

*Bakalářská práce*

**Purifikace monoklonálních protilátek a příprava  
nosiče pro izolaci glutamátcarboxypeptidasy II  
z biologického materiálu**

Jan Parolek

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.



Katedra biochemie

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Výzkumné centrum Gilead Sciences & IOCB

Ústav organické chemie a biochemie

Akademie věd České republiky, v.v.i.

Praha 2013

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

V Praze dne 24. 5. 2013

.....

# Abstrakt

K léčbě benigních i maligních nádorových onemocnění je žádoucí hledat specifitější, méně zatěžující druhy léčby. Jedním z cílů vylepšení metod léčby neoperovatelných nádorů je co nejmenší poškození okolních zdravých tkání při likvidaci nádoru.

Značný pokrok nastal při výzkumu a aplikaci protilátek, jež mohou buňky exprimující určité struktury nejen označit, ale i přímo likvidovat. Nádorové buňky se však od těch zdravých liší jen velmi málo. Tento fakt představuje hlavní problém při léčbě, protože většina látek toxických pro nádor v různé míře negativně ovlivňuje celý organismus. Z tohoto důvodu je nutné hledat nové markery pro léčbu rakovinných onemocnění. Monoklonální protilátky je možné spojit s molekulou léčiva (cytotoxická substance, radionuklid aj.). Vzniklé konjugáty jsou z hlediska léčby nádorů velmi perspektivní, protože protilátka vyhledá cílovou strukturu s velkou specifitou a léčivo může být dodáno lokálně, s minimální zátěží pro organismus pacienta.

Jedním ze specifických markerů nádorových onemocnění prostaty se stala glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII), integrální membránový protein vysoce exprimovaný epiteliálními buňkami karcinomu prostaty. K dalšímu zkoumání GCPII je nutné mít k dispozici dostatečně čisté protilátky.

Monoklonální protilátky proti GCPII s označením GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 byly úspěšně přečištěny pomocí afinitní chromatografie. Imunoprecipitací GCPII z lyzátu buněk tento protein exprimující bylo zjištěno, že jejich afinita vůči GCPII je u tří z nich (GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08) podobná, zatímco GCPII-05 má afinitu mnohem nižší. Protilátky GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 byly dále biotinylovány pomocí specifického biotinylačního činidla. Tato modifikace rozšíří budoucí použití protilátek pro izolaci a identifikaci GCPII v různých tkáních. Metodou ELISA byla ověřena úspěšná biotinylace protilátek a zároveň udržení si jejich schopnosti rozpoznávat nativní GCPII.

*Klíčová slova:*

**GCPII; monoklonální protilátky; konjugáty protilátek; imunoterapie; nádor prostaty.**

# Abstract

For treatment of benign and malignant tumors it is desirable to find more specific and less burdening ways of therapy. The main objective of improving the treatment of inoperable tumors is as low as possible damage to healthy tissues during tumor tissue elimination.

Using antibodies in research and therapy brought significant progress; antibodies are able not to only mark cells expressing certain molecules, but even to eliminate them. However, tumor cells are very similar to healthy cells and this similarity is one of the major problems in treatment of cancer; most of the substances toxic to tumor have also some adverse effect on the whole organism. For this reason, it is necessary to search new tumor-specific markers for treatment of tumor-based diseases. Monoclonal antibodies can be linked with a drug molecule (cytotoxic substance, radionuclide, etc.) and getting antibody-drug conjugate. These conjugates are very promising medicaments for carcinoma treatment because monoclonal antibody can find specific target and drug substance can be delivered locally with minimal harm to patient's organism.

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII) became one of the specific markers for the prostate cancer. GCPII is an integral membrane protein, which is highly expressed by epithelial cells of the prostate carcinoma. To conduct research on GCPII, it is essential to have sufficiently pure antibodies against it.

Monoclonal antibodies against native GCPII labeled as GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 and GCPII-08 were successfully purified using affinity chromatography. Having immunoprecipitated GCPII with these antibodies, we found out that affinities of GCPII-06, GCPII-07 and GCPII-08 towards GCPII are comparable and very good, whereas GCPII-05 binds GCPII poorly. Antibodies GCPII-06, GCPII-07 and GCPII-08 were eventually biotinylated using specific biotinylation reagent. This modification expands future usage of antibodies for detection of GCPII in various tissues. Using the ELISA method, it was confirmed that the biotinylation of the antibodies was successful and affinity to native GCPII was preserved.

(In Czech)

*Key words:*

**GCPII; monoclonal antibody; immunoconjugate; immunotherapy; prostate cancer.**

# Poděkování

Na tomto místě bych v první řadě rád věnoval poděkování svému školiteli Janu Konvalinkovi za přijetí do jeho výzkumného týmu.

Další velký dík patří Tomáši Knedlíkovi za jeho trpělivost při objasňování experimentálních přístupů a za zodpovídání mých otázek k této práci.

Za spolupráci děkuji též Václavu Navrátilovi, který mi pomohl uskutečnit experiment ELISA, a Janu Tykvartovi za pomoc při hledání informací o známých protilátkách proti GCPII.

V neposlední řadě bych rád věnoval poděkování celému kolektivu naší laboratoře za vytváření příjemného prostředí a přátelské atmosféry na pracovišti.

# Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Teoretická část.....	9
2.1.	<i>Glutamátcarboxypeptidasa II</i> .....	9
2.1.1.	Struktura GCPII.....	9
2.1.2.	Fyziologické funkce GCPII.....	10
2.1.3.	Inhibitory GCPII.....	11
2.2.	<i>Protilátky</i> .....	14
2.2.1.	Obecná charakteristika.....	14
2.2.2.	Fyziologické funkce protilátek.....	15
2.2.3.	Protilátky proti GCPII.....	16
2.3.	<i>Klinické využití protilátek</i> .....	17
2.3.1.	Nemodifikované protilátky.....	17
2.3.2.	Cílené dodání látek.....	18
2.3.3.	Konjugáty protilátek proti GCPII.....	19
2.3.3.1.	Protilátky konjugované s radionuklidem určené pro diagnostiku.....	21
2.3.3.2.	Protilátky konjugované s radionuklidem určené pro terapii.....	21
2.3.3.3.	Protilátky konjugované s toxinem.....	22
3.	Cíle práce.....	24
4.	Materiál a metody.....	25
4.1.	<i>Chemikálie a další materiál</i> .....	25
4.2.	<i>Přístroje</i> .....	26
4.3.	<i>Metody</i> .....	27
4.3.1.	Purifikace protilátek z média hybridomů afinitní chromatografií.....	27
4.3.2.	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za redukujících a denaturujících podmínek (SDS-PAGE).....	28
4.3.3.	Barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu.....	29
4.3.4.	Dialýza.....	30
4.3.5.	Koncentrování roztoků protilátek.....	30
4.3.6.	Měření koncentrace proteinů podle Bradfordové.....	31
4.3.7.	Biotinylace protilátek.....	31
4.3.8.	Stanovení koncentrace nemodifikovaných i biotinylovaných protilátek metodou ELISA.....	32
4.3.9.	Stanovení koncentrace protilátek ve všech frakcích purifikace metodou ELISA.....	33

4.3.10.	Imunoprecipitace GCPII pomocí purifikovaných myších protilátek specifických pro GCPII .....	34
4.3.11.	Elektropřenos proteinů na nitrocelulosovou membránu (Western blot) s následnou imunodetekcí .....	35
4.3.12.	Uchování přečištěných protilátek.....	36
5.	Výsledky .....	37
5.1.	Purifikace protilátek proti GCPII afinitní chromatografií .....	37
5.2.	Biotinylace protilátek proti GCPII .....	42
5.3.	Stanovení citlivosti protilátek metodou ELISA .....	42
5.4.	Imunoprecipitace GCPII monoklonálními protilátkami.....	43
6.	Diskuze .....	44
7.	Závěr.....	47
8.	Seznam zkratk.....	48
9.	Seznam použité literatury .....	50

# 1. Úvod

K léčbě benigních i maligních nádorových onemocnění je žádoucí hledat specifičtější, méně zatěžující druhy léčby. Do nedávné doby byli pacienti s nádorovými onemocněními léčeni pouze operativně, radioterapií, chemoterapií nebo kombinací těchto metod. Radioterapií se léčí zhoubné nádory citlivé na záření (např. lymfomy a karcinom prostaty). Chemoterapie se provádí většinou intravenózně, pomocí látek velmi toxických, postihujících mimo nádorových buněk celý organismus. Jedním z cílů vylepšení metod léčby neoperovatelných nádorů je co nejmenší poškození okolních zdravých tkání při likvidaci nádoru.

Značný pokrok nastal při výzkumu a aplikaci protilátek, které mohou buňky exprimující určité struktury nejen označit, ale i přímo likvidovat. Pro identifikaci nádorových buněk protilátkami je nezbytné hledat specifické značky (markery), přítomné na buněčné membráně. Nádorové buňky se však od zdravých buněk liší jen velmi málo; stále se jedná o buňky z původního organismu a proteiny vyskytující se na jejich povrchu jsou ve většině případů proteiny tělu vlastní. Tento fakt představuje hlavní problém při výzkumu, protože většina látek toxických pro nádor v různé míře negativně ovlivňuje celý organismus.

Jedním ze specifických markerů se stala glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII), integrální membránový protein vysoce exprimovaný epiteliálními buňkami karcinomu prostaty. U rakoviny prostaty se v medicíně již řadu let k diagnóze používá monoklonální protilátka 7E11-C5.3 značená radionuklidem india <sup>111</sup>In, známá pod obchodním názvem *ProstaScint*.

V počátcích výzkumu GCPII se používala výhradně monoklonální protilátka 7E11-C5.3, jež váže intracelulární část tohoto proteinu a detekuje tedy jen buňky poškozené či mrtvé. Následně byly vyvinuty protilátky vážící extracelulární část GCPII – tyto protilátky jsou již použitelné i *in vivo* k detekci živých buněk s GCPII nebo k cílenému dodání léčiv do místa účinku (buňky nádoru).

Monoklonální protilátky je možné spojit s molekulou léčiva (cytotoxická substance, radionuklid aj.). Tyto konjugáty jsou z hlediska léčby nádorů velmi perspektivní, neboť protilátka vyhledá cílovou strukturu s velkou specifitou a léčivo je dodáno lokálně, s minimální zátěží pro organismus pacienta.



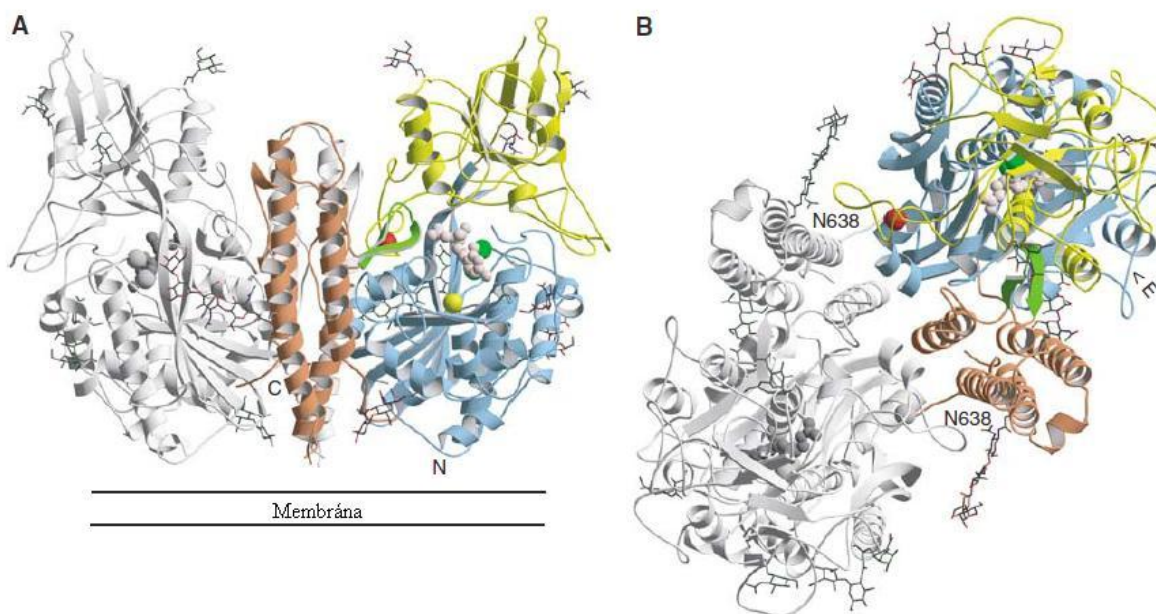
## 2. Teoretická část

### 2.1. *Glutamátcarboxypeptidasa II*

#### 2.1.1. Struktura GCPII

Glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII; EC 3.4.17.21), nazývaná též PSMA (z anglického označení *prostate specific membrane antigen*) nebo folát hydrolasa, je transmembránový protein II. typu. Tato homodimerní zinková metalopeptidasa má molekulovou hmotnost přibližně 100 kDa [1, 2]. Gen pro GCPII se nazývá *FOLH1* a je umístěn na 11. chromozomu [3].

Intracelulární část GCPII je tvořena 19 aminokyselinami, transmembránová část se skládá z 24 aminokyselin a extracelulární část proteinu má 707 aminokyselin [4]. Protein je posttranslačně upraven deseti *N*-glykosylacemi (až 25 % hmotnosti); tyto *N*-glykosylace jsou nezbytné nejen pro správné sbalení GCPII, ale i pro její enzymovou funkčnost [4, 5]. Trojrozměrná struktura GCPII získaná při rentgenostrukturní analýze krystalu enzymu je zobrazena na **obrázku 1**.



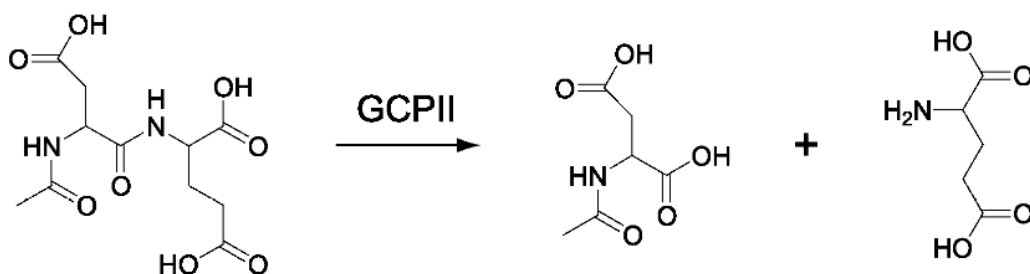
**Obrázek č. 1: Trojrozměrná struktura homodimeru glutamátcarboxypeptidasy II.** Jedna podjednotka dimeru je vybarvena šedě, druhá barevně. Dvě zelené kuličky představují zinečnaté kationty, červená kulička vápenatý kationt a žlutá kulička chloridový aniont. Část A znázorňuje zakotvení a orientaci proteinu v buněčné membráně; C- resp. N-konec proteinu je označen písmenem C, resp. N. Část B zobrazuje GCPII shora, písmeno E značí vstup k aktivnímu místu enzymu (*převzato z [1], kód PDB: 2C6C*).

### 2.1.2. Fyziologické funkce GCPII

U GCPII byly dosud identifikovány dvě enzymatické aktivity. První spočívá ve štěpení *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG) [6, 7], druhá funkce je štěpení folyl-poly- $\gamma$ -glutamátu [8]. U člověka se GCPII vyskytuje nejvíce v prostatě, centrální i periferní nervové soustavě, tenkém střevě a v ledvinách [9].

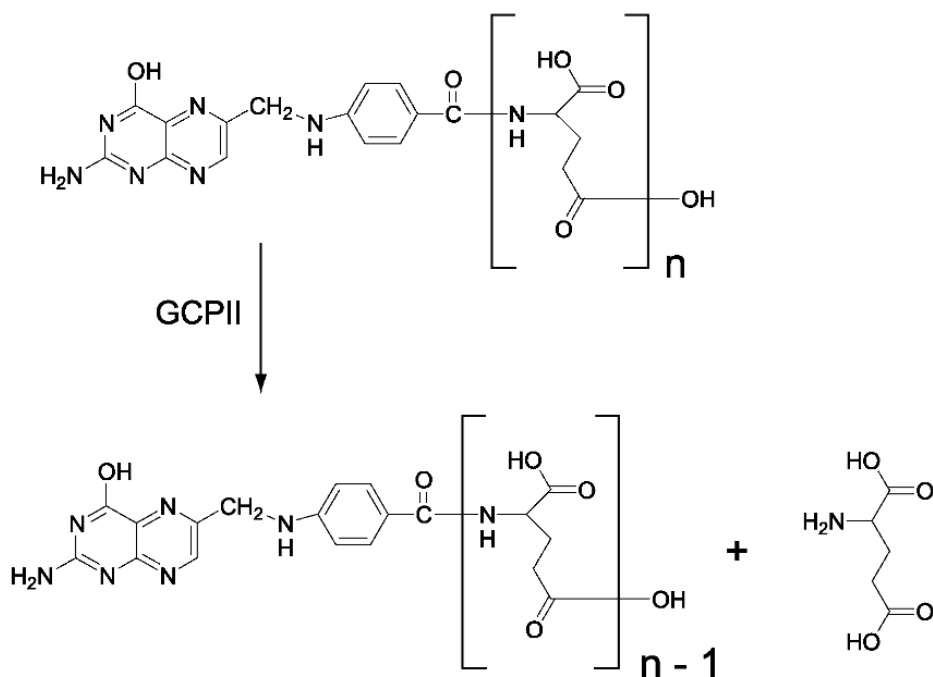
Funkce GCPII ve zdravé prostatě není známa, doposud nebyl identifikován žádný její substrát. V případě karcinomu prostaty je exprese GCPII značně zvýšená, tento jev zatím nebyl uspokojivě vysvětlen [10]. Exprese GCPII je u maligního nádoru prostaty podstatně vyšší než u nádoru benigního; GCPII tedy může sloužit i jako ukazatel agresivity karcinomu [11].

V nervové soustavě hraje GCPII důležitou roli, hydrolyzuje neurotransmitter NAAG za vzniku L-glutamátu a *N*-acetyl-L-aspartátu [7]. Přílišná aktivita GCPII může vést k excitotoxickému projevu nadbytku vznikajícího glutamátu v okolí neuronů. Excitotoxicita vede k poškození či dokonce úhynu nervových buněk; inhibicí GCPII je možné léčit chorobné stavy mající souvislost s toxickým nadbytkem glutamátu [12]. **Obrázek 2** popisuje štěpení NAAG.



**Obrázek č. 2: Hydrolýza neurotransmiteru NAAG pomocí GCPII.** V mozku se štěpí NAAG za vzniku dalšího neurotransmiteru glutamátu. Zvýšená aktivita GCPII a následný nadbytek glutamátu může vést k excitotoxickému poškození tkáně.

Funkce GCPII v tenkém střevě spočívá v hydrolýze folyl-poly- $\gamma$ -glutamátu. Odštěpením glutamátu z folyl-poly- $\gamma$ -glutamátu dochází k absorpci folátu buňkami střevního epitelu z tráveniny [8]. Štěpení folyl-poly- $\gamma$ -glutamátu je zobrazeno na **obrázku 3 (str. 11)**.



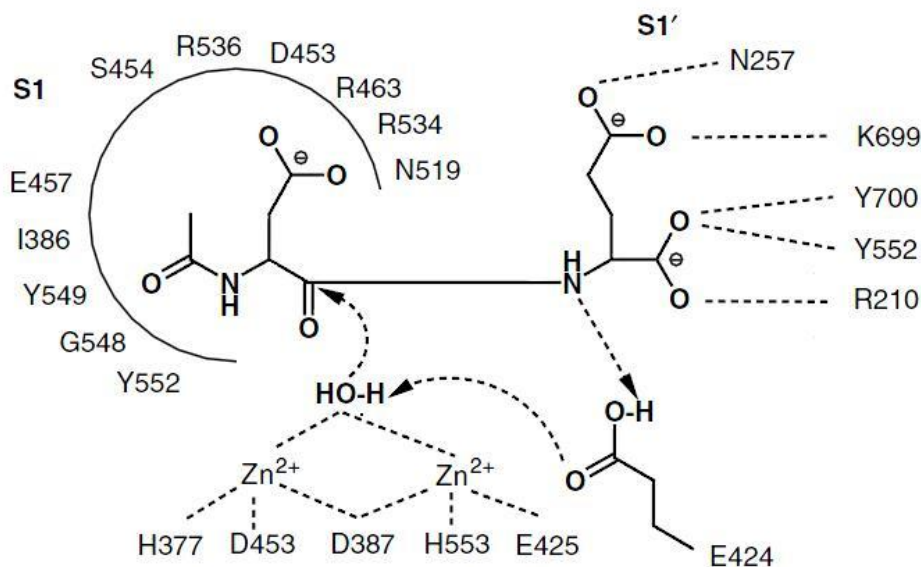
**Obrázek č. 3: GCPII hydrolyzuje peptidovou vazbu folyl-poly- $\gamma$ -glutamátu.** V tenkém střevě tímto procesem vzniká volný folát z jeho polyglutamoylované formy. Volný folát je již ve střevu absorbovatelný.

Podstatnou funkci může mít GCPII při angiogenezi (růstu nových krevních kapilár). Myši s vyřazenou funkcí genu kódujícího GCPII mají hůře vyvinuté kapiláry ve srovnání s kontrolní skupinou myši geneticky neovlivněných [13]. Vysoká exprese GCPII byla též identifikována v neovaskulatuře různých pevných nádorů (plic, tlustého střeva, prsu aj.), nikoliv však v nádoru samotném [14, 15]. V cévách zdravých tkání a orgánů GCPII zaznamenána nebyla [15].

Modelem pro studování GCPII se stala linie buněk odvozená od metastáz karcinomu prostaty v lymfatických uzlinách s označením LNCaP (z anglického *lymph node carcinoma of the prostate*), tyto buňky vysoce exprimují GCPII [16].

### 2.1.3. Inhibitory GCPII

Znalost substrátové specifity GCPII napomohla k vývoji dvou hlavních druhů inhibitorů, derivátů glutamátu a analog NAAG [17]. Schematické zobrazení aktivního místa s navázaným NAAG je na **obrázku 4 (str. 12)**.



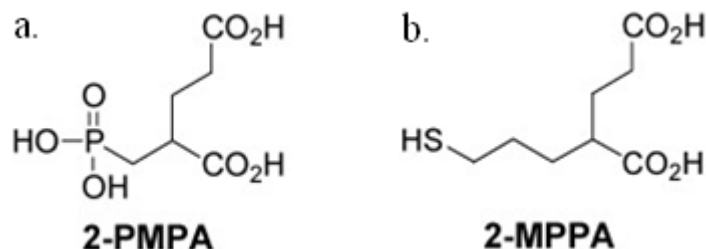
**Obrázek č. 4: Schematické znázornění aktivního místa GCPII s navázaným *N*-acetyl-*L*-aspartyl-*L*-glutamátem.** S1 značí kapsu vázající *N*-acetyl-*L*-aspartát a S1' označuje místo vázající glutamát. Glutamát 424 na obrázku vpravo dole je klíčový pro acidobazickou katalýzu. Postranní řetězce aminokyselin v dolní části obrázku koordinují dva zinečnaté kationty, které jsou navíc přemostěny molekulou vody. Glutamát 424 deprotonizuje vodu navázanou mezi dvěma  $Zn^{2+}$ , vzniklý OH<sup>-</sup> nukleofilně napadá karbonylový uhlík aspartátového zbytku a peptidová vazba mezi aspartátem a glutamátem se hydrolyzuje. Glutamát 424 dále odevzdá přijmutý proton aminové skupině odstupujícího glutamátu, čímž se regeneruje (*podle* [1]).

Inhibice GCPII má neuroprotektivní účinky, neboť snižuje množství glutamátu v okolí neuronů. Tento poznatek otevřel cestu k léčbě patologických stavů způsobených zvýšenou koncentrací glutamátu v oblasti nervových synapsí. Vysoká koncentrace glutamátu způsobuje permanentní aktivaci především receptoru pro *N*-methyl-*D*-aspartát, což na neurony působí excitotoxicky [12].

Inhibice GCPII při mozkové mrtvici významně snižuje poškození způsobené tímto stavem [18, 19]. U myši s vyřazenou funkcí genu *Folh1* bylo zaznamenáno nižší poškození mozku při navozené ischemii ve srovnání s kontrolní skupinou geneticky neovlivněných myši [20]. Blokování funkce GCPII dále snižuje neuropatickou bolest a zpomaluje projevy závažného neurodegenerativního onemocnění amyotrofické laterální sklerózy [21, 22].

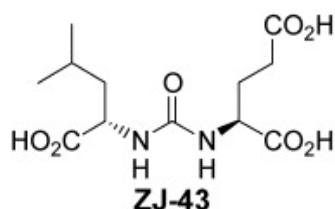
Inhibičně nejúčinnější deriváty glutamátu jsou ty, které se váží na  $Zn^{2+}$  v aktivním místě enzymu. Kyselina 2-(fosfonomethyl)pentandiová (2-PMPA; **obr. 5a, str. 13**), chelatující  $Zn^{2+}$  pomocí fosfonátové skupiny je nejpoužívanější inhibitor GCPII ( $K_i = 0,3$  nM). Thiolový derivát glutamátu, kyselina 2-(3-merkaptopropyl)pentandiová (2-MPPA; **obr. 5b, str. 13**;

$K_i = 90 \text{ nM}$ ), má výhodu orální dostupnosti; je v porovnání s 2-PMPA lipofilní a prostupuje samovolně střevní stěnou do krve, a posléze zčásti i hematoencefalitickou bariérou [23].



**Obrázek č. 5: Inhibitory GCPII odvozené od struktury glutamátu.** Na obrázku 5a je zobrazen strukturní vzorec hydrofilní kyseliny 2-(fosfonomethyl)pentandiové a na obrázku 5b je zobrazen vzorec lipofilní kyseliny 2-(3-merkaptopropyl)pentandiové.

Inhibitory patřící do skupiny látek strukturně připomínající NAAG jsou nejčastěji sloučeniny s nehydrolyzovatelnou peptidovou vazbou (peptidomimetika), založené na močovině. Typickým představitelem této skupiny je ZJ-43, kyselina (N-[[[(1S)-1-karboxy-3-methylbutyl]amino]karbonyl]-L-glutamová) ( $K_i = 0,8 \text{ nM}$ ) [23]. Strukturní vzorec ZJ-43 je uveden na **obrázku 6**.



**Obrázek č. 6: Peptidomimetické inhibitory GCPII.** Inhibitor ZJ-43 je odvozen od močoviny a glutamátu a patří do skupiny inhibitorů s nehydrolyzovatelnou peptidovou vazbou.

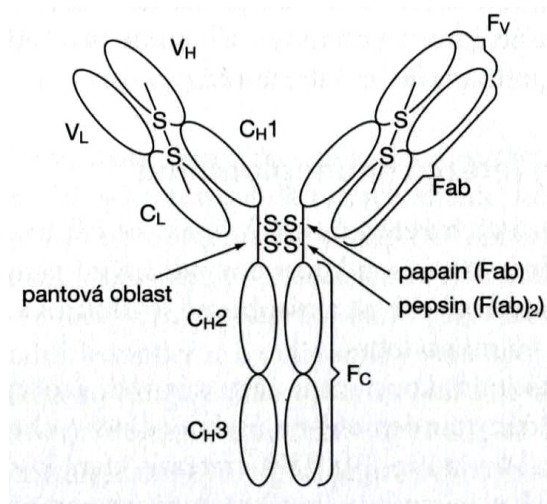
## 2.2. Protilátky

### 2.2.1. Obecná charakteristika

Protilátky (Ab; z anglického *antibody*) jsou imunoglobuliny, tvořící základ mechanismů specifické imunitní odpovědi obratlovců. Představují rozmanitou skupinu látek obsažených v krevním séru, různých tělních tekutinách a na povrchu B-lymfocytů (v podobě B-buněčného receptoru). V organismech jsou rozpustné protilátky produkovány B-lymfocyty [24, 25].

Tyto glykoproteiny se skládají ze dvou identických těžkých řetězců (H; z anglického *heavy*) a dvou identických lehkých řetězců (L; z anglického *light*). Dva těžké řetězce jsou kovalentně spojené dvěma disulfidickými můstky (**obrázek 7**). Ke každému těžkému řetězci je připojený disulfidickou vazbou jeden řetězec lehký; jeden lehký řetězec je složen ze dvou imunoglobulinových domén. Molekulová hmotnost těžkého řetězce je ~50 kDa a lehkého řetězce ~25 kDa, celá molekula protilátky je tedy velká zhruba 150 kDa [26, 27].

Ve struktuře každé IgG protilátky je obsažen úsek s disulfidickými můstky, ve kterém lze protilátku rozštěpit proteasou papainem na fragmenty Fab a F<sub>C</sub>. Tato vlastnost je velmi užitečná při práci s monoklonálními protilátkami, vznikají totiž monovalentní fragmenty. Fragmenty Fab a F<sub>C</sub> lze dále zkoumat, např. stanovit jejich strukturu pomocí rentgenové krystalografie [27].



**Obrázek č. 7: Schematický náčrt IgG.** V<sub>H</sub> a V<sub>L</sub> představují variabilní vazebné domény na N- koncích protilátek, domény C<sub>L</sub>, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 a C<sub>H</sub>3 jsou konstantní. Variabilní domény vytváří dohromady místo, které váže epitop antigenu. Šipky naznačují specifické štěpení papainem, resp. pepsinem (*převzato z [26]*).

Domény umístěné na N-konci L a H řetězců s označení  $V_L$  a  $V_H$  jsou variabilní, protilátka se jimi váže na příslušný antigen. Dva geneticky různé B-lymfocyty se liší právě strukturou variabilních domén [27]. Další domény protilátek jsou konstantní ( $C_L$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  a  $C_{H3}$ ), jejich struktura je u řetězců téhož typu téměř neměnná. Oblast konstantních domén těžkých řetězců  $C_{H2}$  a  $C_{H3}$  se označuje jako  $F_C$  fragment. Tato oblast slouží k interakci s  $F_C$  receptory leukocytů;  $F_C$  fragment zprostředkovává efektorové funkce protilátek [25, 26].

Tzv. “pantová“ oblast poskytuje N-koncům protilátky značnou flexibilitu. Na jedné molekule protilátky jsou dvě místa pro vazbu s antigeny, “pantová“ oblast usnadňuje vazbu obou vazebných domén zároveň (např. opakující se molekuly antigenů na povrchu patogenů) [26, 27]. Při určité koncentraci antigenu usnadňuje flexibilní oblast tvorbu polymerních imunokomplexů.

Protilátky se řadí do několika strukturních tříd (izotypů); u člověka je popsáno pět izotypů imunoglobulinů: *IgG*, *IgM*, *IgA*, *IgD* a *IgE*. Tyto izotopové formy se od sebe liší nejen složením těžkého řetězce, ale i počtem imunoglobulinů v jedné molekule. *IgG*, *IgD* a *IgE* tvoří bivalentní monomery, *IgA* tetraivalentní dimery a *IgM* dekaivalentní pentamery [27].

Sílu vazby protilátky na epitop popisuje afinita a avidita. Afinita, reciproká hodnota disociační konstanty, se vztahuje na interakci jedné vazebné domény na epitop. Avidita shrnuje pevnost vazby celé molekuly protilátky, tedy vazbu všech dílčích vazebných domén na epitopy. Izotyp *IgM* má teoreticky pětikrát vyšší aviditu než izotyp *IgG*. Například vazba *IgM* na bakteriální povrch s repetitivním obsahem antigenu je velmi silná, přestože afinita jednotlivých vazebných domén k epitopům může být nízká [26].

### **2.2.2. Fyziologické funkce protilátek**

Protilátky jsou tvořeny imunitním systémem při odpovědi na cizorodé molekuly (např. na povrchu patogenů). Interakce protilátky s příslušným antigenem má sice nekovalentní charakter, ale přesto je tato vazba velmi pevná (díky množství vodíkových můstků, iontových a hydrofobních interakcí) [26].

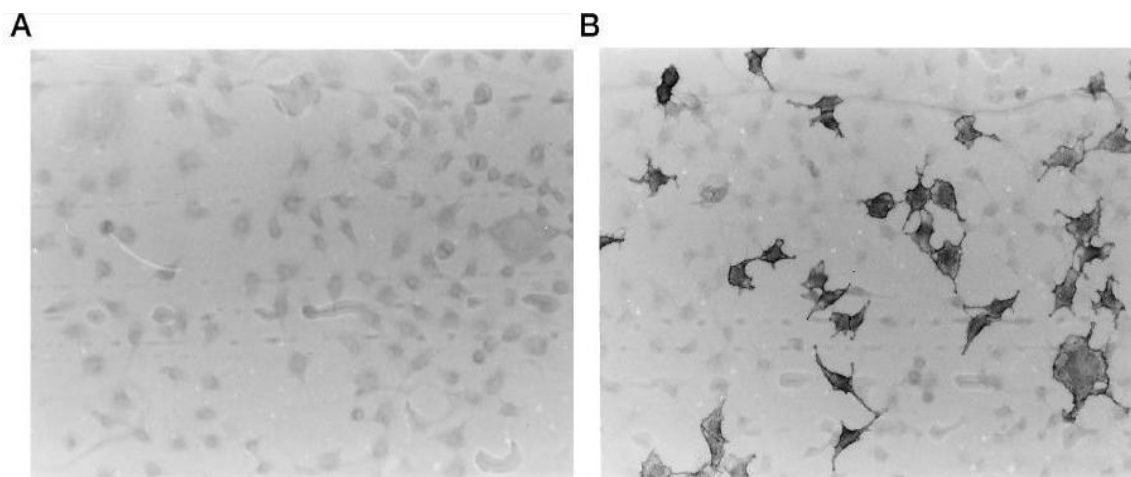
V organismu slouží k označení antigenu, jeho inaktivaci nebo k jeho destrukci aktivací komplementu. Označení antigenu (opsonizace) je potřebné k rozpoznání antigenu dalšími složkami imunitního systému a jeho následné eliminaci. U různých antigenů je důležitá včasná inaktivace; navázaná protilátka znemožní jejich fungování (např. tetanospasmin). Protilátky navázané na povrch patogenů (např. viru) též zabraňují jeho adhezi na hostitelské buňky [24, 26].

### 2.2.3. Protilátky proti GCPII

V současné době existuje množství protilátek proti GCPII, které mají v klinické a laboratorní praxi široké spektrum využití. Protilátky se mohou dělit podle toho, zda se váží na nativní nebo zdenaturovaný protein. Další rozdělení může být, zda se protilátka váže na intracelulární či extracelulární část proteinu.

První monoklonální protilátka proti GCPII, označená jako 7E11-C5.3, byla připravena imunizací myši preparátem z lidských buněk karcinomu prostaty (LNCaP), jež vysoce exprimují GCPII) [16, 28]. Značnou nevýhodou této monoklonální protilátky je fakt, že rozpoznává epitop v intracelulární doméně GCPII [28]. Touto protilátkou je možné detekovat pouze buňky zcela nebo částečně rozpadlé, mající tak epitop přístupný protilátce [9, 29]. I přes tuto skutečnost se protilátka 7E11-C5.3 stala prvním užitečným nástrojem k detekci GCPII (*ProstaScint*) a dala možnost dalšímu zkoumání tohoto proteinu.

Monoklonální protilátky proti GCPII s označením J591, J415, J533 a E99 rozpoznávají epitop v extracelulární části proteinu a jsou tedy použitelné i na živé buňky [14]. U protilátky J591 byly nahrazeny myší sekvence proteinu lidskými sekvencemi, čímž ji lidský imunitní systém toleruje již velmi dobře [9, 14]. Patrný rozdíl mezi imunodetekcí GCPII protilátkami 7E11-C5.3 a J591 je viditelný na **obrázku 8**.



**Obrázek č. 8: Imunodetekce GCPII na povrchu živých buněk LNCaP.** Vlevo (A) byla GCPII vizualizovaná protilátkou 7E11-C5.3 (intracelulární epitop). Vpravo (B) se protilátka J591 váže na extracelulární část GCPII na membráně živých buněk s velkou účinností (*převzato z [9]*).



Monoklonální protilátku s označením 3E6 dodává německá firma DAKO. Jedná se o jednu z nejčastěji používaných a komerčně dostupných protilátek proti GCPII. Je využívána obvykle pro imunodetekci GCPII v histologických vzorcích; výsledek vyšetření může sloužit ke stanovení agresivity nádoru. Protilátka byla připravena imunizací myši denaturovanou GCPII z membrán buněk LNCaP [30].

Protilátky označené jako GCPII-02 a GCPII-04 jsou připravené byly připraveny imunizací myši rekombinantní lidskou GCPII (s aminokyselinovou sekvencí 44-750 endogenní GCPII). Tyto dvě protilátky se ukázaly být při imunodetekci GCPII v porovnání s protilátkou 7E11-C5.3 jako efektivnější [31].

Neméně významné jsou též protilátky vyvinuté skupinou Dr. Ursuly Elsässer-Beile. Protilátky označované jako K7, K12 a D20 byly připraveny imunizací myši denaturovanou GCPII. Další protilátky s označením 3E/17, 3F/11, a 3A/12 byly připraveny imunizací myši nativní GCPII pocházející z lyzátu buněk LNCaP [32].

## **2.3. *Klinické využití protilátek***

### **2.3.1. Nemodifikované protilátky**

Monoklonální protilátky našly využití nejen při množství laboratorních metod *in vitro* (např. ELISA, imunohistochemie aj.), ale i v mnoha metodách *in vivo* (farmaka, diagnostika aj.). Intravenosně podané protilátky našly již použití při léčbě chorobných stavů, kdy mají defektní buňky na svém povrchu různé neobvyklé/unikátní molekuly. Po navázání protilátky na tuto molekulu je nežádoucí buňka označena pro eliminaci imunitním systémem nebo je původní funkce cílové molekuly deaktivována [26]. V současnosti je již k dispozici velké množství schválených a klinicky využívaných monoklonálních protilátek využívaných při léčbě různých onemocnění. Nejdůležitější pokrok imunoterapie je u léčby maligních B-lymfomů. Léčbu pomocí monoklonálních protilátek je výhodné kombinovat s klasickými chemoterapeutiky, čímž se zvyšuje účinnost léčby [33, 34]. V následujících odstavcích je uvedeno několik příkladů neupravených monoklonálních protilátek používaných v medicíně.

Jedna z prvních monoklonálních protilátek schválená pro klinické použití, s názvem **Rituximab**, se váže na cytokin CD20 vyskytující se na povrchu B lymfocytů. Funkce tohoto proteinu není zcela vysvětlena. Po navázání protilátky na CD20 cílových buněk nastává buněčná smrt třemi možnými mechanismy [35]:

1. buňkami zprostředkovanou cytotoxicitou závislou na protilátce
2. aktivací komplementu
3. z nevyjasněných důvodů se samovolně při inhibici CD20 protilátkou spouští apoptosa

Používá se při různorodých patogenních stavech, které mají příčinu ve špatně fungujících, nadměrně aktivních nebo přemnožených B lymfocytech (leukémie, lymfomy, odmítnutí transplantátu aj.). Existence a funkce dalších buněk imunitního systému není ovlivněna [36, 37].

**Alemtuzumab** se váže na glykoprotein CD52 vyskytující se na povrchu všech zralých lymfocytů. Po opsonizaci touto protilátkou jsou buňky posléze zlikvidovány imunitním systémem. Tímto farmakem lze léčit určité druhy leukémií, lymfomů i autoimunitních onemocnění. Značná nevýhoda léčby tímto preparátem je likvidace všech dospělých lymfocytů, což má za následek zvýšené riziko přidružených infekčních chorob [37-39].

Při léčbě karcinomu tlustého střeva jsou využívány **Cetuximab** a **Panitumumab**, jež se váží na receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR; z anglického *epidermal growth factor receptor*). Opsonizace cílových buněk pro likvidaci imunitním systémem je ale minoritní účinek těchto protilátek, jejich hlavní mechanismus účinku tkví v inhibici tohoto receptoru; inhibice EGRF má za následek zastavení růstu karcinomu [40, 41].

Hlavním problémem při používání monoklonálních protilátek a jejich konjugátů jako farmak je jejich velká molekulová hmotnost ~150 kDa, což je zhruba 150krát více než klasická cytostatika. Velká molekulová hmotnost má za následek pomalou distribuční kinetiku a nízké pronikání protilátek do tkání nádoru, zvláště u nádorů velkých nebo málo vaskularizovaných. Tyto faktory určují optimální působnost protilátek pro metastazující buňky cirkulující v krvi [33, 42].

### **2.3.2. Cílené dodání látek**

Současná filozofie léčby nádorových onemocnění je, že rychle dělící se buňky jsou více náchylné na různé preparáty (cytostatika) v porovnání s buňkami zdravými [43]. Pacientům se systémově podávají cytostatická chemoterapeutika (cis-platina, cyklofosfamidy, doxorubicin

aj.), ve snaze dosáhnout zastavení růstu buněk karcinomu. Tento způsob léčby s sebou však nese značné množství obtíží pro pacienta, protože cytostatika působí toxicky i na zdravé, přirozeně se dělicí buňky (epitely gastrointestinálního traktu, kostní dřeň aj.). Z tohoto důvodu je velmi žádoucí vylepšovat specifitu léčiv, a tím omezit oblast účinku jen na nádorové buňky [44].

Hlavní myšlenka cíleného dodání látek spočívá ve spojení léčiva s nosičem. Nosič slouží nejen k nalezení a dodání léčiva do cíle, ale i k udržování léčiva v neaktivní formě do té chvíle, dokud se nedostane do místa účinku. Jako nosič lze použít např. monoklonální protilátku, jež se naváže na specifickou molekulu na buněčném povrchu. Buňka v optimálním případě komplex internalizuje; změněné podmínky uvnitř buňky (zvýšené pH, působení proteas aj.) uvolní molekulu léčiva z protilátky [44].

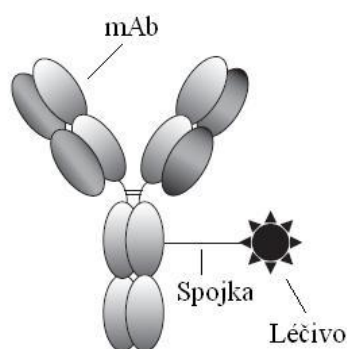
Další látky použitelné jako nosiče léčiv jsou například inhibitory cílových molekul, spojené s léčivem obvykle kovalentní vazbou. Mechanismus působení je podobný jako u protilátek; ideální situace nastává, když se komplex enzymu s inhibitorem internalizuje, dostává se do endosomů, a posléze do intracelulárního prostoru. Léčivo (např. maytansinoid [45]) je aktivováno odštěpením od struktury inhibitoru. Jedním z výhodných nosičů je folát. Kyselina listová kovalentně spojená s léčivem je do buňky transportována endocytózou pomocí folátového receptoru, následné podmínky v lysosomu umožní odštěpení a aktivaci léčiva. Vysoká exprese folátového receptoru je spjata s nádorovou tkání; folát je esenciální pro buněčné dělení [45, 46].

V případě GCPII je možné propojit její inhibitory s různými cytotoxickými komponentami. Propojení peptidomimetických inhibitorů s doxorubicinem lze získat relativně selektivní léčiva s vysokou efektivitou, na buněčné kultury LNCaP účinkující již v nanomolárních koncentracích [47]. Spojením nízkomolekulárního inhibitoru s molekulou chelatující  $Fe^{3+}$  lze získat diagnostické farmakum, jež se specificky váže na buňky exprimující GCPII; železité kationty lze posléze detekovat pomocí nukleární magnetické rezonance. Oblast výskytu nádoru lze určit bez pomoci radioaktivity, a tedy s menší zátěží pro organismus pacienta [48].

### **2.3.3. Konjugáty protilátek proti GCPII**

Hlavní důvod pro výzkum a vývoj konjugátů monoklonálních protilátek pro protinádorovou terapii je ten, že efektivita léčby nemodifikovanými protilátkami je poměrně

nízká; protilátka může např. blokovat funkci cílové molekuly, ale sama o sobě toxická pro buňku není. Přímá cytotoxicita je omezena jen na další složky imunitního systému (aktivace komplementu a buňkami zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátce) [26]. Východiskem se staly monoklonální protilátky konjugované s léčivem (ADC; z anglického *antibody drug conjugate*), schematicky znázorněné na **obrázku 9**. „Ozbrojením“ protilátky vhodnou efektorovou složkou (cytotoxin, cytostatika, radionuklid, cytokin aj.) lze získat účinný terapeutický nástroj s vysokou specifitou [33]. Při navrhování ADC je potřeba zvážit druh použité protilátky, účinnost a mechanismus účinku, cílovou strukturu (antigen) a spojku protilátky a léčiva.



**Obrázek č. 9: Schéma struktury ADC.** Monoklonální protilátka je vybavena efektorovou molekulou léčiva. Chemická spojka musí být stabilní mimo oblast účinku, avšak při dosažení cílové struktury musí léčivo z protilátky uvolnit (*upraveno podle* [49]).

V případě GCPII byl důležitý objev její poměrně agilní internalizace [50]. Internalizace GCPII probíhá pomocí váčků obalených klathrinem a podmiňuje ji internalizační signál MWNLL v intracelulární části proteinu [51]. Tohoto faktu lze využít při cílené dodávce léčiv: po navázání ADC na GCPII a následné internalizaci se z váčku stane pozdní endosom. Uvnitř vezikulu se sníží pH, působí různé peptidasy a změní se i oxidoredukční potenciál prostředí [27]. Všechny tyto fyzikálně-chemické změny lze využít pro uvolnění a aktivaci navázaného léčiva z ADC do nitra buňky. Léčiva jsou obvykle cytotoxiny, způsobující apoptosu. Limitující faktor léčby pomocí ADC je také četnost antigenu na buněčném povrchu, čím nižší je četnost antigenu na povrchu cílové buňky, tím větší jsou požadavky na toxicitu a efektivitu léčiva [49].

Je nezbytné, aby byly ADC mimo endosomy velmi stabilní; nesmí se samovolně hydrolyzovat ani jinak degradovat ve fyziologickém prostředí a uvolňovat tak léčivo mimo oblast účinku [52]. Tento požadavek lze splnit zvolením vhodné struktury vazby spojující léčivo s protilátkou. Při konjugaci protilátky s léčivem byly již úspěšně použity lysosomálně štěpitelné spojky maleimidohexanoátové, dipeptidové (např. valin-citrulin) i disulfidové [53, 54]. Na molekulu protilátky je léčivo napojeno v oblasti těžkého řetězce, aby neinterferovalo s vazebnou doménou na N-koncích protilátky. Na těžké řetězce se chemické spojky obvykle váží buď na postranní zbytky cysteinu nebo lysinu [54, 55].

### **2.3.3.1. Protilátky konjugované s radionuklidem určené pro diagnostiku**

*ProstaScint* představuje první schválené a medicíně využití konjugátů monoklonální protilátky proti GCPII. Základem tohoto farmaka je protilátka 7E11-C5.3 rozeznávající intracelulární epitop GCPII; na protilátku je přes peptidovou chelatační spojku navázán radionuklid  $^{111}\text{In}$  [56]. Při intravenózní aplikaci *ProstaScintu* se oblast karcinomu zobrazuje pomocí jednofotonové emisní tomografie. Toto imunoscintigrafické vyšetření odhalí metastázy adenokarcinomu prostaty [57].

Konjugát protilátky J591 s  $^{111}\text{In}$  představuje pokročilejší variantu preparátu *ProstaScint*; J591 rozpoznává extracelulární část GCPII [58]. Důsledkem rozpoznávání extracelulární části GCPII je větší citlivost, jsou jí detekovány živé buňky (v porovnání s *ProstaScintem*). V organismu detekuje buňky s vysokou expresí GCPII o mnoho lépe než *ProstaScint* [59, 60].

### **2.3.3.2. Protilátky konjugované s radionuklidem určené pro terapii**

Radioimunoterapie je procedura, při níž se pacientovi podá monoklonální protilátka konjugovaná s radioaktivní částicí ( $\beta$  nebo  $\gamma$ -zářičem). Tato cílená radioterapie umožňuje dodat značnou dávku radioaktivity přesně do místa účinku, šetříc zdravou tkáň. GCPII se jeví jako optimální specifický cíl pro radioimunoterapii, neboť její vysoká exprese na buněčném povrchu je úzce spjata s nádorovou tkání. Karcinom prostaty je navíc na ozařování velmi citlivý [60].

Jako  $\beta$ -zářiče pro terapeutické účely bývají nejčastěji používány isotopy  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  aj. Jejich fyzikální vlastnosti určují optimální terapeutické použití; pro různé druhy nádoru se hodí odlišné radionuklidy. Nejdůležitější vlastnosti při výběru jsou jeho poločas rozpadu, celkové množství vyzařené energie (množství  $\beta$  jader a elektronů) a množství energie

vyzářené za jeden den. Výhoda různorodých fyzikálních vlastností je například optimalizace rozsahu oblasti účinku: minimální průměr účinku má  $^{33}\text{P}$  (<200  $\mu\text{M}$  až 1  $\mu\text{M}$ ), největší akční rádius má  $^{90}\text{Y}$  (28-42 mm) [61].

S humanizovanou protilátkou J591 byly již použity  $^{90}\text{Y}$  ( $\beta$ -zářič) a  $^{177}\text{Lu}$  ( $\beta$  i  $\gamma$ -zářič) [62, 63]. Tyto konjugáty vykazují výbornou specifitu, nízkou systémovou toxicitu a vysokou účinnost na buňky karcinomu. Konjugát  $^{177}\text{Lu}$ -J591 emitující i  $\gamma$ -paprsky může být zobrazen přímo rovinnou gama-kamerou, což má výhodu i souběžné diagnostiky karcinomu.  $^{90}\text{Y}$ -J591 musí být pro diagnostiku vnějším  $\gamma$ -detektorem obohacen nuklidem  $^{111}\text{In}$ -J591 [64].

### 2.3.3.3. Protilátky konjugované s toxinem

Terapie založená na ADC měla v počátcích mnoho nedostatků, které se postupným vývojem podařilo eliminovat. První generace ADC obvykle měla vysokou účinnost *in vitro* a posléze i na zvířatech, ale klinické testy v humánní medicíně vždy selhaly. Použité protilátky na přípravu ADC byly myší, cytotoxická substance ADC byla málo účinná a chemická spojka byla *in vivo* nestabilní [44].

V současné době jsou již k dispozici protilátky humanizované, vhodné pro terapeutické účely (lidský imunitní systém je toleruje velmi dobře). Nepřiměřeně labilní spojky byly nahrazeny lepšími, jež jsou extracelulárně stabilní, ale endosomálně štěpitelné. Různými chemickými modifikacemi, nejčastěji známých toxických látek, byly objeveny extrémně cytotoxické sloučeniny, toxické pro buňky již v pikomolárních koncentracích [65].

Polymeraci tubulinového cytoskeletu inhibuje **monomethylauristatin E**, jenž je syntetického původu. Při experimentech se osvědčila valin-citrulinová spojka, která zůstává v krevním séru stabilní a je až po internalizaci komplexu štěpena endosomálním katepsinem B. Na různé modelové buňky karcinomu prostaty tento ADC působil velmi selektivně a účinně, a to již v pikomolárních koncentracích. Tato pozoruhodná účinnost se potvrdila také *in vivo* [66].

Deriváty paclitaxelu (taxoidy) se též výborně osvědčily jako cytotoxická komponenta ADC. Přírodní alkaloid **paclitaxel**, pocházející z tisu tichomořského, nemá dostatečnou účinnost pro užití v ADC, avšak jeho deriváty jsou extrémně cytotoxické (inhibitory depolymerace tubulinu). Léčivo je napojeno k protilátce přes disulfidickou vazbu, po internalizaci je toto spojení rozštěpeno redukčním prostředím v lysosomu na dvě thiolové



### **3. Cíle práce**

Cílem této práce bylo:

1. Purifikovat protilátky proti GCPII afinitní chromatografií
2. Imunoprecipitovat GCPII z lyzátu buněk LNCaP a porovnat citlivost protilátek
3. Biotinylovat část přečištěných protilátek
4. Zjistit optimální podmínky pro dlouhodobé uchování přečištěných protilátek



## 4. Materiál a metody

### 4.1. *Chemikálie a další materiál*

#### **Acros Organics (Geel, Belgie)**

4-jodfenol

#### **Bio-Rad (Hercules, USA)**

All Blue Standard pro SDS-PAGE; MWM Precision Protein Ladder pro SDS-PAGE

#### **Fluka (Buchs, Švýcarsko)**

tetramethylethylendiamin (TEMED); *N,N'*-methylenbisakrylamid; citrát sodný

#### **GE Healthcare (Little Chalfont, UK)**

Protein G Sepharosa 4 Fast Flow

1ml kolonka HiTrap Protein A Sepharose Fast Flow

#### **Koh-i-noor Hardtmuth (České Budějovice, ČR)**

96 jamková průhledná mikrodestička s plochým dnem

#### **Lach-Ner (Neratovice, ČR)**

kyselina chlorovodíková; uhličitan sodný; hydroxid sodný; thiosíran sodný; dusičnan stříbrný

#### **Millipore (Billerica, USA)**

0,22 µm filtrační nitrocelulosová membrána

membrána Pellicon XL 50 Biomax 100 (MWCO 100kDa)

#### **Nunc (New York, USA)**

96 jamková černá mikrodestička Maxisorp s plochým dnem

#### **Penta (Praha, ČR)**

azid sodný; methanol; kyselina octová; aceton; formaldehyd; ethanol; glycerol; peroxid vodíku

#### **Pierce Thermo Scientific (Rockford, USA)**

NeutrAvidin konjugovaný křenovou peroxidasou (1 mg/ml)

kozí protilátka proti myší IgG konjugovaná křenovou peroxidasou (1 mg/ml)

SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate

N-hydroxysulfosukcinimidyl biotin (sulfo-NHS-biotin LC)

### **Sartorius Stedim Biotech S.A. (Aubagne, Francie)**

Vivaspin 6 Centricon

### **SDT (Baesweiler, SRN)**

Casein blocker

### **Serva (Heidelberg, SRN)**

Coomassie Brilliant Blue G-250; bromfenolová modř; Triton X100; hovězí sérový albumin, peroxidisíran amonný

### **Spectrum (Houston, USA)**

dialyzační membrána s MWCO 50kDa

### **Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)**

2-merkптоethanol; glycerol; EDTA; glycin; Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan); akrylamid; dodecylsulfát sodný; luminol; kyselina boritá; Tween-20; hydrogenfosforečnan sodný; dihydrogenfosforečnan draselný; chlorid sodný; chlorid draselný; HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina)

## **4.2. Přístroje**

### **pH-metr**

9450 pH meter, Unicam (USA)

### **Spektrofotometr**

NanoDrop 1000, Thermo Scientific (USA)

### **Spektrofotometrická čtečka**

Infinite M1000, Tecan (Švýcarsko)

### **Laboratorní váhy**

XA 110/X Radwag (Česká Republika)

EK-400H, A&D Engineering, Inc. (USA)

### **Rotační inkubátor**

Kisker (UK)

### **Vertikální polyakrylamidová elektroforéza**

Sigma (USA)

AP Czech (Česká Republika)

### **Zařízení sloužící k reverzní osmóze**

LabScale TFF, Millipore (USA)

### **Přístroj sloužící k elektropřenosu**

Trans-Blot SD se zdrojem PowerPac HC, Bio-Rad (USA)

### **Centrifugy**

Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc. (USA)

Centrifuge 5415R, Eppendorf (SRN)

### **Skener**

CanoScan 8400F, Canon (Japonsko)

### **CCD kamera**

ChemiDocIt 600, UVP (Kanada)

### **Chromatografická pumpa**

ÄKTAprime, GE Healthcare (UK)

## **4.3. Metody**

### **4.3.1. Purifikace protilátek z média hybridomů afinitní chromatografií**

Roztoky, z nichž byly protilátky purifikovány, jsou kultivační média hybridomových buněčných linií produkující monoklonální IgG1 protilátky GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08. Tento materiál pochází z pracoviště Prof. Václava Hořejšího na ÚMG AV ČR.

#### Roztoky:

*Koncentrát vazebného pufru (4×):*

4M NaCl; 2M glycin; pH 8,50

*Vazebný pufr:*

1M NaCl; 0,5M glycin; pH 8,50

*Eluční pufr:*

100mM citrát sodný; pH 5,0

*Neutralizační pufr:*

1M HEPES; pH 8,0

Afinitní nosič v koloně:

rProtein A Sepharose, kolonka HiTrap FF (GE Healthcare) o objemu 1 ml

Pracovní postup:

Médium hybridomů obsahující protilátky bylo zahuštěno 75krát reverzní osmózou na přístroji LabScale TFF (membrána Pellicon XL 50 Biomax 100 s MWCO 100kDa; frakce „nanáška zahušťování“ s další frakcí filtrátu (FT) zahušťování). Koncentrát média byl smíchán s koncentrovaným vazebným pufrům v objemových dílech 3:1 (frakce „nanáška purifikace“) a nanesen na kolonku HiTrap FF rProtein A (GE Healthcare) zapojenou na přístroj ÄKTA PRIME. Po nanesení vzorku byla kolonka promyta 50 ml vazebného pufru (tj. 50 objemů kolony; odebraný vzorek ke konci promývání označen jako W). Proteiny byly z kolonky uvolněny elučním pufrům; eluční frakce (E) byly okamžitě smíchány s neutralizačním pufrům v poměru 5:1. Elučních frakcí bylo 16, jejich celkový objem byl 10 ml. Po celou dobu purifikace byla průtoková rychlost 1 ml/min.

Proteiny v jednotlivých frakcích a krocích purifikace byly analyzovány pomocí elektroforézy (SDS-PAGE) a následným barvením gelu stříbrem. Množství proteinů bylo určeno stanovením celkového obsahu proteinů dle Bradfordové (kapitola 4.3.6.).

### **4.3.2. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za redukujících a denaturujících podmínek (SDS-PAGE)**

Roztoky:

*Zaostřovací gel (6%):*

250mM Tris-HCl; 5,84% (w/w) akrylamid; 0,16% (w/w) *N,N'*-methylen-bis(akrylamid); 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 0,005% (v/v) tetramethylethylendiamin; 0,1% (w/v) peroxodisíran amonný; pH 6,8

*Separací gel (12%):*

375mM Tris-HCl; 11,67% (w/w) akrylamid; 0,33% (w/w) *N,N'*-metylen-bis(akrylamid); 0,1% (w/v) SDS; 0,001% (v/v) tetramethylethyldiamin; 0,1% (w/v) peroxodisíran amonný; pH 8,8

*Vzorkový pufr (6×):*

350mM Tris-HCl; 30% (v/v) glycerol; 10% (w/v) SDS; 6% (v/v) 2-merkptoethanol; 0,012% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

*Elektrodový pufr:*

250mM glycin; 25mM Tris-HCl; 0,1% (w/w) dodecylsulfát sodný (SDS); pH 8,8

#### Pracovní postup:

Proteiny byly rozděleny podle svých elektroforetických pohyblivostí pomocí diskontinuální elektroforézy v redukujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).

Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem a nanášeny do jamek v gelu. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 150 V. Po skončení elektroforetické separace byly proteiny v gelu detekovány buď přenosem na nitrocelulosovou membránu a následnou imunodetekcí, anebo barvení stříbrem.

### **4.3.3. Barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu**

Pro zviditelnění elektroforeticky rozdělených proteinů bylo využito barvení gelů stříbrem; intenzita barvení byla přizpůsobena účelu použití.

#### Roztoky a postup barvení:

1. fixace:	20 min	12% (v/v) CH <sub>3</sub> COOH 50% (v/v) CH <sub>3</sub> OH 0,02% (v/v) HCHO
2. promytí:	3 × 5 min	50% (v/v) CH <sub>3</sub> OH
3. exponace:	60 s	0,02% (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O
4. promytí:	3 × 20 s	destilovaná voda

5. impregnace:	20 min	0,2% (w/v) AgNO <sub>3</sub> 0,02% (v/v) HCHO
6. promytí:	3 × 20 s	destilovaná voda
7. vyvolání:	10 s - 5 min	566mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 16μM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0,02% (v/v) HCHO
8. promytí:	1 × 20 s	destilovaná voda
9. zastavení:	5 min	12% (v/v) CH <sub>3</sub> COOH 50% (v/v) CH <sub>3</sub> OH
10. uchování:		50% (v/v) CH <sub>3</sub> OH

#### 4.3.4. Dialýza

##### Roztoky:

*PBS:*

137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

##### Pracovní postup:

Eluční frakce obsahující protilátky byly smíchány a dialyzovány 3×8 hod proti tisícinásobnému objemovému přebytku PBS. Dialýza probíhala za stálého míchání při 4 °C. Byla použita dialyzační membrána s MWCO 50 kDa.

#### 4.3.5. Koncentrování roztoků protilátek

Roztoky purifikovaných protilátek byly zahuštěny pomocí 6ml centrifugační ultrafiltrační kyvety (10 kDa MWCO; Vivaspin 6 Centricon, Sartorius).

Centrifugací (4000×g, 4 °C) byla koncentrace proteinů zvýšena na požadovanou hodnotu, a to alespoň 0,5 mg/ml. Celková koncentrace proteinů byla posléze stanovena dle Bradfordové.

#### 4.3.6. Měření koncentrace proteinů podle Bradfordové

Stanovení celkové koncentrace proteinů bylo provedeno podle Bradfordové na 96 jamkové mikrotitrační destičce. Pro kalibraci byla využita řada pěti standardů BSA v koncentračním rozmezí 0,00125-0,0200 mg/ml. K roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 v destilované vodě byly přidány testované vzorky, a po důsledném promíchání byly roztoky inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Absorbance při vlnové délce 595 nm byla změřena na spektrofotometrické čtečce Tecan Infinite M1000.

#### 4.3.7. Biotinylace protilátek

##### Roztoky:

*TBS:*

50mM Tris-HCl; 150mM NaCl; pH 7,4

##### Pracovní postup:

Byly připraveny roztoky purifikovaných protilátek GCPII-04, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 o známých koncentracích. K těmto roztokům protilátek bylo přidáno takové množství 10mM vodného roztoku sulfo-NHS-biotinu (N-hydroxysulfosukcinimidyl biotinu), aby při smísení s roztokem protilátek vznikl právě pětinašobný molární přebytek tohoto činidla. Roztok sulfo-NHS-biotinu byl po celou dobu experimentu uchováván na ledu, z důvodu vysoké reaktivity tohoto činidla. Po přidání sulfo-NHS-biotinu k protilátkám byly roztoky inkubovány 16 hod při 4 °C. Reakce byla ukončena dialýzou proti TBS za stálého míchání při 4 °C, 3×8 hod proti tisícinásobnému objemovému přebytku TBS. Byla použita dialyzační membrána s MWCO 50 kDa.

### 4.3.8. Stanovení koncentrace nemodifikovaných i biotinylovaných protilátek metodou ELISA

#### Roztoky:

##### *TBST'*:

50mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,1% Tween-20; pH 7,4

##### *Borátový pufr:*

100mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; pH upraveno přidavkem NaOH na hodnotu 8,2

##### *Chemiluminescenční substrát:*

100mM Tris-HCl; 2mM 4-jodfenol; 2,5mM luminol; 0,018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; pH 8,0

#### Pracovní postup:

Do jamek černé 96 jamkové destičky NUNC MaxiSorb bylo pipetováno 0,2; 1,0; 5,0; 10; 50 ng rekombinantní extracelulární GCPII (aminokyselinová sekvence 44-750 původní GCPII) ve 100 µl borátového pufru. Destička s antigenem byla za stálého míchání inkubována při laboratorní teplotě 1 hod, následně byly jamky propláchnuty 3×250 µl TBST'. Do jamek bylo přidáno 250 µl 20krát zředěného roztoku kaseinu (Casein blocker, SDT) a destička byla inkubována za laboratorní teploty a stálého míchání 2 hod. Poté byl roztok kaseinu odstraněn a jamky byly propláchnuty 3×250 µl TBST'.

Do jamek bylo pipetováno 100 µl roztoků primárních nemodifikovaných protilátek GCPII-02, GCPII-04, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 o koncentracích 0,25 ng/µl (v TBST') a 100 µl roztoků primárních biotinylovaných protilátek GCPII-02, GCPII-04, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 o koncentracích 0,25 ng/µl (v TBST'). S primární protilátkou byla destička inkubována 2 hod za stálého míchání při laboratorní teplotě. Posléze byly roztoky primární protilátky z jamek odstraněny a jamky byly propláchnuty 3×250 µl TBST'.

Do jamek s nemodifikovanými primárními protilátkami bylo přidáno 100 µl sekundární kozí protilátky proti myším protilátkám konjugované s křenovou peroxidasou (Pierce Thermo Scientific; výsledná koncentrace protilátky 0,5 ng/µl) a do jamek s biotinylovanými primárními protilátkami bylo přidáno 100 µl NeutrAvidinu konjugovaného s křenovou peroxidasou (Pierce Thermo Scientific; výsledná koncentrace 0,5 ng/µl). Po přidání sekundárních protilátek následovala inkubace 1 hod za stálého míchání při laboratorní



teplotě. Poté byla sekundární protilátka z jamek odstraněna a jamky byly důkladně vypláchnuty 3×250 µl TBST'. Do jamek bylo přidáno 100 µl chemiluminiscenční substrátu; luminescence byla měřena na přístroji Tecan Infinite M1000 (doba snímání 500 ms).

#### **4.3.9. Stanovení koncentrace protilátek ve všech frakcích purifikace metodou ELISA**

##### Roztoky:

###### *TBST':*

50mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,1% Tween-20; pH 7,4

###### *Borátový pufr:*

100mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; pH upraveno přidavkem NaOH na hodnotu 8,2

###### *Chemiluminiscenční substrát:*

100mM Tris-HCl; 2mM 4-jodfenol; 2,5mM luminol; 0,018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; pH 8,0

##### Pracovní postup:

Do všech jamek černé 96 jamkové destičky NUNC MaxiSorb bylo pipetováno 100 ng rekombinantní extracelulární GCPII (aminokyselinová sekvence 44-750 původní GCPII) rozpuštěného ve 100 µl borátového pufru. Destička s antigenem byla za stálého míchání inkubována při laboratorní teplotě 1 hod, následně byly jamky propláchnuty 3×250 µl TBST'. Do jamek bylo přidáno 250 µl 20krát zředěného roztoku kaseinu (Casein blocker, SDT) a destička byla inkubována za laboratorní teploty a stálého míchání 2 hod. Poté byl roztok kaseinu z jamek odstraněn a jamky byly propláchnuty 3×250 µl TBST'.

Do jamek byly pipetovány roztoky primárních protilátek GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08, u nichž se stanovovala koncentrace. U každé protilátky byly připraveny roztoky různých koncentrací (v TBST'), a to ze všech kroků jejich purifikace (filtrát při zahušťování, nanáška purifikace, filtrát purifikace a eluce). Pro každou protilátku byla připravena kalibrační řada standardů. S primární protilátkou byla destička inkubována 2 hod za stálého míchání při laboratorní teplotě. Posléze byly primární protilátky z jamek odstraněny a jamky byly propláchnuty 3×250 µl TBST'.

Do jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l sekundární kozí protilátky proti myším protilátkám, konjugované s křenovou peroxidasou (Pierce Thermo Scientific; výsledná koncentrace protilátky 0,5 ng/ $\mu$ l) s následnou inkubací 1 hod za stálého míchání při laboratorní teplotě. Poté byla sekundární protilátka z jamek odstraněna a jamky byly důkladně vypláchnuty 3 $\times$ 250  $\mu$ l TBST'. Do jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l chemiluminiscenční substrátu; luminescence byla měřena na přístroji Tecan Infinite M1000 (doba snímání 500 ms).

#### **4.3.10. Imunoprecipitace GCPII pomocí purifikovaných myších protilátek specifických pro GCPII**

##### Roztoky:

*Vzorkový pufr (1 $\times$ ):*

90mM Tris-HCl (pH 6,8); 5% (v/v) glycerol; 1,7% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 6% (v/v) 2-merkaptoethanol; 0,002% (w/v) bromfenolová modř

*TBS:*

50mM Tris-HCl; 150mM NaCl; pH 7,4

##### Pracovní postup:

15  $\mu$ l Protein G Sepharosy 4 Fast Flow (GE Healthcare) bylo promyto 3 $\times$ 0,2 ml TBS z důvodu odstranění uchovávacího ethanolu. Byl připraven roztok protilátky o objemu 200  $\mu$ l a výsledné koncentraci 25 ng/ $\mu$ l. Tento roztok byl přidán k Protein G Sepharose a za míchání byl inkubován přes noc při 4 °C. Suspenze byla usazena centrifugací (3000 $\times$ g, 1 min, 4 °C), supernatant byl odebrán a nosič s navázanou protilátkou byl promyt 3 $\times$ 0,2 ml TBS. K nosiči bylo přidáno 200  $\mu$ l lyzátu buněk LNCaP obsahující endogenní GCPII (o koncentraci všech proteinů 1 mg/ml; nanášková frakce), směs se inkubovala za stálého míchání 1 hod při 4 °C. Suspenze byla usazena centrifugací (3000 $\times$ g, 1 min, 4 °C), supernatant odebrán (frakce FT) a nosič promyt 3 $\times$ 0,2 ml TBS. Nakonec bylo k nosiči přidáno 50  $\mu$ l 1 $\times$  vzorkového pufru a nosič byl zahřát 10 min na 70 °C (eluční frakce E). Tento experiment byl proveden s protilátkami GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08.

Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí elektroforézy (SDS-PAGE) s následujícím přenosem na nitrocelulosovou membránu a imunodetekcí protilátkou GCPII-04.

#### 4.3.11. Elektropřenos proteinů na nitrocelulosovou membránu (Western blot) s následnou imunodetekcí

##### Roztoky:

##### *Přenosový pufr:*

200mM glycin; 25mM Tris-HCl; 10% (v/v) CH<sub>3</sub>OH; 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS);  
pH neupravováno

##### *PBS:*

137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

Po skončení elektroforetické separace proteinů byly gel i nitrocelulosová membrána ponořeny do přenosového pufru. Přenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu byl proveden použitím konstantního napětí 15 V po dobu 15 min.

Membrána byla poté inkubována v 5 ml 20krát zředěného roztoku kaseinu (Casein blocker, SDT) pro zablokování nespecifických vazeb protilátek (1 hod při 4 °C). Posléze byla membrána inkubována s primární myší protilátkou GCPII-04 (200 ng/ml ve 20krát zředěném roztoku kaseinu, 2 hod, 4 °C).

Nitrocelulosová membrána byla následně promyta 3×5 minut PBS + 0,05% Tween-20 a byla přenesena do 5 ml roztoku kaseinu. Posléze byla přidána kozí protilátka proti myším protilátkám konjugovaná s křenovou peroxidasou (Pierce Thermo Scientific; výsledná koncentrace 400 ng/ml v roztoku kaseinu, 1 hod, 25 °C). Po inkubaci se sekundární protilátkou byla membrána opět promyta 3×5 min PBS + 0,05% Tween-20 a 5 min inkubována v roztoku chemiluminiscenčního činidla „SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate“ (Pierce Thermo Scientific). Po osušení membrány listem filtračního papíru byla luminiscence změřena přístrojem ChemiDocIt 600 (UVP).

#### **4.3.12. Uchování přečištěných protilátek**

Protilátky byly rozděleny do několika mikrozkušavek. Pro dlouhodobé uchování purifikovaných protilátek byl navrhnut experiment, při němž jsou vyzkoušeny různé podmínky. Testovat se bude zamražení na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , zamražení na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  s 50 % glycerolu, uchování při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uchování s přídavkem 0,05 %  $\text{NaN}_3$  při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uchování s přídavkem 1 % BSA při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a uchování s přídavkem 0,1% Tween-20 při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Po delším časovém úseku (např. půl roku) bude proveden pokus, při kterém bude prozkoumána „životaschopnost“ protilátek.

## 5. Výsledky

### 5.1. *Purifikace protilátek proti GCPII afinitní chromatografií*

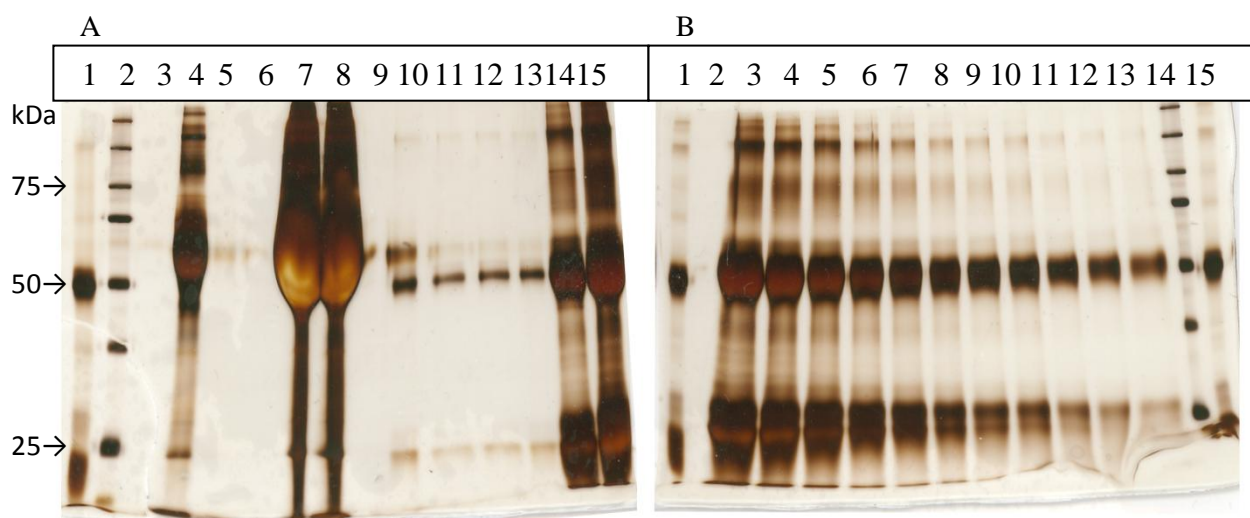
Monoklonální protilátky GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 rozpoznávající nativní GCPII byly z média hybridomů přečištěny a izolovány pomocí afinitní chromatografie. Média měla před zahuštěním objemy 800 ml, a po zakoncentrování měla objem 10 ml. Po zahuštění byla média nanesena na kolonku s proteinem A; po odmytí nečistot byly protilátky eluovány sníženou hodnotou pH. Frakce filtrátu při zahušťování byla označena jako FT zahušťování, frakce nanášky při purifikaci byla označena jako nanáška purifikace, frakce filtrátu při purifikaci byla označena jako FT purifikace, frakce získaná na konci promývání kolonky byla označena jako W a eluční frakce 1-16 byly označeny jako E1-E16.

Obsah proteinů v jednotlivých elučních frakcích byl analyzován pomocí SDS-PAGE (elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za denaturujících a redukčních podmínek; **obrázky 11-14, str. 38-41**). Eluční frakce obsahující protilátky byly smíchány a vzniklý roztok byl dialyzován proti tisícínásobnému objemovému přebytku PBS 3×8 hod při 4 °C za stálého míchání. Následně byla stanovena koncentrace proteinů podle Bradfordové a roztok byl zahuštěn na koncentraci proteinů alespoň 0,5 mg/ml. Výsledné hodnoty koncentrací a objemy roztoků protilátek jsou uvedeny v **tabulce 1**.

**Tabulka č. 1: Objemy, koncentrace a celkové množství přečištěných protilátek.**

Protilátka proti GCPII	V/ml	c <sub>g</sub> /(mg/ml)	m/mg
GCPII-05	4,0	1,1	4,4
GCPII-06	7,0	0,5	3,3
GCPII-07	2,0	0,7	1,4
GCPII-08	8,0	1,0	7,9

Analýza purifikace protilátky GCPII-05 pomocí SDS-PAGE je zobrazena na **obrázku 11**.



**Obrázek 11: Analýza purifikace protilátky GCPII-05.** Vzorky byly elektroforeticky rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu; proteiny byly posléze v gelu zviditelněny pomocí barvení stříbrem. Číslice v řadě nad obrázkem značí číslo dráhy v gelu.

Panel A:

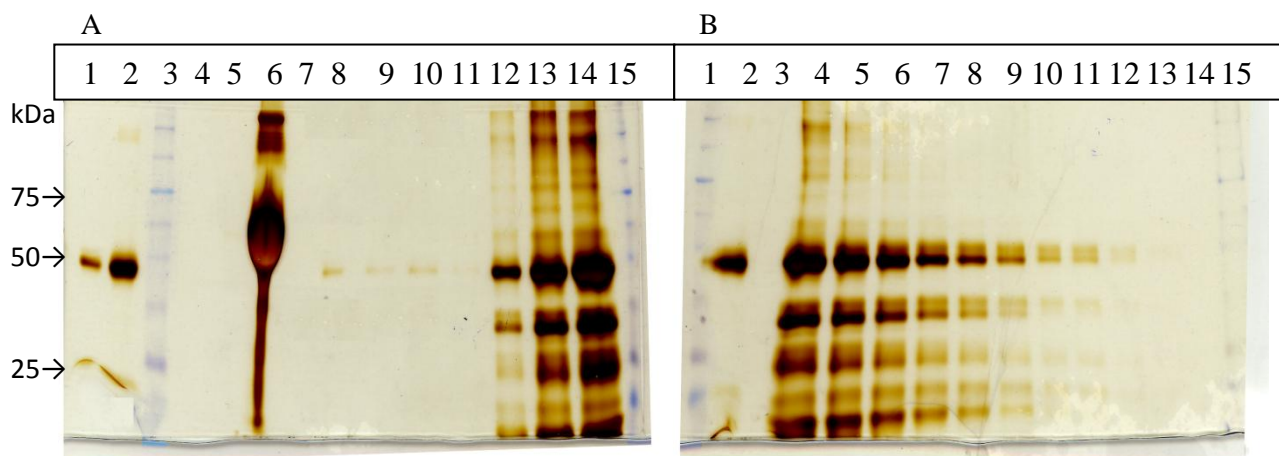
**1:** standard protilátky (GCPII-07; 500 ng); **2:** marker zdánlivých molekulových hmotností (All Blue Standard; 0,3  $\mu$ l); **3:** volná dráha ( $\emptyset$ ); **4:** nanáška při zahušťování (7  $\mu$ l); **5:** FT zahušťování (7  $\mu$ l); **6:**  $\emptyset$ ; **7:** nanáška při purifikaci (7  $\mu$ l); **8:** FT purifikace (7  $\mu$ l); **9:**  $\emptyset$ ; **10:** frakce W (7  $\mu$ l); **11:** eluční frakce E1 (7  $\mu$ l); **12:** frakce E2 (7  $\mu$ l); **13:** frakce E3 (7  $\mu$ l); **14:** frakce E4 (7  $\mu$ l); **15:** frakce E5 (7  $\mu$ l)

Panel B:

**1:** standard protilátky (GCPII-07; 500 ng); **2:**  $\emptyset$ ; **3:** frakce E6 (7  $\mu$ l); **4:** frakce E7 (7  $\mu$ l); **5:** frakce E8 (7  $\mu$ l); **6:** frakce E9 (7  $\mu$ l); **7:** frakce E10 (7  $\mu$ l); **8:** frakce E11 (7  $\mu$ l); **9:** frakce E12 (7  $\mu$ l); **10:** frakce E13 (7  $\mu$ l); **11:** frakce E14 (7  $\mu$ l); **12:** frakce E15 (7  $\mu$ l); **13:** frakce E16 (7  $\mu$ l); **14:** marker zdánlivých molekulových hmotností (All Blue Standard; 0,3  $\mu$ l); **15:** standard protilátky (GCPII-07; 500 ng)

Afinitní chromatografií bylo přečištěno 4,4 mg protilátky GCPII-05; eluát obsahuje minimum kontaminantů.

Analýza purifikace protilátky GCPII-06 pomocí SDS-PAGE je zobrazena na **obrázku 12**.



**Obrázek 12: Analýza purifikace protilátky GCPII-06.** Vzorky byly elektroforeticky rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu; proteiny byly posléze v gelu zviditelněny pomocí barvení stříbrem. Číslice v řadě nad obrázkem značí číslo dráhy v gelu.

Panel A:

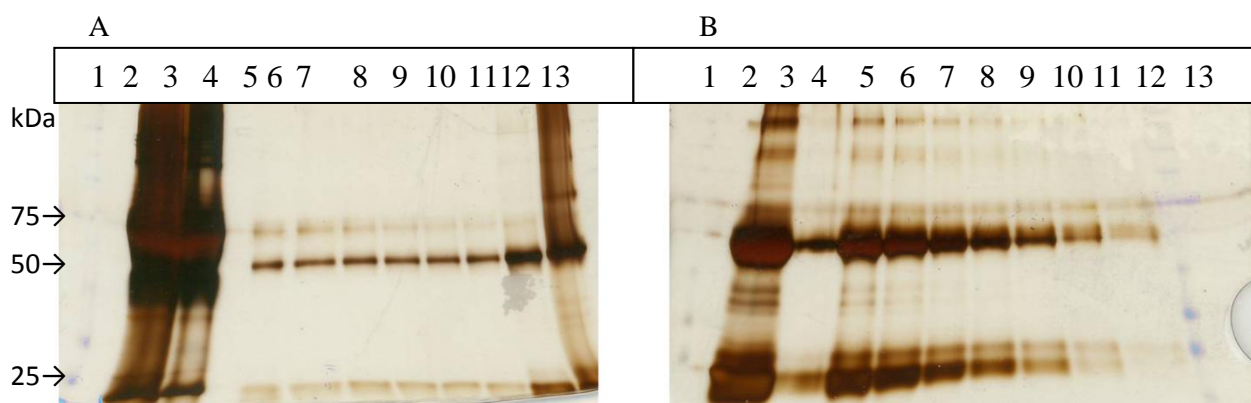
**1:** standard protilátky (GCPII-07; 100 ng); **2:** standard protilátky (GCPII-07; 500 ng); **3:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l); **4:** volná dráha ( $\emptyset$ ); **5:**  $\emptyset$ ; **6:** nanáška při purifikaci (7  $\mu$ l); **7:**  $\emptyset$ ; **8:** frakce W (7  $\mu$ l); **9:** eluční frakce E1; **10:** frakce E2 (7  $\mu$ l); **11:** frakce E3 (7  $\mu$ l); **12:** frakce E4 (7  $\mu$ l); **13:** frakce E5 (7  $\mu$ l); **14:** frakce E6 (7  $\mu$ l); **15:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l)

Panel B:

**1:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l); **2:** standard protilátky (GCPII-07; 500 ng); **3:**  $\emptyset$ ; **4:** frakce E7 (7  $\mu$ l); **5:** frakce E8 (7  $\mu$ l); **6:** frakce E9 (7  $\mu$ l); **7:** frakce E10 (7  $\mu$ l); **8:** frakce E11 (7  $\mu$ l); **9:** frakce E12 (7  $\mu$ l); **10:** frakce E13 (7  $\mu$ l); **11:** frakce E14 (7  $\mu$ l); **12:** frakce E15 (7  $\mu$ l); **13:** frakce E16 (7  $\mu$ l); **14:**  $\emptyset$ ; **15:**  $\emptyset$

Afinitní chromatografií bylo přečištěno 3,3 mg protilátky GCPII-06; eluát obsahuje množství kontaminantů.

Analýza purifikace protilátky GCPII-07 pomocí SDS-PAGE je zobrazena na **obrázku 13**.



**Obrázek 13: Analýza purifikace protilátky GCPII-07.** Vzorky byly elektroforeticky rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu; proteiny byly posléze v gelu zviditelněny pomocí barvení stříbrem. Číslice v řadě nad obrázkem značí číslo dráhy v gelu.

Panel A:

**1:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l); **2:** volná dráha ( $\emptyset$ ); **3:** nanáška při purifikaci (7  $\mu$ l); **4:** FT purifikace (7  $\mu$ l); **5:**  $\emptyset$ ; **6:** frakce W (7  $\mu$ l); **7:** eluční frakce E1; **8:** frakce E2 (7  $\mu$ l); **9:** frakce E3 (7  $\mu$ l); **10:** frakce E4 (7  $\mu$ l); **11:** frakce E5 (7  $\mu$ l); **12:** frakce E6 (7  $\mu$ l); **13:** frakce E7 (7  $\mu$ l)

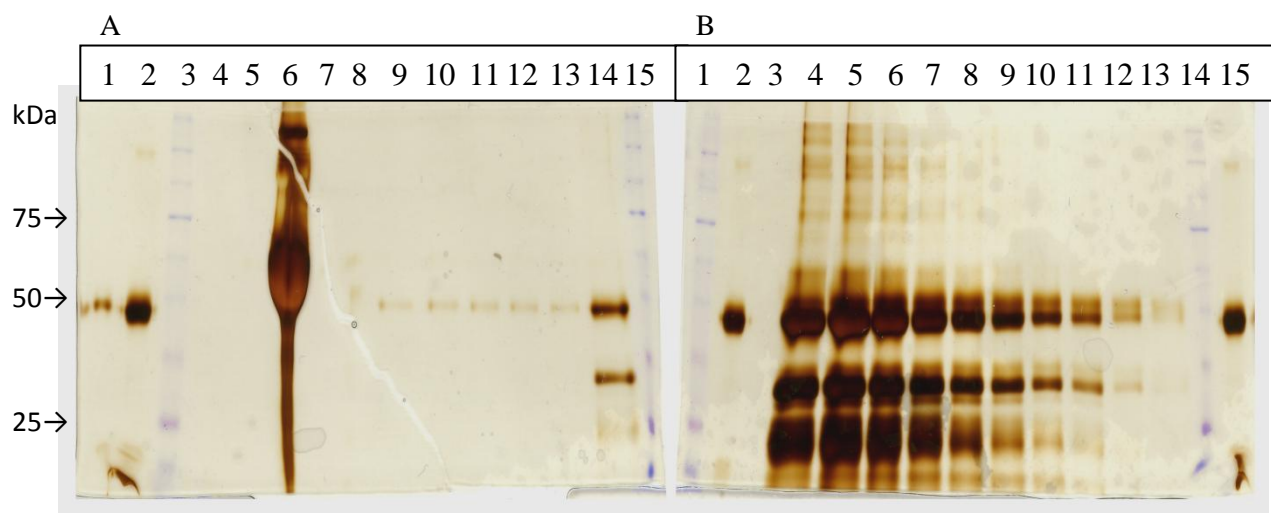
Panel B:

**1:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l); **2:** standard protilátky (GCPII-07; 100 ng); **3:** frakce E8 (7  $\mu$ l); **4:** frakce E9; **5:** frakce E10 (7  $\mu$ l); **6:** frakce E11 (7  $\mu$ l); **7:** frakce E12 (7  $\mu$ l); **8:** frakce E13 (7  $\mu$ l); **9:** frakce E14 (7  $\mu$ l); **10:** frakce E15 (7  $\mu$ l); **11:** frakce E16 (7  $\mu$ l); **12:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l); **13:**  $\emptyset$

Afinitní chromatografií bylo přečištěno 1,4 mg protilátky GCPII-07; eluát obsahuje minimum kontaminantů.



Analýza purifikace protilátky GCPII-08 pomocí SDS-PAGE je zobrazena na **obrázku 14**.



**Obrázek 14: Analýza purifikace protilátky GCPII-08.** Vzorky byly elektroforeticky rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu; proteiny byly posléze v gelu zviditelněny pomocí barvení stříbrem. Číslice v řadě nad obrázkem značí číslo dráhy v gelu.

Panel A:

**1:** standard protilátky (GCPII-07; 100 ng); **2:** standard protilátky (GCPII-07; 500 ng); **3:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l); **4:** volná dráha ( $\emptyset$ ); **5:**  $\emptyset$ ; **6:** nanáška při purifikaci (7  $\mu$ l); **7:**  $\emptyset$ ; **8:** frakce W (7  $\mu$ l); **9:** eluční frakce E1; **10:** frakce E2 (7  $\mu$ l); **11:** frakce E3 (7  $\mu$ l); **12:** frakce E4 (7  $\mu$ l); **13:** frakce E5 (7  $\mu$ l); **14:** frakce E6 (7  $\mu$ l); **15:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l)

Panel B:

**1:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l); **2:** standard protilátky (GCPII-07; 500 ng); **3:**  $\emptyset$ ; **4:** frakce E7 (7  $\mu$ l); **5:** frakce E8 (7  $\mu$ l); **6:** frakce E9 (7  $\mu$ l); **7:** frakce E10 (7  $\mu$ l); **8:** frakce E11 (7  $\mu$ l); **9:** frakce E12 (7  $\mu$ l); **10:** frakce E13 (7  $\mu$ l); **11:** frakce E14 (7  $\mu$ l); **12:** frakce E15 (7  $\mu$ l); **13:** frakce E16 (7  $\mu$ l); **14:** marker zdánlivých molekulových hmotností (MWM Protein Ladder; 0,3  $\mu$ l); **15:** standard protilátky (GCPII-07; 500 ng)

Afinitní chromatografií bylo přečištěno 7,9 mg protilátky GCPII-08; eluát obsahuje množství kontaminantů.

## **5.2. Biotinylace protilátek proti GCPII**

Protilátky GCPII-04, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 byly inkubovány s roztokem N-hydroxysulfosukcinimidyl biotinu. Po přidání tohoto reakčního činidla k protilátkám byly roztoky inkubovány 16 hod při 4 °C. Reakce byla ukončena dialýzou proti TBS za stálého míchání při 4 °C, 3×8 hod proti tisícinásobnému objemovému přebytku TBS. Byla použita dialyzační membrána s MWCO 50 kDa.

Výsledek biotinylace protilátek byl zjištěn metodou ELISA. Biotinylované protilátky se nejdříve navázaly na GCPII adsorbovanou na stěně jamek, a posléze byl na protilátky s kovalentně připojeným biotinem navázán NeutrAvidin, konjugovaný s křenovou peroxidasou. Po přidání chemiluminiscenčního substrátu byla změřena luminiscence v každé jamce; hodnota luminiscence byla přímo úměrná množství navázané protilátky. Samotná vazba protilátek na antigen ověřila jejich nenarušenou citlivost vůči antigenu a vazba sekundární protilátky ověřila úspěšnost biotinylace. Protilátkám GCPII-04, GCPII-06 a GCPII-07 nebyla biotinylací pozměněna afinita vůči GCPII, protilátce GCPII-08 se po biotinylací afinita k GCPII snížila zhruba na polovinu (data nejsou ukázána).

## **5.3. Stanovení citlivosti protilátek metodou ELISA**

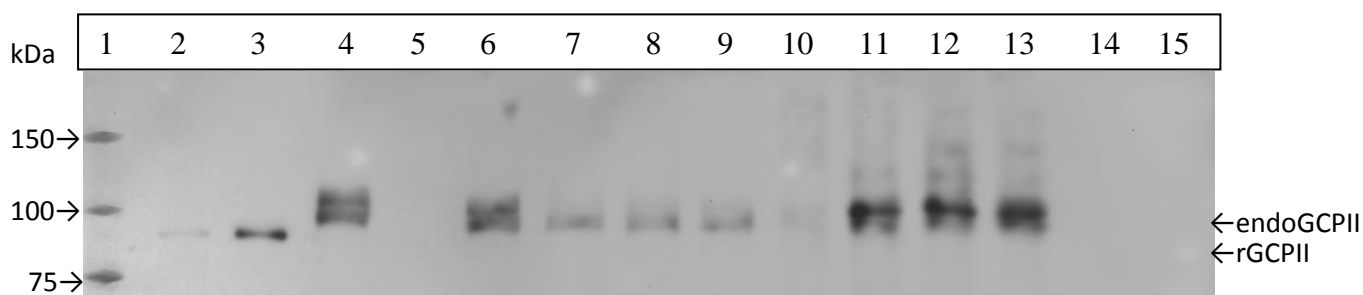
U protilátek GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 byly připraveny roztoky různých koncentrací, a to ze všech kroků jejich purifikace (filtrát při zahušťování, nanáška purifikace, filtrát purifikace a eluce). Pro každou protilátku byla připravena kalibrační řada standardů.

Protilátky byly nejprve inkubovány s GCPII adsorbovanou na stěně jamek, a poté byla k protilátkám přidána sekundární kozí protilátka proti myším protilátkám, konjugovaná s křenovou peroxidasou. Po přidání chemiluminiscenčního substrátu byla změřena luminiscence v každé jamce; hodnota luminiscence byla přímo úměrná množství navázané protilátky. Bylo zjištěno, že protilátky GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 mají podobnou a velmi dobrou citlivost vůči GCPII a že GCPII-05 má citlivost vůči GCPII velmi nízkou (data nejsou ukázána).

## 5.4. *Imunoprecipitace GCPII monoklonálními protilátkami*

Imunoprecipitace GCPII byla provedena protilátkami GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08. Protilátky byly nejprve navázány na Protein G Sepharosu. Posléze byl k protilátkám, zafixovaným na protein G, přidán lyzát z nádorových buněk prostaty LNCaP, jenž obsahoval endogenní GCPII (endoGCPII). K promytému nosiči byl následně přidán vzorkový pufr, a po odstředění byl vzniklý supernatant odebrán jako eluční frakce. Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí elektroforézy (SDS-PAGE) s následujícím přenosem na nitrocelulosovou membránu a imunodetekcí protilátkou GCPII-04, která rozeznává denaturovaný antigen. Jako standard GCPII byla použita rekombinantní extracelulární GCPII (aminokyselinová sekvence 44-750 původní GCPII; rGCPII).

Výsledek imunoprecipitace GCPII myšími monoklonálními protilátkami GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 je zobrazen na **obrázku 15**.



**Obrázek 15: Analýza imunoprecipitace GCPII protilátkami GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08.** Vzorky byly elektroforeticky rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu; proteiny byly posléze přeneseny konstantním elektrickým proudem na nitrocelulosovou membránu a byla vizualizována pomocí specifické protilátky GCPII-04. endoGCPII označuje endogenní GCPII z lyzátu z buněk LNCaP a rGCPII označuje rekombinantní extracelulární GCPII použitou jako standard GCPII (aminokyselinová sekvence 44-750 původní GCPII). Číslice v řadě nad obrázkem značí číslo dráhy v gelu, resp. na membráně. **1:** marker zdánlivých molekulových hmotností (All Blue Standard; 2  $\mu$ l); **2:** standard GCPII (rGCPII; 50 ng); **3:** standard GCPII (rGCPII; 250 ng); **4:** nanáška (lyzát buněk LNCaP, 5  $\mu$ l); **5:**  $\emptyset$ ; **6:** GCPII-05 FT (5  $\mu$ l); **7:** GCPII-06 FT (5  $\mu$ l); **8:** GCPII-07 FT (5  $\mu$ l); **9:** GCPII-08 FT (5  $\mu$ l); **10:** GCPII-05 E (5  $\mu$ l); **11:** GCPII-06 E (5  $\mu$ l); **12:** GCPII-07 E (5  $\mu$ l); **13:** GCPII-08 E (5  $\mu$ l); **14:**  $\emptyset$ ; **15:**  $\emptyset$

Porovnáním elučních frakcí (dráhy 10-13; **obrázek 15**) je patrné, že protilátky GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 precipitují GCPII podobně a velmi dobře, zatímco protilátka GCPII-05 (dráha 10) GCPII takřka neprecipituje.

## 6. Diskuze

V teoretickém úvodu byly shrnuty současné poznatky o glutamátcarboxypeptidase II (GCPII), bylo pojednáno o protilátkách obecně, o protilátkách proti GCPII a o cíleném dodání léčiv. Pro další zkoumání GCPII je nezbytné mít k dispozici dostatečně čisté protilátky proti tomuto proteinu. Jedním z hlavních použití protilátek proti GCPII je stanovení obsahu GCPII v různých biologických vzorcích. V experimentální části byly protilátky proti extracelulární části nativní GCPII přečištěny pomocí afinitní chromatografie s proteinem A. U protilátek byla posléze stanovena jejich citlivost ke GCPII imunoprecipitací a metodou ELISA.

Purifikaci protilátek afinitní chromatografií s proteinem A lze zhodnotit jako úspěšnou. Protilátky GCPII-05 (**obrázek 11, str. 38**) a GCPII-07 (**obrázek 13, str. 40**) obsahují minimum kontaminantů. Přečištěné protilátky GCPII-06 (**obrázek 12, str. 39**) a GCPII-08 (**obrázek 14, str. 41**) obsahují relativně velké množství kontaminantů. Kontaminanty nejsou pro některá stanovení problémové (ELISA, imunodetekce na nitroceluloseové membráně aj.), avšak pro některé experimenty mohou být tyto proteiny značný problém – zvláště pro biotinylation a kvantitativní metody vyžadující znalost přesné koncentrace protilátek, například povrchovou plasmonovou rezonanci (SPR, z anglického *surface plasmon resonance*). Při použití biotinylovaných protilátek (obsahující i biotinylované proteinové kontaminanty) na např. metodu ELISA nebo SPR, může vznikat značná chyba měření.

Výsledek imunoprecipitace GCPII (**obrázek 15, str. 43**) jasně ukázal, že GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 mají vzhledem k GCPII podobou a velmi dobrou citlivost. Protilátka GCPII-05 se na GCPII neváže, případně velmi málo. Rozdílná afinita protilátek GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 a protilátky GCPII-05 může být způsobena nestabilitou GCPII-05 při eluci nízkým pH (100mM citrát sodný o pH 5,0). Z předchozích experimentů je již známo, že některé protilátky jsou náchylné k eluci nízkým pH. U GCPII-05 byla pozorována ztráta afinity k GCPII v průběhu několika let. Předpoklad o destrukci protilátky GCPII-05 nízkým pH by bylo možné ověřit nebo vyvrátit např. imunoprecipitací GCPII nepurifikovaným roztokem (médiem) obsahujícím tuto protilátku (tento experiment zatím nebyl proveden). Pro experiment byl použit lyzát buněk LNCaP obsahující endogenní GCPII. Tato GCPII je v buňkách pravděpodobně glykosylována různými způsoby, což se při elektroforetické separaci projeví neostrými a rozmazanými zónami – v kontrastu s ostrou zónou

rekombinantní GCPII použité jako standard (forma GCPII zkrácená o 43 aminokyselin na N-konci).

Výsledek imunoprecipitace se shoduje s měřením Jana Tykvarta (nepublikovaná data v naší laboratoři), který citlivost protilátek vůči GCPII určil kvantitativně, pomocí SPR. Protilátky GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 vykazují dobrou citlivost vůči antigenu a GCPII-05 ke GCPII vykazuje velmi nízkou afinitu.

Biotinylace protilátek GCPII-04, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 dopadla úspěšně. Citlivost všech těchto protilátek vůči GCPII byla zachována. Při biotinylaci se u protilátek modifikují aminové skupiny; v případě přítomnosti aminové skupiny v místě vazebné domény mnohdy nastává problém s inaktivací protilátek a ztráty jejich citlivosti vůči antigenu. V případě biotinylace protilátek GCPII-04, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 pravděpodobně nemá aminovou skupinu ve vazebné doméně ani jedna z nich, citlivost všech těchto protilátek vůči GCPII zůstala zachována. Biotinylované protilátky byly úspěšně vyzkoušeny při stanovení GCPII v roztoku metodou ELISA (data neuvedena). Purifikované protilátky mohou být využity ke stanovení obsahu GCPII ve vzorcích metodou ELISA - toto stanovení bylo v naší laboratoři zavedeno a optimalizováno Václavem Navrátilem (nepublikovaná data v naší laboratoři). Pro detekci nativní GCPII v biologických vzorcích se zdá být nejvhodnější GCPII-07. ELISA s touto protilátkou umožňuje GCPII přítomnou ve vzorku detekovat i v koncentracích desítek pikomolů na litr.

Metodou ELISA bylo dokázáno, že protilátkám GCPII-04, GCPII-06 a GCPII-07 nebyla biotinylací pozměněna afinita vůči GCPII, přičemž protilátce GCPII-08 se po biotinylaci afinita k GCPII snížila zhruba na polovinu (data neuvedena). Do budoucna by bylo přínosné provést imunoprecipitaci GCPII z různých vzorků (lyzát buněk LNCaP, krevní plasma, lyzát tkání aj.) paralelně nebiotinylovanými a biotinylovanými protilátkami. V biologických vzorcích, zvláště v krevní plasmě, jsou ve velkém množství přítomny různé IgG protilátky, jež při imunoprecipitaci kompetují vazbu na protein G s již navázanými protilátkami proti GCPII - z tohoto důvodu není možné stanovit obsah GCPII v krevní plasmě nebiotinylovanými protilátkami. Při použití biotinylovaných protilátek na imunoprecipitaci GCPII v krevní plasmě lze použít NeutrAvidin Sepharosu místo Protein G Sepharosu. NeutrAvidin Sepharosa váže specificky a velmi silně biotin, jenž je na protilátku připojen kovalentní vazbou. Použitím NeutrAvidinu lze eliminovat problém s kompetiční vazbou IgG ve vzorku a protilátkami proti GCPII v případě proteinu G.

Cílem dalšího výzkumu by bylo objasnit důvody, které vedou při purifikaci k inaktivaci protilátky GCPII-05 a ověřit, zda se opravdu jedná o vliv nízkého pH při eluci. Nutno ale zmínit, že molekuly protilátek jsou velmi stabilní struktury a krátkodobá hodnota pH 5 v roztoku by neměla být pro tyto proteiny destabilizující faktor. V budoucnu by bylo přínosné vyzkoušet imunoprecipitaci GCPII paralelně s protilátkou GCPII-05 z netknutého média hybridomů a s purifikovanou protilátkou GCPII-05.

Protilátka GCPII-07 má ze všech čtyř protilátek největší afinitu vůči GCPII. Její afinita je srovnatelná s nejznámější a v oboru nejdéle používanou protilátkou J591, která je také využívána v klinickém výzkumu. Velký výtěžek a čistota protilátky GCPII-07 získané při purifikaci a její velká afinita vůči GCPII ji určuje k tomu, aby se stala standardně používanou protilátkou v naší laboratoři a byla zavedena např. pro metodu ELISA a imunofluorescenční experimenty zjišťující nativní GCPII.

Budoucí experiment zkoumající optimální uchovávací podmínky pro přečištěné protilátky je velmi přínosný, protože nevhodně zvolené uchovávací podmínky mohou být pro protilátky ničující. Přídavek různých aditiv (glycerol, detergenty aj.) do roztoku může ochránit protilátky např. před denaturací způsobenou zamražením. Aditivum může mít též funkci stabilizátoru (BSA, detergent aj.), jenž omezí samovolnou denaturaci protilátek při dlouhodobém uchovávání.

## 7. Závěr

1. Afinitní chromatografií s proteinem A byly purifikovány 4 monoklonální protilátky proti nativní GCPII (GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08) o výtěžku mezi 1,4 mg a 7,9 mg
2. Z výsledků imunoprecipitace GCPII protilátkami GCPII-05, GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 vyplývá, že protilátky GCPII-06, GCPII-07 a GCPII-08 precipitují GCPII podobně a velmi dobře, zatímco protilátka GCPII-05 GCPII takřka neprecipituje. Relativní citlivost protilátek byla porovnána též metodou ELISA, výsledek se shoduje s výsledkem imunoprecipitace
3. Část přečištěných protilátek byla úspěšně biotinylována; po biotinylaci si protilátky zachovaly schopnost vázat GCPII
4. Byl naplánován experiment zjišťující optimální uchovávací podmínky pro přečištěné protilátky

## 8. Seznam zkratek

3E6	myší monoklonální protilátka proti GCPII
2-PMPA	kyselina 2-(fosfonomethyl)pentandiová
2-MPPA	kyselina 2-(3-merkaptopropyl)pentandiová
7E11-C5.3	myší monoklonální protilátka proti GCPII
Ab	protilátka (z angl. <i>antibody</i> )
ADC	protilátky konjugované s léčivem (z angl. <i>antibody drug conjugate</i> )
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumine</i> )
DM1	maytansinoid mertansin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	z angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GCPII	glutamátcarboxypeptidasa II
GCPII-0n	myší monoklonální protilátka proti GCPII; n značí konkrétní druh protilátky, resp. hybridomového klonu produkujícího protilátku
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
J591	myší monoklonální protilátka proti GCPII
LNCaP	buněčná linie odvozená od metastáz karcinomu prostaty v lymfatických uzlinách (z angl. <i>lymph node carcinoma of the prostate</i> )
mAb	monoklonální protilátka (z angl. <i>monoclonal antibody</i> )
MWCO	limit molekulové hmotnosti (z angl. <i>molecular weight cut off</i> )
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NAAG	<i>N</i> -acetyl-L-aspartyl-L-glutamát
PBS	fosfátový pufr (z angl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PSMA	membránový antigen specifický pro prostatu (z angl. <i>prostate-specific membrane antigen</i> ); synonymum GCPII
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. <i>sodium dodecylsulphate</i> )



SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících a redukčních podmínek v přítomnosti SDS
SPR	povrchová plasmonová rezonance (z angl. <i>surface plasmon resonance</i> )
TBS	pufr s Tris a NaCl (z angl. <i>tris-buffered saline</i> )
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	objemový zlomek (objem složky/objem roztoku)
w/v	poměr hmotnost složky/objem roztoku
w/w	hmotnostní zlomek (hmotnost složky/hmotnost roztoku)
ZJ-43	kyselina N-[[[(1S)-1-karboxy-3-methylbutyl]amino]karbonyl]-L-glutamová

## 9. Seznam použité literatury

1. Mesters, J.R., Barinka, C., Li, W., Tsukamoto, T., Majer, P., Slusher, B.S., Konvalinka, J., Hilgenfeld, R.: *Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer*. EMBO J **2006**; 25, 1375-1384.
2. Schulke, N., Varlamova, O.A., Donovan, G.P., Ma, D., Gardner, J.P., Morrissey, D.M., Arrigale, R.R., Zhan, C., Chodera, A.J., Surowitz, K.G., Maddon, P.J., Heston, W.D., Olson, W.C.: *The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A **2003**; 100, 12590-12595.
3. O'Keefe, D.S., Su, S.L., Bacich, D.J., Horiguchi, Y., Luo, Y., Powell, C.T., Zandvliet, D., Russell, P.J., Molloy, P.L., Nowak, N.J., Shows, T.B., Mullins, C., Vonder Haar, R.A., Fair, W.R., Heston, W.D.: *Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene*. Biochim Biophys Acta **1998**; 1443, 113-127.
4. Barinka, C., Rinnova, M., Sacha, P., Rojas, C., Majer, P., Slusher, B.S., Konvalinka, J.: *Substrate specificity, inhibition and enzymological analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II*. J Neurochem **2002**; 80, 477-487.
5. Holmes, E.H., Greene, T.G., Tino, W.T., Boynton, A.L., Aldape, H.C., Misrock, S.L., Murphy, G.P.: *Analysis of glycosylation of prostate-specific membrane antigen derived from LNCaP cells, prostatic carcinoma tumors, and serum from prostate cancer patients*. Prostate Suppl **1996**; 7, 25-29.
6. Robinson, M.B., Blakely, R.D., Couto, R., Coyle, J.T.: *Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain*. J Biol Chem **1987**; 262, 14498-14506.
7. Carter, R.E., Feldman, A.R., Coyle, J.T.: *Prostate-specific membrane antigen is a hydrolase with substrate and pharmacologic characteristics of a neuropeptidase*. Proc Natl Acad Sci U S A **1996**; 93, 749-753.

8. Pinto, J.T., Suffoletto, B.P., Berzin, T.M., Qiao, C.H., Lin, S., Tong, W.P., May, F., Mukherjee, B., Heston, W.D.: *Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells*. Clin Cancer Res **1996**; 2, 1445-1451.
9. Chang, S.S., Reuter, V.E., Heston, W.D., Bander, N.H., Grauer, L.S., Gaudin, P.B.: *Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature*. Cancer Res **1999**; 59, 3192-3198.
10. Silver, D.A., Pellicer, I., Fair, W.R., Heston, W.D., Cordon-Cardo, C.: *Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues*. Clin Cancer Res **1997**; 3, 81-85.
11. Rajasekaran, A.K., Anilkumar, G., Christiansen, J.J.: *Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?* Am J Physiol Cell Physiol **2005**; 288, C975-981.
12. Slusher, B.S., Vornov, J.J., Thomas, A.G., Hurn, P.D., Harukuni, I., Bhardwaj, A., Traystman, R.J., Robinson, M.B., Britton, P., Lu, X.C., Tortella, F.C., Wozniak, K.M., Yudkoff, M., Potter, B.M., Jackson, P.F.: *Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury*. Nat Med **1999**; 5, 1396-1402.
13. Conway, R.E., Petrovic, N., Li, Z., Heston, W., Wu, D., Shapiro, L.H.: *Prostate-specific membrane antigen regulates angiogenesis by modulating integrin signal transduction*. Mol Cell Biol **2006**; 26, 5310-5324.
14. Liu, H., Moy, P., Kim, S., Xia, Y., Rajasekaran, A., Navarro, V., Knudsen, B., Bander, N.H.: *Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium*. Cancer Res **1997**; 57, 3629-3634.
15. Chang, S.S., O'Keefe, D.S., Bacich, D.J., Reuter, V.E., Heston, W.D., Gaudin, P.B.: *Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature*. Clin Cancer Res **1999**; 5, 2674-2681.

16. Horoszewicz, J.S., Kawinski, E., Murphy, G.P.: *Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients*. *Anticancer Res* **1987**; 7, 927-935.
17. Klusak, V., Barinka, C., Plechanovova, A., Mlcochova, P., Konvalinka, J., Rulisek, L., Lubkowski, J.: *Reaction mechanism of glutamate carboxypeptidase II revealed by mutagenesis, X-ray crystallography, and computational methods*. *Biochemistry* **2009**; 48, 4126-4138.
18. Thomas, A.G., Wozniak, K.M., Tsukamoto, T., Calvin, D., Wu, Y., Rojas, C., Vornov, J., Slusher, B.S.: *Glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) inhibition as a novel therapeutic strategy*. *Adv Exp Med Biol* **2006**; 576, 327-337; discussion 361-323.
19. Tortella, F.C., Lin, Y., Ved, H., Slusher, B.S., Dave, J.R.: *Neuroprotection produced by the NAALADase inhibitor 2-PMPA in rat cerebellar neurons*. *Eur J Pharmacol* **2000**; 402, 31-37.
20. Bacich, D.J., Wozniak, K.M., Lu, X.C., O'Keefe, D.S., Callizot, N., Heston, W.D., Slusher, B.S.: *Mice lacking glutamate carboxypeptidase II are protected from peripheral neuropathy and ischemic brain injury*. *J Neurochem* **2005**; 95, 314-323.
21. Yamamoto, T., Hirasawa, S., Wroblewska, B., Grajkowska, E., Zhou, J., Kozikowski, A., Wroblewski, J., Neale, J.H.: *Antinociceptive effects of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) peptidase inhibitors ZJ-11, ZJ-17 and ZJ-43 in the rat formalin test and in the rat neuropathic pain model*. *Eur J Neurosci* **2004**; 20, 483-494.
22. Ghadge, G.D., Slusher, B.S., Bodner, A., Canto, M.D., Wozniak, K., Thomas, A.G., Rojas, C., Tsukamoto, T., Majer, P., Miller, R.J., Monti, A.L., Roos, R.P.: *Glutamate carboxypeptidase II inhibition protects motor neurons from death in familial amyotrophic lateral sclerosis models*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100, 9554-9559.
23. Zhou, J., Neale, J.H., Pomper, M.G., Kozikowski, A.P.: *NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy*. *Nat Rev Drug Discov* **2005**; 4, 1015-1026.
24. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4. vydání (2002). Garland Science, New York. 1548 stran.

25. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., *Lehninger principles of biochemistry*. 5. vydání (2008). W.H. Freeman, New York.
26. Bartůňková, J., Hořejší V., *Základy imunologie*. 4. vydání (2009). Nakladatelství Triton, Praha. 316 stran.
27. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., *Biochemistry*. 6. vydání (2007). W.H. Freeman, New York.
28. Troyer, J.K., Feng, Q., Beckett, M.L., Wright, G.L., Jr.: *Biochemical characterization and mapping of the 7E11-C5.3 epitope of the prostate-specific membrane antigen*. *Urol Oncol* **1995**; 1, 29-37.
29. Israeli, R.S., Powell, C.T., Corr, J.G., Fair, W.R., Heston, W.D.: *Expression of the prostate-specific membrane antigen*. *Cancer Res* **1994**; 54, 1807-1811.
30. Murphy, G.P., Boynton, A.L., Holmes, E.H., Tino, W.T.: *Monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen*. United States Patent 6,150,508 (**2000**),
31. Sacha, P., Zamecnik, J., Barinka, C., Hlouchova, K., Vicha, A., Mlcochova, P., Hilgert, I., Eckschlager, T., Konvalinka, J.: *Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain*. *Neuroscience* **2007**; 144, 1361-1372.
32. Elsasser-Beile, U., Wolf, P., Gierschner, D., Buhler, P., Schultze-Seemann, W., Wetterauer, U.: *A new generation of monoclonal and recombinant antibodies against cell-adherent prostate specific membrane antigen for diagnostic and therapeutic targeting of prostate cancer*. *Prostate* **2006**; 66, 1359-1370.
33. Hajdúch, M., Cwiertka, K., Trojanec, R., Špačková, K.: *Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii*. *Klinická farmakologie a farmacie* **2004**; 18, 165-170.
34. Press, O.W., Leonard, J.P., Coiffier, B., Levy, R., Timmerman, J.: *Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2001**, 221-240.
35. Shaw, T., Quan, J., Totoritis, M.C.: *B-cell therapy for rheumatoid arthritis: the Rituximab (anti-CD20) experience*. *Ann Rheum Dis* **2003**; 62, 55-59.

36. Dillman, R.O.: *Magic bullets at last! Finally--approval of a monoclonal antibody for the treatment of cancer!!!* Cancer Biother Radiopharm **1997**; 12, 223-225.
37. Dillman, R.O.: *Monoclonal antibody therapy for lymphoma: an update.* Cancer Pract **2001**; 9, 71-80.
38. Smith, J.A.: *Alemtuzumab: a new option for refractory chronic lymphocytic leukemia?* Cancer Pract **2001**; 9, 211-213.
39. Dumont, F.J.: *CAMPATH (alemtuzumab) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and beyond.* Expert Rev Anticancer Ther **2002**; 2, 23-35.
40. Vallbohmer, D., Zhang, W., Gordon, M., Yang, D.Y., Yun, J., Press, O.A., Rhodes, K.E., Sherrod, A.E., Iqbal, S., Danenberg, K.D., Groshen, S., Lenz, H.J.: *Molecular determinants of cetuximab efficacy.* J Clin Oncol **2005**; 23, 3536-3544.
41. Giusti, R.M., Shastri, K.A., Cohen, M.H., Keegan, P., Pazdur, R.: *FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix).* Oncologist **2007**; 12, 577-583.
42. Shockley, T.R., Lin, K., Nagy, J.A., Tompkins, R.G., Dvorak, H.F., Yarmush, M.L.: *Penetration of tumor tissue by antibodies and other immunoproteins.* Ann N Y Acad Sci **1991**; 618, 367-382.
43. Frei, E., 3rd: *Combination cancer therapy: Presidential address.* Cancer Res **1972**; 32, 2593-2607.
44. Chari, R.V.: *Targeted delivery of chemotherapeutics: tumor-activated prodrug therapy.* Adv Drug Deliv Rev **1998**; 31, 89-104.
45. Ladino, C.A., Chari, R.V., Bourret, L.A., Kedersha, N.L., Goldmacher, V.S.: *Folate-maytansinoids: target-selective drugs of low molecular weight.* Int J Cancer **1997**; 73, 859-864.
46. Leamon, C.P., Low, P.S.: *Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis.* Proc Natl Acad Sci U S A **1991**; 88, 5572-5576.

47. Jayaprakash, S., Wang, X., Heston, W.D., Kozikowski, A.P.: *Design and synthesis of a PSMA inhibitor-doxorubicin conjugate for targeted prostate cancer therapy*. ChemMedChem **2006**; 1, 299-302.
48. Ding, P., Helquist, P., Miller, M.J.: *Design and synthesis of a siderophore conjugate as a potent PSMA inhibitor and potential diagnostic agent for prostate cancer*. Bioorg Med Chem **2008**; 16, 1648-1657.
49. Adair, J.R., Howard, P.W., Hartley, J.A., Williams, D.G., Chester, K.A.: *Antibody-drug conjugates - a perfect synergy*. Expert Opin Biol Ther **2012**; 12, 1191-1206.
50. Liu, H., Rajasekaran, A.K., Moy, P., Xia, Y., Kim, S., Navarro, V., Rahmati, R., Bander, N.H.: *Constitutive and antibody-induced internalization of prostate-specific membrane antigen*. Cancer Res **1998**; 58, 4055-4060.
51. Rajasekaran, S.A., Anilkumar, G., Oshima, E., Bowie, J.U., Liu, H., Heston, W., Bander, N.H., Rajasekaran, A.K.: *A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen*. Mol Biol Cell **2003**; 14, 4835-4845.
52. Hamblett, K.J., Senter, P.D., Chace, D.F., Sun, M.M., Lenox, J., Cerveny, C.G., Kissler, K.M., Bernhardt, S.X., Kopcha, A.K., Zabinski, R.F., Meyer, D.L., Francisco, J.A.: *Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate*. Clin Cancer Res **2004**; 10, 7063-7070.
53. Alley, S.C., Benjamin, D.R., Jeffrey, S.C., Okeley, N.M., Meyer, D.L., Sanderson, R.J., Senter, P.D.: *Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates*. Bioconjug Chem **2008**; 19, 759-765.
54. Ducry, L., Stump, B.: *Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies*. Bioconjug Chem **2010**; 21, 5-13.
55. Govindan, S.V., Goldenberg, D.M.: *Designing immunoconjugates for cancer therapy*. Expert Opin Biol Ther **2012**; 12, 873-890.
56. Hinkle, G.H., Burgers, J.K., Neal, C.E., Texter, J.H., Kahn, D., Williams, R.D., Maguire, R., Rogers, B., Olsen, J.O., Badalament, R.A.: *Multicenter*

- radioimmunoscintigraphic evaluation of patients with prostate carcinoma using indium-111 capromab pendetide. Cancer* **1998**; 83, 739-747.
57. Lopes, A.D., Davis, W.L., Rosenstraus, M.J., Uveges, A.J., Gilman, S.C.: *Immunohistochemical and pharmacokinetic characterization of the site-specific immunoconjugate CYT-356 derived from antiprostata monoclonal antibody 7E11-C5. Cancer Res* **1990**; 50, 6423-6429.
  58. Bander, N.H., Trabulsi, E.J., Kostakoglu, L., Yao, D., Vallabhajosula, S., Smith-Jones, P., Joyce, M.A., Milowsky, M., Nanus, D.M., Goldsmith, S.J.: *Targeting metastatic prostate cancer with radiolabeled monoclonal antibody J591 to the extracellular domain of prostate specific membrane antigen. J Urol* **2003**; 170, 1717-1721.
  59. Milowsky, M.I., Nanus, D.M., Kostakoglu, L., Sheehan, C.E., Vallabhajosula, S., Goldsmith, S.J., Ross, J.S., Bander, N.H.: *Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors. J Clin Oncol* **2007**; 25, 540-547.
  60. Akhtar, N.H., Pail, O., Saran, A., Tyrell, L., Tagawa, S.T.: *Prostate-specific membrane antigen-based therapeutics. Adv Urol* **2012**; 2012, 973820.
  61. O'Donoghue, J.A., Bardies, M., Wheldon, T.E.: *Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. J Nucl Med* **1995**; 36, 1902-1909.
  62. Milowsky, M.I., Nanus, D.M., Kostakoglu, L., Vallabhajosula, S., Goldsmith, S.J., Bander, N.H.: *Phase I trial of yttrium-90-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for androgen-independent prostate cancer. J Clin Oncol* **2004**; 22, 2522-2531.
  63. Bander, N.H., Milowsky, M.I., Nanus, D.M., Kostakoglu, L., Vallabhajosula, S., Goldsmith, S.J.: *Phase I trial of 177lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer. J Clin Oncol* **2005**; 23, 4591-4601.



64. Bander, N.H., Nanus, D.M., Milowsky, M.I., Kostakoglu, L., Vallabahajosula, S., Goldsmith, S.J.: *Targeted systemic therapy of prostate cancer with a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen*. *Semin Oncol* **2003**; 30, 667-676.
65. Wu, X., Ojima, I.: *Tumor specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates*. *Curr Med Chem* **2004**; 11, 429-438.
66. Ma, D., Hopf, C.E., Malewicz, A.D., Donovan, G.P., Senter, P.D., Goeckeler, W.F., Maddon, P.J., Olson, W.C.: *Potent antitumor activity of an auristatin-conjugated, fully human monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen*. *Clin Cancer Res* **2006**; 12, 2591-2596.
67. Henry, M.D., Wen, S., Silva, M.D., Chandra, S., Milton, M., Worland, P.J.: *A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer*. *Cancer Res* **2004**; 64, 7995-8001.
68. Fracasso, G., Bellisola, G., Cingarlini, S., Castelletti, D., Prayer-Galetti, T., Pagano, F., Tridente, G., Colombatti, M.: *Anti-tumor effects of toxins targeted to the prostate specific membrane antigen*. *Prostate* **2002**; 53, 9-23.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka