



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ HSP90 JAKO CÍLE BIOLOGICKÉ TERAPIE NÁDORŮ

USE OF HSP90 AS A TARGET OF BIOLOGICAL THERAPY OF TUMORS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristína Bednárová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MUDr. Petr Müller, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1689/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Kristína Bednárová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **MUDr. Petr Müller, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití Hsp90 jako cíle biologické terapie nádorů

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Purifikace monoklonální protilátky
- 2) Konjugace protilátky s fluorochromem pro zobrazovací metody (mikroskopie, průtoková cytometrie)
- 3) Konjugace protilátky s cytostatikem – test cytotoxicity, stanovení viability
- 4) Příprava protilátek na testování in vivo.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kristína Bednárová
studentka

MUDr. Petr Müller, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Konjugáty protilátka-liečivo (ADC) reprezentujú relatívne novú triedu vysoko účinných protinádorových liečiv. Vďaka vysoko špecifickým monoklonálnym protilátkam sú schopné doručiť cytotoxický náklad priamo do nádorových buniek a tým minimalizovať poškodenie zdravých buniek. Jedným z hlavných faktorov, na ktorých závisí terapeutická účinnosť je výber vhodného antigénu, ktorý po väzbe konjugátu podlieha internalizácii. Ako potenciálne ciele boli vybrané proteíny Hsp90 α a c-Met. Hsp90 predstavuje molekulárny chaperón, ktorý je nadmerne exprimovaný v nádorových bunkách a navyše môže byť translokovaný na membránu. Hsp90 prispieva k angiogenéze, motilite nádorových buniek alebo tvorbe metastáz. Druhý spomenutý, C-Met, predstavuje tyrozínkinázový receptor, ktorý hrá ústrednú úlohu v epiteliálnej morfogénese a malígnej transformácii. Jeho zvýšená aktivita indukuje dráhy zodpovedné za proliferáciu, inváziu a migráciu malígnych buniek.

V diplomovej práci bol študovaný potenciál využitia protilátok s anti-Hsp90 a anti-c-Met aktivitou v protinádorovej terapii. Experimentálna časť práce zahrňovala purifikáciu protilátky EEV1-2.1 s anti-Hsp90 aktivitou a jej následnú charakterizáciu. Ďalej zahrňovala charakterizáciu a selekciu dostupných klonov anti-c-Met protilátky. Zaoberala sa tiež výberom a optimalizáciou správnej stratégie konjugácie. Aktivita protilátok a od nich odvodených konjugátov bola skúmaná prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie či prietokovej cytometrie. *In vivo* experimenty boli ďalej zamerané na overenie účinnosti ADC sledovaním miery inhibície proliferácie vybraných nádorových línií. Výsledky diplomovej práce odhalili, že protilátka EEV1 neprechádza do buniek antigénom sprostredkovanou cestou, a nie je tak vhodná pre použitie v konjugácii s cytostatickým liečivom. Na druhej strane, ADC konjugáty anti-c-Met protilátky vykazovali vysokú afinitu voči natívnemu antigénu, dochádzalo k ich internalizácii cez väzbu na antigén a navyše inhibovali proliferáciu c-Met exprimujúcich buniek OE33.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Konjugáty protilátka-liečivo, monoklonálne protilátky, eHsp90, c-Met, konjugácia, linker, MMAE, cielená nádorová terapia

ABSTRACT

Antibody-drug conjugates (ADCs) represent a relatively new class of highly potent anti-tumor drugs. Thanks to highly specific monoclonal antibodies, ADCs are able to deliver a cytotoxic payload directly to tumor cells and thus minimize damage to healthy cells. Therapeutic efficacy depends on the selection of an appropriate antigen that undergoes internalization upon conjugate binding. For this project, pro-oncogenic Hsp90 α and c-Met were selected as potential targets. Hsp90 is a molecular chaperone that is overexpressed in tumor cells and, in addition, can be translocated to the membrane of these cells. Overexpressed Hsp90 contributes to angiogenesis, tumor cell motility or metastasis. C-Met is a receptor tyrosine kinase that plays a central role in epithelial morphogenesis and malignant transformation. Its increased activity induces pathways responsible for the proliferation, invasion and migration of malignant cells.

The aim of the diploma thesis was to study the potential use of antibodies with anti-Hsp90 and anti-c-Met activities in anti-tumor therapy. The experimental part involved the purification of the EEV1-2.1 antibody with anti-Hsp90 activity and its subsequent characterization. Furthermore, it included the characterization and selection of anti-c-Met antibody clones. It was also focused on selection and optimization of the right conjugation strategy. The activity of the antibodies and their conjugates was examined by fluorescence microscopy and flow cytometry. *In vivo* experiments were further aimed at verifying the efficacy of ADC by monitoring the rate of inhibition of proliferation of selected tumor cell lines. The results revealed that the EEV1 antibody does not enter the cells specifically by antigen-mediated way, and is therefore not suitable for use in conjugation with a cytostatic drug. On the other hand, anti-c-Met antibody ADC conjugates exhibit high affinity for native antigen, internalization through antigen binding, and additionally inhibited proliferation of c-Met overexpressing OE33 cells.

KEYWORDS

Antibody-drug conjugates, monoclonal antibodies, eHsp90, c-Met, conjugation, linker, MMAE, targeted cancer therapy

Bibliografická citácia

BEDNÁROVÁ, Kristína. *Využití Hsp90 jako cíle biologické terapie nádorů* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/140464>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Petr Müller.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
Podpis študenta

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa veľmi rada poďakovala vedúcemu mojej diplomovej práce MUDr. Petrovi Müllerovi, Ph.D. za odborné vedenie, inšpiráciu pri štúdiu, cenné rady a pripomienky pri vypracovaní práce. Moje poďakovanie patrí tiež Mgr. Oliverovi Šimončíkovi a Katke Křivánkovej za ich čas, ochotu a pomoc pri práci v laboratóriu. V neposlednej rade by som chcela poďakovať mojej rodine za láskavú podporu počas celého štúdia.

Pracovisko: Regionální centrum aplikované molekulární onkologie RECAMO Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, Brno, 65653

Práca bola podporená projektom MZ ČR - RVO (MOÚ, 00209805)

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická časť.....	10
2.1	Protilátky.....	10
2.1.1	V(D)J rekombinácia.....	11
2.1.2	Monoklonálne protilátky.....	12
2.1.3	Produkcia a purifikácia protilátok.....	14
2.1.4	Mechanizmus účinku terapie mAb.....	14
2.1.5	Konjugáty protilátka-liečivo.....	16
2.1.5.1	Výber cieľového antigénu.....	16
2.1.5.2	Výber protilátky.....	16
2.1.5.3	Linker.....	16
2.1.5.4	Výber liečiva.....	17
2.1.5.5	Mechanizmus pôsobenia ADC in vivo.....	18
2.2	Hsp90 ako cieľový antigén pre ADC.....	19
2.2.1	Klasifikácia.....	20
2.2.2	Štruktúra Hsp90.....	20
2.2.3	Regulácia aktivity Hsp90.....	21
2.2.4	Hsp90 ako potenciálny terapeutický cieľ.....	22
2.2.5	Extracelulárne Hsp90.....	23
2.3	C-Met ako cieľový antigén pre ADC.....	25
2.3.1	Štruktúra c-Met.....	25
2.3.2	Funkcia c-Met pri karcinogéze.....	26
3	Ciele diplomovej práce.....	28
4	Experimentálna časť.....	29
4.1	Použité materiály a prístroje.....	29
4.1.1	Prístrojové vybavenie.....	29
4.1.2	Chemikálie.....	29
4.1.3	Roztoky a pufre.....	30
4.1.4	Rastové médiá.....	31
4.1.5	Bunkové línie.....	31
4.1.6	Protilátky.....	31
4.2	Metódy.....	32

4.2.1	Purifikácia protilátky EEV1	32
4.2.2	Konjugácia protilátok pomocou maleimidu	32
4.2.2.1	Značenie EEV1 cez -SH skupiny.....	32
4.2.2.2	Značenie anti-c-Met protilátok cez -SH skupiny	32
4.2.2.3	Značenie anti-c-Met protilátok cez -NH skupiny	33
4.2.3	Konjugácia protilátok pomocou NHS derivátov	33
4.2.4	SDS-PAGE.....	34
4.2.5	Farbenie Coomassie Brilliant Blue	35
4.2.6	Westernový prenos	35
4.2.7	Imunodetekcia	35
4.2.8	Bunkové kultúry	35
4.2.8.1	Kultivácia bunkových línií.....	35
4.2.8.2	Spracovanie buniek do peletu	36
4.2.8.3	Lýza buniek.....	36
4.2.8.4	Stanovenie koncentrácie proteínov podľa Bradforda	36
4.2.9	Fluorescenčná mikroskopia.....	36
4.2.10	Prietoková cytometria	36
4.2.11	Test životaschopnosti	37
5	Výsledky.....	38
5.1	Purifikácia EEV1-2.1	38
5.2	Overenie aktivity EEV1-2.1	39
5.3	Optimalizácia redukcie EEV1-2.1	40
5.4	Konjugácia EEV1-2.1 s fluorochromom pre zobrazovacie metódy	41
5.5	Detekcia Hsp90 α v nádorových bunkách fluorescenčnou mikroskopiou	42
5.6	Overenie väzbovej špecificity pomocou prietokovej cytometrie	43
5.7	Charakterizácia klonov anti-c-Met protilátok.....	44
5.8	Výber bunkových línií.....	44
5.9	Výber vhodného klonu fluorescenčnou mikroskopiou.....	45
5.10	Výber vhodného klonu prietokovou cytometriou	48
5.11	Optimalizácia podmienok značenia anti-c-Met protilátok.....	48
5.12	Porovnanie aktivity anti-c-Met protilátky s aktivitou EEV1 <i>in vivo</i>	49
5.13	Konjugácia anti-c-Met protilátok s cytostatikom	51
5.14	Testy cytotoxicity anti-c-Met protilátok	52

6	Diskusia.....	56
7	Záver.....	58
8	Zoznam použitej literatúry	59
9	Zoznam použitých skratiek	68

1 ÚVOD

Nádorové ochorenia patria medzi najčastejšie smrteľné choroby, ktoré ročne spôsobujú približne 10 miliónov úmrtí po celom svete [1]. Medzi tradičné liečebné postupy patrí chemoterapia, rádioterapia alebo chirurgický zákrok. Cytotoxické látky používané v chemoterapii častokrát vykazujú nízky terapeutický index a závažné vedľajšie účinky, ktoré sa pripisujú účinku liečiva mimo cieľové tkanivá. Riešením by mohla byť cieleňá terapia monoklonálnymi protilátkami (mAb) v spojení s vysokoúčinnými cytotoxickými látkami. Konjugáty protilátka-liečivo (ADC) momentálne patria medzi najrýchlejšie rastúce skupiny liečiv v onkológii. Kombináciou imunoterapie a chemoterapie vytvárajú výnimočnú skupinu terapeutík, ktorá je vysoko špecifická a cytotoxická zároveň. ADC pozostávajú z troch kľúčových prvkov: monoklonálnej protilátky, ktorá sa selektívne viaže na antigén na povrchu nádorovej bunky, cytotoxického nákladu a štiepateľného alebo neštiepateľného linkera. Každá z týchto zložiek sa môže medzi ADC značne líšiť, čo vedie k obrovskej rozmanitosti štruktúr a následne k farmakologickým a klinickým vlastnostiam jednotlivých ADC [2]. K dnešnému dňu bolo schválených úradom FDA na klinické použitie 12 rôznych ADC [3].

Cieľom mnohých výskumov je nájsť vhodný cieľový antigén, ktorý sa nadmerne exprimuje na povrchu nádorových buniek a väzbou protilátky sa internalizuje do intracelulárneho priestoru. Potencionálnym terapeutickým cieľom by mohol byť extracelulárny Hsp90. Hsp90 je molekulárny chaperón, ktorý je zodpovedný za skladanie de novo syntetizovaných proteínov a za opätovné skladanie nesprávne zložených proteínov. Hsp90 má významnú úlohu v malígnej transformácii, kde podporuje aktiváciu množstva mutovaných proteínov. V nádorových bunkách môže dochádzať k translokácii Hsp90 do membránového a extracelulárneho priestoru a jeho zvýšené hladiny korelujú so zlou prognózou [4].

Vhodnú skupinu antigénov pre ADC terapiu predstavujú aj tyrozín kinázové receptory, ktoré sú často abnormálne exprimované nádorovými bunkami. Jedným z nich je aj c-Met, ktorý má abnormálnu aktivitu v mnohých typoch ľudských malignít, vrátane rakoviny obličiek, pečene, žalúdka, prsníka či mozgu. Po stimulácii ligandom indukuje niekoľko biologických odpovedí, ktoré spoločne vedú k programu známemu ako invazívny rast. Vysoká expresia týchto proteínov v niektorých typoch nádorov v porovnaní s nízkymi hladinami expsie v normálnych tkanivách, robí Hsp90 a c-Met atraktívny cieľ ADC terapie [5].

2 TEORETICKÁ ČASŤ

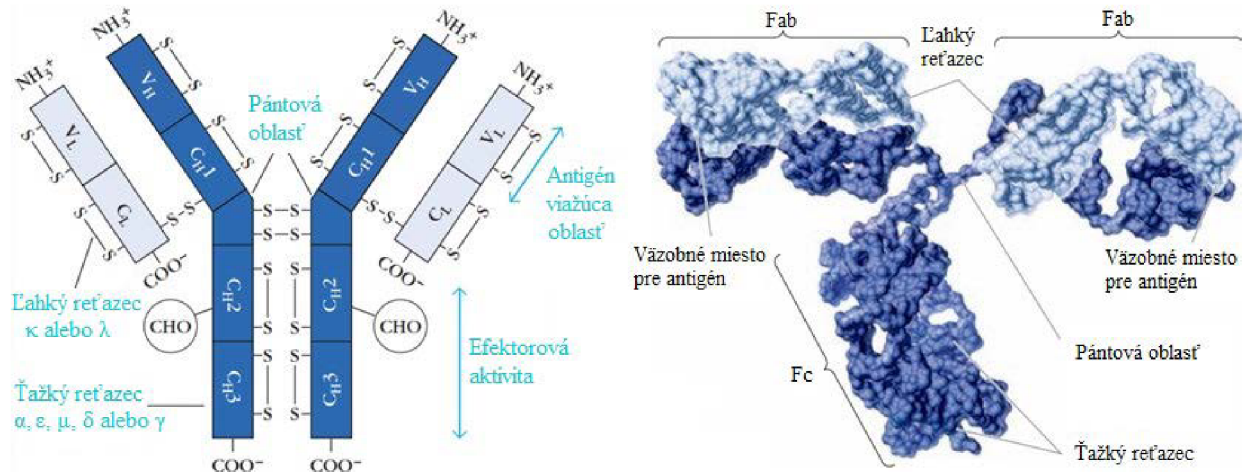
2.1 Protilátky

Protilátky, známe aj ako imunoglobulíny (Ig), sú veľké globulárne proteíny, ktoré sú produkované imunitným systémom v odpovedi na prítomnosť baktérií, vírusov či iných patogénov. Pre ich unikátne vlastnosti našli široké využitie vo výskume a medicíne, kde sú využívané na diagnostické a terapeutické účely. Prvýkrát boli objavené v roku 1890 nemeckým lekárom a bakteriológom Emilom von Behringom. V roku 1906 Paul Ehrlich zaviedol do lekárskej literatúry pojem imunoterapia. Prelomovým bol rok 1974, kedy Cesar Milstein a George F. Kohler pripravili prvé monoklonálne protilátky. Podarilo sa im to vďaka spojeniu B-lymfocytov s nesmrteľnými myelómovými bunkami. Takto vzniknuté hybridné bunky, ktoré dostali názov hybridomy, si zachovávajú kľúčové vlastnosti myelómových buniek ako aj B-lymfocytov, produkujú protilátky B-lymfocytu použitého pri fúzii, rýchlo sa delia a sú takmer nesmrteľné [6, 7, 8].

Molekula imunoglobulínu je tvorená dvoma funkčne sa odlišujúcimi oblasťami, variabilnou (V) oblasťou a konštantnou (C) oblasťou. Konštantná oblasť interaguje s efektorovými bunkami, pričom variabilná oblasť rozpoznáva antigén. V závislosti od typu C oblasti delíme imunoglobulíny do piatich hlavných tried: IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Triedy imunoglobulínov sa teda líšia v type izotypu ťažkého reťazca, ktoré sú označované ako α , ϵ , μ , δ , γ . Jednotlivé triedy izotypov sú produkované v rôznych fázach imunitnej odpovede a majú odlišné funkcie [9].

Imunoglobulíny triedy G tvoria približne 75% sérových protilátok u ľudí, a sú preto najčastejším typom protilátok nachádzajúcim sa v krvnom obehu. Rovnako ide o terapeuticky najvýznamnejšiu a zároveň najviac študovanú triedu imunoglobulínov. Základná štruktúra IgG je tvorená štyrmi polypeptidovými reťazcami zloženými do tvaru písmena Y. Molekulová hmotnosť IgG je 150 kDa. IgG je zložený z dvoch identických ťažkých (H, 50 kDa) a dvoch identických ľahkých (L, 25 kDa) reťazcov. Reťazce sú navzájom stabilizované prostredníctvom disulfidových väzieb. Ľudské IgG sa ďalej delia do podtried na základe ich relatívneho zastúpenia v ľudskej plazme a to na IgG1-IgG4. Podobne je tomu aj u myšíc IgG, ktoré sa však delia na IgG1, IgG2a-c a IgG3. Každá podtrieda je kódovaná iným génom. Podtriedy sa ďalej líšia v počte a umiestnení disulfidových väzieb a v dĺžke takzvanej pántovej oblasti. Ľahký reťazec má 2 izotypy κ a λ , ktorých zastúpenie v molekule protilátky je individuálne variabilné. N-koncový úsek imunoglobulínu je tvorený štyrmi variabilnými úsekmi (V-domény), po dvoch na ťažkých (VH) a ľahkých reťazcoch (VL). Každá V-doména sa skladá z troch hypervariabilných úsekov, ktoré určujú antigénnu špecifitu protilátky. Oblasť VL-VH tak umožňuje väzbu antigénu, ku ktorému je komplementárna. Sekvencie C-koncových ľahkých ako aj ťažkých reťazcov sú na rozdiel od N-koncových sekvencií výrazne konzervovanejšie. Konštantná oblasť obsahuje tri sekvenčne vysoko konzervované domény C_{H1} , C_{H2} a C_{H3} . C_{H1} a C_{H2} sú prepojené pántovou oblasťou, ktorá spája ťažké reťazce vďaka disulfidovým väzbám. Ľahký reťazec obsahuje jednu konštantnú C_{L1} doménu, ktorá sa nachádza oproti C_{H1} doméne a je s ňou rovnako prepojená disulfidovými väzbami. Konštantné úseky zodpovedajú predovšetkým za efektorové funkcie protilátok, ako napríklad za väzbu komplementu alebo interakciu s Fc receptorom na imunokompetentných bunkách. Okrem

disulfidových väzieb, ktoré vzájomne prepájajú HC s LC v pántovej oblasti, molekula protilátky obsahuje aj vnútroreťazcové disulfidové väzby, ktoré stabilizujú H a L domény (obr. 1). Vnútroreťazcový disulfid tvorí slučku, ktorá obsahuje asi 60 aminokyselín. IgG obsahuje okrem polypeptidových reťazcov aj jeden oligosacharidový reťazec, ktorý je naviazaný na C_{H2} doméne. Glykozylácia zvyšuje konformačnú stabilitu a tiež má vplyv na schopnosť protilátky viazať antigén [10, 11, 12, 13, 14].



Obrázok 1: (A.) Schematické znázornenie štruktúry IgG, (B.) a jeho kryštálová štruktúra [14].

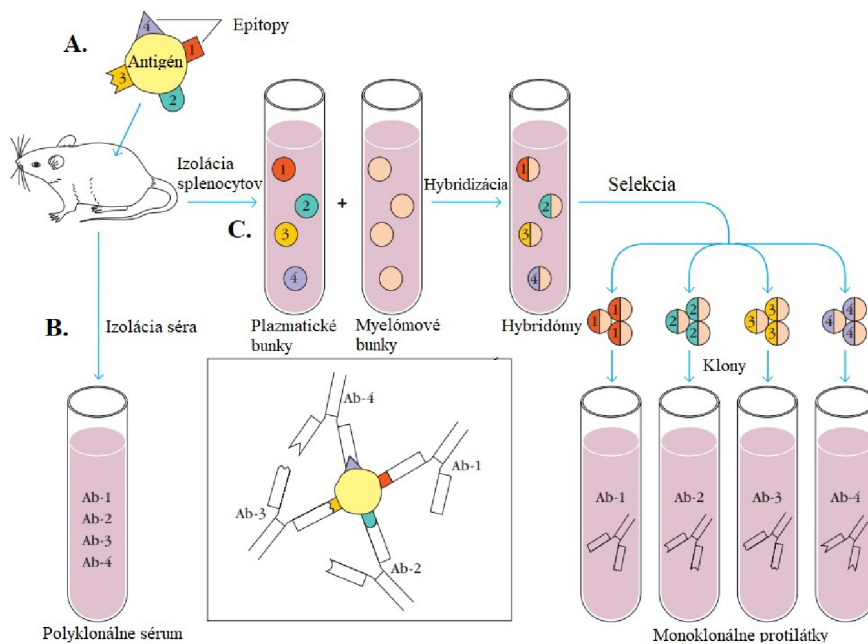
2.1.1 V(D)J rekombinácia

V(D)J rekombinácia je špeciálny mechanizmus, vďaka ktorému sú produkované protilátky schopné rozlíšiť množstvo antigénov. Proces rekombinácie prebieha v skorých štádiách dozrievania T a B lymfocytov. Gény kódujúce reťazce imunoglobulínov sú zložené z niekoľkých typov génových segmentov. Gény ťažkého reťazca ľudského Ig obsahujú 2 konštantné génové segmenty, 50 variabilných (V), 27 diverzitných (D) a 6 spojovacích (J) génových segmentov. Génový lokus ľahkého reťazca obsahuje V a J segmenty, ale je deficientný na D segmenty. V B-lymfocyte dochádza najskôr k DJ rekombinácii, čo znamená, že akýkoľvek úsek medzi vybraným D a J segmentom je vyštiepený. Po tomto procese dochádza k spojeniu jedného V segmentu s DJ oblasťou, pričom všetky segmenty medzi vybraným V a D segmentom sú vymazané z genómu. Výsledkom je primárny transkript ťažkého reťazca. Bunka môže následne zahájiť tvorbu génu pre ľahké reťazce. V prípade ľahkého reťazca ide len o VJ rekombináciu. Po expresii IgM a IgD sa bunka stáva zrelým B-lymfocytom. Po styku zrelej B-bunky s antigénom dochádza k mutáciám V segmentu. B-lymfocyty sa ďalej diferencujú v procese prepínania izotypov, ktorý je známy ako class-switching. Ide o rekombinačný proces, pri ktorom sa mení izotyp produkovaného imunoglobulínu. Pri tomto procese sú z génov ťažkých reťazcov štiepené konštantné úseky. Ak sú prítomné sekvencie, ktoré sa dajú eliminovať, môže class-switching prebiehať v bunke niekoľkokrát za sebou. Výsledná B-bunka produkuje protilátky jedného izotypu, prípadne jednej podtriedy [15].

2.1.2 Monoklonálne protilátky

Použitie monoklonálnych protilátok (mAb) je jednou zo základných stratégií v liečbe onkologických ochorení. Pretože sa táto stratégia zameriava na cieľovú štruktúru, hovoríme o cielej terapii, ktorá zamedzuje poškodeniu zdravého tkaniva v okolí tumoru.

Pri imunizácii antigénom dochádza k stimulácii rôznych klonov B lymfocytov tvoriacich protilátky proti rôznym epitopom antigénu. Pre výzkum, diagnostiku alebo terapeutické aplikácie je však dôležité, aby protilátka mala presne definovanú špecifitu a pochádzala z jedného klonu. Spôsob prípravy monoklonálnych protilátok bol objavený G. Köhlerom a C. Milsteinom v roku 1975. Objav spočíval v spojení aktivovaných B buniek s bunkami myelómu. Takto vzniknuté hybridné bunky dostali názov hybridómy. Hybridóm má zachovanú schopnosť myelómu nekonečne sa deliť a produkovať protilátku ako B bunka, ktorej fúziou vznikol. Celý proces začína imunizáciou, ktorá predstavuje vpravenie špecifického antigénu do experimentálneho zvierat'a, v ktorom dôjde k aktivácii B lymfocytov a produkcii protilátok. V tomto momente je odobratá slezina zvierat'a a jednotlivé B-bunky sú následne fúzované s bunkami myelómu, ktoré sú zbavené génu pre transkripciu HPRGT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza). Rovnako je možné odobrať sérum obsahujúce zmes polyklonálnych protilátok (obr. 2). Ich hlavnou nevýhodou v porovnaní s monoklonálnymi protilátkami je ich veľká variabilita. Fúzované bunky sú ďalej inkubované v HAT médiu. Výsledkom je odumretie nefúzovaných myelómových buniek, ktoré nedokážu produkovať nukleotidy a súčasne odumretie B-buniek z dôvodu ich krátkej životnosti. V médiu prežívajú len hybridy B-bunka-myelóm. V tejto fáze sa médium nariedi a nanesie do viacjamkovej doštičky tak, aby každá jamka obsahovala jednu hybridnú bunku. Primárnym skríningom sa identifikujú a vyberú hybridómy s produkciou vhodnej protilátky. Po selekcii sú klony kultivované a získavané väčšie tkanivové kultúry. V závislosti od typu kultúry je možné získať 1 až 60 µg/ml monoklonálnej protilátky [14, 16].



Obrázok 2: (A.) Vpravenie antigénu s viacerými epitopmi do myši. (B.) Produkcia polyklonálneho antiséra s obsahom zmesi monoklonálnych protilátok špecifických pre rôznych epitopov antigénu. (C.) Fúzia B-buniek s myelómovou líniou a selekcia klonov produkujúcich protilátky [14].

Za účelom liečby ľudí je potrebné modifikovať proteínové sekvencie nehumánnych monoklonálnych protilátok tak, aby sa čo najviac podobali protilátkam produkovaným prirodzene u ľudí. Prvé klinické štúdie pozorovali intravenóznú aplikáciu myších monoklonálnych protilátok do tela ľudských pacientov. Imunoglobulíny produkované hybridómovou technológiou indukovali u pacientov imunitnú odpoveď za tvorby anti-myších protilátok nazývaných HAMA (human anti-mouse antibodies). HAMA spôsobujú tvorbu imunokomplexov, čo znemožňuje väzbu na nádorový antigén, urýchľuje elimináciu liečiva z krvného obehu a môže spôsobiť sérové ochorenia či viesť k anafylaxii. Monoklonálne protilátky delíme podľa pôvodu ich štruktúry na myšie, chimerické, humanizované a ľudské. Chimerická protilátka obsahuje variabilné oblasti ľahkého a ťažkého reťazca myšej mAb a konštantné oblasti ľudskej protilátky. V ľudskom organizme môže stále vyvolávať anti-chimerickú protilátkovú odpoveď proti myším variabilným oblastiam. Humanizované protilátky sú ľudské protilátky upravené tak, že ich variabilné oblasti sú komplementárne k myšej mAb [10, 17, 18].

Problémom pri imunoterapii monoklonálnymi protilátkami je častokrát veľká molekulová hmotnosť protilátok. V porovnaní s bežne používanými cytostatikami je ich molekulová hmotnosť až 150x vyššia a dochádza tak k pomalšej distribúcii a podstatne nižšiemu prieniku do nádorového tkaniva. Bariéru vytvára aj zvýšený intersticiálny tlak vo vnútri nádoru, ktorý zabraňuje pasívnej difúzií imunoglobulínov do tumoru. Čas potrebný k difúzii protilátok k nádorovým bunkám predlžuje pomerne veľká vzdialenosť medzi krvnými cievami a interstíciom. U pacientov s objemnejšími nádormi je použitie monoklonálnych protilátok na liečbu limitujúce. Úspešnosť liečby môže ovplyvňovať aj heterogénna expresia antigénu. Znížené množstvo antigénov môže viesť k rezistencii nádorových buniek na imunoterapiu [19, 20].

2.1.3 Produkcia a purifikácia protilátok

Imunitný systém produkuje protilátky ako odpoveď na prítomnosť pre telo cudzích molekúl. Protilátky sú tvorené B-lymfocytmi a cirkulujú v krvi a lymfe, kde sa viažu na svoj špecifický antigén. Vďaka pokročilému vývoju techník produkcie protilátok dnes existujú rôzne spôsoby ich produkcie. Polyklonálne protilátky sa získavajú z krvného séra zvierat. Monoklonálne protilátky môžu byť produkované hybridómovými líniami alebo metódou myšieho ascitu. Ascitická metóda sa používa na produkciu mAb *in vivo*, kedy sa hybridómové bunky injekčne zavedú do peritoneálnej dutiny. V dutine sa v dôsledku zápalu tvorí ascitická tekutina, ktorá obsahuje vysoké koncentrácie protilátok. Vzniknutá tekutina sa odoberá a sú z nej purifikované protilátky. Na produkciu rekombinantných protilátok sa využívajú napríklad CHO bunky. Ide o bunky vaječníkov čínskeho škrečka, ktoré sa vyznačujú schopnosťou vykonávať posttranslačné modifikácie [21, 22].

Protilátky môžu byť purifikované rôznymi chromatografickými ale aj nechromatografickými technikami. Medzi nechromatografické spôsoby purifikácie patrí precipitácia a extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina. Medzi najpoužívanejšie chromatografické metódy patrí afinitná chromatografia, ktorej princípom je interakcia imunoglobulínu s ligandom. Táto technika je uprednostňovaná z dôvodu rýchlosti, jednoduchosti a vysokej selektívnosti. Princíp afinitnej chromatografie spočíva v imobilizácii ligandu na vhodný, najčastejšie polymérny nosič. Cieľová biomolekula je selektívne zachytená týmto ligandom, zatiaľ čo ostatné molekuly prechádzajú voľne kolónou. Cieľové biomolekuly sú následne uvoľnené z kolóny vhodnými elučnými činidlami. Pri elúcii dochádza k strate väzieb medzi ligandom a biomolekulou [23, 24].

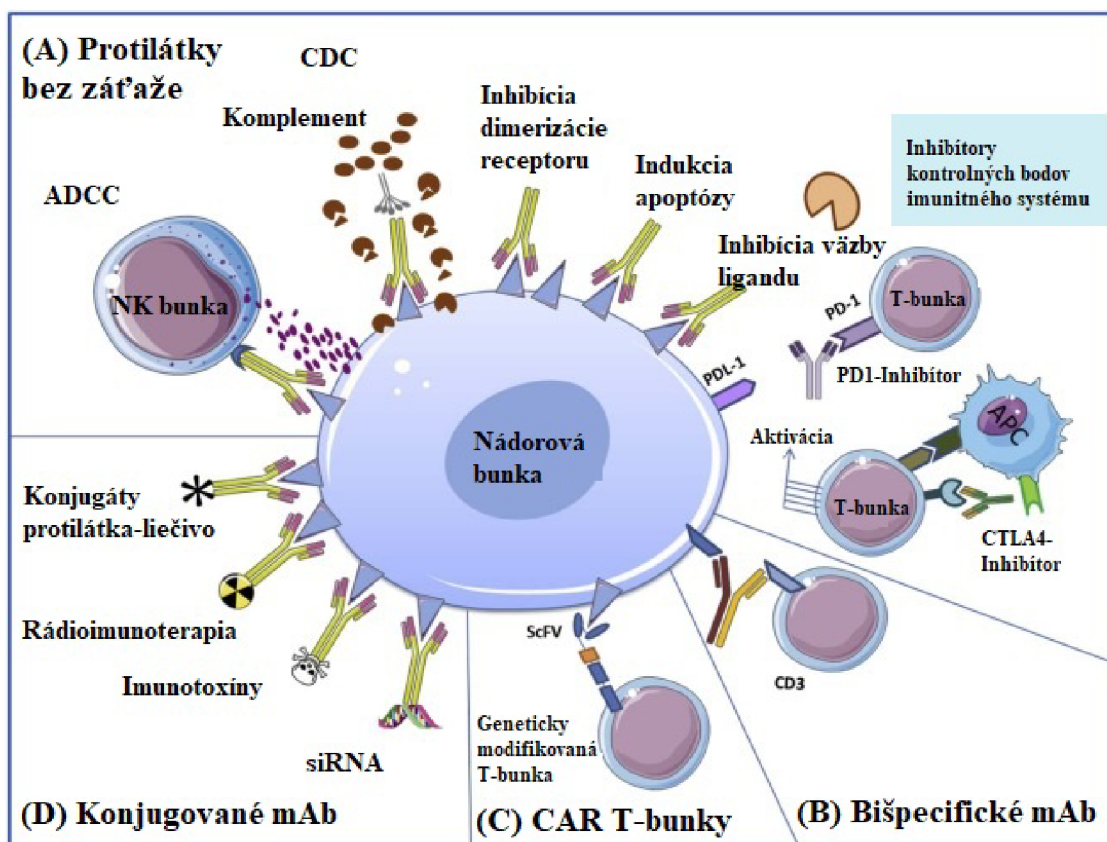
Pri purifikácii protilátok sú používané tri typy ligandov a to antigén, anti-protilátka a bakteriálne Fc receptory. Antigénne ligandy sa používajú pri izolácii špecifickej protilátky zo zmesi rôznych imunoglobulínov. Príkladom je purifikácia protilátky zo séra imunizovaných zvierat. Matrice s anti-protilátkami sa využívajú na získanie najmä potkaních monoklonálnych protilátok. Do tretej kategórie patria Fc receptory, ktoré majú niektoré baktérie a vírusy na svojom povrchu. Vďaka nim sa tieto mikroorganizmy dokážu vyhnúť imunitnej odpovedi hostiteľa. Najlepšie preštudované Fc receptory sú proteín A nachádzajúci sa na povrchu baktérie *Staphylococcus aureus* a proteín G nachádzajúci sa na baktériách rodu *Streptococcus*. Gény týchto proteínov boli klonované a v súčasnej dobe sú vo veľkej miere produkované geneticky modifikovanými baktériami. Viažu sa na Fc fragment IgG. Proteín A s molekulovou hmotnosťou 42 kDa obsahuje päť extracelulárnych Ig-väzbových domén a je stabilný v rozmedzí pH 2-11. Proteín A sa dnes využíva na purifikáciu širokého spektra myších, králičích či ľudských IgG. Proteín G sa delí do dvoch skupín a to G a C. Proteín G skupiny G má molekulovú hmotnosť 65 kDa a skupiny C má 58 kDa. Obe skupiny sú stabilné v rozmedzí pH 4-8. Proteín G obsahuje tri homológne IgG-väzbové domény. Proteín G sa oproti proteínu A používa na purifikáciu potkaních či kozích IgG [24, 25, 26, 27].

2.1.4 Mechanizmus účinku terapie mAb

V liečbe nádorových ochorení môžu byť monoklonálne protilátky využívané samostatne ako forma pasívnej špecifickej imunoterapie alebo vo forme konjugátov. Mechanizmus účinku terapeutických mAb môže byť priamy, kedy protilátka vplýva na bunkové funkcie

prostredníctvom inhibície alebo aktivácie signalizačných dráh, prípadne priamou aktiváciou apoptózy. Ďalším mechanizmom účinku je takzvaná cytotoxicita sprostredkovaná efektorovými bunkami závislá od protilátok (ADCC). Ide o obranný imunitný mechanizmus, kedy sú na povrchu membrány efektorovej bunky (NK bunka) viazané špecifické mAb viažúce sa na antigén nádorových buniek. Efektorové bunky potom aktívne lyzujú malígne bunky. Cytotoxicita závislá na komplemente (CDC) funguje na princípe väzby protilátky na antigén a následnom naviazaní komplementu, čím sa aktivuje komplex atakujúci membránu. Výsledkom CDC je komplementom sprostredkovaná lýza bunky. Ďalšia skupina protilátok sa zameriava na kontrolné body imunitného systému. Takéto protilátky sa viažu na receptory inhibujúce T-bunky (CTLA4, PD-1) alebo zabraňujú väzbe ligandu (obr. 3). Terapia bišpecifickými mAb využíva protilátky s funkčne odlišnými väzbovými doménami, čo umožňuje interakciu s dvoma cieľovými antigénmi naraz. Jedno rameno protilátky tak môže interagovať napríklad s antigénom nádorových buniek, pričom druhé rameno aktivuje antigény na imunitných efektorových bunkách [28].

Účinnosť terapie monoklonálnymi protilátkami sa môže výrazne zvýšiť konjugáciou s vysoko účinnými nákladmi ako sú cytotoxické liečivá, rádioaktívne značky, malé interferujúce RNA (siRNA) alebo imunotoxíny. Protilátky špecifické k nádorovým antigénom umožňujú umožňujú priame dodávanie toxínov do malígnych buniek s minimálnou systémovou toxicitou [28].



Obrázok 3: Znázornenie rôznych mechanizmov účinku terapie mAb: (A) protilátky bez záťaže, (B) bišpecifické mAb, (C) CAR T-bunky, (D) konjugované mAb [28]

2.1.5 Konjugáty protilátka-liečivo

Konjugáty protilátka-liečivo (ADC) poskytujú unikátne spojenie chemoterapie a imunoterapie. Prvé predstavy o ADC mal pred takmer 100 rokmi nemecký lekár a vedec Paul Ehrlich, ktorý hovoril o protilátke ako o kúzelnjej strele identifikujúcej cieľ. Už vtedy hovoril o potenciáli protilátky preniesť toxický liek do cieľa bez poškodenia organizmu. V osemdesiatych rokoch sa uskutočnili prvé klinické skúšky tohto konceptu. K získaniu farmaceuticky účinného ADC však predchádza náročná príprava, ktorá naráža na množstvo prekážok. Medzi kľúčové kroky prípravy ADC patrí výber vhodného cieľa, príprava monoklonálnej protilátky, výber cytotoxickéj látky a výber spôsobu pripojenia tejto látky k protilátke [29, 30].

2.1.5.1 Výber cieľového antigénu

Výber vhodného antigénu je prvým dôležitým krokom výskumu, od ktorého sa ďalej odvíja úspech alebo neúspech celého ADC. Cieľový antigén musí mať zvýšenú expresiu v nádorových bunkách oproti zdravým bunkám. Mal by byť na povrchu malígnych buniek, čo zabezpečí dostupnosť pre cirkulujúce ADC. V neposlednom rade sú dôležité internalizačné vlastnosti antigénu. Internalizáciou antigénu rozumieme prechod antigénu/receptoru z membrány do vnútrobunkového priestoru. Pokiaľ k tomuto procesu dochádza po naviazaní ADC, tak tým je umožnený transport konjugátu do bunky. Vo vnútri bunky dochádza k odštiepeniu cytotoxika a k jeho následnému účinku. Najviac cielenými antigénmi ADC sú HER2, CD19, CD33, CD22 a MSLN [31, 32, 33].

2.1.5.2 Výber protilátky

Hlavnou prednosťou použitia ADC v protinádorovej liečbe je doručenie liečiva priamo do nádorových buniek prostredníctvom vysoko špecifickej monoklonálnej protilátky. Protilátka by preto mala vykazovať vysokú afinitu k povrchovému antigénu malígnych buniek. Nízka afinita môže viesť k neefektívnej internalizácii vedúcej k uvoľneniu ADC mimo cieľ. Pre maximalizáciu účinnosti ADC je dôležitá rovnováha medzi veľkosťou molekuly a väzbovou afinitou, ktorá ovplyvňuje penetráciu ADC do nádoru. Miera internalizácie protilátky je ďalším dôležitým bodom pri vývoji ADC. Protilátka by zároveň nemala v organizme vyvolávať silnú imunitnú odpoveď, a preto sa v súčasnosti na terapeutické účely používajú konjugáty s humanizovanými mAb. Imunogenicita takýchto ADC je výrazne nižšia ako u ADC s myšou mAb [30, 34, 35].

2.1.5.3 Linker

Úlohou linkera je stabilizovať ADC komplex počas cirkulácie v krvnom obeh. Zabraňuje uvoľneniu cytotoxického liečiva mimo cieľové tkanivo a uchováva konjugát v neaktívnom a súčasne netoxickom stave. Linker by mal zároveň umožniť uvoľnenie cytostatika až po jeho internalizácii do bunkového priestoru. Ak linker pozostáva zo stabilných väzieb, ktoré odolávajú proteolitickej degradácii, tak hovoríme o neštiepitelnom linker. Neštiepitelné linkery uvoľňujú cytotoxické liečivá až po internalizácii ADC, ktorá zahájí degradáciu mAb zložky v lyzozóme. Oproti štiepitelným linkerom sú stabilnejšie v krvnej plazme, ale zároveň sú závislé na lyzozomálnej degradácii. Patria sem napríklad tioéterové linkery a linkery na báze maleimidu [30, 35].

Druhú skupinu tvoria štiepiteľné linkery. K ich štiepeniu dochádza pri zmene podmienok prostredia, ako napríklad zmena pH či redoxného potenciálu alebo v prítomnosti proteolytických enzýmov, ktoré sa vyskytujú v nádorových bunkách v hojnom počte.

Podľa spôsobu štiepenia ich delíme na:

1. Linkery labilné v kyslom prostredí
2. Linkery citlivé na lyzozomálne proteázy
3. Disulfidové linkery citlivé na glutatión
4. Linkery štiepené β -glukuronidázou

Linkery citlivé na kyslé prostredie sú v alkalickom prostredí stabilné. K štiepeniu linkera dochádza po internalizácii v lyzozómoch. Konjugát prechádza z neutrálneho medzibunkového prostredia do endozómov (pH 5-6) a následne do kyslého prostredia lyzozómov (pH 4,8). Vzhľadom na nestabilitu linkera v kyslom prostredí dôjde k uvoľneniu cytotoxického nákladu do bunky. Ich použitie však vykazuje mierne riziko nešpecifického uvoľňovania liečiva, a preto sú uprednostňované linkery fungujúce na inej báze. Najviac používanými sú linkery senzitivne na proteázy. Ide o linkery na báze peptidov, ktoré sú štiepiteľné katepsínom B. Katepsín B je v nádorových bunkách mnohonásobne viac exprimovaný ako v zdravých bunkách. Príkladom je linker valín-citrulín, ktorý je odolný aj voči zmenám pH. β -glukuronidové linkery sú štiepené proteázou β -glukuronidáza, ktorá je neaktívna pri fyziologickom pH a aktívna v lyzozomálnom prostredí s hodnotou pH 4,8. Glutatión-senzitivne disulfidové linkery sa štiepia na základe rozdielneho redoxného potenciálu cytoplazmy a krvnej plazmy. Glutatión, ako prirodzený antioxidant, sa nachádza v intracelulárnom ako aj extracelulárnom prostredí, kde je jeho produkcia stimulovaná stresovým stavom buniek. V nádorových bunkách je vo vyšších koncentráciách, a preto je disulfidový mostík tohto typu linkeru redukovaný až v intracelulárnom priestore nádorových buniek [30, 36].

2.1.5.4 Výber liečiva

V konjugátoch ADC musia byť použité najmä látky s vysokou stabilitou. Liečivo musí byť dostatočne toxické v koncentráciách, ktoré sa dajú dosiahnuť pri podávaní protilátok. Prvé ADC obsahovali bežne používané chemoterapeutické lieky, ktoré vykazovali minimálnu alebo žiadnu protinádorovú aktivitu. Keďže množstvo liečiva, ktoré sa môže dostať do bunky je obmedzené množstvom cieľového antigénu na bunkovom povrchu, musí byť liečivo vysoko účinné. Na konjugáciu sa uprednostňujú látky s nízkou molekulovou hmotnosťou, s dostatočnou rozpustnosťou, nízkou imunogenicitou a dlhším polčasom rozpadu. Liečivá používané v ADC sa rozdeľujú do dvoch hlavných kategórií a to na látky poškodzujúce štruktúru DNA a inhibítory mikrotubulov [30, 37].

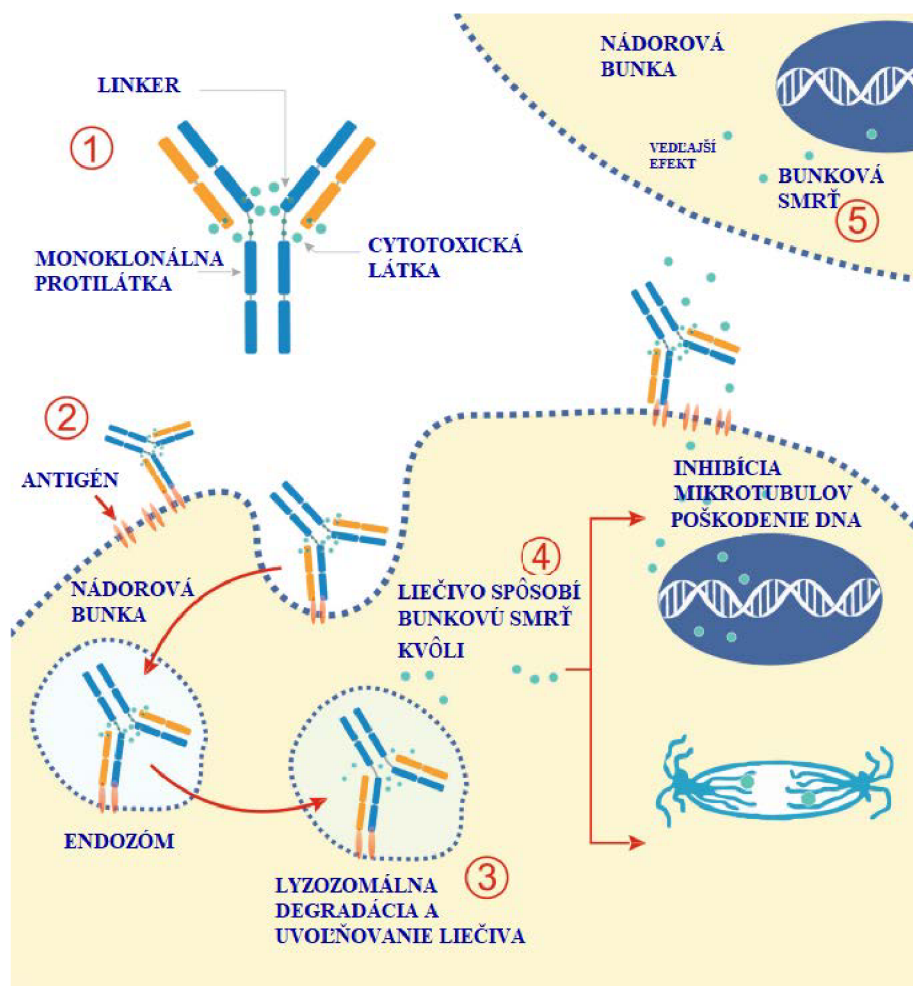
Činidlá poškodzujúce DNA sú aktívne v rôznych fázach bunkového delenia. Patrí sem kalicheamicin radiaci sa do triedy protinádorových antibiotík. Kalicheamicin rozpoznáva krátku sekvenciu DNA, zastavuje replikáciu a indukuje zlomy v dvojvláknovej DNA, ktoré vedú k bunkovej smrti. Duokarmycín je silná cytotoxická alkylačná látka, ktorá sa viaže na malý žliabok DNA. Nepravidelnou alkyláciou narúša štrukturálnu integritu DNA. Doxorubicín inhibuje syntézu DNA interkaláciou do jej štruktúry [30, 37].

Medzi inhibítory mikrotubulov patria deriváty maytansínu. Maytansinoidy blokujú polymerizáciu tubulínu, ktorá vedie k zastaveniu mitózy a bunkovej smrti. Pri testoch na bunkových líniách *in vitro* preukázal maytansín 100-krát vyššiu cytotoxicitu ako klinicky používané alkaloidy vinca alebo taxol. Maytansinoidy sa kvôli svojej nedostatočnej nádorovej špecifickosti a riziku vážneho poškodenia zdravých buniek nemôžu používať samostatne ako protinádorové lieky. Ich vysokou cytotoxicitou sú ideálnymi kandidátmi pri cieleňom dodávaní liečiv pomocou ADC. V klinickom vývoji ADC sa momentálne nachádzajú dva deriváty maytansínu a to DM1 a DM4 [30, 38].

Auristatiny sú ďalšou skupinou antimikrotubulárnych činidiel. Ide o syntetické analógy odvodené od dolastínu 10 a to monomethyl auristatin E (MMAE) a monomethyl auristatin F (MMAF). Auristatiny inhibujú polymerizáciu tubulínu, výsledkom čoho je zastavenie bunkového cyklu a následná apoptóza. MMAF má z dôvodu nabitého fenylalanínu nižšiu aktivitu ako MMAE. MMAE je 50-200krát účinnejší v porovnaní s alkaloidom vinca, pričom porovnanie účinností týchto liečiv bolo testované na viacerých bunkových líniách. MMAE sa kvôli svojej vysokej cytotoxicite nemôže používať samostatne, ale iba v komplexe ADC [38, 39].

2.1.5.5 Mechanizmus pôsobenia ADC *in vivo*

Vďaka spojeniu protilátka-liečivo sú nádorové bunky cielene vystavené vysoko účinným cytostatikám. ADC sa pacientovi podávajú intravenózne do krvného obehu. Po podaní cirkulujú v krvnom obehu tri zložky a to konjugát, mAb a molekuly cytotoxickej látky. Pomery zložiek sa medzi jednotlivými ADC líšia a to v závislosti na čistote produktu a stabilite linkera, pričom pomery zložiek sa môžu meniť v závislosti na čase. Po penetrácii do tkaniva musí ADC rozpoznať cieľový antigén, aby mohlo dôjsť k jeho internalizácii. Niektoré ADC majú protinádorovú aktivitu už v tomto kroku a to v prípade, že blokujú väzbu ligandu alebo narušujú schopnosť dimerizácie receptora. Internalizácia komplexu antigén-ADC prebieha buď antigénom sprostredkovanou endocytózou alebo pinocytózou, ktorá na väzbe antigénu nie je závislá. Internalizácia začína pučaním membrány do vnútra bunky, výsledkom čoho je skorý endozóm s vyššou koncentráciou protónov vytvárajúcich kyslé prostredie. Skorý endozóm sa postupne transformuje do neskorého endozómu, ktorý fúzuje s lyzozómami. Lyzozómy poskytujú prostredie citlivé na štiepenie väčšiny linkerov, pretože má vhodné pH a je bohaté na proteázy, najmä katepsín B. V záverečnom štádiu sa cytotoxické liečivo uvoľňuje do cytoplazmy, kde môže plniť svoju funkciu (obr. 4) [30, 35, 40, 41].



Obrázok 4: (1) Základná kompozícia ADC. (2) Naviazanie protilátky na antigén a endozomálna internalizácia komplexu antigén-ADC. (3) Štiepenie konjugátu a uvoľnenie cytotoxickej látky do cytoplazmy. (4) Cytotoxické látky narušujúce štruktúru DNA a inhibujúce polymerizáciu tubulínu. (5) Výsledkom je bunková smrť [42].

Rovnako ako u bežne používaných cytostatík, tak aj pri ADC si nádorové bunky dokážu vytvoriť mechanizmy ako sa stať voči tejto terapii rezistentnými. Bunky sa voči ADC môžu brániť znížením hladín cieľového antigénu na povrchu bunky, čím sa zníži množstvo prijatej cytotoxickej látky. Rezistencia sa ďalej vytvára v dôsledku zhoršených podmienok v lyzozómoch, a to zvýšením pH, ktoré vedie k zníženej aktivite proteolytických enzýmov. Ďalším známym mechanizmom je zvýšená regulácia ABC-transportérov, ktoré dokážu odstraňovať liečivo z bunkovej cytoplazmy [43, 44, 45].

2.2 Hsp90 ako cieľový antigén pre ADC

Proteíny tepelného šoku sú veľkou skupinou molekulárnych chaperónov, ktoré sú zodpovedné za skladanie de novo syntetizovaných proteínov, za opätovné skladanie nesprávne zložených proteínov a za degradáciu agregovaných proteínov. Sú to vysoko konzervované proteíny, ktoré sú produkované bunkou v odpovedi na vystavenie stresovým podmienkam. Ich zvýšená expresia v dôsledku tepelného stresu bola prvýkrát pozorovaná v laboratóriu talianskeho vedca Ferruccio Ritossu, ktorý neúmyselne ponechal *Drosophila melanogaster* pri vyššej teplote. Nejedná sa však len o reakciu na tepelný stres, expresiu Hsps zvyšujú aj niektoré

enviromentálne a chemické faktory (γ -žiarenie, reaktívne formy kyslíka), hypoxia, vírusové infekcie, nestresové fyziologické stavy či patofyziologické stavy. Zvýšená expresia Hsps hrá významnú rolu aj pri malígnej transformácii [46, 47, 48, 49, 50].

Príkladom stresu na bunkovej úrovni je aj chemoterapia a rádioterapia, kedy Hsps chránia bunku natoľko, že dokáže prežiť aj za inak smrteľných podmienok. Stimulácia expresie Hsps tak môže viesť až k rezistencii buniek na danú liečbu [51]. Ich cytoprotektívny účinok je zakomponovaný vo viacerých mechanizmoch. Hsps katalyzujú skladanie nesprávne zložených proteínov a tým zabraňujú ich agregácii. Zasahujú do procesu bunkovej smrti vďaka interakcii s kľúčovými efektormi apoptotického aparátu. Príkladom je Hsp27, ktorý sa viaže na cytochróm c a Hsp70 alebo Hsp90 vytvárajúce väzbu s faktorom aktivujúcim apoptotickú proteázu 1 (Apaf-1). Väzba s Apaf-1 zabráni aktivácii kaspáz a tým aj bunkovej apoptóze. Okrem toho Hsp70 interaguje s faktorom indukujúcim apoptózu dôsledkom čoho dochádza k inhibícii bunkovej smrti. V neposlednom rade Hsps prispievajú k prežitiu buniek tým, že degradujú alebo stabilizujú vybrané proteíny [52].

2.2.1 Klasifikácia

Proteíny Hsps sa na základe ich molekulovej hmotnosti delia do piatich hlavných rodín a to Hsp100, 90, 70, 60 a malých Hsp. Proteíny rodiny Hsp90 sa ďalej klasifikujú podľa ich bunkovej lokalizácie. V cytoplazme cicavcov sa nachádzajú proteíny Hsp90- α_1 , Hsp90- α_2 a Hsp90- β , v endoplazmatickom retikule Grp94 a v mitochondriách Trap1 (tab. 1) [48, 53]. Dve hlavné cytoplazmatické izoformy Hsp90- α a Hsp90- β sú vysoko homologické so vzájomnou sekvenčnou identitou 85 %. Na druhej strane, Grp94 zdieľa 50 % homológiu a Trap1 zdieľa len 34% homológiu so spomenutými cytoplazmatickými formami [48].

Tabuľka 1: Klasifikácia proteínov rodiny Hsp90 [53].

Rodina	Názov génu	Názov proteínu	Umiestnenie v bunke
HSP90A	<i>HSP90AA1</i>	Hsp90- α_1	cytosol
	<i>HSP90AA2</i>	Hsp90- α_2	
	<i>HSP90AB1</i>	Hsp90- β	
HSP90B	<i>HSP90B1</i>	Grp94	endoplazmatické retikulum
TRAP	<i>TRAP1</i>	Trap1	mitochondrie

2.2.2 Štruktúra Hsp90

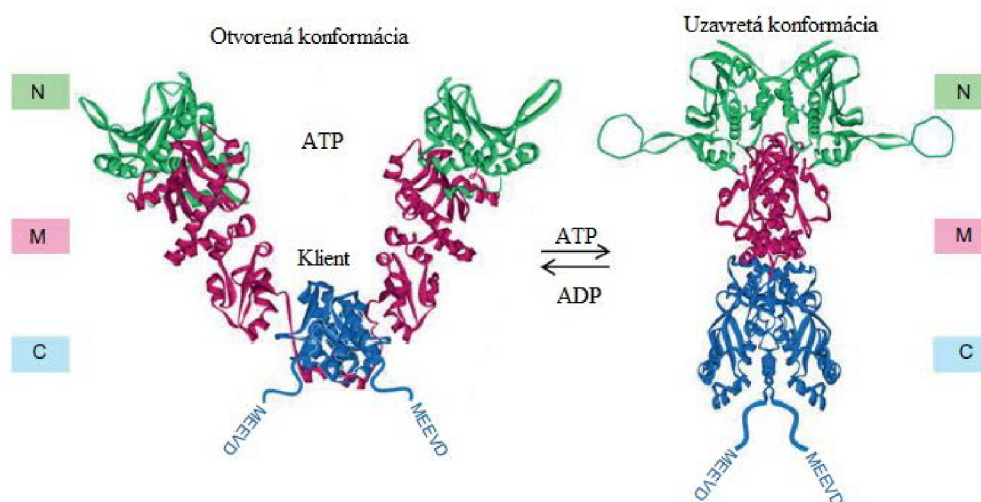
Hsp90 predstavuje flexibilný homodimérny proteín s molekulovou hmotnosťou 90 kDa. Každý monomér sa skladá z 3 funkčne odlišných domén: 25 kDa N-koncovkej domény (NTD), 35 kDa strednej domény (MD) a 12 kDa C-koncovkej domény (CTD) (obrázok 5). Eukaryotické chaperóny Hsp90 navyše obsahujú nabitý linker, ktorý sa nachádza medzi NTD a MD [54].

N-koncová doména obsahuje väzobné miesto pre adenín čo umožňuje väzbu molekuly ATP, ktorá je dôležitá pre aktivitu ATPázy. Vďaka ATPáze môže prebiehať chaperónový cyklus. Na toto miesto sa taktiež viažu klientské proteíny a inhibítory geldanamycín a radicicol, ktoré súperia o väzobné miesto práve s ATP [54, 55, 56].

Dynamickú oblasť v štruktúre Hsp90 tvorí nabitý linker, ktorý má variabilné zloženie aminokyselín. Linker umožňuje zvyšovať flexibilitu proteínu v eukaryotických bunkách [57, 58].

MD slúži ako akceptor γ -fosfátu ATP. Táto oblasť sa spolu s NTD podieľa na modulácii funkcie ATPázy. Na túto oblasť sa viažu klientské proteíny a niektoré co-chaperóny ako napríklad Akt a eNOS [54, 59, 60].

Za homodimerizáciu proteínov je zodpovedná CTD. Dimerizačné rozhranie tvoria dva páry helixov, ktoré vytvárajú štvorzávitnicový zväzok. C-koncové rozhranie však nie je permanentne dimerizované, ale dimér sa veľmi rýchlo otvára a zatvára. Súčasťou tejto domény je aj väzobné miesto pre kalmodulín a co-chaperóny. Cytoplazmatické Hsp90 eukaryot obsahuje špeciálne miesto s pentapeptidovou sekvenciou MEEVD, ktorá sa zapája do väzby s co-chaperónmi obsahujúcimi tetratrikopeptidové repetície (TPR), príkladom takéhoto co-chaperónu je proteín Hop. Hop môže súčasne viazať Hsp70 aj Hsp90 a sprostredkovať tak prenos klientského proteínu z Hsp70 na Hsp90. CTD slúži aj ako alosterický regulátor aktivity N-koncovej ATPázy, pretože obsahuje miesto, ktoré sa otvára po obsadení väzobného miesta na NTD [48, 54, 61, 62].



Obrázok 5: Štruktúrne zmeny Hsp90 závislé na ATP. Kryštálová štruktúra Hsp90 v otvorenej (vľavo) a uzavretej (vpravo) konformácii. Funkčné domény sú farebne odlišené a to N-koncová doména (zelená, N), stredná (fialová, M) a C-koncová doména (modrá, C). Väzobné miesto pre ATP sa nachádza na rozhraní N a M domény. C domény interagujú za vzniku diméru [63].

2.2.3 Regulácia aktivity Hsp90

Hsp90 predstavuje kľúčový bunkový regulátor, a preto sú jeho hladina a funkcia pod prísny dohľadom regulačných mechanizmov. Tvorbu Hsp90 na transkripčnej úrovni reguluje najmä transkripčný faktor tepelného šoku 1 (HSF1). V eukaryotických bunkách patrí HSF1 k hlavným regulátorom reakcie na tepelný šok. Aktivita HSF1 je regulovaná chaperónmi, vďaka čomu je prepojený proteotoxický stres a expresia HSP. U cicavcov za nestresových podmienok dochádza k represii faktoru HSF1. Na druhú stranu, na reguláciu aktivity Hsp90 majú významný vplyv posttranslačné modifikácie (PTM), akými sú fosforylácia, acetylácia, nitrozylácia či ubiquitinácia. PTM majú vplyv napríklad na väzbu klientských proteínov

a co-chaperónov a ovplyvňujú konformačné zmeny molekuly Hsp90. Zatiaľ čo hyperfosforylácia má negatívny vplyv na aktivitu Hsp90, určitá miera fosforylácie je pre skladanie určitých proteínov nevyhnutná. Acetylácia a nitrozylácia znižujú schopnosť Hsp90 interagovať s klientskými proteínmi čo vedie k ich destabilizácii a degradácii [62, 64].

2.2.4 Hsp90 ako potenciálny terapeutický cieľ

Chaperón Hsp90 hrá významnú rolu počas malígnej transformácie, kedy stabilizuje množstvo mutovaných a nadmerne exprimovaných proteínov zúčastňujúcich sa na týchto procesoch. Hsp90 podporuje aktiváciu mutovaných klientských proteínov, akými sú napríklad receptory steroidných hormónov, signálne kinázy a iné transkripčné faktory (tabuľka 2) [48, 57, 65].

Tabuľka 2: Proteínový klienti Hsp90 a ich rola v karcinogéze [66, 67, 68].

Klientský proteín	Úloha v karcinogéze
receptorové tyrozínkinázy, serín, receptory steroidných hormónov	nekontrolovateľné šírenie
telomerázy	imortalizácia
AKT, NF- κ B, p53, c-Met, Apaf-1, survivin	anti-apoptóza
HIF1 α , VEGFR, PI3K/AKT, RTKs, flt-3	angiogenéza
IRAK3	vyhýbanie deštrukcii imunitným systémom
ARNT, ARRB1, HIF-1 α , HMG1, SREBF1	modifikácia energetického mechanizmu
MAFG, NEK8, NEK9, NEK11	nestabilita a mutácia genómu
IL-6, IL-8, IRAK1, IRAK2, IRAK3	zápal podporujúci rast nádoru
MMP2, c-Met	invázia a tvorba metastáz

Expresia Hsp90 je v malígnych bunkách 2 až 10x vyššia ako v tých normálnych. Zvýšená miera proteosyntézy a následná nadmerná produkcia mutantných proteínov vyvoláva zvýšenú expresiu Hsp90. Hoci nejde priamo o onkogén, javí sa ako vhodný terapeutický cieľ. Inhibícia tohto cieľa by mohla viesť k prerušeniu mnohých signálnych transdukčných dráh a k potlačeniu vývoja a progresie nádorov [50, 69].

Väčšina doposiaľ študovaných inhibítorov funguje na princípe kompetície na väzobnom mieste pre ATP v N-koncovej doméne a blokuje interakciu s co-chaperónmi. Na tomto princípe pracujú ansamycínové (geldanamycín, alvespimycín) a neansamycínové (luminespib, ganetespib) inhibítory. Novšie inhibítory indukujú štiepenie Hsp90 čím úplne potláčajú jeho aktivitu. Štiepenie je indukované rôznymi stimulmi, ako napríklad UVB žiarenie, askorbát, andrografolid, inhibítory proteazómu, faktor nádorovej nekrózy (TNF), kombinácia gefitinibu a vorinostatu, atď. [70]. Inhibícia Hsp90 sa zameriava na mechanizmy, ktoré umožňujú nádorovým bunkám adaptovať sa na stres. Môže byť veľmi prínosná, pretože obchádza problémy, ktoré častokrát nastávajú pri liečbe chemoterapeutikami. Nádorové bunky sa vďaka genetickej plasticite jednoducho adaptujú na nepriaznivé prostredie, ktoré nastáva pri ožarovaní, chemoterapii, nedostatku hormónov alebo rastových faktorov či hypoxii. To znamená, že transformujúce bunky sa stávajú nezávislými od hormónov, indukujú sa transkripčné reakcie zamerané na prežitie v nepriaznivom prostredí a aktivuje sa viac signálnych dráh, ktoré chránia bunku pred ďalším poškodením [57, 71].

2.2.5 Extracelulárne Hsp90

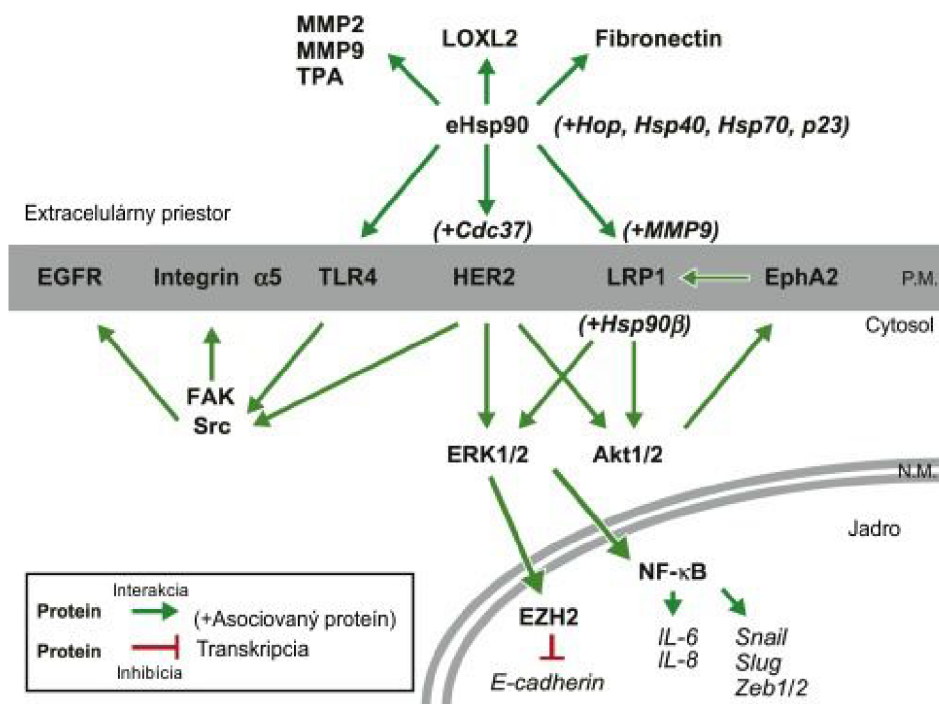
Pomerne nedávnym objavom bola existencia Hsp90 na povrchu buniek. Jedná sa o cytoplazmatické Hsp90, ktoré bolo translokované do extracelulárneho priestoru. V počiatočných sa predpokladalo, že tento proteín sa nachádza v extracelulárnom priestore z dôvodu odumretia a lýzy nekrotických buniek [67, 72]. Teória však bola vyvrátená detekciou eHsp90 na povrchu živých nádorových buniek. Proteín bol tiež pozorovaný v extracelulárnych vezikulách pochádzajúcich z dendritických buniek a na neurónoch vo vyvíjajúcom sa nervovom systéme. Neskôr bolo eHsp90 identifikované na povrchu buniek melanómu, hepatómu, fibrosarkómu, monocytu, dermálneho fibroblastu, glioblastómu či karcinómu pľúc a prsníka [57, 73, 74, 75].

Dnes vieme, že extracelulárne Hsp90 môže byť lokalizované v plazmatickej membráne, môže byť uvoľnené do extracelulárneho prostredia alebo môže byť súčasťou exozómov [76]. Mechanizmus vylučovania eHsp90 však nie je doposiaľ presne objasnený. Pôvodne sa myslelo, že proteíny sú sekretované pomocou vezikulárneho transportu z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu a následne na plazmatickú membránu. V sérii experimentov na ľudských keratinocytoch a nádorových bunkových líniiach sa však ukázalo, že pri inhibícii transportu proteínov pomocou Brefeldinu A sa neznižuje sekrécia Hsp90. Naopak znížená exozomálna sekrécia pomocou dimethylamiloridu výrazne znižuje množstvo sekretovaného eHsp90. Transport Hsp90 z bunky do extracelulárneho priestoru je tak pravdepodobne umožnený pomocou exozómov. Nie je však objasnené či je Hsp90 neoddeliteľnou súčasťou exozómov alebo iba ich nákladom, avšak študované proteíny boli lokalizované prevažne na exozomálnom povrchu ako v luméne izolovaných exozómov. Rovnako tak je známa interakcia Hsp90 s kalmodulínom, proteínom viažúcim vápnik. Prítomnosť takéhoto komplexu môže výrazne ovplyvniť sekréciu exozómu, pretože ide o proces závislý na vápniku [77, 78, 79].

Na povrchu buniek bolo pozorované vylučovanie Hsp90- α aj Hsp90- β . Podľa najnovších štúdií sa však izoforma β rýchlo degraduje zatiaľ čo izoforma α sa aktivuje a stabilizuje viaceré extracelulárne klientské proteíny [78, 80, 81].

Pri analýze vzoriek biopsie tumorov prsníka sa zistilo, že zvýšené množstvo eHsp90 na povrchu nádorových buniek súvisí so zvýšenou úmrtnosťou pacientov. Tento extracelulárny proteín je naozaj zodpovedný za zmeny v rôznych fyziologických a patofyziologických procesoch ako je angiogenéza, aktivácia monocytov, makrofágov a dendritických buniek, hojenie rán, bunková motilita, ale aj invázia nádorov a vznik metastáz. Väčšina doteraz študovaných liečiv sa zameriavala práve na intracelulárne Hsp90. Ideálne by bolo zamerať sa na prvok, ktorý je dôležitý pre inváziu malígnych buniek a nenachádza sa na povrchu zdravých buniek. Extracelulárny Hsp90 je preto veľmi nádejným terapeutickým cieľom [69, 82].

Aby sa eHsp90 podieľalo na malígnej transformácii, tak musí interagovať s extracelulárnymi klientskými proteínmi alebo povrchovými receptormi. Interakcie sú v mnohých prípadoch umožnené vďaka prítomnosti co-chaperónov ako napríklad Hop, Hsp40, Hsp70 a p23, ktoré sa nachádzajú práve v extracelulárnom priestore [79].



Obrázok 6: Interakcia eHsp90 s klientskymi proteínmi a povrchovými receptormi indukujúcimi intracelulárne signálne dráhy. eHsp90 sa nachádza v extracelulárnom priestore spolu s co-chaperónmi Hop, Hsp40, Hsp70 a p23 [79].

Príklad takejto spolupráce predstavuje väzba medzi humánnym epidermálnym receptorom (HER-2), eHsp90 a Cdc37, ktorá prispieva k pohyblivosti buniek. Signalizáciou HER-2 sa aktivuje ERK rastová dráha a dráha podporujúca prežitie buniek pomocou fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI3K). HER-2 tiež aktivuje kinázu Src, ktorá je prítomná v proteínovom komplexe s fokálnou adhéznou kinázou. Tento proteínový komplex interaguje s integrínmi, ktoré premošujú cytoskelet a extracelulárnu matrix (obr. 6). Reakcie sa účastní integrín $\beta 1$, ktorý je kritický pre migráciu buniek. Normálne bunky sú závislé na väzbách s ECM. Pri strate prepojenia by nastala bunková smrť. Touto signálnou dráhou sa v nádorových bunkách podporuje proliferácia závislá od integrínu $\alpha 5$ a zvyšuje sa rezistencia k bunkovej smrti spôsobenej oddelením od ECM. Interakciou Hsp90 s TLR4 receptorom dôjde pomocou Src k transaktivácii receptoru epidermálneho rastového faktora. Nastáva tak epitelovo-mezenchymálny prechod (EMT), ktorý zvyšuje migráciu a inváziu nádorových buniek. Pri tomto procese strácajú polarizované, nepohyblivé epitelové bunky svoju polaritu a stávajú sa z nich pohyblivé a invazívne mezenchymálne bunky. Tento proces je síce dôležitý pre bezproblémový vývoj a regeneráciu tkanív, ale ak nie je regulovaný môže podporovať vznik metastáz [79].

Väzba eHsp90 s LRP1 spôsobuje aktiváciu dráh AKT, ERK a NF- κ B. Okrem toho dochádza k aktivácii receptoru EphA2, ktorý indukuje tvorbu lamellipódií dôsledkom čoho sa zvyšuje motilita a invázivnosť tumoru [83].

Pri rozvoji metastáz v organizme dochádza k disregulovanej prestavbe ECM. Remodelácia ECM je dynamický proces, ktorý je dôležitý pre vývoj, udržanie homeostázy, motilitu buniek a hojenie normálnych tkanív. eHsp90 nepriamo ovplyvňuje remodeláciu aktiváciou niekoľkých proteáz, ktoré modifikujú ECM. V extracelulárnom priestore eHsp90 interaguje s aktivátorom

tkanivového plazminogénu (TPA) a s lysil oxidázou 2 (LOXL2). Z plazminogénu vzniká aktívny plazmín, ktorý uvoľňuje rastové faktory viažuce sa na ECM, remodeluje ECM, aktivuje MMP a štiepenie receptorov bunkového povrchu. LOXL2 modifikuje ECM zosieťovaním kolagénu, čím sa mení tuhosť matrice a dochádza k zvýšenej motilite a proliferácii. Zvýšená produkcia LOXL2 nádorovými bunkami je spájaná so zlou klinickou prognózou [79, 84, 85].

2.3 C-Met ako cieľový antigén pre ADC

Receptory s tyrozínkinázovou aktivitou sú dôležitými mediátormi signálnej kaskády, ktoré určujú kľúčové úlohy v rôznych biologických procesoch. Ide o enzýmy, ktoré katalyzujú fosforyláciu vybraných tyrozínových zvyškov cieľových proteínov za spotreby ATP. Táto kovalentná posttranslačná modifikácia je kľúčovou zložkou bunkovej komunikácie. V nádorových bunkách sú však tieto signálne dráhy často geneticky pozmenené tak, že poskytujú bunkám selekčnú výhodu. Medzi takéto tyrozínkinázy patrí c-Met, známy aj ako HGFR, ktorý reprezentuje tyrozínkinázový receptor hepatocytového rastového faktora (HGF) [86, 87].

HGFR je za normálnych podmienok exprimovaný na povrchu epitelových buniek. Naviazanie ligandu HGF na tento receptor vedie k jeho aktivácii, ktorá je potrebná pre embryonálny vývoj, organogenézu a rast epitelu. HGF je produkovaný hlavne mezenchymálnymi bunkami, fibroblastami a bunkami hladkého svalstva. Je dôležitý pre správne fungovanie organizmu, pretože sprostredkúva regeneráciu tkaniva, embriogenézu a tvorbu svalov a nervov [88, 89].

Proteín HGFR je kódovaný génom *MET*, ktorý sa nachádza na ľudskom chromozóme 7 a obsahuje 21 exónov a 20 intrónov. Jeho transkripcia je regulovaná prostredníctvom Ets, Pax3, AP2 a TCF-4. Rastový faktor HGF je kódovaný génom *HGF*, ktorý sa rovnako nachádza na ľudskom chromozóme 7 a obsahuje 18 exónov a 17 intrónov [90, 91].

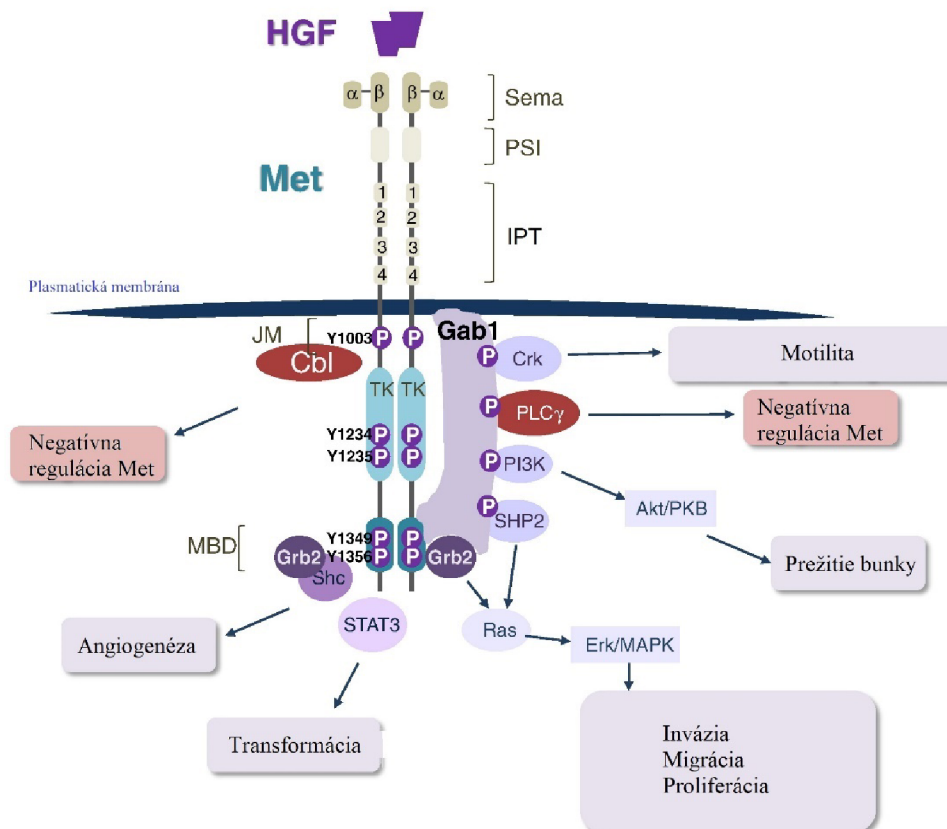
2.3.1 Štruktúra c-Met

Samotný receptor HGFR je heterodimér a má približne 195 kDa. Je tvorený extracelulárnou α -podjednotkou a transmembránovou β -podjednotkou, ktoré sú spojené disulfidovou väzbou. α -reťazec má 50 kDa a tvorí časť Sema domény. Sema doména zahŕňa aj N-koncový úsek β -reťazca a je tvorená semaforínmi a plexínmi. Je zodpovedná predovšetkým za dimerizáciu receptora a väzbu HGF. Transmembránová β -podjednotka má 145 kDa. Jej extracelulárna časť obsahuje Sema doménu, PSI (plexín-semaforín-integrín) doménu a štyri IPT oblasti podobné štruktúre imunoglobulínu. PSI doména stabilizuje interakciu medzi HGFR a HGF. Intracelulárna oblasť pozostáva z juxtamembránovej domény, kinázovej domény a C-koncového úseku [89, 92, 93].

C-koncový úsek obsahuje dokovacie miesto potrebné pre HGFR sprostredkovanú signalizáciu. Po väzbe ligandu dochádza k dimerizácii receptora za vzniku heterodiméru. Heterodimérny receptor autofosforyluje tyrozínové zvyšky Y1230, Y1234 a Y1235 v kinázovej doméne, pričom pravdepodobne fosforylácie tyrozínových zvyškov Y1234 a Y1235 vyvolajú konformačnú zmenu receptora. Táto zmena následne sprístupní dokovacie miesto na C-koncovom úseku, čo vedie k transfosforylácii Y1349 a Y1356. Dokovacie miesto sa tým stáva dostupným pre množstvo biomolekúl čím dochádza k aktivácii rôznych signálnych dráh. Pripájajú sa sem predovšetkým intracelulárne adaptorové molekuly, akými sú Gab1, Grb2, Src

či SHC. Aktivácia napríklad Grb2 vedie k fosforylácii MAP kináz ERK1 a ERK2, ktoré zahajujú bunkovú proliferáciu. Na druhej strane, fosforyláciou PI3K sa aktivuje signálna dráha Akt/PKB, udržiavajúca antiapoptotický stav bunky. Ďalšie signálne dráhy, na ktorých regulácii sa podieľa HGFR sú znázornené na obrázku 7 [86, 92, 94, 95].

Pre významnú úlohu HGFR v bunkovom raste je jeho aktivita v nenádorových bunkách prísne kontrolovaná. Aktivitu receptora reguluje predovšetkým ubiquitín ligáza (PLC γ), ktorá aktivovaný receptor rozpozná a naviaže sa naň skrz Y1003 v juxtamembránovej doméne. Väzba ligázy následne vyvolá polyubikvitináciu receptora, ktorá vedie k internalizácii HGFR prostredníctvom endocytózy. Defekty tohto regulačného procesu taktiež prispievajú k onkogénnemu potenciálu HGFR [96].



Obrázok 7: Štrukturálne znázornenie c-Met receptora. HGF umožňuje dimerizáciu a fosforyláciu HGFR. Signálne a biologické dráhy sprostredkované HGF/HGFR [86].

2.3.2 Funkcia c-Met pri karcinogéze

V nádorových bunkách HGFR zohráva úlohu protoonkogénu. Deregulácia a následná abnormálna signalizácia HGFR môže nastať prostredníctvom troch mechanizmov a to výskytom špecifických genetických porúch, transkripčnou upreguláciou receptora v neprítomnosti génovej amplifikácie či zvýšenou stimuláciou autokrinnými alebo parakrinnými ligandami. Poruchy na génovej úrovni zahŕňajú translokáciu, génové amplifikácie a aktivačné mutácie. HGFR je nadmerne exprimovaný v rôznych karcinómoch vrátane karcinómu žalúdka, pečene, hrubého čreva, prsníka, obličiek, štítnej žľazy a pľúc [88, 90, 97]. Vysoké hladiny HGFR sú spojené so zvýšeným metastatickým potenciálom, rezistenciou voči rádioterapii a nepriaznivou prognózou. Najčastejšou príčinou deregulácie

HGFR je jeho zvýšená expresia v dôsledku amplifikácie génu *MET*, transkripčnej upregulácie alebo posttranskripčnými mechanizmami. Zvýšená expresia na bunkovom povrchu následne podporuje spontánnu dimerizáciu receptora nezávislú od ligandu. Kináza tak môže byť aktivovaná aj inými receptormi nezávislými od HGF. Patria sem integríny, CD44 a receptory Ron a EGF [97].

Štúdie ukazujú, že tento tyrozínkinázový receptor sa amplifikuje v pokročilom štádiu kolorektálneho karcinómu a karcinómu žalúdka, čo vypovedá o jeho úlohe v procese tvorby metastáz. Expresia HGFR sa môže v rámci jedného nádoru líšiť, pretože nedostatočná difúzia kyslíka vo vnútri rastúceho nádoru podporuje expresiu tohto onkogénu. Hypoxia aktivuje *c-MET* promótor cez transkripčný faktor HIF1 α , ktorý je regulovaný koncentráciou intracelulárneho kyslíka [5, 98, 99, 100].

HGFR, ako onkomarker podporujúci invazívnosť nádorových buniek, predstavuje vhodný cieľ protinádorovej terapie. Do klinických štúdií sa dostalo niekoľko nízkomolekulárnych inhibítorov HGFR, medzi ktoré patria napríklad tivantinib, multikinázové inhibítory cabozantinib, foretinib a krizotinib. Do klinických štúdií sa ďalej dostali monoklonálne protilátky zacielené na ligand HGF alebo receptor HGFR. Príkladom monoklonálnej protilátky zameranej na ligand je rilotumumab, ktorá účinne blokuje aktiváciu HGFR. Ďalším príkladom je monovalentná anti-Met chimerická protilátka 5D5, klinicky známa aj ako Onartuzumab, ktorá inhibuje signalizáciu HGFR a spôsobuje internalizáciu receptora. Naopak, anti-Met bivalentné mAb DO-24 a DN-30 vykazovali agonistický účinok, a preto bol skonštruovaný monovalentný fragment DN-30 Fab s vysokou afinitou voči HGFR. DN-30 Fab vykazoval antagonistický účinok a inhiboval aktivitu receptora [88, 101, 107].

3 CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Hlavné ciele diplomovej práce:

- Výber a optimalizácia správnej stratégie pre prípravu konjugátov protilátka-fluorochrom a protilátka-cytostatikum s využitím monoklonálnej protilátky EEV1 (anti-Hsp90 α).
- Využitie fluorescenčne značených konjugátov monoklonálnej protilátky EEV1 pre detekciu lokalizácie Hsp90 α v nádorových bunkových líniiach a detekciu možnej internalizácie ADC po väzbe na antigén Hsp90 α .
- Test účinku cytostaticky značených konjugátov monoklonálnej protilátky EEV1 na rast a delenie nádorových bunkových línii.

Náplň diplomovej práce:

- Purifikácia monoklonálnej protilátky EEV1-2.1 prostredníctvom afinitnej chromatografie.
- Konjugácia protilátky s fluorochromom pre zobrazovacie metódy (fluorescenčná mikroskopia, prietoková cytometria).
- Konjugácia protilátky s cytostatikom a následné testy cytotoxicity.
- Porovnanie terapeutického potenciálu EEV1-2.1 s monoklonálnymi protilátkami proti ľudskému c-Met receptoru.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité materiály a prístroje

4.1.1 Prístrojové vybavenie

NaNoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific)

Sonikátor VibraCell™ (Sonocs & Materials, Inc.)

Invertovaný fluorescenčný mikroskop Eclipse Ti-S (Nikon, Japonsko)

Typhoon FLA 9500 (Cytiva)

Centrifúga chladená multifunkčná Sorvall X4fPro (Thermo Fisher Scientific)

Trepačka DUOMAX 1030 (Heildolph)

Mikrocentrifúga FRESCO 21 (Thermo Fisher Scientific)

AKTApure L1 (Cytiva)

Prietokový cytometer FACSVerser 3 L 4/2/2 (Becton Dickinson)

Dokumentárny zobrazovací systém ChemiDoc (Bio-Rad)

Automatické zariadenie pre analýzu živých buniek INCUCYTE (Sartorius)

Inkubátor s atmosférou CO₂ Heracell (Thermo Fisher Scientific)

4.1.2 Chemikálie

Akrylamid (Sigma Chemical, USA)

Akutáza (Sigma Aldrich, USA)

APS (Sigma Chemical, USA)

BODIPY FL maleimide (Lumiprobe)

Coomassie Brilliant blue G250 (Applichem)

Coomassie Brilliant blue R250 (Biorad)

DBCO-NHS ester (MedChemExpress)

Dimethylformamid (Sigma Aldrich, USA)

Dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, USA)

EDTA (Sigma Aldrich, USA)

Hmotnostný štandard pre SDS-PAGE HyperPAGE ladder (Bioline, kat. č. BIO-33066)

Koktejl fosfatázových inhibítorov, riedenie 1:100 (Sigma Aldrich, kat. č. P5726)

Koktejl proteázových inhibítorov, riedenie 1:100 (Sigma Aldrich, kat. č. P8340)

Kyselina chlorovodíková (Kulichpharma)

2-merkapt ethanol (Sigma Aldrich, USA)
N3-PEG3-vc-PAB-MMAE (MedChemExpress)
PMSF (Sigma Aldrich, USA)
SDS (Roth)
Sulfo-Cyanine5 maleimide (Lumiprobe)
Sulfo-Cyanine5 NHS ester (Lumiprobe)
Sušené mlieko (Laktino)
TCEP: tris(2-carboxyethyl)phosphine (Invitrogen)
Temed (Sigma Chemical, USA)
TRIS (Applichem)
Trypsín (Invitrogen)
Tween-20 (Sigma Aldrich, USA)
VcMMAE: konjugát valín-citrulín-monomethyl auristatín E (MedChemExpress)

4.1.3 Roztoky a pufre

Blokovací pufor: roztok 5% odtučneného sušeného mlieka v PBS s 0,1% Tween-20

10X Blotovací pufor: Tris 30 g/l, glycín 145 g/l, H₂O

1X Blotovací pufor: 200 ml methanol, 100 ml 10X blotovací pufor, 700 ml H₂O

Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% ethanol, 8,5% kyselina fosforečná

ECL A (pH 9,5): 0,5 mM EDTA, 10 mM Luminol, 200 mM TRIS, 405 μM kyselina kumarová (Thermo Scientific, GB)

ECL B (pH 5): 0,5 mM EDTA, 50 mM octan sodný, 8 mM tetrahydrát-peroxoboritan sodný (Thermo Scientific, GB)

Elektroforetický pufor (pH 7,7): 50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA

Farbiaci roztok na Coomassie: Coomassie R250 1 g/l, 50% metanol, 10% kyselina octová

Glycínový pufor (pH 3): 0,1 M glycín-HCl

Nanášací pufor LDS 4x: NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Scientific, GB)

NET pufor: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris pH 8, 50 mM NaF, 5 mM EDTA pH 8, H₂O, inhibítor proteáz 1:100, inhibítor fosfatáz 1:100, 1 mM PMSF

Odfarbovací roztok na Coomassie: 50% metanol, 5% kyselina octová

PBS Tween (pH 7,4): PBS + 0,1% Tween-20

PBS (pH 7,5): (phosphate buffer saline), NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ · 12 H₂O 2,75 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 0,32 g/l, H₂O

Tris-HCl (pH 7,5): Tris(hydroxymethyl)aminomethan (SigmaChemical, USA)

4.1.4 Rastové médiá

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium): DMEM médium s prídavkom 10% fetálneho bovinného séra (Sigma Aldrich, USA), 1 mM pyruvát (Invitrogen Technologies, USA) a 1% zmes antibiotík penicilín a streptomycín (Biosera, France)

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium): RPMI 1640 s prídavkom 10% fetálneho bovinného séra (Sigma Aldrich, USA), 2 mM L-glutamínu a 1% zmes antibiotík penicilín a streptomycín (Biosera, France)

4.1.5 Bunkové línie

H1299 – bunková línia ľudského nemalobunkového karcinómu pľúc odvodená z lymfatických uzlín. Línia H1299 je deficientná o nádorový supresorový proteín p53.

OE33 – bunková línia odvodená z ľudského adenokarcinómu dolného pažeráka 73-ročnej pacientky. OE33 konštitutívne exprimujú antigény HLA-A, -B a -C a ICAM-1.

4.1.6 Protilátky

Primárne protilátky:

EEV1-2.1 - myšia monoklonálna protilátka podtriedy IgG1 proti proteínu Hsp90α. EEV1-2.1 sa viaže na epitop KEFEGKT Hsp90α (Moravian Biotechnology).

Anti-c-Met - myšie monoklonálne protilátky vytvorené proti α-reťazcu ľudského c-Met cieleňé na rôzne epitopy tohto reťazca (tabuľka 3). Na produkciu monoklonálnych protilátok bolo vybraných 5 rôznych klonov hybridómov, z ktorých všetky produkujú izotyp IgG1 (Moravian Biotechnology).

Tabuľka 3: Prehľad použitých klonov protilátok a sekvencie epitopov, ktoré rozoznávajú.

Protilátka c-Met	Sekvencia epitopu	Podtrieda
Klon 2	QIEEPSQCPD	IgG1
Klon 8	KETKDGFMFL	IgG1
Klon 12	LEHPDCFPCQDCSSK	IgG1
Klon 13	FRDS	IgG1
Klon 18	LVVDTYDDQ	IgG1

Sekundárne protilátky:

GAM-AF647 - kozia polyklonálna protilátka proti myším imunoglobulínom s konjugovanou Alexa Fluor 647 (SouthernBiotech)

GAM-HRP - kozia polyklonálna protilátka proti myším imunoglobulínom s konjugovanou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch)

4.2 Metódy

4.2.1 Purifikácia protilátky EEV1

Protilátky boli produkované hybridómovými líniami v médiu Hybridoma SFM pracovníkmi RECAMO alebo priamo spoločnosťou Moravian Biotechnology. Po produkcii sa médium s bunkami stočilo v centrifúge (2000 g/10 min/4 °C) a supernatant bol prenesený do novej nádoby. Následne boli upravené pH roztoku prídavkom 50 mM boritanu sodného (pH 8,9) a iontová sila prídavkom 3 M NaCl. Pred aplikáciou na chromatograf sa médium obsahujúce protilátku prefiltrovalo cez 0,45 µm filter. Takisto všetky pufre boli pred použitím prefiltrované cez 0,22 µm filter a vychladené na teplotu 4 °C. Purifikácia prebiehala na chromatografe AKTApure L1 s použitím kolóny HiTrap rProtein A FF 1ml. V prvom kroku bola kolóna ekvilibrovaná premývacím/ekvilibračným pufrom (50 mM boritan sodný pH 8,9; 3 M NaCl) s 10 objemami kolóny (CV) pri prietoku 1 ml/min. Následne bol na kolónu aplikovaný roztok protilátky s prietokom 0,2 ml/min. Po naviazaní protilátky bola kolóna premytá ekvilibračným pufrom (20 CV, 1 ml/min). V ďalšom kroku bola kolóna premytá 10 mM boritanom sodným pH 8,9 s 3 M NaCl (10 CV, 1 ml/min). Zachytené protilátky boli z kolóny uvoľnené elučným pufrom (0,1 M glycín-HCl, pH 3) pri prietoku 1 ml/min a zozbierané do 1 ml frakcií prostredníctvom frakcionátora F9-C. pH bolo zneutralizované prídavkom 100 mM Tris-HCl, pH 8.0. Na záver bola kolóna ekvilibrovaná premývacím pufrom (5 CV, 1 ml/min). Signál bol zaznamenaný konduktometrickým a UV detektorom, ktoré sú súčasťou chromatografu.

4.2.2 Konjugácia protilátok pomocou maleimidu

4.2.2.1 Značenie EEV1 cez -SH skupiny

Pri konjugácii EEV1 boli použité magnetické guľičky s imobilizovaným G proteínom. Najprv sa odobralo 20 µl suspenzie guľičiek, ktoré sa trikrát premyli v 100 µl premývacieho pufru (PBS, pH 7,5). Premytie zahŕňalo prídavok 100 µl premývacieho pufru, premiešanie, umiestnenie na magnetický stojan a opatrné odsatie pufru. Po poslednom premytí bolo ku guľičkám pridaných 75 µl roztoku protilátky EEV1 s koncentráciou 0,7 mg/ml. Protilátky sa inkubovali s guľičkami za stáleho miešania 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Po naviazaní protilátky bol na magnetickom stojane odobratý supernatant, ktorý neskôr slúžil na overenie efektivity väzby protilátok na G proteín. Ku guľičkám s naviazanou protilátkou bol okamžite pridaný TCEP v molárnom pomere 1:150. Redukcia prebiehala 30 min (rotačná trepačka, laboratórna teplota). Po redukcii bol TCEP odstránený trojnásobným premytím guľičiek v 100 µl premývacieho pufru. Na sulfhydrylové skupiny bol následne naviazaný fluorochrom sulfo-cyanine5 maleimide. Fluorochrom bol pridávaný v 20-násobnom molárnom nadbytku a reakcia prebiehala cez noc pri 4 °C za stáleho miešania. Nenaviazaný fluorochrom bol odstránený trojnásobným premytím guľičiek v 100 µl premývacieho pufru. Značená protilátka bola z guľičiek eluovaná prídavkom 22,5 µl glycínového pufru pH 3 (inkubácia 10 min). Tento krok sa opakoval dvakrát. Na záver bolo upravené pH prídavkom 5 µl neutralizačného pufru (1M Tris-HCl, pH 8).

4.2.2.2 Značenie anti-c-Met protilátok cez -SH skupiny

Protilátky anti-c-Met klony 2 a 8 boli použité v koncentrácii 1 mg/ml. V prvom kroku prebehla čiastočná redukcia disulfidových väzieb v prítomnosti 25 µM TCEP (klon 8) alebo 50 µM TCEP (klon 2). Po hodinovej redukcii, ktorá prebiehala pri laboratórnej teplote, bol TCEP

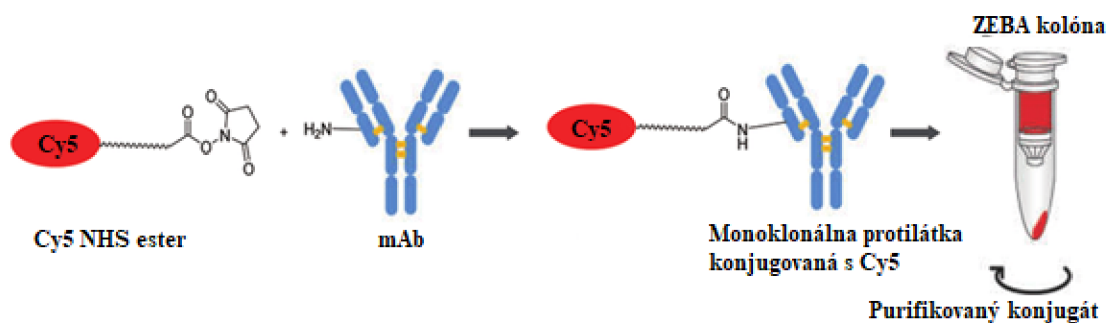
odstránený prostredníctvom ZEBA odsolovacej kolóny (7 K MWCO, 2 ml). Aplikácia ZEBA kolóny obsahovala niekoľko krokov. V prvom kroku bol odstránený uchovávaci roztok stočením kolóny v centrifúge (2 min/ 1000 g). Kolóna bola následne ekvilibrovaná prídavkom PBS pH 7,5 s obsahom 0,5 mM EDTA a stočením v centrifúge (2 min/ 1000 g). Tento krok sa opakoval trikrát. Kolóna sa po ekvilibrácii premiestnila do novej skúmavky. V poslednom kroku sa roztok protilátky nechal pretiecť kolónou stočením v centrifúge (2 min/ 1000 g). Po redukcii a odstránení redukčného činidla ZEBA kolónou bol k protilátke pridaný fluorochrom (BODIPY FL maleimide) alebo konjugát linker-liečivo (vcMMAE) v 20-násobnom molárnom nadbytku pri zachovaní pomeru vcMMAE (5mM, v DMSO) k PBS 1:50. Inkubácia prebiehala 1 hodinu pri laboratórnej teplote za stáleho miešania. Po inkubácii boli konjugáty protilátka-fluorochrom/ protilátka-vcMMAE purifikované prostredníctvom gélovej filtrácie na kolóne ZEBA, ktorá bola pripravená rovnakým spôsobom ako v predchádzajúcom kroku. Výsledná koncentrácia konjugovaných protilátok bola stanovená meraním absorbance pri 280 nm na prístroji NaNoDrop 2000c.

4.2.2.3 Značenie anti-c-Met protilátok cez -NH skupiny

Protilátky anti-c-Met (klony 2 a 8) s koncentráciou 1,2 mg/ml boli doplnené o 100 mM borát sodný pH 8,9. Následne bol k protilátkam o objeme 300 μ l pridaný DBCO-NHS ester v 20-násobnom molárnom nadbytku. Inkubácia prebiehala 1 hodinu pri laboratórnej teplote za stáleho miešania. Nenaviazaný DBCO-NHS ester bol odstránený pomocou gélovej filtrácie na kolóne ZEBA (7 K MWCO, 2 ml). Ku konjugátu anti-c-Met-DBCO bol pridaný N3-PEG3-vc-PAB-MMAE v 10-násobnom molárnom nadbytku. Inkubácia prebiehala 3 hodiny pri laboratórnej teplote za stáleho miešania. Po inkubácii boli konjugáty protilátka-liečivo purifikované prostredníctvom gélovej filtrácie na kolóne ZEBA (7 K MWCO, 2 ml). Výsledná koncentrácia konjugovaných protilátok bola stanovená meraním absorbance pri 280 nm na prístroji NaNoDrop 2000c.

4.2.3 Konjugácia protilátok pomocou NHS derivátov

Roztoky monoklonálnych protilátok EEV1-2.1 a anti-c-Met (klony 2 a 8) s koncentráciou 1,2 mg/ml boli doplnené o 100 mM borát sodný pH 8,9. K protilátkam bol následne v 10-násobnom molárnom nadbytku pridaný sulfo-cyanine5 NHS ester. Inkubácia prebiehala 1 hodinu pri laboratórnej teplote za stáleho miešania. Nenaviazaný sulfo-cyanine5 bol odstránený pomocou gélovej filtrácie na kolóne ZEBA (7 K MWCO, 0,5 ml) a konjugáty boli zároveň premiestnené do PBS pH 7,5 s prídavkom 0,5 mM EDTA (obr. 8). Výsledná koncentrácia protilátok bola stanovená meraním absorbance pri 280 nm na prístroji NaNoDrop 2000c.



Obrázok 8: Schématické znázornenie konjugácie mAb so sulfo-cyanine5 NHS ester (Cy5) a purifikačný proces konjugátu [102].

4.2.4 SDS-PAGE

Bunkové lyzáty, vzorky značených a neznačených protilátok, prípadne kontrolné vzorky odoberané počas konjugácie boli zmiešané v pomere 3:1 so vzorkovým pufrom NuPAGE LDS s prídavkom β -merkaproethanolu v pomere 4:1. V prípade kontroly miery redukcie či rozpadu protilátok boli vzorky zmiešané v pomere 3:1 so vzorkovým pufrom NuPAGE LDS bez prítomnosti β -merkaproethanolu. Vzorky boli po zmiešaní so vzorkovým pufrom denaturované varom po dobu 5 min a okamžite nanosené na gél v množstve 3-5 μ g. SDS-PAGE bola vykonaná podľa štandardného protokolu s použitím 5% zaostrovacieho gélu a 10% deliaceho polyakrylamidového gélu. Spolu so vzorkami bol na gél nanosený hmotnostný štandard HyperPAGE ladder v objeme 3 μ l. Elektroforéza prebiehala v elektroforetickom pufri. Prvá fáza elektroforézy prebiehala 10 min pri napätí 75 V, pričom druhá fáza prebiehala až do ukončenia prechodu proteínov pri napätí 135 V.

Deliaci/spodný (10%) gél:

- 8,73 ml destilovanej H₂O
- 10,03 ml 30% akrylamid
- 11,24 ml 1,5M TRIS, pH 8.8
- 80 μ l 10% APS
- 20 μ l TEMED

Zaostrovací/vrchný (5%) gél:

- 7,06 ml destilovanej H₂O
- 1,68 ml 30% akrylamid
- 1,26 ml 0,5M TRIS, pH 6.8
- 50 μ l 10% APS
- 10 μ l TEMED

4.2.5 Farbenie Coomassie Brilliant Blue

Gél bol opláchnutý v destilovanej H₂O a následne zafixovaný v roztoku 50% metanolu a 5% kyseliny octovej po dobu 10 min. Po fixácii bol inkubovaný s farbiacim roztokom Coomassie Brilliant Blue po dobu 30 min. Nenaviazané farbivo bolo odmyté odfarbovacím roztokom (50% metanol, 5% kyselina octová) až do úplného odstránenia. Gél bol na záver zoskenovaný prostredníctvom zobrazovacieho systému ChemiDoc MP.

4.2.6 Westernový prenos

Pre špecifickú vizualizáciu proteínov bol použitý westernový prenos s následnou imunodetekciou. Westernovým prenosom boli separované proteíny prenesené z polyakrylamidového gélu na nitrocelulóзовú membránu BioTrace NT (Pall Corporation). Aparatúra bola zostavená v poradí: porézna podložka, 2x papier Whatman, gél s proteínmi, nitrocelulóзовá membrána, 2x papier Whatman a porézna podložka. Samotný prenos prebiehal v blotovacom pufri 1 hod pri napätí 100 V. Počas celej doby prenosu bola aparatúra chladená ľadom. Po prenose bola membrána blokovaná 1 hodinu v blokovacom pufri (5% roztok mlieka v PBS Tween).

4.2.7 Imunodetekcia

Primárne protilátky boli zmiešané s blokovacím pufrom na koncentráciu 1 µg/ml a nanosené na zablokovanú membránu. Inkubácia prebiehala cez noc pri 4 °C. Membrány boli následne premyté v PBS Tween (3x10 min). Vizualizácia bola umožnená naviazaním sekundárnych protilátok značených peroxidázou (GAM-HRP). Sekundárna protilátka bola zmiešaná s blokovacím pufrom v pomere 1:5000 a nanosená na membránu. Následná inkubácia prebiehala 1 hod pri laboratórnej teplote. Membrána bola premytá roztokom PBS 0,1% Tween-20 (3x10 min) a na záver roztokom PBS (2x10 min). Chemiluminiscencia bola detekovaná pomocou ECL, ktorý sa pripravil zmiešaním ECL A a ECL B v pomere 1:1. Inkubácia membrány s roztokom ECL prebiehala 5 min. Chemiluminiscenčný signál bol zachytený prostredníctvom zobrazovacieho systému ChemiDoc MP.

4.2.8 Bunkové kultúry

4.2.8.1 Kultivácia bunkových línií

Bunková línia H1299 bola kultivovaná v DMEM médiu s prídavkom 10% fetálneho bovinného séra, 1 mM pyruvátu a 1% zmesi antibiotík penicilín a streptomycín. Bunková línia OE33 bola kultivovaná v médiu RPMI 1640 s prídavkom 10% fetálneho bovinného séra, 2 mM L-glutamínu a 1% zmesi antibiotík penicilín a streptomycín. Kultivácia prebiehala v inkubátore pri teplote 37 °C v atmosfére 5% CO₂. Bunky boli pasážované pri konfluencii 80-90 %, ktorá bola stanovená inverzným mikroskopom. Pri pasážovaní bolo z misiek s bunkami odsaté médium a bunky boli premyté sterilným PBS. Po premytí bol k bunkovej línii H1299 pridaný trypsín a inkubácia prebiehala 5 min pri 37 °C. K bunkovej línii OE33 bola pridaná akutáza a inkubácia prebiehala 15 min pri laboratórnej teplote. Účinok proteáz bol zastavený prídavkom kultivačného média. Bunková suspenzia bola stočená v centrifúge (1000 rpm, 5 min). Supernatant bol odstránený, bunkový pelet bol rozsuspendovaný v čerstvom médiu a prenesený v požadovanom množstve na novú Petriho misku.

4.2.8.2 Spracovanie buniek do peletu

Misky s bunkami boli umiestnené na ľad, kde bolo odsaté médium a bunky boli premyté studeným PBS. Pomocou škrabky boli zoškriabané do 10 ml novo pridaného studeného PBS, v ktorom boli premiestnené do skúmaviek a stočené v centrifúge (10 min/1000 rpm/4 °C). Po stočení bol odstránený supernatant a pelet bol rozsuspendovaný v 1 ml studeného PBS. Bunková suspenzia bola prenesená do nových skúmaviek a opätovne stočená v centrifúge (10 min/1000 rpm/4 °C). Po odstránení supernatantu bol pelet zamrazený na -80 °C alebo podrobený lýze.

4.2.8.3 Lýza buniek

Pelety buniek OE33 a H1299 boli lyzované v NET pufri s prídavkom inhibítorov proteáz, inhibítorov fosfatáz a PMSF (100:1). Každá vzorka sa podrobila trikrát pulznej sonikácii (3x 3 s). Po stočení v centrifúge (10 min/10000 g/4 °C) bol supernatant prenesený do nových skúmaviek. Po celú dobu boli lyzáty uchovávané na ľade. Celková koncentrácia proteínov v lyzátoch bola stanovená Bradfordovou metódou a následne upravená na rovnakú hodnotu. Proteínové lyzáty boli separované metódou SDS-PAGE.

4.2.8.4 Stanovenie koncentrácie proteínov podľa Bradforda

Bradfordovo činidlo bolo zriedené s H₂O v pomere 1:4. Takto pripravené činidlo bolo zmiešané s lyzátom v pomere 1000 dielov bradfordovho činidla a jeden diel lyzátu a spoločne inkubované 15 min pri laboratórnej teplote. Kolorimetrická zmena Coomassie Brilliant blue G250 bola pozorovaná na spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 595 nm.

4.2.9 Fluorescenčná mikroskopia

Priama imunofluorescencia

K bunkám H1299 alebo OE33 kultivovaných na 24 jamkovej doštičke bol pridaný fluorescenčne značený konjugát o koncentrácii 10 µg/ml. V prípade kompetície bola k bunkám okrem fluorescenčne značeného konjugátu (10 µg/ml) pridaná aj ekvivalentná avšak neznačená primárna protilátka o koncentrácii 100 µg/ml. Inkubácia prebiehala 2 hod pri 37 °C, 5% CO₂. Po odmytí voľných protilátok so sterilným PBS bolo k bunkám pridaných 0,5 ml média. Ako kontrola boli použité bunky bez prídavku značených protilátok. Bunky boli pozorované *in vivo* pomocou fluorescenčného mikroskopu Eclipse Ti-S.

Nepriama imunofluorescencia

K bunkám H1299 alebo OE33 kultivovaných na 24 jamkovej doštičke bola pridaná primárna protilátka o koncentrácii 10 µg/ml. Inkubácia prebiehala 2 hod pri 37 °C, 5% CO₂. Po odmytí voľných protilátok so sterilným PBS boli naviazané protilátky detekované pomocou fluorescenčne značenej sekundárnej protilátky (GAM-AF647). Sekundárna protilátka bola pridaná k bunkám v koncentrácii 10 µg/ml a inkubácia prebiehala 1 hod pri 37 °C, 5% CO₂. Po odmytí voľnej protilátky GAM-AF647 so sterilným PBS bolo k bunkám pridaných 0,5 ml média. Bunky boli pozorované *in vivo* pomocou fluorescenčného mikroskopu Eclipse Ti-S.

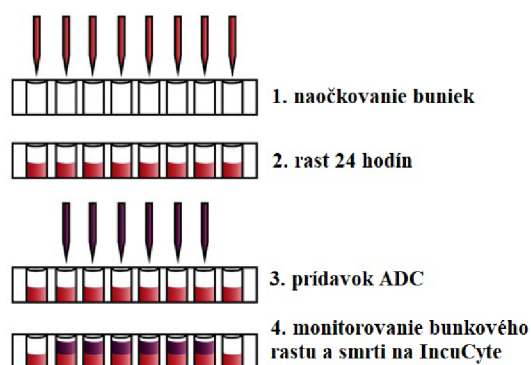
4.2.10 Prietoková cytometria

Bunky H1299 alebo OE33 boli rovnako ako v kapitole (3.2.9) fluorescenčná mikroskopia pripravené aj pre účely prietokovej cytometrie. Boli napestované v 24 jamkovej doštičke a

ošetrené rovnakým spôsobom ako v prípade priamej a nepriamej imunofluorescencie. Po poslednom odstránení nenaviazaných protilátok však boli bunky H1299 oddelené od povrchu účinkom trypsínu a bunky OE33 účinkom akutázy. Po stočení suspenzií v centrifúge (1000 g, 5 min) boli pelety rozsuspendované v médiu a prenesené do sterilných skúmaviek. Vzorky boli analyzované na prietokovom cytometri FACSVerse 3 L 4/2/2.

4.2.11 Test životaschopnosti

Do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky boli nasadené bunkové línie H1299 alebo OE33 s počtom buniek 5 000 na jamku. Na druhý deň boli bunky ošetrené konjugátmi anti-c-Met-vcMMAE (klony 2 alebo 8) v koncentračnej rade 0,010; 0,020; 0,039; 0,078; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 µg/ml a v triplikátoch. Bunky boli v prítomnosti cytostatických konjugátov inkubované pri 37 °C, 5% CO₂ a ich proliferácia bola monitorovaná prístrojom IncuCyte (obr. 9). Prístroj opticky zaznamenával zmenu konfluencie v čase pomocou časozbernej mikroskopie. Každé 4 hodiny boli zaznamenávané 4 snímky z každej jamky pri použití objektívu s 10-násobným priblížením. Celý proces monitorovania prebiehal 3-5 dní.

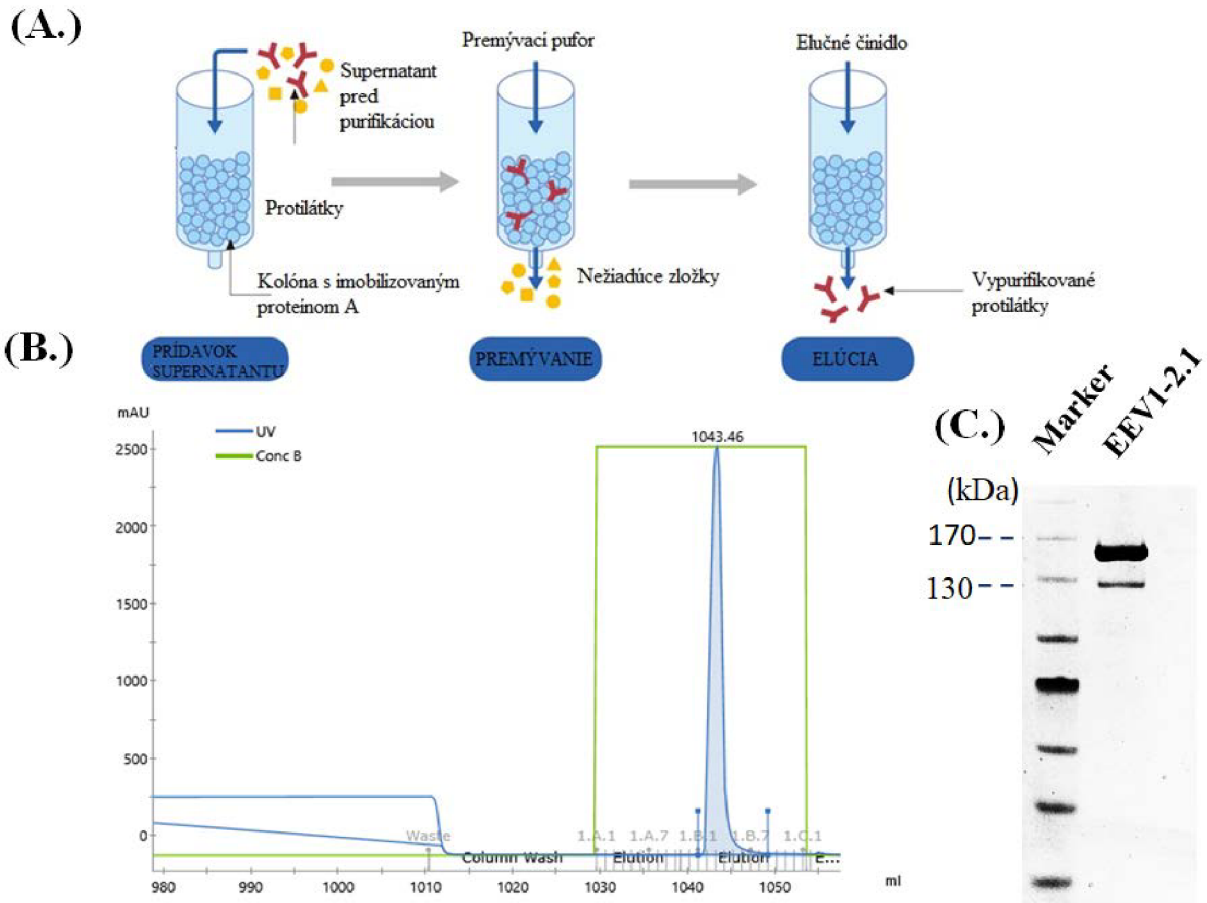


Obrázok 9: Prehľad postupu prípravy buniek na monitorovanie inhibície bunkového delenia pomocou ADC [103].

5 VÝSLEDKY

5.1 Purifikácia EEV1-2.1

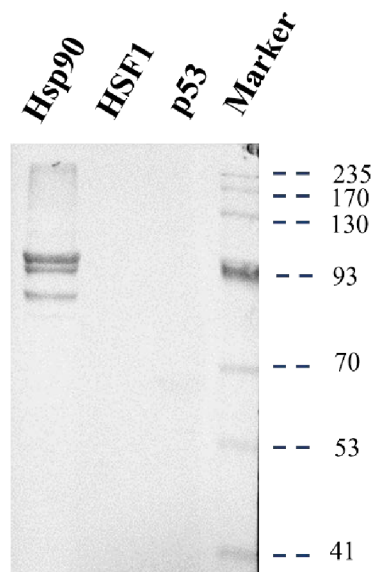
Prvým krokom experimentálnej časti diplomovej práce bola purifikácia protilátky EEV1-2.1, ktorá špecificky rozpoznáva proteín Hsp90. Samotnú produkciu protilátky EEV1-2.1 vykonali pracovníci Recama. Produkcia zahŕňala namnoženie vybraného klonu hybridómovej línie v bezsérovom médiu určenom pre produkciu protilátok a samotnú produkciu protilátky touto líniou hybridómov. Súčasťou našej práce bolo túto protilátku vypurifikovať z pripraveného roztoku prostredníctvom kvapalinovej chromatografie. Na imunoafinitnú separáciu bola použitá kolóna s imobilizovaným proteínom A. V prvej fáze bol roztok s protilátkou doplnený o borát sodný (pH 8,9) a NaCl k zaisteniu vhodných podmienok pre efektívnu väzbu protilátky na kolónu. Po aplikácii a následnom premytí bola protilátka eluovaná v podmienkach nízkeho pH (Obr. 10/A.). Eluát bol zozbieraný do 1 ml frakcií, pričom frakcie B2-B4 poukazovali na základe absorbancie na prítomnosť protilátky (Obr. 10/B.). Koncentrácia jednotlivých frakcií bola dodatočne stanovená spektrofotometricky: B2 (5,45 mg/ml), B3 (9,95 mg/ml) a B4 (1,61 mg/ml). Pre kontrolu správnosti purifikácie bola časť roztoku protilátky separovaná na géle prostredníctvom SDS-PAGE bez prítomnosti redukčného činidla. Výsledky nešpecifického farbenia pomocou Coomassie brilliant blue potvrdzujú precipitáciu proteínu s molekulovou hmotnosťou približne 150 kDa, ktorý odpovedá molekulovej hmotnosti IgG a rovnako ukazujú na vysokú čistotu purifikovanej protilátky (Obr. 10/C.). Precipitácia proteínu s molekulovou hmotnosťou približne 125 kDa môže predstavovať čiastočne rozpadnutý fragment protilátky.



Obrázok 10: (A.) Schématické znázornenie purifikáčného procesu [108]. (B.) Grafický priebeh purifikácie. (C.) Overenie čistoty EEV1-2.1 pomocou metódy SDS-PAGE.

5.2 Overenie aktivity EEV1-2.1

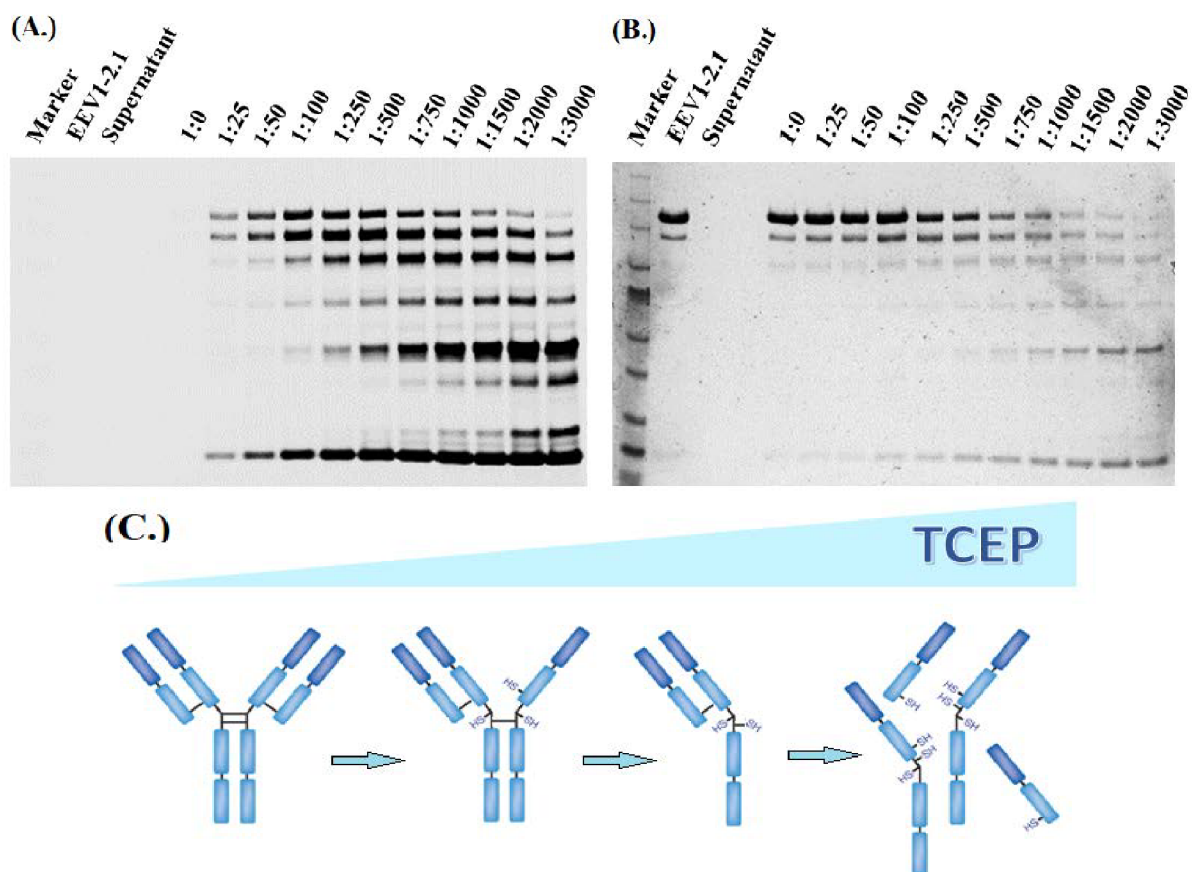
Aby sme overili, že purifikovaná monoklonálna protilátka EEV1-2.1 si zachovala anti-Hsp90 aktivitu po produkcii a purifikácii, tak sme uskutočnili Westernový prenos s následnou imunodetekciou. 1 $\mu\text{g/ml}$ purifikovanej protilátky bol použitý k detekcii purifikovaných proteínov Hsp90 ako pozitívna kontrola a HSF1 a p53 ako negatívna kontrola. Obrázok 11 ukazuje, že EEV1-2.1 úspešne rozpoznáva denaturovaný proteín Hsp90. Súčasne bolo dokázané, že EEV1-2.1 nevykazuje žiadnu afinitu voči proteínom HSF1 (83 kDa) a p53 (44 kDa).



Obrázok 11: Westernový prenos pre test anti-Hsp90 aktivity monoklonálnej protilátky EEV1-2.1. Primárna protilátka bola použitá v koncentrácii 1 $\mu\text{g/ml}$. Komplex bol vizualizovaný sekundárnou protilátkou značenou peroxidázou (GAM-HRP). Ako negatívna kontrola boli použité purifikované proteíny HSF1 a p53.

5.3 Optimalizácia redukcie EEV1-2.1

Pre účely značenia protilátky cez sulfhydrylové skupiny bola v prvom kroku optimalizovaná redukcia protilátky s využitím redukčného činidla tris(2-karboxyethyl)fosfín (TCEP). Na určenie správneho množstva činidla pre čiastočnú redukciu protilátky, ktorá ešte neovplyvní jej väzbovú aktivitu, bola zhotovená rada so zvyšujúcim sa pomerom TCEP k protilátke. Variabilne redukovaná protilátka bola následne separovaná prostredníctvom SDS-PAGE bez prítomnosti β -merkaptoethanolu a gél bol zafarbený prostredníctvom Coomassie Brilliant Blue. Na obrázku 12/B možno pozorovať vplyv redukčného činidla na stabilitu protilátky cez výskyt menších fragmentov. Tieto fragmenty obsahujú plne zredukované thiolové skupiny prístupné pre značenie fluorochromom, a preto sa fluorescenčne značená protilátka javí rozpadnutá vo väčšej miere ako tomu naznačuje farbenie Coomassie Brilliant Blue (obr. 12/A). Na základe koncentračnej rady sme stanovili ideálny pomer mAb:TCEP v rozmedzí 1:100-250. Pri nižších koncentráciách redukčného činidla sú protilátky značené nedostatočne a pri vyššom pomere už strácajú stabilitu a začínajú sa rozpadáť. V supernatante, ktorý reprezentuje nena viazanú frakciu, nepozorujeme žiadne voľné protilátky a to poukazuje na vysokú efektivitu väzby protilátky na proteín G-nesúce magnetické guľičky.



Obrázok 12: Závislosť miery rozpadu protilátky na množstve redukčného činidla. (A.) Fluorescenčná detekcia konjugátov EEV1-2.1-sulfo-Cy5 maleimide, ktoré boli pripravené značením protilátky po jej redukcii koncentračnou radou TCEP (excitácia 646 nm). (B.) Kvantitatívna detekcia protilátky EEV1-2.1 (1,5 $\mu\text{g}/\text{jamka}$) po jej čiastočnej redukcii a separácii prostredníctvom SDS PAGE. Na každú reakciu bolo použitých 5 μg EEV1-2.1 a 3,5 μl suspenzie guľčiek. K protilátke bol pridávaný TCEP v rôznom množstve (viď. obrázok) a sulfo-Cy5 maleimide v 20-násobnom molárnom nadbytku (A.). (C.) Schématické znázornenie medzireťazcových disulfidových väzieb, ktoré sú cieľom pre čiastočnú redukciiu a následné značenie (obrázok modifikovaný z [109]).

5.4 Konjugácia EEV1-2.1 s fluorochromom pre zobrazovacie metódy

Pre kontrolu efektivity značenia, detekciu lokalizácie Hsp90 α v nádorových bunkových líniách a detekciu možnej internalizácie ADC po väzbe na antigén Hsp90 α boli pripravené dve fluorescenčne značené varianty EEV1-2.1. Ich príprava sa líšila v molárnom pomere protilátky a redukčného činidla (mAb:TCEP). Po redukcii boli protilátky značené 20-násobným molárnym nadbytkom sulfo-Cy5 maleimide. U oboch značených konjugátov bola na Nanodrope v programe UV-VIS zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 280 nm a 646 nm. Z nameraných hodnôt boli vypočítané koncentrácia konjugátov a hodnota F/P, ktorá hovorí o počte molekúl fluorochromu naviazaných na molekulu protilátky. Konjugát pripravený redukciiu protilátky so 150-násobným molárnym nadbytkom TCEP (konjugát 1:150) vykazoval vyššiu hodnotu F/P ako konjugát 1:100, avšak na SDS PAGE bez BME (obr. 13/A) vidieť, že časť molekúl sa rozpadla a umožnila tak efektívnejšie naviazanie fluorochromu (obr. 13/B). Pri nižšom množstve redukčného činidla je hodnota F/P síce nižšia, ale predpokladá sa vyššia stabilita protilátky. Pomer 1:100 bol preto zvolený za vhodnejší pre čiastočnú redukciiu protilátky EEV1-2.1 pre následné značenia.

Konjugát redukovaný 100-násobným molárnym nadbytkom TCEP

$$A_{280} = 1,13$$

$$A_{646} = 1,25$$

$$c(\text{konjugát}) = (A_{280} - (A_{503} \times CF_{280})) / 1,4 = 0,77 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$F/P = (A_{503} \times M_{W(\text{mAb})}) / (C(\text{konjugát}) \times \epsilon(\text{S-Cy5-maleimide})) = 0,90$$

Konjugát redukovaný 150-násobným molárnym nadbytkom TCEP

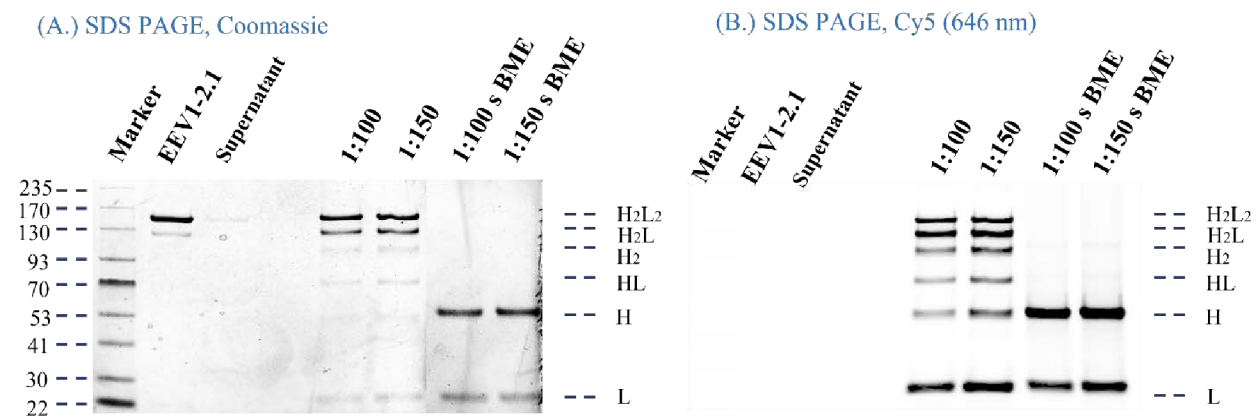
$$A_{280} = 0,93$$

$$A_{646} = 1,35$$

$$c(\text{konjugát}) = (A_{280} - (A_{503} \times CF_{280})) / 1,4 = 0,63 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$F/P = (A_{503} \times M_{W(\text{mAb})}) / (C(\text{konjugát}) \times \epsilon(\text{S-Cy5-maleimide})) = 1,25$$

Prítomnosť β -merkaptoethanolu (BME) spôsobila úplný rozpad disulfidových mostíkov a disociáciu protilátky na ťažké (H ~ 50 kDa) a ľahké reťazce (L ~ 25 kDa). Za neredukčných podmienok sú viditeľné intaktné molekuly IgG1 (H₂L₂ ~ 150 kDa). Zvyšné precipitované proteíny na SDS-PAGE boli určené len orientačne na základe molekulovej hmotnosti.



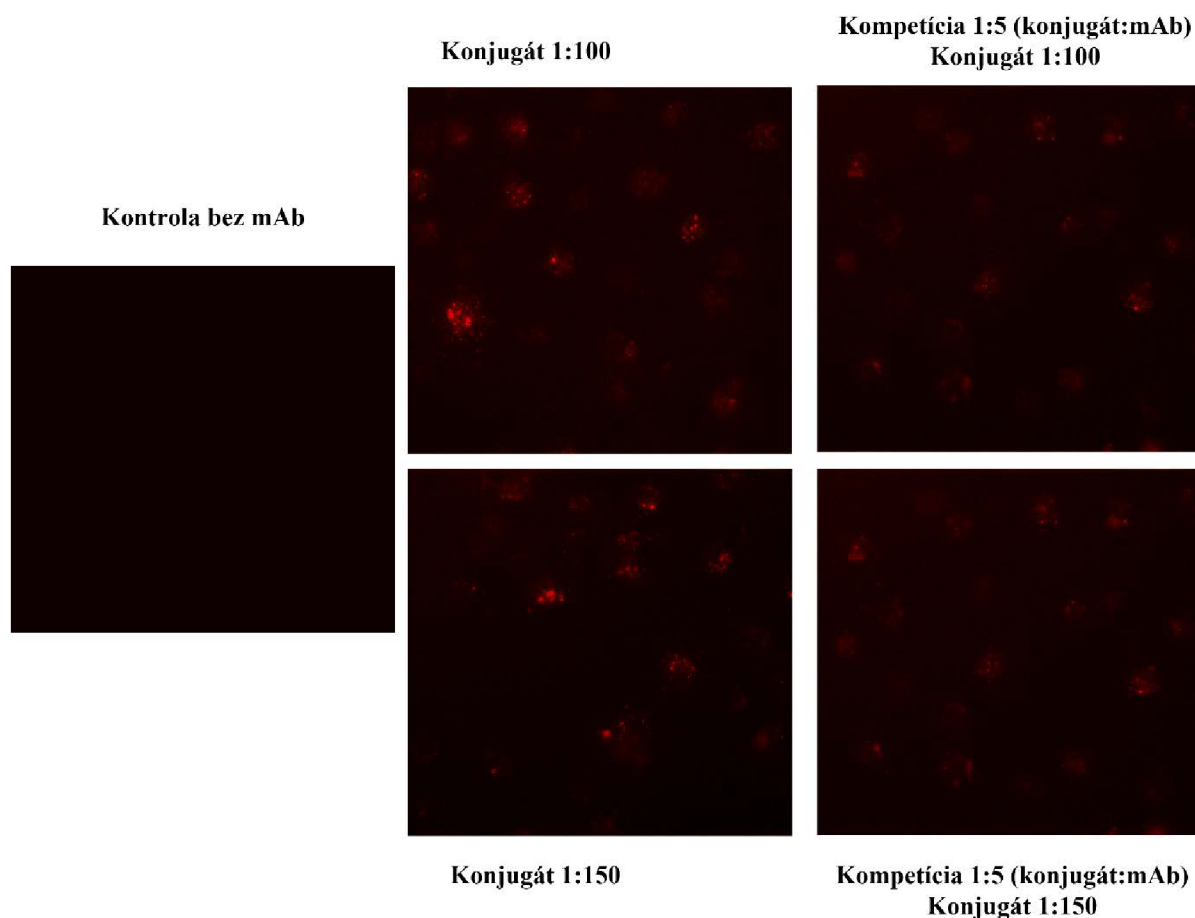
Obrázok 13: Analýza konjugátov pomocou SDS-PAGE. Vzorky boli denaturované a spracované za redukčných aj neredukčných podmienok. (A.) Detekcia protilátky EEV1-2.1 a jej menších fragmentov (1 μg /jamka). EEV1-2.1 reprezentuje vstupnú protilátku, Supernatant reprezentuje nenaviazanú frakciu. (B.) Fluorescenčná detekcia konjugátov EEV1-2.1-sulfo-Cy5 maleimide. Na každú reakciu bolo použitých 52,5 μg EEV1-2.1 a 20 μl suspenzie guľičiek. K protilátke bol pridávaný TCEP v rôznom množstve (viď. obrázok) a sulfo-Cy5 maleimide v 20-násobnom molárnom nadbytku.

5.5 Detekcia Hsp90 α v nádorových bunkách fluorescenčnou mikroskopiou

Aby sme overili či dochádza k väzbe protilátky na natívny proteín eHsp90 α a následnej internalizácii konjugátu, inkubovali sme bunky nádorovej línie H1299 s fluorescenčne značeným konjugátom EEV1-sulfo-Cy5-maleimide. Bunková línia H1299 bola zvolená na základe zvýšených hladín extracelulárneho Hsp90. Výsledky ukazujú, že fluorescenčne značený konjugát prechádza do buniek nádorovej línie H1299 (obr. 14) a červené zhluky ďalej naznačujú prítomnosť konjugátu pravdepodobne v endozómoch.

Aby sme overili, že konjugát prechádza do buniek antigénom sprostredkovanou endocytózou, bola vykonaná kompetícia s neznačenou protilátkou EEV1-2.1. Bunky boli tentokrát inkubované v prítomnosti značenej aj neznačenej protilátky, avšak výsledok kompetície nevykazoval významné zníženie fluorescenčného signálu. Z toho je pravdepodobné, že

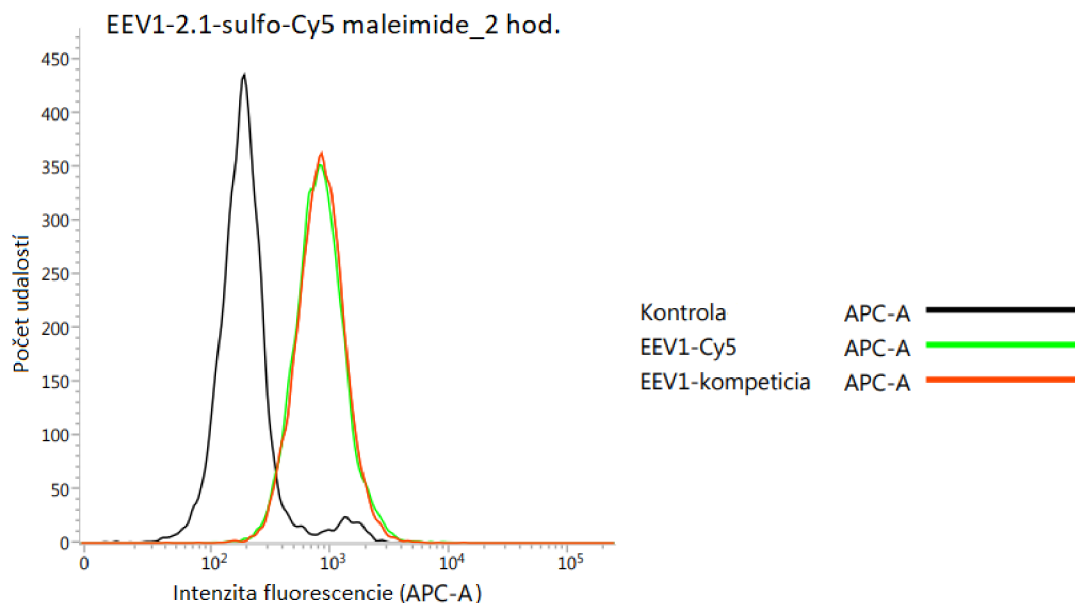
konjugát prechádzal do buniek nešpecificky a prechod tak nebol sprostredkovaný špecifickou väzbou na antigén.



Obrázok 14: Analýza lokalizácie fluorescenčne značených konjugátov EEV1-2.1-sulfo-Cy5-maleimide. Bunková línia H1299 stabilne exprimujúca eHsp90a bola napestovaná na 6-jamkovej doštičke a vystavená pôsobeniu konjugátov 1:100 a 1:150 s koncentráciou 10 µg/ml. Do 2 jamiek bola pridaná neznačená mAb EEV1-2.1 s koncentráciou 50 µg/ml presne 30 min pred prídavkom konjugátu (kompetícia). Bunky boli inkubované 2 hod pri 37 °C, opláchnuté s PBS a po pridaní média boli podrobené fluorescenčnej mikroskopii.

5.6 Overenie väzbovej špecifity pomocou prietokovej cytometrie

Fluorescenčná mikroskopia odhalila prechod konjugátu do buniek, ale zároveň naznačila, že prechod môže byť sprostredkovaný nešpecificky. Aby sme tento fakt overili, bola vykonaná prietoková cytometria. Kompetičný test spočíval v ošetrovaní buniek H1299 nadbytkom neznačenej protilátky EEV1 (100 µg/ml) po dobu 30 minút pred prídavkom fluorescenčne značeného konjugátu. Bunky boli spolu s konjugátom inkubované ďalšie 2 hodiny a následne podrobené prietokovej cytometrii. Neznačená mAb by mala konkurovať väzbe konjugátu na antigén a znižovať tak intenzitu fluorescenčného signálu. Vzhľadom k tomu, že kompetícia nevedla k zmene intenzity fluorescenčného signálu (obr. 15), prietoková cytometria tak len podporila výsledky z mikroskopie, ktoré ukázali, že EEV1 neprechádza do cytosolu antigénom sprostredkovanou dráhou.



Obrázok 15: Analýza buniek ošetrených konjugátom alebo konjugátom v kompetícii s neznačenou protilátkou prietokovou cytometriou. Bunky línie H1299 boli ošetrené protilátkou EEV1-2.1 (100 µg/ml). Po 30 min inkubácii bol pridaný konjugát 1:100 (10 µg/ml). Súčasne boli pripravené bunky ošetrené iba konjugátom 1:100 (10 µg/ml) a negatívna kontrola bez prídavku konjugátov.

5.7 Charakterizácia klonov anti-c-Met protilátok

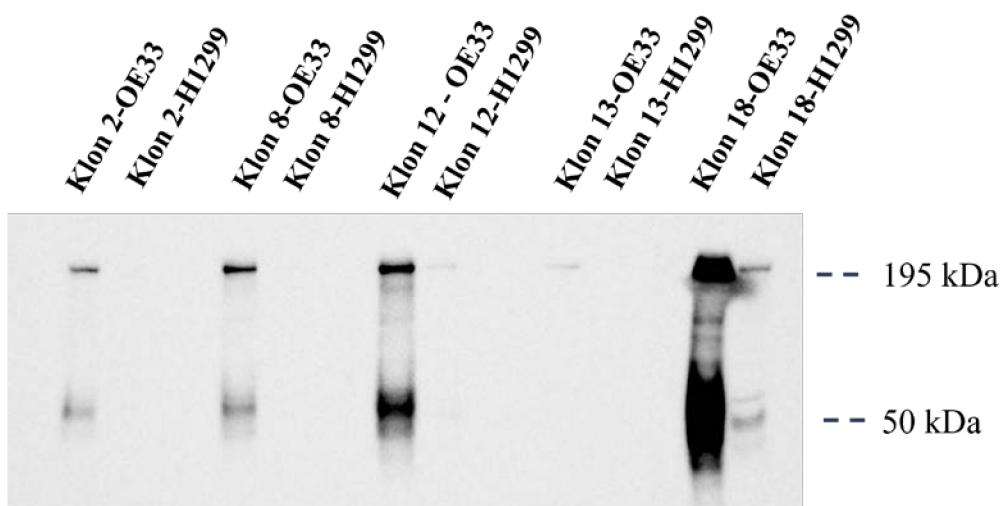
Keďže protilátka EEV1 nevykazovala vlastnosti, ktoré sú nevyhnutné pre správne fungovanie ADC, tak sme pre porovnanie účinnosti a aktivity vybrali protilátky proti ľudskému c-Met receptoru. Bolo vybraných 5 klonov purifikovaných monoklonálnych protilátok s anti-c-Met aktivitou (klony 2, 8, 12, 13, 18), ktoré boli bližšie charakterizované a použité k príprave ADC.

5.8 Výber bunkových línií

Pre účely charakterizácie vybraných klonov protilátky s anti-c-Met aktivitou boli zvolené 2 nádorové bunkové línie. Nádorová bunková línia OE33, ktorá reprezentuje líniu so zvýšenými hladinami receptoru c-Met a bunková línia H1299, ktorá sa vyznačuje nízkymi hladinami c-Met. Aby sme overili tento fakt a zároveň porovnali anti-c-Met aktivitu jednotlivých klonov, tak sme uskutočnili westernový prenos s následnou imunodetekciou endogénneho c-Met, ktorý bol získaný lýzou buniek OE33 a H1299.

Výsledky imunodetekcie potvrdili zvýšenú hladinu c-Met u buniek OE33 a naopak len veľmi nízku hladinu endogénneho receptoru u buniek H1299. Na obrázku 16 sú vyznačené precipitované proteíny c-Met s molekulovou hmotnosťou 195 kDa a α -reťazec s molekulovou hmotnosťou 50 kDa, proti ktorému sú použité klony cielené.

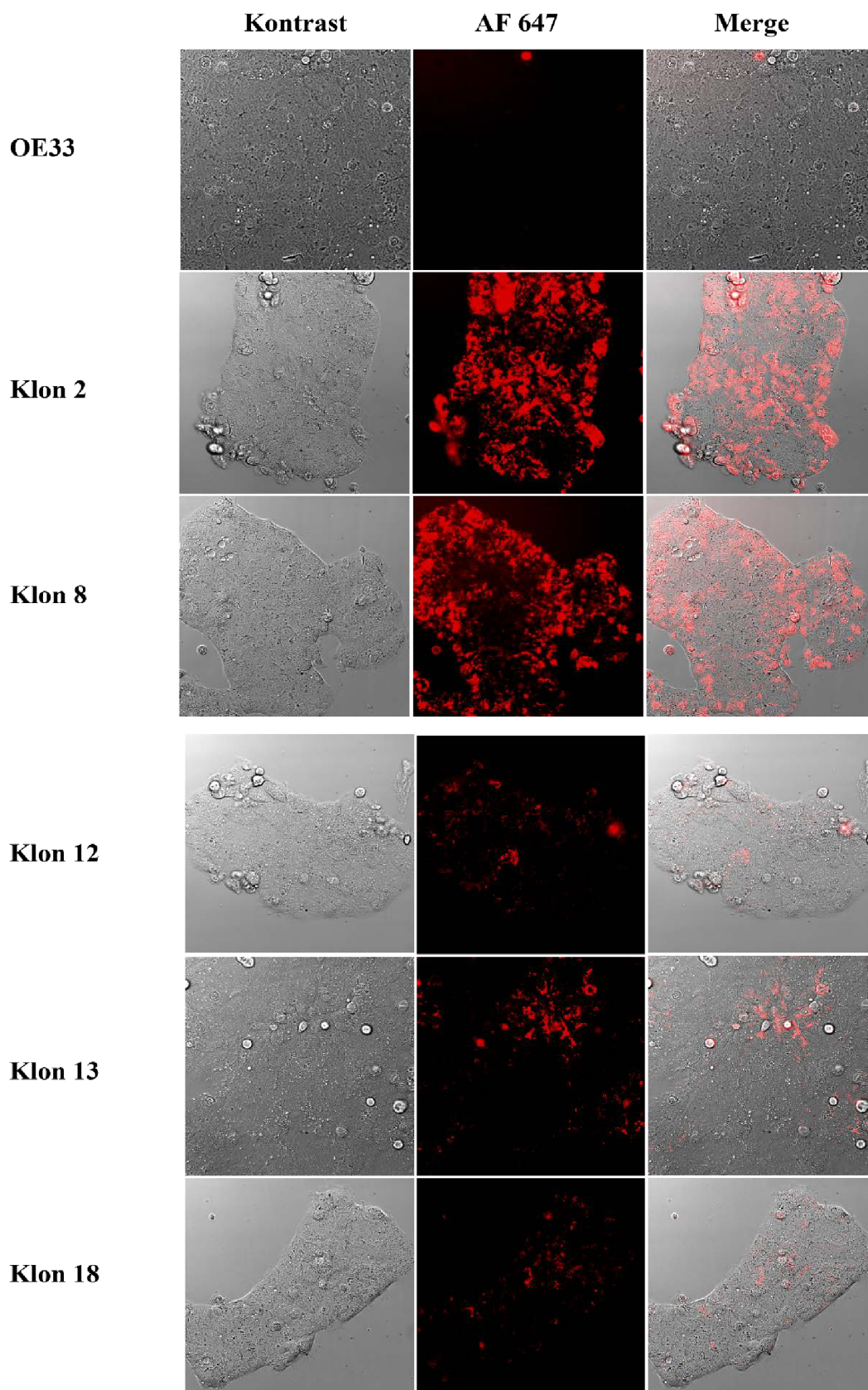
Tieto výsledky zároveň ukázali, že jednotlivé klony rozpoznávajú výhradne c-Met receptor, a sú preto vysoko špecifické. Najvyššiu afinitu k denaturovanému antigénu vykazovali klon 18 a klon 12. Výrazne nižšiu afinitu vykazovali ostatné klony 13, 8 a 2.



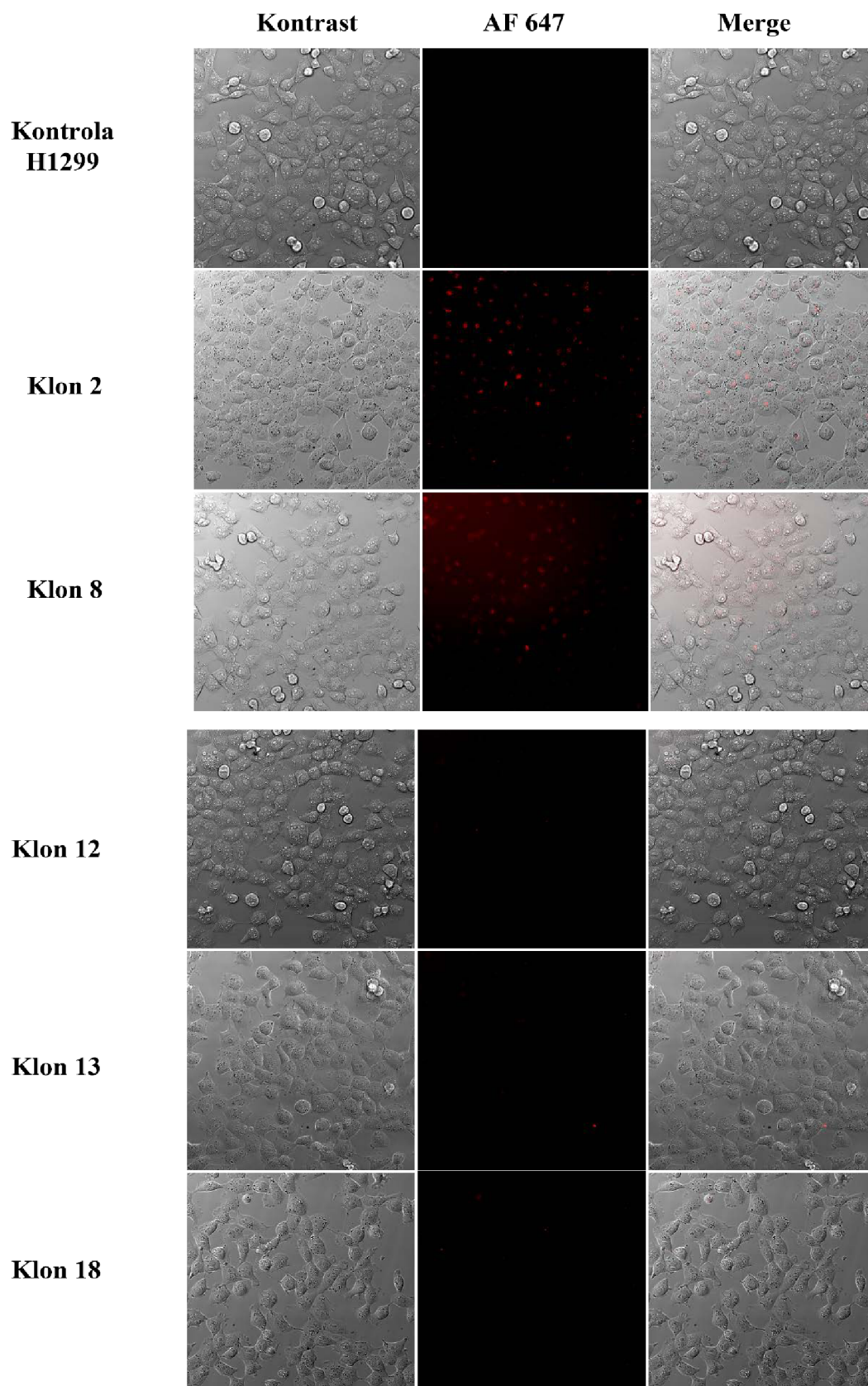
Obrázok 16: *Westernový prenos a imunodetekcia c-Met prostredníctvom jednotlivých klonov anti-c-Met protilátky. C-Met bol získaný z lyzátu buniek OE33 a H1299. Protilátky boli použité v koncentrácii 1 µg/ml. Komplex bol vizualizovaný sekundárnou protilátkou značenou peroxidázou, GAM-HRP.*

5.9 Výber vhodného klonu fluorescenčnou mikroskopiou

Prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie sme overili afinitu jednotlivých klonov anti-c-Met protilátky k natívnemu antigénu ako aj ich následnú schopnosť internalizácie. Na tieto účely boli použité bunkové línie OE33 a H1299, ktoré boli v predchádzajúcom kroku otestované na hladiny c-Met. Lúnia OE33 so zvýšenou hladinou c-Met bola použitá ako pozitívna kontrola, pričom H1299 s nízkou hladinou c-Met bola použitá ako negatívna kontrola. Bunkové línie boli inkubované v prítomnosti jednotlivých klonov anti-c-Met protilátky. Detekcia naviazaných primárnych protilátok bola umožnená väzbou fluorescenčne značenej sekundárnej protilátky (GAM-AF647) (metódy - nepriama imunofluorescencia). Výsledky fluorescenčnej mikroskopie ukazujú, že potenciálne najvyššiu afinitu k antigénu a s tým spojenú schopnosť internalizácie u bunkovej línie OE33 vykazovali klony 2 a 8 (obr. 17). U klonov 12, 13 a 18 bola intenzita fluorescenčného signálu nižšia, čo môže značiť nižšiu afinitu týchto klonov k natívnej forme cieľového antigénu. Použitie bunkovej línie H1299 umožnilo potvrdiť, že fluorescenčný signál je sprostredkovaný špecificky cez väzbu primárnej protilátky na c-Met receptor. V prípade línie H1299 preto sledujeme výrazne znížený signál u klonov 2 a 8 a úplnú stratu signálu u ostatných klonov anti-c-Met (obr. 18). Na základe týchto výsledkov boli klony 2 a 8 vyhodnotené za protilátky s najvyššou anti-c-Met aktivitou.



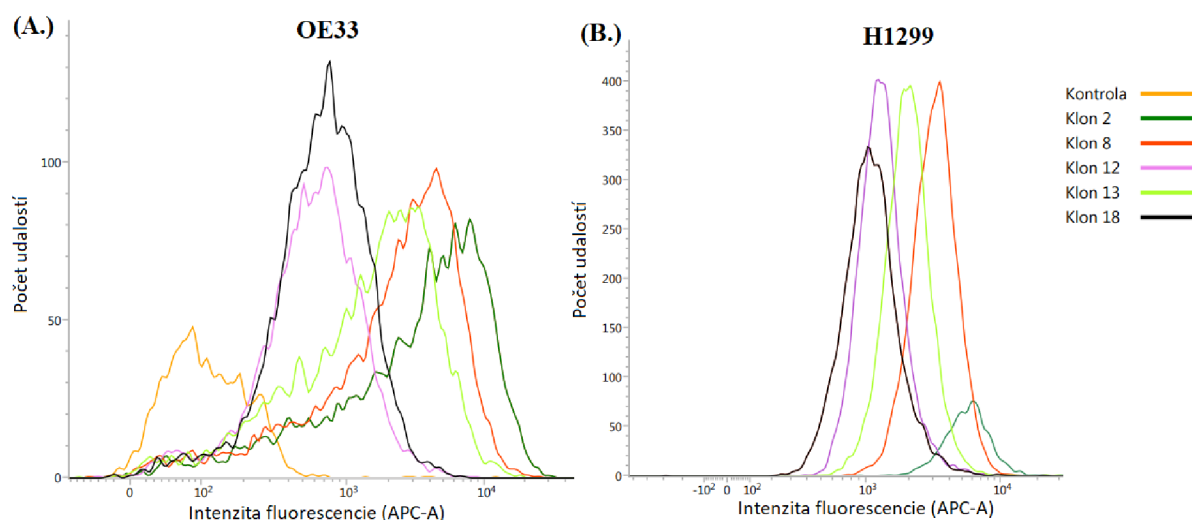
Obrázok 17: *Imunofluorescenčné pozorovanie internalizácie jednotlivých klonov anti-c-Met protilátok na bunkách OE33. Bunky boli ošetrené 10 µg/ml primárnej protilátky a inkubované 2 hod. Po premytí sa inkubovali s 10 µg/ml GAM-AF647 počas 1 hod.*



Obrázok 18: *Imunofluorescenčné pozorovanie internalizácie jednotlivých klonov anti-c-Met protilátok na bunkách H1299. Bunky boli ošetrené 10 µg/ml primárnej protilátky a inkubované 2 hod. Po premytí sa inkubovali s 10 µg/ml GAM-AF647 počas 1 hod.*

5.10 Výber vhodného klonu prietokovou cytometriou

Aby sme bližšie charakterizovali a kvantifikovali väzbovú afinitu jednotlivých klonov anti-c-Met protilátky k natívnemu antigénu, tak bola vykonaná prietoková cytometria s využitím bunkových línií OE33 a H1299. Bunky boli inkubované v prítomnosti jednotlivých klonov purifikovanej protilátky. Detekcia naviazaných primárnych protilátok bola umožnená väzbou fluorescenčne značenej sekundárnej protilátky (GAM-AF647). Výsledky prietokovej cytometrie ukázali, že najvyššiu intenzitu fluorescencie vykazovali bunky inkubované v prítomnosti klonu 2 a klonu 8 (obr. 19). Naopak klon 12 a klon 18 vykazovali nízku intenzitu fluorescencie. Prietoková cytometria tak podporila výsledky z fluorescenčnej mikroskopie, že klony 2 a 8 sa vyznačujú najvyššou anti-c-Met aktivitou.



Obrázok 19: Analýza buniek (A.) OE33 a (B.) H1299 ošetrených jednotlivými klonmi anti-c-Met protilátky pomocou prietokovej cytometrie. Bunky boli ošetrené 10 µg/ml primárnej protilátky a inkubované 2 hod. Po premytí sa inkubovali s 10 µg/ml GAM-AF647 počas 1 hod.

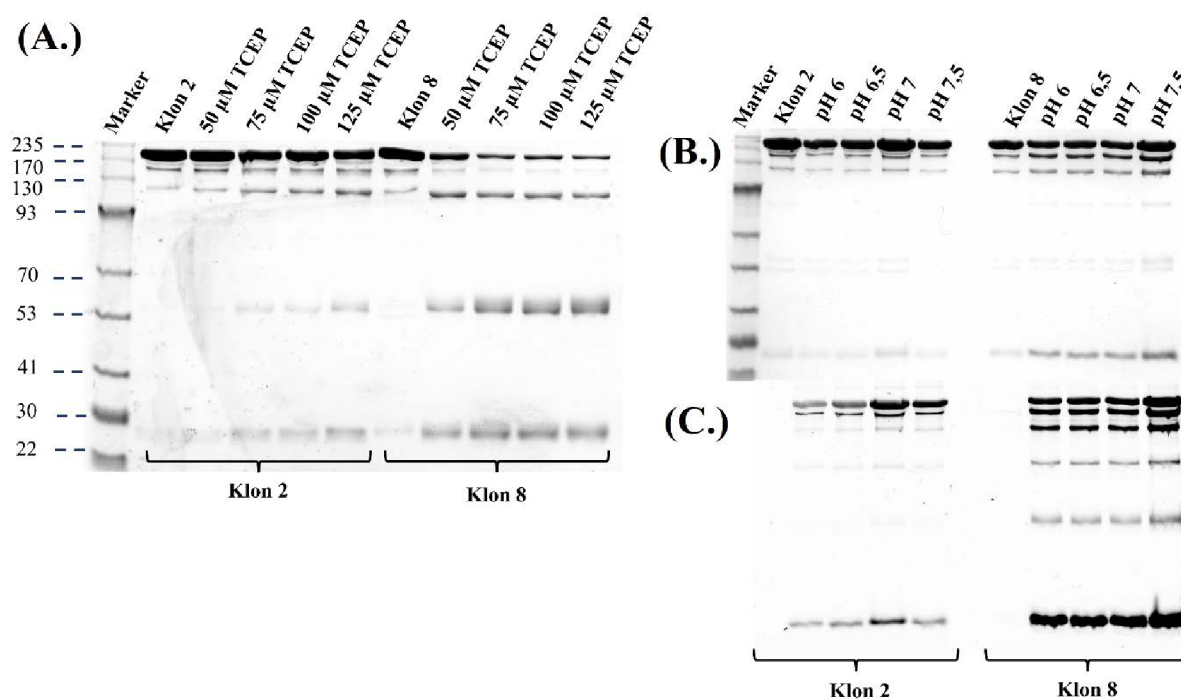
5.11 Optimalizácia podmienok značenia anti-c-Met protilátok

Po overení anti-c-Met aktivity boli klony 2 a 8 vybrané pre prípravu ADC. Prvým nevyhnutným krokom bola optimalizácia množstva redukčného činidla TCEP pre jednotlivé klony. Oproti značeniu EEV1, ktoré bolo postavené na molárnom pomere protilátky a činidla, sme tentokrát zvolili stratégiu presne stanovenej molárnej koncentrácie redukčného činidla bez ohľadu na pracovnú koncentráciu protilátky. Ďalším rozdielom bol mechanizmus, ktorým sme prečisťovali roztok protilátky od nežiadúcich reagensov. Oproti magnetickým guľôčkam s imobilizovaným proteínom G, sme pri značení anti-c-Met protilátky používali ZEBA odsol'ovacie kolóny.

Klony 2 a 8 boli inkubované v prítomnosti rastúcej koncentrácie redukčného činidla TCEP. ZEBA kolóny nám následne umožnili odstrániť redukčné činidlo zo zmesi a previesť protilátku do roztoku s prídavkom 0,5 mM EDTA, ktorá bránila spätnej oxidácii cysteínových zvyškov. Variabilne redukovaná protilátka bola separovaná prostredníctvom SDS-PAGE bez prítomnosti β-merkapt ethanolu a gél bol zafarbený prostredníctvom Coomassie Brilliant Blue. Vplyv redukčného činidla je možné pozorovať cez výskyt menších fragmentov. Výsledky ukazujú, že optimálna koncentrácia činidla v reakčnej zmesi pre čiastočnú redukciu klonu 2 bola 50 µM.

Klon 8 už pri najnižšej zvolenej koncentrácii činidla strácal stabilitu a dochádzalo k jeho rozpadu (obr. 20/A), a preto bola odvodená pre ďalšie postupy koncentrácia redukčného činidla 25 μM .

V ďalšom kroku sme otestovali vplyv pH na efektivitu značenia cez sulfhydrylové skupiny. Po redukcii boli klony prevedené ZEBa kolónou do roztokov s rastúcim pH a naznačené. Fluorescenčne značené fragmenty boli separované prostredníctvom SDS-PAGE a fluorescencia bola zachytená prostredníctvom fluorescenčného skenera Typhoon. Na obrázku 20/C možno pozorovať, že pri klone 2 vyššie pH mierne zvýšilo efektivitu značenia. Pri klone 8 však pH nemalo vplyv na efektivitu značenia. Optimálne pH pre značenie oboch klonov protilátok tak bolo stanovené pH 7,5.



Obrázok 20: (A.) Závislosť koncentrácie redukčného činidla na miere rozpadu protilátok. (B., C.) Závislosť pH na efektivitu značenia. (A.) Protilátky s koncentráciou 1 mg/ml boli redukované s rozdielnym množstvom TCEP (50-125 μM) 1 hodinu. Rozpad protilátok bola detekovaný na SDS-PAGE géli (1,5 μg /jamka) pomocou Coomassie Brilliant Blue. (B.) Klony 2/8 boli redukované TCEP s koncentráciou 50/25 μM pričom reakčné podmienky boli rovnaké ako v experimente A. TCEP bol odstránený pomocou ZEBa kolóny ekvilibrovanej PBS s rôznymi hodnotami pH. Protilátky boli inkubované s BODIPY FL maleimide v 20-násobnom molárnom nadbytku, 1 hodinu. Po odstránení voľných molekúl BODIPY FL maleimide boli konjugáty detekované na SDS-PAGE géli (1,5 μg /jamka) pomocou Coomassie Brilliant Blue. (C.) Intenzita fluorescenčného značenia bola sledovaná na prístroji Typhoon.

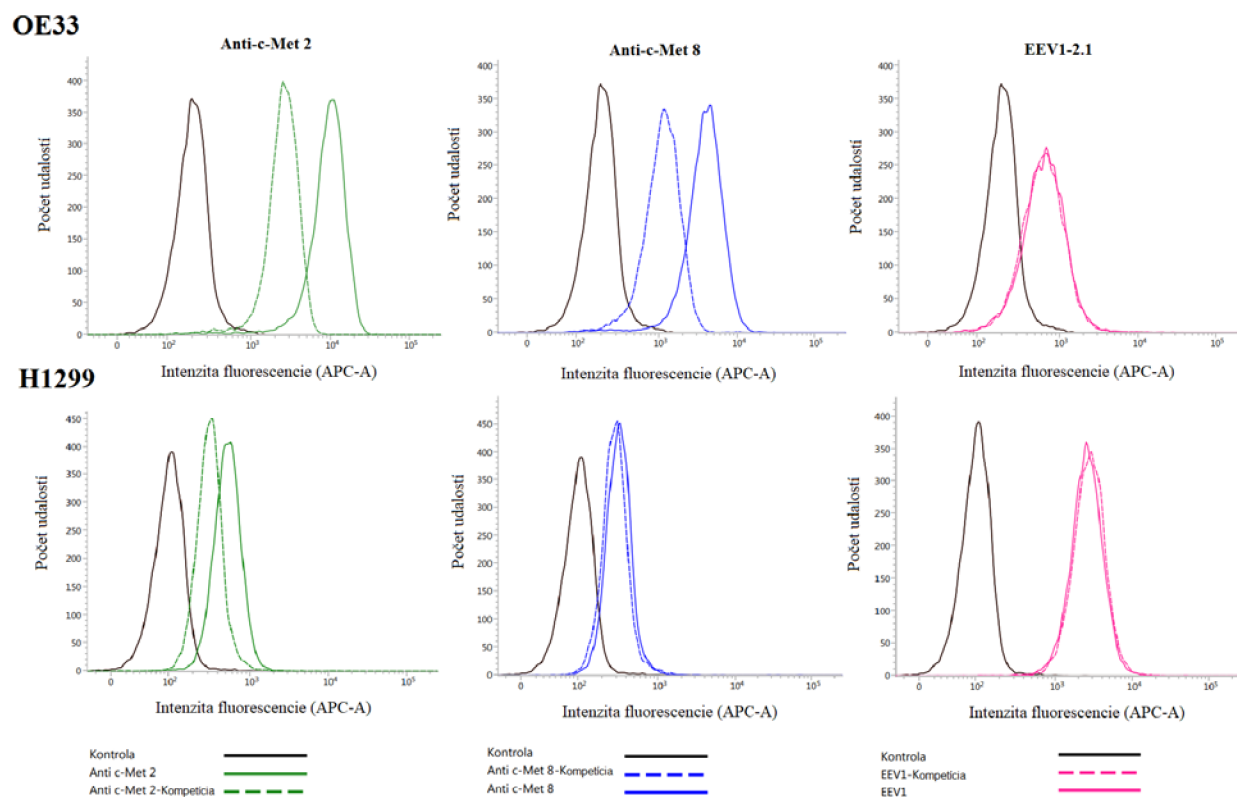
5.12 Porovnanie aktivity anti-c-Met protilátky s aktivitou EEV1 *in vivo*

Aby sme overili, že anti-c-Met protilátka prechádza narozdiel od EEV1 do buniek cez špecifickú väzbu na antigén, tak sme uskutočnili kompetičný test s využitím prietokovej cytometrie. S cieľom zvýšiť intenzitu fluorescenčného signálu značených konjugátov boli v experimente použité konjugáty značené fluorochromom cez -NH skupiny. Primárne aminy

bočných reťazcov lyzínu reagovali so sulfo-cyanine5 NHS ester, ktorý bol pridávaný k protilátke v 10-násobnom molárnom nadbytku. Kompetičný test spočíval v ošetrovaní buniek OE33 a H1299 nadbytkom neznačenej protilátky (100 µg/ml) a fluorescenčne značeného konjugátu (10 µg/ml). Pomocou prietokovej cytometrie sme pozorovali či neznačené protilátky konkurovali väzbe značených konjugátov.

V prípade kompetičného testu na bunkovej línii OE33 bol pri oboch klonoch 2 aj 8 pozorovaný pokles fluorescenčného signálu. Neznačené protilátky konkurovali väzbe značených protilátok na antigén. Je preto pravdepodobné, že anti-c-Met konjugáty sa dostávajú do buniek špecificky a to antigénom sprostredkovanou cestou. Na bunkách H1299 nie je významný rozdiel fluorescence medzi bunkami ošetrenými samotným konjugátom a konjugátom v prítomnosti neznačenej mAb. Dôvodom je predovšetkým nízka hladina c-Met u týchto buniek. V prípade konjugátu s anti-Hsp90 aktivitou sme nepozorovali zmeny intenzity fluorescence pri kompetičných testoch. Keďže však samotný konjugát prechádza do buniek, je z týchto výsledkov viditeľné, že tento prechod je nezávislý od väzby na antigén (obr. 21).

Tabuľka 4 znázorňuje výsledok prietokovej cytometrie vo forme priemernej intenzity fluorescence. Ako je vidno z tabuľky najväčšia intenzita a teda aktivita bola zaznamenaná pri klone 2. Najväčší pokles pri kompetičnom teste vykazuje rovnako klon 2. Naopak aktivita EEV1 je nízka a kompetičný test vyšiel negatívne a bez zmeny intenzity. Ukazuje to oproti c-Met konjugátom na nešpecifický prechod EEV1 konjugátu do buniek.



Obrázok 21: Analýza buniek OE33 a H1299 ošetrených konjugátom alebo konjugátom v kompetícii s neznačenou protilátkou prietokovou cytometriou. Bunky boli ošetrené neznačenými protilátkami (100 µg/ml). Po 30 min inkubácie pri 37 °C boli pridané konjugáty značené sulfo-Cy5 cez NH-skupiny

(10 µg/ml). Súčasne boli pripravené bunky ošetrované iba konjugátom (10 µg/ml) a kontrola bez prídavku konjugátov a protilátok.

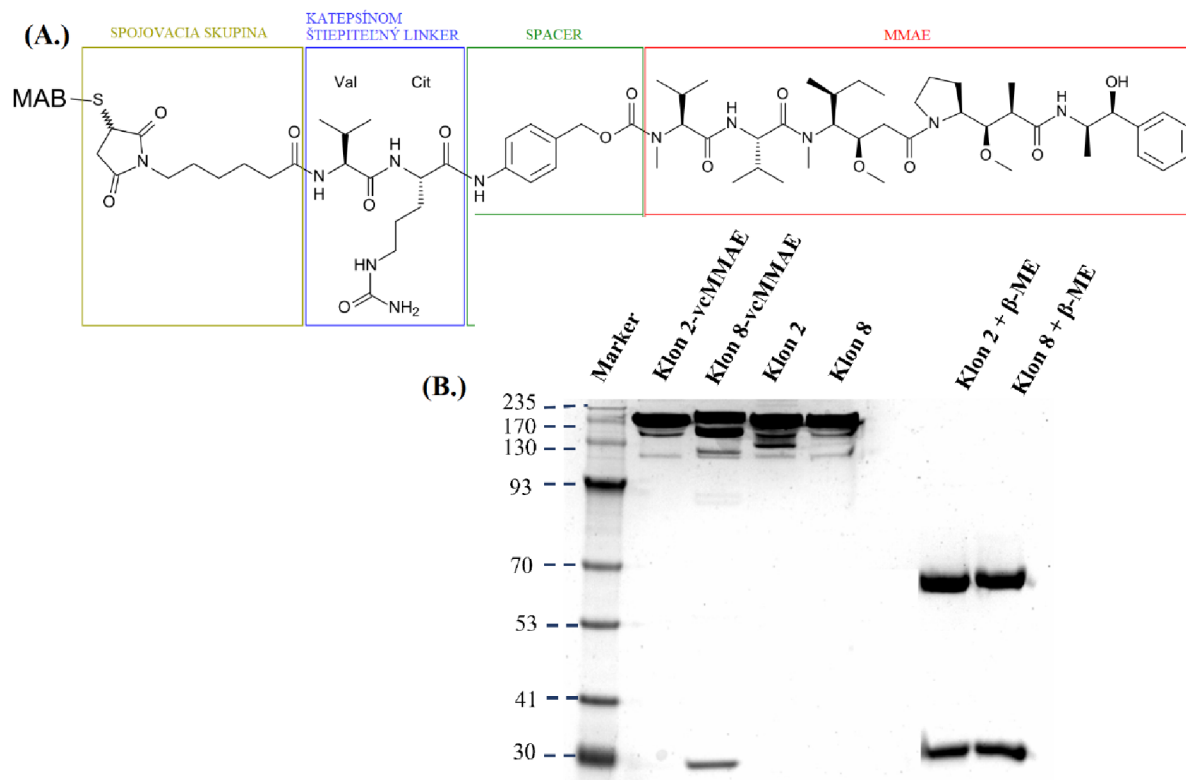
Tabuľka 4: Porovnanie priemerných hodnôt intenzity fluorescence nameraných na bunkách OE33 a H1299 ošetrovanými značenými a neznačenými protilátkami.

Konjugát	OE33		H1299	
	Priemer intenzity fluorescence	Rozdiel	Priemer intenzity fluorescence	Rozdiel
Kontrola	228	-	115	-
Klon 2	10441	7667	557	219
Klon 2 kompetícia	2774		338	
Klon 8	4392	3070	349	45
Klon 8 kompetícia	1322		304	
EEV1	813	36	2895	-209
EEV1 kompetícia	777		3104	

5.13 Konjugácia anti-c-Met protilátok s cytostatikom

Na základe vysokej anti-c-Met aktivity k natívnemu antigénu boli pre značenie cytostatikom vybrané klony 2 a 8. Protilátky boli značené cez sulfhydrylové skupiny, ktoré boli získané čiastočnou redukciou disulfidových väzieb pomocou TCEP. Na sulfhydrylové skupiny bol naviazaný konjugát vcMMAE. Štruktúra výsledného ADC konjugátu je znázornená na obrázku 22/A.

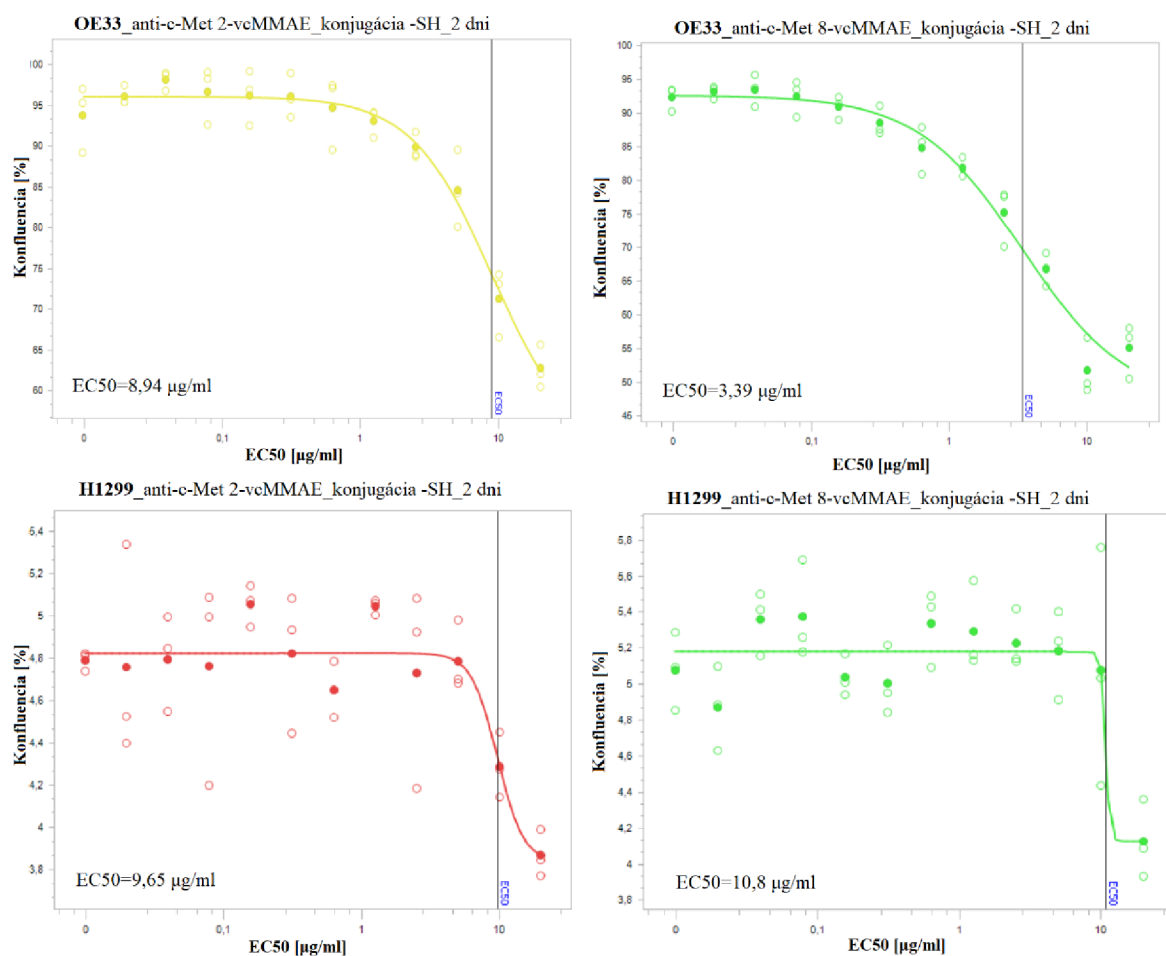
ADC boli následne separované prostredníctvom SDS-PAGE bez prítomnosti β-merkptoethanolu a gél bol zafarbený prostredníctvom Coomassie Brilliant Blue. Výsledky ukazujú, že po naznačení cytostatikom nedochádzalo k porušeniu štruktúry protilátok. Protilátky si zachovali svoju stabilitu aj po naznačení. Pre ukážku sme podrobili protilátky metóde SDS-PAGE v redukčných podmienkach, kde vidíme úplný rozpad protilátky na ľahké a ťažké reťazce. Zároveň sme potvrdili vysokú čistotu purifikovanej protilátky.



Obrázok 22: (A.) Chemická štruktúra konjugátu protilátka-vcMMAE [110]. (B.) Analýza konjugátov anti-c-Met 2-vcMMAE a anti-c-Met 8-vcMMAE pomocou SDS-PAGE. Overenie čistoty protilátok za redukčných aj neredukčných podmienok.

5.14 Testy cytotoxicity anti-c-Met protilátok

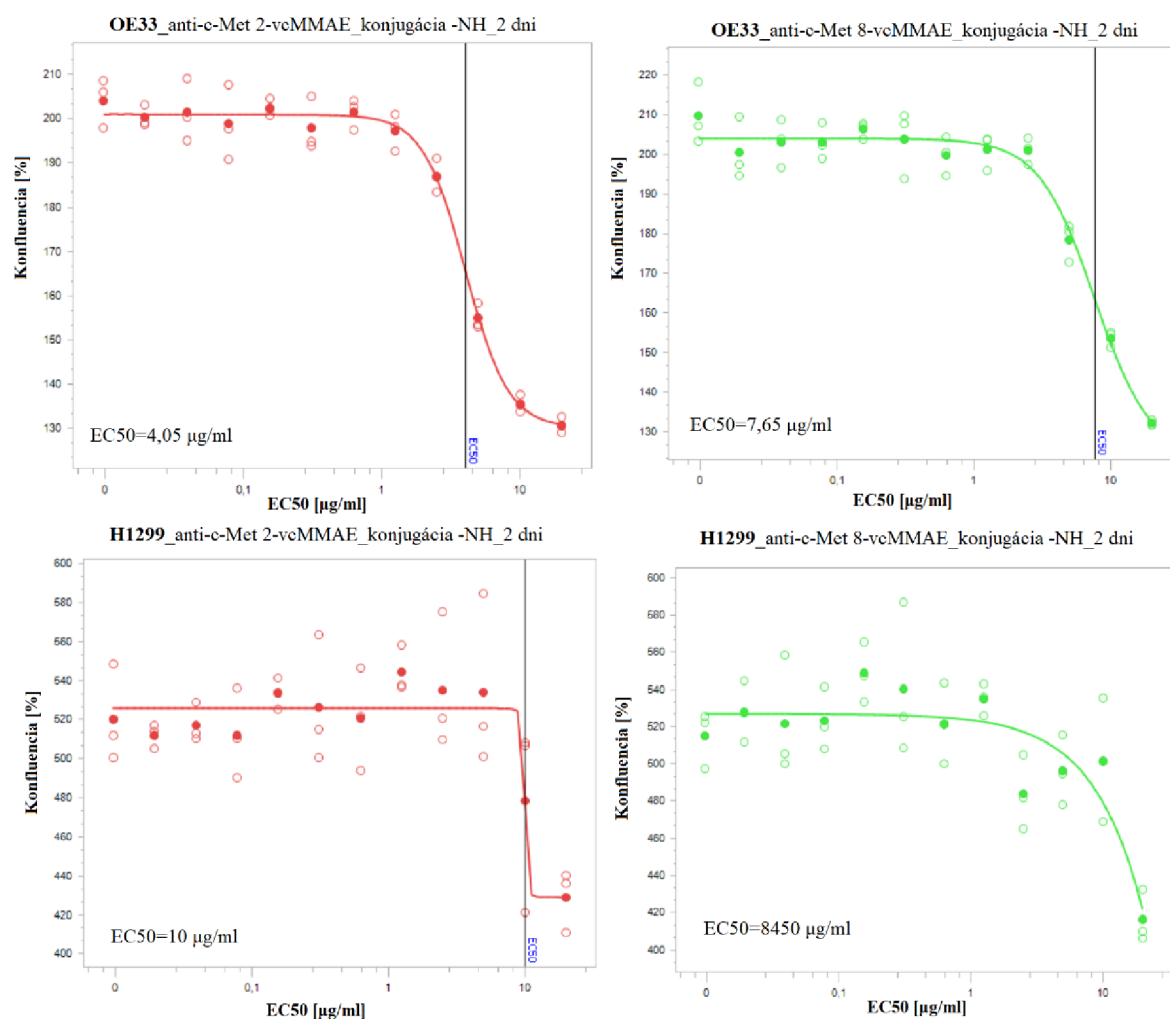
Posledným krokom diplomovej práce bolo overiť špecifickú cytotoxicitu pripravených anti-c-Met konjugátov. Opäť boli použité bunkové línie OE33 a H1299, ktoré boli inkubované v rastovom médiu s rastúcou koncentráciou cytostatických konjugátov anti-c-Met-2-vcMMAE a anti-c-Met-8-vcMMAE značených cez -SH skupiny (0,010; 0,020; 0,039; 0,078; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 µg/ml). Systém IncuCyte zaznamenával zmeny konfluencie ovplyvnených buniek každé 4 hodiny po dobu 96 hodín. Na základe konfluencie bola programom IncuCyte stanovená miera účinnosti jednotlivých konjugátov, ktorá bola vyjadrená hodnotou EC50. EC50 vyjadruje polovicu maximálnej účinnej koncentrácie a teda dávku, pri ktorej 50% populácie vykazuje odozvu po špecifikovanom trvaní expozície. Pri tejto analýze sú stanovené hodnoty EC50 po 48 hodinovej expozícii buniek cytostatickým konjugátom. U bunkovej línie OE33 vykazoval konjugát klonu 8 hodnotu EC50 3,39 µg/ml, zatiaľ čo konjugát klonu 2 hodnotu EC50 8,94 µg/ml (obr. 23). Na základe anti-c-Met aktivity by sa predpokladalo, že konjugát klonu 2 bude vykazovať väčšiu cytotoxicitu a inhibovať proliferáciu vo väčšej miere ako konjugát klonu 8, avšak pri týchto testoch je zohľadnená aj efektívnosť značenia cytostatikom vcMMAE. Použitie línie H1299 ukázalo, že cytotoxický efekt je zapríčinený antigénom sprostredkovanou dráhou. Nízka hladina receptora c-Met na povrchu buniek H1299 viedla pre nízky efekt k nehodnotiteľným údajom.



Obrázok 23: Závislosť konfluencie buniek OE33 a H1299 na množstve cytostatických ADC klonov 2 a 8 konjugovaných cez -SH skupiny.

Pre ďalšie overenie cytotoxického účinku boli protilátky konjugované s cytostatikom cez –NH skupiny modifikáciou bočných reťazcov lyzínu. Príprava takýchto konjugátov nezahŕňala redukciu disulfidových väzieb, a bola preto k protilátkam šetrnejšia. Protilátky si zachovali svoju funkčnú štruktúru, avšak pri tomto type značenia mohlo dôjsť k modifikácii protilátky v aktívnom mieste pre väzbu antigénu. Naopak výhodou tejto konjugácie je vyššia efektivita značenia a menšia spotreba cytostatika. Po odstránení azidu sodného pomocou ZEBA odsolovacej kolóny bola modifikovaná časť lyzínov mAb pomocou DBCO. Molekula DBCO následne reagovala s azidovou skupinou konjugátu N3-PEG3-vc-PAB-MMAE. Reakcia umožnila vznik heterogénnych konjugátov klonov 2 a 8.

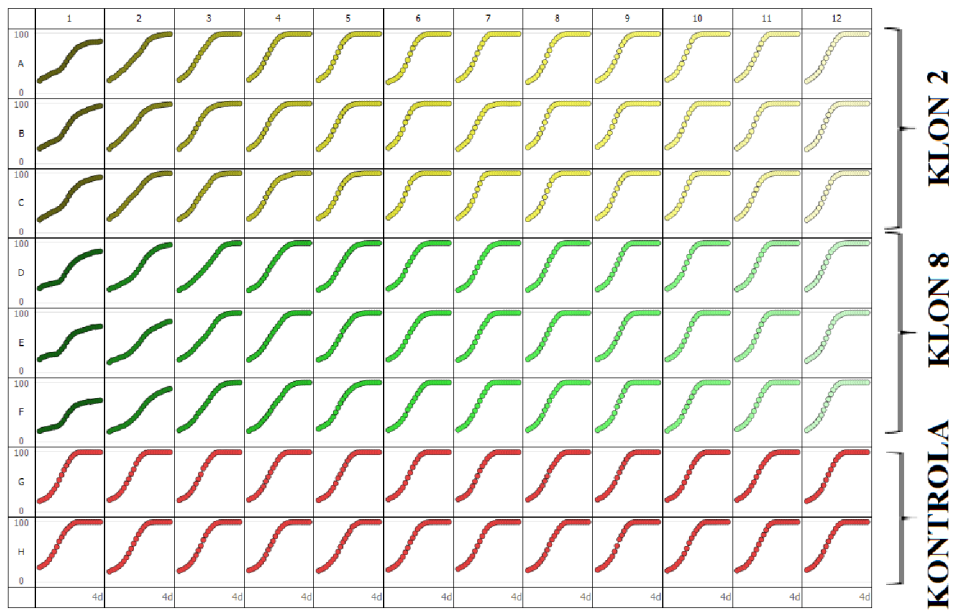
Cytotoxicita získaných konjugátov bola stanovená rovnakým spôsobom ako v prípade thiolových konjugátov. Na bunkách OE33 bola u konjugátu klonu 2 stanovená hodnota EC₅₀ 4,05 µg/ml (obr. 24). U konjugátu klonu 8 bola hodnota EC₅₀ 7,65 µg/ml. V tomto prípade sa potvrdilo, že konjugát s vyššou afinitou k receptoru, má zároveň väčší cytotoxický účinok. Rovnako ako v predchádzajúcom prípade použitie línie H1299 ukázalo, že cytotoxický efekt je zapríčinený antigénom sprostredkovanou dráhou. Nízka hladina receptoru c-Met na povrchu buniek H1299 viedla pre nízky efekt k nepresným údajom.



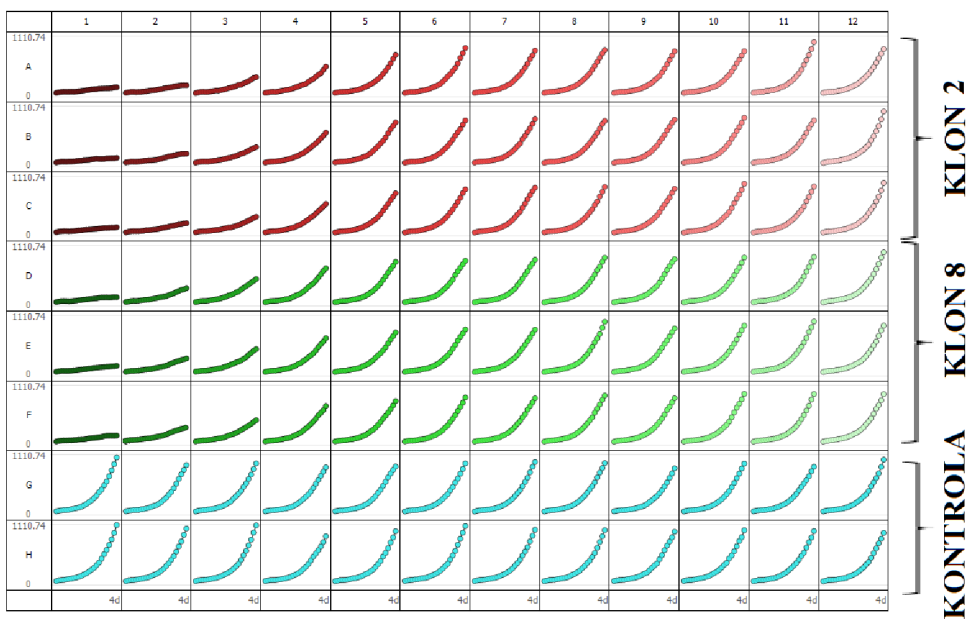
Obrázok 24: Závislosť konfluencie buniek OE33 a H1299 na EC50 ADC klonu 2 a 8 konjugovaných cez -NH skupiny

Obrázok 25 znázorňuje zmenu konfluencie OE33 v prítomnosti cytostatických konjugátov anti-c-Met v čase 96 hodín. Z kriviek je jasne vidieť ako jednotlivé konjugáty inhibujú proliferáciu buniek. Nízke koncentrácie konjugátov nemajú viditeľný vplyv, pričom vysoké koncentrácie konjugátov takmer úplne zastavujú proliferáciu.

Priemerná konfluencia buniek OE33 v čase_-SH konjugáty



Priemerná konfluencia buniek OE33 v čase_-NH konjugáty



Koncentrácia konjugátu

Obrázok 25: Inhibičný účinok ADC klonu 2 a 8 konjugovaných cez -SH a -NH skupiny na proliferáciu buniek OE33

6 DISKUSIA

Prvou časťou práce bola optimalizácia procesu konjugácie protilátky EEV1. Z viacerých možných typov chemickej konjugácie bola vybraná modifikácia cysteínu. Modifikácia cysteínov prostredníctvom čiastočnej redukcie disulfidových väzieb síce poskytuje heterogénnu zmes konjugátov no vo výrazne nižšej miere ako napríklad modifikácia lyzínu. Z toho dôvodu bola za vhodnejšiu metódu zvolená konjugácia cez thiolové skupiny. Štruktúra IgG je stabilizovaná disulfidovými mostíkmi, ktoré môžu byť redukované tris(2-karboxyethyl)fosfínom za vzniku thiolových respektíve sulfhydrylových skupín. Proces redukcie však musel prebehnúť v takej miere, aby nebola ovplyvnená väzbová aktivita a teda nedošlo k rozpadu protilátky na jednotlivé reťazce. Konjugát značený prostredníctvom sulfo-Cy5 maleimide, ktorý spĺňal spomínané požiadavky, bol použitý na detekciu eHsp90 a sledovanie internalizačného procesu komplexu antigén-protilátka. Značená protilátka síce v malej miere prechádzala do buniek no v kompetícii s neznačenými protilátkami nedochádzalo ku zmene intenzity fluorescenčného signálu v bunkách. Išlo pravdepodobne o nešpecifický prechod konjugátu do buniek, ktorý nesúvisel s naviazaním konjugátu na antigén. V nedávnej štúdii Takakura a kol. [104] zistili, že niektoré fluorescenčné farbivá, medzi nimi aj sulfo-Cy5, môžu meniť účinnosť zacielenia a farmakokinetiku takýchto konjugátov. Proteíny konjugované so sulfo-Cy5 potom do buniek vstupujú na základe prítomnosti kladne nabitých lipofilných cyaninových skupín. Samotné fluorescenčné farbivo má potom vplyv na bunkovú absorpciu konjugátu. Sulfo-Cy5 maleimide bol vybraný kvôli dobrým optickým vlastnostiam a relatívne vysokému fluorescenčnému kvantovému výťažku. SO₃ skupina zvyšuje hydrofilnosť molekuly čo umožnilo jednoduchú konjugáciu s protilátkami.

Ako ukázali naše výsledky, protilátka EEV1 sa neviazala na membránový proteín Hsp90 s dostatečnou efektivitou. Dôvodom mohla byť nízka väzbová afinita zvolenej protilátky k natívnemu proteínu eHsp90. Príkladom rozdielnej afinity k odlišným formám toho istého antigénu sú anti-c-Met protilátky, z ktorých každý klon vykazoval rozdielnu afinitu voči c-Met. Väzbe EEV1 protilátky k epitopu mohlo brániť aj konformačné usporiadanie proteínu eHsp90. Ďalším dôvodom mohla byť relatívne nízka expresia eHsp90 na povrchu buniek. Keďže vysoká väzbová špecifita protilátok je základom pre cieľnú terapiu nádorov prostredníctvom ADC, bolo by bezúčelné pokračovať v konjugácii EEV1 s cytostatikom. Naším záverom je, že EEV1 nie je vhodným prostriedkom na cieľné doručenie liečiv prostredníctvom ADC. eHsp90 ale nemožno vylúčiť ako cieľ biologickej liečby. Ako uvádza Stellas a kol. [105] inhibícia eHsp90 monoklonálnou protilátkou 4C5 môže obmedziť motilitu nádoru, inváziu a tvorbu metastáz rakoviny prsníka.

Práca sa ďalej zameriavala na sledovanie rozdielov protilátok pri rozpoznávaní lineárnych a konformačných epitopov. Na tento experiment bolo vybraných päť klonov anti-c-Met protilátok. Povahou väzby polyklonálnych protilátok v sére imunizovaných myší sa zaoberali aj Forsström a kol. [106], ktorý pozorovali vyššie koncentrácie protilátok rozpoznávajúcich lineárne epitopy. Klony anti-c-Met protilátky vykazujúce vysokú afinitu voči natívnemu c-Met mali nízku afinitu voči denaturovanému c-Met. Naopak klony vykazujúce nízku afinitu voči denaturovanému c-Met vykazovali vysokú afinitu voči natívnemu proteínu.

Keďže dva klony anti-c-Met protilátky vykazovali vysokú anti-c-Met aktivitu a vysokú schopnosť internalizácie, tak boli predmetom ďalšieho výskumu. Protilátky prechádzali do buniek špecificky, a tak boli na záver práce konjugované aj s cytostatikom. Konjugácia prebiehala dvomi odlišnými spôsobmi. V prvom prípade išlo o konjugáciu cez thiolové skupiny a v druhom prípade boli modifikované primárne amíny bočných reťazcov lyzínu. Konjugácia cez amino skupiny bola pomerne jednoduchá, pretože molekula IgG obsahuje viac ako 80 ľahko dostupných lyzínových zvyškov, ktoré sa nachádzajú na jej povrchu. Proces nevyžadoval náročnú optimalizáciu množstva použitých reagensí a časov konjugácie. Problémom v celom procese bola iba prítomnosť azidu sodného v uchovávacom roztoku protilátok. Azid sodný bol použitý ako konzervačné činidlo na ochranu voči bakteriálnej a plesňovej infekcii. Z roztoku protilátok sa ho nepodarilo úplne odstrániť a s vysokou pravdepodobnosťou reagoval s DBCO. Azid tak bránil väzbe cytotoxickéj látky. Konjugácia modifikáciou lyzínu je niekoľkonásobne efektívnejšia ako konjugácia cez SH skupiny. V terapeutických ADC sa však nevyužíva, pretože konjugáty majú vysokú heterogenitu. Tá má za následok suboptimálnu farmakokinetiku, stabilitu, účinnosť alebo znášateľnosť. Znamená to, že konjugáty sa medzi sebou môžu výrazne líšiť v počte molekúl cytotoxického liečiva. V práci bola konjugácia cez NH skupiny použitá na sledovanie zvýšeného cytotoxického účinku. Konjugácia cez thiolové skupiny bola pomerne náročná na optimalizáciu celého procesu. Základom bolo stanoviť presnú koncentráciu redukčného činidla, čas redukcie a zvoliť správny reakčný pufo. V prípade, že neboli splnené presné podmienky došlo k fragmentácii protilátok prípadne efektívnosť značenia nebola dostatočná.

Zvýšená efektívnosť značenia cez – NH skupiny sa preukázala pri konjugáte klonu 2, kedy sa hodnota EC50 znížila takmer o polovicu. Vysokú cytotoxicitu vykazoval aj SH konjugát klonu 8. Bolo to pravdepodobne z dôvodu vyššej fragmentácie protilátok, keďže klon 8 bol menej stabilný. Pomerne vysoký cytotoxický účinok mali konjugáty aj na bunky H1299. Inhibícia proliferácie buniek H1299 nebola očakávaná, keďže bunky exprimujú nízke hladiny c-Met. Preto sa domnievame, že inhibícia mohla byť spôsobená prítomnosťou voľnej cytotoxickéj látky. Voľné cytostatikum pravdepodobne nebolo pri purifikácii úplne odstránené. Klon 2 a 8 by mohli po efektívnejšej konjugácii dosiahnuť cytotoxický účinok ako niektoré klinicky testované ADC. C-Met ako cieľ biologickej terapie nádorov vykazuje omnoho sľubnejšie výsledky ako eHsp90.

7 ZÁVER

Pomocou optimalizácie procesu konjugácie cez sulfhydrylové skupiny sa nám podarilo vytvoriť konjugát EEV1-2.1-sulfo-Cy5 maleimide, ktorý bolo možné použiť pri zobrazovacích metódach. Na základe pozorovaní z fluorescenčnej mikroskopie a prietokovej cytometrie sme zistili, že konjugát EEV1 neprechádza do buniek antigénom sprostredkovanou cestou. V prípade využitia EEV1-2.1 v nádorovej liečbe by tak nešlo o cieleňú terapiu. Konjugát EEV1 s cytotoxickou látkou by s vysokou pravdepodobnosťou vykazoval systémovú toxicitu. Na základe štúdií ale nevyklúčujeme eHsp90 ako cieľ biologickej terapie nádorov. Napriek neúspechu bol potenciál EEV1 porovnaný s protilátkami proti c-Met. Anti-c-Met protilátky klonov 2 a 8 vykazovali vysokú afinitu k natívnemu proteínu. U oboch klonov bolo preukázané, že internalizácia je závislá na prítomnosti receptora c-Met. Vďaka pozitívnym výsledkom bolo možné uskutočniť konjugáciu klonov 2 a 8 s cytotoxickou látkou. Testy životaschopnosti buniek preukázali, že oba konjugáty anti-c-Met-vcMMAE inhibovali proliferáciu nádorových buniek. Pre zvýšenie cytotoxického účinku boli protilátky konjugované s cytostatikom cez amino skupiny lyzínu, ktoré sú početnejšie ako sulfhydrylové skupiny. Optimalizácia procesu konjugácie bola jednoduchšia a protilátky si zachovali svoju funkčnú štruktúru. Pri konjugácii cez amino skupiny však hrozilo riziko modifikácie protilátky v aktívnom mieste. Vyššie koncentrácie anti-c-Met-N3-PEG3-vc-PAB-MMAE konjugátov takmer úplne inhibovali proliferáciu nádorových buniek OE33. Výsledky diplomovej práce odhalili potenciál klonov 2 a 8 anti-c-Met protilátky v imunoterapii nádorových ochorení. ADC konjugáty s využitím klonov 2 a 8 by v budúcnosti mohli byť účinným nástrojom na cieleňú liečbu c-Met pozitívnych nádorových ochorení.

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] Cancer. In: *World Health Organisation* [online]. 3 February 2022 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [2] FU, Zhiwen, Shijun LI, Sifei HAN, Chen SHI a Yu ZHANG. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2022, **7**(1) [cit. 2022-04-08]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-022-00947-7
- [3] *FDA Approved Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Up To 2022: Twelve FDA Approved Antibody Drug Conjugates* [online]. In: . 2019/10/30 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://www.biochempeg.com/article/74.html>
- [4] TAHA, Eman A., Kisho ONO a Takanori EGUCHI. Roles of Extracellular HSPs as Biomarkers in Immune Surveillance and Immune Evasion. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(18) [cit. 2022-04-08]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20184588
- [5] MIEKUS, Katarzyna. The Met tyrosine kinase receptor as a therapeutic target and a potential cancer stem cell factor responsible for therapy resistance. *Oncology Reports* [online]. 2017, **37**(2), 647-656 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2016.5297
- [6] KÖHLER, G. a C. MILSTEIN. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* [online]. 1975, **256**(5517), 495-497 [cit. 2021-6-30]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/256495a0
- [7] PASTAN, Ira, Mark C. WILLINGHAM a David J.P. FITZGERALD. Immunotoxins. *Cell* [online]. 1986, **47**(5), 641-648 [cit. 2021-6-30]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(86)90506-4
- [8] PAI, Lee H. Immunotoxin Therapy for Cancer. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* [online]. 1993, **269**(1) [cit. 2021-6-30]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.1993.03500010088038
- [9] WANG, Wei, Satish SINGH, David L. ZENG, Kevin KING a Sandeep NEMA. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2007, **96**(1), 1-26 [cit. 2022-03-04]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.20727
- [10] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 3. inovované vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1999. ISBN 80-902562-1-x.
- [11] TAYLOR, K. Human Molecular Genetics . By T. Strachan and A. P. Read. Oxford: Bios Scientific Publishers. 1996. ISBN 1 872748 69 4. Pp. 596 + Index. £29.95. *Annals of Human Genetics* [online]. 1997, **61**(3), 283-285 [cit. 2021-6-30]. ISSN 00034800. Dostupné z: doi:10.1046/j.1469-1809.1997.61302831.x
- [12] VERMEER, Arnoldus W.P. a Willem NORDE. The Thermal Stability of Immunoglobulin: Unfolding and Aggregation of a Multi-Domain Protein. *Biophysical Journal* [online]. 2000, **78**(1), 394-404 [cit. 2021-6-30]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(00)76602-1
- [13] JONES, R.G.A a J LANDON. A protocol for ‘enhanced pepsin digestion’: a step by step method for obtaining pure antibody fragments in high yield from serum. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2003, **275**(1-2), 239-250 [cit. 2021-6-30]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-1759(03)00005-X
- [14] A OWEN, Judith, Jenni PUNT a Janis KUBY. *Kuby immunology*. The 7th edition. New York: W.H. Freeman, 2013. ISBN 9781429219198.

- [15] RŮČKOVÁ, Eva, Petr MÜLLER a Bořivoj VOJTĚŠEK. Recombinant Antibodies and Their Employment in Cancer Therapy. *Klinická onkologie* [online]. 2015, **28**(Suppl 2), 2S52-2S59 [cit. 2022-04-10]. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20152S52
- [16] *Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies* [online]. March-April, 2010. India: Global research online [cit. 2022-03-04]. ISSN 0976 – 044X.
- [17] KLEE, George G. Human Anti-Mouse Antibodies. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* [online]. 2000, **124**(6), 921-923 [cit. 2021-6-30]. ISSN 1543-2165. Dostupné z: doi:10.5858/2000-124-0921-HAMA
- [18] VAN DIJK, Marc A a Jan G.J VAN DE WINKEL. Human antibodies as next generation therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2001, **5**(4), 368-374 [cit. 2021-6-30]. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/S1367-5931(00)00216-7
- [19] SHOCKLEY, TY R., KE LIN, JANICE A. NAGY, RONALD G. TOMPKINS, HAROLD F. DVORAK a MARTIN L. YARMUSH. Penetration of Tumor Tissue by Antibodies and Other Immunoproteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1991, **618**(1 Temporal Cont), 367-382 [cit. 2021-6-30]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb27257.x
- [20] CERSOSIMO, Robert J. Monoclonal antibodies in the treatment of cancer, Part 2. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 2003, **60**(16), 1631-1641 [cit. 2021-6-30]. ISSN 1079-2082. Dostupné z: doi:10.1093/ajhp/60.16.1631
- [21] Antibody Production. In: *SinoBiological* [online]. [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://www.sinobiological.com/resource/antibody-technical/antibody-production>
- [22] Ascites Antibodies. In: *ProSci* [online]. [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://www.prosci-inc.com/applications-techniques/5-a-of-antibody-development/ascites-antibodies/>
- [23] Denizli, A. "Purification of Antibodies by Affinity Chromatography". Hacettepe Journal of Biology and Chemistry 39 (2011): 1-18
- [24] GAGNON, Pete. Technology trends in antibody purification. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1221**, 57-70 [cit. 2022-03-05]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.10.034
- [25] ZHANG, HUCHENG, WEIFENG LIANG, HAITAO FAN, JUN YANG, GUOWEI YANG, XIAOJIE WANG, LIANG CHEN a TAO LIANG. Immunological characterization and verification of recombinant streptococcal protein G. *Molecular Medicine Reports* [online]. 2015, **12**(4), 6311-6315 [cit. 2022-03-28]. ISSN 1791-2997. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2015.4162
- [26] BOSTRM, Tove, Johan NILVEBRANT a Sophia HOBBER. Purification Systems Based on Bacterial Surface Proteins. AHMAD, Rizwan, ed. *Protein Purification* [online]. InTech, 2012, 2012-01-20 [cit. 2022-03-28]. ISBN 978-953-307-831-1. Dostupné z: doi:10.5772/31078
- [27] HUSE, Klaus, Hans-Joachim BÖHME a Gerhard H SCHOLZ. Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2002, **51**(3), 217-231 [cit. 2022-03-05]. ISSN 0165022X. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-022X(02)00017-9
- [28] CHARMSAZ, Sara, Andrew M. SCOTT a Andrew W. BOYD. Targeted therapies in hematological malignancies using therapeutic monoclonal antibodies against Eph family receptors. *Experimental Hematology* [online]. 2017, **54**, 31-39 [cit. 2022-04-10]. ISSN 0301472X. Dostupné z: doi:10.1016/j.exphem.2017.07.003

- [29] STREBHARDT, Klaus a Axel ULLRICH. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2008, **8**(6), 473-480 [cit. 2022-03-06]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2394
- [30] KHONGORZUL, Puregmaa, Cai Jia LING, Farhan Ullah KHAN, Awais Ullah IHSAN a Juan ZHANG. Antibody–Drug Conjugates: A Comprehensive Review. *Molecular Cancer Research* [online]. 2020, **18**(1), 3-19 [cit. 2021-6-30]. ISSN 1541-7786. Dostupné z: doi:10.1158/1541-7786.MCR-19-0582
- [31] DAMELIN, Marc, Wenyan ZHONG, Jeremy MYERS a Puja SAPRA. Evolving Strategies for Target Selection for Antibody-Drug Conjugates. *Pharmaceutical Research* [online]. 2015, **32**(11), 3494-3507 [cit. 2022-03-06]. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-015-1624-3
- [32] DONAGHY, Heather. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. *MAbs* [online]. 2016, **8**(4), 659-671 [cit. 2022-03-06]. ISSN 1942-0862. Dostupné z: doi:10.1080/19420862.2016.1156829
- [33] STROHL, William R. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein & Cell* [online]. 2018, **9**(1), 86-120 [cit. 2022-03-06]. ISSN 1674-800X. Dostupné z: doi:10.1007/s13238-017-0457-8
- [34] PETERS, Christina a Stuart BROWN. Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Bioscience Reports* [online]. 2015, **35**(4) [cit. 2022-03-06]. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20150089
- [35] DRAGO, Joshua Z., Shanu MODI a Sarat CHANDARLAPATY. Unlocking the potential of antibody–drug conjugates for cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* [online]. 2021, **18**(6), 327-344 [cit. 2022-03-06]. ISSN 1759-4774. Dostupné z: doi:10.1038/s41571-021-00470-8
- [36] JAIN, Nareshkumar, Sean W. SMITH, Sanjeevani GHONE a Bruce TOMCZUK. Current ADC Linker Chemistry. *Pharmaceutical Research* [online]. 2015, **32**(11), 3526-3540 [cit. 2022-03-06]. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-015-1657-7
- [37] DIAMANTIS, Nikolaos a Udai BANERJI. Antibody-drug conjugates—an emerging class of cancer treatment. *British Journal of Cancer* [online]. 2016, **114**(4), 362-367 [cit. 2022-03-07]. ISSN 0007-0920. Dostupné z: doi:10.1038/bjc.2015.435
- [38] GOLDMACHER, Victor S a Yelena V KOVTUN. Antibody–drug conjugates: using monoclonal antibodies for delivery of cytotoxic payloads to cancer cells. *Therapeutic Delivery* [online]. 2011, **2**(3), 397-416 [cit. 2022-03-07]. ISSN 2041-5990. Dostupné z: doi:10.4155/tde.10.98
- [39] DORONINA, Svetlana O, Brian E TOKI, Michael Y TORGOV, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nature Biotechnology* [online]. 2003, **21**(7), 778-784 [cit. 2022-03-07]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt832
- [40] miMA, I, R M Y BARGE, V H J VAN DER VELDEN, B A NIJMEIJER, J J M VAN DONGEN, R WILLEMZE a J H F FALKENBURG. Internalization and cell cycle-dependent killing of leukemic cells by Gemtuzumab Ozogamicin: rationale for efficacy in CD33-negative malignancies with endocytic capacity. *Leukemia* [online]. 2004, **18**(2), 316-325 [cit. 2022-03-16]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/sj.leu.2403205
- [41] KOVTUN, Yelena V. a Victor S. GOLDMACHER. Cell killing by antibody–drug conjugates. *Cancer Letters* [online]. 2007, **255**(2), 232-240 [cit. 2022-03-16]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2007.04.010

- [42] BARROSO-SOUSA, Romualdo a Sara M. TOLANEY. Clinical Development of New Antibody–Drug Conjugates in Breast Cancer: To Infinity and Beyond. *BioDrugs* [online]. 2021, **35**(2), 159-174 [cit. 2022-03-16]. ISSN 1173-8804. Dostupné z: doi:10.1007/s40259-021-00472-z
- [43] CHEN, Robert, Jessie HOU, Edward NEWMAN, et al. CD30 Downregulation, MMAE Resistance, and MDR1 Upregulation Are All Associated with Resistance to Brentuximab Vedotin. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2015, **14**(6), 1376-1384 [cit. 2022-03-16]. ISSN 1535-7163. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0036
- [44] SCHULTZ, Mark L., Luis TECEDOR, Michael CHANG a Beverly L. DAVIDSON. Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends in Neurosciences* [online]. 2011, **34**(8), 401-410 [cit. 2022-03-16]. ISSN 01662236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2011.05.006
- [45] YU, Man, Alberto OCANA a Ian F. TANNOCK. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit?. *Cancer and Metastasis Reviews* [online]. 2013, **32**(1-2), 211-227 [cit. 2022-03-16]. ISSN 0167-7659. Dostupné z: doi:10.1007/s10555-012-9402-8
- [46] RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* [online]. 1962, **18**(12), 571-573 [cit. 2021-6-19]. ISSN 0014-4754. Dostupné z: doi:10.1007/BF02172188
- [47] TISSIÉRES, Alfred, Herschel K. MITCHELL a Ursula M. TRACY. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1974, **84**(3), 389-398 [cit. 2021-6-19]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(74)90447-1
- [48] HOTER, Abdullah, Marwan EL-SABBAN a Hassan NAIM. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(9) [cit. 2021-6-19]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19092560
- [49] *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2001 [cit. 2021-6-19]. ISBN 0470016175.
- [50] LI, Wei, Fred TSEN, Divya SAHU, Ayesha BHATIA, Mei CHEN, Gabriele MULTHOFF a David T. WOODLEY. *Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the Actual Target in Clinical Trials* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 203-235 [cit. 2021-6-19]. International Review of Cell and Molecular Biology. ISBN 9780124076976. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-407697-6.00005-2
- [51] GARRIDO, Carmen, Mathilde BRUNET, Celine DIDELOT, Yael ZERMATI, Elise SCHMITT a Guido KROEMER. Heat Shock Proteins 27 and 70: Anti-Apoptotic Proteins with Tumorigenic Properties. *Cell Cycle* [online]. 2006, **5**(22), 2592-2601 [cit. 2022-02-19]. ISSN 1538-4101. Dostupné z: doi:10.4161/cc.5.22.3448
- [52] JEGO, Gaëtan, Adonis HAZOUMÉ, Renaud SEIGNEURIC a Carmen GARRIDO. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters* [online]. 2013, **332**(2), 275-285 [cit. 2022-02-19]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2010.10.014
- [53] KAMPINGA, Harm H., Jurre HAGEMAN, Michel J. VOS, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* [online]. 2009, **14**(1), 105-111 [cit. 2021-6-19]. ISSN 1355-8145. Dostupné z: doi:10.1007/s12192-008-0068-7
- [54] TERASAWA, K. Constantly Updated Knowledge of Hsp90. *Journal of Biochemistry* [online]. 2005, **137**(4), 443-447 [cit. 2021-6-19]. ISSN 0021-924X. Dostupné z: doi:10.1093/jb/mvi056

- [55] DUTTA, R a M INOUE. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2000, **25**(1), 24-28 [cit. 2021-6-19]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(99)01503-0
- [56] PANARETOU, B. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone *in vivo*. *The EMBO Journal* [online]. **17**(16), 4829-4836 [cit. 2021-6-19]. ISSN 14602075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/17.16.4829
- [57] TSUTSUMI, Shinji, Mehdi MOLLAPOUR, Christian GRAF, et al. Hsp90 charged-linker truncation reverses the functional consequences of weakened hydrophobic contacts in the N domain. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2009, **16**(11), 1141-1147 [cit. 2021-6-19]. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.1682
- [58] SHIAU, Andrew K., Seth F. HARRIS, Daniel R. SOUTHWORTH a David A. AGARD. Structural Analysis of *E. coli* hsp90 Reveals Dramatic Nucleotide-Dependent Conformational Rearrangements. *Cell* [online]. 2006, **127**(2), 329-340 [cit. 2021-6-19]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2006.09.027
- [59] MEYER, Philippe, Chrisostomos PRODROMOU, Bin HU, Cara VAUGHAN, S. Mark ROE, Barry PANARETOU, Peter W. PIPER a Laurence H. PEARL. Structural and Functional Analysis of the Middle Segment of Hsp90: Implications for ATP Hydrolysis and Client Protein and Cochaperone Interactions. *Molecular Cell* [online]. 2003, **11**(3), 647-658 [cit. 2021-6-19]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(03)00065-0
- [60] HUAI, Qing, Huanchen WANG, Yudong LIU, Hwa-Young KIM, David TOFT a Hengming KE. Structures of the N-Terminal and Middle Domains of *E. coli* Hsp90 and Conformation Changes upon ADP Binding. *Structure* [online]. 2005, **13**(4), 579-590 [cit. 2021-6-19]. ISSN 09692126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2004.12.018
- [61] CIGLIA, Emanuele, Janina VERGIN, Sven REIMANN, Sander H. J. SMITS, Lutz SCHMITT, Georg GROTH, Holger GOHLKE a Suzannah RUTHERFORD. Resolving Hot Spots in the C-Terminal Dimerization Domain that Determine the Stability of the Molecular Chaperone Hsp90. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(4) [cit. 2021-6-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0096031
- [62] BIEBL, Maximilian M. a Johannes BUCHNER. Structure, Function, and Regulation of the Hsp90 Machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2019, **11**(9) [cit. 2022-02-19]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a034017
- [63] THOMAS RATAJCZAK, Thomas, Bryan WARD, John WALSH a Carmel CLUNING. Hsp90 as a therapeutic target in endocrinology: current evidence. *Research and Reports in Endocrine Disorders* [online]. [cit. 2021-6-20]. ISSN 2230-2271. Dostupné z: doi:10.2147/RRED.S68546
- [64] ZHANG, Yu, SoHee KWON, Teppei YAMAGUCHI, et al. Mice Lacking Histone Deacetylase 6 Have Hyperacetylated Tubulin but Are Viable and Develop Normally. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2008, **28**(5), 1688-1701 [cit. 2022-02-19]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.01154-06
- [65] MIYATA, Yoshihiko, Hitoshi NAKAMOTO a Len NECKERS. The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2013, **19**(3), 347-365 [cit. 2021-6-20]. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/138161213804143725

- [66] WHITESELL, Luke a Susan L. LINDQUIST. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2005, **5**(10), 761-772 [cit. 2021-6-19]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1716
- [67] GARG, Gaurav, Anuj KHANDELWAL a Brian S.J. BLAGG. Anticancer Inhibitors of Hsp90 Function. *Hsp90 in Cancer: Beyond the Usual Suspects* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 51-88 [cit. 2021-6-20]. Advances in Cancer Research. ISBN 9780128022900. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acr.2015.12.001
- [68] VARTHOLOMAIOU, Evangelia, Pablo C. ECHEVERRÍA a Didier PICARD. Unusual Suspects in the Twilight Zone Between the Hsp90 Interactome and Carcinogenesis. *Hsp90 in Cancer: Beyond the Usual Suspects* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 1-30 [cit. 2021-6-20]. Advances in Cancer Research. ISBN 9780128022900. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acr.2015.08.001
- [69] PICK, Elah, Yuval KLUGER, Jennifer M. GILTANNE, Christopher MOEDER, Robert L. CAMP, David L. RIMM a Harriet M. KLUGER. High HSP90 Expression Is Associated with Decreased Survival in Breast Cancer. *Cancer Research* [online]. 2007, **67**(7), 2932-2937 [cit. 2021-6-20]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4511
- [70] PARK, Sangkyu, Jeong-A PARK, Jae-Hyung JEON a Younghee LEE. Traditional and Novel Mechanisms of Heat Shock Protein 90 (HSP90) Inhibition in Cancer Chemotherapy Including HSP90 Cleavage. *Biomolecules & Therapeutics* [online]. 2019, **27**(5), 423-434 [cit. 2021-6-20]. ISSN 1976-9148. Dostupné z: doi:10.4062/biomolther.2019.051
- [71] CALDERWOOD, Stuart K. Heat shock proteins and cancer: intracellular chaperones or extracellular signalling ligands? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2018, **373**(1738) [cit. 2021-6-20]. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2016.0524
- [72] BASU, Sreyashi, Robert J. BINDER, Ryuichiro SUTO, Kirstin M. ANDERSON a Pramod K. SRIVASTAVA. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *International Immunology* [online]. 2000, **12**(11), 1539-1546 [cit. 2021-6-21]. ISSN 1460-2377. Dostupné z: doi:10.1093/intimm/12.11.1539
- [73] ULLRICH, S. J., E. A. ROBINSON, L. W. LAW, M. WILLINGHAM a E. APPELLA. A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1986, **83**(10), 3121-3125 [cit. 2021-6-21]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.83.10.3121
- [74] THOMAIDOU, D. a E. PATSAVOUDI. Identification of a novel neuron-specific surface antigen in the developing nervous system, by monoclonal antibody 4C5. *Neuroscience* [online]. 1993, **53**(3), 813-827 [cit. 2021-6-21]. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/0306-4522(93)90626-Q
- [75] THÉRY, Clotilde, Muriel BOUSSAC, Philippe VÉRON, Paola RICCIARDI-CASTAGNOLI, Graça RAPOSO, Jérôme GARIN a Sebastian AMIGORENA. Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology* [online]. 2001, **166**(12), 7309-7318 [cit. 2021-6-21]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.166.12.7309
- [76] SHEVTSOV, Maxim, Zsolt BALOGI, William KHACHATRYAN, Huile GAO, László VÍGH a Gabriele MULTHOFF. Membrane-Associated Heat Shock Proteins in Oncology: From Basic Research to

- New Theranostic Targets. *Cells* [online]. 2020, **9**(5) [cit. 2022-03-03]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9051263
- [77] SAVINA, Ariel, Marcelo FURLÁN, Michel VIDAL a Maria I. COLOMBO. Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, **278**(22), 20083-20090 [cit. 2021-6-21]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M301642200
- [78] YANG, Jian, Xiaomin SONG, Yang CHEN, Xin-an LU, Yan FU a Yongzhang LUO. PLC γ 1-PKC γ Signaling-Mediated Hsp90 α Plasma Membrane Translocation Facilitates Tumor Metastasis. *Traffic* [online]. 2014, **15**(8), 861-878 [cit. 2021-6-21]. ISSN 13989219. Dostupné z: doi:10.1111/tra.12179
- [79] WONG, Daniel Senh a Daniel G. JAY. Emerging Roles of Extracellular Hsp90 in Cancer. *Hsp90 in Cancer: Beyond the Usual Suspects* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 141-163 [cit. 2021-6-21]. Advances in Cancer Research. ISBN 9780128022900. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acr.2016.01.001
- [80] SIDERA, Katerina, Martina SAMIOTAKI, Eleni YFANTI, George PANAYOTOU a Evangelia PATSAVOUDI. Involvement of Cell Surface HSP90 in Cell Migration Reveals a Novel Role in the Developing Nervous System. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(44), 45379-45388 [cit. 2021-6-21]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M405486200
- [81] SONG, Xiaomin, Xiaofeng WANG, Wei ZHUO, et al. The Regulatory Mechanism of Extracellular Hsp90 α on Matrix Metalloproteinase-2 Processing and Tumor Angiogenesis*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2010, **285**(51), 40039-40049 [cit. 2021-6-21]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.181941
- [82] LI, Wei, Fred TSEN, Divya SAHU, Ayesha BHATIA, Mei CHEN, Gabriele MULTHOFF a David T. WOODLEY. *Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the Actual Target in Clinical Trials* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 203-235 [cit. 2021-6-21]. International Review of Cell and Molecular Biology. ISBN 9780124076976. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-407697-6.00005-2
- [83] POGGIO, Pietro, Matteo SORGE, Laura SECLÌ a Mara BRANCACCIO. Extracellular HSP90 Machineries Build Tumor Microenvironment and Boost Cancer Progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2021, **9** [cit. 2022-03-03]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.735529
- [84] MOON, Hee-Jung, Joel FINNEY, Li XU, David MOORE, Danny R. WELCH a Minae MURE. MCF-7 Cells Expressing Nuclear Associated Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Exhibit an Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Phenotype and Are Highly Invasive in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2013, **288**(42), 30000-30008 [cit. 2021-6-21]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C113.502310
- [85] BONNANS, Caroline, Jonathan CHOU a Zena WERB. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2014, **15**(12), 786-801 [cit. 2021-6-22]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3904
- [86] MAROUN, Christiane R. a Tracey ROWLANDS. The Met receptor tyrosine kinase: A key player in oncogenesis and drug resistance. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2014, **142**(3), 316-338 [cit. 2022-03-18]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.014

- [87] PAUL, Manash K. a Anup K. MUKHOPADHYAY. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences* [online]. 101-115 [cit. 2022-03-19]. ISSN 1449-1907. Dostupné z: doi:10.7150/ijms.1.101
- [88] SIERRA, J. Rafael a Ming-Sound TSAO. C-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* [online]. 2011, **3**(1_suppl), S21-S35 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1758-8359. Dostupné z: doi:10.1177/1758834011422557
- [89] ZHANG, Yazhuo, Mengfang XIA, Ke JIN, et al. Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Molecular Cancer* [online]. 2018, **17**(1) [cit. 2022-03-18]. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-018-0796-y
- [90] ORGAN, Shawna Leslie a Ming-Sound TSAO. An overview of the c-MET signaling pathway. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* [online]. 2011, **3**(1_suppl), S7-S19 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1758-8359. Dostupné z: doi:10.1177/1758834011422556
- [91] MAULIK, Gautam, Amol SHRIKHANDE, Takashi KIJIMA, Patrick C. MA, Paul T. MORRISON a Ravi SALGIA. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 2002, **13**(1), 41-59 [cit. 2022-03-18]. ISSN 13596101. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6101(01)00029-6
- [92] SAFAIE QAMSARI, Elmira, Sepideh SAFAEI GHADERI, Bahareh ZAREI, Ruhollah DOROSTKAR, Salman BAGHERI, Farhad JADIDI-NIARAGH, Mohammad Hossein SOMI a Mehdi YOUSEFI. The c-Met receptor: Implication for targeted therapies in colorectal cancer. *Tumor Biology* [online]. 2017, **39**(5) [cit. 2022-03-18]. ISSN 1010-4283. Dostupné z: doi:10.1177/1010428317699118
- [93] GRAMANTIERI, Laura, Alessandro GRANITO a Elena GUIDETTI. C-MET receptor tyrosine kinase as a molecular target in advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma* [online]. [cit. 2022-03-18]. ISSN 2253-5969. Dostupné z: doi:10.2147/JHC.S77038
- [94] TJIN, Esther P. M., Richard W. J. GROEN, Irma VOGELZANG, et al. Functional analysis of HGF/MET signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* [online]. 2006, **107**(2), 760-768 [cit. 2022-03-19]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-05-1929
- [95] LAMORTE, Louie, Sonia RODRIGUES, Monica NAUJOKAS a Morag PARK. Crk Synergizes with Epidermal Growth Factor for Epithelial Invasion and Morphogenesis and Is Required for the Met Morphogenic Program. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, **277**(40), 37904-37911 [cit. 2022-03-19]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M201743200
- [96] PESCHARD, Pascal a Morag PARK. Escape from Cbl-mediated downregulation. *Cancer Cell* [online]. 2003, **3**(6), 519-523 [cit. 2022-03-18]. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/S1535-6108(03)00136-3
- [97] DANILKOVITCH-MIAGKOVA, Alla a Berton ZBAR. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2002, **109**(7), 863-867 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI15418
- [98] DE BACCO, Francesca, Paolo LURAGHI, Enzo MEDICO, et al. Induction of MET by Ionizing Radiation and Its Role in Radioresistance and Invasive Growth of Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. 2011, **103**(8), 645-661 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/djr093
- [99] KITAJIMA, Yoshihiko, Takao IDE, Takao OHTSUKA a Kohji MIYAZAKI. Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-

- Met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer. *Cancer Science* [online]. 2008, **99**(7), 1341-1347 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1347-9032. Dostupné z: doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00828.x
- [100] COMOGLIO, Paolo M., Silvia GIORDANO a Livio TRUSOLINO. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2008, **7**(6), 504-516 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd2530
- [101] PRAT, M., T. CREPALDI, S. PENNACCHIETTI, F. BUSSOLINO a P.M. COMOGLIO. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *Journal of Cell Science* [online]. 1998, **111**(2), 237-247 [cit. 2022-03-19]. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.111.2.237
- [102] ZHANG, Chen, Xinyu LING, Yanxiu GUO, et al. Evaluation of COC183B2 antibody targeting ovarian cancer by near-infrared fluorescence imaging. *Chinese Journal of Cancer Research* [online]. 2019, **31**(4), 673-685 [cit. 2022-04-07]. ISSN 1000-9604. Dostupné z: doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2019.04.11
- [103] SZALAI, Paula a Nikolai ENGEDAL. An Image-based Assay for High-throughput Analysis of Cell Proliferation and Cell Death of Adherent Cells. *BIO-PROTOCOL* [online]. 2018, **8**(9) [cit. 2022-04-04]. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.2835
- [104] TAKAKURA, Hideo, Honoka SATO, Kohei NAKAJIMA, Motofumi SUZUKI a Mikako OGAWA. In Vitro and In Vivo Cell Uptake of a Cell-Penetrating Peptide Conjugated with Fluorescent Dyes Having Different Chemical Properties. *Cancers* [online]. 2021, **13**(9) [cit. 2022-05-04]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13092245
- [105] STELLAS, Dimitris, Avraam EL HAMIDIEH a Evangelia PATSAVOUDI. Monoclonal antibody 4C5 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular HSP90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits. *BMC Cell Biology* [online]. 2010, **11**(1) [cit. 2022-05-04]. ISSN 1471-2121. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2121-11-51
- [106] FORSSTRÖM, Björn, Barbara BISŁAWSKA AXNÄS, Johan ROCKBERG, Hanna DANIELSSON, Anna BOHLIN, Mathias UHLEN a Nicholas J MANTIS. Dissecting Antibodies with Regards to Linear and Conformational Epitopes. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(3) [cit. 2022-05-06]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0121673
- [107] PACCHIANA, Giovanni, Cristina CHIRIACO, Maria C. STELLA, et al. Monovalency Unleashes the Full Therapeutic Potential of the DN-30 Anti-Met Antibody. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2010, **285**(46), 36149-36157 [cit. 2022-03-19]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.134031
- [108] *Antibody purification* [online]. [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: https://www.jsr.co.jp/jsr_e/csr/2013/sp3_popup3.shtml
- [109] DAMLE, Nitin K. Antibody-drug conjugates ace the tolerability test. *Nature Biotechnology* [online]. 2008, **26**(8), 884-885 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0808-884
- [110] Monomethyl auristatin E. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 7 February 2022 [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Monomethyl_auristatin_E

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ADC	antibody drug conjugate
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
Akt	protein kinase B
AP2	adaptor complex
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APS	peroxodisíran amónny
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ARRB1	arrestin beta 1
ATP	adenosine triphosphate
CD	cluster of differentiation
CDC	complement-dependent cytotoxicity
Cdc37	Cell Division Cycle 37
c-Met	hepatocyte growth factor receptor
CTD	C-terminal domain
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CV	column volume
DBCO	dibenzocyclooctyne group
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EC50	polovica maximálnej účinnej koncentrácie
ECM	extracellular matrix
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
EGF	epidermal growth factor
eHsp90	extracellular heat shock protein 90
EMT	epithelial-mesenchymal transition
eNos	endothelial nitric oxide synthase
EphA2	ephrin type-A receptor 2
ERK	extracellular signal-regulated kinases
Ets	transkription factor family
FDA	vládna agentúra USA na kontrolu liečiv a potravín
FLT-3	fms like tyrosine kinase 3
Gab1	GRB2-associated-binding protein 1
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2

HAMA	human anti-mouse antibodies
HAT	hypoxanthine-aminopterin thymidin
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HGF	hepatocyte growth factor
HGFR	hepatocyte growth factor receptor
HIF1 α	hypoxia-inducible factor 1-alpha
HMG1	high-mobility group protein 1
Hop	Hsp70/90 organizing protein
HPRGT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HSF1	heat shock factor 1
Hsp	heat shock protein
Ig	imunoglobulín
IL-6	interleukin 6
IRAK	interleukin-1 receptor associated kinase
LOXL2	lysyl oxidase homolog 2
LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1
mAb	monoklonálne protilátky
MAFG	transcription factor
MD	middle domain
MMAE	monomethyl auristatin E
MMAF	monomethyl auristatin F
MMP	matrix metalloproteinase
MMP2	matrix metalloproteinase-2
MSLN	mesothelin
MWCO	molecular weight cut-off
NEK	serine/threonine-protein kinase
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cell
NTD	N-terminal domain
PBS	phosphate buffer saline
PD-1	programed cell death 1
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PLC γ	phosphoinositide-specific phospholipase C
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PSI	plexin-semaphorin-integrin
PTM	posttranslačné modifikácie

RECAMO	regionálne centrum aplikovanej molekulárnej onkológie
Ron	Macrophage-stimulating protein receptor
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium
RTKs	receptor tyrosine kinase
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektororéza s dodecylsírantom sodným
SHC	transforming protein
siRNA	small interfering RNA
Src	proto-oncogene tyrosine-protein kinase
SREBF1	sterol regulatory element-binding transcription factor 1
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCF-4	transcription factor 4
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyléndiamin
TLR4	toll-like receptor 4
TNF	tumor necrosis factor
TPA	tissue plasminogen activator
TRIS-Cl	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vc	valine-citrulline
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor