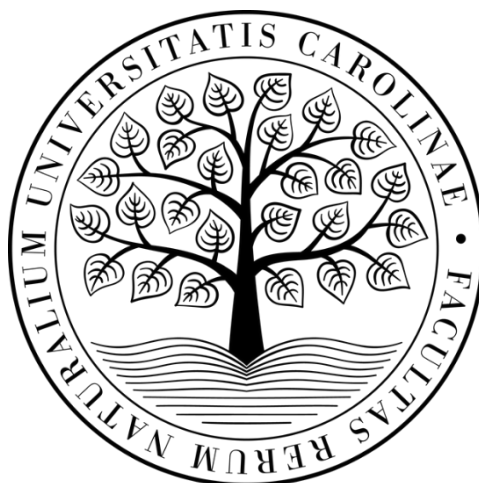


Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Lenka Wojčiková

Studium potenciálu slepičích anti-peptidových protilátek jako prostředku
profylaxe virových infekcí

Study the potential of chicken anti-peptide antibodies as means of viral
infection prophylaxis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 09. 06. 2021

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této bakalářské práce, za trpělivost a cenné rady při jejím vypracování. Rovněž bych ráda poděkovala mým kolegům za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

V roce 2020 byla WHO vyhlášena celosvětová pandemie kvůli nemoci COVID-19, která je způsobovaná virem SARS-CoV-2. Tento vir využívá pro vstup do buňky navázání povrchového „spike“ proteinu na ACE 2 receptor napadené buňky. Očkování se proto zaměřuje na navození produkce protilátek, které tuto vazbu inhibují. Alternativně je možno získat protilátky mimo hostitelský organismus a využít je jako prostředek pasivní imunizace proti nemoci COVID-19. Cílem práce proto bylo připravit slepičí protilátky, IgY, které by byly schopné bránit vazbě viru.

Pro přípravu peptidových imunogenů byly vybrány vhodné sekvence aminokyselin ze struktury RBD domény S1 podjednotky viru SARS-CoV-2, která interaguje s ACE 2 receptorem. Syntetizované peptidy byly navázány na proteinový nosič KLH a vzniklým konjugátem byly imunizovány slepice. Následně byly vytvořené IgY izolovány z vaječného žloutku a za využití metody ELISA byla prokázána schopnost protilátek rozpoznat vybrané peptidy v různých typech antigenů. Poté byly *ex vivo* testovány protektivní vlastnosti protilátek proti viru v buněčných liniích a porovnány s účinností inhibice Remdesivirem. Protilátky byly při testech schopny inhibice vazby viru na buňky, ale výsledek testování byl ovlivněn nízkou počáteční koncentrací protilátek. Proto byla provedena afinitní purifikace protilátek, kterou byly získány pouze specifické anti-peptidové protilátky. U těchto protilátek byla metodou ELISA prokázána mnohonásobně vyšší reaktivita než u původních specifických protilátek. Nakonec byly protilátky testovány na komerčních sadách ELISA s navázaným celým „spike“ proteinem viru SARS-CoV-2 a na rekombinantní antigeny vybraných částí povrchového „spike“ proteinu.

V předkládané práci byla dokázána schopnost protilátek vázat se na virový antigen a zabránit jeho interakci s ACE 2 receptorem. Protilátky by bylo možné aplikovat v podobně nosního spreje, který by sloužil k prevenci proti onemocnění COVID-19.

Klíčová slova: slepičí protilátky, SARS-CoV-2, povrchový S protein, pasivní imunizace, ELISA

Abstract

In 2020, the WHO declared a global pandemic due to the disease COVID-19, which is caused by the SARS-CoV-2 virus. This virus uses the binding of a surface ‘spike’ protein to the affected cell's ACE 2 receptor to enter the cell. Vaccination therefore aims at inducing the production of antibodies that inhibit the virus binding. Alternatively, antibodies can be obtained from other organism and used as a means of passive immunisation against COVID-19 disease. The aim of the work was therefore to prepare chicken antibodies, IgY, that would be able to prevent the virus from binding.

For the preparation of peptide immunogens, appropriate amino acid sequences have been selected from the RBD domain of SARS-CoV-2 S1 protein, which interacts with the ACE 2 receptor. The synthesized peptides were coupled with the KLH protein carrier, and the resulting conjugate was used to immunize hens. Subsequently, the IgY produced was isolated from the egg yolks and their ability to recognise selected peptides in different types of antigens was demonstrated using the ELISA method. After that, the protective properties of antibodies against the virus were tested *ex vivo* in cell lines and their efficiency was compared to that of Remdesivir. The antibodies were able to inhibit virus binding to cells in the assays, but the test result was affected by low initial antibody concentrations. Therefore, affinity purification of antibodies was performed to isolate specific anti-peptide antibodies. Using the ELISA method, these antibodies were shown to be many times more reactive than the original specific antibodies. Finally, antibodies were tested on commercial ELISA kits containing the whole ‘spike’ protein of SARS-CoV-2 virus and on recombinant antigens of selected parts of the surface ‘spike’ protein.

Presented data demonstrated the ability of antibodies to bind to the viral antigen and prevent it from interacting with the ACE 2 receptor. The antibodies could be applied in the form of a nasal spray to prevent COVID-19 disease.

Key words: chicken antibodies, SARS-CoV-2, S protein, passive immunization, ELISA

(in Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	10
1.1 Koronavirová onemocnění	10
1.1.1 Struktura viru	10
1.1.2 Povrchový S protein	11
1.2 Přenos viru	12
1.3 Imunitní systém	13
1.3.1 Vrozená imunita	13
1.3.2 Získaná imunita	14
1.4 Imunizace	14
1.5 Protilátky	15
1.5.1 Struktura protilátek	17
1.5.2 Slepíčí protilátky	18
2 Cíl práce	21
3 Materiály a metody	22
3.1 Použité chemikálie	22
3.2 Použité přístroje a materiály	23
3.3 Metody	24
3.3.1 Výběr peptidu a příprava imunogenu	24
3.3.2 Imunizace a izolace IgY	25
3.3.3 ELISA	27
3.3.4 CPE a IF stanovení	31
3.3.5 Afinitní purifikace IgY	29
4 Výsledky	33
4.1 Výběr peptidu	33
4.2 Izolace protilátek IgY	34

4.3	ELISA	34
4.4	CPE a IF stanovení.....	42
4.5	Afinitní purifikace.....	38
5	Diskuze.....	45
6	Závěr.....	50
	Seznam použité literatury	51

Seznam použitých zkratk

2019-nCoV	„Novel Coronavirus“
A ₄₀₅	absorbance při 405 nm
ACE 2	„Angiotensin-converting enzyme 2“, angiotensin konvertující enzym 2
Ag	antigen
AK	aminokyselina
ARDS	„Acute Respiratory Distress Syndrome“, syndrom akutní dechové tísně dospělých
BLAST	„Basic Local Aligment Search Tool“
BSA	„Bovine Serum Albumine“, hovězí sérový albumin
BSA-CoV1, BSA-CoV2	konjugáty BSA a peptidu CoV1, resp. peptidu CoV2
C	komplement
C1 – C9	systemové proteiny komplementu
CPE	cytopatický efekt
CoV	koronavirus
CoV1, CoV2	protilátky IgY proti syntetizovanému peptidu č. 1, resp. peptidu č. 2
COVID-19	„Coronavirus disease 2019“
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
ER	endoplazmatické retikulum
ERGIC	„Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment“
HCoV	„Human Coronavirus“, lidský koronavirus
ICTV	„International Committee on Taxonomy of Viruses“, Mezinárodní výbor pro klasifikaci virů
Ig	imunoglobulin
ILC buňky	„Innate Lymphoid Cells“, přirozeně lymfoidní buňky
KLH	„Keyhole Lympet Hemocyanin“

MBL	„Manosa Binding Lectins“, lektin vážící manosu
MERS	„Middle East respiratory syndorme“
MOI	„Multiplicity of Infection“, poměr mezi látkami (virem) a cílovými infekcemi (buňkami)
n. a.	„non applicable“, pro toto měření není hodnota
NK buňky	„Natural Killers“, buňky buněčné imunity
NTD	„N-terminal Domain“, N-terminální doména
PBS	„Phosphate Buffered Saline“, fosfátem pufovaný roztok soli
PMS	5-methylfenazanium-methyl-sulfát
pNPP	<i>p</i> -nitrofenylfosfát
Protein E	obalový glykoprotein SARS-CoV-2
Protein M	transmembránový glykoprotein SARS-CoV-2
Protein N	nukleokapsidový protein SARS-CoV-2
Protein S	povrchový spike glykoprotein SARS-CoV-2
RBD	„Receptor Binding Domain“, doména vážící receptor
SARS	„Severe Acute Respiratory Syndrome“, těžký akutní respirační syndrom nebo syndrom náhlého selhání dýchání
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky
WHO	„World Health Organization“, Světová zdravotnická organizace
XTT	tetrazoliová sůl

1 Úvod

1.1 Koronavirová onemocnění

Koronaviry představují významné původce akutních respiračních infekcí. Zoonotické koronaviry byly identifikovány od objevu SARS-CoV v roce 2002. Po detekci SARS-CoV-2 je nyní známo 7 druhů lidských koronavirů, některé z nich se uplatňují jako původci běžných a obvykle nekomplikovaných infekcí horních či dolních cest dýchacích (HCoV-229E, HCoVOC43, HCoV-NL63 a HCoV-HKU1, [1]) patogenními druhy jsou SARS-CoV, MERS-CoV a SARS-CoV-2. Počátkem tohoto století způsobily koronaviry pandemii závažně probíhajících infekcí. Ukázalo se, že původními hostiteli obou těchto virů jsou zřejmě netopýři, z nichž došlo k přenosu na další savce (cibetkovité šelmy v případě SARS-CoV a velbloudy v případě MERS-CoV) a následně na člověka. [1,2]

První případy nákazy „novým typem“ koronaviru byly zaznamenány v prosinci 2019 ve Wu-chanu, v čínské provincii Chu-pej, bylo pro ně typické postižení dolních cest dýchacích. Čínská pobočka Světové zdravotnické organizace (WHO) byla o výskytu nové infekce informována 31. prosince 2019 [3,4], která následně 30. ledna 2020 vyhlásila stav ohrožení veřejného zdraví mezinárodního významu [5] a vzhledem k dalšímu celosvětovému šíření infekce byl výskyt onemocnění COVID-19 Světovou zdravotnickou organizací označen za pandemii dne 11. března 2020 [6]. Jako původce onemocnění byl identifikován nový β -koronavirus, který byl nejprve označen 2019-nCoV („novel coronavirus“) a Mezinárodním výborem pro klasifikaci virů (ICTV) byl pojmenován jako SARS-CoV-2. Onemocnění vyvolané tímto typem viru bylo označeno jako COVID-19 („Coronavirus Disease 2019“) [2].

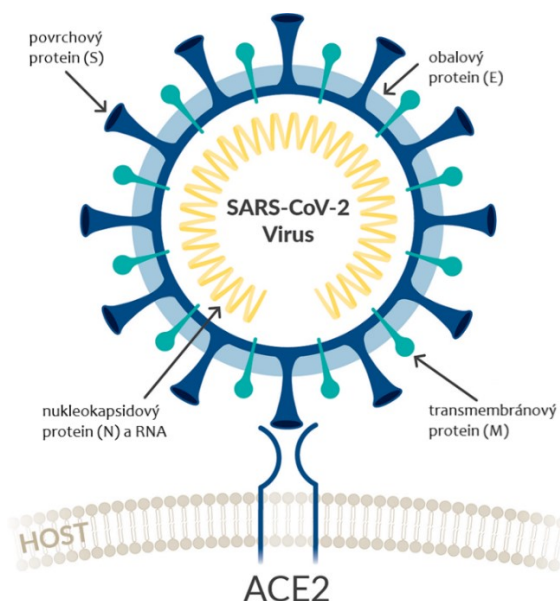
1.1.1 Struktura viru

Koronaviry jsou středně velké obalené viry (60–140 nm), mají genom tvořený nesegmentovanou jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou o velikosti 26–32 kb. Nukleokapsida bývá pleomorfní a obvykle sférického tvaru. Název celé čeledi vznikl odvozením od typického vzhledu virionu, jelikož povrchové S proteiny připomínají věnec či sluneční korunu při zatmění (z lat. *corona* = koruna, věnec). [2]

Koronaviry se dělí do 4 rodů: α -, β -, γ - a δ -koronaviry a rody α a β mohou infikovat savce, zatímco γ a δ infikují savce i ptáky [3,7]. Dosud bylo identifikováno 7 různých lidských koronavirů, které náleží do dvou rodů. Mezi α -koronaviry patří HCoV-229E a

HCoVNL63 a mezi β -koronaviry patří HCoV-OC43, HCoVHKU1, ale i SARS-CoV, SARS-CoV-2 a MERS-CoV [2].

SARS-CoV-2 tvoří 4 hlavní strukturální proteiny (Obrázek 1): povrchový (S), obalový (E), transmembránový glykoprotein (M) a vnitřní fosforylovaný nukleokapsidový protein (N). Genom viru dále kóduje celkem 16 nestructurálních proteinů (nsp1-nsp16) a „akcesorní proteiny“ (přídavné, doplňkové proteiny) nebo další „vedlejší povrchové proteiny“ [2].



Obrázek 1 – Struktura SARS-CoV-2. Zobrazení virové částice SARS-CoV 2 a jejích podstatných částí, z povrchového proteinu (S), obalového proteinu (E), transmembránového proteinu (M), nukleokapsidového proteinu (N) a RNA viru. ACE 2 je receptor, který umožňuje fúzi virové a hostitelské membrány, HOST je hostitelská buňka, kterou virus napadá (převzato a upraveno z [8]).

1.1.2 Povrchový S protein

Povrchový S glykoprotein (z angl. „Spike-glycoprotein“) představuje hlavní faktor virulence. Je tvořen dvěma doménami S1 a S2, které od sebe štěpí peptidasa furin. Podjednotka S1 slouží k vazbě virionu na buněčné receptory a její struktura ovlivňuje afinitu viru. Obsahuje doménu odpovědnou za vazbu na receptor (RBD) a N-terminální doménu (NTD). Právě interakci RBD povrchového S proteinu s buněčnými receptory inhibují tzv. neutralizační protilátky. Druhá podjednotka S2 se uplatňuje během fúze viru s buněčnou membránou. [7,9–11]

S protein je trimerní s molekulovou hmotností monomeru přibližně 150 kDa. Pro vstup do buňky využívá navázání se na povrchový receptor ACE 2 prostřednictvím své

RBD, která specificky rozeznává tento receptor. Aby mohlo dojít k fúzi membrány, musí být virus proteolyticky aktivován proteasami [12]. Po rozštěpení S proteinu dojde k fúzi viru s buňkou pomocí S2 podjednotky a uvolnění virové RNA, která se následně replikuje v hostitelské buňce pomocí RNA dependentní RNA polymerasy [11].

1.2 Přenos viru

K přenosu zvířecích koronavirů na lidskou populaci dochází při těsném kontaktu člověka se zvířaty, přičemž ideální podmínky pro tento přenos byly zřejmě vytvořeny na tržišti v čínském Wu-chanu. Dosud není přesně jasné, z jakého zvířete došlo k přenosu infekce na člověka. Mezi nejbližší příbuzné nového koronaviru patří β -koronaviry izolované od netopýřů. S koronavirem RaTG-13 má sekvenční homologii 96,2 % a s viry bat-SL-CoVZC45 a bat-SL-CoVZXC21 přibližně 88 % [2]. SARS-CoV-2 je snadno přenosný hlavně kapénkami, vzdušnou cestou, proto je vhodné používání ochrany nosu a úst, např. nošení roušky nebo respirátoru. Má $3 \times - 10 \times$ vyšší afinitu k receptorům ACE 2 než původci nemocí SARS a MERS, proto je snadněji přenosný. Ze současného pozorování je zřejmé, že se šíří sezónně jako ostatní respirační onemocnění. K přenosu může také dojít i z kontaminovaného místa a následným dotykem se sliznicí (např. úst, nosu či očí). Proto je vhodné používat desinfekci rukou a potenciálně kontaminovaných míst [13].

Pro vstup do buňky využívá nový koronavirus receptor, angiotensin konvertující enzym 2 (ACE 2), stejně jako původce SARS. Po vstupu viru do buňky se jeho genom uvolní do cytoplazmy a dochází k translaci následované replikací viru. Nově syntetizované povrchové glykoproteiny jsou obaleny membránou z endoplazmatického retikula nebo Golgiho komplexu. Nukleokapsida je vytvořena splynutím nukleokapsidového proteinu a virového genomu. Vzniklé viriony zrají v tzv. ERGIC kompartmentu (z angl. „endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment“) a následně jsou po fúzi s cytoplazmatickou membránou uvolněny z buňky. [2]

Při vstupu do buňky jsou antigeny rozpoznány virově specifickými cytotoxickými T-lymfocyty. Prezentace virových antigenů následně aktivuje pomocí virově specifických T- a B-lymfocytů humorální i buněčnou imunitu. [2]

1.3 Imunitní systém

Imunitní systém je jedním ze základních homeostatických mechanismů organismu. Zajišťuje integritu organismu tím, že rozeznává škodlivé a neškodné látky z vnějšího i vnitřního prostředí. Hlavními funkcemi imunitního systému jsou obranyschopnost, autotolerance, kdy rozpoznává vlastní tkáně a udržuje toleranci vůči nim, a imunitní dohled, při kterém odstraňuje staré, poškozené nebo zmutované buňky. Imunitní systém člověka je dvojího typu – vrozená (neadaptivní, nespecifická) imunita a získaná (adaptivní, specifická) imunita. [14]

1.3.1 Vrozená imunita

Vrozená imunita je založena na molekulách a buňkách, které si organismus vytvořil předem a reagují na celou řadu různých patogenů. Ty reagují na funkční nebo strukturní rysy patogenů, které jsou jim společné. Složky vrozené imunity lze rozdělit na dvě části – buněčnou a humorální (látkovou). Buněčná složka je zajišťována především fagocytujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými buňkami (NK buňky, z angl. „natural killers“). Mezi buňky vrozené imunity patří zvláště leukocyty – makrofágy, monocyty, granulocyty a žírné a dendritické buňky, dále pak některé typy lymfocytů (ILC buňky a NK buňky). Humorální část je tvořena komplementovým systémem, interferony, lektiny a jinými sérovými proteiny. Tato imunitní odpověď je rychlá, v řádu minut. [14]

Při obraně proti infekci se také významně uplatňují další přirozeně neimunitní obranné mechanismy, které lze rozdělit na mechanické, chemické a mikrobiální. Mechanická ochrana spočívá např. v pohybu řasinek nebo podélném toku vzduchu v dýchacích cestách. Chemickou ochranu zajišťují např. mastné kyseliny na kůži, lysozym ve slinách, slzách a potu, pepsin v žaludku či kyselé pH žaludku a moči [14]. Mikrobiální ochranu zprostředkovává přirozený mikrobiom tělních povrchů, např. kůže a sliznice, kde společně žijí aerobní, anaerobní bakterie a kvasinky v symbióze s hostitelem. Tyto mikroorganismy nejsou běžně patogenní a tělu tak neškodí. Ochranu poskytují svou schopností výrazně omezit přežívání a množení patogenů, které se dostaly do těla. Druhou důležitou rolí mikroorganismů je permanentní stimulace imunitního systému [15].

1.3.2 Získaná imunita

Získaná imunita využívá leukocyty, které se dělí na dvě skupiny – T-lymfocyty a B-lymfocyty. T-lymfocyty vznikají v kostní dřeni a dozrávají v brzlíku, při setkání s antigenem zasahují přímo. B-lymfocyty vznikají a dozrávají přímo v kostní dřeni a při kontaktu s antigenem se přemění na tzv. plazmatické buňky, které následně produkují specifické protilátky (imunoglobuliny, Ig) proti příslušnému antigenu. Antigeně specifické T-lymfocyty se po prodělaném boji s patogenem uloží do imunitní paměti a při dalším kontaktu je imunitní odpověď rychlejší a silnější. Ve srovnání s vrozenou imunitou celý tento systém reaguje pomaleji, v řádu dnů až týdnů. [14,16]

1.4 Imunizace

Imunizace organismu se provádí za účelem vyvolání produkce specifických protilátek a navození imunity vůči určitému antigenu či celému patogenu. Existují dva druhy imunizace, a to aktivní a pasivní.

Aktivní imunizace využívá antigen k vyvolání imunitní reakce. Díky tomu může později zabránit vzniku nebo zmírnit průběh infekce stejným nebo podobným mikroorganismem či virem. Většina vakcinací je profylaktická, tedy preventivní, ta má za úkol zabránit možnému onemocnění a je důležité, aby proběhla v dostatečném předstihu před stykem s patogenem. Dále existuje také terapeutická vakcinace (např. u viru vztekliny), kdy se očkuje až po infekci organismu příslušným virem. Pro očkování se používají oslabené živé viry (např. spalničky, příušnice), usmrcené viry (např. chřipka, klíšťová encefalitida), izolované složky virů (např. hepatitida B) nebo toxoidy (chemicky modifikované toxiny). Proti bakteriálním onemocněním se používá inaktivovaná vakcína u černého kašle nebo břišního tyfu, dále atenuovaná vakcína pro onemocnění tuberkulóza nebo břišní tyfus a toxoidová vakcína u záškrtu nebo tetanu. Vakcinace přináší určitá rizika, hlavně u podávání „živé“ vakcíny, kterou nelze očkovat imunitně oslabené pacienty.

Kromě zmíněných postupů imunizace se používají i novější, jako jsou rekombinantní DNA vakcíny a mRNA vakcíny. DNA rekombinantní vakcíny obsahují purifikovanou DNA, která kóduje příslušný antigen patogenu, a je exprimována v buňkách hostitele. Po zachycení antigenu monocyty se rychle tvoří protilátková i T-buněčná imunita. Příkladem mohou být adenovirové vakcíny proti nemoci COVID-19 firmy AstraZeneca nebo vakcína Sputnik V.

Dalším typem jsou mRNA vakcíny, které obsahují mRNA zabalenou do lipidových nanočástic, které jsou endocytovány do různých typů buněk. Tam je mRNA uvolněna a na ribozomu přeložena do proteinu, který je následně transportován na povrch buňky. Část proteinu pak může být sekretována a část vystavena na MHC molekulách, tím pádem se aktivuje jak protilátková, tak T-buněčná imunita. Tyto vakcíny mají několik výhod, jako je např. jejich bezpečnost, účinnost, rychlost výroby, účinnost a snadná možnost aplikace. Na principu mRNA vakcín jsou založeny doposud používané vakcíny proti nemoci COVID-19 od firem Pfizer/BioNTech a Moderna. [14,17,18]

Pasivní imunizace využívá jak zvířecích, lidských, tak i humanizovaných protilátek. Využívá se k prevenci, omezení či zastavení již probíhající infekce. Působení protilátek je okamžité, jelikož způsobí opsonizaci nebo neutralizaci příslušného patogenu. Protilátky také brání adhezi patogenu na epitel hostitelského organismu a tím i rozvoji infekce. Imunita získaná touto cestou je krátkodobá (3–4 týdny) kvůli katabolickému rozpadu IgG. Pasivní imunizace má i své nevýhody, při podání protilátek zvířecího původu může dojít k rozvoji xenoreaktivity a při opakovaném podání k projevům sérové nemoci. To lze ovšem vyřešit humanizací protilátek a podáním pouze jedné monoklonální protilátky. Nejčastěji se takto aplikují zvířecí protilátky proti botulotoxinu nebo proti hadímu jedu. Pasivní imunizace je vhodná pro pacienty, kteří jsou v riziku určité infekce. Takto lze chránit např. před spalničkami (u imunosuprimovaných dětí) nebo před hepatitidou A u neimunizovaných jedinců. [14,19,20]

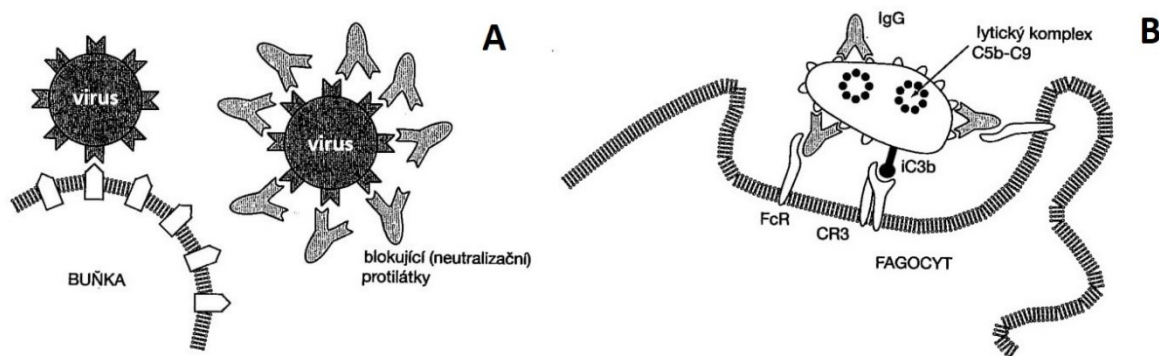
1.5 Protilátky

Protilátky jsou nástrojem specifické imunitní reakce. Jedná se o proteiny označované jako imunoglobuliny (Ig), vylučované plazmatickými buňkami po aktivaci B-lymfocytů daným antigenem. Rozpustné protilátky se mohou specificky s vysokou afinitou vázat na epitop daného antigenu a tím ho neutralizovat, opsonizovat nebo spustit komplementovou reakci (Obrázek 2). Existují jako receptory na povrchu B-buněk nebo jako rozpustné v krevním séru. [14,21]

Při neutralizaci mohou protilátky blokovat aktivitu různých mikroorganismů navázáním se na příslušný epitop daného antigenu, který je potřebný pro adhezi k buňce nebo pro proniknutí do buňky. Tím dojde k inaktivaci patogenu [14].

Oponizace je proces, kdy se protilátka naváže na antigen, aby následně mohl být zlikvidován fagocytou při fagocytóze. Protilátky zde fungují jako „propojovací prostředek“ mezi antigenem a fagocytou [14].

Aktivace komplementu může nastat třemi různými způsoby, které se liší počátečními fázemi, ale výsledek je obdobný. Komplement (C) je tvořen systémem plazmatických bílkovin (C1 – C9), které se kaskádovitě přeměňují z neaktivní formy do podoby enzymů. Klasická cesta má na začátku komplex antigenu (Ag) a protilátky třídy IgG nebo IgM. Na tento komplex se vážou složky komplementu C1, které změnou svou prostorovou strukturu stanou se enzymaticky aktivními. Aktivní C1 aktivuje další složky komplementu až do vzniku komplexu, který se nazývá C3 konvertasa. Zde se schází všechny způsoby aktivace komplementu. Alternativní cesta aktivace komplementu začíná interakcí C3 s tzv. aktivujícím povrchem (např. povrch mikroorganismů). Pokud dojde k rozpadu C3 právě na tomto povrchu, vznikne také komplex C3 konvertasa. Třetí způsob aktivace komplementu je lektinová cesta, která nevyužívá komplex protilátka-antigen, ale bílkoviny podobné složkám C1, např. MBL (lektin vázající manosu), které se vážou na cukerné složky bakteriálních stěn a výsledkem je opět C3 konvertasa. Jednotlivé složky komplementu pak vytváří komplexy, které pak např. způsobí poškození membrány patogenu a lyzi buňky [15].



Obrázek 2 – Mechanismy působení protilátek. Část A zobrazuje, jak se neutralizační protilátky vážou na vazebná místa viru a tím mu následně znemožní napadení hostitelské buňky. Část B zobrazuje proces aktivace komplementu (převzato a upraveno z [14])

Protilátky lze dělit podle způsobu jejich přípravy na **polyklonální a monoklonální**. Polyklonální protilátky jsou souborem protilátek z různých druhů B-lymfocytů získaných ze séra imunizovaného zvířete, zatímco monoklonální protilátky jsou produktem pouze jednoho klonu B-lymfocytů. Polyklonální protilátky jsou schopné se vázat na různé epitopy určitého antigenu oproti monoklonálním, které vážou pouze jeden specifický epitop, proti kterému byly vytvořeny. To přináší i určité riziko, že protilátka nemusí rozpoznat svůj

antigen, pokud je např. v denaturované formě. Polyklonální protilátky se připravují většinou z krve imunizovaného zvířete, kterému byl podán antigen. V séru se pak nachází velké množství protilátek proti různým antigenům, a i epitopům použitého antigenu. U ptáků se protilátky nachází v krvi a ve vajíčkách, nejvíce ve vaječném žloutku. Izolace ptačích protilátek z vajec je neinvazivní způsob získávání na rozdíl od savců, kde je většinou třeba pro získání dostatku séra zvíře zabít a vykřvit.

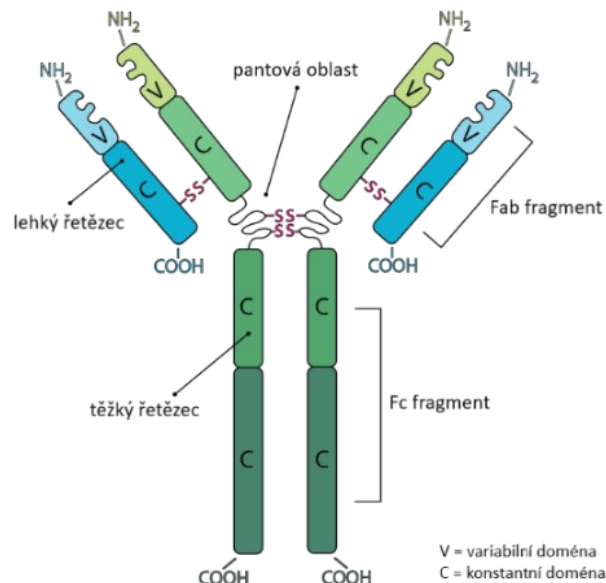
Monoklonální protilátky se získávají hybridomovou technikou. Po imunizaci zvířete čistým antigenem, se připraví hybridom. Ten vzniká fúzí slezinných B-buněk a myelomových buněk, které mu zajistí imortalizaci. Hybridom poté roste v buněčné kultuře a produkuje protilátky. Výhodou monoklonálních protilátek je jejich homogenita a schopnost jednoznačně rozpoznat určité antigenní struktury. Nevýhodou je, že úzká specifita monoklonálních protilátek může omezit jejich užití. Polyklonální protilátky jsou stabilnější při širším rozmezí pH a koncentraci soli, na což jsou monoklonální protilátky citlivé. Při použití polyklonálních protilátek je menší vliv konformačních změn Ag než u monoklonálních. [14,21,22]

1.5.1 Struktura protilátek

Protilátky se skládají ze čtyř symetricky uspořádaných polypeptidových řetězců. Jde o dva identické lehké řetězce (L) a dva identické těžké řetězce (H), které jsou propojeny disulfidickými (cystinovými) můstky. Každý těžký řetězec je cystinovým můstkem spojen s lehkým a tvoří strukturu připomínající písmeno Y, oblast těchto můstků se nazývá pantová (Obrázek 3). Polypeptidové řetězce jsou tvořeny strukturně podobnými doménami, které obsahují 110–120 aminokyselin. Těžké řetězce (50–75 kDa) obsahují čtyři až pět domén a lehké řetězce (25 kDa) dvě. Domény na N-konci řetězců jsou označovány jako variabilní (V_H a V_L), tvoří „ramena“ písmena Y a vytvářejí vazné místo pro antigen. Na opačném konci (C-konci) se nacházejí konstantní domény, jsou shodné u řetězců stejného typu a slouží např. k aktivaci komplementu a interakci s fagocyty při opsonizaci. Působením enzymu papainu lze z protilátky získat dva identické fragmenty Fab a Fc fragment. Každý fragment Fab je monovalentní a obsahuje vazebné místo pro antigen. Fc fragment se účastní opsonizace a váže se na Fc receptory fagocytů. [14,15,21]

Lidské imunoglobuliny se dělí do pěti tříd – IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Označení získaly podle typů řetězců, které obsahují. Existují dva typy lehkých řetězců, κ a λ , konstantní části těžkých řetězců určují izotypy μ , δ , γ , α a ϵ . Třída γ obsahuje čtyři izotypy

$\gamma_1 - \gamma_4$ a třída α dva, α_1 a α_2 . Podle tohoto označení se příslušné imunoglobuliny nazývají IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Při napadení organismu patogenem je iniciována imunitní odpověď a nejprve jsou produkovány imunoglobuliny typu IgM, které vážou protein C1, a tím aktivují komplement. Zhruba po dvou dnech se začnou tvořit IgG, které se vyskytují nejhojněji, dokáží též vázat protein C1 a umožňují vazbu na Fc-receptor fagocytu. IgA neaktivují komplement, ale zprostředkovávají opsonizaci. Nalezneme je na sliznicích, v krevním séru a také v bronchoalveolární laváži.



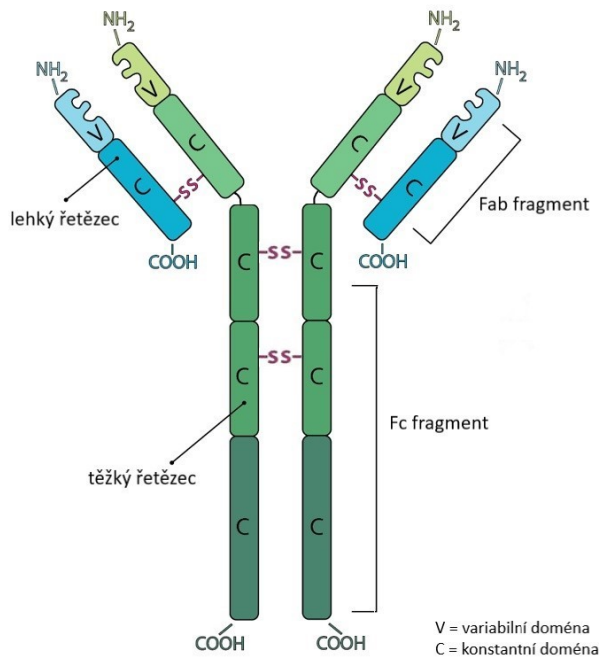
Obrázek 3 – Struktura IgG. Molekula IgG je složena ze dvou typů řetězců – lehký (L) a těžký (H), které jsou kovalentně propojeny disulfidickými můstky. Na N-konci L a H řetězců se nachází variabilní domény s vaznými místy pro antigen a na C-konci se nachází konstantní domény s místy, která jsou schopné vazby na Fc receptory fagocytů. (převzato a upraveno z [23])

1.5.2 Slepičí protilátky

Ptáci vytvářejí tři druhy imunoglobulinů – IgA, IgM a IgY. Největší část vytvořených protilátek, až 75 %, tvoří IgY [24]. Protilátky jsou z krve vychytávány a koncentrovány do vajíčka, IgA a IgM do bílku, IgY do vaječného žloutku, aby zajistily pasivní imunizaci embrya [25].

Slepičí IgA a IgM se strukturně i funkčně podobají savcím IgA a IgM. Dříve byly slepičí IgY označovány také jako IgG, ale poté, co se byly zjištěny zásadní strukturní rozdíly mezi ptačí a savčí molekulou IgG, byly ptačí žloutkové protilátky přejmenovány na IgY (z angl. „yolk“) [24]. IgY se skládá ze dvou identických těžkých (H) a lehkých (L) řetězců. H řetězec IgY obsahuje jednu variabilní doménu a čtyři konstantní domény, na rozdíl od savčí IgG, která obsahuje pouze tři konstantní domény (Obrázek 4). To také odpovídá vyšší

molekulové hmotnosti IgY (180 kDa) než je u savčích IgG (150 kDa) [25,26]. IgY neobsahuje pantovou oblast, což způsobuje menší flexibilitu, než je tomu u savčí IgG [25]. L řetězec obsahuje jednu variabilní a jednu konstantní doménu. Těžký a lehký řetězec je opět propojen disulfidickými můstky. Na N-koncích řetězců se nachází vazné místo pro antigen. IgY lze též enzymaticky štěpit na Fab a Fc fragmenty. Fab fragmenty obsahují specifické vazné místo pro antigen [27].



Obrázek 4 – Struktura IgY. Molekula IgY je složena ze dvou typů řetězců – lehký (L) a těžký (H), které jsou kovalentně propojeny disulfidickými můstky. Na N-konci L a H řetězců se nachází variabilní domény s vaznými místy pro antigen a na C-konci se nachází konstantní domény jejichž úseky jsou schopné vazby na Fc receptory fagocytů. H řetězec IgY obsahuje čtyři konstantní domény a chybí zde pantová oblast. (převzato a upraveno z [23])

Výhoda produkce slepičích IgY protilátek spočívá v tom, že ptáci jsou fylogeneticky vzdáleni od savců, díky tomu tvoří větší množství protilátek proti savčím proteinům, protože na nich rozpoznají větší počet epitopů. Jak již bylo zmíněno, sběr vajec je neinvazivní metodou pro získávání protilátek, oproti odběru krve imunizovaných savců (nejčastěji králíků). Izolace IgY z vaječného žloutku je snadná a ekonomicky výhodná. Z jednoho vaječného žloutku lze izolovat až 100 mg IgY, což může měsíčně dělat až 2 g IgY. Protilátky jsou stabilní v rozmezí hodnot pH 4–9, až do teploty 65 °C ve vodném prostředí. Vykazují tedy vyšší stabilitu v kyslejší oblasti a při vyšších teplotách, než je tomu u IgG. Slepičí IgY lze snadno a rychle purifikovat s vysokou čistotou, protože ve žloutku je jen jeden druh protilátek [28]. IgY nevyvolávají zánětlivou reakci, protože neaktivují lidský komplement a

nereagují s Fc receptory savců, což je výhodou při imunologickém stanovení, např. při ELISA nebo Western blot, kde nevyvolávají interferenci [29]. Díky těmto vlastnostem se hodí i pro profylaxi či perorální imunoterapii. Jsou vhodné v prevenci virových a bakteriálních onemocnění [27]. Mohly by být dobrou alternativou pro použití při pasivní imunizaci v prevenci nebo při léčbě onemocnění způsobených různými patogeny, jelikož rostou rezistence vůči antibiotikům a virostatikům [24].

Jak je zřejmé z výše uvedeného, slepičí protilátky IgY jsou vhodné pro použití při pasivní imunizaci. Vzhledem k současné pandemii COVID-19 je zvažováno jejich použití k prevenci infekce lidské populace virem SARS-CoV-2. Hlavním místem průniku viru do organismu je epitel v nose, kde je právě vysoká koncentrace receptorů ACE 2. Proto se uvažuje o způsobu pasivní imunizace nosním sprejem, který by obsahoval anti-peptidové protilátky proti virovému S proteinu, které by zablokovaly jeho interakční místa a nemohlo by tak dojít k navázání viru a propuknutí nemoci COVID-19.

2 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo připravit anti-peptidové slepičí protilátky proti povrchovému "spike" glykoproteinu viru SARS-CoV-2, které by inhibovaly navázání viru na ACE 2 receptor a bránily tak propuknutí nemoci COVID-19.

Pro dosažení tohoto cíle je zapotřebí:

- 1) Výběr peptidů z interakční domény „spike“ proteinu a jejich syntéza
- 2) Příprava peptidových imunogenů pro imunizaci slepic
- 3) Izolace žloutkových protilátek IgY z vajíček před a po imunizaci imunogeny
- 4) Zjištění reaktivity vytvořených protilátek proti použitým peptidům pomocí metody ELISA
- 5) Ověření schopnosti protilátek rozpoznat peptidy ve struktuře „spike“ proteinu
- 6) Afinitní purifikace anti-peptidových protilátek a jejich charakterizace
- 7) *Ex vivo* testování protektivních vlastností protilátek v buněčných liniích infikovaných virem

3 Materiály a metody

3.1 Použité chemikálie

Diagnovum (USA)

Hovězí sérový albumin (BSA)

Fisher Scientific (USA)

Guanidin hydrochlorid

Fluka (Německo)

Tween-20; azid sodný

Lachner (Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, hydrogenuhličitan sodný, hydroxid sodný, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), kyselina chlorovodíková, uhličitán sodný

Serva (Německo)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Sigma (USA)

Anti-slepičí králičí IgG konjugovaná s alkalickou fosfatou (Anti-Chicken IgY (IgG)), diethylamin (DEA), L-cystein, mcKLH, p-nitrofenylfosfát

Thermo Scientific (USA)

BSA, mcKLH, SulfoLink Coupling Resin, TCEP

VIDIA (Česká republika)

peptid č. 1, peptid č. 2

Lyofilizovaný řídký bílek byl poskytnut prof. RNDr. Petrem Hodkem, CSc.

Rekombinantní antigeny virového „spike“ proteinu označené FL-H, FL-S2, RBD-H a RBD-S2 byly poskytnuté RNDr. Cyrilem Bařinkou, PhD. (BIOCEV)

3.2 Použité přístroje a materiály

Analytické váhy

Discovery, Ohaus Corp. (USA)
40SM-200A, PESA (Švýcarsko)

Automatické mikropipety

Eppendorf Research plus, Eppendorf (Německo)

Centrifugy

Allegra X-30R Centrifuge (USA)
Eppendorf Centrifuge 5418 (USA)
Hermle LaborTechnik GmbH Z 383 K (Německo)

Dialyzační nádoby

D-Tube Dialyzer Mini, MWCO 6–8 kDa, Novagen (Německo)
D-Tube Dialyzer Maxi, MWCO 6–8 kDa, Novagen (Německo)

Inkubátor

Incubator IB-01E, Jeio Tech Co. (USA)
Eppendorf Thermomixer Compact (Německo)

Magnetická míchačka

KMO 2 basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG (Německo)

Mikrotitrační destička

ELISA-VIDITEST; anti-SARS-CoV-2(S1) IgA; VIDIA spol. s.r.o. (Česká republika)
Polysorp, Nunc-immuno plate, Nunc A/S, Roskilde (Dánsko)
ELISA set – GA CoV2-IgG, GA GENERGIC ASSAYS GmbH (Německo)

pH metr

HI 221, HANNA Instruments (USA)

Předvážky

KERN EW 600-2M, ELMA (Německo)

Sonikátor

Elmasonic E 30H, ELMA (Německo)

Spektrofotometr

Agilent 8453 UV-VIS Spectrofotometer, Agilent (USA)
Spektromom 195 D (Maďarsko)
Sunrise Absorbance Reader, TECAN (Švýcarsko)

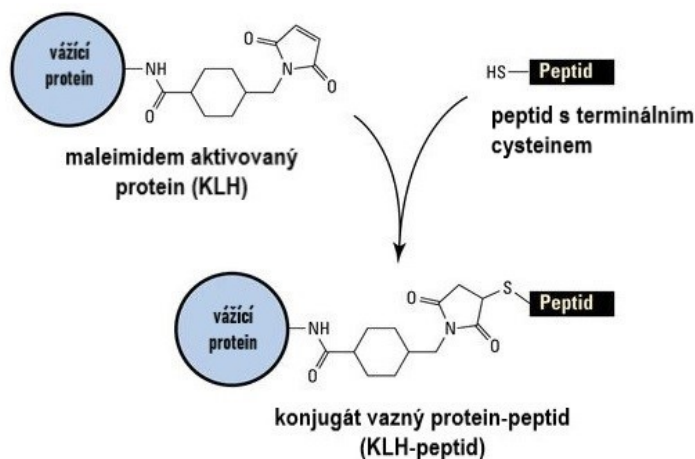
Třepačka

Yellow Line, Orbital shaker, OS 2, IKA (Německo)

3.3 Metody

3.3.1 Výběr peptidu a příprava imunogenu

Z povrchového spike proteinu viru SARS-CoV-2 byly vybrány dvě sekvence aminokyselin na různých místech, u nichž jsme předpokládali interakci s receptorem ACE 2. K výběru sekvencí (CoV1 a CoV2) byla použita krystalová struktura PDB ID: 6vw1 [30] v komplexu vazebné domény „spike“ proteinu s receptorem ACE 2. Pomocí programu PyMOL [31] byla struktura zobrazena a byly na ní vybrána dvě místa, sekvence aminokyselin, která byla součástí interakční oblasti „spike“ proteinu a ACE 2 receptoru, a zároveň nebyly součástí sekundární struktury. Dále byla zjišťována unikátnost vybraných peptidů proti lidským a slepičím proteinům, ta byla vyhodnocena v programu BLAST (z angl. „Basic Local Alignment Search Tool“) [32]. Vybrané sekvence CoV1 a CoV2 byly následně syntetizovány firmou VIDIA (ČR). K oběma byla na N-konci přidána aminokyselina cystein, která zajistila navázání peptidu na nosičovou molekulu (KLH, BSA) pomocí stabilní thioesterové vazby (Obrázek 5). Peptidy jsou malé molekuly a nezajistily by dostatečně silnou imunitní odpověď, proto byly navázány na nosičovou molekulu KLH a BSA za vzniku vhodného imunogenu. Pro vazbu peptidů byl použit postup doporučený výrobcem aktivovaných proteinů mcKLH a mcBSA.



Obrázek 5 – Schéma konjugace mKLH s SH skupinou cysteinu na haptenu. Maleimidem aktivovaný vazný protein (KLH) obsahuje maleimidovou skupinu, která je schopná reagovat s SH skupinou za vzniku stabilní thioesterové vazby. Jedna molekula mKLH je schopna navázat mnoho peptidových haptenu. (převzato a upraveno z [33])

Pro navázání peptidu na mcKLH nebo mcBSA byl připraven konjugační pufr (0,1M NaH₂PO₄; 0,15M NaCl; pH 7,2). Od obou peptidů byly vždy 2 mg rozpuštěny ve 200 µl konjugačního pufru s obsahem 30mM TCEP, aby nedocházelo k oxidaci SH skupin a vytváření disulfidických můstků mezi samotnými hapteny. Roztok peptidu CoV1 byl podle pH papírku příliš kyselý, takže zde proběhla úprava pH pomocí 2M NaOH na hodnotu 7, u roztoku peptidu CoV2 se pH upravovat nemuselo. Poté byly oba roztoky dány inkubovat na 1 hodinu při teplotě 50 °C a 600 RPM do termomixeru (Eppendorf Thermomixer Compact). Po inkubaci bylo znovu překontrolováno a upraveno pH na hodnotu 7. Dále bylo připraveno po 200 µl roztoků mcBSA a mcKLH v destilované vodě o koncentraci 10 mg/ml. Tyto roztoky byly rozpuštěny v ultrazvukové lázni.

Konjugáty peptidů CoV1 a CoV2 byly připraveny smísením 100 µl roztoku peptidu a 100 µl mcKLH nebo mcBSA za stálého míchání na míchačce, kde byly ponechány míchat dvě hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly roztoky 5× zředěny na koncentraci peptidu 1 mg/ml přidáním PBS. Ke konjugátům s KLH bylo přidáno PBS a ke konjugátům s BSA bylo přidáno PBS s 0,1% (w/v) NaN₃, který zajistil stabilitu roztoku.

3.3.2 Imunizace a izolace IgY

K imunizaci byly vybrány dvě slepice. Každá byla imunizována postupně třemi dávkami 100 µg připravených KLH konjugátů. Z vajíček před imunizací byly připraveny preimunní frakce, které sloužily jako kontrolní vzorky.

Pro izolaci protilátek bylo použito vždy 5 vajec, z období počínaje 10 dní po třetí dávce imunogenů. Protilátky IgY proti CoV1 a CoV2 byly izolovány ze žloutků vajec postupem dle Hodek a kol [34].

Použité chemikálie:

- 0,5M kyselina chlorovodíková,
- chlorid sodný,
- PBS s 0,1% (w/v) NaN₃ (28mM sodný fosfátový pufr; pH 7,2),
- vaječné žloutky,
- destilovaná a vodovodní voda.

Postup:

Kontrolní vzorky byly již dodány jako naředěné žloutky s PBS s 0,1% (w/v) NaN_3 v poměru 1:1. Preimunní frakce byla dále čtyřikrát zředěna destilovanou vodou.

Specifická frakce byla připravena tak, že žloutky byly separovány od bílků a omyty vodou. Následně byly osmkrát naředěny vodovodní vodou. Kontrolní i specifická suspenze žloutků byly homogenizovány na magnetické míchače a následně u nich bylo upraveno pH pomocí 0,5M HCl na hodnotu 5,0. Vzniklé směsi byly přelity do nálevky uzavřené zátkou a dány přes noc zmrazit při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Druhý den byly zmrazené roztoky během postupného rozmrazování přefiltrovány přes filtrační papír a smotek vaty na žebrované filtrační nálevce.

Následně byl do filtrátu přidán chlorid sodný do koncentrace 8,76% (w/v) a za stálého míchání bylo upraveno pH na hodnotu 4,0 pomocí 0,5M HCl. Poté byly nechány půl hodiny míchat na magnetické míchače při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby se roztoky nechaly dosrážet 2 hodiny při laboratorní teplotě. Dále byla směs centrifugována na centrifuze při $5000\times g$ a teplotě $5\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut. Supernatant byl oddělen a sediment resuspendován v 10 ml PBS s 0,1% (w/v) NaN_3 . Vzniklý roztok byl uchován při $6\text{ }^\circ\text{C}$ k dalšímu použití.

Z kontrolního a imunizovaného vzorku bylo odebráno 300 μl do mikrozkušavky a centrifugováno při $14\ 500\times g$ v mikrocentrifuze po dobu 5 minut, abychom odstředili případnou sraženinu.

Koncentrace proteinů byla měřena spektrofotometricky na přístroji Spektromom 195 D. Byla měřena absorbance při 280 nm v křemenné kyvetě o optické dráze $l = 1,000\text{ cm}$. Jako srovnávací vzorek bylo použito 2,5 ml PBS s 0,1% (w/v) NaN_3 . Pro měření absorbance bylo do kyvety odměřeno 50 μl odstředěného vzorku a přidáno do 2,5 ml PBS s 0,1% (w/v) NaN_3 . Vše bylo promícháno špičkou pipety.

Výsledná koncentrace proteinů byla vypočtena pomocí vzorce:

$$k = A_{280} \cdot f \cdot n$$

k ... koncentrace proteinů [mg/ml]

A_{280} ... absorbance při 280 nm

f ... experimentální faktor, $f = 1,094$

n ... ředění

3.3.3 ELISA

ELISA (z angl. „Enzyme-linked Immunosorbent Assay”) je imunochemická metoda, založená na interakci protilátky s antigenem na pevné fázi. Tímto postupem lze kvantifikovat jejich koncentrace. ELISA využívá druhou (sekundární) protilátku v konjugátu s enzymem jako indikační molekulou ke kvantitativnímu stanovení komplexu antigen-protilátka.

Tato metoda je založená na specifické interakci mezi protilátkou a antigenem, který je navázaný na dno mikrotitrační destičky. Je zde využíváno vlastnosti antigenů, a to schopnosti sorbovat se na povrch plastů. Antigen je specificky rozpoznán primární protilátkou, se kterou následně během inkubace tvoří komplex antigen-protilátka. Na tento komplex se následně váže sekundární protilátka, která je konjugovaná s enzymem (nejčastěji alkalická fosfatasa nebo křenová peroxidasa). Enzym pak katalyzuje přeměnu chromogenního substrátu na barevný produkt, který lze stanovit fotometricky a naměřená absorbance je přímo úměrná koncentraci sekundární, resp. primární protilátky ve vzorku.

Metoda byla využita pro ověření reaktivity izolovaných specifických slepičích imunoglobulinů. Jako antigeny byly použity buď konjugáty BSA-CoV1, BSA-CoV2, BSA a KLH nebo rekombinantní antigeny „spike“ proteinu viru SARS-CoV-2 exprimované v HEK a S2 buňkách označené FL-H, FL-S2, RBD-H a RBD-S2 (dar od pana RNDr. Cyrila Bařinky, PhD., BIOCEV). Dále byly pro testování reaktivity anti-peptidových protilátek použity komerční destičky ze sady ELISA-VIDITEST od firmy VIDIA spol. s.r.o. (ČR) a ELISA set – GA CoV-2 IgG, GA GENERIC ASSAYS GmbH (Německo), na nichž byl jako antigen navázán celý „spike“ glykoprotein.

Použité chemikálie:

- *Imobilizační pufr:* 50mM sodný uhličitanový pufr; pH 9,6
- *PBS:* 13,4mM NaCl; 28mM sodný fosfátový pufr; pH 7,2
- *Promývací pufr (PBS-Tween):* 13,4mM NaCl; 28mM sodný fosfátový pufr; 0,1% (v/v) Tween 20; pH 7,2
- *Blokující roztok:* 2% (w/v) roztok řídkého bílku v PBS-Tween
- *Roztok substrátu:* 1 mg/ml p-nitrofenylfosfát (pNPP); 0,26M uhličitanový roztok; 1mM MgCl₂
- *Zastavovací roztok:* 3M NaOH

Postup:

Byl připraven 1 ml roztoků z lyofilizátů BSA a KLH v PBS o koncentraci 1 mg/ml. Konjugáty BSA-CoV1 a BSA-CoV2 o koncentraci peptidu 1 mg/ml byly centrifugovány na mikrocentrifuze při $8609\times g$ po dobu 1,5 minuty. Roztoky konjugátů, BSA a KLH byly smíchány s imobilizačním pufrem na koncentraci antigenu 4 $\mu\text{g/ml}$. Roztoky rekombinantních antigenů FL-H, FL-S2, RBD-H a RBD-S2 byly imobilizačním pufrem zředěny na koncentraci antigenu 10 $\mu\text{g/ml}$. Po naředění byly roztoky dávkovány do jamek Polysorp v objemu 100 μl . Destička byla dána inkubovat do druhého dne ve vlhké komoře při teplotě 4 °C. Po inkubaci byly jamky promyty $3\times 220 \mu\text{l}$ promývacím pufrem.

Do každé jamky bylo nanášeno 150 μl blokujícího roztoku a destička byla dána inkubovat na 1 hodinu při teplotě 37 °C ve vlhké komoře. Po inkubaci byla destička promyta promývacím pufrem, $3\times 220 \mu\text{l}$.

Roztoky primární protilátky byly naředěny PBS na konečné koncentrace 90, 30, 10 a 3,3 $\mu\text{g/ml}$ a nanášeny v duplikátech po 100 μl do příslušných jamek. Při pokusu s destičkou ELISA-VIDITEST od firmy VIDIA spol. s.r.o. (ČR) byly na destičku byly aplikovány vysycené roztoky BSA protilátek proti CoV1 a roztoky protilátek proti CoV2 o koncentraci 90, 30, 10 a 3,3 $\mu\text{g/ml}$. Po afinitní purifikaci protilátek byly pro metodu ELISA použity afinitně purifikované protilátky o koncentraci 3,3; 1 a 0,3 $\mu\text{g/ml}$ a nenavázané specifické protilátky o koncentraci 270 a 90 $\mu\text{g/ml}$. Poté byla destička dána inkubovat na 2 hodiny při teplotě 37 °C ve vlhké komoře. Po inkubaci byla destička promyta promývacím pufrem, $3\times 220 \mu\text{l}$.

Po promytí bylo do každé jamky aplikováno 100 μl roztoku sekundární protilátky (konjugát králičí IgG proti slepičím IgY s navázanou alkalickou fosfatase). Roztok sekundární protilátky v PBS byl připraven tak, aby její výsledné ředění bylo 1:1400. Destička byla dána inkubovat na 1 hodinu při teplotě 37 °C ve vlhké komoře. Po inkubaci byla destička promyta promývacím pufrem, $3\times 220 \mu\text{l}$.

Do každé jamky byl přidán vyvolávací roztok substrátu v objemu 100 μl . Po 10 minutách byla reakce zastavena přidáním 100 μl 3M NaOH do každé jamky. Nakonec byla měřena absorbance při 405 nm na přístroji Tecan Sunrise.

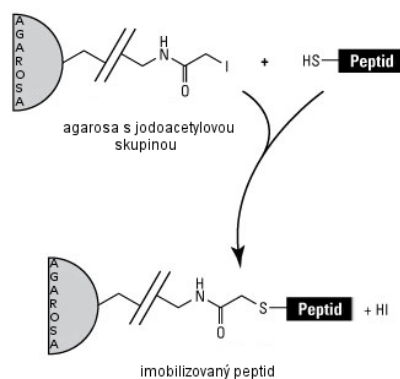
Vysycení BSA

Protilátky proti CoV1 byly vysyceny BSA, protože při úvodním provedení ELISA byla detekována reakce preimunních vzorků s BSA-CoV1. Roztok preimunní a specifické frakce byl smíchán s roztokem BSA (2 mg/ml) a PBS s 0,1 % (w/v) NaN₃ na výslednou koncentraci protilátky a BSA 1 mg/ml v PBS s 0,1 % (w/v) NaN₃. Poté byly vzorky dány inkubovat přes noc do lednice při 4 °C.

3.3.4 Afinitní purifikace IgY

Afinitní chromatografie umožňuje purifikaci biomolekul na základě specifické interakce s ligandem, který je kovalentně navázaný na chromatografický sorbent. Pomocí elučního činidla, které způsobí změnu pH nebo iontové síly, dojde k uvolnění protilátky.

Pro navázání peptidu přes terminální cystein byl využit gel SulfoLink Coupling Resin. Jedná se o zesíťovanou agarosu, která nese na svém raménku navázanou jodoacetylovou skupinu. Ta je schopná vázat peptid na gel za vzniku thioesterové vazby (Obrázek 6).



Obrázek 6 – Schéma imobilizace peptidu obsahujícího SH skupinu na cysteinu na agarosu s jodoacetylovými skupinami (převzato a upraveno z [35]).

Použité chemikálie:

- *Imobilizační pufr:* 50mM Tris; 5mM EDTA; pH 8,5
- *Promývací pufr:* 1M NaCl
- *Blokovací pufr:* 50mM L-cystein·HCl v imobilizačním pufru
- *Eluční pufr:* 50mM diethylamin (DEA); pH 11,5
- *Neutralizační pufr:* 1M KH₂PO₄; pH 6,7 (pH upraveno KOH)
- *Uchovávací pufr:* PBS s 0,1% NaN₃; pH 7,2

Postup:

Nejprve byl 1 mg každého peptidu CoV1 a CoV2, rozpuštěn ve směsi 200 μ l 300mM TCEP a 2 ml imobilizačního pufru na konečnou koncentraci peptidu 0,45 mg/ml. Dále bylo do kolony vneseno 2,5 ml suspenze SulfoLink Coupling Resin, což odpovídalo přibližně 1,1 ml sedimentovaného gelu. Kolona byla promyta 8 ml imobilizačního pufru. Poté bylo přidáno 2,2 ml roztoku peptidu v imobilizačním pufru a obsah kolony byl míchán 15 minut na „end-over-end“ míchačce při laboratorní teplotě. Roztok byl z kolony vypuštěn a následně do ní byly přidány 4 ml blokovacího roztoku (0,05M L-cystein·HCl v imobilizačním pufru + 300mM TCEP, analogie roztoku peptidu). Kolona byla opět umístěna na 15 minut na míchačku. Poté byla postupně promyta 12 ml 1M NaCl; 6 ml 0,05M DEA (pH 11,5); 6 ml 0,1M KH₂PO₄ (pH 7,2) a 6 ml PBS. Nakonec byl gel mimo kolonu smíchán s 10 ml roztoku příslušné specifické protilátky proti peptidu a dán míchat přes noc při 4 °C na „end-over-end“ míchačce.

Druhý den byl roztok gelu s protilátkami přelit zpět do kolony, ze které odtekla nenavázaná frakce protilátek. Následně byla kolona promývána PBS, dokud absorbance při 280 nm neklesla pod hodnotu 0,03. Poté bylo postupně po 0,5 ml nanášeno 5 ml 1M NaCl a byly jímány frakce po 0,5 ml, u kterých byla sledována absorbance při 280 nm. Dále byla kolona promyta 15 ml PBS a specifická protilátka byla uvolněna pomocí elučního pufru (0,05M DEA; pH 11,5). Opět byly jímány frakce po 0,5 ml, které byly okamžitě neutralizovány 100 μ l 1M KH₂PO₄ o pH 6,7. Frakce s největším podílem specifických IgY (5–7) byly dány dialyzovat přes noc proti 10 l PBS při 4 °C. Kolona byla promyta PBS do neutrálního pH a poté bylo aplikováno 6 ml 4M guanidin·HCl (pH 7,0); 6 ml 0,1M KH₂PO₄ (pH 7,2) a 10 ml PBS. Nakonec bylo do kolony přidáno 5 ml PBS s 0,1% NaN₃, ve kterém byla kolona uchovávána při 4 °C.

Dialyzované frakce byly rozděleny na dvě části – 1 ml byl sterilizován filtrací přes 0,4 μ m filtr, aby mohl být použit pro další *ex vivo* testy a k 500 μ l, resp. 600 μ l byl přidán pevný NaN₃ do konečné koncentrace 0,1% (w/v), aby bylo možné vzorky uchovávat při 4 °C pro další použití.

3.3.5 CPE a IF stanovení

Testování vzorků proběhlo na pracovišti ÚOCHB (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR), v Praze v laboratoři Dr. Jana Webera. Experiment byl proveden v triplikátech v 96-jamkové destičce s použitím buněčné linie VERO-E6, s počáteční koncentrací testovaných IgY 2,7 mg/ml.

Vzorky byly nejprve testovány pomocí CPE techniky (cytopatický efekt). Jedná se o test viability buněk, při kterém jsou tetrazoliové soli redukovány v buňce, za vzniku zbarveného formazanu, jehož absorpenci měříme. Během tohoto stanovení se používají i pomocné látky, které zvyšují citlivost metody (např. PMS) tím, že přenášejí elektrony na tetrazoliovou sůl. Naměřená hodnota absorpance při 570 nm vzniklého formazanu odpovídá množství živých buněk, tedy schopnosti protilátek neutralizovat virus poškozující buňky.

IF stanovení (imunofluorescenční stanovení) je metoda, která využívá imunofluorescence. Nejprve je virus inkubován společně s buňkami a protilátkami. Poté je volný virus odmyt a napadené buňky s viry se zafixují a rozlyzují, aby byly přístupné pro následné detekování protilátkami. Pro detekci viru se použije primární protilátka proti nukleoproteinu viru, která je pak detekována sekundární protilátkou s fluorescenční značkou. Nakonec se změří fluorescence v jamce, která odpovídá množství zachycené sekundární protilátky, a to kvantifikuje množství virových partikulí v buňce.

Dialýza

Pro oba buněčné testy bylo potřeba protilátky zbavit azidu sodného, který byl do jejich roztoku přimíchán, aby bylo možné protilátky dlouhodobě uchovávat. Ovšem pro pokusy *in vivo* je přítomnost azidu sodného nepřijatelná, takže roztoky protilátek byly dialyzovány do PBS. Touto metodou se přes polopropustnou membránu odstraní nízkomolekulární látky, zatímco proteiny zůstanou v roztoku před membránou. K pokusu byly použity dialyzační zkumavky s membránou D-Tube Dialyzer Mini, MWCO 6–8 kDa od firmy Novagen (Německo).

Vzorky byly naředěny na stejnou koncentraci 27 mg/ml. Ředění vzorků bylo do celkového objemu 250 µl pomocí PBS. Dialýza proběhla proti 10 l PBS přes noc při 4 °C na magnetické míchačce.

CPE a IF stanovení

IgY byly zředěny dvojkovou ředící řadou a smíchány se SARS-CoV-2 v poměru 1:1 (MOI 0,4). Směs byla inkubována na 60 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly buňky infikovány 20 μ l směsí IgY:SARS-CoV-2 a inkubovány 72 hodin v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C. Po inkubaci byla provedena vyhodnocení obou stanovení.

CPE stanovení bylo analyzováno kolorimetrickým testem XTT (= tetrazoliová sůl). Do jamek bylo ihned přidáno 50 μ l směsi činidla značeného XTT (1mg/ml) a PMS činidla (0,38 mg/ml). Inkubace probíhala 4 hodiny při 37 °C v 5% CO₂. Na čtečce EnVision byla změřena absorbance při 570 nm vytvořeného oranžového barviva formazanu.

Při IF stanovení bylo médium odstraněno a buňky byly fixovány pomocí 4% PFA (paraformaldehyd v PBS) s 0,2% Triton-X100. SARS-CoV-2 byl značen primární myší protilátkou proti nukleoproteinu anti-SARS-CoV-2 a následně sekundární anti-myší protilátkou konjugovanou s Cy3 fluoroforem. Signál byl detekován fluorescenčním mikroskopem Olympus. Výpočty EC50 byly provedeny v GraphPad Prism 8.4.3.

4 Výsledky

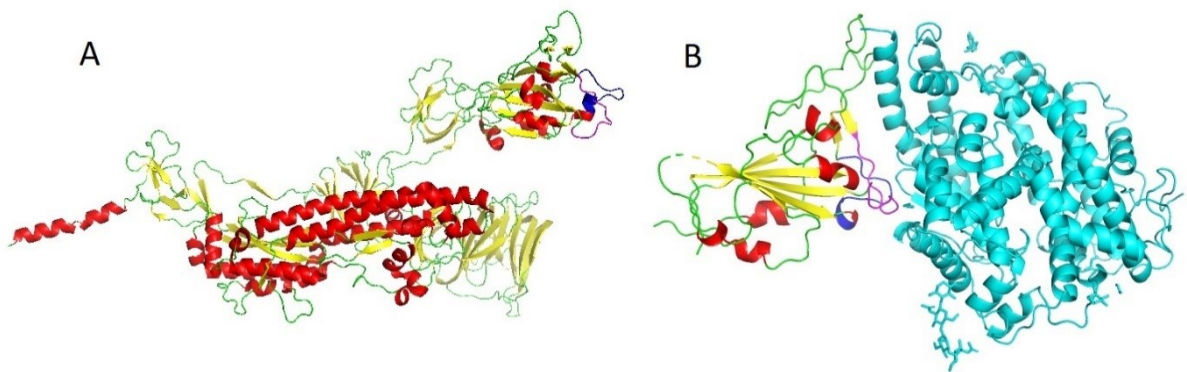
4.1 Výběr peptidu

Vybrané sekvence aminokyselin jsou ve 3D struktuře spike proteinu součástí interakčního místa spike proteinu a receptoru ACE 2 a také smyček, aby byly dobře přístupné pro vazbu protilátek (Obrázek 7). Oba peptidy byly v programu BLAST shledány jako unikátní v lidském a slepičím organismu a byly nechány syntetizovat firmou VIDIA (ČR). K oběma byla na N-konci přidána aminokyselina cystein, která zajistila navázání peptidu na nosičovou molekulu KLH a BSA. KLH je supramolekulární protein, který obsahuje dostatek skupin na povrchu, pro navázání peptidu a zároveň je pro organismus slepice imunogenní.

Sekvence peptidů z oblastí RBD proteinu spike byly vybrány tak, aby zajistily tvorbu protilátek rozpoznávajících spike protein a současně svou vazbou bránily interakci proteinu spike s receptorem ACE 2.

Vybrané sekvence peptidů:

- **Peptid č. 1 (CoV1):** Cys-(440)NLDSKVGGNYN(450)
- **Peptid č. 2 (CoV2):** Cys-(494)SYGFQPTNGVG(504)



Obrázek 7 – Struktura části S1 podjednotky povrchového spike proteinu viru SARS-CoV-2 s vyznačenými sekvencemi vybraných peptidů a její interakce s ACE 2 receptorem. Část A zobrazuje S1 podjednotku spike proteinu viru SARS-CoV-2 a vybrané peptidy. Struktura je barvena podle sekundární struktury proteinu, peptid č. 1 je zobrazen modrou a peptid č. 2 fialovou barvou. Část B zobrazuje interakční část S1 podjednotky spike proteinu a ACE 2 receptoru. Struktura je barvena obdobně jako v části A, ACE 2 receptor tyrkysově.

4.2 Izolace protilátek IgY

Preimunní a specifické frakce protilátek byly připraveny z vaječných žloutků. Preimunní frakce byla vždy připravena ze žloutků před imunizací. Specifické frakce byly připraveny ze žloutků po třetí imunizaci slepice. Z každé frakce byly izolovány protilátky IgY, změřena absorbance při 280 nm a vypočtena koncentrace IgY (Tabulka 1).

Tabulka 1 – Frakce protilátek IgY z vaječných žloutků.

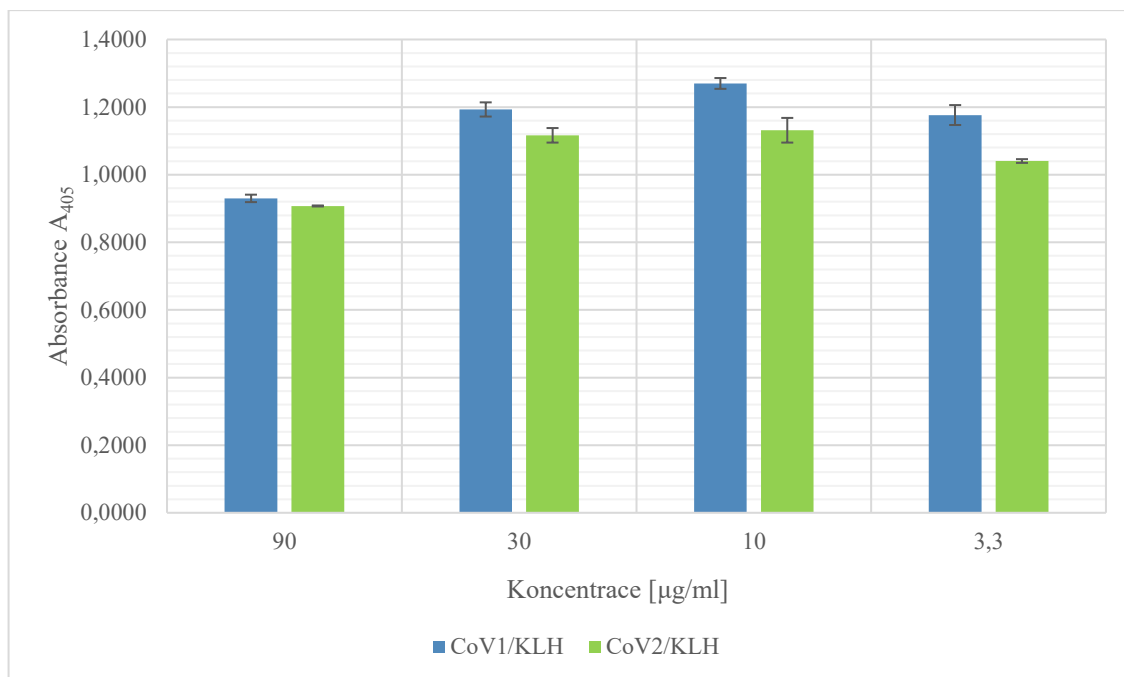
Frakce	Časový interval sběru	Objem frakce [ml]	Koncentrace [mg/ml]
K1	21. 7. – 30. 7. 2020	53,5	35,7
Sp1	29. 8. – 4. 9. 2020	82,0	39,9
K2	17. 8. – 23. 8. 2020	50,0	26,9
Sp2	4. 10. – 9. 10. 2020	78,0	55,1

K1 = preimunní frakce ze žloutků slepice č. 1; Sp1 = specifická frakce ze žloutků slepice č. 1 po imunizaci konjugátem KLH-CoV1; K2 = preimunní frakce ze žloutků slepice č. 2; Sp2 = specifická frakce ze žloutků slepice č. 2 po imunizaci konjugátem KLH-CoV2.

4.3 ELISA

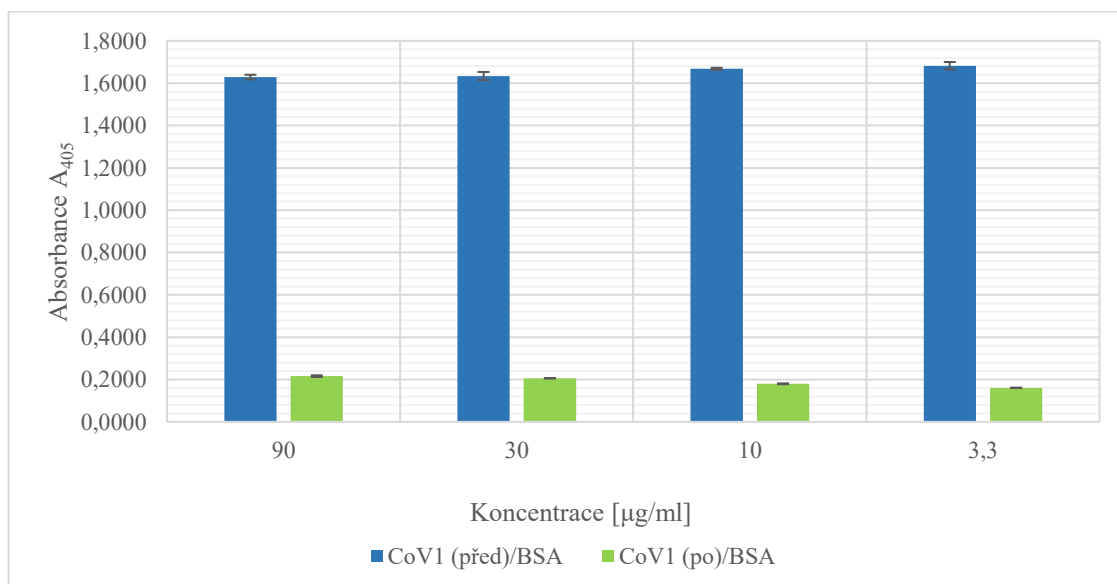
Metoda ELISA byla použita pro ověření reaktivity slepičích protilátek IgY proti CoV1 a CoV2. Preimunní a specifické protilátky byly nanášeny v koncentracích 3,3; 10; 30 a 90 $\mu\text{g/ml}$. Jako antigen byly na jamky navázány konjugáty BSA-CoV1, BSA-CoV2, BSA a KLH, všechny o koncentraci proteinu 4 $\mu\text{g/ml}$. K zjištění přítomnosti primárních protilátek byla použita sekundární protilátka (králičí anti-slepičí protilátka značená alkalickou fosfatou). K vyhodnocení výsledků byl použit spektrofotometr Tecan Sunrise, který měřil absorbanci v jamkách při 405 nm (A_{405}). Výsledky jsou znázorněny na obrázku 8 až 10.

V grafu (Obrázek 8) je patrné, že je zde reaktivita KLH s CoV1 a CoV2, čímž bylo potvrzeno, že obě slepice byly opravdu imunizovány konjugáty KLH-CoV1 a KLH-CoV2, protože v preimunních vzorcích je reaktivita velice malá a ve specifických vzorcích již můžeme reaktivitu pozorovat.



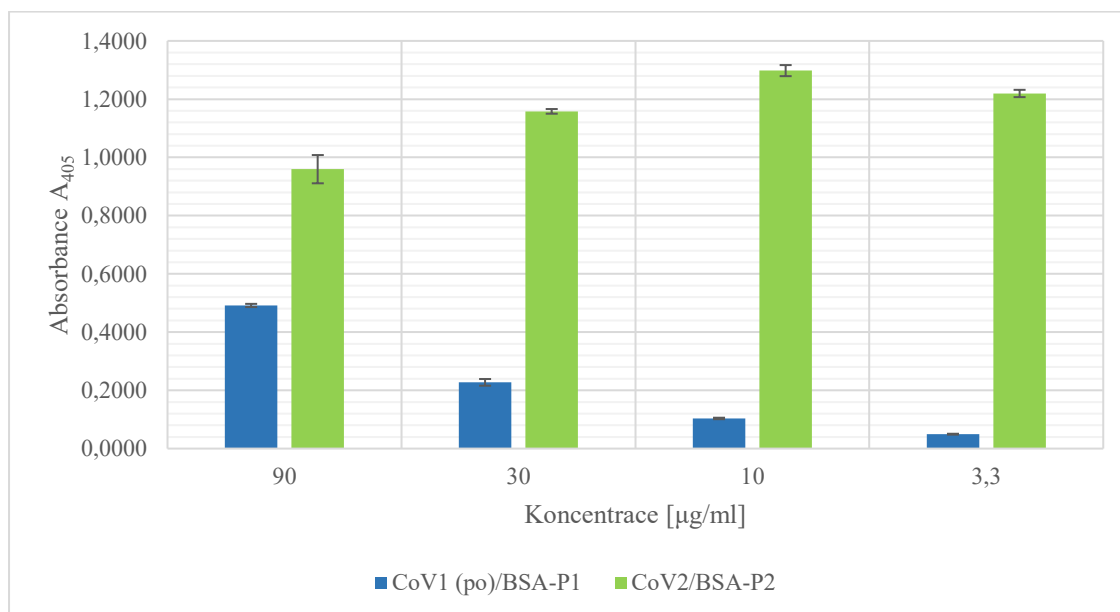
Obrázek 8 – Reaktivita specifických protilátek CoV1 před vysycením BSA a CoV2 proti KLH určená metodou ELISA. Reaktivita obou protilátek CoV1 a CoV2 (v koncentracích 3,3-90 µg/ml) byla testována na samotný KLH. V grafu jsou vyneseny hodnoty absorbance specifické protilátky po odečtení reaktivity preimunní frakce. Hodnoty jsou průměry ze dvou paralelních stanovení.

Jelikož protilátky CoV1 vykazovaly reaktivitu s konjugátem BSA (Obrázek 9), bylo provedeno jejich vysycení, abychom zjistili, jaká je skutečná reaktivita protilátek pouze proti peptidu CoV1. Ze získaných hodnot lze vidět, že vysycení bylo účinné.



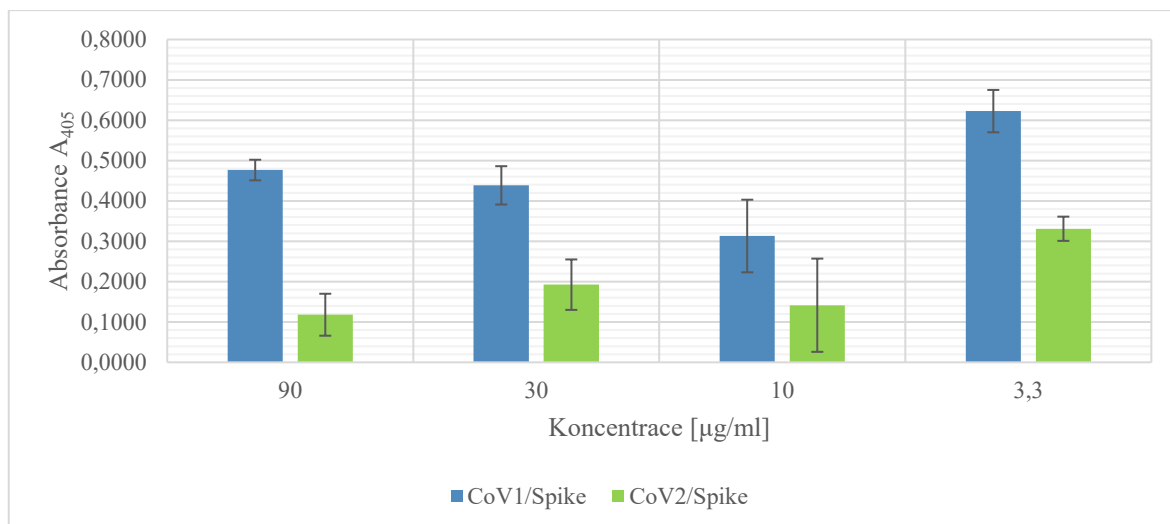
Obrázek 9 – Reaktivita specifických protilátek CoV1 před a po vysycení BSA proti BSA určená metodou ELISA. Protilátka CoV1 byla před použitím vysycena BSA. Reaktivita obou protilátek CoV1 a CoV2 (v koncentracích 3,3-90 µg/ml) byla testována na samotné BSA. V grafu jsou vyneseny hodnoty absorbance specifické protilátky po odečtení reaktivity preimunní frakce. Hodnoty jsou průměry ze dvou paralelních stanovení.

Po vysycení protilátek CoV1 BSA byly opět testovány proti konjugátům BSA s peptidy (BSA-CoV1 a BSA-CoV2), aby mohla být zjištěna reaktivita specifických protilátek proti peptidovým antigenům. Z naměřených hodnot byl sestrojen graf (Obrázek 10), ze kterého je patrné, že reaktivita protilátek CoV1 je výrazně nižší než reaktivita protilátek CoV2.



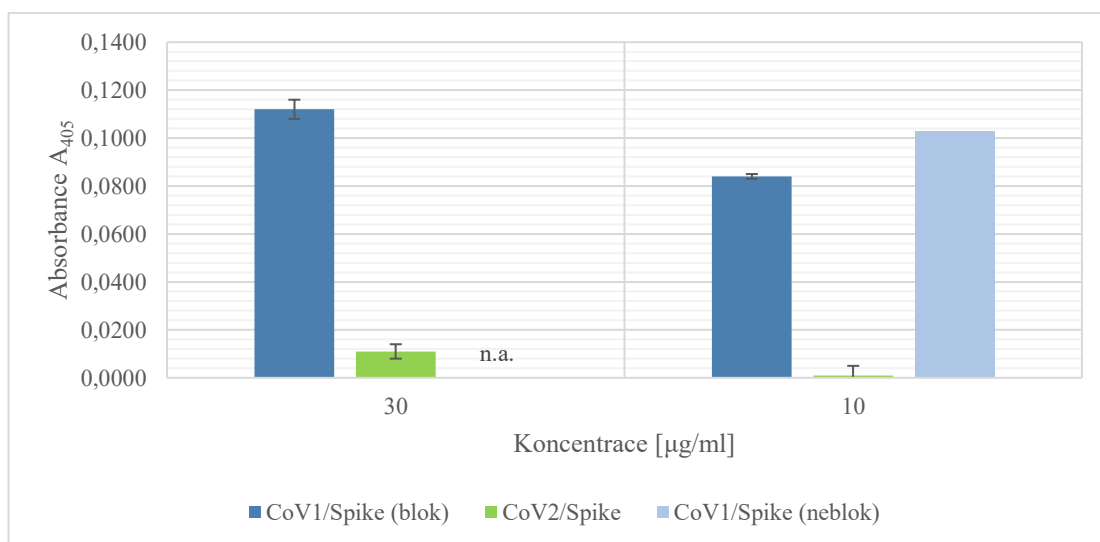
Obrázek 10 – Reaktivita specifických protilátek CoV1 a CoV2 proti peptidovým antigenům určená metodou ELISA. Protilátka CoV1 byla před použitím vysycena BSA. Reaktivita obou protilátek CoV1 a CoV2 (v koncentracích 3,3-90 µg/ml) byla testována na odpovídající peptidy, které byly konjugovány s BSA (BSA-CoV1, BSA-CoV2). V grafu jsou vyneseny hodnoty absorbance specifické protilátky po odečtení reaktivity preimunní frakce. Hodnoty jsou průměry ze dvou paralelních stanovení.

Metoda ELISA byla použita pro ověření reaktivity slepičích protilátek IgY proti CoV1 a CoV2 s celým proteinem „spike“ (VIDIA s.r.o.). Preimunní a specifické protilátky byly nanášeny o koncentracích 90, 30, 10 a 3,3 µg/ml. Jako antigen byl na dno jamek navázán spike glykoprotein. Výsledky jsou zobrazeny v grafech (Obrázek 11 a Obrázek 12).



Obrázek 11 – Reaktivita specifických protilátek CoV1 po vysycení BSA a CoV2 proti celému „spike“ proteinu určena metodou ELISA (VIDIA s.r.o.). Reaktivita obou protilátek (v koncentracích 3,3-90 µg/ml) byla testována na povrchový spike glykoprotein SARS-CoV-2. U protilátky CoV1 bylo provedeno vysycení BSA, jelikož dříve tyto protilátky vykazovaly značnou reaktivitu s BSA. V grafu jsou vyneseny hodnoty absorbance specifické protilátky po odečtení reaktivity preimunní protilátky. Hodnoty jsou průměry ze dvou paralelních stanovení.

Reaktivita protilátek z druhého provedení ELISA (VIDIA s.r.o.) je zachycena v grafu (Obrázek 12). Na rozdíl od prvního provedení s touto sadou byly jamky blokovány 2% roztokem řídkého bílku.



Obrázek 12 – Reaktivita specifických protilátek CoV1 po vysycení a CoV2 proti celému „spike“ proteinu zablokovanému roztokem řídkého bílku určena metodou ELISA (VIDIA s.r.o.). Byla testována reaktivita obou protilátek CoV1 a CoV2 (v koncentracích 10 a 30 µg/ml) na spike glykoprotein z viru SARS-CoV-2. U protilátky CoV1 byla použita vysycená forma protilátek BSA. Jamky, na které byly aplikovány preimunní a specifické protilátky CoV1 po vysycení a CoV2 byly před aplikací zablokovány 2% (w/v) roztokem řídkého bílku. Tři jamky byly ponechány neblokované pro kontrolu s předchozím pokusem. V grafu jsou vyneseny hodnoty absorbance, které odpovídají reaktivitě jednotlivých koncentrací protilátek. Tato hodnota absorbance byla získána odečtením absorbance preimunní frakce od absorbance frakce specifické. Hodnoty jsou průměry ze dvou paralelních stanovení.

4.4 Afinitní purifikace

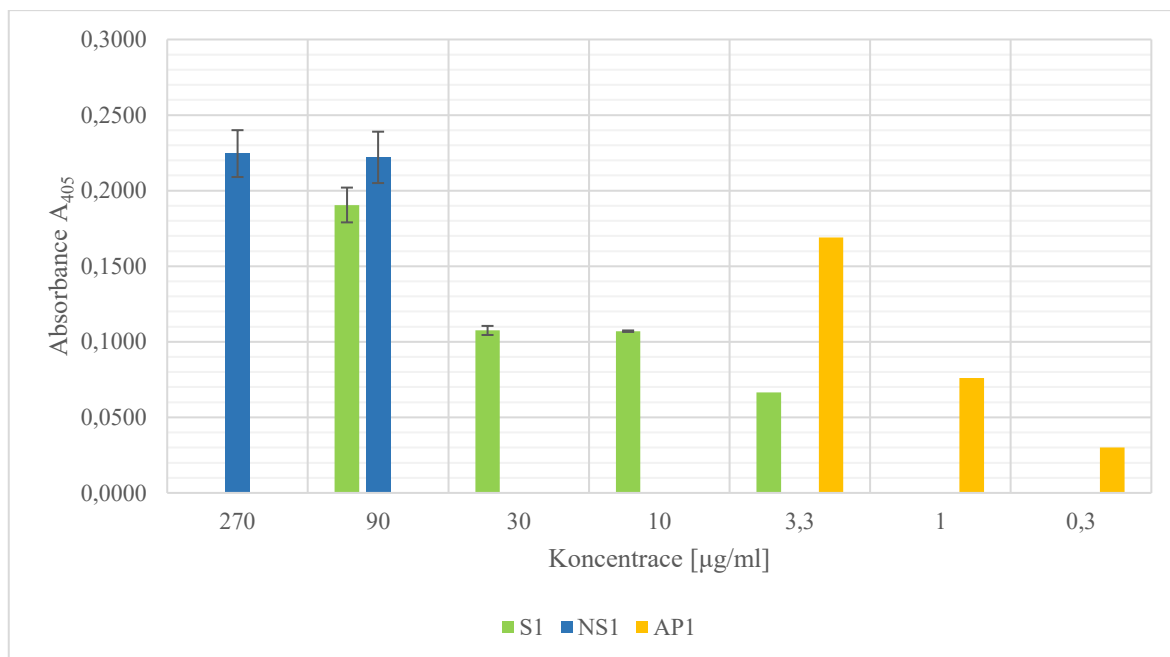
Byla provedena afinitní purifikace vzorků směsných specifických protilátek izolovaných z vajec po imunizaci slepice konjugátem KLH-CoV1 a KLH-CoV2 s cílem izolovat protilátky specifické proti syntetizovaným peptidům ze spike proteinu SARS-CoV-2 (CoV1 a CoV2). Na nosič byl imobilizován peptid CoV1 a na druhý peptid CoV2. Na kolonu byly nasazeny roztoky směsných specifických protilátek Sp1 s obsahem 3,16 mg IgY a Sp2 s obsahem 2,39 mg IgY o koncentraci 55,1 mg/ml (Sp1) a 39,9 mg/ml (Sp2). Pomocí DEA byly eluovány zachycené protilátky a jímány frakce 0,5 ml. Dle hodnoty pH byly spojeny frakce, u nichž byl předpokládán nejvyšší obsah proteinů (frakce 5–7), a dialyzovány proti PBS. Z aplikovaného množství protilátky a množství finálního preparátu protilátek po dialýze byl spočten výtěžek afinitní purifikace (Tabulka 2).

Tabulka 2 – Koncentrace afinitně purifikovaných protilátek a výtěžek afinitní purifikace.

Frakce	Objem [ml]	Koncentrace [µg/ml]	Hmotnost afinitně purifikované IgY [mg]	Výtěžek [%]
AP1	1,5	106	0,029	0,035
AP2	1,5	94	0,025	0,043

AP1 = afinitně purifikované specifické protilátky CoV1 proti peptidu č. 1; AP2 = afinitně purifikované specifické protilátky CoV2 proti peptidu č. 2

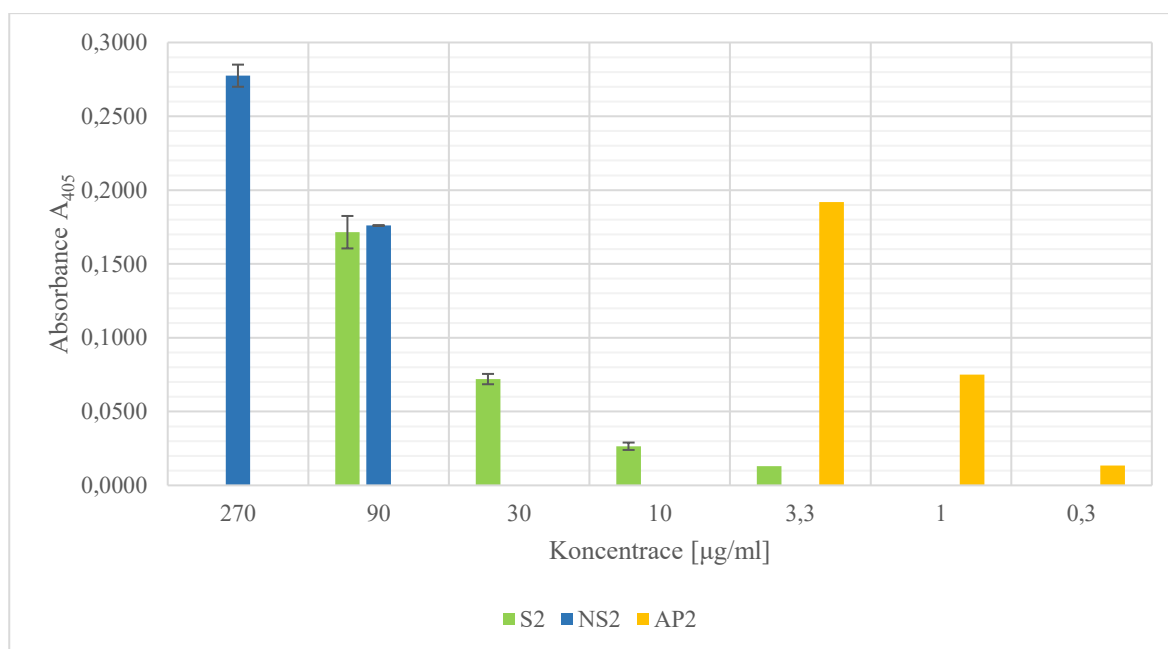
Pro porovnání imunoreaktivity afinitně purifikovaných protilátek byla použita metoda ELISA, při které byla sledována reaktivita směsných specifických protilátek, nezachycených specifických protilátek a afinitně purifikovaných protilátek (Obrázek 13 a Obrázek 14). Při stejné koncentraci 3,3 µg/ml vykazovaly afinitně purifikované protilátky přibližně 2,5× vyšší reaktivitu než směsné specifické protilátky izolované z vaječného žloutku.



Obrázek 13 – Reaktivita frakcí z afinitní purifikace protilátek CoV1 určená metodou ELISA. Jako antigen byl použit konjugát BSA-CoV1 pro protilátky proti proteinu CoV1. Byly testovány izolované specifické protilátky z vaječného žloutku (Sp1) o koncentraci 90, 30, 10 a 3,3 µg/ml, nenavázané specifické protilátky, které se nezachytily na kolonu (NS1) o koncentraci 270 a 90 µg/ml a afinitně purifikované specifické protilátky (AP1) o koncentraci 3; 1 a 0,3 µg/ml. Absorbance byla měřena při vlnové délce 405 nm. V grafu jsou vyneseny hodnoty absorbance, které odpovídají reaktivitě jednotlivých koncentrací protilátek. Tato hodnota absorbance byla získána odečtením absorbance preimunní frakce od absorbance frakce specifické. Hodnoty jsou průměry ze dvou paralelních stanovení.

Z porovnání ředění frakcí s obdobnou imunoreaktivitou (hodnotou absorbance) vychází, že afinitně purifikované protilátky AP1 byly zakoncentrovány přibližně 10× oproti frakci směsné specifické protilátky (4.1).

$$\eta = \frac{A_{3,3} (AP1)}{A_{30} (S1)} \cdot \frac{30}{3,3} = \frac{0,2585}{0,2650} \cdot \frac{30}{3,3} = 8,87 \quad (4.1)$$

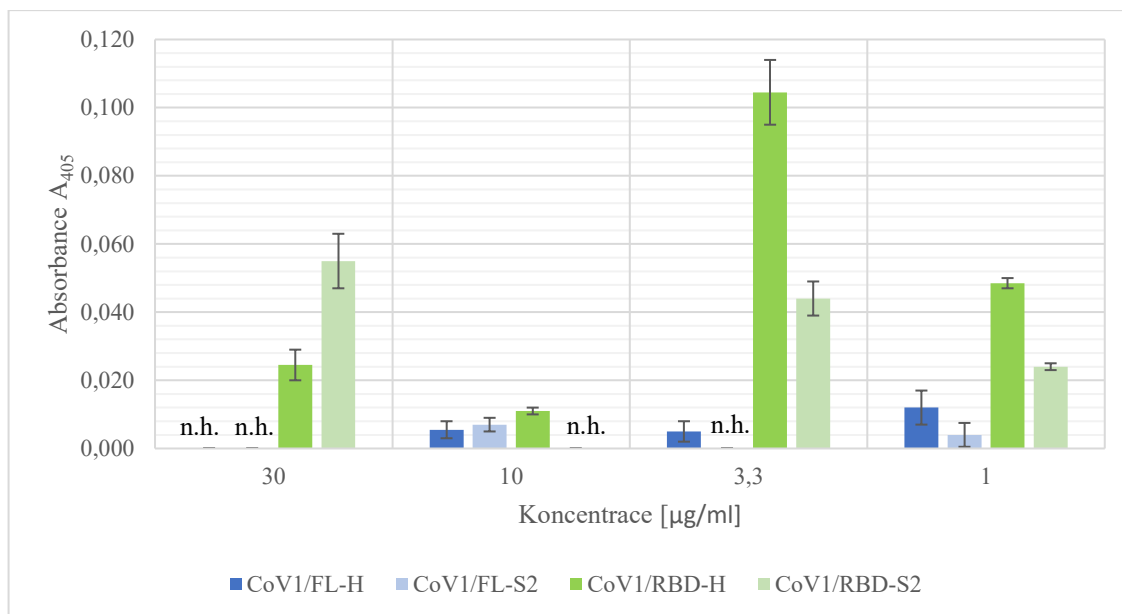


Obrázek 14 – Reaktivita frakcí z afinitní purifikace protilátek CoV2 určená metodou ELISA. Jako antigen byl použit konjugát BSA-CoV2 pro protilátky proti proteinu CoV2. Byly testovány izolované specifické protilátky z vaječného žloutku (Sp2) o koncentraci 90, 30, 10 a 3,3 µg/ml, nenavázané specifické protilátky, které se nezachytily na kolonu (NS2) o koncentraci 270 a 90 µg/ml a afinitně purifikované specifické protilátky (AP2) o koncentraci 3; 1 a 0,3 µg/ml. Absorbance byla měřena při vlnové délce 405 nm. V grafu jsou vyneseny hodnoty absorbance, které odpovídají reaktivitě jednotlivých koncentrací protilátek. Tato hodnota absorbance byla získána odečtením absorbance preimunní frakce od absorbance frakce specifické. Hodnoty jsou průměry ze dvou paralelních stanovení.

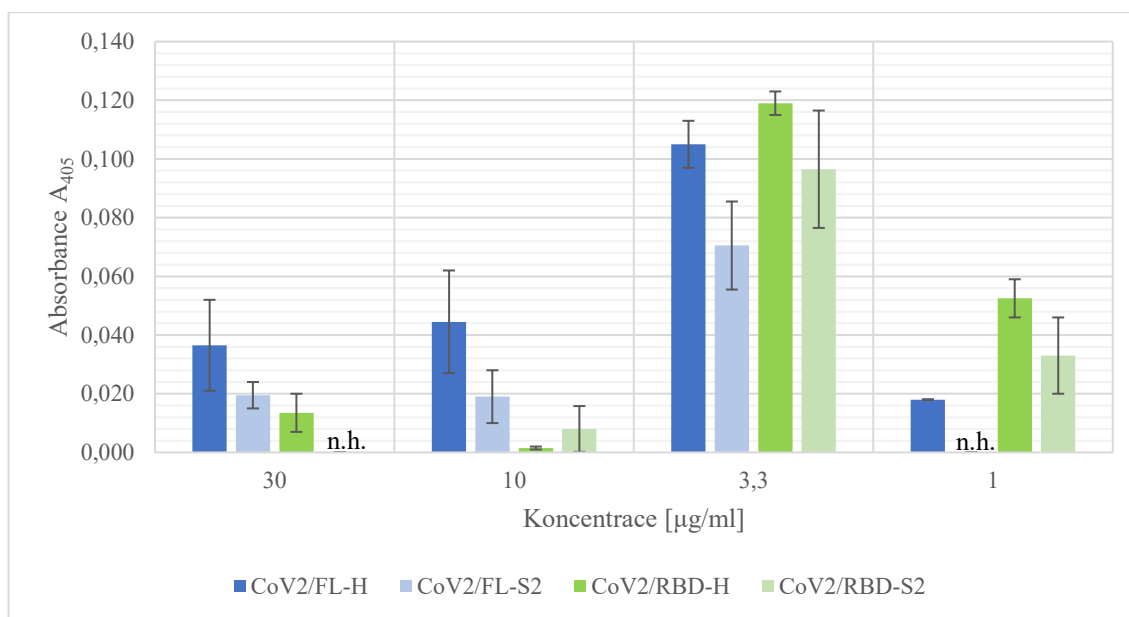
Z porovnání ředění frakcí s obdobnou imunoreaktivitou (hodnotou absorbance) vychází, že afinitně purifikované protilátky AP2 byly zakoncentrovány přibližně 30× oproti frakci směsné specifické protilátky (4.2).

$$\eta = \frac{A_{3,3} (AP2)}{A_{30} (S2)} \cdot \frac{90}{3,3} = \frac{0,2685}{0,2685} \cdot \frac{90}{3,3} = 27,27 \quad (4.2)$$

Dále byla reaktivita protilátek na vybrané antigeny povrchového spike proteinu viru SARS-CoV-2, které byly poskytnuty RNDr. Cyrilem Bařinkou, PhD. (BIOCEV). Jeden antigen byl celý povrchový spike protein viru SARS-CoV-2 exprimovaný s HEK buňkami a S2 buňkami. HEK buňky jsou nádorové buňky ledvin, S2 buňky jsou hmyzí buňky S2, odvozené od organismu *Drosophila*. Jako druhý antigen byla zvolená část RBD domény (sekvence AK 332–529) z interakčního místa s ACE 2 receptorem. Tato část byla také exprimovaná v HEK a S2 buňkách. Vzorky označené FL-H, FL-S2, RBD-H, RBD-S2 byly použity jako antigeny při testování reaktivity specifických protilátek CoV1, CoV2 a afinitně purifikovaných protilátek AP1 a AP2 metodou ELISA. Výsledky jsou zachyceny v grafech (Obrázek 15 a Obrázek 16).



Obrázek 15 – Reaktivita specifických a afinitně purifikovaných protilátek CoV1 proti vybraným antigenům povrchového spike proteinu SARS-CoV-2 určená metodou ELISA. Protilátka CoV1 byla před použitím vysycena BSA. Reaktivita specifických protilátek CoV1 (v koncentracích 10 a 30 µg/ml) a afinitně purifikovaných protilátek AP1 (v koncentracích 1 a 3,3 µg/ml) byla testována na vybraném antigenu z povrchového spike proteinu SARS-CoV-2, které byly exprimovány v HEK a S2 buňkách (FL-H, FL-S2, RBD-H a RBD-S2). V grafu jsou vyneseny hodnoty absorbance specifické protilátky po odečtení reaktivity preimunní frakce. Hodnoty jsou průměry ze dvou paralelních stanovení. Hodnota n.h. označuje negativní hodnotu (nižší reaktivita specifických protilátek oproti kontrolním).



Obrázek 16 – Reaktivita specifických a afinitně purifikovaných protilátek CoV2 proti vybraným antigenům povrchového spike proteinu SARS-CoV-2 určená metodou ELISA. Reaktivita specifických protilátek CoV1 (v koncentracích 10 a 30 µg/ml) a afinitně purifikovaných protilátek AP1 (v koncentracích 1 a 3,3 µg/ml) byla testována na vybraném antigenu z povrchového spike proteinu SARS-CoV-2, které byly exprimovány v HEK a S2 buňkách (FL-H, FL-S2, RBD-H a RBD-S2). V grafu jsou vyneseny hodnoty absorbance specifické protilátky po odečtení reaktivity preimunní frakce. Hodnoty jsou průměry ze dvou paralelních stanovení. Hodnota n.h. označuje negativní hodnotu (nižší reaktivita specifických protilátek oproti kontrolním).

4.5 CPE a IF stanovení

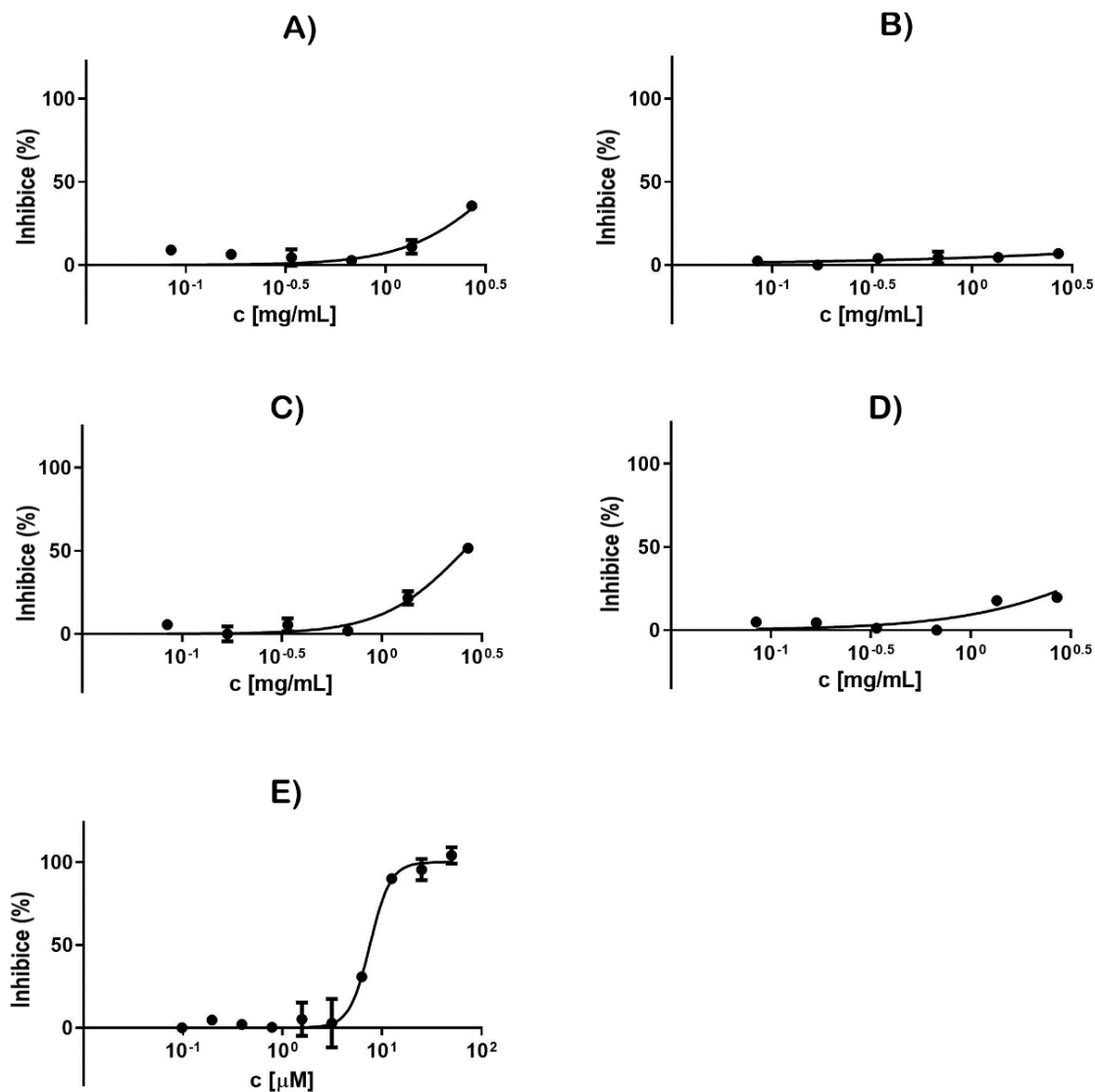
Vzorky K1, Sp1, K2 a Sp2 byly testovány na ÚOCHB na jejich neutralizační aktivitu vůči viru SARS-CoV-2. Test byl proveden dvěma způsoby, CPE a IF testování. Detekce pomocí inhibice cytopatického efektu CPE způsobeného virem ukázala slabou neutralizační aktivitu u Sp1. Při vyhodnocování výsledků pomocí imunofluorescence (IF) byla zaznamenána aktivita, která ale byla pozorována i u K1. Výsledky viz Tabulka 3, Obrázek 17 a Obrázek 18. Pro srovnání byl použit inhibitor Remdesivir. Výrazná inhibiční (neutralizační) aktivita při koncentracích IgY počínaje 2,7 mg/ml nebyla pozorována.

Tabulka 3 – Souhrn výsledků měření CPE a IF testování.

číslo	IgY	CC50 [mg/ml]	EC50 [mg/ml] (CPE)	95% CI z EC50 (CPE)	EC50 [mg/ml] (IF)	95% CI z EC50 (IF)
1	K1	> 2,7	> 2,7	n.a.	2,02	1,2 – 3,3
2	K2	> 2,7	> 2,7	n.a.	> 2,7	n.a.
3	Sp1	> 2,7	2,58	2,1 – 3,2	1,5	1,0 – 2,4
4	Sp2	> 2,7	> 2,7	n.a.	2,25	1,0 – 5,3
5	Remdesivir	> 2,7	7,55 μ M	n.a.	1,16 μ M	0,8 – 1,8

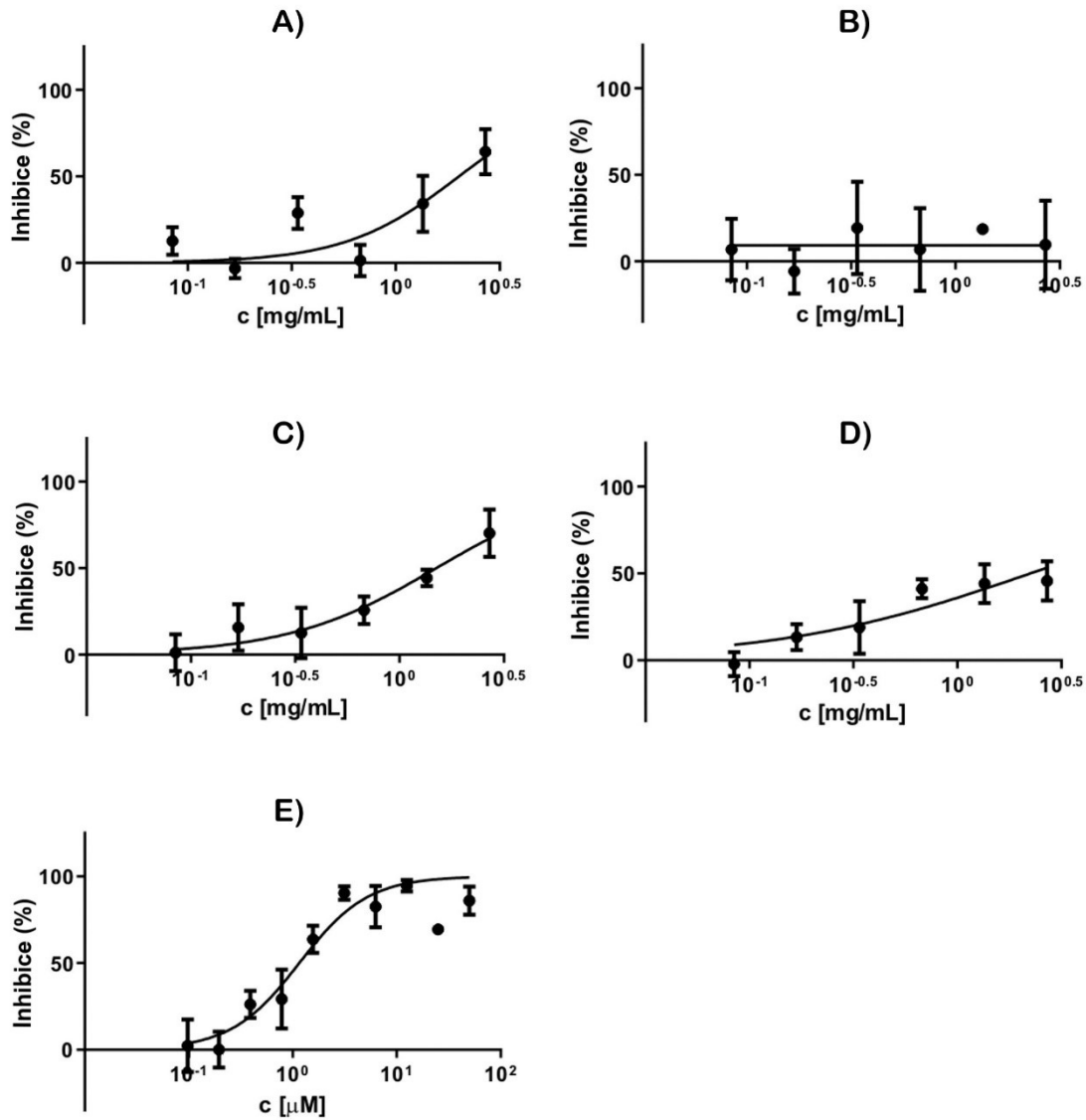
IgY = preimunní a specifické protilátky CoV1 (vzorek K1 = preimunní a Sp1 = specifický) a CoV2 (vzorek K2 = preimunní a Sp2 = specifický); CC50 = cytotoxická koncentrace vzorku, která způsobí 50 % úhyn buněk; EC50 = efektivní koncentrace vzorku, která způsobí 50% inhibici viru; 95% CI EC50 = konfidenční interval hodnot 95%; n. a. = z angl. „non applicable“, pro toto měření není hodnota. Data byla poskytnuta Dr. Janem Weberem (ÚOCHB).

Pro vyhodnocování výsledků byla experimentálními body proložena sigmoidální regrese, ze které byly vypočteny hodnoty EC50 pro vzorky, které vykázaly 50 % efekt sledovaného parametru. Z testovaných vzorků vykázal 100 % inhibici pouze Remdesivir. Z námi dodaných vzorků vyšel nejlépe vzorek Sp1, který při CPE stanovení dosáhl 50 % inhibice v testovaném rozmezí. Druhý vzorek byl méně účinný.



Obrázek 17 – CPE stanovení – grafy s hodnotami EC50. Semilogaritmická závislost koncentrace na procentu inhibice. Při sestrování grafů byla použita sigmoidální regrese. Hodnota EC50 odpovídá inflexnímu bodu na sigmoidě. V části A) je zobrazen graf pro CPE stanovení vzorku K1, v části B) pro vzorek K2, v části C) pro vzorek Sp1, v části D) pro vzorek Sp2 a v části E) pro vzorek s Remdesivirem. Zdrojové obrázky byly poskytnuty Dr. J. Weberem (ÚOCHB).

Při IF stanovení dosáhl 100 % inhibice opět pouze Remdesivir. Alespoň 50 % inhibici vykazaly vzorky K1, Sp1 a Sp2. U vzorku Sp1 je inhibice výraznější než při předchozím stanovení.



Obrázek 18 – IF stanovení – grafy s hodnotami EC50. Semilogaritmická závislost koncentrace na procentu inhibice. Při sestrovování grafů byla použita sigmoidální regrese. Hodnota EC50 odpovídá inflexnímu bodu na sigmoidě. V části A) je zobrazen graf pro IF stanovení vzorku K1, v části B) pro vzorek K2, v části C) pro vzorek Sp1, v části D) pro vzorek Sp2 a v části E) pro vzorek s Remdesivirem. Zdrojové obrázky byly poskytnuty Dr. J. Weberem (ÚOCHB).

5 Diskuze

Koronaviry představují významné původce akutních respiračních infekcí. V roce 2020 vyhlásila Světová zdravotnická organizace (WHO) pandemii kvůli celosvětovému výskytu nemoci COVID-19 způsobenou koronavirem typu SARS-CoV-2. Koronaviry obsahují čtyři hlavní strukturální proteiny – povrchovým (S), obalovým (E), transmembránovým (M) glykoproteinem a vnitřním fosforylovaným nukleokapsidovým proteinem (N). Z pohledu vývoje protilátek proti tomuto viru je nejzajímavější povrchový „spike“ protein, který představuje hlavní faktor virulence. Je tvořen dvěma doménami S1 a S2. Pro vstup do buňky využívá navázání se na povrchový receptor ACE 2 prostřednictvím své RBD, která je součástí S1 podjednotky a specificky rozeznává tento receptor. Právě interakci povrchového spike proteinu s buněčnými receptory inhibují tzv. neutralizační protilátky.

V současnosti se proti nemoci COVID-19 očkuje dvěma typy vakcín. Na principu mRNA vakcín jsou založeny vakcíny od firem Pfizer/BioNTech a Moderna a adenovirové vakcíny využívají firmy AstraZeneca nebo vakcína Sputnik V. Vedle aktivní imunizace byl k léčbě nemoci COVID-19 využíván také lék Remdesivir, který inhibuje RNA-dependentní-RNA-polymerasu viru a který byl podáván pacientům nitrožilně v nemocničních zařízeních.

Jiným konceptem, jak ochránit populaci před zmíněnou pandemií je tzv. pasivní imunizace – tedy podání protilátek „zvenčí“. Cílem předkládané práce bylo vytvořit zvířecí, konkrétně slepičí, protilátky proti vybraným úsekům povrchového proteinu SARS-CoV-2, které by sloužily jako prostředek pasivní imunizace proti onemocnění COVID-19 [36]. Hlavní výhodou slepičích protilátek je, že jsou poměrně snadno dostupné ve velkém množství a jejich produkce je ekonomicky výhodná. Sběr vajec je neinvazivní způsob získání potřebného materiálu k izolaci IgY. Další výhodou je, že slepičí protilátky nezpůsobují cestou aktivace komplementu zánětlivé reakce a jsou snadno a rychle purifikovatelné s vysokou čistotou.

V souvislosti s onemocněním COVID-19 je zvažováno užití specifických slepičích protilátek jako prostředek pasivní imunizace k prevenci infekce virem SARS-CoV-2 [36]. Tuto strategii založenou na použití extraktu ze žloutku vajec slepic imunizovaných rekombinantně připraveným "spike" proteinem testovali výzkumníci sdružení v organizaci

SPARK při Stanford University [37]. Cíl naší práce byl obdobný, ale přesněji zacílený na přípravu protilátek proti peptidům vybraným z oblasti RBD viru. Kromě toho, že se jedná o přístup vedoucí k přípravě jen inhibičních protilátek, je ekonomicky podstatně výhodnější. Imunizace rekombinantním "spike" proteinem je nesrovnatelně dražší než příprava imunogenu na základě syntetizovaného oligopeptidu. Uvažovaným způsobem aplikace je nosní sprej, který by obsahoval anti-peptidové protilátky proti virovému spike proteinu, které by zablokovaly jeho interakční místa a nemohlo by tak dojít k navázání viru a propuknutí nemoci.

Aminokyselinové sekvence zvolených peptidů byly vybírány z interakční oblasti povrchového spike proteinu viru SARS-CoV-2 s receptorem ACE 2 (obrázek 7). Byly vybrány takové sekvence, které nebyly součástí sekundární struktury a pomocí programu BLAST byly shledány jako unikátní vzhledem k lidským a slepičím proteinům. Ze současných poznání bylo zjištěno, že i přes častou mutaci viru SARS-CoV-2 se námi vybrané sekvence vyskytují v každé mutaci viru v podstatě nezměněné, takže lze usuzovat, že byly zvoleny správně, neboť mají zásadní význam pro reprodukci viru.

Syntetizované peptidy jsou poměrně malé molekuly, které by v cizím organismu nevyvolaly dostatečně silnou imunitní odpověď, proto musely být navázány na vhodnou nosičovou molekulu. Touto molekulou bylo zvoleno KLH, jelikož slepice se s tímto proteinem pravděpodobně nemohla nikde setkat, protože je získávána z měkkýšů, kteří jsou fylogeneticky vzdáleni od savců. Také má vysokou molekulovou hmotnost a obsahuje na svém povrchu dostatek skupin pro navázání peptidu, takže po imunizaci zvířete se proti konjugátu peptid-KLH vytvoří dostatek kvalitních protilátek. Dále byly připraveny i konjugáty peptidů s BSA. Tento konjugát byl dále využit při metodě ELISA jako antigen k průkazu tvorby anti-peptidových protilátek, slepice jím imunizovány nebyly.

Pro zjištění schopnosti protilátek specificky rozpoznávat antigen bylo využito nepřímé stanovení pomocí metody ELISA. Výsledky, které jsou zachyceny na obrázku 8 potvrzují, že imunizace proběhla a došlo k vytvoření specifických anti-peptidových protilátek. Dále je patrné, že u protilátek CoV2 naměřená reaktivita neodpovídá očekávané koncentrační závislosti. Zřejmě došlo k tomu, že antigen na destičce byl přesycen, a tak byla naměřená absorbance v příslušných jamkách podobná. Tato skutečnost byla pravděpodobně způsobena nedostatečným množstvím antigenu na destičce.

Překvapivé výsledky byly zjištěny při dalším testování protilátek. Jak kontrolní, tak specifické protilátky rozpoznávají i konjugáty s BSA. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že slepice jsou schopny vytvářet protilátky i proti potravním antigenům. Často jsou krmeny masokostní moučkou, která obsahuje i hovězí sérový albumin, na který si mohly vytvořit protilátky již dříve. Takže při izolaci specifických protilátek z vaječného žloutku obsahují získané polyklonální protilátky i protilátky proti potravním antigenům. Aby bylo možné sledovat jen imunitní odpověď na podaný peptid, byla tato reaktivita s BSA eliminována vysycením protilátek tímto proteinem. Po vysycení protilátek byla znovu zjišťována jejich reaktivita a z hodnot v grafu na obrázku 9 lze říct, že vysycení bylo účinné. Během dalšího provedení imunochemického stanovení bylo zjištěno, že reaktivita protilátek CoV1 je nižší než u protilátek CoV2 (obrázek 10). Vzhledem k tomu, že na každý imunogen byla použita jedna slepice nelze se vyjádřit k imunogenicitě vybraných peptidů.

Dále bylo třeba zjistit, zda připravené anti-peptidové protilátky rozpoznají peptidový epitop ve „spike“ nebo alespoň v jeho RBD. Nejprve byla při metodě ELISA použita destička s jamkami, které měly na svém povrchu komerčně aplikován celý „spike“ protein. Při prvním provedení (obrázek 11) nebyly jamky ničím blokovány a získané výsledky jsou zřejmě chybné. Pro druhé provedení byly jamky zablokovány roztokem řídkého bílku, aby byla eliminována nespecifická reakce protilátek s povrchem jamek, jelikož i preimunní frakce protilátek vykazovala během prvního stanovení značnou reaktivitu. Z výsledků na obrázku 12 je patrné, že protilátky CoV1 vykazují výrazně vyšší aktivitu než protilátky CoV2. Toto zjištění neodpovídá výsledkům ELISA, kdy byly jako antigen použity peptidy konjugované na BSA. Možné vysvětlení souvisí s tím, že v celém „spike“ proteinu je omezená expozice peptidu pro interakci s protilátkami. Celková reaktivita protilátek je po zablokování jamek velice nízká. Bylo to zřejmě způsobeno ovlivněním jamek při skladování v lednici.

Abychom získali z polyklonálních protilátek pouze specifické protilátky CoV1 a CoV2, byla provedena afinitní purifikace protilátek. Díky tomu došlo k navýšení množství specifických protilátek CoV1 a CoV2 celkem 10× a 30×, což odpovídá 0,035 %, respektive 0,043 % z celkového množství izolovaných protilátek. Celkový výtěžek byl velice nízký, pravděpodobně došlo k překročení kapacity kolony, která nebyla dostatečná. Další navýšení jejich množství by bylo možno docílit opakovaným provedením afinitní purifikace frakcí nezachycených specifických protilátek. Reaktivita afinitně purifikovaných protilátek byla

ověřována pomocí metody ELISA, kde byly porovnány se směsnými protilátkami a nezachycenými specifickými protilátkami. Z hodnot na obrázku 13 a 14 je patrné, že afinitně purifikované protilátky vykazovaly vyšší reaktivitu než směsné protilátky.

Následně byly specifické a afinitně purifikované protilátky testovány na vybraných antigenech z interakční domény povrchového spike proteinu s ACE 2 receptorem, které byly laboratorně připraveny expresí v HEK nebo S2 buňkách (obrázek 15 a 16). Z naměřených hodnot absorbance je patrné, že specifické protilátky CoV1 a CoV2 reagují s antigeny jen slabě, zatímco afinitně purifikované vykazují vyšší reaktivitu. Nejvyšší hodnoty reaktivity byly pozorovány vůči antigenu RBD-H, tedy doméně "spike" proteinu, která interaguje s ACE 2 receptorem. To potvrzuje, že peptidy byly správně navrženy a jsou schopné rozpoznat „spike“ protein z viru SARS-CoV-2. Negativní hodnoty reaktivity jsou způsobeny silnější reakcí preimunní frakce než frakce specifické. To může být způsobeno tím, že slepice se mohla v minulosti setkat třeba se „spike“ proteinem jiného koronaviru. V tomto případě je zřejmě vhodnější neodečítat hodnoty absorbance preimunní frakce od specifické, ale vynést do grafu obě hodnoty vedle sebe.

V druhém případě byla využita ELISA destička ze soupravy pro stanovení reaktivity lidských IgG na antigeny viru SARS-CoV-2 (GA CoV-2 IgG, GA GENERIC ASSAYS GmbH, Německo). Protilátky byly také testovány na komerční ELISA (GA CoV-2 IgG, GA GENERIC ASSAYS GmbH, Německo). Výsledné hodnoty reaktivity se pohybovaly v záporných hodnotách, což bylo zřejmě způsobeno tím, že jako antigeny byly použity jiné proteinové epitopy z viru SARS-CoV-2. Tato ELISA nebyla míněna k průkazu neutralizačních protilátek, ale ke zjištění stavu protilátek po prodělaném onemocnění COVID-19.

V závěru práce byla zjišťována inhibiční aktivita protilátek v buněčných liniích infikovaných virem SARS-CoV-2. Pro srovnání byl během testu použit i vzorek Remdesiviru. Vzorky protilátek CoV1 a CoV2 byly testovány na ÚOCHB dvěma způsoby – na cytopatický efekt a imunoflorescenčním stanovením (CPE a IF testování). Hodnoty v konfidenčním intervalu 95 % pro CPE i IF stanovení ukazují, že během testování byly nejúčinnější specifické protilátky CoV1. Zvolená počáteční koncentrace protilátek byly ale nižší, než aby bylo dosaženo úplného protekčního efektu. Přesto se podařilo určit EC₅₀, které jsou v oblasti 2–3 mg IgY/ml v buněčném systému. U hodnot pro EC₅₀ při IF testování je viditelná reakce kontrolního vzorku K1. To mohlo být způsobeno tím, že se zvíře již dříve

mohlo setkat s jiným typem zvířecího koronaviru, a vyvinulo protilátky, které křížově reagují se „spike“ proteinem lidského koronaviru SARS-CoV-2. Neznamená to však nespecifitu vyrobených protilátek. Z výsledků vyplývá, že pro další testování je potřeba připravit vzorky o vyšší koncentraci anti-peptidových protilátek.

6 Závěr

V rámci experimentální části této bakalářské práce se podařilo připravit anti-peptidové slepičí protilátky proti povrchovému spike proteinu viru SARS-CoV-2, které inhibují navázání viru na ACE 2 receptor. Slepičí protilátky by mohly být vhodným způsobem prevence onemocnění COVID-19.

- Byla provedena izolace specifických slepičích imunoglobulinů proti peptidu z povrchového spike proteinu viru SARS-CoV-2.
- Imunochemickou metodou ELISA byla ověřena reaktivita specifických protilátek CoV1 a CoV2 proti peptidům CoV1 a CoV2. Protilátky byly schopné rozpoznat peptidy ve struktuře povrchového spike proteinu.
- Anti-peptidové protilátky vykazovaly inhibiční aktivitu v CPE a IF testech s buněčnou linií infikovanou virem SARS-CoV-2. Hodnota EC50 pro nejúčinnější vzorek protilátek CoV1 byla 1,5 mg/ml.
- Afinitní purifikací došlo k zakoncentrování specifických protilátek přibližně 10× u protilátek CoV1 a 30× u protilátek CoV2.

Seznam použité literatury

1. Malik, Y.A. (2020) Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays. J. Pathol.* **42**, 3–11.
2. Trojánek, M., Grebenyuk, V., Herrmannová, K., Nečas, T., Gregorová, J., Kucbel, M., Šín, R., Roháčová, H., Stejskal, F. (2020) Nový koronavirus (SARS-CoV-2) a onemocnění COVID-19. *Farmakoter. Rev.* **1**, 12.
3. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–33.
4. Singhal, T. (2020) A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.* **87**, 281–86.
5. Sohrabi, C., Alsafi, Z., O'Neill, N., Khan, M., Kerwan, A., Al-Jabir, A., Iosifidis, C., Agha, R. (2020) World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *Int. J. Surg. Lond. Engl.* **76**, 71–76.
6. COVID-19 pandemic URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19-pandemic> [Viděno prosinec 11, 2020].
7. Coronavirus URL: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/coronavirus> [Viděno prosinec 11, 2020].
8. Tools to Study SARS CoV 2 Host Interactions URL: <https://www.caymanchem.com/news/tools-to-study-sars-cov-2-host-interactions> [Viděno prosinec 13, 2020].
9. Ye, Z.-W., Yuan, S., Yuen, K.-S., Fung, S.-Y., Chan, C.-P., Jin, D.-Y. (2020) Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int. J. Biol. Sci.* **16**, 1686–97.
10. Han, Q., Lin, Q., Jin, S., You, L. (2020) Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *J. Infect.* **80**, 373–77.

11. Wang, M.-Y., Zhao, R., Gao, L.-J., Gao, X.-F., Wang, D.-P., Cao, J.-M. (2020) SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 1–17.
12. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 11727–34.
13. Horák, D. (2020) Nový koronavirus SARS-CoV-2., 100.
14. Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdlička, T., Špíšek, R. (2017) *Základy imunologie* (Stanislav Juhaňák - TRITON, Praha). 6. Vyd.
15. Jílek, P. (2014) *Imunologie, stručně, jasně, přehledně* (Grada Publishing a.s., Praha). 4. Vyd.
16. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science). 4. Vyd.
17. Fusek, M., Vítek, L., Blahoš, J., Hajdúch, M., Ruml, T., a kolektiv (2012) *Biologická léčiva* (Grada Publishing a.s.).
18. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report | NEJM URL: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2022483> [Viděno prosinec 11, 2020].
19. Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S., Snowden, N. (2018) *Základy klinické imunologie* (Stanislav Juhaňák - TRITON, Praha). 6. Vyd.
20. Krejsek, J., Kopecký, O. (2004) *Klinická imunologie* (Nucleus HK, Hradec Králové). 1. Vyd.
21. Lipman, N.S., Jackson, L.R., Trudel, L.J., Weis-Garcia, F. (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.* **46**, 258–68.
22. Shou, M., Lu, A.Y.H. (2009) Antibodies as a probe in cytochrome P450 research. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **37**, 925–31.
23. Antibody Structure URL: <https://bxcell.com/antibody-structure/> [Viděno prosinec 12, 2020].

24. Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D., Thewis, A. (2009) Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: A review. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* **13**, 295–308.
25. At, A., Sa, E.-K., Ss, S., Eia, A. (2018) IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Hum. Vaccines Immunother.* **15**, 264–75.
26. Kovacs-Nolan, J., Mine, Y. (2004) Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian Poult. Biol. Rev.* **15**, 25–46.
27. Carlander, D., Kollberg, H., Wejåker, P.-E., Larsson, A. (2000) Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol. Res.* **21**, 1–6.
28. Zhang, W.-W. (2003) The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discov. Today* **8**, 364–71.
29. Carlander, D., Larsson, A. (2001) Avian antibodies can eliminate interference due to complement activation in ELISA. *Ups. J. Med. Sci.* **106**, 189–95.
30. Information, N.C. for B., Pike, U.S.N.L. of M.R., BethesdaMD, 20894USA URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/6VW1> [Viděno březem 24, 2021].
31. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 (Schrödinger, LLC.).
32. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [Viděno březem 24, 2021].
33. Imject™ Maleimide-Activated mcKLH URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/77605> [Viděno prosinec 12, 2020].
34. Hodek, P., Trefil, P., Simunek, J., Hudecek, J., Stiborova, M. (2013) Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 113–24.
35. SulfoLink™ Coupling Resin URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20401> [Viděno březem 5, 2021].

36. Somasundaram, R., Choraria, A., Antonysamy, M. (2020) An approach towards development of monoclonal IgY antibodies against SARS CoV-2 spike protein (S) using phage display method: A review. *Int. Immunopharmacol.* **85**, 106654.
37. Phase I Clinical Trial Begins for COVID-19 Immunity Agent – SPARK Stanford URL: <https://sparkmed.stanford.edu/phase-i-clinical-trial-begins-for-covid-19-immunity-agent/>
[Viděno květen 21, 2021].

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

Jméno a příjmení (s adresou)	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka