

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Medicinální chemie



Tereza Cibiková

Příprava anti-CD20 vazebné domény a její konjugace na polymerní nosič

Anti-CD20 nanobody production and its conjugation to a polymeric carrier

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěla poděkovat RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za vedení celé mé práce, za hodiny a dny, při kterých mě směřoval dále ve výzkumu. Díky jeho vedení jsem se měla možnost nejdříve seznámit a poté i zdokonalit s odbornou prací v laboratoři, s prací s množstvím přístrojů, a to i na jiných specializovaných pracovištích. Za těch několik měsíců v jeho laboratoři mnohokrát děkuji. Další velké poděkování patří Bc. Jakubovi Jeníčkovi, který mi s trpělivostí a ochotou vše v laboratoři názorně předváděl a vysvětloval. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře Dr. Vaňka, kteří byli vždy ochotni mi pomoci. Na závěr bych chtěla podělovat mojí rodině, která mi stála oporou a díky které jsem se dostala takhle daleko.

ABSTRAKT

Pro rakovinná onemocnění způsobená maligní transformací B-lymfocytů je typická zvýšená exprese povrchového znaku 20 (CD20, z angl. cluster of differentiation 20). Tradičně tak léčba tohoto onemocnění cílí právě na CD20, nejčastěji pomocí monoklonálních protilátek (např. rituximab). Kvůli vedlejším účinkům těchto terapeutik jsou však zkoumány alternativní přístupy k terapeutickému zásahu skrz CD20. Jako perspektivní se pak jeví vývoj proteinových léčiv, konjugovaných s polymerním nosičem, která by neměla nežádoucí účinky monoklonálních protilátek, a zároveň by měla dostatečnou dobu působení v organismu.

Cílem této práce byla příprava a charakterizace makromolekulárního konjugátu protein-polymer, jehož interakce s CD20 by vyvolávala apoptózu maligně transformovaných B-lymfocytů.

KLÍČOVÁ SLOVA

CD20, nanoprotlátka, polymerní nosič, pHPMA, sortasa, click reakce

ABSTRACT

Cancerous diseases caused by malignant transformation of B-lymphocytes are characterized by increased expression of surface marker 20 (CD20, cluster of differentiation 20). Traditionally, the treatment of this disease targets CD20, most often with monoclonal antibodies (e.g. rituximab). However, due to the side effects of these therapeutics, alternative approaches to therapeutic intervention through CD20 are being explored. The development of protein drugs conjugated to a polymeric carrier, which would not have the side effects of monoclonal antibodies and would have a sufficient duration of action in the body, seems promising.

The aim of this work was to prepare and characterize a macromolecular protein-polymer conjugate whose interaction with CD20 would induce apoptosis of malignantly transformed B-lymphocytes.

KEY WORDS

CD20, nanobody, polymeric carrier, pHPMA, sortase, click reaction

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(v/v)	objemový podíl (z angl. volume/volume)
(w/v)	podíl hmotnost/objem (z angl. weight/volume)
(w/w)	hmotnostní podíl (z angl. weight/weight)
A ₂₈₀	absorbance měřená při 280 nm
AA	roztok 29% akrylamidu s 1% <i>N,N'</i> -methylen-bis-akrylamidem
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity)
ADCs	komplexní molekuly složené z protilátky spojené s lékem (z angl. antibody-drug conjugates)
aFGF	kyselý růstový faktor fibroblastů (z angl. acidic fibroblast growth factor)
anti-CD20_LPETGG	nanoprotilátka proti CD20 povrchové doméně
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
AUC	analytická ultracentrifugace (z angl. analytical ultracentrifugation)
CD	povrchové membránové znaky buněk (z angl. cluster of differentiation)
CuAAC	mědi katalyzovaná 3+2 cykloadice mezi azidem a terminálním alkyne (z angl. copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti
DALY	počet let života s postižením (z angl. disability-adjusted life years)
DAR	poměr léčiva k protilátce (z angl. drug-to-antibody ratio)
DBCO	dibenzocyklooktyn
DDSs	systemy podávání léků (z angl. drug delivery systems)
dH ₂ O	deionizovaná voda
DLS	dynamický rozptyl světla (z angl. dynamic light scattering)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOTA	chelátor (z angl. dodecane tetraacetic acid)
DOX	kancerostatikum doxorubicin
DyLight633/Dy633	fluorescenční sonda na polymeru
Fc oblast	konstantní oblast IgG - krystalizovatelný fragment protilátky (z angl. fragment crystallizable)
FcRn	protein – krystalizovatelný receptor neonatálního fragmentu (z angl. neonatal fragment crystallizable receptor)
GPC	gelová permeační chromatografie (z angl. gel permeation chromatography)

hcAb	protilátky těžkého řetězce (z angl. heavy chain antibody)
HEK293T	buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293 (z angl. human embryonic kidney)
HL	Hodgkinovy lymfomy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
HRS	Hodgkin Reed-Sternbergovy buňky
IgG	třída protilátek – imunoglobulin G
IL-2	interleukin 2
IPEI	lineární polyethylenimin
LPHL	speciální podtyp HL – Hodgkinova lymfomu s převahou lymfocytů (z angl. lymphocyte-predominant HL)
L-s-P	terapeutický polymerní konjugát s fluorescenční sondou Dy633 (anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO_Dy633)
L-s-P*	terapeutický polymerní konjugát (anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO)
mAb	monoklonální protilátka (z angl. monoclonal antibody)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
NEAK	nepřirozená aminokyselina (Nε-2-azideoethylloxycarbonyl-l-lysin)
nHL	ne-Hodgkinovy lymfomy
NK buňky	přirozeně zabíjäcké buňky (z angl. natural killer)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (z angl. phosphate buffered saline)
PBS-TK	fosfátem pufovaný fyziologický roztok pro tkáňové kultury (z angl. phosphate buffered saline)
PEG	polyethylen glykol
PEGylace	polyethylen glykolace
pH	vodíkový exponent (z angl. potential of hydrogen)
pHPMA	N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidový kopolymer
RIT	radioimunoterapie
scFv	jednořetězcový variabilní fragment odvozený od protilátky (z angl. single-chain fragment variable)
SDS	Dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti denaturačního činidla dodecylsírany sodného (z angl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
s-P	Konjugát spojka-polymer (spojka-pHPMA_DBCO_Dy633)

SPAAC	azido-alkynová cykloadice řízená sterickým pnutím (z angl. strain-promoted azide-alkyne cycloaddition)
SrtA	enzym sortasa A
TDDSs	systemy cíleného podávání léků (z angl. targeted drug delivery systems)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TNF-R	cytokinový receptor pro tumor nekrotizující faktor (z angl. tumor necrosis factor receptor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VHH	nanoprotilátka – variabilní segment velbloudích protilátek těžkého řetězce
VPA	kyselina valproová (z angl. valproic acid)

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	3
ABSTRAKT.....	4
KLÍČOVÁ SLOVA.....	4
ABSTRACT.....	5
KEY WORDS.....	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
OBSAH.....	9
1 TEORETICKÝ ÚVOD.....	12
1.1 RAKOVINA.....	12
1.1.1 LYMFOMY.....	12
1.1.2 IMUNOTERAPIE S VYUŽITÍM MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK.....	13
1.2 NANOPROTILÁTKY.....	14
1.3 „DRUG DELIVERY“ SYSTÉMY V LÉČBĚ RAKOVINY.....	15
1.3.1 „MAGIC BULLET“.....	16
1.3.2 „TARGETED DRUG DELIVERY“ SYSTÉMY V LÉČBĚ RAKOVINY.....	16
1.4 MAKROMOLEKULÁRNÍ (IMUNO-)TERAPEUTIKA.....	16
1.4.1 POLYMERNÍ TERAPEUTICKÁ LÉČIVA.....	18
1.4.1.1 Léčiva na bázi polyethylen glykolu.....	19
1.4.1.2 Léčiva na bázi poly(N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu).....	19
1.4.2 PŘÍPRAVA MAKROMOLEKULÁRNÍCH LÉČIV.....	20
1.4.2.1 Sortasa A a její modifikovaná forma Sortasa A(7+).....	20
1.4.2.2 „Click“ chemie DBCO skupiny s azidem.....	21
2 CÍLE PRÁCE.....	23
3 MATERIÁL.....	24
3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	24
3.2 CHEMIKÁLIE.....	25
3.3 ENZYMY.....	26
3.4 PŘIPRAVENÉ PUFRY A ROZTOKY.....	26
3.5 BUNĚČNÉ LINIE.....	27
3.6 VEKTORY.....	27
3.7 POLYMERNÍ NOSIČE A NÍZKOMOLEKULÁRNÍ SPOJKA.....	27
4 METODY.....	28

4.1	REKOMBINANTNÍ PŘÍPRAVA anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY	28
4.1.1	URČOVÁNÍ VIABILITY A POČÍTÁNÍ BUNĚK HEK293T	28
4.1.2	TRANSIENTNÍ TRANSFEKCE BUNĚK HEK293T	28
4.1.3	PURIFIKACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY	29
4.1.3.1	Afinitní chromatografie spojená s odsolením a zkoncentrováním vzorku... ..	29
4.1.3.2	Gelová permeační chromatografie (GPC).....	29
4.1.4	ANALÝZA IZOLOVANÉHO PROTEINU METODOU SDS-PAGE	30
4.1.4.1	Příprava 15% polyakrylamidového gelu	30
4.1.4.2	Příprava vzorků proteinu anti-CD20_LPETGG pro SDS-PAGE	31
4.2	CHARAKTERIZACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY BIOFYZIKÁLNÍMI METODAMI	31
4.2.1	OVĚŘENÍ O-GLYKOSYLACE KONSTRUKTU anti-CD20_LPETGG	31
4.2.1.1	O-deglykosylační enzymatická reakce.....	31
4.2.1.2	SDS-PAGE analýza reakční směsi deglykosylace konstruktu anti-CD20_LPETGG	31
4.2.2	STANOVENÍ MÍSTA O-GLYKOSYLACE HMOTNOSTNÍ SPEKTOMETRIÍ 32	
4.3	PŘÍPRAVA A PURIFIKACE POLYMERNÍHO KONJUGÁTU anti-CD20.....	32
4.3.1	TRANSPEPTIDASOVÁ REAKCE ZPROSTŘEDKOVANÁ SORTASOU A .	32
4.3.2	NAPOJENÍ KONSTRUKTU anti-CD20_LPET-spojka NA POLYMERNÍ NOSIČE pHPMA_DBCO_Dy633 a pHPMA_DBCO	33
4.3.3	MĚŘENÍ ABSORPČNÍHO SPEKTRA PŘIPRAVENÉHO POLYMERNÍHO KONJUGÁTU	33
4.4	CHARAKTERIZACE POLYMERNÍHO KONJUGÁTU anti-CD20 BIOFYZIKÁLNÍMI METODAMI	33
4.4.1	MĚŘENÍ DYNAMICKÉHO ROZPTYLU SVĚTLA	33
4.4.2	ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE	33
5	VÝSLEDKY	35
5.1	REKOMBINANTNÍ PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY	35
5.1.1	PRODUKCE A PURIFIKACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY	35
5.1.2	BLIŽŠÍ CHARAKTERIZACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY	36
5.1.2.1	SDS-PAGE získaných frakcí proteinu	36
5.1.2.2	Ověření O-glykosylace konstruktu anti-CD20_LPETGG	37

5.1.2.2.1	Deglykosylace anti-CD20_LPETGG vazebné domény enzymatickou reakcí	37
5.1.2.2.2	SDS-PAGE analýza O-glykosylace konstruktů anti-CD20_LPETGG ..	37
5.1.2.2.3	Určení přesného místa O-glykosylace s využitím hmotnostní spektrometrie.....	39
5.2	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE POLYMERNÍHO KONJUGÁTU	39
5.2.1	PŘÍPRAVA A PURIFIKACE POLYMERNÍHO KONJUGÁTU anti-CD20 NA BÁZI pHPMA NOSIČE	39
5.2.1.1	Transpeptidasová reakce konstruktů anti-CD20_LPETGG s GGGG_spojku zprostředkovaná sortasou A	39
5.2.1.2	Napojení konstruktů anti-CD20_LPET-spojka_azid na fluorescenčně značený polymerní nosič pHPMA_DBCO_Dy633 pomocí „click“ chemie.....	40
5.2.1.3	Pokus o určení koncentrace připraveného polymerního konjugátu s fluorescenční sondou na základě absorpčních spekter.....	42
5.2.1.4	Snaha o určení počtu navázaných molekul anti-CD20 vazebné domény na polymerním nosiči pHPMA v připraveném polymerním konjugátu z absorpčních spekter	43
5.2.1.5	Zkouška stanovení molekulové hmotnosti fluorescenčně značeného polymerního konjugátu pomocí AUC a DLS	45
5.2.2	CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÉHO POLYMERNÍHO KONJUGÁTU POMOCÍ BIOFYZIKÁLNÍCH METOD	45
5.2.2.1	Analýza polymerního konjugátu metodou DLS.....	45
5.2.2.2	Analýza polymerního konjugátu metodou AUC.....	47
6	DISKUSE.....	49
7	ZÁVĚR	50
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 RAKOVINA

Celosvětově ze všech lidských onemocnění rakovina představuje, vztaženo na počet let života s postižením (DALY, z angl. Disability-Adjusted Life Years), největší klinickou, sociální a ekonomickou zátěž¹. Z hlediska úmrtnosti byla rakovina až donedávna po ischemické chorobě srdeční druhou nejčastější příčinou úmrtí, nicméně nejnovější data ukázala, že rakovina je od roku 2020 již první příčinou úmrtí v rámci celosvětové populace^{1,2}. Není tedy překvapivé, že téma rakoviny je stále aktuální a v současné době přibývá stále více výzkumů zaměřujících se na její léčbu.

V současnosti mezi populačně nejčastější druhy rakoviny spadá rakovina plic společně s rakovinou prsu². Tato práce se pak dotýká léčby neméně důležité skupiny zhoubných onemocnění souvisejících s poruchami či deficiencemi imunitního systému, mezi které spadá např. leukémie související s poruchami krve a kostní dřeně a s ní provázaná i rakovina lymfatických tkání, nejčastěji mízních uzlin – tzv. lymfom³⁻⁵.

1.1.1 LYMFOMY

Lymfomy představují různorodou skupinu onemocnění vznikajících klonální proliferací lymfocytů (buňky imunitního systému) a lze je zařadit mezi tuhé nádory imunitního systému. Jsou schopny postihnout jakýkoli orgán v lidském těle a projevují se širokou škálou příznaků⁴⁻⁶. Typicky lze lymfomy dělit do dvou hlavních skupin: na Hodgkinovy lymfomy (HL) tvořící zhruba 10% všech lymfomů, jsou odvozeny od T-buněk nebo přirozeně zabíjácích buněk (NK buňky, z angl. Natural Killer) a na ne-Hodgkinovy lymfomy (nHL) tvořící přibližně 90%, které jsou převážně odvozeny od B-buněk imunitního systému^{4,5}. Konkrétní typ lymfomu je pak spojen se specifickými genetickými abnormalitami, které při svém vývoji specificky získal⁵.

Typickým fenotypickým znakem pro HL i nHL je zvýšená exprese konkrétních buněčných membránových znaků (CD, z angl. cluster of differentiation) a to konkrétně CD15, CD30 a CD20 na jejich povrchu⁷.

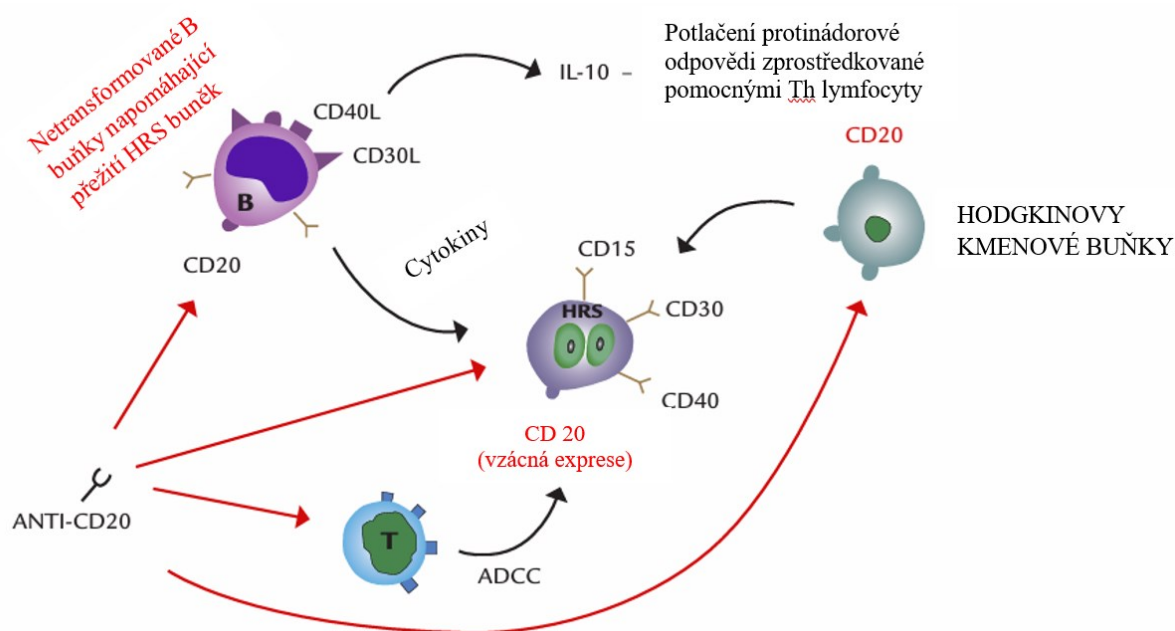
Povrchový znak CD15 patří mezi glykanové struktury (je též známý jako tzv. Sialyl Lewis^x antigen), které se nachází na membránových proteinech řady nádorových buněk a jejich funkcí je adheze lymfocytů k buňkám endoteliální vrstvy. Vazba k buňkám endotelu, která zprostředkovává valivý pohyb cirkulujících nádorových buněk po krevní stěně a tím i šíření rakovinných buněk tělem, je zprostředkována interakcí právě zmiňované povrchové struktury CD15 společně se selektiny – adhezivními proteiny^{8,9}.

Membránový protein CD30 spadá do cytokinové rodiny receptorů – konkrétně do skupiny receptorů pro tumor nekrotizující faktor (TNF-R, z angl. tumor necrosis factor receptor). Mezi širokou škálou funkcí tohoto receptoru (ať už schopnost vyvolávat pleiotropní účinky jak u B-tak i T-lymfocytů, expresi adhezivních molekul, tvorbu cytokinů aj.) v souvislosti s léčbou HL patří i schopnost indukce apoptózy přes CD30⁷.

V neposlední řadě třetí zmíněný znak CD20 se řadí mezi fosfoproteiny a fyziologicky se vyskytuje na povrchu buněk našeho imunitního systému – konkrétně na povrchu B lymfocytů. Tato povrchová struktura našich B-buněk zatím nemá žádný známý fyziologický ligand, ani není známá jeho jakákoli specifická úloha, avšak hraje ústřední roli v humorální imunitní odpovědi tím, že reguluje proliferaci a diferenciaci B buněk^{10–13}.

1.1.2 IMUNOTERAPIE S VYUŽITÍM MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK

Z výše zmiňované specifičnosti CD20 pro B-lymfocyty a díky existenci speciálního podtypu HL – Hodgkinova lymfomu s převahou lymfocytů (LPHL, z angl. lymphocyte-predominant HL), který je charakteristický pouze zvýšenou expresí CD20 bez exprese CD15 a CD30 povrchových struktur, se stal povrchový marker CD20 součástí mnoha výzkumů zaměřených na vývoj nových typů cílených terapeutik^{10,12,14}. S tím souvisí i výzkum a vývoj monoklonálních protilátek (mAb, z angl. monoclonal antibody) se schopností indukce apoptózy u rakovinných buněk¹⁰. Ukázka působení anti-CD20 monoklonálních protilátek na CD20 povrchový marker je uvedena na obr. 1. Zavedení peptidů/proteinů jako bio-terapeutik je tak v oblasti moderního zdravotnictví pravděpodobně jedním z největších úspěchů¹⁵.



Obr. 1: Hlavní cesty, kterými anti-CD20 monoklonální protilátky působí na Hodgkinovu chorobu.

a) přímou inhibicí proliferace Hodgkinových kmenových buněk navázáním se na jejich CD20 vazebnou doménu, čímž dochází k depleci tvorby nových Hodgkins Reed-Sternbergových (HRS) buněk; b) inhibicí diferenciaci HRS vazbou CD20 vazebné domény maligních buněk; c) aktivací komplementové kaskády prostřednictvím buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách (ADCC, z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity), odpovědi zprostředkované T-lymfocyty; d) deplece podpůrných nemaligních B-lymfocytů, které jsou schopny signalizovat RBS buňkám prostřednictvím cytokinů a současně inhibovat Th1 humorální odpověď produkcí IL-10. Obrázek byl převzat a upraven¹⁰.

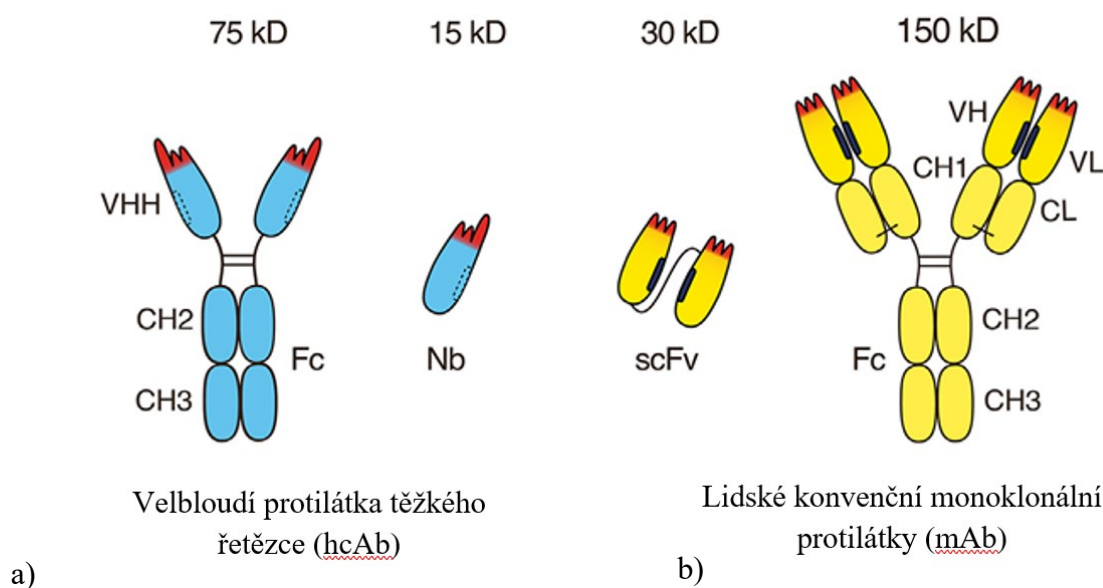
První zavedené mAb terapeutikum cílicí na povrchový znak CD20, který je ve velké míře exprimován různými druhy lymfomů, je rituximab, kdy díky působení rituximab dojde k sítování receptorů CD20 na povrchu rakovinných B-buněk, což má za následek vyvolání apoptózy u zasažených buněk^{16,17}. Dodnes se rituximab v kombinaci s chemoterapií využívá jako první linie léčby CD20 pozitivních B-buněčných nHL¹⁸.

Prokázaný klinický úspěch a účinnost rituximab vedla v posledních letech k vývoji dalších anti-CD20 monoklonálních protilátek, jako např. obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab a ocrelizumab¹⁶.

Při vývoji nových terapeutik odvozených od monoklonálních protilátek je jedním z největších problémů, který je třeba v klinickém použití u proteinových terapeutik (na rozdíl od nativních mAb) řešit, je jejich krátký poločas působení v organismu, který je způsoben jejich rychlou degradací v séru v kombinaci s rychlým vyloučením v důsledku enzymatické degradace, renální clearance, jaterního metabolismu či imunogenicity¹⁵. Krátký poločas účinkování těchto léčiv v těle má za následek, že se onemocnění ve velkém množství případů navrácí a u pacientů nastává relaps. Z tohoto důvodu společně s faktem, že většina nových anti-CD20 mAb vykazuje oproti rituximab větší riziko vedlejších účinků – jako je například vyšší riziko rozvoje autoimunitního onemocnění, se při výzkumu nových či kombinovaných mAb terapeutik s cílem zlepšení klinické účinnosti a/nebo snížení toxicity mimo jiné přistupuje i na modifikaci již schválených užívaných léčiv^{18–22}.

1.2 NANOPROTILÁTKY

Další možností kromě využití mAb terapeutik jako je např. rituximab při cílení na CD20 vazebnou doménu, a čeho je zároveň využito i v této práci, je využití tzv. nanoprotilátek (z angl. nanobodies, nano-antibody; viz obr. 2) – variabilních segmentů (VHH) velbloudích protilátek těžkého řetězce (hcAb, z angl. heavy chain antibody)^{18,19}. Jsou to funkční fragmenty protilátek bez lehkých řetězců, jejichž jediná N-koncová doména je schopna plně vázat antigen se stejnou afinitou i specifitou jako kompletní protilátky. Hlavní výhoda nanoprotilátek tedy spočívá v tom, že VHH kombinují příznivé vlastnosti malých molekul i monoklonálních protilátek^{23–25}.



Obr. 2: Porovnání velbloudích protilátek těžkého řetězce (hcAb) s lidskými monoklonálními protilátkami (mAb).

a) hcAb se skládají ze dvou těžkých řetězců a jejich modul pro vazbu na cíl se skládá z jediného variabilního segmentu hcAb – domény VHH taktéž označovanou jako nanoprotilátka (Nb). **b)** konvenční protilátky se skládají ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců. Modul pro vazbu na cíl je složen ze dvou nekovalentně asociovaných variabilních řetězců – domén VH a VL, a je dále stabilizován disulfidickým můstkem mezi doménami CL a CH1. Dvojici VH–VL domén lze geneticky spojit do jednořetězcového variabilního fragmentu (scFv), ve kterém je správná orientace domén zprostředkována pouze pomocí hydrofobního rozhraní mezi oběma V-doménami. Obrázek byl převzat a upraven²⁶.

Nanoprotílátky jsou díky své malé velikosti (kolem 14 – 15 kDa) v porovnání s mAb (kolem 150 kDa, např. rituximab – 145 kDa) ideální pro vázání ve vyšším počtu např. na polymerní nosiče, což je činí vhodnými kandidáty pro konstrukce multivalentních či např. bispecifických proteinových terapeutik^{23,26,27}. Jednou ze zásadních výhod využití těchto proteinů v léčbě rakoviny je jejich vysoká tolerance k různým modifikacím společně se úpravami různých fyzikálně-chemických vlastností s cílem zvýšit jejich protinádorovou aktivitu²⁸. Mimo jiné je lze využít k tzv. přístupu „plug-and-play“, kdy, jak bylo zmíněno výše, lze v závislosti na cíli zvýšit biologickou účinnost pomocí multivalentních konstruktů nebo vytvořit bispecifické VHH, které by pak rozpoznávaly dva různé cíle^{23,29}. Vyšší počet protílátek navázaných na molekulu terapeutika zvyšuje v místě působení terapeutika koncentraci látek schopných vyvolat imunitní odpověď, což má za následek zvýšení možnosti indukce apoptózy u cílených rakovinných buněk.

Zároveň tyto velbloudí segmenty těžkého řetězce s pouze jedinou doménou mají při biotechnologických aplikacích hned několik dalších výhod: první je snadná imunizace lam či velbloudů – ze kterých se pak nanoprotílátky izolují, další je snadná manipulace – VHH jsou vysoce stabilní a dobře rozpustné a zároveň jsou i ekonomicky dobře exprimovatelné v mikroorganismech, což je činní snadno připravitelnými^{23,24,27}. Díky všem výše vyjmenovaným vlastnostem a výhodám tak nanoprotílátky hrají významnou roli při budoucím výzkumu a vývoji nových imunoterapeutických molekul pro diagnostické, terapeutické či biochemické účely nejen při boji proti rakovině^{23,24}.

1.3 „DRUG DELIVERY“ SYSTÉMY V LÉČBĚ RAKOVINY

Léčivé látky, ať již používané v tradiční chemoterapii či v nové molekulárně cílené terapii, zahrnují přírodní nebo chemické sloučeniny, protílátky (nanoprotílátky nevyjímaje), proteiny/peptidy, malé terapeutické molekuly, antineoplastické látky a někdy dokonce i malé molekuly toxických látek. Protinádorové účinky se pak v závislosti na způsobu působení uplatňují různými mechanismy, ale obvykle mají všechny společné slabiny: po podání do lidského těla jejich špatná rozpustnost a/nebo nepříznivé fyzikálně-chemické vlastnosti vedou ke špatné farmakokinetice, obtížnému přístupu k místu působení (nádoru), nedostatečnému vstupu do rakovinných buněk a také k nespecifické toxicitě pro normální zdravé orgány³⁰.

K řešení těchto problémů byly vyvinuty nanomateriály jako nosiče léčiv, které mají velký potenciál zlepšit doručování terapeutických molekul do svých specifických cílů společně s protinádorovými účinky, čímž zvyšují šanci vyvolání dostatečného terapeutického účinku v organismu, tedy tzv. systémy podávání léků (DDSs, z angl. drug delivery systems)^{30,31}.

Funkcí DDSs, jak již název napovídá, je přenášení terapeutických molekul. Do DDSs kromě způsobu doručení terapeutik do těla, jako je např. tableta či injekce, spadají i metody, jak jsou léčiva přenášena po těle např. v micelách nebo s využitím nanočástic, která léčivo chrání před degradací v biologickém prostředí a umožňují kontrolovaně doručovat terapeutické proteiny/peptidy tam, kam je v těle potřeba – tedy modulovat biodistribuci, akumulaci a s tím i spojenou toxicitu léčiva^{32,33}.

1.3.1 „MAGIC BULLET“

S první myšlenkou cíleného doručování léčivých látek přímo do místa postižení, aby docházelo k zasažení tkání pouze na cíleném místě a ostatní zdravé buňky těla zůstaly léčivem nezasázeny, přišel zakladatel chemoterapie a držitel Nobelovy ceny Paul Ehrlich již před více jak sto lety, a to na samém počátku 20. století. Tuto ideální účinnost léčby označil jako „kouzelnou střelu“ v anglickém originále jako „magic bullet“. Tento koncept „kouzelné střely“ Paula Ehrliche je ve výzkumu nových cílených terapeutických látek uplatňován dodnes, kdy dodání chemoterapeutik specificky, účinně a bezpečně do nádoru zůstává i v posledních letech stále významnou výzvou^{34–36}. S rozvojem ať již stávajících či nových technologií ve vědě a výzkumu se dnes již od klasické nespecifické léčby rakoviny chemoterapií spojenou s mnoha vedlejšími účinky způsobených velkou toxicitou léčby – jako jsou např. bolest, zvracení či dystrofie, aj., daří postupně přecházet k protinádorové léčbě, která šetří a/nebo zabraňuje poškození buněk funkčních, zdravých orgánů³⁷.

1.3.2 „TARGETED DRUG DELIVERY“ SYSTÉMY V LÉČBĚ RAKOVINY

Jedním z možných přístupů je tak využití tzv. systémů cíleného podávání léků (TDDSs, z angl. targeted drug delivery systems), kdy jsme schopni řízeně modulovat biodistribuci a akumulaci chemoterapeutických léčiv v cílovém místě – tedy jsme schopni přesně doručit léčivo do postižených oblastí, a tím do velké míry úspěšně snížit toxicitu daného léčiva^{32,37}. S využitím TDDSs lze tak vcelku markantně snížit dávku terapeutika nutnou k léčbě, protože díky zkoncentrování léčivé látky výhradně v místě postižení odpadá distribuce terapeutika po celém organismu, což má za následek omezení vedlejších účinků léčby. V konečném důsledku by tak nemělo pacientovi nastat tolik komplikací spojených s léčbou³⁸.

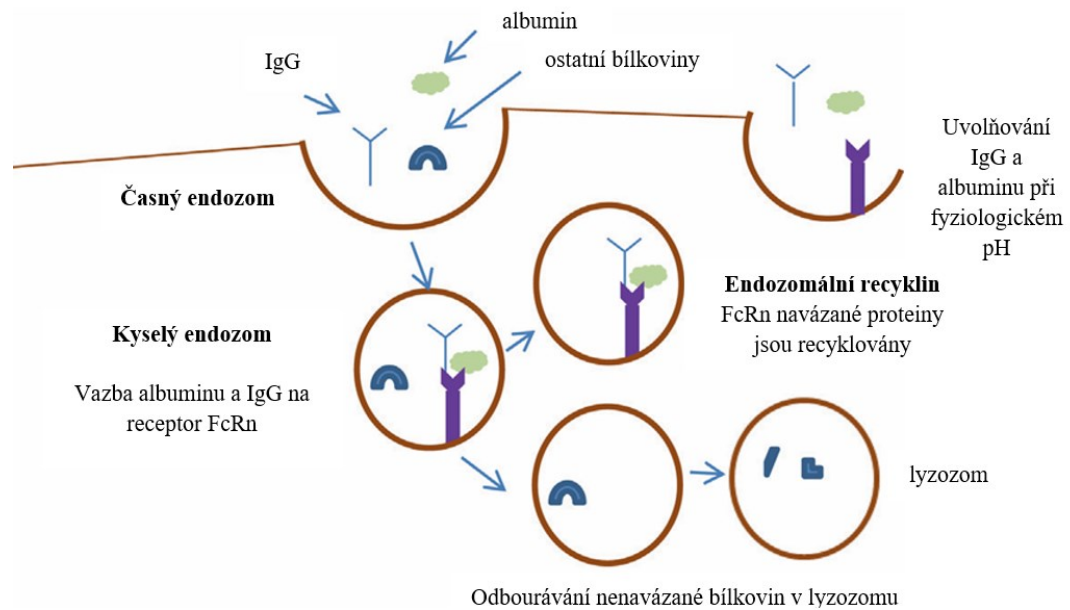
Kupříkladu jako velmi dobré TDDSs fungují konjugáty peptid/protein-léčivo (mezi které spadají i výše uvedené mAb), v současnosti je tak nemálo výzkumů zabývajících se vývojem nových léčiv na bázi biotechnologií, přičemž většina z nich je založena právě na proteinových či peptidových konjugátech^{39,40}. Nádorově cílené peptidy či proteiny jsou totiž specificky schopny identifikovat membránové receptory na nádorových buňkách (např. zmiňovanou CD20 vazebnou doménu)³⁹. Tohoto přístupu lze poměrně snadno využít v imunoterapii. Není tak velkým překvapením, že se imunoterapie v posledních letech stala účinnou klinickou strategií léčby rakoviny solidních nádorů, kdy s postupem času počet schválených imunoterapeutických léků stále roste³⁷.

1.4 MAKROMOLEKULÁRNÍ (IMUNO-)TERAPEUTIKA

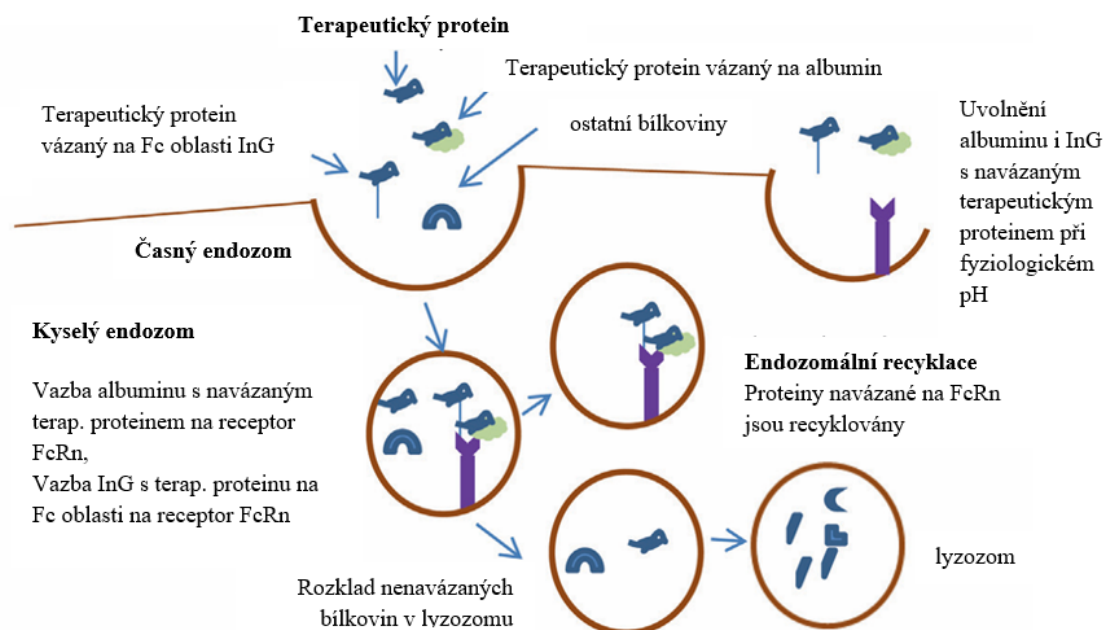
Jak již bylo zmíněno, i přes velký rozvoj společně se širokým výzkumem a zaváděním proteinových imunoterapeutických léčiv (jako je např. mAb rituximab) proti rakovinným buňkám však stále zůstává aktuální a zároveň i klíčovou výzvou otázka, jak, a zároveň co nejlépe, prodloužit dobu cirkulace terapeutika v krevním řečišti^{21,37}.

Odpovědi „jak“ prodloužit terapeutický poločas proteinu v těle lze dosáhnout hned několika způsoby, a to připojením peptidové/proteinové komponenty na molekulu:

- sérového proteinu pomáhající s recyklací zprostředkovanou receptorem (např. albumin nebo imunoglobulin) – tato biokonjugace pak terapeutické peptidové/proteinové komponenty místo degradace v játrech navrácí zpět do krevního řečiště (viz obr. 3 a 4)
- manipulující s aminokyselinovým řetězcem tak, aby byl protein/peptid náchylnější k tvorbě agregátů, a tím i chráněn před rychlou degradací
- zvětšující celkovou velikost podávaného terapeutika – polymeru (např. polyethylen glykol (PEG) či N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidový kopolymer (pHPMA)), či post-translační modifikací a tím zabránění rychlému odstraňování ledvinami¹⁵.



Obr. 3: FcRn zprostředkovává recyklaci albuminu a IgG oproti degradaci ostatních proteinů v lyzozomu. Obrázek byl převzat a upraven [40].



Obr. 4: FcRn zprostředkovává recyklaci terapeutického proteinu navázáním na Fc oblast a albumin. Obrázek byl převzat a upraven¹⁵.

Z dalších studií pak vyplynulo, že na druhou část otázky – tedy „jak nejlépe prodloužit cirkulaci terapeutika v séru“ – je z výše uvedených možností využití nosičů, konkrétně polymerů. Tento objev tak dal vzniku nové třídě léčiv – tzv. makromolekulárním (imuno-)terapeutikům, tedy léčivům kombinujícím polymery, jako nosiče, s nízkomolekulárními medikamenty či terapeutickými proteiny (jako např. námi využívanými a zmiňovanými nanoprotilátkami)³⁷. Tato léčiva jsou schopna překonávat imunitní únikový mechanismus nádoru a znovu probudit imunitní systém k odstranění rakovinných buněk⁴¹.

1.4.1 POLYMERNÍ TERAPEUTICKÁ LÉČIVA

Kromě vlastnosti polymerů prodlužovat požadovanou dobu cirkulace léčiv v organismu byly polymerní struktury charakterizovány i jako výhodné systémy pro regulaci farmakokinetiky společně s biokompatibilitou či biologickou odbouratelností daných terapeutik, což je činí opět lákavější pro další výzkum ve využití v klinické praxi.

Zároveň by se s využitím těchto polymerních nosičů dala vyřešit i další komplikace, které v dnešní době stále ještě čelí většina konjugátů protilátek s léčivy (ADCs, z angl. antibody drug conjugates) a to jejich nízkým poměrem léčiva k protilátce (DAR, z angl. drug-to-antibody ratio) kvůli související fyzikálně-chemické nestabilitě⁴². Konjugace terapeutických molekul na bázi hydrofilního polymeru s protilátkami pomáhá maskovat zvýšenou hydrofobicitu léčiva způsobenou vysokou koncentrací proteinů/peptidů, a zároveň i stabilizovat celou molekulu medikamentu, což ve výsledku umožňuje zvýšit DAR⁴³. Současně k docílení ještě lepších výsledků se v tento okamžik nabízí nahrazení protilátek nanoprotilátkami – terapeutické konjugáty nanoprotilátek na bázi polymerů totiž mají vyšší biokompatibilitu a zároveň se pyšní i vysokou stabilitou⁴¹. Aby však polymery mohly být použity jako biologické nosiče terapeutických domén, musí splňovat několik základních kritérií:

- polymerní nosiče musí ve svém skeletu obsahovat struktury sloužící jako vhodná zásahová místa pro připojení terapeutických látek,
- ani polymer ani jakýkoli jeho derivát či metabolit vzniklý biotransformací či odbouráváním v organismu
 - nesmí být pro tělo toxický,
 - se nesmí nespecificky vázat na plazmatické membrány,
- zároveň u nedegradabilních polymerů, aby nenastávala akumulace léčiva nebo jeho metabolitů v organismu, musí celá distribuce molekulových hmotností (polymerního terapeutika a jeho metabolitů) být pod ledvinovým prahem (40-45 kDa), což zaručuje renální exkreci^{17,37,44,45}.

Další důležité a sledované parametry při výběru polymerů jako terapeutických nosičů jsou tvar a velikost. Protože právě tvar a velikost polymerních domén hraje zásadní roli při určování způsobu či mechanismu jejich interakce s buněčnými membránami a průchodu fyziologickými bariérami v organismu²⁸. V případě enkapsulace nízkomolekulárního léčiva do dutiny polymerního nosiče je finální zprostředkovaná interakce terapeutika s cílovou buňkou zpravidla endocytóza malé molekuly terapeutika. Naopak u větších terapeutických molekul (peptidů/proteinů, aj.) je častější interakce léčiva s povrchem (povrchovými strukturami) cílové

buňky – z tohoto hlediska se tak využívá vázání medikamentů přímo na kostru polymerního nosiče³¹.

1.4.1.1 Léčiva na bázi polyethylen glykolu

Mezi nejčastěji používané biologicky nedegradabilní polymerní nosiče ve výzkumu zaměřeném na polymerní konjugáty v novodobé medicíně v oblasti podávání a cílení léčiv je díky svým nejlepším klinickým účinkům (vynikající biokompatibilitě, snadné modifikovatelnosti a vysoké míře enkapsulace léčiv) polyethylen glykol (PEG)^{15,46}. Mezi stěžejní výhody tohoto polymerního nosiče společně s jeho poměrně snadnou a zároveň i téměř monodisperzní syntézou spadá i následný vznik dobře definovaných produktů konjugace⁴⁷. Polyethylen glykolace (PEGylace) je tak od svého prvního zavedení na počátku 70. let minulého století dodnes velmi oblíbenou technologií modifikace peptidů/proteinů. V současné době je tak v klinické praxi k dispozici mnoho přípravků obsahujících PEG, jako např. Adagen, Oncaspar a SMANCS^{15,48}.

Principem je kovalentní navázání terapeutického peptidového/proteinového řetězce na jeden nebo více vysokomolekulárních řetězců PEG. Tato elongace funguje tak, že skryje antigení determinantu peptidu, což vede k tomu, že protilátky našeho organismu nemohou tyto konjugované peptidy/proteiny rozpoznat jako tělu cizí tělesa, takže medikamenty nebudou tak rychle degradovány¹⁵. Výhradní limitací PEG nosiče je však jeho kapacita pro přenos léčiva, kdy počet reakčních skupin schopných vázat molekuly medikamentu se vyskytují pouze na koncích polymerního řetězce⁴⁷. Zároveň díky PEGylaci dochází i k výraznému zvětšení velikosti terapeutické molekuly (přesněji jejího hydrodynamického poloměru), takže léčivo nebude ani tak snadno odstraňováno ledvinami¹⁵.

1.4.1.2 Léčiva na bázi poly(N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu)

Výzkum naznačuje, že by budoucí možnou alternativou k PEGu v biomedicínských aplikacích mohl být poly(N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (pHPMA)³¹. Obdobně jako PEG i pHPMA spadá do kategorie biologicky nedegradabilních polymerů a stejně jako PEG se i polymerní konjugát HPMA pyšní výhodou hydrofilicity – tj. konjugací pHPMA na hydrofobní terapeutika zvyšujeme míru rozpustnosti těchto léčiv ve vodném prostředí těla a zároveň tím zabraňujeme i rychlému vylučování ledvinami. Zásadní výhody pHPMA oproti PEGu jsou:

- mnohem vyšší kapacita vázat a přenášet molekuly léčiva,
- tvorba unimolekulární micelární struktury, která má v jádře pendantní hydrofobní léčiva,
- jednodušší a účinnější tvorba bisfenických struktur – mnohem větší prostor pro souběžnou vazbu léčiv a cílení působení,
- možnost volby počtu reakčních skupin schopných vázat terapeutické molekuly^{17,47,49,50}.

Na druhou stranu syntéza pHPMA je oproti PEG výrazně obtížnější, kdy pHPMA má mimo jiné i vyšší sklony k vytváření polydisperzních směsí (i když dnes jsme již po mnoha optimalizačních krocích schopni syntetizovat polymerní domény HPMA s velmi malou polydisperzitou)¹⁷.

Ale i přes náročnější syntézu se tak díky výše zmíněným výhodám spojeným s předesílanými vlastnostmi (jako jsou hydrofilita, univerzálnost, biokompatibilita, netoxičnost a neimunogenita) v posledních desetiletích v oblasti (nano-) medicíny tomuto polymernímu nosiči věnuje stále větší pozornost^{51,52}. Dnes se již několik terapeutik na bázi pHPMA dostalo do klinického testování, avšak ještě žádný polymerní konjugát pHPMA s léčivem stále ještě nebyl schválen pro klinické využití v chemoterapii^{53,54}.

V souvislosti s hydrofilními polymerními nosiči (zejména pHPMA) nesmíme opomenout zmínit ani osobnost pana prof. J. H. Kopečka, který své celoživotní dílo zasvětil související tématice, do které mimo jiné spadá i široký výzkum rozebíraného tématu – konjugátů léčiv na bázi polymerních nosičů^{45,50,55,56}. Prof. Kopeček byl mimo jiné i klíčovou osobností skupiny, která vytvořila první klinicky testovaná polymerní kancerostatika – DOX. Tato kancerostatika kombinovala kopolymer pHPMA s mAb (doxorubicin)^{45,57}. Díky vazbě mAb na polymerní nosič se u těchto kombinovaných terapeutik kromě prodloužení doby cirkulace v krvi společně se zvýšenou stabilitou a rozpustností ve vodném prostředí výrazně zlepšila i farmakokinetika těchto léčiv a zároveň se touto konjugací podařilo snížit i projevy vedlejších účinků^{50,58}. Avšak i přes veškeré vylepšené vlastnosti jsou tato terapeutika stále limitována antigenní specifitou a účinností imunitního systému¹⁷. Nová myšlenka související s monoklonálními protilátkami tedy spočívala ve využití zmiňovaných malých molekulových konstruktů nanoprotilátek²². Ani tato práce tak není výjimkou, kdy jsme tento polymer společně se nanoprotilátkou anti-CD20 použili na přípravu případného terapeutika cílicího na leukemické nádorové buňky.

1.4.2 PŘÍPRAVA MAKROMOLEKULÁRNÍCH LÉČIV

Výzkum ve vodě rozpustných makromolekul (např. polymerů) jako nosičů pro podávání léčiv začal před více než 60 lety. Důležitý objev pak byl první komplexní model potenciálu polymerů rozpustných ve vodě jako nosičů léčiv publikovaný prof. H. Ringsdorfem v 70. letech minulého století, kdy se tento model stal nejdůležitějším základem pro výzkum v této oblasti, protože byl prvním modelem, který zohledňoval jak chemické, tak biologické aspekty potřebné pro návrh polymerních léčiv^{45,57}. Makromolekulární terapeutika se zpravidla skládají z vhodného polymerního nosiče, spojky mezi makromolekulárním nosičem a léčivem, případně může být přítomna i cílicí doména⁴⁵.

Pokud ale připravujeme polymerní léčiva s navázanou terapeutickou peptidovou/proteinovou doménou (např. nanoprotilátkou), musíme však kromě vlastností a aspektů polymerních nosičů brát v potaz i fakt, že zároveň pracujeme i s biologickými doménami (proteiny/peptidy), které v zásadě bez výjimky nesou drastické podmínky (extrémní pH, vysoké teploty, aj). Díky vysoké flexibilitě ve výběru a kombinaci složek léčiva (terapeutického proteinu/peptidu, spojky i polymerního nosiče, popř. cílicí domény) máme i nespočet způsobů konjugace těchto složek dohromady. V této práci bylo k přípravě potenciálního terapeutického polymerního konjugátu pHPMA s anti-CD20 nanoprotilátkou využito enzymové reakce zprostředkované sortasou A a „click“ chemie DBCO skupiny s azidem.

1.4.2.1 Sortasa A a její modifikovaná forma Sortasa A(7+)

Enzym sortasa A (SrtA) spadá do skupiny enzymů podrodiny sortas a poprvé byla popsána u gram pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*, kde je tento cysteinový membránový enzym

zodpovědný za kovalentní ukotvení povrchových proteinů, které obsahují C-koncovou sekvenci LPXTG, k buněčné stěně nebo za sestavování fimbrií^{59–63}. Tato prokaryotická rekombinantní transpeptidasa je tedy schopna zprostředkovávat sekvencně specifickou vazbu peptidů, čehož je využíváno i v klinickém výzkumu, kdy s využitím SrtA lze terapeutické proteiny/peptidy za účelem zlepšení jejich stability či specifčnosti poměrně snadno modifikovat. Mezi další využití tohoto enzymu se zahrnuje i cyklizace proteinů a peptidů, modifikace a značení protilátek či syntéza proteinových konjugátů s léčivy, peptidy, peptidovými nukleovými kyselinami a cukry^{61,62,64,65}.

Mechanismus transpeptidasové reakce spočívá v tom, že SrtA rozpoznává pětiaminokyselinový motiv Leu-Pro-Xxx-Thr-Gly (LPXTG, kde Xxx je libovolná aminokyselina a glycin nemůže být volný karboxylát) na C-konci nebo uvnitř sekvence proteinu a rozštěpí vazbu mezi threoninem (Thr/T) a glycinem (Gly/G) za vzniku acyl-enzymového meziprojektu. Tento meziprojekt posléze v přítomnosti vápenatých iontů (Ca^{2+}) napadá nukleofilní substrát spojený s oligo-/polyglycinem za vzniku nové peptidové vazby mezi molekulami obsahujícími LPXT a oligo-/polyglycin⁶⁵.

Právě díky snadnému použití, šetrnosti a specifčnosti tohoto enzymu je tato sortasou A zprostředkovaná ligace, tzv. „sortagging“, šikovná metoda pro klinické konjugace proteinů. Nevýhodou je však její nízká katalytická účinnost, což ve výsledku vyžaduje prodlouženou inkubační dobu reakce pro získávání přijatelných výtěžků produktů, nemluvě o závislosti na Ca^{2+} iontech. Pro zmírnění těchto problémů tak několik skupin nezávisle na sobě vytvořilo heptamutantní (tj. se sedmi bodovými mutacemi) varianty SrtA („7M SrtA“) s kombinací mutací, čímž ve výsledku vznikly verze SrtA nezávislé na Ca^{2+} . U jedné varianty (SrtA(7+)) byla dokázána i zvýšená rychlost jejího kinetického působení^{65,66}. V této práci je pak použita právě tato modifikovaná varianta SrtA(7+), kdy jsme díky reakci zprostředkované touto transpeptidasou kovalentně připojili nanoprotlátku anti-CD20 se zásahovým místem pro SrtA(7+) na spojku.

1.4.2.2 „Click“ chemie DBCO skupiny s azidem

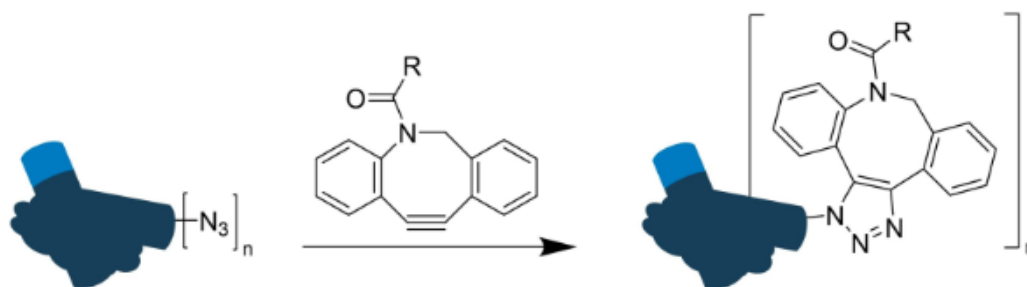
Nobelova cena za chemii za rok 2022 byla udělena profesorům K. Barrymu Sharplessovi, Mortenu Meldalovi a Carolyn Bertozziové za jejich průkopnickou roli při výzkumu a vývoji „click“ chemie. Prof. Sharpless a prof. Meldal pracovali na vývoji kanonické click reakce – mědi katalyzované azido-alkynové cykloadice. A prof. Bertozziová otevřela nové hranice vytvořením bioortogonální sterickým pnutím podporované azido-alkynové cykloadice. Tyto dvě reakce způsobily revoluci v chemické a biologické vědě tím, že umožnily selektivní, vysoce výtěžné (téměř kvantitativní), rychlé, s vodou kompatibilní a čisté ligace, a tím i poskytly bezprecedentní způsoby manipulace s živými systémy⁶⁷. Celou myšlenkou click chemie je poskytnout nové možnosti přípravy materiálů ze snadno dostupných stavebních bloků a mimořádně účinných chemických transformací, jak tomu naznačuje i citát:

“The most fundamental and lasting objective of synthesis is not production of new compounds, but production of properties.”

George S. Hammond, Norris Award Lecture, 1968^{68,69}

Ačkoli byla Sharplessova – Meldalova mědí katalyzovaná 3+2 cykloadice mezi azidem a terminálním alkyne (CuAAC, z angl. copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) označována za průlomovou technologii, její použití v biologických systémech omezovala ternární povaha CuAAC společně s vnitřní toxicitou mědi, kdy přítomnost vysokých koncentrací Cu(I) může ohrozit strukturní integritu citlivějších biomolekul, jako jsou proteiny a imunoglobuliny, a to pak omezovalo její použití v biologických systémech^{67,68}. Použití měďných iontů jako katalyzátoru se lze vyhnout využitím azido-alkynové cykloadice řízené sterickým pnutím (SPAAC, z angl. strain-promoted azide-alkyne cycloaddition) nezávislé na mědi. Reakce SPAAC poskytuje metodu pro syntézu konjugátů nekontaminovaných měďnými ionty⁷⁰. Zároveň selektivita a bioortogonální povaha reakce SPAAC činí tuto cykloadici skvělou strategií pro cílené připojení chem. látek k diskretním místům v protilátkách – tedy biokonjugaci specifickou pro dané místo⁶⁷.

Vývojem těchto technik konjugace byla nejvíce ovlivněna radioimunoterapie (RIT), kdy v radiochemii je k syntéze radioimunokonjugátů jednou z nejčastějších aplikací právě SPAAC. SPAAC byla využita například i při radioaktivním značení mAb rituximab: nejprve s využitím techniky rozšíření genetického kódu byla do anti-CD20 mAb rituximab integrována nepřirozená aminokyselina (Nε-2-azideoethylloxycarbonyl-l-lysinu (NEAK)), čímž vznikl reaktivní protein nazvaný „A122NEAK-rituximab“. Ten byl poté konjugován s variantou DOTA nesoucí dibenzocyclooktyn (DBCO), kdy došlo ke click reakci právě mezi DBCO skupinou a azidovou skupinou na mAb rituximab. Schéma reakce mezi DBCO a azidovou skupinou je znázorněno na obr. 5. Posledním krokem bylo značení ⁶⁴Cu, čímž vznikl radioimunokonjugát značený ⁶⁴Cu – ⁶⁴Cu-značený rituximab ([⁶⁴Cu]-DOTA-rituximab)^{67,71–73}. V této práci bylo obdobně jako u zmínovaného příkladu radioaktivního značení radiokonjugátu rituximab k napojení meziprojektu anti-DC20-spojka na polymerní konjugát PHPMA využito diskutované SPAAC – konkrétně DBCO-azid chemie.



Obr. 5: Azido-alkynová cykloadice řízená sterickým pnutím (SPAAC) mezi DBCO a azidovou skupinou⁷³.

2 CÍLE PRÁCE

- Produkce a purifikace anti-CD20 vazebné domény se zásahovým místem pro sortasu A s využitím rekombinantní exprese v buňkách HEK293T
- Bližší charakterizace proteinového konstruktu anti-CD20-LPETGG biofyzikálními metodami
- Příprava a purifikace polymerního konjugátu anti-CD20 s polymerním nosičem pHPMA
- Charakterizace připraveného polymerního konjugátu pomocí biofyzikálních metod

3 MATERIÁL

3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Aliance Q9	UVItec, UK
Analytické váhy	AND, USA
Analytické váhy HA-180M	A&D, Japonsko
Automatická pipeta 1-5ml	Kartell, Itálie
Automatické pipety Discovery	HTL, Polsko
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Bandelin Sonoplus UQ 3100 se sondou MS73	Merck, USA
Bürkerova komůrka, 0,100mm hloubka, 0,0025mm ²	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Německo
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Avanti JXN-26	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Centrifuga ProteomeLab XL-I	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Centrifugační filtry Ultrafree MC, 0,1 μm	Millipore, USA
Centrifugační filtry Durapore PVDF, 0,1 μm	Millipore, USA
Centrifugační koncentrátor Vivaspin Turbo 4, 10kDa, 5 ml	Sartorius, USA
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	Merck, USA
CO ₂ lahve	Linde Gas, Irsko
Elektroforetická cela Mini-PROTEAN Tetra	Bio-Rad, Německo
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor Elite Dry Bath	Major Science, Taiwan
Inkubátor Sanyo MCO-18AIC CO ₂	Sanyo, Japonsko
Kahan Fuego SCS	VERKON, Česká republika
Kolona Ni-INDIGO	Cube Biotech, Německo
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Koncentrátory Amicon Ultra, MWCO 10kDa	Millipore, USA
Kyveta Micro Cell Rect Quartz 10 mm 40 μl	Agilent Technologies, UK
Kyveta Ultra-Micro Cell 3×3 mm, 45 μl	Hellma Analytics, Německo
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	P-LAB, Česká republika
Laminární box BIO 126	LABOX, Česká republika
Laminární box Clean Air	PMV, Nizozemí
Membránová vývěva LABOPORT N816	KNF, Německo
Mikrocentrifuga Ministar Silverline	VWR International, USA

Mikrostríkačka HAMILTON	Hamilton, USA
Mikrovlnná trouba OPTICOOK compact	Optimo Moulinex, Francie
Odsolovací kolona HiPrep 26/10	GE Healthcare, USA
Orbitální třepačka Orbit 1000	Labnet, USA
pH metr φ200	Beckman Coulter, USA
Pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann, Německo
Počítačka buněk Corning Cell Counter	Corning, USA
Programovatelný rotátor Multi Bio RS-24	BioSan, Lotyšsko
Předvážky KB 1200-2N	KERN, Německo
Rotor s fixním úhlem J-Lite 16.250	Beckman Coulter, USA
RX3 Vortex Mixer	VELP Scientifica, Itálie
Spektrofotometr Cary 60 UV-VIS	Agilent, USA
Spektrofotometr DS-11+ (typu "nanodrop")	DeNovix, USA
Sterilní stříkačkový filtr ROTILABO PES, 0,22 μm	Carl ROTH, Německo
Stolní inkubační třepačka BT921	BT Lab Systems, USA
Stolní mini centrifuga GmCLab PMC880	Gilson, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Třepačka Multitron Cell	Infors HT, Švýcarsko
Vakuový filtr na lahev, 150 ml, vel. pórů 0,22 μm,	Corning, USA
Výkyvný rotor SX4400	Beckman Coulter, USA
Zdroj deionizované vody MilliQ	Millipore, USA
Zdroj stejnosměrného napětí PS 251-2	Sigma-Aldrich, USA
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, UK

3.2 CHEMIKÁLIE

2-merkптоethanol	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
APS	Serva, Německo
Azid sodný	Serva, Německo
BSA	New England Biolabs, USA
Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka, Švýcarsko
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, Česká republika
Dodecylsíran sodný (SDS)	Fluka, Švýcarsko
DPBS	VWR, Francie
Ethanol, 96%	Lach-Ner, Česká republika
EX-CELL 293 médium	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	Lach-Ner, Česká republika
Hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát	PENTA, Česká republika

Hydroxid sodný, pecky	PENTA, Česká republika
Imidazol, 99%	Carl ROTH, Německo
Kyselina chlorovodíková, 35%	Lach-Ner, Česká republika
Kyselina octová, 99%	Lach-Ner, Česká republika
Kyselina valproová	Sigma, USA
Methanol, 96%	Lach-Ner, Česká republika
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Německo
N,N-methylenbisakrylamid	Fluka, Švýcarsko
Oxid uhličitý, potravinářský, lahve	Linde Gas, Irsko
PEI - lineární polyethylenimin (25kDa)	Polysciences, USA
Penicilin a Streptomycin	PAA Laboratories, Německo
Peroxodisíran amonný	Serva, Německo
Quick-Load Purple 1 kbp DNA ladder, 6× konc.	New England Biolabs, USA
Quick-Load Purple 100 bp DNA ladder, 6× konc.	New England Biolabs, USA
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher, USA
Trypanová modř	Sigma-Aldrich, USA
Trypton	Oxoid, UK
Pufr Glycobuffer 2 (10× konc.)	New England Biolabs, USA
Pufr Glycobuffer 3 (10× konc.)	New England Biolabs, USA
Pufr Glycoprotein Denaturing Buffer (10× konc.)	New England Biolabs, USA
Pufr 10% NP-40	New England Biolabs, USA

3.3 ENZYMY

α 2-3,6,8 neuraminidasa	New England Biolabs, USA
O-glykosidasa	New England Biolabs, USA

3.4 PŘIPRAVENÉ PUFRY A ROZTOKY

Barvicí roztok: 45% methanol; 10% kys. octová; 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250

Octanový pufr: 50mM octan sodný; 10nM NaN₃; pH 4,0

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE: 35% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kys. octová

PBS + 250mM imidazol: 250mM imidazol v pufru PBS

PBS + 20mM imidazol: 20mM imidazol v pufru PBS

PBS: 50mM Na₂HPO₄; 300mM NaCl; 10mM NaN₃; pH 7,5

Roztok AA pro SDS-PAGE: 29% (w/v) akrylamid; 1% (w/v) N,N-methylenbisakrylamid

Roztok IPEI: 10 mg/ml IPEI v PBS-TK

Roztok trypanové modři: 0,4% (w/v) trypanová modř v PBS pro tkáňové kultury

SDS-PAGE pufr: 25mM Tris; 14,4 g/l glycin; 0,1% (w/v) SDS

Tris pufr pro SDS-PAGE, pH = 6,8: 0,5M Tris; pH 6,8

Tris pufr pro SDS-PAGE, pH = 8,8: 1,5M Tris; pH 8,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE, neredukující (5× konc.): 150mM Tris; 50% (v/v) glycerol; 5% (w/v) SDS; 0,025% (w/v) bromfenolová modř; 50mM NaN₃; pH 6,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE, redukující (5× konc.): 150mM Tris; 50% (v/v) glycerol; 5% (w/v) SDS; 0,025% (w/v) bromfenolová modř; 50mM NaN₃; 10% (v/v) 2-merkптоethanol; pH 6,8

3.5 BUNĚČNÉ LINIE

HEK293T

prof. Radu Aricescu, Oxford, UK

3.6 VEKTORY

pTW5_aFGF

Laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK

pTW5_p27

Laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK

pTW5sec_aCD20_LPETGG

Mgr. Maxmilián Hejl, katedra biochemie, PřF UK

3.7 POLYMERNÍ NOSIČE A NÍZKOMOLEKULÁRNÍ SPOJKA

GGGG-K(Peg₄-Biotin)-miniPeg₃-(N₃)

Ing. Michal Pechar, CSc. a Ing. Robert Pola, Ph.D., ÚMCH AV ČR

pHPMA_DBCO_Dy633

Ing. Michal Pechar, CSc. a Ing. Robert Pola, Ph.D., ÚMCH AV ČR

pHPMA_DBCO

Ing. Michal Pechar, CSc. a Ing. Robert Pola, Ph.D., ÚMCH AV ČR

4 METODY

4.1 REKOMBINANTNÍ PŘÍPRAVA anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY

První část této práce je zaměřena na přípravu terapeutického proteinu anti-CD20 se zásahovým místem pro sortasu A(7+) s polyhistidinovou kotvou na C-konci, která souží k snadnější izolaci proteinu pomocí afinitní chromatografie.

4.1.1 URČOVÁNÍ VIABILITY A POČÍTÁNÍ BUNĚK HEK293T

Ze zásobní kultury buněk HEK293T v živném médiu EX-CELL 293 bylo do mikrozkušavky odebráno 20 μ l dobře promíchané buněčné suspenze, která byla v poměru 1:1 zředěna 20 μ l roztoku trypanové modři. Směs byla důkladně promíchána několikanásobným nasáváním a opětovným pipetováním ze špičky pipety. Takto připravená buněčná suspenze byla pipetována pod krycí skličko připravené Bürkerovy komůrky. Bürkerova komůrka byla následně vložena do počítačky buněk Corning Cell Counter (Corning), s jehož pomocí byla určena viabilita a buněčná hustota odebrané suspenze buněk.

4.1.2 TRANSIENTNÍ TRANSFEKCE BUNĚK HEK293T

Nejprve byl připraven transfekční mix obsahující 800 μ g plazmidové DNA (704 μ g plazmidu pTW5sec_anti-CD20_LPETGG kódujícího protein anti-CD20_LPETGG, dále 80 μ g plazmidu pTW5_p27 s genem kódujícím inhibitor cyklin-dependentních kinas p27, kvůli kterému buňky neopouštějí G₁ fázi buněčného cyklu, tj. fázi kdy se proteiny produkují nejlépe, a 16 μ g plazmidu pTW5_aFGF nesoucím gen pro kyselý růstový faktor fibroblastů (aFGF, z angl. acidic fibroblast growth factor) regulující proliferaci buněk. Směs plazmidové DNA byla doplněna na celkový objem 6 ml fosfátovým pufrům (PBS, z angl. phosphate buffered saline) pro tkáňové kultury (PBS-TK) a transfekční mix byl přefiltrován přes sterilní stříkačkový filtr ROTILABO PES, 0,22 μ m (Carl ROTH).

Po určení viability a hustoty zásobní kultury buněk HEK293T bylo do 50ml uzavíratelných centrifugačních zkumavek odebráno množství suspenze odpovídající 800 mil. buněk HEK293T. Odebrané buněčné suspenze byly centrifugovány 5 min při 100 \times g. Poté byl supernatant slit a získané buněčné pelety byly resuspendovány v médiu EX-CELL 293 tak, aby výsledný objem buněčné suspenze tvořil 34 ml. Následně byl k takto připraveným buňkám přidán předem připravený a přefiltrovaný transfekční mix, čímž výsledná koncentrace buněk činila 20 mil. buněk/ml a současně bylo dosaženo, že na 1 mil. transfekovaných buněk připadal 1 μ g plazmidové DNA. K suspenzi bylo v dalším kroku přidáno 2,4 mg IPEI jako transfekčního činidla (240 μ l roztoku IPEI o koncentraci 10 mg/ml) – finální poměr IPEI : plazmidové DNA tedy činil 3 : 1. Transfekované buňky byly následně na třepačce při 135 ot./min inkubovány 90 min při 37 °C v 5% atmosféře CO₂.

Po uplynutí inkubační doby byla transfekovaná buněčná suspenze doplněna predehřátým médiem EX-CELL 293 na finální objem 400 ml. Na inhibici buněčného dělení bylo do směsi přidáno 1,6 ml 0,5M kyseliny valproové (VPA, z angl. valproic acid) a na závěr byly přidány 4 ml 100 \times koncentrovaného roztoku antibiotik – směsi streptomycinu a penicilinu, aby se zabránilo případné kontaminaci bakteriemi. Suspenze byla inkubována po dobu 5 dnů na

třepače při 135 ot./min a 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Před ukončením produkce byla dle kapitoly 4.1.1 určena viabilita a hustota sklízených buněk a produkce byla ukončena centrifugací 5 min při 100 × g, kdy došlo k oddělení většiny buněk od supernatantu. Centrifugované médium bylo následně rozlito do dvou 250ml centrifugačních baněk Beckman Coulter a bylo opětovně odstředěno 1 h při 15000 × g. Supernatant z této centrifugace byl přefiltrován přes vakuový filtrační nástavec s velikostí pórů 0,22 μm napojený na vývěvu. Z pelet vzniklých druhou centrifugací byl odebrán vzorek, který byl zmrazen a uschován na kontrolní elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE, z angl. sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis).

4.1.3 PURIFIKACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY

Protein získaný z transientní transfekce buněk HEK293T byl přečištěn na soustavě pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC, z angl. high-performance liquid chromatography) typu ÄKTA basic (GE Healthcare).

4.1.3.1 Afinitní chromatografie spojená s odsolením a zkoncentrováním vzorku

Prvním krokem purifikace proteinu byla ekvilibrace kolony Ni-INDIGO (Cube Biotech), obsahující nikelnaté ionty schopné chelatace C-terminální polyhistidinové kotvy, a odsolovací kolony HiPrep 26/10 (Cytiva) v pufru PBS. Během ekvilibrace kolon bylo k přefiltrovanému médiu obsahujícímu protein přidáno 100 ml 5× konc. roztoku PBS předem přefiltrovaného přes vakuový filtrační nástavec s velikostí pórů 0,22 μm napojený na vývěvu. Těchto 500 ml média bylo postupně nanášeno na ekvilibrovanou kolonu Ni-INDIGO průtokovou rychlostí 5 ml/min. Prošlé médium bylo opětovně jímáno a uschováno v 500ml plastové lahvi s víčkem, dokud nebylo SDS-PAGE potvrzeno, že v médiu už požadovaný protein není přítomný. Po nanesení veškerého média byla kolona Ni-INDIGO propláchnuta ještě 20 ml pufru PBS.

V dalším kroku byla s průtokovou rychlostí 2,5 ml/min pro uvolnění molekul nespecificky vázaných na koloně Ni-INDIGO provedena předeluce pufrům PBS s 20mM imidazolem. Sbírány byla pouze frakce odpovídající nárůstu absorbance, a to do 50ml centrifugační zkumavky. Za kolonu Ni-INDIGO s navázaným proteinem byla zapojena ekvilibrovaná odsolovací kolona HiPrep 26/10 a při průtoku 2,5 ml/min byla provedena eluce proteinu pufrům PBS s 250mM imidazolem, kdy byla obdobně jako při předeluci jímána do 50ml centrifugační zkumavky jen oblast odpovídající nárůstu absorbance. Tato frakce byla následně pomocí centrifugačního koncentrátoru Vivaspin Turbo 4, 10 kDa, 5 ml (Sartorius) na centrifuze Allegra X-22R zkoncentrována na výsledný objem přibližně 250 μl. Během koncentrování byla kolonka Ni-INDIGO regenerována octanovým pufrům a obě kolony byly převedeny do 20% ethanolu, ve kterém se kolony uschovávají.

4.1.3.2 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) byla při průtokové rychlosti 0,5 ml/min ekvilibrována v PBS-TK pufru. Následně byl na kolonu s využitím mikrostříkačky typu Hamilton (Hamilton) nastříknut koncentrát proteinu získaný z afinitní chromatografie. Zároveň byl spuštěn i automatický sběrač jednomililitrových frakcí (GE Healthcare) a eluát proteinu byl jímán do předem připravených mikrozkuvek.

Z naměřených dat byl posléze sestaven chromatografický záznam dokumentující průběh separace, na jehož základě byly následně vybrány frakce pro další analýzu. S pomocí molárního absorpčního koeficientu a molekulové hmotnosti anti-CD20_LPETGG vazebné domény vypočítaných pomocí programu ProtParam⁷⁴ z její aminokyselinové sekvence byla u frakcí odpovídající nárůstu absorbance na chromatogramu postupně spektrofotometricky ze 2 µl vzorku na spektrofotometru DS-11+ (DeNovix) stanovena koncentrace proteinu.

4.1.4 ANALÝZA IZOLOVANÉHO PROTEINU METODOU SDS-PAGE

4.1.4.1 Příprava 15% polyakrylamidového gelu

Na základě molekulové hmotnosti analyzovaného proteinu, tj. anti-CD20_LPETGG vazebné domény (14,5 kDa), byl připraven 15% polyakrylamidový gel o tloušťce 0,75 mm se složením rozdělovacího i zaostřovacího gelu uvedeného v tab. 1. V prvním kroku byla sestavena aparatura pro přípravu 0,75 mm polyakrylamidového gelu. Dále byl připraven čerstvý roztok 15% rozdělovacího gelu obsahujícího destilovanou vodu (dH₂O), 29% akrylamid s 1% *N,N'*-metylen-bis-akrylamidem jako síťovacím činidlem, Tris pufr, roztok SDS a *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED) řídící polymeraci a jako poslední složku iniciátor polymerizace - peroxodisíran amonný (APS, z angl. ammonium persulfate), kdy objemy jednotlivých složek jsou uvedeny v tab. 1. Bezprostředně po přidání APS byl připravený roztok přenesen do předpřipravené aparatury, převrstven dH₂O a ponechán ztuhnout.

Po ztuhnutí rozdělovacího gelu byla dH₂O opatrně vysušena filtračním papírem a do zbylého místa mezi skly byl pipetován roztok zaostřovací části gelu obsahující stejné složky jako rozdělovací gel, pouze v jiných poměrech (viz tab. 1), kdy byl APS opětovně do směsi přidán bezprostředně před pipetováním tohoto roztoku do aparatury pro přípravu gelu. Do aparatury mezi skla byl zasunut 10 jamkový hřeben a zaostřovací gel byl ponechán ztuhnout.

V dalším kroku byla skla s připraveným polyakrylamidovým gelem (včetně hřebenu) přemístěna do aparatury pro SDS-PAGE, která byla vložena do elektroforetické vany naplněné vhodným objemem elektrodového pufru. Hřeben byl vyndán až těsně před pipetováním požadovaných vzorků do jamek gelu.

Tab. 1: Složky pro rozdělovací i zaostřovací část 15% polyakrylamidového gelu. Uvedené pipetované objemy jsou uvedeny na přípravu jednoho polyakrylamidového gelu o tloušťce 0,75 mm, přičemž jak při přípravě rozdělovacího, tak i zaostřovacího gelu byl jako poslední pipetován APS, který způsobuje polymerizaci – ztuhnutí obou gelů.

Složky reakce	15% rozdělovací gel	Zaostřovací gel
dH ₂ O	0,9 ml	1,4 ml
30% AA	2 ml	0,5 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	1 ml	-
0,5M Tris (pH 6,8)	-	250 µl
10% SDS	40 µl	20 µl
TEMED	2 µl	4 µl
10% APS	40 µl	20 µl

4.1.4.2 Příprava vzorků proteinu anti-CD20_LPETGG pro SDS-PAGE

Z jednotlivých vzorků z GPC určených k analýze byl odebrán objem odpovídající 3 μg proteinu. Jednotlivé odebrané vzorky byly následně doplněny pufrům PBS-TK na výsledný objem 20 μl a vždy bylo přidáno 5 μl 5 \times konc. redukujícího / neredukujícího vzorkového pufru. Roztoky byly dobře promíchány a vzorky byly denaturovány 5 min v termobloku předem rozehrátém na 95 °C. Po denuraci byly roztoky odstředěny na stolní minicentrifuze Ministar Silverline (VWR) a takto připravené vzorky byly pipetovány do jamek gelů připravených v soupravě pro SDS-PAGE. Souprava byla zapojena ke zdroji stejnosměrného napětí, jež byl nastaven na 200 V, a byla prováděna elektroforetická separace do okamžiku, kdy čelo elektroforézy nedoputovalo ke konci gelu. Následně byla aparatura rozebrána a gel byl vyjmut ze skel a byl umístěn přes noc do barvicího roztoku. Následující den byl gel odbarven pomocí odbarvovacího roztoku a gel byl vyfocen na přístroji Alliance Q9 (UVItec).

4.2 CHARAKTERIZACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY BIOFYZIKÁLNÍMI METODAMI

4.2.1 OVĚŘENÍ O-GLYKOSYLACE KONSTRUKTU anti-CD20_LPETGG

4.2.1.1 O-deglykosylační enzymatická reakce

Na základě protokolu⁷⁵ uváděného výrobcem (New England BioLabs) deglykosylačních enzymů α 2-3,6,8 neuraminidasy a O-glykosidasy byl připraven protein v denaturovaném stavu. K 90 μg anti-CD20_LPETGG byly přidány 2 μl 10 \times konc. denaturujícího pufru (New England BioLabs) a roztok byl umístěn na 5 min do termobloku předem rozehrátého na 95 °C. Následně byla namíchána reakční směs deglykosylační reakce (viz tab. 2) prováděné s proteinem. Vzorek obsahující konstrukt anti-CD20_LPETGG vazebné domény byl inkubován 3 h při 37 °C. Reakční směs obsahující rekombinantní lidský interleukin 2 (IL-2) byla inkubována pouze 2 h při 37 °C. Před ukončením reakce byly z reakčních směsí odebrány vzorky na SDS-PAGE analýzu (viz kapitola 4.2.1.2) a reakce byla ukončena v obou případech teplotní denaturací enzymů na termobloku (5 min při 95 °C).

Tab. 2: Složení O-deglykosylační enzymatické reakce

Složka směsi	Pipetovaný objem
Roztok denaturovaného proteinu	všechn
10 \times NP-40	4 μl
10 \times GlycoBuffer 2	4 μl
neuraminidasa (50 U/ μl)	2 μl
O-glykosidasa (40000 U/ μl)	2 μl

4.2.1.2 SDS-PAGE analýza reakční směsi deglykosylace konstruktu anti-CD20_LPETGG

Příprava 15% polyakrylamidového gelu proběhla stejným způsobem jako je popsáno v kapitole 4.1.4.1 na str. 30 s jedinou výjimkou – místo 10 jamkového hřebenu byl mezi skla vložen 15 jamkový hřeben.

Obdobně tomu bylo i s přípravou vzorků k elektroforetické analýze, kdy ze vzorků určených k SDS-PAGE analýze byl odebrán objem odpovídající 3 μg proteinu; u enzymů byl k analýze odebrán vždy 1 μl zásobního roztoku příslušného enzymu obdrženého od výrobce a u reakčních směsí bylo odebráno více různých objemů odpovídacích množství 2,5; 3,0 a 3,5 μg . Všechny odebrané vzorky byly následně zředěny PBS-TK na celkový objem 16 μl a byly přidány vždy 4 μl 5 \times konc. neredukujícího vzorkového pufru. Další postup už je shodný s kapitolou 4.1.4.2 na str. 31.

4.2.2 STANOVENÍ MÍSTA O-GLYKOSYLACE HMOTNOSTNÍ SPEKTOMETRIÍ

Pro potvrzení přítomnosti O-glykosylace byl poskytnut vzorek obsahující 20 μg proteinu anti-CD20_LPETGG RNDr. Tomáši Ječmenovi, Ph.D., kterým byl předložený vzorek analyzován na ESI-qToF Maxis spektrometru (Bruker Daltonics) připojenému HPLC Infinite II se separací na reversní fázi (Agilent). Výsledky měření byly zpracovány a vyhodnoceny RNDr. Tomášem Ječmenem, Ph.D.

4.3 PŘÍPRAVA A PURIFIKACE POLYMERNÍHO KONJUGÁTU anti-CD20

4.3.1 TRANSPEPTIDASOVÁ REAKCE ZPROSTŘEDKOVANÁ SORTASOU A

Transpeptidasová reakce mezi proteinem anti-CD20_LPETGG a polyglycinovou spojkou katalyzovaná SrtA(7+) byla provedena s optimalizovaným poměrem složek vycházejícím z diplomové práce Mgr. Maxmiliána Hejla⁷⁶. Optimalizovaný poměr složek i výsledné hmotnostní složení reakční směsi je uvedeno v tab. 3.

Tab. 3: Složení transpeptidasové reakce pro přípravu konstruktů anti-CD20_LPET-spojka. Hmotnosti nízkomolekulární spojky a SrtA vstupujících do reakce byly přes molární poměry dopočteny na danou hmotnost proteinu anti-CD20_LPETGG.

Složka reakční směsi	GGGG_spojka	anti-CD20_LPETGG	SrtA
Molární poměr složek	10	1	0,01
M [g/mol]	1174	14550	17700
Vstupní hmotnost složky do transpept. reakce [mg]	2,4	3,0	0,04

Reakce byla za neustálého míchání inkubována na programovatelném rotátoru Multi Bio RS-24 (Biosan) při laboratorní teplotě do dobu 20 minut. Poté byla reakční směs nanášena na v pufru PBS-TK předem ekvilibrované za sebe zapojené kolony Ni-INDIGO (GE Healthcare) a HiPrep 26/10 (Cytiva). Průtoková rychlost byla nastavena na 2,5 ml/min a do 50ml centrifugační zkumavky byla jímána oblast odpovídající nárůstu absorbance, ve které byl přítomný kýžený konjugát anti-CD20_LPET-spojka společně s hydrolyzovanými molekulami anti-CD20_LPET*. Tato frakce byla pomocí centrifugačního koncentrátoru Vivaspın Turbo 4, 10 kDa, 5 ml (Sartorius) zkoncentrována na výsledný objem činící 420 μl . V posledním kroku byla na spektrofotometru DS-11+ (DeNovix) změřena koncentrace koncentrátu anti-CD20_LPET-spojka.

4.3.2 NAPOJENÍ KONSTRUKTU anti-CD20_LPET-spojka NA POLYMERNÍ NOSIČE pHPMA_DBCO_Dy633 a pHPMA_DBCO

Z koncentráту anti-CD20_LPET-spojka byl odebrán takový objem, který odpovídal patnáctimolárnímu nadbytku konstruktu anti-CD20_LPET-spojka nad polymerním nosičem pHPMA_DBCO_Dy633 – takže k 55 µg polymerního nosiče pHPMA_DBCO_Dy633 byl odebrán objem koncentrátu anti-CD20_LPET-spojka odpovídající množství 125,4 µg tohoto konjugátu (obdobně na 120 µg polymerního nosiče připadlo 273 µg konstruktu anti-CD20_LPET-spojka). Takto smíchaná směs byla inkubována přes noc při laboratorní teplotě.

Druhý den byla reakční směs pomocí GPC purifikována na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), stejným způsobem jako je popsáno v kapitole 4.1.3.2. na str. 29. Frakce obsahující polymerní konjugát byly zkoncentrovány pomocí centrifugačního koncentrátoru Amicon Ultra-0.5, 30 kDa, 0,5 ml (Amicon) na výsledný objem přibližně 300 µl.

Stejným způsobem byl připraven i polymerní konjugát bez fluorescenční sondy Dy633.

4.3.3 MĚŘENÍ ABSORPČNÍHO SPEKTRA PŘIPRAVENÉHO POLYMERNÍHO KONJUGÁTU

Proměření absorpčního spektra získaného koncentrátu polymerního konjugátu anti-CD20 bylo provedeno na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS (Agilent) v kyvetě Micro Cell Rect Quartz 10 mm, 40 µl (Agilent Technologies) s optickou dráhou 1 cm. Jako reference byl použit pufr PBS-TK, ve kterém byl konjugát rozpuštěn.

4.4 CHARAKTERIZACE POLYMERNÍHO KONJUGÁTU anti-CD20 BIOFYZIKÁLNÍMI METODAMI

4.4.1 MĚŘENÍ DYNAMICKÉHO ROZPTYLU SVĚTLA

Měření dynamického rozptylu světla (DLS, z angl. *dynamic light scattering*) bylo provedeno RNDr. Kateřinou Hofbauerovou, Ph.D. (MFF UK). V prvním kroku bylo centrifugováno 50 µl příslušného vzorku na stolní mini centrifuze GmCLab PMC880 (Gilson) 5 min při 6000 × g. Následně byl vzorek přefiltrován přes centrifugační filtr Durapore PVDF 0,1 µm (Millipore) předem promytý pufr, ve kterém je protein/polymerní konjugát rozpuštěn, tedy PBS-TK. Z přefiltrovaného vzorku bylo do kyvety Ultra-Micro Cell 3×3 mm, 45 µl (Hellma Analytics) pipetováno 40 µl. Takto připravený vzorek byl následně proměřen na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) při teplotě 20 °C. Měření bylo RNDr. Kateřinou Hofbauerovou, Ph.D. vyhodnoceny v programu Zetasizer 6.2 (Malvern Instruments).

4.4.2 ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE

Sedimentační analýza rekombinantní antiCD20 nanoprotlátky, pHPMA polymerního nosiče a jejich vzájemného konjugátu byla provedena pomocí analytické ultracentrifugy ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) metodou sedimentační rychlosti⁷⁷. Měření a vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Jednotlivé vzorky byly přečištěny gelovou permeační chromatografií, jako referenční vzorek byl použit PBS-TK pufr. Do centrifugačních kyvet s optickou dráhou 12 mm bylo vloženo vždy 360 µl pufru i daného vzorku. Celkem bylo za teploty 20 °C sbíráno 150-200 skenů s odstupem 3 min při vlnové délce 230 nm a 45000 ot./min

pro vzorky pHPMA a konjugátu, resp. 280 nm a 50000 ot./min pro samotné antiCD20. Parciální specifický objem proteinu a hustota a viskozita pufru byly predikovány pomocí programu Sednterp⁷⁸. Hodnota parciálního specifického objemu pHPMA (0,794 ml/g) byla převzata z práce Bohdanecký a kol.⁷⁹, v níž byla experimentálně stanovena. Data z měření sedimentační analýzy byla vyhodnocena pomocí programů Sedfit⁸⁰ a vizualizována v programu GUSSI⁸¹.

5 VÝSLEDKY

Cílem této práce bylo rozpracovat nové poznatky ve výzkumu týkajícího se potencionálního terapeutika na bázi pHPMA cílicího na CD20 povrchové domény B lymfomů. Tato práce tak vychází a navazuje na diplomovou práci Mgr. Maxmiliána Hejla „*Příprava polymerního terapeutika cílicího na CD20 pozitivní B lymfomy a NK buňky*“ (Katedra biochemie, PŘF UK, 2023), kde se podařilo úspěšně připravit konstrukt nanoprotílátky anti-CD20 se zásahovým místem pro SrtA a s C-terminální histidinovou kotvou, navržený pro produkci v buněčné linii HEK293 se sekrecí proteinu do média. Bylo dokázáno, že požadovaný konjugát (anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO_Dy-633) lze připravit, a že toto potenciální terapeutikum je schopné snižovat rychlost růstu rakovinných buněk⁷⁶.

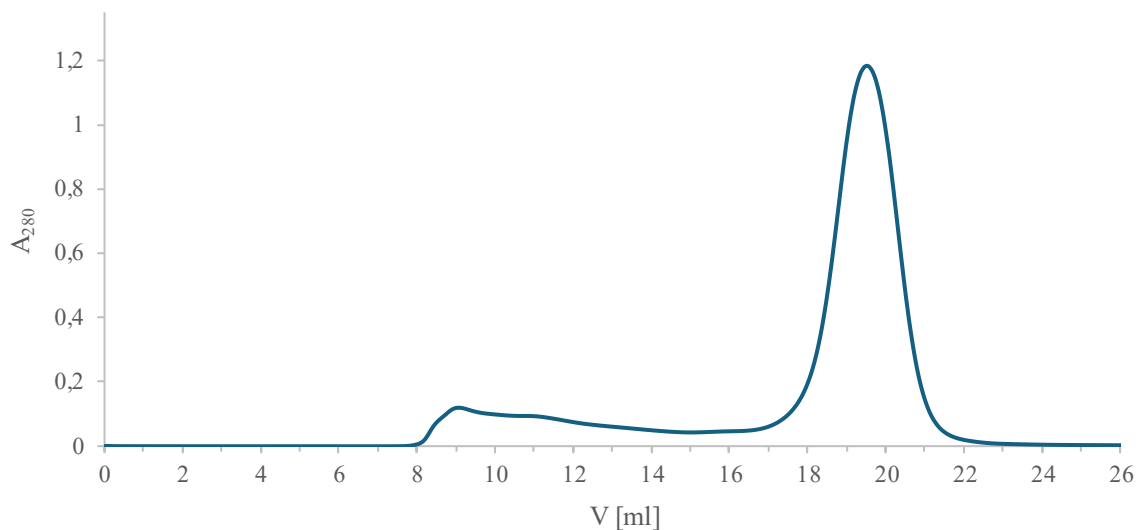
Pro další práci a výzkum je ale nezbytné připravený polymerní konjugát, anti-CD20 nanoprotílátky nevyjímaje, blíže charakterizovat, což je náplň této práce. Protože při výzkumu Mgr. Maxmiliána Hejla bylo veškeré potenciální terapeutikum spotřebováno, bylo v prvním kroku nutné připravit polymerní konjugát znovu.

5.1 REKOMBINANTNÍ PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY

5.1.1 PRODUKCE A PURIFIKACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY

S plazmidem pTW5sec_anti-CD20_LPETGG, kódujícím protein anti-CD20_LPETGG, poskytnutým Mgr. Maxmiliánem Hejlem byla provedena vysokohustotní transienční transfekce cca 800 mil. buněk lidské buněčné linie HEK293T (kap. 4.1.2). Produkce proteinu následně probíhala ve 400 ml živného média EX-CELL 293 s přidanými antibiotiky a kyselinou valproovou při teplotě 37 °C v 5% atmosféře oxidu uhličitého po dobu 5 dní. Pátý den před ukončením produkce činila viabilita buněk 58,2 %. Produkce byla ukončena centrifugací, kdy došlo k oddělení média od buněk. Část získané buněčné pelety z centrifugace byla zmrazena pro provedení případné kontrolní SDS-PAGE, zatímco supernatant s kýženým proteinem anti-CD20_LPETGG byl dále purifikován.

Díky C-terminální histidinové kotvě zavedené do proteinu byla anti-CD20 vazebná doména z odstředěného média izolována s využitím afinitní chromatografie na koloně Ni-INDIGO (Cube Biotech). Při eluci proteinu z kolony bylo současně provedeno i odsolení na napojené odsolovací koloně HiPrep 26/10 (Cytiva). V dalším kroku byl získaný eluát z afinitní chromatografie obsahující anti-CD20_LPETGG zkoncentrován na objem zhruba 250 µl. S takto připraveným proteinem byla provedena gelová permeační chromatografie (GPC) na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), kdy hned od nástřiku vzorku na kolonu byly sbírány jednomililitrové frakce. Chromatografický záznam této purifikace je na obr. 6, str. 36. U frakcí obsahujících protein – na chromatogramu odpovídají 19.–22. ml – byly postupně na spektrofotometru DS-11+ (DeNovix) změřeny následující koncentrace proteinu: frakce 19 (1,47 mg/ml), 20 (4,74 mg/ml), 21 (3,87 mg/ml) a 22 (0,95 mg/ml). Celkový výtěžek proteinu tedy činil 11 mg.



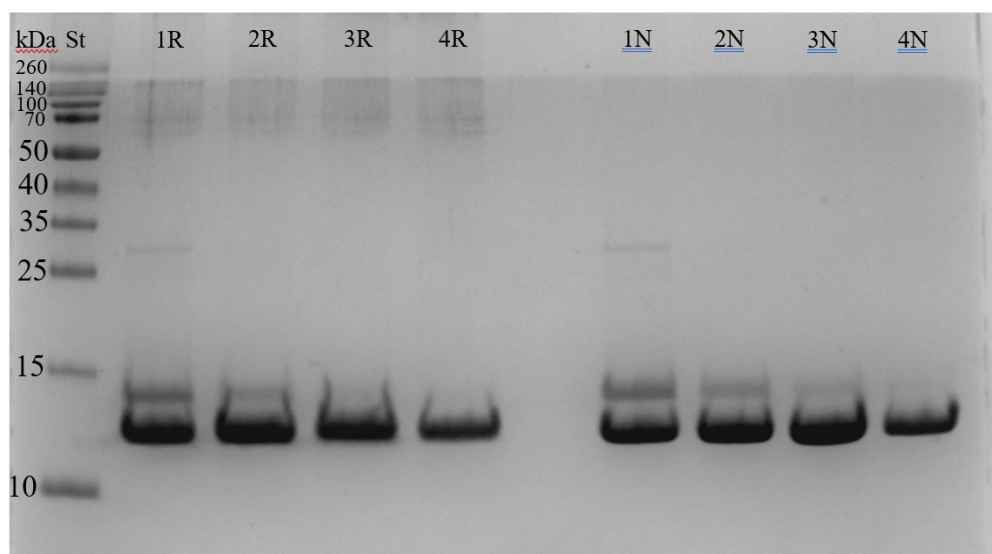
Obr. 6: Gelová permeační chromatografie proteinu anti-CD20_LPETGG.

Přečištění eluátu anti-CD20_LPETGG vazebné domény (14,5 kDa) po afinitní chromatografii bylo prováděno v pufru PBS-TK na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) s průtokem 0,5 ml/min. Od nástřiku vzorku na kolonu byly sbírány jednomililitrové frakce.

5.1.2 BLIŽŠÍ CHARAKTERIZACE anti-CD20 VAZEBNÉ DOMÉNY

5.1.2.1 SDS-PAGE získaných frakcí proteinu

V dalším kroku byla u stejných frakcí, u kterých byla v předešlém kroku stanovena koncentrace (tj. frakcí 19 – 22), provedena SDS-PAGE analýza jak v redukujícím (1–4R), tak i v neredukujícím prostředí (1–4N). Fotodokumentace získaného polyakrylamidového gelu s elektroforeticky separovanými proteiny je na obr. 7. Do jamky gelu bylo vždy pipetováno množství proteinu odpovídající 3 μ g.



Obr. 7: SDS-PAGE analýza čistoty frakcí získaného konstruktů anti-CD20_LPETGG.

SDS-PAGE analýza byla prováděna v 15% polyakrylamidovém gelu při napětí 200 V. Dráha „St“ odpovídá standardu molekulových hmotností Spectra Multicolor Broad Range s příslušnými molekulovými hmotnostmi v kDa. Dráhy 1-4R odpovídají vzorkům frakcí 19 – 22 v redukujícím prostředí. Obdobně značení 1-4N odpovídá drahám se vzorky frakcí 19 – 22 v neredukujícím prostředí. Nanáška proteinu na gel ve všech drahách činila 3 μ g.

Očekávaná molekulová hmotnost anti-CD20_LPETGG vazebné domény vypočtená programem ProtParam⁷⁴ činí 14,5 kDa. Na snímku získaného polyakrylamidového gelu (obr. 7, str. 36) se však konstrukt jeví o trochu lehčí, tento jev je ale zapříčiněn velkým rozptitím jednotlivých signálů, způsobeným nanesením velké nanášky proteinu na SDS-PAGE. Jinak molekulová hmotnost odpovídá očekávané, z čehož bylo usouzeno, že získaný protein doopravdy odpovídá konstruktu anti-CD20_LPETGG vazebné domény.

Vzhledem k tomu, že tento konstrukt ve své struktuře nemá žádné místo, které by mohlo podléhat *N*-glykosylaci, kterou jako posttranslační modifikaci lidské buňky HEK293 ochotně vytvářejí, očekávali jsme, že na gelu po elektroforetické separaci proteinů uvidíme pouze jeden signál. Tato hypotéza se ale neukázala pravdivou, jak je vidět na obr. 7, str. 36, kde u prvních dvou analyzovaných frakcí (tj. 19 a 20) můžeme ve spodní části gelu jak v redukujícím (1-2R) tak i v neredukujícím (1-2N) prostředí pozorovat dva jasné signály. Spodní proužek patrně odpovídá samotnému konstruktu anti-CD20_LPETGG, horní proužek by mohl odpovídat posttranslačně modifikované antiCD20_LPETGG vazebné doméně. Náznak druhého signálu jde dále spatřit i u třetí analyzované frakce (tj. 21) v neredukujícím prostředí (3N). Tento poznatek v kombinaci s rozptitými signály, které jsou kromě vysoké nanášky charakteristické i pro glykosylované proteiny, nás navedl na podezření jiné post-translační modifikace – konkrétně *O*-glykosylace, která sice není tak častá jako *N*-glykosylace, ale buňky HEK293T jsou jí také schopné vytvářet.

U první analyzované frakce je navíc jak v redukujícím (1R), tak v neredukujícím prostředí (1N) viditelný slabý signál kolem 28 kDa, který by mohl naznačovat přítomnost kovalentně propojeného dimeru anti-CD20_LPETGG vazebné domény. Z časových důvodů se ale další výzkum na toto nepodařilo provést.

5.1.2.2 Ověření *O*-glykosylace konstruktů anti-CD20_LPETGG

5.1.2.2.1 Deglykosylace anti-CD20_LPETGG vazebné domény enzymatickou reakcí

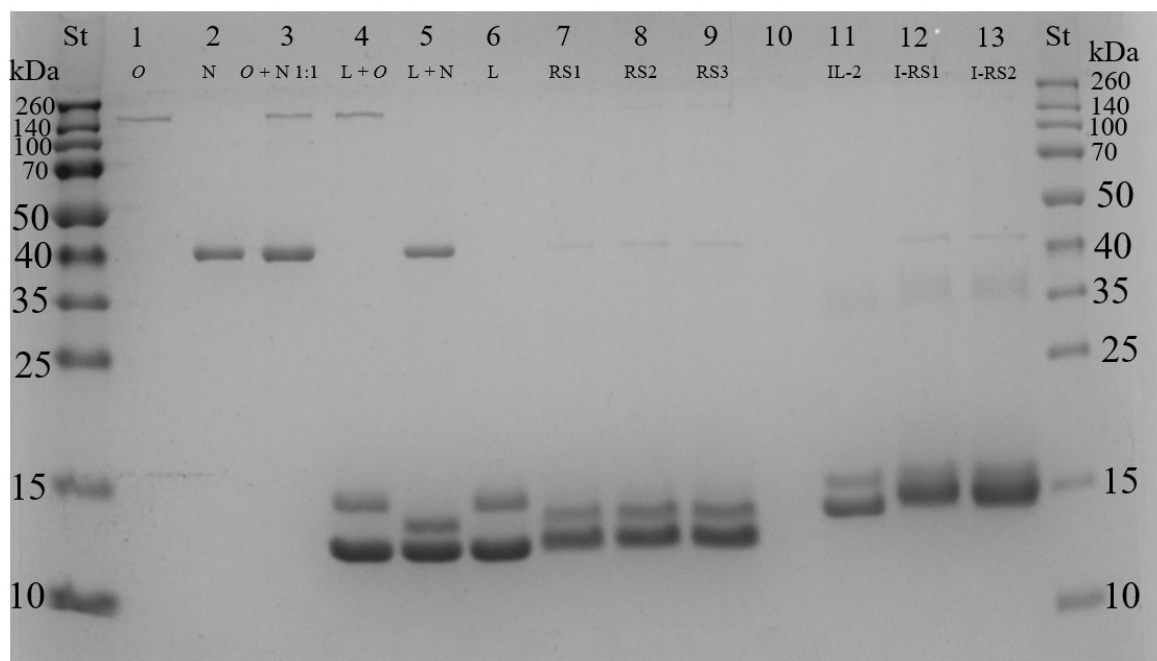
S využitím enzymů α 2-3,6,8 neuraminidasy (taktéž acetyl-neuraminylhydrolasy, New England BioLabs) a *O*-glykosidasy (taktéž endo- α -*N*-acetylgalaktosaminidasy, New England BioLabs) byla pro 90 μ g proteinu odebraných z 20. frakce provedena v denaturujících podmínkách deglykosylace konstruktů anti-CD20_LPETGG. Reakční směs byla kromě použitého množství proteinu, které bylo oproti protokolu poloviční, namíchána dle pokynů na stránkách výrobce enzymů (New England BioLabs) dle bodu 2. A)⁷⁵. Reakce byla inkubována 3 h při 37 °C. Před ukončením byl z reakční směsi postupně odebrán objem odpovídající 2,5, 3,0 a 3,5 μ g analyzovaného proteinu a reakce byla ukončena teplotní denaturací enzymů – 5 min při 95 °C. Odebrané vzorky byly vždy doplněny PBS-TK na celkový objem 16 μ l a stejným způsobem (teplotní denaturací enzymů – 5 min při 95 °C) byla reakce ukončena v neredukujícím prostředí – čímž byly zároveň připraveny vzorky pro další analýzu metodou SDS-PAGE.

Analogickým způsobem byla provedena deglykosylace i u rekombinantního lidského interleukinu 2 (IL-2). Jediná odlišnost v postupu byla v době inkubace, kdy reakční směs s IL-2 byla inkubována pouze 2 h.

5.1.2.2.2 SDS-PAGE analýza *O*-glykosylace konstruktů anti-CD20_LPETGG

Protože výsledek elektroforetické separace metodou SDS-PAGE se pro konstrukt anti-CD20_LPETGG v redukujícím a neredukujícím prostředí nijak výrazně nelišil (viz obr. 7, str.

36), byla SDS-PAGE analýza *O*-glykosylace anti-CD20_LPETGG vazebné domény provedena pouze v neredukujících podmínkách (obr. 8). Jako pozitivní kontrola byla použita deglykosylace IL-2, u kterého je *O*-glykosylace popsána⁸².



Obr. 8: SDS-PAGE analýza přítomnosti *O*-glykosylace na anti-CD20_LPETGG vazebné doméně.

SDS-PAGE analýza byla prováděna v neredukujícím prostředí v 15% polyakrylamidovém gelu při napětí 200 V. Dráhy „St“ odpovídají standardu molekulových hmotností Spectra Multicolor Broad Ranges příslušnými molekulovými hmotnostmi v kDa. Čísla 1-13 značí dráhy, do kterých byly pipetovány příslušné vzorky. Dráha označená „O“ obsahuje enzym *O*-glykosidasu, dráha „N“ α 2-3,6,8 neuraminidasu. Symbol „L“ odpovídá dráze obsahující anti-CD20_LPETGG vazebnou doménu s nanáškou 2,6 μ g. Dráhy „O + N 1:1“, „L + O“ a „L + N“ postupně značí směs enzymů *O*-glykosidasu a α 2-3,6,8 neuraminidasu v poměru 1:1, směs anti-CD20_LPETGG vazebné domény a *O*-glykosidasu, a směs anti-CD20_LPETGG společně s α 2-3,6,8 neuraminidasou. Do drah „RS1-3“ byly pipetovány vzorky reakční směsi antiCD20-LPETGG po deglykosylaci oběma enzymy najednou v postupných navážkách 2,5, 3,0 a 3,5 μ g proteinu. Dráha „IL-2“ obsahuje vzorek rekombinantního lidského interleukinu 2. V drahách značených „I-RS1-2“ byl pipetován vzorek IL-2 po deglykosylaci v postupných navážkách 2,5 a 3,0 μ g proteinu. Množství enzymů nanášené do drah 1-5 odpovídá 1 μ l zásobních roztoků enzymů obdržených od výrobce.

Na snímku polyakrylamidového gelu (obr. 8) dokumentujícího výsledek deglykosylace si lze ve spodní části gelu povšimnout patrného rozdílu v signálech mezi dráhou 6 obsahující samotný konstrukt anti-CD20_LPETGG a dráhou 5 obsahující jeho směs s neuraminidasou, kdy pohyblivost spodního proužku zůstala nezměněna, avšak horní proužek klesl níže, což prokazuje přítomnost kys. sialové v této glykoformě konstruktu. V drahách 7–9 obsahujících anti-CD20_LPETGG vazebnou doménu po deglykosylaci oběma enzymy můžeme pozorovat jak posun horního proužku, tak i drobný posun proužku spodního směrem k vyšším molekulovým hmotnostem. Stejný jev lze vidět i pro kontrolní reakce s interleukinem 2 v drahách 12 a 13, kdy je jednak horní proužek odpovídající *O*-glykosylovanému IL-2 viditelně blíže proužku spodnímu (odpovídajícímu neglykosylované formě IL-2), a zároveň se oproti dráze 11 se samotným IL-2 oba proužky posunuly k vyšším molekulovým hmotnostem. Deglykosylace IL-2 ani anti-CD20_LPETGG vazebné domény sice za daných reakčních podmínek nebyla úplná, přesto se nám s využitím α 2-3,6,8 neuraminidasu a *O*-glykosidasu podařilo odštěpit a tedy i prokázat přítomnost *O*-vázaného sacharidu.

5.1.2.2.3 Určení přesného místa O-glykosylace s využitím hmotnostní spektrometrie

Deglykosylační reakcí využívající α 2-3,6,8 neuraminidasu a O-glykosidasu a následnou SDS-PAGE analýzou bylo dokázáno, že určité procento připravených molekul anti-CD20_LPETGG vazebné domény je O-glykosylováno. Naší další snahou tedy bylo zjištění přesného místa/míst vazby sacharidu/ů metodou hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. mass spectrometry). Štěpení alikvotu frakce 20 pomocí trypsinu a následnou analýzu pomocí chromatografické separace peptidů na obrácené fázi s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (ESI-qToF Maxis, Bruker Daltonics) provedl RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D. Analyty o dostatečné intenzitě byly fragmentovány pomocí kolizně indukované disociace za podmínek vhodných pro fragmentaci glykopeptidů, v žádném z tandemových hmotnostních spekter však nebyly nalezeny oxoniové ionty typické pro glykopeptidy⁸³. Výsledky tedy naznačují, že glykosylované peptidy ve směsi buď nebyly přítomny, což je v rozporu s výsledky z deglykosylačních reakcí (kap. 5.1.2.2.1 na str. 37), nebo nebyly ve vzorku přítomny v dostatečném množství, aby došlo k jejich fragmentaci. Hmotnostně spektrometrická analýza dále ukázala pokrytí aminokyselinové sekvence proteinu ~80 %, kde zejména nebyly detekovány krátké peptidy (obr. 9).

```
ITGMAEVQLQASGGGLVQAGGSLR*LSCAASGISFSASVMGWYR*QAPGK*Q  
R*ELVAYITSGGSTNFADSVK*GR*FTISR*DNAK*NTMYLQMNSLK*AEDT  
GVYFCNRPGR*EISWGQGTQVTVSSGR*LPETGGHHHHHHHHG
```

Obr. 9: Aminokyselinová sekvence anti-CD20_LPETGG vazebné domény rozdělená po segmentech z metody MS.

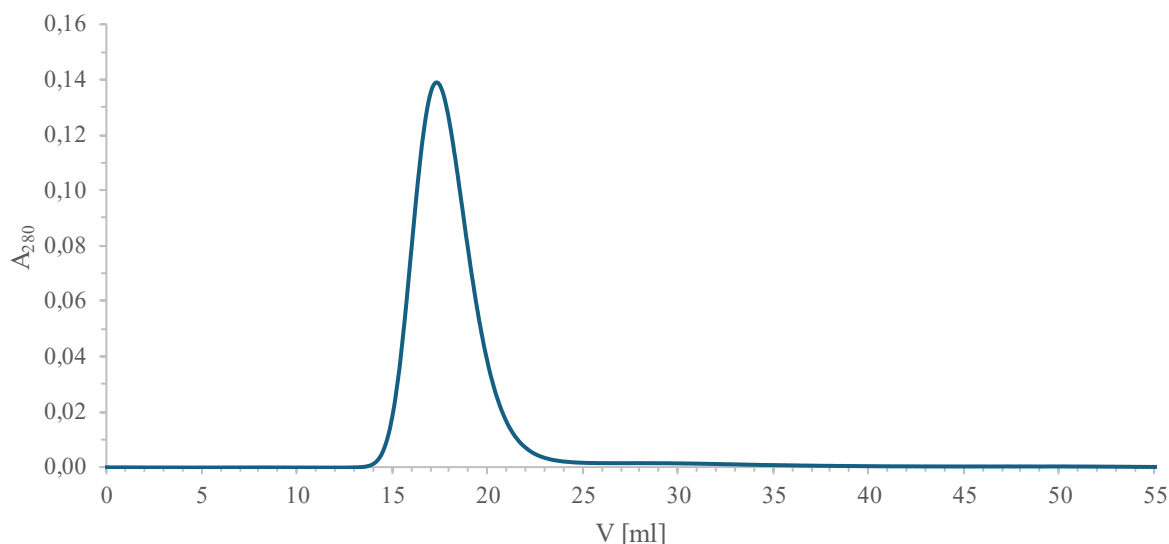
Zeleným písmem jsou vyznačeny peptidy pozorované na MS přístroji. *Fialovým* písmem je znázorněna aminokyselina threonin podezřelá na O-glykosylaci. *Modrým* písmem je znázorněna C-koncová histidinová kotva. „*“ odděluje jednotlivé peptidové segmenty a *šedivě* je vyznačeno zásahové místo pro SrtA.

5.2 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE POLYMERNÍHO KONJUGÁTU

5.2.1 PŘÍPRAVA A PURIFIKACE POLYMERNÍHO KONJUGÁTU anti-CD20 NA BÁZI pHPMA NOSIČE

5.2.1.1 Transpeptidasová reakce konstruktů anti-CD20_LPETGG s GGGG_spojku zprostředkovaná sortasou A

Reakční směs pro napojení anti-CD20_LPETGG na GGGG_spojku s využitím SrtA byla připravena z výchozího množství 3 mg anti-CD20_LPETGG dle kapitoly 4.3.1 na str. 32. Reakce byla za neustálého míchání na programovatelném rotátoru Multi Bio RS-24 (Biosan) inkubována 20 min při laboratorní teplotě. Následně byla reakční směs přečištěna a odsolena na za sebou zapojených kolonách Ni-INDIGO (Cube Biotech) a odsolovací koloně HiPrep 26/10 (Cytiva), viz obr. 10.



Obr. 10: Afinitní chromatografie konstruktů anti-CD20_LPET-spojka.

Přečištění reakční směsi po transpeptidasové reakci anti-CD20_LPETGG vazebné domény (14,5 kDa) s GGGG_spojku zprostředkované SrtA na kolonkách Ni-INDIGO (Cube Biotech) a HiPrep 26/10 (Cytiva) v pufru PBS-TK s průtokem 2,5 ml/min. Sbírána byla pouze oblast odpovídající nárůstu absorpce, kdy byla z kolon eluována směs kýženého konjugátu anti-CD20_LPET-spojka (15,5 kDa) a hydrolyzované molekuly anti-CD20_LPET (13,2 kDa).*

Z afinitní chromatografie byla jímána jen oblast odpovídající nárůstu absorpce (tj. 14. – 24. ml), kdy právě v této oblasti byl přítomen kýžený produkt transpeptidasové reakce – konstrukt anti-CD20_LPET-spojka. Sbíraná oblast dále ještě obsahovala hydrolyzované molekuly anti-CD20_LPET*, které se obdobně jako konstrukt anti-CD20_LPET-spojka bez histidinové kotvy nemohly na kolonce Ni-INDIGO (Cube Biotech) zachytit a které nejde od požadovaného konjugátu oddělit ani na koloně HiPrep 26/10 (Cytiva) kvůli jejich molekulové hmotnosti, která se od molekulové hmotnosti konstruktů anti-CD20_LPET-spojka nijak výrazně neliší.

V dalším kroku byl eluát zkoncentrován na objem 420 μ l a na spektrofotometru DS-11+ (DeNovix) byla změřena koncentrace proteinu, která činila 3,5 mg/ml. Za předpokladu, že hydrolyzovaných molekul anti-CD20_LPET* je v preparátu pouze zanedbatelné minimum, by celkový výtěžek konstruktů anti-CD20_LPET-spojka (dále značeno jen jako L-s) činil 1,47 mg.

Napojení anti-CD20_LPETGG vazebné domény na nízkomolekulární spojku obsahující terminální azidovou skupinu bylo provedeno za účelem zavedení azidové funkční skupiny na konstrukt anti-CD20_LPETGG, abychom posléze díky reakci azidové skupiny pomocí click chemie s DBCO skupinou přítomnou v pHPMA polymeru mohli konstrukt L-s navázat na polymerní nosič pHPMA_DBCO_Dy633 či pHPMA_DBCO, jak je uvedeno níže.

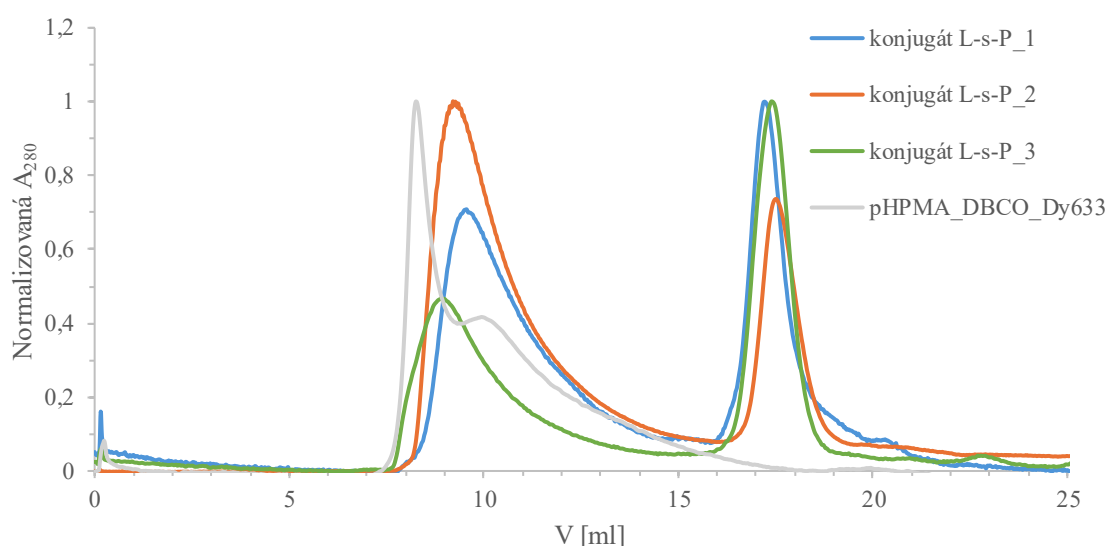
5.2.1.2 Napojení konstruktů anti-CD20_LPET-spojka_azid na fluorescenčně značený polymerní nosič pHPMA_DBCO_Dy633 pomocí „click“ chemie

Polymerní terapeutikum (anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO_Dy633 dále značeno jen jako L-s-P) bylo připraveno dle kapitoly 4.3.2 na str. 33 hned několikrát. Reakce byly připraveny vždy v molárním poměru složek anti-CD20_LPET-spojka : polymerní nosič pHPMA_DBCO_Dy633 odpovídajícímu 15 : 1. Konkrétní použité hmotnosti obou složek jsou uvedeny v tabulce 4. Kvůli fluorescenční značce (DyLight633) na polymerním nosiči byla

reakce inkubována ve zkumavce zakryté alobalem přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byly vždy reakční směsi obsahující požadovaný polymerní konjugát L-s-P přečištěny od nezreagovaného konstruktu anti-CD20_LPET-spojka pomocí GPC na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), kdy od nástřiku vzorku na kolonu byly sbírány jednomililitrové frakce. Normalizované chromatogramy jsou znázorněny na obr. 11.

Tab. 4: Click reakce konstruktu anti-CD20_LPET-spojka a polymerního nosiče pHPMA_DBCO_Dy633. Značení L-s-P_1-3 odpovídá pořadí připravených dávek polymerního konjugátu anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO_Dy633 (L-s-P).

Polymerní konjugát	$m_{\text{pHPMA_DBCO_Dy633}}$ [μg]	$m_{\text{anti-DC20_LPET-spojka}}$ [μg]
L-s-P_1	55	125,4
L-s-P_2	120	273,6
L-s-P_3	120	273,6



Obr. 11: Gelová permeační chromatografie připravených polymerních konjugátů.

Křivky „konjugát L-s-P_1-3“ odpovídají přečištění reakčních směsí click reakce mezi konstruktem anti-CD20_LPET-spojka-azid (L-s) a polymerním nosičem pHPMA_DBCO_Dy633 (P) ve stejném molárním poměru L-s:P ~ 15:1, kdy purifikace byla vždy prováděna v pufru PBS-TK na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) s průtokem 0,5 ml/min. Od nástřiku vzorku na kolonu byly vždy sbírány jednomililitrové frakce. Obdobně se stejnými podmínkami byla proměřena i křivka „pHPMA_DBCO_Dy633“ odpovídající nástřiku samotného polymerního nosiče P.

Při porovnání normalizovaných chromatografických záznamů jednotlivých konjugátů L-s-P z GPC si lze povšimnout, že připravený polymerní konjugát se i přes použití stejných zásobních roztoků jak konstruktu anti-CD20_LPET-spojka, tak polymerního nosiče, pro všechny konjugáty L-s-P i přes stejné reakční podmínky chová pro různá měření odlišně.

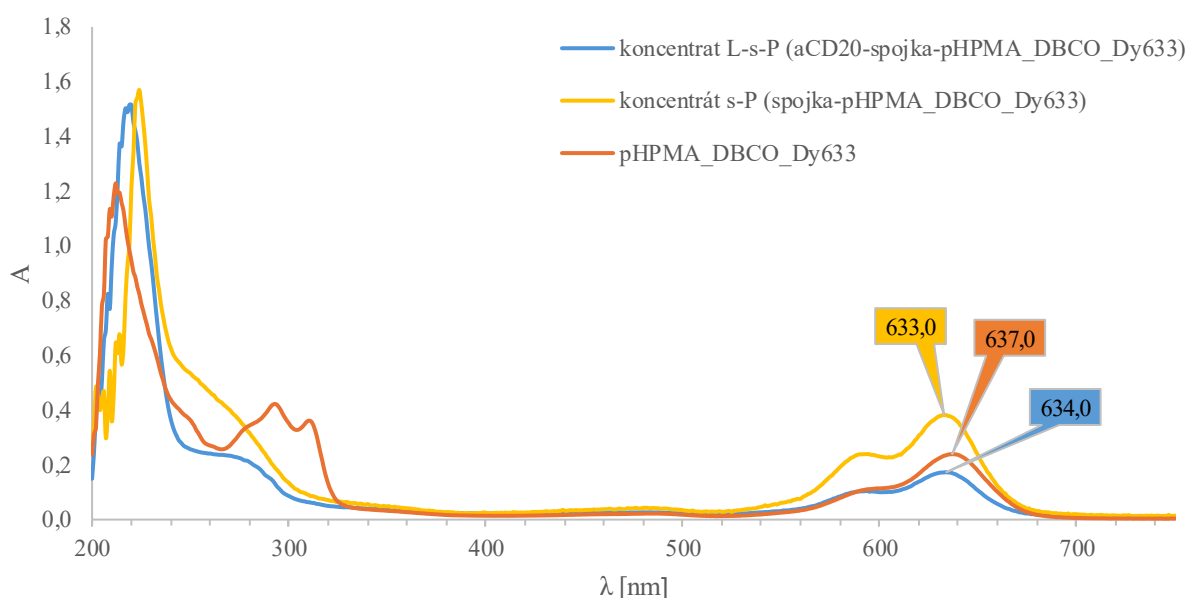
U purifikace 1. a 3. polymerního konjugátu (L-s-P_1 a L-s-P_3) dominantní pík odpovídá připravenému polymernímu terapeutiku. Oproti tomu na chromatogramu odpovídajícímu konjugátu L-s-P_2 hlavní pík odpovídá nezreagovanému konstruktu L-s.

Zároveň je nutné zdůraznit rozdíl v poloze umístění vrcholů píků mezi chromatografickými záznamy jednotlivých konjugátů L-s-P a chromatogramem samotného polymerního nosiče pHPMA_DBCO_Dy633 v oblasti od 7. do 12. ml elučního objemu, kdy se na záznamu GPC

purifikací připravených polymerních konjugátů L-s-P vrchol píku posunul směrem k vyšším elučním objemům (v rozmezí 8,9 – 9,7 ml) oproti samotnému polymeru, kdy umístění hlavního vrcholu píku odpovídá 8,2 ml elučního objemu.

5.2.1.3 Pokus o určení koncentrace připraveného polymerního konjugátu s fluorescenční sondou na základě absorpčních spekter

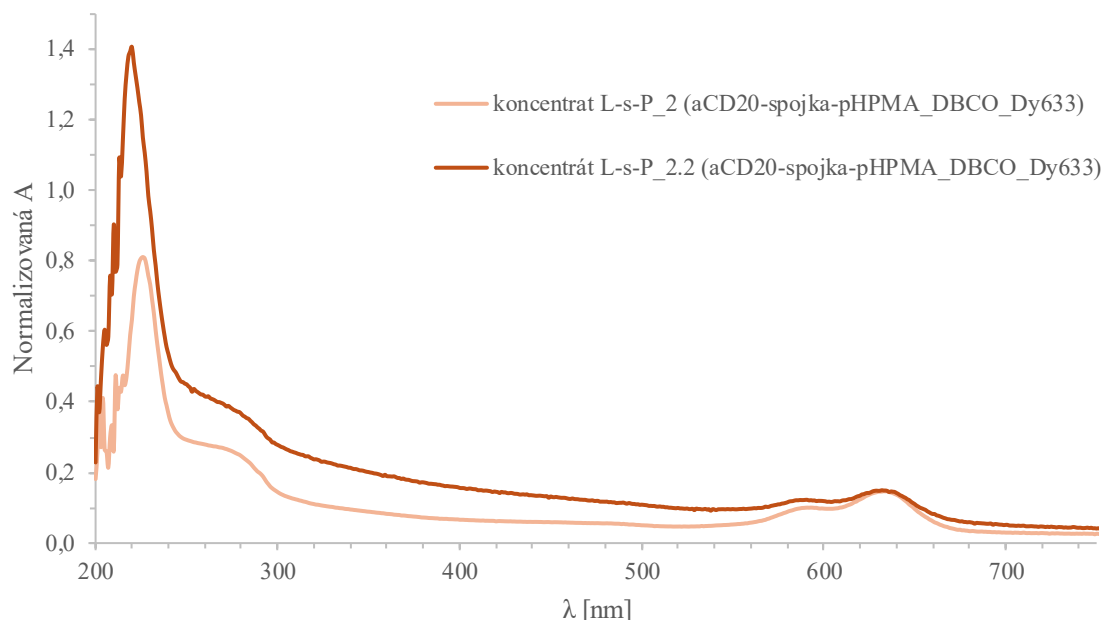
V dalším kroku byly frakce obsahující polymerní konjugát L-s-P_1, tj. frakce 9–13, zkoncentrovány na objem přibližně 300 μl a s tímto roztokem bylo změřeno absorpční spektrum na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS (Agilent), viz obr. 12.



Obr. 12: Graf absorpčních spekter pro polymer pHPMA_DBCO_Dy633, koncentrát polymerního nosiče s navázanou spojkou (s-P) a koncentrát připraveného polymerního konjugátu (L-s-P).

Spektra byla měřena v kyteti Micro Cell Rect Quartz 10 mm 40 μl (Agilent Technologies) s optickou dráhou 1 cm na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS (Agilent). Jako reference byl použit pufr PBS-TK. Koncentrace čistého polymeru činila 0,1 mg/ml. Koncentrace koncentrátů s-P ani L-s-P nebyla známa.

Naším dalším cílem bylo ze znalosti množství navázané fluorescenční sondy na polymeru – DyLight 633 (dále již jen jako Dy633) které činí 1,63 molekul Dy633 na jeden polymerní řetězec, tabelované hodnoty extinkčního koeficientu Dy633 ($\epsilon_{\text{DyLight 633}} = 170000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) a naměřené absorpance při 633 nm dopočítat množství připraveného polymerního konjugátu L-s-P, z čehož by následně šla dopočítat i látková koncentrace získaného koncentráту L-s-P. Bohužel bylo zjištěno, že i přes opatrné zacházení se vzorkem se fluorescenční sonda příliš rychle vysvěcuje, což je znázorněno na obr. 13, kdy byl proměřen tentýž koncentrát L-s-P_2 hned po provedení GPC (na grafu odpovídá L-s-P_2) a následně o dva dny později (L-s-P_2.2), přičemž mezi měřeními byl vzorek zmražen, umístěn do alobalového obalu a skladován ve tmě, aby bylo co nejvíce zabráněno vysvěcování Dy633.

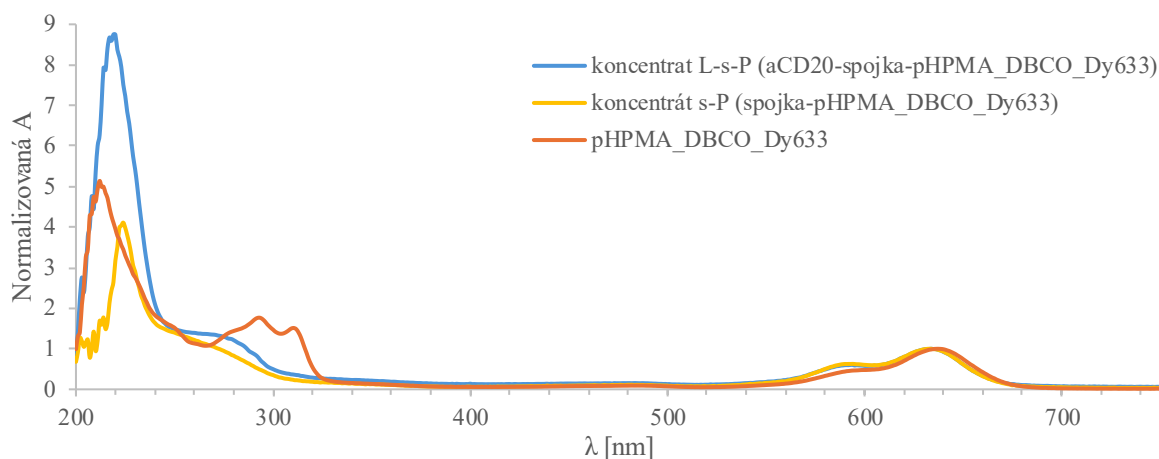


Obr. 13: Normalizovaná absorpční spektra koncentrátů polymerního konjugátu 2 (L-s-P_2) v časovém rozmezí.

Spektra byla měřena v kyvetě Micro Cell Rect Quartz 10 mm 40 μ l (Agilent Technologies) s optickou dráhou 1 cm na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS (Agilent). Jako reference byl použit pufr PBS-TK. Křivka označená „koncentrát L-s-P_2“ odpovídá spektru změřeném bezprostředně po GPC. Křivka „koncentrát L-s-P_2.2“ odpovídá měření stejného vzorku o dva dny později. Obě spektra jsou pro porovnání normalizována tak, aby absorpce na 633 nm odpovídala jedné. Je tedy patrné vysvěcování Dy633.

5.2.1.4 Snaha o určení počtu navázaných molekul anti-CD20 vazebné domény na polymerním nosiči pHPMA v připraveném polymerním konjugátu z absorpčních spekter

S využitím fluorescenční sondy Dy633 bylo taktéž usilováno o zjištění alespoň přibližného množství navázaných molekul konstruktu anti-CD20 na polymerním nosiči pHPMA, kdy byly postupně proměřeny absorpční spektra samotného polymeru pHPMA_DBCO_Dy633, koncentrát konjugátu spojka-pHPMA_DBCO_Dy633 (dále značeno jen jako s-P) a koncentrát polymerního konjugátu L-s-P (uvedeno je absorpční spektrum pouze pro koncentrát konjugátu L-s-P_1 (viz obr. 12, str. 42). Aby však data mohla být mezi sebou porovnávána, byla všechna proměřená spektra normalizována tak, aby absorpce Dy633 na 633 nm odpovídala jedné (obr. 14, str. 44).

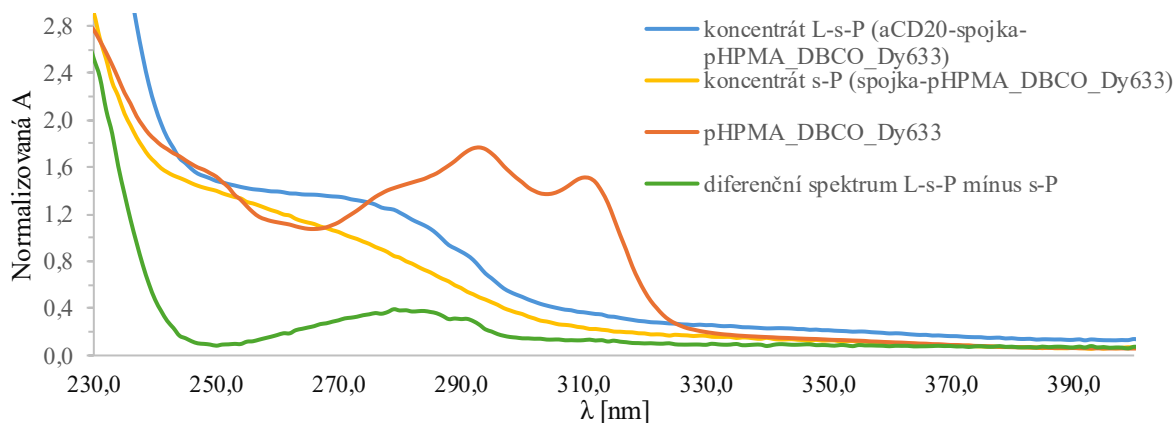


Obr. 14: Normalizovaná absorpční spektra pro polymer pHPMA_DBCO_Dy633, koncentrát polymerního nosiče s navázanou spojkou (s-P) a koncentrát připraveného polymerního konjugátu (L-s-P).

Spektra byla měřena v kyvetě s optickou dráhou 1 cm na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS (Agilent). Jako reference byl použit pufr PBS-TK. Koncentrace čistého polymeru činila 0,1 mg/ml. Koncentrace koncentrátů s-P ani L-s-P nebyla známa. Všechna spektra jsou normalizována tak, aby absorbance při 633 nm odpovídala jedné.

Po znormalizování naměřených spektrálních křivek na 633 nm bylo možné od sebe jednotlivá spektra odečíst – konkrétně od spektra terapeutika L-s-P bylo odečteno spektrum konjugátu s-P. Tímto odečtem tak bylo v oblasti kolem 280 nm, kde absorbuje peptidová vazba v konstruktu anti-CD20, získáno spektrum samotné anti-CD20 vazebné domény, kterou se úspěšně podařilo navázat na polymerní nosič (obr. 15).

Bohužel obdobně jako při určování molární koncentrace polymerního konjugátu L-s-P i zde kvůli vysvěcování fluorescenční sondy Dy633 nebylo možné navázané množství molekul anti-CD20 vazebné domény spolehlivě určit. Nicméně bylo tímto způsobem ověřeno, že alespoň nějaké molekuly konstruktu anti-CD20_LPETGG se na polymerní nosič pHPMA vážou.



Obr. 14: Výřez z grafu normalizovaných absorpčních spekter pro polymer pHPMA_DBCO_Dy633, koncentrát polymerního nosiče s navázanou spojkou (s-P) a koncentrát připraveného terapeutického polymerního konjugátu (L-s-P) a dopočtené diferenční absorpční spektrum pro anti-CD20 vazebnou doménu konjugovanou v L-s-P.

Spektra byla měřena v kyvetě Micro Cell Rect Quartz 10 mm 40 μl (Agilent Technologies) s optickou dráhou 1 cm na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS (Agilent). Jako reference byl použit pufr PBS-TK. Koncentrace čistého polymeru činila 0,1 mg/ml. Koncentrace koncentrátů s-P ani L-s-P nebyla známa. Všechna naměřená spektra (tj spektra polymerního nosiče, konjugátu spojky s polymerem a terapeutika L-s-P) jsou normalizována tak, aby absorbance na 633 nm odpovídala jedné. Poslední spektrum odpovídající diferenčnímu rozdílu spektra s-P od L-s-P by mělo teoreticky odpovídat množství navázaných molekul anti-DC20 vazebné domény na polymerním nosiči pHPMA.

5.2.1.5 Zkouška stanovení molekulové hmotnosti fluorescenčně značeného polymerního konjugátu pomocí AUC a DLS

Souběžně s prováděnými experimenty využívajícími absorpčních spekter bylo s využitím analytické ultracentrifugace (AUC, z angl. analytical ultracentrifugation) při 633 nm u koncentrátu terapeutika L-s-P_1 RNDr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D. provedeno měření sedimentační rovnováhy. Cílem tohoto experimentu bylo stanovení molekulové hmotnosti připraveného polymerního konjugátu L-s-P, ovšem jako i v předešlých způsobech stanovení i u této metody vadilo vysvěcování Dy633, na které se celé měření kalibrovalo.

Po neúspěšném stanovení molekulové hmotnosti s využitím AUC bylo naší další myšlenkou, jak tento parametr stanovit, využití metody dynamického rozptylu světla (DLS, z angl. dynamic light scattering). Bohužel ani touto metodou se kýženou molekulovou hmotnost polymerního terapeutického konjugátu nepodařilo určit, protože fluorescenční sonda navázaná na polymerním nosiči pHPMA interferovala s měřením.

5.2.2 CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÉHO POLYMERNÍHO KONJUGÁTU POMOCÍ BIOFYZIKÁLNÍCH METOD

Kvůli všem komplikacím spojeným s vysvěcováním fluorescenční sondy Dy633 při charakterizaci polymerního konjugátu antiCD20 bylo upuštěno od fluorescenčně značeného polymerního nosiče a bylo připraveno terapeutikum obsahující polymer pHPMA_DBCO – tedy terapeutikum anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO (dále značeno jen jako L-s-P*).

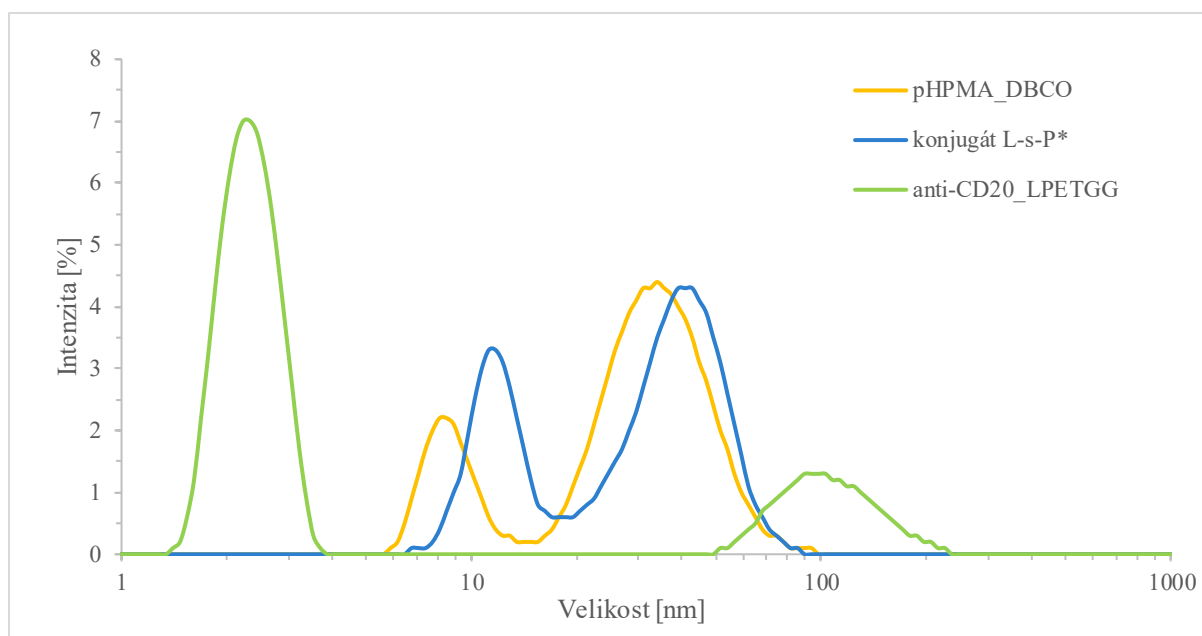
5.2.2.1 Analýza polymerního konjugátu metodou DLS

Bez fluorescenční značky Dy633 byl jak samotný polymer pHPMA_DBCO tak i terapeutický konjugát L-s-P* metodou DLS měřitelný. Pro celistvost výsledků byl touto metodou proměřen i konstrukt samotné anti-CD20_LPETGG vazebné domény.

Měření bylo provedeno RNDr. Kateřinou Hofbauerovou, Ph.D. (MFF UK), kdy bylo měřeno postupně vždy 40 μ l daného preparátu při 20°C. Vzorky byly před měřením DLS nejprve centrifugovány – 5 min při 6000 \times g na stolní mini centrifuze GmCLab PMC880 (Gilson) a následně i zfiltrány přes centrifugační filtry Durapore PVDF 0,1 μ m (Millipore). Získaná data jsou uvedena v tabulce 5 s tím, že odpovídající naměřené křivky jsou znázorněny na obrázcích 16 a 17 na následující straně.

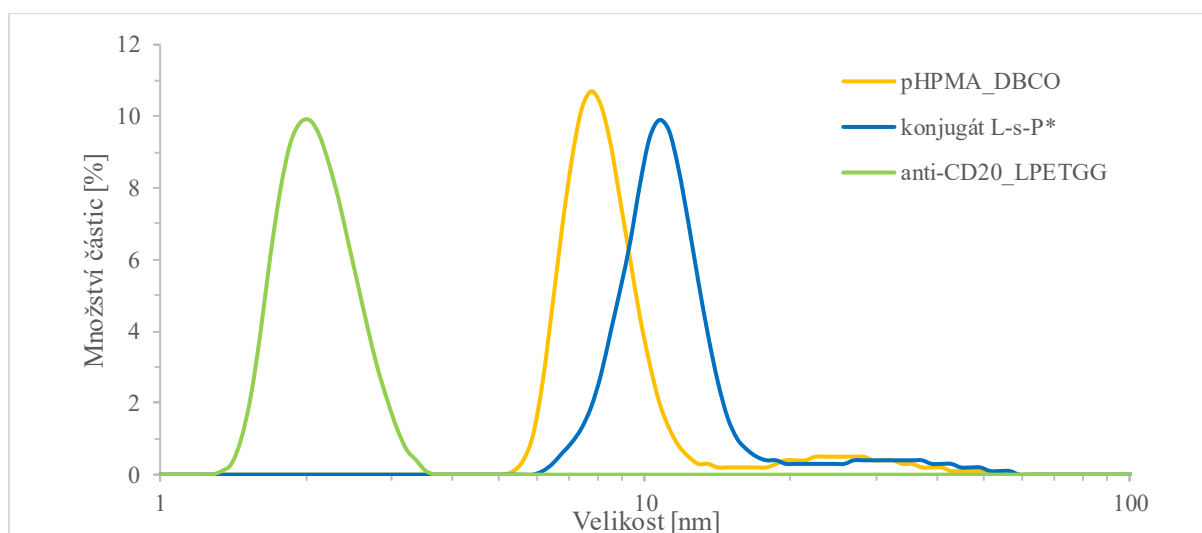
Tab. 5: Hodnoty stanovené metodou DLS pro anti-CD20_LPETGG vazebnou doménu, samotný polymerní nosič pHPMA_DBCO a polymerní konjugát L-s-P*.

	pík	Velikost částice [nm]	Polydisperzita [%]	Odhadovaná mol. hmotnost [kDa]	Intenzita [%]	Hmota [%]	Polydisperzita píku
Anti-CD20_LPETGG							
	1	2,341 \pm 0,424	18,1	24,6 \pm 4,5	76,6	100	monodisperzní
	2	108,8 \pm 35,53	32,7	1,96e+5 \pm 6,40e+4	23,4	0,0	polydisperzní
pHPMA_DBCO							
	1	8,808 \pm 1,613	18,3	547,0 \pm 186,0	20,8	91,7	monodisperzní
	2	35,94 \pm 12,22	34,0	1,47e+4 \pm 2,69e+3	79,2	8,3	polydisperzní
Konjugát L-s-P*							
	1	11,90 \pm 2,175	18,3	1110 \pm 328,1	31,6	93,0	monodisperzní
	2	40,45 \pm 12,01	29,7	1,94e+4 \pm 3,54e+3	68,4	7,0	polydisperzní



Obr. 15: Distribuce velikosti částic stanovená DLS na základě intenzity rozptylu světla pro protein anti-CD20_LPETGG, samotný polymer pHPMA_DBCO a polymerní terapeutikum anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO (L-s-P*).

Měření dynamického rozptylu světla byla prováděna při konstantní teplotě 20 °C na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) vybaveného He-Ne laserem o vlnové délce 633 nm. Vzorky byly před měřením centrifugovány po dobu 5 min při 6000 × g na stolní minicentrifuze GmCLab PMC880 (Gilson) a následně i zfiltrovány přes centrifugační filtry Durapore PVDF 0,1 μm (Millipore). Vzorky byly měřeny v kyvetě Ultra-Micro Cell 3 × 3 mm, 45 μl (Hellma Analytics). Výsledky byly zpracovány v programu Zetasizer 6.2 (Malvern Instruments).



Obr. 16: Distribuce velikosti částic po korekci intenzity DLS na velikost částic pro protein anti-CD20_LPETGG, samotný polymer pHPMA_DBCO a polymerní terapeutikum anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO (L-s-P*) pomocí DLS.

Měření dynamického rozptylu světla byla prováděna při konstantní teplotě 20 °C na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) vybaveného He-Ne laserem o vlnové délce 633 nm. Vzorky byly před měřením centrifugovány po dobu 5 min při 6000 × g na stolní minicentrifuze GmCLab PMC880 (Gilson) a následně i zfiltrovány přes centrifugační filtry Durapore PVDF 0,1 μm (Millipore). Vzorky byly měřeny v kyvetě Ultra-Micro Cell 3 × 3 mm, 45 μl (Hellma Analytics). Výsledky byly zpracovány v programu Zetasizer 6.2 (Malvern Instruments).

Z grafu popisujícího distribuci velikosti částic v analyzovaných vzorcích na základě intenzity rozptylu světla (obr. 16) je jasně viditelné posunutí vrcholu píku pro křivku odpovídající připravenému terapeutiku L-s-P* směrem k větším velikostem částic oproti vrcholu píku křivky

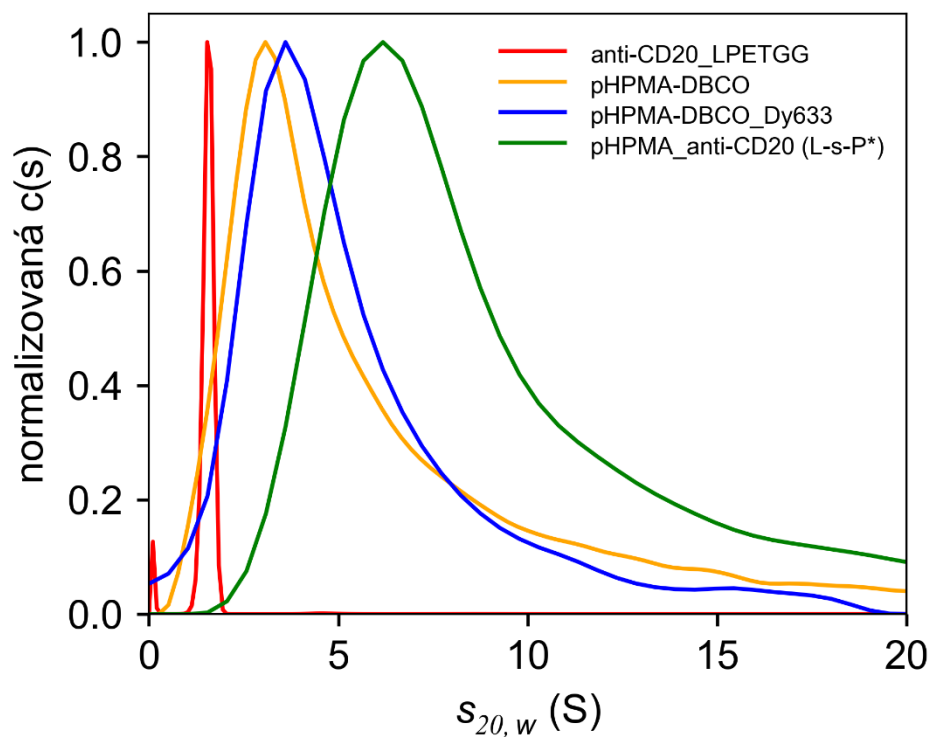
samotného polymeru pHPMA_DBCO, což potvrzuje, že skutečně došlo k navázání anti-CD20 nanoproti látky na polymerní nosič. Zároveň si lze u všech vzorků povšimnout přítomnosti částic mnohem větší velikosti v řádu desítek až ca 100 nm. Zde je ovšem třeba si uvědomit, že pro rozptyl světla platí, že větší částice rozptylují záření mnohem více než částice menší. Proto je třeba provést korekci na tento jev, čímž lze získat graf distribuce odrážející skutečný poměr v zastoupení jednotlivých částic v roztoku (obr. 17, str. 46). Zde již vidíme, že zastoupení částic o větší velikosti je ve skutečnosti zcela minoritní – může představovat příměs menšího množství agregátů či drobných prachových částic, které se nepodařilo odstranit filtrací ani centrifugací. V každém případě je zde ještě lépe pozorovatelný posun distribuce velikosti částic konjugátu L-s-P* oproti samotnému pHPMA_DBCO polymeru k větším částicím, což koreluje s vazbou anti-CD20 na polymerní nosič.

5.2.2.2 Analýza polymerního konjugátu metodou AUC

Za účelem ověření oligomerního stavu rekombinantní anti-CD20 nanoproti látky a polydisperzity použitých pHPMA polymerních nosičů a získaného L-s-P* konjugátu byla provedena sedimentační analýza metodou sedimentační rychlosti, což je technika používaná k analýze velikosti a distribuce makromolekul v roztoku^{77,84}. Při této metodě jsou makromolekuly v roztoku vystaveny vysoké odstředivé síle, která způsobuje jejich sedimentaci směrem ke dnu centrifugační kyvety. Při sedimentaci vytvářejí rozhraní mezi roztokem a čistým pufrem. Sledováním pohybu tohoto rozhraní v čase, obvykle prostřednictvím série skenů, lze určit sedimentační koeficient makromolekul. Tento koeficient poskytuje informace o velikosti a tvaru makromolekul a o jejich distribuci v roztoku.

Sedimentační analýzu provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter). Výsledný graf (obr. 18, str. 48) ukazuje, že anti-CD20 nanoproti látka je přítomna jako jediná diskretní částice o hodnotě sedimentačního koeficientu $s_{20,w} = 1,6$ S, což odpovídá jejímu očekávanému monomernímu stavu. Poměr frikčních koeficientů $f/f_0 = 1,41$ naznačuje protáhlý tvar molekuly, což může spíše souviset s přítomností O-glykosylace a také poměrně dlouhé neuspořádané sekvence na C-konci proteinu (LPETGG-His kotva). Hodnota molekulové hmotnosti predikované na základě sed. koeficientu a poměru frikčních koeficientů 13,9 kDa se v rámci přesnosti metody dobře shoduje s teoretickou hodnotou 14,5 kDa odvozenou ze znalosti aminokyselinové sekvence proteinu a opět potvrzuje monomerní stav proteinu.

Naproti tomu distribuce sedimentačních koeficientů pro pHPMA-DBCO polymerní nosič i jeho konjugát s anti-CD20 nanoproti látkou má mnohem širší průběh, což odpovídá polydisperzní směsi molekul polymeru o různé molekulové hmotnosti, popř. o různém hydrodynamickém poloměru. Pozorované rozpětí hodnot sed. koeficientu pokrývá oblast 0-50 S, přičemž většina částic vykazuje hodnoty ca 1-20 S. Vzhledem k širokému rozpětí nelze integrací jednoznačně určit hodnotu sed. koeficientu hlavního vrcholu, pouze případně průměrnou hodnotu za celou distribuci. Pozorujeme však výrazný posun distribuce pro L-s-P* konjugát s vrcholem okolo ca 6-7 S oproti distribuci samotných polymerních nosičů pHPMA-DBCO či pHPMA-DBCO-Dy633 s vrcholy okolo 3-4 S. To potvrzuje přítomnost částic o vyšší molekulové hmotnosti a/nebo více kompaktního tvaru díky konjugaci anti-CD20 nanoproti látky na pHPMA nosič.



Obr. 18: Sedimentační analýza pro protein anti-CD20_LPETGG, samotný polymer pHPMA_DBCO a polymerní terapeutikum anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO (L-s-P*) pomocí AUC.

Měření sedimentační rychlosti byla prováděna při konstantní teplotě 20 °C na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter) při vlnové délce 230 nm a 45000 ot./min pro vzorky pHPMA a konjugátu, resp. 280 nm a 50000 ot./min pro samotné antiCD20. Data byla vyhodnocena pomocí programů Sedfit⁸⁰ a vizualizována v programu GUSSI⁸¹.

6 DISKUSE

Hlavním cílem této práce byla bližší charakterizace připraveného polymerního konjugátu anti-CD20 nanoprotilátky ať již s neznačeným či fluorescenčně značeným polymerním nosičem pHPMA (konjugátů anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO nebo anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO_Dy633).

Aby však byla možná charakterizace těchto konjugátů, bylo zapotřebí tyto konjugáty (L-s-P a L-s-P*) znovu připravit. Prvním krokem tak byla produkce rekombinantní nanoprotilátky anti-CD20_LPETGG, jejíž produkce byla v rámci této práce provedena celkem třikrát, kdy relativní výtěžky anti-CD20_LPETGG vazebné domény na použité množství média byly do značné míry odlišné. Dvakrát ze tří produkcí byl relativní výtěžek konstruktů anti-CD20_LPETGG zhruba 14 mg proteinu na 400 ml média, ve třetí produkci byl výtěžek proteinu 1 mg / 400 ml média.

Pro ujištění se, že protein byl produkován, ale možná jen selhala jeho purifikace, bylo médium repurifikováno, avšak protein v médiu obsažený nebyl. Z tohoto důvodu byla následně malý výtěžek v rámci třetí série produkce proteinu anti-CD20_LPETGG přisuzován nefunkčnosti plazmidu kódujícího sekvenci daného konstruktů anti-CD20_LPETGG, a tak s využitím agarosové elektroforézy byla ověřena jeho celistvost, která ale byla v pořádku. Naši další, avšak nepotvrzenou hypotézou tedy je, že musel nastat problém v samotných buňkách produkujících daný protein.

Co se týče *O*-glykosylace anti-CD20_LPETGG vazebné domény, analyzovaný vzorek obsahoval sice velké množství proteinu (20 μ g), jeho majoritní část však byla neglykosylovaná (viz nižší z elektroforetických zón na obr. 8, str. 38, dráha 6 „L“). Jelikož jsou jednotlivé glykopeptidy kvůli heterogenitě připojených glykanů méně abundantní v porovnání s ostatními peptidy a také se hůře ionizují, přikláníme se k vysvětlení, že se ve vzorku glykopeptidy nacházely, avšak pod mezí detekce. V budoucnu bude nezbytné pokusit se nabohatit glykosylovanou formu proteinu a štěpení a MS analýzu zopakovat.

Přesouvající se k polymerním konjugátům anti-CD20, neúspěšné stanovení molekulové hmotnosti L-s-P polymerního konjugátu metodou sedimentační rovnováhy měřené na AUC je připisováno vysvěcování fluorescenční sondy Dy633 na kterou bylo celé měření kalibrováno. Z tohoto důvodu bychom chtěli stanovení molekulové hmotnosti L-s-P polymerního konjugátu touto metodou zkusit ještě jednou, avšak s měřením kalibrovaným na jinou vlnovou délku než co odpovídá fluoroforu Dy633. V rámci dalšího výzkumu bychom chtěli zkusit připravit polymerní konjugát anti-CD20 s jinou než fluorescenční sondou, na níž by pak šlo měření kalibrovat.

Další metoda, která byla vyzkoušena na charakterizaci polymerních konjugátů L-s-P a L-s-P* byla hmotnostní fotometrie. Tato metoda má spoustu předností, mezi nejsympatičtější spadá velmi malá spotřeba vzorku (v rámci nmol). Tato metoda je zároveň rychlá a má i vysokou citlivost. Její výraznou nevýhodou ovšem je, že pro vyhodnocení naměřených dat je nutná velmi přesná kalibrace. Protože ovšem hmotnostní fotometrie spadá do poměrně nových metod charakterizace molekul, nebyl zatím nalezen žádný standard, který by našim biokonjugátům protein-polymer vyhovoval. Nicméně s dalším výzkumem bychom v budoucnu chtěli opětovně zkusit i tuto metodu.

7 ZÁVĚR

- Byl úspěšně produkován a přečištěn protein anti-CD20_LPETGG.
- U konstruktů anti-CD20_LPETGG byla prokázána přítomnost *O*-glykosylace.
- Podařilo se připravit dva polymerní konjugáty anti-CD20, jeden značený fluorescenční sondou Dy633 (anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO_Dy633) a druhý neznačený (anti-CD20_LPET-spojka-pHPMA_DBCO).
- U neznačeného polymerního konjugátu se podařilo s využitím DLS a AUC potvrdit navázání anti-CD20 vazebné domény na polymerní nosič pHPMA.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Mattiuzzi, C.; Lippi, G. Current Cancer Epidemiology. *J. Epidemiol. Glob. Health* **2019**, *9* (4), 217–222. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>.
- (2) *Cancer*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed 2024-05-19).
- (3) Juliusson, G.; Hough, R. Leukemia. *Prog. Tumor Res.* **2016**, *43*, 87–100. <https://doi.org/10.1159/000447076>.
- (4) Evans, L. S.; Hancock, B. W. Non-Hodgkin Lymphoma. *Lancet Lond. Engl.* **2003**, *362* (9378), 139–146. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13868-8).
- (5) Armitage, J. O.; Gascoyne, R. D.; Lunning, M. A.; Cavalli, F. Non-Hodgkin Lymphoma. *Lancet Lond. Engl.* **2017**, *390* (10091), 298–310. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32407-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32407-2).
- (6) Matasar, M. J.; Zelenetz, A. D. Overview of Lymphoma Diagnosis and Management. *Radiol. Clin. North Am.* **2008**, *46* (2), 175–198, vii. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2008.03.005>.
- (7) Horie, R.; Higashihara, M.; Watanabe, T. Hodgkin's Lymphoma and CD30 Signal Transduction. *Int. J. Hematol.* **2003**, *77* (1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/BF02982601>.
- (8) Szlasa, W.; Wilk, K.; Knecht-Gurwin, K.; Gurwin, A.; Froń, A.; Sauer, N.; Krajewski, W.; Saczko, J.; Szydelko, T.; Kulbacka, J.; Małkiewicz, B. Prognostic and Therapeutic Role of CD15 and CD15s in Cancer. *Cancers* **2022**, *14* (9), 2203. <https://doi.org/10.3390/cancers14092203>.
- (9) Stenzel, P. J.; Schindeldecker, M.; Seidmann, L.; Herpel, E.; Hohenfellner, M.; Hatiboglu, G.; Foersch, S.; Porubsky, S.; Macher-Goeppinger, S.; Roth, W.; Tagscherer, K. E. CD15 Is a Risk Predictor and a Novel Target in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* **2023**. <https://doi.org/10.1159/000535201>.
- (10) Santos, M. A. O.; Lima, M. de M. CD20 Role in Pathophysiology of Hodgkin's Disease. *Rev. Assoc. Medica Bras.* **1992** **2017**, *63* (9), 810–813. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.09.810>.
- (11) Tedder, T. F.; Streuli, M.; Schlossman, S. F.; Saito, H. Isolation and Structure of a cDNA Encoding the B1 (CD20) Cell-Surface Antigen of Human B Lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85* (1), 208–212. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.208>.
- (12) Cancro, M. P.; Tomayko, M. M. Memory B Cells and Plasma Cells: The Differentiative Continuum of Humoral Immunity. *Immunol. Rev.* **2021**, *303* (1), 72–82. <https://doi.org/10.1111/imr.13016>.
- (13) Kanellopoulos, J. M.; Ojcius, D. M. Development of Humoral Immunity. *Biomed. J.* **2019**, *42* (4), 207–208. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.08.003>.
- (14) Reff, M. E.; Carner, K.; Chambers, K. S.; Chinn, P. C.; Leonard, J. E.; Raab, R.; Newman, R. A.; Hanna, N.; Anderson, D. R. Depletion of B Cells in Vivo by a Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody to CD20. *Blood* **1994**, *83* (2), 435–445.
- (15) Zaman, R.; Islam, R. A.; Ibnat, N.; Othman, I.; Zaini, A.; Lee, C. Y.; Chowdhury, E. H. Current Strategies in Extending Half-Lives of Therapeutic Proteins. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2019**, *301*, 176–189. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.016>.
- (16) Salles, G.; Barrett, M.; Foà, R.; Maurer, J.; O'Brien, S.; Valente, N.; Wenger, M.; Maloney, D. G. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv. Ther.* **2017**, *34* (10), 2232–2273. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0612-x>.

- (17) Chu, T.-W.; Yang, J.; Kopeček, J. Anti-CD20 Multivalent HPMA Copolymer-Fab' Conjugates for the Direct Induction of Apoptosis. *Biomaterials* **2012**, *33* (29), 7174–7181. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.024>.
- (18) Luo, C.; Wu, G.; Huang, X.; Ma, Y.; Zhang, Y.; Song, Q.; Xie, M.; Sun, Y.; Huang, Y.; Huang, Z.; Hou, Y.; Xu, S.; Chen, J.; Li, X. Efficacy and Safety of New Anti-CD20 Monoclonal Antibodies versus Rituximab for Induction Therapy of CD20+ B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 3255. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82841-w>.
- (19) Pavlasova, G.; Mraz, M. The Regulation and Function of CD20: An “Enigma” of B-Cell Biology and Targeted Therapy. *Haematologica* **2020**, *105* (6), 1494–1506. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.243543>.
- (20) Gordon, M. J.; Smith, M. R.; Nastoupil, L. J. Follicular Lymphoma: The Long and Winding Road Leading to Your Cure? *Blood Rev.* **2023**, *57*, 100992. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2022.100992>.
- (21) Riley, R. S.; June, C. H.; Langer, R.; Mitchell, M. J. Delivery Technologies for Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18* (3), 175–196. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>.
- (22) Kubczak, M.; Rogalińska, M. [Evolution of monoclonal antibodies in cancer treatment]. *Postepy Biochem.* **2016**, *62* (4), 518–525.
- (23) Harmsen, M. M.; De Haard, H. J. Properties, Production, and Applications of Camelid Single-Domain Antibody Fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *77* (1), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1142-2>.
- (24) Hamers-Casterman, C.; Atarhouch, T.; Muyldermans, S.; Robinson, G.; Hamers, C.; Songa, E. B.; Bendahman, N.; Hamers, R. Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains. *Nature* **1993**, *363* (6428), 446–448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- (25) Jovčevska, I.; Muyldermans, S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* **2020**, *34* (1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>.
- (26) Bannas, P.; Hambach, J.; Koch-Nolte, F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1603. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603>.
- (27) de Marco, A. Recombinant Expression of Nanobodies and Nanobody-Derived Immunoreagents. *Protein Expr. Purif.* **2020**, *172*, 105645. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105645>.
- (28) Dristant, U.; Mukherjee, K.; Saha, S.; Maity, D. An Overview of Polymeric Nanoparticles-Based Drug Delivery System in Cancer Treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2023**, *22*, 15330338231152083. <https://doi.org/10.1177/15330338231152083>.
- (29) Kooijmans, S. A. A.; Gitz-Francois, J. J. J. M.; Schiffelers, R. M.; Vader, P. Recombinant Phosphatidylserine-Binding Nanobodies for Targeting of Extracellular Vesicles to Tumor Cells: A Plug-and-Play Approach. *Nanoscale* **2018**, *10* (5), 2413–2426. <https://doi.org/10.1039/c7nr06966a>.
- (30) Zhou, Y.; Kopeček, J. Biological Rationale for the Design of Polymeric Anti-Cancer Nanomedicines. *J. Drug Target.* **2013**, *21* (1), 1–26. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.723213>.
- (31) Rani, S.; Gupta, U. HPMA-Based Polymeric Conjugates in Anticancer Therapeutics. *Drug Discov. Today* **2020**, *25* (6), 997–1012. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.04.007>.
- (32) Garbayo, E.; Pascual-Gil, S.; Rodríguez-Nogales, C.; Saludas, L.; Estella-Hermoso de Mendoza, A.; Blanco-Prieto, M. J. Nanomedicine and Drug Delivery Systems in Cancer

- and Regenerative Medicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2020**, *12* (5), e1637. <https://doi.org/10.1002/wnan.1637>.
- (33) *Drug Delivery Systems*. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/drug-delivery-systems-getting-drugs-their-targets-controlled-manner#pid-1241>.
- (34) Tavano, L.; Muzzalupo, R. Multi-Functional Vesicles for Cancer Therapy: The Ultimate Magic Bullet. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *147*, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.060>.
- (35) Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8* (6), 473–480. <https://doi.org/10.1038/nrc2394>.
- (36) Martel, S. Targeting Active Cancer Cells with Smart Bullets. *Ther. Deliv.* **2017**, *8* (5), 301–312. <https://doi.org/10.4155/tde-2016-0088>.
- (37) Wen, R.; Umeano, A. C.; Chen, P.; Farooqi, A. A. Polymer-Based Drug Delivery Systems for Cancer. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2018**, *35* (6), 521–553. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018021124>.
- (38) Ashique, S.; Sandhu, N. K.; Chawla, V.; Chawla, P. A. Targeted Drug Delivery: Trends and Perspectives. *Curr. Drug Deliv.* **2021**, *18* (10), 1435–1455. <https://doi.org/10.2174/1567201818666210609161301>.
- (39) Zhu, Y.-S.; Tang, K.; Lv, J. Peptide-Drug Conjugate-Based Novel Molecular Drug Delivery System in Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2021**, *42* (10), 857–869. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.07.001>.
- (40) Jain, K. K. An Overview of Drug Delivery Systems. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2020**, *2059*, 1–54. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5_1.
- (41) Yu, Z.; Shen, X.; Yu, H.; Tu, H.; Chittasupho, C.; Zhao, Y. Smart Polymeric Nanoparticles in Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (3), 775. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030775>.
- (42) Janrao, C.; Khopade, S.; Bavaskar, A.; Gomte, S. S.; Agnihotri, T. G.; Jain, A. Recent Advances of Polymer Based Nanosystems in Cancer Management. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2023**, *34* (9), 1274–1335. <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2161780>.
- (43) Kanjilal, P.; Singh, K.; Das, R.; Matte, J.; Thayumanavan, S. Antibody Polymer Conjugates (APCs) for Active Targeted Therapeutic Delivery. *Biomacromolecules* **2023**, *24* (8), 3638–3646. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00385>.
- (44) Yang, J.; Zhang, R.; Pan, H.; Li, Y.; Fang, Y.; Zhang, L.; Kopeček, J. Backbone Degradable N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymer Conjugates with Gemcitabine and Paclitaxel: Impact of Molecular Weight on Activity toward Human Ovarian Carcinoma Xenografts. *Mol. Pharm.* **2017**, *14* (5), 1384–1394. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01005>.
- (45) Kopeček, J.; Yang, J. Polymer Nanomedicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *156*, 40–64. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.020>.
- (46) Wang, Z.; Ye, Q.; Yu, S.; Akhavan, B. Poly Ethylene Glycol (PEG)-Based Hydrogels for Drug Delivery in Cancer Therapy: A Comprehensive Review. *Adv. Healthc. Mater.* **2023**, *12* (18), e2300105. <https://doi.org/10.1002/adhm.202300105>.
- (47) Duncan, R.; Vicent, M. J. Do HPMA Copolymer Conjugates Have a Future as Clinically Useful Nanomedicines? A Critical Overview of Current Status and Future Opportunities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (2), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.12.005>.
- (48) Kolate, A.; Baradia, D.; Patil, S.; Vhora, I.; Kore, G.; Misra, A. PEG - a Versatile Conjugating Ligand for Drugs and Drug Delivery Systems. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2014**, *192*, 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.046>.
- (49) Qi, Y.; Chilkoti, A. Protein-Polymer Conjugation-Moving beyond PEGylation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *28*, 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.08.009>.

- (50) Chytil, P.; Kostka, L.; Etrych, T. HEMA Copolymer-Based Nanomedicines in Controlled Drug Delivery. *J. Pers. Med.* **2021**, *11* (2), 115. <https://doi.org/10.3390/jpm11020115>.
- (51) Scales, C. W.; Vasilieva, Y. A.; Convertine, A. J.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. Direct, Controlled Synthesis of the Nonimmunogenic, Hydrophilic Polymer, Poly(N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide) via RAFT in Aqueous Media. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (4), 1846–1850. <https://doi.org/10.1021/bm0503017>.
- (52) Randárová, E.; Kudláčová, J.; Etrych, T. HEMA Copolymer-Antibody Constructs in Neoplastic Treatment: An Overview of Therapeutics, Targeted Diagnostics, and Drug-Free Systems. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2020**, *325*, 304–322. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.040>.
- (53) Wang, Y.; Xia, H.; Chen, B.; Wang, Y. Rethinking Nanoparticulate Polymer-Drug Conjugates for Cancer Theranostics. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2023**, *15* (1), e1828. <https://doi.org/10.1002/wnan.1828>.
- (54) Wadhwa, S.; Mumper, R. J. Polymer-Drug Conjugates for Anticancer Drug Delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2015**, *32* (3), 215–245. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2015010174>.
- (55) Yang, J.; Kopeček, J. Design of Smart HEMA Copolymer-Based Nanomedicines. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2016**, *240*, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.003>.
- (56) Wang, J.; Yang, J.; Kopeček, J. Nanomedicines in B Cell-Targeting Therapies. *Acta Biomater.* **2022**, *137*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.10.024>.
- (57) Říhová, B.; Strohalm, J.; Kubáčková, K.; Jelínková, M.; Hovorka, O.; Kovár, M.; Plocová, D.; Sirová, M.; St'astný, M.; Rozprimová, L.; Ulbrich, K. Acquired and Specific Immunological Mechanisms Co-Responsible for Efficacy of Polymer-Bound Drugs. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2002**, *78* (1–3), 97–114. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00489-8](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00489-8).
- (58) Lizoňová, D.; Majerská, M.; Král, V.; Pechar, M.; Pola, R.; Kovář, M.; Štěpánek, F. Antibody-pHPMA Functionalised Fluorescent Silica Nanoparticles for Colorectal Carcinoma Targeting. *RSC Adv.* **2018**, *8* (39), 21679–21689. <https://doi.org/10.1039/c8ra03487g>.
- (59) Cascioferro, S.; Totsika, M.; Schillaci, D. Sortase A: An Ideal Target for Anti-Virulence Drug Development. *Microb. Pathog.* **2014**, *77*, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.007>.
- (60) Marraffini, L. A.; Dedent, A. C.; Schneewind, O. Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2006**, *70* (1), 192–221. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.192-221.2006>.
- (61) Jacobitz, A. W.; Kattke, M. D.; Wereszczynski, J.; Clubb, R. T. Sortase Transpeptidases: Structural Biology and Catalytic Mechanism. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2017**, *109*, 223–264. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.04.008>.
- (62) Parthasarathy, R.; Subramanian, S.; Boder, E. T. Sortase A as a Novel Molecular “Stapler” for Sequence-Specific Protein Conjugation. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18* (2), 469–476. <https://doi.org/10.1021/bc060339w>.
- (63) Podracky, C. J.; An, C.; DeSousa, A.; Dorr, B. M.; Walsh, D. M.; Liu, D. R. Laboratory Evolution of a Sortase Enzyme That Modifies Amyloid- β Protein. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17* (3), 317–325. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00706-1>.
- (64) Voloshchuk, N.; Liang, D.; Liang, J. F. Sortase A Mediated Protein Modifications and Peptide Conjugations. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2015**, *12* (4), 205–213. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150903115601>.
- (65) Jeong, H.-J.; Abhiraman, G. C.; Story, C. M.; Ingram, J. R.; Dougan, S. K. Generation of Ca²⁺-Independent Sortase A Mutants with Enhanced Activity for Protein and Cell

- Surface Labeling. *PLoS One* **2017**, *12* (12), e0189068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189068>.
- (66) Das, S.; Pawale, V. S.; Dadireddy, V.; Singh, A. K.; Ramakumar, S.; Roy, R. P. Structure and Specificity of a New Class of Ca²⁺-Independent Housekeeping Sortase from *Streptomyces Avermitilis* Provide Insights into Its Non-Canonical Substrate Preference. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (17), 7244–7257. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.782037>.
- (67) Bauer, D.; Sarrett, S. M.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. Click Chemistry: A Transformative Technology in Nuclear Medicine. *Nat. Protoc.* **2023**, *18* (6), 1659–1668. <https://doi.org/10.1038/s41596-023-00825-8>.
- (68) Lallana, E.; Fernandez-Trillo, F.; Sousa-Herves, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. Click Chemistry with Polymers, Dendrimers, and Hydrogels for Drug Delivery. *Pharm. Res.* **2012**, *29* (4), 902–921. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0683-y>.
- (69) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- (70) Beck, S.; Schultze, J.; Räder, H.-J.; Holm, R.; Schinnerer, M.; Barz, M.; Koynov, K.; Zentel, R. Site-Specific DBCO Modification of DEC205 Antibody for Polymer Conjugation. *Polymers* **2018**, *10* (2), 141. <https://doi.org/10.3390/polym10020141>.
- (71) Wu, Y.; Zhu, H.; Zhang, B.; Liu, F.; Chen, J.; Wang, Y.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Wu, L.; Si, L.; Xu, H.; Yao, T.; Xiao, S.; Xia, Q.; Zhang, L.; Yang, Z.; Zhou, D. Synthesis of Site-Specific Radiolabeled Antibodies for Radioimmunotherapy via Genetic Code Expansion. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (10), 2460–2468. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00412>.
- (72) Chopra, A. ⁶⁴Cu-Labeled DOTA-Conjugated Rituximab, a Chimeric Murine/Human Anti-CD20 Monoclonal Antibody. In *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*; National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), 2004.
- (73) Stump, B. Click Bioconjugation: Modifying Proteins Using Click-Like Chemistry. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2022**, *23* (16), e202200016. <https://doi.org/10.1002/cbic.202200016>.
- (74) Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D.; Bairoch, A. ExpPASy: The Proteomics Server for in-Depth Protein Knowledge and Analysis. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (13), 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>.
- (75) *O-Glycosidase Application Note 1 (P0733) | NEB.* <https://www.neb.com/en/protocols/0001/01/01/o-glycosidase-application-note-1-p0733> (accessed 2024-05-24).
- (76) Hejl, M. Příprava polymerního terapeutika cílicího na CD20 pozitivní B lymfomy a NK buňky. **2023**.
- (77) Vaněk, O.; Bezouška, K. Analytická Ultracentrifuga a Její Využití v Biochemické Laboratoři. http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_12_1155-1162.pdf.
- (78) Philo, J. S. SEDNTERP: A Calculation and Database Utility to Aid Interpretation of Analytical Ultracentrifugation and Light Scattering Data. *Eur. Biophys. J. EBJ* **2023**, *52* (4–5), 233–266. <https://doi.org/10.1007/s00249-023-01629-0>.
- (79) Bohdanecky, M.; Bažilová, H.; Kopeček, J. Poly[N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide]—II: Hydrodynamic Properties of Dilute Solutions. *Eur. Polym. J.* **1974**, *10* (5), 405–410. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(74\)90204-3](https://doi.org/10.1016/0014-3057(74)90204-3).
- (80) Schuck, P. Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. *Biophys. J.* **2000**, *78* (3), 1606–1619. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76713-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76713-0).

- (81) Brautigam, C. A. Chapter Five - Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data. In *Methods in Enzymology*; Cole, J. L., Ed.; Analytical Ultracentrifugation; Academic Press, 2015; Vol. 562, pp 109–133. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.05.001>.
- (82) Zhu, Y.; Liu, J.; Wu, J.; Feng, H.; Huang, M.; Lv, H.; Mei, Y.; chen, J.; Pan, Y.; Zhou, Y.; Liu, H. Discovery and Characterization of Hydroxylysine *O*-Glycosylation in an Engineered IL-2 Fusion Protein. *Protein Expr. Purif.* **2023**, *205*, 106244. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2023.106244>.
- (83) Hinneburg, H.; Stavenhagen, K.; Schweiger-Hufnagel, U.; Pengelley, S.; Jabs, W.; Seeberger, P. H.; Silva, D. V.; Wührer, M.; Kolarich, D. The Art of Destruction: Optimizing Collision Energies in Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF) Instruments for Glycopeptide-Based Glycoproteomics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27* (3), 507–519. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1308-6>.
- (84) Cole, J. L.; Lary, J. W.; P. Moody, T.; Laue, T. M. Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. In *Methods in Cell Biology*; Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques; Academic Press, 2008; Vol. 84, pp 143–179. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84006-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84006-4).