prováděných studií lze usuzovat, že ačkoli jsou beta-amyloidy i tau-proteiny nezbytné pro průběh choroby, tvorba plaků je pravděpodobně řídicí silou tvorby košíčků⁴. Přesný mechanismus a příčina vzniku plaků je předmětem mnoha studií.

Historie

Ačkoli původ pojmu „demence“ pochází již ze starověkého Řecka, teprve v roce 1901 byl německým lékařem Aloisem Alzheimerem identifikován první případ choroby dnes známé jako AD. Patientkou byla padesátiletá Auguste D., jejíž zdravotní stav byl sledován až do roku 1906, kdy zemřela. V tomto roce také A. Alzheimer poprvé publikoval svou studii o tomto případě. V následujících pěti letech bylo zaznamenáno jedenáct podobných případů této nemoci a to již pod názvem AD. Nicméně oficiální používání pojmu Alzheimerova choroba je přisuzováno Emilu Kraepelinovi, který označil AD jako jeden z podtypů stařecké demence. Veškeré poznatky o této chorobě shrnul ve svém

psychiatrickém sborníku publikovaném v roce 1910. Většina poznatků jež je známa o AD, byla zjištěna teprve během posledních patnácti let.

Obecná fakta

Ze všech forem demence, kterou trpí 24 miliónů lidí na světě (v České republice 50 – 70 000 lidí), je Alzheimerova choroba zastoupena v 60ti % případů. Ze statistik vyplývá, že AD je postižen každý dvacátý člověk starší 65ti let a každý pátý starší 85ti let⁵. Čtvrtina lidí trpících AD není vůbec diagnostikována⁶. Průměrná doba, po kterou je pacient schopen žít s touto chorobou je 7 – 10 let, existují i výjimky, kdy pacient zemřel až po 21 letech anebo naopak už po 4 letech od zaznamenání prvních symptomů AD. Počet nemocných rok od roku rapidně roste, v roce 2040 se očekává nárůst počtu případů onemocnění Alzheimerovou chorobou a to cca na 80 miliónů. Proto je zřejmé, že je kladen stále větší důraz na výzkum zabývající se vývojem efektivnějších způsobů léčby, oddálení počátku choroby a nyní je dokonce snaha o zavedení prevence ještě před rozvojem AD. K tomu všemu je ale nezbytná včasná diagnóza nemoci.

Alzheimer a mozek

Stejně tak jako stárnou ostatní části našeho těla, stárne a mění se i náš mozek. V důsledku toho může většina z nás zaznamenat pomalejší myšlení a příležitostné problémy se zapomínáním běžných věcí. Nicméně vážná ztráta paměti, zmatenost a další změny v tom, jak pracuje naše mysl, nejsou přirozenou součástí stárnutí. Mohou být znakem ochabujících mozkových buněk. Mozek má přibližně 100 miliard nervových buněk (neuronů). Každá nervová buňka komunikuje s obrovským počtem dalších buněk, čímž tvoří nervovou síť, která je zodpovědná za množství důležitých úkonů jako např.: myšlení, paměť, schopnost učit se, atd. Při onemocnění AD však přestanou neurony správně fungovat. Vědci proto polemizují, kdy nastávají prvotní problémy. Jak se poškození nervových buněk rozšiřuje, ztrácí buňky čím dál více schopnost plnit své funkce, případně dojde až k jejich zániku.

Stadia a symptomy

Ačkoli se symptomy nejčastějšího typu demence mohou velmi lišit, prvotním problémem, který bývá zaznamenán, je natolik závažná porucha paměti, že dokáže značným způsobem ovlivnit běžný život člověka trpícího AD. S rozvojem choroby stále více přibývá nových a nových symptomů znesnadňujících běžný život pacienta. Symptomy se stávají neslučitelné se životem a dochází k úmrtí postiženého člověka. Průběh nemoci lze rozdělit do pěti stádií. První se nazývá prodromální fáze, která se vyznačuje především výraznou zapomnětlivostí bohužel těžko odlišitelnou od běžné stařecké zapomnětlivosti; změnami v chování většinou nezaznamenanými lidmi pohybujícími se v okolí nemocného, dále si můžeme povšimnout podrážděnosti, menší spontánnosti a energičnosti pacienta. Toto stadium může být též nazýváno MCI („minor cognitive impairment“). Druhá fáze bývá často označována jako časná a je charakteristická zapomínáním jmen

členů rodiny, důležitých dat, nesoustředěností, nesprávným zakládáním věcí, neschopností rozhodovat se, poruchou plynulosti řeči a anomii. Pacient je ještě schopen se sám o sebe postarat, ale potřebuje asistenci při komplikovanějších úkonech, jako je např. placení účtů. Při třetí, neboli interdermální, fázi dochází k výrazným poruchám osobnosti, úbytku orientace v místě a čase, apraxii, afázii, zapomínání tváří známých lidí. Ta je následována pozdní fází s velmi výraznou poruchou paměti, komunikace, chůze, hybnosti, reflexů; epilepsií a tvorbou neologismů. Poslední fáze bývá nazývána jako terminální a jejím nejčastějším znakem je nesouvislá řeč následovaná inkontinencí, upoutáním na lůžko, nezbytnou péčí okolí, neschopností jíst, pít a nakonec i polykat. Konečným stadiem je koma a smrt pacienta.

Diagnosa

Demence je a priori klinický stav a tak může být s jistotou diagnostikována až po důkladném testování. Nicméně definitivní diagnóza Alzheimerovy choroby jako jediné příčiny demence musí být potvrzena až mikroskopickou analýzou mozkové tkáně, která zpravidla nastává až při pitvě anebo výjimečně při předsmrtné biopsii mozku. A proto je AD obvykle klinicky stanovována pomocí neurologických a neuropsychologických znaků bez jakýchkoliv dalších způsobů diagnostiky. Pro určení AD se nejčastěji používá neuropsychologický screeningový test, tzv. test kognitivních funkcí (Mini-Mental State Examination, MMSE), pomocí kterého se hodnotí paměťové dovednosti pacienta. Alternativou je tzv. test nekognitivity (Disability Assessment in Dementia, DAD). V tomto případě se hodnotí schopnosti provádět běžné aktivity každodenního života⁵. Dalším způsobem, kterým se dá rozpoznat AD je pozitronová emisní tomografie (PET), stejně jako fotonová emisní tomografie (SPECT). Obě metody vyšetření (PET i SPECT) mají stejnou výpovědní hodnotu jako MMSE. Dalším možným vyšetřením, avšak ne tak často používaným v raných fázích AD, je analýza mozkomíšního moku na přítomnost beta-A a tau-proteinů⁷. Za doprovodné se považují psychologické testy prokazující případnou depresi a krevní testy indikující deficienci určitých vitaminů. Souhrnnými vyšetřeními lze s jistotou potvrdit diagnózu AD, což ale probíhá až po propuknutí a obvykle mohutném rozvoji nemoci. Extrémně obtížné je stanovení AD v nejranějším stadiu choroby.

Autotest

Na základě rozsáhlých výzkumů vznikl test, díky němuž si může každý člověk vyzkoušet, zda netrpí Alzheimerovou chorobou. Pokud člověk odpoví na více než čtyři následující otázky: „Ano.“, je velmi pravděpodobné, že trpí AD⁸. V takovém případě je vhodná návštěva odborného lékaře. Jednotlivé dotazy zní: 1. Dělá vám v poslední době problémy vykonávat i základní pracovní povinnosti? 2. Máte obtíže s vykonáváním každodenních činností, které se váží k běžnému rodinnému „provozu“? 3. Nemůžete často najít vhodné slovo? 4. Špatně odhadujete vzdálenosti? 5. Stává se

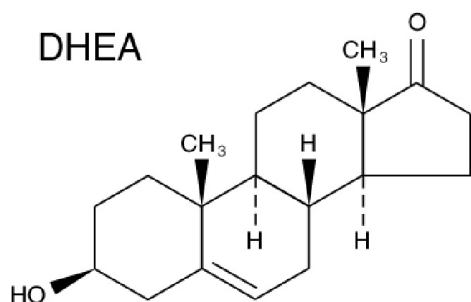
vám někdy, že najednou nevíte, kde právě jste? 6. Býváte často dezorientováni v čase? 7. Dělá vám potíže představit si něco abstraktního? 8. Stává se vám, že ukládáte předměty na nesmyslná místa? 9. Mění se vám nálada několikrát za den? 10. Nechce se vám nic dělat, jako kdybyste ztratili veškerou iniciativu?

Nová strategie při diagnostice AD

Vědci vynalezli jednoduchý krevní test, pomocí kterého jsou schopni předvídat, zda jsou mírné výpadky paměti brzkými příznaky onemocnění Alzheimerovou chorobou. V krvi testovaných lidí bylo identifikováno 18 proteinů, které slouží k přenosu signálů do části mozku zodpovědné za paměť. Pomocí těchto proteinů lze s 90% přesností určit, zda se u daného jedince AD rozvine či ne⁹. Tato nová metoda, publikovaná v r. 2007, je založena především na využití stanovení koncentrace endogenního hormonu dehydroepiandrosteronu (DHEA), případně jeho sulfonylovaného derivátu (DHEA-S). Tyto hormony hrají při diagnóze AD klíčovou úlohu, jejich nízká hladina v krvi totiž může sloužit jako biologický marker k detekci AD¹⁰. Nově vyvinutý test je založený na chemiluminiscenční enzymové imunologické analýze, pomocí níž by mohlo být lékařům umožněno s jistotou diagnostikovat stav pacienta, předpovědět účinnost současné léčby, potvrdit ranou diagnózu a usnadnit léčbu ztráty paměti. Tato rychlá a poměrně jednoduchá metoda má však značná úskalí. Nízká koncentrace DHEA (popřípadě DHEA-S) v krvi totiž může být způsobena řadou dalších chorob, což by mohlo mít za následek značné zkreslení výsledků při diagnóze AD.

Dehydroepiandrosteron (DHEA)

Tento 19ti uhlíkatý steroidní hormon (Obr. 1) a účinný inhibitor glukosa-6-fosfát-dehydrogenasy se vyskytuje v plazmě buď ve volné formě anebo jako konjugát s kyselinou sírovou¹¹. DHEA vzniká především v kůře nadledvinek, ale i v gonádách, placentě a také v mozku. Výchozí látkou je cholesterol, ze kterého vzniká pregnenolon a následně DHEA, jež je prekursorem dalších hormonů: androgenů a estrogenů. Hladina DHEA-S je v plazmě i v moči 300x vyšší než DHEA. Množství DHEA (DHEA-S) v krvi se také liší podle pohlaví (u mužů jsou hodnoty vyšší než u žen), etniky, způsobu životního stylu (pití alkoholu, kouření, užívání léků, druh stravy...) a především podle věku dané osoby. S přibývajícím věkem hladina DHEA v krvi pozvolna klesá. Lidé



Obr. 1. Strukturální vzorec dehydroepiandrosteronu (DHEA)

starší 80ti let mají již jen 5-15 % původního množství tohoto steroidu¹². Nižší, deficitní bazální hladiny DHEA mohou být zapříčiněny chorobami jako např.: AD, syndrom získaného selhání imunity (AIDS), různé formy rakoviny, *diabetes mellitus*, skleróza, astma, chronický únavový syndrom, revmatoidní artritida, osteoporóza, erektilní dysfunkce a další¹³. O tom, jakými mechanismy DHEA při těchto nemocech působí, je toho známo velmi málo.

DHEA jako lék?

Dehydroepiandrosteron se dostává v posledních letech do popředí zájmu. Je zkoumán hlavně jeho možný léčivý účinek suplementací DHEA u osob trpících výše zmíněnými chorobami. Zjistilo se, že umělým dodáváním DHEA orální cestou se zvyšuje hladina testosteronu a androsteronu v krvi a byl tak pozorován jeho pozitivní vliv při léčbě Addisonovy choroby, erektilní dysfunkce, systematického lupusu a depresí. Mírné zlepšení zdravotního stavu bylo sledováno i u lidí s AIDS, osteoporózou, chronickým únavovým syndromem a AD¹⁴. U většiny testovaných osob byly zjištěny pozitivní vedlejší efekty jako např.: podpora funkce imunitního systému (DHEA tlumí tvorbu interleukinu 6), zlepšení smyslů, stavu kostí a kůže (větší hydratace, tloušťka, pigmentace, produkce mazu) a nárůst libida. Negativními vedlejšími účinky ovšem byla výrazná ztráta tělesné hmotnosti u mužů, enormně zvýšené riziko srdečních příhod, menstruační nepravidelnost a rakovina prsu u žen, u obou pohlaví dále pak srdeční arytmie, větší potivost, růst chlupů na lících, značné změny nálady a nesnesitelné bolesti hlavy^{15;16}. Vliv DHEA na léčbu AD je v současné době nadále intenzivně studován.

Prevence, rizika a původ AD

Existuje několik teorií, jež vysvětlují, čím je zapříčiněn vznik Alzheimerovy choroby. Jednou z nich je možnost, že zde pravděpodobně hrají roli dědičné faktory a to mutace alespoň jednoho z chromozomů 14, 19 a 21. U lidí s Downovým syndromem (trisomie 21. chromozomu) je 98% pravděpodobnost vzniku AD po 20. roku věku¹⁷. Mnoho vědců tvrdí, že „prapříčinou“ vzniku Alzheimerovy choroby je nadměrné množství hliníku akumulovaného v organismu anebo naopak deficeience zinku¹⁸. Za dalšího možného původce tohoto onemocnění jsou považovány priony, avšak tato teorie je velmi diskutabilní. Rizikovými faktory pro rozvoj AD jsou např.: pokročilý věk, úrazy hlavy, vysoký příjem hliníku (pravděpodobně z aditiv v potravinách)¹⁸, nízké vzdělání, deprese, vysoká hladina LDL cholesterolu, hypertenze a různá onemocnění. Předcházet vzniku AD (pokud nemáme genetické predispozice k této chorobě) lze životním stylem (zdravou stravou a pravidelnou fyzickou aktivitou), častou intelektuální stimulací (např.: hraním šachů, luštěním křížovek a řešením sudoku), častou komunikací s okolím, pravidelnou konzumací kari koření a tak podobně. Velmi pozitivní efekt při prevenci AD má vitamín E v kombinaci s vitamínem C a dále také např. statiny, oboje bohužel rapidně zvyšuje riziko srdečních příhod¹⁹.

Léčba

V současné době neexistuje žádný lék, pomocí kterého by bylo možné zpomalit postup Alzheimerovy choroby anebo ji dokonce vyléčit úplně. Všechny dostupné a používané léky pouze zmírňují symptomy a zpřijemňují životní podmínky pacienta. Nejčastěji aplikovanými léky jsou inhibitory acetylcholinesterasy, díky nimž dochází ke zvýšení koncentrace acetylcholinu. Mezi tři nejprodávanější látky patří donepezil (s obchodním názvem *Aricept*[®]), galantamin (*Reminylin*[®] a *Nivalin*[®]) a rivastigmin (*Exelon*[®]). Všechny tyto léky jsou poměrně drahé a mají řadu nepříznivých vedlejších efektů. Starší variantou těchto léků je tacrin (*Cognex*[®]). Podobně funguje i řada prekursorů acetylcholinu a to sójový lecitin, muskarin a pravděpodobně i agonisté nikotinu. Druhou skupinou látek jsou antagonisté ionotropních glutamátových receptorů (receptory N-methyl-D-asparátu, NMDAR) a to např.: memantin (*Namenda*[®], *Akaminol*[®], *Auxura*[®], *Exiba*[®]), bohužel i v tomto případě dochází pouze k mírnému potlačení symptomů AD. Dále jsou pacientům podávány látky blokující vápenaté ionty (Ca^{2+} ve stáří destabilizují neurony) a tím uměle prodlužují životaschopnost neuronů. Velmi účinná je stimulace pacientů socioterapiemi, kognitivními psychoterapiemi a především spolupráce s rodinou. Významnou skupinou jsou tzv. nootropika, která zlepšují využitelnost glukosy a kyslíku v centrální nervové soustavě (CNS), zlepšují vlastnosti erytrocytů a usnad-

ňují tak jejich průchodnost kapilárami. Za zmínku stojí i přírodní léčiva. Jsou to především antioxidanty vitamin E v kombinaci s vitaminem C (vhodné i jako prevence); vitamin B1, koenzym Q, L-karnitin, karni koření, atd. Ve třetí fázi klinických studií je extrakt z *Ginkgo bilobae* (jinan dvoulaločného), studie by měly být dokončeny v roce 2008. Symptomy AD mohou být značně potlačeny statiny (podle epidemiologických studií je výskyt Alzheimerovy choroby u pacientů léčených statiny o 70 % nižší než v kontrolní skupině)²⁰, bohužel kvůli řadě vedlejších účinků se tyto látky zdravým jedincům jako prevence AD nedoporučují.

Závěr

Závěrem je nutné dodat, že jelikož počet případů onemocnění Alzheimerovou chorobou neustále roste, bylo by potřeba co nejdříve odhalit mechanismus působení AD a nalézt způsob, kterým by bylo možno tuto nemoc diagnostikovat dříve, než dojde k propuknutí jejích závažných příznaků. Velmi slibně se jeví nová metoda stanovení koncentrace DHEA v krvi, bohužel je zde možná interference nízké hladiny DHEA s jinými chorobami. Předpokládá se, že touto (AD) třetí „nejdražší“ nemocí (na léčbu pacientů v USA je potřeba 100 miliard dolarů ročně) bude v roce 2040 trpět 80 miliónů lidí a proto je vývoj nových, účinnějších léků absolutně nezbytnou záležitostí.

Literatura:

1. WOLFE MS: Nature Rev Drug Discov 2002, 1, 859-866.
2. HAMPEL et al.: J Neural Transmis 2004, 111, 247-272.
3. GOEDERT M, et al.: J Alzheimer Disease, 2006, 9, 195-207.
4. OHNISHI S, TAKANO K: Cell Mol Life Sci 2004, 61, 511-524.
5. http://cs.wikipedia.org/wiki/Alzheimerova_choroba.
6. <http://abcnews.go.com/Health/ActiveAging/story?id=3724741&page=1>.
7. <http://www.reuters.com/article/healthNews/idUSCOL56934220070925>.
8. http://www.medicinenet.com/alzheimers_disease/page4.htm.
9. <http://www.msnbc.msn.com/id/21308346>.
10. <http://www.medinews.com/GMEDTS32olcgi/ts.cgi?tsurl=0.57.25370.0.0>.
11. <http://www.vesmir.cz/clanek.php3?CID=3867>.
12. NASMAN B, OLSSON T, et al.: Biol Psychiatry 1991, 30, 684-690.
13. SCHNEIDER LS, et al.: Biol Psychiatry 1992, 31, 205-208.
14. TANZI R, PARSON A: J. Alzheimer Dis 2001, 3, 407.
15. YEN SC, et al.: Ann NY Acad Sci 1995, 774, 128-142.
16. BARRET-CONNOR E, GOODMAN-GRUEN D: Ann NY Acad Sci 1995, 774, 259-270.
17. <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/geneticsfs.htm>.
18. ROGERS MA, SIMON DG: Age Ageing 1999, 28, 205-209.
19. <http://news.scotsman.com/topics.cfm?tid=1375&id=1363782007>.
20. <http://www.osel.cz/index.php?clanek=827>.
21. HILLEN T, et al.: Biol Psychiatry 2000, 47, 161-163.
22. YANASE T, et al.: Endocrine J 1996, 43, 119-123.
23. BIRKENHAGER-GILLESE EG, et al.: Ann NY Acad Sci 1994, 719, 543-552.
24. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/alzheimersdisease.html>.
25. CRISBY M, et al.: Alzheimer Disease Assoc Dis 2002, 16, 131-136.
26. SUNDERLAND T, et al.: Lancet 1989, 2, 570.

BIOFARMACEUTIKA – CESTA K CÍLENÉMU PŮSOBNÍ LÉČIV

Jiří Blažek

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Mohutný rozvoj nových biotechnologií, který postupně zpřístupňuje jejich produkty stále širšímu průmyslovému využití, se postupně promítá i do odvětví farmaceutických výrob. Podíl tzv. bioléciv – biofarmaceutik se rok od roku zvyšuje. Zatímco roku 1982 byla na trhu přístupná pouze čtyři biofarmaceutika, roku 2004 se jejich počet již blížil ke čtyřem desítkám¹. Ještě více je tento trend patrný ve vývoji světového biofarmaceutického trhu, kde růst obrátu v mld. USD má exponenciální charakter. Jen v samotných USA zaznamenává biofarmaceutický průmysl nárůst okolo 19 %, se současným ročním růstem příjmu zhruba o 21,4 % (cit.¹).

Biofarmaceutika mají navíc oproti tradičním léčivům mnohé výhody, jako jsou jejich menší toxické vedlejší účinky, velmi specificky zaměřené působení nebo možnost individuálního „nastavení“ účinné složky na potřeby pacienta⁵. Nevýhodami pak i nadále zůstává jejich vysoká cena, která je dána nákladností technologií a výzkumu⁴.

Právě specifického cílení některých biofarmak, jež je založeno na strukturní komplementaritě ligandu a jeho receptoru, případně protilátky a antigenu, lze využít ve spojení s „tradičními“ farmaceutickými výrobami pro vývoj nové generace léků, specificky cílených k místě svého účinku – buňce, tkáni nebo orgánu⁵. Toto „cílení“ léčiv (angl. drug targeting) by mohlo vést ke vzniku úzce specializovaných léčiv, jejichž výhody by mohly být např. jejich menší toxicita, snížení vedlejších účinků a lokální působení v místě potřeby, bez zatěžování zdravých součástí organismu.

Biofarmaceutika

Jako biofarmaceutika se označují léčiva, nebo látky, které by se jimi mohly stát, jež byla získána jinak, než klasickou cestou syntetické chemie, přičemž se do těchto klasických postupů zahrnují metody kombinatorní chemie a izolace léčiv z rostlinného materiálu¹. Vedle této definice je možno biofarmaceutika také chápat jako léčiva získaná biotechnologickými metodami, přičemž zde máme na mysli přístupy rekombinantních technologií⁶.

Biofarmaceutika jsou tak původu rekombinantně – technologického, genetického, případně se jedná o fragmenty buněk a membrán, které jsou používány při výrobě vakcín. Jako biofarmaceutika však můžeme označit i klasická léčiva, která byla na výše zmíněnými postupy připravená biofarmaceutika navázána a využívají je tedy pro aktivní transport do cílového místa účinku¹.

Stejně problematické jako biofarmaceutika definovat je i biofarmaceutika smysluplně klasifikovat. Asi nejsnadnější by jistě bylo dělení podle jejich molekulové hmotnosti, které však postrádá vztah k funkčnímu působení těchto látek. Stejně tak by bylo možné biofar-

maceutika rozdělit i podle způsobu jejich přípravy a typu molekuly. Obvykle se však setkáváme s následujícím rozdělením¹:

- Monoklonální protilátky
- Vakcíny
- Proteiny, včetně peptidických hormonů
- Kombinace biofarmaceutik s klasickými léčivy
- Jiná biofarmaceutika

Je však možné se setkat i s dělením podrobnějším, které do zmíněného výčtu přidává dodatečně⁶:

- Krevní faktory (VIII, IX)
- Thrombolytická agens
- Hematopoetické růstové faktory
- Interferony
- Interleukiny

Pro výrobu biofarmaceutik ve velkém měřítku byla optimalisována řada technologií, využívajících pro produkci velkoobjemové fermentory. Bioléčiva je tak možné získávat např. kultivací geneticky modifikovaných bakterií, jako je *E. coli*, která byla využita pro syntézu rekombinantního insulinu. Dále je využíváno savčích buněčných linií, jež jsou základem pro produkci virálních vakcín, imunoglobulinů, interleukinů, lymfokinů, protinádorových agens a erythropoetinu⁶. Vedle savčích buněčných kultur je pak možné využívat i kultury rostlinného původu, které byly úspěšně aplikovány pro výrobu imunoglobulinů, Ab řetězců, podjednotek vakcín, či proteinových antibiotik².

Následující přehled pak ilustruje některé příklady užití biofarmaceutik⁶:

- Erythropoetin – anémie
- Interferon a – leukémie
- Interferon b – roztroušená sklerosa
- Monoklonální protilátky – revmatoidní artritida, karcinomy
- Glukocerebrosidasa – Gaucheroova nemoc

Monoklonální protilátky – léčivo i nosič

Monoklonální protilátky tvoří relativně dobře konstituovanou skupinu léčiv¹. Jejich výhodou je jasně definovaná interakce s antigenem, která spočívá v komplementaritě proměnlivých úseků Ig a povrchových struktur antigenu. Této specifické interakce je možno využít nejen při použití samotných protilátek, ale i při jejich fusi s klasickými léčivy, která pak jsou cílena k žádaným strukturám. Monoklonální protilátky tak mohou sloužit nejen jako léčivo, ale současně i jako nosič, zaručující transport léčiva k místu účinku^{1,5}.

Do klinické praxe se monoklonální protilátky dostaly již před delší dobou a je možné se s nimi setkat pod rozličnými názvy, které mohou sice působit krkolomně, ale přesto podléhají normovanému názvosloví, jehož konstantní součástí je koncovka –mab, značící monok-

lonální protilátky, nebo jejich fragmenty. Další součásti jejich názvu se vztahují k:

a) původu protilátky:

- o myš
- a potkan
- e křeček
- i primáti
- u humánní
- xi chimerní

b) místu zásahu:

- vir virální
- bac bakteriální
- lim imunitní
- les infekční lese
- cir kardiovaskulární.

V případech, že jsou protilátky použité pro léčební nádorů, je nadále upřesněno i místo jejich zásahu:

- col kolon
- mel melanom
- mar prsní mléčná žláza
- got testes
- gov ovaria
- pr(o) prostata
- tum různé.

Monoklonální protilátky jsou používány hlavně proti nádorovým onemocněním, kde byla potvrzena jejich schopnost zastavovat růst a v některých případech i vyvolat apoptosu nádorových buněk⁵. K dalším onemocněním, které je možno takto léčit patří revmatoidní artritida a sklerosa multiplex. Velký výběr konkrétních příkladů čtenář může najít např. v článku Beneše¹.

Výzkum v oblasti monoklonálních protilátek se však nezaměřuje jen na přípravu protilátek, specifických k novým cílům. Mnoho úsilí bylo věnováno i přípravě modifikovaných protilátek, jež by zaručovaly lepší odezvu imunitního systému. Byl tak např. zkoumán vliv změn aminokyselinového složení a glykosylačního motivu v Fc regionu imunoglobulinů. Při tomto byl prokázán patrný vliv *in vivo* u zvířecích modelů nádorových onemocnění⁴.

Jiným směrem se ubíral výzkum koktejlových preparátů monoklonálních protilátek. Ten byl povzbuzen známým faktem, že polyklonální protilátky mohou působit jako léčivo. Pro úspěšnou iniciaci apoptosu buněk je navíc třeba dosažení určité koncentrace vázaných protilátek na povrchu buňky, což lépe zaručují právě polyklonální protilátky obsahující imunoglobuliny specifické k různým epitopům na povrchu buněk. Koktejl monoklonálních protilátek pak měl řešit některé problémy vyskytující se při užití polyklonálních protilátek – jejich imunogenitu, nízký titr žádaných protilátek a fluktuace kvality v závislosti na výrobní šarži. Byly vypracovány výrobní postupy, které měly řešit problém cenové náročnosti a stability výroby. Jako možné cesty tak byly vybrány produkce protilátek v transgenních zvířatech a pomocí monoklonálních a polyklonálních buněčných linií⁴.

Současně s vývojem imunoglobulinů probíhá i výzkum léčiv založených na jejich fusi s monoklonální

protilátkou. I když se ukazuje, že hlavní nevýhodou bude cena konečného preparátu⁴, bylo by možné tímto způsobem připravit perspektivní účinné látky. Imunoglobuliny lze totiž použít jako nosiče pro širokou paletu látek – léčiva, toxiny, enzymy, radioisotopy a adenovirální vektory⁵. Výhoda těchto konjugátů nespočívá jen v cíleném působení, ale i ve snížení toxicity některých léčiv nebo nahrazení MHC struktur u nádorů, které cíleně potlačují jejich expresi. To by mohlo vést k novým cestám v jejich terapii⁵. V literatuře je jako příklad zmínovaných konjugátů uváděn Mycograb[®], což je kombinace monoklonální protilátky s docetaxelem, jehož využití je předpokládáno pro léčení metastazujících a vracejících se nádorů prsu¹. Imunoglobuliny je dále možné navázat i na liposomy, což vedle cíleného působení má za následek i kontrolované uvolňování léčiva a prodloužení jeho účinku⁵.

„Virální biofarmaceutika“

Ve stadiu výzkumu a úvah se nyní nachází využití virových proteinů pro modulaci chemokinového systému lymfocytů. Tento systém hraje důležitou roli v chemotaxi lymfocytů a způsobu imunitní odpovědi organismu. Jeho specifické ovlivňování by tak mohlo otevřít cesty k novým terapiím.

Bylo například zjištěno, že lidský herpesvirus 8 (HHV8) produkuje látky, které působí jako antagonisté i agonisté chemokinových receptorů lymfocytů. Mezi tyto látky se řadí protein vMIP-II, jenž specificky blokuje šest z 18-ti chemokinových receptorů lymfocytů Th1, které jsou odpovědné právě za imunitní odpověď proti virům. Na druhou stranu tento virus uvolňuje i proteiny vMIP-I a III, které působí jako agonisté chemokinových receptorů lymfocytů Th2, odpovědných za humorální imunitu, a tím je aktivují. To má za následek změnu charakteru imunitní odpovědi a inhibici lymfocytů Th1 (lymfocyty Th2 dodatečně vylučují látky, které těmto lymfocytům dále brání v růstu).

Podobnost tohoto procesu s jinými, probíhajícími při různých patofysiologických stavech, by mohla podpořit vývoj terapeutik modulujících imunitní odpověď jejich cíleným, lokálním působením a navíc šetrným k organismu. Využití léčiv na tomto principu je myslitelné např. při transplantacích, revmatoidní artritidě a sklerose multiplex.

Jinou strategii používá poxvirus *Molluscum contagiosum*, jenž svým proteinem MC148 výjimečně specificky blokuje chemokinový receptor CCR8. Proč právě pouze tento receptor není jasný, ale podobný přístup je plánován pro studium a vývoj nových léků proti astmatu.

Poslední skupinu látek virového původu (poxviry), jež by mohly sloužit jako modulátory chemokinových receptorů, tvoří tzv. chemokiny vázající proteiny (CBP), které působí vazbou a maskováním přirozených ligandů chemokinových receptorů a bývají tak nazývány neutralizující chemokiny.

Je možné rozlišit tři typy:

a) **CBP-I**, které se váží na glykosaminyglykan (GAG) vázající epitop chemokinů. To je zajímavé pro další výzkum, neboť právě vazbou chemokinů na GAG se tvoří v tkáních chemokinový gradient.

b) **CBP-II** interagují s receptor vázajícím epitopem většiny chemokinů

c) **CBP-III**, jejichž mechanismus účinku je prozatím neznámý a vyskytující se u g-herpesvirus 68.

Bez ohledu na mechanismus vazby CBP na chemokin je účinek stejný – zhroucení chemokinového gradientu a porušení chemotaxe lymfocytů.

Závěr

Biofarmaceutika jsou dynamicky se rozvíjející skupinou léčiv, kdy strmý nárůst jejich počtu je podmíněn novými objevy v rámci rekombinantních technologií, využití buněčných kultur pro velkoobjemové výroby, biologie, biochemie a molekulární genetiky. Vedle jejich použití jako samostatných léčiv, kde působí jako

vlastní účinná látka, je možné s jejich pomocí připravit i fúzní léčiva, kde jejich role spočívá hlavně v přesném cílení léčiva k postižené tkáni. Pro tento účel se výborně hodí monoklonální protilátky, kdy konjugát klasického léčiva s imunoglobulinem zajišťuje cílené použití s menšími vedlejšími účinky. Hlavním nedostatkem těchto léčiv zůstává jejich cena. Současně byly představeny i jiné směry výzkumu, namířené např. na zlepšování vlastností monoklonálních protilátek, nebo použití jejich směsí. Nově se uvažuje i o využití virových proteinů pro cílené použití k modulaci imunitní odpovědi pomocí ovlivnění chemokinového systému. Zda se tyto látky dají využít i pro cílení léčiv bude v následujících letech předmětem dalšího výzkumu.

Literatura:

1. Beneš L: Chem Listy 101, 18 (2007).
2. Kempken F, Kempken R: Gentechnik bei Pflanzen, ISBN: 3-540-01216-8 (2004).
3. Lindow M et al: Trends Pharmacol Sci 24, 126 (2003).
4. Logtenberg T: Trends Biotechnol 25, 390 (2007).
5. Molema G: Drug Targeting Organ-Specific Strategies, ISBN: 3-527-60006-X (2001).
6. <http://en.wikipedia.org/wiki/Biopharmaceutical> (staženo 2.12.2007).

O B S A H

Káš J.: Úvodem	37
Pozvánka na 34 th FEBS Congress, Prague 2009	38
Holubová M., Strnádel J., Usvald D., Klaudy J., Plánská D., Vannuci L., Váňa P., Reisnerová H., Jílek F., Horák V.: TERAPEUTICKÁ A PATOLOGICKÁ FÚZE NÁDOROVÝCH BUNĚK S IMUNITNÍMI BUŇKAMI – NÁDOROVÉ VAKCÍNY VERSUS NÁDOROVÉ HYBRIDY	39
Rusňáková V.: Červené biotechnologie – historie a současnost	41
Dolejšová J.: Zlepšení kvality manga biotechnologickými postupy	44
Hašlerová L.: Aptamery – možnosti jejich přípravy a aplikace	46
Pospíšilík R.: Modré biotechnologie	48
Rimpelová S.: Alzheimerova choroba – Dehydroepiandrosteron (DHEA) jako biologický marker k detekci Alzheimerovy choroby	50
Blažek J.: Biofarmaceutika – Cesta k cílenému působení léčiv	54

C O N T E N T S

Kás J. Editorial	37
Invitation for FEBS meeting in Prague, July 4-9, 2009	38
Holubová M., Strnádel J., Usvald D., Klaudy J., Plánská D., Vannuci L., Váňa P., Reisnerová H., Jílek F., Horák V.: Therapeutic and pathological fusion of tumor cells with immune cells – tumor vaccines contra tumor hybrids	39
Rusňáková V.: Red biotechnology – history and present times	41
Dolejšová J.: Quality improvement of mango by biotechnological approaches	44
Hašlerová L.: Aptamers – prospects of their preparation and application	46
Pospíšilík R.: Blue biotechnology	48
Rimpelová S.: Dehydroepiandrosterone (DHEA) as a biological marker for detection of Alzheimer disease	50
Blažek J.: Biopharmaceuticals – Challenge for drug targeting	54

POKYNY PRO AUTORY

Vážení přátelé,
aby byla technická úprava našeho časopisu co nejlepší a s minimálním množstvím chyb, uvítali bychom dodržování některých dále uvedených zásad.

1. Texty zasílejte elektronickou formou jako "attachment" spolu s tištěnou verzí, aby bylo možno opravit chyby způsobené přenosem.
2. Texty pište v editoru **WORD** (formát .doc), písmo **Arial**, velikost 11. Zarovnání do bloku, styl **NORMÁLNÍ**, nečíslovat stránky. Nerozdělujte slova na konci řádků. V textu lze používat zvýraznění některých termínů tučným písmem či kurzívou, a také horní a dolní index. Řádkování jednoduché. Odsazení odstavců a mezery mezi nimi nepoužívejte (nastavení = 0).
3. Nepoužívejte automatické číslování, tabulátory, ani „tvrdé“ definice stránek.
4. Obrázky zasílejte **zásadně zvlášť** v některém z běžných formátů (.jpg, .tif).
5. Připojte vždy svoji e-mailovou adresu či číslo telefonu, aby případné problémy bylo možno rychle řešit.

BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

Podávání novinových zásilek povoleno Ředitelstvím pošt Praha, čl. NP 1177/1994 ze dne 13. 6. 1994