

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

IN VITRO HODNOTENIE NOVÝCH LIGANDOV

TOLL-LIKE RECEPTOROV III

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Konzultant: PharmDr. Jan Honegr, PhD.

Hradec Králové 2019

Linda Tamášiová

PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z nich som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, dňa 15.5.2019

.....

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa chcela poďakovať svojmu konzultantovi PharmDr. Janovi Honegrovi, PhD. za všetky cenné rady a predovšetkým čas, ktorý mi venoval počas vedenia experimentálnej práce, ako aj počas všetkých konzultácií spojených s priebehom a finalizáciou mojej diplomovej práce. Taktiež sa chcem poďakovať doc. PharmDr. Františkovi Trejtnarovi, CSc. za všetky užitočné rady týkajúce sa formálnych aspektov mojej diplomovej práce.

V neposlednom rade veľká vďaka patrí mojej rodine a blízkym za podporu počas celého štúdia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Študentka: Linda Tamášiová

Školiteľ: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Názov diplomovej práce: In vitro hodnotenie nových ligandov Toll-like receptorov III

Výskum nových ligandov s potenciálnou imunomodulačnou aktivitou je nástrojom k vývoju nových imunologických adjuvancií pre použitie do vakcín, alebo ako samostatných imunomodulátorov v terapii rôznych ochorení. Cieľom diplomovej práce bolo analyzovať schopnosti nových ligandov stimulovať toll like receptory 4 (TLR4) a na základe stanovenej imunomodulačnej aktivity posúdiť potenciál ďalšieho využitia týchto látok. Analýza prebiehala na modifikovaných bunkových líniach exprimujúcich TLR4, ktorých aktivácia bola následne zisťovaná s použitím kolorimetricko-enzymatickej reakcie. U šiestnástich nových látok bola zisťovaná miera aktivácie receptorov TLR4 v porovnaní so štandardným agonistom. Výsledky ukázali u niekoľkých z testovaných látok významnú agonistickú aktivitu voči TLR4, čo svedčí o tom, že sú aktivujúcimi ligandmi testovaného receptoru. Avšak vzhľadom k nízkej rozpustnosti nie sú niektoré z týchto látok vhodnými kandidátmi pre ďalšie využitie a testovanie. Na základe zváženia všetkých parametrov sa javia zo všetkých hodnotených látok, ktoré vykazovali agonistickú aktivitu, ako perspektívne ligandy k ďalšiemu hodnoteniu látky SB003 a SB010. Látka SB005 vykazovala aktivitu parciálneho antagonistu a je teda vhodným kandidátom pre ďalšie skúmanie antagonistického potenciálu študovanej skupiny látok voči TLR4.

Kľúčové slová

adjuvanciá, TLR4, vakcíny, imunomodulátory

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Linda Tamášiová

Supervisor: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Title of diploma thesis: In vitro evaluation of novel Toll-like receptor ligands III

Research on new ligands with potential immunomodulatory activity is a tool for the development of new immunological adjuvants for use in vaccines, or as separate immunomodulators in the treatment of various diseases. The aim of this thesis was to analyze the ability of new ligands to stimulate toll-like receptors 4 (TLR4) and to assess the potential for further use of these substances based on established immunomodulatory activity. The analysis was performed on modified TLR4-expressing cell lines whose activation was subsequently detected using a colorimetric-enzymatic reaction. Sixteen new substances were tested for TLR4 receptor activation in comparison with a standard agonist. The results showed a significant TLR4 agonistic activity in several of the test substances, suggesting that they are activating ligands of the receptor tested. However, due to their low solubility, some of these substances are not suitable candidates for further use and testing. Taking all parameters into consideration, among of all of the evaluated substances that showed agonistic activity, ligands SB003 and SB010 appear to be perspective ligands for further evaluation. Substance SB005 exhibited partial antagonistic activity and is therefore a suitable candidate for further investigation of TLR4 antagonistic potential of the tested group of compounds.

Key words

adjuvants, TLR4, vaccines, immunomodulators

OBSAH

1	ZOZNAM SKRATIEK.....	9
2	ÚVOD	12
3	TEORETICKÁ ČASŤ	1
3.1	Adjuvanciá.....	1
3.2	Klasifikácia adjuvancií	2
3.2.1	Klasické adjuvanciá	4
3.2.2	Nové adjuvanciá	8
3.3	Využitie adjuvancií	12
3.4	Bezpečnostný profil	14
3.5	Mechanizmus účinku adjuvancií	15
3.5.1	Depotný mechanizmus účinku	17
3.5.2	Aktivácia buniek imunitného systému	19
3.6	Význam TLR4 pre imunomoduláciu rakoviny.....	20
3.6.1	TLR4 agonisti	20
3.6.2	Imunomodulácia pomocou TLR4 v terapii nádorov	24
3.6.3	Polymorfizmus génov pre TLR	25
3.6.4	Preventívne a terapeutické vakcíny schválené pre imunoterapiu rakoviny	26
4	CIEĽ PRÁCE.....	29
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	30
5.1	Materiál	30

5.1.1	Bunkový model.....	30
5.1.2	Prístrojová technika.....	30
5.1.3	Chemikálie	30
5.1.4	Analyzované látky.....	31
5.2	Metódy	35
5.2.1	Príprava bunkových kultúr a ich udržiavanie.....	35
5.2.2	Príprava roztokov	36
5.2.3	Príprava roztokov analyzovaných látok.....	37
5.2.4	Príprava štandardov TLR4.....	38
5.3	In vitro screeningová analýza agonizmu ligandov hTLR4.....	39
5.3.1	Princíp analýzy.....	39
5.3.2	Postup analýzy.....	40
5.4	In vitro screeningová analýza antagonizmu ligandov hTLR4.....	42
5.5	Stanovenie EC50 štandardného agonistu	44
5.6	Stanovenie IC 50 štandardného antagonistu	45
6	VÝSLEDKY.....	47
6.1	In vitro screeningová analýza agonizmu ligandov hTLR4.....	47
6.2	In vitro screeningová analýza antagonizmu ligandov hTLR4.....	48
6.3	Stanovenie EC50 štandardného agonistu	49
6.4	Stanovenie IC 50 štandardného antagonistu	51
7	DISKUSIA.....	53

8	ZÁVER	56
9	LITERATÚRA	57

1 ZOZNAM SKRATIEK

AGP - aminoalkyl glukosaminid 4-fosfát

APC - antigen prezentujúca bunka

bFGF - základný fibroblastový rastový faktor

CD14 - klaster diferenciácie 14

CFA - kompletne Freundové adjuvans

CTL - cytotoxická T-lymfocytová odpoveď

DAMP - molekulárne vzory spojené s nebezpečenstvom

DC - dendritové bunky

DM - deriváty sukcinimidu

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DTaP - vakcína: diftéria, tetanus, čierny kašeľ

EMA - Európska lieková agentúra (European Medicines Agency)

FasL - Fas ligand

GC - galaktosylceramid

GLA - SE - glukopyranozyl lipid A

GM - CSF - faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov

HA - hemaglutinín

Her / neu - ľudský epidermálny receptor/ protoonkogén

HMGB1 - High-Mobility Group Box 1

HPV - ľudský papillomavírus

HSP - proteín teplotného šoku

IFN - interferón

IgE - imunoglobulín E

IgM - imunoglobulín M

IL - interleukín

IRF3 - interferónovo regulačný faktor 3

LLC - Lewisov karcinóm pľúc

LPS - lipopolysacharid

LRR - repetícia bohatá na leucín

MAGE - A3 - antigén asociovaný s melanómom 3

MDP - muramyldipeptid

MHC - hlavný histokompatibilný komplex

MPL - monophosphoryl lipid A

NA - neuraminidáza

NALP3 - komplex inflamazómu 3

NeuGcGM3 - gangliozid asociovaný s nádorom

NK - T - prirodzené cytotoxické T- bunky

NLRP3 - inflamazomová dráha proteínu 3

NSCLC - nemalobunkový karcinóm pľúc

o/v - olej vo vode

ODN - oligodeoxynukleotid

PAMP - molekulárne vzory spojené s patogénom

PLG - laktid-ko-glykolid

PRRs - receptory rozpoznávania patogénov

SNP - jednonukleotidový polymorfizmus

TDM - trehalosa dimykolát

TLR - toll-like receptor

TNF - tumor nekrotizujúci faktor

v/o - voda v oleji

VLP - častice podobné vírusu

2 ÚVOD

Vakcinácia predstavuje jediný účinný a časom jednoznačne dokázaný spôsob, ako efektívne chrániť celú ľudskú populáciu pred nebezpečnými a často smrteľnými infekciami. Celosvetovým vakcinačným úsilím je možné niektoré infekcie úplne vyhubiť. To sa potvrdilo v prípade infekcie pravých kiahní, ktoré sa podarilo vakcináciou úspešne eradikovať. Je to platné jedine za predpokladu, že očkovaní budú všetci ľudia s výnimkou jedine tých, ktorým to nedovoľuje zdravotný stav. Benefity vakcinácie mnohonásobne prevyšujú možné riziká nežiadúcich účinkov. Strach z nežiadúcich účinkov a obavy zo zloženia vakcín spôsobujú, že sa dnes stáva trendom nepodať vakcínu vôbec, alebo akokoľvek upraviť postupy vakcinácie (Calandrillo 2004; Salmon et al. 2005). To prináša veľké riziko, ktoré vedie k návratu nebezpečných infekcií, ktoré sa v minulosti podarilo vakcináciou úspešne potlačiť (Phadke et al. 2016).

Z uvedených dôvodov sa výskum vakcín upriamuje na adjuvanciá, ktoré patria spolu s antigénom medzi hlavné komponenty vakcín. Adjuvanciá zvyšujú imunogenitu antigénu, umožňujú použitie nižších dávok antigénu, ale hlavne ovplyvňujú kvalitu imunitnej odpovede a tým vytvorenie dlhodobej imunitnej odpovede, špecifickej pre patogén. Najnovšie výskumy sa upriamujú na adjuvanciá zo skupiny imunomodulátorov, ktorých mechanizmus účinku predstavuje aktiváciu Toll-like receptorov (TLR), ktorá vedie až k tvorbe imunitnej odpovede špecifickej pre antigén. Výskum nových ligandov aktivujúcich TLR receptory je preto dôležitým krokom k vývoji nových potenciálnych adjuvancií. Tým môžeme pomôcť prekonať mnohé výzvy vo vakcinácií, napr. u vakcín cielených na patogény, ale aj v imunoterapii autoimunitných a onkologických ochorení (O'Hagan 2000).

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Adjuvanciá

Adjuvanciá sú látky, ktoré sú viac ako 80 rokov pridávané do vakcín za účelom zlepšenia ich účinnosti a zvýšenia imunogenity antigénu. Antigén vo vakcíne určuje špecifickosť imunitnej odpovede a adjuvancium pomáha túto odpoveď zvyšovať. Použitie adjuvancia je potrebné hlavne pri úplne alebo čiastočne inaktivovaných vakcínach a taktiež u moderných vakcínach z vysoko purifikovaných antigénov. Takéto typy vakcín vyžadujú prítomnosť adjuvancia na zvýšenie antigén-špecifickej imunitnej odpovede. Patogény obsahujú vnútorné spúšťače imunitnej obrany PAMP (pathogen-associated molecular patterns), ktoré sú rozpoznávané bunkami vrodeneho imunitného systému a sú potrebné pre získanie imunitnej odpovede. Adjuvanciá poskytujú prvky, ktoré sú normálne prítomné vo väčšine patogénov, ale vo vysoko purifikovanom antigéne sa už nenachádzajú. Tým dochádza k stimulácií vrodenej imunitnej odpovedi. Inaktivované vakcíny počas inaktivačného procesu taktiež strácajú (úplne alebo čiastočne) patogénne znaky mikroorganizmov a ich miera prirodzene stimulovať imunitný systém môže byť nedostačujúca k indukcii dlhodobej imunity. Indukcia dlhodobej imunitnej odpovede zahŕňa moduláciu alebo napodobňovanie interakcie medzi PAMP a vrodеныmi receptormi TLR (toll-like receptors), podporu intracelulárnych signalizačných dráh, zvýšené vychytávanie antigénu pomocou APCs (antigen-presenting cells), up-reguláciu alebo modifikáciou komunikácie na povrchovo-bunkovej úrovni medzi APC a T bunkami. U živých vakcín, ktoré sa stimulujú prirodzenie, použitie adjuvancia nie je potrebné (Garçon et al. 2011; Oberdan et al. 2011).

„Adjuvanciá, ktoré sú v súčasnosti všeobecne používané, či už u človeka alebo u zvierat, boli z väčšej časti vyvinuté empiricky, bez jasného pochopenia ich bunkových a molekulárnych mechanizmov účinku. V poslednej dobe údaje naznačujú, že väčšina adjuvancií, ak nie všetky, zvyšujú T a B bunkové odpovede zapojením komponentov vrodenej imunity skôr než priamymi účinkami na samotné lymfocyty“ (Coffman et al. 2010).

Vývoj nových adjuvancií a ich kombinácií môže pomôcť prekonať mnohé výzvy v modernom očkovaní, napr. u vakcín cielených na komplexné patogény a vakcín u imunokompromitovaných jedincov. Adjuvanciá používané v profylaktických vakcínach

môžu taktiež zohrávať dôležitú úlohu v imunoterapii a najmä terapii rakoviny (Garçon et al. 2011).

Medzi mnohé efektívne vakcíny patria živé vakcíny, ktoré nesú oslabené varianty cieleného patogénu, ktoré po podaní vyvolávajú dlhodobú imunitu podobnú imunite, ktorú pozorujeme u jedincov po prekonaní prirodzenej infekcie. Výsledkom podania živej oslabenej vakcíny je mierna, zvyčajne asymptomatická infekcia. Pre veľa patogénov sa adekvátne účinné oslabené vakcíny nepodarilo vyvinúť, alebo takýto typ vakcinácie (napr. proti chrípke) je nevyužiteľný z dôvodu, že prirodzená infekcia sama o sebe nevytvorí dostatočnú dlhodobú imunitu. Na očkovanie takýmito organizmami sa používajú neživé antigény, či už z celých inaktivovaných vírusov a mikroorganizmov, až po jednotlivé rekombinantné antigény. Takéto antigény, sú vo väčšine prípadov slabo imunogénne a vyžadujú prídanie adjuvancia, ktoré na základe protilátok a funkcie efektorových T buniek pomáha stimulovať ochrannú imunitu (Coffman et al. 2010).

Adjuvanciá vo vakcínach dovoľujú použiť menšie množstvo antigénu v porovnaní s neadjuvantnými vakcínami, čo prináša radu výhod. Znížením množstva antigénov v kombinovaných vakcínach sa zníži pravdepodobnosť kompetície medzi antigénom a supresie epitopu špecifického pre nosiča. Okrem toho, znížením množstva antigénu potrebného na ochranu, je možné znížiť náklady na vakcíny a zvýšiť tak dostupnosť očkovacích látok. Na druhej strane, vysoké náklady na niektoré moderné adjuvanciá môžu vyrovnávať úspory, ktoré boli dosiahnuté znížením spotreby antigénu a paradoxne celkové náklady na očkovanie sa zvyšujú (O'Hagan 2000).

3.2 Klasifikácia adjuvancií

Adjuvanciá môžeme klasifikovať na základe niekoľkých kritérií, ako je napr. ich chemická štruktúra, formulácia a rozpoznávanie receptorov. Najnovšia klasifikácia ich rozdeľuje do dvoch tried na základe ich dominantného mechanizmu účinku, a to na distribučné systémy a imunomodulátory. Imunomodulátory zvyšujú imunitnú odpoveď vrodeneho imunitného systému aktiváciou rôznych tried receptorov PRR (pattern recognition receptors), hlavne TLR. Druhá skupina adjuvancií klasifikovaných ako distribučné systémy, podporuje uptake antigénu pomocou APCs (Banday et al. 2015). Rozdelenie adjuvancií znázorňujú nasledovné tabuľky (tab. 1, tab. 2).

Tab. 1 Klasifikácia hlavných tried adjuvancií a ich zástupcovia

TRIEDA	ADJUVANCIÁ
Distribučné systémy	hliníkové soli, AS04, fosforečnan vápenatý, lipozómy, virozómy, emulzie (MF59, montanid), VLP (virus-like particles), ISCOMs
Imunostimulanty	CpG oligodeoxynukleotidy (CpG ODN), saponíny (QS-21, quilly), chemokíny, cytokíny, MDP (muramyl dipeptid), TLR ligandy: MPLA (monophosphoryl lipid A) a deriváty

Modifikované podľa: Temizoz et al. (2016); Banday et al. (2015)

Tab. 2 Ďalšie adjuvanciá používané vo vakcínach

TRIEDA	ADJUVANCIUM
Bakteriálne produkty	LPS (lipopolysaccharide), peptidoglykány, TDM (trehalose dimycolate), MDP, MLP viažuci sa na TLR
Cytokíny	IFN-g, IFN-a, IL-1, IL-6, IL-12 a GM-CSF
Uhľovodíky	gama-inulin, glukany, xylany, acemannan aktivujúce humorálnu aj bunkovú imunitu
Polymérové mikrosféry	(DL-lactide-coglycolide) (DL-PLG), polyanhydridy- biodegradovateľné a biokompatibilné mikrosféry ktoré inkorporujú antigény rôznych typov

Modifikované podľa: Banday et al. (2015)

Staršia literatúra klasifikuje adjuvanciá do dvoch skupín, a to na klasické a nové adjuvanciá. Klasické adjuvanciá ako napr. hliníkové soli, sú najdlhšie používané látky, ktoré oproti novým adjuvanciám nedokážu poskytnúť dostatočnú imunitnú odozvu. Do skupiny nových adjuvancií sa radia aj adjuvantné systémy, ktoré sú tvorené kombináciou už známych adjuvancií.

V súčasnosti je vývoj vakcín s novými adjuvanciami podporovaný z viacerých dôvodov. Klasické hliníkové adjuvanciá používané v tradičných vakcínach sú schopné indukovať slabšie Th2 odpovede s produkciou IgM, IgE a určitých cytokínov, ale nedokážu produkovať silnejšiu a robustnejšiu Th1 alebo cytotoxickú T-lymfocytovú odpoveď (CTL) (Pashine et al. 2005). Klasické adjuvanciá sú tiež neúčinné pri použití proti najnáročnejším patogénom spôsobujúcim infekčné ochorenia, ako je napr. AIDS, malária, tuberkulóza, alebo proti alergickým a autoimunitným ochoreniam. Optimálnu účinnosť vakcín proti týmto ochoreniam sa podarilo zabezpečiť použitím adjuvantných systémov (ako napr. AS01 a AS04). To znamená, že takáto vakcína musí okrem iných možných reakcií nevyhnutne vyvolať silnú Th1 reakciu. Neustále snahy o pochopenie mechanizmu, prostredníctvom ktorého adjuvanciá spúšťajú odozvu T-buniek, zohráva kľúčovú úlohu vo vývoji vakcín novej generácie. Táto výzva spočíva vo vyváženom používaní distribučných systémov a imunostimulantov takým spôsobom, aby sa vytvorila trvalá a robustná imunitná reakcia (Banday et al. 2015).

Niekoľko príkladov najviac používaných zástupcov zo skupiny klasických a nových adjuvancií je uvedených v ďalších oddieloch (vid' Odd. 3.2.1, 3.2.2).

3.2.1 Klasické adjuvanciá

Virozómy

Virozómy sú sférické vírusové častice, ktoré nesú vo svojej membráne vírusové glykoproteíny hemaglutinín (HA) a neuraminidázu (NA), pochádzajúce z vírusu chrípky. Neobsahujú genetický materiál ani nukleokapsid, preto nie sú schopné replikácie a infikovania. Vďaka tomu, že si virozómy zachovávajú schopnosť fúzovať (ako ich rodičovské kmene), môžu byť upravené tak, aby niesli nádorovo špecifické antigény a/alebo adjuvanciá do APC, a tým zlepšili účinnosť vakcín. Mechanizmus účinku virozómov zahŕňa priamu interakciu častíc virozómu s APCs, pohltenie antigénu

endocytózou a prezentáciu antigénu T bunkám po proteolytickej degradácii. Existujúca imunita proti chrípke môže predstavovať ďalší dôležitý determinant imunostimulačného účinku virozómov. V súčasnosti existujú dve očkovacie látky obsahujúce virozóm ako adjuvancium, ktoré sú povolené v niektorých európskych a mimoeurópskych krajinách (Garçon et al. 2011; Temizoz et al. 2016).

U chrípkových virozómov, ktoré sa používajú v mnohých protirakovinových vakcínach sa preukázalo, že indukujú nádorovo špecifické protilátky a T lymfocyty a najmä reakcie cytotoxických T-lymfocytov (CTL). Výsledky z klinickej štúdie vo fáze I zahŕňajúce pacientov s metastázujúcim karcinómom prsníka (Her/neu+) preukázali, že terapeutická očkovacia látka proti rakovine formulovaná s Her/neu peptidom obsahujúcim virozóm chrípky je dobre tolerovaná a je schopná indukovať protilátku špecifickú pre Her/neu a bunkové imunitné odpovede, spolu so znižujúcim sa počtom regulačných T buniek (Treg buniek) v periférnej krvi očkovaných pacientov (Temizoz et al. 2016).

Lipozómy

Lipozómy sú syntetické fosfolipidové vezikuly pozostávajúce z lipidových vrstiev, ktoré dokážu zapuzdriť antigén vo svojej membráne a tým fungovať ako nosič. Štruktúru lipozómov tvoria fosfolipidy, ktoré svojimi hydrofilnými hlavami a hydrofóbnymi chvostami po dispergovaní vo vode tvoria malé sférické tvary, ktoré uzatvárajú vodné jadro (Garçon et al. 2011). Napriek tomu, že sa lipozómy vyznačujú všestrannosťou, biologickou kompatibilitou a biologickou odbúrateľnosťou a mohli by byť vhodnými systémami na adjuvantné použitie do vakcín, ich použitie v humánnych vakcínach je obmedzené kvôli vysokým nákladom a obavám o stabilnej výrobe lipozómov (Temizoz et al. 2016).

Viacere štúdie na zvieratách používajúce lipozómy ako adjuvanciá alebo nádorovo špecifické činidlá na dodávanie antigénu ukázali, že protirakovinové vakcíny s lipozómami majú vynikajúcu protinádorovú účinnosť oproti nelipozomálnym očkovacím látkam. V štúdiu u myšacieho modelu neuroblastómu bolo preukázané, že lipozomálne podávanie CpG oligodeoxynukleotidov (CpG ODNs) špecificky na nádory poskytuje silné protinádorové účinky, zatiaľ čo samotná skupina CpG ODNs nedokázala indukovať taký protinádorový účinok. U myši napadnutých bunkami Lewisovho karcinómu pľúc

(LLC) sa zistilo, že lipozomálne vakcíny s obsahom základného fibroblastového rastového faktora (bFGF) spolu s adjuvanciom monofosforyl lipid A (MPLA) navyše indukujú protinádorovú imunitu indukciou nádorovo špecifickej protilátky a imunitnej odozvy typu Th1. V ďalšej štúdií poskytlo lipozomálne dodávanie lipidového antigénu α -galaktozylceramidu (α -GC) silné protinádorové imunitné reakcie v prevencii pľúcnych metastáz u 65% myši nesúcich nádor B16 F10, prostredníctvom špecifickej aktivácie NK-T lymfocytov (NKT) v slezine. Klinické skúšky u pacientov s folikulárnym lymfómom, ktoré používajú lipozómy s tumorovo špecifickým antigénom (Id) vo vakcíne preukázali, že lipozomálne vakcíny sú potenciálne bezpečné a schopné indukovať dlhodobé antigénovo špecifické CD4+ a CD8+ T bunkové odpovede (Temizoz et al. 2016).

Hliníkové adjuvanciá

Z obmedzeného počtu adjuvancií, ktoré boli schválené na humánne použitie, sú najbežnejšie používané práve hliníkové adjuvanciá zahŕňajúce fosforečnan hlinitý alebo hydroxid hlinitý (Hogenesch 2012). Napriek kontroverzným výsledkom o mechanizme pôsobenia sa napokon zdá, že hlinité soli fungujú prostredníctvom tvorby depa v mieste aplikácie vakcíny, odkiaľ sa antigén postupne uvoľňuje, aby umožnil predĺženú interakciu s imunitnými bunkami a spôsobil tak indukciu trvale antigénovo špecifických odpovedí B a T buniek po dlhší čas (Temizoz et al. 2016). Hliníkové adjuvanciá boli doposiaľ použité v rôznych očkovacích látkach vrátane protilátok proti diftérii, čiernemu kašľu, tetanu, HPV, hemofilovej infekcii typu B a vírusu hepatitídy A (Hogenesch 2012).

Niektoré štúdie najnovšie naznačili, že apoptóza predstavuje ďalší mechanizmus, ktorým hliníkové soli pôsobia. Konkrétne štúdie ukázali, že hostiteľská DNA, ktorá je uvoľnená kvôli bunkovej smrti indukovanej hliníkovými adjuvanciami je rozpoznávaná imunitným systémom a indukuje tvorbu protilátok typu IgE pomocou interferónovo regulačného faktora 3 (IRF3), zatiaľ čo reakcie protilátok typu IgG sú indukované nezávisle od IRF3. Preto uvoľňovanie hostiteľskej DNA spôsobené apoptózou môže fungovať ako DAMP a sprostredkovať adjuvantnú aktivitu hliníka (Marichal et al. 2011; Temizoz et al. 2016). Viaceré správy preukázali, že hliníkové adjuvanciá môžu indukovať trvalé antigénovo špecifické B bunkové odpovede a pri použití v kombinovaných adjuvantných látkach, ako je napr. AS04, dokážu indukovať zmiešané antigén-špecifické Th1/Th2 odpovede. Napriek tomu u hliníkových adjuvancií nedochádza k dostatočne silnej indukcii Th1 typu bunkovej imunitnej odpovedi, u

ktorých bolo preukázané, že zvyšujú protinádorovú imunitnú odpoveď. Z toho dôvodu zostáva použitie hliníkových adjuvancií v protirakovinových vakcínach obmedzené. Avšak nedávne klinické štúdie u pacientov s pokročilým nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC) ukázali, že hliníkové adjuvanciá, v protirakovinovej vakcíne zameranej na gangliozid asociovaný s nádorom (NeuGcGM3), sú schopné indukovať vysoké hodnoty IgM a IgG typov protilátok proti NeuGcGM3, ktoré korelovali s predĺženým prežitím očkovaných pacientov (Marichal et al. 2011; Temizoz et al. 2016).

Emulzie

Emulzie sú založené na kombinácii dvoch nemiešateľných zložiek, typicky olej a voda, kde je jedna látka rozptýlená v druhej. Kvôli tejto inherentnej inkompatibilite musia byť emulzie stabilizované pridaním povrchovo aktívnych látok alebo emulgátorov, ako napr. Tween 80 alebo Span 85. Existujú dva typy emulzií; voda v oleji (v/o) a olej vo vode (o/v). Oba typy emulzií indukujú vysoké protilátkové odpovede, napriek tomu emulzie o/v vykazujú vyššiu reaktogenitu. Tieto emulzie sú úspešne použité ako adjuvanciá v licencovaných vakcínach (Garçon et al. 2011).

Emulzný adjuvans Montanid

Montanid patrí do skupiny emulzných adjuvancií (v/o), ktoré sa pripravujú s použitím povrchovo aktívnych látok z rodiny manid monooleátov. Ukázalo sa, že Montanid účinkuje podobne ako aj hliníkové adjuvanciá prostredníctvom tvorby depa v mieste aplikácie injekcie, čím umožňuje postupné uvoľňovanie antigénu a následne indukciu dlhodobej imunitnej odpovede (Temizoz et al. 2016).

Zistilo sa, že v prípade Montanidu ISA 51 tvorba depa s pretrvávajúcim antigénom v mieste podania vakcíny zoslabuje tumor špecifické CTL reakcie prostredníctvom apoptózy indukovanej IFN- γ a Fas ligandom (FasL). Adjuvancium ISA 51 je známy tiež ako nekompletné Freudovo adjuvancium (IFA). Montanidy ISA 720, ISA 51 (IFA) použité vo vakcínach boli podrobené klinickým štúdiám u ľudí a Montanidy ISA 206 a ISA 50 použité vo veterinárnych vakcínach. V klinických štúdiách zahrňujúcich niekoľko rôznych typov rakoviny, ako je melanóm a nemalobunkový karcinóm (NSCLC) sa ukázalo, že použitie Montanidov ISA 720 a ISA 51 v protirakovinovej vakcíne indukuje antigén-špecifické protilátky a T-bunkové odpovede

korelované s predĺženým prežitím imunizovaných pacientov. Toto zistenie naznačuje, že pomocné látky na báze Montanidu môžu byť sľubné adjuvanciá v protirakovinových vakcínach (Temizoz et al. 2016).

Emulzný adjuvans MF59

MF59 je emulzné adjuvancium (o/v) na báze skvalénu, založené na emulzifikácii skvalénu pomocou povrchovo aktívnych látok ako je Tween 80 a Span 85 a tvorbe stabilných nanočastíc s priemerom 250 nm. Mechanizmus účinku MF59 zahŕňa indukciu uvoľňovania ATP zo svalov v mieste aplikácie vakcíny, čo môže pôsobiť ako DAMP a zvyšovať antigén-špecifické imunitné odpovede (Temizoz et al. 2016). V porovnaní s adjuvanciami hliníka, MF 59 vyvoláva silnejšiu imunitnú odozvu a vyššiu produkciu protilátok a reakcie T-buniek (Garçon et al. 2011).

V roku 1997, po registrácii MF 59 v chrípkovej vakcíne bolo preukázané, že MF 59 sa vyznačuje dobrým bezpečnostným profilom a imunogenitou. MF59 je dnes prítomná v licencovanej sezónnej a pandemickej chrípkovej vakcíne. Vakcíny s MF59 sú schopné poskytnúť ochranné imunitné reakcie proti chrípke u starších ľudí a detí, prostredníctvom indukcie antigén-špecifickej protilátky a zmiešanej imunitnej odpovede typu Th1/Th2. Použitie MF59 je však obmedzené u vakcín proti rakovine, pretože môže vyvolať nielen výhodné reakcie typu Th1, ale tiež nežiadúce imunitné reakcie typu Th2 na protinádorovú imunitu. Zistilo sa však, že kombinácia MF59 s CpG ODN po použití ako adjuvancium v terapeutickvej vakcíne proti rakovine, indukuje protinádorovú imunitnú odpoveď špecifickú pre melanóm a predlžuje prežitie myši nesúcich nádor v modeli myšacieho melanómu (Garçon et al. 2011; Temizoz et al. 2016).

3.2.2 Nové adjuvanciá

ISCOMs

Imunostimulačné komplexy (ISCOMs) sú častice, zložené zo saponínov (z Quillaja Saponaria), fosfolipidov a cholesterolu, tvorené klieťkovou štruktúrou s priemerom približne 40 nm. Ich štruktúra im umožňuje efektívne dodávať antigén do buniek a následne indukovať bunkovú i dlhodobú humorálnu imunitnú odpoveď, antigén špecifickým spôsobom. Mechanizmus účinku ISCOMs zahŕňa priamu interakciu s DC na dosiahnutie skríženej prezentácie antigénov, čo umožňuje indukciu robustných antigén-

špecifických odpovedí CD4+ a CD8+ T-buniek (Temizoz et al. 2016). Nedávne štúdie naznačili, že adjuvancium ISCOMATRIX môže aktivovať inflamazomovú dráhu proteínu 3 (NLRP3) obsahujúcu pyrolín (NLR), ktorá spôsobuje produkciu IL-1 β a IL-18 u myši. Avšak jedine IL-18 má podiel na mechanizme účinku ISCOMATRIXu ako vakcínového adjuvancia a čiastočne aj TNF-a, u ktorého taktiež prostredníctvom inflamazómu NLRP3 dochádza k produkcii IL-18 (Sanders et al. 2005).

Ďalšie predklinické testy na myšiach naznačili, že vývoj účinnejších a sľubných adjuvancií v protirakovinovej vakcíne sa dá dosiahnuť kombináciou ISCOMs so súčasne dostupnými adjuvanciami. Tieto predklinické štúdie naznačili, že použitie ISCOMs spolu s ďalšími adjuvanciami, ako napr. s ligandmi TLR9, CpG ODN vyvolalo výraznú protinádorovú imunitu a ochranu u myši nesúcich nádor (Temizoz et al. 2016).

QS-21

Adjuvancium QS-21 je látka založená na báze saponínu, pozostávajúca zo saponínov extrahovaných zo stromu Quillaja Saponaria. QS-21, vyznačujúci sa nízkou toxicitou, je schopný indukovať antigén špecifické protilátky, CTL a Th1 typy imunitnej odpovede (Temizoz et al. 2016). Nedávno sa v štúdiu u myši preukázalo, že QS-21 aktivuje inflamazóm NLRP3 a indukuje produkciu IL-1 β a IL-18. Skutočne myši s deficitom NLRP3 vykazovali zvýšenie antigénovo špecifických protilátok a odpovedí T buniek v porovnaní s myšami divokého typu, čo naznačuje negatívnu regulačnú úlohu inflamazómu NLRP3 pri imunitnej odpovedi indukovanej QS-21 (Marty-Roix et al. 2016).

V klinických štúdiách sa ukázalo, že QS-21 je dobre tolerovaným a imunogénnym adjuvanciom, schopným indukovať antigén-špecifické protilátkové odpovede. Zlepšenie jeho imunogenity je možné dosiahnuť kombinovaným použitím QS-21 s ďalšími adjuvanciami, ako napr. MPLA a CpG ODN. Z toho dôvodu je dnes snaha vyvinúť optimálne kombinácie QS-21 s rôznymi adjuvanciami pre použitie v protirakovinových vakcínach (Temizoz et al. 2016).

Adjuvantné systémy

Adjuvantné systémy sú tvorené rozličnými kombináciami doteraz známych adjuvancií s cieľom vyvinúť účinnejšie vakcíny, schopné silne indukovať antigén-spezifickú imunitnú odpoveď. Vývoj rekombinantných adjuvantných vakcín, ktorý bol zahájený spoločnosťou GlaxoSmithKline Biologicals pred viac ako dvadsiatimi siedmimi rokmi, viedol k technológii adjuvantných systémov. Adjuvantná systémová technológia zahŕňala starostlivé navrhnutie kombinácie adjuvancií so synergickým alebo aditívnym účinkom s cieľom zlepšiť imunitnú odpoveď. Koncept adjuvantných systémov v už existujúcich vakcínach alebo látkach v klinických štúdiách ukázal lepšie zacielenie účinku, lepšiu humorálnu a celulárnu imunitu, dlhodobejšie pretrvávanie skríženej imunitnej odpovede, zlepšenie pamäťovej imunity, indukciu ochrany voči komplexným patogénom a lepšiu imunitnú odpoveď u imunokompromitovaných pacientov (Leroux-Roels 2010).

V súčasnosti sú adjuvantné systémy spoločnosti GlaxoSmithKline tvorené kombináciami dostupných adjuvancií, ako je napr. MPL, CpG ODN a hliníkovými adjuvanciami. Adjuvantné systémy, ktoré sú povolené vo vakcínach pre humánne použitie sú, AS03 (pre vakcíny proti chrípke) a AS04 (pre vakcíny proti vírusu hepatitídy B a HPV) a niekoľko ďalších adjuvantných systémov pre použitie v protirakovinových vakcínach je vo fáze predklinického alebo klinického výskumu. Adjuvantný systém AS02, zložený z MPL, QS-21 a emulzie (o/v), bol testovaný v protirakovinovej vakcíne u pacientov s nádormi MAGE-A3+, ako je melanóm a nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC). Tieto klinické štúdie ukázali, že AS02 je schopný indukovať MAGE-A3 špecifickú protilátkovú a T bunkovú odpoveď. Okrem toho sa uvádza, že AS15 zložený z CpG ODN, MPL, QS-21 podrobený klinickým štúdiám fázy II a III zahŕňajúcich pacientov s melanómom alebo karcinómom NSCLC, je imunogénny. Hoci štúdie fázy II u pacientov s melanómom preukázali, že vakcína s adjuvanciom AS15 indukuje ochrannú protinádorovú imunitnú odpoveď a je dobre znášaná, v klinickej štúdii fázy III s pacientmi s NSCLC sa nepodarilo zvýšiť prežitie vyliečených pacientov. Z toho vyplýva, že imunoterapeutický potenciál AS15 je vhodné testovať na iné než NSCLC karcinómy (Temizoz et al. 2016).

TLR ligandy

Do skupiny nových adjuvancií s imunostimulačným účinkom radíme aj agonistov TLR receptory, ktorým sú venované ďalšie kapitoly.

Nasledujúce tabuľky zahŕňajú adjuvanciá, ktoré sú v súčasnosti v štádiu výskumu a doteraz neboli schválené (tab. 3), ako aj niekoľko schválených adjuvancií, ktoré sú používané v ľudských vakcínach (tab. 4).

Tab. 3 Adjuvanciá vo výskume, ktoré doteraz neboli schválené

ADJUVANCIUM	TRIEDA	INDIKÁCIA	ŠTÁDIUM KLINICKÉHO VÝSKUMU
Montanid	Emulzia (o/v)	malária a rakovina	fáza III
MF 59 + MTP-PE	lipidovaná MDP + o/v emulzia	HIV a chrípka	fáza I
ISCOMs (saponíny +cholesterol +fosfolipidy)	ISCOMs	široké použitie	fáza I
QS 21	Saponín	široké použitie	fáza II
AS01 (MPLA + lipozómy + QS21)	adjuvantný systém	malária a tuberkulóza	fáza II
AS02 (MPLA + o/v emulzia + QS 21)	adjuvantný systém	malária	fáza II

Modifikované podľa: Banday et al. (2015)

Tab. 4 Adjuvanciá schválené pre ľudské vakcíny

ADJUVANCIUM	TRIEDA
Hliníkové adjuvanciá	hepatitída B, hepatitídaA, HPV, chrípka (H5N1), pneumokok, DTaP (diftéria, tetanus, čierny kašeľ)
Virozómy	vírus hepatitídy A a sezónna chrípka
MF 59	chrípka (H1N1), chrípka (H5N1), sezónna chípka
Montanid ISA51	protirakovinová vakcína
AS03 (o/v emulzia + tokoferol)	vakcína proti pandemickej chrípke
AS04 (MPLA + hliníkový adjuvans)	vakcína proti hepatitíde B a HPV

Modifikované podľa: Banday et al. (2015); Garçon et al. (2011)

3.3 Využitie adjuvancií

Adjuvanciá sú v dnešnej dobe klinicky využívané v niekoľkých prípadoch. Zlepšujú vlastnosti vakcín prostredníctvom prírodných, syntetických alebo endogénnych molekúl, ktoré modulujú a / alebo zvyšujú imunitný efekt. To vplýva na zvýšenie, urýchlenie a vytvorenie dlhodobej imunitnej odpovede, špecifickej pre patogén. V konkrétnych prípadoch sa môže jednať o zvýšenie citlivosti na podanie vakcíny v bežnej populácii, zvýšenie účinku titrov protilátok a tým narastajúci podiel aktívne imunizovaných osôb. Adjuvanciá umožňujú imunizáciu za použitia menšej dávky vakcíny, potrebnej k dosiahnutiu požadovanej ochrany, ako aj použitie nižších dávok antigénu k získaniu porovnateľného výsledku. To je možné využiť napr. v prípade manifestácie pandemickej chrípky, kedy je potrebné urgentne zabezpečiť rozsiahle očkovanie. Adjuvanciá majú potenciál posilniť imunitné reakcie, zvýšením rýchlosti sérokonverzie. To je potrebné v populácií so zníženou citlivosťou z dôvodu choroby, veku (starší ľudia a dojčatá) a u imunokompromitovaných osôb. Napríklad adjuvancium

MF59 sa používa na zlepšenie reakcie starších osôb na očkovaciu látku proti chrípke (Coffman et al. 2010; Eglia et al. 2014).

V ďalších prípadoch pôsobia adjuvanciá na kvalitatívnu odozvu imunitnej odpovede prostredníctvom modulácie afinity, rozsahu a špecifickosti imunitnej odpovede. Pozitívne vplývajú na zvýšenie bunkovej pamäte, hlavne pamäte T buniek. V prípade pandemického prepuknutia infekcie dokážu adjuvanciá zvýšiť rýchlosť počiatočnej odpovede, ktorá môže byť kritická. U vakcín, ktoré sú v súčasnosti vo výskume sa adjuvancium používa na vyvolanie typu imunity, ktorú sa nepodarilo dosiahnuť pomocou neadjuvantných antigénov. Jedná sa o prípady použité v predklinických a klinických štúdiách. Poskytnutie prijateľných a funkčných typov imunitnej odpovede (napr. (Th1) bunka vs. (Th2) bunka, CD8+ vs. CD4+ T bunkám, izotypy špecifických protilátok) (Coffman et al. 2010).

Výber vhodného adjuvancia

Výber vhodného adjuvancia zohráva kľúčovú úlohu pri formulácii nových a účinných vakcín. Adjuvancium pridané do vakcíny musí byť optimalizované pre špecifický antigén a pridané na základe požadovaného typu imunitnej odpovede. Hliníkové soli vo forme hydroxidu alebo fosfátu sú používané v závislosti od ich iontového náboja, potrebného pre väzbu s antigénom (Eglia et al. 2014; Garçon et al. 2011).

„Je pravdepodobné, že "ideálne" adjuvancium nie je a nebude existovať, pretože každé adjuvancium a jeho cieľový antigén budú mať svoje jedinečné požiadavky,, (O'Hagan 2000).

Ideálne adjuvancium musí byť presne chemicky a biologicky definované a účinné, a musí umožniť použitie nižších dávok a/alebo nižších koncentrácií antigénu. Dôležitým atribútom je bezpečnosť bez výskytu okamžitých a dlhodobých vedľajších nežiadúcich účinkov. Po ukončení účinku musí byť látka schopná biodegradácie a eliminácie z tela, aby sa znížilo riziko neskorších vedľajších účinkov. V neposlednom rade musí adjuvancium spĺňať požiadavky na stabilitu pri skladovaní a následnom použití a byť cenovo dostupný. V súčasnosti však ideálne adjuvancium, ktoré by spĺňalo všetky tieto požiadavky nenájdeme (O'Hagan 2000).

Výrazné rozdiely v účinnosti adjuvancií sú podmienené spôsobom ich podania, napr. u parenterálneho podania a podania cez sliznice. Pri vývoji nových adjuvancií musia byť tieto cesty podania zohľadnené. Subkutánna forma imunizácie je ďaleko viac účinná pri stimulácii imunity, ako intramuskulárna. Nie vždy je to však možné zohľadniť. Hliníkové adjuvanciá sa v dôsledku ich miestnej toxicity používajú výhradne intramuskulárne. Benefity inkorporácie adjuvancií do vakcín musia vždy prevyšovať riziko vzniku nežiadúcich účinkov. Lokálne nežiadúce účinky môžu zahŕňať bolesť, opuch, zápal a nekrózu v mieste vpichu, granulómy, lymfadenopatiu, tvorbu vredov a sterilných abscesov. Systémové reakcie môžu vyvolať závažnejšie komplikácie sprevádzané nevoľnosťou, horúčkou až po uveitídu, adjuvantnú artritídu, eozinofíliu, alergiu, anafylaxiu, orgánovo špecifickú toxicitu a imunotoxicitu (t.j. uvoľňovanie cytokínov), imunosupresiu alebo autoimunitné ochorenia. Účinné adjuvanciá stále vykazujú zvýšenú toxicitu, preto minimalizácia toxicity zostáva jednou z hlavných výziev v adjuvantnom výskume (Aguilar a Rodriguez 2007).

3.4 Bezpečnostný profil

Veľké množstvo údajov týkajúcich sa adjuvantných vakcín sa venuje ich bezpečnosti a znášanlivosti. Prevencia infekcie v porovnaní s neadjuvantnými vakcínami sa zriedkavo vyšetruje a často sa porovnáva s historickými údajmi alebo literatúrou. Priame meranie odpovede T-buniek, najmä uvoľňovanie Th cytokínov a meranie aktivácie B-buniek, najlepšie koreluje s ochranou. Väčšina výskumov však považuje hladiny titrov protilátok, ktoré sú ľahko merateľné, ako náhradný marker pre ochranu.

Zvýšenie hladín protilátok nemusí nutne súvisieť s ochranou, napriek tomu, ako bolo uvedené, sérokonverzia je najbežnejšie používaným markerom ochrany. Ukázalo sa, že sérokonverzia sa zvyšuje vo väčšej miere u pacientov s nízkymi alebo nulovými základnými titrami v porovnaní s pacientmi s vysokými východiskovými titrami, a že relatívny vzrast príjemcov vakcín s titrami preočkovania $> 1:40$, je významne nižší. Mohlo by to byť spôsobené vyšším "prahom aktivácie", ktorý je potrebný dosiahnuť (Eglia et al. 2014).

V minulosti bolo vyvinutých už mnoho adjuvancií, u ktorých z dôvodu obáv o ich bezpečnosť, ako napr. riziko akútnej toxicity a možnosť oneskorených vedľajších účinkov, nikdy nedošlo k schváleniu na použitie do vakcín.

Súčasný postoj podporuje bezpečnosť vakcín v porovnaní s účinnosťou, keď je vakcína podávaná zdravej populácii. Avšak u vysoko rizikových skupín, vrátane pacientov s rakovinou a AIDS, ale aj v prípade iných terapeutických vakcín, môže byť prijateľná zvýšená úroveň toxicity, ak je prínos vakcíny podstatný. V prípade potreby by sa preto malo riešiť neklinické hodnotenie bezpečnosti (European Medicines Agency 2005).

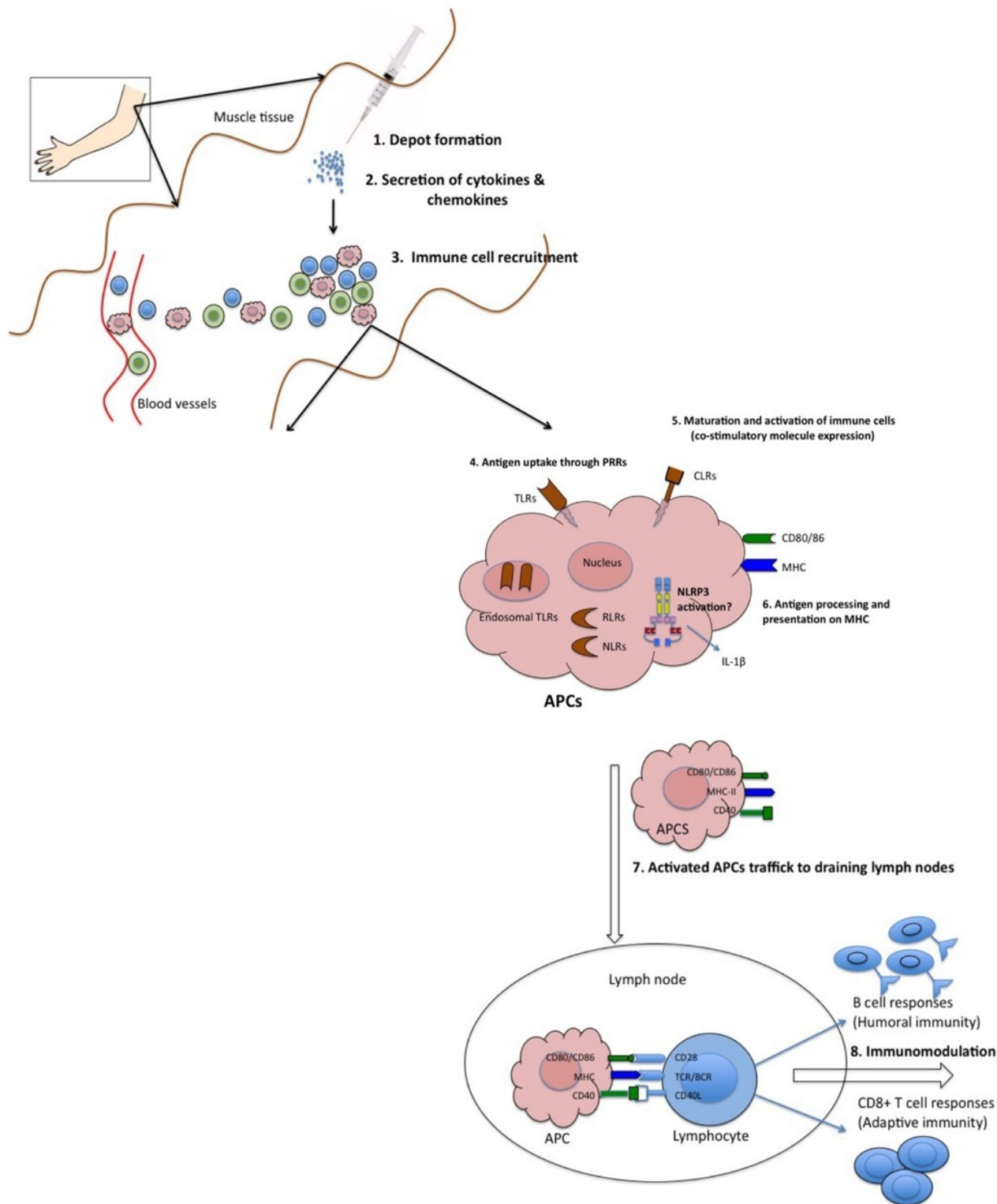
Bezpečnostný profil adjuvancií hliníkových solí patrí medzi najznámejší. Prispeli k tomu údaje z miliardy aplikovaných dávok vakcín obsahujúcich hliníkové soli a viac ako osemdesiat rokov aplikácie dojčatám, deťom, dospelým a starším ľuďom. Bezpečnosť MF59 a virozómov bola preukázaná po takmer desaťročí používania. Inovatívne adjuvanciá v klinických štúdiách a po udelení licencie k dnešnému dňu taktiež preukazujú prijateľný bezpečnostný profil. Lokálne príznaky súvisiace s očkovaním, ktoré sú vo všeobecnosti hlásené s vyššou frekvenciou, sú miernej až stredne závažnej intenzity s krátkym trvaním a neovplyvňujú súlad s očkovacími plánmi. Vo všeobecnosti majú adjuvantné vakcíny pozitívny pomer benefit/risk, ktorý je klinicky akceptovateľný (Garçon et al. 2011).

3.5 Mechanizmus účinku adjuvancií

Podrobná znalosť mechanizmu, akým adjuvanciá pôsobia, je dôležitá pri výskume nových vakcín. Posledné roky priniesli pokrok v pochopení mechanizmu ich účinku, najmä aktivácie vrodenej imunity. Budúcnosť výskumu sa snaží priniesť vakcíny s kombinovanými adjuvanciami, zahrňujúce agonistov PRR a časticové adjuvanciá. Tieto kombinované adjuvanciá vedú k zvýšeniu kvality a sily imunitnej odpovedi a sú charakterizované zložitejším mechanizmom účinku (Awate et al. 2013). Väčšina adjuvancií pôsobí komplexnými a multifaktoriálnymi in vivo imunologickými mechanizmami, ktoré sú často nedostatočne pochopené (O'Hagan 2000). Podľa nedávneho pokroku v imunobiologickom výskume sa ukázalo, že adjuvanciá môžu pôsobiť nasledovnými mechanizmami, ktoré sú uvedené nižšie. Na dosiahnutie imunitnej odozvy sa uplatňuje jeden alebo viacero mechanizmov súčasne (obr. 1) (Awate et al. 2013).

- Tvorba depa v mieste aplikácie vakcíny spôsobuje pomalé uvoľňovanie antigénu a následnú produkciu protilátok (Awate et al. 2013).

- Ďalšie adjuvanciá vedú k vzniku lokálneho imunokompetentného prostredia v mieste aplikácie vakcíny, prostredníctvom sekrécie prozápalových cytokínov a chemokínov. Vyplavenie cytokínov a chemokínov aktivuje dozrievanie APC ako aj DC (dendritové bunky), ktoré sú tzv. profesionálne APC (Marciani 2003).
- Aktivácia APC prezentáciou antigénu; prostredníctvom endocytózy dochádza k tvorbe multimolekulárnych bunkových agregátov, ktoré sú pohlcované APC, alebo priamym naviazaním antigénu na receptory APC. Zrelé APC následne up-regulujú expresiu MHC a ko-stimulačných molekúl a sú charakterizované zvýšenou kapacitou na spracovanie antigénov. K prezentácii antigénu dochádza cestami MHC triedy I alebo MHC triedy II, pomocou zlúčenia alebo rozrušenia bunkových membrán, alebo priamou výmenou peptidov na povrchu MHC molekuly. Zrelé APC potom migrujú do drenážnych lymfatických uzlín kde interagujú s antigén-špecifickými B alebo T bunkami. Tie aktivujú B bunky, ktoré vytvárajú protilátky, a/alebo efektorové CD8 T bunkové odpovede (Awate et al. 2013; Marciani 2003; O'Hagan 2000).



Obr 1. Mechanizmy účinku adjuvancií

Prevzaté z : Awate et al. (2013)

3.5.1 Depotný mechanizmus účinku

Tvorba depa v mieste aplikácie vakcíny patrí k prvým popísaným a najrozšírenejším mechanizmom účinku adjuvancií. V mieste aplikácie vakcíny

dochádza ku kumulácii antigénov a ich pomalé uvoľňovanie zaisťuje konštantnú stimuláciu imunitného systému a schopnosť produkcie vysokých titrov protilátok (Awate et al. 2013).

V roku 1926, Glenny a kolektív ako prví zistili dôležitosť tvorby depa v adjuvantnej aktivite hliníkových zlúčenín. Antigén sa detekoval počas 2-3 týždňov v granulómoch indukovaných géloom z oxidu hlinitého (Awate et al. 2013). Glenny predpokladal, že soli hliníka sú účinnými adjuvanciami, pretože podporujú pretrvávanie antigénu a predlžujú jeho uvoľňovanie. Tiež sa zistilo, že antigény adsorbované na hliníkových soliach sú prezentované v časticovej multivalentnej forme, pre lepšie rozpoznanie pomocou APC. Antigény sú adsorbované na hliníkovú soľ, kde dochádza prostredníctvom hydrofóbných a elektrostatických interakciám k vzniku väzby medzi antigénom a hliníkovou soľou. Hydroxid hlinitý je kladne nabitý pri fyziologickom pH 7,4 a viaže kyslé proteíny, fosforečnan hlinitý je na druhej strane negatívne nabitý a preto viaže základné proteíny (Garçon et al. 2011). Nové objavy vo výskume neskôr priniesli zmenu v chápaní mechanizmu interakcie hliníkových solí s imunitným systémom. Predpokladalo sa, že hliníkové soli spúšťajú zastaralú dráhu vrodeneho rozpoznávania kryštálov v monocytoch a ich aktiváciou podnietujú tvorbu imunogénnych dendritových buniek. Ukázalo sa, že hlinité soli priamo aktivujú vrodene imunitné bunky, ktoré spúšťajú komplex inflammasóm NALP3, alebo nepriamo, uvoľnením endogénneho signálu, prostredníctvom kyseliny močovej. K produkcii kyseliny močovej in vivo dochádza rozpadom purínových nukleotidov v apoptotických bunkách, ktoré sa chovajú ako poškodené molekulárne vzory (DAMP). DAMP sú vo všeobecnosti látky uvoľňované stresovými alebo umierajúcimi bunkami a sú rozpoznané bunkami vrodeneho imunitného systému. Teraz je taktiež zrejmé, že adjuvanciá spúšťajú stromálne bunky lymfatickej uzliny, kde prebiehajú rôzne deje vďaka schopnosti stromálnych buniek exprimovať radu molekúl a produkovať potrebné chemokíny, ktoré priťahujú vrodene imunitné bunky k miestu aplikácie vakcíny. Ako presne tieto cesty medzi sebou interagujú zostáva zatiaľ nezistené (Garçon et al. 2011; Lambrecht et al. 2009). Depotný mechanizmus účinku u hliníkových solí našiel uplatnenie aj v prípade použitia u adjuvantného systému AS04. Hlinitá soľ v tomto systéme zohráva dôležitú úlohu pri stabilizácii MPLA a antigénu vo vakcíne (Didierlaurent et al. 2009).

Neskoršie štúdie jasne ukazujú, že depotný účinok nie je jediným mechanizmom adjuvantné aktivity hliníka, a nehrá hlavnú rolu u MF59 alebo ISCOMs. U MF59 nedochádza k vytvoreniu depa v mieste vakcinácie a MF59 bolo distribuované a odstránené nezávisle od antigénu s polčasom 42 hodín v svalovom tkanive (Awate et al. 2013). Podobne ISCOMs mal tendenciu byť po podaní rýchlo transportovaný do odvodňovacích lymfatických uzlín (Morein et al. 1999). Aj keď neexistujú žiadne definitívne dôkazy o tom, že depotný účinok významne prispieva k adjuvantnej aktivite, hliníkové adjuvanciá zostávajú aj naďalej najrozšírenejšie adjuvanciá na humánne použitie (Lambrecht et al. 2009; Marrack et al. 2009).

3.5.2 Aktivácia buniek imunitného systému

Mechanizmus účinku väčšiny imunologických adjuvancií je založený na signalizácii prostredníctvom „vzory rozpoznávajúcich receptorov“ (PRRs- pattern recognition receptors), ku ktorým patria aj receptory z rodiny TLR, ktoré viažu molekuly exprimované širokou škálou infekčných agens. PRRs sú exprimované na bunkách zodpovedných za vrodenu aktiváciu imunitného systému. Objavenie PRRs spolu s PAMPs a TLRs a rozpoznanie väzby medzi vrodenu a adaptačnou imunitou uľahčilo vývoj série inovatívnych adjuvancií (Garçon et al. 2011).

Adjuvanciá, ako je MF59, galaktosylceramid, MPLA aktivujú dozrievanie DC. Spôsob, akým sú DC aktivované patogénmi môže byť priamy, alebo nepriamy. Tento dvojitý aktivačný mechanizmus vysvetľuje mechanizmus pôsobenia väčšiny adjuvancií. Priama aktivácia DC prebieha prostredníctvom PAMPs (pathogen associated molecular patterns) ako je napr. endotoxín, peptidoglykán alebo nemetylované CpG motívy na TLR. Nepriama aktivácia DC spočíva v rozpoznávaní DAMPs (damage-associated molecular patterns), ktoré sú uvoľňované po poškodení tkaniva spôsobeného patogénmi. Medzi tieto signály neinfekčného poškodenia DAMPs patrí kyselina močová, ATP, nukleotidy alebo HMGB-1 (highly mobility group box 1). Reakcia DC na pôsobenie cudzích antigénov je súčasťou vrodenej imunitnej odpovede a poskytnutím spojenia medzi rozpoznávaním a spracovaním antigénu pre prezentáciu na T bunkách, tieto bunky premostujú vrodenu a adaptačnú imunitu (Awate et al. 2013; Lambrecht et al. 2009).

Dendritové bunky sú dôležitými antigén prezentujúcimi bunkami imunitného systému. Sú schopné rozpoznať cudzí antigén, spracovať ho na malé peptidy

a prezentovať prostredníctvom MHC molekúl k TLR a poskytnúť esenciálne kostimulačné molekuly schopné aktivovať CD4⁺ a CD8⁺ T-bunky. Pamäťové T-bunky podporujú aktiváciu a dozrievanie špecifických B-buniek a ovplyvňujú tak produkciu protilátok (Beesu et al. 2014; Lambrecht et al. 2009).

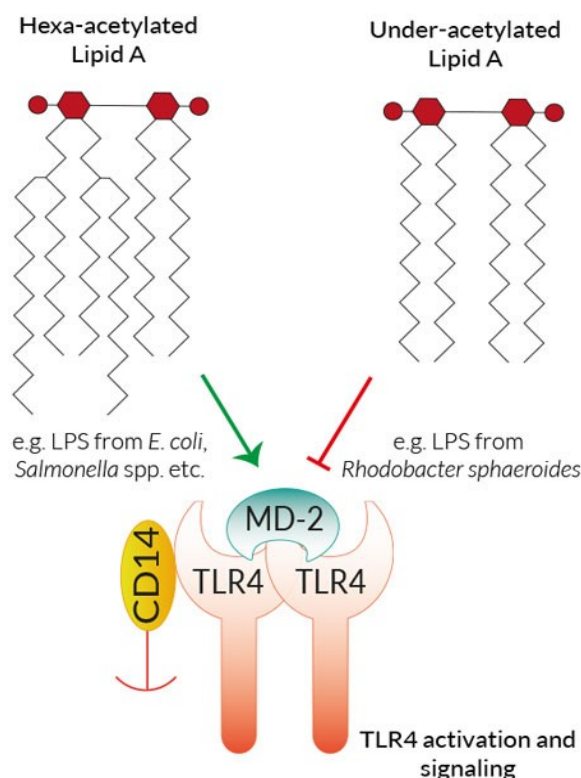
Adjuvanciá, ktoré aktivujú TLR zohrávajú dôležitú úlohu v ovplyvnení vrodenej imunity. Špecifické TLR, ktoré patria do rodiny transmembránových proteínov, spúšťajú po kontakte s antigénom signalizačnú kaskádu. Kaskáda prozápalových cytokínov a chemokínov; IL-1, IL-8, IL-12, TNF-a a IFN- γ vedie k zhromažďovaniu a dozrievaniu vrodenných imunitných buniek, ako sú APC. Miera aktivácie APC ovplyvňuje následnú povahu, silu a kvalitu odpovede T a B lymfocytov a mieru následnej indukcie pamäťových buniek. Cieľom je dosiahnuť zvýšenú koncentráciu a stimuláciu APC v mieste aplikácie vakcíny a v mieste regionálnych lymfatických uzlín a tým požadovanú imunitnú odpoveď (Garçon et al. 2011; Honegr et al. 2015).

3.6 Význam TLR4 pre imunomoduláciu rakoviny

3.6.1 TLR4 agonisti

Doteraz bolo u cicavcov identifikovaných 11 Toll-like receptorov, z ktorých každý rozpoznáva jedinečné súbory molekúl z baktérií, húb alebo vírusov (Baldrige et al. 2004). Každý TLR obsahuje extracelulárnu doménu LLR (leucine-rich repeats), ktorá obsahuje väzobné miesto na rozpoznanie príslušných patogénov. Aby došlo k naviazaniu ligandu na TLR a následnej aktivácii signalizačnej kaskády, je potrebná interakcia s ďalšími koreceptormi, ako sú CD14 a MD-2 a LPS- viažucim proteínom (obr. 2).

TLR agonisti sú látky používané vo vakcínach ako adjuvanciá, alebo ako samostatné imunomodulátory, pretože sú schopné stimulovať vrodené a adaptačné imunitné reakcie. Súčasné využitie agonistov TLR4 ako imunomodulátorov v terapii rakoviny je zhrnuté na konci tohoto oddielu (tab. 5). Medzi najdôkladnejšie preskúmaných agonistov TLR4 radíme LPS, MPLA, AGP (Baldrige et al. 2004).



Obr 2. Aktivácia TLR4 receptora

Prevzaté z: Invivogen (2019a)

LPS

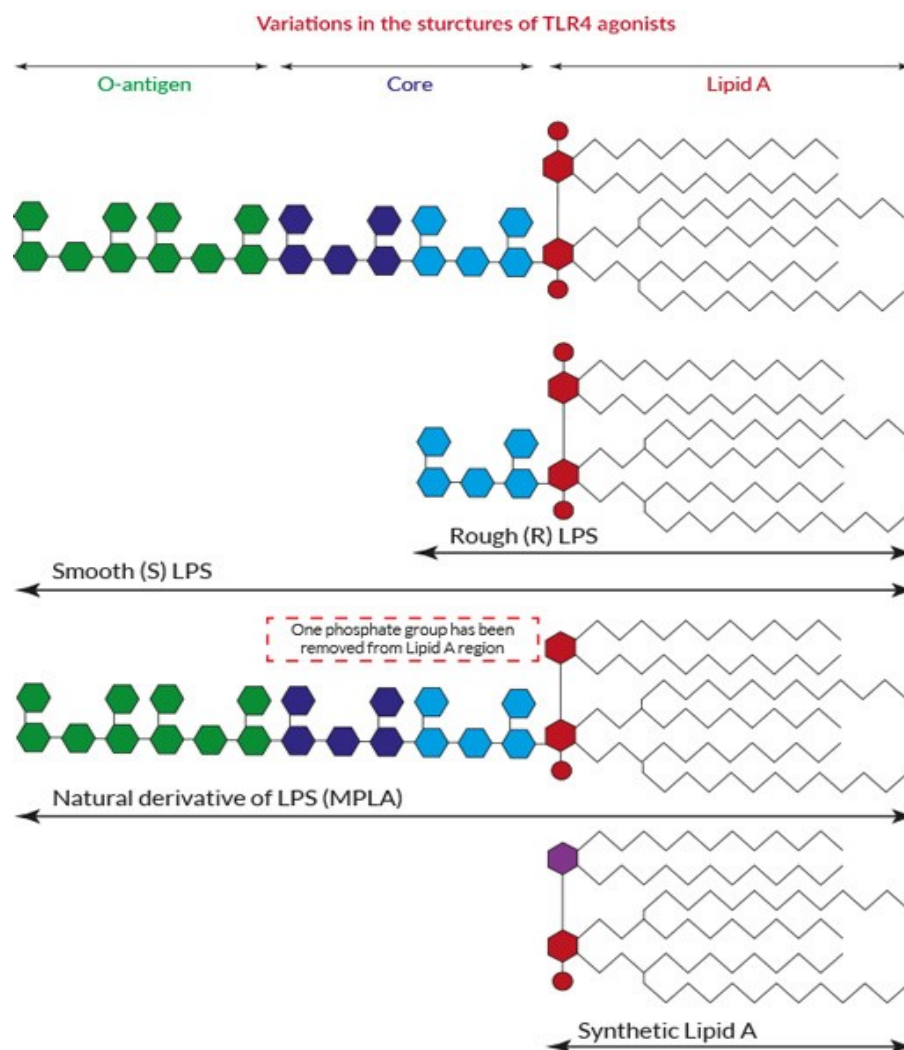
Prvá mikrobiálna molekula identifikovaná ako agonista TLR je LPS, ktorá sa viaže na komplex TLR4 a tým ho aktivuje (Baldrige et al. 2004). LPS patrí k najviac študovaným ligandom TLR4 a prakticky všetky klinické štúdie zahŕňajúce adjuvanciou TLR4 sa zaoberajú skúmaním derivátov LPS. LPS sa nachádza vo vonkajšej membráne gram-negatívnych baktérií. Ako komplexná molekula sa skladá z lipidovej časti A pozostávajúcej z polyacylovaných diglukozamínových lipidov, ktoré sprostredkovávajú interakcie s TLR4. Aj keď imunostimulačná kapacita LPS je známa už desaťročia, neporušená molekula je vysoko toxická a preto nie je vhodná na použitie ako vakcínové adjuvancium (Steinhagen et al. 2011).

MPLA

V roku 1980 Edgar Ribi a kolegovia systematicky modifikovali LPS zo *Salmonella minnesota*, čo viedlo k identifikácii frakcie monofosforyl lipidu A (Rook a

Zumla 1997), ktorá vykazovala významne nižšiu toxicitu a pyrogenicitu pri zachovaní prospešných imunopotenciálnych charakteristík (Baldrige et al. 2004).

Táto imunologicky aktívna lipidová A frakcia obsahuje niekoľko úzko príbuzných druhov, ktoré sa líšia len stupňom a typom acylácie mastných kyselín, vrátane hlavnej hexa-acylovej zložky (obr. 3). Predbežné dôkazy naznačili, že imunostimulačná aktivita MPLA je primárne sprostredkovaná väzbou na komplex TLR4, tak ako pri materskej LPS molekule. Zistenie, že MPLA nevykazuje toxicitu, tak ako LPS a pritom si zachováva veľkú časť imunostimulačnej kapacity, viedla k vývoju adjuvancia MPL® (Corixa Corporation). Štúdie u králikov, morčiat, psov a koní ukázali, že MPLA je 1000-násobne menej toxické ako LPS. Toto zistenie bolo podnetom ku klinickým skúškam agonistov TLR4 (Evans et al. 2003; Steinhagen et al. 2011).



Obr. 3 Rozdiel v štruktúre LPS a MPLA

Prevzaté z: Invivogen (2019)

„Rozsiahle klinické štúdie preukázali, že MPLA spĺňa bezpečnostné kritéria a predstavuje účinné vakcínové adjuvancium. Viac ako 120,000 dávok bolo podaných až takmer 50,000 ľudským subjektom, pričom všetky bezpečnostné údaje zhromaždené v súčasnosti poukazujú na profil ekvivalentný hliníkovým zlučeninám, ktoré sa používali ako očkovacie adjuvanciá po dobu viac ako 60 rokov. Tieto štúdie spoločne naznačili významné výhody zahrnutia MPLA adjuvancia vo vakcínových formuláciách; znížené počty dávok, a/alebo znížené antigénové požiadavky sa často uvádzajú ako hlavné prínosy,, (Evans et al. 2003).

AGP

Ďalší vývoj vedcov spoločnosti Corixa Corporation priniesol nové mimetiká syntetických lipidov A, ktoré sú chemicky jedinečné acylované monosacharidy, nazývané aminoalkyl glukozaminid 4-fosfát (AGP). Na rozdiel od komplexnej rodiny lipidov A nachádzajúcich sa v MPLA, syntetické AGP predstavujú mimetiká lipidu A, ktoré môžu byť syntetizované ako vysoko čisté, jednotlivé chemické entity. Okrem toho boli AGP navrhnuté tak, aby vyhovovali molekulárnym zmenám na zlepšenie biologických a farmakologických aktivít. AGP predstavujú jedinečné molekuly agonistov TLR4, klinicky používané ako vakcínové adjuvancium, ale aj ako samostatné terapeutické imunomodulátory (Baldrige et al.).

Tab. 5 Súčasné využitie agonistov TLR4 v imunoterapii rakoviny

TLR4 AGONISTA	KLINICKÝ STATUS	
	A TYP	VÝSLEDKY
	IMUNOTERAPIE	
MPLA v lipozomálnej emulzii	Pilotná štúdia (adjuvancium)	Indukcia tumor špecifickej bunkovej a humorálnej imunitnej odpovede u pacientov s kolorektálnym karcinómom
GLA-SE (glucopyranosyl lipid A-stabilná emulzia)	Fáza I klinického výskumu (intratumorálna adjuvantná injekcia)	Hodnotenie bezpečnosti a účinnosti u pacientov s metastatickým sarkómom

AS04 (hliníkové adjuvancium + MPLA)	Licencovaný v profilaktickej HPV vakcíne	Ochrana proti HPV genitálnym a vulvalným prekanceróznym léziám a genitálnym bradaviciam
--	--	---

Modifikované podľa: Temizoz (Temizoz et al.)

3.6.2 Imunomodulácia pomocou TLR4 v terapii nádorov

V súčasnosti, spojitosť medzi vrodenu imunitou a rakovinou, je neustálym predmetom výskumu (So a Ouchi 2010). MLA a AGP, dokážu sprostredkovať nešpecifickú ochranu u myší proti nádorom a rade infekčných organizmov prostredníctvom ich schopnosti stimulovať TLR4. Hoci špecifické mechanizmy sprostredkujúce ochranný účinok neboli úplne objasnené, hlavné vrodenné imunitné efekty sa pravdepodobne značne prekrývajú s tými indukovanými LPS. Expozícia LPS vedie k produkcii defenzínov, ktoré obsahujú niekoľko odlišných rodín antibakteriálnych, antifungálnych a antivírusových peptidov (Baldrige et al.).

Nedávne štúdie a patenty ukázali, že profil výskytu TLR by mohol byť jedným z vodítkom pre diagnózu špecifickej rakoviny. Pomocou agonistov alebo antagonistov TLR v kombinácii s antigénom izolovaným z nádoru, môžeme predvídať rastúci účinok očkovania a vyvolanie špecifickej vrodenej imunity proti rakovine. V niektorých štúdiách sa paradoxne zistilo, že v nádoroch bol preukázaný výskyt nadmernej expície TLR. Zistilo sa, že signalizácia sprostredkovaná TLR podporuje rast nádoru a u niektorých modelov rakoviny sa pozoroval únik nádorových buniek z hostiteľského imunitného systému (So a Ouchi 2010).

Zvýšená expícia niektorých TLR bola zaznamenaná v mnohých nádorových bunkách, tkanivách, alebo líniách nádorových buniek. U TLR4 sa jedná napr. o výskyt ligandu LPS v bunkách a tkanivách rakoviny prs (Harmey et al. 2002), ligand MMTV (Envelope protein) v bunkách a tkanivách nádoru hrubého čreva (Furrie et al. 2005), Oligosacharidy z hyalúronovej kyseliny- Host (HA) v tkanivách melanómu (Molteni et al. 2006) a HSP (Heat-shock protein 60/70-Host) v bunkách rakoviny žalúdka (Schmausser et al. 2005).

Napriek tomu, že nedávne zistenia potvrdzujú podiel špecifických TLR, alebo signalizačných molekúl v dráhe TLR, na patogeneze nádorov, použitie agonistu alebo antagonistu TLR v kontexte terapie nebolo možné ešte rozhodnúť. Keďže sú štúdie zaoberajúce sa TLR stále v počiatočnej fáze, je potrebné podrobnejšie preskúmať funkcie každého TLR v rôznych typoch nádorov. Tieto poznatky sú kľúčové k schopnosti vyvinúť terapeutické stratégie využívajúce cestu TLR (So a Ouchi 2010).

TLR4 je nadmerne exprimovaný u ľudí a myši pri kolorektalnej neoplázii spojenej so zápalom. Na druhej strane myši s deficienciou TLR4 sú výrazne chránené pred karcinómom hrubého čreva, čo naznačuje, že expresia TLR na nádorových bunkách priamo, alebo nepriamo podporuje progres nádoru (Fukata et al. 2007). Výskyt nádorovo špecifických TLR a reakcia týchto buniek na ligandy TLR v špecifických typoch nádoru by mala priniesť nové poznatky k stratégii liečby rakoviny. Zatiaľ čo expresia TLR často vedie k progresii nádoru, signalizačná dráha sprostredkovaná TLR tiež zvyšuje protinádorovú imunitu a proteíny v signálnej dráhe TLR sú často považované za dôležité ciele v terapii rakoviny (Wolska et al. 2009). Je dôležité, aby protinádorová liečba vyvolala proti antigénom z nádorových buniek dostatočne účinnú imunitnú stimuláciu, prostredníctvom APC (He et al. 2007). Nedávny vývoj v terapii rakoviny prostredníctvom ligandov TLR zahŕňa, detekciu rôznych hladín TLR proteínu a jeho aktivitu v nádorových tkanivách, potenciálnu stratégiu liečby pomocou agonistu TLR na vyvolanie imunitnej funkcie špecifických buniek proti nádorovým antigénom a vývoj nového agonistu TLR s protinádorovým účinkom. Napriek tomu, že niektoré štúdie opísali, že tumorogenné stavy sú podporované signalizáciou spojenou s TLR, antagonisti TLR by mali byť tiež považované za protinádorové ligandy (So a Ouchi 2010).

3.6.3 Polymorfizmus génov pre TLR

Polymorfizmus génov TLR umožňuje hostiteľovi prekonať mnohé mikrobiálne vplyvy, avšak u jedincov, u ktorých sa objavujú určité genotypy, spojené s nadmernou imunitnou aktiváciou a zvýšeným zápalom, môžu existovať menej priaznivé výsledky. Zistilo sa, že zmeny v týchto génoch priamo ovplyvňujú riziko vzniku infekčných ochorení, kardiovaskulárnych ochorení, alergií a rakoviny (El-Omar et al. 2008).

Polymorfizmus TLR má vplyv na rakovinu prostaty a rakovinu žalúdka, vyvolanú H. Pylori. Chronický zápal v týchto zhubných nádoroch spôsobuje fyziologické zmeny na daných orgánoch. Pre rakovinu žalúdka aj prostaty štúdium hostiteľskej genetiky TLR významne prispelo k pochopeniu etiológie a patogenézy rakoviny (El-Omar et al. 2008).

Prevažná väčšina študovaných polymorfizmov sú polymorfizmy s jedným nukleotidom (SNP), ktoré sa vyskytujú s frekvenciou > 1% u normálnej populácie, na rozdiel od "mutácií", ktoré sa vyskytujú s frekvenciou <1%. Odhaduje sa, že v ľudskom genóme pravdepodobne existuje až 10 miliónov SNP, aj keď sa ešte nepodarilo všetky identifikovať. Väčšina týchto SNP sa nevyskytuje v kódujúcich sekvenciách. Tie SNP, ktoré sa vyskytujú v kódujúcich sekvenciách, nie sú spojené s akoukoľvek zmenou aminokyselinovej sekvencie, preto nemajú žiaden funkčný dôsledok. Genetické variability SNP popisuje aj haplotypová analýza. Haplotypy sú kombinácie alelí na rôznych markeroch pozdĺž toho istého chromozómu, ktoré sa dedia ako jednotka. Ďalšie genetické variácie môžu zahŕňať polymorfizmus delécie, inzercie a mikrosatelitné opakujúce sa polymorfizmy (El-Omar et al. 2008).

V TLR boli identifikované stovky SNP, ale ich funkčné dôsledky neboli v prevažnej väčšine odhalené. SNP narúšajú normálnu štruktúru extracelulárnej oblasti TLR4, preto sa predpokladá, že znižujú schopnosť reagovať s LPS prostredníctvom zmien vo väzbe. Ďalej sa preukázalo, že mutantné TLR4, transfekované THP-1 bunkové línie, vyvolávajú zníženú LPS-indukovanú imunitnú reakciu. To vedie k produkcii nižších hladín cytokínov a následne zvýšenej náchylnosti hostiteľa k bakteriálnej infekcii. Zo 44 identifikovaných SNP TLR4, zostáva TLR4 Asp299Gly najlepšie opísaným a študovaným SNP, v zmysle zmeny funkčnosti génu a rizika vzniku ochorenia. Systémová génová analýza TLR4 SNP ukázala spojitosť medzi vzácnou mutáciou G11481C v 3'UTR oblasti TLR4 a zvýšeným rizikom vzniku rakoviny prostaty (El-Omar et al. 2008).

3.6.4 Preventívne a terapeutické vakcíny schválené pre imunoterapiu rakoviny

Napriek nedávnym prelomom v prognóze, prevencii a liečbe, rakovina zostáva naďalej hlavnou príčinou smrti a postihuje milióny ľudí na celom svete. Vývoj vakcín

proti rakovine bol diskutovaný a študovaný desaťročia a nedávne úspechy na klinickej úrovni podporili vývoj takýchto vakcín. Paul Ehrlich už pred viac ako sto rokmi prišiel s návrhom použiť oslabený nádor ako vakcínu proti rakovine. Použitie vlastného imunitného systému v terapii rakoviny pokročilo ku klinickému použitiu až v posledných desiatich rokoch (Banday et al. 2015).

Liečba rakoviny prostredníctvom imunoterapie využíva schopnosti vlastného imunitného systému deštruovať rakovinové bunky. Napriek doterajším zisteniam, je potrebný podrobnejší výskum v oblasti protirakovinových vakcín, ktorý by prispel novším zložením vakcín, založených na začlenení účinných adjuvancií, na zvýšenie kvality imunitnej odpovede z hľadiska veľkosti, trvalej udržateľnosti, množstva dávky a počtu očkovaní. Potom čo v USA došlo u FDA k schváleniu niekoľkých preventívnych vakcín proti rakovine, ako sú Gardasil (Merck), Cervarix (Glaxosmithkline) a terapeutická vakcína Sipulencel-T (Provenge), vývoj vakcín proti rakovine nadobudol obrovský záujem. Schválenie týchto očkovacích látok podporil koncept liečby rakoviny prostredníctvom bunkovej imunoterapie, ako aj podporu v novom záujme a pozornosti, ktorý si rozvoj nových terapeutických protirakovinových vakcín zaslúži (Banday et al. 2015).

Pridanie agonistov TLR do protirakovinových vakcín bol veľkým skokom v imunoterapii rakoviny. MPLA sa používa v registrovaných vakcínach ako je napr. Cervarix (schválených proti HPV) a Melacine (schválený proti melanómu v Kanade) a ďalších vakcínach, ktoré sú v neskorších fázach klinického výskumu. GLA, syntetický TLR4 agonista, bol klinicky analyzovaným adjuvanciom pre vakcínu sezónnej chrípky a v súčasnosti sa vyvíja na použitie do vakcínových prípravkov proti rakovine (Banday et al. 2015).

Gardasil, Cervarix

Vakcíny Gardasil a Cervarix sú účinné proti rôznym funkčným typom vírusu ľudského papilómu (HPV), ako sú typy 6,11, 16 a 18, ktoré vo svete predstavujú takmer 70% celkových karcinómov krčka maternice, celosvetovo vyskytujúcich sa u žien. Obe vakcíny obsahujú čistené VLP (virus like particles) z hlavného kapsidového (L1) HPV proteínového typu 6, 11, 16 a 18. VLP sú samostatne tvorené štruktúry proteínov L1, ktoré sa vyrábajú oddelenou fermentáciou v rekombinantnom *Saccharomyces cerevisiae*.

Chemicky dobre definované fermentačné médium, ktoré je chemicky presne definované vo forme minerálnych solí, sacharidov, vitamínov a aminokyselín, produkuje kvasinky. VLP vznikajú rozpadom kvasinkových buniek a následne sa čistia vhodnými fyzikálnymi a chemickými metódami. Vyčistené VLP sú potom adsorbované na častice hydroxidu hlinitého, ktoré pôsobia ako adjuvanciá (Banday et al. 2015).

Cervarix (Glaxo-SmithKline) vo svojom zložení obsahuje dva typy adjuvancií. Prvé adjuvancium pozostáva z VLP typu HPV 16 a 18, a agonista TLR4 MPLA, predstavuje druhé adjuvancium, ktoré rozširuje imunitnú odpoveď. Cervarix je účinný hlavne proti infekciám spôsobeným HPV 16 a 18. Nedávne správy ukázali potenciálnu účinnosť proti niektorým iným typom HPV, čo vyžaduje podrobnejšie štúdie účinkov a rozsahu. Cervarix a Gardasil boli schválené Európskou liekovou agentúrou (EMA). V porovnaní s tetravalentnou vakcínou Gardasil, produkuje bivalentná vakcína Cervarix väčšiu protilátkovú odozvu, ako aj rozšírenejšie reakcie proti heterológym HPV kmeňom. Cervarix je schválený u žien vo veku od 9 do 25 rokov ako preventívna vakcína proti rakovine krčka maternice, spôsobenej HPV 16 a 18. Jedná sa o bivalentnú očkovaciu látku s vysokou toleranciou a bezpečnosťou, čomu zodpovedá približne 57 miliónov dávok Cervarixu podaných celosvetovo, čo umožnilo zostaviť významné množstvo údajov o účinnosti a bezpečnosti. Bezpečnostný profil sa doteraz ukázal ako vynikajúci, s podobným výsledkom ako u kontrolných imunizácii s výnimkou očakávaného zvýšenia lokálnych nežiadúcich účinkov, ako je bolesť (Banday et al. 2015; Fox et al. 2017).

Gardasil (Merck) pozostáva z VLP, založených na HPV 6, 11, 16 a 18. Je účinný proti HPV infekciám spôsobeným typmi HPV 6, 11, 16 a 18. Jedná sa o neinfekčné kvadrivalentné rekombinantné vakcínové protilátky proti všetkým štyrom typom HPV. Gardasil je jednotková sterilná suspenzia, zložená zo štyroch purifikovaných VLP, adsorbovaných na povrchu častíc hydroxysulfátu hlinitého s ďalším množstvom naviazaného adjuvancia na povrchu, vo finálnom čistenom purifikovanom roztoku. Gardasil je schválený u žien vo veku od 9 do 26 rokov ako preventívna vakcína proti rakovine krčka maternice, vulvalných a vaginálnych typov rakovín, spôsobených HPV 16 a 18. Použitie je možné aj u mužov rovnakej vekovej skupiny, ako prevencia vzniku genitálnych bradavíc spôsobených HPV 6 a 11 (Banday et al. 2015).

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo identifikovať nové ligandy receptora TLR4 a na základe stanovenia ich imunomodulačnej aktivity stanoviť možný potenciál ich využitia ako adjuvancií do vakcín, alebo ako samostatných imunomodulátorov pre terapiu autoimunitných alebo onkologických ochorení. Analyzované látky boli nasyntetizované na základe výsledkov *in silico* modelovania a testovaním *in vitro* bola stanovená ich imunomodulačná aktivita. Vychádzalo sa z modelovej predlohy imunomodulátoru Monofosforyl Lipid A (MPLA), ktorý slúžil ako štandard pre TLR4.

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Materiál

5.1.1 Bunkový model

- HEK-Blue™ hTLR4 bunky (ľudské embryonálne obličkové bunky-modré) sú vyvinuté HEK 293 bunky, ktoré stabilne exprimujú ľudský TLR 4 a NF-κB indukovaný SEAP (vylučovaná embryonálna alkalická fosfatáza) reportérový gén (Invivogen 2016a)

5.1.2 Prístrojová technika

- Analytické váhy CPA225, Sartorius Stedim Biotech
- Automatické pipety Research plus, Eppendorf
- Automatické pipety, Thermo Scientific
- Bürkerova počítačacia komôrka
- Centrifuga Universal 320 R (Hettich), Schoeller
- Laboratórny inkubátor CO₂ FORM Direct Heat 311, Thermo Scientific
- Laboratórny vodný kúpeľ, PolyScience
- Laminárny box Safeflow 1.2 (BioAir), EuroClone
- Mikroskop inverzný, Optika Microscopes
- Multidetekčná čítačka mikrodostičiek Synergy HT, BioTek
- Nástavec pipety, accu-jet® pro
- Ultrasonický kúpeľ, Bandelin Sonorex

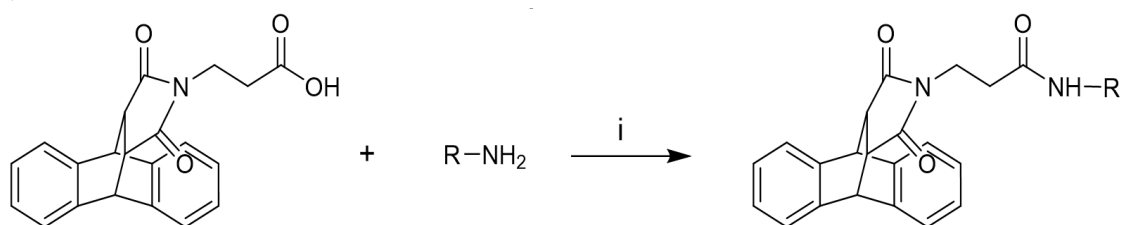
5.1.3 Chemikálie

- Aqua pro injectione Braun, B. Braun
- Antibiotiká udržiavajúce bunky s hTLR4, HEK-Blue™ Selection, InvivoGen
- Deaktivované médium hTLR4, Sigma-Aldrich
- Detekčné médium Quanti - Blue™, Invivogen
- Dimetyl sulfoxid (DMSO), Penta
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), Sigma-Aldrich
- Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, Sigma-Aldrich

- Kultivačné médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), s glukózou 4,5 g/l a L-glutamínom 2mM, Sigma-Aldrich
- Lipopolysaccharide from Escherichia coli (LPS-EB) - hTLR4 agonista, Sigma-Aldrich
- Lipopolysaccharide from Rhodobacter sphaeroides (LPS-RS) - hTLR4 antagonist, Sigma-Aldrich
- NaCl 0,9% Braun infúzny intravenózný roztok, B.Braun
- Normocin™ 50mg/ml, InvivoGen
- Penicillin Streptomycin 50 ug/ml, Sigma-Aldrich
- QUANTI-Blue™ Solution
- Synthetic Monophosphoryl Lipid A (MPLAs) - hTLR4 agonista, InvivoGen

5.1.4 Analyzované látky

Analyzované látky (tab. 6), použité pre tento experiment, vychádzali z derivátov sukcinimidu. Na základe obecnej rovnice reakcie (obr. 4), bolo syntetizovaných 16 nových ligandov.



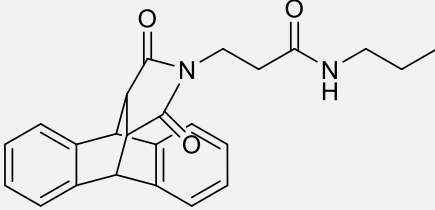
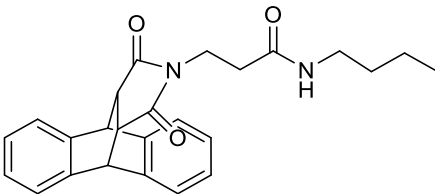
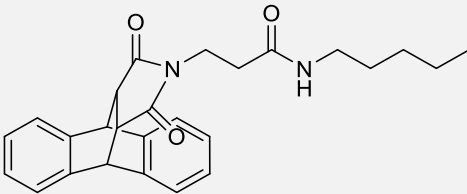
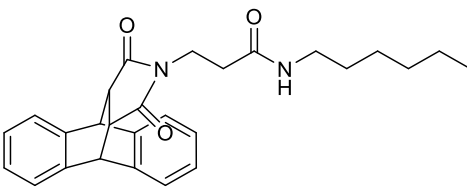
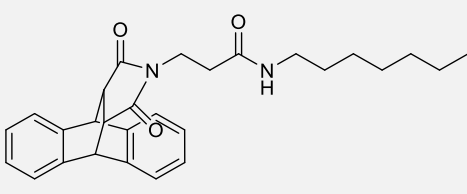
R = cyclohexyl; isopentyl; *tert*-butyl

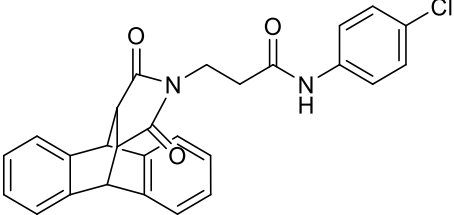
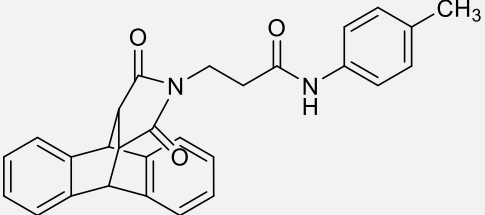
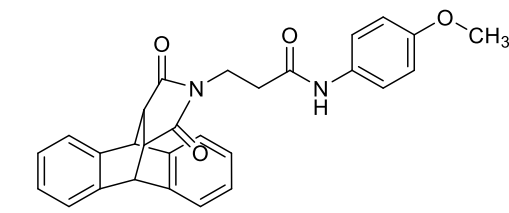
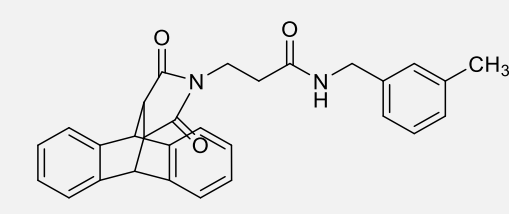
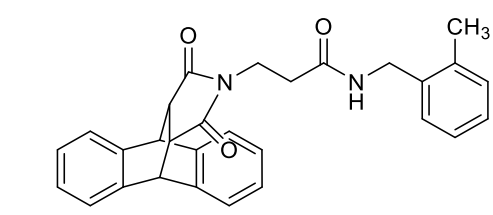
Reagents and conditions: (i) DCC, HOBt, CH₂Cl₂, THF, 0 °C to rt, 24 h.

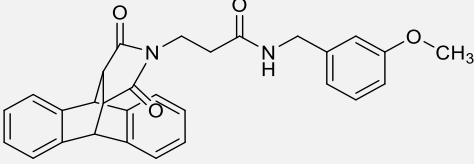
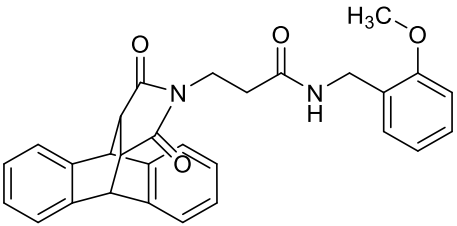
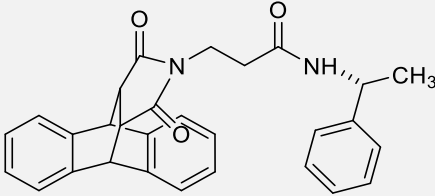
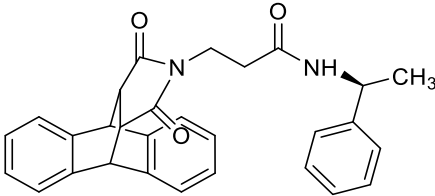
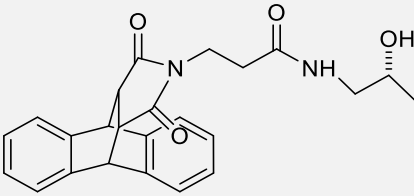
Obr. 4 Rovnica reakcie syntetizovaných ligandov

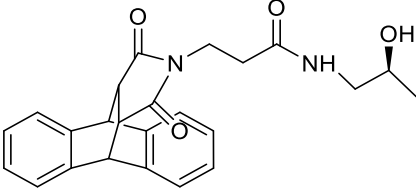
Prevzaté z: Honegr et al. (2018)

Tab. 6 Štruktúra analyzovaných látok a ich molekulová hmotnosť

STRUCTURE	DESIGNATOR	CAL.M(G.MOL ⁻¹)
	<p>ADJ-033</p>	<p>88,46700</p>
	<p>SB 003</p>	<p>402,49400</p>
	<p>SB 004</p>	<p>416,52100</p>
	<p>SB 005</p>	<p>430,54800</p>
	<p>SB 006</p>	<p>444,57500</p>

STRUCTURE	DESIGNATOR	CAL.M(G.MOL ⁻¹)
	SB 009	456,92600
	SB 010	436,51100
	SB 011	452,51000
	SB 012	450,53800
	SB 013	450,53800

STRUCTURE	DESIGNATOR	CAL.M(G.MOL ⁻¹)
	SB 014	466,53700
	SB 015	466,53700
	SB 016	450,53800
	SB 017	450,53800
	SB 018	404,46600

STRUCTURE	DESIGNATOR	CAL.M(G.MOL ⁻¹)
	SB 019	404,46600

5.2 Metódy

5.2.1 Príprava bunkových kultúr a ich udržiavanie

Bunky HEK-Blue™ hTLR4 boli odvodené z buniek HEK293 (transformovaných s adenovírusom 5 DNA). Pre tento experiment bola použitá vialka s obsahom 3-7 x 10⁶ HEK-Blue™ hTLR4 buniek v zmrazovacom médiu. Ihneď po obdržaní bolo potrebné bunky rozmraziť a nechať kultivovať, aby sa zaistila ich životaschopnosť a správny priebeh testu. Bunky sa nesmeli opätovne zamraziť, mohlo by dôjsť k ich nenávratnému poškodeniu. Prvý rast buniek by mal slúžiť výhradne k tvorbe zásob k ďalšiemu použitiu, tým sa zabezpečí stabilita a výkonnosť buniek pre nasledovné experimenty.

V prvom kroku bola vialka rýchlo rozmrazená jemným pohybom vo vodnom kúpeli s teplotou vody 37 °C. Aby sa zabránilo novej kontaminácii buniek, vrchný uzáver vialky sa ponechal nad hladinou vody. Akonáhle sa obsah rozmrazil, vialka sa vyňala z vodného kúpeľa a dekontaminovala sa sprejom s 70 % etanolom. Od tohto okamihu, bol priebeh všetkých nasledovných krokov pod striktnými aseptickými podmienkami. Vialka s bunkami bola premiestnená do boxu s laminárnym prúdením a bunky sa preniesli do väčšej vialky s obsahom 15 ml vopred predhriateho rastového média, na teplotu 37 °C. Vialka sa umiestnila do centrifúgy na 1000-1200 RPM (rotation per minute), po dobu 5 minút. Po centrifugácii sa odstránil supernatant, ktorý obsahoval kryoprotektívne činidlo a bunky sa rozsuspendovali s 1ml rastového média bez obsahu selektívnych ATB (selektívne ATB bolo možné do rastového média pridať, ak boli bunky

pasážované najmenej dvakrát). Obsah vialky sa vložil do kultivačnej nádoby s obsahom 5 ml rastového média bez obsahu selektívnych ATB. Takto pripravené HEK-Blue™ hTLR4 bunky sa následne umiestnili do laboratórneho inkubátora s teplotou 37 °C pri 5 % CO₂ a nechali sa inkubovať.

Po úspešnej príprave bunkových kultúr bolo potrebné bunkám zabezpečiť priaznivé prostredie, potrebné pre ich rast a delenie. Rastové médium bolo bunkám menené dvakrát týždeň. Keďže sa jednalo o živé jednotky, čas za ktorý bola dosiahnutá požadovaná konfluencia buniek, potrebná k prvému pasážovaniu a zahájeniu experimentu, nebolo možné dopredu stanoviť. Dôležité bolo sledovať priebežný rast, aby nedošlo k 100 % konfluencii buniek.

Prvé pasážovanie buniek sa začalo pri dosiahnutí 70-80 % konfluencie buniek. Z kultivačnej nádoby sa odobralo prebytočné médium a následne boli bunky niekoľkokrát spláchnuté prúdom 3 ml nového rastového média, pokiaľ sa nepodarilo dostať všetky bunky z dna nádoby. Obsah (3ml buniek v rastovom médiu) sa rozdelil do dvoch nových kultivačných nádob a doplnil sa rastovým médiom na 10 ml. Kultivačné nádoby s bunkami sa vložili do laboratórneho inkubátora. V prípade zistenia, že bunky neochotne prisadali na dno nádoby, bolo možné dodatočne pridať 1 ml FBS (Invivogen 2016a).

5.2.2 Príprava roztokov

Rastové médium

Základ pre prípravu rastového média bol tvorený 500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), ktoré vo svojom zložení už obsahovalo požadovanú koncentráciu glukózy a L-glutaminu. Aby sa dosiahol potrebný objem (500 ml) a požadované vlastnosti rastového média, ako prvé sa odobralo 55,5 ml DMEM a k zvyšku sa pridalo: 10 % FBS (Fetal Bovine Serum)=10% FBS z 500 ml= 50ml; 2,5 ml Penicilin-Streptomycin 1%; 2 ml HEK-Blue™ Selection a 1ml 100 ug/ml Normocin™. Všetky látky sa pomocou pipety/mikropipety kvantitatívne previedli. Rastové médium bolo uchovávané v chlade pri teplote 5°C a pred každým použitím sa nahrialo na teplotu 37 °C vo vodnom kúpeli.

Zloženie rastového média obsahovalo FBS, ktoré vzhľadom na svoj obsah embryonálnych rastových faktorov zabezpečovalo bunkám potrebnú výživu pre ich rast. Antibiotiká Penicilin-Streptomycin, boli pridávané do rastového média výhradne ako prevencia pred bakteriálnou kontamináciou. Normocin™ rozširoval antibakteriálne spektrum a chránil aj pred kontamináciou mykoplazmami a hubami.

Deaktivované médium

Deaktivované médium bolo používané k experimentálnej práci s bunkami. Postup prípravy deaktivovaného média bol totožný s prípravou rastového média. Jediný rozdiel spočíval v použití teplom deaktivovaného FBS. Bolo to z dôvodu, že niektoré FBS mohli obsahovať určité množstvo alkalickéj fosfatázy (AP), ktorá mohla následne interferovať s kvantifikáciou SEAP (secreted embryonic alkaline phosphate) pri záverečnom hodnotení. Z toho dôvodu bolo odporúčané použiť teplom inaktivované FBS, kde pomocou tepla sa inaktivovali termosenzitívne enzýmy. Inaktivované FBS bolo pripravené inkubáciou FBS pri teplote 56 °C po dobu 30 minút (Invivogen 2016c).

Detekčné médium

Detekčné médium bolo pripravené pomocou komerčne dostupného QUANTI-Blue™ Solution, vo forme prášku. QUANTI-Blue™ predstavoval kolorimetrický enzýmový test, vyvinutý na stanovenie akejkoľvek aktivity alkalickéj fosfatázy v supernatante bunkovej kultúry.

Obsah prášku sa vysypal do 250 ml sterilnej fľaše opatrenej vrchnákom a bol doplnený vodou bez endotoxínu na 100 ml. Celý obsah sa dôkladne premiešal. Pre zaistenie kompletného rozpustenia prášku, detekčné médium sa umiestnilo do vodného kúpeľa a zahrievalo sa po dobu 30 minút, pri teplote 37°C . Detekčné médium bolo možné použiť ihneď po príprave, alebo sa mohlo uchovať v chlade pri 2-8 °C , po dobu dvoch týždňov. Pri opakovanom použití, bolo potrebné detekčného média nahriať vo vodnom kúpeli na teplotu 37°C (Invivogen 2016c).

5.2.3 Príprava roztokov analyzovaných látok

Analyzované látky boli nasyntetizované v Centre biomedicínskeho výskumu (CBV). Aby sa docielila presnosť výsledkov v in vitro analýze, bolo potrebné pripraviť

z každej látky zásobný roztok v rovnakom objeme 1 ml a koncentrácii 10 mM. Látky sa riedili v dimethylsulfoxide (DMSO). Na základe molekulových hmotností jednotlivých látok sa vypočítala teoretická navážka každej látky. Potom boli jednotlivé látky navážené na analytických váhach, priamo do označených vialiek. Na základe skutočných navážok sa dopočítal presný objem DMSO, ktorým sa jednotlivé látky nariedili. Takto získané zásobné roztoky boli uložené do mrazu a pred experimentom sa rozmrazili vo vodnom kúpeli.

5.2.4 Príprava štandardov TLR4

Ligandy MPLAs a LPS-RS sú štandardy Toll-like receptorov 4, ktoré sa použili v in vitro analýze agonizmu ligandov hTLR4 a ku stanoveniu EC50 a IC50. Jednotlivé ligandy sa postupne nariedili na požadovanú koncentráciu.

Základný roztok MPLAs (1mg/ml) sa pripravil pridaním 1 ml DMSO do vialky s obsahom 1 mg MLPAs. Pripravený roztok sa nechal za pomoci ultrasonického kúpeľa 15 minút sonikovať, do úplného rozpustenia. Riedením základného roztoku MPLAs s fyziologickým roztokom sa pripravila požadovaná koncentrácia 500 $\mu\text{mol/l}$. Podobným postupom riedenia sa pripravila požadovaná koncentrácia ligandu LPS-RS (100 ng/ml). Tieto koncentrácie boli použité ako štandardy v in vitro analýze nových ligandov (Invivogen 2016b).

Pri stanovení EC50, sa zo základného roztoku MPLAs (1mg/ml) pripravili nové koncentrácie, riedením pomocou NaCl 0,9% :

1. roztok MPLAs $c=100\ 000\ \text{ng/ml}$
2. roztok MPLAs $c=50\ 000\ \text{ng/ml}$
3. roztok MPLAs $c=10\ 000\ \text{ng/ml}$
4. roztok MPLAs $c=1000\ \text{ng/ml}$
5. roztok MPLAs $c=100\ \text{ng/ml}$
6. roztok MPLAs $c=10\ \text{ng/ml}$
7. roztok MPLAs $c=0,1\ \text{ng/ml}$
8. roztok MPLAs $c=0,001\ \text{ng/ml}$
9. roztok MPLAs $c=0,00001\ \text{ng/ml}$

Pri stanovení IC50, sa ako prvé pripravil základný roztok LPS-RS (5mg/ml), pridaním 1 ml DMSO, do vialky s obsahom 5 mg LPR-RS. Pripravený roztok sa nechal za pomoci ultrasonického kúpeľa 15 minút sonikovať, do úplného rozpustenia (Invivogen 2016b).

Z pripraveného základného roztoku LPS-RS sa pripravili nové koncentrácie, riedením pomocou NaCl 0,9% :

1. roztok LPR-RS c= 1000 ng/ml
2. roztok LPR-RS c=500 ng/ml
3. roztok LPR-RS c=100 ng/ml
4. roztok LPR-RS c=50 ng/ml
5. roztok LPR-RS c= 10 ng/ml

5.3 In vitro screeningová analýza agonizmu ligandov hTLR4

5.3.1 Princíp analýzy

HEK-Blue™ hTLR4 bunky na ktorých experiment prebiehal, boli špeciálne vyvinuté pre štúdium imunostimulácie ľudských hTLR4 receptorov pomocou monitoringu aktivácie NF-κB. (Invivogen 2016a)

Toll-like receptor 4 je aktivovaný prostredníctvom lipopolysacharidu (LPS), ktorý tvorí základnú zložku vonkajšej membrány gramnegatívnych baktérií. Aby došlo k indukcii signalizačnej kaskády, receptor TLR4 interaguje s množstvom iných koreceptorov, ako napr. CD14, LPS binding protein (LBP) a myeloid differentiation protein 2 (MD-2). Signalizačná kaskáda následne vedie k produkcii prozápalových cytokínov a aktivácii NF-κB. Bunky HEK-Blue™ sú tvorené okrem iného aj reportérovým génom SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase), pomocou ktorého zistíme aktiváciu receptora TLR4. Pri aktivácii receptora TLR4, následná aktivita NF-κB indukuje tvorbu SEAP. Aktivitu SEAP v bunkách analyzovaného supernatantu, môžeme zistiť, pomocou detekčného média QUANTI-Blue™. Detekčné médium mení farbu z fialovej na modrú v závislosti na množstve prítomnej alkalickéj fosfatázy. Táto farebná zmena sa následne hodnotí spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 630nm, pomocou multidetekčnej čítačky mikrodôštičiek Synergy HT (Invivogen 2016c).

HEK-Blue™ bunky slúžili k určeniu imunomodulačnej aktivity analyzovaných látok na hTLR4. Ako zrovnávacie štandardy boli použité dva ligandy TLR4 (LPS-RS a MPLAs). MPLAs predstavoval štandard agonistu TLR4, ktorý aktivoval TLR4 receptory. Ligand LPS-RS bol použitý ako štandard antagonistu TLR4, ktorý po naviazaní na TLR4 spôsobil inhibíciu agonistu v závislosti na koncentrácii.

5.3.2 Postup analýzy

Celý postup práce bol vykonávaný v laminárnom boxe za dodržania striktných aseptických podmienok. Predtým, ako bol pracovný postup zahájený, deaktivované médium sa vložilo do vodného kúpeľa a nahrialo sa na teplotu 37°C. Z vopred pripraveného zásobného roztoku každej analyzovanej látky (10 mM) sa nariedením pripravili nové roztoky v objeme 1ml s koncentráciou 500 µM. Výpočtom sa zistil potrebný objem zásobného roztoku (50 µl), ktorý sa doplnil deaktivovaným médiom (950 µl), na požadovaný objem. Pripravené koncentrácie roztokov jednotlivých látok sa napipetovali do dôkladne označených vialiek. Každý roztok látky sa následne napipetoval do plastového zásobníka podľa rovnakej schémy, ako sa postupovalo pri ďalšom pipetovaní do 96-jamkovej mikrodostičky. Pripravené štandardy MPLAs (10 µmol/l) a LPS-RS (100 ng/ml) sa napipetovali do zásobníka, podľa rovnakej schémy (tab. 7, tab. 8).

V ďalšom kroku sa z inkubátora vybrala kultivačná nádoba s hTLR4 bunkami, dôkladne sa postriekala etanolom a následne sa vložila do laminárneho boxu. Z kultivačnej nádoby sa odsalo prebytočné médium a napipetovalo sa 3 ml nového deaktivovaného média. Deaktivovaným médiom sa niekoľkokrát spláchni bunky, zachytené na dne kultivačnej nádoby. Ak sa oddelili všetky bunky od dna nádoby, následný objem bunkovej suspenzie (3ml) sa preniesol do 50 ml skúmavky.

V tomto kroku bolo potrebné zistiť presný počet buniek v 1 ml bunkovej suspenzie. 200 µl bunkovej suspenzie sa odobralo do novej skúmavky a bolo doplnené s 1800 µl DPBS. Pipetou sa celý obsah dôkladne premiešal. Následne sa napipetovalo 50 µl suspenzie do Bürkerovej komôrky a bunky sa spočítali. Potom, čo bol zistený počet buniek v 1 ml, sa musel zistiť počet buniek a objem potrebný na 4 mikrodostičky. Na jednu mikrodostičku bolo potrebné 23 ml bunkovej suspenzie s počtom 140 000 buniek/ml. Výpočtom sa zistil presný počet buniek potrebných na 2 mikrodostičky a na základe toho sa vypočítalo, koľko ml buniek bolo potrebné pridať k deaktivovanému médiu, aby sa dosiahla požadovaná bunková suspenzia s objemom 46 ml.

Suspenzia buniek, ktorá sa nepotrebovala na experiment, bola premiestnená do novej kultivačnej nádoby a doplnila sa rastovým médiom na 10 ml. Nádoba sa označila a

bola vložená do inkubátora. Nespotrebovaným bunkám bolo umožnené narásť, pre potreby ďalšieho experimentu.

Suspenszia s bunkami (V=46 ml) sa vyliala do plastového zásobníka a multikanálovou mikropipetou sa napipetovalo 180 μ l do každej jamky 96-jamkovej mikrodštičky. Tento krok sa zopakoval ešte jedenkrát. Následne sa do dvoch mikrodštičiek napipetovalo 20 μ l z každého roztoku analyzovanej látky a 20 μ l štandardov MPLAs a LPS-RS (tab. 7, tab. 8). Výsledné koncentrácie analyzovaných látok a štandardov po zriedení 1:10, sú uvedené v legende tabuľky (tab. 7, tab. 8).

Tab. 7 Schéma pipetovania in vitro analýzy agonizmu ligandov hTLR4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A
B	0	SB003	SB004	SB005	SB006	LPS - RS	MPLA s	SB009	SB010	SB011	SB012	0	B
C	0	SB003	SB004	SB005	SB006	LPS - RS	MPLA s	SB009	SB010	SB011	SB012	0	C
D	0	SB003	SB004	SB005	SB006	LPS - RS	MPLA s	SB009	SB010	SB011	SB012	0	D
E	0	SB003	SB004	SB005	SB006	LPS - RS	MPLA s	SB009	SB010	SB011	SB012	0	E
F	0	SB003	SB004	SB005	SB006	LPS - RS	MPLA s	SB009	SB010	SB011	SB012	0	F
G	0	SB003	SB004	SB005	SB006	LPS - RS	MPLA s	SB009	SB010	SB011	SB012	0	G
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Legenda: **Analyzované látky:** SB003-006 a SB009-SB012 (c=50 μ M); **Antagonista TLR4:** LPS-RS (c=10 ng/ml); **Agonista TLR4:** MPLAs (c=50 μ mol/l); **Antagonista TLR4:** LPS-RS (c=10 ng/ml); **0:** 20 μ l NaCl 0,9%

Tab. 8 Schéma pipetovania in in vitro analýzy agonizmu ligandov hTLR4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A
B	0	SB013	SB014	SB015	SB016	LPS-RS	MPLAs	SB017	SB018	SB019	ADJ-033	0	B
C	0	SB013	SB014	SB015	SB016	LPS-RS	MPLAs	SB017	SB018	SB019	ADJ-033	0	C
D	0	SB013	SB014	SB015	SB016	LPS-RS	MPLAs	SB017	SB018	SB019	ADJ-033	0	D
E	0	SB013	SB014	SB015	SB016	LPS-RS	MPLAs	SB017	SB018	SB019	ADJ-033	0	E
F	0	SB013	SB014	SB015	SB016	LPS-RS	MPLAs	SB017	SB018	SB019	ADJ-033	0	F
G	0	SB013	SB014	SB015	SB016	LPS-RS	MPLAs	SB017	SB018	SB019	ADJ-033	0	G
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Legenda: **Analyzované látky:** SB013-019 a ADJ-033 (c=50 µM); **Antagonista TLR4:** LPS-RS (c=10 ng/ml); **Agonista TLR4:** MPLAs (c=50 µmol/l); **Antagonista TLR4:** LPS-RS (c=10 ng/ml); **0:** 20µl NaCl 0,9%

Po napipetovaní sa mikrodoštičky vložili do inkubátora a nechali sa inkubovať 16 hodín, pri teplote 37°C a 5% CO₂. Po uplynutí inkubačnej doby sa 20 µl supernatantu z každej jamky napipetovalo do rovnakej jamky detekčnej mikrodoštičky, ktorá obsahovala 180 µl zohriateho detekčného média QUANTI-Blue™ v každej jamke. Pre uľahčenie a lepšiu presnosť práce sa použila multikanálová mikropipeta, ktorou sa pipetoval každý riadok zvlášť. Takto sa pripravené mikrodoštičky určené na detekciu, vložili do inkubátora na 2 hodiny, pri teplote 37°C a 5% CO₂.

Po uplynutí dvoch hodín sa v každej jamke vyhodnotila hladina SEAP, pomocou multidetekčnej čítačky mikrodoštičiek Synergy HT. Hladiny SEAP sa hodnotili spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 60nm.

5.4 In vitro screeningová analýza antagonizmu ligandov hTLR4

Celý postup práce bol vykonávaný totožným postupom ako v prípade analýzy agonizmu. Po napipetovaní 180 µl suspenzie s bunkami do každej jamky 96-jamkovej doštičky sa následne napipetovalo 20 µl z každého roztoku analyzovanej látky a 20 µl štandardov MPLAs a LPS-RS (tab. 9, tab. 10). Jediný rozdiel v postupe predstavovalo pripipetovanie 50 µmol/l agonistu MPLAs do každej doštičky po uplynutí jednej hodiny.

Takto pripravené doštičky sa vložili do inkubátora a nechali sa inkubovať 16 hodín, pri teplote 37°C a 5% CO₂. Hodnotenie hladín SEAP sa vykonalo totožným postupom ako v prípade analýzy agonizmu. Výsledné koncentrácie analyzovaných látok a štandardov po zriedení 1:10, sú uvedené v legende tabuľky (tab. 9, tab. 10)

Tab. 9 Schéma pipetovania in vitro analýzy antagonizmu ligandov hTLR4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A
B	0	SB003 MPLA s	SB004 MPLA s	SB005 MPLA s	SB006 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB009 MPLA s	SB010 MPLA s	SB011 MPLA s	SB012 MPLA s	0 MP LAs	B
C	0	SB003 MPLA s	SB004 MPLA s	SB005 MPLA s	SB006 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB009 MPLA s	SB010 MPLA s	SB011 MPLA s	SB012 MPLA s	0 MP LAs	C
D	0	SB003 MPLA s	SB004 MPLA s	SB005 MPLA s	SB006 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB009 MPLA s	SB010 MPLA s	SB011 MPLA s	SB012 MPLA s	0 MP LAs	D
E	0	SB003 MPLA s	SB004 MPLA s	SB005 MPLA s	SB006 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB009 MPLA s	SB010 MPLA s	SB011 MPLA s	SB012 MPLA s	0 MP LAs	E
F	0	SB003 MPLA s	SB004 MPLA s	SB005 MPLA s	SB006 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB009 MPLA s	SB010 MPLA s	SB011 MPLA s	SB012 MPLA s	0 MP LAs	F
G	0	SB003 MPLA s	SB004 MPLA s	SB005 MPLA s	SB006 MPLA s	LPS -RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB009 MPLA s	SB010 MPLA s	SB011 MPLA s	SB012 MPLA s	0 MP LAs	G
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Legenda: **Analyzované látky:** SB003-006 a SB009-SB012 (c=50 µM); **Antagonista TLR4:** LPS-RS (c=10 ng/ml); **Agonista TLR4:** MPLAs (c=50 µmol/l); **Antagonista TLR4:** LPS-RS (c=10 ng/ml); **0:** 20µl NaCl 0,9% ; po 1h pridaný **Agonista TLR4:** MPLAs (c=50 µmol/l)

Tab. 10 Schéma pipetovania in vitro analýzy antagonizmu ligandov hTLR4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A
B	0	SB013 MPLA s	SB014 MPLA s	SB015 MPLA s	SB016 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB017 MPLA s	SB018 MPLA s	SB019 MPLA s	ADJ- 033 MPLA s	0 MP LAs	B
C	0	SB013 MPLA s	SB014 MPLA s	SB015 MPLA s	SB016 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB017 MPLA s	SB018 MPLA s	SB019 MPLA s	ADJ- 033 MPLA s	0 MP LAs	C
D	0	SB013 MPLA s	SB014 MPLA s	SB015 MPLA s	SB016 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB017 MPLA s	SB018 MPLA s	SB019 MPLA s	ADJ- 033 MPLA s	0 MP LAs	D
E	0	SB013 MPLA s	SB014 MPLA s	SB015 MPLA s	SB016 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB017 MPLA s	SB018 MPLA s	SB019 MPLA s	ADJ- 033 MPLA s	0 MP LAs	E
F	0	SB013 MPLA s	SB014 MPLA s	SB015 MPLA s	SB016 MPLA s	LPS - RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB017 MPLA s	SB018 MPLA s	SB019 MPLA s	ADJ- 033 MPLA s	0 MP LAs	F
G	0	SB013 MPLA s	SB014 MPLA s	SB015 MPLA s	SB016 MPLA s	LPS -RS MP LAs	MPLA s MPLA s	SB017 MPLA s	SB018 MPLA s	SB019 MPLA s	ADJ- 033 MPLA s	0 MP LAs	G
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Legenda: **Analyzované látky:** SB013-019 a ADJ-033 (c=50 µM); **Antagonista TLR4:** LPS-RS (c=10 ng/ml); **Agonista TLR4:** MPLAs (c=50 µmol/l); **Antagonista TLR4:** LPS-RS (c=10 ng/ml); **0:** 20µl NaCl 0,9%; po 1h pridaný **Agonista TLR4:** MPLAs (c=50 µmol/l)

5.5 Stanovenie EC50 štandardného agonistu

Pracovný postup stanovenia EC 50 štandardu MPLAs je totožný s postupom uvedeným v prípade in vitro analýzy agonizmu, až na niekoľko rozdielov. Základné kroky sú zhrnuté nižšie.

Bunková suspenzia HEK-Blue™ hTLR4 bola pripravená štandardným spôsobom na výsledný objem, potrebný pre dve mikrodštičky. Napipetovalo sa 180 µl bunkovej suspenzie do každej jamky 96-jamkovej mikrodštičky a následne sa pridalo 20 µl pripravených štandardov MPLAs, podľa schémy pipetovania (tab. 11).

Tab. 11 Schéma pipetovania MPLAs pre stanovenie EC50

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A
B	0	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	0,1 ng/ml	0,1 ng/ml	0,1 ng/ml	0,1 ng/ml	0	0	0	B
C	0	50 000 ng/ml	50 000 ng/ml	50 000 ng/ml	50 000 ng/ml	0,001 ng/ml	0,001 ng/ml	0,001 ng/ml	0,001 ng/ml	0	0	0	C
D	0	10 000 ng/ml	10 000 ng/ml	10 000 ng/ml	10 000 ng/ml	0,00001 ng/ml	0,00001 ng/ml	0,00001 ng/ml	0,00001 ng/ml	0	0	0	D
E	0	1000 ng/ml	1000 ng/ml	1000 ng/ml	1000 ng/ml	10 000 ng/ml	10 000 ng/ml	10 000 ng/ml	10 000 ng/ml	0	0	0	E
F	0	100 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	50 000 ng/ml	50 000 ng/ml	50 000 ng/ml	50 000 ng/ml	0	0	0	F
G	0	10 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	0	0	0	G
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Legenda: **koncentrácie štandardov MPLAs; 0:** 20µl NaCl 0,9%

Mikrodoštičky sa inkubovali 22 hodín pri teplote 37°C a 5% CO₂. Po 22 hodinách sa odobralo 20 µl supernatantu z každej jamky, do rovnakej jamky novej doštičky s obsahom 180 µl detekčného média QUANTI-Blue™ v každej jamke. Mikrodoštičky sa nechali inkubovať pri teplote 37°C a 5% CO₂. Hodnotenie hladín SEAP sa prevádzalo po uplynutí 2 a 3 hodín.

5.6 Stanovenie IC 50 štandardného antagonistu

Bunková suspenzia HEK-Blue™ hTLR4 bola pripravená štandardným spôsobom na výsledný objem, potrebný pre dve mikrodoštičky. V prvom kroku sa pridalo 180 µl bunkovej suspenzie HEK-Blue™ hTLR4 do každej jamky 96-jamkovej mikrodoštičky. Následne sa pridalo 20 µl štandardov LPS-RS podľa schémy pipetovania (tab. 12), následne sa do každej jamky, ktorá obsahovala LPS-RS, pridalo 20 µl štandardu MPLAs (100 µg/ml). V ďalších krokoch inkubácie a detekcie sa postupovalo rovnako,

ako v prípade stanovenia EC50 v štandarde ligandu MPLAs. Mikrodoštičky sa nechali inkubovať. Hodnotenie hladín SEAP sa prevádzalo po uplynutí 2 a 3 hodín.

Tab. 12 Schéma pipetovania LPS-RS na stanovenie IC 50 inhibičnou štúdiou

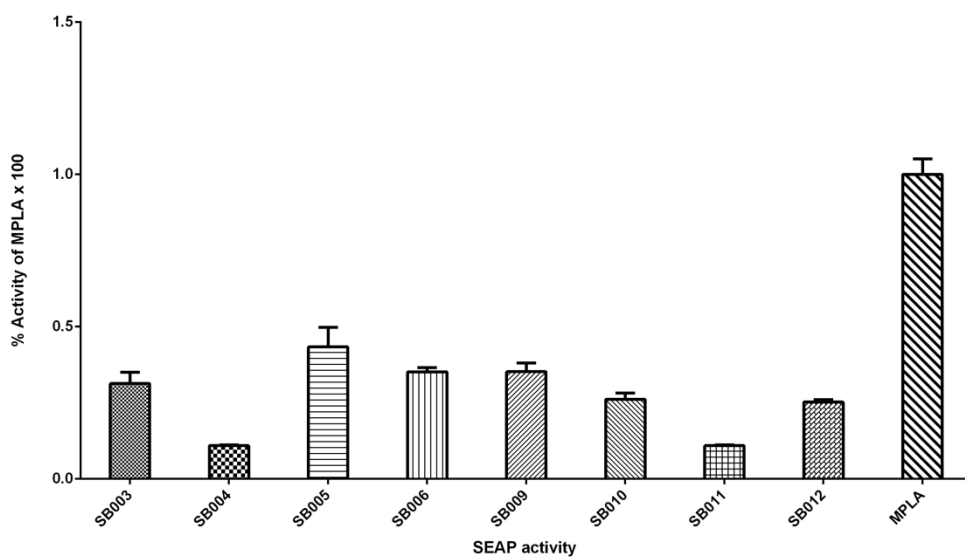
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A
B	0	0	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	1000 ng/ml	500 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	0	B
C	0	0	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	1000 ng/ml	500 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	0	C
D	0	0	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	1000 ng/ml	500 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	0	D
E	0	0	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	1000 ng/ml	500 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	0	E
F	0	0	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	1000 ng/ml	500 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	0	F
G	0	0	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	1000 ng/ml	500 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	0	G
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Legenda: **koncentrácie štandardov LPS-RS; 0:** 20µl NaCl 0,9%

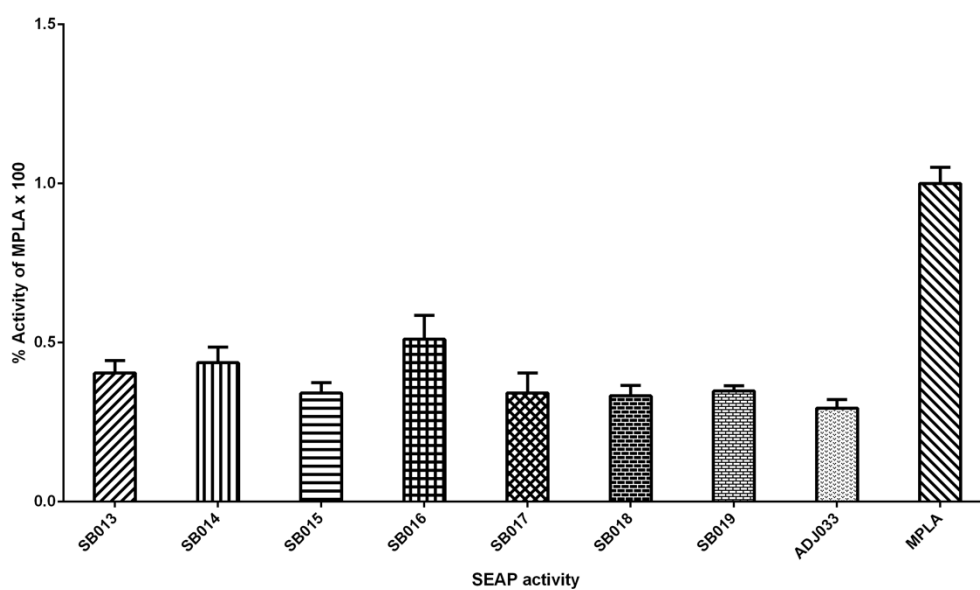
6 VÝSLEDKY

6.1 In vitro screeningová analýza agonizmu ligandov hTLR4

Pri in vitro analýze agonizmu ligandov na receptore TLR4 bola porovnaná agonistická aktivita každej látky s agonistickou aktivitou štandardu MPLA. Výsledky jednotlivých látok vzťahujúce k štandardu MPLA (obr. 5, obr. 6).



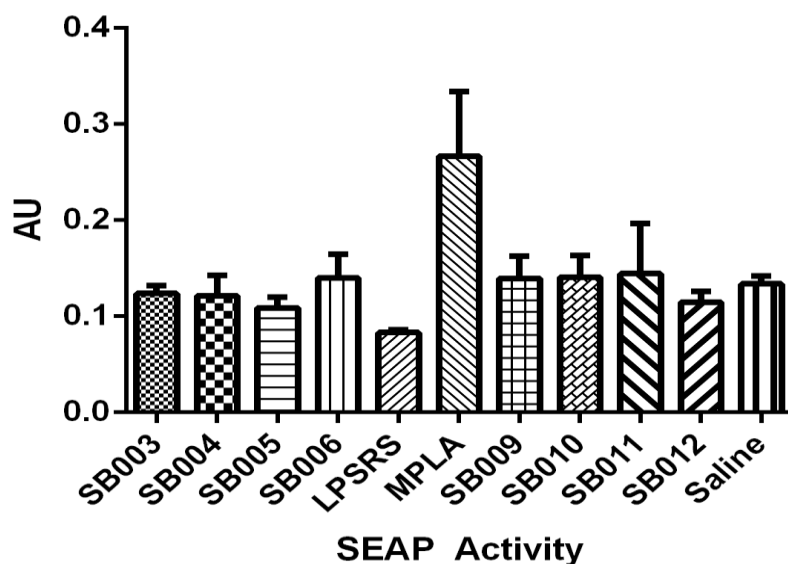
Obr. 5 Analyzované látky: SB003- SB006 a SB009- SB012 (c=50 μ M); Agonista TLR4: MPLAs (c=50 μ mol/l) n=5



Obr. 6 Analyzované látky: SB013- SB019 a ADJ033 (c=50 μ M); Agonista TLR4: MPLAs (c=50 μ mol/l) n=5

6.2 In vitro screeningová analýza antagonizmu ligandov hTLR4

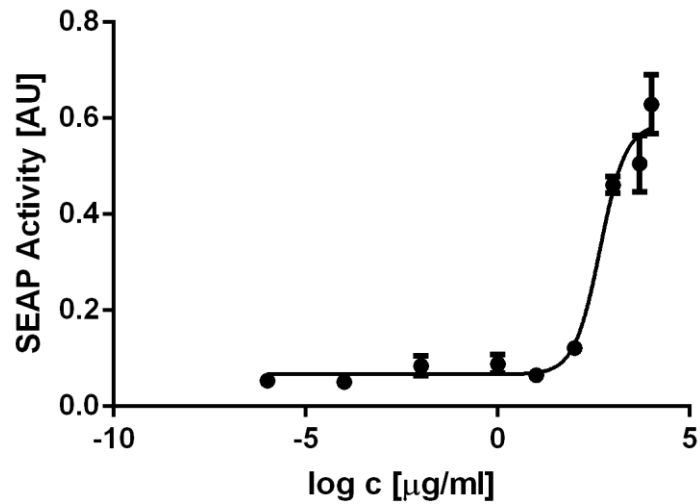
Pri in vitro analýze antagonizmu ligandov na receptore TLR4 bola porovnaná antagonistická aktivita každej látky s antagonistickou aktivitou štandardu LPS-RS. Výsledky látok SB003- SB006 a SB009- SB012 vzťahnuté k štandardu LPS-RS (obr. 7). V prípade látok SB013- SB019 a ADJ033 sa nepodarilo získať validné hodnoty.



Obr. 7 Analyzované látky: Analyzované látky: SB003- SB006 a SB009- SB012 (c=50 μ M); Antagonista TLR4: LPS-RS (c=10 ng/ml); Agonista TLR4: MPLAs (c=50 μ mol/l) n=5

6.3 Stanovenie EC50 štandardného agonistu

Na základe odozvy klesajúcich koncentrácií agonistu MPLAs bola stanovená polovičná maximálna efektívna koncentrácia (EC50) (obr. 8, tab. 13).



Obr. 8 EC50 agonistu MPLAs

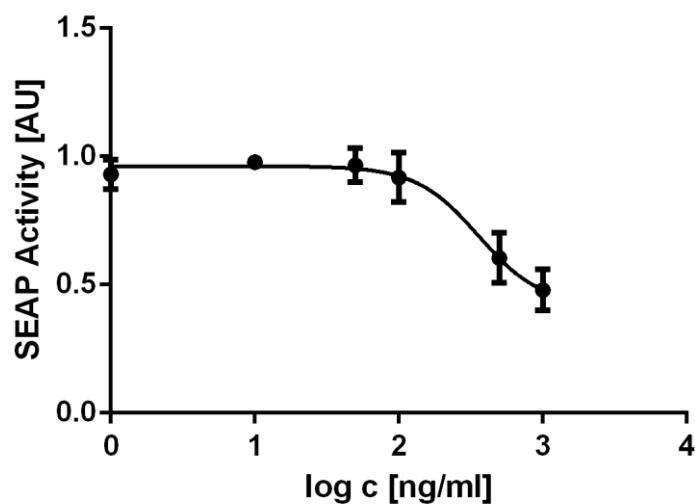
Tab. 13 Popisná charakteristika krivky EC50 z GraphPad Prism

LOG(AGONIST) VS. RESPONSE (FOUR PARAMETERS)	
BEST-FIT VALUES	
BOTTOM	0,06671
TOP	0,5882
LOG EC50	2,664
HILL SLOPE	1,301
EC50	461,1
SPAN	0,5215
STD. ERROR	
BOTTOM	0,009725
TOP	0,02073
LOG EC50	0,0779
HILL SLOPE	0,2188
SPAN	0,02385

95% CONFIDENCE INTERVALS	
BOTTOM	0,04691 to 0,08652
TOP	0,5460 to 0,6304
LOG EC50	2,505 to 2,822
HILL SLOPE	0,8554 to 1,747
EC50	320,0 to 664,5
SPAN	0,4729 to 0,5700
GOODNESS OF FIT	
DEGREES OF FREEDOM	32
R SQUARE	0,9672
ABSOLUTE SUM OF SQUARES	0,05762
SY.X	0,04244
NUMBER OF POINTS	
ANALYZED	36

6.4 Stanovenie IC 50 štandardného antagonistu

Antagonistický efekt LPS-RS na aktivovaných TLR4 receptoch a stanovenú polovičnú maximálnu inhibičnú koncentráciu (IC 50) (obr. 9, tab. 14).



Obr. 9 IC50 antagonistu LPS-RS

Tab. 14 Popisná charakteristika krivky IC50 z GraphPad Prism

LOG(INHIBITOR) VS. RESPONSE (FOUR PARAMETERS)	
BEST-FIT VALUES	
BOTTOM	0,419
TOP	0,9624
LOG IC50	2,555
HILL SLOPE	-2,011
IC50	358,7
SPAN	0,5435
STD. ERROR	
BOTTOM	0,06548
TOP	0,02033
LOG IC50	0,07756
HILL SLOPE	0,6381
SPAN	0,07622

95% CONFIDENCE INTERVALS	
BOTTOM	0,2878 to 0,5501
TOP	0,9217 to 1,003
LOG IC50	2,399 to 2,710
HILL SLOPE	-3,289 to -0,7328
IC50	250,8 to 513,0
SPAN	0,3908 to 0,6962
GOODNESS OF FIT	
DEGREES OF FREEDOM	56
R SQUARE	0,873
ABSOLUTE SUM OF SQUARES	0,357
SY.X	0,07984
NUMBER OF POINTS	
ANALYZED	60

7 DISKUSIA

Základným cieľom práce bolo posúdiť potenciálnu aktivitu novo syntetizovaných látok voči TLR4 s predpokladom, že môžu byť účinnými stimulátormi, či prípadne inhibítormi tohoto receptora, ktorý je dôležitou súčasťou imunitného systému. Pri screeningovej analýze potenciálnych ligandov SB003-006, SB009-SB012, SB013-SB019 a ADJ-033 na receptoroch TLR4 bola hodnotená ich imunostimulačná/imunoinhibičná aktivita, ktorá bola porovnávaná s aktivitou štandardného agonistu týchto receptorov MPLA a štandardného antagonistu týchto receptorov LPS-RS. Z výsledkov sme zistili, že látky SB003, SB005, SB006, SB009, SB010, SB013, SB014, SB016 vykazujú agonistickú aktivitu v rozmedzí cca 30-50 % hodnoty agonistu MPLA. Na základe širšej analýzy sme dospeli k záveru, že v prípade niektorých ligandov, ktoré aj keď vykazovali vyššiu agonistickú aktivitu v porovnaní s inými, potenciálne použitie nie je možné z dôvodu limitovanej rozpustnosti. Jedná sa napr. o látku SB016, ktorá sa podľa dosiahnutých výsledkov (obr. 6) javí ako najsilnejší agonista.

Pri screeningovej analýze potenciálnych ligandov SB003-006 a SB009-SB012 na receptoroch TLR4 bola hodnotená ich imunoinhibičná aktivita v porovnaní s aktivitou štandardného antagonistu týchto receptorov LPS-RS. Z výsledkov je možné usúdiť, že látka SB005 vykazuje miernu antagonistickú aktivitu (obr. 7). Z tohto dôvodu bola u tejto látky vykonaná ďalšia analýza potenciálnej inhibičnej aktivity (vid' ďalej). V prípade potenciálnych ligandov SB013-SB019 a ADJ-033 sa nepodarilo odpovedajúce výsledky získať z dôvodu zlej aktivity použitého detekčného média pri vyhodnocovaní výsledkov.

Vyššie uvedené výsledky ukazujú, že látka SB005 vykazovala ako agonistickú aktivitu voči TLR4, tak aj antagonistickú. Túto skutočnosť by bolo možné vysvetliť jej možným dualistickým efektom, kedy pôsobí parciálne agonisticky a parciálne antagonisticky. Perspektívne by tento nález mohol byť impulzom pre ďalšiu chemickú obmenu štruktúry tejto zlúčeniny, ktorá by mohla viesť k ďalším látkam so silnejším antagonistickým efektom.

Pre podrobnejšiu analýzu agonistickej a antagonistickej aktivity identifikovaných ligandov TLR4 bolo treba najprv stanoviť príslušné účinnostné parametre u štandardného agonistu a antagonistu. U štandardného agonistu MPLA bola pomocou analýzy stimulačnej krivky úspešne stanovená efektívna koncentrácia (EC50) (obr. 8). Pri

inhibičnej štúdií štandardného antagonistu LPS-RS sa skúmal efekt rôznych koncentrácií antagonistu na stimulačnú aktivitu agonistu MPLAs. Pomocou analýzy inhibičnej krivky bola úspešne určená koncentrácia inhibujúca efekt agonistu na 50% (IC50) (obr. 9). Zistené parametre štandardných ligandov TLR4 boli základom pre porovnávaciu štúdiu, ktorá by porovnávala aktivitu a účinok testovaných potenciálnych ligandov. V prípade ligandu SB005 bolo vykonané stanovenie antagonistickej aktivity pomocou inhibičnej štúdie, ale vzhľadom k zlej rozpustnosti sa nepodarilo IC50 stanoviť. Kvôli obmedzenej rozpustnosti sa nepodarilo vykonať ani ďalšie testy, pretože nebolo možné dosiahnutie efektívnych koncentrácií.

Na základe zváženia všetkých parametrov testovaných potenciálnych ligandov, môžeme za vhodných kandidátov k ďalšiemu hodnoteniu považovať zo všetkých hodnotených ligandov s agonistickou aktivitou zlúčeniny SB003 a SB010 a ligand SB005, ktorý vykazuje určitú antagonistickú aktivitu. Zlúčeniny zo skupiny SB sú zaujímavé aj z ďalšieho pohľadu, pretože boli navrhnuté s cieľom skúmať vplyv chirálnej skupiny v molekule na vnútornú aktivitu (Honegr et al. 2018), pričom ďalšie hodnotenie by malo byť cieľom rozpracovania tejto témy.

Výsledky analýzy látok typu SB možno porovnať s obdobnou štúdiou, ktorá bola zameraná na látky odvodené od sukcinimidu (zlúčeniny zo skupiny DM), ktoré sú predlohovými štruktúrami pre nami testované látky (Honegr et al. 2018). V tejto práci autori tiež skúmali imunomodulačnú aktivitu potenciálnych ligandov DM na hTLR4 s ich ďalším využitím vo vakcínach. Analýza prebiehala na HEK-Blue™ hTLR4 bunkách s využitím pozitívnej kontroly agonistu MPLA a antagonistu LPS-RS. Z výsledkov práce vyplýva, že niektoré látky vykazovali agonistickú aktivitu v rozsahu 30-80 % aktivity MPLA. Nami testované látky typu SB vykazovali aktivitu v rozmedzí cca 30-50 % použitého štandardného komparátoru, čo z nich robí zaujímavých kandidátov pre ďalší výskum s podobnou aktivitou voči TLR4, tak ako látky typu DM.

Z obecného pohľadu výsledky práce potvrdzujú nálezy, ktoré ukazujú, že i pomerne malá zmena štruktúry zlúčenín môže viesť ku zmene účinku voči TLR4. Vo veľmi recentnej štúdií zameranej na interakcie látok s TLR4, v ktorej bol použitý rovnaký in vitro model s HEK293 bunkami exprimujúcimi TLR4, bol zistený zvrät účinku u zlúčenín typu kardiopolipinu pri nasýtení acylového reťazca z antagonistického efektu na agonistický (Pizzuto et al. 2019). V našom prípade u látky SB005, ktorá je štruktúrne len

minimálne odlišná od ďalších nami testovaných látok, nedošlo k úplnej konverzii efektu z agonistického na antagonistický, ale podľa experimentálnych dát je možné, že došlo k zmene agonistického efektu detekovaného u ostatných zlúčenín na parciálne agonistický/antagonistický.

Výsledky, ktoré boli v práci dosiahnuté neodpovedali v niektorých oblastiach ideálnym očakávaniam. K faktorom, ktoré mohli ovplyvniť konečné výsledky patrí napríklad skutočnosť, že experimenty na živých bunkách so sebou prinášajú mnoho úskalí aj napriek presným postupom práce na základe protokolu. Z hľadiska praktického vykonania experimentov je potrebné vziať do úvahy, že stav a rast buniek môže byť ovplyvnený podmienkami prostredia. V prípadoch, keď bunky nedokázali priľnúť na dno kultivačnej nádoby, pozorovali sme faktory vplyvu rôznych šarží a pôvodu FBS na rast buniek. Zistilo sa, že bunky najlepšie rástli za použitia FBS z EU a USA. Analýza látok prebiehala vždy na dvoch totožných mikrodoštičkách. Bolo to z dôvodu dosiahnutia čo najlepšej presnosti výsledkov a možnosti odhalenia prípadnej chyby. V prípade testovania viacerých koncentrácií MPLA a LPS-RS, viaceré jamky obsahovali rovnakú koncentráciu. Nerovnomerné prúdenie vzduchu v inkubátore, môže spôsobiť rozdielne teploty v jednotlivých jamkách mikrodoštičiek. Rozdielne teploty mohli mať následne vplyv na rast a aktivitu buniek. Z toho dôvodu sa jamky krajných riadkov a stĺpcov nepoužívali k analýze látok a bol do nich pridávaný blank. Rozpustnosť analyzovaných látok do veľkej miery ovplyvnila výsledky. Analyzované látky boli k stanoveniu použité v rovnakej koncentrácií, napriek tomu rozpustnosť každej látky v danej koncentrácií sa mohla líšiť. Aby sme toto riziko čo najviac minimalizovali, experimenty sa vykonávali vždy niekoľkokrát za sebou a každému kroku predchádzal dobre naštudovaný postup práce so zaistením vhodných podmienok, ktoré s tým súviseli. Preto sa domnievame, že dosiahnuté výsledky po ďalšom potvrdení a ich prípadnom rozšírení by mohli poslúžiť ako dobré východisko pre ďalšiu výskumnú prácu v danej oblasti.

8 ZÁVER

Adjuvanciá predstavujú dôležitý komponent, ktorý prináša vakcínam radu výhod. Zvýšenie imunogenity a možnosť použitia nižších koncentrácií antigénu, prispelo už k formulácií niekoľkých vakcín, ktoré by neboli možné bez pomoci adjuvancia sformulovať. Výskum smerom k novým, bezpečným a účinným adjuvanciám, ktoré dokážu vyvolať dostatočnú imunitnú odozvu, predstavuje základ pre vývoj nových, potrebných vakcín.

Experimentálne výsledky *in vitro*, prezentované v tejto práci potvrdili teoretické predpoklady o významnej interakcii novo syntetizovaných zlúčenín s TLR4 u niekoľkých z analyzovaných látok. V prípade dvoch ligandov, SB003 a SB010, ktoré *in vitro* stimulujú hTLR4 v relatívne významnej miere, možno uvažovať o ich ďalšom skúmaní. U látky SB005 sa nám naopak podarilo preukázať parciálne antagonistickú aktivitu voči TLR4. Tieto tri zmienené ligandy vzhľadom na dostatočnú rozpustnosť a imunostimulačnú aktivitu predstavujú podklad pre ďalší výskum ich potenciálu na periférnych krvných bunkách (PBMC), pre overenie ich účinnosti *ex-vivo*. Z výsledkov dosiahnutých u ostatných látok je možné sa domievať, že dôvodom, prečo sa nám nepodarilo preukázať ich imunomodulačnú aktivitu mohla byť ich nedostatočná rozpustnosť.

9 LITERATURA

AGUILAR, J. C. AND E. G. RODRIGUEZ Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, May 2007, 25(19), 3752-3762.

AWATE, S., L. A. BABIUK AND G. MUTWIRI Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4, 114.

BALDRIDGE, J. R., P. MCGOWAN, J. T. EVANS, C. CLUFF, et al. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opinion on Biological Therapy*, Jul 2004, 4(7), 1129-1138.

BANDAY, A. H., S. JEELANI AND V. J. HRUBY Cancer vaccine adjuvants - recent clinical progress and future perspectives. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, Feb 2015, 37(1), 1-11.

BESU, M., S. S. MALLADI, L. M. FOX, C. D. JONES, et al. Human toll-like receptor 8-selective agonistic activities in 1-alkyl-1 h -benzimidazol-2-amines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57(17), 7325-7341.

CALANDRILLO, S. P. Vanishing vaccinations: why are so many Americans opting out of vaccinating their children? *Univ Mich J Law Reform.*, 2004, 37(2).

COFFMAN, R. L., A. SHER AND R. A. SEDER Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*, Oct 29 2010, 33(4), 492-503.

DIDIERLAURENT, A. M., S. MOREL, L. LOCKMAN, S. L. GIANNINI, et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *Journal of Immunology*, Nov 2009, 183(10), 6186-6197.

EGLIA, A., D. M. SANTER, K. BARAKAT, M. ZAND, et al. Vaccine adjuvants - understanding molecular mechanisms to improve vaccines. *Swiss Medical Weekly*, May 2014, 144, 16.

EL-OMAR, E. M., M. T. NG AND G. L. HOLD Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene*, Jan 2008, 27(2), 244-252.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY Guideline on Adjuvants in vaccines for human use - EMEA/CHMP/VEG/134716/2004. European Medicines Agency, 2018/09/17/T14:07:22+02:00 2005.

EVANS, J. T., C. W. CLUFF, D. A. JOHNSON, M. J. LACY, et al. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines*, Apr 2003, 2(2), 219-229.

FOX, C. B., D. CARTER, R. M. KRAMER, A. M. BECKMANN, et al. Chapter 6 - Current Status of Toll-Like Receptor 4 Ligand Vaccine Adjuvants. In V.E.J.C. SCHIJNS

AND D.T. O'HAGAN eds. *Immunopotentiators in Modern Vaccines (Second Edition)*. Academic Press, 2017, p. 105-127.

FUKATA, M., A. CHEN, A. S. VAMADEVAN, J. COHEN, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*, Dec 2007, 133(6), 1869-1881.

FURRIE, E., S. MACFARLANE, G. THOMSON AND G. T. MACFARLANE Toll-like receptors-2,-3 and-4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, Aug 2005, 115(4), 565-574.

GARÇON, N., G. LEROUX-ROELS AND W.-F. CHENG Vaccine adjuvants. *Perspectives in Vaccinology*, 8// 2011, 1(1), 89-113.

HARMEY, J. H., C. D. BUCANA, W. X. LU, A. M. BYRNE, et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *International Journal of Cancer*, Oct 2002, 101(5), 415-422.

HE, W. G., Q. Y. LIU, L. WANG, W. CHEN, et al. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Molecular Immunology*, Apr 2007, 44(11), 2850-2859.

HOGENESCH, H. Mechanism of immunopotential and safety of aluminum adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 2012, 3, 406.

HONEGR, J., D. MALINAK, R. DOLEZAL, O. SOUKUP, et al. Rational design of novel TLR4 ligands by in silico screening and their functional and structural characterization in vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018/01/11/ 2018.

HONEGR, J., O. SOUKUP, R. DOLEZAL, D. MALINAK, et al. Structural Properties of Potential Synthetic Vaccine Adjuvants - TLR Agonists. *Current Medicinal Chemistry*, 2015 2015, 22(29), 3306-3325.

INVIVOGEN [online]. 2019a. Available from Internet: <<https://www.invivo-gen.com/tlr4-ligands>>. Date accessed: 18.4.2019.

INVIVOGEN [online]. 2016a. Available from Internet: <http://www.invivo-gen.com/PDF/HEK_Blue_htlr4_TDS.pdf>. Date accessed: 18.4.2019.

INVIVOGEN [online]. 2016b. Available from Internet: <http://www.invivo-gen.com/PDF/LPS_RS_TDS.pdf>. Date accessed: 17.4.2019.

INVIVOGEN [online]. 2016c. Available from Internet: <http://www.invivo-gen.com/PDF/QUANTI_Blue_TDS.pdf>. Date accessed: 18.4.2019.

INVIVOGEN [online]. 2019. Available from Internet: <<https://www.invivo-gen.com/tlr4-agonist>>. Date accessed: 18.4.2019.

- LAMBRECHT, B. N., M. KOOL, M. A. M. WILLART AND H. HAMMAD Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current Opinion in Immunology*, Feb 2009, 21(1), 23-29.
- LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*, Aug 31 2010, 28 Suppl 3, C25-36.
- MARCIANI, D. J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discovery Today*, 10/15/ 2003, 8(20), 934-943.
- MARICHAL, T., K. OHATA, D. BEDORET, C. MESNIL, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Medicine*, Aug 2011, 17(8), 996-U118.
- MARRACK, P., A. S. MCKEE AND M. W. MUNKS Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology*, Apr 2009, 9(4), 287-293.
- MARTY-ROIX, R., G. I. VLADIMER, K. POULIOT, D. WENG, et al. Identification of QS-21 as an Inflammasome-activating Molecular Component of Saponin Adjuvants. *Journal of Biological Chemistry*, Jan 2016, 291(3), 1123-1136.
- MOLTENI, M., D. MARABELLA, C. ORLANDI AND C. ROSSETTI Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and express TLR-4. *Cancer Letters*, Apr 2006, 235(1), 75-83.
- MOREIN, B. AND K. L. BENGTSSON Immunomodulation by iscoms, immune stimulating complexes. *Methods*, Sep 1999, 19(1), 94-102.
- O'HAGAN, D. T. *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*. Edition ed. New York, NY: Humana Press, 2000. ISBN 9780896037359.
- OBERDAN, L., A. CUNNINGHAM AND P. L. STERN Vaccine immunology. *Perspectives in Vaccinology*, 8// 2011, 1(1), 25-59.
- PASHINE, A., N. M. VALIANTE AND J. B. ULMER Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature Medicine*, Apr 2005, 11(4), S63-S68.
- PHADKE, V. K., R. A. BEDNARCZYK, D. A. SALMON AND S. B. OMER Association between vaccine refusal and vaccine-preventable diseases in the united states: A review of measles and pertussis. *JAMA*, 2016, 315(11), 1149-1158.
- PIZZUTO, M., C. LONEZ, A. BAROJA-MAZO, H. MARTÍNEZ-BANACLOCHA, et al. Saturation of acyl chains converts cardiolipin from an antagonist to an activator of Toll-like receptor-4. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2019. doi: 10.1007/s00018-019-03113-5.
- ROOK, G. A. W. AND A. ZUMLA Gulf War syndrome: Is it due to a systemic shift in cytokine balance towards a Th2 profile? *Lancet*, Jun 1997, 349(9068), 1831-1833.

SALMON, D. A., L. H. MOULTON, S. B. OMER, M. DEHART, et al. Factors associated with refusal of childhood vaccines among parents of school-aged children: A case-control study. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 2005, 159(5), 470-476.

SANDERS, J. W., S. D. PUTNAM, M. S. RIDDLE AND D. R. TRIBBLE Military importance of diarrhea: lessons from the Middle East. *Current Opinion in Gastroenterology*, Jan 2005, 21(1), 9-14.

SCHMAUSSER, B., M. ANDRULIS, S. ENDRICH, H. K. MULLER-HERMELINK, et al. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: An implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *International Journal of Medical Microbiology*, Jun 2005, 295(3), 179-185.

SO, E. Y. AND T. OUCHI The application of Toll like receptors for cancer therapy. *International Journal of Biological Sciences*, 2010, 6(7), 675-681.

STEINHAGEN, F., T. KINJO, C. BODE AND D. M. KLINMAN TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*, Apr 2011, 29(17), 3341-3355.

TEMIZOZ, B., E. KURODA AND K. J. ISHII Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *International Immunology*, Jul 2016, 28(7), 329-338.

WOLSKA, A., E. LECH-MARANDA AND T. ROBAK Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cellular & Molecular Biology Letters*, Jun 2009, 14(2), 248-272.