

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza  
Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Gabriela Chytrá

**Studium vlivu N-vázané glykosylace na funkci nanoprotilátky cílíci  
receptor HER2**

Study of the role of N-glycosylation in function of anti-HER2 nanobody

Bakalářská práce

Konzultant: Mgr. Barbora Kalousková  
Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha, 2020

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a uvedla veškerou použitou literaturu a informační zdroje. Tištěná verze bakalářské práce se shoduje s elektronickou verzí vloženou v SIS.

V Praze, 15. 6. 2020

Podpis: .....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala mému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. a Mgr. Barboře Kalouskové za konzultace a odborné rady při vypracování této práce. Mgr. Barboře Kalouskové bych také chtěla poděkovat za pomoc při vyhodnocování výsledků nanoDSF. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Denisu Cmuntovi za velkou pomoc při experimentální části a pomoci při vyhodnocování výsledků průtokové cytometrie. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat všem členům laboratoře 204 za příjemné pracovní prostředí a mé rodině za podporu během studia.

## Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou v současnosti velmi rozšířená a jejich kompletní léčba vyžaduje eliminaci všech nádorových buněk v organismu. Jedním ze způsobů léčby je imunoterapie, která se snaží vyvolat imunitní odpověď a aktivovat tak protinádorové obranné mechanismy organismu. K tomu se používají terapeutické protilátky, které cílí markery na nádorových buňkách. Jeden z těchto markerů je receptor HER2, jehož exprese je zvýšená například na povrchu nádorových buněk karcinomu prsu.

Jako terapeutické protilátky se často používají humanizované monoklonální protilátky, ale používají se i jiné konstrukty, jako jsou bispecifické částice, nanoprottilátky či jejich analogy. Nanoprottilátkami se označují rekombinantní variabilní domény odvozené od protilátek, které ve své struktuře postrádají lehké řetězce. V přírodě se takové protilátky přirozeně vyskytují například u savců z čeledi velbloudovití nebo u některých paryb, jako jsou žraloci.

Tato práce popisuje přípravu různých glykoforem nanoprottilátky antiHER2 a ověření vlivu této glykosylace na vazbu nanoprottilátky na povrch buněčné linie exprimující na svém povrchu receptor HER2. Byla připravena nanoprottilátka s komplexní přirozenou glykosylací (produkovaná v buněčné linii HEK293T) a nanoprottilátka s homogenní glykosylací (produkovaná v buněčné linii HEK293S GnTI). Práce také popisuje klonování a produkci antiHER2 nanoprottilátky s mutovaným glykosylačním místem v paratopu. Bylo ověřeno, že glykosylace negativně ovlivňuje vazbu na receptor HER2, což je důležitý poznatek pro budoucí využití této nanoprottilátky při přípravě potenciálních imunoaktivních terapeutik.

## Klíčová slova

nanoprottilátka, HER2, N-glykosylace, mutace, HEK293, rekombinantní exprese proteinů

## **Abstract**

Cancer is currently widespread disease and its successful treatment requires the elimination of all cancer cells in the body. One method of cancer treatment is immunotherapy, which seeks to elicit an immune response and activate the body's anti-tumor defense mechanisms. Therapeutic antibodies are used to target tumor cells markers. One of such markers is the HER2 receptor which is overexpressed for example on the surface of breast cancer cells.

Humanized monoclonal antibodies are often used as therapeutic antibodies, but other constructs such as bispecific particles, nanobodies or their analogs are also used. Nanobodies refer to recombinant antibody-derived variable domains that lack light chains in their structure. Such antibodies occur naturally, for example in camelid mammals or in certain cartilaginous fishes, such as sharks.

This work describes the preparation of various glycoforms of the antiHER2 nanobody and verification of the effect of the glycosylation on the ability of nanobody to bind to the cell line that is overexpressing the HER2 receptor on its surface. A nanobody with complex natural glycosylation (produced in the HEK293T cell line) and a nanobody with uniform glycosylation (produced in the HEK293S GnTI<sup>-</sup> cell line) were prepared. The work also describes the cloning and production of antiHER2 nanobody with a mutated glycosylation site in the paratope. Glycosylation has been shown to negatively affect binding on HER2 receptor, an important finding for the future use of this nanobody in the preparation of potential immunoactive therapeutics.

## **Key words**

nanobody, HER2, N-glycosylation, mutation, HEK293, recombinant protein expression

# Obsah

1. Seznam zkratk	8
2. Teoretický úvod	10
2.1. Protilátky	10
2.1.1. Role protilátek	10
2.1.2. Struktura protilátek	11
2.1.3. Nanoprotiátky	12
2.1.4. Alternativy protilátek	14
2.2. Rakovinné markery	15
2.2.1. Změny povrchových znaků na rakovinných buňkách	15
2.2.2. Markery využívané pro cílenou terapii	16
2.2.3. HER2 receptor	17
2.3. Imunoterapie	18
2.3.1. Obecné principy	18
2.3.2. Terapeutické protilátky	19
2.3.3. Bispecifické částice	21
3. Cíle práce	22
4. Experimentální část	23
4.1. Použité materiály	23
4.1.1. Chemikálie	23
4.1.2. Roztoky a pufrы	24
4.1.3. Kultivační média a misky	24
4.1.4. Primery a vektory	25
4.1.5. Enzymy, polymerázy a jim příslušné pufrы	25
4.1.6. Buněčné kmeny a linie	25
4.1.7. Přístroje, pomůcky a soupravy	26
4.2. Metody	28
4.2.1. Příprava expresního vektoru	28
4.2.1.1. PCR amplifikace plazmidu	28
4.2.1.2. Elektroforéza v agarózovém gelu	29
4.2.1.3. Restrikční štěpení templátové DNA	29
4.2.1.4. Izolace DNA z agarózového gelu	29
4.2.1.5. Transformace kompetentních buněk	30
4.2.1.6. Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA	30
4.2.1.7. Měření koncentrace a čistoty DNA	31
4.2.1.8. Sekvence DNA	31
4.2.1.9. Velkoobjemová izolace plazmidové DNA	31
4.2.2. Expres proteinů	32

4.2.2.1.	Kultivace buněčných linií HEK293T a HEK293S GnTI <sup>-</sup> .....	32
4.2.2.2.	Tranzientní transfekce .....	32
4.2.3.	Purifikace proteinů .....	33
4.2.3.1.	Chelatační afinitní chromatografie .....	33
4.2.3.2.	Koncentrování proteinů .....	33
4.2.3.3.	Gelová permeační chromatografie .....	33
4.2.3.4.	Měření koncentrace proteinů .....	34
4.2.3.5.	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	34
4.2.4.	Deglykosylace proteinů .....	35
4.2.5.	Diferenční skenovací fluorimetrie .....	35
4.2.6.	Průtoková cytometrie .....	35
5.	Výsledky .....	37
5.1.	Příprava expresních vektorů nanoprotilátky antiHER2 .....	37
5.2.	Expresa a purifikace proteinu antiHER2 .....	39
5.2.1.	Expresa proteinu antiHER2 v buněčné linii HEK293T .....	39
5.2.2.	Expresa proteinu antiHER2 v buněčné linii HEK293S GnTI <sup>-</sup> .....	39
5.2.3.	Purifikace proteinu antiHER2 z produkce v linii HEK293T .....	39
5.2.4.	Purifikace proteinu antiHER2 z produkce v linii HEK293S GnTI <sup>-</sup> .....	42
5.2.5.	Deglykosylace antiHER2 z produkce v linii HEK293S GnTI <sup>-</sup> .....	43
5.3.	Expresa a purifikace proteinu antiHER2_N32Q .....	44
5.3.1.	Expresa proteinu antiHER2_N32Q v buněčné linii HEK293T .....	44
5.3.2.	Purifikace proteinu antiHER2_N32Q .....	44
5.4.	Expresa a purifikace proteinu antiHER2_S34A .....	45
5.4.1.	Expresa proteinu antiHER2_S34A v buněčné linii HEK293T .....	45
5.4.2.	Purifikace proteinu antiHER2_S34A .....	45
5.5.	Měření termální stability mutovaných nanoprotilátek .....	46
5.6.	Ověření vazby nanoprotilátek na povrch buněčné linie .....	47
6.	Diskuse .....	49
7.	Závěr .....	51
8.	Literatura .....	52

## 1. Seznam zkratek

AMK – aminokyselina

Amp – ampicilin

APS – peroxodisíran amonný (*ammonium persulfate*)

BCR – antigenně specifický receptor B-lymfocytů (*B-cell receptor*)

bp – páry bází (jednotka délky DNA) (*base pair*)

CD – diferenciační skupina (*cluster of differentiation*)

CDR – hypervariabilní oblast variabilní domény (*complementarity-determining region*)

CGA – rakovinné antigeny zárodečné linie (*cancer germline antigen*)

C<sub>H</sub> – konstantní doména těžkého řetězce protilátek

C<sub>L</sub> – konstantní doména lehkého řetězce protilátek

Da – Dalton (jednotka molekulové hmotnosti)

DARPin – vazebná doména odvozená od ankyrinu (*designed ankyrin repeat protein*)

dH<sub>2</sub>O – deionizovaná voda

DMSO – dimethylsulfoxid

dNTPs – směs deoxynukleotidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

Fab – fragment protilátky s vazebným místem pro antigen (*fragment antigen-binding*)

Fc – konstantní fragment protilátky (*fragment crystallizable*)

FGFR – receptor růstového faktoru fibroblastů (*fibroblast growth factor receptor*)

F<sub>v</sub> – fragment konvenční protilátky složený z V<sub>H</sub> a V<sub>L</sub> domény (*fragment variable*)

H řetězec – těžký řetězec protilátky

hcAb – protilátky tvořené pouze těžkými řetězci (*heavy chain-only antibody*)

HEK293 – linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293 (*human embryonic kidney 293 cells*)

HER2 – receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)



HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*high-performance liquid chromatography*)

kb – kilobáze (jednotka délky DNA) (*kilobase pair*)

L řetězec – lehký řetězec protilátky

IPEI – lineární polyethylenimin

mAb – monoklonální protilátka (*monoclonal antibody*)

MES – 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina

N32Q – rekombinantní antiHER2 nanoprotlátka s mutací N32Q

NK buňky – přirození zabijáci (*natural killer cells*)

PBS – fosfátem pufovaný fyziologický roztok (*phosphate buffered saline*)

PCR – polymerázová řetězová reakce (*polymerase chain reaction*)

PD-1 – povrchový buněčný receptor (*programed cell death 1*)

PD-L1 – povrchový buněčný receptor (*programed cell death ligand 1*)

S34A – rekombinantní antiHER2 nanoprotlátka s mutací S34A

scFv fragment – jednořetězový fragment variabilních domén (*single-chain fragment variable*)

sdAb – protilátky s jedinou doménou / nanoprotlátka (*single-domain antibody*)

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

SDS – dodecylsíran sodný (*sodium dodecyl sulfate*)

TAA – antigeny asociované s nádory (*tumor associated antigen*)

TEMED – tetramethylethylendiamin

TSA – antigeny specifické pro nádory (*tumor specific antigen*)

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

V<sub>H</sub> – variabilní doména těžkého řetězce konvenčních protilátek

V<sub>HH</sub> – variabilní doména protilátek čeledi velbloudovitých

V<sub>L</sub> – variabilní doména lehkého řetězce konvenční protilátky

V<sub>NAR</sub> – variabilní doména protilátek žraloků

(v/v) – objem/objem (*volume/volume*)

(w/v) – hmotnost/objem (*weight/volume*)

(w/w) – hmotnost/hmotnost (*weight/weight*)

## 2. Teoretický úvod

### 2.1. Protilátky

Studium protilátek začalo v roce 1890, kdy Emil von Behring a Shibasaburo Kitasato objevili, že látky v krevním séru zvířat imunních vůči tetanu nebo záškrtu měly specifickou „antitoxickou“ aktivitu a dokázaly neutralizovat toxiny produkované bakteriemi, kterými byly imunizovány [1–3]. Jejich objev přispěl ke vzniku imunologie, jak jí známe dnes.

#### 2.1.1. Role protilátek

Antigeně specifickou (adaptivní) část imunitního systému lze rozdělit na část humorální a buněčnou [1,4]. Do buněčné části specifické imunity spadají T-lymfocyty. T-lymfocyty jsou aktivovány po setkání s antigenem, kdy dojde k jejich proliferaci a diferenciaci na jeden z funkčních typů efektorových T-lymfocytů – cytotoxické, pomocné anebo regulační T-lymfocyty. Cytotoxické T-lymfocyty ničí buňky napadené virem nebo jinými intracelulárními patogeny. Pomocné T-lymfocyty poskytují nezbytné signály, které aktivují antigenem stimulované B-lymfocyty, aby u B-lymfocytů došlo k diferenciaci a produkci protilátek. Některé z těchto T-lymfocytů mohou také aktivovat makrofágy. Regulační T-lymfocyty potlačují aktivitu ostatních lymfocytů a pomáhají tak kontrolovat odpověď imunitního systému.

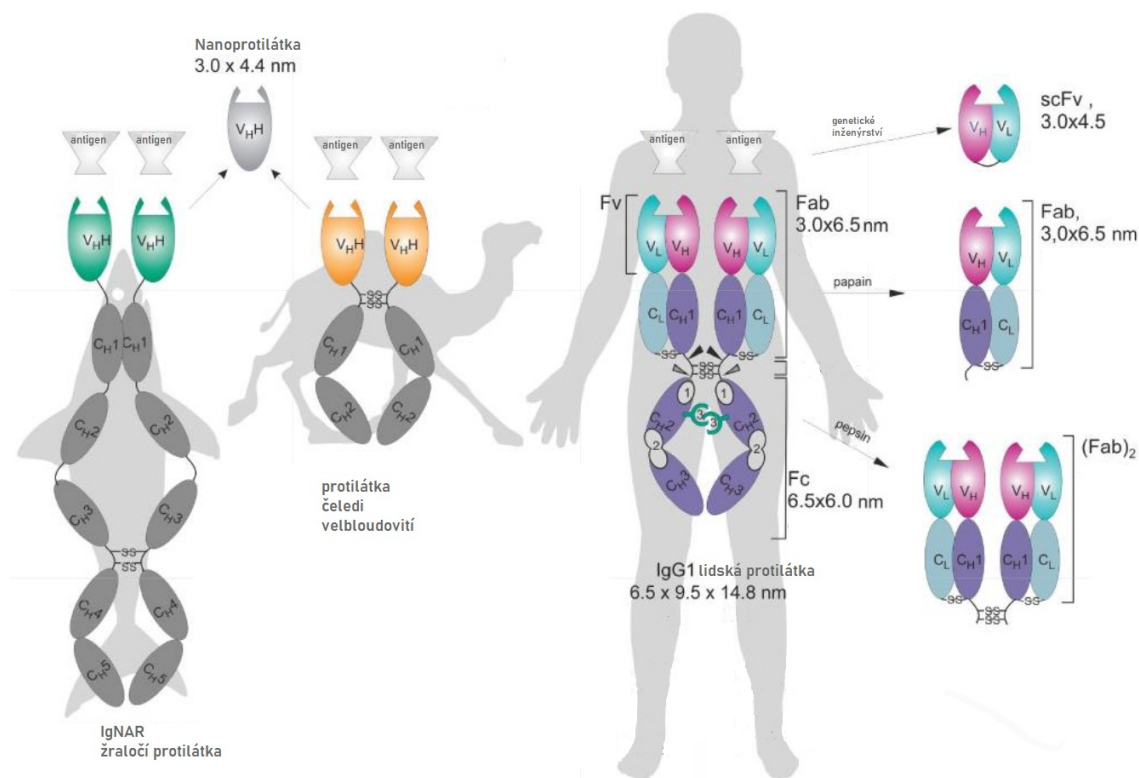
Součástí humorální antigeně specifické (adaptivní) části imunitního systému jsou protilátky, jejichž produkce je však úzce spojena s částí nespecifickou [1,4]. Aby došlo ke specifické imunitní odpovědi a produkci protilátek, musí být antigen rozpoznán pomocí antigeně specifického receptoru B-lymfocytů (BCR). Za vhodných podmínek se stimulované B-lymfocyty pomnoží a vznikne mnoho dceřiných klonů s podobnou či identickou specifitou vůči antigenu, které se následně diferencují na plazmatické buňky (plazmocyty). Plazmatické buňky produkují ve velkém množství protilátky, které mají stejnou strukturu jako BCR. Funkcí protilátek v imunitním systému je opsonizace (vazbou na antigen usnadňují fagocytózu makrofágy), aktivace cytotoxických buněk, aktivace komplementu nebo neutralizace toxinů.

Protilátky jsou vysoce specifické pro své odpovídající antigeny a vytváří s nimi stabilní vazbu, čehož využívá mnoho molekulárních, diagnostických a zobrazovacích metod [5]. RIA (radioimmunoassay), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), Coombův test, tzv. phage display (viz kapitola 2.1.3, str. 12), imunofluorescenční mikroskopie nebo Western blot (imunoblot) jsou pouze některé z nich.

Protilátky se uplatňují nejen v diagnostických, zobrazovacích a molekulárních metodách, ale mají i terapeutické využití. Monoklonální protilátky (mAb) se běžně používají pro léčbu rakoviny a autoimunitních, infekčních nebo kardiovaskulárních onemocnění [6]. Obzvláště efektivní se ukázaly být při léčbě rakoviny, a to jak maligních, tak benigních nádorů [7]. V posledních letech jsou mAb jedny z nejprodávanějších biofarmaceutik. V roce 2017 tvořily 65,6 % všech prodaných biofarmaceutik na trhu a očekává se, že v budoucnosti toto číslo ještě poroste [8].

## 2.1.2. Struktura protilátek

Molekuly lidských protilátek se skládají z dvou těžkých (H) řetězců a dvou lehkých (L) řetězců [1,9]. Dva H řetězce jsou k sobě vázány disulfidickými (cystinovými) můstky a ke každému z H řetězců je připojen cystinovým můstkem jeden L řetězec. H řetězce tvoří čtyři imunoglobulinové domény (u některých typů imunoglobulinů pět), každá doména je tvořena sekvencí 110 - 120 aminokyselin a domény jsou navzájem propojeny krátkými úseky polypeptidového řetězce. Přibližná molekulová hmotnost každého z H řetězců je 50 - 75 kDa v závislosti na typu řetězce. L řetězce se skládají ze dvou imunoglobulinových domén a přibližná molekulová hmotnost řetězce je 25 kDa, také v závislosti na jeho typu. H i L řetězce mají na svých N-koncích variabilní domény ( $V_H$  a  $V_L$  domény), které tvoří vazebné místo pro antigen. Struktura variabilních domén se individuálně liší dle toho, jakým klonem B lymfocytu byly produkovány a díky tomu se liší i jejich specifita vůči antigenu. Ostatní domény tvořící řetězce jsou konstantní ( $C_{H1}$  -  $C_{H3}$ , popř.  $C_{H4}$  a  $C_L$  domény) a jejich struktura je totožná se strukturou u všech protilátek s řetězci téhož typu. Indexy L a H bývají nahrazovány symboly označující konkrétní typy řetězců. U lidských protilátek existují dva typy L řetězců,  $\kappa$  a  $\lambda$ , které se



**Obrázek 1: Složení lidských IgG protilátek, velbloudích protilátek, žraločích IgNAR protilátek a jejich fragmentů.** Lidská IgG protilátka se skládá z dvou L a dvou H řetězců. Její fragmenty lze získat štěpením papainem – vznikne Fc a dva Fab fragmenty, nebo pepsinem – vznikne Fc a  $(Fab)_2$  fragment. Dalším štěpením Fab fragmentu můžeme získat Fv fragment tvořený  $V_H$  a  $V_L$  doménou. Tento fragment lze modifikovat a  $V_H$  a  $V_L$  domény spojit krátkou peptidovou spojkou za vzniku scFv. Dále jsou na obrázku znázorněny velbloudí a žraločí protilátky, které ve své struktuře postrádají L řetězce. Jejich štěpením lze získat  $V_HH$  doménu. Převzato a upraveno z [59].

liší primární strukturou  $C_L$  domén a které jsou kódovány odlišnými geny. U H řetězců existují řetězce  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , a  $\epsilon$ , které jsou kódovány na úseku jednoho chromozomu. Řetězce  $\alpha$  a  $\gamma$  mají tři  $C_H$  domény a řetězce  $\mu$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$  mají  $C_H$  domény čtyři. Dle druhu konstantních H řetězců se rozlišuje pět izotopů lidských imunoglobulinů – IgA, IgG, IgM, IgD a IgE.

Molekulu lze v pantové (hinge) oblasti proteolyticky rozštěpit použitím enzymu papainu na tři fragmenty – dva identické Fab fragmenty, které obsahují vazebné místo pro antigen a jeden Fc fragment, který se u opsonizujících protilátek váže na Fc receptory fagocytů [1,9]. Použitím pepsinu lze protilátku rozštěpit na dva fragmenty – bivalentní (Fab)<sub>2</sub> fragment a Fc fragment. Dalším štěpením Fab fragmentu lze získat Fv fragment, který se skládá pouze z variabilních N-koncových domén obou řetězců.

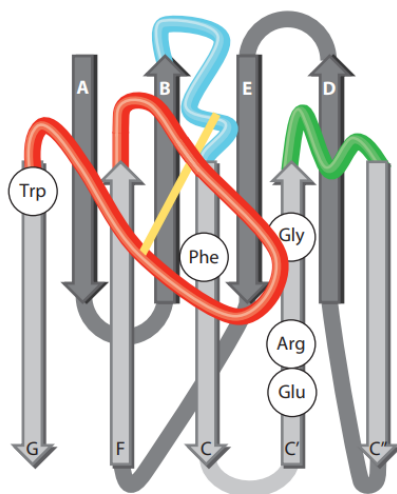
Kromě imunoglobulinů skládajících se z dvou H a L řetězců se vyskytují i jiné variace protilátek. Variabilní domény L a H řetězce mohou být spojeny krátkou peptidovou spojkou, vznikne tak jedno-řetězcový fragment scFv, který je schopen vázat antigen [10]. Molekulová hmotnost scFv se pohybuje okolo 30 kDa a správnou orientaci vazebného místa pro antigen zajišťují hydrofobní interakce mezi doménami.

Struktura protilátek se mezi jednotlivými živočišnými druhy liší (viz Obr. 1, str. 11). Speciální strukturu mají protilátky, které byly roku 1989 objeveny v krevním séru velblouda jednohrbého (*Camelus dromedarius*). Po dalším výzkumu se ukázalo, že se nacházejí u všech živočichů z čeledi velbloudovitých [11,12]. Tyto protilátky ve své struktuře postrádají L řetězce a jsou tvořeny pouze dvěma H řetězci, které jsou tvořeny 3 doménami, proto jsou označovány jako hcAb (*heavy chain-only antibody*). Řetězec hcAb je tvořen variabilní doménou  $V_{HH}$  a dvěma konstantními doménami  $C_{H2}$  a  $C_{H3}$  (doména  $C_{H1}$  chybí) a  $V_{HH}$  doména je přímo spojena s pantovou oblastí a Fc fragmentem [13]. Molekulová hmotnost hcAb je okolo 75 kDa [10]. Z hcAb lze získat samostatné  $V_{HH}$  domény, která mají širokou škálu využití (viz. kapitola 2.1.3). Kromě čeledi velbloudovitých se podobný druh protilátek postrádající L řetězce (IgNAR) vyskytuje i u jiných živočichů, jako jsou některé paryby, např. žralok nebo rejnok [14].

### 2.1.3. Nanoprotilátky

Rekombinantní antigen-specifické  $V_{HH}$  odvozené z hcAb jsou známy jako protilátky s jedinou doménou (sdAb) nebo jako nanoprotilátky, jednak díky jejich malé velikosti (cca  $2,5 \times 4$  nm), ale i proto, že představují nejmenší možnou formu protilátek [15,16].

Nanoprotilátky mají oproti ostatním druhům protilátek několik výhod. Jedna z nich je malá velikost. Velikost konvenčních mAb tvořených čtyřmi řetězci (okolo 150 kDa) může znemožnit přístup k nádorové buňce, což u nanoprotilátek nehrozí – jejich molekulová hmotnost se pohybuje okolo 15 kDa. Dalším problémem je nekovalentní asociace variabilních domén u mAb, tvořící vazebné místo pro antigen. Hydrofobně asociované  $V_H$  a  $V_L$  domény lze snadno disociovat a domény následně mohou interagovat s jinými hydrofobními povrchy [10]. To je problém při praktických aplikacích scFv fragmentů a překážkou při vývoji bispecifických biofarmaceutik. Ovšem stabilita není dána strukturou scFv fragmentu jako celku, ale jednou určitou sekvencí, kterou lze modifikovat a stabilitu fragmentu tak zlepšit [17]. Naopak struktura  $V_{HH}$  domény má zčásti hydrofilní charakter, což ji dělá stabilnější a rozpustnější [10].



**Obrázek 2: Schéma  $V_{HH}$  domény.** Doména se skládá ze dvou  $\beta$ -skládaných listů, jeden list obsahuje 5 vláken (světle šedá) a druhý list obsahuje 4 vlákna (tmavě šedá). Vlákna jsou na N-koncové straně domény spojena třemi hypervariabilními smyčkami – H1 (modrá), H2 (zelená), H3 (červená). H1 a H3 smyčky jsou spojeny disulfidickým můstkem (žlutá). Převzato z [15].

Strukturně jsou  $V_H$  domény a  $V_{HH}$  domény velmi podobné, ale v několika oblastech se liší. Obě variabilní domény jsou tvořeny dvěma  $\beta$ -skládanými listy, s tím, že jeden list je tvořený 4 vlákny a druhý list je tvořený 5 vlákny [10,15,16]. Na N-koncové straně domény jsou vlákna spojena třemi hypervariabilními smyčkami, které vytvářejí vazebné místo (CDR, *complementarity-determining region*). Ale u  $V_{HH}$  domén jsou CDR1 a hlavně CDR3 smyčky výrazně delší než u  $V_H$  domén. Předpokládá se, že prodloužením CDR1 a CDR3 smyček u  $V_{HH}$  domén se kompenzuje nepřítomnost tří dalších CDR domén, které mají konvenční protilátky navíc v rámci  $V_L$  domén, a zajišťují tak dostatečnou diverzitu a specifitu  $V_{HH}$  domény, a tudíž i hcAb. Navíc CDR3 smyčka u  $V_{HH}$  domén často vytváří strukturu podobnou prstu (viz Obr. 2), která umožňuje nanoprotilátce vázat epitopy, které konvenční mAb vázat nemohou, jelikož mají povrch vazebného místa pro antigen obecně spíše plochý [18].

Jedna z technik používaných pro produkci nanoprotilátek nebo variabilních domén obecně je tzv. **phage display** [5]. Genový segment kódující variabilní doménu protilátky je sloučen s genovým segmentem kódujícím obalové proteiny bakteriofága. Bakteriofág s takto sloučenými genovými segmenty infikuje bakterii a následně produkované bakteriofágy mají na svém obalu fúzní proteiny, které zvnějšku vystavují vybranou antigenně specifickou doménu. Knihovna rekombinantních bakteriofágů, kde každý vystavuje jinou antigenně specifickou doménu (*phage display library*) může obsahovat až  $10^{10}$  různých variant rekombinantních bakteriofágů [19]. Bakteriofág s antigen vázající doménou specifickou pro určitý antigen může být izolován podobně jako u afinitní chromatografie. Následně mohou být geny kódující specifickou antigen vázající doménu extrahovány z DNA bakteriofága a použity pro expresi nanoprotilátky. Běžně používanými bakteriofágy jsou vláknité bakteriofágy M13, fd a f1 nebo také T4, T7 či lambda bakteriofágy [19,20]. Stejným způsobem jakým sbírka bakteriofágů vystavuje antigen vázající doménu může být bakteriofág modifikován, aby vystavoval

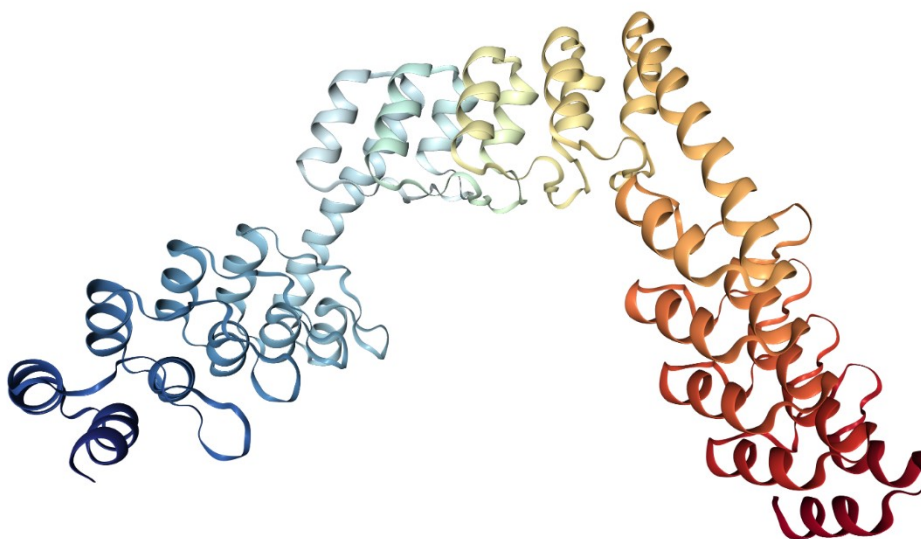
antigeny (*antigen display library*). V případě nanoprotilátek lze genetickou informaci kódující variabilní domény získat z bílých krvinek neimunizovaného zvířete, což je šetrnější než v případě klasické produkce protilátek [21].

#### 2.1.4. Alternativy protilátek

Vzhledem k tomu, že terapeutické protilátky občas vykazují i nežádoucí vlastnosti jako agregaci, nestabilní disulfidické můstky, malé výtěžky při expresi (která je obecně velmi nákladná), byla vyvinuta řada jejich analogů, s cílem dosáhnout výrazně nižších nákladů na přípravu a přitom zachovat stejně vysokou míru specifity, jakou mají protilátky. Alternativami, kterými se v biomedicinském výzkumu protilátky nahrazují, jsou například tzv. Affibodies, Adnectins, ADAPTs (*albumin-binding domain-derived affinity proteins*), i-Bodies, DARPins nebo Avimers [22].

Jednou z alternativ jsou i-Bodies, což jsou lidským protilátkám podobné konstrukty o jedné doméně s molekulovou hmotností okolo 12 kDa [23,24]. Bylo pozorováno, že variabilní domény u žraločích protilátek ( $V_{\text{NAR}}$ ) jsou strukturně podobné imunoglobulinovým (Ig) doménám některých lidských proteinů. Z těchto Ig domén se následně podařilo vytvořit lidský ekvivalent  $V_{\text{NAR}}$  neboli i-Body. i-Body je vytvořené z lidského proteinu (konkrétně např. z Ig domény lidské neuronové adhezivní molekuly 1 (NCAM)) na který jsou připojeny dvě smyčky vázající antigen. Stejně jako u žraloka je jedna z vazebných smyček velmi dlouhá a umožňuje tak i-Body přístup do žlábků a dutin, kam se konvenční mAb a dalších protilátky nedostanou. Knihovna i-Body konstruktů může obsahovat až  $2 \cdot 10^{10}$  variant těchto řetězců.

DARPins (*designed ankyrin repeat proteins*) jsou malé modifikované proteiny schopné rozpoznat a vázat cílové molekuly se stejnou nebo i vyšší specifitou jako protilátky (viz Obr. 3) [25]. Jsou odvozeny od struktury proteinu ankyrinu, který v buňkách zprostředkovává hlavně spojení mezi integrálními membránovými proteiny a spektrin-aktinovým cytoskeletem [26]. Primární struktura ankyrinu sestává z 24



Obrázek 3: Krystalová struktura varianty DARPIn s rigidní strukturou. PDB kód struktury 5LE2 [27].

homologních modulů a každý modul sestává z 33 AMK. Sekundární struktura jednotlivých modulů je následující –  $\beta$ -otočka následovaná dvěma anti-paralelními  $\alpha$ -helixy zakončená smyčkou, která celý modul spojuje s dalším [28]. Spojené moduly tvoří mírně zakřivenou konkávní strukturu. DARPins jsou termodynamicky velmi stabilní, a to díky pravidelné struktuře opakujících se úseků a síti vodíkových můstků [29], jsou dobře rozpustné a neagregují. Uplatňují se ve výzkumu a mají diagnostické i terapeutické využití – v imunoterapii se používají při léčbě rakoviny a ve výzkumu se používají jako intracelulární sensory konformace proteinů v reálném čase nebo jako krystalizační chaperony [25]. Co se diagnostiky týče, mají využití v imunohistochemii, například při testování míry exprese HER2 receptoru na povrchu buněk [30].

## **2.2. Rakovinné markery**

Nádorové buňky se od normálních buněk, ze kterých vznikly, liší a díky tomu by měly být rozpoznány imunitním systémem a eliminovány [31]. Vyznačují se rakovinnými markery, což jsou látky v nádorových buňkách nebo látky nádorovými buňkami produkované, popřípadě látky přítomné v ostatních buňkách těla jako odpověď na maligní proces v organismu. Tradičně to bývají proteiny nebo jiné látky nacházející se v tělních tekutinách, ale postupně se jako rakovinné markery začínají používat i genomové markery, jako jsou například mutace onkogenů.

### **2.2.1. Změny povrchových znaků na rakovinných buňkách**

Změny povrchových znaků spojených s maligními procesy mohou ovlivnit jak rozvoj nádorového onemocnění, tak i reakci organismu [32]. U proteinů a sacharidů, které se chovají jako enzymy a povrchové receptory buňky, může docházet k několika změnám. U rakovinných buněk může dojít ke zvýšení nebo naopak snížení výskytu určitých povrchových receptorů a tím ke změně citlivosti buňky vůči regulačním mechanismům organismu. Dále může dojít ke změně struktury proteinů nebo povrchových receptorů, které poté nejsou schopné reagovat s odpovídajícími ligandy. Na povrchu buňky se také mohou objevit molekuly, které jsou indukované buněčným stresem, nebo které jsou přítomny pouze v embryonální tkáni a na dospělých buňkách se běžně nevyskytují.

Abnormální povrchové molekuly na rakovinných buňkách se mohou chovat jako antigeny a být rozpoznány mechanismy humorálního a buněčného imunitního systému [32]. Rakovinné buňky jsou poté pokryté imunokomplexy, které umožňují rozpoznání a eliminaci buňky pomocí komplementu a fagocytózou. Rakovinné buňky na povrchu vystavují především diferenciační antigeny, které zajišťují normální vývoj rakovinné buňky a antigeny specifické pro nádor, které se objevují při onkogenní transformaci změnou genetického programu buňky. Také distribuce receptorů na povrchu maligních buněk je rozdílná, což mění jejich aglutinaci. Na povrchu buněk jsou specifické povrchové proteázy, které jsou zodpovědné za aglutinační kapacitu buněk působením lektinů. Ztrátou kontaktní inhibice rakovinné buňky získají metabolickou autonomii, což podporuje jejich proliferaci a pohyb.

Povrchové nádorové antigeny se dělí do tří kategorií – antigeny specifické pro nádory (TSA), antigeny asociované s nádory (TAA) a rakovinné antigeny zárodečné linie (CGA) [33,34]. Mezi TSA patří proteiny, které se na normálních buňkách nevyskytují. Jedněmi z nich jsou komplexy MHC glykoproteinů I. třídy, jejichž funkcí je prezentace antigenu cytotoxickým T-buňkám, s abnormálními fragmenty buněčných proteinů. Tyto TSA jsou typické pro chemicky indukované nádory a pro některé leukemie asociované s chromozomálními translokacemi, které produkují specifický abnormální protein. Mezi TSA dále spadají komplexy MHC glykoproteinů s fragmenty proteinů onkogenních virů, které jsou typické u nádorů vyvolaných viry, jako je polyomavirus SV40 nebo virus EBV. Další TSA jsou abnormální formy glykoproteinů. Glykosylace povrchových proteinů mnohých rakovinných buněk je odlišná od glykosylace buněk normálních, a to zejména u sialylace (připojování molekul kyseliny sialové na konce oligosacharidových řetězců). Idiotypy u myelomů a lymfomů také patří mezi TSA a jsou to druhy rakovinných buněk odvozených od B, respektive T-lymfocytů, které mají na povrchu klonálně specifické BCR, respektive TCR receptory. Vazebná místa receptorů jsou unikátními antigenními strukturami.

TAA nejsou specifické pro rakovinné buňky, ale nacházejí se i na normálních buňkách [34]. Odlišnost u rakovinných buněk spočívá v míře exprese či v abnormální místní nebo časové expresi a využívají se jako pomocné diagnostické markery. Mezi nejznámější TAA patří melanomové antigeny (např. MAGE-1, Melan-A), které jsou silně exprimovány na melanomových buňkách a v menším množství na normálních melanocytech a dalších buňkách. TAA jsou také onkofetální antigeny, které jsou normálně přítomny u embryonálních buněk, ale v postnatálním období mizí. Mezi tyto antigeny patří  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), který je produkován hepatomy, a karcinoembryonální antigen (CEA) produkován buňkami karcinomu tlustého střeva. Mezi TAA také spadá prostatický specifický antigen (PSA), který je používán pro screening a monitorování léčby karcinomu prostaty. Dále mezi TAA spadá například receptor HER2/neu (viz kapitola 2.2.3, str. 17), adhezivní molekuly epiteliálních buněk EpCAM nebo diferenciační antigeny leukemických buněk.

CGA, známé také jako tzv. cancer-testis (CT) antigeny, jsou třída imunogenních nádorových antigenů, které jsou kódované geny exprimovanými v gametogenních buňkách varlat nebo vaječníků a při rakovině [33,35]. Hlavní kritérium pro klasifikaci genu jako CGA souvisí s mírou exprese v gametogenních, somatických a nádorových tkáních. CGA jsou v normálních tkáních těla naprosto tiché, výjimkou jsou mužské zárodečné buňky, popřípadě placenta [36]. Při maligním procesu jsou exprimovány v buňkách různého původu, kde mohou být rozeznány cytotoxickými T-lymfocyty.

### 2.2.2. Markery využívané pro cílenou terapii

S příchodem mAb a jejich analogů se objevila možnost cílení a eliminace nádorů pomocí protilátek. Tato metoda závisí na nalezení vhodného antigenu na povrchu rakovinné buňky. V této kapitole jsou uvedeny některé markery běžně využívané pro terapeutické cílení.

Jedním takovým markerem je CD20 (*cluster of differentiation 20*) – neglykosylovaný membránový fosfoprotein o velikosti 33-37 kDa na povrchu



B-lymfocytů, který hraje roli v jejich vývoji a diferenciaci [37]. CD20 je exprimován na povrchu nezralých B-lymfocytů a zůstává na nich až do konečné diferenciaci na plazmocyty. Tato selektivní exprese na zralých B-lymfocytech a nepřítomnost CD20 na protilátky sekretujících plazmocytech a prekurzorech B-lymfocytů, jako jsou např. kmenové buňky, z něj dělají atraktivní cíl pro terapeutickou léčbu rakoviny. Redukce B-lymfocytů cílením CD20 antigenu pomocí terapeutických protilátek se ukázala být účinnou léčbou pro různé druhy rakoviny a autoimunitních onemocnění [38]. V klinické praxi existuje několik terapeutických protilátek cílících tento antigen, příkladem jsou například ofatumumab [39] nebo rituximab (viz kapitola 2.3.2, str. 19).

Dalším markerem jsou FGFRs. Existuje pět receptorů růstového faktoru fibroblastů neboli FGFR, z nichž receptory FGFR1-4 jsou strukturně příbuzné tyrosinkinázové receptory [40]. FGF receptory jsou součástí mnohých biologických procesů, jako je buněčný růst, migrace, diferenciaci, apoptóza a přežití buňky. Nadměrná exprese růstových faktorů fibroblastů a jejich receptorů byla pozorována v mnoha nádorech. FGFR a několik jejich ligandů také hrají roli v progresi rakoviny pomocí angiogeneze, změn morfologie buňky, pohyblivosti a proliferace buněk. Byly popsány různé mechanismy onkogenní signalizace FGF receptorů v nemalobuněčném karcinomu plic [41], např. lokální amplifikace FGFR1 byla nalezena ve 22 % spinocelulárních nemalobuněčných karcinomů plic, a mutace v FGFR2 a FGFR3 byly popsány až u 6 % skvamózních nemalobuněčných karcinomů plic. Kromě karcinomu plic se amplifikace genu FGFR1 vyskytuje také u karcinomu prsu pozitivního na estrogenový receptor. Amplifikace FGFR2 se vyskytuje u karcinomu žaludku difúzního typu a u trojitě negativního karcinomu prsu [42].

Dalším významným markerem používaným pro terapeutické cílení je receptor HER2, o kterém pojednává následující kapitola 2.2.3.

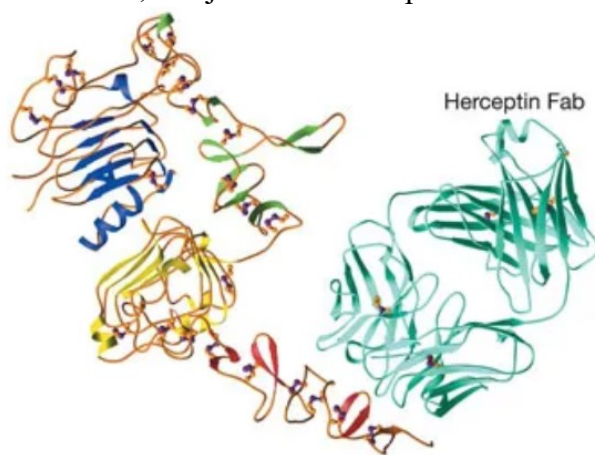
### 2.2.3. HER2 receptor

HER2 receptor neboli receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2, patří do rodiny epidermálních růstových faktorů (EGF) spolu s dalšími třemi receptory – HER1, HER3 a HER4 [43]. Receptor je znám také pod jmény ErbB2, HER2/neu nebo CD340. HER2 receptor je kódován genem *HER2* nacházejícím se na 17. chromozomu [44] a spolu s ostatními receptory z EGF rodiny patří mezi tyrosinkinázové receptory. HER2 je transmembránový glykoprotein složený z 1255 AMK o molekulové hmotnosti 185 kDa [45]. Strukturu má stejnou jako ostatní protein-tyrosinkinázové receptory. Skládá se z extracelulárního vazebného místa pro ligand bohatého na cystein, lipofilní transmembránové části, intracelulární domény s tyrosinkinázovou katalytickou aktivitou a řady cytoplazmatických tyrosinových zbytků, které slouží jako místa pro fosforylaci [46,47]. Extracelulární část HER2 receptoru se dále dělí na čtyři funkční domény (I, II, III, IV; viz Obr. 4, str. 18). Doména IV se nachází blízko transmembránové části receptoru a stabilizuje protein-proteinovou interakci mezi HER2 receptorem a jeho dimerizačním partnerem (viz níže) [47]. Vazba růstového faktoru na receptor reguluje buněčný růst, proliferaci a diferenciaci prostřednictvím tyrosinkináz [48].

HER receptory existují jako monomery, ale při vázání ligandu tvoří dimery. Může docházet k vazbě na receptor stejného druhu a tvorbě homodimeru (např. dimer

HER1-HER1) nebo s jiným receptorem a vytvoří se heterodimer (např. dimer HER2-HER3) [45]. HER2 je koreceptorem mnoha ligandů a tvoří heterodimery se všemi třemi receptory z EGF rodiny, ale není žádný známý ligand, který by podporoval vznik homodimeru HER2-HER2. Z toho lze vyvodit, že neexistuje ligand, který by se přímo vázal na HER2 receptor. Ale, na rozdíl od ostatních HER receptorů, HER2 receptor může zaujmout stálou konformaci podobající se ligand-aktivovanému stavu a může tak dojít k homodimerizaci bez přítomnosti ligandu [49]. K homodimerizaci HER2 receptoru také dochází při jeho zvýšené expresi nebo mutaci [43].

HER2 receptor hraje důležitou roli v buněčném růstu a diferenciaci, ale jeho zvýšená exprese je spojena s různými druhy rakoviny, například s karcinomem žaludku (u přibližně 22 % případů [50]), plic, vaječníků, slinné žlázy a především s karcinomem prsu (u přibližně 20-30 % případů [51]). U pacientů s karcinomem prsu, ale i u většiny dalších druhů rakoviny, je zvýšená exprese HER2 receptoru spojena s agresivními nádory a obecně špatnou prognózou, což také dělá receptor atraktivním cílem pro terapii – exprese HER2 je v rakovinných buňkách mnohem vyšší než ve zdravých, což snižuje citlivost zdravých buněk vůči terapeutickým protilátkám cílící HER2 receptor. Navíc k zvýšené expresi HER2 receptorů nedochází pouze na primárním nádoru, ale i na jeho metastázách [52]. Terapie pomocí humanizovaných mAb cílících HER2 u HER2<sup>+</sup> karcinomů se obzvláště v kombinaci s chemoterapií a dalšími standardními metodami léčby rakoviny ukázala být velmi efektivní. Běžně používané mAbs cílící HER2 jsou pertuzumab a trastuzumab (viz kapitola 2.3.2, str. 19) [53], zpravidla v kombinaci s léčivem lapatinib, což je inhibitor tyrosinkinázové aktivity HER2/neu. Nevýhodou těchto léčiv je vznik rezistence, což je momentálně předmětem dalšího výzkumu.



*Obrázek 4: Struktura extracelulární části lidského HER2 receptoru s Fab fragmentem protilátky trastuzumab (Herceptin). Extracelulární část HER2 se skládá ze čtyř domén – doména I (modrá), II (zelená), III (žlutá), a IV (červená). Převzato a upraveno z [49].*

## 2.3. Imunoterapie

### 2.3.1. Obecné principy

Rakovina je celosvětově jedna z nejčastějších příčin úmrtí a je způsobena nekontrolovatelnou proliferací dceřiných buněk jediné maligně transformované buňky.

Účinná léčba vyžaduje eliminaci všech maligních buněk a zajištění přežití pacienta. Ideálním řešením by bylo vyvolat v organismu imunitní odpověď, která by rozlišovala mezi rakovinnými a zdravými buňkami. Právě tímto se zabývá imunoterapie.

V roce 2018 obdrželi James P. Allison a Tasuku Honjo Nobelovu cenu za objev léčby rakoviny pomocí inhibice negativní imunitní regulace [54]. Oba pracovali na způsobu, jak aktivovat vrozenou schopnost imunitního systému napadnout nádorové buňky a zasloužili se tak o vznik nového terapeutického principu v boji proti rakovině.

Imunoterapie zahrnuje několik metod: a) použití mAb, b) inhibici kontrolních bodů T-lymfocytů, což jsou regulátory, které zabraňují útoků T-lymfocytů na normální buňky, c) imunitní modulátory, které posilují imunitní systém, d) vakcíny, které cílí nádorové buňky [55]. Imunoterapie nepokročila pouze v medicíně, ale také ve veterinárním lékařství.

Asi nejvíce rozšířené jsou v imunoterapii humanizované mAbs cílicí nádorové antigeny [34]. V klinické praxi jsou dnes běžně používané pro léčbu rakoviny, například trastuzumab cílicí HER2, ocrelizumab a rituximab cílicí CD20, nebo avelumab a curvalumab cílicí PD-L1 [56]. Kromě konvenčních protilátek existují i jejich konjugáty s účinnými toxiny (imunotoxiny), či s radioizotopy (radioimunoterapie). Samotné mAbs vyvolávají vazbou na antigen apoptózu rakovinných buněk, nebo opsonizací aktivují obranné mechanismy imunity. Protilátka může být použita jako nosič a zanést toxin do místa nádoru, kde se naváže na antigen a způsobí nekrózu buňky. Protilátka také může nést molekulu přitahující pozornost imunitního systému proti nádorovým buňkám. Nevýhodou tohoto přístupu je možnost poškození zdravých buněk (většina terapeutických protilátek cílí TAA) nebo imunoselektce rezistentních rakovinných buněk.

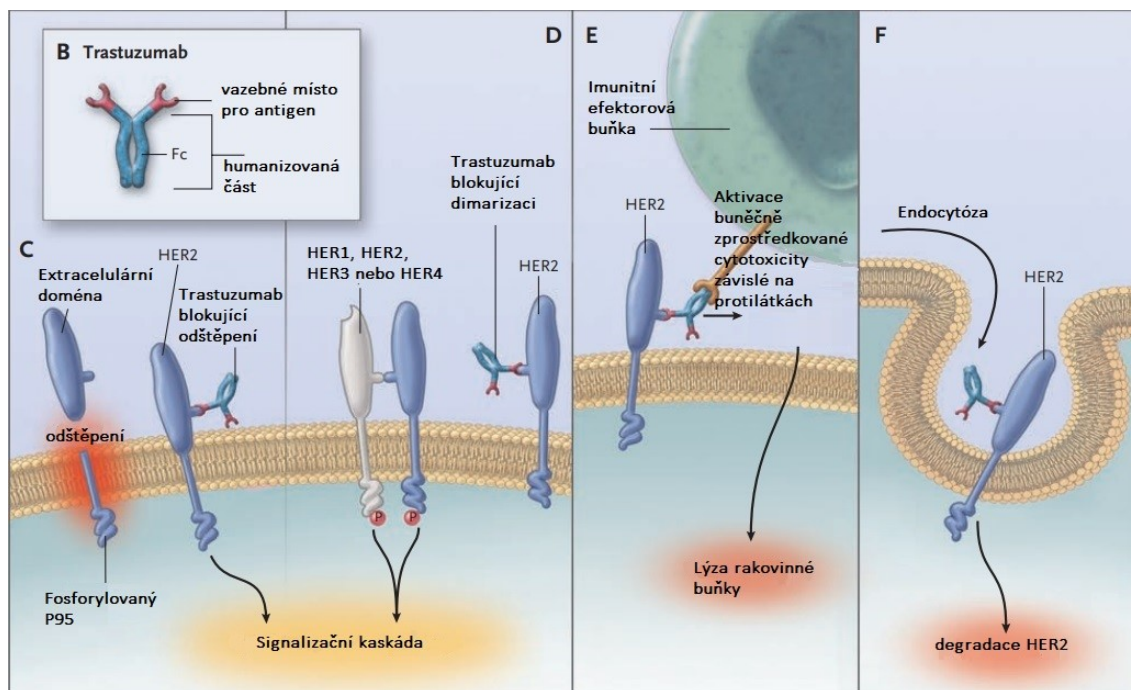
Kromě přirozených protilátek se v imunoterapii používají také uměle konstruované molekuly, například bispecifické částice (viz kapitola 2.3.3, str. 21) nebo alternativy protilátek (viz kapitola 2.1.4, str. 14).

### **2.3.2. Terapeutické protilátky**

Terapeutické protilátky jsou používány k léčbě rakoviny, autoimunitních, kardio-vaskulárních a zánětlivých onemocnění. Dále jsou uvedeny některé vybrané příklady.

Trastuzumab, prodáváný pod jménem Herceptin, je první schválená registrovaná látka pro léčbu pacientů s HER2<sup>+</sup> karcinomem prsu [52]. Je to humanizovaná mAb typu IgG1, která se váže na extracelulární část HER2 receptoru a zamezuje tak aktivaci intracelulární tyrosinkinázy. Je několik možných mechanismů, jak trastuzumab snižuje signalizaci HER2 receptoru (viz Obr. 5, str. 20) [57]. Trastuzumab může snížit signalizaci inhibicí heterodimerizace HER2 receptoru (popřípadě homodimerizaci) nebo může přitáhnout Fc-kompetentní efektorové buňky a cytotoxické buňky antigeně specifického imunitního systému, což vede k eliminaci rakovinné buňky. Trastuzumab se také může vázat k extracelulární části HER2 receptoru a zamezit tak ztrátě této části. Tím se sníží množství fosforylovaného P95, které po odštěpení extracelulární části HER2 vzniká a je zodpovědné za aktivaci signalizační kaskády v buňce. Dále může docházet k zvýšení endocytózy zprostředkované HER2 receptorem a jeho následné

degradaci v buňce. Při samostatném použití trastuzumab se u pacientů může vzácně objevit nevolnost, zvracení či myelosuprese [57]. U méně jak 10 % pacientů byla pozorována akutní, hypersenzitivitě podobná reakce, kterou ale lze potlačit antihistaminiky, kortikosteroidy nebo protizánětlivými léky. V raných stádiích používání trastuzumab byly zaznamenány ojedinělé případy srdečního selhání.



**Obrázek 5: Mechanismy inhibice signalizace HER2 receptoru pomocí trastuzumab.** Panel B – struktura terapeutické mAb trastuzumab. Panel C – inhibice odštěpení extracelulární domény. Panel D – inhibice hetero- nebo homodimerizace HER2 receptoru. Panel E – aktivace imunitní odpovědi organismu. Panel F – eliminace HER2 receptoru endocytózou. Převzato a upraveno z [57].

PD-1 receptor (*programed cell death 1* nebo také CD279) a jeho ligand PD-L1 (*programed cell death ligand 1* nebo také CD274 či B7-H1) hrají klíčovou roli ve schopnosti rakovinných buněk vyhýbat se imunitnímu systému, interakce těchto dvou receptorů utlumuje imunitní odpověď [58]. Zablokováním interakce mezi PD-1 a PD-L1 nedojde k inhibici cytotoxických lymfocytů a imunitní protinádorová odpověď se může rozvinout. To dělá receptory přitažlivým cílem pro imunoterapii. Nivolumab je terapeutická protilátka cílící PD-1 a používá se pro léčbu metastatického melanomu [56]. Atezolizumab, avelumab a curvalumab jsou terapeutické protilátky cílící PD-L1. Atezolizumab a curvalumab se používají pro léčbu uroteliálního karcinomu a avelumab se používá pro léčbu metastatického karcinomu z Merkelových buněk.

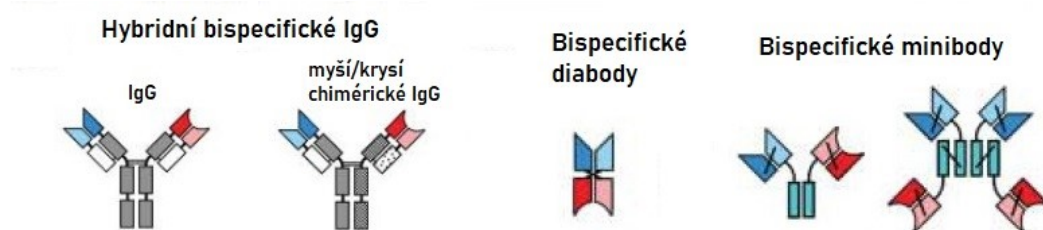
Dalším příkladem terapeutických protilátek je rituximab. Rituximab se stal v roce 1998 první schválenou monoklonální protilátkou cílící antigen CD20 [38]. Rituximab je mAb, která spouští apoptózu buňky vazbou na CD20 na B-lymfocytech. Výborné výsledky ukázal při léčbě non-Hodgkin lymfomů B-lymfocytů.

### 2.3.3. Bispecifické částice

Bispecifické částice jsou rekombinantní proteiny schopné vázat dva různé antigeny. První takovéto částice byly vytvořeny sloučením dvou hybridomových buněčných kultur [59]. Výsledná quadroma linie produkuje směs bispecifických a konvenčních protilátek a požadovaná varianta je poté komplikovaně izolována. Nevýhodou této metody je malá produkce bispecifických protilátek [60]. Navzdory tomu existují schválené bispecifické protilátky používané pro léčbu pacientů s rakovinným onemocněním a další, které jsou ve fázi klinických studií. Další metody pro získání bispecifických částic jsou chemická konjugace a genové inženýrství [61]. Výhodou bispecifických částic je, že dokáží propojit rakovinné buňky s cytotoxickými buňkami a tím efektivně ničit nádorové buňky a zvýšit šanci organismu na přežití [62]. Další výhodou je, že účinná dávka bispecifických částic potřebná pro léčbu rakoviny je menší než u terapeutických mAbs.

Bispecifické protilátky jsou pak uměle konstruované molekuly, které mají dvě vazebná místa pro antigen, každé z nich pro jiný epitop [34,63]. Částice mohou mít dvě vazebná místa pro dva rozdílné epitopy stejného antigenu, což zvyšuje afinitu i aviditu protilátky pro antigen. V případě, že mají částice vazebná místa pro epitopy dvou rozdílných antigenů, pak jedno vazebné místo reaguje s antigenem, zatímco druhé vazebné místo zprostředkovává aktivaci a přesměrování cytotoxických buněk (T-lymfocyty a NK buňky), toxinů nebo radionuklidů na konkrétní cílené místo. Navíc Fc část bispecifické protilátky může aktivovat Fc receptory efektorových buněk.

Kromě bispecifických protilátek se strukturou podobnou konvenčním protilátkám existují další bispecifické konstrukty [63,64]. Například bispecifické diabody je složeno ze dvou spojených scFv fragmentů, jejichž variabilní domény váží rozdílné epitopy. Bispecifické minibody je, stejně jako diabody, složeno z dvou scFv fragmentů s vázanými místy vázající různé epitopy, ale jsou spojené C<sub>H3</sub> doménou (viz Obr. 6). Existuje nespočet dalších druhů bispecifických konstruktů. Kromě bispecifických částic také existují částice trispecifické, které jsou schopny vázat tři různé epitopy.



*Obrázek 6: Schéma vybraných bispecifických částic. Vlevo jsou zobrazené hybridní bispecifické protilátky. Uprostřed je struktura bispecifického diabody. Vlevo jsou zobrazené bispecifické minibody. Převzato a upraveno z [64].*

### 3. Cíle práce

- Exprese antiHER2 nanoprotiřátky s homogenní a přirozenou glykosylací
- Klonování a exprese antiHER2 nanoprotiřátky s mutovaným glykosylačním místem
- Ověření vazby různých glykosylačních variant antiHER2 nanoprotiřátky na povrch buněk exprimujících HER2 receptor

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité materiály

#### 4.1.1. Chemikálie

100 bp DNA standard (New England Biolabs, USA)  
1 kb DNA standard (New England Biolabs, USA)  
2-merkapttoethanol (Sigma, USA)  
Agar (Sigma, USA)  
Agaróza (Sigma, USA)  
Akrylamid (Sigma, USA)  
Ampicilin (Roth, Německo)  
APS (Serva, USA)  
Azid sodný (Serva, USA)  
Bromfenolová modř (Lachema, ČR)  
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka Chemika, Švýcarsko)  
DMSO (Sigma, USA)  
dNTPs (Sigma, USA)  
EDTA (Lach-Ner, ČR)  
GoodView™ Nucleic Acid Stain (Ecoli, Slovensko)  
Kyseliny valproová (Sigma, USA)  
L-glutamin (Sigma, USA)  
IPEI 25 kDa (Polysciences, USA)  
N,N'-metylenbisakrylamid (Serva, USA)  
Penicilin (Sigma, USA)  
Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad, Německo)  
SDS (Jersey Lab Supply, USA)  
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)  
Streptomycin (Sigma, USA)  
TEMED (Serva, USA)  
Tris (Roth, Německo)  
Trypanová modř (Sigma, USA)  
Ostatní běžné chemikálie (Lach-Ner, ČR)

#### 4.1.2. Roztoky a pufrы

AA (30 % akrylamid, 1 % N,N'-methylenbisakrylamid)

Barvicí roztok pro SDS-PAGE (45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250)

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE 10× koncentrovaný (0,25 M Tris, 1,9 M glycin, 1 % (w/v) SDS, pH = 8,3)

Eluční pufr při izolaci DNA z agarózového gelu (5 mM Tris, pH = 8,5)

Eluční pufr pro TALON (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 250 mM imidazol, pH = 7,0)

FACS barvicí pufr (PBS-TK pufr, 0,1% želatina, 0,05 % NaN<sub>3</sub>)

HEPES pufr (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7,5)

MES pufr (20 mM MES, 100 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 5,0)

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE (35 % ethanol, 10 % kyselina octová)

PBS pufr (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7,5)

PBS-TK pufr (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,0)

TAE pufr (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA)

TES pufr (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 8,0)

Tris pufr o pH 6,8 (1,5 M Tris, pH upraveno HCl)

Tris pufr o pH 8,8 (1,5 M Tris, pH upraveno HCl)

Vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu 6× koncentrovaný (30 % glycerol, bromfenolová modř v TAE pufru)

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující 5× koncentrovaný (31,5 mM Tris, 10 % (v/v) glycerol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 6,8)

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující 5× koncentrovaný (vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující 5× koncentrovaný s desetinným objemovým podílem 2-merkaptoethanolu)

#### 4.1.3. Kultivační média a misky

Excell293 Free médium, komerční médium (Sigma, USA) – před použitím doplněno L-glutaminem na výslednou koncentraci 4 mM

LB médium (1 % (w/v) trypton, 0,5 % (w/v) kvasniční extrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH = 7,4)

SOB médium (2 % (w/v) trypton, 0,5 % (w/v) kvasniční extrakt, 0,058 % (w/v) NaCl, 0,019 % (w/v) KCl, 0,2034 % (w/v) MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0,2464 % (w/v) MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH = 7,0)

Kultivační misky s LB médiem (LB médium, 1,5 % (w/v) agar, 100 µg/ml Amp)



Kultivační misky se SOB médiem (SOB médium, 1,5 % (w/v) agar, 100 µg/ml Amp)

#### 4.1.4. Primery a vektory

Sekvenační primer pTT\_FW

5'-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3'

Sekvenační primer pTW5seq\_REV

5'-AAGCAGCGTATCCACATAGCG-3'

PCR primer antiHER2\_N32Q\_L\_FW

5'-CGGAGCAACATCACAGATCAGTAACATGGG-3'

PCR primer antiHER2\_N32Q\_L\_REV

5'-CCCATGTTACTGATCTGTGATGTTGCTCCG-3'

PCR primer antiHER2\_S34A\_L\_FW

5'-AACATCAAACATCGCTAACATGGGCTGGTT-3'

PCR primer antiHER2\_S34A\_L\_REV

5'-AACCAGCCCATGTTAGCGATGTTTGATGTT-3'

Plazmid pTW5sec\_antiHER2 (Mgr. Denis Cmunt, katedra biochemie PřF UK)

Plazmid pTW5sec\_p27 (laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK)

Plazmid PTW5sec\_aFGF (laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK)

#### 4.1.5. Enzymy, polymerázy a jim příslušné pufry

CutSmart™ pufr (New England Biolabs, USA)

EmeraldAmp® GT PCR MasterMix (Takara Bio, Japonsko)

Q5 DNA polymeráza (New England Biolabs, USA)

Q5 GC enhancer (New England Biolabs, USA)

Q5 reakční pufr (New England Biolabs, USA)

Restrikční endonukleáza DpnI (New England Biolabs, USA)

Endoglykosidáza ENDO F<sub>1</sub> (laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK)

#### 4.1.6. Buněčné kmeny a linie

*Escherichia coli* DH5α (laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK)

HEK293S GnTI (laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK)

HEK293T (laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK)

SK-BR3 (laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK)

#### 4.1.7. Přístroje, pomůcky a soupravy

Automatické pipety (Discovery HTL, Polsko)

Automatické pipety (Pipetman Gilson, USA)

BD<sup>TM</sup> LSR II průtokový cytometr (BD Biosciences, USA)

Centrifuga Allegra X-22R (Beckman Coulter, USA)

Centrifuga EBA 12R (Hettich, Německo)

Centrifuga Universal 320R (Hettich, Německo)

Centrifugační zkumavky Falcon (VWR, USA)

Centrifugační zkumavky Oak Ridge (Sigma, USA)

Filtry pro sterilizaci 0,22 µm (TPP, Švýcarsko)

HPLC systém ÄKTA basic (GE Healthcare, USA)

Inkubátor IR 5000 (LABsystem Praha, ČR)

Inkubátor MCO-18 AIC (Sanyo, Japonsko)

Kahan Fuego SCS (VERKON, ČR)

Kolona Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL (GE Healthcare, USA)

Kolona Superdex<sup>TM</sup> 75 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, USA)

Kolona Superdex<sup>TM</sup> 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, USA)

Kolona HiTrap Talon Crude 5 ml (GE Healthcare, USA)

Koncentrátory Amicon Ultra, MWCO 10000 (Millipore, USA)

Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky (P-Lab, ČR)

Laminární box Clean Air (PMV, Nizozemí)

Laminární box BIO 126 (LABOX, ČR)

Mikroskop inverzní AE31 (Motic, Německo)

Mikrostříkačka HAMILTON (Hamilton, USA)

Mikrozkumavka 200 µl (Eppendorf, USA)

Mikrozkumavka 1,5 ml (Eppendorf, USA)

Mix & Go! *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set (Zymo Research, USA)

NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Plus (Macherey-Nagel, Německo)

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo)

NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit (Macherey-Nagel, Německo)

pH metr φ200 (Beckman Coulter, USA)

Pipetovací nástavec Pipetus (Hirschmann, Německo)

Plastik pro tkáňové kultury (VWR, USA)  
Prometheus NT.48 (NanoTemper, Německo)  
Předvážky KB1200-2 (Kern, Německo)  
Souprava pro agarózovou elektroforézu Liberty 120 (Biokeystone, USA)  
Souprava pro SDS-PAGE (Bio-Rad, Německo)  
Spektrofotometr DS-11+ (DeNovix, USA)  
Stericup® vakuový filtrační nástavec 0,22 µm (Millipore, USA)  
Stolní centrifuga MiniStar Silverline (VWR, USA)  
Termoblok LS1 (VLM, Německo)  
Termocykler T100 (Bio-Rad, Německo)  
Třepačka Celltron (Infors HT, Švýcarsko)  
Třepačka Multitron Cell (Infors HT, Švýcarsko)  
Třepačka G24 (New Brunswick Scientific, USA)  
Vodní lázeň WNB 29 (Memmert, Německo)  
Vortexový mixér (VELP Scientifica, Itálie)  
Zobrazovací systém Alliance Q9 (UVItec, UK)  
Zdroj deionizované vody Milli Q (Millipore, USA)  
Zdroj stejnosměrného napětí EC250-90 (E-C Apparatus Corporation, UK)

## 4.2. Metody

### 4.2.1. Příprava expresního vektoru

Expresní vektory byly připravené pomocí amplifikace celého plazmidu s využitím plazmidu pTW5sec\_antiHER2, který poskytl Mgr. Denis Cmunt [65], jako templátu. Do nukleotidové sekvence byla pomocí specifických oligonukleotidů vložena mutace tak, aby bylo v aminokyselinové sekvenci porušeno glykosylační místo.

#### 4.2.1.1. PCR amplifikace plazmidu

PCR amplifikace plazmidu probíhala v 200 $\mu$ l mikrozkušavkách. Do mikrozkušavky byly pipetovány objemy složek reakční směsi dle Tab. 1. Reakční směs měla celkový objem 20  $\mu$ l.

*Tabulka 1: Složky reakční směsi a pipetované objemy pro PCR amplifikaci celého plazmidu pro přípravu expresních vektorů mutantů antiHER2\_N32Q a antiHER2\_S34A.*

Složky reakční směsi pro mutantu N32Q a S34A	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetovaný objem
Q5 DNA polymeráza	2 000 U/ml	0,2 $\mu$ l
Q5 reakční pufr	5 $\times$ koncentrovaný	4 $\mu$ l
Q5 GC enhancer	5 $\times$ koncentrovaný	4 $\mu$ l
templátový plazmid (pTW5sec_antiHER2)	135 ng/ $\mu$ l	0,37 $\mu$ l
dNTPs	10 mM	0,4 $\mu$ l
přímý (FW) primer	5 $\mu$ M	2 $\mu$ l
zpětný (REV) primer	5 $\mu$ M	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	-	7,03 $\mu$ l

Reakční směsi byly pro odstranění bublinek odstředěny na stolní centrifuze. Zkušavky byly vloženy do termocykleru a byl spuštěn časový a teplotní program uvedený v Tab. 2. Výsledek reakce byl ověřen elektroforézou v agarózovém gelu.

*Tabulka 2: Časový a teplotní program pro PCR amplifikaci expresních vektorů.*

Krok	Doba trvání	Teploty kroků cyklu	
		N32Q	S34A
1	5 min	95 °C	95 °C
2 30 $\times$ opakovaný	30 s	95 °C	95 °C
	30 s	54 °C	56 °C
	1 min	72 °C	72 °C
3	10 min	72 °C	72 °C
4	$\infty$	4 °C	4 °C

#### 4.2.1.2. Elektroforéza v agarózovém gelu

Pro ověření přítomnosti očekávaných produktů po PCR reakci byly vzorky analyzovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

Agarózový gel byl připraven povařením agarózy v TAE pufru. Na přípravu 1 % gelu bylo naváženo 0,70 g agarózy, která byla rozpuštěna v 70 ml TAE pufru v mikrovlnné troubě. Do zchlazeného, avšak ne zatuhlého, gelu byly přidány 3  $\mu$ l barviva GoodView<sup>TM</sup>. Gel byl nalit do předem připravené elektroforetické aparatury a do gelu byl vložen hřeben. Po zatuhnutí gelu byl hřeben vyjmut, gel převrstven dH<sub>2</sub>O a do komor k elektrodám byl přilít TAE pufr.

Vzorky byly zředěny na vhodný objem a k nim přidán vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu. Objem přidaného 6× koncentrovaného vzorkového pufru byl takový, aby byl ve výsledné směsi 1× koncentrovaný. Následně byly takto připravené vzorky pipetovány do jamek gelu. Do dalších jamek bylo pipetováno 5  $\mu$ l vhodného DNA standardu.

Elektroforéza probíhala 20 minut při napětí 180 V. Výsledek byl ověřen vizualizací pomocí snímkovacího systému Alliance Q9. V případě použití elektroforézy pro preparativní účely byl výsledek vizualizován pod modrým světlem, aby nedošlo k poškození vzorků UV zářením.

#### 4.2.1.3. Restrikční štěpení templátové DNA

Pro odstranění nežádoucí templátové DNA z reakční PCR směsi bylo provedeno restrikční štěpení pomocí restrikční endonukleázy DpnI.

Do mikrozkušavky s produkty PCR reakce byl přidán 1  $\mu$ l restrikční endonukleázy DpnI, která štěpí methylovanou DNA, a 5  $\mu$ l CutSmart<sup>TM</sup> pufru pro vytvoření vhodného prostředí. Směs byla inkubována přes noc při 37 °C.

#### 4.2.1.4. Izolace DNA z agarózového gelu

Pro přečištění DNA od restrikčních enzymů byla použita preparativní elektroforéza (viz. kapitola 4.2.1.2, str. 29). Následně byly vyříznuty odpovídající proužky agarózy, ze kterých byla DNA izolována.

Pro izolaci DNA byla použita komerční souprava NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Z gelu byl vyříznut proužek se vzorkem a k němu bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku NT1 na 100 mg gelu. Směs byla rozpouštěna po dobu 10 minut při 50 °C v termobloku. Rozpuštěná směs byla pipetována do 2ml mikrozkušavky s kolonkou vázající DNA a centrifugována 30 s při 11000  $\times$  g. Filtrát byl odstraněn a na kolonku bylo nanášeno 700  $\mu$ l NT3 pufru. Kolonka byla centrifugována 30 s při 11000  $\times$  g. Krok byl zopakován pro lepší čistotu vzorku. Samotná mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována 1 minutu při 11000  $\times$  g pro vysušení kolonky. Kolonka byla přemístěna do nové 1,5ml mikrozkušavky a bylo na ní nanášeno 30  $\mu$ l předehřátého elučního pufru. Kolonka byla po minutové inkubaci při pokojové teplotě centrifugována 1 minutu při 11000  $\times$  g. V eluátu byla změřena koncentrace DNA (viz. kapitola 4.2.1.7, str. 31).

V případě, že DNA nebyla izolována z gelu, ale z reakční směsi, pak se k reakční směsi pipetovalo 200  $\mu$ l roztoku NT1. Dále byla směs nanášena na kolonku vázající DNA. Postup izolace DNA byl poté totožný s postupem uvedeným výše.

#### 4.2.1.5. Transformace kompetentních buněk

Pro transformaci buněk byly třeba kultivační misky s médiem a kompetentní buňky *E. coli* TOP10, v případě transformace klonovací směsí, nebo DH5 $\alpha$ , v případě transformace přečištěnou plazmidovou DNA. Kultivační misky pro transformace přečištěnou DNA byly připraveny převařením LB média s agarem, zatímco kultivační misky pro transformace klonovací směsí byly připraveny převařením SOB média s agarem. Po zchlazení média byl přidán ampicilin. Takto připravená média byla rozlita do Petriho misek a ponechána ztuhnout.

Kompetentní buňky byly k dispozici v mrazáku, kde jsou uchovávány při -80  $^{\circ}$ C. Buňky připravil Mgr. Denis Cmunt pomocí soupravy Mix & Go! *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set [66].

K 100  $\mu$ l suspenze kompetentních buněk *E. coli* bylo přidáno 50 ng – 1  $\mu$ g DNA plazmidu a směs byla inkubována 10 minut na ledu. Suspenze byla poté pipetována na kultivační misku a rozetřena sterilní hokejkou. Po vsáknutí suspenze do pevného média byla miska inkubována přes noc při teplotě 37  $^{\circ}$ C.

#### 4.2.1.6. Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA

Z narostlé kultivační misky byla špičkou pipety odebrána bakteriální kolonie a zaočkována do 5 ml LB média obsahujícího ampicilin o koncentraci 1  $\mu$ g/ml. Takto připravená suspenze byla třepána v 50ml zkumavce přes noc při 37  $^{\circ}$ C a 200 ot./min.

Pro nízkoobjemovou izolaci plazmidové DNA byla použita komerční souprava NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit. Přes noc narostlé buněčné kultury byly centrifugovány 5 minut při 11000  $\times$  g. Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 250  $\mu$ l pufru A1 s přídáním RNAsou A. Poté bylo přidáno 250  $\mu$ l lyzačního pufru A2 a směs byla opatrně promíchána a inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Bylo přidáno 300  $\mu$ l neutralizačního pufru A3 a směs byla opatrně promíchána do úplného odbarvení. Směs byla centrifugována 5 minut při 20000  $\times$  g. Čistý supernatant byl pipetován do 2ml mikrozkušavky s kolonkou a centrifugován 1 minutu při 11000  $\times$  g. Na kolonku bylo pipetováno 500  $\mu$ l pufru AW, předehřátého na 50  $^{\circ}$ C, a kolonka byla centrifugována 1 minutu při 11000  $\times$  g. Následně bylo na kolonku pipetováno 600  $\mu$ l pufru A4 a kolonka byla opět centrifugována 1 minutu při 11000  $\times$  g. Filtrát byl odstraněn a kolonka byla sušena centrifugací 2 minuty při 11000  $\times$  g. Suchá kolonka byla přemístěna do 1,5ml čisté mikrozkušavky a bylo na ní pipetováno 50  $\mu$ l elučního pufru AE, který byl inkubován 1 minutu při pokojové teplotě. Poté byla kolonka centrifugována 1 minutu při 11000  $\times$  g. Kolonka byla odstraněna a v eluátu byla změřena koncentrace DNA (viz. kapitola 4.2.1.7, str. 31).

#### 4.2.1.7. Měření koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace izolované DNA byla změřena na spektrofotometru DS-11 proti elučnímu pufru. Spektrofotometr používá k výpočtu koncentrace empirický vztah, kde dvouřetězcová DNA o koncentraci 50 µg/ml má při 260 nm absorbanci 1,0. Čistota izolované DNA byla určena z poměru absorbancí 260/280 nm. Čisté DNA odpovídá poměr mezi 1,8 – 2,0.

#### 4.2.1.8. Sekvence DNA

Nukleotidová sekvence vzorků byla ověřena sekvenací v Laboratoři sekvenace DNA ve výzkumném centru BIOCEV.

Pro každý vzorek byly namíchány dvě reakční směsi na sekvenaci – reakční směs obsahující přímý primer pTT\_FW a reakční směs obsahující zpětný primer pTW5seq\_REV. Do 0,2ml mikrozkušavky bylo pipetováno 200 ng plazmidové DNA, 1 µl příslušného primeru a sterilní dH<sub>2</sub>O do celkového objemu 8 µl. Takto připravené vzorky byly odeslány do sekvenační laboratoře. Výsledky sekvenace byly porovnány s předpokládanou sekvencí plazmidu.

#### 4.2.1.9. Velkoobjemová izolace plazmidové DNA

Z narostlé kultivační misky byla špičkou pipety odebrána kolonie a zaočkována do 500 ml LB média obsahujícího ampicilin o koncentraci 1 µg/ml. Takto připravená suspenze byla třepána přes noc v 2l Erlenmayerově baňce při teplotě 37 °C a 180 ot./min.

K velkoobjemové izolaci plazmidové DNA byla použita komerční souprava NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Plus. Přes noc narostlé buněčné kultury byly centrifugovány při 4 °C po dobu 20 minut při 4500 × g. Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 15 ml pufru RES zchlazeného na 4 °C. Ke směsi bylo přidáno 15 ml pufru LYS a směs byla opatrně promíchána a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Mezitím byla kolona s filtrem ekvilibrována pomocí 25 ml EQU pufru. Po pěti minutách bylo k inkubované směsi přidáno 15 ml pufru NEU a směs byla opatrně promíchána do úplného odbarvení. Následně byla směs centrifugována 15 minut při 5000 × g a supernatant byl přenesen na kolonu s filtrem. Po prokapání vzorku byla kolona s filtrem promyta 15 ml EQU pufru a filtr byl z kolony odstraněn. Samotná kolona byla promyta 25 ml WASH pufru. Poté byla kolona promyta 15 ml ELU pufru a eluát byl sbírán do 50ml centrifugační zkumavky.

Pro precipitaci plazmidové DNA bylo k 15 ml eluátu přidáno 10,5 ml isopropanolu pokojové teploty a vzorek byl důkladně promíchán vortexovým mixérem a poté centrifugován při 4 °C po dobu 30 minut při 15000 × g. K precipitované plazmidové DNA byly přidány 4 ml 70% ethanolu pokojové teploty a směs byla centrifugována při pokojové teplotě 5 minut při 15000 × g. Ethanol byl opatrně odstraněn a peleta byla ponechána vyschnout 15-30 minut při pokojové teplotě. Suchá peleta byla resuspendována v 1 ml sterilní dH<sub>2</sub>O a následně byla v tomto roztoku změřena koncentrace DNA (viz. kapitola 4.2.1.7, str. 31).

## 4.2.2. Exprese proteinů

### 4.2.2.1. Kultivace buněčných linií HEK293T a HEK293S GnTI<sup>-</sup>

Buněčné linie byly uchovávány v mrazáku při -80 °C v objemu 1 ml při buněčné hustotě  $5 \times 10^6$  buněk/ml. Buněčná suspenze byla tvořena kultivačním médiem ExCell293 s buňkami dané buněčné linie s 10 % DMSO.

Buněčná suspenze byla rozmrazena ve vodní lázni o teplotě 37 °C a pipetována do 10 ml média ExCell293. Suspenze byla centrifugována 5 minut při  $95 \times g$ . Peleta byla resuspendována v 10 ml média ExCell293 a přenesena na kultivační misku. Kultivace buněk probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C za 5 % nasycení CO<sub>2</sub>.

Poté, co se buňky začaly dělit, byly přeneseny do čtverhranných lahví s prodyšnými víčky, aby mohlo docházet k výměně plynů s okolím, a byly umístěny do inkubátoru s třepačkou (37 °C, 5 % nasycení CO<sub>2</sub> a 135 ot./min).

Subkultivace buněk probíhala každé 3-4 dny. Část buněk byla přenesena do čisté čtverhranné lahve a doplněna médiem ExCell293 na takový objem, aby suspenze buněk měla hustotu přibližně  $0,3 \times 10^6$  buněk/ml. Objem suspenze vždy tvořil maximálně 40 % celkového objemu láhve, aby bylo zajištěno dostatečné provzdušnění buněčných kultur. Tento postup byl opakován, dokud buňky nedosáhly optimální viability a nebylo jich dostatečné množství na provedení tranzientní transfekce.

### 4.2.2.2. Tranzientní transfekce

Na produkci proteinu ve 400 ml média bylo třeba 800 miliónů buněk. Transfekce byla provedena v desetině konečného objemu (40 ml).

Z buněčné suspenze bylo odebráno 20  $\mu$ l buněk a přidáno 160  $\mu$ l trypanové modři, vznikla tedy  $9 \times$  ředěná barevná suspenze buněk. Ředěná barevná suspenze byla pipetována do Bürkerovy komůrky (hemocytometru) a buňky byly spočítány pod mikroskopem v devíti velkých čtvercích o rozměru  $1 \times 1$  mm. Z počtu buněk v komůrce byla vypočítána buněčná hustota suspenze pomocí vzorce:

$$\text{buněčná hustota} = \frac{\text{buňky v komůrce} \cdot \text{ředění barevné suspenze}}{\text{počet velkých čtverců}} \cdot 10^4$$

Z buněčné suspenze byl odebrán takový objem, aby obsahoval 800 miliónů buněk a byl centrifugován 5 minut při  $95 \times g$ . Buňky byly resuspendovány ve 34 ml média ExCell293 a bylo přidáno 6 ml transfekčního mixu obsahujícího 800  $\mu$ g plazmidové DNA (na 1 milión buněk byl přidán 1  $\mu$ g DNA). Transfekční mix obsahoval 88 % (w/w) expresního plazmidu, 10 % (w/w) plazmidu pTW5\_p27, 2 % (w/w) plazmidu pTW5\_aFGF. Na konečný objem byl transfekční mix doplněn PBS-TK pufrem.

Do 40 ml suspenze byl k plazmidové DNA přidán IPEI v hmotnostním poměru 1:3 při tranzientní transfekci buněčné linie HEK293T a v poměru 1:4 při tranzientní transfekci buněčné linie HEK293S GnTI<sup>-</sup> (optimalizaci poměru plazmidové DNA:IPEI prováděla Mgr. Barbora Kalousková). Buněčná suspenze byla ponechána v inkubátoru



na třepačce 1,5 - 2 hodiny při 37 °C, 5 % nasycení CO<sub>2</sub> a 135 ot./min. Suspenze byla doplněna na 400 ml médiem ExCell293, byla přidána kyselina valproová do koncentrace 2 mM a odpovídající množství 100× koncentrovaných antibiotik (penicilin a streptomycin).

Proteiny byly buňkami sekretovány do média, jelikož expresní plazmidy obsahují v nukleotidové sekvenci sekreční signál. Buněčné kultury byly sklizeny šestý den po transfekci. Buněčná suspenze byla centrifugována 30 minut při 20000 × g. Supernatant obsahující produkované proteiny byl zfiltrován přes 0,22 µm filtrační nástavec a filtrát byl naředěn PBS pufrům v poměru 1:1. Takto připravený roztok byl ihned purifikován nebo zamražen při teplotě -20 °C.

### **4.2.3. Purifikace proteinů**

#### **4.2.3.1. Chelatační afinitní chromatografie**

Produkované proteiny obsahují ve své sekvenci histidinovou kotvu, a tudíž je možné k jejich purifikaci použít chelatační afinitní chromatografii s nosičem TALON, který obsahuje ionty kobaltu. Kolona byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic. Nejprve byla kolona převedena do dH<sub>2</sub>O a nosič byl regenerován pomocí roztoku CoSO<sub>4</sub>. Po regeneraci byla kolona opět převedena do dH<sub>2</sub>O a poté ekvilibrována PBS pufrům při průtoku 2,5 ml/min. Následně byl na kolonu nanesen vzorek při průtoku 5 ml/min. Kolona byla převedena zpět do PBS pufru při stejném průtoku. Pro eluci byl použit eluční pufr pro nosič TALON při průtoku 2,5 ml/min. Po eluci vzorku byla kolona převedena do MES pufru, poté do dH<sub>2</sub>O a nakonec do 20 % ethanolu, ve kterém byla uchována.

#### **4.2.3.2. Koncentrování proteinů**

Eluát byl koncentrován pomocí koncentrátorů Amicon Ultra. Eluát byl pipetován do koncentrátoru a centrifugován 5 minut při 4000 × g. Zbývající eluát v koncentrátoru byl promíchán opakovaným nasátím a vytlačení ze špičky pipety, aby nedošlo ke sražení proteinu. Postup byl několikrát opakován až do dosažení výsledného objemu (250-500 µl pro gelovou permeační chromatografii) nebo potřebné koncentrace proteinu.

#### **4.2.3.3. Gelová permeační chromatografie**

Vazba proteinu s histidinovou kotvou na nosič TALON není zcela specifická a na nosiči může docházet k zachycení nečistot. Eluát se proto přečišťuje pomocí gelové permeační chromatografie. Při použití analytické kolony s dostatečným rozlišením je možné od sebe oddělit jednotlivé formy proteinu, pokud se dostatečně liší jejich velikost (nekovalentní oligomery, glykoformy).

Přečištění proteinu probíhalo na koloně Superdex™ 200 10/300 GL nebo Superdex™ 200 Increase 10/300 GL které byly připojeny k HPLC systému ÄKTA basic, popřípadě Superdex™ 75 Increase 10/300 GL. Kolona byla převedena do

PBS-TK pufru při průtoku 0,65 ml/min. Smyčka byla promyta minimálně 5 ml PBS-TK pufru a následně byl do smyčky nanesen zkoncentrovaný vzorek. Vzorek byl před nanesením centrifugován 5 min při  $20000 \times g$  pro odstranění případných nečistot v koncentrátu. Eluční frakce byly sbírány automatickým sběračem frakcí do 1,5 ml mikrozkušavek po 0,25-1 ml při průtoku 0,65 ml/min. Následně byla kolona při průtoku 0,50 ml/min převedena do 20 % ethanolu. V průběhu chromatografie byla měřena absorbance při 280 nm.

#### 4.2.3.4. Měření koncentrace proteinů

Koncentrace jednotlivých frakcí byla změřena spektrofotometricky při 280 nm na spektrofotometru DS-11. Pro výpočet koncentrace byl použit teoretický extinkční koeficient a molekulová hmotnost daného proteinu vypočítaná na základě aminokyselinové sekvence nástrojem ProtParam [67].

#### 4.2.3.5. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Čistota frakcí byla zkontrolována pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného, SDS-PAGE.

Polyakrylamidový gel pro elektroforézu byl tvořen dvěma gely – gelem zaostřovacím a gelem rozdělovacím. Chemikálie a jejich množství potřebné pro přípravu zaostřovacího gelu a 12,5% rozdělovacího gelu jsou uvedené v Tab. 3. Rozdělovací gel byl pipetován mezi dvě sklíčka a převrstven destilovanou vodou. Po zatuhnutí rozdělovacího gelu byla destilovaná voda odstraněna a navrch byl pipetován zaostřovací gel a vložen hřeben. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byl hřeben vyjmut a hotový gel byl vložen do předem připravené elektroforetické aparatury. Elektroforetická komora byla naplněna  $1 \times$  koncentrovaným elektrolytickým pufrům pro SDS a do jamek gelu byly naneseny předem připravené vzorky a 5  $\mu$ l standardu Spectra™ Multicolor nebo standardu Precision Plus Protein™ Dual Color.

*Tabulka 3: Chemikálie potřebné k přípravě 12,5% rozdělovacího gelu a zaostřovacího gelu.*

Rozdělovací gel 12,5 %		Zaostřovací gel	
H <sub>2</sub> O	1,265 ml	H <sub>2</sub> O	0,7 ml
AA	1,675 ml	AA	0,25 ml
Tris (pH 8,8)	1 ml	Tris (pH 6,8)	0,125 ml
SDS	40 $\mu$ l	SDS	10 $\mu$ l
APS	40 $\mu$ l	APS	10 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l	TEMED	1,5 $\mu$ l

Vzorky obsahovaly 3  $\mu$ g proteinu naředěného destilovanou vodou na dobře pipetovatelný objem a takové množství redukcujícího či neredukujícího vzorkového pufru pro SDS, aby byl  $1 \times$  koncentrovaný. Takto připravené vzorky byly inkubovány v termobloku 10 minut při 90 °C. Vzorky byly odstředěny a naneseny na gel.

Elektroforéza probíhala 40-50 minut při napětí 200 V. Gely byly zdokumentovány pomocí snímkovacího systému Alliance Q9.

#### 4.2.4. Deglykosylace proteinů

Proteiny produkované v buněčné linii HEK293S GnTI<sup>-</sup> byly deglykosylovány pomocí endoglykosidázy ENDO F<sub>1</sub>.

K purifikované frakci proteinů antiHER2\_WT\_HEK293S byla přidána endoglykosidáza ENDO F<sub>1</sub> v hmotnostním poměru 1:10 (ENDO F<sub>1</sub> : protein). Reakční směs byla inkubována přes noc při 37 °C. Deglykosylovaný protein byl přečištěn gelovou permeační chromatografií.

#### 4.2.5. Diferenční skenovací fluorimetrie

Termální stabilita purifikovaných proteinů antiHER2\_N32Q a antiHER2\_S34A byla změřena metodou diferenční skenovací fluorimetrie, konkrétně nanoDSF v centru BIOCEV na přístroji Prometheus NT.48. Tepelná denaturace proteinů byla sledována pomocí fluorescence tryptofanu a tyrosinu při vlnových délkách 350 nm a 330 nm.

Před měřením byly vzorky v PBS-TK pufru centrifugovány 10 minut při 10000 × g. Vzorky byly měřeny v teplotním rozmezí 20 – 95 °C při teplotním přírůstku 1,5 °C za minutu. Data byla sbírána pomocí programu PT.ThermControl a analyzována pomocí programu PR.Stability analysis.

#### 4.2.6. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (*fluorescence activated cell sorting* – FACS) byla zvolena pro studium interakce různých glykosylačních variant nanoprotilátky antiHER2 s HER2<sup>+</sup> nádorovou buněčnou linií SK-BR3 odvozenou od karcinomu prsu. Proteiny byly značeny pomocí iBodies, což jsou syntetické protilátky založené na organickém polymeru, který nese funkční skupiny cílicí histidinovou kotvu a fluorofor ATTO488 [68]. Všechny glykosylační formy byly značeny stejně, tedy smícháním proteinu a iBodies v molárním poměru 3:1 tak, aby byly výsledné histogramy získané fluorescenční cytometrií porovnatelné.

SK-BR3 buňky byly mechanicky dispergovány v 15 ml kultivačního média. Následně byly buňky 2× promyty FACS barvicím pufrům (vždy s centrifugací 5 minut při 95 × g) a resuspendovány v 800 μl FACS barvicího pufru.

Vzorek o výsledném objemu 200 μl obsahoval 100 μl resuspendovaných buněk SK-BR3, příslušnou glykosylační formu antiHER2 o výsledné koncentraci 30 nM, iBodies o výsledné koncentraci 10 nM a PBS-TK pufr. Takto připravené vzorky byly inkubovány 30 min na ledu za tmy. Buňky byly poté 2× opláchnuty (vždy s centrifugací 5 min při 300 × g a 4 °C) a resuspendovány ve 250 μl FACS barvicího pufru.

Měření vazby glykosylačních forem nanoprotilátky aHER2 probíhalo na přístroji BD LSR II v Laboratoři cytometrie PřF UK pod odborným dohledem

Mgr. Denise Cmunta. Měření glykosylačních forem nanoprotiátky antiHER2 probíhalo za pomoci excitačního laseru 488 nm a emisního filtru  $525 \pm 50$  nm (kanál B1). Měření pozitivní kontroly SK-BR3 buněk s komerční protilátkou AF647 probíhalo s excitačním laserem 637 nm a emisním filtrem  $670 \pm 30$  nm (kanál R1). Data byla vyhodnocena v programu FlowJo.

## 5. Výsledky

### 5.1. Příprava expresních vektorů nanoprotilátky antiHER2

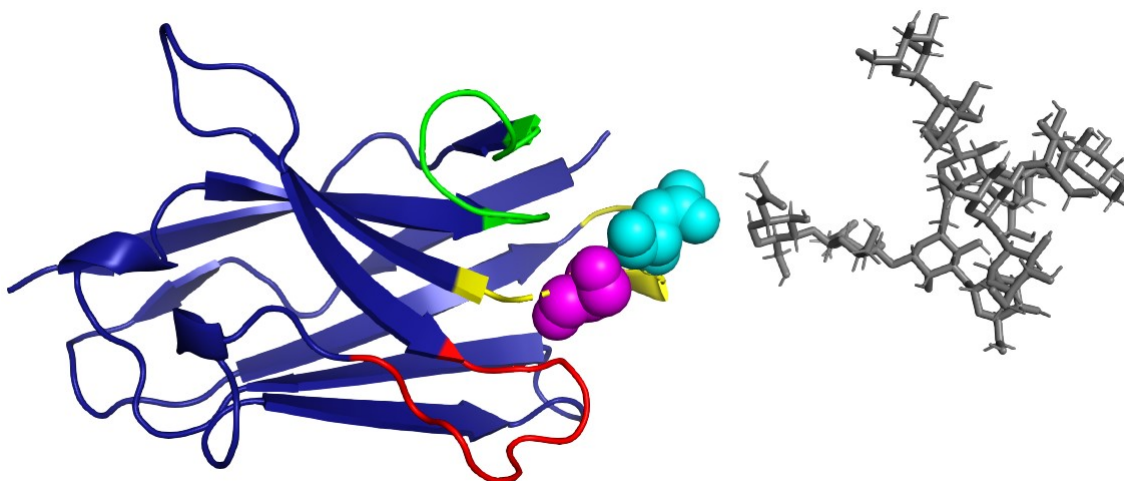
Jedním z cílů práce bylo připravit expresní vektory antiHER2 nanoprotilátky s mutovaným glykosylačním místem. K tomu byl použit plazmid pTW5sec\_antiHER2, který poskytl Mgr. Denis Cmut [65]. Expresní vektory byly připraveny pomocí PCR amplifikace tohoto plazmidu. Primery se specifickou sekvencí (viz kapitola 4.1.4., str. 25) nasedaly na templátový plazmid pTW5sec\_antiHER2 v místě mutace a měnily tak sekvenci plazmidů produkovaných PCR reakcí. Nukleotidová sekvence konstruktů nanoprotilátek antiHER2\_N32Q a antiHER2\_S34A, které mají mutaci na 32. AMK resp. 34. AMK, je zobrazena na Obr. 7 a jejich aminokyselinová sekvence je zobrazena na Obr. 8. Model struktury nanoprotilátky antiHER2 vytvořený s pomocí programu SWISS-MODEL [69–73] je znázorněn na Obr. 9, str. 38. Paratop nanoprotilátky byl určen dle výsledků srovnávací studie [74]. Konstrukty všech variant nanoprotilátky obsahují sekreční signál, buňky tedy sekretují proteiny do média, a histidinovou kotvu, která umožňuje purifikaci proteinů pomocí chelatační afinitní chromatografie. Teoretická molekulová hmotnost proteinu je 15 kDa.

```
ATGGGAGAACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCTTCAGCTGAGTC
TTGGAATTACCGGTATGGCGGAAGTGCAGCTGCAGGCTTCCGGGGGAGGAT
TTGTGCAGCCGGGGGGGTCATTGCGACTGAGCTGCGCCGCATCCGGAGCAA
CATCAAACATCAGTAACATGGGCTGGTTTCGTCAGGCCCTGGCAAGGAGA
GAGAGTTCGTTTCCGCCATCTCCCGTGCAGAATCGCGTCCTCTGTATTACGC
TGACAGCGTAAAGGGAAGATTTACAATTAGCCGGGATAACTCCAAAAACAC
GGTCTATCTCCAGATGAACAGCCTCAGGGCCGAGGACACAGCTACGTATTA
CTGTGCATATATGCCTCTGGTTCGTCACAAGGCATACTGGGGACAGGGGAC
GCAGGTAAGTGTGAGTAGCGGTACCACCATCACCACCATCACCACCACGG
GTGA
```

*Obrázek 7: Nukleotidová sekvence konstruktů nanoprotilátky antiHER2 ve směru 5' → 3'. Na obrázku sekvence nanoprotilátky je vyznačený start kodon, sekreční signál, restrikční místo pro endonukleázu AgeI, sekvence samotného konstruktů nanoprotilátky antiHER2, mutované místo u nanoprotilátky antiHER2\_N32Q (mutace AAC → CAG), mutované místo u nanoprotilátky antiHER2\_S34A (mutace AGT → GCT), restrikční místo pro endonukleázu KpnI, histidinová kotva složená z 8 histidinů, glycin a stop kodon.*

```
ITGMAEVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGATSNISNMGWFRQAPGKEREFV
SAISRAESRPLYYSVVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAYMP
LVRHKAYWGQGTQVTVSSGTHHHHHHHHG
```

*Obrázek 8: Aminokyselinová sekvence nanoprotilátky antiHER2. Na obrázku aminokyselinové sekvence je vyznačený pozůstatek sekrečního signálu a místa pro restrikční endonukleázu AgeI, sekvence nanoprotilátky antiHER2, mutovaná místa v sekvenci u nanoprotilátky antiHER2\_N32Q (z asparaginu na glutamin) a nanoprotilátky antiHER2\_S34A (ze serinu na alanin), pozůstatek místa pro restrikční endonukleázu KpnI a histidinová kotva.*



**Obrázek 9: Model struktury nanoprotilátky antiHER2.** Struktura nanoprotilátky (modrá) je zobrazena spolu s glykosylací (šedá) na paratopu. Jsou naznačeny hypervariabilní smyčky H1 (žlutá), H2 (červená) a H3 (zelená). Mutovaná místa se nacházejí na variabilní smyčce H1, je to asparagin 32 (tyrkysová) a serin 34 (růžová). Struktura byla modelována pomocí programu SWISS-MODEL [69-73] a zobrazena v programu PyMOL.

Vznik produktu PCR reakce, tedy amplifikovaného mutovaného plazmidu, byl ověřen analýzou vzorku reakční směsi pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (viz 4.2.1.2., str. 29). K reakční směsi byla přidána restriční endonukleáza DpnI pro odstranění nežádoucí metylované templátové DNA a směs byla inkubována přes noc při 37 °C. Plazmidová DNA byla od restričních enzymů přečištěna elektroforézou v agarózovém gelu, poté byla izolována a použita pro transfekci kompetentních bakteriálních buněk *E. coli*. Suspenze buněk s plazmidovou DNA byla pipetována a rozetřena na kultivační misce, která byla poté inkubována přes noc při 37 °C. Následující den byla špičkou odebrána bakteriální kolonie, která byla zaočkována do kultivačního média. Z narostlé buněčné kultury byla provedena nízkoobjemová izolace plazmidové DNA (viz 4.2.1.6., str. 30) a změřena její koncentrace – naměřené koncentrace pro plazmidy pTW5sec\_antiHER2\_N32Q a pW5sec\_antiHER2\_S34A jsou uvedeny v Tab. 4. Pro potvrzení správnosti sekvence plazmidů byly vzorky plazmidů zaslány na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA ve výzkumném centru BIOCEV.

**Tabulka 4: Koncentrace plazmidové DNA získané z nízkoobjemové izolace DNA.**

Plazmid	Koncentrace [ng/μl]	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
pTW5sec_antiHER2_N32Q	135	1,82
pTW5sec_antiHER2_S34A	577	1,91

Plazmidová DNA získaná z nízkoobjemové izolace s ověřenou sekvencí byla použita pro transformaci bakteriálních buněk *E. coli*. Transformace byla provedena i s plazmidem pTW5sec\_antiHER2, který poskytl Mgr. Denis Cmunt. Z transformovaných buněk byla provedena velkoobjemová izolace plazmidové DNA a změřena její koncentrace – naměřené koncentrace pro plazmidy pTW5sec\_antiHER2, pTW5sec\_antiHER2\_N32Q a pTW5sec\_antiHER2\_S34A jsou v Tab. 5, str. 39.

*Tabulka 5: Koncentrace plazmidové DNA získané z velkoobjemové izolace DNA.*

<b>Plazmid</b>	<b>Koncentrace [mg/ml]</b>	<b>A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub></b>
pTW5sec_antiHER2	2,5	1,90
pTW5sec_antiHER2_N32Q	1,1	1,97
pTW5sec_antiHER2_S34A	1,0	1,95

Tyto plazmidy byly použity pro tranzientní transfekci buněčných linií HEK293T a HEK293S GnTI<sup>-</sup>. Že se jedná o čisté preparáty DNA je patrné z poměru absorbancí A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, který pro čistou dvouvláknovou DNA odpovídá 1,8 – 2,0.

## **5.2. Expres a purifikace proteinu antiHER2**

### **5.2.1. Expres proteinu antiHER2 v buněčné linii HEK293T**

Pro expresi přirozeně glykosylované nanoprotilátky antiHER2 byla použita buněčná linie HEK293T, která je schopna tvořit komplexní N-glykosylaci savčího typu.

Pro tranzientní transfekci při vysoké hustotě buněk ve 400 ml média bylo použito  $800 \times 10^6$  buněk (viz 4.2.2.2., str. 32). Nejdříve byl smíchán transfekční mix DNA s buněčnou suspenzí a IPEI. Poté byla buněčná suspenze ponechána v inkubátoru na třepačce 1,5 - 2 hodiny při vysoké buněčné hustotě, následně byla suspenze zředěna a doplněna na 400 ml médiem ExCell293, byla přidána kyselina valproová a antibiotika. Kultury byly sklizeny šestý den po transfekci, buňky byly centrifugovány a kultivační médium zfiltrováno.

### **5.2.2. Expres proteinu antiHER2 v buněčné linii HEK293S GnTI<sup>-</sup>**

Pro expresi nanoprotilátky antiHER2 s homogenní glykosylací manosového typu byla použita buněčná linie HEK293S GnTI<sup>-</sup>. Tato buněčná linie postrádá N-acetylglukosaminyltransferázu I, tudíž není schopná vytvářet komplexní N-glykosidy a její glykosylace je jednoduchá. Glykosid lze odštěpit endoglykosidázou ENDO F<sub>1</sub>.

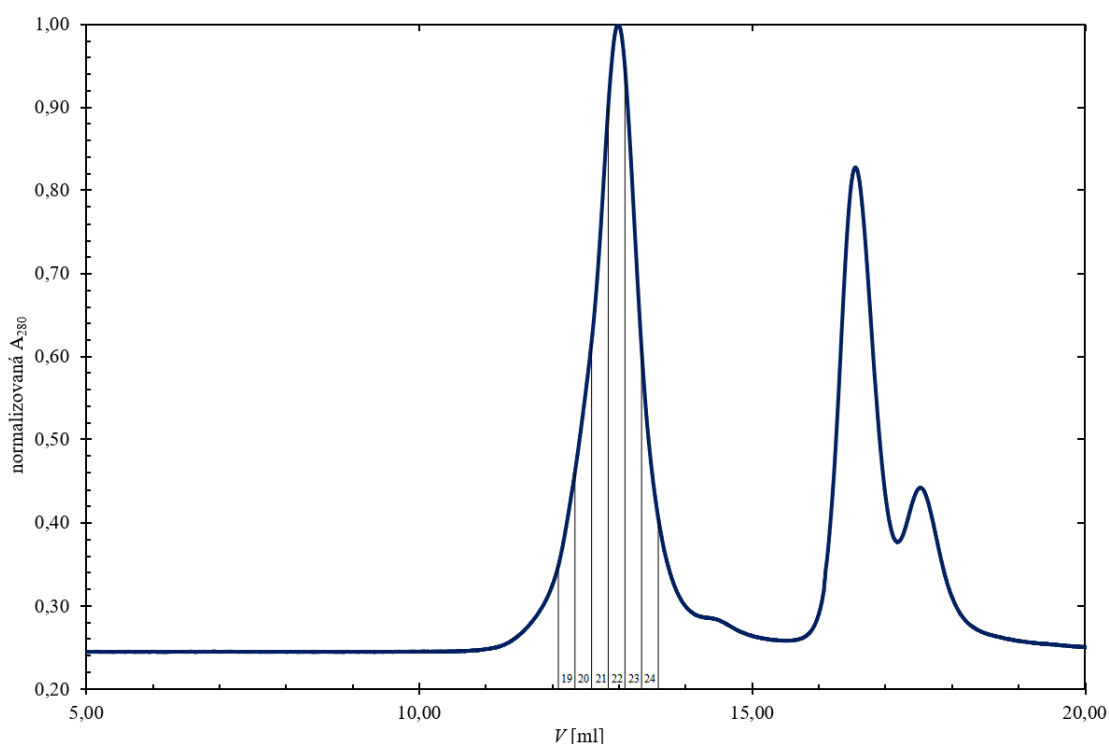
Postup pro expresi nanoprotilátky antiHER2 v buněčné linii HEK293S GnTI<sup>-</sup> byl stejný jako u exprese nanoprotilátky antiHER2 v linii HEK293T (viz 5.2.1., str. 39).

### **5.2.3. Purifikace proteinu antiHER2 z produkce v linii HEK293T**

Produkované proteiny ve své sekvenci obsahují histidinovou kotvu, tudíž je možné je purifikovat pomocí chelatační afinitní chromatografie na nosiči TALON (viz 4.2.3.1., str. 33). Proteiny v kultivačním médiu byly naředěny PBS pufrém v poměru 1:1 a poté byly nanášeny na kolonu. K eluci byl použit eluční pufr pro nosič TALON, který obsahuje imidazol. Eluát byl poté zkoncentrován, centrifugován a přečištěn gelovou permeační chromatografií (viz 4.2.3.3., str. 33). Gelová permeační chromatografie byla provedena několikrát s využitím kolon s různou rozlišovací schopností, pro oddělení jednotlivých glykoforem. Protein byl nejdříve rozdělen na koloně Superdex<sup>TM</sup> 200

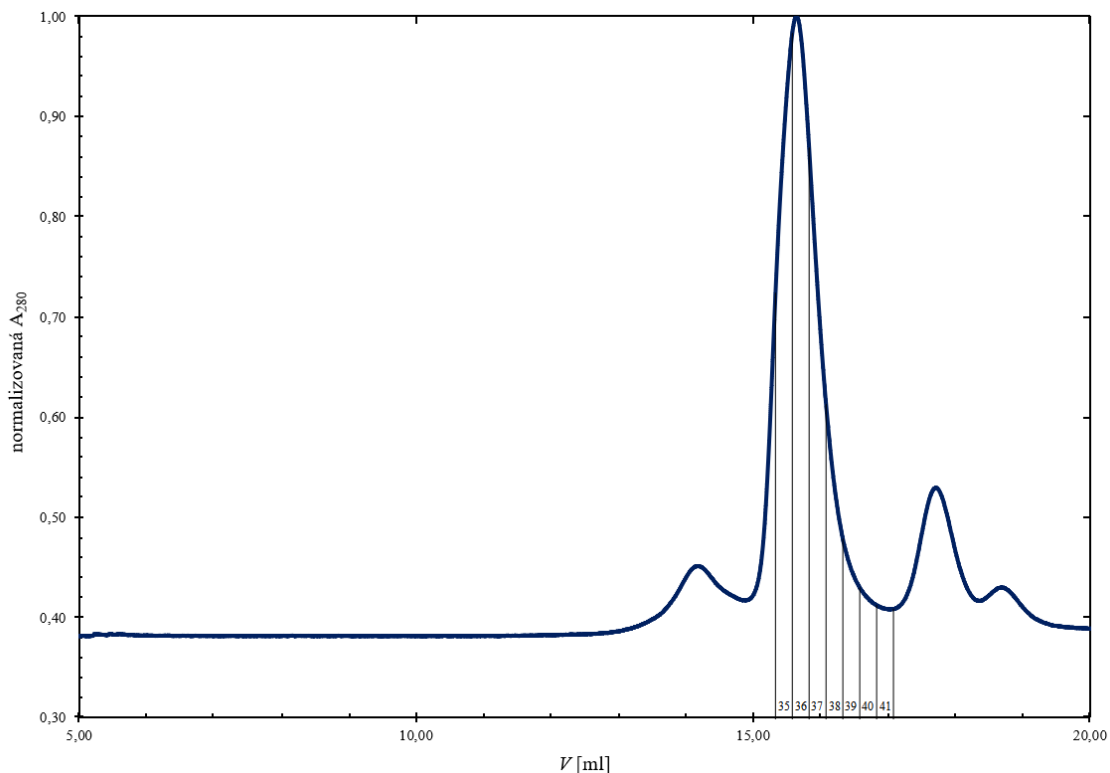
Increase 10/300 GL, kde se nepodařilo zcela oddělit píky patřící jednotlivým glykosylačním formám proteinu. Frakce s nejvyšším podílem jednotlivých glykoforem byly následně rozděleny na koloně Superdex™ 75 Increase 10/300 GL. Chromatogram frakcí obsahující vyšší podíl glykosylované formy nanoprotilátky je na Obr. 10 a chromatogram frakcí s vyšším podílem neglykosylované formy nanoprotilátky je na Obr. 11, str. 41. Frakce byly jímány při izokratické eluci do 1,5ml mikrozkuvek po 250 µl. Jako eluční pufr byl použit PBS-TK pufr.

Na záznamu chromatogramů lze v obou případech vidět dva majoritní píky, což jsou glykosylovaná a neglykosylovaná forma antiHER2\_WT\_HEK293T. Podařilo se získat čisté frakce jednotlivých glykoforem, jak je patrné z polyakrylamidového gelu na Obr. 12, str. 41.

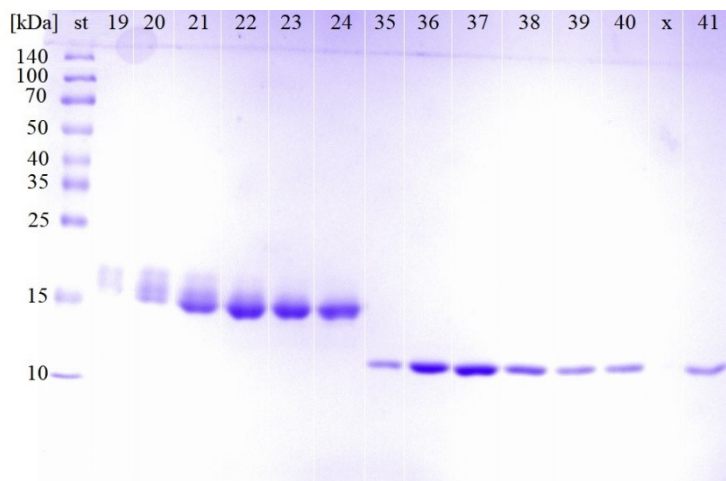


**Obrázek 10:** Záznam gelové permeační chromatografie glykosylované formy antiHER2\_WT\_HEK293T. Izokratická eluce probíhala na koloně Superdex™ 75 Increase 10/300 GL. Modrá čára představuje profil eluce, svislé černé čáry zobrazují jímání frakce 19-24. Glykosylovaná forma měla vrchol elučního objemu v 12,98 ml.





**Obrázek 11:** Záznam gelové permeační chromatografie neglykosylované formy *antiHER2\_WT\_HEK293T*. Izokratická eluce probíhala na koloně Superdex™ 75 Increase 10/300 GL. Modrá čára představuje profil eluce, svislé černé čáry zobrazují jímání frakce 35-41. Glykosylovaná forma měla vrchol elučního objemu v 15,70 ml.

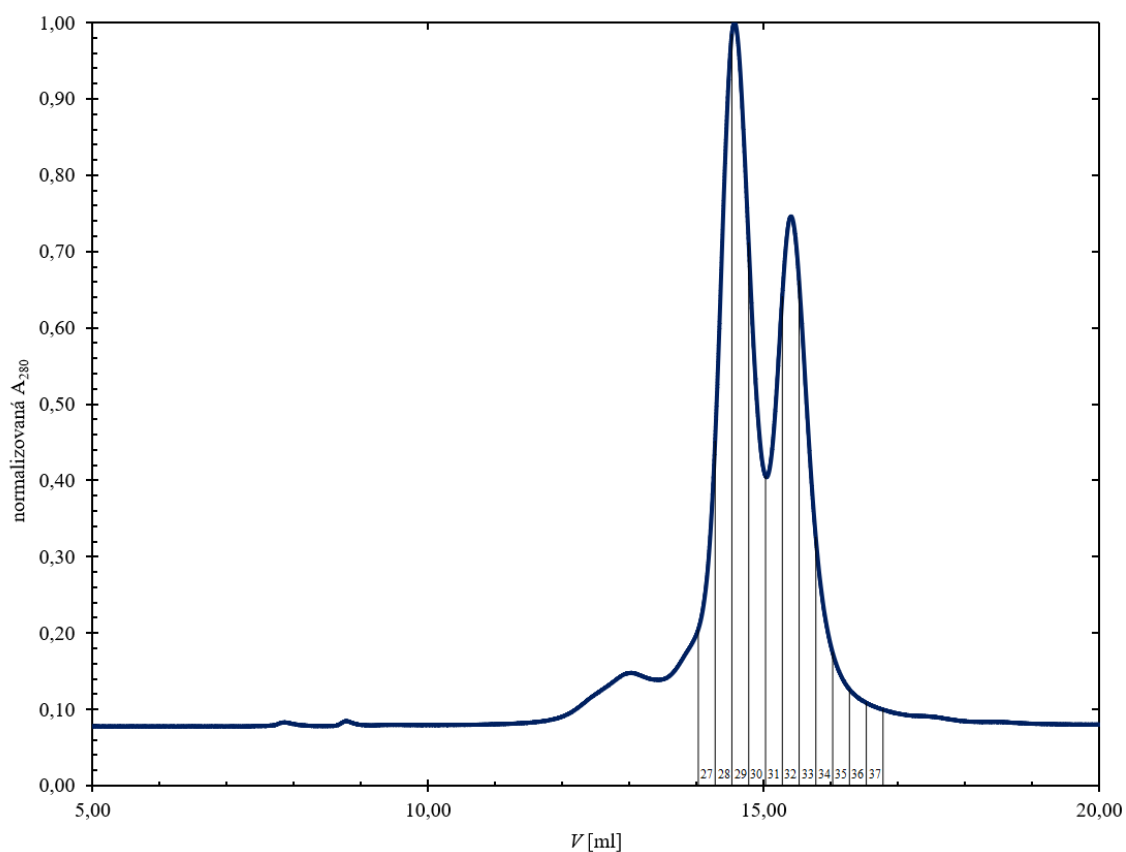


**Obrázek 12:** SDS-PAGE frakcí obou glykosylačních forem *antiHER2\_WT\_HEK293T*. 12,5% neredukující polyakrylamidový gel. V dráze *st* se nachází standard molekulových hmotností. Proužky s vyšší molekulovou hmotností (frakce 19-24) patří glykosylované formě nanoprotilátky a proužky s nižší molekulovou hmotností (frakce 35-41) patří neglykosylované formě nanoprotilátky. V dráze *x* se nachází kontrola čistoty vzorkového pufru pro SDS-PAGE.

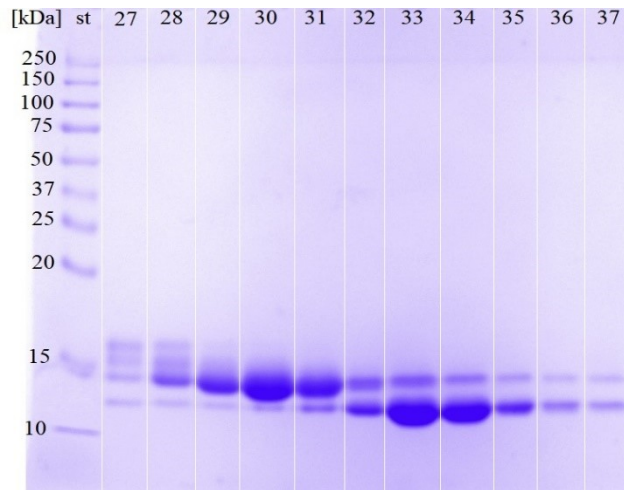
#### 5.2.4. Purifikace proteinu antiHER2 z produkce v linii HEK293S GnT1<sup>-</sup>

Postup purifikace proteinu antiHER2 produkovaného v buněčné linii HEK293S GnT1<sup>-</sup> byl stejný jako u purifikace proteinu antiHER2 produkovaného v buněčné linii HEK293T (viz 5.2.3., str. 39). Byla provedena chelatační afinitní chromatografie na koloně TALON a gelová permeační chromatografie na koloně Superdex<sup>TM</sup> 75 Increase 10/300 GL. Frakce byly při izokratické eluci jímány do 1,5ml mikrozkušavek po 250  $\mu$ l. Jako eluční pufr byl použit PBS-TK pufr.

Záznam gelové permeační chromatografie je na Obr.13. Na záznamu chromatogramu lze vidět dva píky znázorňující proteiny s rozdílnou molekulovou hmotností, což jsou glykosylovaná a neglykosylovaná forma antiHER2\_WT\_HEK293S. Glykosylační formy se od sebe nepodařilo dokonale oddělit a eluované frakce obsahovaly obě glykoformy, což je patrné z polyakrylamidového gelu na Obr. 14, str. 43.



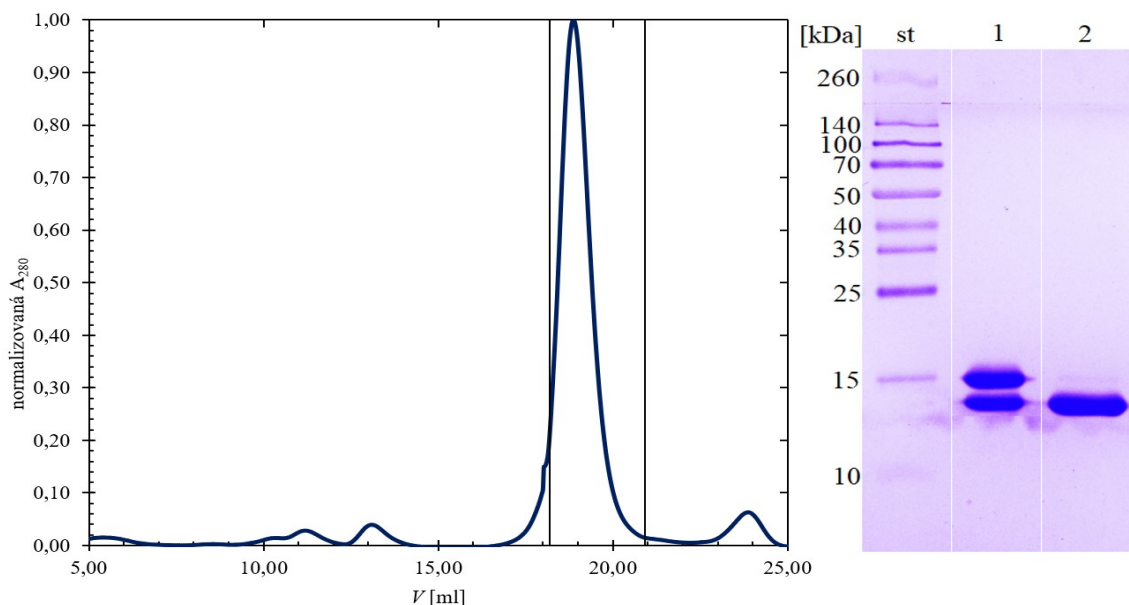
**Obrázek 13:** Záznam gelové permeační chromatografie antiHER2\_WT\_HEK293S. Izokratická eluce probíhala na koloně Superdex<sup>TM</sup> 75 Increase 10/300 GL. Modrá čára představuje profil eluce, svislé černé čáry zobrazují jímání frakce 27-37. Glykosylovaná forma antiHER2\_WT\_HEK293S měla vrchol elučního objemu v 14,57 ml, zatímco neglykosylovaná forma měla vrchol elučního objemu v 15,41 ml.



**Obrázek 14: SDS-PAGE frakcí obou glykosylačních forem antiHER2\_WT\_HEK293S.** 12,5% neredukující polyakrylamidový gel. V dráze *st* se nachází standard molekulových hmotností. Proužky s vyšší molekulovou hmotností patří glykosylované formě nanoprotilátky a proužky s nižší molekulovou hmotností patří neglykosylované formě nanoprotilátky.

### 5.2.5. Deglykosylace antiHER2 z produkce v linii HEK293S GnTI<sup>-</sup>

Protein antiHER2\_WT\_HEK293S byl smíchán s endoglykosidázou ENDO F<sub>1</sub> a inkubován přes noc při 37 °C. Následně byl deglykosylovaný protein purifikován gelovou permeační chromatografií. Frakce byly při izokratické eluci jímány do 1,5ml mikrozkušavek po 250 µl. Jako eluční pufr byl použit PBS-TK pufr. Polyakrylamidový gel a záznam gelové permeační chromatografie jsou na Obr. 15.



**Obrázek 15: Záznam gelové permeační chromatografie deglykosylované nanoprotilátky antiHER2\_WT\_HEK293S a její analýza pomocí SDS-PAGE.** Vlevo: Izokratická eluce na koloně Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL. Modrá čára představuje eluční profil, zatímco svislé černé čáry zobrazují rozsah jímáných frakcí. Vpravo: 12,5% neredukující polyakrylamidový gel. V dráze *st* se nachází standard molekulových hmotností. V dráze **1** se nachází mix glykosylačních forem nanoprotilátky antiHER2\_WT\_HEK293S. V dráze **2** se nachází deglykosylovaná nanoprotilátka antiHER2\_WT\_HEK293S.

### 5.3. Expres a purifikace proteinu antiHER2\_N32Q

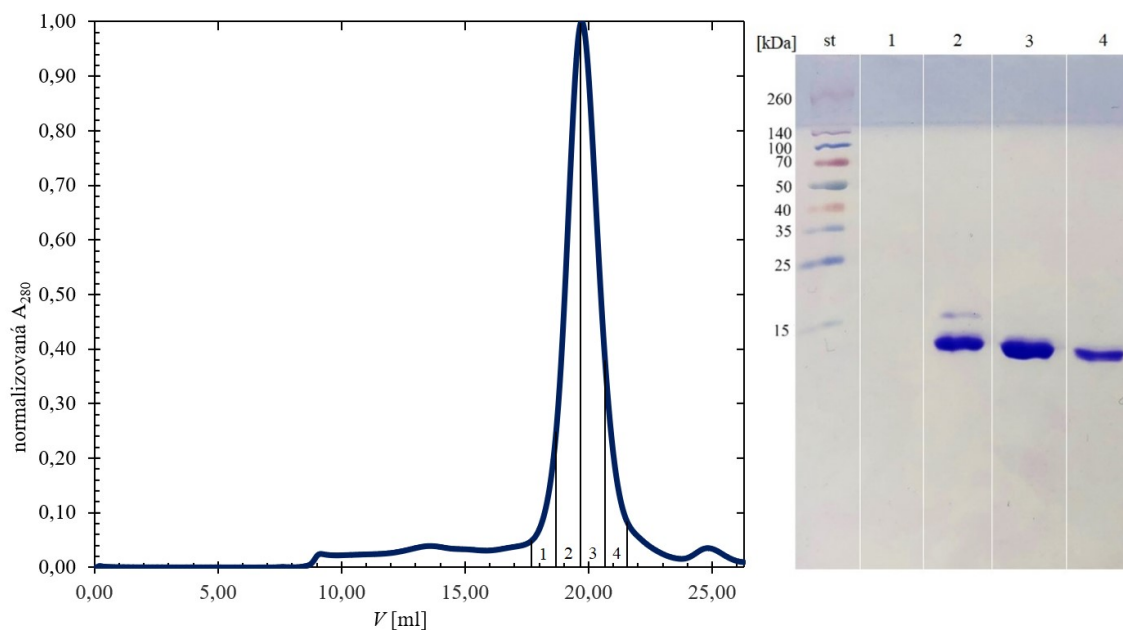
#### 5.3.1. Expres proteinu antiHER2\_N32Q v buněčné linii HEK293T

Pro expresi přirozeně glykosylované nanoprotilátky antiHER2\_N32Q byla použita buněčná linie HEK293T. Postup pro expresi nanoprotilátky antiHER2\_N32Q byl stejný jako u exprese nanoprotilátky antiHER2 v linii HEK293T (viz 5.2.1., str. 39).

#### 5.3.2. Purifikace proteinu antiHER2\_N32Q

Postup purifikace proteinu antiHER2\_N32Q byl stejný jako u purifikace proteinu antiHER2 produkovaného v buněčné linii HEK293T (viz 5.2.3., str. 39). Pro purifikaci proteinu antiHER2\_N32Q při gelové permeační chromatografii byla použita kolona Superdex™ 200 30/100 GL a frakce byly jímány po 1 ml.

Na záznamu gelové permeační chromatografie lze vidět jeden pík představující nanoprotilátku antiHER2\_N32Q. Protein se podařilo úspěšně purifikovat bez významných kontaminací, což potvrzuje polyakrylamidový gel. Záznam gelové permeační chromatografie proteinu antiHER2\_N32Q a výsledek SDS-PAGE frakcí tohoto proteinu jsou znázorněny na Obr. 16.



**Obrázek 16:** Záznam gelové permeační chromatografie nanoprotilátky antiHER2\_N32Q a SDS-PAGE analýzy eluovaných frakcí. Vlevo: Izokratická eluce na koloně Superdex™ 200 10/300 GL. Modrá čára představuje eluční profil, zatímco svislé černé čáry zobrazují jímání frakce 1-4. Vrchol elučního maxima antiHER2\_N32Q byl v 19,73 ml. Vpravo: 12,5% neredukující polyakrylamidový gel. V dráze st se nachází standard molekulových hmotností. V ostatních drahách se nacházejí frakce 1-4 proteinu antiHER2\_N32Q.

## 5.4. Expres a purifikace proteinu antiHER2\_S34A

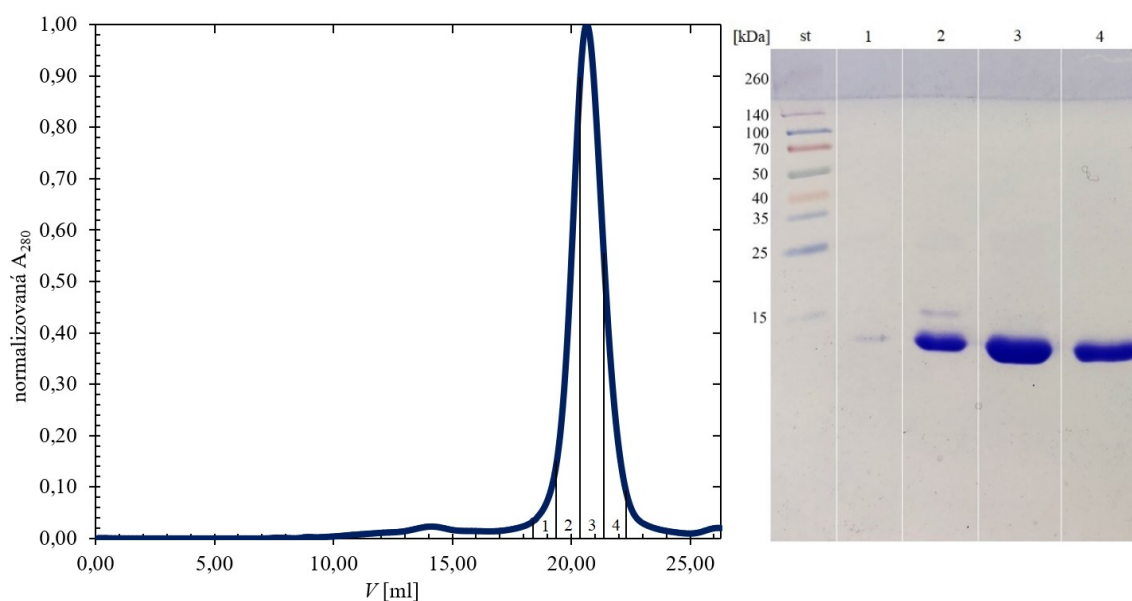
### 5.4.1. Expres proteinu antiHER2\_S34A v buněčné linii HEK293T

Pro expresi přirozeně glykosylované nanoprotilátky antiHER2\_S34A byla použita buněčná linie HEK293T. Postup pro expresi nanoprotilátky antiHER2\_S34A byl stejný jako u exprese nanoprotilátky antiHER2 v buněčné linii HEK293T (viz 5.2.1., str. 39).

### 5.4.2. Purifikace proteinu antiHER2\_S34A

Postup purifikace proteinu antiHER2\_S34A byl stejný jako u purifikace proteinu antiHER2 produkovaného v buněčné linii HEK293T (viz 5.2.3., str. 39). Pro purifikaci proteinu antiHER2\_S34A při gelové permeační chromatografii byla použita kolona Superdex™ 200 30/100 GL a frakce byly jímány po 1 ml.

Na záznamu gelové permeační chromatografie lze vidět pouze jeden pík představující nanoprotilátku antiHER2\_S34A. Protein se podařilo purifikovat bez kontaminací, což potvrzuje polyakrylamidový gel. Záznam gelové permeační chromatografie proteinu antiHER2\_S34A a výsledek SDS-PAGE frakcí tohoto proteinu jsou znázorněny na Obr. 17.



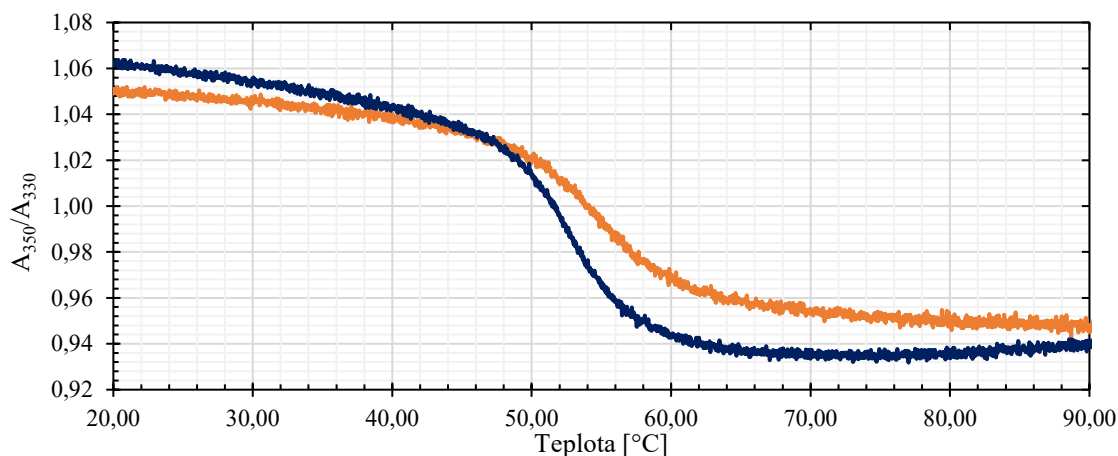
**Obrázek 17:** Záznam gelové permeační chromatografie nanoprotilátky antiHER2\_S34A a SDS-PAGE analýzy eluovaných frakcí. Vlevo: Izokratická eluce na koloně Superdex™ 200 10/300 GL. Modrá čára představuje eluční profil, zatímco svíslé černé čáry zobrazují jímání frakce 1-4. Vrchol elučního maxima antiHER2\_S34A byl v 20,63 ml. Vpravo: 12,5% neredukující polyakrylamidový gel. V dráze st se nachází standard molekulových hmotností. V ostatních dráhách se nacházejí frakce 1-4 proteinu antiHER2\_S34A.

## 5.5. Měření termální stability mutovaných nanoprotilátek

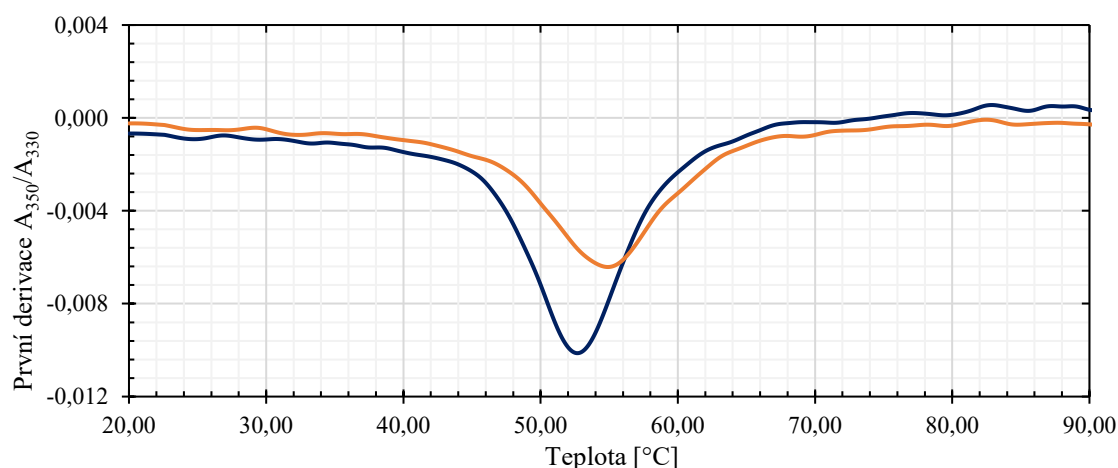
Termální stabilita nanoprotilátek antiHER2\_N32Q a antiHER2\_S34A byla stanovena pomocí metody nanoDSF (Nano Differential Scanning Fluorimetry) [75]. Změna fluorescence v závislosti na teplotě u obou proteinů byla měřena na přístroji Prometheus NT.48 a data byla sbírána při dvou vlnových délkách – 350 a 330 nm, byla tedy měřena vnitřní fluorescence proteinu bez použití fluorescenční značky. Pomocí nanoDSF lze zjistit nejen teplota tání proteinu, ale i stupeň agregace.

Z grafu změny poměru fluorescence dvou vlnových délek ( $A_{350}/A_{330}$ ) v závislosti na teplotě lze získat informaci o denaturaci proteinu (Obr. 18). Přesnější hodnoty teploty tání jednotlivých proteinů lze získat provedením první derivace poměru absorbancí při 350 a 330 nm (Obr. 19). Pomocí nanoDSF lze také vyhodnotit agregaci vzorků. V tomto případě se měří intenzita rozptylu světla opět v závislosti na teplotě (Obr. 20, str. 47).

Teplota tání proteinu antiHER2\_S34A je 54,9 °C a teplota tání proteinu antiHER2\_N32Q je 52,7 °C. Z toho lze soudit, že nanoprotilátka antiHER2\_S34A je stabilnější než nanoprotilátka antiHER2\_N32Q, rozdíl hodnot však není významný.

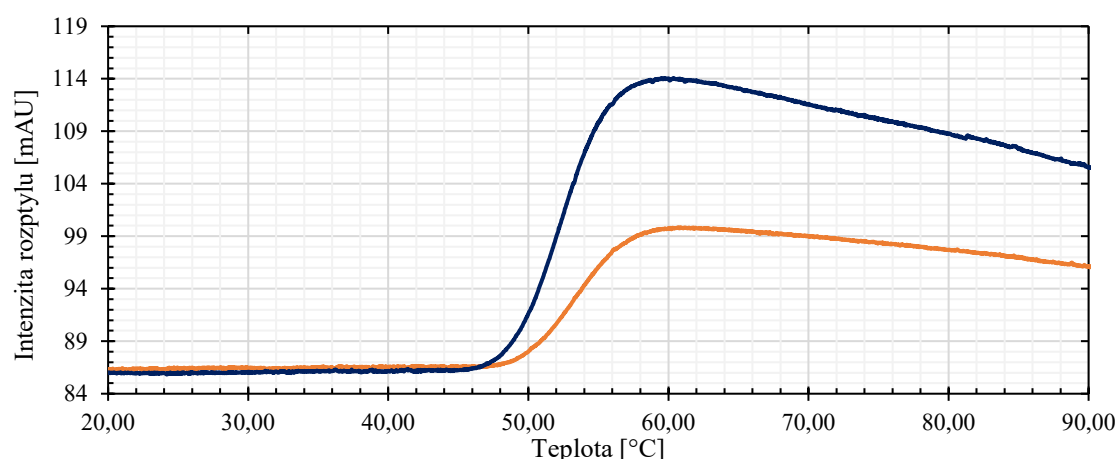


*Obrázek 18: Závislost poměru absorbancí  $A_{350}/A_{330}$  na tepelném přírůstku. Modrá křivka představuje protein antiHER2\_N32Q, oranžová křivka představuje antiHER2\_S34A.*



*Obrázek 19: Závislost první derivace poměru absorbancí  $A_{350}/A_{330}$  na tepelném přírůstku. Modrá křivka představuje protein antiHER2\_N32Q s  $T_m = 52,7$  °C, oranžová křivka představuje protein antiHER2\_S34A s  $T_m = 54,9$  °C.*





*Obrázek 20: Závislost intenzity rozptylu světla na tepelném přírůstku. Modrá křivka představuje protein antiHER2\_N32Q, oranžová křivka představuje antiHER2\_S34A.*

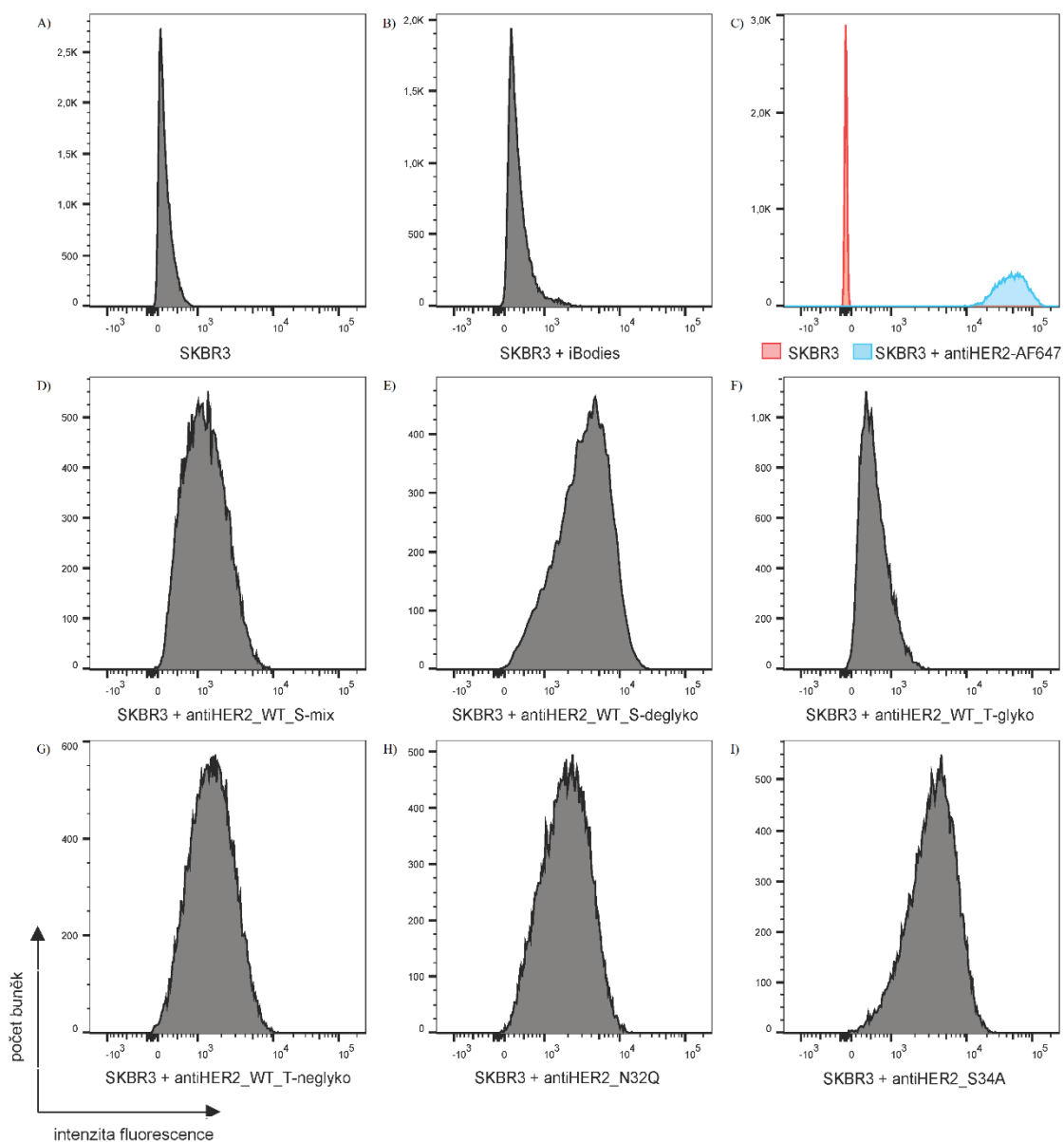
## 5.6. Ověření vazby nanoprotilátek na povrch buněčné linie

Pomocí metody průtokové cytometrie byla studována interakce jednotlivých glykosylačních forem nanoprotilátky antiHER2 s HER2<sup>+</sup> nádorovou buněčnou linií SK-BR3. Exprese HER2 receptorů na povrchu buněk SK-BR3 byla ověřena vazbou komerční antiHER2 protilátky značené fluorescenční sondou AlexaFluor647. Počet naměřených událostí pro každý z proteinů byl 27-30 tisíc buněk. Stupeň značení byl pro všechny glykosylační formy proteinu antiHER2 stejný, tudíž lze výsledné histogramy mezi sebou porovnávat.

Z výsledků průtokové cytometrie v Tab. 6 a na Obr. 21, str. 48 je patrné, že neglykosylované (histogram G) či deglykosylované (histogram E) formy nanoprotilátky antiHER2 se váží lépe než nanoprotilátky s komplexním typem glykosylace (histogram F) nebo směs glykoforem nanoprotilátky s glykosylací manosového typu (histogram D). Mutované antiHER2 nanoprotilátky antiHER2\_N32Q (histogram H) a antiHER2\_S34A (histogram I) se váží podobně jako neglykosylované či deglykosylované formy nanoprotilátky. Směs obou glykoforem nanoprotilátky antiHER2\_WT\_HEK293S (histogram D) se váže lépe než nanoprotilátky glykosylované, ale hůře než nanoprotilátky neglykosylované či deglykosylované.

*Tabulka 6: Medián intenzit fluorescence vzorků měřených průtokovou cytometrií*

Vzorek	Medián intenzit fluorescence (MFI)
SKBR3	233
SKBR3 + iBodies	347
SKBR3 + antiHER2-AF647	47789
SKBR3 + iBodies + antiHER2_WT_S-mix	1237
SKBR3 + iBodies + antiHER2_WT_S-deglyko	3372
SKBR3 + iBodies + antiHER2_WT_T-glyko	527
SKBR3 + iBodies + antiHER2_WT_T-neglyko	1487
SKBR3 + iBodies + antiHER2_N32Q	1935
SKBR3 + iBodies + antiHER2_S34A	3518



**Obrázek 21:** Analýza vazby glykosylačních variant nanoprotilátky antiHER2 na HER2<sup>+</sup> buněčnou linií SK-BR3 pomocí průtokové cytometrie. Histogramy znázorňují počty buněk s odpovídající intenzitou fluorescence. V prvním řádku jsou kontrolní měření **A)** samostatné SK-BR3 buňky, **B)** SK-BR3 buňky a iBodies ATTO488 bez přítomnosti nanoprotilátky, **C)** kontrola SK-BR3 buněk s komerční protilátkou značenou AlexaFluor647. Na dalších dvou řádcích jsou zobrazeny histogramy měřené se vzorky jednotlivých glykosylačních forem nanoprotilátky antiHER2. V druhém řádku jsou na histogramu **D)** SK-BR3 buňky se směsí obou glykosylačních forem nanoprotilátky antiHER2\_WT\_HEK293S, **E)** SK-BR3 buňky s nanoprotilátkou antiHER2\_WT\_HEK293S deglykosylovanou endoglykosidázou ENDO F1, **F)** SK-BR3 buňky s glykosylovanou formou nanoprotilátky antiHER2\_WT\_HEK293T. Na třetím řádku jsou na histogramu **G)** SK-BR3 buňky s neglykosylovanou formou nanoprotilátky antiHER2\_WT\_HEK293T, **H)** SK-BR3 buňky s nanoprotilátkou antiHER2\_N32Q, **I)** SK-BR3 buňky s nanoprotilátkou antiHER2\_S34A.



## 6. Diskuse

Tato práce se věnuje přípravě konstruktů proteinu, který se váže na receptor HER2. Tento protein je fragment lami protilátky, také nazývaný nanoprotilátka. Sekvenci poskytl prof. Ario de Marco, Univerzita Nová Gorica, Slovinsko. Nanoprotilátka byla selektována pomocí metody „phage display“, který využívá expresi knihovny fúzních fágů a nanoprotilátek v *E. coli*. V tomto expresním systému jsou pak také obvykle nanoprotilátky připravovány. Budoucí práce však předpokládá využití této nanoprotilátky jako součást terapeutických proteinů, cílicích rakovinné linie a aktivující buňky imunitního systému, přičemž druhou složkou těchto fúzních proteinů jsou další proteiny studované v Laboratoři strukturní biochemie imunitního rozpoznávání, konkrétně např. ligandy pro aktivační receptory NK buněk. Tyto ligandy však nelze exprimovat v bakteriálním systému, neboť obsahují disulfidické můstky a vlastní místa N-glykosylace, která je důležitá i pro jejich stabilitu, a jsou v laboratoři běžně připravovány v expresním systému buněčné linie HEK293. Proto jsme přistoupili k expresi nanoprotilátky v této buněčné linii. Analýzou její sekvence však bylo zjištěno, že její konstrukt obsahuje neočekávaně místo pro N-glykosylaci, a to navíc přímo v paratopu rozpoznávajícím HER2 receptor. Toto místo by při bakteriální expresi glykosylováno nebylo, avšak při expresi v buněčné linii HEK293 zde ke glykosylaci dochází. Proto bylo potřeba ověřit, jestli glykosylace v sekvenci antiHER2 ovlivňuje vazbu na cílovou HER2<sup>+</sup> nádorovou buněčnou linii SK-BR3.

Cílem práce tedy byla exprese nanoprotilátky antiHER2 s přirozenou a s jednoduchou homogenní glykosylací, klonování a exprese nanoprotilátky antiHER2 s mutovaným glykosylačním místem a ověření vazby glykosylačních forem nanoprotilátky antiHER2 na povrch buněčné linie exprimující HER2 receptor. Byly navrženy dvě mutace v sekvenci, N32Q a S34A. Každá z nich ruší místo pro N-vázanou glykosylaci. Důvodem pro dvě mutace byla obava z toho, že mutace může relativně malý protein destabilizovat nebo že naruší vazbu na receptor HER2.

Chromatogramy proteinu nanoprotilátky antiHER2\_WT\_HEK293T s přirozenou glykosylací (Obr. 10, str. 40 a Obr. 11, str. 41) svědčí o přítomnosti jak glykosylované, tak neglykosylované formy proteinu. Pomocí gelové permeační chromatografie se podařilo obě formy oddělit, což je zřejmé z polyakrylamidového gelu na Obr. 12, str. 41, a díky tomu bylo možné studovat jejich interakci s SK-BR3 buněčnou linií s každou formou samostatně. Naopak pro nanoprotilátku antiHER2\_WT\_HEK293S s jednoduchou homogenní glykosylací, u které se také vyskytuje glykosylovaná a neglykosylovaná forma, se glykosylační formy oddělit nepovedlo, což je zřejmé z polyakrylamidového gelu na Obr. 14, str. 43. Důvodem je pravděpodobně příliš malý rozdíl v molekulových hmotnostech glykosylované a neglykosylované formy proteinu, kdy homogenní glykosylace manosového typu obsahuje pouze dvě molekuly N-acetylglukosaminu a pět molekul manosy a má molekulovou hmotnost přibližně 1,2 kDa. Bylo tedy možné studovat pouze interakci povrchu buněčné linie SK-BR3 se směsí obou glykoforem proteinu antiHER2\_WT\_HEK293S a proteinu deglykosylovaného endoglykosidázou ENDO F<sub>1</sub>, což poskytuje přímé porovnání proteinu s glykosylací a bez ní.

U nanoprotilátek s mutovaným glykosylačním místem, tj. antiHER2\_N32Q a antiHER2\_S34A, se podařilo připravit expresní vektory pomocí PCR amplifikace celého výchozího plazmidu a produkované proteiny následně purifikovat chelatační iontovou chromatografií a gelovou permeační chromatografií. Dle profilu gelové permeační chromatografie se proteiny nesráží ani netvoří rozpustné agregáty či oligomery. Termální stabilita obou mutovaných proteinů byla změřena pomocí metody nanoDSF. Teplota tání antiHER2\_N32Q je 52,7 °C a teplota tání antiHER2\_S34A je 54,9 °C, z čehož plyne, že antiHER2\_S34A je za daných podmínek mírně stabilnější, než antiHER2\_N32Q, ale rozdíl není zásadní (Obr. 19, str. 46).

Výsledky měření interakce jednotlivých glykosylačních forem antiHER2 nanoprotilátek s HER2<sup>+</sup> nádorovou buněčnou linií SK-BR3 pomocí průtokové cytometrie jsou znázorněny v Tab. 6, str. 47 a na Obr. 21, str. 48. Z kontrolních grafů v prvním řádku obrázku můžeme konstatovat, že buněčná linie SK-BR3 na svém povrchu exprimuje HER2 receptory, a že nedochází k nežádoucím nespecifickým interakcím mezi iBodies polymerem nesoucím fluorescenční značku ATTO488 a buněčnou linií SK-BR3.

Nanoprotilátky antiHER2\_N32Q, antiHER2\_S34A, deglykosylované antiHER2\_WT\_HEK293S a neglykosylované antiHER2\_WT\_HEK293T, tedy varianty bez glykosylace, vykazují lepší vaznost na povrch buněčné linie SK-BR3 než glykosylované varianty nanoprotilátky. Jak deglykosylovaná, tak mutovaná nanoprotilátka postrádají přirozenou glykosylaci v oblasti vazebného místa, a to zvyšuje jejich schopnost se vázat na HER2 receptor. Naopak glykosylovaná forma antiHER2\_WT\_HEK293T vykazuje nízkou vaznost, což je způsobeno přítomností relativně velkého oligosacharidu přirozené glykosylace v oblasti vazebného místa a dochází tak k sterickému bránění vzájemné interakce nanoprotilátky a HER2 receptoru.

Z Tab. 6, str. 47 a z Obr. 21, str. 48 se zdá, že nanoprotilátka antiHER2\_N32Q se váže hůře než antiHER2\_S34A. Důvodem menší vaznosti antiHER2\_N32Q oproti antiHER2\_S34A, navzdory velmi podobné struktuře, může být stabilita proteinu antiHER2\_N32Q, která je dle výsledků měření nanoDSF menší než proteinu antiHER2\_S34A. Pro potvrzení signifikantního rozdílu ve vazbě obou mutovaných proteinů by bylo nutné provést více měření a statisticky je vyhodnotit.

Směs glykosylačních forem antiHER2\_WT\_HEK392S se váže lépe než glykosylované proteiny, ale hůře než neglykosylované. Příčinou může být jednak to, že máme směs glykosylovaného a neglykosylovaného proteinu, a dále fakt, že oligosacharidy nacházející se na nanoprotilátce produkované buněčnou linií HEK293S GnTI jsou jednoduché a v porovnání s přirozenou komplexní glykosylací nacházející se na nanoprotilátce produkované buněčnou linií HEK293T jsou výrazně menší. Díky tomu je i pro glykosylovanou formu antiHER2\_WT\_HEK393S snazší se na HER2 receptor navázat.

## 7. Závěr

- Byly připraveny expresní vektory pro mutované formy antiHER2 nanoprotilátky antiHER2\_N32Q a antiHER2\_S34A.
- Byly připraveny obě mutované nanoprotilátky – antiHER2\_N32Q a antiHER2\_S34A.
- Byla připravená přirozeně glykosylovaná nanoprotilátka antiHER2 v expresním systému HEK293T.
- Podařilo se připravit homogenně glykosylovanou nanoprotilátku antiHER2 v expresním systému HEK293S GnTI, protein byl následně úspěšně deglykosylován.
- Bylo zjištěno, že přítomnost glykosylace ovlivňuje vazbu nanoprotilátky antiHER2 na povrch HER2<sup>+</sup> buněčné linie, lepší vazbu vykazují neglykosylované nanoprotilátky, tedy i obě mutované formy antiHER2\_N32Q a antiHER2\_S34A.

## 8. Literatura

1. Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. Basic Concepts in Immunology. *Immunobiology (Seventh Edition)*; Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, **2008**; s. 1-38.
2. The Nobel Prize in Physiology or Medicine **1901**. Dostupné online: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1901/behring/biographical/> (navštíveno dne 22.3.2020).
3. A.G.N. The Late Baron Shibasaburo Kitasato. *Canadian Medical Association Journal* **1931**; *25*, s. 206.
4. Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdlička, T.; Špíšek, R. Základní pojmy, funkce a složky imunitního systému. *Základy imunologie (5.vydání)*; Triton, **2013**; s. 23-32.
5. Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. The detection, measurement, and characterization of antibodies and their use as research and diagnostic tools. *Immunobiology (Seventh Edition)*; Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, **2008**; s. 740-782.
6. Chames, P.; Van Regenmortel, M.; Weiss, E.; Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology* **2009**; *157*, s. 220-233.
7. Scott, A.M.; Wolchok, J.D.; Old, L.J. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **2012**; *12*, s. 278-287.
8. Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology* **2018**, *36*, s. 1136-1145.
9. Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdlička, T.; Špíšek, R. Antigenně specifické receptory. *Základy imunologie (5.vydání)*; Triton, **2013**; s. 61–69.
10. Bannas, P.; Hambach, J.; Koch-Nolte, F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Frontiers in Immunology* **2017**; *8*, 1603.
11. Arbabi-Ghahroudi, M. Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook. *Frontiers of Immunology* **2017**; *8*, 1589.
12. Vincke, C.; Muyldermans, S. Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies. *Methods in Molecular Biology* **2012**; *911*, s. 15–26.
13. Conrath, K.E.; Wernery, U.; Muyldermans, S.; Nguyen, V.K. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Developmental & Comparative Immunology* **2003**; *27*, s. 87–103.
14. Flajnik, M.F.; Deschacht, N.; Muyldermans, S. A Case Of Convergence: Why Did a Simple Alternative to Canonical Antibodies Arise in Sharks and Camels? *PLoS Biology* **2011**; *9*, e1001120.
15. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry* **2013**; *82*, s. 775–797.
16. Muyldermans, S.; Baral, T.N.; Retamozzo, V.C.; De Baetselier, P.; De Genst, E.; Kinne, J.; Leonhardt, H.; Magez, S.; Nguyen, V.K.; Revets, H.; et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2009**; *128*, s. 178–183.
17. Wörn, A.; Plückthun, A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of Molecular Biology* **2001**; *305*, s. 989-1010.

18. Koch-Nolte, F.; Reyelt, J.; Schössow, B.; Schwarz, N.; Scheuplein, F.; Rothenburg, S.; Haag, F.; Alzogaray, V.; Cauerhff, A.; Goldbaum, F.A. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *The FASEB Journal* **2007**; *21*, s. 3490-3498.
19. Bazan, J.; Calkosiński, I.; Gamian, A. Phage display – A powerful technique for immunotherapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **2012**; *8*, s. 1817–1828.
20. Krumpal, L.R.H.; Atkinson, A.J.; Smythers, G.W.; Kandel, A.; Schumacher, K.M.; McMahon, J.B.; Makowski, L.; Mori, T. T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries. *Proteomics* **2006**; *6*, s. 4210–4222.
21. Monegal, A.; Olichon, A.; Bery, N.; Filleron, T.; Favre, G.; de Marco, A. Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (*Lama glama*) naïve libraries. *Developmental & Comparative Immunology* **2012**; *36*, s. 150–156.
22. Löfblom, J.; Frejd, F.Y. Alternative Scaffolds as Bispecific Antibody Mimetics. *Bispecific Antibodies*; Springer, **2011**; s. 115-133.
23. Griffiths, K.; Dolezal, O.; Cao, B.; Nilsson, S.K.; See, H.B.; Pflieger, K.D.G.; Roche, M.; Gorry, P.R.; Pow, A.; Viduka, K.; et al. i-bodies, Human Single Domain Antibodies That Antagonize Chemokine Receptor CXCR4. *Journal of Biological Chemistry* **2016**; *291*, s. 12641-12657.
24. AdAlta - Developing i-body drugs to treat fibrotic diseases. Dostupné online: <http://adalta.com.au/technology/i-bodies/> (navštíveno dne 1.6.2020).
25. Plückthun, A. Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPin): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2015**; *55*, s. 489–511.
26. Bennett, V.; Baines, A.J. Spectrin and Ankyrin-Based Pathways: Metazoan Inventions for Integrating Cells Into Tissues. *Physiological Reviews* **2001**; *81*, s. 1353–1392.
27. Wu, Y.; Batyuk, A.; Honegger, A.; Brandl, F.; Mittl, P.R.E.; Pluckthun, A. Rigidly connected multispecific artificial binders with adjustable geometries. *Scientific Reports* **2017**; *7*, 11217.
28. Seeger, M.A.; Zbinden, R.; Flütsch, A.; Gutte, P.G.M.; Engeler, S.; Roschitzki-Voser, H.; Grütter, M.G. Design, construction, and characterization of a second-generation DARPin library with reduced hydrophobicity. *Protein Science* **2013**; *22*, s. 1239-1257.
29. Binz, H.K.; Kohl, A.; Plückthun, A.; Grütter, M.G. Crystal structure of a consensus-designed ankyrin repeat protein: implications for stability. *Proteins* **2006**; *65*, s. 280-284.
30. Theurillat, J.-P.; Dreier, B.; Nagy-Davidescu, G.; Seifert, B.; Behnke, S.; Zürcher-Härdi, U.; Ingold, F.; Plückthun, A.; Moch, H. Designed ankyrin repeat proteins: a novel tool for testing epidermal growth factor receptor 2 expression in breast cancer. *Modern Pathology* **2010**; *23*, s. 1289–1297.
31. Tumor Markers. Dostupné online: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet> (dostupné dne 2.4.2020).
32. Baba, A.I.; Cătoi, C. Tumor Cell Morphology. *Comparative Oncology*; The Publishing House of the Romanian Academy, **2007**.

33. Bonaventura, P.; Shekarian, T.; Alcazer, V.; Valladeau-Guilemond, J.; Valsesia-Wittmann, S.; Amigorena, S.; Caux, C.; Depil, S. Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Frontiers of Immunology* **2019**; *10*, 168.
34. Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdlička, T.; Špíšek, R. Protinádorová imunita. *Základy imunologie (5.vydání)*; Triton, **2013**; s. 195–202.
35. Karpf, A.R. Cancer Germline Antigens. *Encyclopedia of Cancer*; Springer, **2009**; s. 478–479.
36. Chomez, P.; Backer, O.D.; Bertrand, M.; Plaen, E.D.; Boon, T.; Lucas, S. An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family. *Cancer Research* **2001**; *61*, s. 5544–5551.
37. Vital, E.M.; Dass, S.; Emery, P. 60 – B-cell depletion. *Rheumatology (Sixth Edition)*; Elsevier Health Sciences, **2015**; s. 472–478.
38. Boross, P.; Leusen, J.H.W. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *American Journal of Cancer Research* **2012**; *2*, s. 676–690.
39. Lin, T.S. Ofatumumab: a novel monoclonal anti-CD20 antibody. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* **2010**; *3*, s. 51–59.
40. Drafaehl, K.A.; McAndrew, C.W.; Donoghue, D.J. Chapter 237 – Signaling from Fibroblast Growth Factor Receptors in Development and Disease. *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*; Academic Press, **2010**; s. 1939–1947.
41. Mansfield, A.S.; Dy, G.K.; Ahn, M.-J.; Adjei, A.A. 48 – New Targets for Therapy in Lung Cancer. *IASLC Thoracic Oncology (Second Edition)*; Elsevier Health Sciences, **2018**; s. 479–489.
42. Katoh, M.; Nakagama, H. FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics. *Medicinal Research Reviews* **2014**; *34*, s. 280–300.
43. Dębska, S. Systematic treatment of HER2+ breast cancer patients. Part 1. *Current Gynecologic Oncology* **2011**; *9*, s. 227–237.
44. Fukushige, S.; Matsubara, K.; Yoshida, M.; Sasaki, M.; Suzuki, T.; Semba, K.; Toyoshima, K.; Yamamoto, T. Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Molecular and Cellular Biology* **1986**; *6*, s. 955–958.
45. Rubin, I.; Yarden, Y. The basic biology of HER2. *Annals of Oncology* **2001**; *12*, s. 3–8.
46. van der Geer, P.; Hunter, T.; Lindberg, R.A. Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Their Signal Transduction Pathways. *Annual Review of Cell Biology* **1994**; *10*, s. 251–337.
47. Kanthala, S.; Mill, C.P.; Riese, D.J.; Jaiswal, M.; Jois, S. Expression And Purification Of HER2 Extracellular Domain Proteins In Schneider2 Insect Cells. *Protein Expression and Purification* **2016**; *125*, s. 26–33.
48. Brennan, P.J.; Kumogai, T.; Berezov, A.; Murali, R.; Greene, M.I. HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene* **2000**; *19*, s. 6093–6101.
49. Cho, H.-S.; Mason, K.; Ramyar, K.X.; Stanley, A.M.; Gabelli, S.B.; Denney, D.W.; Leahy, D.J. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **2003**; *421*, s. 756–760.
50. Meza-Junco, J.; Au, H.-J.; Sawyer, M.B. Critical appraisal of trastuzumab in treatment of advanced stomach cancer. *Cancer Management and Research* **2011**; *3*, s. 57–64.

51. Mitri, Z.; Constantine, T.; O'Regan, R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy Research and Practice* **2012**; *2012*, 743193.
52. Valabrega, G.; Montemurro, F.; Aglietta, M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of Oncology* **2007**; *18*, s. 977–984.
53. Fernández-Nogueira, P.; Mancino, M.; Fuster, G.; López-Plana, A.; Jauregui, P.; Almendro, V.; Enreig, E.; Menéndez, S.; Rojo, F.; Noguera-Castells, A.; et al. Tumor-Associated Fibroblasts Promote HER2-Targeted Therapy Resistance through FGFR2 Activation. *Clinical Cancer Research* **2020**; *26*, s. 1432–1448.
54. The Nobel Prize in Physiology or Medicine **2018**. Dostupné online: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/press-release/> (navštíveno dne 30.3.2020).
55. Gyles, C. Cancer immunotherapy - a promising approach. *Canadian Veterinary Journal* **2018**; *59*, s. 825-827.
56. Tsumoto, K.; Isozaki, Y.; Yagami, H.; Tomita, M. Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy* **2019**; *11*, s. 119-127.
57. Hudis, C.A. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *New England Journal of Medicine* **2007**; *357*, s. 39–51.
58. Brahmer, J.R.; Tykodi, S.S.; Chow, L.Q.M.; Hwu, W.J.; Topalian, S.L.; Hwu, P.; Drake, C.G.; Camacho, L.H.; Kauh, J.; Odunsi, K.; et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine* **2012**; *366*, s. 2455–2465.
59. Deyev, S.M.; Lebedenko, E.N. Modern Technologies for Creating Synthetic Antibodies for Clinical application. *Acta Naturae* **2009**; *1*, s. 32–50.
60. Liu, H.; Saxena, A.; Sidhu, S.S.; Wu, D. Fc Engineering for Developing Therapeutic Bispecific Antibodies and Novel Scaffolds. *Frontiers in Immunology* **2017**; *8*, 38.
61. Fan, G.; Wang, Z.; Hao, M.; Li, J. Bispecific antibodies and their applications. *Journal of Hematology & Oncology* **2015**; *8*, 130.
62. Kriangkum, J.; Xu, B.; Nagata, L.P.; Fulton, R.E.; Suresh, M.R. Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. *Biomolecular Engineering* **2001**; *18*, s. 31–40.
63. Attarwala, H. Role of antibodies in cancer targeting. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* **2010**; *1*, s. 53-56.
64. Brinkmann, U.; Kontermann, R.E. The making of bispecific antibodies. *mAbs* **2017**; *9*, s. 182–212.
65. Cmunt, D. Příprava fúzních domén lidských imunoreceptorů pro jejich využití v imunoterapii; **2019**.
66. Mix & Go E. coli Transformation Kit & Buffer Set Protocol. Dostupné online: [https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_t3001\\_t3002\\_mix\\_go\\_e\\_coli\\_transformation\\_kit\\_buffer\\_set.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_t3001_t3002_mix_go_e_coli_transformation_kit_buffer_set.pdf) (navštíveno dne 6.6.2020).
67. ExpASy - ProtParam tool. Dostupné online: <https://web.expasy.org/protparam/> (navštíveno dne 6.6.2020).
68. Šácha, P.; Knedlík, T.; Schimer, J.; Tykvart, J.; Parolek, J.; Navrátil, V.; Dvořáková, P.; Sedlák, F.; Ulbrich, K.; Strohalm, J.; et al. iBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with

- Functional Moieties. *Angewandte Chemie International Edition in English* **2016**; *55*, s. 2356–2360.
69. Guex, N.; Peitsch, M.C.; Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* **2009**; *30*, s. 162–173.
  70. Bertoni, M.; Kiefer, F.; Biasini, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports* **2017**; *7*, 10480.
  71. Studer, G.; Rempfer, C.; Waterhouse, A.M.; Gumienny, R.; Haas, J.; Schwede, T. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* **2020**; *36*, s. 1765–1771.
  72. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; de Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* **2018**; *46*, s. W296-W303.
  73. Bienert, S.; Waterhouse, A.; de Beer, T.A.P.; Tauriello, G.; Studer, G.; Bordoli, L.; Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research* **2017**; *45*, s. D313-D319.
  74. Mitchell, L.S.; Colwell, L.J. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2018**; *86*, s. 697-706.
  75. nanoDSF Systems for Protein Folding & Stability Analysis. Dostupné online: <https://nanotempertech.com/prometheus/> (navštíveno dne 1.6.2020).