

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra buněčné biologie

**HPMA konjugáty a imunogenní smrt nádorových
buněk**



Bakalářská práce

Martina Kabešová

Vedoucí práce: RNDr. Lubomír Kovář Ph.D.

Praha 2008

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím uvedených zdrojů, a souhlasím s jejím eventuálním zveřejněním v tištěné nebo elektronické podobě.

V Praze dne 5. srpna 2008



.....
Kabešová Martina

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Lubomíru Kovářovi Ph.D. za vedení této práce, ochotu a trpělivost při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat paní profesorce RNDr. Blance Říhové, Drsc. za příležitost pracovat v laboratoři Mikrobiologického ústavu AV ČR.

Obsah

Abstrakt	5
Seznam zkratek	7
1. Úvod	8
Klasická chemoterapie s volným léčivem	8
Imunoterapie	9
2. Imunitní systém a nádorová onemocnění	10
Imunitní dozor a imunoediting	10
Eliminace	11
Rovnováha	12
Únik	12
3. Antracykliny a imunogenní buněčná smrt	13
Antracykliny	13
Imunogenní apoptotická buněčná smrt	14
Změny na povrchu buněk během apoptózy	14
Chaperonové proteiny	16
Calreticulin	16
„Heat shock“ proteiny	19
HMGB 1	20
4. Pokročilá chemoterapie s polymerním nosičem a imunomodulace	22
Polymerní cytostatická léčiva na bázi HPMA	22
Syntetický polymerní nosič <i>N</i> -(2-hydroxypropyl)metakrylamid (HPMA)	23
Polymerní konjugáty HPMA s doxorubicinem	24
Imunomodulační vlastnosti polymerních léčiv na bázi HPMA	26
Imunogenicita polymeru HPMA	26
Imunogenní vlastnosti HPMA konjugátů s doxorubicinem	26
5. Závěr	28
Přehled použité literatury	29

Abstrakt

Nedávné vědecké poznatky přinesly nové možnosti pro efektivní léčbu nádorových onemocnění s využitím obraných schopností imunitního systému. Je zřejmé, že značný podíl na úspěchu či neúspěchu protinádorové terapie má právě imunitní systém pacienta. Ukazuje se, že je možné imunitní systém aktivovat pomocí radioterapie či chemoterapie a že apoptotická buněčná smrt nemusí být vždy imunologicky tichý proces. Antracykliny, známé v protinádorové léčbě již od šedesátých let minulého století, jsou příkladem chemoterapeutik, která dokáží (mimo přímý cytotoxický účinek) vyvolat imunitní reakci proti nádoru, a tím zapojit do terapie i imunitní systém pacienta. Postupně jsou odhalovány mechanismy, které stojí za imunogenitou apoptotické buněčné smrti způsobenou antracyklinovými antibiotiky jako je například doxorubicin. Antracykliny však nepůsobí jen cytotoxicky na nádorové buňky, ale vzhledem k systémovému působení poškozují svou cytotoxickou aktivitou celý organizmus pacienta. Aby se těmto vedlejším účinkům předešlo, používá se poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid] jako nosič pro nízkomolekulární léčiva jakým je např. doxorubicin. Práce popisuje současné poznatky o imunomodulačním působení antracyklinových antibiotik (především doxorubicinu) a srovnává je s imunomodulačním působením polymerních konjugátů s navázaným doxorubicinem.

Klíčová slova: HPMA konjugáty, imunogenní apoptóza, doxorubicin, calreticulin, HMGB1, Heat shock proteiny

Abstract

Recent scientific findings provide a new opportunity for anticancer treatment with the exploitation of patient's defense immune system. It's obvious that the patient immune system also contributes to the therapeutic outcome with a great share. Current data show that specific anticancer immune response could be elicited by radiotherapy or chemotherapy and that apoptotic cell death isn't always immunologically silent. Anthracyclines, which have been used to treat different types of cancer since the 1960's, are an example of anticancer treatment that can boost the patient's immune response against tumor (besides a direct cytotoxic effect to the tumor). Mechanisms underlying not only the immunogenicity of anthracycline-treated cells have progressively been revealed. But anthracyclines also exhibit dangerous side-effects to patient's body. To overcome this negative impact poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamid] HPMA is used as a carrier for the drug. The work describes recent knowledge about the immunomodulatory effects of anthracycline antibiotics (particularly doxorubicin) and compares them with immunomodulatory effects of polymeric conjugates containing doxorubicin.

Key words

HPMA conjugates, immunogenic apoptosis, doxorubicin, calreticulin, HMGB1, Heat shock proteins

Seznam zkratk

CD31	viz PECAM-1
CD47	Protein asociovaný s integriny
CRT	Calreticulin
CTL	Cytotoxický T lymfocyt
DC	Dendritická buňka
DOX	Doxorubicin
eIF2 α	Eukaryotický iniciační faktor 2 α
EPR	Enhanced permeability and retention effect, efekt zvýšené propustnosti a zadržení
ER	Endoplasmatické retikulum
ERp57	Protein 57 endoplasmatického retikula
HMGB1	High mobility group box1 protein
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl) metakrylamid
HPMA-Dox ^{AM}	HPMA konjugát s doxorubicinem navázaným amidovou vazbou
HPMA-Dox ^{HYD}	HPMA konjugát s doxorubicinem navázaným hydrazonovou vazbou
Hsp	Heat Shock Protein, proteiny tepelného šoku
Hulg	lidský imunoglobulin
IL	Interleukin
INF γ	Interferon γ
kDa	kilodalton
LAK	Lymphokine-activated killer, lymfokiny aktivovaný zabíječ
LRP	LDL-receptor-related protein
MHC	Major histocompatibility komplex, hlavní histokompatibilitní komplex
NK	Natural killer, přirozený zabíječ
PECAM-1	Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PP1/ GADD34	Protein phosphatase1/ growth arrest and DNA damage inducible protein 34
PS	Fosfatidylserin
RAGE	Receptor pro konečné produkty pokročilé glykosilace
siRNA	Small interfering RNA, malé interferující RNA
SIRP α	Signálu podobný protein α
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor, nádor nekrotizující faktor

1. Úvod

Léčba zhoubných nádorových onemocnění je záležitostí složitou, obvykle dlouhodobou a náročnou pro pacienta a jeho zdravotní stav. Pro léčbu nádorových onemocnění existuje větší počet různých léčebných metod, nejčastěji využívané metody jsou tři: chirurgická léčba, radioterapie (eliminace nádoru pomocí radioaktivního záření) a léčba cytostatiky neboli chemoterapie. Ve většině případů nestačí k efektivnímu léčení nebo vyléčení pouze jediná z uvedených metod. Je možno říci, že úmrtnost na nádorová onemocnění se postupně snižuje, a to díky jednak úspěšnější léčbě těchto nádorů, jednak dokonalejším diagnostickým metodám, které umožní stanovit diagnózu v časném stadiu. Čím dříve je rakovinové bujení odhaleno a započata léčba, tím je pravděpodobnost úspěchu větší, organismus nemocného lépe odpovídá na protinádorovou léčbu, protože není tolik oslaben. Problémem stále zůstává jak se vypořádat i s posledními zbytkovými nádorovými buňkami, kmenovými nádorovými buňkami a buňkami, které neodpovídají na léčbu.

Mezi hlavní cíle protinádorové terapie tedy patří zastavení růstu nádoru, co možná nejdůkladnější zničení a odstranění nádorových buněk, včetně kmenových nádorových buněk, čímž se zamezí možnému relapsu onemocnění. To vše s ohledem na celkový zdravotní stav pacienta. V budoucnu se bude odvíjet nádorová terapie nejen podle typu nádoru, ale bude volena také na základě konkrétního pacienta a jeho fyziologických možností.

Klasická chemoterapie s volným léčivem

Pro úspěšnou léčbu nádorových onemocnění zůstává klíčovým problémem selektivní chemoterapie. V dnešní době se převážně využívají neselektivní léčiva, která jsou charakteristická přímým toxickým účinkem na nádor a vysokou systémovou toxicitou vedoucí k vážným vedlejším účinkům jako je poškození buněk hematopoetické řady, gastrointestinálního traktu, srdce a gonád, atd.

Imunoterapie

Imunoterapie postupně získává uznání jako plnohodnotný přístup pro léčbu nádorů. V současné době jsou vyvíjeny moderní terapeutické systémy, které specificky ničí nádorové buňky s pomocí imunitního systému pacienta. Cílem účinné protinádorové chemoterapie by nemělo být jen zničení nádorových buněk, ale také aktivace či povzbuzení imunitního systému, což významně přispívá k úspěšné léčbě. Úspěšnost chemoterapie velmi závisí právě na indukci imunogenní buněčné smrti, protože tento způsob zániku buňky stimuluje aktivaci protinádorových reakcí zprostředkovaných adaptivním imunitním systémem pacienta. Chemické látky, které vykazují přímý cytotoxický efekt a současně vyvolávají specifickou protinádorovou odpověď, se nazývají imunomodulační léčiva.

Nedávné studie na myších modelech ukázaly, že poté co je u nádorových buněk indukována apoptóza např. antracykliny (Casares a spol., 2005 ; Obeid a spol., 2007b), ale také oxaliplatinou (Apetoh a spol., 2007), γ zářením nebo ultrafialovým zářením (Obeid a spol., 2007a) změní se tyto umírající nádorové buňky tak, že se stávají imunogenní a aktivují specifickou imunitní odpověď hostitele. Významným přínosem takovéto terapie může být odstranění jak rezistentních (rezistentních k chemoterapii) nádorových buněk, tak i nádorových kmenových buněk, popřípadě i navození dlouhodobé protinádorové rezistence jak bylo pozorováno u myších modelů vyléčených doxorubicinem navázaným na polymerní nosič (Říhova, 2005).

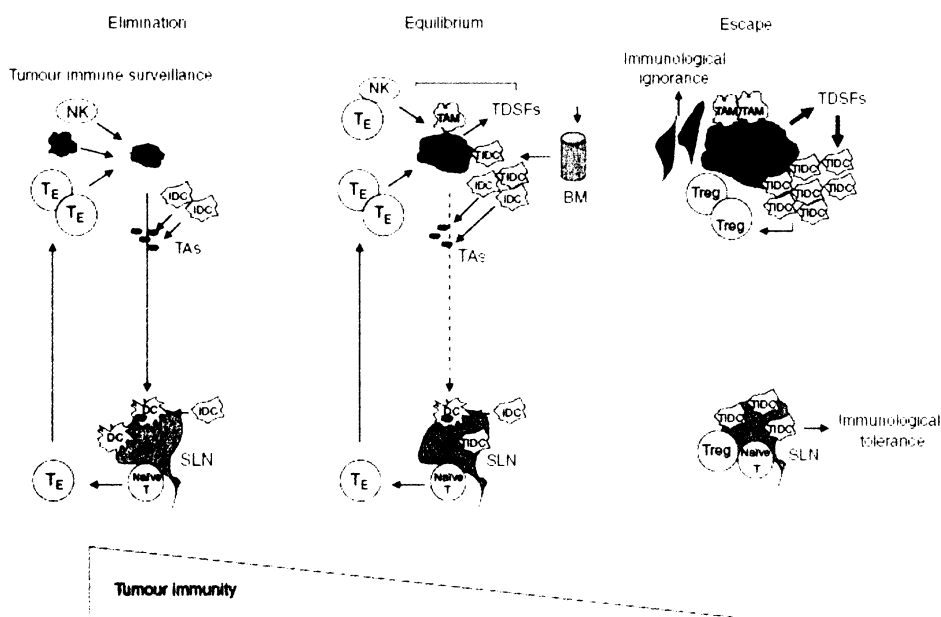
Imunogenní smrt nádorových buněk a porozumění procesům, které ji ovlivňují, může být důležitým přínosem při vývoji nových léčebných postupů, které využívají přirozené obranné schopnosti pacienta.

2. Imunitní systém a nádorová onemocnění

Imunitní dozor a imunoediting

V padesátých letech minulého století přednesl Macfarlane Burnet koncept nádorového imunitního dozoru: imunitní systém může rozeznat a zničit vznikající transformované buňky. Postupem času se ukázalo, že se jedná o velmi heterogenní proces a jeho uplatnění může být různé podle původu nádoru, mechanismu transformace a způsobu rozpoznání. Centrální roli v imunitním dozoru hrají B a T lymfocyty, NK buňky (natural killer NK), NK T lymfocyty, interferony typu I a II a perforiny.

Současný koncept interakce mezi hostitelem a nádorovými buňkami - imunoediting je rozdělen na tři fáze: eliminace, rovnováha a únik (Obr. 1) což v principu znamená, že imunitní systém proti nádoru bojuje, ale na druhou stranu reakcí na jeho aktivaci je selekce nádorových buněk, které jsou méně imunogenní a mohou tedy uniknout imunitnímu systému.

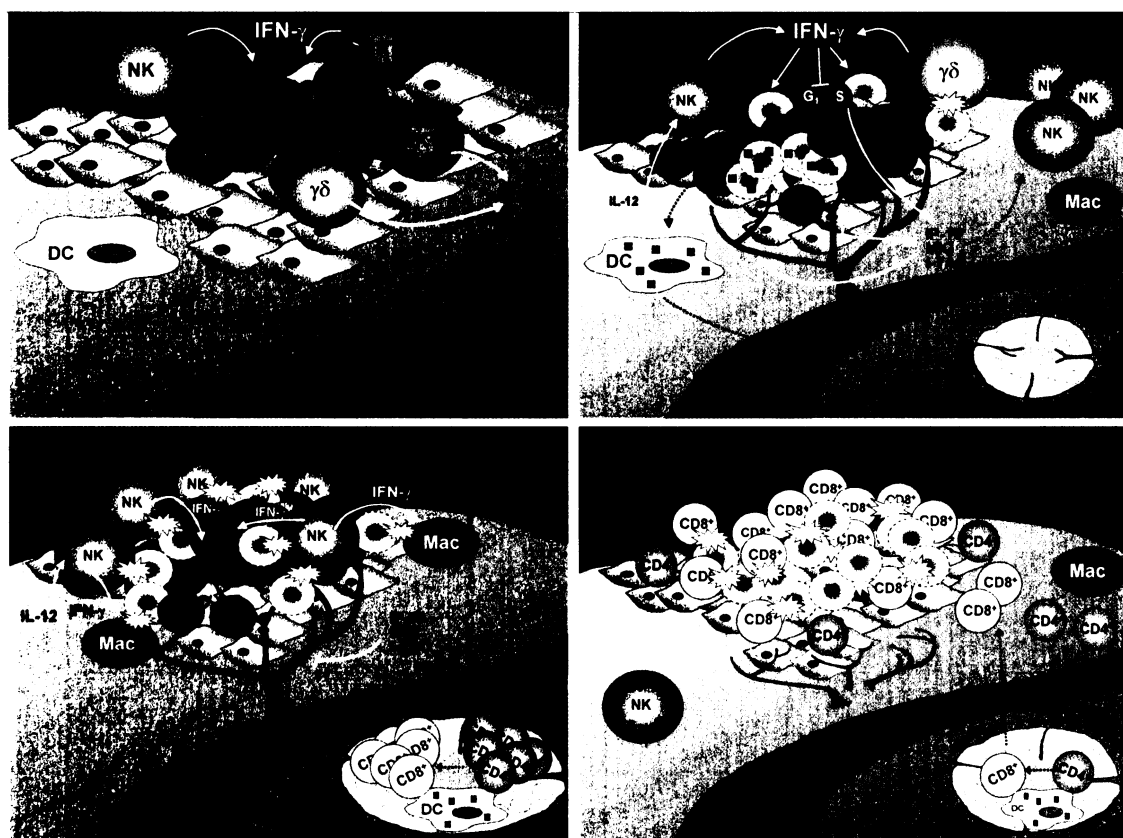


Obr 1. Tři fáze imunoeditingu: eliminace (Elimination), rovnováha (Equilibrium) a únik (Escape)

(T_E: efektové T buňky, iDC: nezralé dendritické buňky, MΦ: makrofágy, TAs: nádorové antigeny, SLN: sentinelová lymfatická uzlina, TDSF: rozpustné faktory pocházející z nádoru, BM: kostní dřeň) podle (Ryungsa a spol., 2007)

Eliminace

Vznikající transformované buňky mohou být odstraněny procesy přirozené i adaptivní imunitní odpovědi. Jakmile nádor doroste určité velikosti, potřebuje lepší cévní zásobení, zároveň utlačuje a poškozuje okolní tkáň. To vyvolává produkci prozánětlivých signálů, následně aktivaci a přilákání buněk, které jsou součástí přirozené obrany: NK buňky, NK T lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky. NK buňky a NK T lymfocyty produkují IFN γ , ten snižuje proliferaci nádorových buněk a tvorbu nových zásobujících cév (neoangiogenezu), a indukují apoptózu. Umírající nádorové buňky jsou pohlcovány nezralými dendritickými buňkami, které pak v prozánětlivém prostředí dozrávají a putují do sekundárních lymfatických orgánů (uzliny). Zde vystavují pohlcené nádorové antigeny na pozadí MHC glykoproteinů I. a II. třídy a aktivují tak naivní CD4 $^+$ a CD8 $^+$ T buňky, které dozrávají v nádorově specifické T buňky, pomnoží se a přesouvají se do místa nádoru (Obr. 2). V této fázi je imunitní systém hostitele schopen zcela odhojit nádor a opravit poškozenou tkáň.



Obr 2. Proces eliminace nádorových buněk, podle (Gavin a spol., 2002).

Rovnováha

Postupem času se rychle mutující nádorové buňky pod tlakem imunitního systému stávají odolnější vůči efektorovým buňkám a snižují svoji imunogenicitu. Tyto buňky dokáží přežít i v imunokompetentním hostiteli, kdy mezi hostitelem a nádorem nastává dynamická rovnováha. Imunitní systém ještě zvládá odstraňovat nádorové buňky, ale zároveň tím napomáhá selekci nádorových mutant, které jsou rezistentnější k imunitnímu útoku. Tato rovnováha může přetrvávat relativně dlouho, případně ještě může dojít eliminaci nádoru.

Únik

Během procesu úniku se vytvoří nádorové buňky, které nejsou rozpoznány imunitním systémem a začnou nekontrolovatelně expandovat i do okolních tkání. Rozvíjí se maligní nádorové onemocnění, které často vede ke smrti hostitele (shrnutí v (Gavin a spol., 2002; Ryungsa a spol., 2007)).

Imunitní systém někdy v boji proti nádoru selhává a to z několika důvodů. Nádorové buňky pochází z buněk pacienta, takže jsou v mnoha ohledech podobné normálním buňkám, tělu vlastním. Rychlý růst nádoru může překonat schopnost imunitního systému ničit nádorové buňky. Mnoho nádorů se dokáže specifickými mechanismy vyhnout imunitní odpovědi či dokonce přímo poškozovat efektorové buňky. Dále je také často organismus a imunitní systém vyčerpán dlouhotrvajícím bojem proti nádorovému bujení. V této fázi musí nastoupit léčba z vnějšku, tedy chirurgická operace, radioterapie či chemoterapie.

3. Antracykliny a imunogenní buněčná smrt

Antracykliny

Antracyklinová antibiotika získávala důležitou pozici při léčbě rakoviny od roku 1963, kdy byl izolován první člen antracyklinové rodiny-daunorubicin, později se jiný zástupce antracyklinových antibiotik, doxorubicin (DOX, starší pojmenování adriamycin), stal jedním z nejpoužívanějších antracyklinů pro svou vysokou účinnost proti solidním nádorům a nižší systémovou toxicitu (oproti daunorubicinu). Na druhou stranu dlouhodobé vystavení antracyklinům způsobuje/přispívá ke kardiomyopatii, selhání srdce a myelodysplázii (Shapiro a Recht., 2001).

Už první pokusy *in vivo* (1973), které porovnávaly působení antracyklinů u imunokompetentních a imunodeficientních myší, ukázaly, že by se na protinádorové aktivitě mohl podílet také imunitní systém pacienta (Schwartz a Grindey, 1973). Skupina D. L. Maccubina jako první prokázala, že doxorubicin je také imunomodulátorem, který stimuluje cytotoxické T lymfocyty, zvyšuje protinádorovou aktivitu makrofágů, avšak tlumí funkce NK lymfocytů (Maccubbin a spol., 1990). Podle skupiny Ujhazy zvyšuje DOX produkci prozánětlivých cytokinů (TNF, IL1, INF γ), což se odráží v nárůstu počtu NK buněk a makrofágů (Ujhazy a spol., 2003). Aby byl podpořen účinek doxorubicinu jako stimulantu imunitního systému, byl DOX kombinován v terapii s např. rekombinantním interleukinem-2 (Lumsden, 1992), TNF- α (Ehrke a spol., 2000) nebo interleukinem-12 (Zagozdzon a spol., 1998).

Doxorubicin interkaluje do dvoušroubovice DNA, tím inhibuje replikaci a transkripci. Dále inhibuje topoizomerázu I a II a způsobuje dvouvláknové DNA zlomy. Poškození DNA aktivuje jaderný protein p53, jeho působením je blokován buněčný cyklus a spouštěna apoptóza, shrnuto v (Gewirtz, 1999).

Buňky vystavené působení antracyklinů podléhají buněčné smrti – apoptóze. Apoptóza byla v minulosti považována za imunologicky "tichou" ba dokonce tolerogenní formu buněčné smrti. Není se čemu divit, apoptotická buněčná smrt je v žijícím organismu velmi rozšířený a fyziologický proces, který je důležitý pro normální vývoj organismu, udržení tkáňové homeostázy a další procesy v organismu. Pokud dojde k narušení mechanismu této neimunogenní apoptózy, může být výsledkem nepřiměřená imunitní odpověď vedoucí k autoimunitnímu onemocnění nebo chronické zánětlivé nemoci.

Nově však byla popsána i imunogenní forma (Casares a spol., 2005). Imunogenicitu buněčné smrti nádorových buněk nezávisí jen na typu smrti, ale především na buňkách nádoru jako takových, na povaze impulsu, který buněčnou smrt způsobil a také na průběhu buněčné smrti. Casares a spol. provedl experimenty, kdy použití inhibitoru kaspáz Z-VAD-fmk nezabránilo buněčné smrti indukované doxorubicinem, ale snížilo imunogenicitu zabíjených buněk a zhoršilo tak jejich rozpoznání a fagocytózu dendritickými buňkami. Stejně tak poškození plazmatické membrány apoptotických buněk zmražením-rozmražením snížilo jejich imunogenicitu (Casares a spol., 2005).

Imunogenní apoptotická buněčná smrt

Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt je zcela fyziologický děj. Programově řízená buněčná smrt je označovaná řeckým termínem apoptóza, který se dá volně přeložit jako „opadávaní“. Poprvé použili toto označení v roce 1972 Kerr a kolektiv (Kerr a spol., 1972). Na rozdíl od nekrózy, která postihne víceméně náhodnou buňku, která byla vystavena nepříznivým vlivům, je apoptóza indukována naprosto cíleně. Buňka je usmrcena a následně odstraněna takovým způsobem, že nedojde k poškození okolních buněk. Apoptóza může být indukována neopravitelným poškozením DNA, toxiny, virovou infekcí, interakcí s cytotoxickými T lymfocyty, chemoterapeutiky aj.

Buňka se při apoptóze smrští, obsah cytoplasmy z kondenzuje. Jaderná DNA může být endonukleasami fragmentována na různé dlouhé úseky, cytoskelet degradován. Buněčný povrch je změněn tak, že svými vlastnostmi napomáhá rychlému rozpoznání a pohlcení umírající buňky fagocyty, ještě dříve než může dojít k vylití jejího obsahu do okolí (sekundární nekróza). Apoptotické buňky se nakonec rozpadají na apoptotická tělíška obklopená membránou, která obsahují nepoškozené cytoplasmatické organely a fragmenty jádra. Dále se objevuje také permeabilizace mitochondriální membrány podobně jako u ostatních typů buněčné smrti (Galluzzi a spol., 2007).

Změny na povrchu buněk během apoptózy

Účinné a rychlé odstranění apoptotických buněk usnadňují změny na buněčném povrchu, kdy se na vnější straně objevují molekuly jinak přítomné uvnitř buňky nebo dochází k pozměnění povrchových molekul (oxidace, modifikace cukerných zbytků).

Tyto vystavené molekuly fungují jako „eat me“ signály pro okolní buňky a fagocyty (makrofágy, nezralé dendritické buňky, endotelové buňky a fibroblasty). „Eat me“ molekuly signalizují, že je buňka poškozená či napadená patogenem a je třeba ji odstranit. Na povrchu zdravých, životaschopných buněk se také v malé míře vyskytují „eat me“ molekuly, avšak převažují „don't eat me“ signály, které tyto buňky chrání před jejich rozpoznáním a následnou fagocytózou.

Mezi nejprostudovanější změny na povrchu apoptotické buňky patří přesun fosfatidylserinu (PS) z vnitřní strany plazmatické membrány na vnější stranu. U živých buněk se fosfatidylserin nachází na vnitřní straně lipidické dvojvrstvy a pokud dojde k jeho překlopení do vnější vrstvy, je vrácen zpět aktivitou aminofosfolipid-translokasy. Během apoptózy je aminofosfolipid-traslokasa inaktivována, a tak je fosfatidylserin na vnější straně vystaven permanentně (Züllig a spol., 2007). Fosfatidylserin pak interaguje s molekulami na fagocytu přímo nebo za pomoci „přemost'ujících“ (bridging) molekul, které se nachází v extracelulárním prostoru, shrnuto (Krysko a spol., 2006). Po takovémto rozpoznání následuje pohlcení apoptotických tělísek a zpracování buněčného materiálu uvnitř fagocytu, aniž by došlo k imunitní odpovědi proti takto označeným apoptotickým tělískům. Při neimunogenní apoptotické smrti je hlavním cílem odstranění mrtvých buněk co nejrychleji, aby nedošlo k aktivaci imunitního systému a následnému zánětu. Zatímco u imunogenní apoptotické smrti se objevují signály, které imunitní systém naopak stimulují.

Dendritické buňky se ukázaly jako hlavní buňky imunitního systému, které rozpoznávají nádorové buňky umírající imunogenní apoptózou a dokáží tak zahájit imunitní reakci. V současné době je známo několik determinant, které způsobují, že umírající apoptotická nádorová buňka aktivuje imunitní systém. V současné době jsou popsány dvě hlavní skupiny proteinů, které způsobují chemoterapeutiky indukovanou imunogenicitu apoptotických nádorových buněk. Jsou to membránově vázané chaperonové proteiny (calreticulin a heat shock proteiny) a z buňky uvolněný protein HMGB1 (high mobility group box1) (Tab1).

Tab 1. Hlavní determinanty imunogenní smrti nádorových buněk a jejich vliv na dendritické buňky (upraveno podle (Tesniere a spol., 2007))

Nádorové buňky	Dendritické buňky
<i>Membránově vázané „eat me“</i>	
<i>molekuly</i>	
HSP 70, HSP 90	Cross-prezentace antigenů nádorové buňky
Calreticulin	Fagocytóza
Fosfatidylerin, Intergriny	Rozpoznání, neaktivují dendritické buňky
<i>Prozánětlivé mediátory</i>	
HSP 70, HSP90	Maturace DC
HMGB1	Zpracování a prezentace nádorového antigenu

Chaperonové proteiny

Calreticulin

Calreticulin (CRT) byl v roce 2007 identifikován jako hlavní protein zodpovědný za imunogenicitu nádorových buněk vystavených antracyklinům (Obeid a spol., 2007b). Calreticulin byl poprvé izolován Ostwaldem a MacLennanem v roce 1974, od té doby je intenzivně studován. Podařilo se ho izolovat z bezobratlých i obratlovců a dokonce byl nalezen i u vyšších rostlin.

CRT je rozpustný protein, který se volně pohybuje v lumen ER, na rozdíl od calnexinu, který se nachází vázaný v membráně ER. CRT se skládá z globulární amino-koncové N-domény, která váže karbohydráty, z centrální P-domény, která je složena tak, že tvoří protaženou sekvenci a interaguje s ERp57 (enzym endoplasmatického retikula; disulfid-izomeráza, viz dále) a z karboxy-terminální C-domény, která váže Ca^{2+} . N-terminální doména a centrální P-doména calreticulinu jsou zodpovědné za jeho chaperonovou aktivitu, zatímco C-terminální oblast hraje důležitou roli při skladování Ca^{2+} uvnitř endoplasmatického retikula. C-terminální oblast obsahuje aminokyselinovou sekvenci KDEL, která je zodpovědná za směrování a udržování CRT v lumen ER (Fliegel a spol., 1989).

Asi nejlépe prozkoumanou funkcí CRT je jeho chaperonová aktivita u živých buněk, tj. pomáhá skládání nově syntetizovaných proteinů do správné konformace. Jeho další dobře známou funkcí je regulace volného Ca^{2+} v cytoplazmě. Vápník (vápenatý kationt Ca^{2+}) je univerzální signalizační molekula, která je zapojena do mnoha buněčných procesů včetně sekrece, kontrakce-relaxace, syntézy, metabolismu, ale i genové exprese, buněčném cyklu a apoptóze. V lumen ER je Ca^{2+} navázán na Ca^{2+} vázající chaperony jako je CRT, ze kterých se může uvolňovat a tím je regulováno množství volného Ca^{2+} v cytoplazmě.

Ačkoli byl calreticulin nalezen převážně v endoplasmatickém retikulu (Ostwald a MacLennan, 1974), není to jediné místo jeho působení. Předpokládá se, že CRT je v cytozolu asociován například se stresovými granulemi (Decca a spol., 2007) nebo se podílí na regulaci jaderného transportu proteinů (Holaska a spol., 2002). Do cytoplasmy je CRT transportován z lumen ER poté co je odstřižena směrovací sekvence aminokyselin KDEL (Afshar a spol., 2005) nebo pokud selže jeho správné směrování do lumen ER.

CRT se objevuje ve zvýšené míře na povrchu apoptotických nádorových buněk po působení ultrafialového záření (Gardai a spol., 2005), působení inhibitorů PP1/GADD34 (protein fosfatáza1) a především po vystavení buněk antracyklinům (Obeid a spol., 2007b). Calreticulin pak na povrchu umírajících nádorových buněk funguje jako „eat me“ signál. Usnadňuje tak jejich rozpoznání a odstranění nezralými dendritickými buňkami a makrofágy (Gardai a spol., 2005). Calreticulin se na povrchu apoptotických buněk objevuje ještě dříve, než jsou patrné změny, ze kterých je zřejmé, že buňka umírá apoptózou (např. vystavení fosfatidylserinu na buněčném povrchu).

Mechanismy jak dochází k přesunu CRT z endoplasmatického retikula na povrch, nejsou ještě přesně známy. Nicméně se ukázalo, že cytoplasty (buňky zbavené jádra) inkubované s antracykliny také dokáží CRT přesunout na povrch. Z toho vyplývá, že cílové působení antracyklinů se nenachází jen v jádře, ale musí být i někde v cytoplasmě. Podobně jako po použití inhibitorů defosforylačního komplexu protein fosfatázy 1(PP1)/ GADD34 (tautomycin, caliculin A a salubrinal), je i po inkubaci buněk s antracykliny fosforylován eukaryotický iniciační faktor 2 α (eIF2 α). Fosforylací eIF2 α dojde k zastavení iniciace translace a tím i proteosyntézy

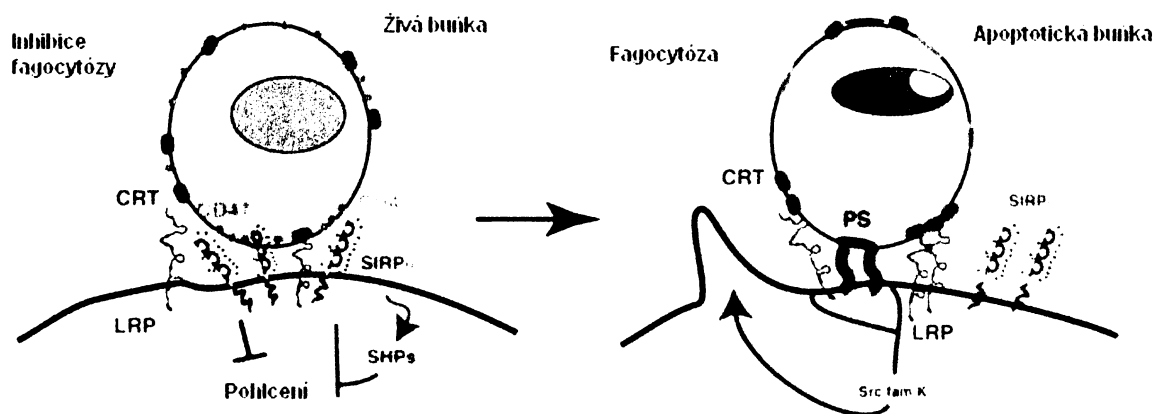
(Krishnamoorthy a spol., 2001) a zároveň dojde k rychlému přesunu CRT z ER na povrch umírající buňky. Avšak samotná indukce fosforylace eIF2 α (tunicamycinem, brefeldinem A, aj.) nevyvolá vystavení calreticulinu na povrch buňky, takže k přesunu CRT jsou potřeba ještě další faktory (Obeid a spol., 2007b).

Calreticulin není na povrch transportován osamoceně, spolu s ním se tam objevuje protein ERp57 (enzym disulfid-izomeráza), s nímž je CRT asociován už v endoplasmatickém retikulu. Ukázalo se, že tato kotranslokace určuje imunogenicitu buněčné smrti vyvolanou antracykliny (Panaretakis a spol., 2008). Calreticulin a ERp57 se na povrch dostává jako molekulární komplex. Odstranění ERp57 kompletně inhibovalo vystavení CRT na povrch přenosem z ER. Samotný ERp57 se neváže na plasmatickou membránu bez přítomnosti CRT, což nejspíše znamená, že je k plasmatické membráně vázán nepřímo přes calreticulin. Naopak exogenní calreticulin se na povrch vázal i za nepřítomnosti ERp57. Buňky, které neexprimovaly ERp57, podléhaly buněčné smrti účinkem antracyklinů *in vitro*, ale jejich smrt nevyvolala imunitní odpověď *in vivo*. To se stalo pouze v přítomnosti vnějšího calreticulinu (Panaretakis a spol., 2008).

Imunogenní efekt calreticulinu souvisí s jeho schopností stimulovat odstranění umírajících nádorových buněk jeho navázáním na LDL-receptor-related protein (LRP) na fagocytujících buňkách (Gardai a spol., 2005).

Živé buňky na svém povrchu v menší míře také vystavují calreticulin (nebo fosfatidylserin), přesto nejsou schopny indukovat u dendritických buněk zranění a prezentaci antigenu, a tak nejsou imunogenní (Obeid a spol., 2007b). To je dáno přítomností „don't eat me“ signálů na povrchu životaschopných buněk, které se tak brání před pohlcením fagocyty. „Don't eat me“ molekuly signalizují, že buňka není určená k fagocytóze a po interakci fagocytem napomáhají přerušení vazby mezi živou buňkou a fagocytující buňkou. Jedním z popsanych zástupců „don't eat me“ molekul je CD47 (protein asociovaný s integriny) na povrchu živých buněk, který slouží jako ligand silně glykosilovaného transmembránového proteinu SIRP α (signálu podobný protein α) na fagocyty (Obr. 3). Interakce CD47 a SIRP α brání pohlcení živé buňky, která na povrchu exprimuje CRT nebo PS. Na mnoha buňkách je exprese CD47 snížena během apoptózy, a tak mohou být apoptotické buňky odstraněny buňkami imunitního systému (Gardai a spol., 2005). Další takovým zástupcem je molekula CD31 (platelet-endothelial cell adhesion molekule-1, PECAM-1) popsaná

kolektivem Simona Browna. Interakcí molekuly CD31 na živé buňce a CD31 na makrofágu je předán odpuzující signál, aby se buňka od makrofágu odpojila, a tak nebyla pohlcena. U apoptotické buňky je signalizace přes CD31 defektní a naopak přítomnost CD31 na fagocyty usnadňuje přichycení umírající buňky a její pohlcení (Brown a spol., 2002).



Obr. 3 Interakce povrchových molekul živé a apoptotické buňky po UV ozáření s povrchem fagocyty podle (Gardai a spol., 2005) (CRT: calreticulin, LRP: LDL-receptor-related protein, SIRP α : signálu podobný protein α)

„Heat shock“ proteiny

„Heat shock“ proteiny (Hsp) patří, podobně jako calreticulin, do rodiny chaperonů a napomáhají správnému sbalení proteinů (nejen za stresových podmínek), účastní se procesů degradace proteinů a skládání vícepodjednotkových komplexů proteinů. Obvykle se nachází v intracelulárním prostoru, kde mají ochrannou funkci a pomáhají buňce přežít stresové podmínky (oxidativní stres, teplo, protinádorová léčiva, atd.). Za běžných podmínek se v buňce hojně vyskytuje Hsp90, ale málo Hsp27 a Hsp70. U řady nádorových buněk je zvýšená exprese Hsp 27 a Hsp 70 a tyto Hsp zde inhibují apoptózu na několika úrovních signalizační apoptotické kaskády. Někteří členové Hsp mohou být vystaveni na povrchu buňky nebo se mohou nacházet v extracelulárním prostoru, často v komplexu s imunogenními peptidy a vyvolávat tak imunitní odpověď. Heat shock proteiny exprimované na povrchu působí jako endogenní signály nebezpečí a „eat me“ signály. Jsou jimi např. Hsp70, Hsp90 a Hsp27, které se objevují na povrchu plasmatické membrány několik hodin po indukci

buněčné smrti a mohou napomáhat aktivaci imunitního systému. Mechanismus přesunu Hsp na povrch buňky není zatím přesně znám.

Hsp70 vystavený na povrchu nádorové buňky může zvyšovat imunogenicitu nádorů a aktivovat přirozené i adaptivní imunitní reakce jako například NK buňky a cytotoxické T lymfocyty (Multhoff a spol., 1999; Noessner a spol., 2002). Galetto a kolektiv zkoumali vliv 5-fluorouracilu na odstranění nádorových buněk dendritickými buňkami a cross-prezentaci nádorových antigenů. 5-fluorouracil sice nebyl nejlepším spouštěčem apoptózy, ale vyvolal zvýšenou expresi Hsp70 na povrchu nádorových buněk a především dobře aktivoval cross-prezentaci nádorových antigenů pro cytotoxické T lymfocyty (Galetto a spol., 2003). Špíšek a kolektiv nedávno poprvé informovali, že chemoterapeutikum bortezomib *in vitro* indukuje u lidských myelomových buněk imunogenní buněčnou smrt spojenou s expresí Hsp90 na povrchu těchto buněk. Imunogenní buněčná smrt způsobená bortezomibem vede k maturaci dendritických buněk a ty dále aktivují T lymfocyty (Špíšek a spol., 2007)

Hsp mohou stimulovat imunitní systém několika způsoby: Hsp 70 a 90 interakcí s receptorem CD91 na nezralých dendritických buňkách předávají signál pro maturaci DC (Somersan a spol., 2001) a dále fungují (podobně jako calreticulin) jako „eat me“ signály, které usnadňují rozpoznání a pohlcení nádorových buněk fagocyty.

HMGB 1

V poslední době se ukázalo, že dalším signálem nebezpečí, který se za určitých podmínek objevuje během v pozdějších fázích imunogenní buněčné smrti, je uvolnění proteinu HMGB1 (high mobility group box1) do extracelulárního prostoru umírajícími buňkami. Takto uvolněný HMGB1 se pak váže na Toll-like receptor 4 (TLR4) na dendritických buňkách (Apetoh a spol., 2007).

HMGB1 je chromatin vázající protein, který intracelulárně funguje jako DNA chaperon, ale pokud je uvolněn do extracelulárního prostoru působí jako prozánětlivý cytokin (Dumitriu a spol., 2005). HMGB1 se pasivně uvolňuje z buněk podléhajících nekrotické smrti nebo aktivně aktivovanými makrofágy a monocyty (lipopolysacharidem, TNF α či poškozenou tkání). HMGB1 navázáním na receptor pro konečné produkty pokročilé glykace (RAGE), podporuje aktivaci dendritických buněk (Messmer a spol., 2004). Také se ukázal jako schopné adjuvans *in vivo* (Rovere-Querini a spol., 2004). Interakce HMGB1 a TLR4 na povrchu dendritických

buněk umožní, aby dendritické buňky dokázaly cross-prezentovat antigeny z nádorových buněk T buňkám, konkrétně cytotoxickým T lymfocytům.

Inkubace nádorových buněk s doxorubicinem vyvolala uvolnění HMGB1 *in vitro* (Apetoh a spol., 2007). Význam proteinu HMGB1 pro imunogenicitu vyvolanou antracykliny a zprostředkovanou přes Toll-like receptor 4 byl zkoumán inhibicí exprese HMGB1 pomocí specifických siRNA. Výsledky ukázaly, že HMGB1 uvolňovaný z umírajících buněk je nutný pro aktivaci naivních T lymfocytů a pro vytvoření protinádorové imunity chránící proti relapsu nádoru. Navíc blokuující protilátky proti HMGB1 zcela zrušily doxorubicinem vyvolanou imunogenicitu buněčné smrti *in vivo* a také inhibovaly cross-prezentaci umírajících buněk T lymfocytům *in vitro*. Signalizace přes TLR4 brání rychlé degradaci fagocytovaného materiálu dendritickou buňkou a tím je umožněna optimální prezentace antigenu. Pokud chybí v systému TLR4 a HMGB1 je i přesto umírající buňka pohlcena dendritickou buňkou, ale fagosom rychle splývá s lysosomy a materiál z nádorové buňky je degradován místo, aby se antigenní peptidy vázaly na MHC molekuly. Tak pomáhá HMGB1 vyvolat protinádorovou imunitní odpověď a přispívá k protinádorovému efektu klasické chemoterapie.

Apetoh a kolegové dále zkoumali možnost vlivu mutace pro TLR4 (Asp299Gly) na úspěšnost chemoterapeutické léčby nádoru prsu. Tato mutace znamená záměnu jednoho nukleotidu, což se projeví jako změna aminokyseliny (Asp299→Gly) na extracelulární části TLR4. Experimenty *in vitro* odhalily sníženou interakci mezi takto mutovaným TLR4 a HMGB1 a s tím související sníženou schopnost cross-prezentace nádorových antigenů dendritickými buňkami. Dendritické buňky odvozené od monocytů, které pocházely z pacientů nesoucích mutaci TLR4, nedokázaly prezentovat pohlcené melanocytové antigeny cytotoxickým T lymfocytům. V klinickém pozorování byli sledováni pacienti s nemetastazujícím nádorem prsu, kteří podstoupili úspěšnou léčbu odstraněním mízních uzlin, následovanou lokální radioterapií a léčbou antracyklinovými chemoterapeutiky. U pacientů s mutovanou TLR4 alelou byl zaznamenán statisticky zvýšený výskyt metastáz do pěti let po operaci na rozdíl od pacientů s plně funkčním TLR4 (Apetoh a spol., 2007). Je možno konstatovat, že úspěšnost takovéto léčby lze alespoň z části posoudit předem na základě genetické výbavy pacienta.

4. Pokročilá chemoterapie s polymerním nosičem a imunomodulace

Moderní protinádorové terapie se opírají o cílené směřování léčiva a jeho kontrolované uvolnění uvnitř nádoru. Jednou z těchto moderních terapií je i terapie založená na makromolekulárních polymerních systémech, které se aktivně nebo pasivně akumulují v místě nádoru. V takovémto systému je léčivo připojeno k nosiči, který zajistí transport krevním řečištěm přímo do místa působení, aniž by došlo k degradaci léčiva nebo jeho nežádoucímu toxickému působení na jinou než nádorovou tkáň.

Jako první formuloval podstatu směřovaných léčiv, avšak pro léčbu infekčních onemocnění, německý lékař Paul Ehrlich už v roce 1906. Tuto myšlenku pak rozvinul v sedmdesátých letech Helmut Ringsdorf svým konceptem o použití polymerů jako cílených nosičů léčiv (Ringsdorf, 1975). Vlastnosti polymerních léčiv mohou být modulovány použitím různých typů polymeru. Optimálně by však polymery s léčivou měly působit jen na nádorovou tkáň a nepoškozovat ostatní zdravé tkáně pacienta, zvláště však buňky imunitního systému. Tímto způsobem se dá omezit systémová toxicita a nežádoucí působení například doxorubicinu, taxolových derivátů, 5-fluorouracilu a zlepšit tak jejich protinádorový efekt. Obecně lze říci, že polymery jsou používány jako nosiče různých nízkomolekulárních farmak, nukleových kyselin (krátkých antisense oligonukleotidů i celých genů) a proteinů (enzymů, hormonů, cytokinů) či peptidických fragmentů.

Světové laboratoře používají nejrůznější polymerní nosiče jak přirozené tak syntetické: dextransy, polygalakturonovou kyselinu, polyglutamovou kyselinu, poly-L-lysin, ale také například československý patent Ústavu makromolekulární chemie AV ČR *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamid (HPMA), na němž se podílel prof. Ing. Jindřich Kopeček, DrSc.

Polymerní cytostatická léčiva na bázi HPMA

Vynikající vlastnosti pro cílené směřování chemoterapeutik mají vodorozpustné syntetické polymery založené na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) metakrylamidové kostry které představují biokompatibilní, netoxické, neimunogenní a směrovatelné nosiče pro doručení léčiva.

Syntetický polymerní nosič *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamid (HPMA)

PolyHPMA je vodorozpustný syntetický kopolymer na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu, na který je pomocí přesně definované spojky kovalentně navázáno léčivo, případně i směřující struktura. Hydrofilní řetězec poly(HPMA) nenesou žádné funkční skupiny, které by umožňovaly kontrolované navázání a uvolnění léčiva, případně směřující struktury. Proto se používá modifikovaný kopolymerní HPMA řetězec nesoucí krátké postranní oligopeptidické sekvence zakončené reaktivní 4-nitrofenylesterovou skupinou (ONp), pomocí které mohou být na daný kopolymer navázané potřebné molekuly obsahující -NH₂ skupiny (Kovář a spol., 2003).

Spojka není vybrána náhodně, ale po několika desítkách pokusů byly připraveny polymery s aminokyselinovou spojkou (nejčastěji tetrapeptid Gly-Phe-Leu-Gly, případně dipeptid Gly-Gly pro směřující ligandy), dále se používá např. 6-aminohexanová kyselina nebo 4-aminobenzoová kyselina (Etrych a spol., 2002). Tato spojka zaručuje, že komplex léčiva s nosičem je při transportu krevním řečištěm stabilní a léčivo se uvolňuje až intracelulárně při nízkém pH nebo aktivitou proteáz v lysosomech. Jakmile je léčivo navázáno na polymerní nosič, stává se biologicky inaktivní a netoxické.

Léčivo může být aktivně pomocí směřující struktury nebo pasivně akumulováno. Pasivně akumulované léčivo se v nádoru hromadí díky abnormalitám nádorové tkáně: a) zvýšené propustnosti cév-endotel nádorových cév není celistvý, snadno propouští makromolekuly a nanočástice (liposomy a nanosféry) b) špatnému nebo nepřítomnému lymfatickému odvodnímu systému-nedochází k odstraňování nahromaděného léčiva. Odstranění makromolekul větších než 40kDa, které se nahromadily v nádoru, je tudíž velmi omezené. Souhrnně se tomuto fenoménu říká efekt zvýšené propustnosti a zadržení (Enhanced Permeability and Retention effect- EPR effect), který poprvé popsal Maeda a Matsumura (Maeda, 2001; Matsumura a Maeda, 1986). EPR efekt je základní princip pro pasivní akumulaci makromolekulárních léčiv do místa nádoru. Do buňky se pak pasivně akumulované léčivo dostává prostou pinocytózou.

Aktivní směřování znamená, že polymerní nosič nese mimo léčiva ještě ligand, který se s vysokou afinitou váže na konkrétní specifický receptor na nádorové buňce. Směřující strukturou může být polyklonální i monoklonální protilátka, ale také lektin,

karbohydrát, růstový faktor, transferrin nebo jakýkoli jiný ligand, který má na nádorové buňce svůj receptor. Poté může být aktivně směrované léčivo pohlceno receptorem zprostředkovanou endocytózou.

Cytostatický a protinádorový efekt pasivně či aktivně směrovaných *proléčiv* na bázi HPMA kopolymerů byl zaznamenán *in vitro* i *in vivo*. Experimentální i klinická data prokázala výhody HPMA makromolekulárních terapeutik (Kopeček a spol., 2000; Říhová a Kubáčková, 2003b).

Polymerní konjugáty HPMA s doxorubicinem

Konkrétním léčivem navázaným na HPMA nosič je například antracyklinové antibiotikum doxorubicin (Obr. 4), který se hojně používá v protinádorové léčbě. Připojením na kopolymer HPMA ztrácí doxorubicin systémové cytotoxické vlastnosti a zvyšuje se jeho terapeutický efekt.

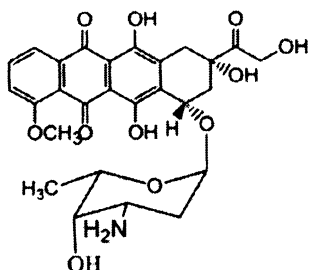
Konjugát s doxorubicinem vázaným na polymerní nosič pomocí oligopeptidické spojky –Gly-Phe-Leu-Gly- amidovou vazbou (PK1) byl konstruován tak, aby byl doxorubicin uvolněn z polymeru proteolytickým odštěpením pomocí lysosomálních proteáz (Obr. 5A). V roce 1994 byl ve Velké Británii zapojen do první a později druhé fáze klinických testů (Vasey a spol., 1999). V ČR byl testován konjugát podobný konjugátu PK1: Hulg-HPMA-Dox^{AM}, který byl směrovaný nespecifickým lidským imunoglobulinem (Říhová a spol., 2003c).

U konjugátu HPMA-Dox^{HYD} je doxorubicin připojen k HPMA hydrazonovou vazbou, která je pH senzitivní (Obr. 5B). Za fyziologického pH ~7,4 je hydrazonová vazba relativně stabilní, ale je rychle hydrolyzována za nízkého pH ~5 a doxorubicin je z polymeru uvolněn již v endozómu (Etrych a spol., 2002; Říhová a spol., 2001b). HPMA-Dox^{HYD} vykazuje vysokou cytostatickou aktivitu *in vitro* proti mnoha různým nádorovým buněčným liniím a je také účinný na myších experimentálních modelech *in vivo* (Kovář a spol., 2004; Mrkvan a spol., 2005).

Mechanismus působení konjugátu PK1 a konjugátu HYD či volného doxorubicinu se však liší. Volný doxorubicin a doxorubicin uvolněný z konjugátu HYD je akumulován v jádře nádorové buňky. Pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu však neukázala přítomnost doxorubicinu v jádře buněk inkubovaných s PK1, PK1 se akumuloval na membránách buněčných organel a doxorubicin zůstával navázan na

konjugátu. Předpokládá se, že hromadění HPMA-Dox^{AM} na membránách způsobuje blokádu buněčného metabolismu s následnou indukci buněčné smrti (Hovorka a spol., 2002).

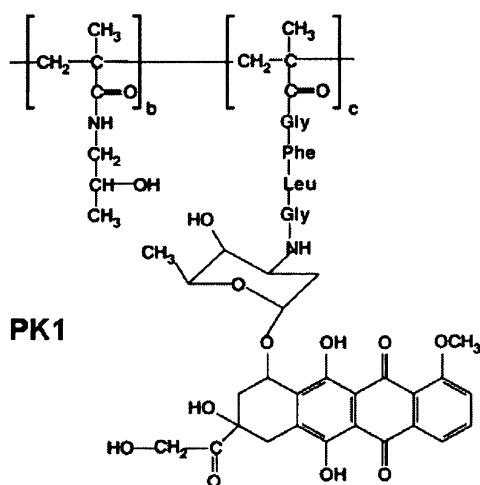
Obr 4. Antracyklinové antibiotikum doxorubicin (DOX)



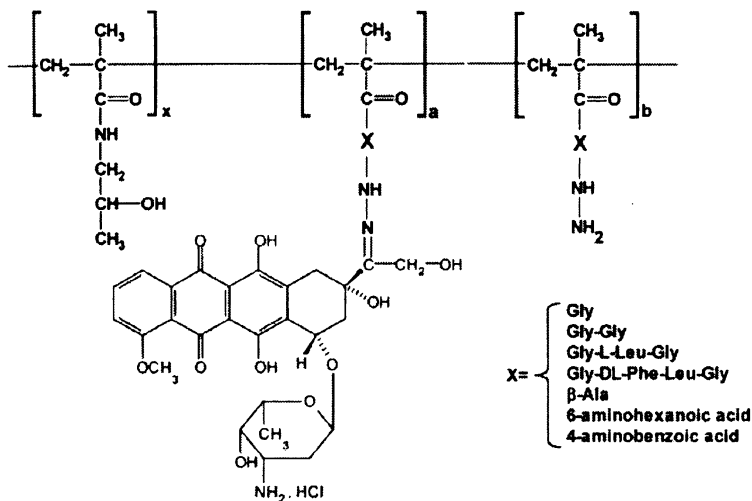
DOX

Obr 5. Molekulární struktury polymerních konjugátů s doxorubicinem

A) s amidovou vazbou HPMA-DOX^{AM} podle (Říhová a spol., 2001b)



PK1



Obr. 4 B) s hydrazonovou vazbou HPMA-Dox^{HYD} podle (Etrych a spol., 2002)

Imunomodulační vlastnosti polymerních léčiv na bázi HPMA

Imunogenicita polymeru HPMA

Samotný homopolymer *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu s molekulovou hmotností okolo 30kDa nebyl rozpoznán jako cizí makromolekula u žádného z pěti testovaných inbredních kmenů myši a nevyvolal zvýšenou tvorbu protilátek. Imunogenicitu mírně zvyšuje připojení oligopeptidického řetězce, kdy kopolymer vyvolává slabou protilátkovou odpověď imunitního systému namířenou hlavně proti peptidovému řetězci a částečně i proti hydroxypropylovým skupinám. Intenzita odpovědi závisí na struktuře oligopeptidického řetězce, struktuře navázané nízkomolekulární látky (haptenu), dávce antigenu a genetickém vybavení testovaného organismu (Říhová, 2002; Říhová a spol., 1984). Polymer HPMA dokáže jako nosič snižovat imunogenicitu různých proteinů (např. protilátek, transferrinu aj.) na něj vázaných. To je pravděpodobně dáno tím, že antigenní epitopy proteinů vázaných na neimunogenní poly(HPMA) jsou prostorově nedostupné a pro imunitní systém skryty (Říhová, 2002).

Imunogenní vlastnosti HPMA konjugátů s doxorubicinem

Účinná protinádorová terapie s polymerními cytostatiky závisí také na protinádorové imunitní odpovědi pacienta. Léčiva vázaná na nosič HPMA nejen že nepoškozují imunitní systém pacienta, ale naopak dokáží mobilizovat protinádorovou imunitní odpověď. V roce 1988 byly publikovány první informace o imunostimulačních vlastnostech nových makromolekulárních polymerních systémů, na které bylo vázáno protinádorové antibiotikum daunorubicin (Říhová a spol., 1988). Daunorubicin vázaný na HPMA dokázal stimulovat proliferaci buněk kostní dřeně. O mnoho let později byla popsána aktivace imunitního systému pro konjugát HPMA s navázaným doxorubicinem jak při laboratorních pokusech, tak během klinických testů (Říhová a spol., 2001a; Říhová a spol., 2003c).

Myši, kterým byla podána dávka nádorových buněk, byly účinně vyléčeny polymerními konjugáty s DOX a zároveň získaly dlouhodobou nádorově specifickou imunitu. Pokud jim byl znovu injikovány buňky stejného nádoru, z kterého byly předtím vyléčeny, dokázaly ho odhojit bez jakékoli terapie. Tato dvojí cytotoxická a

imunostimulační aktivita byla pozorována na různých experimentálních modelech (např. EL4 myší T buněčný lymfom, BCL1 myší B buněčná leukémie a 38C13 myší B buněčný lymfom) a po použití různých polymerních konjugátů s doxorubicinem. V závislosti na myším modelu, terapeutické dávce a režimu až 100% myší přežilo retransplantaci nádoru (Mrkvan a spol., 2005; Říhová a spol., 2001a; Šírová a spol., 2007). U myší, které byly léčeny volným doxorubicinem, se dlouhodobá protinádorová imunita nevyvinula, protože umíraly kvůli opožděnému toxickému účinku volného doxorubicinu (Mrkvan a spol., 2005). Pouze vyléčené myši s nepoškozeným imunitním systémem se stávaly rezistentní vůči opakovanému podání nádoru. Ve skupině athymických imunodeprimovaných nu/nu myší nebyli jedinci, kteří by dokázali dlouhodobě přežít, což ukazuje, že pro úspěšnou léčbu a navození dlouhodobé rezistence vůči nádoru je zapotřebí nepoškozený imunitní systém.

Dlouhodobá protinádorová imunita závisí především na cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytech a může být přenesena se splenocyty do naivního příjemce. Splenocyty nebo CD8⁺ buňky izolované z myší, které účinně odhojily nádor, byly přeneseny spolu s nádorovými buňkami do naivních myší. Tam dokázaly zpomalit růst nádoru či dokonce pomohly nádor zcela eliminovat (Mrkvan a spol., 2005; Šírová a spol., 2007). Tato nádorová imunita byla specifická pouze proti nádoru, který byl původně vyléčen. Myši neodhojily nádorové buňky, které pocházely z jiného typu syngenního nádoru (Šírová a spol., 2007).

Cytotoxický efekt spolu s aktivací imunitního systému díky léčbě Dox-HPMA konjugáty byl také potvrzen v klinickém pozorování. Klinické testy ukázaly nárůst počtu NK buněk a jejich aktivity a také LAK buněk (lymphokine-activated killer) u pacientek s rakovinou prsu po léčbě Hulg-HPMA-DOX^{AM} (PK1) (Říhová a spol., 2003c).

5. Závěr

V oblasti vývoje protinádorových léčiv dochází neustále k zdokonalování používaných chemoterapeutik, hledání účinnějších a k pacientům šetrnějších léčebných postupů. Nedávné studie a z nich získané poznatky objasňují procesy a změny u nádorových buněk, které jsou vyvolány protinádorovou léčbou ať už chemoterapeutickou či radioterapeutickou. Přináší možná vysvětlení proč je léčba určitými chemoterapeutiky účinnější, proč jiná selhává. Zatím jsou to jen střípky a je potřeba identifikovat další mechanismy, které se podílí na stimulaci imunitního systému, jak případně obnovit jejich funkci či jejich přínos zvýšit, v jakých souvislostech spolupracují s dalšími částmi organismu.

Poznání, že apoptotická smrt může spustit imunitní reakce, osvětluje také možné mechanismy působení polymerních HPMA-DOX konjugátů. O nich je dlouho známo, že kromě cytotoxických vlastností na nádorovou tkáň mají schopnost stimulovat imunitní systém a vytvořit v organismu protinádorovou imunitní paměť jak dokládají pokusy na myších modelech. Dosud ale byla předkládána různá vysvětlení. V současné době jsou konjugáty HPMA s amidovou vazbou i HPMA s hydrazonovou vazbou používány k pokusům, které ukazují, že charakteristické znaky imunogenní smrti vyvolané volným léčivem se objevují také u nádorových buněk inkubovaných s polymerními cytostatiky. Tyto výsledky by mohly významně přispět k vývoji další generace HPMA konjugátů s lepšími léčebnými účinky.

Přehled použité literatury

- Afshar N, Black BE and Paschal BM (2005) Retrotranslocation of the Chaperone Calreticulin from the Endoplasmic Reticulum Lumen to the Cytosol. *Mol Cell Biol* **25**:8844-8853.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Antoine Tesniere, Michel Obeid, Carla Ortiz, Alfredo Criollo, Grégoire Mignot, M Chiara Maiuri, Evelyn Ullrich, Patrick Saulnier, Huan Yang, Sebastian Amigorena and B. Ryffel FJB, P. Saftig (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine* **13**:10.
- Brown S, Heinisch I, Ewan Ross and Kate Shaw ea (2002) Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* **418**.
- Casares N, Pequignot MO and A. Tesniere FG, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, Ahmed Hamai, Sandra Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, Didier Métivier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, Carmen Garrido, L. Zitvogel, G. Kroemer (2005) Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* **202**:1691-1701.
- Decca MB, Carpio MA, Bosc C, Galiano MR, Job D, Andrieux A and Hallak ME (2007) Post-translational Arginylation of Calreticulin: A NEW ISOSPECIES OF CALRETICULIN COMPONENT OF STRESS GRANULES. *J Biol Chem* **282**:8237-8245.
- Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi Marco EBAngelo A and Rovere-Querini P (2005) Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology* **35**:2184-2190.
- Ehrke MJ, Srdan V and Darbie L. Maccubbin PU, Gintaras Zaleskis, Erica Berleth, Enrico Mihich (2000) Protective specific immunity induced by doxorubicin plus TNF-alpha combination treatment of EL4 lymphoma-bearing C57BL/6 mice. *International Journal of Cancer* **87**:101-109.
- Etrych T, Chytil P, Jelínková M, Říhová B and Ulbrich K (2002) Synthesis of HPMA Copolymers Containing Doxorubicin Bound via a Hydrazone Linkage. Effect of Spacer on Drug Release and in vitro Cytotoxicity. *Macromolecular Bioscience* **2**:43-52.
- Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA and Michalak M (1989) Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **264**:21522-21528.
- Galetto A, Buttiglieri S and Forno SM, Francesco; Mussa, Antonio; Matera, Lina (2003) Drug- and cell-mediated antitumor cytotoxicities modulate cross-presentation of tumor antigens by myeloid dendritic cells. *Anti-cancer drugs* **14**:833-843.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L and Kroemer G (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death & Differentiation* **14**:1237-1243.
- Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg P-A, Michalak M and Henson PM (2005) Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell* **123**:321-334.
- Gavin PD, Bruce AT, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old and Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* **3**:991-999.

- Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* **57**:727-741.
- Holaska JM, Black BE and Fraydoon Rastinejad aBMP (2002) Ca²⁺-Dependent Nuclear Export Mediated by Calreticulin. *Mol Cell Biol* **22**:6286–6297.
- Hovorka O, Št'astný M, Etrych T, Šubr V, Strohalm J, Ulbrich K and Říhová B (2002) Differences in the intracellular fate of free and polymer-bound doxorubicin. *Journal of Controlled Release* **80**:101-117.
- Kerr J, Wyllie AH and AR C (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**:239-257.
- Kopeček J, Kopečková P, Minko T and Lu Z-R (2000) HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **50**:61-81.
- Kovář M, Kovář L, Šubr V, Etrych T, Ulbrich K, Mrkvan T, Loucká J and Říhová B (2004) HPMA copolymers containing doxorubicin bound by a proteolytically or hydrolytically cleavable bond: comparison of biological properties in vitro. *Journal of Controlled Release* **99**:301-314.
- Kovář M, Mrkvan T, Strohalm J, Etrych T, Ulbrich K, Št'astný M and Říhová B (2003) HPMA copolymer-bound doxorubicin targeted to tumor-specific antigen of BCL1 mouse B cell leukemia. *Journal of Controlled Release* **92**:315-330.
- Krishnamoorthy T, Pavitt GD and Fan Zhang TED, and Alan G. Hinnebusch (2001) Tight Binding of the Phosphorylated α Subunit of Initiation Factor 2 (eIF2 α) to the Regulatory Subunits of Guanine Nucleotide Exchange Factor eIF2B Is Required for Inhibition of Translation Initiation. *Mol Cell Biol* **21**:5018-5030.
- Krysko DV, K D'Herde and Vandenabeele P (2006) Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* **11**:1709–1726.
- Lumsden A (1992) Improved efficacy of doxorubicin by simultaneous treatment with interferon-gama and interleukin-2. *In Vivo* **6**:553-558.
- Maccubbin DL, Cohen SA and Ehrke MJ (1990) Indomethacin modulation of Adriamycin-induced effects on multiple cytolytic effector functions. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **31**:373-380.
- Maeda H (2001) The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation* **41**:189-207.
- Matsumura Y and Maeda H (1986) A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res* **46**:6387-6392.
- Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, Tracey KJ and Chiorazzi N (2004) High Mobility Group Box Protein 1: An Endogenous Signal for Dendritic Cell Maturation and Th1 Polarization. *J Immunol* **173**:307-313.
- Mrkvan T, Šírová M, Etrych T, Chytil P, Strohalm J, Plocová D, Ulbrich K and Říhová B (2005) Chemotherapy based on HPMA copolymer conjugates with pH-controlled release of doxorubicin triggers anti-tumor immunity. *Journal of Controlled Release* **110**:119-129.
- Multhoff G, Lee M, Christopher CW, Caroline MM, Susanne W, Guenther E, Harm HK, Barbara L and Judith J (1999) Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Experimental Hematology* **27**:1627-1636.

- Noessner E, Gastpar R, Milani V, Brandl A, Hutzler PJS, Kuppner MC, Roos M, Kremmer E, Asea A, Calderwood SK and Issels RD (2002) Tumor-Derived Heat Shock Protein 70 Peptide Complexes Are Cross-Presented by Human Dendritic Cells. *J Immunol* **169**:5424-5432.
- Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, Zitvogel L and Kroemer G (2007a) Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of [gamma]-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **14**:1848-1850.
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L and Kroemer G (2007b) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13**:54-61.
- Ostwald TJ and MacLennan DH (1974) Isolation of a High Affinity Calcium-binding Protein from Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* **249**:974-979.
- Panaretakis NJ, Modjtahedi N and A Tesniere IV, M Durchschlag, GM Fimi, O Kepp, M Piacentini, K-U Froehlich, P van Endert, L Zitvogel, F Madeo4 and G Kroemer (2008) The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death and Differentiation*:11.
- Ringsdorf H (1975) Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia* **51**:135-153.
- Rovere-Querini P, A. Capobianco and Paola Scaffidi BV, Federica Catalanotti, Marta Giazzon, Ingrid E Dumitriu, Susanne Müller, Matteo Iannacone, Catia Traversari Marco E Bianchi, Angelo A Manfredi (2004) HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* **5**:825-830.
- Ryungsa K, Manabu E and Tanabe K (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**:1-14.
- Říhová B (2002) Immunomodulating activities of soluble synthetic polymer-bound drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**:653-674.
- Říhová B, J. Strohalm, et al. (2005) Induction of systemic antitumour resistance with targeted polymers. *Scandinavian Journal of Immunology* **62**:100-105.
- Říhová B, Kopeček J, Ulbrich K, Pospíšil M and Mančal P (1984) Effect of the chemical structure of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers on their ability to induce antibody formation in inbred strains of mice. *Biomaterials* **5**:143-148.
- Říhová B, Kopečková P, Strohalm J, Rossmann P, Větvicka V and Kopeček J (1988) Antibody-directed affinity therapy applied to the immune system: In vivo effectiveness and limited toxicity of daunomycin conjugated to HPMA copolymers and targeting antibody. *Clinical Immunology and Immunopathology* **46**:100-114.
- Říhová B and Kubáčková K (2003b) Clinical Implications of N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **4**:311.
- Říhová B, Strohalm J, Hoste K, Jelínková M, Hovorka O, Kovář M, Plocová D, Šírová M, Šťastný M, Schacht E and Ulbrich K (2001a) Immunoprotective therapy with targeted anticancer drugs. *Macromolecular Symposia* **172**:21-28.
- Říhová B, Strohalm J, Prausová J, Kubáčková K, Jelínková M, Rozprimová Lk, Šírová M, Plocová D, Etrych T, Šubr V, Mrkvan T, Kovář M and Ulbrich K (2003c) Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs: experimental and first clinical data. *Journal of Controlled Release* **91**:1-16.

- Říhová B, T. Etrych and M. Pechar MJ, M. Šťastný, O. Hovorka, M. Kovář, K. Ulbrich (2001b) Doxorubicin bound to a HPMA copolymer carrier through hydrazone bond is effective also in a cancer cell line with a limited content of lysosomes. *Journal of Controlled Release* **74**:225–232.
- Shapiro CL and Recht. A (2001) Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *The New England Journal of Medicine* **344**:1997-2008.
- Schwartz HS and Grindey GB (1973) Adriamycin and Daunorubicin: A Comparison of Antitumor Activities and Tissue Uptake in Mice following Immunosuppression. *Cancer Res* **33**:1837-1844.
- Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, Basu S, Srivastava P and Bhardwaj N (2001) Primary Tumor Tissue Lysates Are Enriched in Heat Shock Proteins and Induce the Maturation of Human Dendritic Cells. *J Immunol* **167**:4844-4852.
- Šírová M, Strohalm J, Šubr V, Plocová D, Rossmann P, Mrkvan T, Ulbrich K and Říhová B (2007) Treatment with HPMA copolymer-based doxorubicin conjugate containing human immunoglobulin induces long-lasting systemic anti-tumour immunity in mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **56**:35-47.
- Špíšek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S and Dhodapkar MV (2007) Bortezomib enhances dendritic cell (DC) mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* **109**:4839-4845.
- Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L and Kroemer G (2007) Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* **15**:3-12.
- Ujhazy P, Zaleskis G, Mihich E, Ehrke MJ and Berleth ES (2003) Doxorubicin induces specific immune functions and cytokine expression in peritoneal cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **52**:463-472.
- Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R, Thomson AH, Murray LS, Hilditch TE, Murray T, Burtles S, Fraier D, Frigerio E and Cassidy J (1999) Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents--Drug-Polymer Conjugates. *Clin Cancer Res* **5**:83-94.
- Zagozdzon JG, Stokosa T and Jakóbisiak AGDNWFWLM (1998) Effective chemo-immunotherapy of L1210 leukemia *in vivo* using interleukin-12 combined with doxorubicin but not with cyclophosphamide, paclitaxel or cisplatin. *International Journal of Cancer* **77**:720-727.
- Züllig S, Neukomm LJ, Marko Jovanovic SJC, Nicholas N Lyssenko MSH, Chris PM Reutelingsperger RAS and Hengartner aMO (2007) Aminophospholipid Translocase TAT-1 promotes Phosphatidylserine exposure during *C. elegans* apoptosis. *Current Biology* **17**:994–999.