

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Hana Štefanská

Školitel: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D

**Název diplomové práce:** Online chemické štěpení proteinů pro rychlou analýzu bioléciv a identifikaci bakterií

V roce 2023 Dr. Lenčo se svým týmem publikoval rychlou a nenáročnou metodu kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií pro analýzu proteinů. Metoda spočívala ve štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi. Tato metoda byla úspěšně použita pro rychlou detekci ricinu. Další potenciální využití této metody zahrnuje rychlou charakterizaci proteinových bioléciv a rychlou identifikaci bakterií.

Proteinová bioléciva, která vycházejí z monoklonálních protilátek, jsou vysoce účinná a bezpečná. Tato léčiva se využívají zejména při léčbě závažných onemocnění, jako jsou onkologická onemocnění a autoimunitní poruchy. Zvýšený počet schválených protilátkových léčiv v nedávných letech dokládá jejich významný terapeutický potenciál. Jistou nevýhodou je jejich komplexní struktura a s tím související potřeba důkladné analýzy a monitorování kvality, kde by rychlá online příprava vzorků mohla přinést určité výhody.

V současnosti se v klinické diagnostice bakterií uplatňuje především hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která dokáže změřit specifická spektra i pro příbuzné bakterie. Tato spektra však neposkytují žádné informace o sekvenci. Pokud by hmotnostní spektra obsahovala sekvenční informace, identifikace bakterií by se stala mnohem jistější. Tím by se také odstranila závislost na knihovnách MALDI-TOF spekter.

Tato diplomová práce se zaměřuje na další optimalizaci metody štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi a rozšíření jejího možného uplatnění. Abychom toho dosáhli, využili jsme tuto metodu k analýze pěti bioléciv na bázi monoklonálních protilátek (panitumumabu, bevacizumabu, cetuximabu, trastuzumabu a afliberceptu) a tří bakteriálních kmenů (*B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*).

Během optimalizace metody byla původní suchá lázeň nahrazena vyhřívaným blokem. Ačkoliv tento přechod vedl k nižšímu počtu identifikovaných peptidů, výrazně zvýšil pohodlí a bezpečnost práce. Metoda prokázala určitou použitelnost při analýze protilátkových bioléciv, avšak její účinnost byla výrazně omezena vznikem nežádoucích modifikací peptidů. V oblasti identifikace bakterií představovalo největší výzvu nalezení univerzálního postupu pro efektivní a rychlou přípravu celobuněčného lyzátu. Nejlepší výsledky byly dosaženy při použití lyzačního roztoku sestávajícího ze 100% kyseliny mravenčí.

Vzhledem k tomu, že tvorba nežádoucích modifikací při online štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi značně omezovala možnost efektivní kontroly kvality proteinových bioléciv, byla metoda přeměrována na aplikaci v rychlé a sekvenčně specifické identifikaci bakterií. Výsledky experimentů ukazují, že online štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi může nabídnout zajímavou alternativu k tradiční diagnostice založené na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii.

**Klíčová slova:** proteiny, peptidy, online štěpení, protilátková bioléciva, identifikace bakterií, LC/MS