

Moderní technologie výroby vakcín. Část I.

(A plethora of hi-tech vaccines - genetic, edible, sugar glass, and more. Special report).

Maurice John, Children's Vaccine Initiative (CVI)
CVI Forum, č. 18, July 1999, s. 5-23.
Volně přeložil a zkrátil MUDr. Plesník

V celém článku bude pojednáno o DNA vakcínách, o vakcínách z transgeních rostlin, o cukrových (sugar glass) vakcínách a o náplastových (skin patch) vakcínách.

Všichni vědátoři se shodují na tom, že očkování je nejspolehlivější a nejlevnější cesta ke zdraví lidstva a k jeho udržení. Ve světě je očkováno asi 80% dětí. Každý rok je tak zabráněno třem milionům úmrtí dětí na infekční nemoci a u dalších 750. 000 tisíc se očkováním předejde slepotě, obrnám a poškození mozku. Ale proč, když je dnes na trhu přes 100 různých vakcín proti cca 40 infekcím a tři čtvrtiny světové populace dětí jsou očkovány proti "nejčastějším" dětským infekcím, ještě stále každý rok umírá na infekční nemoci asi 12 milionů dětí ?

Především proto, že asi 2/3 z těchto úmrtí působí infekce proti nimž dosud není účinná vakcína (tab 1). Ta chybí pro velké výrobní potíže (HIV/AIDS, malárie, RSV, shigelózy), nebo pro malý zájem firem o výrobu vakcín pro země se slabou kupní silou

Tab. 1: Úmrtí na infekce dle dostupnosti účinné vakcíny

Infekce A	Počet a % úmrtí	Infekce B	Počet a % úmrtí
AIDS	2285 30, 4	VH-B	1000 24, 6
TBC	1498 19, 9	Morbily	888 21, 9
Malárie	1110 14, 8	Rotaviry	800 19, 6
Pneumokoky	1100 14, 6	Haem. infl. b	500 12, 3
Shigelózy	600 8, 0	Tetanus	410 10, 1
Enterotox. E. coli	500 6, 7	Pertuse	346 8, 5
RSV	160 2, 1	Cholera	120 3, 0
Schistosomóza	150 2, 0	Záškrt	5 0, 12
Leishmanióza	42 0, 6	Jap. encefalitis	3 0, 07
Chagasova n.	17 0, 2	Poliomyelitis	2 0, 05
Dengue	15 0, 2		
Lepra	2 0, 03		
Celkem úmrtí	7519 100, 0		4074 100, 0
Všechna úmrtí na infekce :	11593		

A= infekce proti nimž dosud není účinná vakcína

B= infekce proti nimž existují účinné vakcíny

Počet úmrtí je vyjádřen v tisících !

Některé užívané vakcíny (BCG, cholerové) nestačí k výraznému snížení úmrtnosti, některé jsou příliš drahé (VH-B, Hib). Údaje o 80% proočkovánosti dětí proti základním

infekcím jsou hrubým průměrem. Např. v některých afrických zemích není očkována ani polovina dětí (války, hladomory, rozpad zdrav. sítě aj.).

- 2 -

Suma financí na výzkum, výrobu a distribuci vakcín ze všech hlavních zdrojů (státních, soukromých) nyní tvoří asi 1 miliardu USD. Je to dvojnásobek částky vynakládané před 10 lety. Ale ve stejném období ještě více vzrostly zisky z prodeje vakcín. Ze dvou miliard na asi 6 miliard USD. Firmy však věnují na další výzkum a výrobu vakcín jen zhruba 15% zisku.

Současný výzkum pracuje asi na pětistech nových vakcín, namířených i proti neinfekčním nemocem (některým formám slepoty, Ca děložního krčku, žaludečním vředům, onemocnění koronárek), či revmatické artritidě, schizofrenii, roztroušené skleróze, diabetu aj. Výzkum se týká také nových adjuvans, vektorů (syntetických, živých), aplikačních pomůcek (stříkačky, tlakové injektory, aerosoly aj). Nové technologie usilují o přípravu vakcín, které bude možné snadněji aplikovat (na sliznice úst, nosu, střeva aj), které budou nejméně stejně účinné jako dosavadní vakcíny ale vyvolávat trvalejší imunitu i po menším počtu dávek, které lze efektivně vyrábět ve vysoké kvalitě a za nejnižší možné ceny a které budou stabilnější v nejrůznějších podmínkách (např nebude nutné je skladovat v chladničce).

DNA- vakcíny

Využití deoxyribonukleové kyseliny (DNA), tedy neživé látky, k produkci cytotoxických T-buněk, představuje revoluci ve výrobě vakcín. V r. 1989 bylo zjištěno, že do savčích buněk lze přímo, bez pomoci nějakého vektoru, vpravit cizí gen. O 3 roky později se ukázalo, že tato tzv. technika "holé DNK" může nejen navodit u zvířete-příjemce DNK produkci cizích bílkovin, ale že tyto bílkoviny mohou u zvířete vyvolat imunitu. V r. 1994 bylo neodvolatelně prokázáno, že u zvířat může cizí bílkovina, produkovaná buňkami transfikovanými holou DNA, navodit ochrannou imunitní reakci. DNA byla injikována nebo tlakovým injektorem vpravována do svaloviny, nebo vetřena v podobě prášku do kůže. Experimentální DNA-vakcíny vyvolávaly imunitní reakce u celé řady živočichů, od myší po delfíny a ptáky, navozovaly u nich imunitu proti virům, bakteriím, mykobakteriím, houbám i parazitům (tab. 2) a chránily zvířata před rakovinou (T- i B-buněčný lym- fom a Ca ledvin), autoimunními nemocemi (roztroušené skleróza) a alergiemi (na burské oříšky). Imunology zvláště zaujala schopnost DNA-vakcín vyvolat širokou imunitní reakci, zahrnující jak vznik protilátek (humorální imunitu), tak T-buněk (buněčná imunita), zejména cytotoxických T-buněk (CTL). Tak širokou reakci vyvolávaly dosud jen živé vakcíny (morbily, TBC, OPV). U zvířat navozují DNA-vakcíny dlouho trvající ochranu, jsou mimořádně stabilní (jejich imunogenita neklesá ani během dlouhého skladování v extrémně nepříznivých podmínkách). Navíc jejich výroba je jednoduchá, zvládnutelná i v rozvojových zemích. Na rozdíl od atenuovaných živých vakcín, u nichž vzácně může dojít k reverzi do virulence, DNA-vakcíny nemohou způsobit infekci.

A protože DNA-vakcína je představována bílkovinou, kterou tvoří vlastní buňky očkovanice stejným způsobem jako při přirozené infekci, je antigen i reakce na něj mnohem přirozenější, než po jiných vakcínách.

Genová technologie slouží také ke zjištění jak vypadá celý genom určitého patogenu a k vyhledání genu, který vede k nejlepší imunitní odpovědi. Snadná je též příprava DNA-vakcín s mnoha - 3 -

geny, řídícími produkci všech antigenů potřebných pro vznik imunity. Dosud nezodpovězenou otázkou však je, zda tyto vakcíny se osvědčí také u lidí.

Imunitní reakce na DNA-vakcínu byla dosud zjištěna u ptáků, šimpanzů, krav, delfínů, frettek, ryb, myší, opic, prasat, králíků, krys, koček, koz a morčat.

DNA-vakcíny vyvolaly u nich ochranu před antraxem, Ca děložního krčku, cysticerkózou, cytomegalií, encefalitidou japonskou i klíšťovou, herpes simplex, HIV/AIDS, horečkou dengue a Ebola, chřipkou, kočičím imunodeficitem (FIV), kokcidiomykózou, kryptosporidiózou, leishmaniózou, malárií, nemocí Lymeskou, n. spavou, n. rukou, nohou a úst, parvovirózou psů, psinkou, rotavirózou, roztroušenou sklerózou, tuberkulózou, VH-B a VH-C, vzteklinou, yersiniózou, zarděnkami a alergií na burské oříšky.

V čase přípravy tohoto článku bylo asi 40 kandidátních DNA-vakcín, určených k ochraně proti cca 30 různým nemocem, od antraxu po alergii. Pět z nich procházelo prvou fází (imunogenita, bezpečnost) testování na lidech: proti VH-B, HSV-1 a HSV-2, HIV (dvě kandidátní vakcíny), chřipce a malárii.

Snad vyjma vakcíny proti malárii, vyvolávající u lidí vznik cytotoxických T-buněk, dosavadní výsledky klinických studií s ostatními vakcínami nejsou příliš optimistické. Zatím co u zvířat jsou velmi účinné, je u lidí je odpověď slabá, nebo k jejímu dosažení bylo třeba velké dávky DNA.

Jednou z příčin je malý průnik plasmidové DNA do buňky hostitele, kam se dostává jen zlomek podané dávky. Proto místo plasmidů se zkouší virový vektor (např. v. Sindbis), převyšující potenci plasmidové DNA až tisíckrát. Testuje se zpětné vložení plasmidu nesoucího gen do bakteriální buňky (vakcíny ze shigel a salmonel, listerií), obalení plasmidu s DNA do biodegradabilního polymeru, zajišťujícího ochranu proti žaludeční šťávě po podání ústy, zkouší se různá adjuvans (aluminium hydroxid, cytokiny) a další.

Každá novinka vyvolává také obavy. K nejčastějším patří dotazy typu: Nemohou protilátky navozené DNA-vakcínou napadat DNA očkovanice samotného a vyvolat u něj autoimunní nemoc? Nepovede dlouhá imunostimulace po podání vakcíny k chronickým zánětům či k autoimunní reakci? Nedojde k integraci DNA-vakcíny s DNA očkovanice a ke vzniku onkogenů nebo k potlačení represorů (genů, které tlumí onkogeny)? Musíme si však uvědomit, že DNA-vakcína vyvolává imunitní reakci nikoliv proti DNA, ale proti bílkovině produkované buňkami, které jsou penetrovány (transfikovány) vakcinální DNA. A navíc, většina lidí je nositeli protilátek proti DNA, např. z bakterií, a je exponována DNA z bakterií či jídla stále. Nezdá se však, že by jim to škodilo. Zatím nevíme jak dlouho cizí DNA v organismu přetrvává. Bezpečnostní studie u zvířat však prokázaly, že tím nedochází k poškozování organismu. Dosud také chybí detailní studie, které by se u

zvířat zabývaly integrací DNA z vakcíny s DNA očkovance. Někteří odborníci soudí, že i. m. aplikace není pro DNA-vakcíny optimálním způsobem aplikace. Prosazují se metody umožňující přímý styk DNA s dendritickými buňkami v kůži a sliznici. So-
tva však lze pochybovat o tom, že DNA-technologie bude v novém tisíciletí jednou z hlavních metod přípravy nových vakcín.

- 4 -

Jedlé rostlinné vakcíny

V polovině osmdesátých let napadlo dva molekulární biology při klábosení v autě, že cizorodá DNA by mohla být zavedena do genomu rostlin. Nápad zkusili u tabáku a petunie. Vzniklé transgenní rostliny skutečně produkovaly cizorodou DNA. Odtud byl už jen krůček k nápadu, proč nepřimět jedlé rostliny aby v listech či kořenech, které lidé jedí, začaly produkovat vakcinální antigeny. A tak vznikly "jedlé vakcíny". Na rozdíl od DNA-vakcín rostliny nejen produkuje antigen, ale současně konzumace rostlin představuje expozici vakcinálnímu antigenu, tedy "očkování".

V posledních 15 letech bylo geneticky "obohaceno" nejméně 50 potravin rostlinného původu různými viry a postup je podrobně propracován. Jedlé vakcíny získaly velmi rychle pevné postavení ve výzkumu vakcín. Roku 1992 byla publikována zpráva o první úspěšné expresi HBsAg v transgenním tabáku. O tři roky později bylo sděleno, že tento HBs-antigen vyvolává stejně intenzivní humorální i celulární imunitní odpověď jako komerční HBsAg, získávaný z kvasinek. Objev silně zaujal jak pracovníky sdělovacích prostředků, tak výrobce vakcín. V současnosti se zabývá vývojem jedlých vakcín jako jedinou, či hlavní pracovní náplní, nejméně pět biotechnologických společností.

V březnu 1998 byl zveřejněn první důkaz, že myši krmené bramborami, exprimujícími netoxický fragment choleroxinu, tvoří na sliznicích antitoxin. Po čelendži úplným choleroxinem došlo v krmené proti kontrolní skupině k 60% snížení akumulace průjmové tekutiny. V uvařených bramborách zůstalo 50% aktivního antigenu

Australané uskutečnili úspěšnou transfekci rostlin tabáku, který začal produkovat antigen viru spalniček. U myši vyvolal tento antigen tvorbu neutralizačních protilátek.

V květnu 1998 se objevila první zpráva o imunizaci lidí: deset z jedenácti dobrovolníků, kteří snědli 100 g syrových brambor geneticky upravených tak, aby produkovaly B subjednotku enterotoxigenní E. coli (ETEC - častá příčina průjmu cestovatelů), mělo výraznou imunitní odpověď. Jedinou nežádoucí reakcí byla lehká nevolnost po požití syrových brambor.

V březnu 1999 se uskutečnila obdobná studie s bramborami, exprimujícími antigeny viru Norwalk, jiného původce průjmů. U 19 ze 20 dobrovolníků vznikla výrazná imunitní odpověď buněk produkujících sekreční IgA protilátky. V červenci 1999 byla zahájena první etapa klinické studie s orální vakcínou proti VH-B, produkovanou transgeními bramborami. Bude-li ověřování úspěšné, bude tato vakcína sloužit k přeočkování osob dříve očkovaných

klasickou rekombinantní vakcínou. Probíhají studie s kombinovanými jedlými vakcínami z brambor (HBsAg+choleratoxin) a s jedlou vakcínou proti vzteklině z transgenních rajčat. Další práce jsou zaměřeny na vznik transgenních rostlin, které budou zdrojem protilátek k pasivní imunizaci. Např. sekrečních IgA proti nejčastějšímu původci zubního kazu- Streptococcus mutans, anebo proti HSV-2 (transgenní banány).

Také u "jedlých vakcín" se vynořily kritické připomínky, ke kterým je třeba zaujmout stanovisko:

- * Náš imunitní systém nereaguje na jídlo stejně (bohudík !) jako na infekční agens. Nebude však stejně tolerantní na vakcinální antigeny v potravině a dojde vůbec k ochranné reakci ?

- 5 -

Ve studii u lidských dobrovolníků s atenuovaným toxinem E. coli, produkovaným bramborami, došlo k výrazné imunitní odpovědi na toxin a nebyly žádné známky tolerance.

- * Nedojde k destrukci proteinových antigenů, přítomných v požitém jídle, vlivem působení žaludeční šťávy, enzymů a střevní mikroflóry ?
Antigeny jsou chráněny před žaludeční šťávou značně odolným rostlinným pletivem, na němž závisí stupeň jejich narušení. Ale některé antigeny jsou samy o sobě rezistentní vůči působení kyselin a enzymů.

- * Uplatní se tento druh vakcín i proti nepřátelskému postoji, který zaujali odpůrci očkování a genetických manipulací ?
I podle velmi přísných norem a předpisů bylo prokázáno, že jedlé vakcíny jsou bezpečné a účinné. Není žádných důvodů pro jejich odmítání s ohledem na způsob výroby.

- * Jak se pozná, že transgenní rostliny s vakcinačním antigenem "dozrály" ke sklizni ?
Tady velmi záleží na druhu rostliny. Současné studie s alfafou naznačují, že po dozrání listů může být sklizena kdykoliv. U banánů se hledá vhodný signál, svědčící o expresi DNA, který by ukazoval, v průběhu zrání, dosažení maximální koncentrace vakcinálního antigenu.

- * Jak bude zajištěno podání správné dávky vakcíy v konzumovaném jídle ?
Zřejmě bude třeba mít k tomu uniformní rostlinný materiál. Technologické postupy potravinářského průmyslu sloužící k zajištění jednotné kvality a složení potravin by měly být použitelné i u potravin obsahujících vakcinální antigen.

- * Jak bude ověřováno, že určitá rostlina skutečně obsahuje vakcinální antigen ?
Standartní metody běžně užívané ve výzkumu snadno prokážou zda a kolik antigenu obsahuje vzorek rostliny. Biotechnologickými postupy je možné navodit o rostlin s antigenem nové fenotypické znaky, např. oranžové zbarvení

banánů nebo rajčat.

- * I transgenní rostliny bude třeba přepravovat a skladovat. Nakolik bude uchován vakcinální antigen v nahnívajících skladovaných rostlinách ?

Zkoumají se způsoby vysušování těchto rostlin a zpracování do výrobků jako např. dětská banánová kašička, sušená rajčata, bramborové lupínky atd. Další možností je prodej tablet ze sušených listů alfafy jako náhražky bílkovin.

Pokračování a závěr v SMD 18.