

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Robin Kryštůfek

**Návrh, příprava a charakterisace polymerních konjugátů rozeznávajících proteiny  
s pomocí peptidových ligandů**

**Design, preparation and characterisation of polymer conjugates for protein  
recognition using peptide ligands**

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka CSc.

Praha 2019

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze 15.5.2019

.....

Robin Kryštůfek

## Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Janu Konvalinkovi za podporu, osobní i profesionální, v průběhu mého působení v jeho laboratoři. Stejný dík patří i Pavlu Šáchovi, který se rovným dílem zasloužil o zdárné dokončení této práce svými radami a pomocí.

# Obsah

Seznam zkratk	1
Abstract	2
Abstrakt	3
1. Teoretická část	4
1.1. Imunoglobuliny	4
1.1.1. Struktura	5
1.1.2. Diverzita	8
1.1.3. Aplikace	10
1.2. Ligandy Fc-fragmentu	11
1.3. Technologie iBodies	15
2. Cíle práce	17
3. Materiál a metody	18
3.1. Materiál a chemikálie	18
3.2. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	21
3.3. Příprava konjugátů	22
3.4. Stanovování inhibičních konstant ligandů	23
3.5. Analýza peptidových polí	24
3.6. Tečkový blot	25
4. Výsledky	28
4.1. Příprava konjugátů	28
4.2. Vliv konjugace a způsobu cyklizace peptidů	29
4.3. Sekvenční preference Fc-III	31
4.4. Srovnání s komerčními sekundárními protilátkami	32
5. Diskuze	34
6. Závěr	37
Reference	38

## Seznam zkratek

Ig	imunoglobulin
Fc	krystalizující fragment, bazální úsek imunoglobulinu, z angl. fragment, crystallizable
Fab	antigen-vázající fragment imunoglobulinu, z angl. fragment, antigen-binding
CDR	z angl. complementarity-determining region, oblast určující komplementaritu
C <sub>H</sub> , C <sub>L</sub>	konstantní domény těžkého, resp. lehkého řetězce
V <sub>H</sub> , V <sub>L</sub>	variabilní domény těžkého, resp. lehkého řetězce
IgNAR	jednořetězcový Ig paryb, z angl. new antigen receptor
scFv	jednořetězcový variabilní fragment, z angl. single-chain fragment variable
HRP	křenová peroxidasa, z angl. horseradish peroxidase
HPMA	N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid
RAFT	reversibilní adičně-fragmentační polymerizace přenosem řetězce, z angl. reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization
AIBN	azobisisobutyronitril
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
TT	thiazolidin-2-thion
Acap	6-aminokapronová kyselina
TBS(T)	Trisový pufr (s Tween-20), z angl. Tris-buffered saline (Tween)
TTDS	1,13-diamino-4,7,10-trioxatridekan-sukcinamidová kyselina
Fmoc	fluorenylmethyloxycarbonyl
DIC	diisopropylkarbodiimid
PEG	polyethylenglykol
GRAVY	průměrný hydrofatický index, z angl. grand average of hydrophathy
DIEA	N,N-diisopropylethylamin
SDS	dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate
APS	peroxodisírán amonný, z angl. ammonium persulfate
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
PDB	databáze struktur makromolekul, z angl. protein data bank
MWCO	meze molekulové hmotnosti, z angl. molecular weight cutoff

## Abstract

Antibodies stand as a cornerstone of many laboratory assays and are used as indispensable tools in biomedicine. iBodies polymer conjugates have been proposed as a possible alternative to antibodies in several traditionally immunological methods. iBodies are based on methacrylamide copolymers decorated with affinity anchors, reporters and targeting ligands which mediate conjugate specificity. The necessity to design ligands and their linkage is a significant obstacle to the generalization of this technology. One way of overcoming this obstacle is the development of secondary antibody mimetics which will use antibodies to obtain specificity for target identification and/or visualization.

Based on the literature, several cyclic peptide Fc-binding ligands were designed with linker moieties for attachment to the polymer conjugate. Free and conjugated ligands were compared based on their interaction constants with human IgG. Conjugation with polymer carrier in all cases led to an increase in affinity. Human isotype specificity is dependent on the cyclization method, with single disulfide bridge cyclization exhibiting selectivity for IgG1-4 and IgM, and N→C cyclization leading to abolition of IgM binding.

The polymer conjugates have been compared in terms of sensitivity and selectivity using dot blot with several commercial secondary antibodies. As a visualization agent, conjugates exhibit selectivity and sensitivity throughout a panel of 16 antibody species comparable to protein G. However, secondary antibodies in comparison to polymers still dominate in their respective idiotype with sensitivity higher by one to four orders of magnitude.

Based on the available data, further optimization of targeting peptide ligand is necessary in order to obtain performance comparable to secondary antibodies. Amino acid substitution preferences in targeting peptide for antibodies of selected species were obtained through analysis of a combinatorial peptide library. Uncovered motifs will be used as a basis for further optimization of Fc-binding ligands and their conjugates.

Keywords: iBody; antibody mimetics; molecular recognition; binding constants; cell receptors

(In Czech)

## Abstrakt

Protilátky jsou důležitou součástí řady laboratorních testů a klíčovými nástroji v biomedicině. Polymerní konjugáty zvané iBodies byly navrženy jako možná alternativa k protilátkám v několika tradičně imunologických metodách. iBodies jsou založeny na methakrylamidových kopolymerech substituovaných záchytovými kotvami, reportéry a cílicími ligandy, které konjugátu propůjčují jeho specifitu. Nutnost návrh ligandu a způsobu jeho napojení pro každý zkoumaný cíl je však významnou překážkou pro generalizaci této technologie. Jednou z možných cest k překonání této překážky je vývoj konjugátů podobných sekundárním protilátkám a využití protilátek ke specifickému cílení na zkoumaný protein.

Za tímto účelem byly na základě literární rešerše navrženy cyklické peptidové ligandy Fc-fragmentů protilátek se spojovacími motivy pro konjugaci s polymerním nosičem. Volné a konjugované ligandy byly srovnány na základě interakčních konstant s lidským IgG, přičemž konjugace s nosičem ve všech případech vedla ke zvýšení afinity. V závislosti na způsobu cyklizace konjugáty vykazují selektivitu vůči lidskému IgG1-4 a IgM v případě jednoduché disulfidové cyklizace peptidového ligandu, v případě N→C cyklizace je vazba na IgM potlačena.

Polymery byly následně srovnány z hlediska citlivosti a selektivity pomocí tečkových blotů s několika komerčními sekundárními protilátkami. Jako vizualizační činidlo polymerní konjugáty vykazují citlivost a selektivitu v rámci panelu protilátek 16 živočišných druhů srovnatelnou s proteinem G. Při srovnání se sekundárními protilátkami vykazují v rámci jejich idiotypu o jeden až čtyři řády horší citlivost.

Jelikož je dle předložených dat nutná další optimalizace výchozího peptidového ligandu k dosažení parametrů na úrovni sekundárních protilátek, je též prozkoumána a diskutována možnost modifikace jeho aminokyselinové sekvence k dosažení vyšší citlivosti a selektivity. Analýzou kombinatoriální peptidové knihovny byly zjištěny preference variací peptidového ligandu pro protilátky několika živočišných druhů. Získané motivy budou použity jako podklad k racionálnímu návrhu optimalizovaných ligandů a konjugátů vzájemných Fc-fragmety protilátek.

**Klíčová slova:** iBody; mimetika protilátek; molekulární rozpoznávání; vazebné konstanty; buněčné receptory

# 1. Teoretická část

## 1.1. Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (Ig) jsou proteinovou složkou[1] humorálního imunitního systému čelistnatců[2] obecně organizovanou jako komplexy ve tvaru písmena Y sestávající ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců[3] s 12-14 doménami (viz Obrázek 1A dále), za jejíž produkci jsou zodpovědné B-lymfocyty[4]. Zprostředkovávají adaptivní imunitu vůči patogenům, kterým je živočich v průběhu života vystaven[5].

Tato funkce je podmíněna imunogenicitou patogenu – přítomností antigenu se schopností selektivně vázat složky adaptivního imunitního systému a vyvolávat jejich produkci. Bohužel každý patogen nemusí být imunogenní (rozeznatelný antigen není přístupný nebo dochází k jeho změnám[6, 7], je manipulováno se systémem jeho prezentace[8]) a každý antigen nemusí nutně náležet strukturám patogenů (př. autoimunitní choroby, alergie, odmítnutí transplantátů). Vazba a rozpoznávání antigenu protilátkou se odehrává na rozhraních, která označujeme jako epitop antigenu a paratop protilátky.

Ig působí proti rozpoznávaným antigenům přímou inhibicí způsobenou jejich navázáním, agregačně propojováním antigenů do větších nerozpustných celků, aktivací komplementu, a charakteristicky zprostředkováním informace o přítomnosti antigenu buněčnému imunitnímu systému (opsonizaci)[9].

Ig se vyskytují ve volné a membránové formě. Volné Ig jsou produkovány stimulací B-lymfocytů na základě navázání antigenu na B-buněčný receptor, transmembránový multiproteinový komplex sestávající z membránového Ig a proteinů CD79A/B, které jsou zodpovědné za přenos signálu po navázání antigenu vedoucímu ke změně konformace a transientní fosforylaci jejich C-koncového imunoreceptorového tyrosinového aktivačního motivu (ITAM), zahajující další postoupení signálu[10, 11].

K vazbě širokého spektra epitopů antigenů je zapotřebí odpovídající spektrum paratopů. K zajištění této diverzity jsou na protilátce vyhrazeny hypervariabilní CDR (z angl. complementarity-determining region, regiony určující komplementaritu). Šestice (3 na lehkém i těžkém řetězci označované L1-3, resp. H1-3) těchto regionů tvoří každý ze dvou paratopů protilátky.

Sestavování těchto hypervariabilních úseků probíhá procesem V(D)J rekombinace na počátku vývoje B-lymfocytu v kostní dřeni. Genom nascentního lymfocytu obsahuje mnoho variant variabilních (V, variable; a D, diverse, v případě těžkých řetězců) a



spojovacích (J, joining) segmentů, které jsou náhodně zvoleny a následovány odpovídajícím konstantním segmentem ( $C_{\mu}$  a  $C_{\delta}$  v případě těžkého a  $C_{\kappa}$  nebo  $C_{\lambda}$  u lehkého řetězce)[12]. Nezralé B-lymfocyty v důsledku post-translační modifikace produkují nejprve membránový IgM, dále v ontogenezi též IgD, další isotypy jsou produkovány až v důsledku isotypového přesmyku na základě stimulace[13, 14].

Klíčovou vlastností protilátek je, že za fyziologických podmínek (obecně[15]) nevykazují autoreaktivitu, tedy nerozpoznávají tělu vlastní struktury. Eliminace autoreaktivity probíhá nejprve centrálně během vývoje B-lymfocytu v kostní dřeni podnícením další rekombinace, alelickým, či isotypovým přechodem (lehkého řetězce, u člověka počínaje  $\kappa$  lokusem[16])[17, 18], a dále periferně v průběhu dalšího vývoje buňky spoluprací s přísněji regulovanými T-lymfocyty [19, 20]. Na rozdíl od T-lymfocytů B-lymfocyty v sekundárních lymfatických orgánech podléhají dalším mutacím v oblastech CDR a selekci na jejich základě[21].

### 1.1.1. Struktura

Řetězce Ig sestávají z domén s charakteristickou dvouvrstvou  $\beta$ -listovou architekturou[22], kterou sdílí s celou řadou proteinů souhrnně označovanou nezávisle na funkci jako Ig rodina[23]. Lehké i těžké řetězce se skládají z variabilních ( $V_L$ , resp.  $V_H$ ; proměnlivé mezi jednotlivými B-lymfocyty) a konstantních domén ( $C_L$ , resp.  $C_{H1-4}$ ; stejné pro daný isotyp a podtřídu v případě  $C_H$ ). Lehké řetězce jsou u člověka (stejně jako dále v oddílu) dvojího druhu –  $\kappa$  a  $\lambda$  – těžké řetězce se vyskytují v pěti hlavních variantách –  $\gamma_{1-4}$ ,  $\delta$ ,  $\alpha_{1,2}$ ,  $\mu$  a  $\epsilon$ . Druh těžkého řetězce určuje isotyp výsledného Ig – IgG1-4, D, A1,2, M, resp. E – a má výrazný vliv na organizaci komplexu protilátky (přípony označují další dělení na podtřídy, viz dále). Typ lehkého řetězce Ig je v isotypu proměnlivý, ale na něm závislý[24], s obecnou preferencí řetězce  $\kappa$  v důsledku způsobu eliminace autoreaktivity v průběhu ontogeneze B-lymfocytů[16]. Pro úplné označení isotypu je možné uvést jako příponu i druh lehkého řetězce (př. IgG $\kappa$ ).

Důležitou oblastí, ve které se isotypy a jejich podtřídy často liší je oblast pantu (angl. hinge, viz Obrázek 1, šedě). Pantové sekvence jsou rozeznávány řadou proteas[25], z praktického hlediska má však největší význam štěpení v této oblasti enzymy papainem[26] a pepsinem[27]. Na základě štěpných produktů IgG s papainem se protilátky arbitrárně dělí na fragmenty označované Fc (z angl. fragment, crystallizable, díky čemuž bylo odvozeno, že je

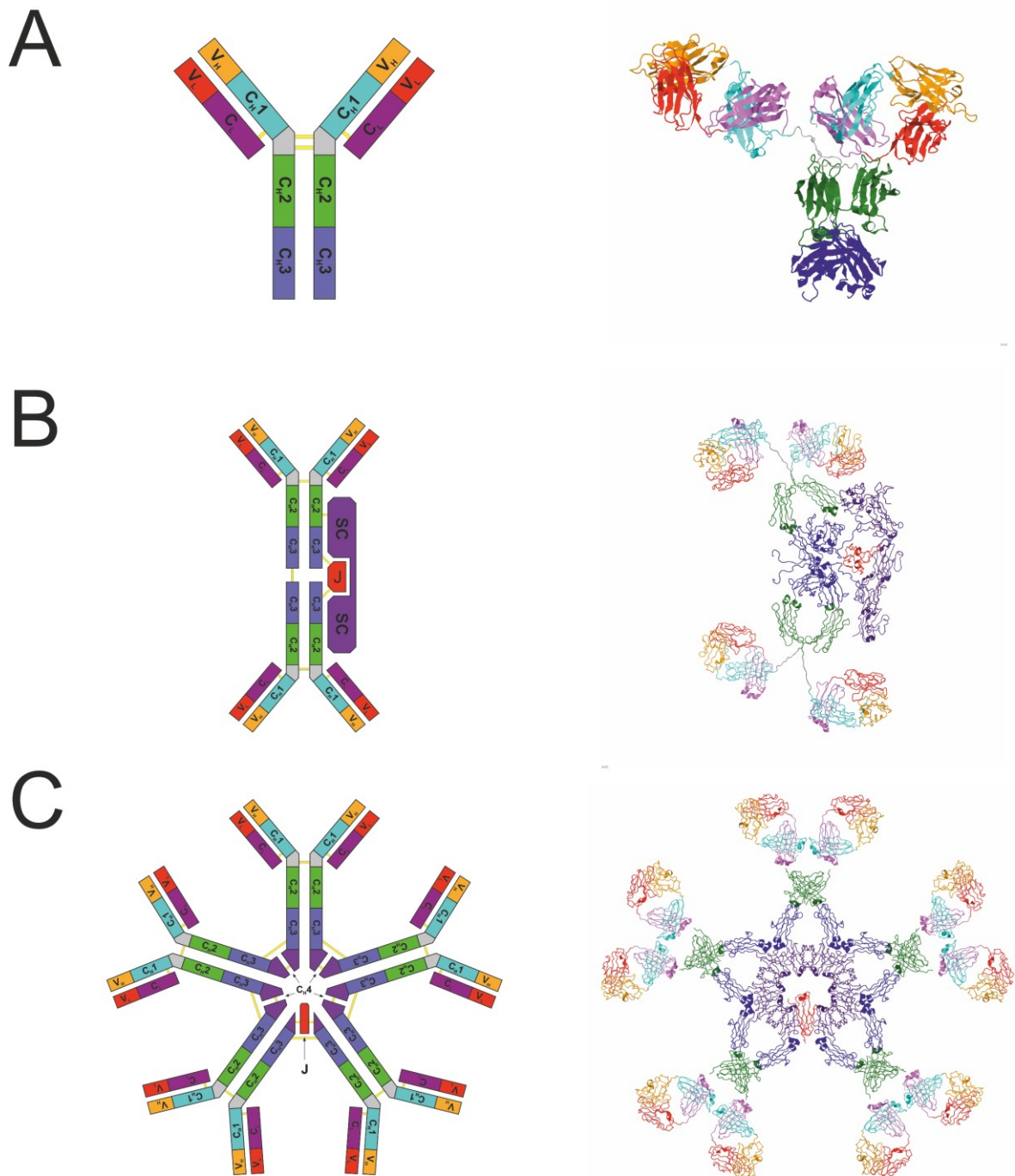
tato část IgG sdílena[26]) a Fab (z angl. fragment, antigen-binding). Štěpením pepsinem dochází k degradaci Fc fragmentu, nicméně pod oblastí disulfidových můstků spojujících těžké řetězce. Zbylý dimer je označován jako F(ab')<sub>2</sub>, který si stejně jako Fab zachovává vazebnou afinitu k antigenu.

IgG s  $\gamma$  těžkým řetězcem se vyskytuje v podtřídách IgG1 až 4 (s klesajícím podílem v plasmě), ve všech případech organizovaných do 12 domén, strukturně odlišných zejména v oblasti pantu spojujícího C<sub>H1</sub> a C<sub>H2</sub>. Ze čtyř lidských podtříd IgG nejvíce vystupuje IgG3 s výrazně vyšší molekulovou hmotností (176 vs 146 kDa pro IgG1, 2 a 4, pro náhled na strukturní motivy isotypů viz Obrázek 2 v sekci Diverzita dále) a až jedenácti (v závislosti na allotypu[28]) disulfidovými můstky v oblasti pantu. IgG2 a 4 se mimo jiné vyskytují v několika isoformách lišících se v organizaci disulfidových můstků[28].

IgD se vyskytuje ve dvou formách – sekretované a membránové. Sekretovaná forma má obdobnou organizaci jako IgG, membránová forma má navíc C-koncový úsek zodpovědný za vazbu na buněčnou membránu[29]. Obdobná organizace C-koncového úseku se vyskytuje i u IgE, jehož  $\epsilon$  řetězec je navíc na C-konci prodloužen o doménu C<sub>H4</sub>[30].

IgA se od předcházejících isotypů liší tím, že existuje též v podobě multimerů. IgA se vyskytuje ve dvou isotypech – IgA1 s prodlouženým úsekem v oblasti pantu a IgA2, který je zajímavý nepřítomností disulfidového můstku mezi lehkým a těžkým řetězcem u jednoho z jeho allotypů[31], díky čemuž může kovalentně dimerizovat lehký řetězec[32] – toto je jedno z možných vysvětlení abnormální mobility lidského IgA2 v neredukované formě na Obrázku 2 dále. Většina sérového IgA se nachází v podobě monomeru, avšak slizniční IgA (viz Obrázek 1B) je převážně ve formě dimerů, či méně trimerů a tetramerů[33]. Asymetrickou multimerizaci zprostředkovává řetězec J disulfidovým můstkem a sekretorní komponenta, která je pozůstatkem proteolýzy polymerního Ig receptoru[34].

Řetězec J je jako multimerizační faktor sdílen i s Ig isotypu M. Těžké řetězce  $\mu$  sestávají ze čtyř konstantních domén a C-terminálního koncového úseku zprostředkovávajícího interakci s dalšími monomery IgM. Za přítomnosti řetězce J vzniká pentamerní IgM (viz Obrázek 1C, v této formě je v séru nejvíce zastoupen), za nepřítomnosti řetězce J IgM tvoří hexamery[35]. IgM se v membránové podobě vyskytuje též v podobě monomeru, kde stejně jako IgD tvoří součást B-buněčného receptoru[11].



**Obrázek 1.** Příklady organizace vybraných forem lidských isotypů Ig. Struktura (A) IgG1 (PDB 1HZH [36]), (B) slizničního IgA1 (3CHN [37]), kde byla vybrána pouze jedna z pozic sekretorního řetězce z klastru modelu, (C) IgM (2RCJ [38]) v pentamerní formě. V<sub>H</sub>: variabilní doména těžkého řetězce, C<sub>H</sub>1-4: konstantní domény těžkého řetězce, V<sub>L</sub>: variabilní doména lehkého řetězce, C<sub>L</sub>: konstantní doména lehkého řetězce, J: J řetězec, spojovací motiv IgM a IgA, SC: sekretorní komponenta. Meziřetězcové disulfidové můstky jsou znázorněny žlutě.

### 1.1.2.Diverzita

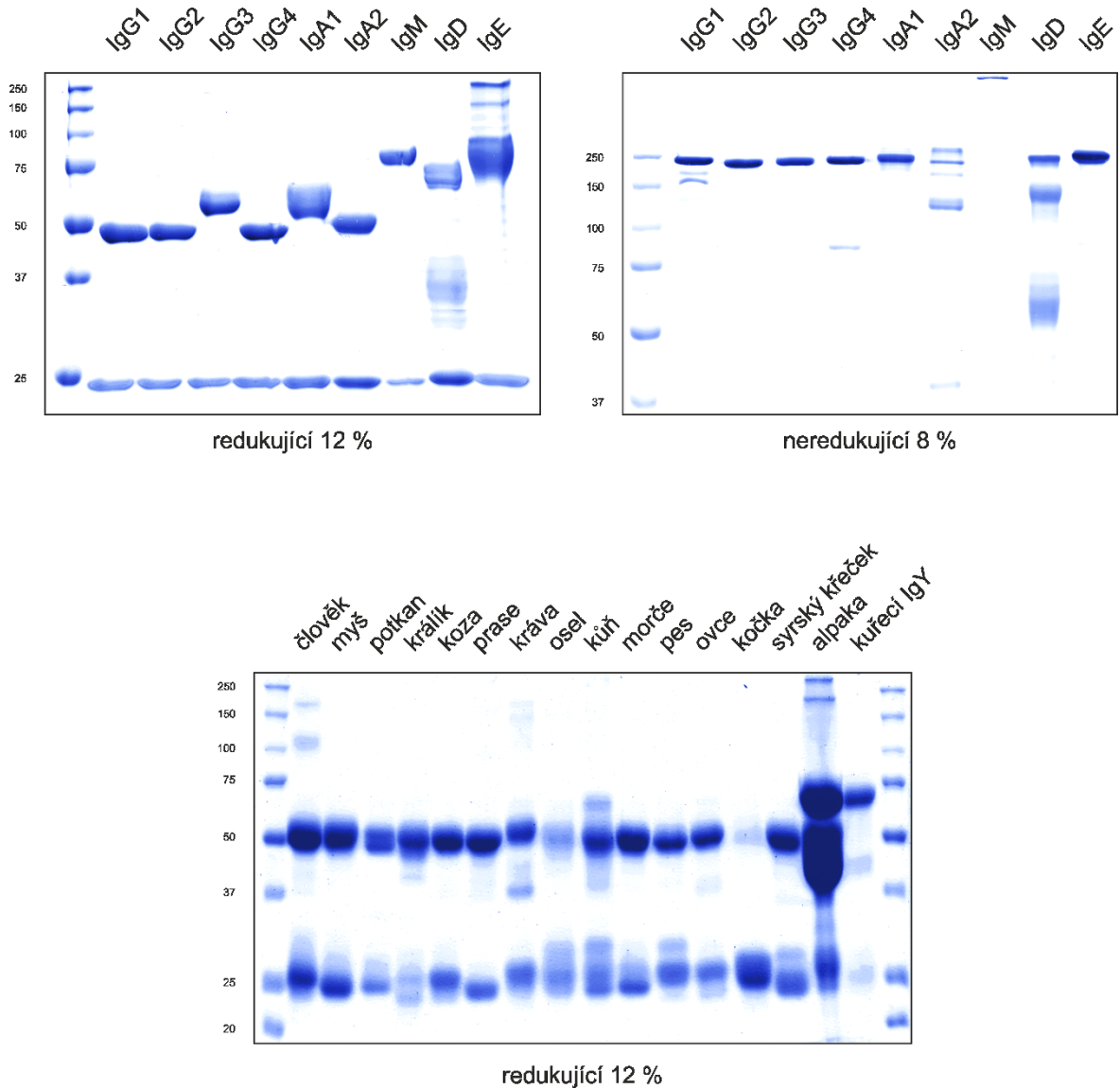
Ig jsou různorodou skupinou proteinových komplexů. V rámci živočišného druhu rozlišujeme diversitu isotypovou, nastíněnou v předchozí sekci, idiotypovou, popisující rozdíly ve struktuře paratopu, potažmo ve specifitě pro různé antigeny, a allotypovou, jež určuje alelu řetězce Ig [39].

Diverzita se dále prohlubuje napříč různými živočišnými druhy sdílejícími tento systém adaptivní imunity. Člověku fylogeneticky nejvzdálenější třídou se systémem Ig jsou paryby[40] s isotypy IgM, IgW (ortologní k odvozenějšímu IgD) a IgNAR (z angl. new antigen receptor, nový antigenní receptor), který je funkčně podobný IgG[40-42], avšak liší se mj. nepřítomností lehkých řetězců. Tato jednořetězcová organizace se později objevuje též u čeledi velbloudovitých (př. IgG2 a 3 vs. konvenční IgG1 u lamy alpaky, viz Obrázek 2)[43], jako příklad evoluční konvergence[44]. Jelikož jsou protilátky této třídy zdrojem hotových *de facto* jednořetězcových variabilních fragmentů (scFv, ačkoli v literatuře jsou označovány jako nanobodies[45]), přinášejí možnost zrychlení vývoje terapeutik a molekulárně biologických nástrojů bez nutnosti návrhu a optimalizace mezidoménového spojovacího motivu[45], což je důvodem zahrnutí IgG lamy alpaky do panelu zkoumaných protilátek.

Pro obojživelníky, plazy a ptáky je charakteristický isotyp IgY, ortolog IgG a IgE, který se zdá být jejich možným vývojovým prekurzorem a přechodem od původnějšího IgM[46]. Plazi a ptáci jsou již rovněž vybaveni IgA, u obojživelníků plní jejich funkci IgX. IgY je důležitý z biotechnologického hlediska, jelikož jej lze snadno produkovat a purifikovat z vajec ve velkých množstvích (př. 14-doménový IgY kura domácího, viz Obrázek 2)[47, 48]. Důležitou vlastností IgY je též, že vzhledem k odlišné architektuře Fc fragmentu a nepřítomnosti  $\kappa$  řetězců[49] není snadno dostupná jednokroková afinitní purifikace jako u většiny běžněji používaných IgG[47].

V rámci třídy savců, do níž spadá většina druhů zkoumaných v této práci, se rozdíly v isotypovém repertoáru Ig nacházejí např. v počtu (identifikovaných) podtříd jednotlivých isotypů (př. IgG1, 2a-c, a 3 u myši domácí, či výše zmíněná lama alpaka), podílu lehkých řetězců (př. převaha  $\lambda$  nad  $\kappa$  u některých kopytníků[49]) či organizaci CDR (př. abnormálně dlouhé H3 krav[50]). Pro účely této práce je však důležité, že savcí IgG obecně sdílí doménovou organizaci těžkého řetězce s člověkem (nepřímo doložitelné též pohyblivostí

jejich těžkých řetězců, viz Obrázek 2) a tudíž potenciálně i sdílí vazebné místo na rozhraní C<sub>H2</sub> a C<sub>H3</sub> pro dále zkoumané ligandy.



**Obrázek 2.** Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) vybraných preparátů Ig. Postup přípravy je popsán v sekci Materiál a metody. Horní řádek: Srovnání pohyblivosti lidských isotypů Ig a jejich podtříd v redukované a neredukované formě. Dolní řádek: Srovnání pohyblivosti IgG a IgY živočišných druhů zkoumaných v této práci v redukované formě.

### 1.1.3. Aplikace

Z isotypů protilátek nastíněných v předchozích sekcích se pro imunologické metody (např. sendvičové imunotesty, imunohistochemie, imunoprecipitace) v laboratoři ve většině případů používají IgG získané imunizací zvířat[51]. V závislosti na konkrétní metodě je k úspěšné imunodetekci třeba využít ideálně protilátek s vysokou afinitou (vyjadřována jako disociační konstanta  $K_D$ ) a specifitou (schopnost rozeznávat výhradně antigen). Specifita i afinita protilátek je proměnlivá a závislá na imunogenicitě antigenu (schopnosti vyvolat imunitní odpověď), způsobu imunizace (místo, intervaly, použité adjuvans, či nosič), použitém organismu a klonalitě výsledné protilátky[52].

Použité protilátky dělíme podle živočišného druhu hostitele – obvykle myši, králíci, kozi, morčecí, oslí aj., antigenu – primární (antigen je analyt) a sekundární (antigen je primární protilátka) – a klonality – na polyklonální a monoklonální. Výhody různých druhů a klonalit spolu souvisí. Výroba polyklonální protilátky je levnější a rychlejší a využívá často větších organismů, u kterých je možno provádět více odběrů (např. králík, koza, osel), preparát však obsahuje mnoho (obvykle desítky detekovatelných[53]) individuů rozeznávajících různé epitopy antigenu. Toto může být v závislosti na aplikaci výhoda i nevýhoda – rozeznávání více epitopů může v závislosti na uspořádání testu vést k nežádoucímu chování (př. znepřístupnění vazebných míst pro primární protilátku záchyťovou protilátkou v sendvičových imunotestech), ale též k zesílení signálu zejména při použití jako sekundární protilátka v důsledku navázání většího počtu Ig.

Monoklonální protilátky mají oproti tomu výhodu homogenity – preparát se skládá z jednoho proteinového individua rozeznávajícího jeden epitop. Produkce trvá delší dobu a probíhá obvykle hybridomovou technikou[54] izolací splenocytů imunizovaných zvířat (myš, nebo králík) a jejich hybridizací s imortalizovanou buněčnou linií, nebo též rekombinantně[55] s pomocí identifikované sekvence, nebo v návaznosti na techniky *in vitro* evoluce[56].

Protilátky je též možné použít ve formě fragmentů kvůli menší velikosti (např. při návrhu terapeutik[57], či pro stabilizaci antigenů v krystalografii[58]), či vyšší efektivitě produkce. V takovém případě je možné použít fragmentů Fab, či  $F(ab')_2$  nastíněných v předchozích sekcích, či snáze rekombinantně produkovatelných scFv (single chain fragment variable, jednořetězcový variabilní fragment) či nanobodies (v případě nativně jednodoménových protilátek)[45, 57].

Primární i sekundární protilátky mohou být značeny reportéry, které zprostředkovávají informaci o přítomnosti protilátky. Značení primární protilátky má výhodu zkrácení a zjednodušení analýzy, využití značené sekundární protilátky má obvykle výhodu větší citlivosti[59].

Reportérové systémy se dělí na kolorimetrické[60], fluorescenční[61], luminiscenční[62] a radiografické[63], se vzrůstající mírou citlivosti[64, 65]. Kolorimetrické systémy fungují na principu zvyšování extinkčního koeficientu protilátky v oblasti viditelného světla, typicky konjugací s nanočásticemi (např. latex, zlato), a jsou detekovány vizuálně nebo kolorimetrem[66]. Fluorescenční reportéry jsou konjugovány s fluorofory (např. fluorescein, rhodaminy) a jsou detekovány fluorimetrem[61]. Luminiscenční reportéry konjugované s luminofory (např. akridinium, isoluminol) emitují světlo a jsou detekovány fotometricky (fotopapír, luminometr)[67, 68]. Radiografické systémy jsou založeny na konjugaci protilátek se značkami s radioaktivními isotopy (např.  $^{125}\text{I}$ -tyrosin,  $^3\text{H}$ ), které jsou detekovány autoradiograficky nebo scintilačními čítači[63].

Kolorimetrické a luminiscenční systémy velmi často s výhodou využívají enzymů (např. alkalická fosfatasa[60], křenová peroxidasa[69]), které po přidání substrátu dávají vzniknout barevným produktům, resp. způsobují emisi světla, čímž velmi významně zvyšují citlivost metody[70]. Dále v textu je právě HRP (z angl. horseradish peroxidase, křenová peroxidasa) použit jako luminiscenční reportér pro stanovování inhibičních konstant Fc-ligandů.

Paralelní odnoží k těmto systémům je systém avidin-biotin, který umožňuje protilátky značené biotinem detekovat avidinovými proteiny konjugovanými se zmíněnými reportéry[71]. Tento systém je dále použit pro vizualizaci panelu protilátek navázaných na peptidových polích fluorescenčně značeným streptavidinem.

## 1.2. Ligandy Fc-fragmentu

Důležitými nástroji pro práci s protilátkami, usnadňující jejich purifikaci či zapojení do funkčních testů, jsou ne-protilátkové ligandy schopné jejich specifické vazby[72]. Oproti sekundárním protilátkám jsou používány zejména kvůli nižším produkčním nákladům, vyšší stabilitě a v případech kdy je žádoucí paušální vazba protilátek různých druhů, či isotypů (typicky purifikace), či nežádoucí zavedení dalších druhových antigenů (v imunotestech).

Nejdůležitějšími z těchto jsou v praxi bakteriální proteiny vázající Fc fragment (protein A[73], G[74], či jejich mutanty[75]), dále však též např. protein L vázající  $\kappa$  lehké řetězce[76], či rostlinné lektiny rozpoznávající Ig glykosylace (př. jacalin[77]).

Společným interakčním místem proteinů A a G a peptidových ligandů zkoumaných v této práci je rozhraní  $C_{H2}$  a  $C_{H3}$  domén těžkého řetězce Ig[78]. Výchozím peptidem je v roce 2000 identifikovaný Fc-III, který je jako volný tridekapeptid schopen vazby lidského IgG a vytěšňování proteinu G s  $K_i$  25-215 nM[78-80]. Jeho malá velikost, oproti výše uvedeným proteinovým partnerům, otevírá možnosti využití jako molekulárně biologického nástroje např. pro média pro afinitní chromatografii s vyšší vazebnou kapacitou[81], či pro selektivní modifikace Ig[82].

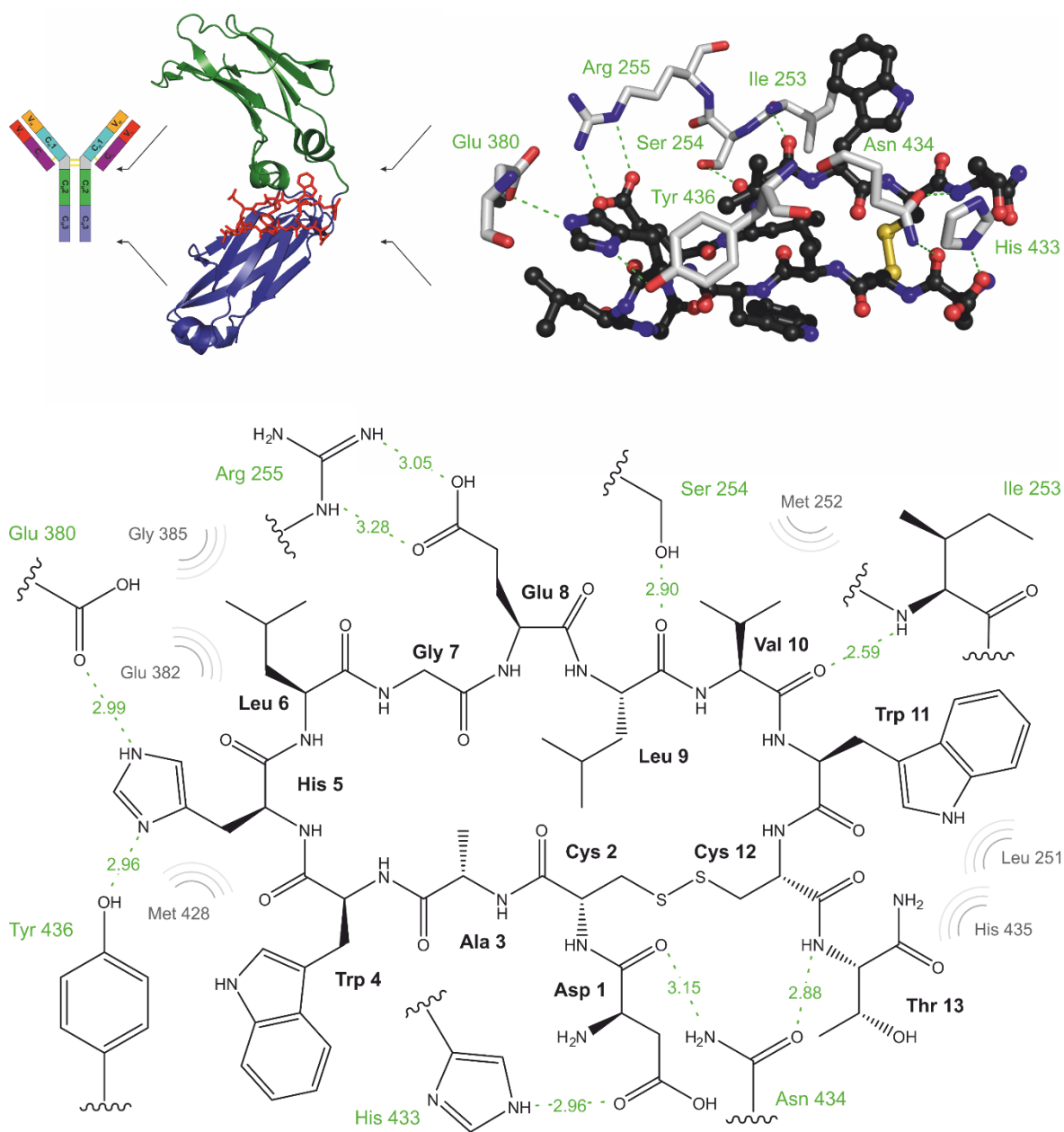
V této práci je zkoumána možnost zvýšení afinity Fc-III a jeho derivátů konjugací s polymerním nosičem a její vliv na specifitu vazby. Za tímto účelem bylo nutno navrhnout strategii napojení peptidu k nosiči. Na základě publikované krystalové struktury komplexu Fc-III s Fc-fragmentem lidského IgG1[78] byl navržen způsob napojení N-terminálního spojovacího motivu TTDS (1,13-diamino-4,7,10-trioxatridekan-sukcinamidová kyselina).

Parentální Fc-III je strukturou beta-vlášenkou[78], jejíž N a C-koncové Asp1 a Thr13 se účastní důležité elektrostatické interakce s Asn434 a His433 (viz Obrázek 3). Bylo ukázáno, že úpravou geometrie molekuly N $\rightarrow$ C koncovou cyklizací diprolylovými můstkem (autory označen Fc-BP2, dále v tomto textu Fc-{R/S}) lze zvýšit afinitu k lidskému IgG[80]. Podobných výsledků bylo dosaženo i při přidání druhého N/C-koncového disulfidového můstku (Fc-4C)[79].

Jelikož nejsou k dispozici struktury komplexů derivátů Fc-BP2 ani Fc-4C, nelze s jistotou určit důvod zvýšení afinity. Možným vysvětlením může být usnadnění koncových interakcí můstkovou stabilizací, či změna geometrie vlásenky v důsledku napnutí přidaným cyklem.

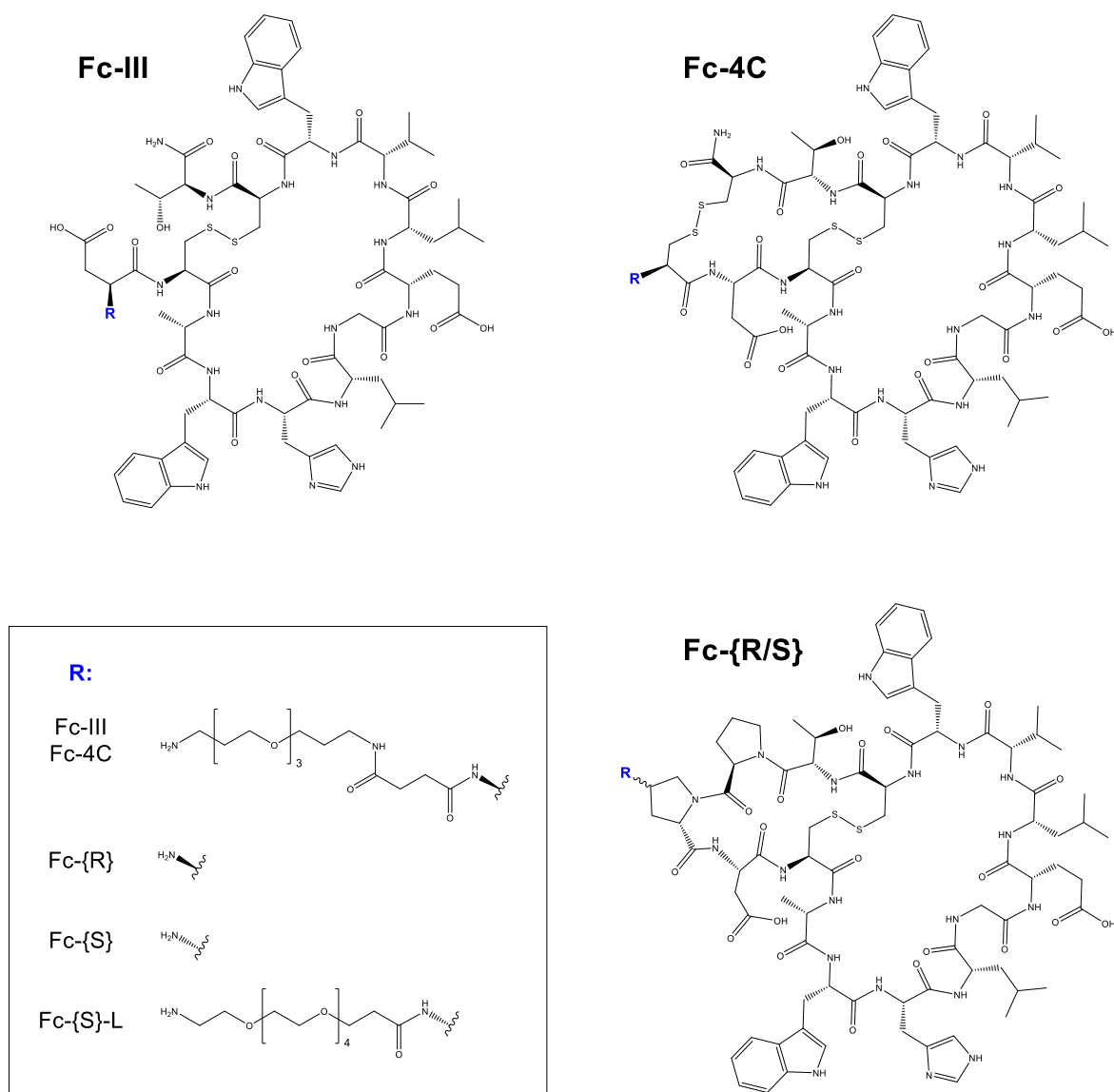
Spojovací motiv H-PEG<sub>5</sub>-COOH pro N $\rightarrow$ C cyklizované peptidy byl napojen na amin zavedený na 4-pozici pyrrolidinového kruhu L-Pro. Substituovaný uhlík na této pozici je chirální. Na základě modelu diprolylového analogu v komplexu s lidským IgG1 (výchozí model PDB 1DN2) byly oba stereoizomery vyhodnoceny jako potenciálně viabilní s dostatkem prostoru pro acylaci, je tedy nutné je porovnat experimentálně.





**Obrázek 3.** Struktura peptidu Fc-III v komplexu s Fc fragmentem IgG1 (PDB 1DN2 [78]). Horní řádek: Vazba ligandu v kontextu komplexu IgG1 a zbytky vazebného místa (šedě) elektrostaticky interagující s peptidem (černě). Dolní řádek: Interakční mapa ligandu (Ligplot+ [83]) s též zahrnutými nepolárními interakcemi (šedě) a vzdálenostmi elektrostaticky interagujících skupin.

Pro účely srovnání obou stereozomerů ve formě konjugátu není zaveden spojovací motiv a peptid je napojen na kopolymer přímo přes aminokapronovou kyselinu. V případě peptidu Fc-4C byla použita stejná strategie přidání spojovacího motivu jako u parentálního Fc-III, tedy N-terminální TTDS. Struktury peptidů s navrženými spojovacími motivy jsou srovnány na Obrázku 4.



**Obrázek 4.** Strukturní vzorce Fc-vázajících peptidů s různými metodami cyklizace a napojení spojovacích motivů.

### 1.3. Technologie iBodies

Polymerní konjugáty iBodies byly navrženy jako možná alternativa k protilátkám v sendvičových imunotestech, imunoprecipitacích a v průtokové cytometrii[84, 85]. Jsou založeny na methakrylamidových kopolymerech substituovaných cílicími ligandy, záchyťovými kotvami (např. biotin, motivy pro selektivní cykloadice) a reportéry (např. fluorescenční, radiografické, luminiscenční).

Methakrylamidové polymery jsou připravovány pomocí reversibilní adičně-fragmentační polymerizace přenosem řetězce (angl. zkr. RAFT, druh radikálové polymerizace) s následným odstraněním přenašečové skupiny dle Perriera[86]. Mechanismus RAFT sestává z kroků[87, 88]:

1. Inicie – Iniciátor (typicky azobisalkylnitril, též peroxidy) se rozpadá za vzniku radikálů, jejichž reakcí s monomerem (obecně monoalkeny schopné radikálové polymerizace[89]) vzniká radikál monomeru.
2. Propagace – Adicí polymerního radikálu na monomer se řetězec radikálu prodlužuje.
3. Předběžná rovnováha – Polymerní radikál reaguje s přenašečím činidlem (obecně dithioester či trithiokarbonát) za vzniku adduktu, který postupuje nepárový elektron odstupujícímu zbytku činidla – tento reakcí s monomerem spouští další iniciaci.
4. Pracovní rovnováha – Polymerní zbytek na přenašeči je vyměňován za volné polymerní radikály, čímž může být dále prodlužován. Hotovost volných radikálů schopných propagace je tak ideálně rovnoměrně sdílena napříč řetězci.
5. Terminace – Radikály (polymerní, iniciátorové, přenašečové) společnou reakcí zanikají. Koncový přenašečový motiv musí být ze zbývající populace odstraněn přidáním nadbytku azobisalkylnitrilu[86].

Prekurzory kopolymerů použitých v této práci vznikají z monomerů N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) a 3-(3-methakrylamido-propanoyl)thiazolidin-2-thionu pro kopolymery s napojením substituentů přes  $\beta$ -Ala, či 3-(6-methakrylamido-hexanoyl)thiazolidin-2-thionu pro napojení přes aminokapronovou kyselinu (Acap) s použitím azobisisobutyronitrilu (AIBN) jako štěpného iniciátoru a 2-kyanoprop-2-yl ethyl trithiokarbonátu jako přenašečícího činidla ve směsi DMSO:*t*-butanol 1:9 (v/v), která byla probublána argonem ve skleněné ampuli, jež je posléze zatavena před 16-h reakcí při 40°C[90].

Ligandy s volnou aminoskupinou jsou posléze navázány na polymer v DMF s organickou bází (typicky DIEA) záměnou za aktivní TT (thiazolidin-2-thion) skupinu jako amidy[91]. Podíl aktivních TT skupin je možno stanovovat spektrofotometricky ( $\epsilon_{302\text{nm, methanol}} = 10600 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )[84], avšak s opatrností vzhledem k blízkosti absorpčního pásu aromatických skupin. Jako purifikaci mezi reakčními kroky je možné využít nízké rozpustnosti pHPMA v acetonu a etherech a produkt srážet směsí aceton-diethylether 3:1 (v/v).

Jako finální purifikační krok je použita gelová permeační chromatografie. Klíčovou validační metrikou pro preparáty polymerů je index polydispersity ( $M_w/M_n$ , či Đ)[88] stanovovaný nejprve pomocí geometrie chromatografického vrcholu produktu a následně ověřovaný pomocí rozptylové analýzy.  $M_w/M_n$  určuje rozpětí distribuce molekulových hmotností makromolekul preparátu ( $M_w/M_n = 1$  pro ideální směs makromolekul o identické molekulové hmotnosti).

## 2. Cíle práce






- Analýza specificity peptidových variant Fc-III vůči vybraným druhům Ig
- Příprava série polymerních konjugátů nesoucích peptidy rozeznávající Ig
- Analýza vlivu cyklizační topologie a spojovacího motivu na afinitu a specificitu konjugátů
- Stanovení detekčních limitů vybraných konjugátů a srovnání s komerčními sekundárními protilátkami

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Materiál a chemikálie

Peptidy (viz Tabulka 1) byly připraveny Ing. Miroslavou Blechovou a Dr. Martinem Hradílkem ze skupiny Medicinální chemie ÚOCHB Dr. Pavla Majera. Aminokyselinové a chromatografické analýzy byly provedeny Radkem Součkem z téže skupiny. Peptidy byly připraveny standardní Fmoc/DIC/Oxyma chemií na pevné fázi s cyklizacemi provedenými dle literatury[92], následované purifikací pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Lyofilizáty byly rozpuštěny v DMSO a koncentrace byla stanovena pomocí aminokyselinové analýzy.

**Tabulka 1.** Seznam peptidů použitých v této práci se sekvencemi, základními motivy a tučně označeným místem napojení na polymerní nosič. Strukturní vzorce jsou v Obrázku 4 v Teoretické části.

Název	Sekvence
Fc-III	H-[TTDS]-DCAWHLGELVWCT-NH <sub>2</sub> 
Fc-4C	H-[TTDS]-CDCAWHLGELVWCTC-NH <sub>2</sub> 
Fc-{R}	
Fc-{S}	
Fc-{S}-L	H-PEG <sub>5</sub>  

Polymerní prekurzory a většina konjugátů (viz Tabulka 2) byly připraveny Dr. Liborem Kostkou, Dr. Jiřím Strohalmem a Dr. Vladimírem Šubrem ze skupiny Biolékařských polymerů ÚMCH Dr. Tomáše Etrycha.

Peptidová pole byla dodána firmou PEPperPRINT, Heidelberg, SRN.

**Tabulka 2.** Seznam polymerů použitých v této práci s jejich základními parametry a průměrným počtem ligandů na molekulu polymeru stanoveným pomocí aminokyselinové analýzy.

Název	M <sub>w</sub> [g/mol]	M <sub>w</sub> M <sub>n</sub>	Spojovací motiv	Ligand 1		Ligand 2		Ligand 3	
				Název	Poč.	Název	Poč.	Název	Poč.
U-40	79000	1,19	β-Ala	Dy-676	3	TT	60	-	-
U-50	78500	1,19	β-Ala	biotin	4	TT	50	-	-
U-133	138600	1,19	Acap	Fc-{R}	14	Atto488	4	biotin	5
U-134	145600	1,19	Acap	Fc-{S}	17	Atto488	4	biotin	5
U-138B	115000	1,21	Acap	Fc-{S}	23	Cy7.5	3	biotin	5
U-139A	117000	1,65	Acap	Fc-{S}-L	24	Atto488	3	-	-
U-139B	161000	1,20	Acap	Fc-{S}	23	Atto488	3	-	-

Normální alpačí sérum a γ-globulinové frakce byly zakoupeny od Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK. Ačkoli jsou preparáty označovány výrobcem jako γ-globuliny, způsob jejich purifikace vede k tomu, že preparát je z většiny IgG[93]. Alpačí IgG1-3 byl izolován z normálního alpačího séra dle literatury[94]. Kuřecí IgY byl připraven z vejce (Schubert, Praha, CZ) dle literatury[48]. Seznam použitých imunoglobulinových preparací se zdroji je k dispozici v Tabulce 3. Čistoty preparací lze zhodnotit z Obrázku 2 v sekci Diverzita výše. Protilátky byly dále biotinylovány dle protokolu výrobce[95].

**Tabulka 3.** Seznam použitých preparací IgG a IgY. Názvy druhů jsou v dalším textu zkráceny dle uvedeného klíče.

Název v textu	Živočišný druh	Obj. číslo
kuře	kur domácí ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	8594032850327
syřský křeček	křeček zlatý ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	007-000-002
kočka	kočka domácí ( <i>Felis catus</i> )	002-000-002
alpaka	lama alpaka ( <i>Vicugna pacos</i> )	028-000-121
ovce	ovce domácí ( <i>Ovis ammon</i> )	013-000-002
pes	pes domácí ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	004-000-002
morče	morče domácí ( <i>Cavia porcellus</i> )	006-000-002
kůň	kůň domácí ( <i>Equus caballus</i> )	008-000-002
osel	osel domácí ( <i>Equus africanus asinus</i> )	017-000-002
kráva	tur domácí ( <i>Bos taurus</i> )	001-000-002
prase	prase domácí ( <i>Sus domesticus</i> )	014-000-002
koza	koza domácí ( <i>Capra aegagrus hircus</i> )	005-000-002
králík	králík domácí ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	011-000-002
potkan	potkan obecný ( <i>Rattus norvegicus</i> )	012-000-002
myš	myš domácí ( <i>Mus musculus</i> )	015-000-002
člověk	člověk moudrý ( <i>Homo sapiens sapiens</i> )	009-000-002

Zdroje lidských isotypových kontrol jsou shrnuty v Tabulce 4.

**Tabulka 4.** Zdroje a stručný popis použitých lidských isotypů Ig a jejich podtříd.

Ig	Zdroj <sup>[a]</sup>	Výrobce	Obj. číslo
G	1 κ R	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	HCA192
	2 κ R		HCA193
	3 κ R		HCA194
	4 κ R		HCA195
E κ R			HCA190
A	1 κ R	Invivogen, Toulouse, Francie	HCA189
	2 κ R		maba2-ctrl
M κ+λ I	Abcam, Cambridge, Spojené království		ab90348
D κ/λ I			ab91022

[a] R: rekombinantní, I: izolát

Seznam dalších použitých reagensů a materiálů je v Tabulce 5, resp. 6. K deionizaci vody byl použit systém Millipore Milli-Q (dále voda).

**Tabulka 5.** Seznam použitých chemikálií a dalších reagensů.

Název	Výrobce	Obj. číslo
protein G-HRP	Invitrogen	P21041
protein G IRDye800	Rockland	PG00-32
IRDye 800CW Streptavidin	LI-COR	926-32230
IRDye 800CW Goat anti-Human IgG (H + L)	LI-COR	926-32232
IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L)	LI-COR	926-32210
IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L)	LI-COR	926-32211
IRDye 800CW Donkey anti-Goat IgG (H + L)	LI-COR	926-32214
IRDye 680RD Goat anti-Rat IgG (H + L)	LI-COR	926-68076
EZ-Link NHS-PEG4-Biotin	Thermo Fisher	21362
kasein koncentrát 5,5 %	SDT	CBC2
luminol 97 %	Sigma-Aldrich	123072
4-jodofenol 99 %	Sigma-Aldrich	I10201
tris hydrochlorid 99 %	Sigma-Aldrich	T5941
DL-1-amino-2-propanol 90 %	Sigma-Aldrich	W396508
N,N-Diisopropylethylamine (DIEA) 99,5 %	Sigma-Aldrich	387649
2-merkaptoethanol 99 %	Sigma-Aldrich	M6250
dodecylsulfát sodný (SDS) 98,5 %	Sigma-Aldrich	L3771
akrylamid 99 %	Sigma-Aldrich	A9099
N,N'-metylenbisakrylamid 99 %	Sigma-Aldrich	M7279
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 99 %	Sigma-Aldrich	T9281
Coomassie Brilliant blue R 250	Sigma-Aldrich	1.12553
peroxid vodíku 30 %	Lachner	10064
chlorid sodný p.a.	Lachner	30093
N,N-Dimethylformamid (DMF) HPLC	Lachner	20021-LT0



**Tabulka 5. Pokračování**

Název	Výrobce	Obj. číslo
kyselina boritá p.a.	Lachner	10017-AP0
kyselina octová p.a.	Lachner	10047-A80
diethylether stabilizovaný p.a.	Lachner	20018-AT0
glycerin bezvodý p.a.	Lachner	40058-AT0
peroxodisíran amonný (APS) p.a.	Lachner	30154-AP0
aceton p.a.	Lachner	20001-CT0
methanol p.a.	Lachner	20038-AT0
azid sodný p.a.	Penta	10620-3010
modř bromfenolová p.a.	Penta	21500-30010
glycin p.a.	Penta	14570-30500

**Tabulka 6. Seznam použitých materiálů.**

Název	Výrobce	Obj. číslo
Nunc MaxiSorp 96-jamkové destičky černé	Thermo Fisher	437111
Amicon Ultra-0.5 mL 30 kDa MWCO	Merck	UFC5030BK
nitrocelulózová membrána, role, 0,45 µm	Bio-Rad	1620115
Echo-kompatibilní 384-jamkové PP destičky	Labcyte	PP-0200

Klíčové použité přístroje:

- čtečka Infinite M1000 Pro, Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko
- skener Odyssey CLx, LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
- skener Typhoon FLA 9000, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA
- akustický dávkovací systém Echo 550, Labcyte, San Jose, USA.

Pro zpracování strukturních dat byly využity programy PyMOL[96] a LigPlot+[83]. K analýze inhibičních dat byl použit GraphPad Prism 6. Chemické vzorce a diagramy byly zpracovány v programu ChemDraw 16. K obecným grafickým úpravám byl použit CorelDRAW X8 a GIMP 2.10.10.

### 3.2. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

- 6 × Vzorkový pufr neredukující: 350 mM Tris-HCl, 30 % (v/v) glycerol, 9 % (w/v) SDS, 180 mM bromfenolová modř; pH 6,8
- 6 × Vzorkový pufr redukující: neredukující s 5 % (v/v) 2-merkptoethanol
- 10 × elektrodový pufr: 250 mM Tris-HCl, 1,9 M glycin, 1 % SDS; pH 8,3

- Rozlišovací gel (x %): 375 mM Tris-HCl, x % (w/v) akrylamid směs, 0.1 % (w/v) SDS, 0.2 % (v/v) TEMED, 0.1 % (w/v) APS; pH 8,8
- Zaostrovací gel (6,6 %): 250 mM Tris-HCl, 6.6 % (w/v) akrylamid směs, 0.1 % (w/v) SDS, 0.2 % (v/v) TEMED, 0.1 % (w/v) APS; pH 6,8  
Pro přípravu použita směs 36:1 (w:w) akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu
- Barvicí roztok: 0,1% (w/v) Coomassie R250, 10% (v/v) kyselina octová, 40% (v/v) methanol
- Odbarvovací roztok: 10% (v/v) kyselina octová, 20% (v/v) methanol

Gelová elektroforéza byla využita k vyhodnocení čistoty preparátů protilátek použitých v této práci a k ilustraci jejich organizace. Pro přípravu vzorků byly k 10  $\mu$ l roztoku preparátu o koncentraci 0.5 mg/ml přidány 2  $\mu$ l 6  $\times$  redukujícího, či neredukujícího Vzorkového pufru s následnou inkubací 10 minut při 96  $^{\circ}$ C za intenzivního míchání. Vzorky byly nanášeny na gel (x = 12 % pro redukované, 8 % pro neredukované vzorky; nanáška 10  $\mu$ l) a byla spuštěna elektroforéza s konstantním napětím 200 V po dobu 60 minut.

Gel byl vyjmut z aparatury, promyt vodou a obarven Barvicím roztokem 60 sekund v mikrovlnné troubě při 600 W a následně 5 minut při 100 úderech za minutu na orbitální třepačce (jako v následujících krocích). Gel byl třikrát promyt vodou a odbarven Odbarvovacím roztokem 60 sekund v mikrovlnné troubě s následným 5-minutovým třepáním. Odbarvování bylo prováděno typicky třikrát do dosažení přijatelné intenzity proužků proti pozadí.

### 3.3. Příprava konjugátů

Pro přípravu konjugátů UR-74 a UR-75 byl použit obecný postup – 10 nmol prekursoru bylo rozpuštěno v DMF s 10 ekvivalenty DIEA a jedním ekvivalentem Fc-III peptidu vůči látkovému množství TT skupin – v případě UR-74 a prekursoru U-40 600 nmol, UR-75 a prekursoru U-50 500 nmol – s výsledným objemem 100  $\mu$ l. Reakce při pokojové teplotě probíhala přes noc za intenzivního míchání (vortex). Druhý den bylo přidáno 10  $\mu$ mol 1-amino-2-propanolu v 10  $\mu$ l vody a reakce byla dále inkubována jednu hodinu k vysycení případných zbývajících aktivních skupin.

Konjugát byl následně sražen směsí aceton/diethylether 3:1 (v/v), rozpuštěn ve vodě a izolován opakovanou ultrafiltrací na 30 kDa MWCO filtrační jednotce při  $13000 \times g$ , s desetinásobným promytím vodou (propustnost pro peptid ověřena předchozím experimentem). Roztok byl posléze upraven na původní koncentraci polymeru 100  $\mu\text{M}$  ve vodě. Průměrný počet substituentů na částici polymeru byl stanoven pomocí aminokyselinové analýzy.

### 3.4. Stanovování inhibičních konstant ligandů

- Adsorbční pufr: 100 mM borát, pH 9.5
- TBS: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7,4
- TBST: 0,05 % Tween-20 (v/v) v TBS
- Blokační pufr: 0,5 % (w/v) kasein v TBS
- Chemiluminiscenční substrát: 100 mM Tris-HCl, 2,5 mM luminol, 2 mM 4-jodofenol, 0,02 % peroxid vodíku, pH 8,0

Pro stanovování disociačních konstant ligandů bylo využito sdílení vazebného místa mezi  $\text{C}_{\text{H}2}$  a  $\text{C}_{\text{H}3}$  doménami IgG s proteinem G, který jako konjugát s HRP sloužil jako reportér. Test je prováděn při laboratorní teplotě v duplikátech.

Na každou analyzovanou jamku titrační destičky bylo zachyceno 10 ng lidského IgG (pro silné inhibitory sníženo[97]) ve 100  $\mu\text{l}$  Adsorbčního pufru s časem inkubace 60 minut při 100 úderech za minutu na orbitální třepačce (jako v následujících krocích). Destička byla vyprázdněna a následovala hodinová blokace s 200  $\mu\text{l}$  Blokačního pufru. Po třech promytích 200  $\mu\text{l}$  TBST byla nanášena typicky 12-bodová třínásobná ředící řada analyzovaného ligandu v TBST s koncentrací reportéru 10  $\text{pg}/\mu\text{l}$ .

Jako pozitivní kontrola byla použita série jamek pouze s reportérem, jako negativní kontrola byla použita série jamek s 10  $\mu\text{M}$  Fc-III (v předchozích experimentech ověřeno, že jako negativní kontrola funguje stejně jako protein G). Destička byla po hodinové inkubaci pětkrát promyta TBST, bylo přidáno 175  $\mu\text{l}$  Chemiluminiscenčního substrátu a luminiscence byla bezprostředně přečtena (integrace 100 ms, bez atenuace).

S použitím kontrol byly hodnoty relativní luminiscence pro jednotlivé body přepočteny na procentuální podíl navázaného reportéru. Tyto hodnoty byly posléze vyneseny v závislosti na logaritmu koncentrace ligandu a byla provedena nelineární regrese

této závislosti v programu GraphPad Prism 6 pomocí Cheng-Prusoffova modelu[98] pro stanovení konstanty  $K_i$  a jejího 95% intervalu spolehlivosti.

Jelikož molekulová velikost konjugátu je kvůli způsobu přípravy neznámá[99], je vhodné použít odhad pro stanovení koncentrace konjugátu (zde 100 pM při 10 pg/ $\mu$ l a  $M_w$  100 kDa) a následně pro vyjádření jeho disociační konstanty ( $K_D = 6,5$  nM). Oba tyto údaje jsou nutné k zpřesnění výsledných inhibičních konstant pomocí Cheng-Prusoffova modelu (ačkoli pouze o 1,5 %), kde odhad dělením zanikne. Výsledky jsou uváděny po zaokrouhlení na odpovídající počet platných číslic ve formátu  $K_i \pm 95\%$  CI.

### 3.5. Analýza peptidových polí

- TBST: 0,1 % Tween-20 (v/v) v TBS
- Blokační pufr: Rockland MB-070 v TBST
- Inkubační pufr: 10 % Rockland MB-070 v TBST
- Smáčecí pufr: 1 mM Tris-HCl, pH 7,4

K vyhodnocení sekvenčních preferencí byly využity kombinatoriální peptidové knihovny na pevné fázi (angl. peptide arrays, peptidová pole, mikropole) zahrnující všechny bodové záměny za proteinogenní aminokyseliny s výjimkou cysteinu napříč peptidem Fc-III (DCAWHLGELVWCT).

Mikropole jsou velmi náchylná na artefakty způsobené částicemi prachu, všechny roztoky byly tedy před použitím filtrovány 0,22  $\mu$ m stříkačkovými filtry a všechny operace byly prováděny v laminárním boxu. Protokol je prováděn při pokojové teplotě a v duplikátu na separátních polích. Ke stanovení pozadí v důsledku nespecifické vazby reportéru (zde fluorescenčně značený streptavidin) je třeba protokol provést nejprve bez inkubace s IgG.

Pole na podložním sklíčku 25  $\times$  75 mm byla nejprve ekvilibrována 15 minut v 500  $\mu$ l TBST na orbitální třepačce při 150 úderech za minutu (stejně jako dále). Po odsátí následovala hodinová inkubace v Blokačním pufru (500  $\mu$ l). Posléze bylo přidáno 500  $\mu$ l 10  $\mu$ g/ml roztoku biotinylovaného IgG v Inkubačním pufru a pole byla inkubována přes noc.

Druhý den byla pole třikrát promyta 500  $\mu$ l TBST a byla jednu hodinu vyvolávána za pomoci 500  $\mu$ l roztoku 1:10000 Streptavidin-800CW v Inkubačním pufru. Pole bylo promyto stejně jako v předchozím kroku a bylo dvakrát smočeno ve Smáčecím pufru a osušeno proudem

dušíku. Suché pole bylo následně analyzováno pomocí fluorescenčního skeneru (LI-COR Odyssey CLx „800 kanál“, Ex 785 nm LP 810 nm, 21  $\mu\text{m}/\text{px}$ , maximální kvalita, automatická korekce signálu).

Obrazová data byla posléze analyzována v programu ImageJ (doplněk Microarray profile[100]) s odečtením pozadí zjištěného předchozím experimentem. Jako negativní kontrola (0 %) sloužily tečky se stejným aminokyselinovým složením s pozměněnou peptidovou sekvencí (WLHETLCVADGCW), jako pozitivní kontrola (100 %) byly použity tečky s parentálním peptidem Fc-III (DCAWHLGELVWCT). S jejich pomocí byla transformačně stanovena procentuální hodnota signálu teček jednotlivých mutantů. Na základě hodnot v duplikátu byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Datové body s odchylkou větší než 30 % byly vyloučeny. Zbylé hodnoty byly posléze vyneseny jako teplotní mapy a logo-grafy pomocí tabulkového procesoru MS Excel.

### 3.6. Tečkový blot

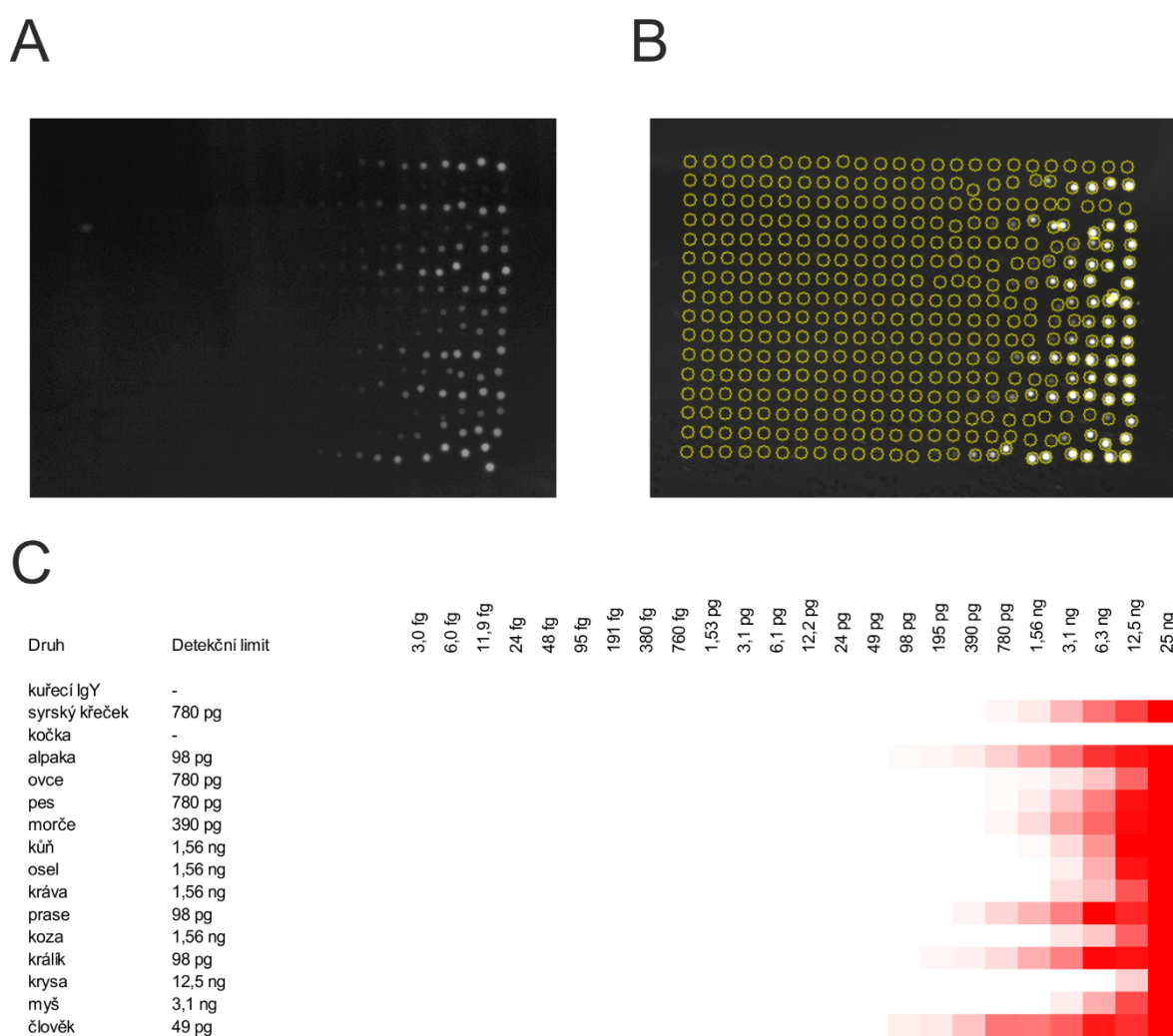
- Tečkový pufr: 100 mM borát, 0,1 % azid sodný, pH 9.5
- Blokační pufr: 0,5 % (w/v) kasein v TBS
- TBST: 0,1 % Tween-20 (v/v) v TBS

K vyhodnocení detekčních limitů a isotypových preferencí konjugátů byl využit tečkový blot (angl. dot blot). Roztoky IgG, či IgY o koncentraci 10 mg/ml v Tečkovém pufru byly 23-krát dvounásobně zředěny a 2,5 nl každého bodu vzniklé řady bylo akusticky přeneseno na nitrocelulosovou membránu (Labcyte Echo 550, celkem 24 bodů na každou protilátku). Výsledná pole byla připravena v kvadruplikátu. Grafická ilustrace pracovního postupu je zachycena v Obrázku 5 na další straně.

Membrána byla ponechána 30 minut na stole k usušení, poté byla přenesena do 50 ml konické zkumavky a inkubována za valivého otáčení  $50 \text{ min}^{-1}$  a laboratorní teploty (stejně jako dále) s 5 ml Blokačního pufru. Membrána byla posléze třikrát 5 minut promývána 5 ml TBST před hodinovou inkubací s 5 ml 4 nM roztoku zkoumaného polymeru (u protilátek proteinu G bylo použito ředění 1:10000) v TBST. Na závěr byla membrána pětikrát 5 minut promyta 5 ml TBST a bezprostředně poté analyzována na fluorescenčním skeneru – u polymerů a protilátek s 800CW, 680RD a Cy7.5 fluorofory na LI-COR Odyssey CLx (800CW, Cy 7.5: „800 kanál“, Ex 785 nm LP 810 nm; 680RD: „700 kanál“, Ex 685 nm

SP 750 nm; 21  $\mu\text{m}/\text{px}$ , maximální kvalita, automatická korekce signálu), u polymeru UR-74 s Dy-676 fluoroforem na GE Typhoon FLA 9000 (zisk 550 V, 25  $\mu\text{m}/\text{px}$ , Ex 635 nm LP 665 nm).

Obrazová data byla posléze analyzována v programu ImageJ (doplněk Microarray profile[100]). Získané hodnoty signálů jednotlivých teček byly v rámci kvadruplikátu převedeny na medián a získané hodnoty byly vyneseny v závislosti na množství nanesené protilátky pomocí tabulkového procesoru MS Excel.



**Obrázek 5.** Grafický popis pracovního postupu pro příklad konjugátu U-138B. (A) Ředící řady roztoků protilátek jsou přeneseny na nitrocelulosovou membránu, zablokovány a vizualizovány. (B) Přiřazení signálů teček. (C) Vyhodnocení detekčních limitů.

K nalezení detekčního limitu byla využita iterativní podmínka začínající od bodu 4. nejnižšího množství protilátky (24 fg; arbitrární, zvoleno ke snížení vlivu velmi blízkých hodnot v pozadí, nejnižší pozorovaný limit byl 760 fg) – první bod s intenzitou signálu vyšší než tři směrodatné odchylky souboru předcházejících signálů byl označen jako detekční limit. Výsledné hodnoty byly kontrolovány na přítomnost artefaktů bez nutnosti úpravy.

V případě vyšetřování specifity pro lidské isotypy a jejich podtřídy, a srovnávání konjugátů s proteinem G byly vyhodnoceny pouze relativní intenzity signálů teček s nejvyšší nanáškou ve vztahu k signálu s nejvyšší intenzitou v daném souboru. Tento způsob vyhodnocení byl zvolen, aby bylo možno srovnat selektivitu konjugátů s rozdílnou aviditou, fluorofory a potenciálně absolutní citlivostí. Pro vyhodnocení statistické významnosti byl ve vybraných případech použit dvouvýběrový nepárový T-test.

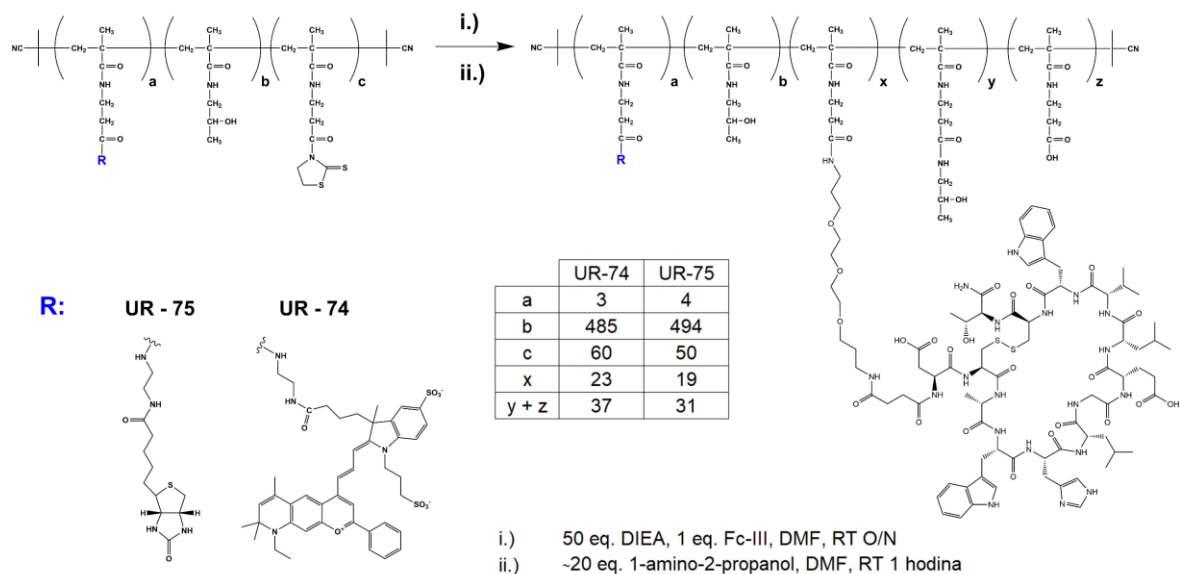
## 4. Výsledky

### 4.1. Příprava konjugátů

Přípravy konjugátů UR-74 a 75 na základě aminokyselinové analýzy proběhly úspěšně, s účinností navázání peptidů 38 % v případě obou konjugátů. Kombinací dat z rozptylové, spektrofotometrické a aminokyselinové analýzy byly získány průměrné počty monomerních jednotek a substituentů (viz Obrázek 6).

Protokol je možno v suchém prostředí DMF, nicméně zbytková voda v prekurzoru po přidavku organické báze vede k hydrolyze aktivních TT skupin (ověřeno spektrofotometricky předchozím experimentem) a v některých případech k nižším a méně předvídatelným podílům substituce.

V dalších experimentech bylo pro reakce zvoleno vodné prostředí PBS pH 7.4, ve kterém je účinnost navázání srovnatelná, avšak méně proměnlivá napříč různými ligandy.

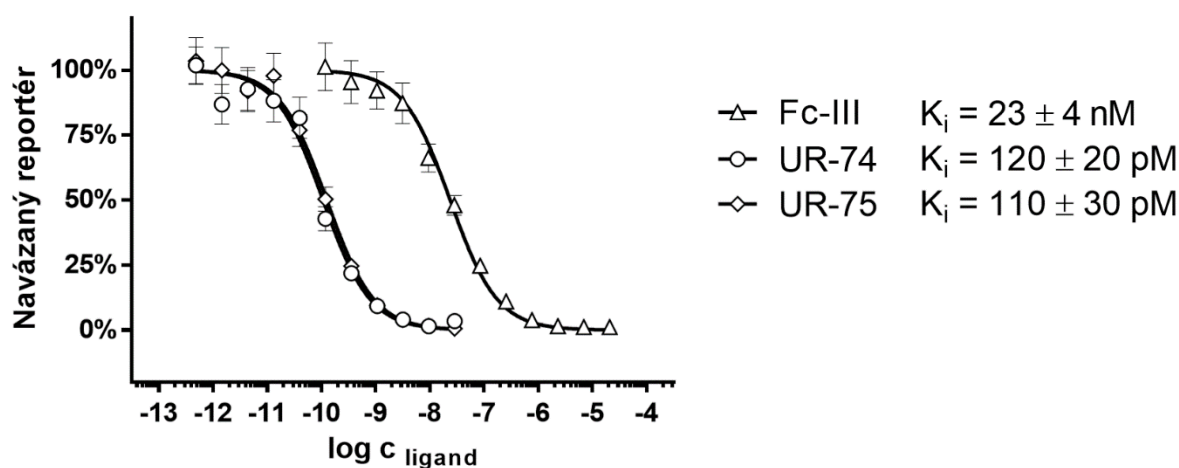


**Obrázek 6.** Reakční schéma přípravy konjugátů UR-74 a UR-75 s tabulkou průměrných počtů monomerů a substituentů na molekulu polymeru.



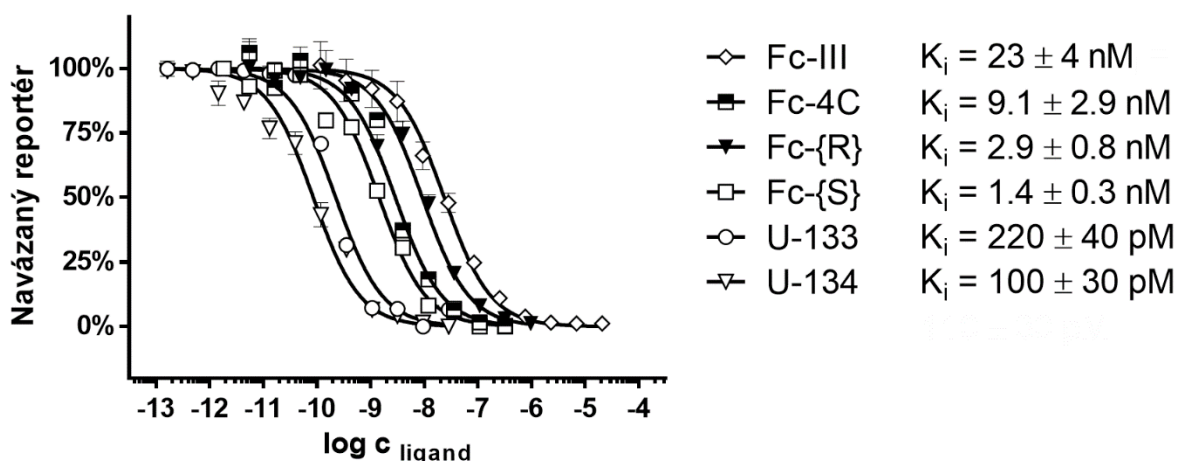
## 4.2. Vliv konjugace a způsobu cyklizace peptidů

Polymerní konjugáty UR-74 a 75 nesoucí peptid Fc-III se spojovacím motivem TTDS byly srovnány s výchozím peptidem se spojovacím motivem na základě hodnot inhibičních konstant. Při průměrném počtu 23, resp. 19 peptidů na molekulu polymeru došlo ke zvýšení afinity o dva řády (viz Obrázek 7).



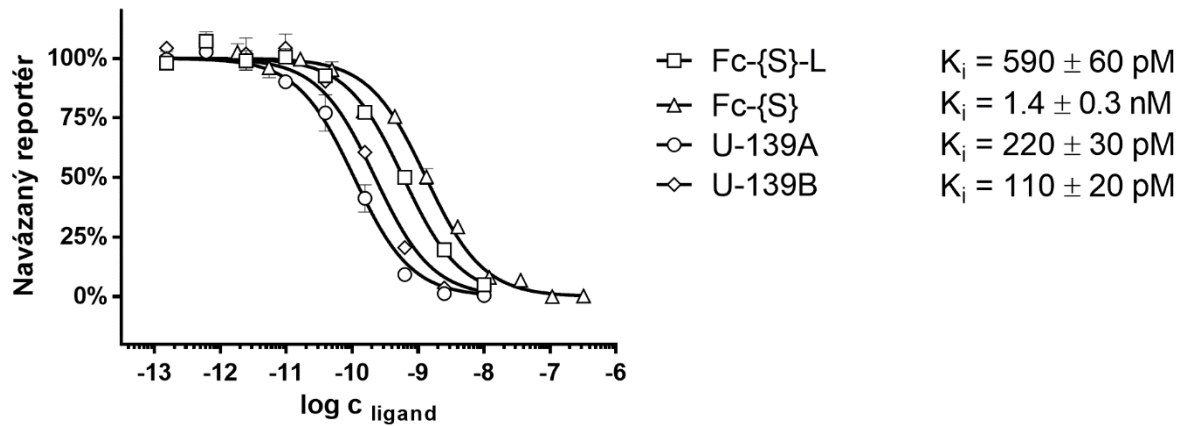
**Obrázek 7.** Stanovení inhibičních konstant polymerů UR-74 a 75 a výchozího peptidu.

Úprava topologie Fc-III v případě Fc-4C a Fc- $\{R/S\}$  (viz Obrázek 4 v Teoretické části) vedla v obou případech ke zvýšení afinity v souladu s literaturou (viz Obrázek 8)[79, 80]. Rozdíl v afinitě mezi peptidy Fc- $\{R\}$  a  $\{S\}$  byl dle očekávání mírně za hranicí chyby měření ve prospěch Fc- $\{S\}$ . Obdobný rozdíl byl též pozorován u polymerních konjugátů nesoucích tyto peptidy – U-133 resp. U-134.



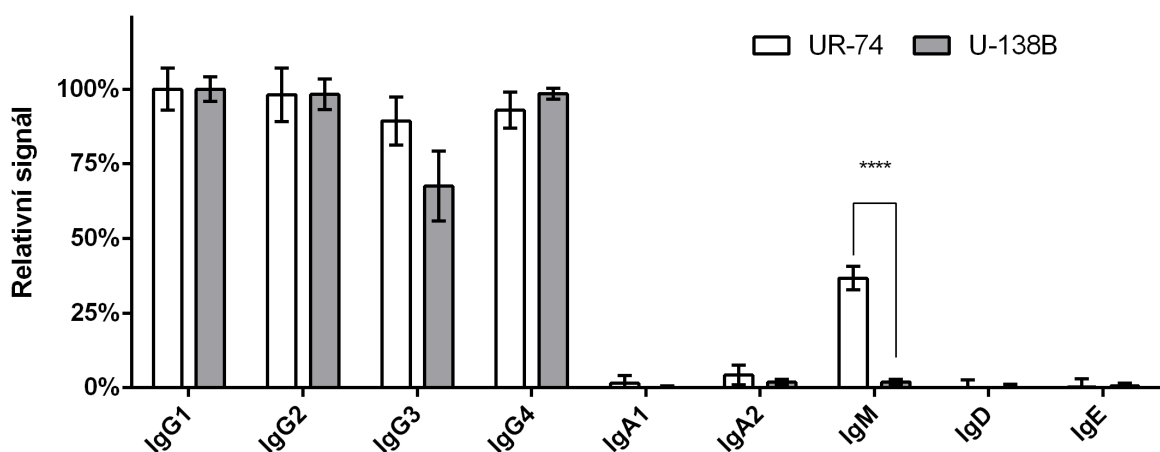
**Obrázek 8.** Srovnání peptidů s různými strategiemi cyklizace, stereoizomerů peptidů s dipolylovým můstkem a jejich peptidových konjugátů (Fc- $\{R\}$  U-133; Fc- $\{S\}$  U-134)

Zavedení PEG<sub>5</sub> jako spojovacího motivu na Fc-{S} peptid způsobilo zvýšení afinity, které se však již neprojevovalo po navázání na polymerní nosič (viz Obrázek 9).



**Obrázek 9.** Porovnání vlivu zavedení spojovacího motivu do peptidu Fc-{S} ve volné formě a ve formě polymerního konjugátu (Fc-{S}-L U-139A; Fc-{S} U-139B)

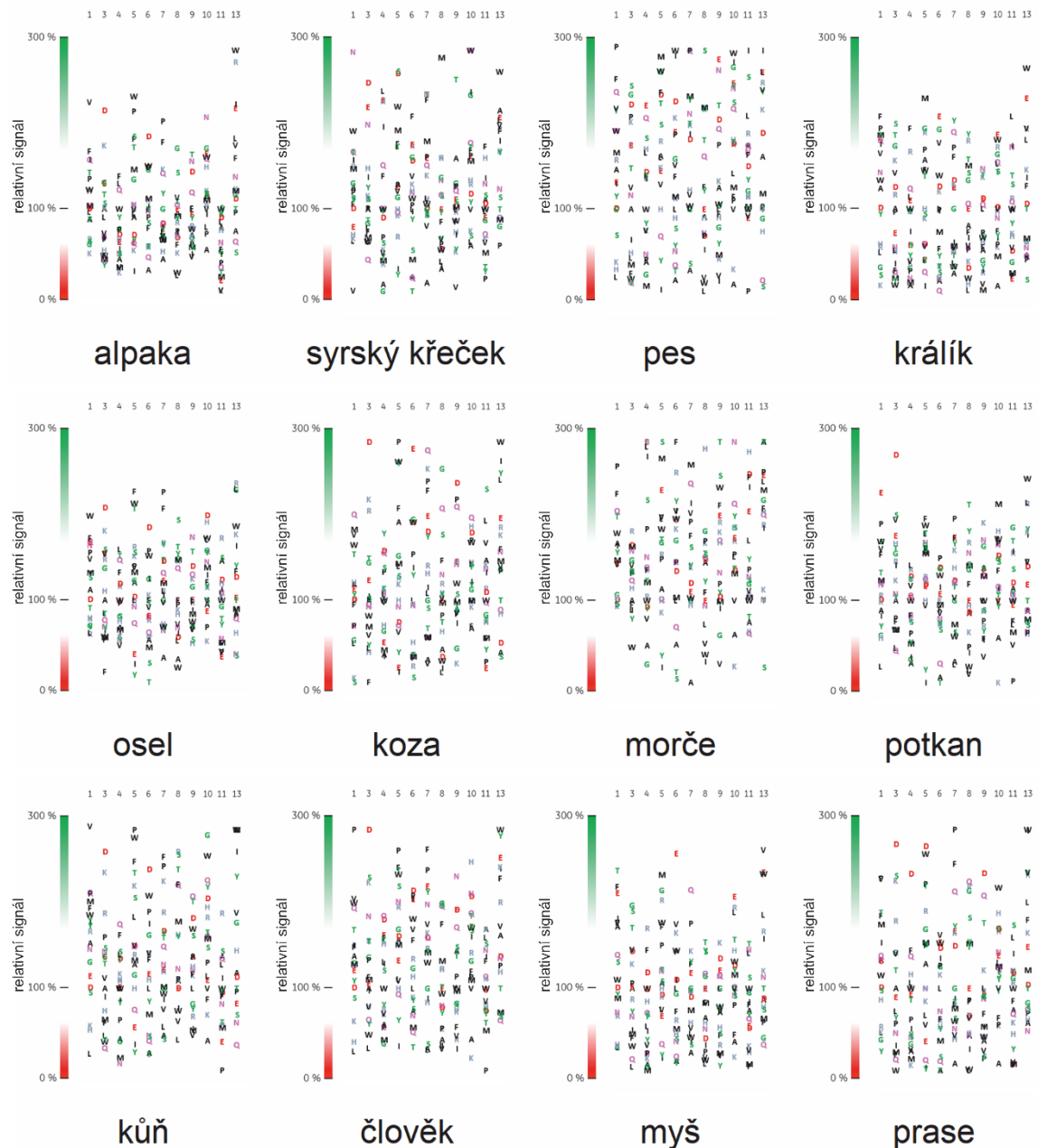
Zajímavým efektem změny cyklizační strategie z Fc-III na Fc-{S} byla změna selektivity vůči lidským isotypům. Zatímco Fc-III konjugát UR-74 vázal IgG1-4 a IgM, v případě Fc-{S} konjugátu U-138B byla vazba na IgM potlačena ( $p < 0,0001$ , viz Obrázek 10).



**Obrázek 10.** Rozdíly v profilu selektivity lidských isotypů a jejich podtříd pro konjugát UR-74 s Fc-III a U-138B s Fc-{S}.

### 4.3. Sekvenční preference Fc-III

Ze surových dat získaných skenováním peptidových polí vizualizovaných vybranými preparáty biotinylovaných protilátek byly před další interpretací vyloučeny datové body s větší než 30% směrodatnou odchylkou signálů v rámci duplikátu.



**Obrázek 11.** Preference záměn za proteinogenní aminokyseliny s výjimkou cysteinu napříč peptidem Fc-III s výjimkou pozic 2 a 12 (Cys) pro IgG vybraných živočišných druhů. Vertikální osa vyjadřuje relativní signál tečky daného mutantu, kde 100% odpovídá signálu parentálního Fc-III peptidu.

Předběžná rafinace dat je shrnuta v Tabulce 7. Zbývající soubor průměrů byl lineárně transformován za položení průměru souboru signálů výchozího peptidu Fc-III jako 100% a signálů zamíchané sekvence jako 0%. Výsledné hodnoty relativního signálu, či relativní preference mutantu protilátkou daného druhu, byly znázorněny v Obrázku 11 na předchozí straně.

**Tabulka 7.** Validace analýzy peptidových polí se shrnutím počtu vyloučených bodů (>30% směrodatná odchylka) a průměrná směrodatná odchylka (SD) zbývajícího souboru.

	syrský											
	člověk	alpaka	křeček	pes	králík	osel	koza	morče	potkan	kůň	myš	prase
vyloučené	1	1	2	7	1	0	4	17	0	6	1	0
prům. SD	10%	6%	13%	20%	7%	8%	10%	19%	7%	17%	13%	8%

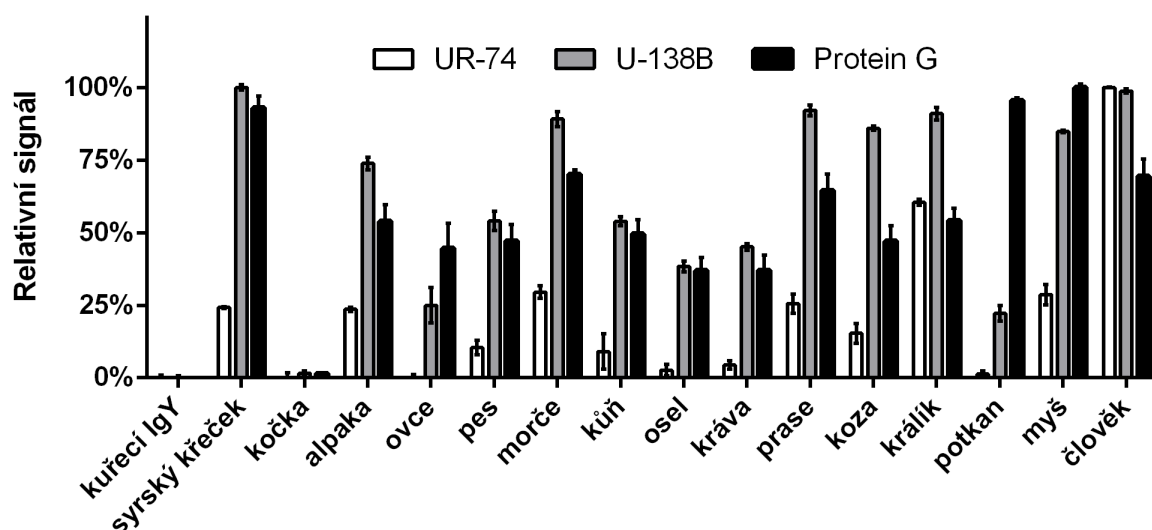
#### 4.4. Srovnání s komerčními sekundárními protilátkami

Fluorescenčně značené polymery UR-75 a U-138B, panel sekundárních protilátek a protein G byly analyzovány pomocí tečkových blotů za účelem vyhodnocení detekčních limitů pro protilátky vybraných druhů (viz Tabulka 8).

**Tabulka 8.** Detekční limity panelu protilátek pro polymerní konjugáty ve srovnání s proteinem G a komerčními sekundárními protilátkami (označení a výrobci v sekci Materiál a chemikálie výše). Pomlčky (-) označují, že vazba nebyla pozorována.

Druh	UR-74	U138B	protein G	koza $\alpha$ -člověk	osel $\alpha$ -koza	koza $\alpha$ -myš	koza $\alpha$ -králík	koza $\alpha$ -potkan
kuřecí IgY	-	-	-	-	-	-	-	-
syrský křeček	3,1 ng	780 pg	1,56 ng	98 pg	-	24 pg	195 pg	12,5 ng
kočka	-	-	25 ng	195 pg	6,1 pg	1,56 ng	195 pg	-
alpaka	390 pg	98 pg	390 pg	98 pg	195 pg	-	98 pg	-
ovce	-	780 pg	780 pg	-	1,53 pg	-	390 pg	-
pes	6,3 ng	780 pg	780 pg	12,2 pg	-	780 pg	390 pg	-
morče	1,56 ng	390 pg	780 pg	98 pg	390 pg	98 pg	780 pg	-
kůň	6,3 ng	1,56 ng	1,56 ng	-	-	1,56 ng	390 pg	-
osel	12,5 ng	1,56 ng	1,56 ng	-	-	1,56 ng	780 pg	-
kráva	25 ng	1,56 ng	780 pg	-	24 pg	1,56 ng	98 pg	-
prase	780 pg	98 pg	390 pg	98 pg	98 pg	390 pg	98 pg	-
koza	6,3 ng	1,56 ng	780 pg	-	6,1 pg	-	-	-
králík	195 pg	98 pg	390 pg	98 pg	-	780 pg	760 fg	98 pg
potkan	25 ng	12,5 ng	3,1 ng	98 pg	-	98 pg	6,3 ng	12,2 pg
myš	12,5 ng	3,1 ng	1,56 ng	49 pg	-	12,2 pg	-	-
člověk	24 pg	49 pg	390 pg	1,53 pg	-	-	-	-

Oba polymery vykazovaly specifitu srovnatelnou s proteinem G (viz Obrázek 12), avšak pouze U-138B se mu blížil i absolutní citlivostí. Oba konjugáty dle očekávání vykazovaly největší citlivost pro lidský IgG, proti kterému byly výchozí peptidy selektovány, avšak ani v tomto případě citlivostí nepřekonal sekundární protilátky, které byly konzistentně v rámci svého idiotypu o jeden až čtyři řády citlivější.



**Obrázek 12.** Srovnání relativních signálů (100% normalizace na nejvyšší signál souboru), potažmo druhové preference polymerních konjugátů UR-74 a U-138B a fluorescenčně značeného proteinu G.

## 5. Diskuze

Hodnoty inhibičních konstant zkoumaných ligandů ve volné formě jsou v přibližné shodě s publikovanými hodnotami pro výchozí peptidy (viz Tabulka 9). Jelikož byly v této práci použity peptidy s modifikacemi – PEG spojovacími motivy v případě Fc-III, Fc-4C a Fc- $\{S\}$ -L a aminacemi v případě Fc- $\{R/S\}$  – a pro stanovení konstant byly v některých případech použity odlišné metody, nelze tyto hodnoty striktně srovnávat.

**Tabulka 9.** Porovnání interakčních konstant peptidů použitých v této práci s literárními hodnotami pro výchozí peptidy.

Peptid	Tato práce		Literární hodnoty pro výchozí peptidy	
	$K_i \pm 95\% \text{ CI}$	Modifikace	$K_i$	Reference
Fc-III	$23 \pm 4 \text{ nM}$	N-TTDS	$25 \text{ nM}^{[a]}$ , $70 \text{ nM}^{[a]}$ , $215 \text{ nM}^{[b]}$	[78-80]
Fc-4C	$9.1 \pm 2.9 \text{ nM}$	N-TTDS	$2.45 \text{ nM}^{[a]}$	[79]
Fc- $\{S\}$	$1.4 \pm 0.3 \text{ nM}$	4-amin (S)		
Fc- $\{R\}$	$2.9 \pm 0.8 \text{ nM}$	4-amin (R)	$0.4 \text{ nM}^{[b]}$ , $2.2 \text{ nM}^{[c]}$	[80]
Fc- $\{S\}$ -L	$590 \pm 60 \text{ pM}$	4-PEG <sub>5</sub> (S)		

[a] luminiscenční kompetitivní test s proteinem G, [b] povrchová plasmonová resonance, kompetitivní s proteinem G, [c] povrchová plasmonová resonance, přímá ( $K_D$ )

Na základě srovnání interakčních konstant ligandů a jejich polymerních konjugátů, lze usoudit, že konjugace má pozitivní vliv na afinitu, avšak ne zcela konzistentně. Zatímco ligand Fc-III ve volné formě vykazuje  $K_i$  23 nM a na nosiči 120 a 110 pM pro UR-74, resp. UR-75, ligand Fc- $\{S\}$ -L vykazuje  $K_i$  590 pM a 220 pM ve volné, resp. konjugované formě (U-139A). Při srovnatelném počtu peptidů na polymer (23 a 19 u UR-74 resp. 75 vs. 24 u U-139A) dochází v prvním případě ke zvýšení afinity o více než dva řády a v případě druhém méně než třínásobně. K objasnění této diskrepance byly navrženy dvě možná vysvětlení.

Effekt disproporčního zvýšení afinity oproti výchozím peptidům lze vysvětlit hydrofilizací jinak mírně hydrofobního peptidu (GRAVY index pro parentální Fc-III 0,42[101]). Volný peptid by v roztoku podléhal agregaci, a tak efektivně snižoval jeho aktivní koncentraci, čímž by docházelo ke zvýšení hodnot měřených  $K_i$ . Navázáním hydrofilního polymeru, či spojovacího motivu by bylo možné tento efekt zmírnit v případě, že by reálné  $K_i$  bylo nižší než kritická agregační koncentrace peptidu. Po dosažení meze reálného  $K_i$  v důsledku

modifikace by bylo další snížení možné pouze v násobcích počtu ligandů na molekulu za předpokladu neomezené dostupnosti vazebných míst (větší koncentrace ligandu), či funkčně závisle na tomto počtu v případě omezené dostupnosti (polymer o hydrodynamickém poloměru 15-20 nm vs. řídká vrstva adsorbovaného proteinu s teoretickou mezimolekulovou vzdáleností přibližně 50 nm při 10 ng proteinu na jamku) v důsledku větší pravděpodobnosti produktivní kolize.

Tímto by bylo možno vysvětlit též „afinitní strop“, který brání dalšímu snižování  $K_i$  konjugátů s ligandy s vyšší afinitou ve volné formě (viz Obrázek 7 vs. 8 a 9 v sekci Výsledky). K potvrzení tohoto vysvětlení by bylo potřeba agregaci prokázat např. gelovou permeační chromatografií, či dynamickým rozptylem světla. Zároveň by bylo vhodné vyšetřit interakci konjugátu i výchozího peptidu s vazebným místem v roztoku, kde by se nabízely fluorescenční techniky (polarizace, rezonanční přenos), či kalorimetrie.

Dalším možným vysvětlením tohoto efektu by mohl být vliv zvýšení molekulové hmotnosti, vedoucí ke snížení difusního koeficientu. U ligandů s vysokou konstantou disociace  $k_{off}$  by mohlo dojít k jejímu snížení v důsledku menší tendence většího ligandu přecházet zpět do roztoku a opouštět vazebné místo. Jaký vliv má zvýšení molekulové hmotnosti na dílčí konstanty a potažmo disociační konstantu  $K_D = k_{off}/k_{on}$  by bylo nutno ověřit metodou schopnou sledování asociace i disociace, např. povrchovou plasmonovou resonancí, jelikož u většího ligandu by bylo stejně tak možno předpokládat i snížení  $k_{on}$ , což by toto vysvětlení mohlo vyvracet.

Ačkoli je možno v kombinaci s nosičem získat konjugáty s pikomolárními interakčními konstantami, je důležité je zasadit do kontextu v současné době dostupných řešení. Konjugáty nedosahují selektivity ani citlivosti sekundárních protilátek, srovnatelné jsou pouze s proteinem G.

Z tohoto důvodu je v práci zkoumána i možnost optimalizace sekvence výchozího peptidu Fc-III. Pro stanovení sekvenčních preferencí napříč druhy byl zvolen Fc-III kvůli snazší syntetické dostupnosti jednoduché disulfidové cyklizace při paralelní syntéze. Získané preferenční motivy je možné použít k racionálnímu návrhu sekvencí s větší afinitou a selektivitou pro protilátky různých živočišných druhů. Jelikož mutace krátkého tridekapeptidu mají vysoký potenciál pro vzájemnou neslučitelnost, bude třeba je prozkoumat ve skupinách pomocí dalších kombinatoriálních knihoven.

Zatímco peptidová pole umožňují rychlé prozkoumání rozsáhlých strukturních prostorů, jsou inherentně omezena způsobem syntézy peptidu, který je připojen přes C-konec na tripeptidový spojovací motiv navázaný na polymerním povlaku podložního sklíčka. Peptidy v této práci používají N-koncové (Fc-III, Fc-4C), či jemu strukturně podobné (Fc- $\{R/S\}$ ) napojení spojovacího motivu, jelikož dle krystalové struktury komplexu parentálního peptidu Fc-III s lidským IgG1 (viz Obrázek 3 v Teoretické části) je tato část molekuly nejlépe dostupná rozpouštědly.

Ligandy na poli se tedy liší od ligandů zde zkoumaných navzdory shodným sekvencím a je možné, že optimalizovaný ligand získaný analýzou dat z těchto polí by paradoxně mohl vykazovat horší interakční konstanty právě z důvodu nevhodného spojovacího motivu během selekce.



## 6. Závěr

Na základě literární rešerše byly připraveny peptidové ligandy Fc-fragmentů protilátek se spojovacími motivy pro konjugaci s polymerním nosičem. Volné a konjugované ligandy byly srovnány na základě interakčních konstant s lidským IgG.

Konjugace s nosičem ve všech případech vedla ke zvýšení afinity. Konjugáty vykazují selektivitu vůči lidskému IgG1-4 a IgM v případě jednoduché disulfidové cyklizace peptidového ligandu, v případě N→C cyklizace je vazba na IgM potlačena.

Jako vizualizační činidlo polymerní konjugáty vykazují citlivost a selektivitu v panelu protilátek 16 živočišných druhů srovnatelnou s proteinem G. Při srovnání se sekundárními protilátkami vykazují v rámci jejich idiotypu o jeden až čtyři řády horší citlivost.

Analýzou kombinatoriální peptidové knihovny byly zjištěny preference aminokyselinových záměn Fc-III peptidu pro protilátky několika živočišných druhů. Získané motivy budou použity jako podklad k racionálnímu návrhu optimalizovaných ligandů vázajících Fc-fragmety protilátek.

## Reference

1. Heidelberger, M., Kendall, F.E., J Exp Med, 50(6):809-823 (1929)
2. Flajnik, M.F., Kasahara, M., Nat Rev Genet, 11(1):47-59 (2010)
3. Edelman, G.M., Gally, J.A., Proc Natl Acad Sci USA, 51(5):846-853 (1964)
4. Fagraeus, A., Acta Med Scand, 130(204S) (1948)
5. Ehrlich, P., Dtsch Med Wschr, 17:1218 (1891)
6. Simmons, R.A., Willberg, C.B., Klenerman, P., eLS, 6 (2013)
7. Stijlemans, B., Caljon, G., Van Den Abbeele, J., Van Ginderachter, J.A., Magez, S., De Trez, C., Front Immunol, 7:233 (2016)
8. Goldberg, M.F., Saini, N.K., Porcelli, S.A., Microbiol Spectr, 2(5) (2014)
9. Schroeder, H.W., Cavacini, L., J Allergy Clin Immunol, 125(2 S2):S41-S52 (2010)
10. Reth, M., Wienands, L., Annu Rev Immunol, 15:453-479 (1997)
11. Treanor, B., Immunology, 2012. 136(1):21-27
12. Schatz, D.G. Ji, Y., Nat Rev Immunol, 11:251 (2011)
13. LeBien, T.W., Tedder, T.F., Blood, 112(5):1570-1580 (2008)
14. Stavnezer, J., Amemiya, C.T., Semin Immunol, 16(4):257-275 (2004)
15. Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., Immunity, 26(2):205-213 (2007)
16. Nemazee, D., Nat Rev Immunol, 6(10):728-740 (2006)
17. Murphy, K.M., Weaver, C., *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Group, str. 305-307 (2016)
18. Nemazee, D., Nat Rev Immunol, 17:281 (2017)
19. Goodnow, C.C., Adelstein, S., Basten, A., Science, 248(4961):1373-1379 (1990)
20. Mathis, D., Benoist, C., Nat Rev Immunol, 7(8):645-650 (2007)
21. Murphy, K.M., Weaver, C., *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Group, str. 410-412 (2016)
22. Bork, P., Holm, L., Sander, C., J Mol Biol, 242(4):309-320 (1994)
23. Barclay, A.N., Semin Immunol, 15(4):215-223 (2003)
24. Chui, S.H., Lam, C.W., Lai, K.N., Clin Chem, 36(3):501-502 (1990)
25. Brezski, R.J., Jordan, R.E., mAbs, 2(3):212-220 (2010)
26. Porter, R.R., Nature, 182(4636):670-671 (1958)
27. Nisonoff, A., Wissler, F.C., Lipman, L.N., Science, 132(3441):1770-1771 (1960)
28. Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., Front Immunol, 5:520-520 (2014)
29. Chen, K., Cerutti, A., Curr Opin Immunol, 23(3):345-352 (2011)
30. Wu, L.C., Zarrin, A.A., Nat Rev Immunol, 14:247 (2014)
31. Chintalacheruvu, K.R., Morrison, S.L., J Immunol, 157(8):3443-3449 (1996)
32. Chintalacheruvu, K.R., Yu, L.J., Bhola, N., Kobayashi, K., Fernandez, C.Z., Morrison, S.L., J Immunol, 169(9):5072-5077 (2002)
33. Brandtzaeg, P., Front Immunol, 4(222) (2013)

34. Kaetzel, C.S., Robinson, J.K., Chintalacheruvu, K.R., Vaerman, J.P., Lamm, M.E., Proc Natl Acad Sci USA, 88(19):8796-8800 (1991)
35. Müller, R., Gräwert, M.A., Kern, T., Madl, T., Peschek, J., Sattler, M., Groll, M., Buchner, J., Proc Natl Acad Sci USA, 110(25):10183-10188 (2013)
36. Saphire, E.O., Parren, P.W., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Morris, G.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Wilson, I.A., Science, 293(5532):1155-1159 (2001)
37. Bonner, A., Almogren, A., Furtado, P.B., Kerr, M.A., Perkins, S.J., Mucosal Immunol, 2(1):74-84 (2009)
38. Perkins, S.J., Nealis, A.S., Sutton, B.J., Feinstein, A., J Mol Biol, 221(4):1345-1366 (1991)
39. Murphy, K.M., Weaver, C., *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Group, str. 304 (2016)
40. Pettinello, R., Dooley, H., Biomolecules, 4(4):1045-1069 (2014)
41. Greenberg, A.S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E.C., Flajnik, M.F., Nature, 374(6518):168-173 (1995)
42. Das, S., Hirano, M., Tako, R., McCallister, C., Nikolaidis, N., Curr Genomics, 13(2):95-102 (2012)
43. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., Hamers R., Nature, 363(6428):446-448 (1993)
44. Flajnik, M.F., Deschacht, N., Muyldermans, S., PLoS Biol, 9(8):e1001120 (2011)
45. Arbabi-Ghahroudi, M., Front Immunol, 8:1589 (2017)
46. Zhang, X., Calvert, R.A., Sutton, B.J., Doré, K.A., Biol Rev Camb Philos Soc, 92(4):2144-2156 (2017)
47. Larsson, A., Bålöw, R.M., Lindahl, T.L., Forsberg, P.O., Poult Sci, 72(10):1807-1812 (1993)
48. Pauly, D., Chacana, P.A., Calzado, E.G., Brembs, B., Schade, R., J Vis Exp, (51):3084 (2011)
49. Butler, J.E., Scand J Immunol, 45(5):455-462 (1997)
50. Haakenson, J.K., Huang, H., Smider, V.V., Front Immunol, 9:1262-1262 (2018)
51. Detrick, B., Schmitz, J.L., Hamilton, R.G., *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*. ASM Press (2016)
52. Delves, P.J., Martin S.J., Burton, D.R., Roitt, I., *Essential Immunology*. Wiley (2017)
53. Wine, Y., Boutz, D.R., Lavinder, J.J., Miklos, A.E., Hughes, R.A., Hoi, K.H., Jung, S.T., Horton, A.P., Murrin, E.M., Ellington, A.D., Marcotte, E.M., Georgiou, G., Proc Natl Acad Sci USA, 110(8):2993-2998 (2013)
54. Milstein, C., BioEssays, 21(11):966-973 (1999)
55. Kunert, R., Reinhart, D., Appl Microbiol Biotechnol, 100(8):3451-3461 (2016)
56. Hammers, C.M., Stanley, J.R., J Invest Dermatol, 134(2):1-5 (2014)
57. Nelson, A.L., mAbs, 2(1):77-83 (2010)
58. Griffin, L., Lawson, A., J Clin Exp Immunol, 165(3):285-291 (2011)
59. Manning, C.F., Bundros, A.M., Trimmer, J.S., PLOS One, 7(6):e38313 (2012)

60. Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J., Gotschlich, E.C., *Anal Biochem*, 136(1):175-179 (1984)
61. Geschwender, A.S., Zhang, Y., Holt, T., McDermitt, D., Olive, D.M., *Quantitative, Two-Color Western Blot Detection With Infrared Fluorescence*. LI-COR Biosciences (2004)
62. Leong, M.M., Milstein, C., Pannell, R., *J Histochem Cytochem*, 34(12):1645-1650 (1986)
63. Burnette, W.N., *Anal Biochem*, 112(2):195-203 (1981)
64. Bass, J.J., Wilkinson, D.J., Rankin, D., Phillips, B.E., Szewczyk, N.J., Smith, K., Atherton, P.J., *Scand J Med Sci Sports*, 27(1):4-25 (2017)
65. Taylor, S.C., Posch, A., *Biomed Res Int*, 2014:361590 (2014)
66. Hayat, M.A., *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*. Academic Press (1989)
67. Weeks, I., Sturgess, M., Brown, R.C., Woodhead, J.S., *Methods Enzymol*, 133:366-387 (1986)
68. Palmiolia, A., Crisma, M., Peggion, C., Brusasca, P.N., Zanin, D., Dal Corso, A., Ingallinella, P., Peri, F., *Tetrahedron Lett*, 54(33):4446-4450 (2013)
69. Veitch, N.C., *Phytochemistry*, 65(3):249-259 (2004)
70. Mahmood, T., Yang, P.C., *N Am J Med Sci*, 4(9):429-434 (2012)
71. Wilchek, M., Bayer, E.A., *Trends Biochem Sci*, 14(10):408-412 (1989)
72. Sidorin, E.V., Solov'eva, T.F., *76(3):295* (2011)
73. Verwey, W.F., *J Exp Med*, 71(5):635-644 (1940)
74. Bjorck, L., Kronvall, G., *J Immunol*, 133(2):969-674 (1984)
75. Eliasson, M., Olsson, A., Palmcrantz, E., Wiberg, K., Inganäs, M., Guss, B., Lindberg, M., Uhlén, M., *J Biol Chem*, 263(9):4323-4327 (1988)
76. Bjorck, L., *J Immunol*, 140(4):1194-1197 (1988)
77. Roque-Barreira, M.C., Campos-Neto, A., *J Immunol*, 134(3):1740-1743 (1985)
78. DeLano, W.L., Ultsch, M.H., de Vos, A.M., Wells, J.A., *Science*, 287(5456):1279-1283 (2000)
79. Gong, Y., Zhang, L., Li, J., Feng, S., Deng, H., *Bioconjug Chem*, 27(7):1569-1573 (2016)
80. Dias, R.L., Fasan, R., Moehle, K., Renard, A., Obrecht, D., Robinson, J.A., *J Am Chem Soc*, 128(8):2726-2732 (2006)
81. Kang, H.J., Choe, W., Min, J.K., Lee, Y.M., Kim, B.M., Chung, S.J., *J Chromatogr A*, 1466:105-112 (2016)
82. Kishimoto, S., Nakashimada, Y., Yokota, R., Hatanaka, T., Adachi, M., Ito, Y., *Bioconjug Chem*, 30(3):698-702 (2019)
83. Laskowski, R.A., Swindells, M.B., *J Chem Inf Model*, 51(10):2778-2786 (2011)
84. Dvořáková, P., Bušek, P., Knedlík, T., Schimer, J., Etrych, T., Kostka, L., Stollinová Šromová, L., Šubr V., Šácha, P., Šedo, A., Konvalinka, J., *J Med Chem*, 60(20):8385-8393 (2017)

85. Šácha, P., Knedlík, T., Schimer, J., Tykvart, J., Parolek, J., Navrátil, V., Dvořáková, P., Sedlák, F., Ulbrich, K., Strohalm, J., Majer, P., Šubr, V., Konvalinka, J., *Angew Chem Int Ed Engl*, 55(7):2356-2360 (2016)
86. Perrier, S., Takolpuckdee, P., Mars, C.A., *Macromolecules*, 38(6):2033-2036 (2005)
87. Moad, G., Chong, Y.K., Postma, A., Rizzardo, E., Thang, S.H., *Polymer*, 46(19):8458-8468 (2005)
88. Carraher, C.E., *Seymour/Carraher's Polymer Chemistry: Sixth Edition*. CRC Press (2003)
89. Perrier, S., *Macromolecules*, 50(19):7433-7447 (2017)
90. Ulbrich, K., Šubr, V., Strohalm, J., Plocová, D., Jelínková, M., Říhová, B., *J Control Release*, 64(1-3):63-79 (2000)
91. Šubr, V., Ulbrich, K., *React Funct Polym*, 66(12):1525-1538 (2006)
92. White, C.J., Yudin, A.K., *Nat Chem*, 3(7):509-524 (2011)
93. *Normal Serums & Gamma Globulins*. (15. května 2019)  
<https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/groups/normal-sera/>
94. Maass, D.R., Sepulveda, J., Pernthaner, A., Shoemaker, C.B., *J Immunol Methods*, 324(1-2):13-25 (2007)
95. *TFS User Guide: EZ-Link NHS-Biotin Reagents*. (15. května 2019)  
[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011206\\_EZ\\_NHS\\_Biotin\\_Reag\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011206_EZ_NHS_Biotin_Reag_UG.pdf)
96. DeLano, W.L., *Proteins Struct Funct Bioinf*, 30:442-454 (2002)
97. Cha, S., *Biochem Pharmacol*, 24(23):2177-2185 (1975)
98. Cheng, Y., Prusoff, W.H., *Biochem Pharmacol*, 22(23):3099-3108 (1973)
99. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. 1996, Elsevier Science
100. *MicroArray Profile*. (15. května 2019)  
[http://www.optinav.info/MicroArray\\_Profile.htm](http://www.optinav.info/MicroArray_Profile.htm)
101. Kyte, J., Doolittle, R.F., *J Mol Biol*, 157(1):105-132 (1982)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka