

## REKOMBINANTNÉ DNA VAKCÍNY - NOVÉ PERSPEKTÍVY IMUNIZÁCIE

"Technológia" rekombinantnej DNA má rôzne, viac-menej priliehavé označenia (génové manipulácie, génové technológie a pod.). Poskytuje už dve desaťročia nové možnosti riešenia mnohých závažných problémov v medicínskych a iných biologických vedách a v technológii biologicky aktívnych látok. Umožnili ju najmä dva základné objavy v bakteriálnej genetike: objav DNA plazmidov, kódujúcich rezistenciu na antibiotiká u baktérií, a objav a využitie enzýmov restriktívnych endonukleáz. Tie zodpovedajú za tzv "imunitu" bakteriálnych buniek, nesúcich určité bakteriofágy, na infekciu inými fágami. Bunka sa bráni vstupu cudzorodej DNA najmä tým, že degraduje, "rozstrihá" túto genetickú informáciu. Tak sa zabezpečí nenarušená replikácia vlastnej DNA, a tým aj reprodukcia identických buniek.

Restriktívne endonukleázy alebo restriktázy sa v technikách rekombinantnej DNA využívajú tak, že sa určitou restriktívnou endonukleázou nechá najprv rozstrihnúť molekula DNA bakteriálneho plazmidu. Tým sa táto "kruhovú" molekula DNA otvorí a stane sa "lineárnou". Má na oboch koncoch doplnkové sekvencie nukleotidov (obyčajne tzv. sextet), ktoré by sa v prípade potreby mohli opäť spojiť na pôvodnú kruhovú molekulu R plazmidu (napr. pôsobením enzýmu DNA-ligáza).

Tento proces sám osebe by však nemal význam, keby sa tou istou restriktívnou endonukleázou nepodarilo nastrihať inú molekulu DNA, obsahujúcu určitý "potrebný" gén na produkciu príslušného proteínu. Tým vznikajú aj na koncoch tejto molekuly, resp. sekvencie DNA tie isté koncové štruktúry, ten istý sextet nukleotidov.

Ak sa teda pripraví zvlášť plazmidová DNA a zvlášť DNA génu, ktorý chceme "pomnožiť", a to obidve vlákna DNA s tou istou štruktúrou koncového sextetu (nazývajú sa aj "lepivé konce" - sticky ends), nič nebráni tieto dve molekuly zmiešať, čím vznikne určitý počet rekombinantných molekúl DNA. Tieto obsahujú príslušný gén vsunutý do DNA plazmidu.

Izolácia DNA rekombinantného plazmidu a jeho vsunutie do baktérií, ktoré ho potom replikujú a zároveň produkujú hľadaný proteín, kódovaný rekombinantným plazmidom, nie je už viac technickým problémom. Využíva sa pritom znak rezistencie na antibiotiká na plazmide, ktorý si baktérie osvojili.

Tak sa už vyrobili rekombinantné hormóny (napr. inzulín), imunomodulátory (interferóny, interleukíny CSF), niektoré rekombinantné antigény vhodné na imunizáciu (napr. povrchový antigén vírusu hepatitídy B, HBAgS) a i.

Stojíme však bezprostredne pred zavedením celých vakcín DNA do očkovacej praxe. Zakladá sa na priamom injikovaní DNA, kódujúcej ľubovoľnú zostavu antigénov, do organizmu ľudí či zvierat. Injikovaním týchto "konštruktov DNA" do organizmu sa "indukuje" hostiteľský organizmus na produkciu proteínov, ktoré zasa vyvolávajú protektívne protilátky, a, čo je dôležité, aj na vytváranie bunkovej imunitnej odpovede. Dosaiaľ poznáme hlavne tieto druhy vakcín:

1. živé atenuované vakcíny (napr. BCG),
2. inaktivované (usmrtené) vírusy (napr. Salkova polio-vakcína obsahuje vírus inaktivovaný formaldehydom),
3. purifikované komponenty baktérií či vírusov (napr. pneumokokové /polysacharidy/, alebo hemofilové),
4. už spomenuté vakcíny pripravené "génovými manipuláciami" (napr. HBAGS),
5. DNA vakcíny.

Príprava DNA vakcíny pomocou R plazmidov:

Gén, kódujúci určitý imunogén, sa vpraví pomocou techník rekombinantnej DNA do "expresívneho" alebo "expresného" R plazmidu (nazývaný tak, pretože sa pomocou DNA plazmidu tento vsunutý gén v produkčných baktériách "exprimuje"). Deoxyribonukleínová kyselina (DNA) rekombinantného plazmidu sa izoluje a vpraví (napr. transformáciou) do buniek produkčných baktérií. V nich sa DNA rekombinantného plazmidu replikuje. Potom sa plazmidová DNA z produkčných baktérií izoluje. Deoxyribonukleínová kyselina plazmidu exprimujúceho príslušný imunogén sa potom používa na imunizáciu.

DNA vakcíny majú celý rad výhod oproti dosiaľ používaným vakcínam. Priame injikovanie DNA vedie v organizme očkovanej osoby k syntéze proteínov - protilátok - v ich prirodzenej forme. V iných vakcínach môžu byť proteíny poškodené, napr. pri ich purifikácii, takže sa môžu čiastočne líšiť od ich "natívnej formy", ktorá sa fakticky vyskytuje u mikroorganizmov - pôvodcov ochorení. Najdôležitejšou vlastnosťou DNA vakcín je však skutočnosť, že stimulujú tvorbu nielen protilátok, ale aj T-buniek (T-helper 1 alebo T-helper 2). Bežné tzv. subjednotkové vakcíny, ako napr. už spomenutý rekombinantný povrchový antigén vírusu hepatitídy B (HBAgS), stimulujú tvorbu cytolytických T-buniek len veľmi málo. Cytolytické T-bunky sú schopné priamo usmrcovať bunky obsahujúce patogénne mikroorganizmy. A tak "použitie DNA na stimuláciu cytolytických T-buniek predstavuje míľnik v súčasnej vakcinológii" (ASM News 63, 1997, č. 12, s. 660-663).

DNA vakcíny vyvolávajú dlhotrvajúcu imunitnú odpoveď hostiteľského organizmu podobne ako živé atenuované vírusy, ale bez rizika, ktoré predstavuje používanie živých vakcín.

Technológia DNA vakcín je v porovnaní s ostatnými spôsobmi prípravy vakcín podstatne jednoduchšia. Výrobcovia vakcín môžu použiť prakticky totožné metódy fermentácie, purifikácie a testovania kvality, ako boli už dovtedy vypracované pre iné génové technológie. Používa sa tá istá technológia s R plazmidmi a metódami rekombinantnej DNA. Táto skutočnosť vedie k zníženiu cien vakcín rôzneho druhu. Okrem toho DNA vakcíny sú stabilné pri rôznych teplotách, čo umožňuje ich transport a skladovanie aj v extrémnych klimatických podmienkach.

Ostáva ešte určiť optimálny čas na imunizáciu novorodencov rôznymi DNA vakcínami, vypracovať nové metódy ich aplikácie (napr. ako spray na rôzne sliznice) a získať vakcíny pre ich prípadné použitie napr. pri chronických ochoreniach, autoimúnnych ochoreniach, alergických, nádoroch a AIDS.

Celkom nedávne výsledky, získané na zvieracích modeloch a čiastočne aj u ľudí, naznačujú, že táto nová rekombinantná technológia prípravy a použitia DNA vakcín budú znamenať zásadný pozitívny obrat vo vakcinácii ľudí i zvierat. Treba dúfať, že táto technológia urýchli prípravu aj celkom nových, dosiaľ neexistujúcich vakcín a zlepší situáciu v riešení súčasných závažných problémov zdravotníctva na celom svete.

V. Krčméry, sen.  
R. Menkyna