

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Nikola Bělousová

Lidská glutamát karboxypeptidasa II (GCPII) a deriváty protilátek využitelné
k její detekci

Antibody derivatives for the detection of human glutamate carboxypeptidase II

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 6. 5. 2016

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Cyrilovi Bařinkovi, Ph.D. za poskytnutí odborných konzultací, za veškeré připomínky a čas, který mi věnoval. Dále upřímně děkuji konzultantce mé práce RNDr. Zorce Novákové, Ph.D. za laskavost, ochotu a poskytnutí velmi cenných rad. Dále jí také děkuji za obrovskou dávku trpělivosti a vstřícnosti, která mi velmi pomáhala při zpracování bakalářské práce. V neposlední řadě děkuji svým blízkým, kteří mi projevovali velkou podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Rakovina prostaty je nejčastěji diagnostikované nádorové onemocnění mužů. V pokročilém stadiu je toto onemocnění velmi špatně léčitelné, a proto je včasná diagnostika prostatického nádorového bujení zásadní pro úspěšnou léčbu. Jedním z důležitých biomarkerů karcinomu prostaty je glutamát karboxypeptidasa II (GCPII). Úroveň exprese GCPII v prostatické tkáni se výrazně zvyšuje s progresí nádoru od benigní hyperplasie až po agresivní metastatickou formu. Cílem současného biomedicínálního výzkumu GCPII je vývoj terapeutických a diagnostických modalit založených buď na nízkomolekulárních sloučeninách nebo na makromolekulách specificky rozpoznávajících tento protein. Protilátky jsou preferovaným typem makromolekul využívaných v klinické praxi. Z důvodů lepší využitelnosti v biomedicínských aplikacích jsou nicméně přirozené protilátky obvykle modifikovány metodami proteinového inženýrství. Tato práce shrnuje současné poznatky o struktuře a funkci GCPII a o jeho využití jako biomarkeru rakoviny prostaty.

Klíčová slova: glutamát karboxypeptidasa II, protilátky, rekombinantní protilátkové deriváty, proteinové inženýrství, malé molekuly specifické pro GCPII

Abstract

Prostate cancer is the most common neoplasia in men. The therapy of progressed tumor is usually not efficient and early diagnosis is therefore crucial for successful treatment. Glutamate carboxypeptidase II (GCPII) is an established marker for prostate cancer imaging and therapy as the neoplastic transformation of prostate tissue is accompanied by the substantial increase of GCPII expression levels. Currently used GCPII-specific diagnostic and therapeutic reagents can be broadly categorized as small-molecule ligands or macromolecules. Antibodies are preferred macromolecules used in clinic. At the same time, however, protein engineering is regularly applied to modify natural antibodies to enhance their utility in biomedicine applications. This thesis summarizes the current knowledge about the GCPII structure and function and its role in diagnosis and therapy of prostate carcinoma.

Key words: glutamate carboxypeptidase II, antibody, recombinant antibody fragment, protein engineering, small molecule GCPII ligand

Seznam zkratk

2-MPPA	kyselina 2-(3-merkaptopropyl) pentandiová
2-PMPA	kyselina 2-(fosfonomethyl)pentandiová
Å	angström
Ac-Asp	N-acetyl aspartát
CDR	úseky určující komplementaritu
C _L	konstantní doména lehkého řetězce
Fab	fragment vázající antigen
Fc	krystalizující fragment
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FOLH1	folátová hydrolasa
Fv	variabilní fragment protilátky
GCPII	glutamát karboxypeptidasa II
GCPIII	glutamát karboxypeptidasa III
C _H	konstantní doména těžkého řetězce
CHO	buněčná linie odvozená od vaječníku čínského křečka
Ig	imunoglobulin
mGluR3	metabotropní glutamátový receptor 3
NAAG	N-acetyl aspartylglutamát
NAALADasa	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátová peptidasa
NMDAR	N-methyl-D-aspartátový receptor
PGCP	plasmatická glutamátová karboxypeptidáza
PSM	pro prostatu specifický membránový antigen – sestřihová varianta
PSMA	pro prostatu specifický membránový antigen
PSMAL	pro prostatu specifický membránový antigen L
scFv	jednořetězcový variabilní fragment protilátky
TGFβ	transformující růstový faktor β
V _H	variabilní doména těžkého řetězce
V _L	variabilní doména lehkého řetězce

Obsah

1	ÚVOD.....	2
2	GLUTAMÁT KARBOXYPEPTIDASA II (GCPII)	3
2.1	Charakteristika GCPII	3
2.2	Struktura GCPII	3
2.3	Enzymy příbuzné GCPII proteinu.....	6
2.4	Fyziologická funkce GCPII	6
2.4.1	Funkce GCPII v nervové tkáni	7
2.4.2	Funkce GCPII v tkáni tenkého střeva.....	8
2.5	Patofyziologický výskyt GCPII	9
2.5.1	Výskyt GCPII v nádorové tkáni prostaty	9
2.5.2	Výskyt GCPII v nově vynikající cévní tkáni nádorů	10
3	DETEKČNÍ ČINIDLA CÍLENÁ NA GCPII	10
3.1	Malé molekuly specificky vážící GCPII	10
3.2	Protilátky specificky reagující s GCPII	13
4	PROTILÁTKY.....	14
4.1	Struktura protilátek.....	14
4.1.1	Imunoglobulinové třídy	16
4.2	Protilátky v experimentální praxi.....	17
4.2.1	Polyklonální protilátky	17
4.2.2	Monoklonální protilátky	17
4.2.3	Rekombinantní protilátky	18
4.2.4	Chimerní a humanizované protilátky	18
4.2.5	Deriváty protilátek.....	20
4.2.6	Produkce imunoglobulinů.....	22
5	Závěr.....	24
	Seznam literatury.....	25

1 ÚVOD

Glutamát karboxypeptidasa II je tkáňově specifická hydrolasa vyskytující se v nejvyšší míře v nervovém systému a v karcinomu prostaty. V nervové tkáni je GCPII spoluzodpovědná za produkci důležitého neurotransmiteru glutamátu. Nadměrná produkce glutamátu však může způsobit glutamátovou neurotoxicitu spojenou s dalšími neurologickými poruchami. Snížení hladiny glutamátu díky specifické inhibici GCPII vede v preklinických modelech k potlačení příznaků některých neurologických chorob, např. roztroušené sklerózy, mrtvice a schizofrenie. Vývoj nových látek specificky inhibujících GCPII je tedy důležitý pro zlepšení prognózy zmíněných neurologických onemocnění.

Rakovina prostaty je jedno z nejčastějších nádorových onemocnění mužů. Specifickým rysem tohoto onemocnění je vzrůstající produkce GCPII v nádorové tkáni spojená s progresí nádoru. Díky specifické expresi je GCPII molekulou vhodnou pro diagnostiku a terapii karcinomu prostaty. Pro úspěšnou léčbu tohoto onemocnění je zásadní včasná diagnostika, protože v pokročilém stadiu je onemocnění obtížně léčitelné. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny nové nástroje schopné detekce velmi malého množství GCPII, které je přítomno v počátečních stádiích nádorového bujení. Cílem vývoje diagnostických preparátů je především zlepšit jejich farmakokinetické parametry důležité pro specifické značení GCPII v tkáních. Vedle syntézy nových nízkomolekulárních látek se za účelem detekce GCPII v nádorových tkáních vyvíjejí především nové protilátkové deriváty. Různé druhy protilátkových fragmentů a chimérických molekul jsou konstruovány rekombinantními technikami a metodami proteinového inženýrství.

Tato práce má sloužit k seznámení s patofyziologickou rolí GCPII v lidském těle, s jeho strukturou a s využitím tohoto enzymu jakožto diagnostického a terapeutického cíle. Práce má dále seznámit čtenáře s rychle se rozvíjícím oborem vývoje derivátů odvozených z imunoglobulinových molekul.

2 GLUTAMÁT KARBOXYPEPTIDASA II (GCPII)

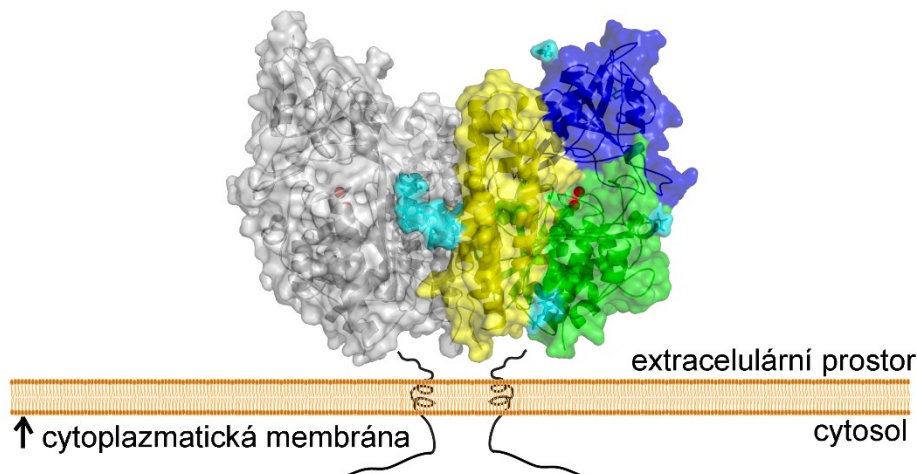
2.1 Charakteristika GCPII

Glutamát karboxypeptidasa II (GCPII) také známá jako PSMA (prostate specific membrane antigen; pro prostatu specifický membránový antigen), NAALADasa (N-acetyled-alpha-linked acidic dipeptidase; N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátová peptidasa) a FOLH1 (folate hydrolase; folátová hydrolasa) je C-terminální exopeptidasa závislá na zinku, která je ukotvená v cytoplazmatické membráně buněk. Nejvíce se nachází v nervové tkáni, v ledvinách, v tkáni tenkého střeva a především v patologických tkáních prostaty (Barinka et al. 2012).

2.2 Struktura GCPII

GCPII je enzym složený ze 750 aminokyselin. Je to transmembránový protein sestávající z krátké N-koncové oblasti umístěné v cytoplazmě (aminokyseliny 1-18), z transmembránové části procházející plazmatickou membránou ve formě α -helixu (aminokyseliny 19-43) a z velké extracelulární části (aminokyseliny 44-750; Obr. 1). N-koncová část v cytosolu je s velkou pravděpodobností nestrukturovaná a interaguje s proteiny asociovanými s cytoskeletem, které řídí endocytózu a recyklaci enzymu (Anilkumar et al. 2003). Většina molekuly GCPII se nicméně nachází v extracelulárním prostoru, kde se svou enzymatickou aktivitou účastní několika fyziologických procesů. Za fyziologických podmínek tvoří protein homodimer, jehož existence je zásadní pro hydrolytickou aktivitu enzymu (Schulke et al. 2003). Aktivní místa obou podjednotek jsou na sobě strukturně nezávislá. GCPII je silně glykosylovaná, primární struktura obsahuje 10 N-glykosylačních míst a vázané cukry mohou tvořit až 25% celkové molekulové hmotnosti enzymu. Glykosylace proteinu výrazně ovlivňuje jeho enzymatickou aktivitu, stabilitu, apikální třídění a asociaci s lipidovými mikrodomény (Castelletti et al., 2008; Barinka et al., 2004)

Terciární struktura enzymu je velmi podobná struktuře transferinového receptoru. Extracelulární část GCPII je složena ze tří domén: proteasové, apikální a C-terminální. Všechny tři domény se podílí na struktuře vazebného místa pro substrát a tedy přítomnost všech tří domén je nezbytná pro správné fungování enzymu (Mesters et al. 2006; Davis et al. 2005).



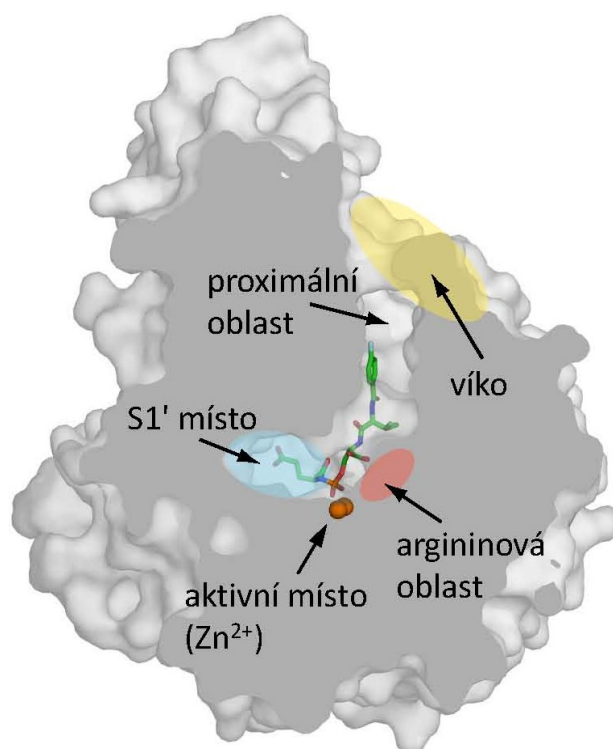
Obr. 1 Schéma struktury homodimeru GCPII. Extracelulární část molekuly GCPII je tvořena proteasovou doménou (zelená), C-terminální doménou (žlutá) a apikální doménou (modrá). Součástí aktivního místa jsou dva atomy zinku (červená). Cukerné zbytky jsou zbarveny světle modře. Převzato a upraveno z (Pavliceck et al. 2012).

Proteasovou doménu tvoří sedm β -skládaných listů obklopených deseti α -helixy. Součástí této domény je flexibilní smyčka (aminokyseliny 541–548), která tvoří „vstupní víko“ (Barinka et al. 2008).

Apikální doména je vložena mezi první a druhý β -skládaný list proteasové domény a je tvořena dvěma centrálními β -skládanými listy obklopenými čtyřmi α -helixy.

C-terminální doména, označovaná také jako helikální doména, je tvořena čtyřmi svazky α -helixů zahrnující helixy 15,17,18,19 a 20. Mezi helixy 18-19 jsou dvě smyčky. První smyčka (aminokyseliny 679-690) interaguje s proteasovou doménou, zatímco druhá (aminokyseliny 692-704) tvoří z části aktivní místo a váže molekulu inhibitoru nebo substrátu ve farmakoforové kapse. Tato sensorová smyčka při vazbě substrátu či inhibitoru k enzymu podstupuje zásadní strukturální změny (Mesters et al. 2006).

Dutina pro vazbu substrátu je nepravidelně tvarovaný tunel o délce přibližně 30 Å, zakončený farmakoforovou kapsou (Obr. 2). Tento tunel je chráněn vstupním víkem, které kontroluje komunikaci mezi extracelulárním prostředím a vnitřní dutinou enzymu.



Obr. 2 Schéma struktury vnitřní dutiny GCPII. *Vnitřní dutina má tvar nepravidelně tvarovaného tunelu končícího farmakoforovou kapsou (S1' místo; světle modrá). Tento tunel je chráněn vstupním víkem (žlutá), které může být v otevřeném a uzavřeném stavu. Dále je zobrazena argininová oblast (červená), která interaguje se záporně nabitými zbytky substrátu/inhibitoru. Aktivní místo je zobrazeno dvěma zinečnatými ionty, které jsou pro vazbu substrátu zásadní. Ve vnitřní dutině je naznačena pozice a orientace vysokoafinního inhibitoru na bázi fosforamidátu. Převzato a upraveno z (Novakova et al. 2016).*

Dutina pro vazbu substrátu může být rozdělena do dvou částí, proximální oblasti a S1' místa (farmakoforová kapsa). Proximální oblast zahrnuje prostor v tunelu od vstupu, případně zavřeného víka, k aktivnímu místu charakterizovanému přítomností dvou zinečnatých iontů (Zn^{2+}). Stěna proximální oblasti poblíž aktivního místa je charakterizována přítomností tří argininových zbytků - Arg534, Arg536 a Arg463. Tato tzv. argininová oblast je důležitá pro interakce se záporně nabitými skupinami na substrátu nebo inhibitoru. Strukturu argininové oblasti stabilizuje přítomnost chloridového iontu (Barinka et al. 2007; Barinka et al. 2008).

Aktivní místo enzymu se nachází mezi proximální oblastí a S1' kapsou a jeho součástí jsou dva zinečnaté ionty. Katalytický Zn^{2+} je koordinován postranními řetězci His553, Asp387 a Glu425 a kokatalytický Zn^{2+} je vázán zbytkem His377, Asp387, Glu425 a Asp453. Ionty Zn^{2+} hrají zásadní roli v katalytickém mechanismu a také jsou velmi důležité pro návrh nových vysokoafinních inhibitorů. Důležitou součástí nově syntetizovaných inhibitorů GCPII je tedy funkční skupina vážící zinek, která zajišťuje vysokou afinitu daného inhibitoru. Mezi

tyto skupiny patří například močovina, fosfonát, fosfinát, fosforamidát a hydroxamát (Barinka et al. 2007; Mlčochová et al. 2007).

S1' kapsa je důležitá část vnitřní dutiny GCPII, která je podstatná pro substrátovou specifitu enzymu. Kapsa se nachází na konci vnitřní dutiny a má velikost zhruba $8 \times 8 \times 8$ Å. Kapsa je charakteristická poměrně rigidní konformací s jedinou výjimkou glutarátového senzoru (Tyr692-Ser704), který se může vzdálit od kapsy až o 4 Å, čímž výrazně zvětšuje její povrch. Do S1' místa se váže glutamát a glutamátu podobné motivy (Barinka et al. 2007). Z tohoto důvodu mají substráty a inhibitory specifické pro GCPII na svém C konci vždy glutamát nebo jeho deriváty. Specifita GCPII vůči glutamátu je zajištěna především složitou sítí polárních interakcí s postranními skupinami aminokyselin tvořících S1' místo. Zásadní je interakce α -karboxylové skupiny glutamátu s guanidinovou skupinou Arg210 a s hydroxylovou skupinou aminokyselinového zbytku Tyr552 a Tyr700 (Mlčochová et al. 2007).

2.3 Enzymy příbuzné GCPII proteinu

Podle orientace polypeptidového řetězce v membráně řadíme GCPII do druhé třídy transmembránových glykoproteinů. Na základě sekvenční homologie a katalytického mechanismu je GCPII součástí peptidasové rodiny M28. Do této rodiny je zařazena například i aminopeptidasa S, aminopeptidasa Ap1 a tranferinový receptor (Lambert & Mitchell 2007).

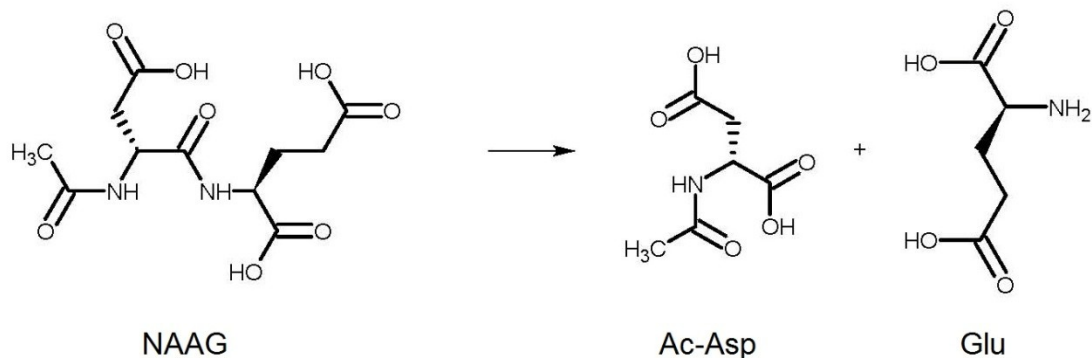
Byly identifikovány čtyři paralogy GCPII: GCPIII, NAALADAsa L, NAALADAsa L2 a PSMAL, a rovněž několik sestříhových variant (PSM', PSM-C, PSM-D, PSM-E a PSM-F). PSMAL protein je exprimován v ledvinách a v játrech, jeho aminokyselinová sekvence je z 97 % shodná s GCPII, ale na rozdíl od GCPII je lokalizován v cytoplazmě a jeho fyziologická funkce není známá. GCPIII vykazuje 67% sekvenční identitu s GCPII. Nachází se v mnohých tkáních lidského těla a je díky vysoké míře podobnosti schopen vázat inhibitory specifické pro GCPII, ale kvůli absenci inhibitorů specifických výhradně pro GCPIII dosud neznáme jeho přesnou funkci (Hlouchova et al. 2007; Hlouchova et al. 2009).

2.4 Fyziologická funkce GCPII

Ve zdravé lidské tkáni se GCPII vyskytuje především v nervovém systému, v ledvinách a v tenkém střevě. V závislosti na své lokalizaci GCPII štěpí dva různé substráty. Substrát N-acetyl aspartylglutamát (NAAG) je štěpen v nervové tkáni a folyl-poly- γ -glutamát ve střevě. Z povahy substrátů vyplývá, že GCPII protein je zodpovědný za produkci jednoho z nejdůležitějších neurotransmiterů v nervové tkáni a za absorpci folátů v tenkém střevě (Rovenská et al. 2008; Mhaweche-Fauceglia et al. 2007).

2.4.1 Funkce GCPII v nervové tkáni

V nervové tkáni GCPII štěpí NAAG na glutamát a N-acetyl-aspartát (Obr. 3). Tento substrát, dipeptid složený z aspartátu acetylovaném na N konci a glutamátu, je nejrozšířenější savčí peptidový neurotransmitter (Neale et al. 2000). NAAG je syntetizován v neuronech NAAG-syntetasou I a synaptickými váčky je přenášen k axonovému zakončení neuronu. Po depolarizaci membrány je NAAG uvolněn do synaptické štěrbině, z níž rychle difunduje do okolí. Zde může interagovat buď s metabotropním glutamátovým receptorem (mGluR3) exprimovaným na presynaptickém zakončení a na povrchu astrocytů nebo může být hydrolyzován prostřednictvím GCPII na povrchu astrocytů (popřípadě Schwannových buněk). Vazba molekuly NAAG na mGluR3 v presynaptickém zakončení spouští signalizaci přes G protein a vede zpětně k omezení sekrece neurotransmiterů při následném podráždění neuronu, zatímco v astrocytech aktivace mGluR3 způsobuje produkci transformujícího růstového faktoru β (TGF β). Oba tyto děje mají neuroprotektivní charakter (Wroblewska et al. 1997; Wroblewska et al. 1998; Neale et al. 2000).



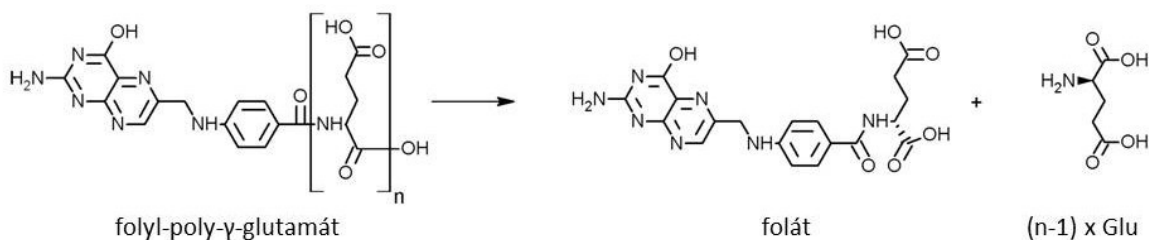
Obr 3. Štěpení substrátu NAAG GCPII proteinem. GCPII hydrolyzuje v nervové tkáni N acetyl aspartylglutamát (NAAG) na glutamát (Glu) a N-acetyl aspartát (Ac-Asp). Obrázek vytvořil autor.

Glutamát je nejvýznamnější excitační neurotransmitter v savčím nervovém systému. Nadměrné množství glutamátu v nervové tkáni způsobuje disfunkci zvanou „glutamátová excitotoxicita“. Tato disbalance je spojována s mnohými neurologickými chorobami, například s mozkovou mrtvicí, mozkovým zánětem, amyotrofickou laterální sklerózou, Alzheimerovou nemocí a Parkinsonovou chorobou. Spouštěcím mechanismem glutamátové excitotoxicity je zvýšené množství glutamátu v synapsi, což vede k hyperaktivaci ionotropních glutamátových kanálů, zejména N-methyl-D-aspartátového receptoru

(NMDAR). Zvýšený vstup vápenatých iontů přes NMDAR spouští kaskádu vedoucí k buněčným odpovědím zahrnujícím nadprodukcí oxidu dusnatého, tvorbu volných radikálů, aktivaci kaspas a homeostatickou nerovnováhu. Tyto změny vedou k buněčné smrti neuronů. V současné době je farmakologická léčba zaměřena na blokování glutamátových receptorů, tj. na zmírňování sekundárních symptomů, nikoli na primární příčinu těchto patologických stavů, tj. nadměrné uvolňování glutamátu. Alternativní strategie léčby využívá poznatky o metabolismu substrátu NAAG v nervové tkáni, které dokládají, že inhibice GCPII vedoucí k aktivaci mGluR3 díky zvýšené hladině NAAG substrátu má pozitivní efekt na snížení hyperaktivace ionotropních glutamátových kanálů. Moderní postupy se soustředí na blokování uvolnění glutamátu z presynaptického zakončení axonu, což může následně ovlivnit několik dysfunkcí najednou. Tento princip léčby je využíván při léčbě epilepsie a amyotrofické laterální sklerózy pomocí léků lamotriginu a riluzolu, které zmírňují symptomy chorob blokováním presynaptických sodných kanálů (Sácha et al. 2007; Lau & Tymianski 2010; Kiernan et al. 2011; Rahn et al. 2012).

2.4.2 Funkce GCPII v tkáni tenkého střeva

GCPII se vyskytuje na povrchu střevní sliznice, kde štěpí folyl-poly- γ -glutamáty na folát a glutamát (Obr. 4). GCPII zde tedy funguje jako folátová hydrolasa. Tato enzymová aktivita hraje důležitou roli v absorpci folátu, tedy v jeho přenosu přes stěnu střeva do krevního řečiště. Folát je přijímán v potravě ve formě folyl-poly- γ -glutamátů, které neprocházejí střevní stěnou. GCPII díky své hydrolytické aktivitě produkuje mono-glutamylované foláty, které jsou přenášeny specifickými transportéry umístěnými ve střevní sliznici dále do krevního oběhu. Tento mechanismus tedy zajišťuje vstřebávání folátů z potravy (Zhao et al. 2009; Devlin et al. 2000).



Obr 4. Hydrolytická aktivita GCPII v tenkém střevě. GCPII hydrolyzuje folyl-poly- γ -glutamáty na mono-glutamylovaný folát (folát) a několik molekul glutamátu (Glu) na povrchu buněk střevní sliznice. Produkty štěpení jsou vstřebávány střevní stěnou do krevního oběhu. Obrázek vytvořil autor.

2.5 Patofyziologický výskyt GCPII

Patologický výskyt GCPII je spojován s rakovinou prostaty, s angiogenezí pevných nádorů, s rakovinou ledvin a s nádory močového měchýře. Nejvyšší míra exprese GCPII spojená s patologickými stavy je nacházena v invazivních prostatických nádorech a z nich odvozených metastázách a v neovaskulatuře pevných nádorů, přičemž funkce GCPII v těchto tkáních zatím nebyla plně objasněna (Silver et al. 1997).

2.5.1 Výskyt GCPII v nádorové tkáni prostaty

Ve zdravé prostatické tkáni je hladina exprese GCPII relativně nízká. S postupem transformace prostatické tkáně v rakovinnou dochází k výraznému zvýšení exprese membránově vázané GCPII (Su et al. 1995). V tkáni se začíná vyvíjet počáteční stadium adenokarcinomu, který je zprvu potlačován účinkem androgenů. Inhibiční efekt těchto hormonů na povrchovou expresi GCPII má zřejmě souvislost s omezením/zpomalením nádorového bujení (Israeli et al. 1994; Evans et al. 2011). S progresí nádoru však rakovinné buňky ztrácí tuto regulaci a podstupují opakované dělení nezávisle na působení androgenních hormonů, nádor přechází do invazivního stadia a metastazuje. Pomocí imunohistochemických studií byla prokázána korelace mezi vysokým množstvím molekul GCPII vystavených na povrchu rakovinných buněk a agresivním fenotypem nádoru (Wright et al. 1995). Objevená spojitost mezi progresí nádoru a zvyšující se expresí GCPII vedla k domněnce, že se GCPII podílí na transformaci buněk a na růstu invazivity nádoru. Avšak studie buněčné invazivity v *in vitro* podmínkách naopak naznačila, že foláty štěpené GCPII proteinem mohou vykazovat protektivní účinek vůči nádorovému bujení (Yao et al. 2008). Funkce GCPII na povrchu rakovinných prostatických buněk nebyla zatím plně odhalena, avšak existují hypotézy o úloze v alternativní cestě metabolismu folátů, v produkci glutamátu i o zapojení GCPII v signalizační dráze jakožto receptoru zatím neidentifikovaného ligandu. Takřka výlučná přítomnost GCPII v metastázách ukazuje také na potenciální roli v podpoře migrace nádorových buněk a kolonizace vzdálených destinací, například kostní tkáně (Foss et al. 2012).

Na poli nádorových onemocnění představuje rakovina prostaty jednu z nejčastějších příčin úmrtí mužů ve vyspělých zemích a je nejčastěji diagnostikovaná rakovina vůbec (D'Amico et al. 2000). Z tohoto důvodu bylo v uplynulých letech věnováno velké úsilí hledání molekul vhodných k využití v medicínské praxi. Díky své tkáňově specifické expresi představuje GCPII slibný marker pro diagnostiku prostatických nádorů i případný cíl léčebných postupů.

2.5.2 Výskyt GCPII v nově vznikající cévní tkáni nádorů

Angiogeneze, neboli vývoj nových cév, probíhá výrazně v ontogenetickém vývoji mladého jedince, zatímco v dospělosti dochází k jejímu omezení. Současné studie ukazují, že peptidasy patří mezi významné regulátory tohoto děje.

V roce 1997 byl GCPII objeven v neovaskulatuře nově vznikajících pevných nádorů (Silver et al. 1997). Imunohistochemické značení odhalilo přítomnost GCPII proteinu v nově vznikajících cévách karcinomů ledvin, močového měchýře, varlat, tlustého střeva, jater, plic, prsu a neuroendokrinních tkání, dále pak v sarkomech měkkých tkání, osteosarkomech, melanomech a glioblastomech (Chang et al. 1999; Zeng et al. 2012; Silver et al. 1997). Spojitost mezi výskytem GCPII proteinu a vývojem nových cév v nádorové tkáni byla potvrzena pomocí *in vitro* modelu endoteliálních buněk, ve kterých byla exprese povrchového GCPII proteinu vyvolána faktory pocházejícími z nádorových buněk rakoviny prsu (Liu et al. 2011). Stojí za zmínku, že exprese GCPII byla nalezena také v nově vznikajících cévách několika nenádorových tkání, například v endometriu a v keloidních jizvách (Gordon et al. 2008). Funkce GCPII jak v patologické tak ve fyziologické angiogenezi zatím nebyla odhalena.

3 DETEKČNÍ ČINIDLA CÍLENÁ NA GCPII

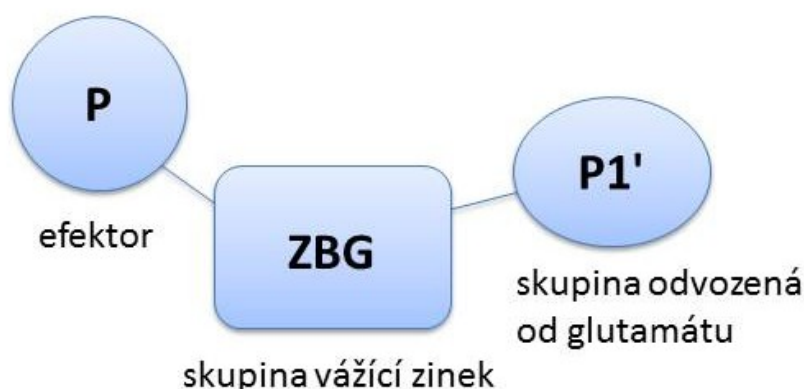
V uplynulých letech byla velká pozornost soustředěna na vývoj protilátek i malých molekul vážících GCPII s vysokou specifitou (Ristau et al. 2014). Inhibitory GCPII jsou vyvíjeny za účelem omezení aktivity tohoto enzymu v mozku, což má pozitivní efekt na některé neuronální choroby (Barinka et al. 2012). Fakt, že se GCPII vyskytuje ve velkém množství selektivně v adenokarcinomu prostaty, je využíván k zobrazování a k léčbě tohoto typu nádoru, především pomocí protilátek a jejich derivátů.

3.1 Malé molekuly specificky vážící GCPII

Inhibitory jsou zde definovány jako nízkomolekulární látky, které se váží do aktivního místa enzymu a zabraňují tak jeho fyziologické aktivitě. Tyto malé molekuly se díky své vysoké afinitě vůči enzymu také používají ke specifickému značení.

Inhibitory GCPII se skládají ze tří základních částí (Obr. 5). První z nich je zinek vážící skupina, která interaguje se zinečnatými ionty v aktivním místě a je zodpovědná za vysokou afinitu inhibitorů. Příkladem skupin vážící zinek v inhibitech GCPII jsou močovina,

fosfonáty, fosfináty, fosforamidáty, hydroxamáty a sulfamidy. Druhou částí je struktura odvozená od glutamátu, označující se P1', která interaguje s aminokyselinami tvořícími S1' kapsu GCPII. Tato skupina zpravidla obsahuje dva karboxyly a je klíčová pro vysokou specifitu a afinitu k enzymu. Její modifikace většinou vedou k výraznému snížení afinity inhibitoru. Třetí je efektorová část P, která zasahuje do proximální oblasti vnitřní dutiny enzymu. Tato část může být velmi variabilní, díky poměrně velké sterické toleranci proximální části vnitřní dutiny GCPII (viz Obr. 2). Efektorová část může obsahovat fluorofor vhodný k zobrazení nádoru nebo radioaktivní značku použitelnou pro terapii rakovinné tkáně.



Obr 5. Obecné schéma inhibitoru. Inhibitor GCPII obsahuje tři základní části. Skupinu odvozenou od glutamátu (P1'), která se váže do S1' místa enzymu. Inhibitor dále obsahuje skupinu vážící zinek (ZBG, anglicky zinc binding group), která interaguje se zinečnatými ionty v aktivním místě enzymu. Efektorová skupina P zasahuje do proximální oblasti vnitřní dutiny GCPII. Obrázek vytvořil autor.

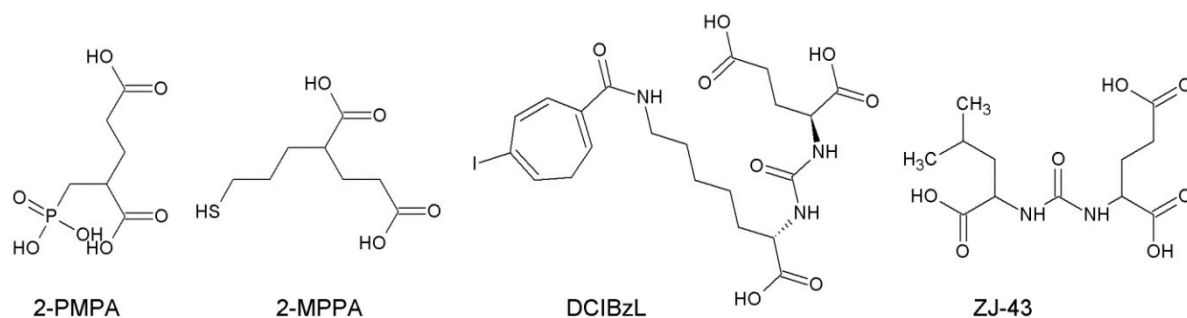
Skupina inhibitorů odvozených od fosfonátů

Historie vývoje inhibitorů GCPII zaznamenala největší zlom v roce 1996, kdy byl objeven vysokoafinní inhibitor 2-PMPA (kyselina 2-(fosfomethyl)pentandiová; Jackson et al. 1996). 2-PMPA má malou molekulovou hmotnost a představuje významný kompetitivní inhibitor s inhibiční konstantou $K_i = 0,2$ nM (Rojas et al. 2002). Optický izomer S-2-PMPA je výrazně preferován před isomerem R-2-PMPA (300-násobný rozdíl K_i) a dokládá silnou stereoselektivitu tohoto enzymu pro vazbu inhibitorů do S1' kapsy (Tsukamoto et al. 2007). Vysoká afinita 2-PMPA je způsobena produktivní kombinací silné chelatace zinečnatých iontů fosfonátovou skupinou a současnou interakcí glutarátové části inhibitoru s aminokyselinami definujícími S1' kapsu. Na 2-PMPA je možno pohlížet jako na analog

glutamátu, který však na rozdíl od glutamátu vysoce specificky interaguje pouze s GCPII proteinem (Obr. 6). S využitím 2-PMPA jako „dokovacího modulu“ byly následně připraveny inhibitory, jejichž efektorová část zahrnuje funkční skupiny, které umožňují vizualizaci GCPII proteinu (Ferraris et al. 2012).

Inhibitory na bázi močoviny

Inhibitory odvozené od močoviny se vyznačují poměrně snadnou syntézou, umožňující vysokou modularitu těchto sloučenin (Obr. 6). Zmíněné vlastnosti činí tyto inhibitory vhodnými pro zobrazování GCPII v nádorové tkáni. Inhibitory mohou být modifikovány radioaktivní nebo fluorescenční značkou, jako například radioaktivním jodem v případě vysokoafinního inhibitoru DCIBzL (Chen et al. 2008; Barinka et al. 2008). Poměrně jednoduchý inhibitor na bázi močoviny je ZJ-43. Účinnost tohoto inhibitoru byla prokázána v *in vivo* podmínkách při parenterální (mimostřevní) aplikaci (Yamamoto et al. 2004). V současnosti je ZJ-43 testován v preklinických studiích neurologických onemocnění.



Obr. 6 Schéma struktury významných inhibitorů GCPII. Zleva: vysokoafinní fosfonátový inhibitor 2-PMPA, jednoduchý inhibitor odvozený od thiolu 2-MPPA a inhibitory na bázi močoviny zahrnující DCIBzL inhibitor určený pro vysoce specifické radioaktivní značení GCPII v tkáních a jednoduchý inhibitor ZJ-43 testovaný v preklinických stadiích. Obrázek vytvořil autor.

Inhibitory odvozené od thiolové skupiny

Inhibitory obsahující thiol jakožto funkční skupinu nebyly dosud charakterizovány rentgenostrukturní analýzou a nejsou tedy popsány přesné interakce a umístění inhibitorů ve vnitřní dutině enzymu. Síla vazby těchto inhibitorů na GCPII je závislá na počtu methylenových skupin mezi thiolovou skupinou a glutamátovou částí inhibitoru. Nejsilnější inhibitor z této skupiny je 2-MPPA (2-(3-merkaptopropyl)pentandiová kyselina). Zajímavostí je absence stereoselektivity GCPII vůči tomuto typu inhibitoru. Tato vlastnost, společná také

pro inhibitory na bázi hydroxamové skupiny, poukazuje na možnost atypické pozice inhibitoru vůči aktivnímu místu a S1' části enzymu (Novakova et al. 2016).

3.2 Protilátky specificky reagující s GCPII

Během posledních dvaceti let bylo vyvinuto několik specifických protilátek proti GCPII, které jsou využitelné pro experimentální značení GCPII a některé jsou používány i pro diagnostiku GCPII v lidském těle. Díky své selektivní expresi v nádorové tkáni prostaty a neovaskulatuře některých pevných nádorů, která řádově převyšuje míru fyziologické exprese, je GCPII zajímavá molekula jakožto diagnostický marker. Většina GCPII proteinu se nachází na povrchu buněk a tento antigen je tedy v tkáních dobře přístupný pro interakci s aplikovanou protilátkou.

První vyvinutou monoklonální protilátkou proti GCPII byla 7E11-C5.3, která byla připravena v roce 1987 za použití LNCaP buněčného lyzátu. 7E11-C5.3 se váže na N-koncovou intracelulární sekvenci GCPII (Horoszewicz et al. 1987). Tato protilátka označená radioaktivním ¹¹¹In je současně jedinou protilátkou specifickou pro GCPII schválenou FDA (U.S. Food and Drug Administration; Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) pro použití v klinické praxi a to pro diagnostiku rakoviny prostaty. Tato protilátka je však v tkáni schopna označit pouze apoptotické a nekrotické buňky s narušenou plazmatickou membránou (Tykvar et al. 2014).

Spolu se studiem GCPII jakožto potenciálního diagnostického cíle byly vyvíjeny i nové protilátky specificky značící tento protein. V současnosti je nejlepší protilátkou druhé generace J591 protilátka, která rozpoznává extracelulární doménu enzymu GCPII. Tato protilátka byla vyvinuta v roce 1997 (Chang et al. 1999). Na rozdíl od 7E11-C5.3 protilátka J591 rozpoznává GCPII na povrchu živých buněk. J591 je v současné době díky svému potenciálnímu využití v klinické praxi významným cílem výzkumu mnoha týmů. Různé konjugáty a deriváty této protilátky byly charakterizovány jako potenciální diagnostické a terapeutické agens a některé jsou v současnosti testovány v II. fázi klinických testů.

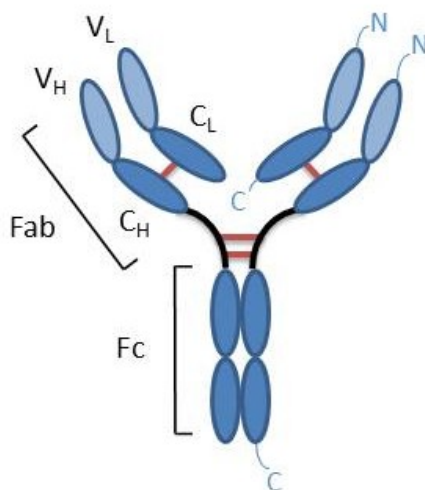
4 PROTILÁTKY

Protilátky jsou bílkoviny živočišného původu, patřící do rodiny imunoglobulinů. Hrají nepostradatelnou roli v imunitní obraně organismu, jejich funkcí je identifikovat a zneškodnit cizí objekty v těle. Protilátky tvoří B-lymfocyty a plasmatické buňky (diferencované B-buňky) v procesu specifické imunitní odpovědi. Protilátky brání tělo zejména proti extracelulárním bakteriím, parazitům a toxinům. Zahajují zánětlivou reakci, aktivují cytotoxické reakce a opsonizují patogeny. V těle se protilátky nachází v krvi, krevním séru, mateřském mléce, slzách a ve slinách. Analogy protilátek se nalézají na povrchu B-lymfocytů. Délka života protilátek se pohybuje od 2 do 23 dní.

Každá protilátka ideálně rozpoznává pouze jeden antigen. Antigeny mohou být endogenní, vznikající ve vnitřním prostředí organismu, nebo exogenní dostávající se do těla z vnějšího prostředí. Exogenní typ antigenů vyvolává imunitní odpověď. Antigeny mohou být proteiny (například receptory na povrchu rakovinných buněk), cukry na povrchu bakterií nebo virů, hormony, chemické sloučeniny nebo nukleové kyseliny. Specifická část antigenu, která interaguje s protilátkou, se nazývá epitop. Antigen může mít epitopů několik, jejich počet úzce souvisí s velikostí antigenu. V případě proteinových antigenů mohou být epitopem individuální modifikované aminokyseliny (například fosforylované nebo oxidované).

4.1 Struktura protilátek

Protilátka je molekula ve tvaru Y, složená ze dvou identických těžkých řetězců a dvou identických lehkých řetězců. Strukturu čtyř polypeptidových řetězců drží dohromady nekovalentní interakce a disulfidické můstky. N-koncové domény těžkého a lehkého řetězce tvoří takzvanou variabilní oblast protilátky, tedy místo pro vazbu antigenu. Struktura tvořící ramena ypsilonového tvaru se nazývá Fab fragment (Obr. 7) a zahrnuje lehký řetězec a dvě N-terminální domény těžkého řetězce. C-koncové domény těžkých řetězců tvoří Fc fragment. Fc část protilátky je důležitá pro interakci antigenu s makrofágy a pro aktivaci kaskády komplementu.



Obr 7. Struktura protilátky. Protilátky jsou tvořeny dvěma lehkými a dvěma těžkými řetězci. Fab fragment je složen z variabilních domén a prvních konstantních domén obou řetězců, zatímco Fc část je tvořena zbývajících konstantními doménami těžkých řetězců. Konstantní domény (C_H , C_L) jsou znázorněny tmavě modrou barvou, variabilní domény (V_H , V_L) bleděmodrou barvou. Červené spojky zobrazují S-S můstky propojující jednotlivé řetězce. Obrázek vytvořil autor.

Lehké řetězce jsou tvořeny N-koncovou variabilní (V_L) doménou a na C-koncovou konstantní doménou (C_L). Tyto domény se vyskytují ve dvou typech κ a λ , ale v jedné molekule jsou vždy oba řetězce téhož typu. Lehké řetězce sestávají přibližně z 220 aminokyselin. Těžké řetězce sestávají z jedné variabilní domény (V_H) a několika konstantních domén (C_H). Například IgG obsahuje jednu variabilní a tři konstantní domény těžkého řetězce, kdy každá doména je tvořena přibližně 110 aminokyselinami. Těžké řetězce rozdělujeme do pěti typů označovaných α , γ , δ , ϵ a μ . Těžké řetězce α a γ tvoří přibližně 440 aminokyselin, zbylé přibližně 550 aminokyselin.

Variabilní domény obou řetězců, tvoří vazebné místo protilátky pro antigen a jsou zodpovědné za specifitu protilátky. Ve variabilních úsecích řetězců se nacházejí tři tzv. hypervariabilní regiony, což jsou 5-30 aminokyselin dlouhé úseky, které určují komplementaritu protilátky k antigenu. Vazebných míst může mít protilátka různý počet, liší se jimi třídy imunoglobulinů. Vazebné místo je vždy komplementární ke struktuře na povrchu antigenu a vytváří tak reverzibilní komplex. Tento komplex se vyznačuje určitou rychlostí vzniku a rozpadu a poměr obou těchto rychlostí definuje rovnovážná konstanta, která odráží tzv. aviditu protilátky, tedy afinitu protilátky k antigenu násobenou počtem vazebných míst.

Imunoglobuliny obsahují tzv. pantovou část, což je oblast na těžkém řetězci mezi první a druhou konstantní doménou, kterou lze rozštěpit rostlinným enzymem papainem. Tímto štěpením vznikne Fab fragment a Fc fragment, který zahrnuje zbytky těžkých řetězců spojené disulfidickými můstky. Dalším štěpením lze z Fab fragmentů získat Fv fragmenty, které zahrnují jen nekovalentně asociované variabilní domény obou řetězců.

Lidské tělo umí tvořit více než 10^{11} variant protilátek. Vysoký počet variací je způsoben vývojem protilátek proti velkému množství různých antigenů. To je dáno afinitní maturací, která probíhá při kontaktu B lymfocytu s antigenem. Vyštěpují se oblasti v sekvenci imunoglobulinových genů a jejich kombinací vzniká unikátní vazebné místo.

Protilátky mohou být velmi silně glykosylovány. Cukerné zbytky se nachází převážně na těžkých řetězcích a jsou k polypeptidovému řetězci připojeny N-glykosidickou vazbou přes asparagin nebo O-glykosidickou vazbu přes serin nebo threonin. Glykosylace ulehčuje sekreci protilátky a zvyšuje její rozpustnost.

4.1.1 Imunoglobulinové třídy

Dle druhu těžkého řetězce se imunoglobuliny dělí do několika tříd (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE). Třídy se liší svou stavbou, velikostí a účinkem *in vivo*. Konstantní oblast je stejná ve všech protilátkách stejné třídy. IgG je nejvýznamnější třídou protilátek a je také jediná schopná procházet placentou. Z pohledu experimentálních a analytických postupů jsou zásadní protilátky třídy IgG a IgM. Protilátky třídy IgG jsou vysoce afinní molekuly vznikající při sekundární imunitní odpovědi, zatímco IgM protilátky jsou obvykle nízkoafinní, schopné vytvářet velké imunokomplexy a tvoří se jako první protilátkové molekuly při primární imunitní odpovědi na antigen. Molekula IgM tvoří pentamer složený ze základní jednotky. Obsahuje deset lehkých řetězců, deset těžkých řetězců a jeden spojovací J- řetězec. Díky této struktuře má IgM deset vazebných míst pro antigen, kvůli stérickým důvodům je jich dostupných ale pouze pět. Protilátky ostatních tříd hrají důležitou úlohu ve fyziologické odpovědi na antigen, avšak pro experimentální užití nemají příliš velký význam. Rozdíly v prostorovém uspořádání tříd imunoglobulinů jsou dány odlišným počtem konstantních domén a rozdílným uspořádáním disulfidických můstků mezi jednotlivými řetězci nebo různými částmi téhož řetězce.

4.2 Protilátky v experimentální praxi

4.2.1 Polyklonální protilátky

Imunitní systém produkuje fyziologicky velké množství protilátek, které mohou v rámci jednoho antigenu rozpoznávat několik epitopů. Každá protilátka je produkována jinou plasmatickou buňkou a je specifická pro určitý epitop. Směs těchto protilátek proti určitému antigenu se nazývá polyklonální protilátka a získává se izolací z krevního séra. Tyto protilátky jsou obrovskou výhodou při boji organismu proti infekci.

4.2.2 Monoklonální protilátky

Přelomový objev ve vývoji protilátek pro výzkumné účely nastal v roce 1975, kdy se Köhlerovi a Milsteinovi poprvé podařilo připravit monoklonální protilátky. Fúzí B-buněk ze sleziny zvířete, jež byly vystaveny antigenu, s myeloidní rakovinnou buněčnou linií vznikly jednobuněčné hybridy nazývané hybridomy. B-buňky daly hybridomu schopnost produkovat protilátky a myeloidní buňky poskytly možnost stálého dělení a růstu v buněčné kultuře (Köhler & Milstein 1975). Klon pocházející z hybridomů sekretuje vždy jeden typ protilátek, který je selektivní pouze proti jednomu typu epitopu a nazývá se monoklonální protilátka.

Ačkoli byl vývoj hybridomů přelomem ve výzkumu protilátek, stále má metoda několik limitací. Vývoj hybridomů je časově i finančně velmi náročný a vyžaduje odborný přístup. Navíc antigeny použitelné pro imunizaci mohou být toxické pro savce nebo nemusí vyvolat imunitní odpověď spojenou s protilátkovou produkcí. Myší monoklonální protilátky jsou nevhodné pro použití v léčbě lidí díky vysoké imunogenicitě myšního proteinu v lidském těle. Různé přístupy, jak překonat tuto terapeutickou bariéru, jsou například:

- Kombinování vazebných míst pocházejících z myších monoklonálních protilátek s konstantními částmi lidských protilátek za účelem vytvoření chimerní nebo humanizované protilátky, která nevyvolá imunitní odpověď v lidském těle
- Používání geneticky modifikovaných myší k produkci protilátkových molekul s lidskou sekvencí
- Vývoj plně lidských protilátek neobsahující žádnou část myšního imunoglobulinu přímo technologií *in vitro* rekombinace.

4.2.3 Rekombinantní protilátky

Rekombinantní protilátky jsou vysoce specifické molekuly používané ve výzkumu a diagnostice. Představují je modifikované imunoglobulinové molekuly anebo molekuly připravené molekulárně biologickými metodami. Rekombinantními protilátkami mohou být celé imunoglobuliny, případně jejich deriváty a fragmenty.

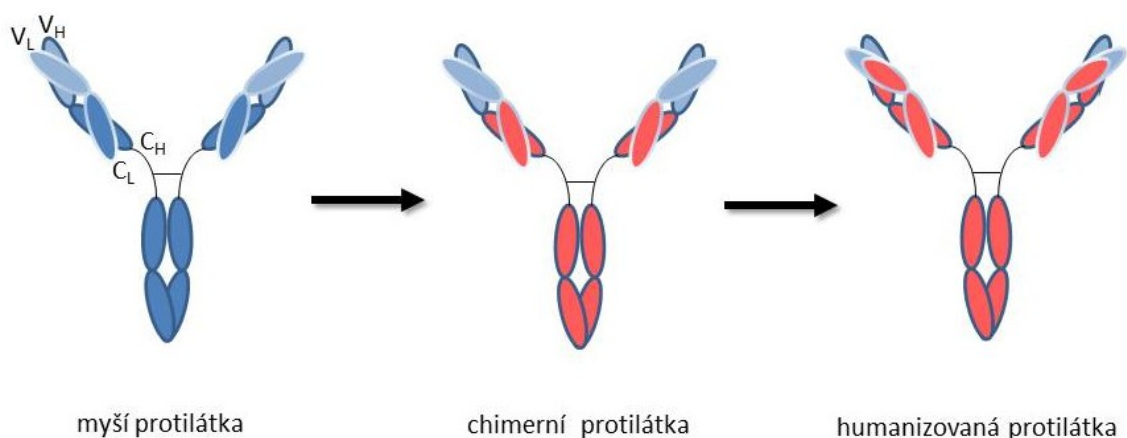
Technologie vývoje rekombinantních protilátek má mnoho výhod. Genetické modifikace rekombinantních protilátek nám umožňují studovat strukturální a funkční vlastnosti protilátek a poskytují protilátky s žádanou charakteristikou. Rekombinantní techniky umožňují vývoj malých fragmentů protilátek tvořících vazebné místo, zvyšování afinity protilátek a vývoj plně lidských protilátek. Rekombinantní protilátky mohou být produkovány různými expresními systémy včetně bakteriálních kultur, které jsou velmi výhodné z ekonomického hlediska. Rekombinantní protilátky bývají odvozovány z hybridomů pomocí klonovacích technik, díky nimž je sekvence dané protilátky zavedena do vektoru a následně produkována expresním systémem kultivovaným *in vitro* podmínkách. V současné době mohou být protilátky produkovány kompletně mimo zvířecí nebo lidské tělo. K tomuto účelu slouží genové knihovny, ze kterých je protilátka vybrána na základě interakce směsi *in vitro* exprimovaných imunoglobulinů s určitým antigenem. Dnes existují obrovské knihovny genů protilátek odvozených od B-buněk z neimunizovaných donorů nebo vzniklých *de-novo* syntézou. Kdyby tato knihovna obsahovala dostatečné množství funkčních členů, teoreticky by bylo možné najít specifickou protilátku proti jakémukoliv antigenu (Kipriyanov & Le Gall 2004).

4.2.4 Chimerní a humanizované protilátky

Tvorba lidsko-myších chimerních protilátek zahrnuje klonování a ligaci variabilní domény genu myši monoklonální protilátky do expresního vektoru, který obsahuje konstantní domény obou řetězců imunoglobulinu.

Chimerní protilátka má tedy variabilní doménu obou řetězců z myšního imunoglobulinu, ale konstantní domény jsou lidského původu. Humanizovaná protilátka má původní myší sekvence pouze ve svém vazebném místě a celý zbytek sekvence je lidského původu (Obr. 8). Podstatou humanizace protilátky je přenesení malých částí sekvence myšního imunoglobulinu, které jsou zodpovědné za interakci s antigenem (CDR oblasti), do molekuly lidského imunoglobulinu (Dang et al. 2013).

Vývoj chimérických a humanizovaných protilátek je velmi důležitý pro terapeutické účely. Protilátkové preparáty jsou v současnosti podávány pacientům v rámci očkování, ale jsou také využívány jako terapeutika a diagnostické nástroje. V poslední době se používání rekombinantních protilátek a pasivní imunoterapie zaměřuje na léčbu rakoviny a zánětlivých stavů. Imunoterapie pomocí monoklonálních protilátek se stává velmi významnou v léčbě infekčních onemocnění, u nichž je zjištěna velká odolnost patogenů k lékům nebo opakovaný vnik patogenu do těla. Očkování představující pasivní imunoterapii může být použito k zajištění obrany organismu v době vysokého rizika vystavení organismu patogenu. Avšak podávání heterologních sér i purifikovaných myších imunoglobulinů vyvolává u lidí nežádoucí imunitní reakci, která brání opakovanému podávání preparátu (Berger et al. 2002). Konzervované C-koncové domény jsou nejvíce imunogenní regiony protilátek (Khazaeli et al. 1994). Zatímco chimerní protilátky vyvolávají významně nižší imunitní odpověď než původní myší imunoglobuliny, humanizované protilátky nevyvolávají nežádoucí imunitní reakci vůbec. Při procesu humanizace je však nutné zachovat specifitu a afinitu dané protilátky.



Obr 8. Schéma tvorby chimerní a humanizované protilátky. Rekombinantními postupy je vytvořena chimerní molekula obsahující myší variabilní domény lehkého i těžkého řetězce (modrá) a lidské konstantní domény (červená). Humanizovaná protilátka nevyvolávající téměř žádnou imunitní odpověď obsahuje myší sekvence pouze ve vazebném místě (bleděmodrá), zatímco zbývající část variabilní domény a všechny konstantní domény pocházejí z lidské imunoglobulinové sekvence (červená). Obrázek vytvořil autor.

Existuje několik způsobů humanizování protilátek. Nejvíce používaný je tzv. CDR grafting, při kterém se do molekuly lidské protilátky vloží vhodná CDR oblast myší protilátky. Tato oblast je částí variabilních domén, zodpovědných za vazbu s antigenem. Tato metoda se provádí rekombinací DNA za použití vhodného vektoru a následnou expresí v savčích buňkách. U nově vyvinuté myší monoklonální protilátky s požadovanými vlastnostmi

je zjištěna její nukleotidová sekvence variabilních domén. Oblasti odpovídající CDR regionům jsou vloženy do konstruktů se sekvencí lidské protilátky. Expresí takto sestavené DNA vzniká humanizovaná protilátka (Dang et al. 2013).

4.2.5 Deriváty protilátek

Intaktní molekula protilátky je velký proteinový komplex (cca 150 kDa). Díky své velikosti protilátky nesnadno prostupují tkáněmi a jsou z těla velice pomalu vylučovány. Proto jsou rekombinantními technikami vyvíjeny protilátkové fragmenty o menší molekulové hmotnosti (Obr. 9). Geneticky zkrácené úseky nových protilátek se řadí k nejmenším jednotkám schopným vazby na antigen.

Monovalentní fragmenty protilátek

Fv fragment se skládá pouze z V_H a V_L domény a je to nejmenší možný fragment obsahující celé vazebné místo pro antigen. Ukázalo se, že Fv fragmenty mají obecně nižší afinitu vazby než Fab fragmenty, které dohromady drží konstantní domény. Pro stabilizaci regionů se používá propojení peptidovým řetězcem, disulfidickými můstky nebo „knob into hole“ mutací. Tato mutace spočívá ve změně aminokyseliny na V_H a V_L doménách protilátky. Na jedné doméně se vytvoří výčnělek a na druhé prohlubeň, které jsou vzájemně strukturně komplementární a vedou ke stabilizaci celého Fv fragmentu.

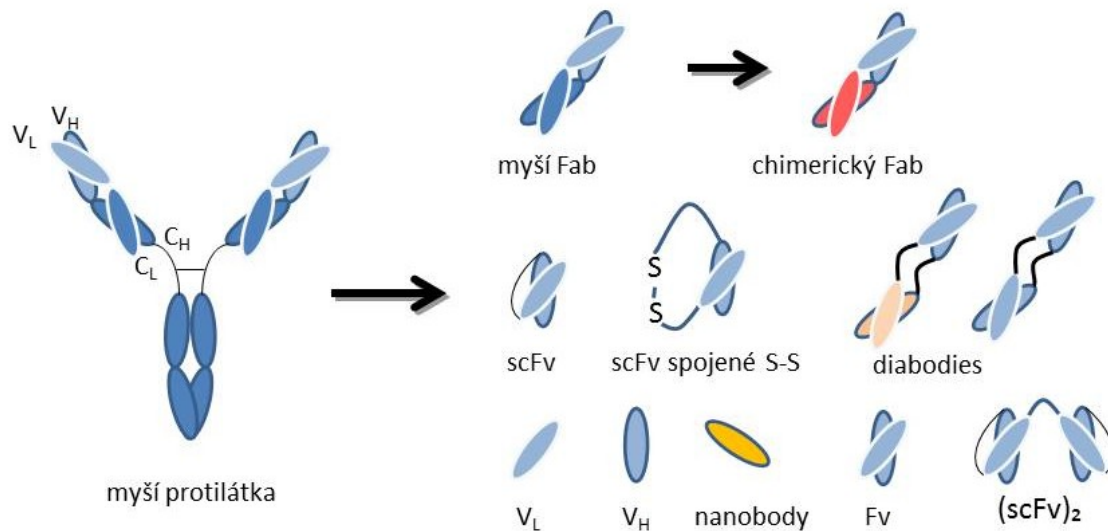
Jedním typem monovalentních fragmentů protilátek mohou být jednořetězcové Fv fragmenty spojené peptidovým linkerem (scFv). Linker je přibližně 15 aminokyselin dlouhý a spojuje C-konec jedné domény s N-koncem druhé domény protilátky. Tyto malé fragmenty jsou vhodné pro klinické využití. Ve srovnání s Fab fragmentem mají poloviční velikost a nižší retenční čas v necílové tkáni a lépe pronikají do tkáně nádoru. Tyto fragmenty jsou produkovány v bakteriích, což je výhodné kvůli nízké ceně (Kipriyanov & Le Gall 2004).

Fv fragmenty spojeny S-S můstkem jsou více rezistentní vůči nevratné denaturaci, která může být způsobena teplotou 37°C a jsou stabilnější než scFv fragmenty (Glockshuber et al. 1990). Jejich výhodou je možnost redukce S-S můstku.

Dalším typem monovalentních fragmentů protilátek mohou být samostatné V domény (V_H nebo V_L), které si uchovávají specifitu k antigenu. Tyto domény při izolaci z myších monoklonálních protilátek mají však nízkou rozpustnost, sníženou afinitu pro antigen a jejich purifikace bývá špatně reprodukovatelná. Z uvedených důvodů se k vývoji tohoto typu fragmentů používá proteinové inženýrství. Při vývoji je možno jako vzor pro tvoření

proteinových knihoven, konkrétně variabilní domény, používat například velbloudí těžký řetězec a variabilní řetězec žraloka (Nuttall et al. 2001; Riechmann & Muyldermans 1999).

Nejmenší intaktní agens schopné vázat antigen je nanobody, tvoří ho jedna variabilní doména a má velikost okolo 13 kDa. Molekuly jsou původně odvozeny od velbloudího a žraločího imunoglobulinu. Tyto fragmenty jsou ale ve vodném prostředí nestabilní, a mají tendenci vzájemně agregovat (Chakravarty et al. 2014).



Obr. 9. Příklady současných vyvíjených rekombinantních derivátů protilátek. V současné době se rozvíjí techniky proteinového inženýrství, které umožňují přípravu mnoha variant malých a středně velkých protilátkových fragmentů vykazujících odlišné charakteristiky. Protilátkové fragmenty jsou moderními nástroji vhodnými pro vysoce specifické homogenní značení antigenu v tkáních a *in vivo* modelech. Tyto deriváty jsou také využívány pro další vývoj bispecifických molekul schopných atrahovat imunitní buňky do požadované tkáně/oblasti. Obrázek vytvořil autor.

Bivalentní a multivalentní fragmenty protilátek

Fv domény protilátek mohou vytvářet bivalentní i multivalentní molekuly. Existují například dva spojené Fv fragmenty (scFv₂) s přidaným C-koncovým cysteinem, který vytváří S-S můstek. Bylo zjištěno, že scFv₂ mají čtyřikrát vyšší afinitu k antigenu než monovalentní fragment scFv (Kipriyanov et al. 1994). V *in vivo* podmínkách zůstávají bivalentní fragmenty scFv₂ déle v krevním řečišti a vykazují vyšší akumulaci v nádorech než monovalentní fragmenty (Adams et al. 1993).

Když jsou V_H a V_L domény spojeny linkerem o délce větší než je 12 aminokyselinových zbytků, monomerní Fv fragment má velikost okolo 30 kDa. Zkrácením peptidového linkeru na 3-12 zbytků mohou vznikat multimery, například o velikosti zhruba 60 kDa, ve kterém jsou dva scFv nekovalentně spojeny (diabody; Adams et al. 1998). Dalším snižováním délky linkeru lze docílit formování trimerů (triabodies), které mají velikost 90 kDa (Kortt et al. 1997) nebo tetramerů (tetrabodies), které jsou velké 120 kDa. Bylo dokázáno, že diabody a tetrabody mají v porovnání s monovalentním fragmentem 1,5 – 2,5 krát vyšší afinitu k antigenu (Le Gall et al. 1999). Tvorba bivalentních molekul může být také docílena fúzí s dimerizujícími motivy, jakými je například amfipatický helix (miniantibodies; Pack & Plückthun 1992) nebo C_H3 doména imunoglobulinu (minibodies; Hu et al. 1996). Obdobným způsobem lze vytvořit tetramer spojený streptavidinem (Kipriyanov et al. 1996).

Bispecifické rekombinantní protilátky jsou uměle vytvořené molekuly, skládající se z fragmentů dvou různých monoklonálních protilátek. Díky tomu se mohou zároveň vázat na dva různé antigeny (Kipriyanov & Le Gall 2004). Nejrozšířenější aplikace tohoto přístupu je při imunoterapii rakoviny, kde je protilátka schopna se současně vázat na cytotoxické imunitní buňky a na rakovinné buňky.

4.2.6 *Produkce imunoglobulinů*

Expresní systémy představují buněčné kultury, které produkují rekombinantní molekuly ve velkém množství. Pro výrobu celých protilátek a jejich fragmentů se používají rozličné expresní systémy. V současnosti jsou využívány především čtyři typy expresních systémů, a to kvasinkové, bakteriální, savčí a hmyzí. Použití bakteriální exprese je rychlé a nenákladné, jednoduché na manipulaci s výtěžky až 0,5 g na 1 litr media. Tyto expresní systémy také vylučují kontaminaci protilátek zvířecími patogeny. Producentem je nejčastěji bakterie *E. coli*. Produkce proteinu probíhá do intracelulárního prostoru nebo do periplasmatického prostoru. U proteinů produkovaných bakteriemi chybí posttranslační modifikace a pro preferenční proteosyntézu podle eukaryotního genetického kódu je třeba využít modifikované bakteriální kmeny. Rekombinantní genetická informace je vkládána do buněk v expresním plazmidu a nedochází k integraci do genomu (Chadd & Chamow 2001).

V bakteriálních systémech lze exprimovat většinu genů z prokaryotických organismů, eukaryotní geny, jejichž produkty nepodléhají posttranslačním modifikacím, většinu cytosolických proteinů (nejsou glykosylované) a geny kódované chloroplastovou nebo mitochondriální DNA.

Bakteriální systémy jsou využívány k produkci fragmentů protilátek, zejména scFv a Fab fragmentů. ScFv fragmenty mohou být produkovány v hmyzích buňkách odvozených z *Drosophila melanogaster*. Výtěžek rekombinantních fragmentů sekretovaných do média dosahuje až 25 mg/l (Reavy et al. 2000). K výrobě scFv fragmentů mohou být použity i kvasinky, nicméně problematickou může být odlišná glykosylace oproti lidským proteinům.

Expres v savčích systémech se využívá především pro produkci celých protilátek, převážně kvůli glykosylaci. K produkci protilátek se využívají myší kmeny se změněným genem imunoglobulinu na lidskou variantu. Gen pro produkci myších protilátek je v tomto modelu umlčen (Kipriyanov & Le Gall 2004).

Většina protilátek typu IgG je produkována v savčích buněčných liniích CHO (Chinese hamster ovary) nebo NS0 (mouse myeloma). Systém rekombinace musí být zvolen tak, aby byla udržena efektorová funkce protilátky. Savčí buňky mohou produkovat nepřečištěné protilátky v koncentraci 1–2 g/l (Zhou et al. 1997).

Alternativní metodou pro produkci velkého množství protilátek je exprese v transgenních zvířatech nebo rostlinách. Generace stáda transgenních koz je schopna produkovat protilátku použitelnou pro 1. fázi klinického výzkumu po 24 měsících. Hlavní výhoda této výroby protilátek spočívá ve vyšší produkci, nicméně finančně je rozhodně výhodnější produkovat protilátky ze savčích buněk. Dalším způsobem je produkce protilátek ve vaječném bílku, při které produkce trvá přibližně 18 měsíců, tato metoda je poměrně finančně výhodná. Využití transgenních rostlin pro klinické studie zabírá asi 20 měsíců, ovšem finanční stránka produkce moc výhodná není (Pollock et al. 1999; Hiatt et al. 1989).

5 Závěr

Tato práce shrnuje současné poznatky o struktuře a funkci glutamát karboxypeptidasy II. GCPII je enzym vykazující hydrolasovou aktivitu na povrchu buněk. Produktem enzymatické aktivity je glutamát, který představuje jeden z nejdůležitějších neurotransmiterů. V práci je zmíněna fyziologická funkce tohoto proteinu v tkáni tenkého střeva a především v nervové tkáni, kde může jeho nadměrná aktivita způsobovat glutamátovou neurotoxicitu.

Součástí práce je shrnutí možných způsobů inhibice nebo značení GCPII. GCPII lze specificky detekovat a inhibovat pomocí vysoce specifických malých molekul, jejichž účinek je využitelný při léčbě neuronálních onemocnění spojených s glutamátovou neurotoxicitou. Výhoda malých molekul pro využití v případě neuronálních chorob spočívá v jejich velikosti, která v ideálním případě umožňuje průchod hematoencefalickou bariérou.

Patofyziologický výskyt GCPII je spojen s karcinomem prostaty. Zvýšená exprese proteinu zde koreluje s pokročilým stadiem rakoviny. Mimo nádorovou tkáň prostaty se GCPII nalézá také v neovaskulatuře některých pevných nádorů. Výskyt GCPII v nádorových tkáních předurčuje tento protein jako slibný diagnostický marker, případně i jako terapeutický cíl. Pro značení GCPII v nádorových tkáních je možno využít vedle malých molekul také protilátky nebo jejich deriváty. Vývoj derivátů protilátek je velmi dynamický obor výzkumu, v současnosti vznikají nové typy derivátů vykazující výhodnější parametry afinity a specifity, penetrace tkání a clearance. Z výsledků experimentálních studií je zřejmé, že diagnostika GCPII má v terapii nádorů nepopiratelný význam.

Z mé práce vyplývá, že inhibice, respektive značení, GCPII má zásadní význam pro léčbu neuronálních onemocnění a pro diagnostiku nádorů, zejména karcinomu prostaty. Vývoj nových diagnostických látek povede k účinnější a časnější diagnostice, tedy k lepším prognózám a vyšším šancím na přežití pacientů.

Seznam literatury

- Adams, G.P. et al., 1993. Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. *Cancer research*, 53(17), pp.4026–4034.
- Adams, G.P. et al., 1998. Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *British journal of cancer*, 77(9), pp.1405–1412.
- Anilkumar, G. et al., 2003. Prostate-specific membrane antigen association with filamin A modulates its internalization and NAALADase activity. *Cancer Research*, 63(10), pp.2645–2648.
- Barinka, C., Starkova, J., et al., 2007. A high-resolution structure of ligand-free human glutamate carboxypeptidase II. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(3), pp.150–153.
- Barinka, C. et al., 2012. Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 19(6), pp.856–870.
- Barinka, C. et al., 2004. Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 13(6), pp.1627–1635.
- Barinka, C., Byun, Y., et al., 2008. Interactions between human glutamate carboxypeptidase II and urea-based inhibitors: Structural characterization. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(24), pp.7737–7743.
- Barinka, C., Hlouchova, K., et al., 2008. Structural basis of interactions between human glutamate carboxypeptidase II and its substrate analogs. *Journal of molecular biology*, 376(5), pp.1438–50.
- Barinka, C., Rovenská, M., et al., 2007. Structural insight into the pharmacophore pocket of human glutamate carboxypeptidase II. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(14), pp.3267–3273.
- Berger, M., Shankar, V. & Vafai, A., 2002. Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *The American Journal of the Medical Sciences*, 324(1), pp.14–30.
- Castelletti, D. et al., 2008. Different glycoforms of prostate-specific membrane antigen are intracellularly transported through their association with distinct detergent-resistant membranes. *Biochem J*, 409(1), pp.149–157.
- D'Amico, a V et al., 2000. Endorectal magnetic resonance imaging as a predictor of biochemical outcome after radical prostatectomy in men with clinically localized prostate cancer. *The Journal of urology*, 164(3 Pt 1), pp.759–63.
- Dang, V.T. et al., 2013. A simple methodology for conversion of mouse monoclonal antibody to human-mouse chimeric form. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.
- Davis, M.I. et al., 2005. Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), pp.5981–5986.
- Devlin, M. et al., 2000. Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with

- lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. *Human molecular genetics*, 9(19), pp.2837–2844.
- Evans, M.J. et al., 2011. Noninvasive measurement of androgen receptor signaling with a positron-emitting radiopharmaceutical that targets prostate-specific membrane antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), pp.9578-9582
- Ferraris, V.D., Shukla, K. & Tsukamoto, T., 2012. Structure-Activity Relationships of Glutamate Carboxypeptidase II (GCPII) Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 19(9), pp.1282–1294.
- Foss, A.C. et al., 2012. GCPII Imaging and Cancer, *Current Medicinal Chemistry*, 19(9), pp. 1346-1359.
- Le Gall, F. et al., 1999. Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: Effect of valency on cell binding. *FEBS Letters*, 453(1-2), pp.164–168.
- Glockshuber, R. et al., 1990. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry*, 29, pp.1362–1367.
- Gordon, I.O. et al., 2008. Prostate-specific membrane antigen expression in regeneration and repair. *Modern Pathology*, 21(12), pp.1421–1427.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. & Bowdish, K., 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342(6245), pp.76–8.
- Hlouchova, K. et al., 2007. Biochemical characterization of human glutamate carboxypeptidase III. *J Neurochem*, 101(3), pp.682–696.
- Holmes, E.H. et al., 1996. Analysis of glycosylation of prostate-specific membrane antigen derived from LNCaP cells, prostatic carcinoma tumors, and serum from prostate cancer patients. In *Prostate*. pp. 25–29.
- Horoszewicz, J.S., Kawinski, E. & Murphy, G.P., 1987. Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Research*, 7(5 B), pp.927–935.
- Hu, S.Z. et al., 1996. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Research*, 56(13), pp.3055–3061.
- Chadd, H.E. & Chamow, S.M., 2001. Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), pp.188–194.
- Chakravarty, R., Goel, S. & Cai, W., 2014. Nanobody: The “magic bullet” for molecular imaging? *Theranostics*, 4(4), pp.386–398.
- Chang, S.S. et al., 1999. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Research*, 59(13), pp.3192–3198.
- Chen, Y. et al., 2008. Radiohalogenated prostate-specific membrane antigen (PSMA)-based ureas as imaging agents for prostate cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(24), pp.7933–7943.
- Israeli, R.S. et al., 1994. Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer research*, 54(7), pp.1807–11.

- Jackson, P.F. et al., 1996. Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(2), pp.619–622.
- Khazaeli, M.B., Conry, R.M. & LoBuglio, a F., 1994. Human immune response to monoclonal antibodies. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy*, 15, pp.42–52.
- Kipriyanov, S.M. et al., 1996. Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein Engineering*, 9(2), pp.203–211.
- Kipriyanov, S.M. et al., 1994. Recombinant single-chain Fv fragments carrying C-terminal cysteine residues: Production of bivalent and biotinylated miniantibodies. *Molecular Immunology*, 31(14), pp.1047–1058.
- Kipriyanov, S.M. & Le Gall, F., 2004. Generation and production of engineered antibodies. *Molecular biotechnology*, 26(1), pp.39–60.
- Köhler, G. & Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, pp.495–497.
- Kortt, a a et al., 1997. Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. *Protein engineering*, 10(4), pp.423–433.
- Lambert, L.A. & Mitchell, S.L., 2007. Molecular evolution of the transferrin receptor/glutamate carboxypeptidase II family. *Journal of Molecular Evolution*, 64(1), pp.113–128.
- Liu, T. et al., 2011. Detection of prostate-specific membrane antigen on HUVECs in response to breast tumor-conditioned medium. *International Journal of Oncology*, 38(5), pp.1349–1355.
- Mesters, J.R. et al., 2006. Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer. *The EMBO journal*, 25(6), pp.1375–1384.
- Mlčochová, P. et al., 2007. Mapping of the active site of glutamate carboxypeptidase II by site-directed mutagenesis. *FEBS Journal*, 274(18), pp.4731–4741.
- Neale, J.H., Bzdega, T. & Wroblewska, B., 2000. N-Acetylaspartylglutamate: The Most Abundant Peptide Neurotransmitter in the Mammalian Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*, 75(2), pp.443–452.
- Novakova, Z., Cerny, J., et al., 2016. Design of composite inhibitors targeting glutamate carboxypeptidase II: the importance of effector functionalities. *The FEBS journal*, 283(1), pp.130-143.
- Novakova, Z., Wozniak, K., et al., 2016. Unprecedented binding mode of hydroxamate-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II: Structural characterization and biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, in press
- Nuttall, S.D. et al., 2001. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Molecular Immunology*, 38(4), pp.313–326.
- Pack, P. & Plückthun, a, 1992. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in Escherichia coli.

Biochemistry, 31(6), pp.1579–84.

- Pavlicek, J., Ptacek, J. & Barinka, C., 2012. Glutamate carboxypeptidase II: an overview of structural studies and their importance for structure-based drug design and deciphering the reaction mechanism of the enzyme. *Current Medicinal Chemistry*, 19(9), pp.1300–1309.
- Pollock, D.P. et al., 1999. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *Journal of immunological methods*, 231, pp.147–157.
- Reavy, B. et al., 2000. Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression systems. *Protein Expression and Purification*, 18(2), pp.221–228.
- Riechmann, L. & Muyldermans, S., 1999. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *Journal of immunological methods*, 231(1-2), pp.25–38.
- Ristau, B.T., O'Keefe, D.S. & Bacich, D.J., 2014. The prostate-specific membrane antigen: lessons and current clinical implications from 20 years of research. *Urologic oncology*, 32(3), pp.272–9.
- Rojas, C. et al., 2002. Kinetics and inhibition of glutamate carboxypeptidase II using a microplate assay. *Analytical Biochemistry*, 310(1), pp.50–54.
- Rovenská, M. et al., 2008. Tissue expression and enzymologic characterization of human prostate specific membrane antigen and its rat and pig orthologs. *The Prostate*, 68(2), pp.171–82.
- Sácha, P. et al., 2007. Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain. *Neuroscience*, 144(4), pp.1361–72.
- Schulke, N. et al., 2003. The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), pp.12590–12595.
- Silver, D. a et al., 1997. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3, pp.81–85.
- Su, S.L. et al., 1995. Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA : ratio of expression as a potential measurement of progression. *Cancer research*, 55(7), pp.1441–1443.
- Tsukamoto, T., Wozniak, K.M. & Slusher, B.S., 2007. Progress in the discovery and development of glutamate carboxypeptidase II inhibitors. *Drug Discovery Today*, 12(17-18), pp.767–776.
- Tykvar, J. et al., 2014. Comparative analysis of monoclonal antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA). *The Prostate*, 74(16), pp.1674–90.
- Wright, G.L. et al., 1995. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urologic Oncology*, 1(95), pp.18–28.
- Wroblewska, B. et al., 1997. N-Acetylaspartylglutamate Selectively Activates mGluR3 Receptors in Transfected Cells. *Journal of Neurochemistry*, 69(1), pp.174–181.
- Yamamoto, T. et al., 2004. 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. *European Journal of Neuroscience*, 20(2), pp.483–494.
- Yao, V. et al., 2008. Moderate expression of prostate-specific membrane antigen, a tissue differentiation antigen and folate hydrolase, facilitates prostate carcinogenesis. *Cancer Research*, 68(21), pp.9070–9077.
- Zeng, C. et al., 2012. Prostate-specific membrane antigen: a new potential prognostic marker of osteosarcoma. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 29(3), pp.2234–9.
- Zhao, R., Matherly, L.H. & Goldman, I.D., 2009. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert reviews in molecular medicine*, 11, p.e4.
- Zhou, W. et al., 1997. Fed-batch culture of recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production. *Biotechnology and bioengineering*, 55(5), pp.783–792.