

Geny v biotechnologiích

Jak to všechno začalo?

Jan Šmarda

MUNI
SCI

Ústav
experimentální
biologie

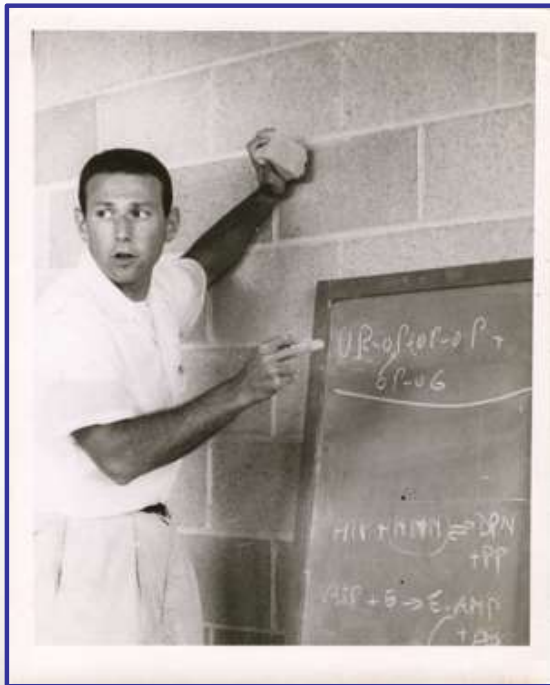
Začalo to stvořením rekombinantní DNA

- 70. léta 20. století
- západní pobřeží USA: Stanford, San Francisco

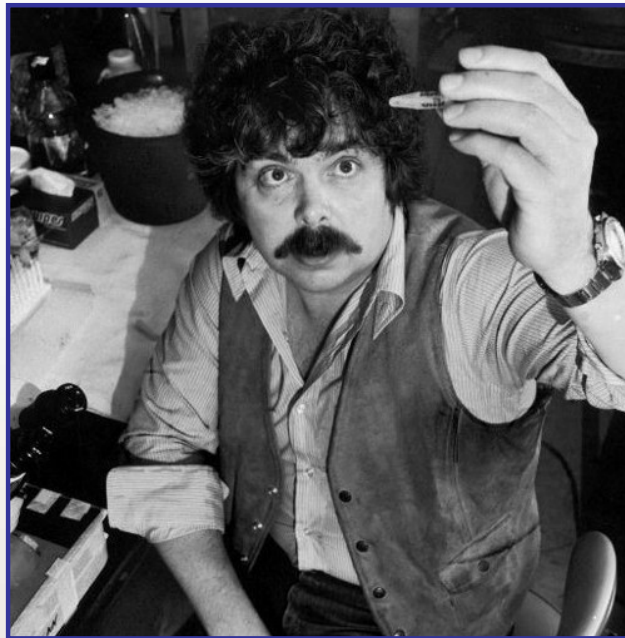


Hlavní protagonisté

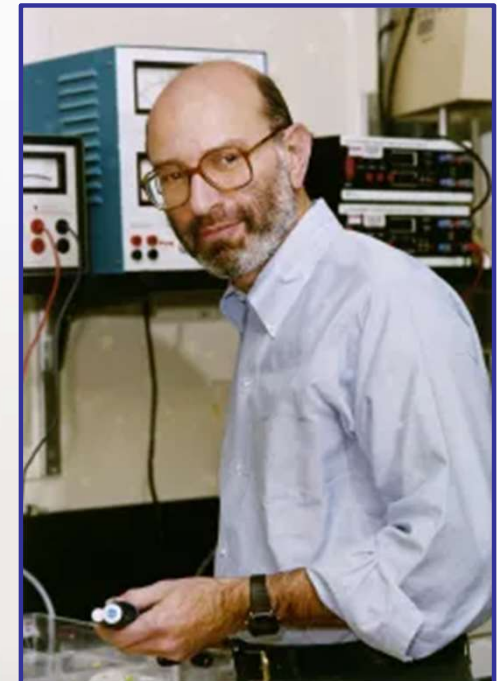
**Paul Berg
(1926-2023)**



**Herbert Boyer
(*1936)**



**Stanley Cohen
(*1935)**



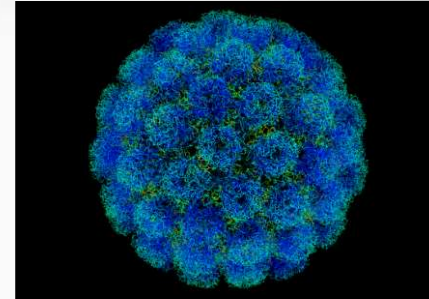
Virus jako dopravní prostředek genů?

- Berg se v r. 1968 se vrací z ročního pobytu na Salkově ústavu v La Jolla do Stanfordu
- ovlivněn virologem R. Dulbeccem se nově zaměřuje na lidské a živočišné viry

Vize:

pomocí viru SV40 do lidské buňky „propašovat“ cizí geny

Proč SV40?

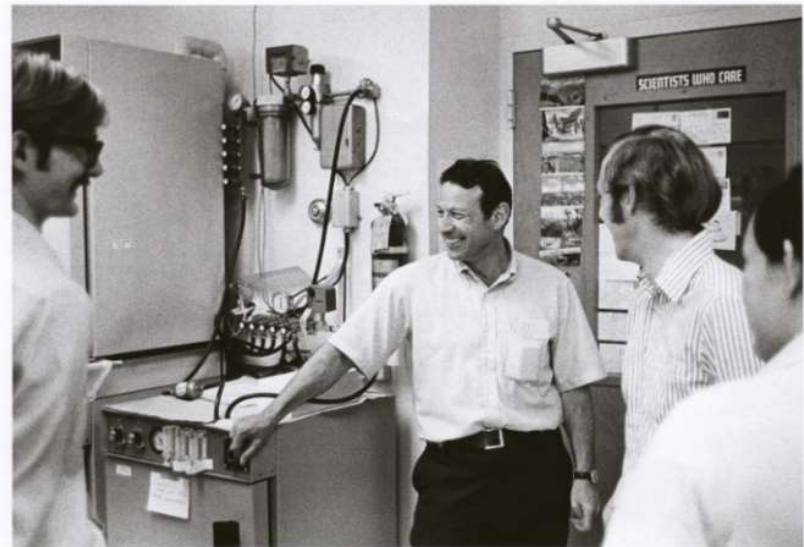


- modelový virus eukaryotických buněk po objevu kontaminovaných vakcín proti dětské obrně v 50. a 60. letech 20. stol.
- infikuje opičí a lidské buňky a perzistuje v nich (latentní - spící infekce)
- dokáže mírumilovně koexistovat s infikovanou buňkou

Cíl: Specifická změna genomu hostitelské buňky

Technické výzvy:

- Jak otevřít kružnicovou DNA viru?
- Jak do ní začlenit cizí gen?



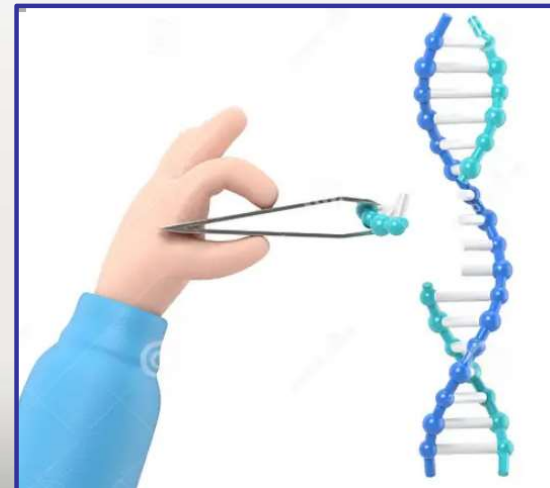
„DNA je jako traverza“

- tvrdí ve své disertaci **Peter Lobban**, student Stanfordovy univerzity
- přišel z MIT a pracuje v laboratoři sousedící s laboratoří Berga
- podle jeho „inženýrských“ představ lze DNA libovolně opracovávat a tvarovat jako ocelovou traverzu
- Griffith ji považil a přesto byla schopná transformovat bakterie
- jen je třeba najít vhodné nástroje



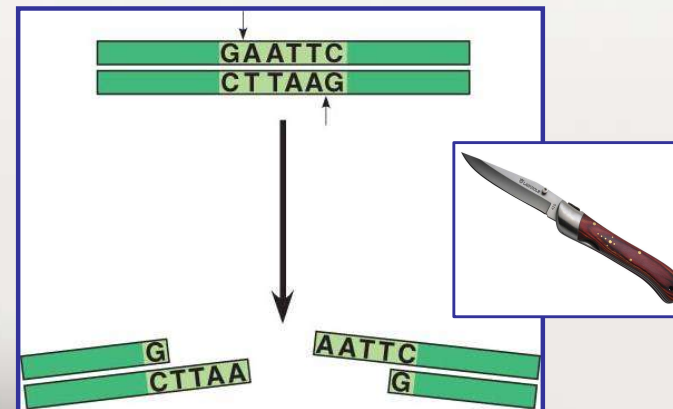
Kde najít nástroje pro manipulaci s DNA?

- pro začlenění genu do genomu viru SV40 je třeba jeho DNA přerušit, vlepít do ní cizí gen a zase spojit
- jako vhodné nástroje se jeví **enzymy**, které bakterie přirozeně používají pro odstraňování cizorodé DNA a udržování své vlastní
- všechny buňky mají „sadu nástrojů“ pro opravování poškozené DNA: **nukleázy**, **DNA-polymerázy** a **DNA-ligázy**



Bakterie mají navíc cílené „stříhací“ enzymy

- **restrikční endonukleázy**, protože omezují infekci virů – likvidují jejich genetickou informaci
- rozeznávají **specifické sekvence** nukleotidů v DNA, navážou se ně, a přeruší chemické vazby, které udržují kostru DNA, takže se rozpadne na kousky s určitými nukleotidy na koncích
- součást restrikčně-modifikačního systému bakterií, který slouží jako primitivní „imunitní systém“: likvidují DNA „nepřátelských“ patogenů

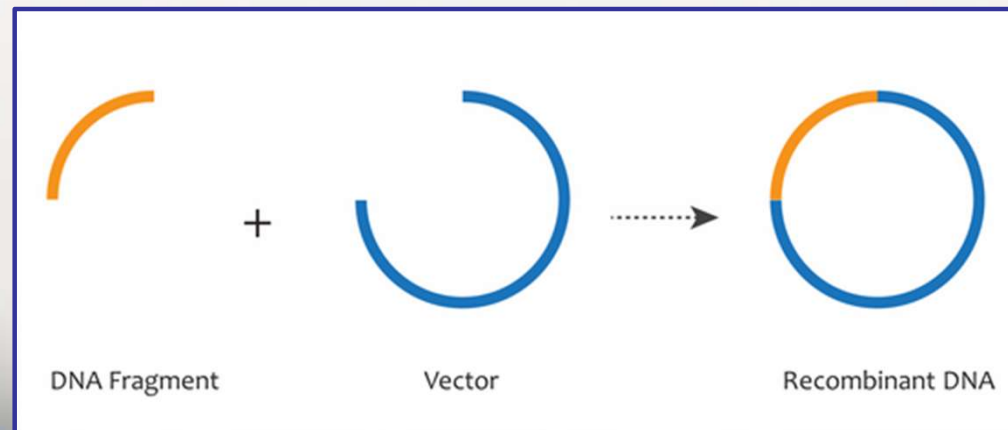


Přínos Berga

- zkombinování dřívějších poznatků a jejich vzájemné propojení do logického sledu kroků:
 - vyštěpení genu restriční endonukleázou
 - purifikace vzniklého fragmentu DNA
 - spojení s DNA viru ligázou
- nutnost opakované purifikace DNA na kolonách (před i po působení enzymů)
 - optimalizace reakčních podmínek enzymů
 - nepatrné výtěžky

Přínos Berga

- přes technické potíže se genom SV40 podaří spojit s fragmentem DNA bakteriofága lambda a třemi geny bakterie *E. coli*
- poprvé se v jediné molekule DNA setkávají geny z velmi evolučně vzdálených organismů (fág – virus – bakterie)
- vzniká nová technologie s dalekosáhlými důsledky: umožňuje geny nově kombinovat, měnit a přenášet mezi organismy!
- hybridní DNA Berg označuje jako „**rekombinantní DNA**“



Herbert Boyer

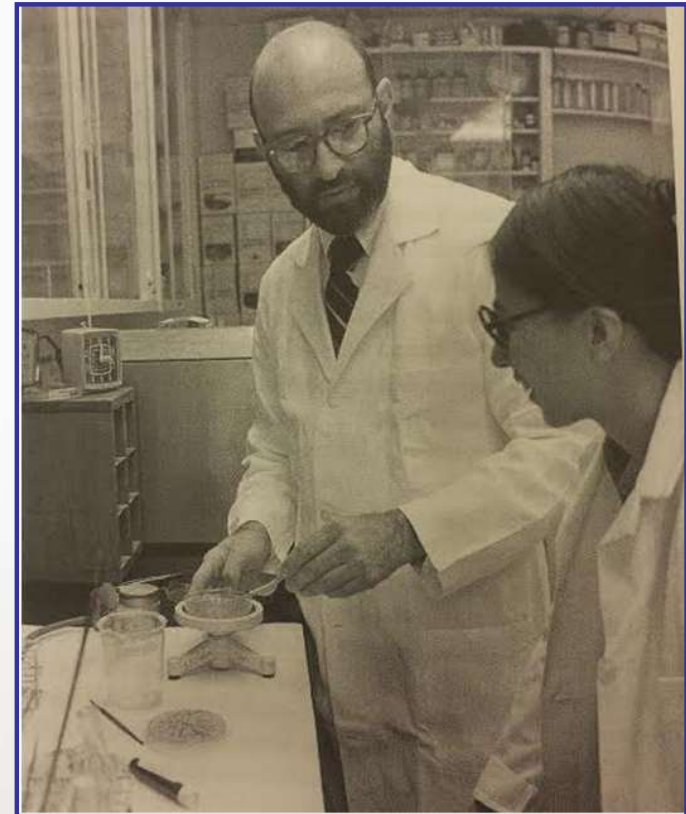
(*1936)

- nastupuje jako asistent na UCSF v r. 1966
- už na střední škole okouzlen moderní biologii
- své siamské kočky pojmenovává Watson a Crick
- zabývá se izolací restričních enzymů



Seznámení s Cohenem

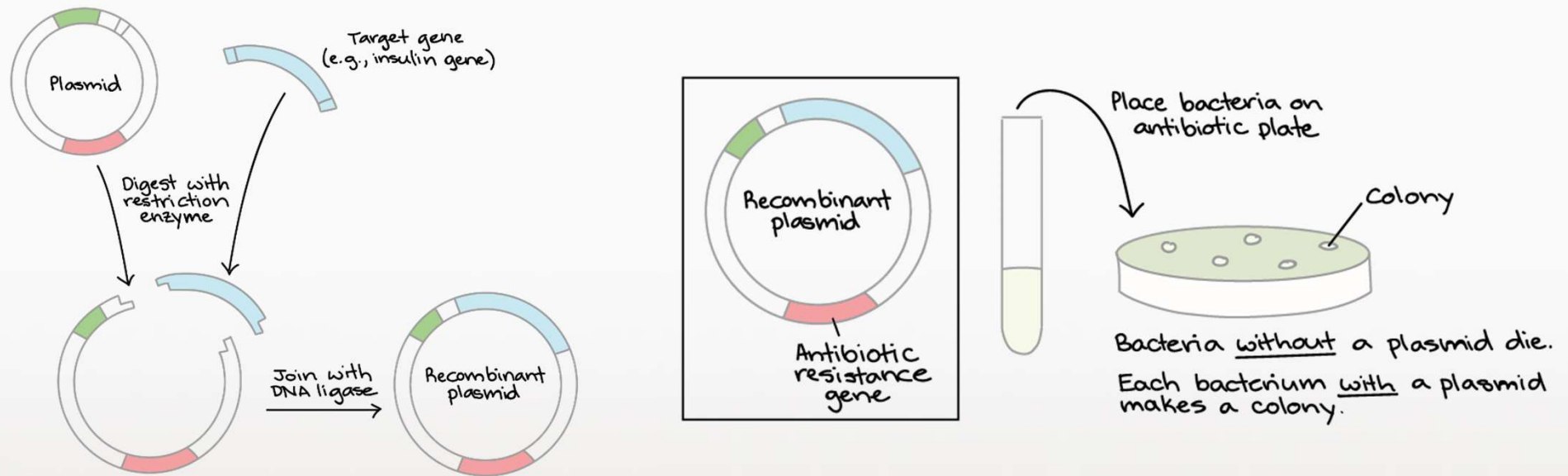
- Boyer se v listopadu 1972 na Havaji účastní konference zaměřené na genetiku bakterií
- vyslechne zde přednášku **S. Cohena** (Stanford University) o nově objevených plazmidech v *E. coli*
- Stanley Cohen je odborníkem na práci s plazmidy a jejich přenos do bakterií
- seznamují se



Spolupráce Boyer - Cohen

- optimalizace purifikace příslušných enzymů, transformačních a selekčních postupů
- Cohen objevuje možnost využití plazmidů nesoucích rezistenční geny a antibiotik pro selekci transformovaných bakterií
- **Berg** jednotlivé kroky propojí a vznikne sled reakcí: izolace plazmidu, naštěpení plazmidu, smísení s příslušnými fragmenty DNA, jejich spojení ligací, přenos do bakterií transformací, selekce transformantů rezistentních na antibiotikum, jejich kultivace, která je zároveň amplifikací hybridní DNA
- zavedena **technologie klonování DNA** - používá se dodnes

Klonování DNA



Úspěšný přenos genů mezi druhy

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 71, No. 5, pp. 1743–1747, May 1974

Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli* (restriction/plasmid/transformation/recombination/ribosomal DNA)

JOHN F. MORROW*†‡, STANLEY N. COHEN†, ANNIE C. Y. CHANG†, HERBERT W. BOYER§, HOWARD M. GOODMAN¶, AND ROBERT B. HELLING§||

Departments of *Biochemistry and †Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and Departments of §Microbiology and ¶Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, Calif. 94143

Communicated by Joshua Lederberg, January 4, 1974

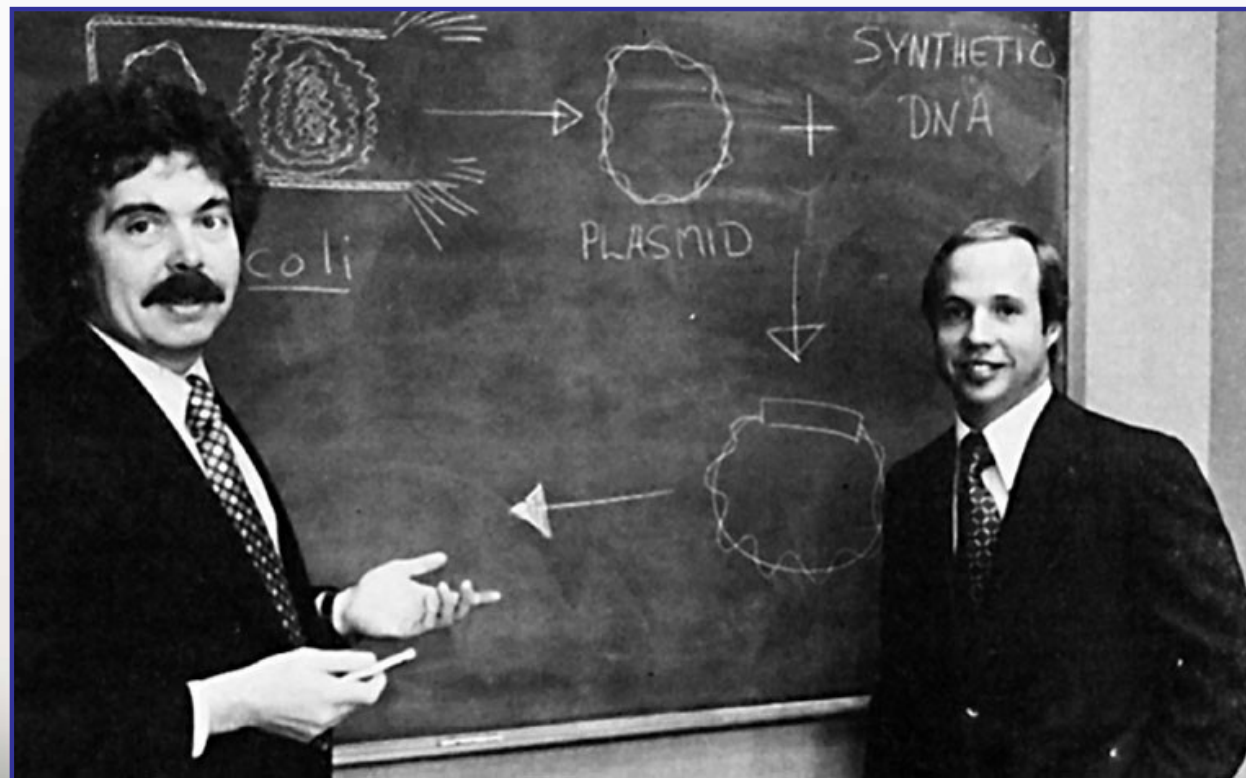
- novinku zachycují média a sdělují ji laické veřejnosti

Význam?

- techniky **klonování DNA** umožňují experimentálně manipulovat s geny a jejich prostřednictvím i s organismy
- společně s technikami **sekvenování** přináší klonování DNA **převrat v experimentálních možnostech biologie**

Genentech: zrození biotechnologického průmyslu

Koncem roku 1975 podnikatel **Robert Swanson** (28 let) telefonuje **Boyerovi** a prosí o schůzku.



Kdo je Robert Swanson?

- čtenář populárně vědeckých časopisů a milovník sci-fi
- začínající podnikatel
- z médií se dovídá o technologii rekombinantní DNA
- o biologii neví skoro nic
- intuitivně cítí, že rekombinantní DNA má komerční potenciál
- potřebuje odborníka - spojence
- hledá kontakty
- nejprve volá **Bergovi**, který se s ním odmítne bavit
- pak **Boyerovi**, ten mu roztržitě přislíbí 10 minut v pátek odpoledne

Schůzka Boyer - Swanson

- leden 1976 v laboratoři Boyera mezi hromadami napůl zahnívajících bakteriálních misek a inkubátory v Medical Sciences Building, UCSF
- Boyer v džínách a kožené vestičce, Swanson v obleku s kravatou



Schůzka Boyer - Swanson

- Boyer Swansona nezná
- dozvídá se, že je to investor, který by rád založil společnost zabývající se rekombinantní DNA
- Boyer neví, že téměř všechny Swansonovy předchozí investice do start-upů byly neúspěšné
- Swanson nemá práci, bydlí ve sdíleném podnájmu, jezdí v rozpadajícím se autě (Datsun)
- desetiminutová schůzka se natahuje na 3 hodiny a pokračuje v nedalekém baru
- diskutují o budoucnosti biologie a rekombinantní DNA



Schůzka Boyer - Swanson

- Swanson navrhuje zřízení společnosti, která by využívala nových klonovacích technik pro výrobu léků
- skeptický Boyer se nakonec se pro věc nadchne
- má syna, kterému diagnostikovali potenciální růstovou poruchu
- možnost výroby lidského růstového hormonu by mu mohla pomoci
- po 3 pivech se dohodli: každý dá 500 USD na pokrytí nákladů souvisejících se zřízením nové společnosti
- Swanson se obrací na svého bývalého zaměstnavatele – firmu **Kleiner Perkins** s žádostí o 500 000 USD na investici do nové společnosti
- firma odsouhlasí 100 000 USD (investici považuje za vysoce rizikovou, ale přesvědčuje ji Swansonovo nadšení)



KLEINER PERKINS

Řeší se název a první produkt

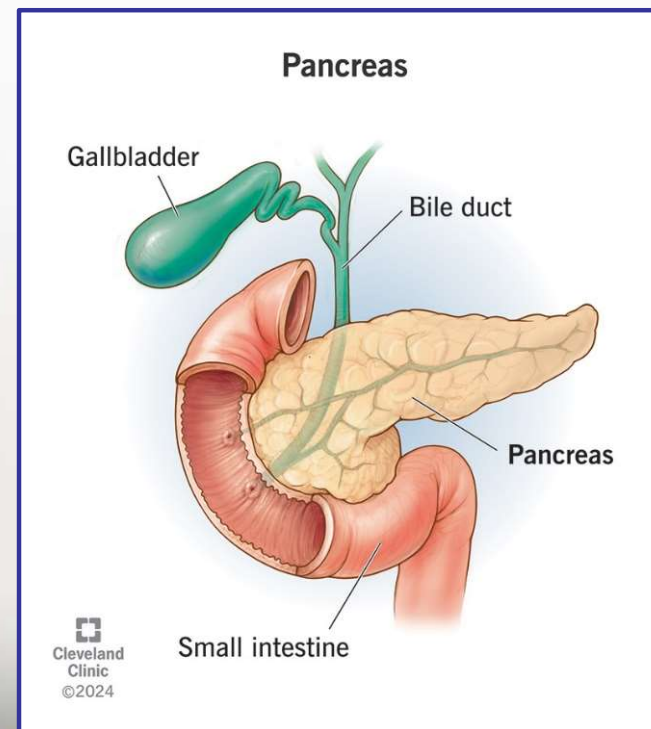
- první varianta názvu „**HerBob**“
(z křestních jmen Boyera a Swansona) zamítnuta
- přijat název **Genentech** (***Gen**etic **Eng**ineering **Tech**nology*)
- jako první produkt zvolen **inzulin**
- dosud se získává extrakcí z vnitřností krav a prasat
(půl kila inzulinu z 3,5 tun slinivek)
- šlo by nahradit tuto zastaralou technologii genovými manipulacemi?

Příběh slinivky břišní

- název pancreas (pan=vše, kréas=maso) se objevuje už ve spisech **Aristotelových**
- slavný starověký lékař **Galén** si všímá, že je tento orgán je naplněn sekretem a odhaduje, že má mechanickou zpevňovací funkci polštáře – brání poškození vnitřních orgánů při ohybu těla, aby nedošlo k natlačení žaludku na krevní cévy proti páteři
- tuto funkci akceptuje i **Vesalius** o staletí později
- protestuje jen Gabriel **Fallopious**, biolog z Padovy (16. stol.):
“polštář za břichem nemá smysl u zvířat chodících po čtyřech nohách”

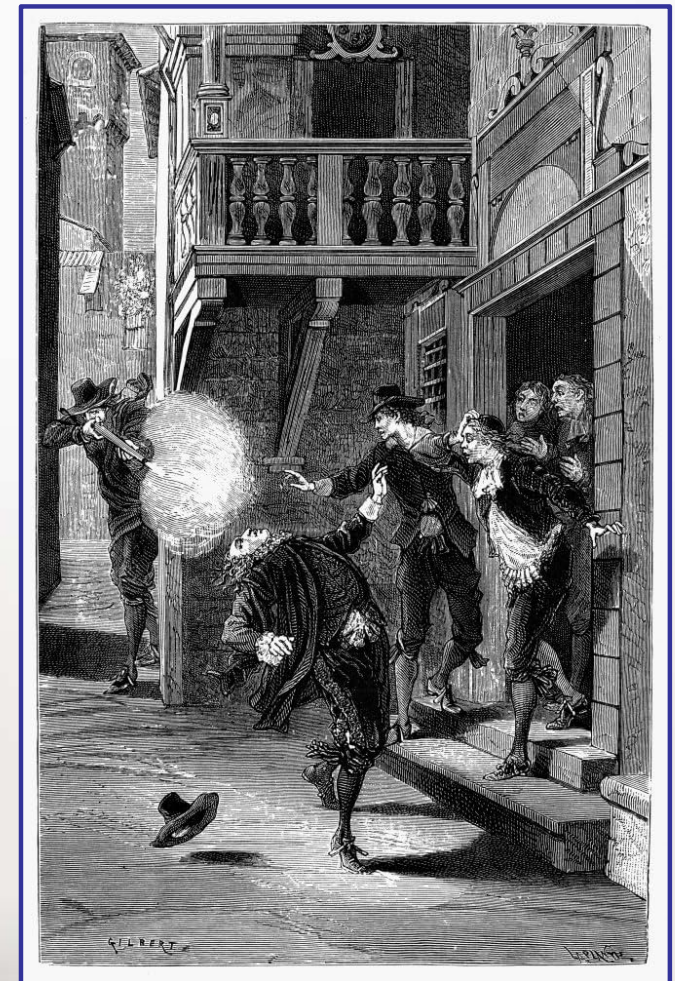
Rozkrývání funkce slinivky

- 1642: **Johan Wirsung** (1589-1643), německý patolog působící v Padově provádí pitvu břicha oběšeného zločince
- při pitvě mu pomáhá i mladý asistent Moritz Hoffman
- Wirsung objevuje novinku: slinivkou probíhá kanálek s vývodem do střeva
- funkce?



Vražda při rozkrývání funkce slinivky

- rok po publikaci svého objevu, 22.8.1643, je Wirsung před svým domem v Padově zastřelen
- možný motiv: Moritz Hoffman se dostal do ostrého sporu se svým mentorem
- Hoffman tvrdí, že je to on, kdo Wirsungovi dříve ukázal vývod slinivky u pokusného ptáka a Wirsung použil Hoffmanův objev pro identifikaci stejného kanálku u člověka



Zkoumání pankreatické tekutiny



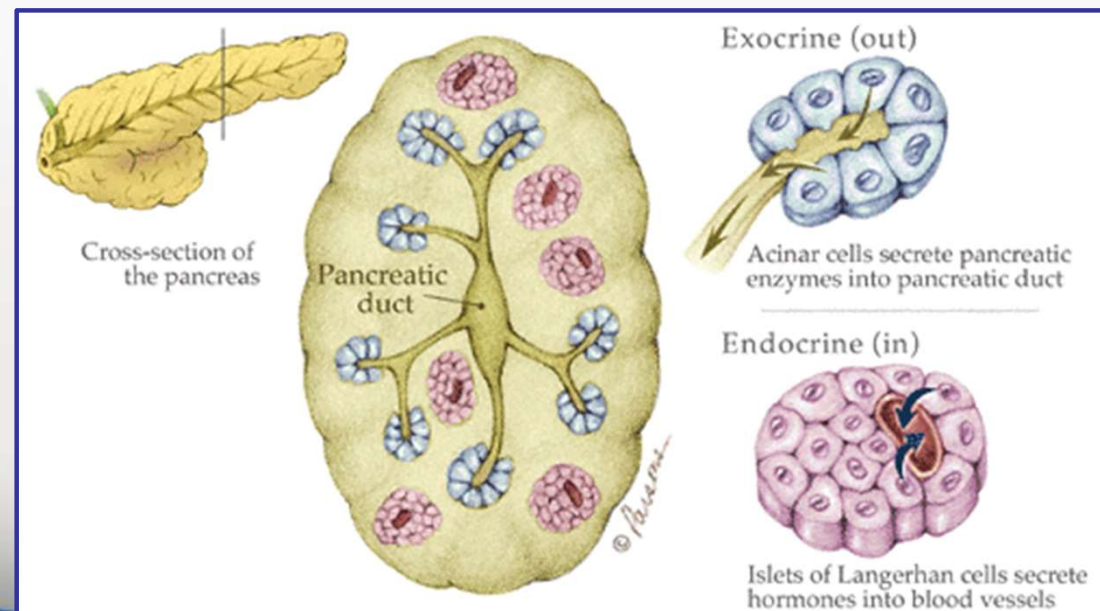
- 1848: francouzský fyziolog **Claude Bernard** provádí zásadní experiment
- extrahuje tekutinu ze slinivky psa a přidává k ní kousek tuku
- objev: tekutina během 8 hodin tuk emulguje – rozloží na malé částice
- závěr: šťávy vylučované slinivkou břišní rozkládají tuky, ale také škroby a bílkoviny – přeměňují komplexní molekuly potravin na jednodušší, stravitelné jednotky, tj. usnadňují trávení

Langerhanovy ostrůvky

- **Paul Langerhans** studuje medicínu v Berlíně
- jeho velkým vzorem je Rudolf Virchow, se kterým se přátelí jeho otec
- 1869: studuje slinivku mikroskopem
- nachází buňky, které se liší od ostatních a vypadají jako ostrůvky – funkce nejasná



Paul Langerhans
(1847-1888)



Funkce Langerhansových ostrůvků

- řešena o 20 let později (1889)
- chirurgové **Oskar Minkowski** a **Josef von Mering**



- odstraňují slinivku pokusnému psovi

Výsledek?

- pes trpí silnou žízní a vymočí se na podlahu
- není jasné, co to znamená
- po pár dnech si asistent všimne, že v laboratoři je plno much, které se hemží kolem psí moči seschlé do podoby lepivého sirupu
- vychází najevo, že moč i krev tohoto psa jsou přeplněné cukrem
- diagnóza: silná **cukrovka**



**ve slinivce musí být obsažený nějaký faktor,
který zodpovídá za regulaci hladiny cukru v krvi**

Dnes víme, že

- žízeň je příznakem cukrovky
- příčinou je nedostatek inzulinu → vyšší hladina glukózy v krvi → více glukózy v moči → vyšší míra vylučování vody močí → častější močení

Objev inzulinu

- později objeveno, že tímto faktorem je hormon – protein, který do krve sekretují buňky Langerhansových ostrůvků
- označuje se nejprve jako „isletin“ (*island protein*) a později inzulin
- v r. 1921 extrahují pár miligramů isletinu Američan **Frederick Banting** a Kanadán **Charles Best**



Charles Best
(1899-1978)

Frederick Banting
(1891-1941)

Příběh Bantinga

- 1920: Frederick Banting pracuje jako soukromý chirurg v Torontu, jeho praxe je malá a nevýdělečná
- kvůli svým dluhům přijímá nabídku pracovní pozice demonstrátora – asistenta hlavního lektora - na *University of Toronto*
- v říjnu 1920 si přečte vědecký článek o cukrovce pozorované u pacientů s onemocněním slinivky břišní
- autor zmiňuje, že v případě degenerace Langerhansových ostrůvků se objevuje cukrovka
- Bantinga to zaujme: **funkce ostrůvků nebyla známá, je zde hypotéza, že by mohla souviset s cukrovkou**

Rodí se experimentální koncept

- produkuje-li slinivka buňkami ostrůvků do krve jiné látky než kanálkem do střeva, je třeba obě funkce oddělit
- podvázat slinivkové kanálky psů
- udržet psy při životě dokud buňky produkující látky do střeva nezdegenerují
- ostrůvky by měly zůstat funkční
- z nich izolovat produkované látky
- otestovat, zda jsou schopny snižovat obsah cukru v moči

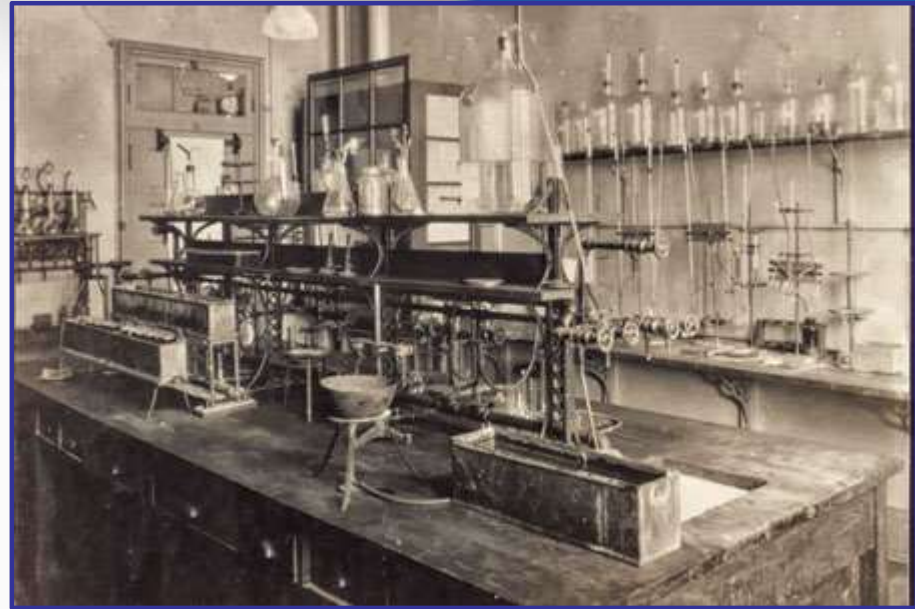
Reakce šéfa



- Banting jde za nadřízeným
- velmi respektovaným profesorem
v oblasti metabolismu cukrů **Johnem Macleodem**
- ten nejistému mladému chirurgovi bez zkušeností ve vědě moc nevěří
- nakonec souhlasí, že Bantingovi umožní provedení experimentu
na několika psech v jeho laboratoři a pověří jednoho ze svých dvou studentů,
aby mu pomohl: hodí si mincí, vyhrává **Charles Best**

Experiment

- princip jednoduchý
- provedení velice obtížné



léto 2021: nedostatečně vybavená laboratoř ve vrchním patře LF pod dehtovou střechou (vedro, obtížné zajišťování sterility zákroků)

1. skupina psů: chirurgické sešití vývodů slinivky, aby odumřely buňky produkující tekutiny do střev a nikoliv buňky ostrůvků

2. skupina psů: odstranění celých slinivek: eliminace veškerých šťáv produkovaných slinivkou, aby po přenesení šťáv z ostrůvků z první skupiny mohli definovat jejich funkci

Výsledek

- první pokusy neúspěšné
- první pes nepřežívá příliš vysokou dávku anestetika
- druhý pes vykrvácí
- třetí pojde na infekci
- trvalo několik pokusů než Banting a Best dokázali psa udržet při životě dostatečně dlouho, aby mohla být dokončena první fáze experimentu

Výsledek

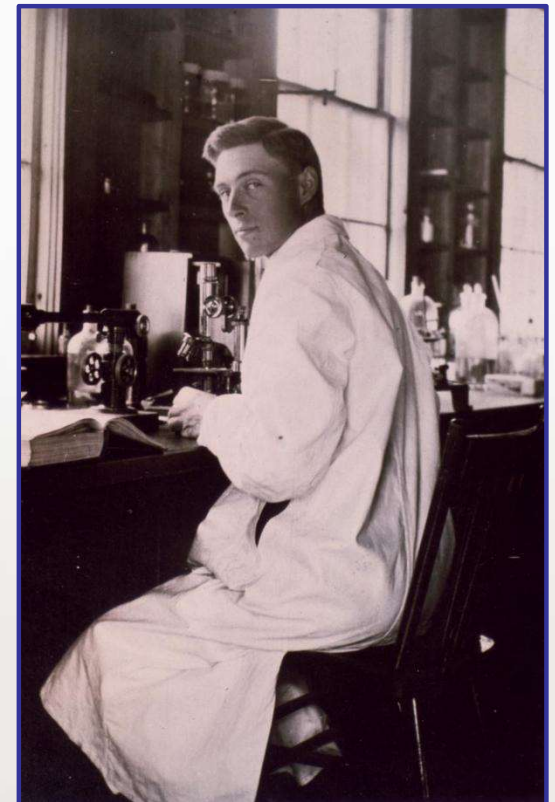
- konec léta: pokusný pes s odstraněnou celou slinivkou
- podle očekávání se u něj objevuje mírná cukrovka s hladinami cukru v krvi na cca dvojnásobku hladiny normální
- homogenizace slinivky psa s neporušenými ostrůvky
- extrahovaná tekutina aplikována psovi s cukrovkou
- o hodinu později se jeho hladina cukru normalizuje
- pokus několikrát opakují: začínají si být jistí, že ostrůvkové buňky vylučují něco, co způsobuje pokles krevního cukru
- tuto hypotetickou látku označují **isletin**



Banting a Best s prvním psem léčeným isletinem

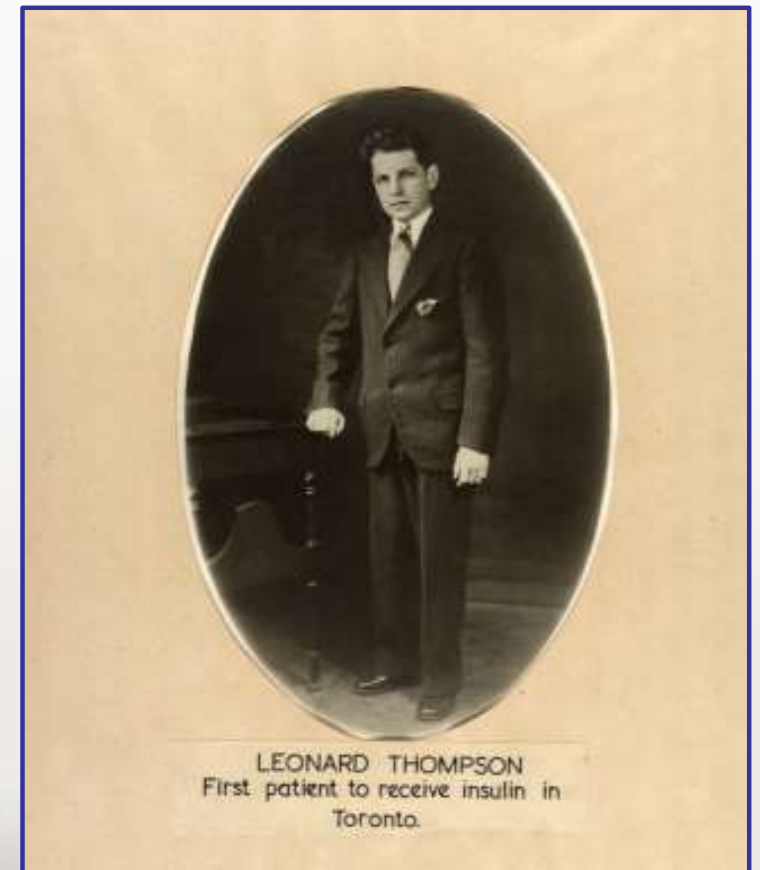
Isletin je nestabilní

- Macleod začíná věřit, že B+B objevili něco podstatného a na jejich projekt přiděluje dalšího vědce: **Jamese Collipa** – biochemika – specialistu na extrakce látek
- jeho úkolem je zajistit účinnou purifikaci aktivní látky z extraktů slinivky
- Collip pracuje z litry rozemletého pankreatického kalu a snaží se najít a zakonzentrovat látku, zodpovědnou za snižování krevního cukru
- kritické je otestování její účinnosti na člověku s cukrovkou



První klinické použití inzulínu

- v lednu 1922 v Torontské nemocnici na cukrovku pomalu umírá 14-ti letý **Leonard Thompson**
- v té době jde o nemoc, na kterou neexistuje lék
- pacient má těžkou cukrovku
- jeho moč přetéká cukrem
- tělo je poznamenáno kachexií
- upadá do kómatu a zase se z něj probouzí
- 11.1.1922 je chlapci injekčně aplikován extrakt isletinu připravený **Bantingem** (29 let) a **Bestem** (23 let)
- jen velmi mírná, téměř nezjistitelná reakce



První klinické použití inzulínu

- B+B jsou zklamaní
- Collip však postupuje vpřed a daří se mu získávat stále čistější extrakty
- 23.1.1922 Thomson dostává další injekci, tentokrát vysoce přečištěným extraktem
- účinek je okamžitý
- cukr v krvi dramaticky klesá, mizí i z moči
- pacient se probouzí v mnohem lepším stavu (umírá o 13 let později na tuberkulózu)

Spory místo spolupráce

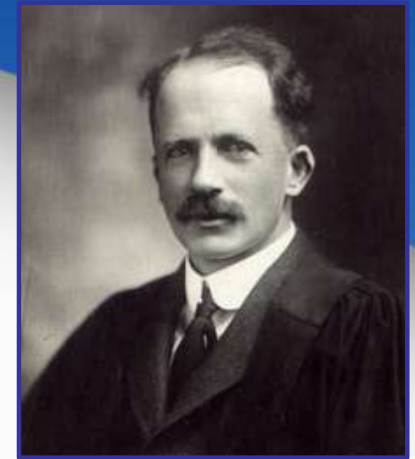
- Banting potřebuje pro léčbu dalších pacientů větší množství extraktu
 - Collip ale odmítá poskytnout purifikační protokol!
 - nervózní Banting chytá Collipa pod krkem a vyhrožuje, že ho zabije
 - zasahuje Best a odtrhne je od sebe
-
- dosaženo křehké příměří: univerzita získává licenci na purifikovanou látku a zřizuje laboratoř na její přípravu pro další pacienty
-
- rozsáhlá klinická studie potvrzuje úspěch: hladina cukru u pacientů s cukrovkou aplikací této látky dramaticky klesá!

Příběh Bantinga

vyléčení cukrovky náležitě oslavováno v médiích



Příběh Bantinga

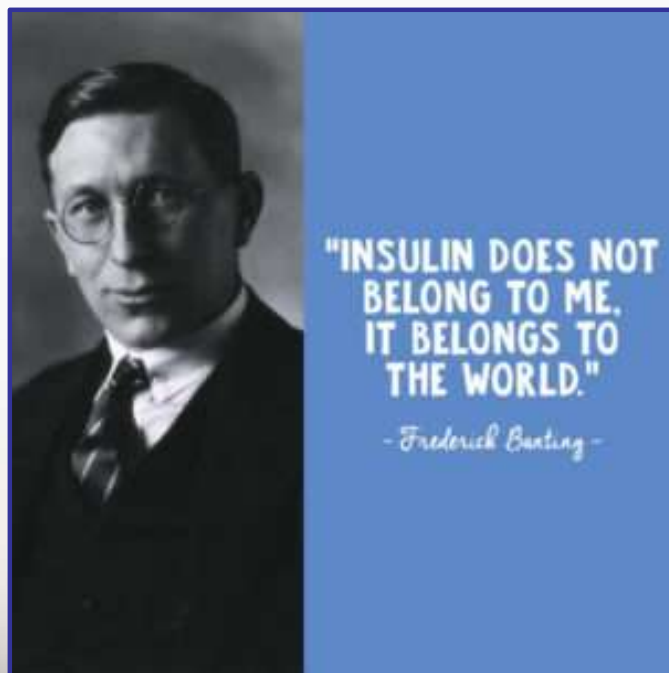


John Macleod
(1876-1935)

- nadřízený Bantinga, **prof. Macleod**, referuje o objevu B+B v létě 1922 na konferenci ve Washingtonu
- poprvé zde užívá termín inzulin a dostává se mu ovací ve stoje
- 1923: **Banting** a **Macleod** získávají **Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu**
- Banting je zklamán z toho, že Nobelovu cenu nezískal kolega Best
- dle Bantinga byl Macleodův příspěvek relativně malý (poskytl sponzorství, laboratorní prostor, pokusné psy a dva asistenty)
- uvažuje o nepřijetí ceny
- nakonec ji přijímá a rozdělují si finanční odměnu 40 000 \$ s Bestem
- Macleod zase polovinu odměny věnuje Collipovi

Příběh Bantinga

výrobní postup pro získávání inzulínu poskytuje zdarma,
takže se již v r. 1925 vyrábí v 17 zemích světa



world diabetes day



Celebrating the Birthday of Sir Frederick Banting
Discoverer of Insulin
Gift of Life to People with Diabetes since 1921

Příběh Bantinga

- v r. 1924 se žení s laborantkou **Marion Robertsonovou**
- rozvod v r. 1932 se silně probírá tiskem
- umírá při letecké havárii v r. 1941

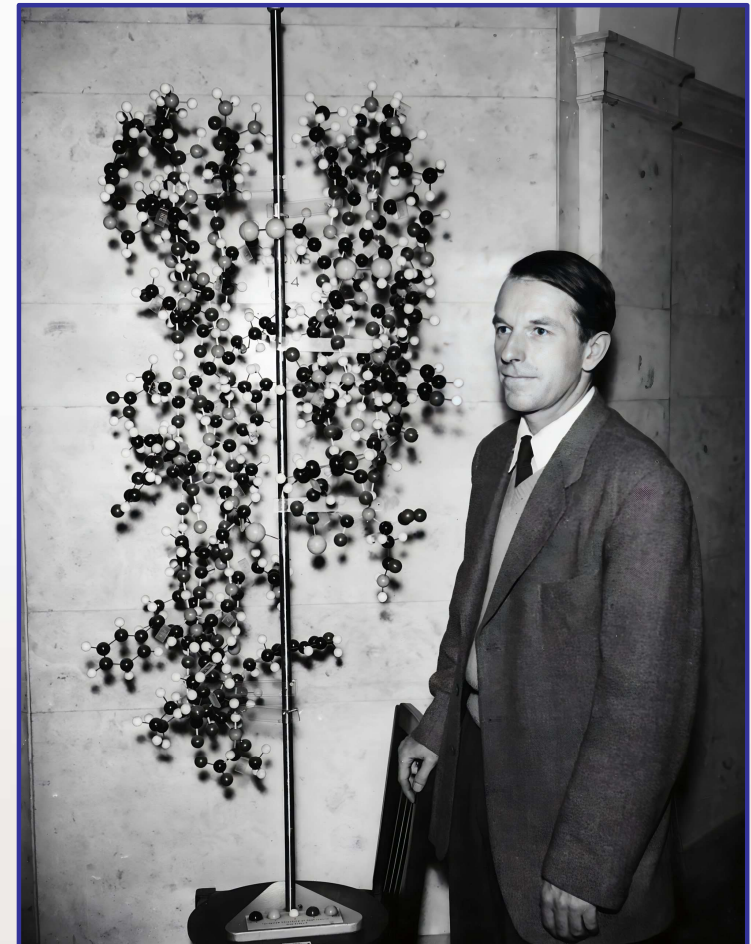
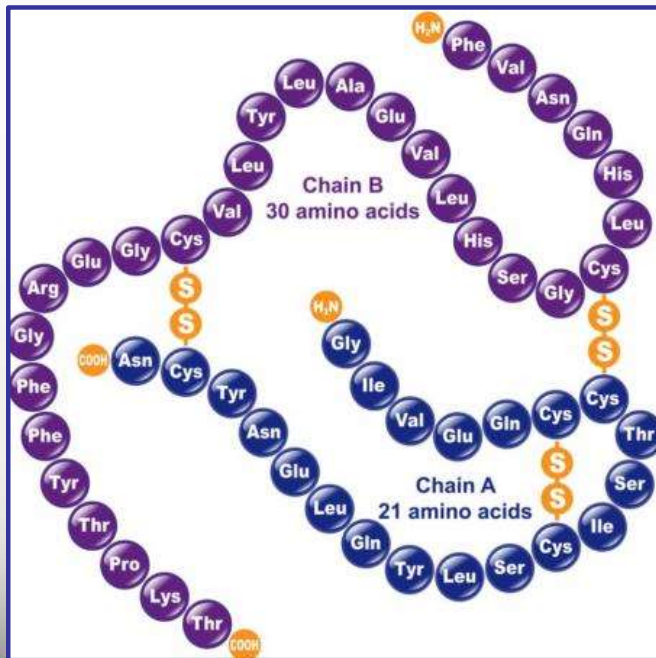


Funguje to, ale...!

- začátek 20. let: po injekci purifikovaného inzulínu se pacientům s cukrovkou rychle upravuje hladina krevního cukru (mizí žíznivost, potřeba močení)
- s hormonem se ale pracuje těžko: je nerozpustný, citlivý na teplotu, nestabilní, obtížně získatelný
- jsou potřeba vagóny zmražených pankreatů: 3500 kg z 24 000 ks prasat a hovězího dobytka na 0,5 kg inzulínu
- výrobce Eli Lilly na roční produkci pro pokrytí nároků trhu v USA potřebuje slinivky z 56 milionů ks zvířat

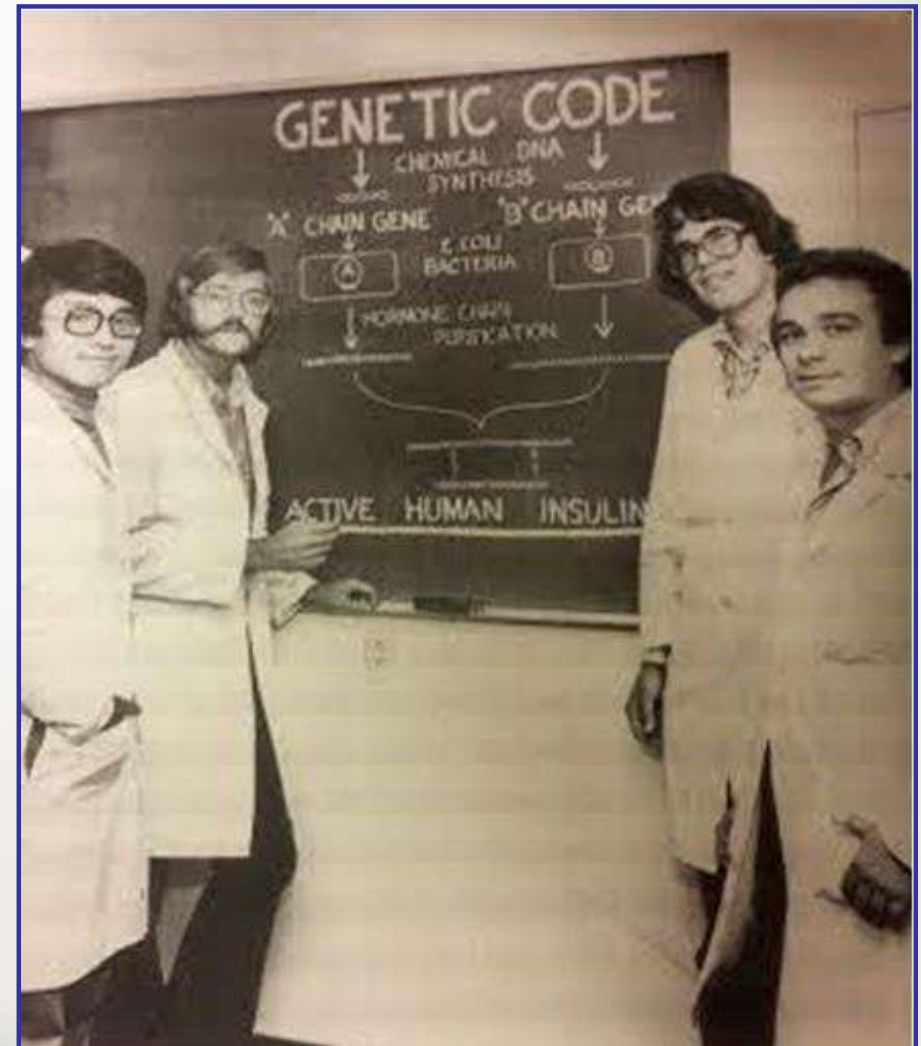
Struktura inzulinu

- Fred Sanger, University of Cambridge, 1953: popisuje aminokyselinovou strukturu inzulinu
- tvoří jej jeden větší a jeden menší řetězec, které jsou spojené chemickými vazbami



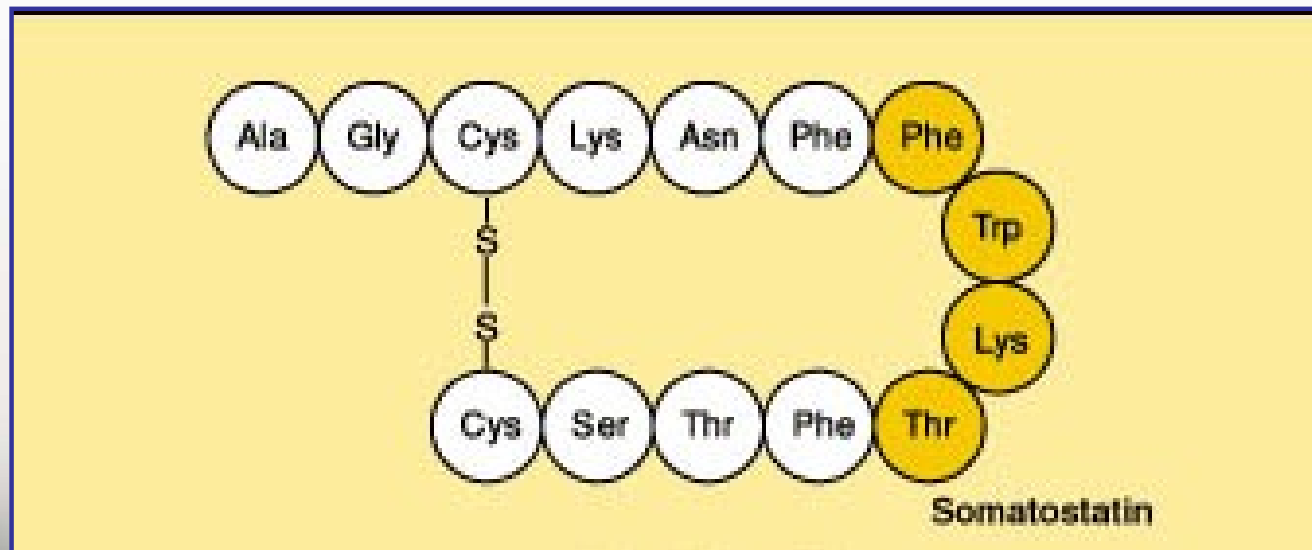
Boyerův plán syntézy inzulinu

- gen kódující inzulin není k dispozici
- z aminokyselinové struktury proteinu lze odvodit strukturu genu
- inzulinový **gen má být uměle nasyntetizován** – jeden nukleotid za druhým
- když se nasyntetizované geny pro malý a velký řetězec **přenesou do bakterií**, měly by se exprimovat a vytvořit **proteiny**
- pak stačí oba proteiny z bakterií purifikovat a chemicky spojit



Drobný odklad

- Boyer si netroufá novou metodou pustit rovnou do přípravy inzulinu
- pro otestování postupu zvolen menší a jednodušší hormon – **somatostatin** (14 AA)
- malý komerční potenciál
- Swanson tento plán kritizuje, prosazuje přímou syntézu inzulinu



Syntéza somatostatinu

- 1977: gen úspěšně syntetizován Genentechem v pronajatých prostorách UCSF dvěma najatými chemiky z nemocnice *City of Hope (Los Angeles)*
- **nasyntetizovaný gen pro somatostatin začleněn do plazmidu**
- **plazmid přenesen do bakterií transformací**

Syntéza somatostatinu

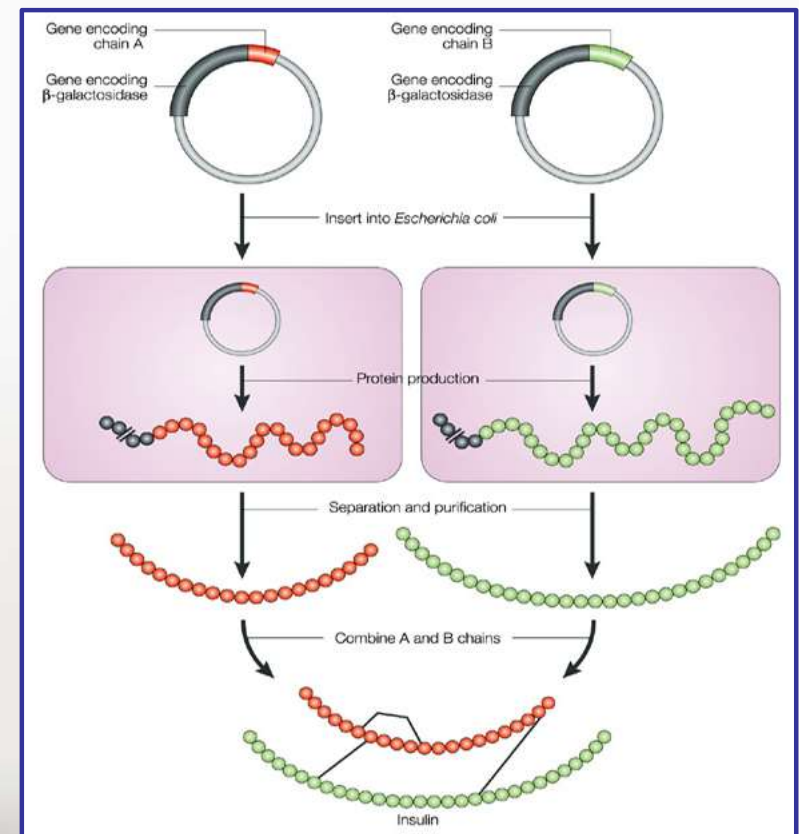
- v červnu 1977 se Boyer a Swanson setkávají, aby byli společně svědky očekávaného zjevení somatostatinu v bakteriích
- zklamání, přítomnost somatostatinu neprokázána!
- Swanson kolabuje a končí na pohotovosti s akutními žaludečními problémy
- Boyer a ostatní se zotavují kávou a hledají příčiny neúspěchu: možná somatostatin podléhá degradaci bakteriálními enzymy?

Úprava postupu

- spojení genu pro lidský somatostatin s jiným bakteriálním genem
- přenos vzniklého fúzovaného genu do bakterií, aby jeho expresí vznikla proteinová chiméra
- po purifikaci této chiméry by se somatostatin uměle odštěpil od svého nosiče
- srpen 1977: **úspěšné získání somatostatinu!**
- okamžitě se přechází na inzulin

Úspěch Genentechu

- v květnu 1978 úspěšně dokončena syntéza dvou inzulinových řetězců
- přenos do bakterií, aby je exprimovaly
- v červenci jejich produkty z bakterií purifikovány
- začátkem srpna oddělení od pomocných bakteriálních nosičů
- 21.8.1978 večer jsou inzulinové řetězce úspěšně spojeny



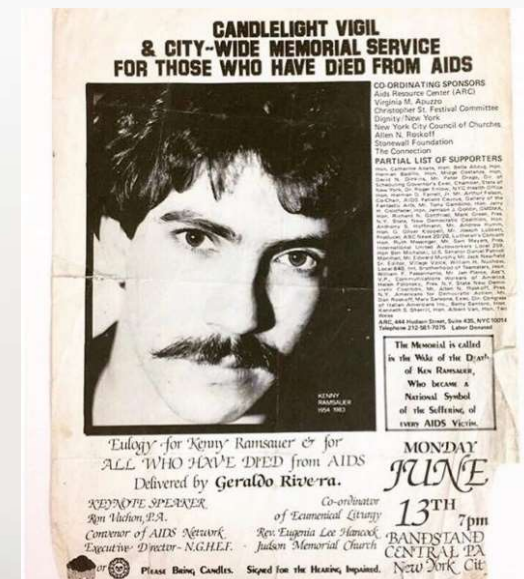
Zrození rekombinantního inzulínu

- v září 1978 si Genentech patentuje způsob přípravy inzulínu založený na rekombinantní DNA a produkci rekombinantního produktu v mikroorganismu
- jeden z nejlukrativnějších patentů v historii technologií



Do povědomí veřejnosti novou technologií přivádí AIDS

- duben 1982: **Ken Horne**, baletní tanečník v San Francisku navštěvuje dermatologa a stěžuje si na zvláštní potíže (slabost, kašel, průjem, hubnutí a divný pocit ve svalech, modřinové skvrny na kůži)
- lymfatické uzliny oteklé
- mezi květnem a srpnem 1982 se v USA objevují další případy



Do povědomí veřejnosti novou technologií přivádí AIDS

- Úřad pro kontrolu nemocí v Atlantě zaznamenává neobvykle vysokou poptávku po pentamidinu, který se používá pro léčbu zápalu plic vyvolaného bakterií *Pneumocystis*
- taková infekce je velmi vzácná a týká se obvykle pacientů s rakovinou – s oslabeným imunitním systémem
- tito noví pacienti jsou ale mladí a až dosud zdraví
- u Hornea mezitím diagnostikován Kaposiho sarkom, pomalu rostoucí kožní nádor, připomínající mateřské znaménko
- v tomto a dalších případech ale šlo o rychle rostoucí agresivní nádory
- častý výskyt u homosexuálů



GRID/AIDS

- *gay-related immune deficiency (GRID)*
- novináři novou nemoc označují mor homosexuálů
- později přejmenovaná na **AIDS**



AIDS a hemofilie

- v září 1982 se nemoc objevuje u pacientů s hemofilií A – geneticky podmíněnou poruchou srážlivosti krve
- původcem hemofilie je mutace v genu kódujícím faktor VIII pro srážení krve
- hemofilici po staletí žili v obavě z krvácení
- od poloviny 70. let 20. století se k léčbě používal faktor V
 - zakonzentrovaný z tisíců litrů lidské krve tisíců dárců
- následně se u nich často objeví kolaps imunitního systému jako u AIDS
- podezření, že přenos AIDS na hemofiliky je důsledkem kontaminace krve/faktoru VIII neznámým virem

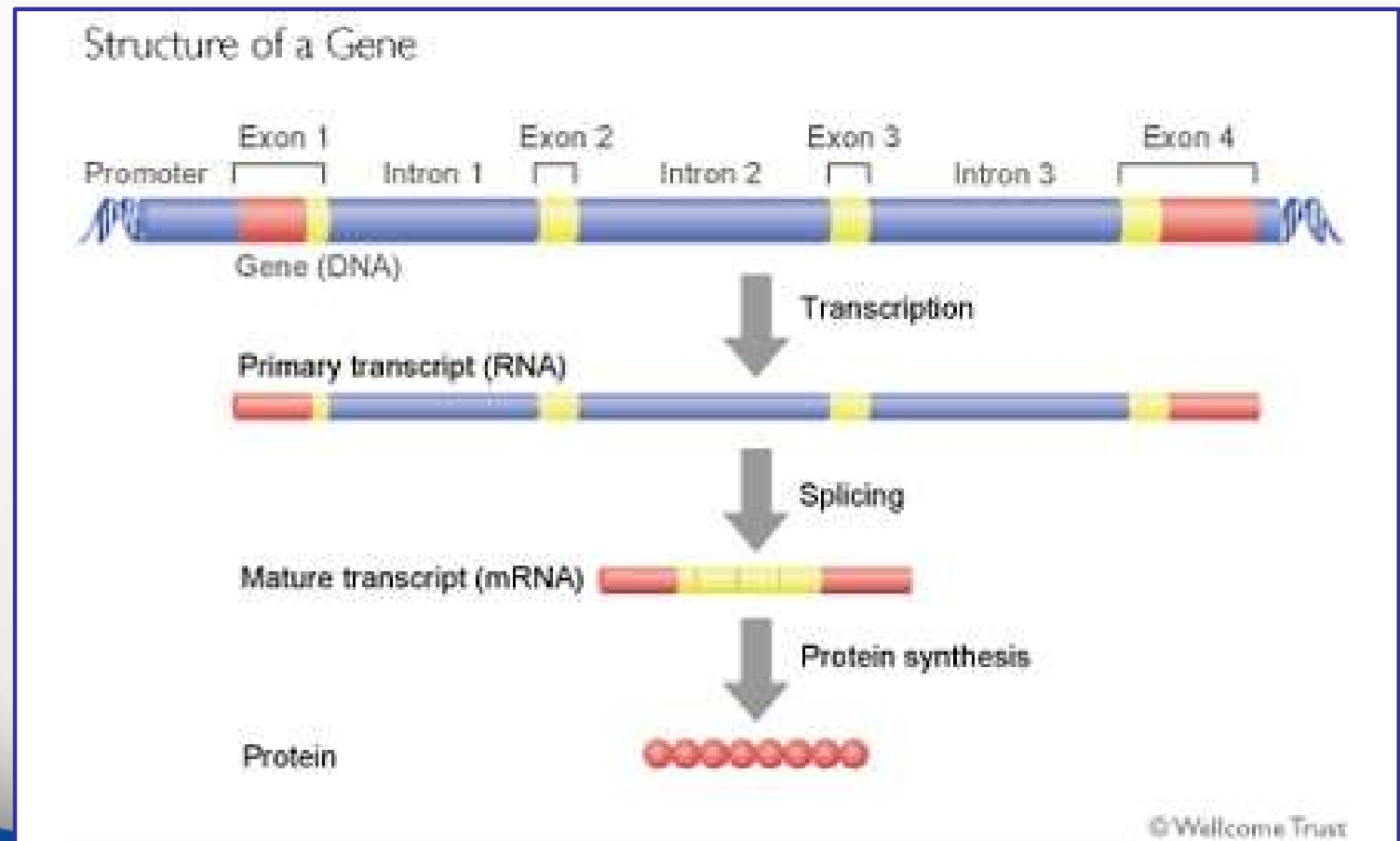
AIDS a Genentech

- 1983: návrh připravit faktor VIII stejným způsobem jako inzulin a tím se vyhnout riziku kontaminace virem
- velikosti proteinů:
 - somatostatin -14 AK
 - inzulin - 51 AK
 - faktor VIII – 2350 AK
- gen pro faktor VIII nelze chemicky syntetizovat – je příliš velký
- nutná úprava technologie – gen musí být izolován z lidských buněk



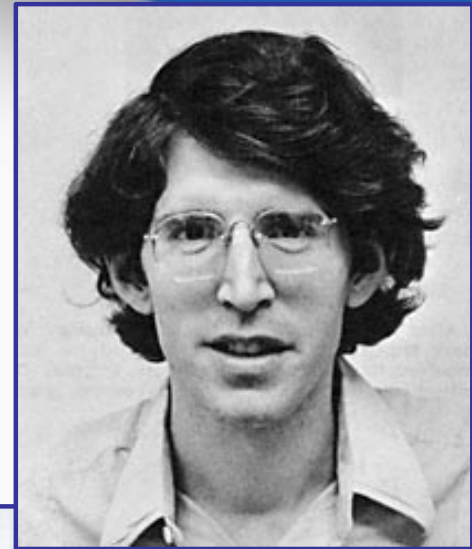
Problém přerušovaných genů

- lidské geny jsou běžně přerušovány nekódujícími úseky (introny)
- jsou tak velké, že je nelze klonovat v plazmidech

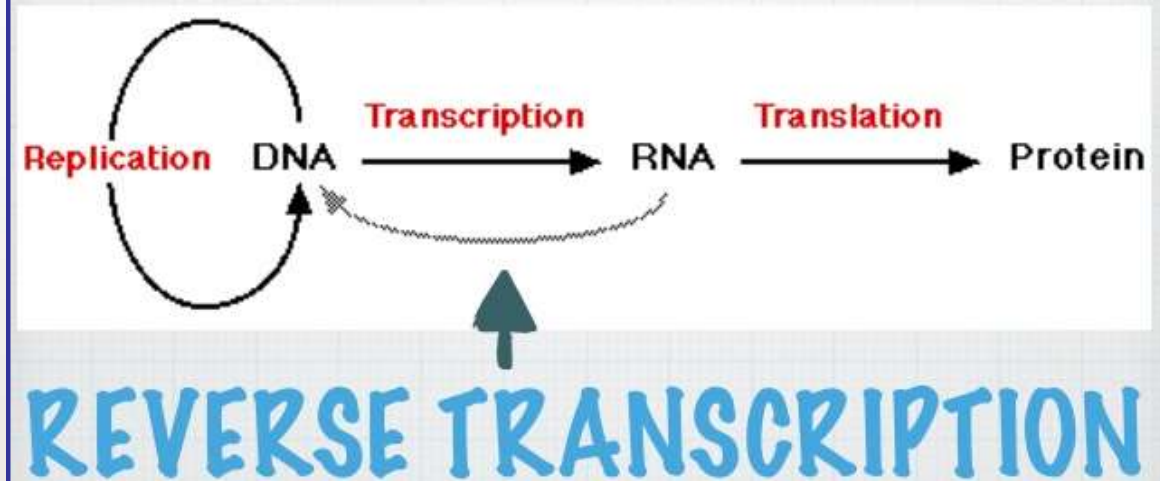


Jak se zbavit intronů?

Tom Maniatis: přepsat sestřiženou mRNA zpět do DNA reverzní transkripcí



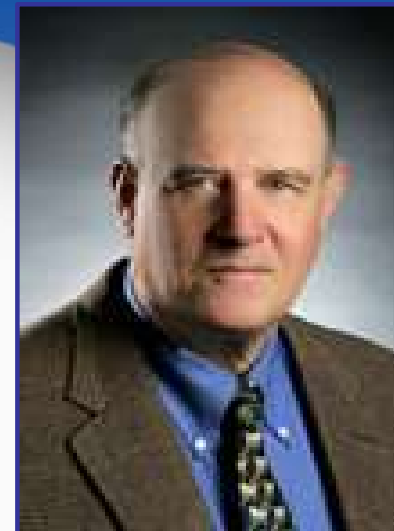
Tom Maniatis
(*1943)



Klonování faktoru VIII

- léto 1983: Genentech purifikuje gen pro faktor VIII
- prosinec 1983: gen úspěšně vložen do plazmidu
- rekombinantní plazmid přenesen do buněk odvozených z vaječníků křečka (schopných syntetizovat velká množství proteinů)
- leden 1984: v kultivačním médiu těchto buněk se poprvé objevuje faktor VIII
- duben 1984: faktor VIII úspěšně purifikován (ve zkumavce, bez kontaminace krví)

První klinický pokus



březen 1987: hematolog **Gilbert White** poprvé úspěšně aplikuje rekombinantní faktor VIII izolovaný z křeččích buněk v *Center for Thrombosis* v Severní Karolině pacientovi s hemofilií



První klinický pokus

- pro hemofiliky je nový lék skvělou ochranou před AIDS a rychle se mezi nimi šíří
- mezi dubnem 1984 a březnem 1985, kdy se zavedl u krve určené k transfúzi první test na virovou kontaminaci, neměli hemofilici moc možností: buď riziko vykrvácení nebo riziko infekce HIV
- postup klonování genů v bakteriích a produkce proteinů v křeččích buňkách se ukázal být velmi bezpečným pro použití u lidí

Nová technologie přípravy léků

- prudký rozvoj, revoluce ve farmaceutickém průmyslu, ohromné zisky
- 1982: Genentech začíná s výrobou růstového hormonu
- 1986: klonování interferonu alfa pro léčbu onemocnění krve
- 1987: Genentech vyrábí rekombinantní protein TPA, který rozpouští sraženiny v krvi související s infarkty a mrtvicemi
- 1990: příprava vakcíny proti hepatitidě B
- prosinec 1990: většinu akcií Genentechu kupuje Roche Pharmaceuticals za \$ 2,1 miliardy, **Swanson** rezignuje na šéfa exekutivy
- 1991: **Boyer** rezignuje na pozici viceprezidenta



Genentech dnes

2001: Genentech se rozrůstá a tvoří největší biotechnologický komplex na světě





Epilog

- odhalení sochy připomínající první setkání s Boyerem se Robert Swanson nedožil
- 6.12. 1999 umírá ve svém domě pár kilometrů od kampusu Genentechu na nádor mozku glioblastoma multiforme