

ZÁVĚRY

Cílem této disertační práce bylo připravit "ideální" struktury nesoucí Tn antigene, které by mohly být využity při modulaci jak přirozené tak i adaptivní imunity. Tn antigen byl vybrán proto, že je jedním z důležitých antigenů, které se nachází na povrchu nádorových buněk a dále proto, že bylo prokázáno, že N-acetylhexosaminu a jejich glykokonjugáty jsou schopné modulovat cytotoxickou aktivitu NK buněk.

Shrnutí:

Byly navrženy a úspěšně připraveny čtyři typy Multiple antigenic glycopeptides" (MAG):

- tyto látky byly dobře rozpoznávány monoklonálními protilátkami s Tn specifitou
- indukovaly v myším séru vysoký titer protilátek proti Tn antigenu

Rozpustné MAG mající stejnou strukturu se použitými postupy nepodařilo připravit. Důvody neúspěchu jejich syntézy byly částečně vyjasněny výpočetní studií, která ukázala negativní roli γ -aminomáselného zbytku na prostorové „chování“ jednotlivých větví rostoucí dendrimerní struktury, která měla za následek znemožnění a zastavení další syntézy.

Tato situace si vynutila návrh a přípravu nových struktur, které zohlednily dosažené poznatky jak teoretické tak i praktické. Bylo navrženo sedm typů volných „comblíků“ glykopeptidů, které se lišily počtem kopií Tn antigenu na každé větvi (1,2 nebo 3 kopie), přítomností haptenu (DNP) nebo zabudováním T-buněčného epitopu. Studium jejich biologických vlastností bylo zjištěno následující:

- rostlinné lectiny dobře rozpoznávaly Tn antigen na „comblíku“ dendrimru což ukázalo na dobrou sterickou přístupnost této struktury při její různé „hustotě“, tj jako monomeru, dimeru resp. trimeru
- prezentovaný Tn antigen byl též dobře rozpoznáván monoklonální protilátkou 83D4, která byla použita jako systém velmi podobný NKR-P1 receptoru
- testované látky fungovaly velmi dobře jako ligandy pro obě izoformy a látka **11** byla identifikována jako nejlepší známý ligand pro NKR-P1B, pro který byla tato látka též v systému s NKR-P1A vysoce selektivní; látka **10** byla identifikována jako vysokoafinitní ligand pro NKR-P1A receptor
- testované látky dokázaly efektivně modulovat cytotoxickou aktivitu NK buněk, s tím, že při testování směsi těchto látek byl inhibiční účinek látky **11** dominantní.
- testované látky indukovaly imunitní odpověď u myši a látky **13** a **15** byly vyhodnoceny jako nejperspektivnější pro další studium-optimizaci

PERSPEKTIVY A DALŠÍ VYUŽITÍ

Schopnost připravených látek indukovat imunitní odpověď u myši, zvláště pak látek **13** a **15** ukázaly na vhodnost těchto strukturálních typů pro další vývoj směrem k plně syntetické vakcíně. V první řadě je třeba prokázat schopnost těchto látek aktivně snižovat úmrtnost

v experimentálním modelu po jeho vystavení např. TA3/Ha nádorové linii tzv. test přežívání. V porovnání s výsledky publikovanými v literatuře,^{1,2} tento koncept nabízí několik výhod: vysoká syntetická „flexibilita“ těchto struktur s ohledem na optimalizaci jejich imunogenních vlastností tj. např. tvorba lipo-derivátů a zvláště pak se zajímavým jeví snadná možnost zabudování „bezpečného adjuvancia“ do struktury. Je třeba vyjasnit vliv preimunizace na produkci různých podtříd protilátek, protože získané výsledky ukázaly, že uvedení imunitního systému do stavu „pohotovosti“ je významným faktorem ovlivňujícím charakter jeho odpovědi. Jako bezpečného adjuvansu plánujeme použít analog muramylpeptidu (MDP), který má potlačené vedlejší účinky a to v rámci rozvíjející se spolupráce s laboratorní Dr. Ledviny z ÚOCHB. Využití lakovéhoho typu adjuvancia je výhodné také z hlediska toho, že v současné době jsou již do klinické praxe zavedena některá analoga MDP jedná se zejména o RomurtidTM a LikopidTM. Tyto látky však mají některé vedlejší účinky a proto by zavedení tohoto nového analoga MDP s lepším imunofarmakologickým profilem (a vakciny na něm založené) by mohlo být méně problematické.

Povzbudivé výsledky získané při testech cytotoxické aktivity NK buněk prostřednictvím NKR-P1A a NKR-P1B receptorů ukazují, že glykodendrimery by mohly fungovat jako selektivní ligandy jednotlivých izoform NKP-P1 receptoru, případně i dalších receptorů. Do současné doby nebylo provedeno mnoho testů s dendrimery nesoucími monosacharidy či krátké oligosacharidy. Proto bychom chtěli provést komplexní studii, která by vyhodnotila vztah mezi charakterem dendrimru, druhem a počtem sacharidů a typem vazby mezi sacharidem a dendrimerním nosičem. Jejím výsledkem by mohlo být několik struktur se selektivní vazbou na jednotlivé receptory resp. jejich izoformy.

Plánujeme též využít glykodendrimery pro přípravu mimetik přirozených větvených oligosacharidů. Rádi bychom navázali na práci A. Kovalové, Ph.D., která se zaměřila na přípravu krátkých oligosacharidů s vazebnou afinitou k CD69 receptoru³ a připravili strukturu, která by mohla být využita jako mimetikum přírodního pentaantennárního oligosacharidového ligandu získávaného z ovomukoidu.⁴

CITACE

1. Lo-man R., Vichier-Guerre S., Bay S., Dériaud E., Cantacuzène D., Leclerc C.: Antitumour immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotop. *J. Immunol.* **2000**, *166*, 2849-2854.
2. Grigalevicius S., Chierici S., Renaudet O., Lo-Man R., Deriaud E., Leclerc C., Dumy P.: Chemoselective assembly and immunological evaluation of multiepitopic glycoconjugates bearing clustered Tn antigen as synthetic anticancer vaccines. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1149-1159.
3. Kovalová A.: Disertační práce: Syntéza oligosacharidů d-hexosaminového typu – potenciálních ligandů aktivních receptorů NK buněk, Karlova univerzita, **2006**.
4. Bezouška K.: Carbohydrate and non-carbohydrate ligands for the C-type lectin-like receptors of natural killer cells. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, *69*, 555-563.

Tato práce byla financována z výzkumného záměru ÚOCHB Z4050506, grantovou agenturou ČR (granty č. 203/97/0176, 303/01/0690, 304/06/1691) a grantovou agenturou akademie věd ČR (granty č. A402013, A5020403).