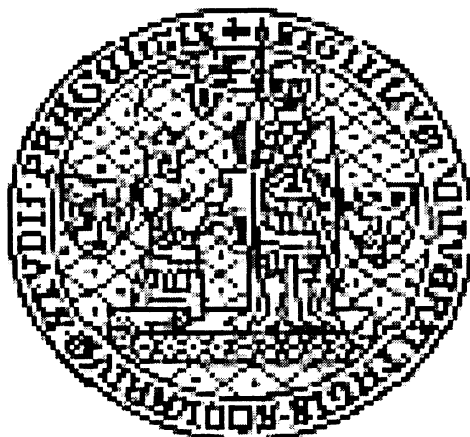


Katedra vývojové biologie a fyziologie živočichů

Oddělení imunologie

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Diplomová práce

**Jakub Tomala**

# **BCL1 leukémie jako experimentální model *in vivo***

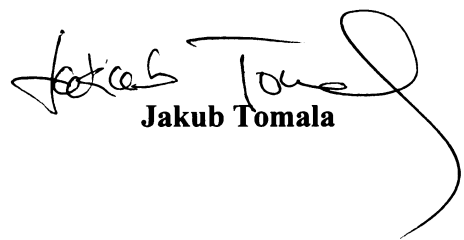
**Vedoucí diplomové práce:**

**prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.**

Především děkuji prof. RNDr. Blance Říhové, DrSc. za možnost pracovat v této skvělé laboratoři a s touto neobyčejnou ženou, za odborné vedení mojí práce a za skvělé pracovní podmínky, které dokázala vytvořit. Poděkovat bych chtěl i všem ostatním kolegům z Laboratoře humorální imunity Mikrobiologického ústavu AV ČR za veškerou nejen odbornou podporu, kterou mi poskytovali. Děkuji i všem pracovníkům Laboratoře biomedicinských polymerů Ústavu makromolekulární chemie vedené prof. Ing. Karlem Ulbrichem, CSc. za přípravu polymerních konjugátů.

**Prohlašuji, že tuto práci jsem vypracoval samostatně a s použitím uvedené literatury.**

**V Praze dne 4.5.2006**

  
**Jakub Tomala**

# **OBSAH**

OBSAH	STRANA
<b>I. Úvod</b> .....	1
<b>II. Literární přehled</b> .....	5
II.1. CHEMOTERAPIE.....	5
II. 1. 1. Chemoterapeutika .....	5
II. 1. 2. Nevýhody a omezení léčby klasickými cytostatiky.....	6
II. 2. POLYMERNÍ LÉČIVA.....	7
II. 2. 1. Polymerní nosiče.....	7
II. 2. 2. Vlastnosti polymerních léčiv.....	10
II. 3. AFINITNÍ TERAPIE.....	11
II. 3. 1. Monoklonální protilátky.....	12
II. 3. 2. Imunotoxiny.....	12
II. 3. 3. Radioimunotoxiny.....	13
II. 3. 4. ADEPT- antibody directed enzyme prodrug therapy.....	13
II. 3. 5. Směřované lipozómy.....	14
II. 3. 6. Směřovaná polymerní proléčiva.....	14
II. 4. POLY( <i>N</i> -[2-HYDROXYPROPYL]METAKRYLAMID) – HPMA.....	15
II. 4. 1. Struktura a vlastnosti HPMA.....	15
II. 4. 2. Vazba léčiva a směřujících struktur na HPMA.....	16
II. 4. 3. Struktura směřovaných HPMA konjugátů.....	17
II. 4. 4. Mechanismus účinku HPMA konjugátů.....	18
II. 5. SLIZNIČNÍ MIKROFLÓRA.....	19
II. 5. 1. Slizniční imunitní systém.....	20
II. 5. 2. Bezmikrobní zvířata.....	21
<b>III. Materiál a metody</b> .....	24
III. 1. ROZTOKY.....	24
III. 2. BUŇKY.....	27
III. 2. 1. Používané buněčné linie.....	27
III. 2. 2. Propagace buněk <i>in vitro</i> , zamrazení a rozmrazení buněk.....	27
III. 2. 3. Pasážování BCL1 leukémie <i>in vivo</i> .....	28
III. 2. 4. Inokulace nádorových buněk .....	28
III. 3. EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA.....	28
III. 3. 1. Mikrobiologická kontrola bezmikrobních myší.....	29
III. 4. PROTILÁTKY.....	29
III. 4. 1. Produkce protilátek.....	30
III. 4. 2. Purifikace protilátek.....	30
III. 4. 3. Kontrola čistoty protilátek.....	32
III. 4. 4. Biotinylace volných protilátek a protilátek obsažených v polymerních konjugátech.....	33
III. 5. PŘÍPRAVA HPMA KONJUGÁTŮ.....	34
III. 5. 1. Příprava monomerních derivátů MA.....	34
III. 5. 2. Příprava polymerních prekurzorů.....	35
III. 5. 3. Příprava HPMA konjugátů.....	36
III. 6. PRŮTOKOVÁ CYTOFLUOROMETRIE.....	37
III. 6. 1. Stanovení vazebné aktivity volných směřujících struktur a směřovaných polymerních konjugátů s doxorubicinem na cílové buňky.....	38
III. 6. 2. Stanovení BCL1 buněčné populace.....	38
III. 7. IZOLACE SPLENOCYTŮ.....	39
III. 8. STANOVENÍ IC <sub>50</sub> VYBRANÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ.....	39

III. 8. 1. Proliferační test <i>in vitro</i> pomocí <sup>3</sup> H-thymidinu .....	40
III. 8. 2. Metoda inkorporace <sup>3</sup> H-thymidinu .....	40
III. 9. HISTOLOGICKÁ ANALÝZA SLEZINY, JATER A PLIC.....	40
II. 9. 1. Odběr a fixace orgánů .....	41
II. 9. 2. Příprava parafinových řezů.....	41
II. 9. 3. Příprava zmrazených řezů.....	41
II. 9. 4. Histologické barvení hematoxylinem a eozinem .....	41
II. 9. 5. Imunohistochemický průkaz idiotypu IgM BCL1 leukémie.....	42
III. 10. ELISA.....	42
III. 10. 1. Příprava séra .....	42
III. 10. 2. Detekce idiotypu IgM BCL1 leukémie.....	42
III. 11. APLIKACE KONJUGÁTŮ A PROTILÁTEK .....	43
III. 12. ZJIŠTĚNÍ MÍRY PROGRESE BCL1 LEUKÉMIE V BEZMIKROBNÍCH PODMÍNKÁCH.....	43
III. 13. KOMBINOVANÁ TERAPIE BCL1 LEUKÉMIE .....	43
III. 14. IDIOTYP IGM BCL1 LEUKÉMIE.....	44
III. 14. 1. Sérum Balb/c myši v terminálním stádiu BCL1 leukémie.....	45
III. 14. 2. Kinetika idiotypu IgM BCL1 leukémie.....	45
III. 14. 3. Odbourání idiotypu IgM BCL1 leukémie pomocí B1 protilátky.....	45
<b>IV. Experimentální část.....</b>	<b>46</b>
IV.1. PROGRESE BCL1 LEUKÉMIE.. .....	46
IV. 1. 1. Histologická analýza sleziny, jater a plic Balb/c myši s inokulovanou BCL1 leukémií .....	47
IV. 1. 2. Stanovení BCL1 buněčné populace pomocí průtokové cytofluorometrie .....	49
IV. 1. 3. Detekce idiotypu IgM BCL1 leukémie .....	51
IV. 2. <i>IN VITRO</i> PROLIFERAČNÍ TESTY .....	51
IV. 3. STANOVENÍ VAZEBNÉ AKTIVITY POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE.....	52
IV. 3. 1. Monoklonální protilátky B1 a anti-CD71 (C2).....	52
IV. 3. 2. Hvězdicové směrované doxorubicinové konjugáty.....	53
IV. 4. KINETIKA IDIOTYPU IGM BCL1 LEUKÉMIE V PERIFERNÍ KRVI.....	55
IV. 5. ODBOURÁNÍ IDIOTYPU IGM BCL1 LEUKÉMIE POMOCÍ B1 PROTILÁTKY.....	55
IV. 6. KVANTIFIKACE AKUTNÍ REAKCE NA PODÁNÍ B1 SMĚROVANÉHO HPMA KONJUGÁTU.....	56
IV. 7. KOMBINOVANÁ TERAPIE BCL1 LEUKÉMIE DVĚMA DOXORUBICINOVÝMI KONJUGÁTY SMĚROVANÝMI DVĚMA RŮZNÝMI MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI.....	57
IV. 8. PROGRESE BCL1 LEUKÉMIE NA BEZMIKROBNÍM MYŠÍM MODELU BALB/C.	59
<b>V. Diskuze.....</b>	<b>62</b>
<b>VI. Závěr.....</b>	<b>69</b>
<b>VII. Seznam zkratk.....</b>	<b>70</b>
<b>VIII. Přehled použité literatury.....</b>	<b>72</b>

# I. ÚVOD

# I. ÚVOD

Jelikož v současnosti ve vyspělých zemích celého světa umírá řádově jeden z pěti lidí na nádorová onemocnění, ta tak představují významný problém současné medicíny. Česká republika, držící primát ve výskytu rakoviny konečníku tlustého střeva, na tom není jinak. Bohužel se počet pacientů s diagnostikovaným onemocněním tohoto druhu každoročně zvyšuje. Je velmi obtížné říci, který z vlivů má největší podíl na vzniku rakoviny, je ale mnohem jednodušší je vyjmenovat. Pravděpodobně nikoho nepřekvapí tvrzení, že se jedná o vliv životního prostředí a jeho kontaminaci karcinogenními látkami a mutageny, nezdravý životní styl včetně kouření a v neposlední řadě také vzrůstající průměrný věk, neboť riziko vzniku rakoviny neoddiskutovatelně roste s zvyšujícím se věkem. Jedním ze zajímavých, a možná i celkem překvapivých, faktorů vzniku rakoviny se jeví skutečnost, že stále efektivnější zdravotnická péče vede ke kumulaci potenciálně letálních alel v genofundu populace, které by jinak byly ze systému odstraněny. Jelikož je vznik nádorového onemocnění podmíněn právě genetickým poškozením genů ovlivňujících například buněčnou proliferaci, pravděpodobnost nádorového bujení se zvyšuje.

V současné době uplatňuje medicína v léčbě nádorových onemocnění tři základní postupy. Prvním z nich je chirurgické vyjmutí nádorové masy, druhým je radioterapie (aktinoterapie), která spočívá v použití radioaktivního záření za účelem eliminace radiačně-senzitivních nádorových buněk. Poslední je reprezentován chemoterapií. Tyto postupy jsou podle typu nádoru a každého konkrétního pacienta kombinovány k maximalizaci léčebného účinku. Efektivita léčby konvenčními postupy může být jak poměrně efektivní (až 80 % u některých typů nádorových onemocnění – akutní lymfoblastická leukémie, nádory varlat nebo Wilmsův nádor), tak téměř bez výrazného účinku (generalizované formy Grawitzova karcinomu a maligního melanomu). Typ tumoru není ovšem jediný faktor, který je odpovědný za úspěšnost terapie. Míra progresu, ve které je tumor diagnostikován, sehrává klíčovou roli. To lze názorně ukázat na karcinomu prsu. Jedná se o často se vyskytující nádor, který, jedná-li se o včasné diagnostikovaný nález (bez metastáz nebo jen s několika v blízkých uzlinách), bývá po chirurgickém odstranění a následné radioterapii a/nebo adjuvantní chemoterapii prognózy dobré. Naopak generalizovaný karcinom prsu je stále považován za neléčitelný a prognóza je velmi špatná. Proto je třeba stále pracovat na zdokonalování diagnostických prostředků, aby mohla být zlepšena efektivita léčby obecně.



Chemoterapie, na rozdíl od chirurgického zákroku nebo radioterapie, je léčba se systémovým dopadem na organismus. Velká část pacientů je diagnostikována v generalizovaném stádiu onemocnění. U těchto pacientů hraje chemoterapie hlavní roli, stejně tak u pacientů s leukémiemi, které rostou roztroušeně a netvoří solidní nádorovou masu. Navíc je chemoterapie užívána jako prostředek k likvidaci zbylých nádorových buněk, které v organismu zůstávají po chirurgickém odstranění nádoru. Tento způsob využití se nazývá adjuvantní chemoterapie.

Ačkoli chemoterapie je mocný nástroj v léčbě nádorových onemocnění, velký důraz je kladen na vývoj nových metod, a to hned z několika důvodů. Některá nádorová onemocnění totiž jeví velmi vysokou rezistenci k cytostatikům, jak již bylo zmíněno výše (Grawitzův karcinom a maligní melanom). Dalším důvodem je fakt, že léčba cytostatiky může vyvolávat vznik resistance k chemoterapii. Dokonce i nádory původně velmi citlivé k určitému cytostatiku se postupně stávají vysoce resistantními. Tento jev se nazývá tzv. mnohočetná léková resistance (MDR – multidrug resistance). Dochází k němu díky značnému zvýšení exprese genu *mdr-1*, jehož produkt, p-glykoprotein, je membránová ATPáza aktivně pumpující xenobiotika ven z buňky. Konečně, vysoká vedlejší toxicita (nefrotoxicita, kardiotoxicita) je velmi důležitým a často limitujícím faktorem při aplikaci chemoterapie.

Na základě nejnovějších poznatků z rozmanitých vědních oborů byla vypracována řada nových léčebných metod, z nichž některé již vstoupily do klinického testování, jiné jsou prozatím ve stádiu testů na zvířecích modelech. Mezi nejznámější jistě patří genová terapie. Metoda je založena na vnášení (či inaktivaci) různých regulačních genů přímo do nádorových buněk s cílem zvrátit maligní fenotyp. Do nádorových buněk jsou také vnášeny geny, jejichž produkty hrají roli při vzniku imunitní odpovědi (CD80, IL-2) a vedou k eliminaci nádoru nebo „sebevražedné geny“ (HSV-TK, cytidindeamináza), jejichž exprese je pro buňku letální. Ukazuje se, že při kontrole vzniku, rozvoji a potlačení zhoubného bujení hraje nezanedbatelnou roli imunitní systém, a proto se mnozí badatelé intenzivně zabývají otázkou imunomodulace neboli metodami, které ovlivňují regulační mechanismy imunitního systému. Jako účinné imunomodulátory lze využít mnohé cytokiny (např. IL-2 a IFN- $\alpha$  jsou již klinicky používané léky). Další strategií je příprava LAK či TIL buněk pacienta. CTL a NK buňky pacienta, respektive lymfocyty izolované přímo z nádoru, jsou následně *in vitro* aktivovány a poté navraceny zpět do pacientova organismu. V obou případech je cílem aktivovat cytotoxickou imunitní odpověď pacienta vedoucí k eliminaci nádoru. Jinou, velmi zajímavou možností v boji proti nádorovým onemocněním představuje skupina látek, které mají zvýšenou afinitu k maligním buňkám. Skutečnost, že tyto sloučeniny mají sníženou

toxicitu, prodloužený poločas setrvání v krevním oběhu a zvýšenou akumulaci přímo v nádorových buňkách, je činilo a činí velmi zajímavými pro výzkum. Jedná se o liposomy [1, 2], dendrimery, nanočástice [3], mikrokuličky [4], hydrogely [5] nebo vodorozpustné polymerní nosiče [6-10]. Všechny tyto systémy obsahují léčebně-efektivní složku, ne všechny obsahují směřující jednotku, tak aby byly aktivně zachycovány v cílových buňkách. Některé jsou pasivně vychytávány nádorem z krevního oběhu za pomoci tzv. EPR (Enhanced Permeability and Retention) efektu [11-13].

O cílených aktivně směřovaných formách léčiv se poprvé zmínil v roce 1906 Paul Ehrlich svou tézí o „magické střele“ [14] a objasnil tím svou představu o selektivním směřování biologicky aktivních látek do místa jejich účinku. Specificita vůči nádorům je dána přítomností směřující struktury na léčebném komplexu rozpoznávajícím na cílových buňkách odpovídající receptor zajišťující zvýšenou akumulaci léčiva v místě patologického procesu a snižující nežádoucí vedlejší účinky na organismus. První směřovaná léčiva, tzv. imunotoxiny, nesla toxin (ricinový toxin, difterický toxin, cholerový toxin) kovalentně vázaný přímo na směřující strukturu, kterou byla monoklonální protilátka [15]. Jejich využití v klinické praxi [16] je omezeno mimo jiné poměrně vysokou imunogenicitou. Později byla pozornost zaměřena na směřovaná polymerní léčiva, kde jak směřující struktura, tak cytotoxická složka jsou navázány na polymerní nosič. Takovéto konjugáty mají většinou podstatně příznivější farmakologické vlastnosti než imunotoxiny. Jedním z nejperspektivnějších nosičů je poly[N-(2-hydroxypropyl)-metakrylamid] (HPMA), československý patent, vyvinutý ve spolupráci Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, Mikrobiologického ústavu AV ČR a University of Koele [17].

Ačkoliv stále dokonalejší diagnostické možnosti nádorových onemocnění zlepšují vyhlídky postižených, většina z nich se k efektivní léčbě dostává až v mnohem pozdější fázi, než je ideální. Proto je žádoucí studovat možnosti léčby v pozdních stádiích těchto onemocnění.

Ani vztah nádoru a mikrobiální flóry není zanedbatelným tématem, jelikož ten zaujímá v organismu savců ne zcela objasněnou, ale nepochybně velmi důležitou imunologickou roli.

Navíc myšlené použití polymerních léčiv v bezmikrobním systému pak činí pochopení tohoto vztahu ještě o mnoho lákavějším.

Cíl této práce lze rozdělit na několik částí:

- Výběr vhodných směrujících struktur, jejich produkce a purifikace
- Příprava směrovaného polymerního a polymerního (nesměrovaného) doxorubicinu (ÚMCH)
- Charakterizace progresu diseminovaného nádorového onemocnění (BCL1 leukémie) v organismu myšího modelu
- *In vitro* zjištění cytotoxicity volného a polymerního doxorubicinu, směrovaných polymerních konjugátů a směrujících struktur, určení  $IC_{50}$
- Určení schopnosti vazby směrovaného polymerního doxorubicinu a volných směrujících struktur na cílové buňky, porovnání
- Detekce BCL1 idiotypu IgM v séru a kinetika jeho odbourávání přirozeně a za pomoci B1 monoklonální protilátky
- Léčba BCL1 leukémie pomocí dvojitého časově sekvenčního směrování směrovaných doxorubicinových konjugátů – Double Impact Therapy
- Charakterizace progresu diseminovaného nádorového onemocnění (BCL1 leukémie) v organismu *bezmikrobního* myšího modelu

## **II. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

## II. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### II. 1. CHEMOTERAPIE

Chemoterapie se ze všech tří metod používaných při léčbě rakoviny prosadila nejpozději. První novodobé použití toxických látek pro léčbu malignit je spojeno s obdobím druhé světové války [18], intenzivní vývoj nových preparátů však začal až v 70. letech minulého století [19]. Chemoterapie může být podávána jednak jako adjuvantní léčba, což znamená, že je podávána poté, co je solidní nádor odstraněn lokálními metodami (chirurgie, radioterapie). Cílem je zvýšit úspěšnost léčby. U diseminovaných nádorových onemocnění má chemoterapie jakožto systémová léčba zásadní postavení, přestože jen málokdy vede k uzdravení a je nasazována převážně jako léčba paliativní [20].

#### II. 1. 1. Chemoterapeutika

V klinické praxi se v současnosti používá více jak 100 cytotoxických látek [21], které lze podle mechanismu jejich účinku rozdělit do několika skupin:

1. **Antimetabolity** – látky podobné přirozeným metabolitům, vstupující do jejich biosyntetických drah a narušující syntézu biologicky důležitých látek [22, 23].
2. **Alkylační látky** – kovalentní vazbou na DNA modifikují její strukturu, a tím ji poškozují [24, 25].
3. **Interkalační látky** – obsahují chromoforovou skupinu, která jim umožňuje interkalaci (vmezeření) do struktury DNA a inhibují tak replikaci i transkripci [26, 27].
4. **Radiomimetika** – látky, které se váží na DNA a působí její rozštěpení [28].
5. **Inhibitory mitózy** – působí zablokování buněčného cyklu v mitotické fázi mechanismem inhibice polymerizace tubulinu (vinca alkaloidy) [29] nebo blokace jeho depolymerizace (taxany) [30].

6. **Inhibitory topoizomeráz** – látky inhibující topoizomerázy [31, 32].

7. **Inhibitory proteosyntézy** – nevelká skupina látek inhibujících translaci [33].

Toxicitu některých terapeutik způsobuje řada mechanismů, a proto mohou být a také bývají zařazena do jedné nebo několika skupin současně.

Konkrétní příklady cytostatik z uvedených skupin jsou v tabulce č. 1.

Antimetaboly	metotrexát, edatrexát, merkaptopurin, 5-fluorouracil, cytosinarabinosid, gemcitabin
Alkylační látky	chlorambucil, cyklofosamid, thiotepa, busulfan, cisplatina, karmustin, mitomycin C
Interkalační látky	aktinomycin D, doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, mitoxantron
Radiomimetika	bleomycin, neokarcinostatin, streptonigrin
Inhibitory mitózy	vinblastin, vinkristin, vindezin, paklitaxel, docetaxel
Inhibitory topoizomeráz	topotekan, irinotekan, tenipozid, etopozid
Inhibitory proteosyntézy	L-asparagináza

Tab. 1. Běžně používaná cytostatika rozdělená podle své funkce

## II. 1. 2. Nevýhody a omezení léčby klasickými cytostatiky

Zásadním nedostatkem současné protinádorové terapie je nespecifické působení cytostatik. Cytostatika neselektivně inhibují buněčnou proliferaci, a proto samozřejmě poškozují i zdravé proliferující buňky a tkáně, nejen nádorové elementy. Poškození silně proliferujících tkání (tzv. systémová toxicita) je pro chemoterapii typickým a pro pacienty velmi nepříjemným vedlejším účinkem léčby. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří hematologická toxicita [34], gastrointestinální toxicita [35] a poškození gonád [36]. Mnohá cytostatika vykazují ještě sobě vlastní specifickou orgánovou toxicitu, např. antracyklinová antibiotika jsou kardiotoxická [37], metotrexát a cis-platina jsou nefrotoxické [38, 39]. Většina cytostatik má také imunosupresivní účinky, což prakticky eliminuje možnost uplatnění přirozených imunitních a získaných mechanismů při potlačení nádorového růstu.

Cytostatika, která vyvolávají změny DNA (alkylační činidla), mohou navíc působit vznik mutací a sekundárních malignit [40].

Léčba cytostatiky více než jasně demonstruje pravdivost Paracelsova výroku, že jediný rozdíl mezi jedem a lékem spočívá v množství podané substance. Současné přístupy k léčbě malignit spoléhají na podání takové dávky léčiva, která by zajistila co nejvyšší terapeutický efekt a přitom nevratně nepoškodila zdraví pacienta. Výsledkem je podání kompromisní dávky, pro daný nádor nejvhodnějšího cytostatika (či cytostatik), která ještě nevyvolává život ohrožující komplikace. Bohužel takto pojatá léčba často nepostačuje k úplné eradikaci nádoru. Po určité době podávání cytostatik se nádor stane rezistentní na další léčbu. Rezistence může mít různé příčiny, mezi nejčtenější patří indukce exprese P-glykoproteinu, který způsobuje vylučování xenobiotik ven z buňky. Následně vzniká fenomén zvaný mnohočetná léková rezistence (MDR). Vznik MDR provází léčbu pomocí doxorubicinu, daunomycinu, etopozidu, vinblastinu, vinkristinu, taxolu a dalších [41].

## **II. 2. POLYMERNÍ LÉČIVA**

Již v polovině sedmdesátých let minulého století uvažoval Helmut Ringsdorf o možném použití vodorozpustných polymerů jako nosičů biologicky aktivních látek [42]. Tyto polymery podle jeho představy měly být hydrofilní, což by zaručovalo dobrou rozpustnost konjugátu ve vodných roztocích, a obsahovat takové funkční skupiny, které umožní kovalentní navázání cytostatika, případně směřující struktury. Vazba léčiva na polymerní nosič měla být realizována prostřednictvím krátkého mezičlánku, který je hydrolyticky či enzymaticky biodegradovatelný a umožňuje kontrolované uvolňování cytostatika v cílové tkáni.

### **II. 2. 1. Polymerní nosiče**

Jako nosiče biologicky aktivních látek lze použít jen poměrně úzkou skupinu polymerů, protože polymerní nosič:

- nesmí být toxický, a je-li metabolizován, pak ani žádný z jeho metabolitů nesmí být toxický,

- nesmí se akumulovat v organismu (není-li metabolizován, pak jeho molekulová hmotnost musí být nižší než je renální práh – 40 kDa),
- musí být biokompatibilní a imunokompatibilní,
- musí být schopen navázat terapeuticky účinné množství biologicky aktivní látky,
- musí být stabilní a chemicky dobře definovaný,
- jeho produkce nesmí být příliš nákladná.

Požadavky jsou diktovány tím, že se polymerní nosič bude opakovaně dostávat do pacientova těla, a není možné, aby ho poškozoval.

Jako polymerní nosiče lze použít jak polymery přírodní, tak syntetické. Z přírodních polymerů se testují dextransy [43, 44], polypeptidy [45], různé formy  $\beta$ -D-glukanu [46], kyselina hyaluronová [47] či polyfosfáty. Zdá se však, že v klinické praxi se uplatní spíše polymery syntetické, které nabízejí více možností ve způsobu vazby biologicky aktivní složky. Některé ze syntetických polymerů testovaných jako nosiče jsou tyto: poly(hydroxybutyrát) [48], deriváty poly[ $N^5$ -(2-hydroxyethyl)-L-glutamin]u [49] nebo kopolymery vinylpyrrolidon/maleinové kyseliny nebo anhydridu [50]. Mezi nejperspektivnější syntetické polymerní nosiče využívané v klinické praxi patří poly[ $N$ -(2-hydroxypropyl)metakrylamid] [6, 51-56] a poly(ethylen glykol) [55, 57]. Dále se testují ethylen/vinyl acetátové kopolymery [50], kopolymer styrenu a maleinové kyseliny [58] a další.

Konjugáty polymerů s navázanou biologicky aktivní složkou jsou intenzivně testovány v experimentálních, preklinických a klinických studiích. Do klinického testování se však dostalo jen několik preparátů.

Jedním z prvních byl konjugát styrenu a maleinové kyseliny s účinnou látkou neokarzinostatinem (SMANCS), vyvinutý v Japonsku [58]. Přípravek je určen pro léčbu hepatocelulárního karcinomu. Další preparát, subkutánní implantát Zoladex [59], je tvořen polylaktid-koglykolidovými mikrokuličkami uvolňujícími luteinizační hormon a je používán při léčbě nádorů prostaty. Jiným preparátem je Pegasys, interferon  $\alpha$  navázaný na poly(ethylen glykol), používaný pro léčbu pacientů s hepatitidou B i C [60]. ADAGEN je konjugát poly(ethylen glycol)u a adenosin deaminasy [61]. Je předepisován pacientům s nedostatečností ADA. Dalším prostředkem je konjugát poly(ethylen glycol)u a L-asparaginasy [57]. V současnosti je v 3. fázi klinického testování konjugát poly-L-glutamové kyseliny PG-paclitaxel (PG-TXL) [62], zaměřený na nádorová onemocnění vaječníků a plic.

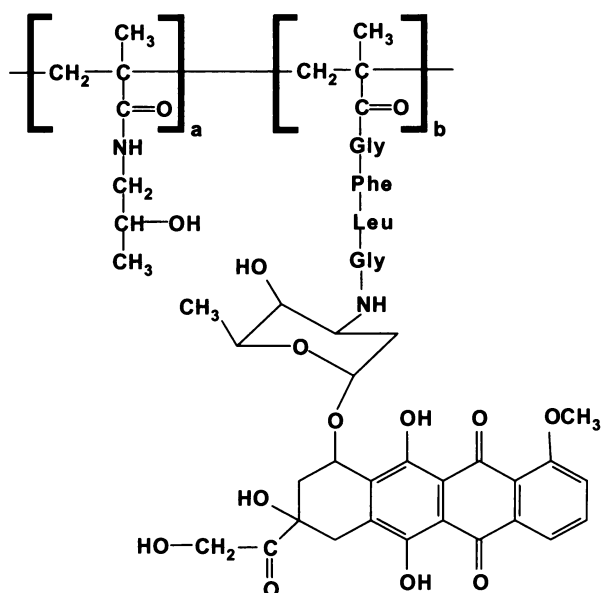


Paclitaxel je také k dispozici navázaný na poly[*N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamid], stejně tak jako cisplatina [63]. V současné době se zároveň nachází ve 1. fázi klinického testování pegylovaný lipozomální doxorubicin, nazývaný Caelyx nebo také Doxyl [64].

Z předchozího krátkého výčtu je vidět, že polymery mohou sloužit jako nosiče chemicky naprosto odlišných látek. 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.

Mezi preparáty vzbuzující velké naděje patří doxorubicin navázaný na řetězec poly[*N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamid]u pomocí tetrapeptidické spojky GlyPheLeuGly. Tento preparát, označovaný jako PK1 (Obr. 1), ve Velké Británii úspěšně dokončil fázi I klinických zkoušek a stojí před ukončením fáze II [65].

Velmi slibné výsledky také jeví doxorubicin navázaný na HPMa polymer směřovaný lidským imunoglobulinem, použitý při paliativní léčbě pacientek s angiosarkomem a karcinomem prsu [66]. V experimentálním modelu byl testován mitomycin C navázaný na dextran, který se prokázal jako velmi účinný při léčbě myší leukémie L1210 [67], či rifampicin kontrolovaně uvolňovaný z polyhydroxybutyrátových mikrokuliček [68]. Polymerní nosič na bázi polylysinu zvyšuje účinnost c-myc antisense DNA oligomeru [69]. Použití antisense oligonukleotidů také výrazně vylepšuje jejich vazba na HPMa přes sulfhydrylové skupiny [70, 71].



Obr. 1: Molekulární struktura PK1 (převzato z Říhová et al., 2001).

Z konjugátů proteinů navázaných na polymerní nosič byly testovány enzymy jako superoxid dismutáza a kataláza navázané na poly(etylen glykol), které vykazovaly účinnost ve smyslu ochrany experimentálních zvířat před reaktivními kyslíkovými radikály [72] [73]. Konjugace biologicky aktivní látky k polymernímu nosiči byla testována taktéž u cytokinů, konkrétně u IL-2. IL-2 navázaný na poly(etylen glykol) zvýšil T- buněčnou protinádorovou odpověď u morčat s hepatocelulárním karcinomem [74] a byl též přínosem u vybraných pacientů s karcinomem hlavy a krku [75]. Dobrou antimetastatickou aktivitu vykazoval konjugát, kde krátké oligopeptidické sekvence RGDT byly vázány rovněž na poly(etylen glykol) [76].

## II. 2. 2. Vlastnosti polymerních léčiv

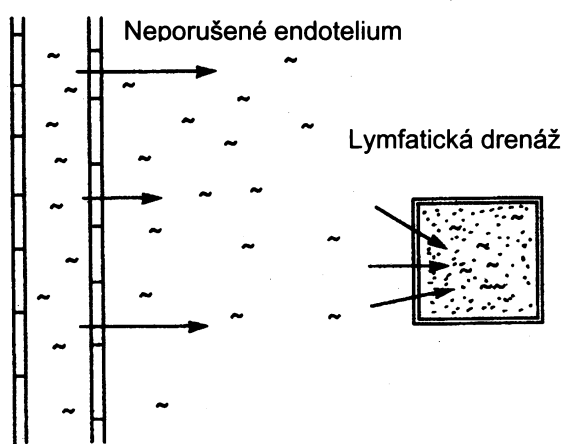
Mnohé biologicky aktivní látky jsou terapeuticky velmi účinné, žel některé jejich vlastnosti brání jejich širokému klinickému použití. Vazba na polymerní nosič však dokáže mnohé nepříznivé vlastnosti potlačit natolik výrazně, že se některé z těchto biologicky aktivních látek mohou ve formě polymerních konjugátů stát skutečně účinnými léky moderní medicíny.

Jedním z problémů, které mohou vzniknout při léčbě allogenními proteiny, je jejich imunogenicita. Výrazná imunitní odpověď byla zaznamenána při léčbě adenosindeaminázou či L-asparaginázou. Tuto komplikaci při terapii lze částečně obejít přípravou proteinu jako rekombinantní molekuly produkované v různých bakteriálních kmenech. Takto získané proteiny se vzájemně antigenně liší. Z hlediska opakované terapie jde však o omezené řešení. Bylo prokázáno, že navázáním proteinu na poly(etylen glykol) se výrazně sníží jeho imunogenicita. Takto byla testována adenosindeamináza [77], L-asparagináza [57], superoxid dismutáza, kataláza [78] a další. Nejen poly(etylen glykol) jako nosič snižuje imunogenicitu. Například po navázání na HPMA vykazují proteiny taktéž výrazné snížení imunogenicity [79].

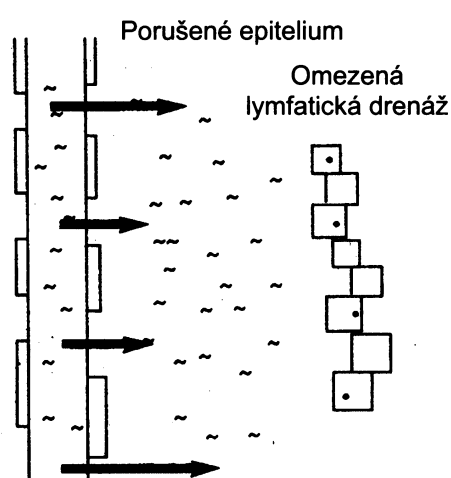
Vazbou biologicky aktivní látky na polymerní nosič se nejen sníží její imunogenicita, ale také se prodlouží poločas setrvání v krevním oběhu [80]. Tento efekt se uplatňuje také u konjugátů s nízkomolekulárními farmaky, kde je přetrvávání v séru většinou ještě výraznější. Tento fakt byl pozorován například u HPMA [6] - doxorubicin konjugovaný s HPMA nosičem má 15x delší plazmatický poločas než volný doxorubicin [81].

Dlouhodobě cirkulující léčiva mohou být akumulována a uvolňována v požadovaném místě účinku. To platí i pro konjugáty bez specifické směřující struktury, které mohou být pasivně akumulovány v solidních nádorech pomocí EPR efektu [12]. EPR efekt (Obr. 2) je popisován jako pasivní akumulace makromolekul v nádorech díky porušenému epitelu cév nádoru a omezení lymfatické drenáže. Limit EPR efektu byl stanoven zhruba na úrovni 40 kDa. Molekuly o velikosti cca 50 kDa a větší jsou zachycovány, zatímco molekuly menší než 40 kDa jsou z nádorů odstraňovány.

A) normální tkáň



B) tumor



Obr. 2: EPR effect (Enhanced Permeability and Retention effect; převzato z Duncan et al., 1992).

Jiný negativní rys, který může být potlačen vazbou na polymerní nosič, je citlivost biologicky aktivních peptidů k účinkům aminopeptidáz. Navázáním peptidu na polymer se jeho citlivost vůči těmto enzymům sníží [82].

Nespornou výhodou polymerních léčiv je solubilizace špatně rozpustných farmak, ke které v důsledku vazby dochází [10]. Mnohá léčiva navíc vazbou na polymer ztrácejí svou vedlejší toxicitu. Například cyklosporin A vázaný na HPMA řetězec na rozdíl od volného cyklosporinu A téměř nepoškozuje thymus [83] a ledviny a u doxorubicinu vázaného na stejný kopolymer je snížena jeho hepatotoxicita, kardiotoxicita a myelotoxicita [7, 62, 84].

### II. 3. AFINITNÍ TERAPIE

Jak už bylo zmíněno dříve, myšlenku vyrobit „kouzelné střely“, léčiva, která budou působit pouze na dané cílové buňky, aniž by poškozovala ostatní části organismu, vyslovil na

počátku minulého století Paul Ehrlich, který se pokoušel najít účinný lék na trypanosomové infekce [14]. Jeho myšlenka, dnes nazývaná afinitní terapie, však byla do důsledku realizována až o několik desítek let později. Pro směřování „kouzelných střel“ se používá řada látek, například hormony [85], růstové faktory, lektiny [86, 87], sacharidy [88, 89], transferin [90, 91] ale především polyklonální a monoklonální protilátky [8, 51, 92-95].

### **II. 3. 1. Monoklonální protilátky**

Monoklonální protilátky jsou od chvíle, kdy byly připraveny Köhlerem a Milsteinem [15] používány v nejrůznějších klinických aplikacích, mezi jinými také při léčbě nádorů. Monoklonální protilátky mají celou řadu vlastností, které je k tomu předurčují. K nejdůležitějším patří jejich uniformita, vysoká specifita a nízká křížová reaktivita. Ačkoliv i samotné monoklonální protilátky někdy vykazují velmi zřetelný protinádorový efekt [96], používají se častěji jejich konjugáty s izotopem, toxinem nebo jinou biologicky aktivní látkou. Jednou ze závažných komplikací, které omezují použití volných i konjugovaných monoklonálních protilátek, je jejich imunogenicita. Tento problém se vědci pokouší obejít pomocí rekombinantní DNA technologií, přípravou tzv. humanizovaných monoklonálních protilátek, které obsahují konstantní domény lidského původu a variabilní domény [97] nebo jen jejich antigen vázící úseky [98] mají původ v myším nebo krysím imunoglobulinu. Nejnověji používané metody přípravy humanizovaných myších či dokonce zcela lidských protilátek jsou založeny na technologii bakteriofágových knihoven [99, 100].

### **II. 3. 2. Imunotoxiny**

Jako imunotoxiny se označují konjugáty získané vazbou monoklonální protilátky a toxinu - bakteriálního či rostlinného jedu. Byly připraveny imunotoxiny obsahující ricinový toxin [101], pokeweed antivirální protein [102], saporin [103], pseudomonádový exotoxin [104], difterický toxin [105] a další. Jiné typy těchto konjugátů mají na molekulu protilátky kovalentně navázána běžně používaná cytostatika. Takto byl testován například desacetylvinblastin [106], metotrexát [107] nebo neokarcinostatin [108].

Protilátka v molekule imunotoxinu má za úkol směřovat toxické účinky cytostatika či toxinu pouze na vybrané cílové buňky, a tím i zajistit co možná největší specifitu účinku imunotoxinu. Nejhojněji se používají konjugáty A řetězce ricinového toxinu navázaného na

molekulu monoklonální protilátky [109-111]. Používají se při léčbě lymfomů a leukémií a jejich testování postoupilo už do II. fáze klinických zkoušek. Byly připraveny i imunotoxiny obsahující řetězec A ricinového toxinu směřované proti nádoru prsu či melanomu [112, 113], avšak výsledky léčby nebyly příliš příznivé. Mnohé imunotoxiny jsou úspěšně testovány na experimentálních modelech [114-118]

U toxinů navázaných na protilátky je velkým problémem „nosná kapacita“ protilátky. Znamená to, že na molekulu protilátky se dá navázat jen omezené množství léčiva [107]. U imunotoxinů je největším problémem tvorba anti-imunotoxinových protilátek [16, 112], které imunotoxin vyvazují a celá léčba se tudíž stává neúčinnou.

### **II. 3. 3. Radioimunotoxiny**

Radioimunotoxin [119, 120] je konjugát směřující protilátky s navázaným radionuklidem. Obecně lze tyto látky použít pro diagnostické a terapeutické účely. Použití monoklonálních protilátek pro specifickou dopravu radioizotopů je ovšem z terapeutického pohledu atraktivní hlavně proto, že nemusí být zasažena každá jednotlivá nádorová buňka zvláště, jako v případě imunotoxinů, ale působení většiny izotopů vede k ozáření a zabití všech buněk v oblasti akumulace radionuklidu. Ukázalo se ale, že radioimunoterapie je účinnější spíše při léčbě lymfomů a leukémií než při terapii ostatních nádorů, což je dáno radiosenzitivitou těchto nádorů a také snadným přístupem konjugátů k těmto buňkám. Nadějná je zejména léčba akutní myeloidní leukémie pomocí anti-CD33 protilátky s navázaným  $^{131}\text{I}$ , která postoupila do I. fáze klinického testování [121]. Dalším příkladem by mohly být radioimunotoxiny s anti-CD5 [122] a anti-CEA [123] protilátkou konjugovanou s  $^{90}\text{Y}$ .

### **II. 3. 4. ADEPT - antibody directed enzyme prodrug therapy**

Další velmi zajímavý druh cílené terapie je *in situ* aktivace netoxického proléčiva pomocí enzymu, který je protilátkou nasměrován k nádorovým buňkám. Je to postup kombinující specifitu monoklonálních protilátek a amplifikační efekt enzymu, který je schopen katalyzovat velmi rychlou přeměnu velkého množství substrátu. Konkrétním příkladem je podání konjugátu alkalické fosfatázy s monoklonální protilátkou a následnou

aplikací etopozid fosfátu nebo mitomycin fosfátu, které jsou defosforylovány a přeměněny na účinné léčivo, a to pouze v místech, kde je již nakumulována fosfatáza, tj. v nádoru. [124].

### **II. 3. 5. Směřované lipozómy**

Lipozómy jsou lipidické vesikuly, které je možné použít pro transport biologicky aktivních látek, většinou klasických cytostatik. Doxorubicinové lipozómy [125] se už nacházejí ve stádiu klinického testování, lipozómy obsahující mitoxantron [126] a taxany [127, 128] jsou stále testovány na experimentálních modelech. Enkapsulace snižuje nespecifickou toxicitu léčiva a zabraňuje jeho předčasné metabolické degradaci. Povrch lipozómu může být upraven přítomností reaktivních skupin, což umožňuje navázání dalších struktur. Na povrch lipozómů může být poté navázána směřující struktura, která zvýší specifickou akumulaci léčiva v cílové tkáni. Pro směrování se používají například monoklonální protilátky [129, 130] nebo transferin [131]. Další možností je přítomnost poly(ethylen glykol)u, což zlepšuje rozpustnost, farmakokinetiku, biodistribuci [132] a zpomaluje eliminaci lipozómů makrofágy a jinými fagocytujícími buňkami. Takové lipozomy se nazývají „stealth liposomes“ [133]. Zástupcem takového transporteru je například již dříve zmiňovaný přípravek Caelyx. Jedná se o liposomy s enkapsulovaným doxorubicinem a povrchově navázaným methoxypolyethylenglykolem. Používá se u pacientů s metastazujícím karcinomem prsu, u kterých je zvýšené kardiální riziko, popřípadě jako druhý stupeň u pacientů s ovariálním karcinomem poté, co selhala léčba chemoterapeutiky na bázi platiny. Jeví se též jako vhodný pro pacienty s Kaposiho sarkomem sdruženým s AIDS (nízký počet CD4, rozsáhlý mukokutánní a viscerální postižení).

### **II. 3. 6. Směřovaná polymerní proléčiva**

Mnohé negativní vlastnosti (např. imunogenicita či vysoká toxicita) konjugátů, kde je cytostatikum navázáno přímo na molekulu protilátky (II. 3. 1.), lze zmírnit nebo zcela odstranit navázáním léčiva i směřující struktury na polymerní nosič, například poly[*N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamid] [51]. Polymerní nosič zvyšuje rozpustnost farmak a umožňuje definované navázání dostatečného množství léčiva (II. 4. 2.). Konjugáty tvořené polymerním nosičem, na který je kovalentně navázána směřující struktura a léčivo, se nazývají směrovaná polymerní proléčiva [134].

Jako směřující struktury se používají nejvíce protilátky [51, 92-95], ale i albumin [135] a transferrin [90, 91], sacharidy [88, 89], lektiny [86] a hormony [8].

Protilátkou směřovaná polymerní proléčiva mohou využívat různé polymerní nosiče. Experimenty ukazují, že jedním z nejnadějnějších je HPMA, kterému bude věnována samostatná kapitola (II. 4.). Existuje a bylo testováno množství jiných konjugátů. Například dextran směřovaný protilátkou proti  $\alpha$ -fetoproteinu byl použit jako nosič daunomycinu a při experimentální léčbě krysího hepatomu je podstatně účinnější než volné léčivo [136]. Dalším příkladem je dextranový konjugát s doxorubicinem a směřovaný anti-CD5 monoklonální protilátkou, který byl testován na lidské T-buněčné linii rostoucí na nu/nu myších [137]. V jiném případě byl daunomycin nebo doxorubicin navázán na aminodextran a směřován anti-CEA protilátkou. Konjugát vykazoval vysokou schopnost inhibice růstu lidského kolorektálního karcinomu rostoucího na imunodeficientních myších [138]. Oproti tomu poměrně neúčinný je konjugát 5-fluorouridinu s nosičem poly(L-lysinem) směřovaný protilátkou proti glykoproteinu při léčbě lidského kolorektálního karcinomu [139].

## **II. 4. POLY [N-(2-HYDROXYPROPYL)METAKRYLAMID] – HPMA**

Na počátku vzniku syntetického vodorozpuštného polymeru na bázi [N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid]u [140] stála snaha získat náhražku krevní plazmy. To se nakonec skutečně na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR povedlo a byl připraven produkt komerčního názvu Duxon, o kterém se později zjistilo, že je to zároveň i velmi dobrý a účinný základ polymerního nosiče léčiv, splňující všechny podmínky postulované prof. Ringsdorfem [42]. V průběhu následujících let, naplněných nespočetnou řadou *in vitro* testů a studií na experimentálních zvířecích modelech, se zjistilo, že polymer splňuje přísná kritéria umožňující jeho použití v humánní medicíně. Ve Velké Británii konjugát HPMA s doxorubicinem úspěšně ukončil I. fázi klinického testování a stojí před ukončením II. fáze [65].

### **II. 4. 1. Struktura a vlastnosti HPMA**

Základní polymerní řetězec poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu] nese žádné funkční skupiny, které by umožňovaly kontrolované navázání a uvolnění léčiva nebo směřující struktury, a proto se používá kopolymerní HPMA řetězec nesoucí krátké postranní

oligopeptidické sekvence zakončené reaktivní p-nitrofenylesterovou skupinu. Pomocí této skupiny jsou aminolýzou navazovány jak molekuly léčiva, tak i směřující struktury obsahující -NH<sub>2</sub> skupiny. Postranní oligopeptidické sekvence jsou důležitou součástí celého léčiva, neboť výrazně rozhodují o jeho účinnosti (II. 3. 2.).

Hydrofilní syntetický HPMA je chemicky dobře definován a splňuje řadu požadavků, které jsou pro dobrý polymerní nosič nezbytné. Samotný homopolymer je zcela netoxický až do testované dávky 30 g/kg [51, 84, 141] a velmi slabě imunogenní [6, 8, 51, 142, 143]. Stejně jako ostatní nosiče zmírňuje systémovou toxicitu navázaného nízkomolekulárního cytostatika. Další důležitou vlastností HPMA nosiče je skutečnost, že protilátky nebo jiné proteiny, které jsou na něm navázány a slouží jako směřující struktury, mají až o několik řádů nižší imunogenicitu ve srovnání s volnými molekulami. Homopolymer HPMA je naprosto neimunogenní [51]. Kopolymery HPMA obsahující postranní oligopeptidické sekvence jsou slabě antigenní a intenzita protilátkové odpovědi závisí na povaze postranních řetězců. Vznikající protilátky náleží k IgM izotypu a jsou namířeny proti postranním oligopeptidickým řetězcům [51]. HPMA kopolymery patří mezi slabé antigeny nezávislé na T lymfocytech, neboť mírnou odpověď lze navodit také u nu/nu myši [51].

Rovněž byl studován vliv HPMA a jeho kopolymerů na klasickou a alternativní dráhu komplementu. Bylo prokázáno, že HPMA a jeho kopolymery v obvyklých dávkách neovlivňují ani klasickou, ani alternativní dráhu komplementu [51, 141, 144, 145].

Sledovány byly také účinky dlouhodobého podávání extrémně vysokých dávek HPMA a jeho kopolymerů na imunitní systém organismu. Dlouhodobé podávání vysokých dávek HPMA a jeho kopolymerů neinhibuje schopnost protilátkové odpovědi na T dependentní a T independentní antigeny ani fagocytární aktivitu monocytů a neutrofilů [51, 141].

#### **II. 4. 2. Vazba léčiva a směřujících struktur na HPMA**

Již bylo řečeno, že vazbu léčiva a směřující struktury na řetězec HPMA umožňují postranní oligopeptidické sekvence HPMA kopolymeru. Též bylo řečeno, že pro směrování HPMA konjugátů jsou používány nejrůznější molekuly, například protilátky [51, 92, 95] a jejich fragmenty [88, 146], lektiny [86], transferin [90, 91], galaktosamin [51, 147] a N-acetylgalaktosamin. Je-li ke směrování použita protilátka, pak aminolytický způsob navázání může způsobit, že k vazbě dojde s -NH<sub>2</sub> skupinou, která je v blízkosti vazebného místa imunoglobulinu nebo přímo v něm. Konjugát pak má samozřejmě sníženou směrovací



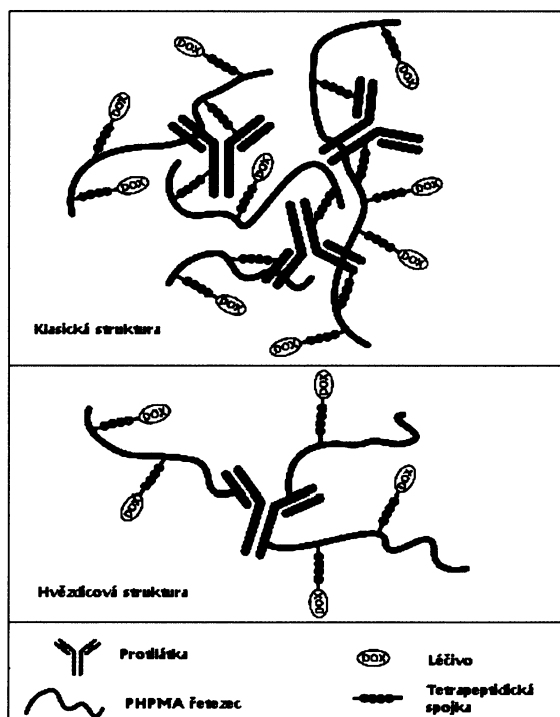
schopnost [148]. Protilátka však může být navázána i tzv. orientovanou vazbou přes molekulu karbohydrátu. Při tomto způsobu vazby se využívá glykosylace imunoglobulinů ( $C_{H2}$  doména) a spočívá v šetrné oxidaci -OH skupin sacharidů na aldehydickou skupinu, která je pak využita k vazbě [88].

V experimentech jsou používány HPMA konjugáty doxorubicinu (adriamycinu) [149, 150], daunomycinu [51] a puromycinu [151], 5-fluorouracilu [152], methotrexátu a fotoaktivovatelných léčiv [88].

O účinnosti preparátu významně rozhoduje povaha postranního oligopeptidického řetězce (aminokyselinové spojky), který spojuje HPMA řetězec s léčivem [153]. Aby mohlo léčivo po vstupu do buňky vykonat svou funkci, musí se v cílové buňce z konjugátu opět uvolnit (výjimku tvoří pouze fotoaktivovatelná léčiva). Proto jsou používány aminokyselinové spojky, u kterých je vazba mezi nimi a léčivem štěpitelná lysozomálními proteázami, zvláště kathepsiny B, H a L [6]. Typickou enzymaticky dobře štěpitelnou a rovněž nejpoužívanější spojkou je tetrapeptid GlyPheLeuGly. Je-li k vazbě léčiva na nosič použita spojka s enzymaticky neštěpitelnou sekvencí, například dipeptid GlyGly, je výsledný konjugát neúčinný [154]. Účinnost konjugátu není ovlivněna, pokud se pomocí neštěpitelného dipeptidu naváže na nosič pouze směřující struktura [51]. Jiným efektivním způsobem, který umožní intracelulární uvolnění léčiva, je použití tzv. hydrazonové vazby, která je nestabilní při nízkém pH a způsobuje odštěpení léčiva v endozómech a lysozómech cílové buňky [155].

### **II. 4. 3. Struktura směřovaných HPMA konjugátů**

První směřovaná polymerní léčiva na bázi HPMA byla tvořena polymerním řetězcem, na který bylo pomocí štěpitelné aminokyselinové spojky navázáno léčivo a směřující struktura. U těchto konjugátů, které jsou dnes označovány jako klasické, může s protilátkou nebo jinou směřující molekulou obsahující více  $-NH_2$  skupin zreagovat více molekul HPMA a s nimi opět další směřující molekuly. Mohou tak vzniknout velké prostorové sítě, které mohou přerůst v nerozpustné supramolekuly, jež nejsou terapeuticky použitelné. Proto byl vypracován jiný způsob syntézy, kdy každý řetězec HPMA, obsahující příslušné množství léčiva, nese na svém konci pouze jednu reaktivní skupinu. Výsledný, tzv. hvězdicový, konjugát je tvořen centrální molekulou protilátky či jiné směřující struktury, na které jsou navázány krátké HPMA řetězce nesoucí léčivo [93] (Obr. 3).



Obr. 3: Klasická a hvězdicová struktura HPMA konjugátů (převzato z M. Kovář et al. 2002).

#### II. 4. 4. Mechanismus účinku HPMA konjugátů

Opakovaně bylo prokázáno, že mezi volným a polymerním léčivem existují výrazné rozdíly v působení jak na celý organismus, tak na cílovou buňku. Biodistribuce konjugátu je zásadním způsobem ovlivněna jeho molekulovou hmotností, eliminace z organismu pak velikostí polymerního nosiče, je-li neštěpitelný. Vysokomolekulární konjugáty přetrvávají v oběhu mnohem déle než konjugáty s nižší molekulovou hmotností. U neštěpitelného HPMA polymerního nosiče je důležité, aby jeho hmotnost byla nižší než je renální práh ( $M_w \sim 40$ ). Při  $M_w \sim 20$  má HPMA polymer optimální velikost jak pro průchod přes anatomické bariéry a akumulaci v nádoru, tak pro účinné vylučování z těla. Na rozdíl od léčiva volného, které se do buněk dostává prostou difuzí či pinocytózou, a nesměrovaného polymerního léčiva, které se do buňky dostává pouze pinocytózou, je vstup směrovaného léčiva zajištěn receptory zprostředkovanou endocytózou, což zaručuje jeho specifický účinek. Po internalizaci konjugátu navázaného na receptor se vytvoří endozóm, který záhy splývá s lysozómem. Vlivem lysozomálních proteáz se z konjugátu uvolní léčivo. Vlastní léčivo se tedy v krevním oběhu vyskytuje ve formě neaktivního proléčiva, které se aktivuje až v lysozómech cílových buněk. HPMA konjugáty nesou většinou antracyklinová antibiotika, která svého cytotoxického efektu většinou dosahují poškozením jaderné a mitochondriální DNA, a proto

se uvolněné léčivo musí difúzí přesunout z lysozómu do jádra a mitochondrií. Jsou-li použita fotoaktivovatelná léčiva [153, 156], jejichž mechanismus účinku spočívá v tom, že po ozáření světlem určité vlnové délky produkují singletový kyslík, který je extrémně reaktivní a atakuje zejména membránové struktury, pak k odštěpení, a dokonce ani k internalizaci konjugátu nemusí dojít a polymerní léčivo je přesto účinné [51].

Polymerní směrovaná léčiva na bázi HPMA se v experimentálních modelech ukazují jako velmi účinné protinádorové preparáty. Léčba malignit však není jedinou možností v uplatnění těchto látek. Bylo též zkoumáno jejich použití při specifické imunopresi [7].

## II. 5. SLIZNIČNÍ MIKROFLÓRA

Každý organismus je vystaven neustálým interakcím se svým prostředím, které jsou jak životně důležité pro jeho přežití, tak i potenciálně život ohrožující. K největším a nejdůležitějším interakcím mezi organismem a prostředím dochází na površích, které jsou pokryty epitelialními buňkami. Je důležité uvědomit si, že například u člověka tvoří pokožka cca 2m<sup>2</sup>, zatímco mukózní povrchy zaujímají cca 300 m<sup>2</sup>. Ačkoli se savčí plod rodí bezmikrobní, už těsně po porodu dochází k nezvratné kolonizaci makroorganismu mikroorganismy. Za hlavní kolonizační kanály lze považovat pokožku a slizniční povrchy gastrointestinální soustavy, pohlavní soustavy a plic. Tyto interakce za fyziologických podmínek vedou ke kolonizaci epitelialních povrchů, harmonickému soužití hostitele s mikroorganismy a z toho plynoucích výhod pro hostitele – komensalismus. Tím je vytvořen velmi složitý, otevřený a dynamický ekosystém, tvořený přítomnými bakteriemi a krátkodobě i mikroby. Za určitých podmínek ovšem také může docházet k tomu, že některý z členů tohoto ekosystému se stane pro hostitele parazitem a může docházet k oportunním infekcím [157-159]. Mikroflóra interaguje s organismem jak lokálně, tak i na úrovni systému. Tyto interakce jsou založené na oboustranně aktivní účasti a vykazují shodnou strategii, protože dlouhá koevoluce vybavila mikroorganismy i imunitní systém podobnými mechanismy diverzifikace a selekce [160].

Počet mikroorganismů tvořících tento ekosystém se odhaduje na cca 10<sup>14</sup> jedinců, což je o řád více než buněk, které tvoří lidský organismus. Normální mikroflóra je převážně tvořena bakteriemi, ale vyskytují se v ní i houbové organismy, prvoci a viry. Odhaduje se, že se na jejím složení podílí více jak 1000 druhů. Bohužel se naše současná znalost tohoto ekosystému omezuje na informace získané známými mikrobiologickými kultivačními postupy. Například střevní mikroflóra je tvořena převážně anaerobními bakteriemi, které jsou

právě těmito technikami obtížně identifikovatelné [161]. Navíc je až 80 % bakterií přítomných v normální mikroflóře nekultivovatelných [158, 159, 161, 162]. Proto se v poslední době přistupuje k použití nových molekulárně biologických metod, jako jsou sekvenční analýza knihoven amplifikované ribozomální DNA nebo gelové elektroforézy s teplotním gradientem nebo denaturačními podmínkami. Obě tyto metody jasně dokazují, jak různorodá je střevní mikroflóra. Další velmi efektivní metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR), společně s oligonukleotidy na bázi 16S ribozomální RNA. Tyto oligonukleotidy lze také použít pro *in situ* fluorescenční hybridizaci (FISH). Tak již byly popsány sondy pokrývající zhruba 80% střevní mikroflóry [163-166].

## II. 5. 1. Slizniční imunitní systém

Slizniční lymfatická tkáň (MALT) se skládá z části z organizovaných struktur, které zahrnují jak samostatné, tak vícečetné lymfatické uzliny (Peyerovy plaky, appendix), z části z difúzně rozprostřených lymfocytů pod celým povrchem sliznic v lamina propria. Tyto komponenty společně s nespecifickou částí slizničního imunitního systému tvoří specifickou (adaptivní) odpověď.

Organizovaná část slizničního imunitního systému zastupuje indukční funkci. Terminální centra lymfatických uzlin jsou tvořeny převážně B lymfocyty, T lymfocyty zauímají místo především v interfolikulárním prostoru v blízkosti venul s vysokým endotelem. Organizovaná slizniční tkáň je kryta vrstvou epitelu (tzv. epitel asociovaný s folikuly, FAE), který v sobě obsahuje speciální typ membranózních epiteliálních buněk. Nazývají se M-buňky a jsou velmi efektivní v pohlcování některých antigenů a jejich transportu z lumen do folikulárního prostoru (Peyerovy plaky), kde dochází k aktivaci T lymfocytů a tedy indukci slizniční imunitní odpovědi [167, 168].

Difúzní lymfocyty reprezentují účinnou efektorovou část slizničního imunitního systému. Lymfocyty, které jsou přítomné v epitelu na bazolaterální straně enterocytů, se nazývají intraepiteliální lymfocyty (IEL). Jedná se o T lymfocyty především CD8<sup>+</sup> fenotypu, které se liší od lymfocytů přítomných v krevním řečišti. Tyto lymfocyty jsou charakterizovatelné jako CD8<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> s adhesivními molekulami (integrin  $\alpha\text{E}\beta\text{7}$ ) a cytoplazmatickými granulami s obsahem cytolytických proteinů (perforin). Předpokládá se, že intraepiteliální lymfocyty jsou schopny rozpoznat některé proteiny, které normálně nejsou přítomné v epitelu, a reagovat cytologicky na poškozené nebo pozměněné epiteliální buňky.

Difuzní lymfocyty v lamina propria jsou nejpočetnější a neaktivnější slizniční efektorové buňky. Jsou to především B lymfocyty produkující polymerní IgA a T lymfocyty fenotypu CD4<sup>+</sup> produkují různé cytokiny, kde velmi zajímavá a důležitá subpopulace je tvořena T regulačními lymfocyty (T<sub>reg</sub>), které jsou významné hlavně díky své supresorové funkci. Tyto regulační T buňky exprimují CD25 a produkují inhibiční cytokiny IL-10 a TGF-β [169-173].

IgA patří mezi jeden z nejdůležitějších humorálních obranných mechanismů na slizničním povrchu. Jeho polymerní forma dominuje při sekreci, monomerní forma je dominantní v krevním oběhu. Hlavním zdrojem monomerního IgA je kostní dřev, naproti tomu polymerní forma je produkována hlavně plazmatickými buňkami ve sliznici a exokrinních žlázách. Lymfatická tkáň asociovaná se zažívacím traktem (GALT) je největším lymfatickým orgánem v těle. Celkové množství IgA produkujících buněk ( $7 \times 10^{11}$ ) a denní produkce IgA ve střevě (2-5 g) poukazuje na skutečnost, že IgA je nejvíce prezentovanou třídou imunoglobulinů v organismu. Většina IgA idiotypů je použita proti slizničním mikrobiotám. Jeho polymerní struktura mu umožňuje pronikat do sekretů, odolávat enzymatickým aktivitám a fungovat jako efektorová molekula na slizničních površích [167, 169, 174-177]. Sekretované IgA, tj. jeho dimerní forma, je odolná k proteolýze a její hlavní úkol spočívá v znemožnění bakteriím adherovat na sliznici a zabránění průniku antigenů do vnitřních prostor organismu. Navíc je IgA schopné reagovat s některými nespecifickými baktericidními látkami, jako je laktoperoxidáza nebo laktoferrin, a transportovat je k bakteriálnímu povrchu [176-178].

## **II. 5. 2. Bezmikrobní zvířata**

Neocenitelným nástrojem pro studium role normální mikroflóry nebo rozdílu mezi geneticky determinovanými spontánně se vyvíjejícími imunitními mechanismy a těmi, které jsou vyvolány agens původem z prostředí, jsou právě zvířecí modely chované v bezmikrobním prostředí [179-186]. Gnotobiologické techniky, které byly vyvinuté od konce devatenáctého století, umožnily zavedení různorodých bezmikrobních zvířecích modelů, nejčastěji hlodavčích. Obvykle je první generace bezmikrobních zvířat porozena císařským řezem a převedena do izolátoru k dalšímu chovu v bezmikrobním prostředí, kde jsou krmena buď náhradní matkou nebo z láhve stravou na bázi kravského mléka. Složení stravy je v případě bezmikrobních modelů potřeba brát v úvahu. De facto, nejlépe definovaný a gnotobiologicky nejčistší bezmikrobní zvířecí model je totiž právě ten, který nepostrádá jen

slizniční mikroflóru, ale i antigeny pocházející z potravy. Fakticky jsou ale modely prosté antigenů používány jen zřídka, jelikož chemicky dobře definovaná neantigenní potrava je velmi obtížná na přípravu [182, 186].

V současné době existuje celá řada bezmikrobních druhů, hlavně hlodavčích, ale k dispozici jsou i kuřata, selata, telata nebo kozy. Změny v lymfatické tkáni asociované s zaživacím traktem byly popsány u všech bezmikrobních modelů. Nejvýraznější změny byly pozorovány v tlustém střevě. U bezmikrobních hlodavců dochází k desetinásobnému zvětšení slepého střeva v porovnání s konvenčně chovanými jedinci a k akumulaci hlenu a zadržování vody jako důsledek chybějících mukolytických bakterií. Epiteliální buňky střeva mají výrazně prodloužený buněčný cyklus (4 dny) oproti konvenčním zvířatům (2 dny), popsáno bylo i zeslabení peristaltiky. Složky střevní lymfatické tkáně jsou slabě vyvinuté a množství lymfocytů přítomných v organizované a difúzní GALT jsou sníženy [180, 182, 184]. Nepřítomnost slizniční mikroflóry postihuje především T lymfocyty nesoucí  $\alpha\beta$  typ TCR receptoru [187].

Nepřítomnost mikroflóry má vliv také na produkci protilátek. Bylo prokázáno, že u novorozených selat, krys a králíků v bezmikrobních podmínkách se buňky produkující přirozené protilátky proti bakteriálním antigenům (LPS) a tkáňovým antigenům přítomných hlavně ve slizniční lymfatické tkáni objevují výrazně později [180, 184]. Porovnáním humorálních odpovědí a dalších faktorů bylo zjištěno, že bezmikrobní zvířecí modely mají nižší diverzitu imunoglobulinů než konvenční zvířata [184, 188-192]. Lymfocyty z bezmikrobních zvířat reagují na mitogeny a polyklonální stimulaci s nízkou intenzitou.

Zapojení složek vrozené imunitní odpovědi do interakcí mikroflóry a imunitního systému bylo studováno již od počátků vzniku gnotobiologie. Bylo prokázáno, že fagocytická aktivita a chemotaxe makrofágů v bezmikrobních zvířecích modelech je snížena. Rozdíl v odpovědi na LPS již byl zmíněn výše. Většina komponent vrozené imunity začíná být teprve charakterizována a identifikována, právě srovnáváním konvenčních a bezmikrobních jedinců. Tak byla například objevena nová skupina angiogenních proteinů s baktericidními vlastnostmi [193].

Jelikož mikroflóra hraje velmi důležitou roli při metabolických procesech, byla provedena komparativní studie na konvenčních a bezmikrobních modelech s cílem zjistit, jaký je mikrobiální vliv na enzymatickou aktivitu membrán kartáčového lemu v tenkém střevě [194]. Bylo zjištěno, že bezmikrobní mláďata vykazují vyšší aktivitu enzymů ve střevě, ne ale dříve, než dojde k jejich odstavení. Takové ovlivnění se nevztahuje jen na aktivitu enzymatických glykoproteinů mikrovilární membrány ve střevě, ale zahrnuje například i

syntézu cukerných řetězců glykoproteinů asociovaných s membránou. Funkce a účinek slizniční mikroflóry se začíná studovat za pomoci současných metod funkční genomiky [162, 195].

### **III. MATERIÁL A METODY**



## III. MATERIÁL A METODY

### III. 1. ROZTOKY

#### Citrátový pufr

Zásobní roztok	0,1 M	
Roztok A:	kyselina citronová	19,21 g/1000 ml
Roztok B:	dihydrát citrátu sodného	29,41 g/1000 ml

Pracovní roztok (pH 6): 9,5 obj. dílů A + 41,5 dílů B + 41,5 dílů H<sub>2</sub>O.

#### Fyziologický roztok (Fo)

NaCl 9,0g

Doplnit do 1 l destilovanou vodou a upravit pH pomocí 4M NaOH na 7,35.

#### Fosfát –fyziologický roztok (PBS)

NaCl 9,0g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 1,2g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O 0,2g

Doplnit do 1 l destilovanou vodou a upravit pH pomocí 4M NaOH na 7,35.

#### Lyzační roztok

NH<sub>4</sub>Cl 8,3 g

KHCO<sub>3</sub> 1,0 g

Na<sub>2</sub>EDTA . 2 H<sub>2</sub>O 0,037 g

Doplnit do 900 ml destilovanou vodou, upravit pH pomocí 4 M NaOH na 7,2-7,4 a doplnit do 1000 ml. Uchovávat při 4°C.

#### Ředící pufr (RBT)

PBS 100 ml

1% želatina 100 ml

PEG 6000 6 g

Tween 20 0,2 ml (vznikne 0,1% roztok)

### Promývací pufr (PBT)

PBS	1000 ml
Tween 20	1 ml (vznikne 0,1% roztok)

### 1% želatina

Želatina	1 g
PBS	100 ml

### Pufr pro biotinylní (BP) – dialyzační pufr

NaCl	9,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	1,4 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,12 g

Doplnit do 900 ml destilovanou vodou a upravit pH pomocí 4 M NaOH na 8,1-8,2. Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml.

### Roztok na FACS

NaN <sub>3</sub>	0,1% roztok ve F $\odot$
BSA	1% roztok ve F $\odot$

Zfiltrovat přes 0,22  $\mu$ m filtr (Millipore). Uchovávat při 4 °C.

### RPMI 1640 s 10% FCS: médium pro buněčné kultury

Základní kultivační médium vyvinuté G. E. Moorem z Roswell Park Memorial Institute (odtud zkratka).

450 ml RPMI 1640:

základní aminokyseliny: Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Tyr;

solí: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, KCl;

pufrovací roztoky: NaHCO<sub>3</sub> -7,5% roztok

tkáňová H<sub>2</sub>O

5 ml	glutamin (200 mM)
5 ml	antibiotika (10 000 U penicilin + 10 mg streptomycin/ml)
5 ml	Na-pyruvát (100mM)
5 ml	HEPES (1,5 M, pH 7,2)

50 ml fetální telecí sérum (FCS) s inaktivovaným komplementem (komplement byl inaktivován zahřátím séra ve vodní lázni na teplotu 56 °C po dobu 1 h)

#### Směs pro 8% dělicí polyakrylamidový gel

4,6 ml destilovaná H<sub>2</sub>O  
2,7 ml 30% akrylamidový mix (BIO-RAD)  
2,5 ml 1,5M TRIS (pH 8,8)  
0,1 ml 10% SDS (dodecylsulfát sodný)  
0,1 ml 10% APS (persíran amonný)  
0,006 ml TEMED (N, N, N', N' tetramethylethylendiamin)

#### Směs pro zaostřovací polyakrylamidový gel

2,7 ml destilovaná H<sub>2</sub>O  
0,67 ml 30% akrylamidový mix (BIO-RAD)  
0,5 ml 1,0M TRIS (pH 6,8)  
0,04 ml 10% SDS  
0,04 ml 10% APS  
0,004 ml TEMED

#### TRIS-glycinový pufr

0,25M TRIS  
0,2M glycin  
0,1% SDS

#### Barvicí roztok

50 ml metanol  
40 ml destilovaná H<sub>2</sub>O  
10 ml kyselina octová  
200 mg Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva)

#### Odbarvovací roztok

50 ml destilovaná H<sub>2</sub>O  
40 ml etanol  
10 ml kyselina octová

## III. 2. BUŇKY

### III. 2. 1. Používané buněčné linie

**BCL1** buněčná linie je spontánní B-buněčná leukémie odvozená z myšího inbredního kmene Balb/c [196]. Jedná se o maligně transformovaný B-lymfocyt, exprimuje membránovou formu IgM a IgD (BCR), ale sekretuje pouze mizivá množství tohoto imunoglobulinu. V syngenním příjemci nevytváří solidní nádory, ale masivně osídluje peritoneum, později i periferní lymfatické orgány. Dochází k mnohonásobnému zvětšení sleziny – splenomegálii. Tato linie se nedařila propagovat *in vitro*, a proto byla pasážována *in vivo* (III. 2. 3.).

**B1** buněčná linie je myší hybridom sekretující protilátku (IgG1) rozeznávající epitop IgM imunoglobulinů na BCL1 buňkách [197]. Dobře se propaguje v *in vitro* systému. Adheruje k podkladu.

**C2** buněčná linie je potkaní hybridom [198, 199] sekretující protilátku (IgG2a) rozeznávající myší transferrinový receptor (CD71). Tato protilátka blokuje vazbu transferrinu na CD71. Dobře se propaguje v *in vitro* systému. Tento hybridom jsme dostali jako dar z laboratoře RNDr. J. Kováře, CSc., ÚMG AV ČR.

### III. 2. 2. Propagace buněk *in vitro*, zamrazení a rozmrazení buněk

Buňky byly propagovány v tkáňovém médiu (III. 1.), a to buď na petriho miskách (Nunc), anebo v lahvích pro buněčné kultury (Nunc). Kultivace probíhala v kultivačním boxu (Sanyo) při 37°C, 100% vlhkosti a v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly ředěny při dosažení vysoké, ale pokud možno ne maximální, populační density.

Zamrazování buněk bylo prováděno v kultivačním médiu s 20% fetálního telecího séra a 10% DMSO. Buňky ( $2 \cdot 10^6$ - $10^7$ ) byly v zamrazovacích ampulích (Nunc) po 1 ml nejprve cca 20 min. v -20°C, poté přes noc v -70°C a nakonec uloženy při -150°C v mrazícím boxu (Sanyo).

Buňky byly rozmrazovány co nejrychleji ve vodní lázni (37°C), poté převedeny do 50 ml kyvety (Nunc) a 2x promyty větším objemem (20-30 ml) tkáňového media (III. 1.).

Životnost buněk byla určena pod mikroskopem pomocí trypanové modři, vždy se pohybovala mezi 65-95 %.

S buňkami bylo manipulováno v laminárním boxu (Hereaus) za sterilních podmínek. Při jakémkoliv podezření na kontaminaci tkáňové kultury jsme tuto dále nepoužívali. Počítání buněk bylo prováděno pod mikroskopem v trypanové modři pomocí Bürkerovy komůrky.

### **III. 2. 3. Pasážování BCL1 leukémie *in vivo***

Protože propagace buněčné linie BCL1 se nedařila *in vitro*, musela být tato linie udržována pomocí pasážování *in vivo*. Myš Balb/c v pokročilém stádiu vývoje BCL1 leukémie (silně zvětšené peritoneum) byla usmrcena cervikální dislokací a byla vyjmuta její slezina. Ta byla zhomogenizována v tkáňovém médiu (III. 1.). Buňky byly stočeny (800 G, 5 min.), 3x promyty tkáňovým médiem a spočítány (živé buňky). Poté bylo zdravým samicím Balb/c myši inokulováno intraperitoneálně  $10^5$  buněk v 0,5 ml PBS.

### **III. 2. 4. Inokulace nádorových buněk**

Buňky BCL1 byly získány perfuzí sleziny Balb/c myši v pokročilém stádiu onemocnění stejným způsobem jako při pasážování (III. 3. 1.). Buňky byly naředěny na koncentraci  $10^6$  buněk/ml a pomocí injekční stříkačky intraperitoneálně aplikovány Balb/c myším (500  $\mu$ l suspenze). Den, kdy byly myším injikovány buňky, je označován jako 0. den experimentu.

## **III. 3. EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA**

Experimenty byly prováděny na myších inbredního kmene Balb/c /H-2d/ (FGÚ AV ČR) na samicích starých 8–14 týdnů. V průběhu pokusu na zjištění významu mikroflóry na rozvoj nádorového onemocnění (IV. 8.) byly myši z bezmikrobní skupiny chovány v izolátorech, krmeny sterilní stravou s pitím sterilní vody bez omezení. Byla u nich prováděna pravidelná kontrola bezmikrobního stavu (III. 3. 1.) Kontrolní skupina myši byla chována v konvenčních podmínkách. Celý pokus proběhl na detašovaném pracovišti MBÚ

AV ČR Nový Hrádek. V průběhu ostatních pokusů byly myši chovány v konvenčních podmínkách a krmeny standardní dietou bez omezení pití.

### **III. 3. 1. Mikrobiologická kontrola bezmikrobních myší**

Mikrobiologická kontrola bezmikrobních myší je prováděna pravidelně jednou za tři týdny. Čerstvé vzorky trusu jsou v každém izolátoru přímo odebírány do tří typů bujónů. Jedná se o masopeptonový bujón pro aerobní kultivaci bakterií při 37°C, Sabouraudův bujón pro kultivaci aerobních bakterií, kvasinek a plísní, které mají růstové teplotní optimum při 25°C a Schaedlerův anaerobní bujón pro kultivaci anaerobních bakterií (37°C). Bujóny s odebraným trusem jsou po vyjmutí z izolátorů inkubovány po dobu sedmi dnů v termostatu při teplotách 37°C (MPB a Schaedlerův anaerobní bujón) nebo 25°C (Sabouraudův bujón). Po této době jsou přeočkovány na pevná média, která mají stejné složení jako výše jmenované bujóny. Kultivace vzorků na plotnách trvá pět dní. Plotny pro anaerobní kultivace jsou kultivovány v anaerobní atmosféře (Anaerogen 2,5lt, DIOXO). Výsledky kultivací jsou odečítány za pět dní.

Souběžně s mikrobiologickou kontrolou probíhá mikroskopická kontrola nátěru vzorku trusu z jednotlivých izolátorů. Nátěry trusu na podložním sklíčku jsou po zaschnutí zafixovány nad plamenem a poté obarveny May Grünwald-Giemzovým barvivem pro odečet G+ a G- bakterií.

Izolátory s negativním kultivačním i mikroskopickým vyšetřením jsou považovány za bezmikrobní.

### **III. 4. PROTILÁTKY**

Produkovali jsme vlastní anti-idiotypovou protilátku B1 (IgG1) a C2 monoklonální protilátku (IgG2a) pomocí hybridomové technologie. B1 protilátka rozpoznává IgM idiotyp na povrchu BCL1 leukemických buněk. C2 protilátka se váže na transferrinový receptor (CD71).

### III. 4. 1. Produkce protilátek

Protilátky byly produkovány ve formě ascitu. B1 hybridom roste v syngenním příjemci – Balb/c myších. Hybridom C2 byl pěstován na samcích potkana (Wistar Furth x Lou). Buňky byly nejdříve napěstovány ve velkém množství v *in vitro* systému. Poté byly stočeny (800 G, 5 min.), rozsuspendovány v čerstvém médiu, spočítány a naředěny na koncentraci  $10^7$  buněk/ml. Poté bylo myším aplikováno intraperitoneálně 0,5 ml této suspenze buněk. Myši byly dva týdny předem ošetřeny intraperitoneální aplikací 0,5 ml sterilního parafinového oleje (Sigma).

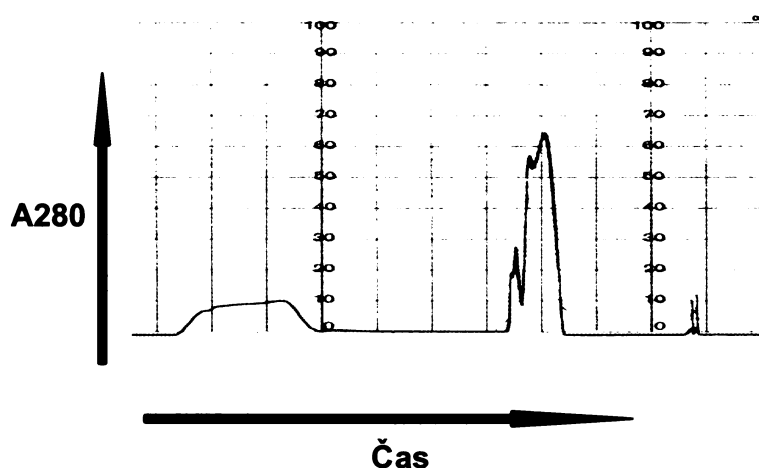
Po signifikantním zvětšení peritonea (2–3 týdny) byly myši usmrceny cervikální dislokací a byla odebrána ascitická tekutina. Ta byla stočena (2700 G, 5 min.) a supernatant byl pipetou odtážen do čisté kyvety. Po přidání azidu sodného (10%, 100x ředěno) byl takto ošetřený ascites skladován při 4°C až do dalšího použití.

### III. 4. 2. Purifikace protilátek

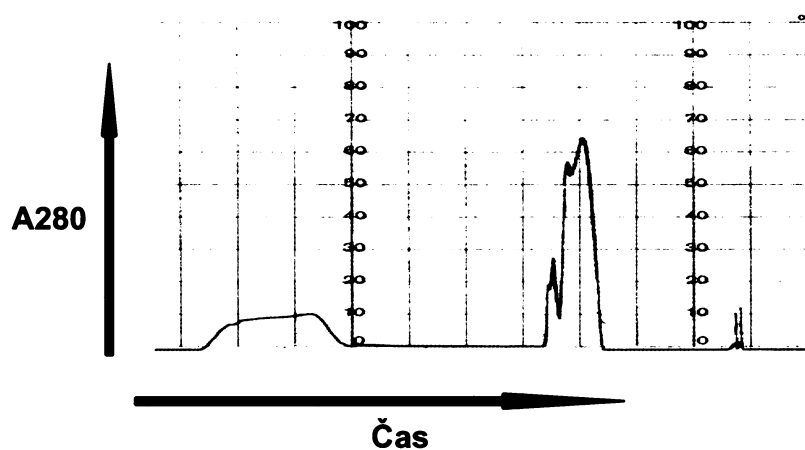
Ascites byl nejprve odsát přes injekční jehlu nabodnutím kyvety zespu (odstranění kapének tuku), a poté stočen (8000 G, 20 min.). Supernatant byl přelit do skleněné kádinky a za stálého míchání (magnetická tyčinka) byl přikapáván SAS (III. 1.), a to polovina objemu ascitu. Za stálého míchání probíhalo srážení 2 hodiny při laboratorní teplotě. Celý objem kádinky byl pak stočen (8000 G, 20 min.), pelet rozsuspendován v 3x ředěném SAS a znovu stočen (8000 G, 20 min.). Pelet byl rozpuštěn v co možná nejmenším objemu PBS, převeden do dialyzačního sřeva (16 mm, Serva) a 2x dialyzován 24 hod. při 4°C oproti čistému PBS. Obsah dialyzačního sřeva pak byl stočen (8000 G, 20 min.) a supernatant použit jako vstupní materiál pro následnou chromatografickou purifikaci.

Anti CD71 protilátka (IgG2a, hybridom C2) i B1 protilátka (IgG1, hybridom B1) byla purifikována pomocí afinitní chromatografie na proteinu A (Affi-Prep Protein A Matrix, BIO-RAD). Kolona měla parametry 125x10 mm a byla obsluhována pomocí zařízení pro nízkotlakou kapalinovou chromatografii (Bio-Logic LP, BIO-RAD). Vzorek s protilátkou po srážení síranem amonným a dialýze byl naředěn (alespoň 5x) ve vazebném pufu (BIO-RAD) a vazebným pufem byla též kalibrována kolona (1,5 ml/min., 10 min.). Poté byl na kolonu aplikován vzorek s protilátkou (0,75 ml/min.). Po aplikaci vzorku byla kolona promyta vazebným pufem (1,0 ml/min., 30min.). Navázaný imunoglobulin byl eluován (1,25 ml/min.,

24 min.) pomocí elučního pufru (BIO-RAD). Kolona byla poté vždy regenerována pomocí 50% metanolu v destilované vodě a uskladněna v PBS s 0,1% NaN<sub>3</sub>. Na obrázku III. 4. 2. 1 a III. 4. 2. 2 je ukázkový chromatograf z purifikace anti-CD71, respektive B1 IgG.



Obr. III. 4. 2. 1. Průběh purifikace anti CD71 protilátky (IgG) pomocí afinitní chromatografie na proteinu A. Absorbance při 280 nm byla měřena průtokovým UV spektrofotometrem, který je součástí nízkotlakého chromatografického systému Bio-Logic LP, na kterém byla separace provedena.



Obr. III. 4. 2. 2. Průběh purifikace B1 protilátky (IgG) pomocí afinitní chromatografie na proteinu A. Absorbance při 280 nm byla měřena průtokovým UV spektrofotometrem, který je součástí nízkotlakého chromatografického systému Bio-Logic LP, na kterém byla separace provedena.

Eluované IgG bylo sbíráno po 2 ml do polypropylenových zkumavek s 50  $\mu$ l 2M TRISu. Z ostatních proteklých frakcí bylo uchováno jen malé množství pro kontrolní elektroforézu.



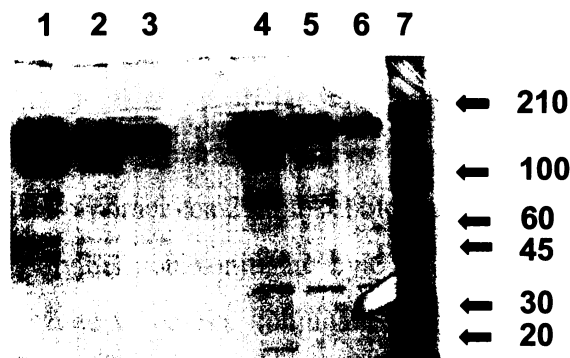
Eluované IgG bylo sbíráno po 2 ml do polypropylenových zkumavek s 50  $\mu$ l 2M TRISu. Z ostatních proteklých frakcí bylo uchováno jen malé množství pro kontrolní elektroforézu. Frakce obsahující IgG byly slity, převedeny do dialyzačního sřeva (Serva) a dialyzovány 2x po 24 hodinách oproti PBS s 0,1%  $\text{NaN}_3$ . Po dialýze bylo IgG zahuštěno (membrána YM50, Amicon) na koncentraci 20-35 mg/ml. Purifikované a zahuštěné IgG bylo jednak použito pro vazbu na HPMa řetězec s doxorubicinem a jednak menší část byla uchována ve volné formě jako kontrola pro *in vitro* a v případě B1 IgG na *in vivo* experimenty.

### III. 4. 3. Kontrola čistoty protilátek

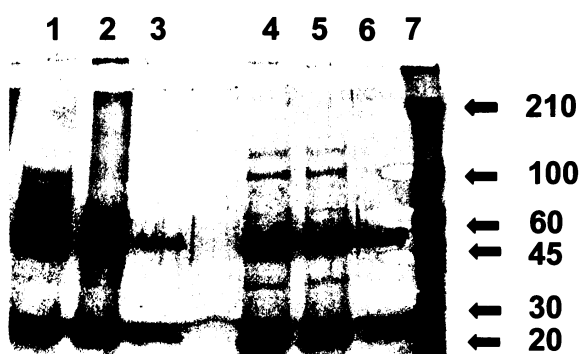
Čistota purifikovaných protilátek byla kontrolována pomocí elektroforézy na 8% polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) jak za neredukujících, tak i za redukčních podmínek. K elektroforéze bylo používáno zařízení Mini-Protean II (BIO-RAD). Celý gel měl rozměry 83 x 73 mm, používaný hřeben vytvořil 10 jamek po 6 mm.

Mezi dvě skla (spacer 1 mm) byla nalita směs pro 8% polyakrylamidový dělicí gel (III. 1.) asi 2 cm pod okraj kratšího skla a převrstvena 1 ml izopropanolu. Po 15 minutách byl izopropanol vylit, gel propláchnut destilovanou vodou a pečlivě osušen (filtrační papír). Na dělicí gel byla nanesena směs pro zaostřovací gel (III. 1.) a zasunut do ní hřeben. Po 10 minutách byly skla s gelem umístěny do elektroforetické vany a přelity TRIS-glicinovým pufrem (III. 1.). Vzorky byly naředěny 1:2 v Laemli Sample Buffer (BIO-RAD) a povařeny 5 minut. Při elektroforéze za redukčních podmínek byl ještě před povařením k vzorkům přidán 2-merkeptoetanol do výsledné koncentrace 5 %. Vzorky byly nanášeny v množství 20  $\mu$ l/jamka (2,5-20  $\mu$ g proteinu/jamka). Jako hmotnostní standard byla použita předznačená směs proteinů s velkým rozpětím molekulových hmotností (Color Burst, Sigma) .

Migrace probíhala za konstatního proudu 25-30 mA a byla ukončena, když čelo bromfenolové modři bylo asi 2–4 mm před koncem gelu. Po ukončení migrace byl gel umístěn na 1–2 hodiny do barvicího roztoku (III. 1.). Poté byl gel 2–3 promýván (3–6 hodin) vždy v čerstvém odbarvovacím roztoku, nakonec ponechán přes noc v destilované vodě a usušen při laboratorní teplotě v celofánu. Na obrázku III. 4. 3. 1. a III. 4. 3. 2. je kontrolní elektroforéza z purifikace anti-CD71 (C2) a anti-idiotypové (B1) protilátky.



Obr. III. 4. 3. 1. Kontrolní elektroforéza z purifikace C2 a B1 protilátky. Dělení probíhalo na 8% polyakrylamidovém gelu za konstantního proudu 25-30 mA. Gel byl barven pomocí Commassie Blue. Z leva do prava: purifikovaná C2 – 20/10/2,5 µg/jamka, purifikovaná B1 - 20/10/2,5 µg/jamka, hmotnostní standard (kDa)



Obr. III. 4. 3. 2. Kontrolní elektroforéza z purifikace C2 a B1 protilátky v redukujících podmínkách. Dělení probíhalo na 8% polyakrylamidovém gelu za konstantního proudu 25-30 mA. Gel byl barven pomocí Commassie Blue. Z leva do prava: purifikovaná C2 – 20/10/2,5 µg/jamka, purifikovaná B1 - 20/10/2,5 µg/jamka, hmotnostní standard (kDa)

### III. 4. 4. Biotinylace volných protilátek a protilátek obsažených v polymerních konjugátech

Anti-CD71 i B1 protilátka byly biotinylovány pomocí sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoátu (Pierce). Protilátka byla naředěna na 2 mg/ml a dialyzována 2x 24 hodin oproti dialyzačnímu pufru (pH 8,1-8,2, III. 1.). Biotinylační reagens bylo rozpuštěno v destilované vodě (1 mg/ml) a přidáno v množství 75 µl na každý 1 ml zdialyzované protilátky. Reakce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě. Takto biotinylovaná protilátka byla dále používána. Stanovení molárního poměru biotin/IgG zde nebylo provedeno, jelikož uvedený postup vede k inkorporaci cca 2 molekul biotinu na 1 molekulu imunoglobulinu.

protilátky. Reakce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě. Takto biotinylovaná protilátka byla dále používána. Stanovení molárního poměru biotin/IgG zde nebylo provedeno, jelikož uvedený postup vede k inkorporaci cca 2 molekul biotinu na 1 molekulu imunoglobulinu.

Pro biotinylacii polymerních konjugátů bylo přidáno 50  $\mu$ l biotinylačního reagensu na 1 mg protilátky obsažené v roztoku konjugátu (Tab. III. 5. 3. 1.). Reakce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě, pak byl roztok dialyzován 1x 24 h proti PBS (pH=7,2-7,4). Stanovení molárního poměru biotin/IgG zde nebylo provedeno, jelikož přítomný doxorubicin brání spektrofotometrické detekci.

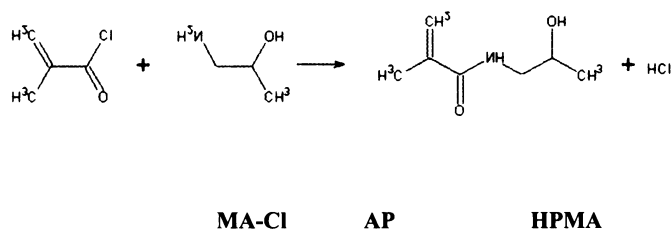
### III. 5. PŘÍPRAVA HPMA KONJUGÁTŮ

Všechny konjugáty používané v průběhu experimentů popisovaných v diplomové práci byly připraveny Oddělením biolékařských polymerů v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR.

Konjugáty byly syntetizovány z prekurzorů, které vznikají polymerací monomerů.

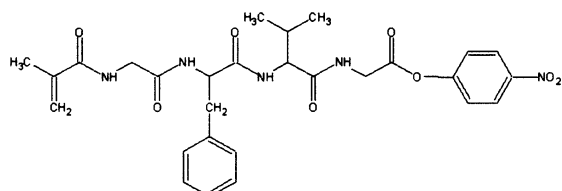
#### III. 5. 1. Příprava monomerních derivátů MA

HPMA [N-2-(hydroxypropyl)methakrylamid] byl připraven reakcí methakryloylchloridu (MA-Cl) s 1-aminopropan-2-olem (AP) v prostředí s  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :



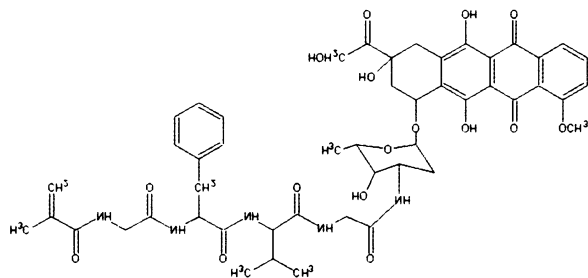
Methakryloyl-glycyl-D,L-fenylalanyl-L-leucylglycin-4-nitrofenylester (MA-GlyPheLeuGly-O-Np) byl připraven v několika krocích. Nejdříve byl reakcí MA-Cl s glycyl-DL-fenylalaninem připraven methakryloyl-glycyl-DL-fenylalanin (MA-GlyPhe-OH). Reakcí L-leucylglycinu s methanolem v prostředí s thionylchloridem ( $\text{SOCl}_2$ ) byl souběžně připraven L-leucylglycinmethylester (LeuGly-O-Me). Reakcí MA-GlyPhe-OH s LeuGly-O-Me v

přítomnosti *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCCI) byl získán methakryloylglycyl-DL-fenylalanyl-L-leucylglycinmethylester, který byl pomocí NaOH převeden na sodnou sůl a poté pomocí HCl na karboxylovou kyselinu. Ta byla nakonec esterifikována 4-nitrofenolem pomocí DCCI na výsledný produkt MA-GlyPheLeuGly-O-Np:



**MA-GlyPheLeuGly-O-Np**

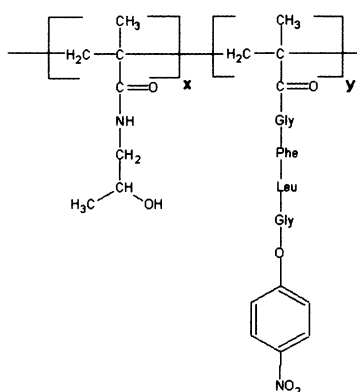
Methakryloylglycyl-DL-fenylalanyl-L-leucylglycin-doxorubicin (MA-GlyPheLeuGly-Dox) byl připraven reakcí MA-GlyPheLeuGly-O-Np s hydrochloridem doxorubicinu v *N,N'*-dimethylformamidu (DMF) za přítomnosti triethylaminu (TEA):



**MA-GlyPheLeuGly-Dox**

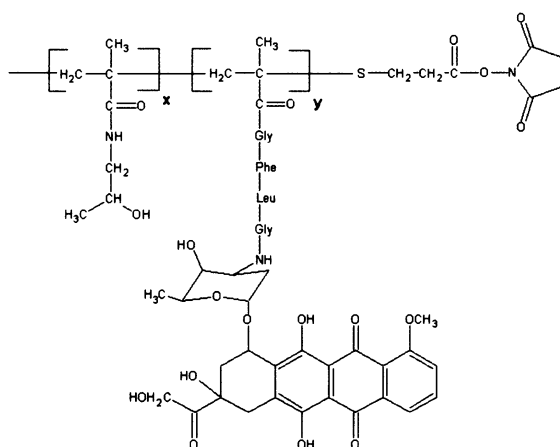
### III. 5. 2. Příprava polymerních prekurzorů

Polymerní prekurzor I byl připraven radikálovou kopolymerizací HPMA s MA-GlyPheLeuGly-O-Np (III. 5. 1.). Polymerizace byla prováděna v acetonu za iniciace 2,2'-azobisisobutyronitrilem (AIBN) při 60°C.



**Polymerní prekurzor I**

Polymerní prekurzor II byl připraven radikálovou kopolymerizací HPMA s MA-GlyPheLeuGly-Dox (III. 5. 1.). Polymerizace byla prováděna v acetonu za iniciace azoizobutyronitrilem (AIBN) při 50°C v přítomnosti 3-merkaptopropionové kyseliny, která sloužila jako agens pro přenos řetězce. Koncová karboxylová skupina byla aktivována reakcí polymeru s N-hydroxysukcinimidem (H-O-Su) a DCCl v DMF :



**Polymerní prekurzor II**

### III. 5. 3. Příprava HPMA konjugátů

Při přípravě hvězdicových konjugátů byl polymerní prekurzor II rozpuštěn v destilované vodě a smíchán s roztokem směřující protilátky v PBS (pH 7,3-7,8). Vazba probíhala při 5°C přes noc.

Po ukončení syntézy všech vzorků byly zbývající nitrofenylesterové skupiny odstraněny reakcí s AP.

Číslo vzorku	Struktura	Mw	Obsah léčiva (hmot. %)	Obsah protilátky (hmot. %)
0	P GlyPheLeuGly-Dox	25.000	5,1	0
1	P* GlyPheLeuGly-Dox GlyPheLeuGly-C2 mAb	1.000.000	3,8	31,6
2	P* GlyPheLeuGly-Dox GlyPheLeuGly-B1 mAb	755.000	3	44

Tab. III. 5. 3. 1.: Charakteristika polymerních konjugátů.

**P** - HPMA (klasická struktura)

**P\*** - HPMA (hvězdicová struktura)

**Dox**- doxorubicin

**B1 mAb** – IgG1 monoklonální protilátka proti idiotypu IgM myší BCL1 leukémie.

**C2 mAb** – IgG2a monoklonální protilátka proti CD71 receptoru

Množství doxorubicinu bylo určeno spektrofotometricky ( $\epsilon = 11500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ), množství protilátky bylo stanoveno za použití aminokyselinové analýzy (LDC Analytical, USA).

### III. 6. PRŮTOKOVÁ CYTOFLUOROMETRIE

Průtokovou cytofluorometrii lze využít pro charakterizaci různých buněčných typů v heterogenní populaci a pro zjištění relativní velikosti a granularity buněk. Metoda je používána převážně k měření fluorescenčně značených protilátek nebo ligandů, které se specificky váží s receptorem na cílových buňkách.

### **III. 6. 1. Stanovení vazebné aktivity volných směřujících struktur a směrovaných polymerních konjugátů s doxorubicinem na cílové buňky**

Byla testována vazba biotinylované B1 protilátky, biotinylované C2 protilátky a biotinylovaného směrovaného doxorubicinového HPMA konjugátu (III. 4. 3. 4.), obsahujícího jednak B1 protilátku a jednak C2 protilátku, na BCL1 buňky.

Jako zdroj BCL1 buněk byla brána slezina Balb/c myši v terminální fázi onemocnění. Slezina byla zhomogenizována v tkáňovém médiu, stočena (800 G, 5 min.) a buňky resuspendovány v lyzačním roztoku. Po 3 minutách inkubace za laboratorní teploty byly buňky stočeny (800 G, 5 min.) a rozsuspendovány v PBS. Celý proces (točení, lyzační roztok, točení) byl ještě dvakrát zopakován (tím dojde k dokonalému odstranění retikulocytů) a nakonec byly buňky rozsuspendovány v roztoku na FACS. Buňky byly 3x promyty roztokem na FACS a spočítány. Do polypropylenových zkumavek bylo napipetováno  $10^6$  buněk ve 100  $\mu$ l roztoku na FACS a bylo k nim přidáno 100  $\mu$ l roztoku streptavidinu konjugovaného s FITC (1  $\mu$ g/ml). Po 20 minutách inkubace při 0°C byly buňky opět 3x promyty a nakonec resuspendovány v 0,5 ml roztoku na FACS. Bezprostředně před analýzou na průtokovém cytofluorometru (FACSort Becton Dickinson, argonový laser - 488 nm) bylo k buňkám přidáno 10  $\mu$ l propidium jodidu (1  $\mu$ g/ml). Do analýzy (10 000 buněk) nebyly zahrnuty mrtvé buňky vykazující vysokou fluorescenci v kanálu 3 (propidium jodid). Byla sledována fluorescence buněk v kanálu 1 (FL1). Jako kontrola pro nastavení parametrů přístroje byly použity zcela čisté buňky a buňky inkubované se streptavidinem konjugovaným s FITC.

### **III. 6. 2. Stanovení BCL1 buněčné populace**

Splenocyty získané z Balb/c myši v určených dnech po inokulaci BCL1 leukémie, byly zcentrifugovány (800 G, 5 min.) a resuspendovány v lyzačním roztoku. Po 5 minutách inkubace za laboratorní teploty byly buňky opětovně zcentrifugovány. Celý proces (inkubace v lyzačním roztoku a centrifugace) byl zopakován tolikrát, až došlo k dokonalému odstranění erytrocytů. Buňky byly 3x promyty roztokem na FACS a spočítány. Do polypropylenových zkumavek bylo napipetováno  $10^6$  buněk ve 10  $\mu$ l roztoku na FACS, a bylo k nim přidáno 50  $\mu$ l biotinylované B1 protilátky (20x ředěno, 2  $\mu$ g/ml). Po 20 minutách inkubace při 0°C byly buňky opět 3x promyty a bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku streptavidinu konjugovaného s FITC

(200x ředěno, SIGMA) a 100  $\mu$ l konjugátu anti-CD71 protilátky s PE (100x ředěno, Pharmingen). Po 20 minutách inkubace při 0 °C byly buňky znovu 3x promyty a nakonec resuspendovány v 0,1 ml roztoku na FACS. Bezprostředně před analýzou na průtokovém cytofluorometru (BD FACS Vantage, argonový laser - 488 nm) bylo k buňkám přidáno 10  $\mu$ l propidium jodidu (1  $\mu$ g/ml). Do analýzy (10 000 buněk) nebyly zahrnuty mrtvé buňky vykazující vysokou fluorescenci v kanálu 3 (propidium jodid). Byla sledována fluorescence buněk v kanálu 1 (FL1). Jako kontrola pro nastavení parametrů přístroje byly použity zcela čisté buňky a čisté buňky inkubované se streptavidinem konjugovaným s FITC.

Periferní krevní lymfocyty byly podobně jako splenocyty získány z Balb/c myši v určené dny po aplikaci BCL1 buněk. Krev byla odebrána z arteria jugularis do heparinu. Další postup se již shoduje s postupem u splenocytů.

### **III. 7. IZOLACE SPLENOCYTŮ**

Slezina, sterilně odebraná do 5 ml kultivačního média z myši usmrčené cervikální dislokací, byla zhomogenizována ve skleněném homogenizátoru. Získaná buněčná suspenze byla zcentrifugována (800 G, 5 min) a 2x promyta 3 ml čerstvého média. Po resuspendaci buněk v 5 ml média byla zjištěna jejich koncentrace tak, že splenocyty byly naředěny 1:40 v Türkově roztoku, který lyzuje erytrocyty a spočítány v Bürkerově komůrce.

### **III. 8. STANOVENÍ IC<sub>50</sub> VYBRANÝCH BUNĚČNÝCH LINÍÍ**

BCL1 buňky byly kultivovány v 96jamkové mikrotitrační destičce (III. 8. 1) za přítomnosti volného doxorubicinu (v koncentraci 0.4, 0.128, 0.04, ..., 0.000128  $\mu$ g/ml), PK1 (40, 12.8, 4 ... , 0.0128  $\mu$ g/ml), směrovaného hvězdicového konjugátu B1 mAb-HPMA-Dox (40, 12.8, 4 ... , 0.0128  $\mu$ g/ml) a C2 mAb-HPMA-Dox (40, 12.8, 4 ... , 0.0128  $\mu$ g/ml). Po 72 hodinách kultivace byla změřena míra proliferace buněk (III. 7.). IC<sub>50</sub> byla stanovena jako koncentrace konjugátu, při které buňky vykazují poloviční míru proliferace oproti kontrolním buňkám.



### **III. 8. 1. Proliferační test *in vitro* pomocí <sup>3</sup>H-thymidinu**

Čerstvě narostlá kultura buněk BCL1 byla stočena (800 G, 5min.), buňky byly spočítány a rozsuspendovány v čerstvém médiu (III. 1.) na hustotu  $5 \times 10^4$  buněk/ml. Na 96jamkovou mikrotitrační destičku (Nunc) bylo přeneseno 100  $\mu$ l/jamka této suspenze buněk, 100  $\mu$ l/jamka kultivačního media a 50  $\mu$ l/jamka testovaného vzorku v kultivačním médiu. K buňkám kontroly bylo připipetováno čisté kultivační medium ve stejném objemu (50  $\mu$ l/jamka). V každé jamce bylo 250  $\mu$ l média. Celá práce byla prováděna za sterilních podmínek v laminárním boxu (Hereaus). Poté byla destička umístěna do kultivačního boxu a buňky inkubovány 72 hodin. Na takto ošetřených buňkách byla pak testována proliferační aktivita buněk, a to metodou inkorporace <sup>3</sup>H-thymidinu (III. 8. 2.).

### **III. 8. 2. Metoda inkorporace <sup>3</sup>H-thymidinu**

K buňkám na 96 jamkové mikrotitrační destičce po 72 hodinách inkubace (III. 6.) bylo připipetováno 50  $\mu$ l roztoku <sup>3</sup>H-thymidinu (20 kBq, Lacoméd). Destička byla dále 6 hodin inkubována za stejných podmínek. Poté byly buňky z celé destičky harvestovány přes membránu se skleněnými vlákny (Wallac) na harvestovacím přístroji (Tomtec). Membrána byla usušena v digestoři za laboratorní teploty. Poté byla zasunuta s destičkou tuhého scintilátoru Melti-Lex A (Wallac) do foliové kapsy a na zatavovacím přístroji (Wallac) byl tuhý scintilátor protaven skrz membránu. Membrána s protaveným scintilátorem byla zasunuta do plastické kazety, která má jamky přesně odpovídající 96 jamkové mikrotitrační destičce. Měření aktivity odpovídající jednotlivým jamkám probíhalo na přístroji Micro-Beta (Wallac). Průměr aktivit odpovídající jamkám kontroly byl pro danou destičku brán jako 100% proliferační aktivity.

## **III. 9. HISTOLOGICKÁ ANALÝZA SLEZINY, JATER A PLIC**

K vizualizaci stavu organismu jsme použili histologické řezy, jelikož v případě BCL1 leukémie dochází i k infiltraci některých orgánů maligními BCL1 pozitivními buňkami, zvláště od určité doby (po proběhnutí tzv. blastického zvratu). Jedná se o plíce, játra a především o slezinu, která je typická masivní splenomegálií.

### **III. 9. 1. Odběr a fixace orgánů**

Orgány byly odebrány ve stanovených dnech myším usmrceným cervikální dislokací a pomocí skalpelu rozděleny na dvě části, s výjimkou plic, kde byly odebrány jednotlivé plíce. Jedna část byla zmrazena tekutým dusíkem a uskladněna při  $-20^{\circ}\text{C}$ , druhá část byla vložena do 5% vodného roztoku formaldehydu (objem roztoku byl 10-50násobkem objemu orgánu) a uchovávána při laboratorní teplotě.

### **III. 9. 2. Příprava parafinových řezů**

Orgány uchovávané v 5% formaldehydu byly 4 hodiny vypírány pod tekoucí vodou a odvodněny ethanol-acetonovou řadou (ethanol 75%- 1 h, 96%- 12 h, 100%- 1 h, aceton- 1,5 h, isopropanol- 2x 1 h). Před zalitím tkáně do parafinu (Histoplast Serva, 2x 24 h) byly vzorky projasňovány 2x 15 min. v toluenu a 30 min. ve směsi toluenu a histoplastu (1:1). Z tkání byly připraveny řezy ( $d = 4-5 \mu\text{m}$ ), které byly nataženy na podložní sklíčka.

### **III. 9. 3. Příprava zmrazených řezů**

Orgány odebrané do tekutého dusíku (III. 8. 1.) byly nakrájeny na kryostatu ( $d = 5-6 \mu\text{m}$ ) a uchovávány při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Před použitím byly sušeny po 30 min. při laboratorní teplotě a 5 min. extrahovány v acetonové lázni ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

### **III. 9. 4. Histologické barvení hematoxylinem a eozinem**

Parafinové řezy (III. 9. 2.) byly nalepeny na podložní sklíčka pomocí vaječného bílku a zavodněny v xylenové (2x 30 min.) a ethanolové lázni (2x 30 min.). Vzorky byly následně 2-4 min barveny v Harrisově hematoxylinu a poté diferenciovány 10 s v 1% roztoku HCl v ethanolu. Po 10 min. promývání řezů pod tekoucí vodou byly vloženy do eozinové lázně (3 min.) a odvodněny ethanol-xylenovou řadou. Řezy byly zamontovány do kanadského balzámu.

### **III. 9. 5. Imunohistochemický průkaz idiotypu IgM BCL1 leukémie**

Parafinové řezy (III. 9. 2.) byly nafiloxovány na podložní sklíčka pomocí chromové želatiny a zavodněny v xylenové (2x 30 min) a ethanolové lázni (2x 30 min). Preparáty pak byly ponořeny do citrátového pufru a vyvařeny v tlakovém hrnci (6 min.). Následovala 5 min inkubace s 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, čímž byla zablokována endogenní peroxidáza. Buňky byly permeabilizovány 2x 5 min. roztokem PBT a nespecificky blokovány 20 min koňským sérem ze soupravy Vectastain Elite. Dále byl po dobu 15 min blokován endogenní biotin roztokem avidinu a následně biotinu (Vector). Endogenní imunoglobuliny byly blokovány činidlem ze soupravy M.O.M. kit (Vector) a řezy byly promyty rozpouštědlem z uvedené soupravy. Dále byly řezy inkubovány přes noc při 4°C s myší B1 protilátkou (1: 20, III. 3.). Poté byla na preparáty aplikována biotinylovaná sekundární protilátka (30 min.) a ABC-Elite komplex (avidin-biotin-křenová peroxidáza, 30 min.). Preparáty byly vyvolány Grahamovým činidlem (roztok diaminobenzidinu; 0,5 mg/ml s 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) za optické kontroly pod mikroskopem a dobarveny Harrisovým hematoxylinem (III. 9. 4.), odvodněny a montovány do kanadského balzámu. Mezi jednotlivými kroky byly preparáty oplachovány PBS ve vlhké komoře při laboratorní teplotě.

### **III. 10. ELISA**

#### **III. 10. 1. Příprava séra**

Sérum bylo připraveno z periferní krve odebrané myším z ocasní žíly. 5 µl krve bylo přidána do 195 µl PBS, zcentrifugována (800 G, 5 min) a bylo odsáto 175 ml supernatantu, který byl zamražen. Takto připravené sérum bylo uschováno při -20°C.

#### **III. 10. 2. Detekce idiotypu IgM BCL1 leukémie**

Polypropylenové destičky (E.I.A./R.I.A Corning Costar) byly opracovány 12 hodin při 4°C připraveným myším sérem (50 µl/jamka, III. 9.) ředěným v PBT. Destičky byly promyty 3x 200 µl PBT, stejně jako po každé následující inkubaci. Povrch jamek byl blokován 200 µl 1% roztoku želatiny v PBT 2 hodiny při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 50 µl biotinylované B1 protilátky v ředícím pufru (2 mg/ml, 100x ředěno). Po dvouhodinové

inkubaci při laboratorní teplotě bylo do jamek přidáno 50 µl avidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou (Extravidin-Px, 5000x ředěno, Sigma). Po hodinové inkubaci za laboratorních podmínek bylo do jamek přidáno 50 µl peroxidázového substrátu obsahujícího 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB, Sigma). Reakce byla ukončena v okamžiku zbarvení 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance byla změřena při vlnové délce 450 nm na ELISA readru (Rainbow Thermo, Tecan). Všechny vzorky byly analyzovány v tetrapletech. Jako kontrola bylo použité sérum z myši v terminálním stádiu BCL1 leukémie a sérum z naivních Balb/c myši.

### **III. 11. APLIKACE KONJUGÁTŮ A PROTILÁTEK**

Vzorky byly podávány intravenózně, s výjimkou B1 protilátky, která byla podávána jak intravenózně, tak intraperitoneálně. Vzorky byly aplikovány ve fyziologickém roztoku (III. 1.) pomocí injekční stříkačky do ocasní žíly.

### **III. 12. ZJIŠTĚNÍ MÍRY PROGRESE BCL1 LEUKÉMIE V BEZMIKROBNÍCH PODMÍNKÁCH**

Experimentální myši byly chovány v konvenčních a bezmikrobních podmínkách, tj. v izolátorech. Po inokulaci BCL1 leukemických buněk (III. 2. 4.) byly myši obou skupin pravidelně váženy, byla jim odebírána krev k přípravě séra (III. 10. 1.), v němž bylo detekováno množství IgM idiotypu BCL1 leukémie (III. 10. 2.) ke srovnání obou skupin. Byl zaznamenáván úhyn v obou skupinách experimentálních myši.

### **III. 13. KOMBINOVANÁ TERAPIE BCL1 LEUKÉMIE**

Myším byly inokulovány BCL1 leukemické buňky. Experiment probíhal podle následujícího schématu:

Dny	Kombinovaná terapie	Kontrola 3	Kontrola 2	Kontrola 1
20. den	Vzorek 1, 7,5 mg Dox/kg 300 µl	Vzorek 1, 7,5 mg Dox/kg 300 µl	PBS, 300 µl	PBS, 300 µl
22. den	Vzorek 1, 7,5 mg Dox/kg 300 µl	Vzorek 1, 7,5 mg Dox/kg 300 µl	PBS, 300 µl	PBS, 300 µl
24. den	0,4 mg B1 mAb, 200 µl	0,4 mg B1 mAb, 200 µl	0,4 mg B1 mAb, 200 µl	0,4 mg B1 mAb, 200 µl
25. den	Vzorek 2 7,5 mg Dox/kg 400 µl	PBS, 400 µl	Vzorek 2 7,5 mg Dox/kg 400 µl	PBS, 400 µl
27. den	Vzorek 2 7,5 mg Dox/kg 400 µl	PBS, 400 µl	Vzorek 2 7,5 mg Dox/kg 400 µl	PBS, 400 µl

Tab. III. 13. 1.: Schéma pokusu kombinované terapie

**Vzorek 1** anti - CD71-HPMA-DOX hvězdicový konjugát, obsahuje C2 protilátku (IgG2a)

**Vzorek 2** B1-HPMA-DOX hvězdicový konjugát, obsahuje B1 protilátku (IgG1)

Oba vzorky konjugátů i PBS bylo podáváno intravenózně, volná B1 protilátka intraperitoneálně. Všechny skupiny experimentálních myší byly pravidelně váženy.

### III. 14. IDIOTYP IGM BCL1 LEUKÉMIE

Idiotyp IgM se jeví nejen jako výborná směřující struktura, ale také jako významná komplikace možné léčby. Je proto potřeba znát jeho chování v experimentálním organismu.

### **III. 14. 1. Sérum Balb/c myši v terminálním stádiu BCL1 leukémie**

Sérum bylo připraveno z periferní krve odebrané myším Balb/c v terminálním stádiu BCL1 leukémie. Sraženina krevního koláče, která vznikla po 4 hodinách stání při laboratorní teplotě (nebo přes noc při 4°C), byla pomocí skleněné tyčinky jemně uvolněna od stěn zkumavky, ve které byla krev uskladněna. Suspenze krevních elementů a séra byla odtážena pipetou a zcentrifugována (2700 G, 10 min). Sérum bylo uschováno při -20°C.

### **III. 14. 2. Kinetika idiotypu IgM BCL1 leukémie**

Balb/c myším bylo intravenózně aplikováno 0,5 ml séra z myši v terminálním stádiu BCL1 leukémie (III. 14. 1.). Myším byla odebírána ve zvolených intervalech krev a připraveno sérum (III. 10. 1.), které bylo poté analyzováno ELISA metodou na přítomnost IgM idiotypu BCL1 leukémie (III. 10. 2.).

### **III. 14. 3. Odbourání idiotypu IgM BCL1 leukémie pomocí B1 protilátky**

Pokus byl proveden obdobně, jako popisuje předešlá metodika (III. 13. 2.) s tím rozdílem, že 1 hodinu po aplikaci séra (III. 13. 1.) byl každé myši intraperitoneálně podán 1 mg B1 protilátky.

## **IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

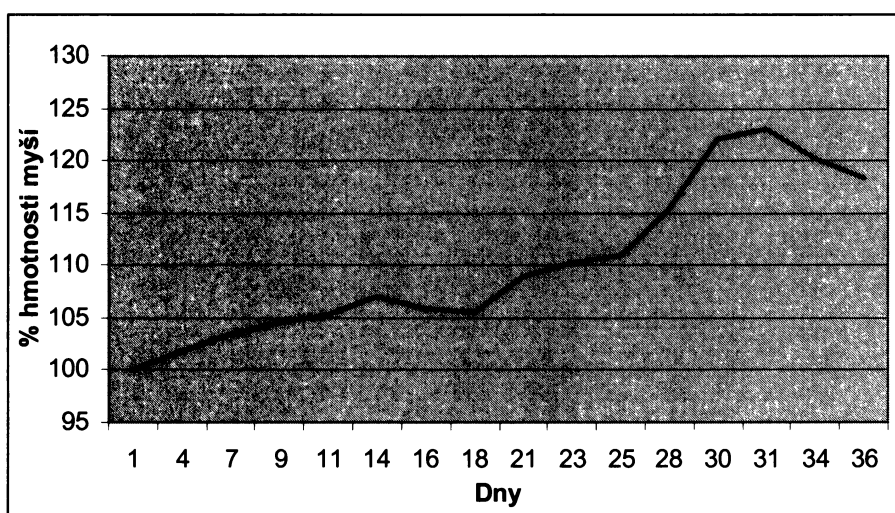
## IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### IV. 1. PROGRESE BCL1 LEUKÉMIE

Nejprve bylo třeba stanovit, jaký je celkový stav myšího organismu po podání BCL1 leukemických buněk.

Myší BCL1 leukémie je spontánní B-buněčnou leukémií odvozenou z myšího inbredního kmene Balb/c (H-2<sup>d</sup>). V syngenním příjemci nevytváří solidní nádory, ale masivně osidluje peritoneum a dochází k mnohonásobnému zvětšení sleziny – splenomegalii. Buňky této linie exprimují membránovou formu IgM, ale IgM sekretují pouze *in vitro* po podání LPS, *in vivo* jen v minimálních množstvích. Idiotyp IgM se ovšem v krvi objevuje, pravděpodobně jako důsledek rozpadajících se BCL1 buněk a jako odvržené receptorové molekuly. Právě idiotyp tohoto IgM byl vybrán jako cílová struktura pro směřování. Jedná se o striktně specifický nádorový antigen. Jako směřující struktura byla použita myší monoklonální protilátka IgG1 izotypu (B1 monoklonální protilátka), která rozeznává idiotyp membránového IgM na BCL1 buňkách. Tato nádorová buněčná linie též exprimuje transferrinový receptor (CD71).

Na Obr. IV.1.1 je vidět postupný růst hmotností myší po inokulaci BCL1 leukémie.

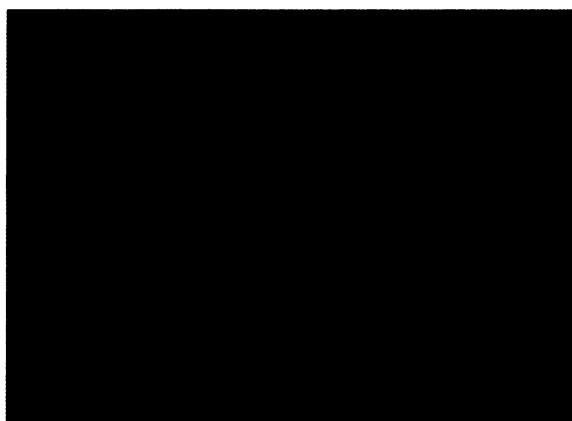


Obr. VI. 1.1.: Růst hmotnosti u samic Balb/c myší po intraperitoneální aplikaci  $5 \times 10^5$  buněk BCL1. Buňky byly aplikovány v 250  $\mu$ l tkáňového 1 média (III. 1.).

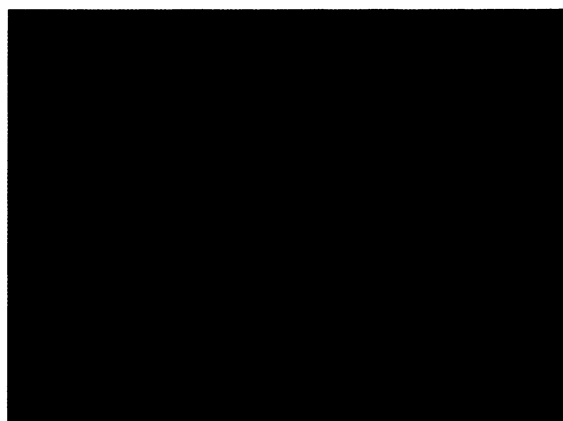


#### **IV. 1. 1. Histologická analýza sleziny, jater a plic Balb/c myší s inokulovanou BCL1 leukémií**

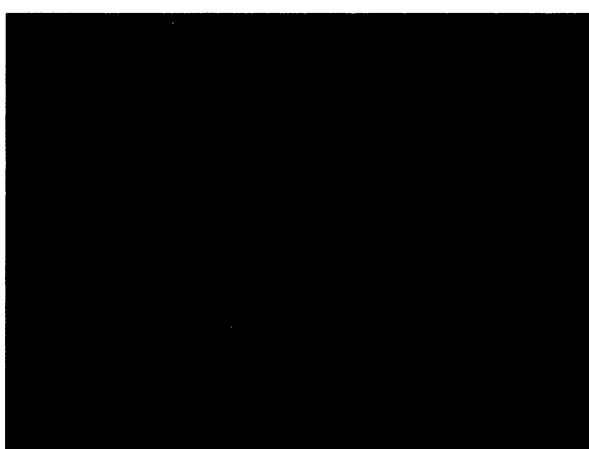
Jako jedna z metod pro charakterizaci stavu modelového organismu bylo zvoleno jednak histologické barvení hematoxilínem a eozínem, jednak imunohistochemická detekce BCL1 buněk pomocí biotinylované B1 protilátky a vizualizace konjugátem křenové peroxidázy s avidinem. Myším bylo inokulováno  $5 \times 10^5$  BCL1 buněk a za účelem odběru vzorků byly usmrceny 11. a 24. den. Vzorky byly neprodleně zmrazeny v tekutém N<sub>2</sub> a vzorky byly dále uchovány při teplotě  $-70^\circ\text{C}$ . Na Obr. IV.1.1.1. jsou zobrazené fotografie imunohistochemické analýzy BCL1 pozitivních buněk 24. den po inokulaci v játrech (A), plicích (B) a slezině (C). Hnědé zbarvení signalizuje expresi idiotypu IgM BCL1 leukémie. Všechny tyto orgány vykazují pozitivitu, ať už se jedná o ojedinělé buňky s membránovou expresí epitopu s B1 protilátkou v sinusech jaterní tkáně (A), disperzní jednotlivé B1 pozitivní mononukleáry v plicních septech a kapilárách (B) nebo masivní B1 pozitivní folikuly sleziny s ojedinělými pozitivními buňkami uvnitř folikulu a v červené pulpě (C).



A



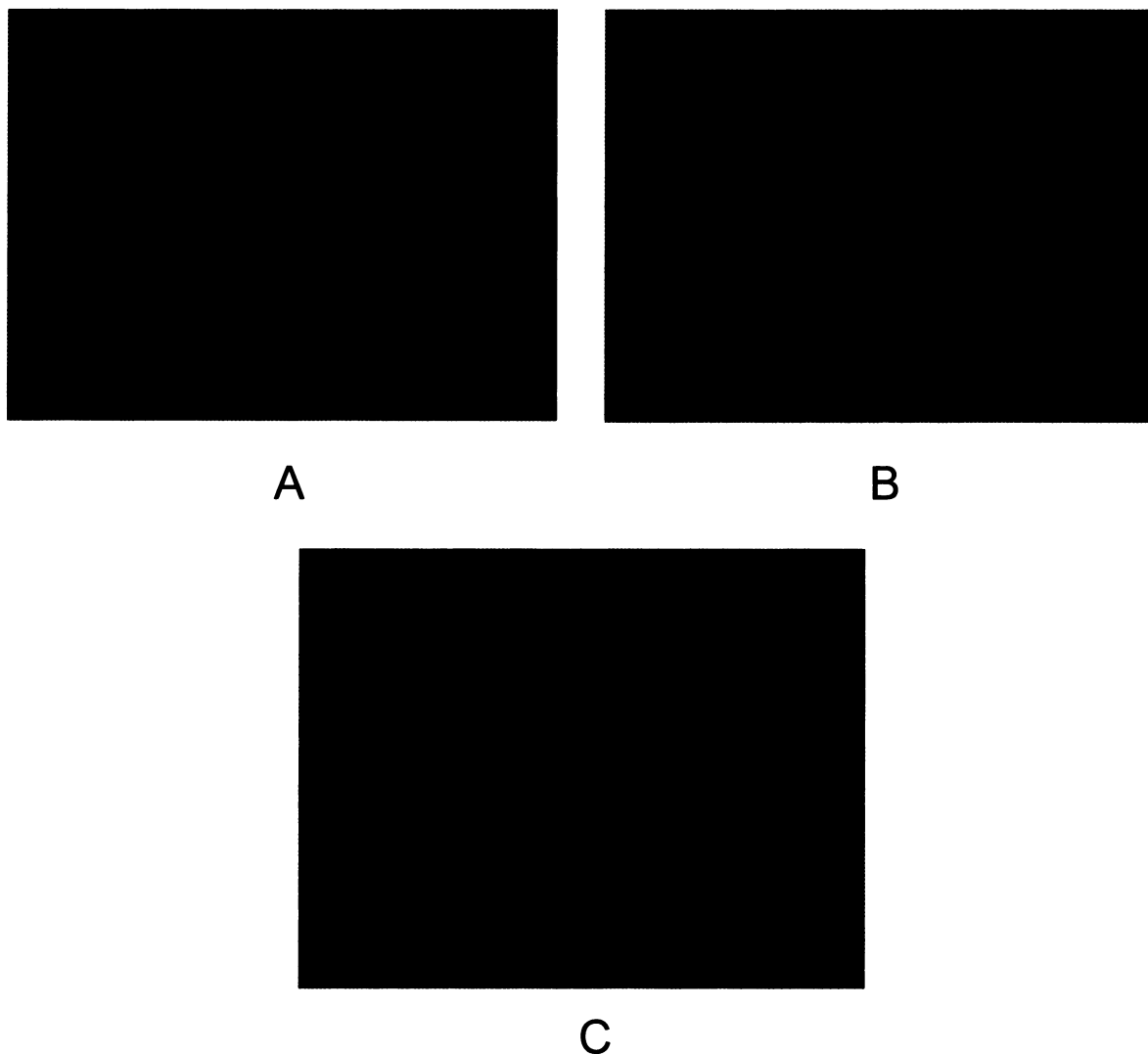
B



C

**Obr. VI. 1.1.1.: Imunohistochemie orgánu myši s BCL1 leukémií 24. den po inokulaci, A – játra, B – plíce, C – slezina. Balb/c samicím bylo injikováno  $5 \times 10^5$  BCL1 buněk i.p. a 24. den po inokulaci byly tři myši usmrceny a odebrány vzorky jater, plic a sleziny do tekutého N<sub>2</sub>. Vizualizováno pomocí biotinylované protilátky B1 a avidin-HRP konjugátu (tmavě hnědé zbarvení).**

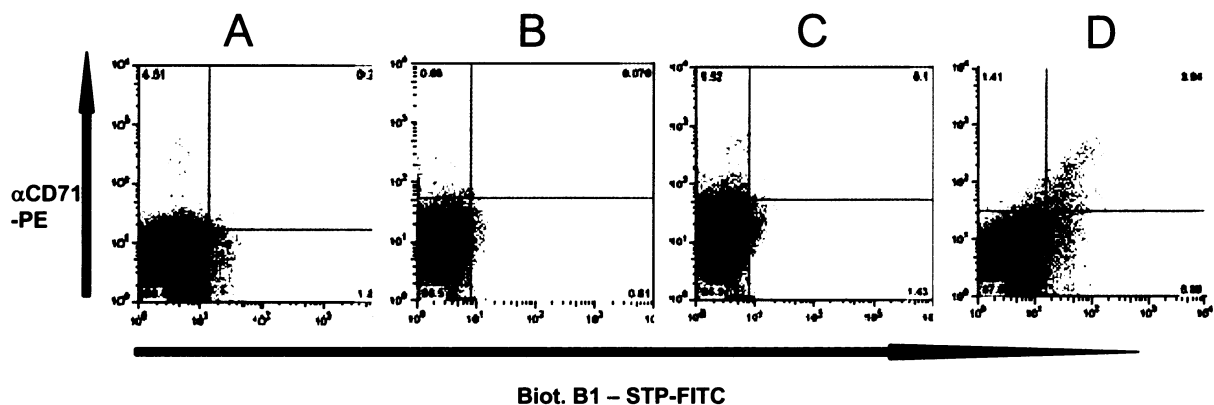
Naproti tomu, na obr. IV. 1. 1. 2. je možné porovnávat s výsledky z 11. dne po inokulaci leukemických buněk, kde naopak žádné B1 pozitivní elementy nelze najít, ať už se jedná o játerní tkáň (A), plicní tkáň (B) nebo slezinu (C). Tyto výsledky jsou plně ve shodě s vzorky z kontrolních zvířat, kterým nebyly inokulovány BCL1 leukemické buňky.



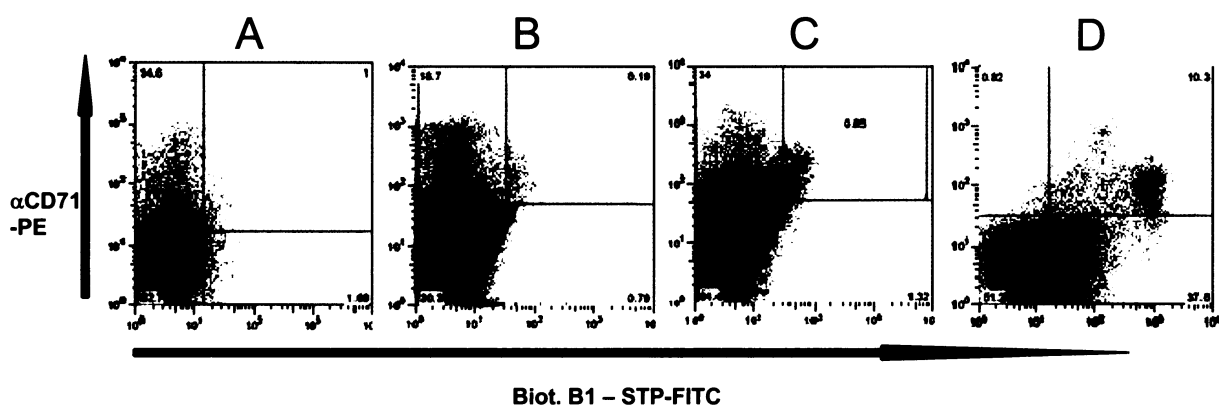
Obr. VI. 1.1.2.: Imunohistochemie orgánu myši s BCL1 leukémií 11. den po inokulaci, A – játra, B – plíce, C – slezina. Balb/c samicím bylo injikováno  $5 \times 10^5$  BCL1 buněk i.p. a 11. den po inokulaci byly tři myši usmrceny a odebrány vzorky jater, plic a sleziny do tekutého N<sub>2</sub>. Vizualizováno pomocí biotinylované protilátky B1 a avidin-HRP konjugátu (tmavě hnědé zbarvení).

#### **IV. 1. 2. Stanovení BCL1 buněčné populace pomocí průtokové cytofluorometrie**

K detekci obou cílových struktur vyskytujících se na povrchu BCL1 buněčné populace, které jsme se rozhodli využít k směřování námi zvolených doxorubicinových konjugátů, jsme zvolili průtokovou cytofluorometrii buněk z periferní krve a splenocytů izolovaných homogenizací sleziny. Vzorky byly odebrány 11., 15., 17. a 24. den po inokulaci.



Obr. VI. 1.2.1.: Expresse CD 71 na BCL1 pozitivních buňkách v periferní krvi – A - 11. den, B – 15. den, C – 17. den, D - 24. den, osa X – biotinylovaná B1 - STP-FITC, osa Y – konjugát anti-CD71-PE.



Obr. VI. 1.2.2.: Expresse CD 71 na BCL1 pozitivních buňkách ve slezině– A - 11. den, B – 15. den, C – 17. den, D - 24. den, , osa X – biotinylovaná B1 - STP-FITC, osa Y – konjugát anti-CD71-PE.

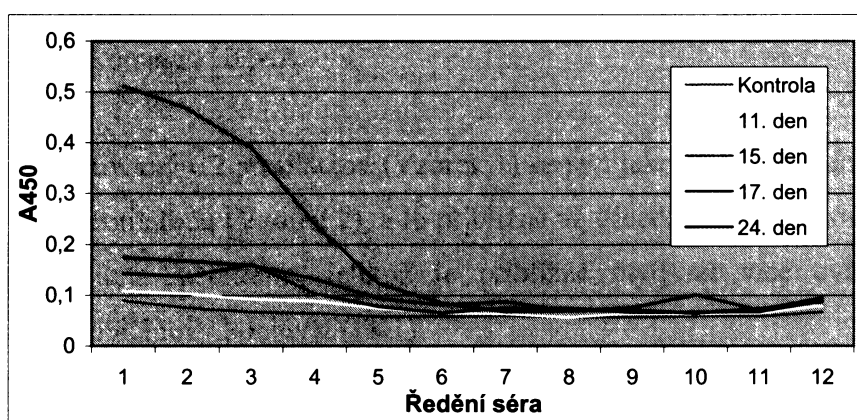
Obr. VI. 1. 2. 1. a obr. VI. 1. 2. 2. ukazují, že dochází k postupnému a pozvolnému nárůstu BCL1 pozitivních buněk, a to jak ve slezině, tak v periferní krvi. K markantnímu nárůstu BCL1 pozitivní populace dochází okolo 24. dne nebo jen těsně před ním. Jak vychází z charakteru nemoci, ve slezině bylo detekovatelné vyšší množství BCL1 buněk než v periferní krvi, a to po celou dobu experimentu.

Expresse CD71 (transferrinový receptor) povrchového markeru je v periferní krvi pozvolna vzrůstající, stále ale poměrně slabá. Do přibližně 18. dne se jedná především o buňky nenádorového charakteru, které jsou nositeli CD71. Okolo 24. dne dochází k výraznému přesunu CD71 pozitivních buněk od nenádorového k nádorovému charakteru.

Ve slezině dochází k podobnému jevu jako v periferní krvi. Hladina CD71 pozitivních buněk je ovšem na začátku poměrně vyšší než v periférii. Okolo 24. dne je zároveň patrné silné zvýšení exprese CD71 na některých BCL1 pozitivních buňkách.

#### IV. 1. 3. Detekce idiotypu IgM BCL1 leukémie

Díky skutečnosti, že se idiotyp IgM BCL1 leukémie objevuje v krvi, je striktně specifický a koreluje s rozvojem onemocnění, využili jsme tento parametr a porovnali hladiny tohoto imunoglobulinu v séru pozorovaných myší.



Obr. IV.1.3.1.: Hladiny idiotypu IgM BCL1 leukémie v Balb/c myši, myším bylo inokulováno  $5 \times 10^5$  buněk BCL1, sérum ředěno 40x, testováno ELISA metodou pomocí biotinylované B1 protilátky a konjugátu avidin-HRP.

Zpočátku se hladiny idiotypu IgM pohybují jen minimálně nad hladinou kontrolních myší bez inokulovaných BCL1 buněk. Výrazné zvýšení je možné pozorovat až okolo 24. dne.

#### IV. 2. IN VITRO PROLIFERAČNÍ TESTY

Jako jeden z parametrů vypovídajících o terapeutické účinnosti byla stanovena cytotoxická aktivita hvězdicového polymerního doxorubicinového konjugátu směřovaného jednak C2 protilátkou (Vzorek 1) a jednak B1 protilátkou (Vzorek 2) v porovnání s polymerním (nesměrovaným) doxorubicinovým konjugátem (PK1) a doxorubicinem volným. Samotná B1 protilátka nevykazuje žádnou vlastní cytotoxicitu, naproti tomu volná C2 protilátka je mírně cytotoxická s  $IC_{50}$  5,65  $\mu\text{g/ml}$ .

Všechny experimenty byly provedeny alespoň dvakrát s podobnými výsledky.

Struktura	Id.	IC <sub>50</sub> (nM Dox)
Dox. HCl	Dox	1,7
P-GFLG-Dox	PK1	1397
<p>P* <math>\left\{ \begin{array}{l} \text{GlyPheLeuGly-Dox} \\ \text{GlyPheLeuGly-C2 mAb} \end{array} \right.</math></p>	Vzorek 1	371
<p>P* <math>\left\{ \begin{array}{l} \text{GlyPheLeuGly-Dox} \\ \text{GlyPheLeuGly-B1 mAb} \end{array} \right.</math></p>	Vzorek 2	12,6

**P** Klasický konjugát HPMA

**P\*** Hvězdicový konjugát HPMA

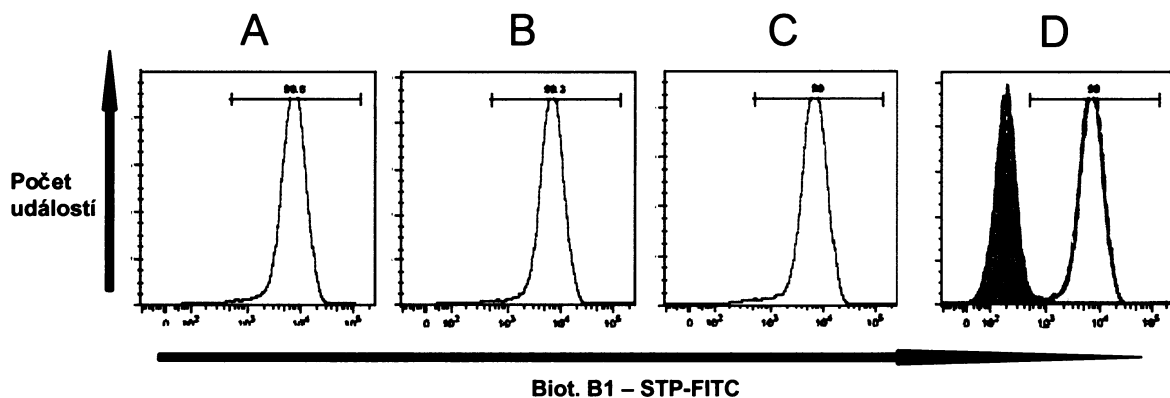
Konjugát směřovaný C2 protilátkou (Vzorek 1) se jeví jako výrazně méně cytotoxický než konjugát s B1 protilátkou (Vzorek 2), a to přibližně až třicetkrát. C2 směřovaný konjugát stále vykazuje určitou specificitu, jelikož je přibližně čtyřikrát více cytotoxický než nesměrovaný doxorubicinový konjugát (PK1).

### IV. 3. STANOVENÍ VAZEBNÉ AKTIVITY POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Jako další ověření účinnosti použitých léčiv jsme provedli stanovení vazebné aktivity volných protilátek a protilátek konjugovaných v HPMA polymerech na povrch BCL1 buněk.

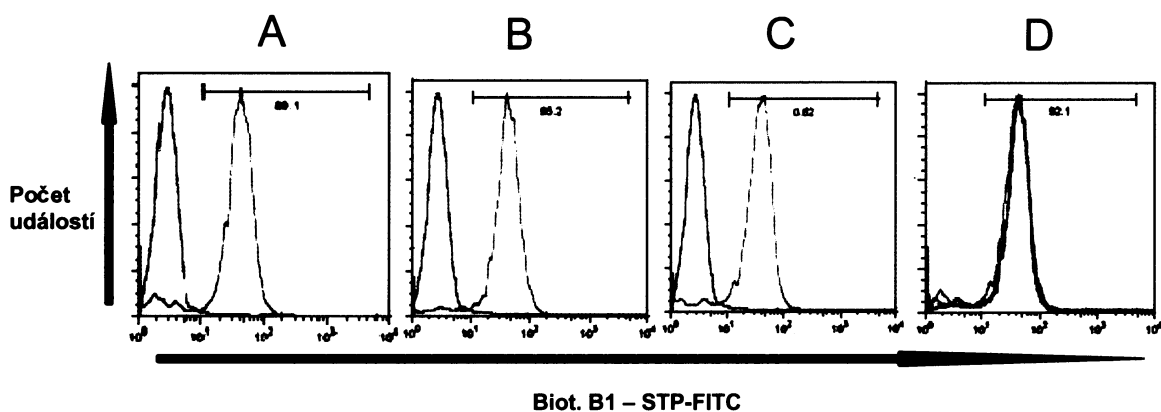
#### IV. 3. 1. Monoklonální protilátky B1 a anti-CD71 (C2)

Volná B1 monoklonální protilátka byla testována v biotinylované formě (III. 3. 4.) z hlediska schopnosti vazby na BCL1 leukemické buňky. Na obr. IV. 3. 1. 1. A-D je vidět, že biotinylovaná B1 protilátka se na cílové buňky váže dobře. Tato protilátka se na jiné idiotypy IgM neváže.



Obr. IV.3.1.1. : Vazba biotinylované protilátky B1 : A – 100 µg/ml, B – 10 µg/ml , C – 1 µg/ml, D - srovnání všech koncentrací protilátky proti negativní kontrole, jako sekundární značení byl použit STP-FITC.

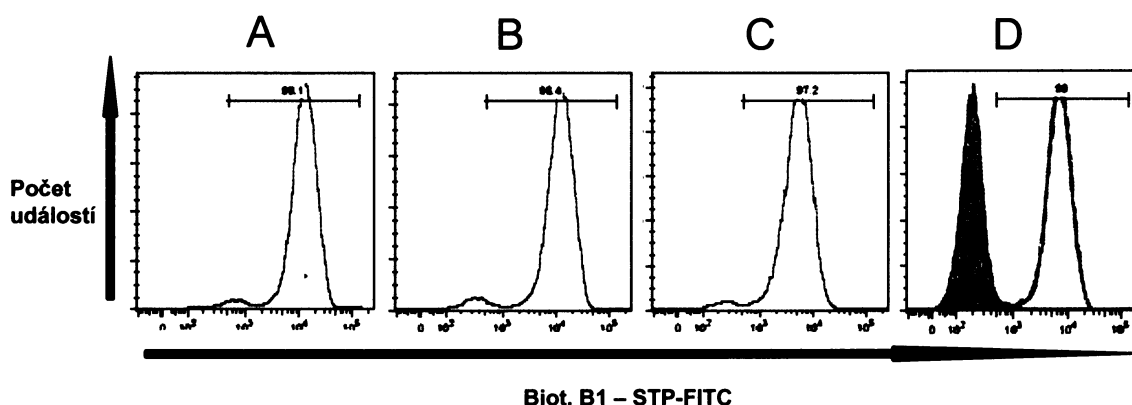
Anti-CD71 protilátka (C2) byla testována obdobným způsobem jako B1 protilátka, a taktéž na BCL1 buňkách. Tato protilátka se váže také dobře (obr. IV. 3. 1. 2. A-D), v porovnání s B1 protilátkou je zde ale patrný mírný pokles vazebné aktivity.



Obr. IV.3.1.2. : Vazba biotinylované protilátky anti - CD71 (červená – protilátka, modrá – negativní kontrola): A – 100 µg/ml, B – 10 µg/ml , C – 1 µg/ml, D – srovnání všech koncentrací protilátky, jako sekundární značení byl použit STP-FITC.

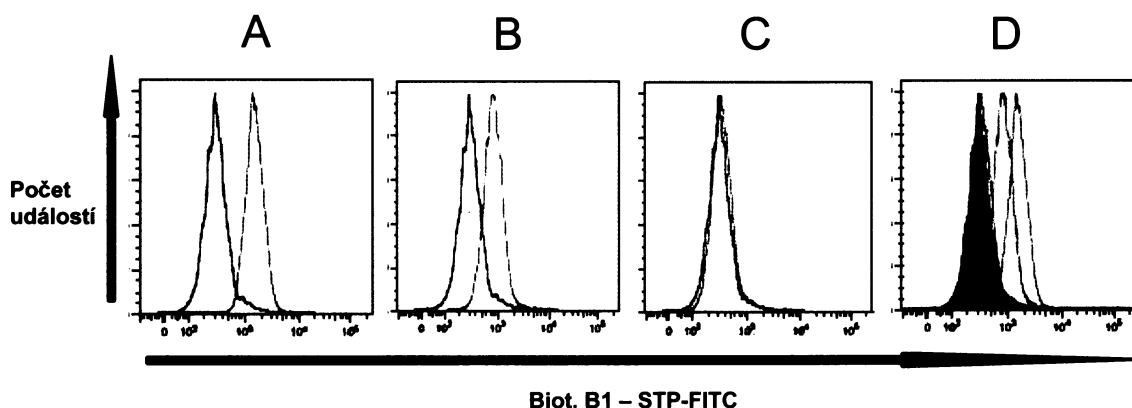
### IV. 3. 2. Hvězdicové směrované doxorubicinové konjugáty

B1 protilátka byla použita jako směrující struktura pro přípravu hvězdicového polymerního směrovaného doxorubicinového konjugátu (Vzorek 2). Vazba tohoto polymerního konjugátu směrovaného B1 protilátkou na cílové buňky je oproti volné B1 protilátce částečně snížena (Obr. IV. 3. 2. 1. A-D).



Obr. IV.3.2.1.: Vazba biotinylovaného hvězdicového konjugátu směřovaného B1 protilátkou: A – 100 µg/ml, B – 10 µg/ml, C – 1 µg/ml, D – srovnání všech koncentrací protilátky proti negativní kontrole, jako sekundární značení byl použit STP-FITC.

Jako směřující struktura pro přípravu hvězdicového polymerního směřovaného doxorubicinového konjugátu (Vzorek 1) byla použita protilátka anti-CD 71 (C2). Jak je možné vidět z obr. IV. 3. 2. 2. A-D, vazba na cílové buňky byla v případě tohoto konjugátu snížena až do té míry, že se konjugát váže pouze při vyšších koncentracích obsažené protilátky.



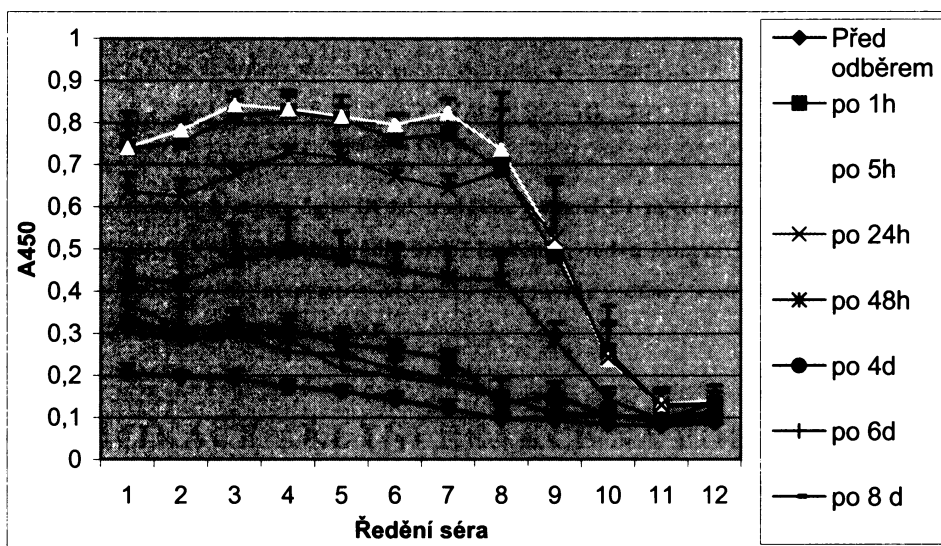
Obr. IV.3.2.2.: Vazba biotinylované protilátky anti-CD71 (červená – protilátka, modrá – negativní kontrola): A – 100 µg/ml, B – 10 µg/ml, C – 1 µg/ml, D – srovnání všech koncentrací protilátky proti negativní kontrole, jako sekundární značení byl použit STP-FITC.



#### IV. 4. KINETIKA IDIOTYPU IGM BCL1 LEUKÉMIE V PERIFERNÍ KRVÍ

Jak už bylo výše zmíněno, BCL1 leukémie obecně idiotyp IgM nesekretuje, tyto imunoglobuliny se přesto v krvi objevují (IV. 1.). Toto IgM může kompetovat s vazbou B1 směrovaného konjugátu, nebo alespoň částečně zhoršovat jeho fungování. Protože předpokládáme velké zvýšení idiotypu IgM v krvi po aplikaci první části léčby konjugátem (Vzorek 1), je důležité zjistit, jak rychle lze předpokládat, že se množství IgM idiotypu vrátí do původní hladiny.

Obr. IV. 4.1 ukazuje, že původní hladiny IgM idiotypu je dosaženo zhruba po 5. dni.

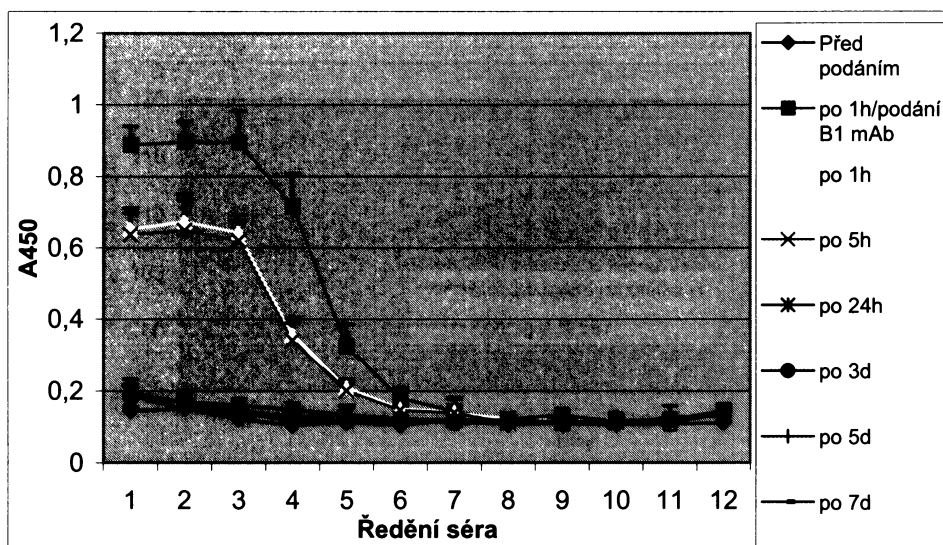


Obr. IV.4.1.: Sledování eliminace idiotypu IgM BCL1 leukémie přirozeně. Balb/c samicím bylo injikováno i.v. 500  $\mu$ l séra z myši v terminálním stádiu BCL1 leukémie, odebráno sérum v stanovených intervalech, ředěno 40x, testováno ELISA metodou pomocí biotinylované B1 protilátky a konjugátu avidin-HRP.

#### IV. 5. OBOURÁNÍ IDIOTYPU IGM BCL1 LEUKÉMIE POMOCÍ B1 PROTILÁTKY

Z důvodu velmi pomalého přirozeného odstraňování IgM idiotypu z oběhu jsme aplikovali 1 mg/myš volné B1 protilátky intraperitoneálně, s úmyslem tak celý jev urychlit. Uvolňování B1 protilátky z peritonea by mělo zajistit pomalejší uvolňování do oběhu a zabránit tvorbě komplexů typu protilátka-protilátka, které by mohly vést k úhynu experimentálních zvířat.

IgM idiotyp z krve byl odbourán během méně než 24 hodin. Nebylo pozorováno žádné zhoršení stavu myší, ani nedošlo k žádnému úhynu v experimentální skupině.



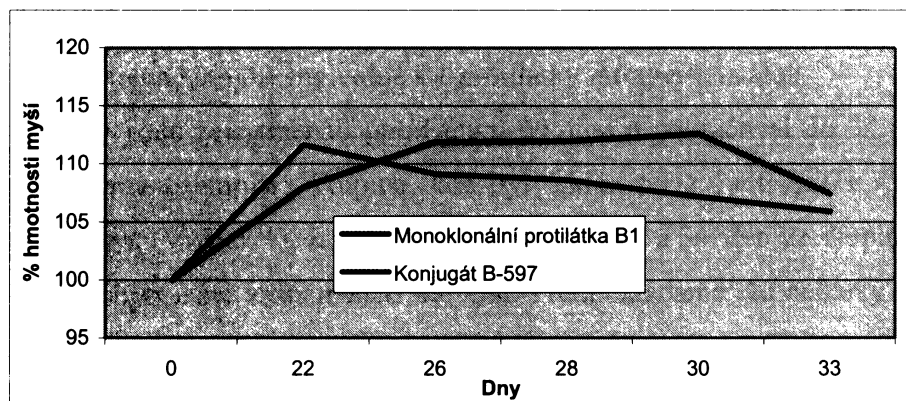
Obr. IV.5.1.: Sledování eliminace idiotypu IgM BCL1 leukémie pomocí B1 mAb (1 mg/myš). Balb/c samicím bylo injikováno i.v. 500  $\mu$ l séra z myší v terminálním stádiu BCL1 leukémie, podán 1 mg/myš B1 protilátky i.p 1 hodinu po podání séra, ve stanovených časových intervalech odebráno sérum, 40x ředěno, testováno ELISA metodou pomocí biotinylované B1 protilátky a konjugátu avidin-HRP.

#### IV. 6. KVANTIFIKACE AKUTNÍ REAKCE NA PODÁNÍ B1 SMĚROVANÉHO HPMA KONJUGÁTU

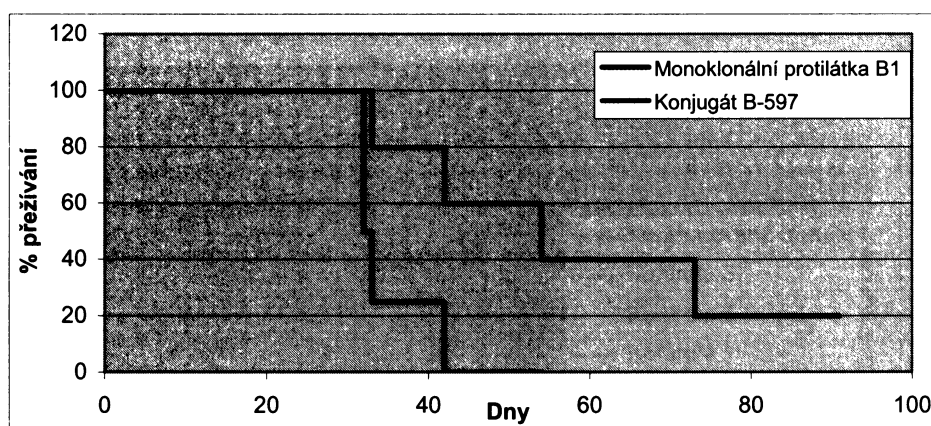
Jelikož je pozdní stádium léčby BCL1 leukémie provázeno akutní reakcí na podávaný B1 směrovaný konjugát [9], bylo žádoucí zjistit, jak je takový jev častý a tedy jak dalece by mohl narušit průběh pokusu.

Myším bylo podáno 150  $\mu$ g Dox/myš B1 směrovaného hvězdicového konjugátu intravenózně, jako kontrola byla použita volná protilátka B1 podaná stejným způsobem a v adekvátním množství k obsahu protilátky v konjugátu (2,22 mg/myš). Okamžitě po podání nedošlo k úmrtí žádné z myší, a to ani po podání doxorubicinového konjugátu, ani po podání volné protilátky. Po podání B1 volné protilátky však došlo k viditelnému zhoršení stavu všech pozorovaných myší, které ovšem nevedlo k pozdějšímu úmrtí experimentálních zvířat. Na Obr. IV.6.2 je znázorněn úhyn v obou skupinách experimentálních zvířat a Obr. IV.6.1 reprezentuje vývoj hmotnosti v průběhu experimentu.

Podání jak B1 protilátky, tak B1 směrovaného HPMA-Dox konjugátu vede k prodloužení přežívání a nižšímu nárůstu hmotnosti, konjugát ovšem vykazuje v porovnání s B1 protilátkou obrovský terapeutický účinek.



Obr. IV.6.1.: Vliv B1 směrovaného konjugátu a B1 mAb na hmotnost myši. Balb/c samicím bylo injikováno  $5 \times 10^5$  BCL1 buněk i.p. a 23. den aplikováno i.v.  $150 \mu\text{g}$  Dox/myš B1 směrovaného konjugátu nebo 2,22 mg B1 protilátky.



Obr. IV.6.2.: Vliv B1 směrovaného konjugátu a B1 mAb na přežívání myši. Balb/c samicím bylo injikováno  $5 \times 10^5$  BCL1 buněk i.p. a 23. den bylo aplikováno i.v.  $150 \mu\text{g}$  Dox/myš B1 směrovaného konjugátu nebo 2,22 mg B1 protilátky.

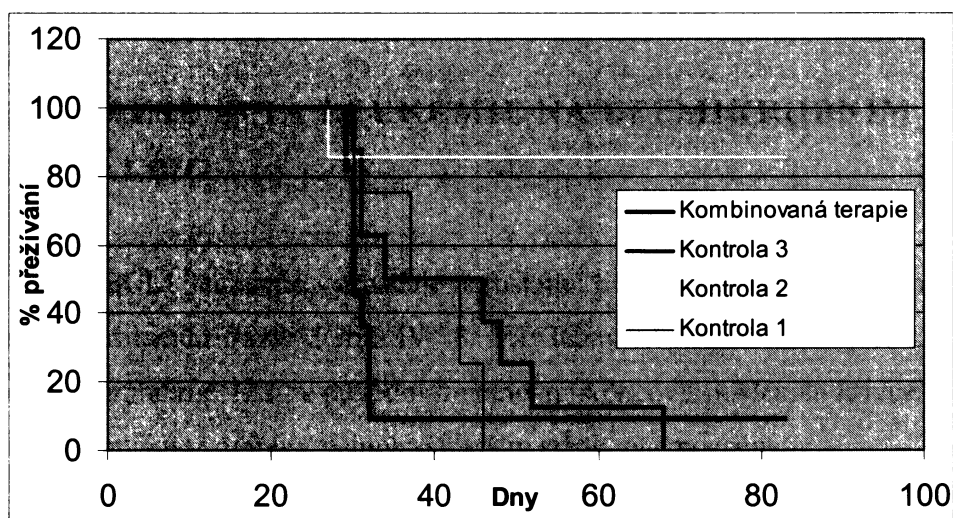
#### IV. 7. KOMBINOVANÁ TERAPIE BCL1 LEUKÉMIE DVĚMA DOXORUBICINOVÝMI KONJUGÁTY SMĚROVANÝMI DVĚMA RŮZNÝMI MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI

Předpoklad, že B1 směrovaný doxorubicinový konjugát není v pozdních stádiích BCL1 leukémie schopen vyléčit myši a že podání tohoto konjugátu způsobuje akutní reakci

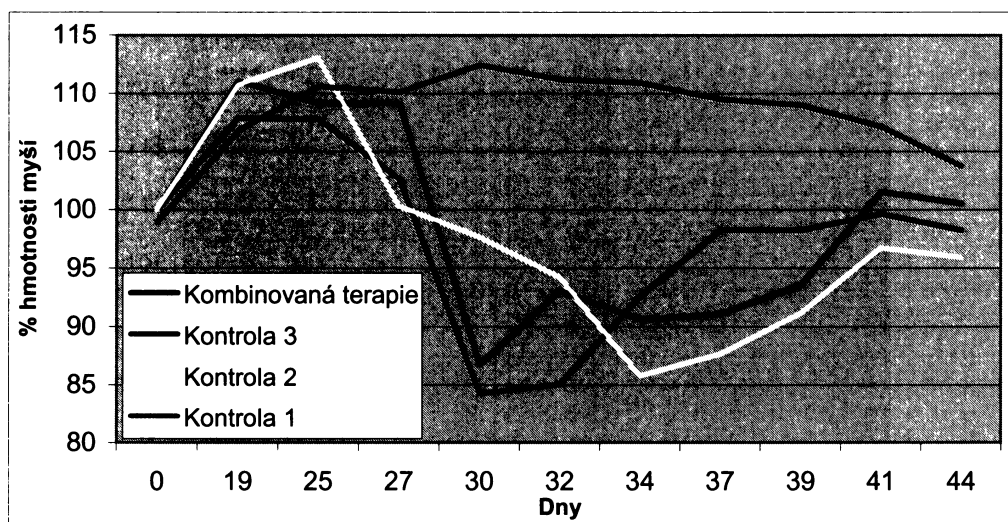
nás vedlo k úvaze o využití dvou směrovaných doxorubicinových konjugátů. V průběhu pokusu byla sledována hmotnost myši a jejich přežívání.

Konkrétně byl v hlavní skupině (Kombinovaná terapie) 20. a 22. den podán anti-CD71-HPMA-DOX konjugát (Vzorek 1) v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v. a 25. a 27. den byl podán B1-HPMA-DOX konjugát (Vzorek 2) v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v. Všem myším ve všech skupinách bylo podáno 0,4 mg volné B1 protilátky intraperitoneálně.

U této skupiny jsme zaznamenali první úhyn 29. den a pokračoval do 32. dne, kdy zůstal ve skupině jediný exemplář. Skupina, kde byl podán pouze anti-CD71 směrovaný doxorubicinový konjugát (Vzorek 1), započala svůj úhyn 30. den a 34. den ve skupině zůstalo 50 % jedinců. Další úhyn jsme zaznamenali 48. den. Předpokládáme, že celkový úhyn byl způsoben následkem podání volné B1 protilátky následně po podání anti-CD71 směrovaného doxorubicinového konjugátu. Skupina, kde byl podán pouze B1 směrovaný doxorubicinový konjugát (Vzorek 2), zaznamenala jediný úhyn 27. den, pravděpodobně jako následek reakce na podání léčiva. Skupina bez aplikované léčby uhynula celá do 46. dne.



Obr. IV.7.1.: Přežívání myši, Balb/c samicím bylo injikováno  $5 \times 10^5$  BCL1 buněk i.p., Kombinovaná terapie - 20. a 22. den byl podán anti - CD71-HPMA-DOX konjugát v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v. a 25. a 27. den byl podán B1-HPMA-DOX konjugát v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v., KONTROLA 3 - 20. a 22. den byl podán anti - CD71-HPMA-DOX konjugát v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v. a 25. a 27. den bylo podáno 400 µl PBS i.v., KONTROLA 2 - 20. a 22. den bylo podáno 300 µl PBS i.v. a 25. a 27. den byl podán B1-HPMA-DOX konjugát v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v., KONTROLA 1 - 20. a 22. den bylo podáno 300 µl PBS i.v. a 25. a 27. den bylo podáno 400 µl PBS i.v. Všem myším bylo 24. den injikováno 0,4 mg volné B1 protilátky i.p.

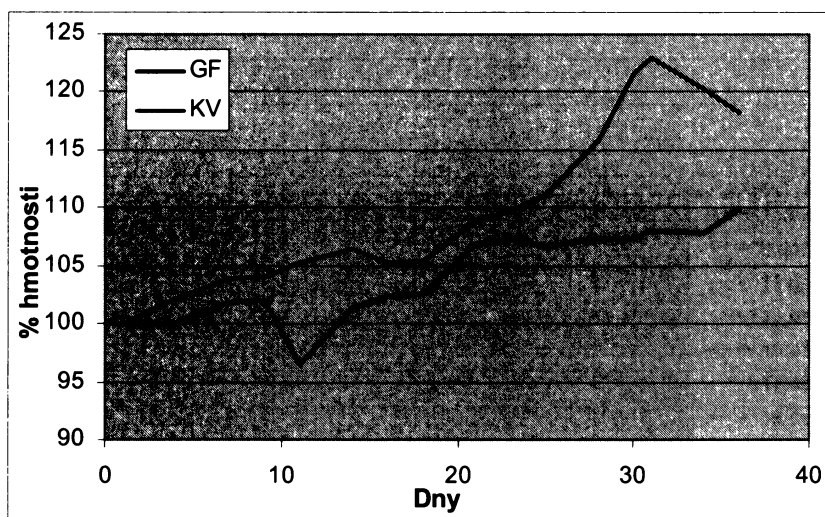


Obr. IV.7.2. : Přežívání myši, Balb/c samicím bylo injikováno  $5 \times 10^5$  BCL1 buněk i.p., Kombinovaná terapie - 20. a 22. den byl podán anti - CD71-HPMA-DOX konjugát v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v. a 25. a 27.den byl podán B1-HPMA-DOX konjugát v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v., KONTROLA 3 - 20. a 22. den byl podán anti - CD71-HPMA-DOX konjugát v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v. a 25. a 27. den bylo podáno 400  $\mu$ l PBS i.v., KONTROLA 2 - 20. a 22. den bylo podáno 300  $\mu$ l PBS i.v. a 25. a 27. den byl podán B1-HPMA-DOX konjugát v koncentraci 7,5 mg Dox/kg i.v., KONTROLA 1 - 20. a 22. den bylo podáno 300  $\mu$ l PBS i.v. a 25. a 27. den bylo podáno 400  $\mu$ l PBS i.v.. Všem myším bylo 24. den injikováno 0,4 mg volné B1 protilátky i.p.

#### IV. 8. PROGRESE BCL1 LEUKÉMIE NA BEZMIKROBNÍM MYŠÍM MODELU BALB/C

Jelikož se BCL1 leukémie vyznačuje narůstající hmotností myši, obě skupiny jsme po celou dobu experimentu vážili (Obr. IV. 8. 1.). Konvenční myši postupně zvýšily svoji hmotnost až na průměrně 122 % původní hmotnosti. Koncový pokles na křivce je způsoben úmrtím experimentálních zvířat v nejpokročilejším stádiu onemocnění.

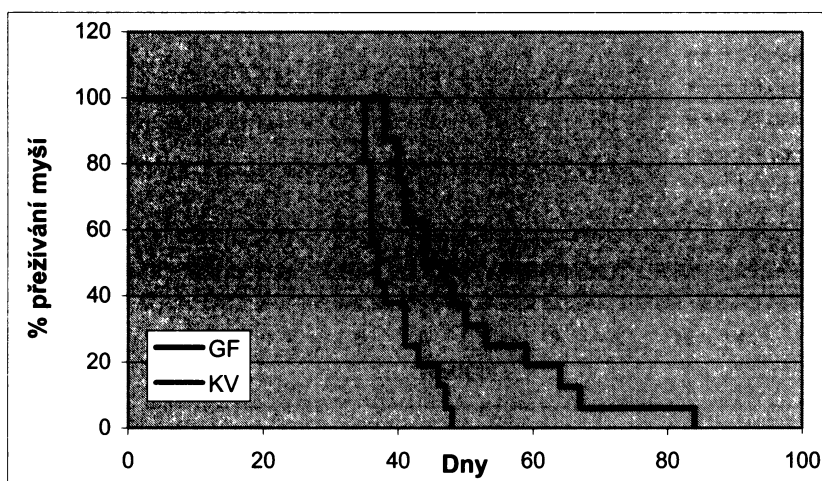
Bezmikrobní skupina také zvýšila postupně svou hmotnost, a to na 110 % výchozí hodnoty. Prudký pokles v začátku byl způsoben tím, že vážení experimentálních zvířat v izolátoru skýtá značné obtíže a pravděpodobně došlo k chybnému odečtu hmotnosti.



Obr. IV.8.1.: Hmotnost konvenčních a GF myší s BCL1 leukémií. Balb/c samicím bylo injikováno  $5 \times 10^5$  BCL1 buněk i.p.

Za nejdůležitější parametr jsme zvolili délku přežívání obou skupin a jejich následné porovnání. Z Obr. IV. 8. 2. je patrné, že bezmikrobní skupina myší přežívala výrazně déle v porovnání s konvenční skupinou.

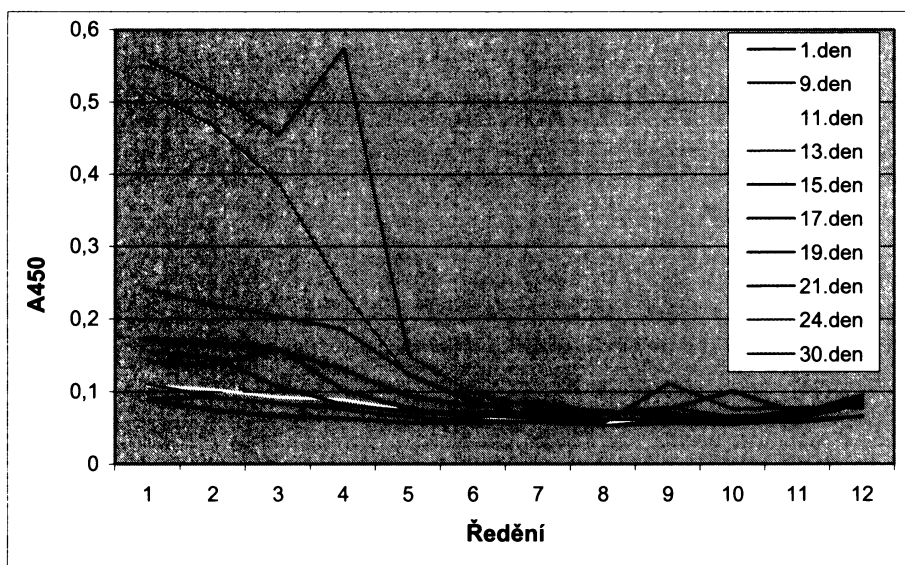
Skupina 16 myší chovaná v bezmikrobním prostředí vykazovala průměrné přežití 49,9 dne  $\pm$  12,8 (SD). Naproti tomu skupina 16 konvenčních myší měla signifikantně ( $p < 0,01$ ; t-test) nižší přežití s průměrem 39,8 dne  $\pm$  4,5 (SD).



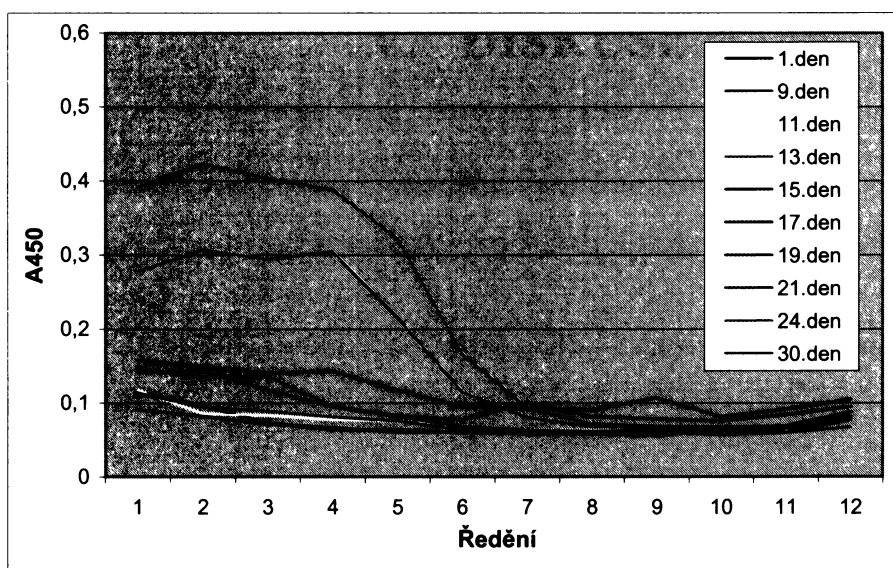
Obr. IV.8.2.: Doba přežívání konvenčních a GF myší s BCL1 leukémií. Balb/c samicím bylo injikováno  $5 \times 10^5$  BCL1 buněk i.p.

Jako další a poslední parametr jsme stanovovali hladinu idiotypu IgM BCL1 leukémie v séru myší, která přímo koreluje s rozvojem onemocnění. Na Obr. IV. 8. 3. jsou vidět hladiny

IgM konvenčních myší, které jsou výrazně vyšší než srovnatelné hladiny IgM u myší bezmikrobních (Obr. IV. 8. 4.).



**Obr. IV.8.3.: Hladiny IgM BCL1 leukémie v konvenčních myších, odebráno sérum v stanovených intervalech, ředěno 40x, testováno ELISA metodou pomocí biotinylované B1 protilátky a konjugátu avidin-HRP.**



**Obr. IV.8.4.: Hladiny IgM (BCR) BCL1 leukémie v GF myších, odebráno sérum v stanovených intervalech, ředěno 40x, testováno ELISA metodou pomocí biotinylované B1 protilátky a konjugátu avidin-HRP.**

## **V. DISKUSE**



## V. DISKUZE

Uvedení chemoterapie do klinické praxe bylo záhy následováno dvěma jevy. Prvním z nich byl obrovský nárůst počtu nově objevených a používaných cytostatik, druhým pak pesimistické názory hlásající, že chemoterapie nepřežije přelom tisíciletí. Oba jevy postupně měnily své kontury, jelikož se snižovalo jak množství nových cytostatik, které farmaceutický průmysl uváděl na trh, tak mizely i negativní názory na vrub budoucnosti cytostatických preparátů. Všichni si jasněji uvědomovali, že se chemoterapie nestane spásou pacientů s nádorovými onemocněními, ale že její významná role přetrvává a společně s dalšími postupy se pevně zabydlí v onkologii.

Chemoterapie hledá stále nové možnosti zdokonalení, kromě vývoje nových a účinnějších cytostatik se ubírá mnoha dalšími směry. S velkými nadějemi byl přijat objev monoklonálních protilátek Köhlerem a Milsteinem (1975), který sliboval neomezené možnosti jejich efektivního využití zejména na poli směrované terapie [103]. Poté se začaly ozývat hlasy, že je tímto z velké části problém nádorových onemocnění vyřešen. Bohužel se ukázalo, že tyto předpoklady byly příliš optimistické. Ačkoliv protilátky samotné či protilátkami směrované toxiny nepřinesly zpočátku při léčbě malignit očekávané výsledky, idea specificky působícího léčiva je natolik lákavá, že je jí neustále věnována obrovská pozornost [84, 200].

Jako jedno z úskalí nádorové léčby obecně se jeví diagnostika nádorových onemocnění a na ní navazující včasné započatá léčebná procedura. Pacient se ovšem často k účinné léčbě dostává až dlouho poté, kdy by ideálně terapie měla být započata, což zdůrazňuje důležitost výzkumu, který by nabídl nové přístupy terapie účinné v pozdních stádiích nádorových onemocnění.

V této práci byla studována možnost použít pro léčbu dva polymerní doxorubicinové konjugáty, každý směrovaný jinou protilátkou. Tento přístup jsme studovali na inbredním myším kmenu Balb/c (H-2<sup>d</sup>), který je z dříve prováděných studií známý predispozicí k výrazné T<sub>H</sub>2 (protilátkové) odpovědi [201]. Oba použité polymerní konjugáty byly založeny na bázi HPMA, přičemž léčivo bylo na polymerní nosič navázáno pomocí enzymaticky štěpitelné tetrapeptidické spojky, na rozdíl od protilátky, která je navázána přes *N*-hydroxysuccinimidylovou skupinu na konci polymerní páteře. Jedná se o nový typ hvězdicového konjugátu [93], který se liší od dříve užívaného tzv. klasického konjugátu způsobem vazby protilátky na polymerní řetězec, což má za následek odlišnou molekulární

strukturu, rychlost uvolňování vázaného doxorubicinu a cytotoxickou aktivitu *in vitro* i *in vivo*. Dále byla studována role střevní mikroflóry při rozvoji BCL1 leukémie. Jako zvířecí model jsme opětovně použili Balb/c myši.

Jak už bylo uvedeno, modelovým systémem byla nádorová linie myši B buněčné leukémie BCL1. Jako cílová struktura pro směřování byl zvolen idiotyp membránového IgM, který tyto buňky exprimují. V tomto případě se tedy jedná o striktně nádorově specifický antigen, který se nevyskytuje nikde jinde v organismu. Anti-idiotypové směřování cytotoxických látek tedy dává možnost velmi přesného „zasazení“ klonu maligních buněk. Díky tomu je směřování proti idiotypům membránových imunoglobulinů velmi atraktivní možností afinitní terapie B lymfomů a leukémií. Další výhodou této linie je fakt, že se nejedná o nádorové onemocnění přímo asociované s trávicím traktem. Tak lze obecněji zhodnotit vliv intestinální mikroflóry na námi studovanou progresi nádorového onemocnění.

Anti-idiotypové protilátky jako takové byly použity k léčbě B buněčných maligních onemocnění v několika formách [202, 203]. Léčba malignit samotnými protilátkami byla nejuspěšnější právě u anti-idiotypových protilátek. Zaznamenali jsme velmi slabý terapeutický efekt i u volné B1 monoklonální protilátky rozeznávající idiotyp membránového IgM na BCL1 buňkách. Mechanismus protinádorového účinku volné protilátky pravděpodobně spočívá v aktivaci komplementu a buněčné cytotoxicitě závislé na protilátkách (ADCC). Nedá se vyloučit ani přímý antiproliferační efekt anti-idiotypových protilátek [204].

V souvislosti s anti-idiotypovým směřováním byly testovány imunotoxiny [103], které se ukázaly být v tomto případě poměrně účinné. BCL1 linie byla použita též k experimentům s bispecifickými protilátkami. Bispecifická protilátka rozeznávající jednak CD3 a jednak idiotyp IgM na BCL1 buňkách se ukázala jako velmi účinná v léčbě BCL1 myši leukémie *in vivo* [197]. Dalším jejím úspěšným využitím bylo použití B1 směřovaného doxorubicinového konjugátu klasického i hvězdicového typu v jejím časném stádiu [9, 93], jimiž bylo vyléčeno až 100 % myši.

I když je B1 směřovaný konjugát v počátečních stádiích velmi účinný, není tomu tak při podání ve stádiích pozdějších. Jeho účinnost od určité doby klesá úměrně s délkou prodlevy mezi inokulací leukemických buněk a podáním léčiva. Postupné snižování účinnosti ovšem není jedinou komplikací, kterou je třeba překonat, chceme-li použít B1 směřovaný konjugát v terapii BCL1 leukémie. Byla pozorována akutní reakce na intravenózním podání tohoto konjugátu později jak 15 dnů po inokulaci nádorových buněk. Proto jsme se rozhodli otestovat, zda je možné k překonání těchto úskalí použít dva polymerní doxorubiciny

směřované dvěma různými protilátkami, anti-CD71 (proti transferrinu, C2) a anti-idiotypovou (proti IgM BCL1 leukémie, B1). Současně jsme zaměnili intravenózní aplikaci za intraperitoneální aplikaci volné B1 protilátky mezi jejich podáním. Fungování takového systému samozřejmě záleží na účinnosti jeho jednotlivých složek. Zároveň ale také nelze předpovědět synergický účinek při jejich následném podání.

Jako hlavní, i když v pořadí druhou směřující strukturu jsme z výše uvedených důvodů použili B1 protilátku. Volná B1 protilátka, která se na BCL1 buňky váže dobře, vazbou HPMA řetězců svou afinitu k BCL1 buňkám zčásti ztrácí. Tento jev je zřejmě způsoben buď inaktivací vazebného místa protilátky navázáním HPMA (například přímo do vazebného místa), nebo sterickým zakrytím vazebného místa navázaným HPMA řetězcem. To bylo pozorováno i u jiných protilátek navázaných na HPMA kopolymer jako nosič [147].

Pro uskutečnění buněčného cyklu je nezbytně nutný příjem železa buňkou. Proto je zablokování příjmu železa jedním z možných přístupů k léčbě nádorů [205]. Nejčastěji je příjem železa zabráněno blokováním CD71 pomocí monoklonálních protilátek, či chelátorů železa [199].

Kromě samotné anti-CD71 protilátky je možné využít CD71 (receptor proti transferrinu) jako cílové struktury pro směrování nějaké cytotoxické látky. I když takové směrování samozřejmě není vůči nádorovým buňkám úplně specifické, má tu velikou výhodu, že nádorová buňka nemůže ztratit expresi CD71 a stát se tak „neviditelnou“ pro anti-CD71 směřovaný preparát. Byla připravena a testována celá řada imunotoxinů směřovaných anti-CD71 protilátkou [206, 207]. Proto jsme se jako vedlejší a v pořadí ale první směřující strukturu rozhodli použít potkaní protilátku proti myším anti-CD71 (C2). Tento receptor, který nepatří mezi nádorově specifické antigeny, je v nízké míře exprimován na většině buněk. Aktivované dělicí se buňky však mají expresi CD71 silně zvýšenou [208]. CD71 zajišťuje buňkám přísun  $Fe^{3+}$  z extracelulárního prostředí, kde je  $Fe^{3+}$  vázáno na svůj plazmatický transportní protein transferrin. Železo je pro dělicí se buňku naprosto nepostradatelným a nenahraditelným prvkem. Má esenciální roli v energetickém metabolismu buňky, který musí zabezpečit tak energeticky náročný proces, jako je buněčné dělení. Kromě toho je železo kofaktorem ribonukleotidreduktázy, která je jedním z klíčových enzymů syntézy deoxyribonukleotidů, bez nichž buňka nemůže syntetizovat DNA. Je tedy zřejmé, že i nádorové buňky, vyznačující se rychlým dělením, musí CD71 silně exprimovat - BCL1 leukémie patří mezi poměrně rychle rostoucí typ nádorového onemocnění. Buněčný cyklus trvá zhruba 24 hodin. Jedná se o analog lidské leukocytární leukémie, která je typická právě blastickým zvratem a následnou velmi rychlou progresí.

U obou konjugátů došlo po navázání na HPMA k očekávanému snížení vazebné aktivity. V případě C2 protilátky, respektive C2 směrovaného polymerního doxorubicinového konjugátu bylo snížení vazebné aktivity natolik výrazné, že nelze vyloučit, že vazbou protilátky na polymer mohlo dojít nejen k sterickému zakrytí jejího vazebného místa, ale i k jeho částečnému poškození a tudíž snížení afinity k transferrinovému receptoru.

Otestovali jsme proto cytotoxicitu obou konjugátů a protilátky C2 a zjistili jejich  $IC_{50}$ . Zjištěné hodnoty potvrdily naši teorii, že snížená vazebná aktivita vedla zároveň i k snížené cytostatické aktivitě C2 směrovaného konjugátu (Vzorek 1). Jelikož ale tento konjugát stále vykazoval nejméně třikrát větší cytostatickou aktivitu než nesměrovaný doxorubicinový konjugát (PK1), při vyšších koncentracích se stále vázal a jeho funkce má být spíše jako úvod léčby než jako hlavní léčebné agens, nepovažovali jsme obecně slabší hodnoty tohoto konjugátu za překážku k možnosti testovat kombinovanou terapii myši BCL1 leukémie.

Dříve než bylo možné přistoupit k samotné aplikaci obou doxorubicinových konjugátů jako léčiv, bylo třeba provést některé pilotní studie a testy, abychom byli schopni námi zvolený experimentální model monitorovat.

U myši, kterým byly inokulovány BCL1 leukemické buňky a nebyly podrobeny žádné léčbě, jsme provedli histologii a imunohistochemii sleziny, jater a plic, cytofluorometrickou analýzu buněčných populací exprimujících na svém povrchu idiotyp IgM BCL1 leukémie a tranferinový receptor a detekovali jsme hladinu idiotypu IgM BCL1 leukémie v séru experimentálních zvířat. Zvířata byly též pravidelně vážena, jelikož nárůst množství leukemických buněk a s ním související splenomegálie a vznik ascites se na hmotnosti výrazně podílí. Výsledky celé této škály pokusů potvrzují skutečnost, že zlom ve vývoji onemocnění nastává okolo 24. dne po inokulaci BCL1 leukemických buněk do oblasti peritonea. Na základě těchto dat jsme se rozhodli podat doxorubicinový konjugát směrovaný C2 protilátkou krátce před 24. dnem po inokulaci nádorových buněk a podání B1 směrovaného doxorubicinového konjugátu krátce po tomto dni. Pokusili jsme se tak co nejdříve simulovat podmínky léčby pozdního stádia nádorového onemocnění.

Již z předešlých studií je známo [9], že idiotypový receptor uvolněný do krevního oběhu z rozpadlých buněk brání plné účinnosti B1 směrovaného konjugátu tím, že ho vyvazuje z oběhu a brání tak jeho akumulaci na povrchu leukemických buněk. Proto jsme nejprve pomocí ELISA testu zjistili, jak rychle tento idiotyp IgM imunoglobulinu přirozeně mizí z oběhu. Předpokládali jsme, že po podání C2 protilátkou směrovaného konjugátu dojde, jako důsledek rozpadu většího počtu BCL1 leukemických buněk, k prudkému nárůstu tohoto idiotypu IgM v oběhu. Zjistili jsme, že nádorově specifický IgM idiotyp přetrval v séru

dlouho, protože je detekovatelný ještě osm dní po aplikaci séra z myši v terminálním stádiu BCL1 leukémie.

Proto jsme se pokusili tuto dobu zkrátit, a to intraperitoneálním podáním volné B1 protilátky, jenž by měla idiotyp IgM BCL1 leukémie z oběhu vyvázat a vyčistit tak celý experimentální systém. Po podání se skutečně během méně jak 24 hodin hladina idiotypu IgM vrátila na základní úroveň. Aplikace B1 protilátky intraperitoneálně neměla žádný negativní vliv na zdraví a přežívání experimentálních zvířat. Jelikož je intraperitoneální podání charakteristické tím, že veškeré látky takto podané jsou nejdříve dolní dutou žílou odvedené do jater, dříve než se dostanou do celého krevního oběhu, předpokládáme, že nedošlo k tvorbě imunokomplexů, které by játra nedokázaly zpracovat. Myši přežívaly další nejméně 3 měsíce bez jakýchkoliv následků.

Další úskalí, které bylo popsáno při léčbě BCL1 leukémie v pozdním stádiu, je negativní až život ohrožující reakce na podávaný konjugát [9]. Zjistili jsme, že při podání B1 protilátkou směřovaného konjugátu v koncentraci 150 µg DOX/myš s vysokou pravděpodobností nedošlo k akutní reakci. Konjugát jsme podali 5 myším a žádná z nich bezprostředně neuhynula. Jako kontrolu jsme použili myši, kterým byla intravenózně podána volná B1 protilátka ve stejném množství (2,22 mg/myš), v jakém je obsažena v 150 µg DOX B1 směřovaném doxorubicinovém konjugátu. Tyto myši bezprostředně po podání jevíly viditelné obtíže (zježená srst, trhané pohyby nebo výrazná nehybnost, silná dýchavičnost, ...) ale k jejich úhynu nedošlo. Proto se domníváme, že mediátorem této „anafylaktoidní“ reakce, pokud se vyvine, je právě volná protilátka B1 podaná intravenózně. Navázání na HPMa vede ke zmírnění tohoto jevu, stejně tak podání B1 volné protilátky intraperitoneálně. Předpokládáme, že na vzrůstající pravděpodobnosti vzniku této akutní reakce se podílí i vzrůstající koncentrace podané protilátky, volné nebo vázané na polymer.

Dále už jsme se soustředili na samotnou kombinovanou terapii BCL1 leukémie dvěma doxorubicinovými konjugáty směřovanými dvěma různými monoklonálními protilátkami. Celkový výsledek ovšem nebyl příliš uspokojivý. Podané dávky byly odvozeny od dříve získaných výsledků s podobnými konjugáty [9, 93]. Tato aplikace léčiv způsobila, že během 3 dnů (29. – 32. den) uhynulo 10 z 11 myši. Jelikož skupina, ve které byl podán pouze anti-CD71 směřovaný doxorubicinový konjugát (Kontrola 3), zaznamenala velmi podobnou tendenci, i když v menší míře – 4 z 8 myši uhynuly v rozmezí 4 dnů (30. – 34. den), domníváme se, že úhyn myši ve skupině s kombinovanou terapií byl způsoben podáním anti-CD71 směřovaného doxorubicinového konjugátu, po kterém následovalo podání volné B1 protilátky. K úhynu došlo pravděpodobně jako následek zablokování cévního řečiště

uvolněnými rozpadajícími se BCL1 leukemickými buňkami, které na svém povrchu stále drží IgM idiotyp. Domníváme se, že tyto buňky po podání volné B1 protilátky vytvořily shluky a tromby, které způsobily embolizaci cévního systému. Za další jev, který mohl přispět k úhynu myši, považujeme skutečnost, že podání volné B1 protilátky mohlo vést ke vzniku komplexů s uvolněným receptorem IgM idiotypu BCL1 leukémie, což na rozdíl od fragmentů buněk vedlo k akumulaci těchto komplexů v ledvinách, a tedy ke glomerulonefritidě. Tento jev lze přirovnat svým charakterem k lidské komplexové chorobě. Relativně nižší účinnost konjugátů směřovaných anti-CD71 protilátkami může být způsobena tím, že na rozdíl od klasických membránových receptorů je intracelulární osud transferrinového receptoru odlišný například tím, že již záhy po internalizaci je tento receptor recyklován a navrácen na povrch buňky. Jelikož doxorubicinové konjugáty vyžadují ke své funkci akumulaci v membránových strukturách (ER, Golgi, glykolipidické membrány), nelze v případě transferrinového receptoru s jistotou tvrdit, že akumulace sledovaného konjugátu je dostatečná. Jak lze usuzovat z výsledků (jediný úhyn ve skupině, kde byl podáván pouze B1 směřovaný doxorubicinový konjugát - Kontrola 2), vliv tohoto B1 směřovaného konjugátu byl při úhynu pouze doplňující (zesilující). Jeho podání pouze zatížilo už tak zesláblý organismus experimentálních zvířat, což vedlo k výrazně vyššímu úhynu ve skupině s kombinovanou terapií než ve skupině, kde byl podáván konjugát směřovaný proti transferrinovému receptoru (Kontrola 3).

Souhrnně lze tedy říci, že tento druh terapie pravděpodobně není ideálním přístupem k léčbě pozdního stádia nádorového onemocnění, nebo alespoň ne v tomto terapeutickém schématu. Její úskalí tkví ve dvou faktech. Jednak je velmi obtížné určit správnou dobu k aplikaci konjugátů, protože doba, počet dávek a celkové množství podaného léčiva kriticky ovlivňuje výsledek celé procedury. Druhým úskalím je pak výběr cílových struktur na povrchu nádorových buněk. V našem případě není třeba zpochybňovat idiotyp IgM BCL1 leukémie, když právě ten se chová jako téměř ideální cílová struktura. Větším problémem se jeví právě transferrinový receptor, jak již bylo zmíněno výše. Alternativou by mohlo být nahrazení této cílové struktury jinou, vhodnější. Takovou strukturou by mohl velmi dobře být například receptor CD20. Jelikož se v současnosti jedná o dostatečně dobře popsany povrchový znak, pro který je u lidí dostatečný výběr anti-CD20 protilátek, lze o tomto směřování uvažovat i u myšího modelu.

Posledním tématem, kterému jsme se v této práci věnovali, bylo to, zda se střevní mikroflóra nějakým způsobem podílí na rozvoji nádorového onemocnění myši BCL1 leukémie. Jak již bylo zmíněno výše, u nádorů přímo asociovaných s trávicím traktem je

možný vliv střevní mikroflóry logický, ne však u ostatních nádorových onemocnění. Použití leukémie jako modelové nádorové linie proto otevírá nový pohled na tuto problematiku.

V tomto experimentu jsme se rozhodli porovnat hmotnost, přežívání a hladinu idiotypu IgM v séru konvenčních a bezmikrobních myší kmene Balb/c. Všechny tři parametry, které jsme sledovali, nás přesvědčily o pravděpodobně významné roli mikrobiální flóry při rozvoji nádorového onemocnění. Hmotnost obou experimentálních skupin se po celou dobu probíhajícího pokusu výrazně lišila. Relativní hmotnost konvenčních myší vždy převyšovala hmotnost myší bezmikrobních. Bezmikrobní myši také přežívaly výrazně delší dobu než myši konvenční, průměrná doba přežívání byla u bezmikrobní skupiny o 10 dní delší. Taktéž hladiny IgM idiotypu BCL1 leukémie byly u bezmikrobní skupiny myší v průběhu pokusu výrazně zvýšené. V souhrnu lze tedy konstatovat, že nepřítomnost střevní mikroflóry vedla k prodlouženému přežívání a pomalejší progresi BCL1 leukémie. V objasnění tohoto jevu je třeba dále pokračovat. Důvodů uvedeného pozorování může být více. V bezmikrobním prostředí se u jedinců nerozvíjí akutní infekce, které jsou jednou z mnoha příčin úhynu. Tento jev není pravděpodobně závislý na přítomnosti jednoho konkrétního mikroorganismu, ale že je zahrnut buď celý slizniční imunitní systém, nebo alespoň střevní slizniční systém, který je zodpovědný svou produkcí IL-10 a TGF- $\beta$  za indukci tolerance k vlastním buňkám a běžným nepatogenním antigenům. Jelikož jsou nádorové buňky de facto vlastními buňkami organismu a v bezmikrobních myších není tato část imunomodulačních buněk vyvinuta, je imunitní systém bezmikrobních zvířat výrazně citlivější a tak je schopen na nádorové buňky lépe reagovat. Tato skutečnost podporuje představu, že právě vlastní imunitní systém je pro kompletní vyléčení nezbytný

Směřované doxorubicinové konjugáty vykazují dobré experimentální výsledky při léčbě nádorových onemocnění. I přes komplikace, které mohou při jejich použití vyvstávat, jsou to právě ony, které by mohli v budoucnu přispět k lepší perspektivě těch, kteří v současných terapeutických přístupech tuto perspektivu nenachází.

## **VI. ZÁVĚR**



## VI. ZÁVĚR

- Plíce, játra a slezina je 11. den po inokulaci BCL1 leukémie bez jakýchkoli známek infiltrace nádorovými buňkami.
- Ve slezině i v periferní krvi dochází k pozvolnému nárustu BCL1 pozitivních buněk, který se okolo 24. dne výrazně zvýší. Množství BCL1 pozitivních buněk je větší ve slezině než v periferní krvi.
- Ve slezině i v periferní krvi je exprese CD71 pozvolně vrůstající. Na splenocytech je exprese silnější než v periferní krvi. Do 18. dne se jedná především o buňky nenádorového charakteru. Okolo 24. dne dochází k nárustu exprese CD71 a k koexpresi s idiotypem IgM BCL1 leukémie.
- Množství idiotypu IgM BCL1 leukémie je do 17. dne jen málo odlišná od kontrolních hodnot. Do 24. dne dojde k silnému nárustu hladiny tohoto idiotypu IgM.
- Konjugát směřovaný C2 protilátkou se jeví jako výrazně méně cytotoxický než konjugát s B1 protilátkou, a to až přibližně třicetkrát. C2 směřovaný konjugát stále vykazuje určitou specificitu, jelikož je přibližně čtyřikrát více cytotoxický než nesměrovaný doxorubicinový konjugát.
- Obě volné protilátky se na povrch BCL1 buněk váží dobře. Protilátka B1 se váže na povrch BCL1 buněk s mírně vyšší afinitou než C2 (anti-CD71) protilátka. Po navázání na polymerní nosič HPMa došlo u obou protilátek k zeslabení vazebné aktivity, které bylo u C2 směřovaného doxorubicinového konjugátu výrazné do té míry, že se vázal pouze při vyšších koncentracích protilátky.
- Idiotyp IgM BCL1 leukémie zůstává v krevním oběhu za normálních okolností i po 8. dni po aplikaci. Pomocí intraperitoneálního podání volné B1 protilátky je možné odstranit IgM idiotyp z oběhu do 24 hodin.
- Intravenózní podání B1 směřovaného doxorubicinového konjugátu způsobuje akutní reakci jen s malou pravděpodobností.
- Podání obou doxorubicinových směřovaných konjugátů po sobě se neukázalo jako účinné.
- BCL1 leukémie se v bezmikrobních podmínkách na *in vivo* experimentálním modelu rozvíjí výrazně pomaleji než v podmínkách konvenčních. V bezmikrobních podmínkách dochází k pomalejšímu nárustu hmotnosti a k pomalejšímu úhynu experimentálních zvířat.

## **VII. SEZNAM ZKRATEK**

## VII. SEZNAM SKRATEK

<b>ABC-Elite</b>	avidin-biotin konjugát
<b>ADCC</b>	antibody dependent cell cytotoxicity
<b>ADEPT</b>	antibody-directed-enzyme-prodrug-therapy
<b>AIBN</b>	2,2'-azobisisobutyronitrilem
<b>AP</b>	1-aminopropan- 2-ol
<b>Av/px</b>	avidin konjugovaný s peroxidázou
<b>AVČR</b>	Akademie věd ČR
<b>B1 mAb</b>	anti-idiotypová protilátka
<b>Balb/c</b>	imbrední myší kmen
<b>BCL1</b>	B buněčná leukémie
<b>C2 mAb</b>	monoklonální protilátka
<b>CD71</b>	transferrinový receptor
<b>CTL</b>	cytotoxické T lymfocyty
<b>DCCI</b>	dicyklohexyl-karbodiimid
<b>DMF</b>	dimethylformamid
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>Dox</b>	doxorubicin
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EPR</b>	enchanced permeability and retention
<b>FACS</b>	průtokový cytofluorometr
<b>FCS</b>	fetální telecí sérum
<b>FGÚ</b>	Fyziologický ústav
<b>FITC</b>	fluorescein-isothiokyanát
<b>FL1</b>	fluorescence v kanálu 1
<b>GALT</b>	Lymfatická tkáň asociovaná se zažívacím traktem
<b>Gly</b>	glycin
<b>HPMA</b>	N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid
<b>HRP</b>	křenová peroxidáza
<b>i.p.</b>	intraperitoneálně
<b>i.v.</b>	intravenózně
<b>IgA</b>	imunoglobulin A
<b>IgG</b>	imunoglobulin G
<b>IgM</b>	imunoglobulin M
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>LAK</b>	lymphokine activated killer
<b>Leu</b>	leucin
<b>LPS</b>	lipopolysacharid
<b>MA</b>	methakrylamid
<b>MALT</b>	Lymfatická tkáň asociovaná se sliznicemi
<b>MBÚ</b>	Mikrobiologický ústav

<b>MDR</b>	mnohočetná léková rezistence
<b>Mw</b>	molekulová hmotnost
<b>NK</b>	natural killer
<b>ONp</b>	orto-nytrofenyl
<b>PBS</b>	fosfátový fyziologický roztok
<b>PBT</b>	PBS s 1% Tween 20
<b>PE</b>	fykoerytrin
<b>PEG</b>	poly(ethylen glykol)
<b>Phe</b>	fenylalanin
<b>SMANCS</b>	styren maleic acid-neocarzinostatin
<b>TEA</b>	Triethylamin
<b>TIL</b>	tumor infiltrating leukocyte
<b>ÚMG</b>	Ústav molekulární genetiky

## **VIII. POUŽITÁ LITERATURA**

## VIII. POUŽITÁ LITERATURA

1. Rahman, A., et al., *Antitumor and toxicity evaluation of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1986. **16**(1): p. 22-7.
2. Krishna, R. and L.D. Mayer, *Liposomal doxorubicin circumvents PSC 833-free drug interactions, resulting in effective therapy of multidrug-resistant solid tumors*. *Cancer Res*, 1997. **57**(23): p. 5246-53.
3. Muller, R.H., et al., *In vitro model for the degradation of alkylcyanoacrylate nanoparticles*. *Biomaterials*, 1990. **11**(8): p. 590-5.
4. Kerr, D.J. and S.B. Kaye, *Chemoembolism in cancer chemotherapy*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1991. **8**(1): p. 19-37.
5. Ulbrich, K., et al., *Novel biodegradable hydrogels prepared using the divinyllic crosslinking agent N,O-dimethacryloylhydroxylamine. 1. Synthesis and Characterization of rates of gel degradation and rate of release of model drug*. *J. Control. Rel.*, 1993. **24**: p. 181-190.
6. Rihova, B. and J. Kopecek, *Biological properties of targetable poly N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide - antibody conjugates*. *J. Control. Rel.*, 1985. **2**: p. 289-310.
7. Rihova, B., et al., *Antibody-directed affinity therapy applied to the immune system: in vivo effectiveness and limited toxicity of daunomycin conjugated to HPMA copolymers and targeting antibody*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1988. **46**(1): p. 100-14.
8. Rihova, B., *Targeting of drugs to cell surface receptors*. *Crit Rev Biotechnol*, 1997. **17**(2): p. 149-69.
9. Kovar, M., et al., *HPMA copolymer-bound doxorubicin targeted to tumor-specific antigen of BCL1 mouse B cell leukemia*. *J Control Release*, 2003. **92**(3): p. 315-30.
10. Kopecek, J., et al., *HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000. **50**(1): p. 61-81.
11. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. *Cancer Res*, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
12. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. *J Control Release*, 2000. **65**(1-2): p. 271-84.
13. Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. *Adv Enzyme Regul*, 2001. **41**: p. 189-207.
14. Ehrlich, P., *Studies in immunity*. Plenum Press, John Wiley and Sons, New York, 1906.
15. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
16. Cobb, P.W. and C.F. LeMaistre, *Therapeutic use of immunotoxins*. *Semin Hematol*, 1992. **29**(3 Suppl 2): p. 6-13.
17. Kopecek, J., et al., *Synthetic polymeric drugs*. *Czech Patent Application*, 1985. **0097:85**.
18. Gilman, A., *The initial clinical trial of nitrogen mustard*. *Am J Surg*, 1963. **105**: p. 574-8.
19. Burchenal, J.H., *The historical development of cancer chemotherapy*. *Semin Oncol*, 1977. **4**(2): p. 135-46.

20. Klener, P., *Postavení chemoterapie v komplexní léčbě nádorů*, in *Protinádorová imunologie*. 1996: Praha. p. 31.
21. Wilkes, G.M. and T.B. Ades, *American Cancer Society Consumer's Guide to Cancer Drugs*. 2 ed. 2004: Jones and Bartlett Publishers. 535.
22. Au, J.L., et al., *Pharmacokinetics and metabolism of florafur in man*. *Cancer Treat Rep*, 1979. **63**(3): p. 343-50.
23. Cheson, B.D., *New antimetabolites in the treatment of human malignancies*. *Semin Oncol*, 1992. **19**(6): p. 695-706.
24. Dechant, K.L., et al., *Ifosfamide/mesna. A review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer*. *Drugs*, 1991. **42**(3): p. 428-67.
25. MacFarland, J.G., M.C. Kirk, and D.B. Ludlum, *Mechanism of action of the nitrosoureas--IV. Synthesis of the 2-haloethylnitrosourea-induced DNA cross-link 1-(3-cytosinyl),2-(1-guanyl)ethane*. *Biochem Pharmacol*, 1990. **39**(1): p. 33-6.
26. Albert, D.S., *Pharmacology of mitoxantron: mode of action and pharmacokinetics*. *New Drugs*, 1983(3): p. 67-81.
27. Weiss, R.B., *The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?* *Semin Oncol*, 1992. **19**(6): p. 670-86.
28. Legha, S.S., et al., *Neocarzinostatin (NSC 157365) a new cancerostatic compound*. *Oncology*, 1976. **33**(5-6): p. 265-70.
29. Jordan, M.A., D. Thrower, and L. Wilson, *Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids*. *Cancer Res*, 1991. **51**(8): p. 2212-22.
30. Rowinsky, E.K., et al., *Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents*. *Semin Oncol*, 1992. **19**(6): p. 646-62.
31. Jones, S.F. and H.A. Burris, 3rd, *Topoisomerase I inhibitors: topotecan and irinotecan*. *Cancer Pract*, 1996. **4**(1): p. 51-3.
32. Slevin, M.L., *The clinical pharmacology of etoposide*. *Cancer*, 1991. **67**(1 Suppl): p. 319-29.
33. Adamson, R.H. and S. Fabro, *Antitumor activity and other biologic properties of L-asparaginase (NSC-109229)-a review*. *Cancer Chemother Rep*, 1968. **52**(6): p. 617-26.
34. Gastineau, D.A. and H.C. Hoagland, *Hematologic effects of chemotherapy*. *Semin Oncol*, 1992. **19**(5): p. 543-50.
35. Mitchell, E.P. and P.S. Schein, *Gastrointestinal toxicity of chemotherapeutic agents*. *Semin Oncol*, 1982. **9**(1): p. 52-64.
36. Gradishar, W.J. and R.L. Schilsky, *Effects of cancer treatment on the reproductive system*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1988. **8**(2): p. 153-71.
37. Allen, A., *The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs*. *Semin Oncol*, 1992. **19**(5): p. 529-42.
38. Cordonnier, D., et al., *[Nephrotoxicity of antitumor chemotherapy]*. *Presse Med*, 1984. **13**(18): p. 1141-5.
39. Teramoto, S., et al., *[Cisplatin and vinca alkaloid combination chemotherapy of advanced non-small-cell lung cancer in the aged]*. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, 1990. **27**(6): p. 680-6.
40. Levine, E.G. and C.D. Bloomfield, *Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure*. *Semin Oncol*, 1992. **19**(1): p. 47-84.
41. Eytan, G.D., R. Regev, and Y.G. Assaraf, *Functional reconstitution of P-glycoprotein reveals an apparent near stoichiometric drug transport to ATP hydrolysis*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(6): p. 3172-8.

42. Ringsdorf, H., *Structure and properties of pharmacologically active polymers*. J. Polym. Sci. Polym. Symp., 1975. **51**: p. 135-153.
43. Nakashima, M., et al., *In vitro characteristics and in vivo plasma disposition of cisplatin conjugated with oxidized and dicarboxymethylated dextrans*. Biol Pharm Bull, 1999. **22**(7): p. 756-61.
44. Ohya, Y., et al., *Synthesis and cytotoxic activity of dextran carrying cis-dichloro(cyclohexane-trans-1,2-diamine)platinum(II) complex*. J Biomater Sci Polym Ed, 1996. **7**(12): p. 1085-96.
45. Arencibia, J.M., et al., *In vitro targeting of a cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207 to ES-2 human ovarian cancer cells as demonstrated by microsatellite analyses*. Anticancer Drugs, 2001. **12**(1): p. 71-8.
46. Hoes, C., W. Portman, and W. Van Heeswijk, *Optimisation of macromolecular prodrugs of the antitumor antibiotic adriamycin*. J Control Rel, 1985. **2**: p. 205-218.
47. Coradini, D., et al., *Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line*. Int J Cancer, 1999. **81**(3): p. 411-6.
48. Koosha, F., R.H. Muller, and S.S. Davis, *Polyhydroxybutyrate as a drug carrier*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1989. **6**(2): p. 117-30.
49. Seymour, L.W., et al., *Polymeric prodrugs of mitomycin C designed for tumour tropism and sustained activation*. Anticancer Drug Des, 1996. **11**(5): p. 351-65.
50. Fischel-Ghodsian, F., et al., *Enzymatically controlled drug delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(7): p. 2403-6.
51. Rihova, B., *Antibody-tergeted HPMA copolymer-bound anthracycline antibiotics*. Drugs of the future, 2003. **28**(12): p. 1189-1210.
52. Kopecek, J. and R. Duncan, *Targetable polymeric prodrugs*. J. Control. Rel., 1987. **6**: p. 315-327.
53. Kopecek, J., *Soluble biomedical polymers*. Polym Med, 1977. **7**(3): p. 191-221.
54. Kopecek, J., *Targetable polymeric anticancer drugs. Temporal control of drug activity*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **618**: p. 335-44.
55. MacEwen, E.G., et al., *A preliminary study on the evaluation of asparaginase. Polyethylene glycol conjugate against canine malignant lymphoma*. Cancer, 1987. **59**(12): p. 2011-5.
56. Pechar, M., et al., *Poly(ethylene glycol) multiblock copolymer as a carrier of anti-cancer drug doxorubicin*. Bioconjug Chem, 2000. **11**(2): p. 131-9.
57. Abuchowski, A., et al., *Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates*. Cancer Biochem Biophys, 1984. **7**(2): p. 175-86.
58. Maeda, H., L.W. Seymour, and Y. Miyamoto, *Conjugates of anticancer agents and polymers: Advantages of macromolecular therapeutics in vivo*. Bioconjugate Chem, 1992. **3**: p. 351-62.
59. Debruyne, F.M., et al., *Long-term therapy with a depot luteinizing hormone-releasing hormone analogue (Zoladex) in patients with advanced prostatic carcinoma*. J Urol, 1988. **140**(4): p. 775-7.
60. Motzer, R.J., et al., *Phase I trial of 40-kd branched pegylated interferon alfa-2a for patients with advanced renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2001. **19**(5): p. 1312-9.
61. Hershfield, M.S., *PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: an update after 8.5 years*. Clin Immunol Immunopathol, 1995. **76**(3 Pt 2): p. S228-32.
62. Rihova, B., *Polymer therapeutics - Sixth International Symposium: from laboratory to clinical practice*. IDrugs, 2004. **7**(2): p. 114-7.



63. Rihova, B. and K. Kubackova, *Clinical implications of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2003. **4**(5): p. 311-22.
64. Ghesquieres, H., et al., *Phase I dose escalation study of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx((R))) in combination with topotecan in patients with advanced malignancies*. Invest New Drugs, 2006.
65. Cassidy, J., et al., *A phase I clinical trial of PK1: a novel drug targeting system in human cancers*. Proc. 2nd International Symposium on Polymer Therapeutics, Kumamoto, Japan, April 18-20, 1997: p. 18.
66. Rihova, B., et al., *Drug-HPMA-HuIg conjugates effective against human solid cancer*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **519**: p. 125-43.
67. Takakura, Y., et al., *Enhanced lymphatic delivery of mitomycin C conjugated with dextran*. *Cancer Res*, 1984. **44**(6): p. 2505-10.
68. Kassab, A.C., et al., *Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1997. **8**(12): p. 947-61.
69. Ginobbi, P., et al., *Folic acid-polylysine carrier improves efficacy of c-myc antisense oligodeoxynucleotides on human melanoma (M14) cells*. *Anticancer Res*, 1997. **17**(1A): p. 29-35.
70. Jensen, K.D., P. Kopeckova, and J. Kopecek, *Antisense oligonucleotides delivered to the lysosome escape and actively inhibit the hepatitis B virus*. *Bioconjug Chem*, 2002. **13**(5): p. 975-84.
71. Wang, L., J. Kristensen, and D.E. Ruffner, *Delivery of antisense oligonucleotides using HPMA polymer: synthesis of A thiol polymer and its conjugation to water-soluble molecules*. *Bioconjug Chem*, 1998. **9**(6): p. 749-57.
72. Yabe, Y., et al., *Targeted delivery and improved therapeutic potential of catalase by chemical modification: combination with superoxide dismutase derivatives*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **289**(2): p. 1176-84.
73. Ikeda, Y., J.H. Anderson, and D.M. Long, *Oxygen free radicals in the genesis of traumatic and peritumoral brain edema*. *Neurosurgery*, 1989. **24**(5): p. 679-85.
74. Balemans, L.T., et al., *Locoregional therapy with polyethylene-glycol-modified interleukin-2 of an intradermally growing hepatocellular carcinoma in the guinea pig induces T-cell-mediated antitumor activity*. *Cancer Immunol Immunother*, 1993. **37**(1): p. 7-14.
75. Mattijssen, V., et al., *Intratatumoral PEG-interleukin-2 therapy in patients with locoregionally recurrent head and neck squamous-cell carcinoma*. *Ann Oncol*, 1994. **5**(10): p. 957-60.
76. Saiki, I., et al., *Antimetastatic activity of polymeric RGDT peptides conjugated with poly(ethylene glycol)*. *Jpn J Cancer Res*, 1993. **84**(5): p. 558-65.
77. Chun, J.D., et al., *Suppression of an antibody to adenosine-deaminase (ADA) in an ADA-deficient patient receiving polyethylene glycol modified adenosine deaminase*. *Ann Allergy*, 1993. **70**(6): p. 462-6.
78. Nucci, M.L., J. Olejarczyk, and A. Abuchowski, *Immunogenicity of polyethylene glycol-modified superoxide dismutase and catalase*. *J Free Radic Biol Med*, 1986. **2**(5-6): p. 321-5.
79. Rihova, B., *Immunomodulating activities of soluble synthetic polymer-bound drugs*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. **54**(5): p. 653-74.
80. Abuchowski, A., et al., *Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase*. *J Biol Chem*, 1977. **252**(11): p. 3582-6.

81. Seymour, L.W., et al., *The pharmacokinetics of polymer-bound adriamycin*. *Biochem Pharmacol*, 1990. **39**(6): p. 1125-31.
82. Bernkop-Schnurch, A. and M.K. Marschutz, *Development and in vitro evaluation of systems to protect peptide drugs from aminopeptidase N*. *Pharm Res*, 1997. **14**(2): p. 181-5.
83. St'astny, M., et al., *Abnormal differentiation of thymocytes induced by free cyclosporine is avoided when cyclosporine bound to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer carrier is used*. *Transplantation*, 1997. **63**(12): p. 1818-27.
84. Duncan, R., *Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy*. *Anti-Cancer Drugs*, 1992. **3**: p. 175-210.
85. O'Hare, K.B., et al., *Polymeric drug-carriers containing doxorubicin and melanocyte-stimulating hormone: in vitro and in vivo evaluation against murine melanoma*. *J Drug Target*, 1993. **1**(3): p. 217-29.
86. Rihova, B., et al., *Antiproliferative effect of a lectin- and anti-Thy-1.2 antibody-targeted HPMA copolymer-bound doxorubicin on primary and metastatic human colorectal carcinoma and on human colorectal carcinoma transfected with the mouse Thy-1.2 gene*. *Bioconjug Chem*, 2000. **11**(5): p. 664-73.
87. Lu, Z.R., et al., *Synthesis of bioadhesive lectin-HPMA copolymer-cyclosporin conjugates*. *Bioconjug Chem*, 2000. **11**(1): p. 3-7.
88. Rihova, B., N.L. Krinick, and J. Kopecek, *Targetable fotoaktivatable drugs. 3. In vitro efficacy of polymer bound chlorine e6 toward human hepatocarcinoma cell line (PLC/PRF/5) targeted with galactosamine and to mouse splenocytes targeted with anti-Thy 1.2 antibodies*. *J Control Rel*, 1993. **11**: p. 71-87.
89. Pimm, M.V., et al., *Targeting of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-doxorubicin conjugate to the hepatocyte galactose-receptor in mice: visualisation and quantification by gamma scintigraphy as a basis for clinical targeting studies*. *J Drug Target*, 1993. **1**(2): p. 125-31.
90. Kovar, M., et al., *In Vitro and In Vivo Effect of HPMA Copolymer-bound Doxorubicin Targeted to Transferin Receptor of B-cell Lymphoma 38C13*. *J. Drug. Targ.*, 2002. **10**(1): p. 23-30.
91. Flanagan, P.A., et al., *Evaluation of protein-N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugates as targetable drug carriers. 1. Binding, pinocytotic uptake and intracellular distribution of transferrin and anti-transferrin receptor antibody conjugates*. *Biochim Biophys Acta*, 1989. **993**(1): p. 83-91.
92. Jelinkova, M., et al., *Targeting of human and mouse T-lymphocytes by monoclonal antibody-HPMA copolymer-doxorubicin conjugates directed against different T-cell surface antigens*. *J Controlled Release*, 1998. **52**(3): p. 253-70.
93. Kovar, M., et al., *Star structure of antibody-targeted HPMA copolymer-bound doxorubicin: a novel type of polymeric conjugate for targeted drug delivery with potent antitumor effect*. *Bioconjug Chem*, 2002. **13**(2): p. 206-15.
94. Omelyanenko, V., et al., *HPMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates. II. Processing in epithelial ovarian carcinoma cells in vitro*. *Int J Cancer*, 1998. **75**(4): p. 600-8.
95. Peterson, C.M., et al., *Combination chemotherapy and photodynamic therapy with N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer-bound anticancer drugs inhibit human ovarian carcinoma heterotransplanted in nude mice*. *Cancer Res*, 1996. **56**(17): p. 3980-5.

96. Baselga, J., et al., *Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer*. *Semin Oncol*, 1999. **26**(4 Suppl 12): p. 78-83.
97. Billetta, R. and A.F. Lobuglio, *Chimeric antibodies*. *Int Rev Immunol*, 1993. **10**(2-3): p. 165-76.
98. Winter, G. and W.J. Harris, *Humanized antibodies*. *Trends Pharmacol Sci*, 1993. **14**(5): p. 139-43.
99. Burton, D.R. and C.F. Barbas, 3rd, *Human antibodies from combinatorial libraries*. *Adv Immunol*, 1994. **57**: p. 191-280.
100. Persson, M.A., *Combinatorial libraries*. *Int Rev Immunol*, 1993. **10**(2-3): p. 153-63.
101. Pearson, J.W., et al., *Restoration of interferon alpha potentiation of a recombinant ricin A chain immunotoxin following cytoreduction of xenografts of advanced ovarian tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1993. **85**(11): p. 907-12.
102. Ramakrishnan, S. and L.L. Houston, *Prevention of growth of leukemia cells in mice by monoclonal antibodies directed against Thy 1.1 antigen disulfide linked to two ribosomal inhibitors: pokeweed antiviral protein or ricin A chain*. *Cancer Res*, 1984. **44**(4): p. 1398-404.
103. Glennie, M.J., et al., *Emergence of immunoglobulin variants following treatment of a B cell leukemia with an immunotoxin composed of antiidiotypic antibody and saporin*. *J Exp Med*, 1987. **166**(1): p. 43-62.
104. Willingham, M.C., D.J. FitzGerald, and I. Pastan, *Pseudomonas exotoxin coupled to a monoclonal antibody against ovarian cancer inhibits the growth of human ovarian cancer cells in a mouse model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(8): p. 2474-8.
105. Greenfield, L., V.G. Johnson, and R.J. Youle, *Mutations in diphtheria toxin separate binding from entry and amplify immunotoxin selectivity*. *Science*, 1987. **238**(4826): p. 536-9.
106. Starling, J.J., et al., *In vivo antitumor activity of a monoclonal antibody-Vinca alkaloid immunoconjugate directed against a solid tumor membrane antigen characterized by heterogeneous expression and noninternalization of antibody-antigen complexes*. *Cancer Res*, 1991. **51**(11): p. 2965-72.
107. Umemoto, N., H. Kato, and J. Hara, *Molecular design of methotrexate-antibodyconjugates for targeted cancer treatment*. *J Bioact Compat Pol*, 1992. **7**: p. 197-219.
108. Yamaguchi, T., et al., *[Application of immunotoxin in cancer therapy; its usefulness and problems in the future]*. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1989. **16**(4 Pt 2-1): p. 1152-6.
109. Schindler, J., et al., *The toxicity of deglycosylated ricin A chain-containing immunotoxins in patients with non-Hodgkin's lymphoma is exacerbated by prior radiotherapy: a retrospective analysis of patients in five clinical trials*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(2): p. 255-8.
110. Multani, P.S., et al., *Phase II clinical trial of bolus infusion anti-B4 blocked ricin immunoconjugate in patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(11): p. 2599-604.
111. Schnell, R., et al., *Treatment of refractory Hodgkin's lymphoma patients with an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin*. *Leukemia*, 2000. **14**(1): p. 129-35.
112. Hertler, A.A., L.E. Spitler, and A.E. Frankel, *Humoral immune response to a ricin A chain immunotoxin in patients with metastatic melanoma*. *Cancer Drug Deliv*, 1987. **4**(4): p. 245-53.
113. Hall, W.A., *Immunotoxin therapy*. *Neurosurg Clin N Am*, 1996. **7**(3): p. 537-46.

114. Chignola, R., et al., *Sensitivity of human leukemia cells in exponential or stationary growth phase to anti-CD5 immunotoxins. Role of intracellular processing events.* J Immunol, 1994. **152**(5): p. 2333-43.
115. Schnell, R., et al., *A Phase I study with an anti-CD30 ricin A-chain immunotoxin (Ki-4.dgA) in patients with refractory CD30+ Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(6): p. 1779-86.
116. Fan, D., et al., *Targeted therapy against human lung cancer in nude mice by high-affinity recombinant antimesothelin single-chain Fv immunotoxin.* Mol Cancer Ther, 2002. **1**(8): p. 595-600.
117. Chignola, R., et al., *Cytoreductive effects of anti-transferrin receptor immunotoxin in a multicellular tumor spheroid model.* Int J Cancer, 1994. **57**(2): p. 268-74.
118. Chignola, R., et al., *Heterogeneous response of individual multicellular tumour spheroids to immunotoxins and ricin toxin.* Br J Cancer, 1995. **72**(3): p. 607-14.
119. Buchsbaum, D.J., et al., *Human leukemia cell binding and killing by anti-CD5 radioimmunotoxins.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1987. **13**(11): p. 1701-12.
120. Buchsbaum, D.J., *Experimental tumor targeting with radiolabeled ligands.* Cancer, 1997. **80**(12 Suppl): p. 2371-7.
121. Jurcic, J.G., et al., *Radiolabeled anti-CD33 monoclonal antibody M195 for myeloid leukemias.* Cancer Res, 1995. **55**(23 Suppl): p. 5908s-5910s.
122. Manske, J.M., et al., *Cytotoxic effects of anti-CD5 radioimmunotoxins on human tumors in vitro and in a nude mouse model.* Cancer Res, 1988. **48**(24 Pt 1): p. 7107-14.
123. Ito, T., et al., *Intratumoral and whole-body distributions of C110 anti-carcinoembryonic antigen radioimmunotoxin after intraperitoneal and intravenous injection: a quantitative autoradiographic study.* Cancer Res, 1992. **52**(7): p. 1961-7.
124. Melton, R.G. and R.F. Sherwood, *Antibody-enzyme conjugates for cancer therapy.* J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(3-4): p. 153-65.
125. Storm, G., et al., *Release of doxorubicin from peritoneal macrophages exposed in vivo to doxorubicin-containing liposomes.* Biochim Biophys Acta, 1988. **965**(2-3): p. 136-45.
126. Schwendener, R.A., et al., *Evaluation of incorporation characteristics of mitoxantrone into unilamellar liposomes and analysis of their pharmacokinetic properties, acute toxicity, and antitumor efficacy.* Cancer Chemother Pharmacol, 1991. **27**(6): p. 429-39.
127. Sharma, A., et al., *Antitumor efficacy of taxane liposomes on a human ovarian tumor xenograft in nude athymic mice.* J Pharm Sci, 1995. **84**(12): p. 1400-4.
128. Sharma, U.S., S.V. Balasubramanian, and R.M. Straubinger, *Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins.* J Pharm Sci, 1995. **84**(10): p. 1223-30.
129. Straubinger, R.M., et al., *Liposome-based therapy of human ovarian cancer: parameters determining potency of negatively charged and antibody-targeted liposomes.* Cancer Res, 1988. **48**(18): p. 5237-45.
130. Berinstein, N., et al., *Antibody-directed targeting of liposomes to human cell lines: role of binding and internalization on growth inhibition.* Cancer Res, 1987. **47**(22): p. 5954-9.
131. Gijssens, A., et al., *Targeting of the photocytotoxic compound ALPcS4 to HeLa cells by transferrin conjugated PEG-liposomes.* Int J Cancer, 2002. **101**(1): p. 78-85.
132. Mori, A., et al., *In vivo antitumor activity of cis-bis-neodecanoato-trans-R,R-1, 2-diaminocyclohexane platinum(II) formulated in long-circulating liposomes.* Cancer Chemother Pharmacol, 1996. **37**(5): p. 435-44.

133. Kim, D.W., et al., *Modulation of innate immunological factors by STEALTH liposome-encapsulated tumor necrosis factor-alpha in a colon tumor xenograft model*. *Anticancer Res*, 2002. **22**(2A): p. 777-88.
134. Freeman, A.I. and E. Mayhew, *Targeted drug delivery*. *Cancer*, 1986. **58**(2 Suppl): p. 573-83.
135. Fichtner, I., N. Beyer, and U. Folken, *Efficacy of acid labile transferrin and albumin doxorubicin conjugates in in vitro and in vivo breast carcinoma system*, in *Second international symposium on polymer therapeutics* 1997: Kumamoto, Japan.
136. Tsukada, Y., K. Ohkawa, and N. Hibi, *Therapeutic effect of treatment with polyclonal or monoclonal antibodies to alpha-fetoprotein that have been conjugated to daunomycin via a dextran bridge: studies with an alpha-fetoprotein-producing rat hepatoma tumor model*. *Cancer Res*, 1987. **47**(16): p. 4293-5.
137. Dillman, R.O., et al., *Preclinical trials with combinations and conjugates of T101 monoclonal antibody and doxorubicin*. *Cancer Res*, 1986. **46**(10): p. 4886-91.
138. Shih, L.B., et al., *Anthracycline immunoconjugates prepared by a site-specific linkage via an amino-dextran intermediate carrier*. *Cancer Res*, 1991. **51**(16): p. 4192-8.
139. Hurwitz, E., et al., *A conjugate of 5-fluorouridine-poly(L-lysine) and an antibody reactive with human colon carcinoma*. *Bioconjug Chem*, 1990. **1**(4): p. 285-90.
140. Sprincl, L., et al., *Biological tolerance of poly(N-substituted methacrylamides)*. *J Biomed Mater Res*, 1971. **5**(3): p. 197-205.
141. Volfova, I., et al., *Biocompatibility of biopolymers*. *J. Bioact. Compt. Polymers*, 1992. **7**: p. 175-90.
142. Rihova, B., et al., *Immunogenicity of N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide copolymers-potential hapten or drug carriers*. *Folia Microbiol*, 1983. **28**(3): p. 217-27.
143. Flanagan, P.A., R. Duncan, and B. Rihova, *Immunogenicity of protein - N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugates in A/J and B10 mice*. *J. Bioact. Compat. Polymers*, 1990. **151-166**.
144. Rihova, B., *Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers*. *Adv. Drug Del. Rev.*, 1996. **21**: p. 157-176.
145. Simeckova, J., et al., *Activity of Complement in the Presence of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymers*. *J. Bioact. Comp. Polym.*, 1986. **1**: p. 20-31.
146. Rihova, B., et al., *Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules. II. Anti-cancer activity of antibody or (Fab')(2)-targeted conjugates and combined therapy with immunomodulators*. *J Controlled Release*, 2000. **64**(1-3): p. 241-61.
147. Seymour, L.W., et al., *N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers targeted to the hepatocyte galactose-receptor: pharmacokinetics in DBA2 mice*. *Br J Cancer*, 1991. **63**(6): p. 859-66.
148. Omelyanenko, V., et al., *HPMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates. 1. influence of the method of synthesis on the binding affinity to OV-CAR-3 ovarian carcinoma cells in vitro*. *J Drug Target*, 1996. **3**(5): p. 357-73.
149. Rihova, B., et al., *Biocompatibility of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers containing adriamycin. Immunogenicity, and effect on haematopoietic stem cells in bone marrow in vivo and mouse splenocytes and human peripheral blood lymphocytes in vitro*. *Biomaterials*, 1989. **10**(5): p. 335-42.

150. Omelyanenko, V., et al., *Targetable HPMA copolymer-adriamycin conjugates. Recognition, internalization, and subcellular fate.* J Control Release, 1998. **53**(1-3): p. 25-37.
151. Duncan, R., et al., *Anticancer agents coupled to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. I. Evaluation of daunomycin and puromycin conjugates in vitro.* Br J Cancer, 1987. **55**(2): p. 165-74.
152. Putnam, D. and J. Kopecek, *Enantioselective release of 5-fluorouracil from N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-based copolymers via lysosomal enzymes.* Bioconjug Chem, 1995. **6**(4): p. 483-92.
153. Šubr, V., J. Strohal, and K. Ulbrich, *Polymers containing enzymatically degradable bonds. XII. Release of daunomycin and adriamycin from poly-(HPMA) drug carriers in vitro and antitumor activity measured in vivo.* J. Control. Rel., 1992. **18**: p. 123-132.
154. Rihova, B., et al., *Bioaffinity therapy with antibodies and drugs bound to soluble synthetic polymers.* J Chromatogr, 1986. **376**: p. 221-33.
155. Rihova, B., et al., *Doxorubicin bound to a HPMA copolymer carrier through hydrazone bond is effective also in a cancer cell line with a limited content of lysosomes.* J Control Release, 2001. **74**(1-3): p. 225-32.
156. Krinick, N.L., et al., *A polymeric drug delivery system for the simultaneous delivery of drugs activatable by enzymes and/or light.* J Biomater Sci Polym Ed, 1994. **5**(4): p. 303-24.
157. Savage, D.C., *Mucosal microbiota*, in *Mucosal immunology*, P.L. Ogra, et al., Editors. 1999, Academic Press: New York. p. p. 19-30.
158. Berg, R.D., *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract.* Adv Exp Med Biol, 1999. **473**: p. 11-30.
159. Henderson, B., et al., *Cellular microbiology.* 1999, Chichester: Wiley.
160. Boman, H.G., *Innate immunity and the normal microflora.* Immunol Rev, 2000. **173**: p. 5-16.
161. Schaedler, R.W., R. Dubos, and R. Costello, *The Development of the Bacterial Flora in the Gastrointestinal Tract of Mice.* J Exp Med, 1965. **122**: p. 59-66.
162. Hooper, L.V. and J.I. Gordon, *Commensal host-bacterial relationships in the gut.* Science, 2001. **292**(5519): p. 1115-8.
163. Rappuoli, R., *Pushing the limits of cellular microbiology: microarrays to study bacteria-host cell intimate contacts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13467-9.
164. Harmsen, H.J., et al., *Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces.* Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(6): p. 2982-90.
165. Salzman, N.H., et al., *Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria.* Microbiology, 2002. **148**(Pt 11): p. 3651-60.
166. Wilson, M., et al., *Bacterial disease mechanisms.* 2002, Cambridge: Cambridge University Press.
167. Ogra, P.L., et al., *Mucosal Immunology.* 1999, New York: Academic Press.
168. Fujihashi, K., et al., *A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance.* Acta Odontol Scand, 2001. **59**(5): p. 301-8.
169. Mestecky, J., et al., *Advances in mucosal immunology.* 1995, New York/London: Plenum Press.
170. Tlaskalova-Hogenova, H., et al., *Mucosal immunity: its role in defense and allergy.* Int Arch Allergy Immunol, 2002. **128**(2): p. 77-89.

171. Hayday, A., et al., *Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 997-1003.
172. Powrie, F., *T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles*. Immunity, 1995. **3**(2): p. 171-4.
173. Singh, B., et al., *Control of intestinal inflammation by regulatory T cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 190-200.
174. Bos, N.A., J.J. Cebra, and F.G. Kroese, *B-1 cells and the intestinal microflora*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **252**: p. 211-20.
175. Macpherson, A.J., et al., *A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria*. Science, 2000. **288**(5474): p. 2222-6.
176. Fagarasan, S. and T. Honjo, *Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 63-72.
177. Mestecky, J., M.W. Russell, and C.O. Elson, *Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface*. Gut, 1999. **44**(1): p. 2-5.
178. Phalipon, A., et al., *Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo*. Immunity, 2002. **17**(1): p. 107-15.
179. Gustafsson, J.A., *Germfree rearing of rats*. Acta Pathol Microb Scand, 1948. **22**(Suppl 1): p. 1-132.
180. Cebra, J.J., *Influences of microbiota on intestinal immune system development*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(5): p. 1046S-1051S.
181. Umesaki, Y., et al., *Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system*. Infect Immun, 1999. **67**(7): p. 3504-11.
182. Pleasants, J.R., M.H. Johnson, and B.S. Wostmann, *Adequacy of chemically defined, water-soluble diet for germfree BALB/c mice through successive generations and litters*. J Nutr, 1986. **116**(10): p. 1949-64.
183. Sterzl, J., L. Mandel, and R. Stepankova, *The use of gnotobiological models for the studies of immune mechanisms*. Nahrung, 1987. **31**(5-6): p. 599-608.
184. Tlaskalova-Hogenova, H., et al., *Development of immunological capacity under germfree and conventional conditions*. Ann N Y Acad Sci, 1983. **409**: p. 96-113.
185. Vetvicka, V., H. Tlaskalova-Hogenova, and R. Stepankova, *Effects of microflora antigens on lymphocyte migration patterns in germfree and conventional rats*. Folia Biol (Praha), 1983. **29**(6): p. 412-8.
186. Tlaskalova-Hogenova, H., *Gnotobiology as a tool - an introduction*, in *Immunology methods manual*, I. Lefkovits and editors, Editors. 1997, Academic press: London. p. 1524-9.
187. Stepankova, R., et al., *Differences in development of lymphocyte subpopulations from gut-associated lymphatic tissue (GALT) of germfree and conventional rats: effect of aging*. Folia Microbiol (Praha), 1998. **43**(5): p. 531-4.
188. Tlaskalova, H., et al., *The immune response of germ-free piglets after peroral monocontamination with living Escherichia coli strain 086. I. The fate of antigen, dynamics and site of antibody formation, nature of antibodies and formation of heterohaemagglutinins*. Folia Biol (Praha), 1970. **16**(3): p. 177-87.
189. Tlaskalova-Hogenova, H. and R. Stepankova, *Development of antibody formation in germ-free and conventionally reared rabbits: the role of intestinal lymphoid tissue in antibody formation to E. coli antigens*. Folia Biol (Praha), 1980. **26**(2): p. 81-93.
190. Tlaskalova-Hogenova, H., J. Cerna, and L. Mandel, *Peroral immunization of germfree piglets: appearance of antibody-forming cells and antibodies of different isotypes*. Scand J Immunol, 1981. **13**(5): p. 467-72.

191. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets. III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 119-30.
192. Bos, N.A., H.Q. Jiang, and J.J. Cebra, *T cell control of the gut IgA response against commensal bacteria*. Gut, 2001. **48**(6): p. 762-4.
193. Hooper, L.V., et al., *Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 269-73.
194. Kozakova, H., et al., *Differences in enterocyte brush border enzyme activities in ageing rats reared in germ-free and conventional conditions*. Physiol Res, 1998. **47**(4): p. 253-8.
195. Bry, L., et al., *A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1380-3.
196. Slavin, S. and S. Strober, *Spontaneous murine B-cell leukaemia*. Nature, 1978. **272**(5654): p. 624-6.
197. Brissinck, J., et al., *Treatment of mice bearing BCL1 lymphoma with bispecific antibodies*. J Immunol, 1991. **147**(11): p. 4019-26.
198. Kemp, J.D., et al., *Role of the transferrin receptor in lymphocyte growth: a rat IgG monoclonal antibody against the murine transferrin receptor produces highly selective inhibition of T and B cell activation protocols*. J Immunol, 1987. **138**(8): p. 2422-6.
199. Kemp, J.D., et al., *Inhibition of lymphoma growth in vivo by combined treatment with hydroxyethyl starch deferoxamine conjugate and IgG monoclonal antibodies against the transferrin receptor*. Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3817-24.
200. Ulbrich, K., et al., *Polymeric conjugates of drugs and antibodies for site-specific drug delivery*. Macromolecular Symposia, 1996. **103**: p. 177-192.
201. Adkins, B., et al., *Exclusive Th2 primary effector function in spleens but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2347-53.
202. Powell, T.J., Jr., et al., *Isotype distribution and specificity of the antibody response to primary Moloney murine sarcoma virus infection in BALB/c mice*. Viral Immunol, 1989. **2**(2): p. 89-101.
203. Pratt, L.F., et al., *Molecular characterization of a supratypic cross-reactive idiotype associated with IgM autoantibodies*. J Immunol, 1991. **147**(6): p. 2041-6.
204. Vuist, W.M., R. Levy, and D.G. Maloney, *Lymphoma regression induced by monoclonal anti-idiotypic antibodies correlates with their ability to induce Ig signal transduction and is not prevented by tumor expression of high levels of bcl-2 protein*. Blood, 1994. **83**(4): p. 899-906.
205. Kemp, J.D., et al., *Effects of anti-transferrin receptor antibodies on the growth of neoplastic cells*. Pathobiology, 1992. **60**(1): p. 27-32.
206. Batra, J.K., et al., *Antitumor activity in mice of an immunotoxin made with anti-transferrin receptor and a recombinant form of Pseudomonas exotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(21): p. 8545-9.
207. Martell, L.A., et al., *Efficacy of transferrin receptor-targeted immunotoxins in brain tumor cell lines and pediatric brain tumors*. Cancer Res, 1993. **53**(6): p. 1348-53.
208. Weber, R.J. and F.D. Finkelman, *Increased expression of the B lymphocyte receptor for transferrin is stimulated by in vivo crosslinking of cell surface IgD*. Cell Immunol, 1987. **104**(2): p. 400-8.