

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

# Online chemické štěpení proteinů pro rychlou analýzu bioléciv a identifikaci bakterií

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Bc. Hana Štefanská

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové.....

Podpis.....

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Juraji Lenčovi, Ph.D za cenné rady, konzultace, trpělivost, ochotu a pomoc při vypracování této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala panu doktorovi Mgr. Ivo Fabrikovi, Ph.D. a paní doktorce PharmDr. Michaele Hympánové Ph.D. z Fakultní nemocnice v Hradci Králové za přípravu vzorků.

# 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 přeměřována 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

# ABSTRAKT

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Analytical Chemistry**

**Candidate:** Bc. Han Štefanská

**Supervisor:** PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Online chemical cleavage of proteins for rapid analysis of biopharmaceuticals and identification of bacteria

In 2023, Dr. Lenčo and his team published a fast and easy method of liquid chromatography coupled with mass spectrometry for protein analysis. The method consisted of the cleavage of proteins in a subcritical acidified mobile phase. This method demonstrated success in the rapid detection of ricin. Other potential applications of the method may include the rapid characterization of protein biopharmaceuticals and the rapid identification of bacteria.

Protein biotherapeutics based on monoclonal antibodies are highly effective and safe. These drugs are particularly used to treat serious diseases such as oncological and autoimmune disorders. The increased number of approved antibody-based drugs compared to conventional chemical therapies in recent years demonstrates their significant therapeutic potential. A certain disadvantage is their complex structure and the related need for thorough analysis and quality monitoring, where rapid online sample preparation could bring certain advantages.

Currently, the main method in clinical diagnostics of bacteria is MALDI-TOF mass spectrometry, which can record specific spectra even for related bacteria. However, these spectra do not provide any sequence information. If the mass spectra contained sequence information, the identification of bacteria would become much more certain. This would also remove the dependence on libraries of MALDI-TOF spectra.

This thesis focuses on further optimization of the method of protein cleavage in the subcritical acidified mobile phase and the extension of its possible applications. To this end, we have used this method to analyze five monoclonal antibody-based

biotherapeutics (panitumumab, bevacizumab, cetuximab, trastuzumab, and aflibercept) and three bacterial strains (*B. subtilis*, *E. coli*, and *S. aureus*).

During optimizing the method, the original dry bath was replaced by a heated block. Although this transition resulted in a lower number of identified peptides, it greatly improved the convenience and safety of the work. The method demonstrated some applicability in the analysis of antibody-based biologics, but its performance was severely limited by the occurrence of undesirable peptide modifications. In the field of bacterial identification, the greatest challenge was to find a universal procedure for efficient and rapid preparation of whole cell lysate. The best results were obtained using a lysis solution consisting of 100% formic acid.

Since the formation of unwanted modifications during online protein cleavage in the subcritical acidified mobile phase severely limited the possibility of effective quality control of protein biotherapeutics, the method was redirected to applications in rapid and sequence-specific identification of bacteria. Experimental results show that online protein cleavage in subcritical acidified mobile phase may offer an interesting alternative to traditional MALDI-TOF mass spectrometry-based diagnostics.

**Keywords:** proteins, peptides, online cleavage, antibody biomedicines, bacterial identification, LC/MS

# OBSAH

1.	Úvod .....	11
1.1	Proteiny .....	12
1.1.1	Struktura proteinů .....	14
1.1.2	Léčebný a terapeutický potenciál proteinů .....	14
1.2	Analýza proteinů.....	15
1.2.1	Příprava vzorků .....	15
1.2.2	Kapalinová chromatografie .....	16
	Kapalinová chromatografie na reverzních fázích.....	17
	Gradientová eluce .....	19
	Detektory v kapalinové chromatografii .....	20
1.2.3	Hmotnostní spektrometrie .....	20
	Kvadrupól .....	21
	Orbitální elektrostatická past.....	22
	Tandemový analyzátor kvadrupól-orbitrap (Q-Orbitrap) .....	23
	Typy získávání MS dat v analýze proteinů.....	23
1.2.4	Bioinformatický software .....	24
1.3	Protilátky.....	25
1.3.1	Struktura protilátek .....	26
1.3.2	Monoklonální protilátky .....	27
	Panitumumab.....	29
	Bevacizumab .....	30
	Cetuximab .....	30
	Trastuzumab.....	30
	Aflibercept.....	31
1.4	Bakterie.....	32
1.4.1	<i>Bacillus subtilis</i> .....	32
1.4.2	<i>Escherichia coli</i> .....	32
1.4.3	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
2.	Cíle práce .....	34
3.	Experimentální část .....	35
3.1	Materiál .....	35



3.1.1	Chemikálie .....	35
3.1.2	Protilátková bioléčiva .....	35
3.1.3	Bakterie.....	36
3.1.4	Chromatografické kolony .....	36
3.1.5	Přístroje a zařízení .....	36
3.1.6	Mobilní fáze .....	37
3.2	Příprava redukovaných protilátkových bioléčiv .....	37
3.3	Příprava bakterií .....	38
3.4	Parametry HPLC/MS analýz .....	38
3.4.1	Analýzy redukovaných monoklonálních bioléčiv.....	38
3.4.2	Online štěpení redukovaných monoklonálních bioléčiv.....	39
3.4.3	Analýza proteinů <i>B. subtilis</i> štěpeného pomocí trypsinu .....	40
3.4.4	Analýza připravených sad bakterií.....	41
3.5	Softwarová analýza LC/MS dat .....	41
3.5.1	Analýza monoklonálních bioléčiv .....	41
3.5.2	Analýza bakterií .....	42
4.	Výsledky a diskuze.....	43
4.1	Optimalizace online štěpení .....	43
4.1.1	Ověření redukce monoklonálních bioléčiv .....	43
4.1.2	Štěpení monoklonálních bioléčiv v subkritické okyselené mobilní fázi.....	44
4.2	Využití online štěpení v analýze monoklonálních bioléčiv .....	45
4.3	Analýza online štěpení proteinů bakterií.....	46
4.3.1	První sada vzorků bakterií (IF229) .....	46
4.3.2	Druhá sada vzorků bakterií (IF246).....	47
4.3.3	Třetí sada vzorků bakterií (IF257) .....	49
4.3.4	Čtvrtá sada vzorků bakterií (IF261).....	51
4.3.5	Pátá sada vzorků bakterií (IF268) .....	52
4.3.6	Šestá sada vzorků bakterií (IF280).....	54
4.3.7	Sedmá sada vzorků bakterií (IF287).....	55
4.4	Využití online štěpení pro rychlou identifikaci bakterií.....	57
5.	Závěr.....	58
6.	Seznam zkratk.....	60

7. Seznam obrázků .....	61
8. Seznam tabulek .....	62
9. Seznam příloh.....	63
10. Přílohy.....	64
11. Použitá literatura.....	71

## 1. Úvod

V posledních letech zaznamenala kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií významný pokrok, zejména v oblasti analýzy proteinů. Tato instrumentace dnes dokáže identifikovat tisíce vzorků z několika desítek ng materiálu a takových analýz je schopná provádět vyšší desítky během 24 hodin. S rychlostí těchto analýz již nedokáže držet krok příprava vzorků.

Nová metoda, kterou v roce 2023 publikoval tým vedený Dr. Lenčem se zaměřuje na online štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi. Tato technika umožňuje rychlou detekci toxinů, jako je ricin, a nabízí potenciál pro aplikaci v oblasti bioléciv a identifikace bakterií, jakožto i dalších oblastí analýzy proteinů.

Bioléciva založená na monoklonálních protilátkách se v medicíně stávají stále důležitějšími díky jejich účinnosti a bezpečnosti při léčbě závažných onemocnění. Jejich analýza však vyžaduje důkladné monitorování kvality kvůli jejich komplexní molekule. Tradiční metody identifikace bakterií, jako MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, sice poskytují rychlé výsledky, ale nenabízejí sekvenčně specifické informace, které by zlepšily přesnost diagnostiky, jako je tomu například při použití PCR.

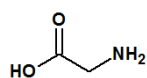
Tato práce se zaměřuje na další optimalizaci a rozšíření metody vyvinuté Dr. Lenčem, se zaměřením na možnost analyzovat vybraná bioléciva a identifikovat bakteriální patogeny.

## 1.1 Proteiny

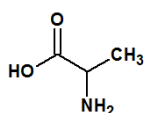
Proteiny patří spolu s nukleovými kyselinami, lipidy a polysacharidy mezi čtyři hlavní biomolekuly. Všechny tyto rozsáhlé skupiny jsou označovány jako makromolekuly, což jsou komplexní sloučeniny na bázi uhlíku. Využívají slabé, reverzibilní interakce k jejich sestavování a interakci s cílovými strukturami. To dává molekulám a jejich komplexům rozmanité tvary a dynamiku [1].

Proteiny jsou polymery. Typicky se skládají ze stovek aminokyselin, které jsou propojeny peptidovými vazbami. Každá aminokyselina má svou charakteristickou strukturu s centrálním  $\alpha$ -uhlíkovým atomem ( $C\alpha$ ), který je propojený s aminoskupinou ( $-NH_2$ ) a karboxylovou skupinou ( $-COOH$ ). Obě skupiny slouží k vytváření peptidových vazeb [1][2].

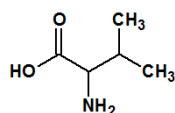
Navzdory tomu, že v přírodě, zvláště v rostlinách, existuje více než 100 různých aminokyselin, většina proteinů obsahuje pouze 20 variant. Jednotlivé struktury těchto dvaceti nejběžnějších aminokyselin jsou znázorněny na obrázku 1. Dělí se na neutrální hydrofilní (např. serin), neutrální hydrofóbní (např. leucin), kyselé (např. kyselina asparagová) anebo zásadité (např. histidin). Je to právě boční řetězec, který je zodpovědný za vytváření nechtěných artefaktů během jejich analýzy za neoptimálních podmínek [2][3][4].



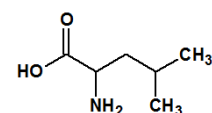
glycín



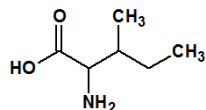
alanín



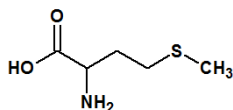
valín



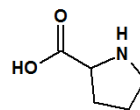
leucín



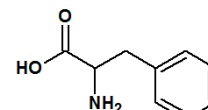
izoleucín



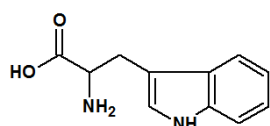
metionín



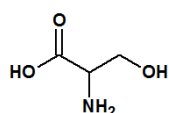
prolín



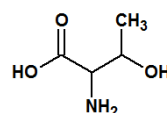
fenylalanín



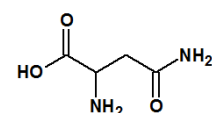
tryptofán



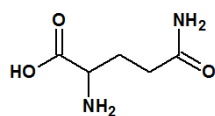
serín



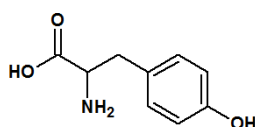
treonín



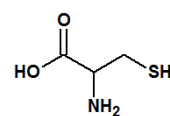
asparagín



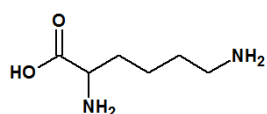
glutamín



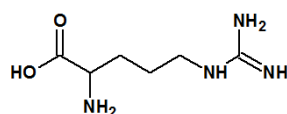
tyrozín



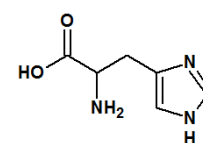
cystein



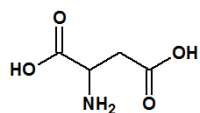
lyzín



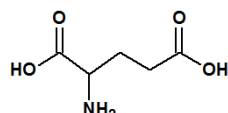
arginín



histidín



kys. asparágová



kys. glutámová

**Obrázek 1 – Vzorce základních aminokyselin**  
(převzato z <https://biopedia.sk/biomolekuly/aminokyseliny>)

### 1.1.1 Struktura proteinů

Struktura proteinů je organizována do čtyř hlavních úrovní. Tato diplomová práce se zaměřila pouze na analýzu primární strukturu proteinů. Primární struktura proteinu představuje pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Neposkytuje informace o konformaci peptidového řetězce v prostoru, ačkoliv ji výrazně předurčuje. Tato struktura tedy podmiňuje vlastnosti proteinů a jejich biologickou funkci [1].

Peptidový řetězec začíná volnou aminoskupinou, která určuje N-konec proteinu, zatímco na opačném konci řetězce je volná karboxylová skupina, která definuje C-konec. Jako součást primární struktury se považuje také umístění disulfidových vazeb, které kovalentně spojují různé části polypeptidového řetězce dohromady. Tyto vazby vznikají mezi dvěma cysteinovými zbytky prostřednictvím jejich thiolových skupin postranních řetězců (-SH) a významně stabilizují strukturu proteinů [1][3][5].

### 1.1.2 Léčebný a terapeutický potenciál proteinů

Terapeutický potenciál protilátek byl poprvé identifikován na konci 19. století během výzkumu zaměřeného na léčbu záškrtu pomocí sérové terapie. Proteinová terapeutika jsou v klinické praxi vysoce účinná a nacházejí široké uplatnění. Proteiny mají klíčovou roli v různých biologických procesech v lidském těle, proto jsou využívány k léčbě řady onemocnění, jako jsou genetické poruchy, autoimunitní choroby, záněty a malignity. Mezi hlavní výhody těchto terapeutik patří vysoká specifita, nízká toxicita a dobrá rozpustnost. Nicméně jejich klinické využití provázejí i určité výzvy, jako je krátký biologický poločas, riziko imunogenicity a omezená permeabilita, což může snižovat jejich účinnost. Modifikace struktury proteinových terapeutik, například zvětšením jejich molekulové velikosti, může zlepšit stabilitu a prodloužit jejich poločas v plazmě [6][7].

Moderní terapeutické proteiny zahrnují především monoklonální protilátky, vakcíny, některé rekombinantní proteiny a interferony. Zvláštní kategorii tvoří enzymy. Většina dostupných terapeutických proteinů na trhu je rekombinantního původu. V průběhu posledních čtyř desetiletí schválila FDA více než 200 terapeutických proteinů pro klinické použití. V posledních dvou dekadách se jedná především o léčiva na bázi monoklonálních protilátek [6][7].

Proteiny jsou využívány také k diagnostice. Existuje celá řada markerů proteinové povahy, které se dnes rutinně klinicky stanovují. Mezi diagnostické markery patří také některé proteiny bakterií, které umožňují upřesnit původce infekčních onemocnění. Tuto úlohu však dnes převzaly jiné metody, především PCR a biotypizace bakterií pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (viz dále) [6][7].

## 1.2 Analýza proteinů

Mezi nejpoužívanější metody ke zkoumání a analýze proteinů a peptidů dnes patří kapalinová chromatografie nejčastěji v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Pomocí těchto metod lze proteiny analyzovat na různých úrovních – od původní intaktní molekuly až po úroveň jednotlivých aminokyselin vzniklých totální hydrolyzou proteinů. Velice často se používá analýza na úrovni peptidů, které z proteinů vznikají chemickým nebo enzymatickým štěpením. Nejčastěji se používají sekvenčně specifické způsoby štěpení. Tento typ analýz se označuje jako mapování peptidů [8].

Pro mapování peptidů a identifikaci proteinů je vhodné využívat chromatografii na reverzní fázi, která zajišťuje účinnou separaci s relativně vysokým rozlišením. Tento chromatografický mód se rovněž využívá běžně k rutinní analýze monoklonálních protilátek (mAbs) a jejich řetězců a podjednotek (např. Fab a Fc) [8].

### 1.2.1 Příprava vzorků

Vzhledem k vysoké složitosti proteomu neexistuje univerzální metoda pro přípravu proteinových vzorků k analýze pomocí hmotnostní spektrometrie. Použité protokoly se liší v závislosti na typu vzorku, experimentálním záměru a aplikované analytické technice. Při návrhu strategií pro přípravu vzorků je nutné zohlednit řadu faktorů, včetně zdroje vzorku, typu proteinu, jeho fyzikálně-chemických vlastností (rozpuštěnost, izoelektrický bod, molekulová hmotnost), množství, složitosti a buněčného umístění [9].

Příprava proteinů pro separaci zahrnuje několik zásadních kroků, které jsou klíčové pro optimalizaci následné analýzy. Tento proces zahrnuje izolaci proteinů ze vzorku, jejich denaturaci, odstranění nežádoucích kontaminantů a často také redukci a alkylování disulfidových můstků. Volba vhodné metody přípravy vzorků je přizpůsobena specifické separační technice, jako je gelová elektroforéza či chromatografie [9].

Buněčná lýza je prvním krokem při přípravě proteinů k analýze. Pro efektivní extrakci buněčných proteinů je často nutné využít jak fyzikální metody, tak metody založené na použití chemických činidel, což závisí na typu buněk a složení jejich membrán či buněčných stěn. Fyzikální metody, jako je ultrazvuk, vyžadují specializovaná zařízení a mohou vykazovat variabilitu mezi různými přístroji, což komplikuje jejich reprodukovatelnost. Naopak metody založené na působení chemických činidel, využívající detergenty, nejenže efektivně lyzují buňky, ale také solubilizují membránové proteiny. Optimalizace buněčné lýzy zahrnuje použití vhodných pufrů, detergentů, solí a redukčních činidel, aby byly zajištěny co nejlepší výtěžky pro daný typ buněk či proteinovou frakci [9][10].

Pro ochranu proteinů před degradací během izolace je klíčové použití proteázových inhibitorů. Následně dochází k denaturaci proteinů, aby byly rozloženy do svých lineárních forem, což zajišťuje konzistentní a efektivní separaci. Tento krok obvykle zahrnuje použití denaturačních činidel, jako je SDS (dodecyl síran sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate) nebo močovina. Pro odstranění nežádoucích kontaminantů, jako jsou lipidy, nukleové kyseliny či soli, se běžně používají metody, jako je precipitace proteinů pomocí organických rozpouštědel (např. aceton). Pro optimalizaci separace proteinů se často provádí redukce disulfidových můstků pomocí činidel, jako je dithiothreitol (DTT) nebo  $\beta$ -merkaptoethanol, následovaná alkylací cysteinových zbytků například jodacetamidem, aby se zabránilo jejich opětovnému spojení [9][10].

### 1.2.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC, z angl. liquid chromatography) je separační metoda, která probíhá mezi pevnou a kapalnou fází. Vzorek je rozdělen na analyty díky interakcím mezi mobilní fází (proudící kapalina) a pevnou stacionární fází (sorbenty uložené uvnitř kolony). Tento proces rozdělení může probíhat prostřednictvím rozdělování, adsorpce nebo jiných typů nekovalentních interakcí. Nejčastějším příkladem mobilní fáze může být organické rozpouštědlo (např. hexan) a stacionární fáze mohou být porézní částice ze silikagelu ( $\text{SiO}_2$ ) [8].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. high performance liquid chromatography) je moderní verze kapalinové chromatografie, která využívá kolony

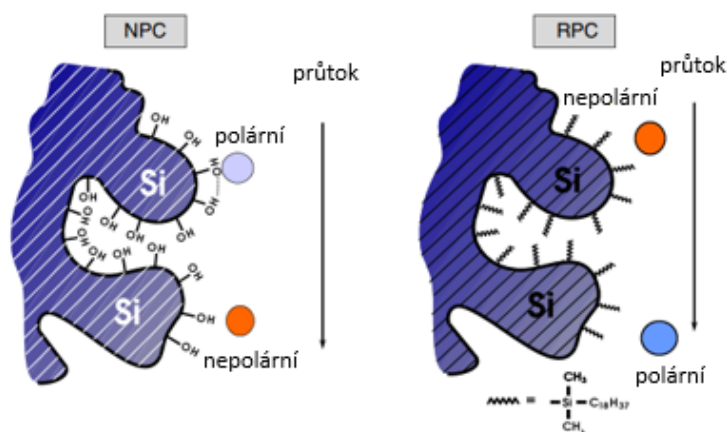


s malými částicemi a mobilní fází čerpá pod vysokým tlakem. Jedná se o univerzální analytickou metodu používanou k separaci různých látek, včetně léčiv, biomolekul a polymerů. Tato technika je široce rozšířená a nachází využití v mnoha oblastech vědy a průmyslu [8].

Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC, z angl. ultra-high performance liquid chromatography) je velmi podobná HPLC. UHPLC se používá zejména pro identifikaci, kvantifikaci a separaci složek směsi. Na rozdíl od HPLC, která používá kolony s částicemi velikosti 3 až 5  $\mu\text{m}$ , UHPLC využívá částice menší než 2  $\mu\text{m}$ , což umožňuje lepší separaci složek. Tyto menší částice však vyžadují vyšší tlaky čerpadla k dosažení optimálních výsledků. Kombinace UHPLC s hmotnostní spektrometrií (MS) poskytuje výrazné výhody v oblasti selektivity, citlivosti a vysoké propustnosti při analýze složitých vzorků. Za neoptimálních podmínek však UHPLC neposkytuje výsledky výrazně lepší než HPLC za optimálních podmínek [11].

### **Kapalinová chromatografie na reverzních fázích**

U kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RPLC) probíhá separace na základě preferencí analytů mezi polární mobilní fází a nepolární, tedy hydrofóbní stacionární fází. Typickou stacionární fází jsou silikagelové částice z oxidu křemičitého kovalentně pokryté hydrofobními alifatickými řetězci, jako je  $\text{C}_{18}$ . Analyty s vyšší polaritou jsou eluovány jako první, zatímco analyty s nižší polaritou jsou eluovány později. Zpoždění je způsobeno jejich silnější interakcí s hydrofobními skupinami  $\text{C}_{18}$ , které virtuálně vytváří jakousi kapalnou vrstvu kolem pevného nosiče oxidu křemičitého. Toto pořadí eluce je opačné než u chromatografie na normálních fázích (NPLC), a proto se využívá termín chromatografie na reverzních fázích. Na obrázku 9 je zjednodušené schéma chromatografie na normálních a reverzních fázích [8][12].



**Obrázek 9 – Normální a reverzní fáze chromatografie (převzato z *HPLC and UHPLC for practicing scientists. Second edition, ISBN 978-111-9313-762.*)**

Chromatografie na normálních a reverzních fázích spolu souvisí, ale jsou založeny na odlišných fyzikálních principech. V chromatografii na normálních fázích dochází k retenci látek díky jejich adsorpci na povrchu stacionární fáze, zatímco v chromatografii na reverzních fázích je retence nejčastěji způsobena rozdělením rozpuštěných látek do kapalné stacionární fáze, která obklopuje povrch nosných částí. Nicméně míra retence rozpuštěné látky v RPLC i NPLC je určena vzájemnými nekovalentními interakcemi mezi rozpuštěnou látkou a mobilní fází ve srovnání s interakcemi se stacionární fází [12].

Jako mobilní fáze se v RPLC obvykle využívá směs methanolu nebo acetonitrilu s vodou. Hlavní mechanismus separace a retence rozpuštěné látky je založen na hydrofobních interakcích mezi molekulami analytu a stacionární fází. RPLC je velmi rozšířenou a preferovanou metodou kapalinové chromatografie. Lze ji využít pro analýzu širokého spektra látek, zahrnující polární, středně polární a některé nepolární analyty. Uplatňuje se v různých oblastech vědy a technologie. Je využívána například k analýze potravin a ve farmaceutickém průmyslu. Používá se ke zpracování surovin a léčiv, měření fyzikálně-chemických vlastností léčivých látek a k separaci peptidů, proteinů a nukleových kyselin [8][13].

Pro analýzu proteinů a peptidů jsou běžně využívány metody reverzní fázové chromatografie s použitím kolon C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>, ale nejčastěji C<sub>18</sub>. Jsou separovány na základě jejich interakce s hydrofobními ligandy ve stacionární fází. Mobilní fáze se obvykle skládá

z vody a acetonitrilu, doplněná o kys. trifluoroctovou (TFA) nebo kys. mravenčí jako aditiva pro zlepšení separace. Aby se minimalizoval přenos mezi analýzami, často se pracuje při vyšších teplotách kolon, v extrémech dosahujících až 110 °C. Pro separaci menších proteinů a peptidů je nutné najít kompromis mezi účinnou chromatografií a stabilitou analytů. Dále je také podstatná velikost póru nosného materiálu. Pro velké proteiny, jako jsou protilátky, se často používají materiály s póry o velikosti 300-1000 Å, zatímco pro separaci peptidů jsou vhodnější materiály s menšími póry, například 120 Å [8][13].

Kromě běžných kyselých mobilních fází se pro separaci menších proteinů a peptidů využívají také alkalické pufrы. Jejich vysoké pH poskytuje jedinečnou selektivitu, což se často využívá pro frakcionaci komplexních peptidových směsí před RPLC v kyselém pH [13].

## Gradientová eluce

Gradientová eluce se používá v případě, že vzorky obsahující analyty s různou polaritou, jejichž eluce vyžaduje úzké rozmezí složení mobilní fáze, a rozsah jejich retence překračuje optimální parametry pro isokratickou separaci. Během gradientové eluce se na rozdíl od isokratické eluce v čase postupně zvyšuje podíl komponenty mobilní fáze s vyšší eluční silou, jako je metanol nebo acetonitril. V analýze proteinů a peptidů se kapalinová chromatografie používá výhradně s gradientovou elucí, protože vzorky obsahují velké množství analytů s rozdílnou polaritou (např. směsi peptidů pro peptidové mapování) nebo obsahují analyty s velmi úzkým oknem složení mobilní fáze pro jejich účinnou eluci (např. intaktní nebo na řetězce redukováná protilátková léčiva) [8].

Gradientová eluce má několik výhod, ale zároveň má své nevýhody. Jak již bylo zmíněno, tato metoda je ideální pro vzorky, které obsahují analyty s různou polaritou. Kromě toho je vhodná také pro kvantifikaci více analytů v jednom vzorku. Zlepšuje rozlišení mezi časnými a pozdními elučními píky a udržuje konzistentní šířku píku po celou dobu analýzy. Tím poskytuje lepší citlivost pro pozdně elující analyty a zvyšuje kapacitu píků, což umožňuje lepší detekci analytů. Mezi nevýhody patří potřeba složitějšího HPLC přístroje s binárním čerpadlem. Pro míchání komponent mobilní fáze jsou nejčastěji

využívány vysokotlaké systémy. Nízkotlaké systémy se používají, pokud je nutné mísit více než dvě komponenty mobilní fáze. Vývoj gradientových metod je náročnější a vyžaduje více času. Přenos gradientních metod mezi laboratořemi může být problematický. Kromě toho je do času analýzy potřeba započítat čas nutný pro ekvilibraci kolony. Při vývoji gradientové metody je nutné optimalizovat několik parametrů, jako jsou počáteční a konečné složení mobilní fáze, doba trvání gradientu, průtok apod [8].

## Detektory v kapalinové chromatografii

Detektor v kapalinové chromatografii převádí určité fyzikálně-chemické vlastnosti analytu na měřitelný signál. Některé detektory jsou univerzální a dokážou detekovat širokou škálu analytů, zatímco jiné jsou specifické a zaměřují se pouze na určité třídy látek. Nejčastěji využívaný je UV detektor, který zaznamenává absorpenci látek procházející průtokovou detekční celou v UV oblasti záření. Pokud je potřeba separované látky také identifikovat, je potřeba použít složitější detektory, které zaznamenávají jednoznačné charakteristiky látek. V analýze proteinů a peptidů se k tomuto účelu nejčastěji využívají hmotnostní spektrometry, které lze při takovém použití označit jako hmotnostní detektor [8].

### 1.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr je přístroj, který dokáže rozlišit ionty v plynné fázi na základě jejich poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Aby se tato kombinace stala funkčním hmotnostním spektrometrem vhodným pro analytické účely, je nezbytné propojit ji s vhodným zdrojem iontů. Existuje několik typů hmotnostních spektrometrů, které se liší ve způsobu ionizace, analyzátoru iontů a detektoru. Nejčastějším způsobem ionizace je dnes ionizace elektrosprejem. V analýze proteinů se lze často setkat také s ionizací laserem zprostředkovanou matricí (MALDI, z angl. matrix assisted laser desorption-ionization) [8][12].

Mezi běžné typy analyzátorů patří jednoduchý kvadrupól (Q), iontová past (IT, z angl. ion trap), trojitý kvadrupól (QqQ), analyzátor času letu (TOF, z angl. time of flight), orbitální elektrostatická past (známá jako orbitrap) a iontová cyklotronová rezonance

s Fourierovou transformací (FT-ICR). Většina systémů Q nebo IT obvykle dosahuje jednotkového rozlišení a pokrývá hmotnostní rozsah do 3000. Naopak systémy FTI-ICR, TOF a orbitrap jsou schopny dosáhnout vyššího hmotnostního rozsahu a mnohem vyššího rozlišení, které standardně překračuje hodnotu 10 000, ale v extrémech může dosáhnout i 1 000 000 [12].

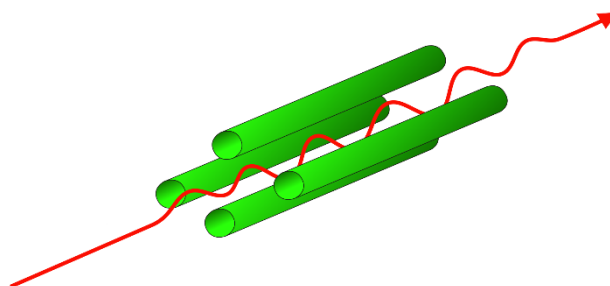
Rozdělení iontů může být dosaženo buď v časové nebo prostorové dimenzi. Některé typy hmotnostních analyzátorů umožňují současnou detekci všech iontů, jako například FT-ICR. Další typy hmotnostních analyzátorů, jako je například kvadrupólový hmotnostní analyzátor, fungují jako hmotnostní filtry. Signál tedy mohou v daném okamžiku produkovat pouze ionty s určitým poměrem  $m/z$ . Hmotnostní analyzátor typu TOF vyžaduje, aby všechny ionty byly urychleny na stejnou kinetickou energii současně před jejich oddělením v letové trubici [14].

Hmotností spektrometry jsou v současné době nejčastěji preferovanými detektory v kapalinové chromatografii proteinů a peptidů. MS detekce se stala běžným detekčním systémem také pro bioanalytické postupy, jako je analýza farmaceutických sloučenin v biologických systémech. V porovnání s běžnými detektory HPLC, MS detekce poskytuje vyšší citlivost, specifickou a definitivní informace o hmotnosti a u složitějších přístrojů také strukturu analytů [8].

## **Kvadrupól**

Kvadrupól je analyzátor, který využívá stabilní trajektorie iontů k separaci podle jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř tyčových elektrod, které mají hyperbolický nebo válcovitý tvar. Tyto elektrody jsou nejčastěji uspořádány do čtverce rovnoběžně a ve stejných vzdálenostech kolem centrální osy. Iontový svazek je směřován dolů podél osy pole, přičemž na diagonálně protilehlé tyče je aplikován elektrický potenciál s konstantní radiofrekvenční složkou. Na ion působí přitažlivá síla jedné z tyčí, jejíž náboj je opačný než náboj iontu. Na tyčových elektrodách je udržováno konstantní napětí [12][16].

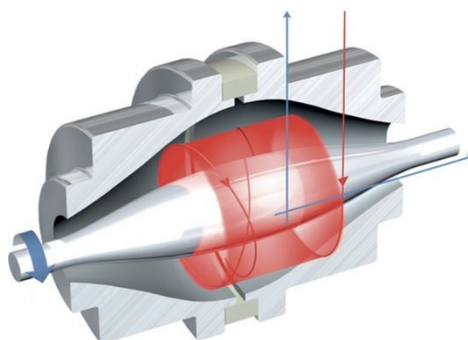
Kvadrupólové přístroje dosahují rozsahu  $m/z$  až 2000. Především v provedení QqQ jsou běžně používány v LC/MS analýzách jako rutinní nástroje pro svoji robustnost a citlivost [16].



Obrázek 2 – Kvadrupól  
(převzato z [https://en.wikipedia.org/wiki/Quadrupole\\_mass\\_analyzer](https://en.wikipedia.org/wiki/Quadrupole_mass_analyzer))

### Orbitální elektrostatická past

Orbitální elektrostatická past, i když se řadí mezi iontové pasti, se od ostatních liší tím, že v ní nedochází k radiofrekvenční excitaci, která by iniciovala pohyb iontů v pasti. V orbitrapu jsou ionty zachycovány pomocí elektrostatické přitažlivosti centrální elektrody ve tvaru vřetena, když vstupují do záchytného pole pod tangenciálním úhlem. Tato elektrostatická přitažlivost k centrální elektrodě je vyvážena odstředivou silou, která vzniká z počáteční rychlosti iontů. Optimálního vstřikování iontů s ohledem na jejich kinetickou energii, prostorovou fokusaci a synchronizaci se dosahuje pomocí radiálního výstupu iontových svazků z jednoduché iontové pasti ve tvaru písmene C. Pohyb iontů v orbitrapu je výsledkem kombinace cirkulace kolem centrální elektrody a oscilace podél její osy. Tato oscilace vzniká díky gradientu elektrického pole podél osy vřetena. Tento pohyb iontů je detekován v čase pomocí proudu měřeného dvěma vnějšími elektrodami. Frekvence zaznamenaného signálu je následně zpracována pomocí Fourierovy transformace a výsledné spektrum je použito k určení  $m/z$  poměru a zastoupení iontů v orbitrapu. Analyzátor Orbitrap™, uvedený na trh společností Thermo Fisher Scientific v roce 2005, nabízí vysoké rozlišení a přesné měření hmotnosti [16].



**Obrázek 3 – Orbitrap**

(převzato z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3134075/>)

### **Tandemový analyzátor kvadrupól-orbitrap (Q-Orbitrap)**

Orbitrap má nesporné výhody. Jeho omezením ale je, že nedokáže izolovat prekurzory k fragmentaci. Za tímto účelem se nejčastěji kombinuje s kvadrupólem do hybridního tandemového spektrometru. Q-Orbitrap umožňuje nastavení hmotnostního rozlišení pomocí vstříkání prekurzorových/produktových iontů do hmotnostního analyzátoru orbitrap pomocí C-pasti. Toto poskytuje potenciální výhodu vylepšení citlivosti analýzy. V Q-Orbitrapu jsou ionty nejprve akumulovány anebo fragmentovány v pólu směřování iontů a poté přeneseny do C-pasti [16][17].

Analyzátor orbitrap se stal jedním z klíčových analyzátorů v proteomice založené na hmotnostní spektrometrii. Použití spojení kvadrupól-orbitrap z řady Exactive™ v proteomických aplikacích přineslo výrazné zlepšení výkonu. Hybridní kvadrupólový orbitrap Q Exactive HF-X obsahuje nový algoritmus pro výběr píků, zdokonalený iontový zdroj a optimalizovaný přenos iontů. Tato vylepšení vedla k významnému zrychlení identifikace peptidů a proteinů, a to až o 50 % při použití krátkých LC/MS gradientů. Takto lze identifikovat více než 1000 unikátních peptidů za minutu [18].

Během dlouhodobého provozu může dojít ke vstupu kontaminantů do analyzátoru, což může způsobit místní nabíjení a snížení citlivosti MS/MS. Tím může být ovlivněn výkon přístroje. Proto je nezbytné provádět pravidelně čištění a preventivní údržbu, aby byla zachována jeho vysoká účinnost [18].

### **Typy získávání MS dat v analýze proteinů**

U necílených analýz proteinů, v kterých je cílem identifikovat a případně i kvantifikovat neznámé peptidy, potažmo proteiny, se využívá dvou hlavních typů sběru MS dat [19].

U datově závislých analýz (DDA, z angl. data-dependent acquisition), se nejprve měří souhrnné spektrum všech peptidů vstupujících do hmotnostního spektrometru (MS spektrum). Pomocí nastavených parametrů, jako je minimální MS intenzita a upřednostňovaný náboj, se z tohoto spektra vybere stanovený maximální počet iontů, které budou postupně fragmentovány. Fragments každého vybraného iontu jsou zaznamenány ve vlastním MS/MS spektru. Měření MS a MS/MS spekter se cyklicky opakuje během celé analýzy [8][12][20].

U datově nezávislých analýz (DIA, z angl. data-independent acquisition) nedochází ke specifickému výběru iontů, ale dochází v každém chromatografickém časovém bodě v definovaném rozsahu  $m/z$  k detekci všech fragmentačních iontů. DIA představuje efektivní přístup pro systematickou analýzu peptidových směsí. Hlavní výhodou DIA je schopnost analyzovat všechny prekurzorové ionty [8][12][20].

#### 1.2.4 Bioinformatický software

Nezávisle na typu sběru MS dat, je nutné po získání fragmentačních spekter z nich určit sekvence peptidů. Tento proces lze realizovat dvěma odlišnými přístupy: porovnáváním fragmentačních spekter s hodnotami vypočítaných z proteinových databází a *de novo* sekvenováním proteinů. V rámci přístupu založeného na porovnávání hodnot z databází se nejprve vytvoří cílová databáze, která obsahuje *in silico* štěpené sekvence všech hypotetických proteinů určitého organismu či organismů. Následně se pro každé fragmentační spektrum vypočítá skóre shody peptidového spektra (PSM) v porovnání se všemi teoretickými fragmentačními spektry z databáze. Peptid s nejvyšším skóre PSM je vybrán pro identifikaci [19][20].

Klíčovým krokem je výběr adekvátních vyhledávacích algoritmů, které umožní dosažení přesných a spolehlivých výsledků shody peptidového spektra. Tradiční vyhledávače proteinových databází, například SEQUEST, využívají skórovací funkci založenou na normalizované křížové korelaci mezi poměrem hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) teoretických fragmentů z databázových sekvencí aminokyselin a detekovanými fragmentovými ionty z hmotnostního spektra. SEQUEST využívá dvě skórovací funkce: první se používá k omezení množiny kandidátních peptidů pro každé spektrum ( $S_p$ ), zatímco druhá



funkce aplikuje křížovou korelaci mezi experimentálně získaným a teoreticky předpovězeným spektrem (Xcorr) [19][20].

Další hojně využívaný software je MASCOT, který generuje skóre založené na pravděpodobnosti pro identifikaci proteinů. Mezi hlavní parametry patří tolerance hmotnosti prekurzoru a fragmentových iontů, jejichž precizní nastavení je nezbytné pro dosažení přesných a spolehlivých výsledků [19][20].

Další široce používaný algoritmus je MS-Tag, který zahrnuje extrakci krátkého, unikátního úseku aminokyselinové sekvence peptidu z experimentálních dat. Tento úsek se následně kombinuje s naměřenou hmotností peptidu pro identifikaci původního proteinu [19][20].

Algoritmy pro *de novo* sekvenování jsou výpočetně náročné a vyžadují vysoce kvalitní DDA data. V důsledku toho je v rámci vysokokapacitních proteomických studií identifikace proteinů často omezena na ty, jejichž sekvence jsou obsaženy v prohledávané databázi. To znamená, že mnoho posttranslačně modifikovaných nebo mutovaných proteinů může být přehlédnuto. Při *de novo* sekvenování peptidů se sekvence určují na základě dat z fragmentačních spekter a vlastností metody fragmentace. Mezi hlavní analytické přístupy v této oblasti patří metody založené na grafických pravděpodobnostních modelech a skrytých Markovových modelech, jako jsou nástroje PepNovo a NovoHMM [19][20].

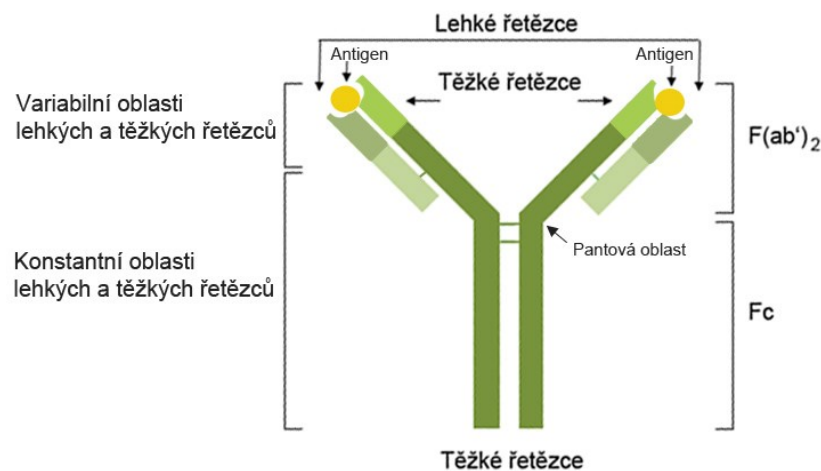
### 1.3 Protilátky

Protilátky, známé také jako imunoglobuliny, jsou glykoproteiny, které mají významnou roli v obraně organismu. Jejich primárním úkolem je identifikovat a neutralizovat cizorodé makromolekuly, nazývané antigeny. Ty mohou být různé povahy, často se jedná o proteiny, ale může jít také o sacharidy s vyšší molekulovou hmotností. Protilátky jsou produkovány specifickou skupinou bílých krvinek nazývaných B-lymfocyty. Každá protilátka vytvořená těmito buňkami je vysoce specifická. To znamená, že se dokáže vázat pouze na jeden konkrétní antigen. V posledních dvou dekadách se protilátky staly předlohou řady velice účinných léčiv [21][22][23].

### 1.3.1 Struktura protilátek

Imunoglobulinová molekula má strukturu podobnou písmenu „Y“. Funkční protilátka s molekulovou hmotností přibližně 150 kDa se skládá ze čtyř polypeptidových řetězců: dvou lehkých a dvou těžkých. Každá dvojice je identická. Lehký řetězec má hmotnost přibližně 25 kDa, zatímco těžký řetězec má hmotnost kolem 50 kDa. Tyto dva typy řetězců jsou vzájemně propojeny kovalentními disulfidovými vazbami a nekovalentními interakcemi [21][24].

Lehké a těžké řetězce obsahují dvě variabilní (VL a VH) a čtyři imunoglobulinové (CL, CH1, CH2 a CH3) domény, seřazené v určeném pořadí. Aminokonce obou řetězců se nacházejí ve variabilních doménách, které tvoří místo pro vazbu antigenu, jehož specifičnost se mění. V oblasti variabilní domény se nachází oblast určující komplementaritu (CDR), zatímco oblast, která zůstává stabilní, se nazývá oblast základní struktury (FW) [21].



**Obrázek 4 – Struktura protilátky**  
(převzato z <https://labguide.cz/reagencie/protilatky/>)

Existují různé varianty protilátek nabízející široké spektrum možností, od původních, nepozměněných verzí získaných z myši či lidských zdrojů, až po upravené typy, jako jsou chimérické, humanizované a fragmentované protilátky vytvořené díky proteinovému inženýrství. Specifickou skupinu protilátkových léčiv tvoří jejich konjugáty s vysoce účinnými toxiny či radionuklidy. Základy pro moderní vývoj terapeutických protilátek byly položeny myšími IgG monoklonálními protilátkami. Jejich struktura je podobná lidským protilátkám [21].

### 1.3.2 Monoklonální protilátky

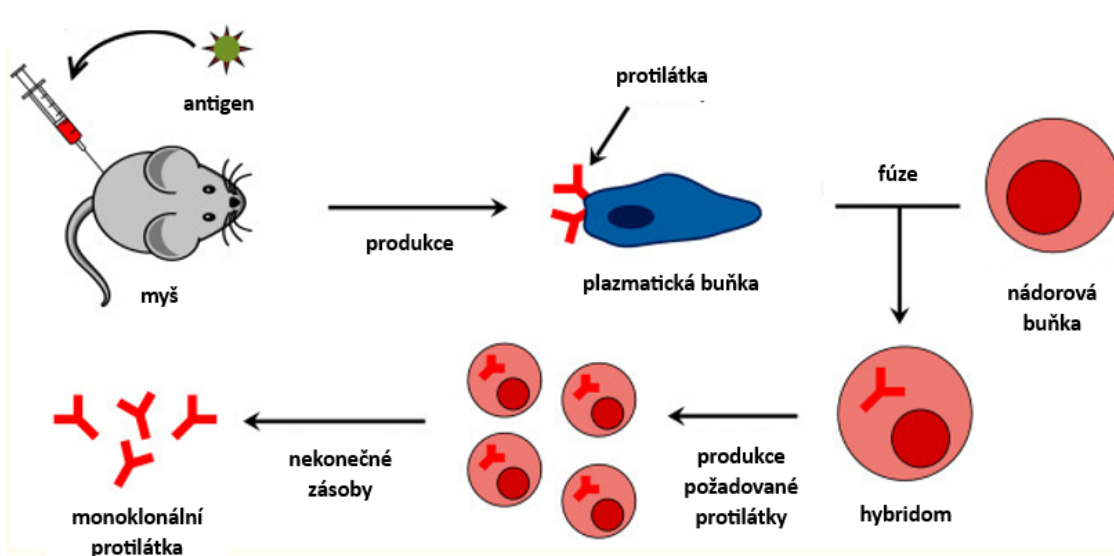
Protilátky vynikají svou schopností identifikovat a vázat se na specifické cíle zájmu. Pro výzkumné účely jsou dostupné dva typy konvenčních protilátek: polyklonální a monoklonální. I když v průběhu času byly provedeny určité modifikace a vylepšení, metody generování těchto protilátek se v posledních 40 letech zásadně nezlepšily. Pro moderní terapeutika se používají monoklonální protilátky [25].

Monoklonální protilátky jsou definovány jako monospecifické protilátky, které vycházejí z identických imunitních buněk, jež jsou klonovány z jedné rodičovské buňky. V roce 1986 schválil americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv první monoklonální protilátku pro léčbu akutního odmítnutí transplantátu ledvin či srdce. Tato protilátka je známá pod názvem Muromonab-CD3 (OKT3) [21][23][26][27].

Monoklonální protilátky jsou v laboratoři vyráběné technologií hybridomů. V sedmdesátých letech 20. století přinesla tato technologie, vyvinutá Köhlerem a Milsteinem, revoluční změny [23][25].

Za produkci monoklonálních protilátek, které se specializují na rozpoznání a vázání specifických antigenů, jsou zodpovědné B-lymfocyty. Konkrétně se tyto protilátky vytvářejí fúzí normálního B-lymfocytu produkujícího protilátky s nádorovou buněčnou linií s neomezenou životností. K vytvoření těchto pro antigen specifických B-lymfocytů je nezbytná imunizace zvířete daným antigenem. Obvykle se používá myš, potkan nebo křeček. B-lymfocyty se získávají ze sleziny po usmrcení zvířete, a to obvykle po několika imunizačních cyklech. B-lymfocyty produkují protilátky fúzovány s nevylučujícími myelomovými (hybridomovými) buňkami. Výsledný produkt je následně klonován a podroben testům na antigenní specifičnost [21][22].

Výsledné hybridomy mají schopnost vytvářet pouze jeden unikátní klon protilátek. Tuto protilátku označujeme jako monoklonální. Tato vlastnost představuje významnou výhodu oproti polyklonálním protilátkám. Monoklonální protilátky jsou schopny identifikovat specifické epitopy s vysokou afinitou a minimalizovat riziko zkřížené reaktivity. Dále, hybridomové buněčné linie mohou produkovat konzistentní množství identických protilátek, čímž odstraňují variabilitu mezi šaržemi. Avšak i monoklonální protilátky jsou náchylné k možným kontaminacím jinými nežádoucími protilátkovými řetězci [25].

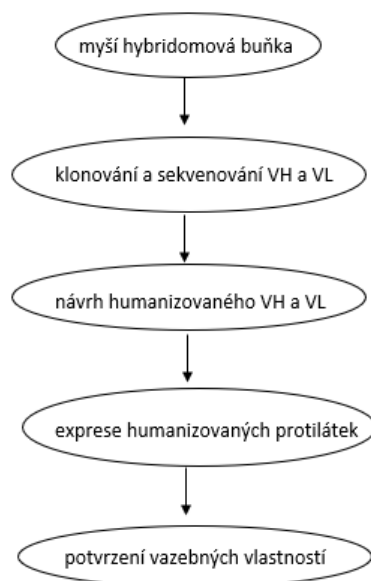


**Obrázek 5 – Schématické znázornění produkce monoklonální protilátky**  
 (převzato z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323461436000257>)

Klinický výzkum potvrdil, že humanizované protilátky vykazují obecně nižší imunogenitu, než myší či chimérické varianty. Tyto protilátky jsou tudíž považovány za bezpečné a dobře tolerované u lidí. Vývoj humanizační technologie umožnil redukovat imunogenicitu spojenou s použitím hlodavčích protilátek nebo ji alespoň snížit na přijatelnou úroveň pro klinické použití. To otevřelo cestu pro širší použití monoklonálních protilátek v léčbě lidských onemocnění [28].

Cílem humanizace protilátek je přenést zbytky CDR a minimální počet klíčových aminokyselin z myších monoklonálních protilátek na lidskou základní strukturu tak, aby se zachovala afinita vůči antigenu a specifičnost. Tento proces vyžaduje znalosti zejména v oblastech trojrozměrného modelování proteinových struktur a genetického inženýrství [28].

První humanizovanou protilátkou schválenou FDA pro terapeutické použití u lidí v USA je daclizumab. Tato humanizovaná forma IgG1 je odvozena z myší monoklonální protilátky anti-Tac, která cílí na  $\alpha$ -řetězce receptoru lidského IL-2. Daclizumab získal schválení v roce 1997 pro prevenci odmítnutí renálního aloštěpu [28].



**Obrázek 6 – Schéma humanizace protilátky (převzato z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202305000174?via%3Dihub>)**

K srpnu 2024 existuje více než 100 schválených terapeutických monoklonálních protilátek, mezi které patří například panitumumab, bevacizumab, cetuximab, trastuzumab a aflibercept, které byly použity v rámci této diplomové práce [29].

### **Panitumumab**

Panitumumab (Vectibix) představuje humanizovanou monoklonální protilátku IgG<sub>2</sub>, která zabraňuje aktivaci receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), jenž je exprimován v různých typech nádorů. Tento lék spadá do kategorie cílené terapie. Od běžně používané chemoterapie se liší tím, že má nižší toxicitu zaměřenou na konkrétní cíl [30][31].

Účinnost panitumumabu se sleduje u tumorů exprimujících EGFR. Panitumumab prokázal svou účinnost jak v monoterapii, tak i v kombinaci s chemoterapií. Mezi další potenciální cílové oblasti patří například lokálně pokročilé spinocelulární karcinomy hlavy a krku nebo nemalobuněčné karcinomy plic [30][32].

## Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin) představuje humanizovanou monoklonální protilátku typu IgG<sub>1</sub>, která cílí na vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) klíčový pro angiogenezi [24].

Potlačení angiogeneze pomocí bevacizumabu zpomaluje růst nádoru a snižuje tvorbu metastáz. Tato vlastnost určuje jeho využití v léčbě nádorů. Tento lék je vyroben pomocí rekombinantní technologie na buňkách ovaria čínských křečků. Přibližně 93 % aminokyselinových sekvencí pochází z lidského imunoglobulinu, zatímco 7 % tvoří myší protilátka [33][34].

Bevacizumab je důležitou součástí komplexní léčby kolorektálního karcinomu, protože v kombinaci se standardní chemoterapií posiluje protinádorový účinek. Je pravděpodobné, že by mohl být účinný i při léčbě dalších typů nádorových onemocnění, zejména karcinomu prsu, pankreatu a plic [33].

## Cetuximab

Cetuximab (Erbix) je specifická chimérická monoklonální protilátka třídy IgG<sub>1</sub> zaměřená proti receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR). Vedle kompetitivní blokády tohoto receptoru může cetuximab vyvolávat i imunologické odpovědi, které přispívají k jeho protinádorovému účinku [25][31][33].

V terapeutické praxi je cetuximab registrován pro léčbu metastatického kolorektálního karcinomu po selhání standardní chemoterapie. Také se využívá při léčbě pokročilých karcinomů hlavy a krku, často v kombinaci s radioterapií. Cetuximab, ačkoliv prokazuje určitou účinnost jako samostatná terapie, dosahuje svého maximálního potenciálu ve spojení s cytotoxickými chemoterapeutiky nebo radioterapií [35][36].

Cetuximab kombinuje oblast Fv od myšího původu, která je zodpovědná za vazbu na antigen, s konstantními oblastmi molekuly protilátky humánního původu [35].

## Trastuzumab

Trastuzumab (Herpecin) představuje humanizovanou monoklonální protilátku třídy IgG<sub>1</sub> navrženou tak, aby specificky integrovala s extracelulární částí receptoru 2 pro lidský

epidermální růstový faktor (HER2). Používá se především u HER2-pozitivního karcinomu prsu, kde výrazně zlepši dlouhodobou prognózu pacientek [24][37].

Trastuzumab se vyrábí pomocí rekombinantní DNA technologie, která využívá buněčné linie savčích buněk získaných z ovaríí čínských křečků. Po této fázi následuje proces čištění protilátky pomocí běžných chromatografických a filtračních postupů [25].

Trastuzumab se stal prvním cíleným biologickým lékem v boji proti karcinomu prsu. Od roku 1998 se uplatňuje v klinické praxi v USA, od roku 2000 v Evropě a od roku 2001 v České republice. Jeho podání, buď samostatně nebo v kombinaci s chemoterapií, výrazně prodlužuje přežití pacientek s metastatickým karcinomem prsu. Původně byl indikován pouze pro pacientky s metastázemi, avšak od roku 2006 je také doporučován jako adjuvantní terapie. Trastuzumab rovněž představuje první cílenou biologickou léčbu, která prokazatelně prodlužuje životnost pacientů s karcinomem žaludku v pokročilém stádiu [37].

### **Aflibercept**

Aflibercept spadá do skupiny inhibitorů vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) určených pro nitrooční aplikaci. Je schválen k léčbě vlhké formy makulární degenerace související s věkem a makulárního edému vznikajícího v důsledku uzávěry centrální sítnicové žíly [38][39].

Aflibercept je rekombinantní fúzní protein, který kombinuje extracelulární domény receptorů 1 a 2 pro VGF, které jsou spojeny s Fc fragmentem lidského IgG1. Tento lék, známý také jako „VEGF past“, má schopnost působit jako falešný receptor, který váže všechny izoformy VEGF-A, dále VEGF-B a placentární růstový faktor (PlGF). Brání proliferaci endotelových buněk a inhibuje růst nových cév. Tento lék proniká všemi vrstvami sítnice [39][40].

Aflibercept je dimerní glykoprotein, jehož proteinová část má molekulovou hmotnost 97 kDa. Díky glykosylaci se celková hmotnost zvyšuje o 15 % na 115 kDa [39][41].

## 1.4 Bakterie

Kromě terapeutického potenciálu nesou proteiny také význam pro diagnostiku. V této diplomové práci jsme se zabývali možnostmi využít online chemické štěpení proteinů v subkritické mobilní fázi pro přesnější identifikaci bakterií. Pro účely této diplomové práce byly vybrány tři reprezentativní bakterie.

### 1.4.1 *Bacillus subtilis*

*B. subtilis* je grampozitivní sporulující bakterie, která preferuje aerobní prostředí. Její tyčinkovité buňky obvykle dosahují délky 2-6  $\mu\text{m}$  a průměru menšího než 1  $\mu\text{m}$ . Díky vynikajícím fyziologickým vlastnostem a vysoce adaptabilnímu metabolismu *B. subtilis* roste snadno na levných substrátech. Fermentační cyklus je proto kratší, obvykle kolem 48 hodin. *B. subtilis* představuje typový kmen řádu *Bacillales* a základní organismus celého kmene *Firmicutes* [42][43].

*B. subtilis* patří mezi první organismy, u nichž byl úspěšně proveden popis genomu. V akademickém prostředí se kmen 168 *B. subtilis* stal klíčovým mikroorganismem pro zkoumání fyziologických vlastností, včetně analýzy proteomu, mechanismů proteinové sekrece a translokace, buněčného dělení a vývoje minimálních buněčných struktur. V průmyslu je *B. subtilis* dobře známý pro svou bezpečnost. Tato bakterie je běžně používána jako průmyslový mikroorganismus pro výrobu vitamínů, inositolu, acetoinu, hyaluronanu a dalších produktů [43][44].

*B. subtilis* byl do experimentů vybrán, protože je známý svou rezistencí k různým lyzačním činidlům a nepříznivým vlivům prostředí.

### 1.4.2 *Escherichia coli*

*E. coli* patří mezi nejlépe adaptované a patogenicky rozmanité bakterie. Tato bakterie patří mezi gramnegativní tyčinky, které jsou fakultativně anaerobní. Měří obvykle kolem 1  $\mu\text{m}$  na délku a 0,35  $\mu\text{m}$  na šířku. Spadá do čeledi *Enterobacteriaceae* [45].

*E. coli* je převážně nepatogenní bakterie. V řadě studiích zabývajících se dospělými jedinci se *E. coli* vyskytuje ve střevním mikrobiomu u více než 90 % jedinců. Nicméně



některé kmeny vyvolávají různé infekce u lidí, včetně gastrointestinálních a extraintestinálních onemocnění [45][46][47][48].

*E. coli* rychle roste jak v kapalných, tak v pevných médiích různých druhů. Pro *E. coli* je optimální teplota růstu 37 °C za anaerobních podmínek. Dokáže přežít až 3 měsíce při teplotě 4 °C na pevném médiu. Rovněž je schopna růst v širokém rozmezí pH. Typický růst a udržování se provádí při neutrálním pH 7. Běžné laboratorní kmeny *E. coli* mají dobře charakterizované fenotypy a genotypy, což umožňuje jejich využití jako modelového organismu pro výuku a výzkum [49][50]

Bakterie *E. coli* byla do experimentů vybrána jako prototyp gramnegativní bakterie.

### 1.4.3 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* je grampozitivní bakterie a oportunní patogen, který se běžně vyskytuje na kůži a sliznicích asi 30 % zdravé dospělé populace. *S. aureus* bezpříznakově kolonizuje nosní dutinu nebo nosohltan. Teprve po porušení slizniční imunity dojde k rozvoji onemocnění. Poprvé byl *S. aureus* identifikován v purulentní tekutině z abscesu nohy skotským chirurgem a profesorem Alexandrem Ogstonem [51][52][53].

*S. aureus* má kulovitý tvar a seskupuje se do shluků, které připomínají hrozny. Tato bakterie je schopna růst na médiích až v 10% soli. Její kolonie mají charakteristické zlaté nebo žluté zbarvení. Mohou růst jak v aerobním, tak v anaerobním prostředí při teplotách 18 °C až 40 °C [52][53].

Tato bakterie může vyvolat celou řadu onemocnění, od mírných kožních infekcí až po život ohrožující pneumonie a sepse. Tento mikroorganismus je rovněž spojen s chirurgickými, nozokomiálními a kardiovaskulárními infekcemi. *S. aureus* se obvykle přenáší přímým kontaktem. Léčba bývá náročná, především kvůli narůstající rezistenci bakterií vůči lékům. Zvláště problematickým kmenem je meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA). Nicméně i nadále zůstává penicilin a vankomycin běžnými volbami léčby [52][53].

Bakterie *S. aureus* byla do experimentů vybrána jako prototyp grampozitivní bakterie s velmi odolnou buněčnou stěnou.

## 2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo dále optimalizovat metodu štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi a rozšířit možnosti jejího potencionálního uplatnění. Součástí práce tedy bylo porovnání dvou zařízení pro superkritickou okyselenou mobilní fázi, konkrétně blokového termostatu a suché lázně. Dalším cílem bylo ověřit, zda tuto metodu lze použít pro charakterizaci protilátkových bioléciv a identifikaci bakterií a stanovit nejvhodnější postupy pro jejich přípravu.

### 3. Experimentální část

Tato diplomová práce vychází ze studie publikované týmem Dr. Lenča, která se zaměřovala vývoj metody štěpení proteinů v subkritické kyselé mobilní fázi pomocí suché lázně s aplikací na rychlou detekci ricinu. Tato vyvinutá metoda se ukázala jako jednoduchá, levná, účinná a schopna bezproblémově interagovat s LC-MS. Nabízí rychlou identifikaci proteinů s minimální manipulací vzorků, což jí přisuzuje významný potenciál pro proteomické a diagnostické aplikace. Aby byla tato metoda plně využitelná v praxi, je nezbytné provést modifikaci spočívající v nahrazení suché lázně blokovým termostatem. Možný potenciál pro využití metody je charakterizace terapeutických monoklonálních protilátek a rychlá identifikace bakterií v klinickém prostředí. Oba tyto potenciály byly v této diplomové práci zkoumány.

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Chemikálie

**Guanidin hydrochlorid** (zkráceně guanidin) – 8M, pH 8,5 (Sigma–Aldrich)

**Kyselina mravenčí** – LC/MS (Fisher chemicals)

**Voda** – HPLC grade (VWR chemicals)

**Acetonitril** – LC/MS grade (Fisher Scientific)

**Dithithreitol** (DTT) –  $\geq 98 \%$  (Sigma-Aldrich)

**Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid** (TCEP) – (Sigma-Aldrich)

##### 3.1.2 Protilátková bioléciva

**Trastuzumab** (Herceptin) – Roche; 21 mg/mL

**Aflibercept** (Zaltrap) – Sanofi-aventis; 25 mg/mL

**Bevacizumab** (Avastin) – Roche; 25 mg/mL

**Cetuximab** (Erbix) – Merck Europe B.V.; 5 mg/mL

**Panitumumab** (Vectibix) – Amgen Europe B. V.; 20 mg/mL

### 3.1.3 Bakterie

***B. subtilis*** (Ehrenberg 1835) Cohn 1872<sup>AL</sup> – CCM 2217

***E. coli*** (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919<sup>AL</sup> – CCM 7929

***S. aureus*** subsp. aureus (Rosenbach 1884<sup>AL</sup>) De La Fuente et al. 1985<sup>VP</sup> – CCM 4516

### 3.1.4 Chromatografické kolony

HALO 160 Å, ES-C18, 2,7 µm, 1,5 x 150 mm (č. 1) – Advanced Materials Technology

BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2,7 µm, 2,1 x 100 mm (č. 1) – Waters

BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2,7 µm, 2,1 x 100 mm (č. 2) – Waters

### 3.1.5 Přístroje a zařízení

**Q Exactive HF-X mass spectrometer with H-ESI II ion source and Thermo Scientific™**

**Vanquish™ UHPLC Systém (viz. příloha 1)**

- Autosampler
- Pumpa
- Kolonový termostat
- Viper Inline Filter – 2261.1045 (filtr sloužící k přečištění)

**Blokový termostat (viz. příloha 2) – MBT-250 (Kleinfeld LaborTechnik, Německo)**

- Před zahájením analýzy byl termostat zahřát na 195 °C

**Suchá lázeň (viz. příloha 3)**

- Kuličky z oxidu hlinitého
- Dvě kapiláry
  - Viper MP35N P/N 6042.2395 IDxL 0,10 x 950 mm
  - Viper MP35N P/N 6042.2373 IDxL 0,13 x 750 mm
- Závaží 2 kg (kapiláry se nesmí překrývat na dně suché lázně)
- Před zahájením analýzy byla suchá lázeň zahřáta na 195 °C, přičemž teplotu kontrolovaly dva teploměry a teplotní sonda (IKA Werke ETS-D4 Fuzzy)

### 3.1.6 Mobilní fáze

Pro RPLC separaci na kolonách uvedených výše byly použity dvě složky mobilní fáze. Složka A mobilní fáze obsahovala vodu a 0,1% kyselinu mravenčí. Složka B mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí. Obě složky se připravovaly pro analýzu jednotlivých sad vzorků vždy čerstvé dedikovaným laboratorním sklem.

### 3.2 Příprava redukovaných protilátkových bioléciv

V této diplomové práci bylo využito pět bioléciv na bázi monoklonálních protilátek (panitumumab, bevacizumab, cetuximab, trastuzumab a aflibercept). Všechny tyto protilátky byly před vlastní analýzou redukovány z důvodu snazší identifikace jednotlivých peptidů.

Celkové množství připraveného protilátkového biologického léčiva činilo vždy 400 µg. Nejprve byla protilátka o určité koncentraci smíchána s 8 M guanidinem (GuHCl) v poměru 1:3. Následovala inkubace po dobu 5 minut při 60 °C. Poté byl přidán dithiothreitol (DTT) o koncentraci 20 mM tak, aby jeho finální koncentrace dosáhla 200 mM. Po dalších 30 minutách inkubace při 60 °C a 1000 otáčkách za minutu byla přidána voda, aby byla dosažena konečná koncentrace 1 µg/µL. Příprava jednotlivých redukovaných protilátkových bioléciv je shrnuta v následující tabulce 1.

**Tabulka 1 – Rozpis reagentů pro přípravu redukovaných protilátkových bioléciv**

protilátkové biolécivo	koncentrace bioléciva (mg/mL)	objem bioléciva (µl)	objem GuHCl (µl)	objem DTT (µl)	objem H <sub>2</sub> O (µl)
panitumumab	20	20	60	8,89	311,11
bevacizumab	25	16	48	7,11	328,89
cetuximab	5	80	240	35,56	44,44
trastuzumab	21	19,05	57,14	8,47	315,34
aflibercept	25	16	48	7,11	328,89

### 3.3 Příprava bakterií

Byly vyzkoušena různá činidla a techniky pro přípravu bakterií s cílem nalézt univerzální postup pro účinnou a rychlou přípravu celobuněčného lyzátu. Tento lyzát byl nezbytný pro komplexní analýzu vnitřní struktury bakterií.

Kultivaci jednotlivých bakterií prováděla PharmDr. Michaela Hympanová, Ph.D a přípravu celobuněčného lyzátu postupně realizoval Mgr. Ivo Fabrik ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Přesné postupy přípravy lyzátu jsou stručně popsány v jednotlivých protokolech v přílohách 4-10.

### 3.4 Parametry HPLC/MS analýz

#### 3.4.1 Analýzy redukovaných monoklonálních bioléciv

Před zahájením finálních experimentů bylo potřeba ověřit, zda došlo ke správné redukci protilátkových bioléciv, která byla provedena za použití guanidinu a dithiothreitolu. Dávkový objem byl 2  $\mu$ L. Vzhledem k vysoké koncentraci guanidinu ve vzorku byl využit přepínací ventil k odklonění toku mobilní fáze do odpadu. Tím se minimalizovalo znečištění a zvýšila se citlivost detekce. Doba trvání metody byla 18 minut při průtok 0,300 mL/min. Tok mobilní fáze byl směřován do hmotnostního spektrometru v intervalu od 1,8 do 15,10 minuty během analýzy. Teplota kolony byla nastavena na 70 °C. Byla použita gradientová eluce s délkou 10 minut (viz. tabulka 2).

Následně byly nastaveny parametry hmotnostního spektrometru. Byl použit mód full MS v rozmezí m/z 1000 až 3500. Rozlišení bylo nastaveno na 7500 a doba pro dosažení maximálního množství iontů ve skenu byla 50 ms.

Metoda RPLC-MS poskytuje možnost analyzovat protilátková bioléciva na různých úrovních molekulové hmotnosti. Při analýze proteinů je zvýšená teplota klíčová, protože zlepšuje difuzi a zrychluje procesy adsorpce a desorpce, což vede k lepšímu přenosu hmoty analytů a optimalizaci výtěžnosti. Nicméně, vyšší teplota také zvyšuje riziko tepelné degradace proteinů. Studie Khalikova a kol. prokázala, že teploty nad 60 °C výrazně zvyšují riziko vzniku artefaktů proteinů a peptidů. Dále ukázali, že kombinace vysokých teplot a kyselých mobilních fází, běžně používaných při analýze, může nepříznivě ovlivnit životnost chromatografické kolony.

**Tabulka 2 – Program gradientové eluce pro analýzu redukovanych monoklonálních bioléciv**

čas	prútok (mL/min)	%B	%A
1,00	0,30	1	99
11,00	0,30	51	49
11,25	0,30	80	20
12,75	0,30	80	20
13,00	0,30	1	99

### 3.4.2 Online štěpení redukovanych monoklonálních bioléciv

Parametry HPLC-MS analýzy při štěpení monoklonálních bioléciv v subkritické okyselené mobilní fázi za použití suché lázně nebo termostatu byly obdobné jako předchozí parametry při kontrole redukce monoklonálních bioléciv.

Opět byl použit přepínací ventil. Doba trvání metody byla 18 minut při průtoku 0,300 mL/min. Tok mobilní fáze byl směřován do hmotnostního spektrometru v intervalu od 2,35 do 15,10 minuty během analýzy. Teplota kolony byla nastavena na 70 °C. Gradient byl 10 minut.

Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru bylo odlišné, protože MS data byla získávána v DDA módu. Nejprve byl použit mód tzv. full MS, jehož rozsah skenování byl 325 až 2000 m/z. Rozlišení bylo nastaveno na 60 000 a maximální doba pro zachycení co největšího množství iontů v orbitrapu byla 60 ms. Ze spekter získaných v předchozím módu byly vybrány maximálně tři prekurzory na základě stanovených parametrů. Mezi tyto parametry patřila jejich minimální intenzita  $2,5 \cdot 10^5$ . Dalšími parametry byla minimální intenzita iontového signálu  $3,75 \cdot 10^4$  a tzv. apex trigger, reagující na maximální intenzitu iontového signálu (vrchol signálu), byl nastaven na 1 až 3 sekundy. Další klíčový parametr ovlivňující výběr iontů pro fragmentační analýzu je izolační okno, které bylo stanoveno na 2,5 m/z s posunem o 0,3 m/z. Tyto prekurzory byly podrobeny fragmentaci v kolizní cele pomocí normalizované kolizní energie 27 a dusíku jako kolizního plynu. Rozlišení bylo nastaveno na 30 000 a maximální doba pro zachycení co největšího množství iontů v orbitrapu byla 150 ms.

### 3.4.3 Analýza proteinů *B. subtilis* štěpeného pomocí trypsinu

Aby se urychlilo bioinformatické hodnocení DDA dat, omezil se prohledávací prostor tím, že byla vytvořena proteinová databáze pouze z proteinů, u kterých bylo jednoznačně potvrzeno, že dochází k jejich produkci. Za tímto účelem se provedla standardní analýza *B. subtilis*, při které byly její proteiny štěpeny trypsinem. Trypsin je proteolytický enzym, který štěpí proteiny na menší peptidy. To umožňuje analýzu specifických částí proteinů, které jsou snáze detekovatelné a analyzovatelné [54].

Doba trvání metody byla 46 minut při průtoku 115  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Teplota kolony byla nastavena na 55  $^{\circ}\text{C}$ . Byla použita gradientová eluce s délkou 30 + 2 minuty (viz tabulka 3). Při této metodě nebyl použit přepínací ventil.

**Tabulka 3 – Nastavení gradientové eluce u analýzy proteinů *B. subtilis* specificky štěpeného pomocí trypsinu**

čas	průtok (mL/min)	%B	%A
0,00	0,115	2	98
30,00	0,115	50	50
32,00	0,115	60	40
32,25	0,115	95	5
33,75	0,115	95	5
34,00	0,115	2	98

Následně byly nastaveny parametry hmotnostního analyzátoru pro DDA metodu. Byl použit mód full MS v rozmezí  $m/z$  350 až 1500. Rozlišení bylo nastaveno na 60 000 a maximální doba pro zachycení co největšího množství iontů v orbitrapu byla 110 ms. Ze spekter získaných v předchozím módu bylo vybráno deset prekurzorů na základě stanovených parametrů. Mezi tyto parametry patřila jejich minimální intenzita  $1 \cdot 10^5$  a minimální intenzita iontového signálu  $5 \cdot 10^3$ . Další klíčový parametr, ovlivňující výběr iontů pro fragmentační analýzu, je izolační okno, které bylo stanoveno na 1,8  $m/z$  s posunem o 0,3  $m/z$ . Tyto prekurzory byly podrobeny fragmentaci v kolizní cele pomocí normalizované kolizní energie 27 a dusíku jako kolizního plynu. Rozlišení bylo nastaveno na 15 000 a maximální doba pro zachycení co největšího množství iontů v orbitrapu byla 50 ms.



Bioinformatické hodnocení prováděl Dr. Lenčo, protože jako jediný měl přístup k serveru s bioinformatickým nástrojem Byonic. Výsledkem hodnocení bylo vytvoření omezené proteinové databáze, která byla použita pro hodnocení dat z online chemického štěpení proteinů v subkritické mobilní fázi. Později však bylo zjištěno, že takováto omezená databáze nepřináší významné urychlení.

#### 3.4.4 Analýza připravených sad bakterií

Doba trvání metody byla 20 minut při průtoku 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Teplota kolony byla nastavena na 60 °C. Byla použita gradientová eluce s délkou 10 minut (viz. tabulka 4). Opět byl použit přepínací ventil. Tok mobilní fáze byl směřován do hmotnostního spektrometru v intervalu od 5,25 do 15,10 minuty během analýzy. Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru bylo stejné jako při štěpení monoklonálních bioléciv.

**Tabulka 4 – Nastavení gradientové eluce u analýzy štěpení bakterií**

čas	průtok (mL/min)	%B	%A
3,00	0,300	1	99
12,00	0,300	51	49
13,25	0,300	80	20
14,75	0,300	80	20
15,00	0,300	1	99

### 3.5 Softwarová analýza LC/MS dat

Získaná data byla vyhodnocována ve dvou softwarech, Skyline a Byonic. Zpracování výsledků v softwaru Byonic prováděl Dr. Lenčo z důvodu uvedeného výše.

#### 3.5.1 Analýza monoklonálních bioléciv

Primární data z LC/MS analýz byla přenesena a zpracována v softwaru Skyline ve verzi 22.2. Bylo nezbytné vytvořit FASTA soubory obsahující sekvence protilátek, které sloužily jako vstupní formát pro analýzu v programu. Tento soubor je klíčový pro bioinformatické analýzy, jako je identifikace proteinů. FASTA formát je standardní formát pro uchovávání sekvencí, což umožňuje jejich snadnou manipulaci a analýzu. Jednotlivé sekvence monoklonálních bioléciv byly získány z webových stránek DrugBank

nebo Protein Data Bank in Europe. Takto zpracovaná data byla použita k vytvoření knihoven pro jednotlivé monoklonální bioléčiva.

Další získaná data byla vyhodnocována Dr. Lenčem v programu Byonic. Opět bylo zapotřebí FASTA souboru obsahující sekvence bioléčiv. Díky tomuto postupu bylo možné provést porovnání peptidových sekvencí našich vzorků s těmi vytvořenými z FASTA souboru a přiřadit odpovídající počet identifikovaných peptidů k chromatogramům z LC-MS analýzy.

### **3.5.2 Analýza bakterií**

Vyhodnocení analýz bakterií bylo provedeno obdobným způsobem. Primární data byla zpracována v programu Byonic Dr. Lenčem. K tomu bylo nutné mít k dispozici FASTA soubor obsahující sekvence proteinů jednotlivých bakterií. Tyto FASTA soubory byly staženy z webové stránky UniProt. Následovalo porovnání hodnot vyčtených z MS a MS/MS spekter získaných z našich vzorků s teoretickými hodnotami vytvořenými z FASTA souboru programem Byonic.

## 4. Výsledky a diskuze

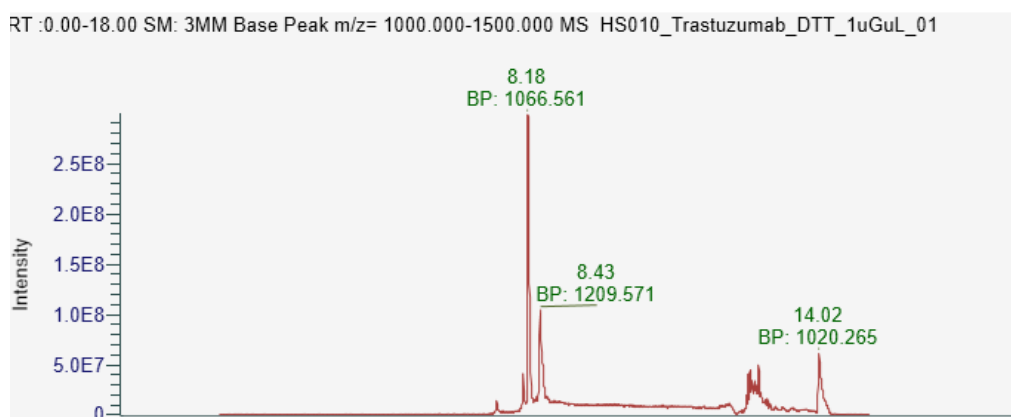
### 4.1 Optimalizace online štěpení

Prvním cílem diplomové práce byla optimalizace přístrojového vybavení k online chemickému štěpení proteinů. K optimalizaci chemického štěpení proteinů v subkritické mobilní fázi byly využity protilátková léčiva v redukované formě.

#### 4.1.1 Ověření redukce monoklonálních bioléciv

Redukce monoklonálních bioléciv před analýzou je nezbytná. Bioléciva jsou velké, komplexní proteiny složené z několika řetězců držených pohromadě disulfidovými vazbami. Redukcí těchto disulfidových vazeb se oddělí těžké a lehké řetězce, což umožňuje jejich podrobnější analýzu. Pokud není provedena redukce nebo je provedena nedokonale, může být obtížné pokrýt konkrétní oblasti protilátky, včetně těch, které jsou upraveny disulfidickými vazbami nebo posttranslačními modifikacemi.

Na obrázku 7 je zobrazen ukázkový chromatogram redukovaného trastuzumabu zobrazující dva hlavní píky pro lehké (8.18 min) a těžké řetězce (8.43 min) trastuzumabu. Na základě chromatogramů všech redukovaných protilátek bylo potvrzeno správné provedení redukce vzorků.



**Obrázek 7 – Chromatogram redukovaného trastuzumabu**

#### 4.1.2 Štěpení monoklonálních bioléciv v subkritické okyselené mobilní fázi

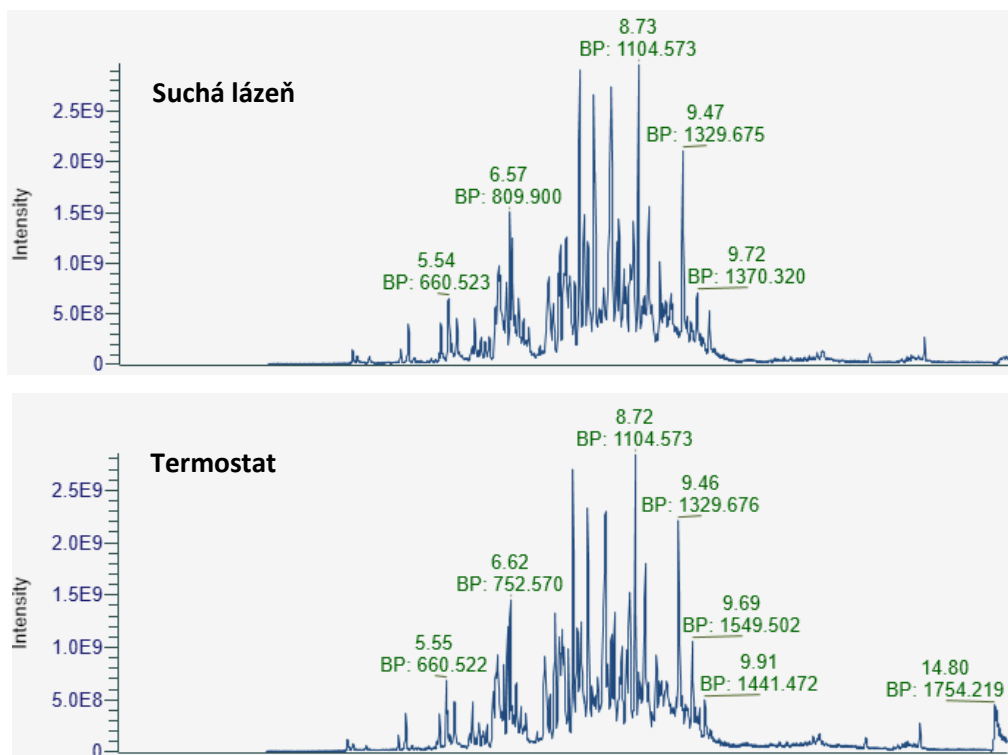
Metoda štěpení jednotlivých protilátkových bioléciv v subkritické okyselené mobilní fázi byla realizována dvěma odlišnými způsoby. V prvním případě využití blokový termostat nastavený na teplotu 195 °C. Druhý přístup spočíval ve využití původní suché lázně, která byla opět nastavena na teplotu 195 °C.

Získaná data jsou shrnuta v tabulce 5. Tato tabulka poskytuje informace o počtu identifikovaných peptidů, včetně spekter shodujících se s peptidy a pokrytí sekvence (angl. coverage). Všechna měření byla provedena v duplikátu pro zajištění vyšší spolehlivosti výsledků. Hodnoty mezi replikáty se výrazně nelišily.

**Tabulka 5 – Porovnání použití blokového termostatu a suché lázně ke štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi**

protilátkové biolécivo	počet unikátních peptidů		spektra shodující se s peptidy		pokrytí sekvence (%)	
	b. termostat	suchá lázeň	b. termostat	suchá lázeň	b. termostat	suchá lázeň
trastuzumab	334,5	354,5	489	498,5	99,9	99,*
aflibercept	295,5	261	394,5	349	100	99,*
bevacizumab	389,5	374	578,5	541,5	100	100
cetuximab	319,5	320,5	470	468,5	96,8	96,9
panitumumab	296	283,5	428	396,5	98,4	98,4

Zjištěné rozdíly nejsou příliš výrazné a odpovídají zaznamenaným chromatogramům (viz reprezentativní chromatogramy získané z trastuzumabu na obrázku 8). V případě afliberceptu, bevacizumabu a panitumumabu bylo nalezeno více peptidů při použití termostatu. Naopak u trastuzumabu a cetuximabu se situace obrátila. Pokrytí proteinů představuje, kolik procent aminokyselin v sekvenci pokryly identifikované peptidy. Vyjadřuje, jak účinně analytická metoda dokáže zmapovat protein. Všechny naše výsledky vykazují vysoké procento pokrytí, což potvrzuje schopnost použité metody zachytit a identifikovat podstatnou část proteinu a jistý potenciál pro využití v rychlé charakterizaci léčivých přípravků obsahujících monoklonální protilátky.



**Obrázek 8 – Srovnání LC/MS chromatogramů trastuzumabu po jeho štěpení v subkritické okyselené mobilní fázi pomocí blokového termostatu a suché lázně**

## 4.2 Využití online štěpení v analýze monoklonálních bioléciv

Vývoj a výroba terapeutik, jako jsou monoklonální protilátky, vyžaduje vysoce výkonnou analýzu vzorků a vysoce kvalitní data. Například posttranslační modifikace mohou mít zásadní dopad na kvalitu a účinnost konečného produktu, a proto je třeba je sledovat. Mapování peptidů je považováno za zlatý standard pro analýzu protilátkových bioléciv, protože poskytuje informace o mnoha attributech jejich účinnosti a bezpečnosti na úrovni peptidů v rámci jediné analýzy [55][56].

Online štěpení je způsob přípravy vzorků, který lze potenciálně využít k detailnímu vyhodnocení protilátkových bioléciv. Tato metoda by mohla umožnit monitorování strukturálních a stabilitních vlastností bioléciv v reálném čase, čímž by poskytla cenné informace o jejich molekulární struktuře. V praxi by online štěpení mohlo umožnit sledovat degradaci a fragmentaci protilátkových bioléciv za různých podmínek, což je klíčové pro posouzení jejich stability a životnosti. Tato technika by mohla být zásadní pro optimalizaci výrobních podmínek. Nicméně během detailnějšího hodnocení dat Dr. Lenčo odhalil, že ačkoliv online chemické štěpení v subkritické mobilní fázi rychle přineslo informace o primární struktuře analyzovaných bioléciv, podmínky štěpení

modifikovaly některé aminokyseliny. Jednalo se zejména o dehydrataci kys. asparagové a tvorbu pyroglutamátu z některých N-koncových aminokyselin. Tento nález výrazně omezuje použití testovaného způsobu štěpení pro kontrolu kvality protilátkových léčiv [55][56].

### 4.3 Analýza online štěpení proteinů bakterií

Po ověření účinnosti metody online štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi na protilátkových biolécivech jsme přešli k analýze bakterií. V této aplikaci by neměly mít odhalené artefakty vzniklé během online štěpení výrazný negativní vliv.

#### 4.3.1 První sada vzorků bakterií (IF229)

V první sadě vzorků byla použita bakterie *B. subtilis*. Jednalo se o první analýzy takového druhu vůbec. Před samotnou analýzou byly proto vzorky připravené podle protokolu IF229 bezpečně naředěny. Jeden způsob zředil původní vzorek 100× (198  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  + 2  $\mu\text{L}$  vzorku), zatímco druhý jej naředil 20× (95  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  a 5  $\mu\text{L}$  vzorku). V obou případech byl dávkovaný objem 2  $\mu\text{L}$ . Následně byl u těchto vzorků sledován vliv redukce pomocí TCEP. V tomto případě bylo smícháno 10  $\mu\text{L}$  vzorku s 10  $\mu\text{L}$  100 mM TCEP (poměr 1:1).

První měření skončilo neúspěchem. Ve výsledných chromatogramech nebylo detekováno nic relevantního. Jednalo se převážně o šum. Příčinou byla pravděpodobně naakumulovaná kontaminace iontového zdroje. Proto bylo provedeno jeho čištění s následnou kalibrací hmotnostního spektrometru. Druhým vysvětlením byl nízký obsah proteinů v naředěných vzorcích. Proto jsme se rozhodli vzorky připravené kolegy ve Fakultní nemocnici již neředit.

Druhé měření, které se zaměřilo na sledování vlivu redukce pomocí TCEP, přineslo uspokojivější výsledky. V tabulce 6 jsou zaznamenány výsledné počty identifikovaných peptidů. Z hodnot lze vyčíst, že nejvyšší počet peptidů byl identifikován u vzorků bakterie *B. subtilis* lyzované difluorocetvou kyselinou (DFA) a kyselinou mravenčí v kombinaci s anhydridem kyseliny octové (FA/AAH). Významný počet peptidů byl také zaznamenán u vzorků připravených v kys. mravenčí s tris(hydroxymethyl)aminomethanem (FA/Tris) a 50% trifluoroethanolem (TFE). Naopak nižší počet peptidů byl zjištěn u vzorků

s kys. trifluoroctovou (TFA) a 6 M guanidinem (Gau). U ostatních vzorků byl zjištěn velmi nízký počet peptidů.

**Tabulka 6 – Počet identifikovaných peptidů u první sady bakterií (*B. subtilis*) po redukci TCEP**

označení vzorku	charakterizace (lyzační činidlo)	počet unikátních peptidů
TFA	100% TFA	234,0
DFA	100% DFA	457,5
FA/AAH	směs kys. mravenčí a acetanhydridu	458,5
FA/Tris	směs kys. mravenčí s tris(hydroxymethyl)aminomethanem	405,0
Ac Acid	100% kys. octová	56,0
Pro Acid	100% kys. propionová	22,0
6M Gua	roztok 6M guanidin chloridu	145,5
6M NaTCA	roztok 6M trichloracetátu sodného	2,5
50% TFE	50% trifluoroethanol	383,0
100% IL	100% 1-ethyl-3-methylimidazolium acetát	23,5
90% IL	90% 1-ethyl-3-methylimidazolium acetát	9,5

#### 4.3.2 Druhá sada vzorků bakterií (IF246)

V rámci druhé sady vzorků byla zopakována příprava tří vzorků z první sady (FA/AAH, FA/Tris a Ac/acid). V rámci měření byla poprvé sledována také míra formylace peptidů v důsledku použití vysoké koncentrace kys. mravenčí. Aby se zamezilo prohledávání exponenciálně zvětšeného prohledávacího prostoru, nejprve bylo provedeno měření vzorků připravených pomocí trypsinu. K analýze vzorků štěpených pomocí trypsinu nebyla zapotřebí subkritická okyselená mobilní fáze.

Jak již bylo dříve uvedeno, trypsin je proteolytický enzym, který štěpí proteiny na menší peptidy. Používá se pro standardní proteomické analýzy. Tato analýza byla v našem případě použita pro omezení FASTA databáze jen na proteiny, které se v bakterii nacházejí ze 100% jistotou. Tato strategie nám umožnila zmenšit teoretický prohledávací prostor a zkrátit tak prohledávací čas a zvýšit pravděpodobnost správné identifikace formylovaných peptidů.

**Tabulka 7 – Počet identifikovaných peptidů *B. subtilis* specificky štěpené pomocí trypsinu**

	počet vybraných fragmentů v DDA metodě	počet unikátních peptidů
<i>B. subtilis</i>	10	2930,5
<i>B. subtilis</i>	15	2493,5

Pro analýzu byly použity dvě DDA metody lišící se počtem vybíraných prekurzorů, buď 10 nebo 15. Z tabulky 7 vyplývá, že bylo nalezeno nejvíce 2930,5 unikátních peptidů. Soubor *B. subtilis* s počtem vybraných fragmentů 10, z důvodu nejvyššího obsahu peptidů, byl použit k vytvoření cílového FASTA souboru. Tento soubor pak sloužil k identifikaci peptidů v nově připravených vzorcích. Dávkovaný objem byl 2  $\mu$ L.

Tabulka 8 obsahuje celkový počet identifikovaných peptidů, a to jak s formylacemi, tak bez nich. Tímto způsobem poskytuje přehled o rozsahu formylací v analýze. Pro bakterie je charakteristické, že většina jejich proteinů má na svých N-koncích N-formylmethionin, který je nezbytný pro zahájení proteosyntézy. Tato modifikace významně ovlivní strukturální uspořádání a funkci proteinů, čímž ovlivňuje jejich aktivitu a interakce s dalšími molekulami. Formylace také ovlivňuje stabilitu proteinů. V našich analýzách však byla formylace sledována z jiného důvodu. Kys. mravenčí je reaktivní činidlo, které může za běžných podmínek formylovat proteiny a peptidy dokonce ve velmi nízkých koncentracích [57]. Taková formylace se může vyskytnout hned na několika místech v peptidech (N-konec peptidu, postranní řetězce lyzinu, serinu a threoninu) a výrazně tak komplikuje vyhodnocování naměřených spekter. Reakce totiž neprobíhá se 100% výtěžností a při hodnocení se musí tedy brát v úvahu jak formylované, tak neformylované formy jednotlivých míst. Při přítomnosti tří potencionálně formylovaných míst v peptidu se tak musí spektrum hodnotit proti 2×2×2 možným kombinacím. Z tohoto důvodu bylo velké úsilí kolegů z Fakultní nemocnice věnováno možnostem, jak tyto formylace potlačit. Výsledky ukazují, že nežádoucí formylace mohou představovat problém ve využití online chemického štěpení v subkritické mobilní fázi a žádné z protipatření tomuto problému nezamezilo.



**Tabulka 8 – Počet identifikovaných peptidů u *B. subtilis* (druhá sada vzorků)**

označení vzorku	charakterizace (lyzační činidlo)	počet unikátních peptidů		
		bez formylací	s formylacemi	jen formylace
FA/AAH	směs kys. mravenčí a acetanhydridu	520	606,5	123
FA/Tris	směs kys. mravenčí s tris(hydroxymethyl)aminomethanem	479,5	527	88
Ac Acid	100% kys. octová	99,5	102	8

### 4.3.3 Třetí sada vzorků bakterií (IF257)

Vzhledem k tomu, že analýza první sady bakterií (IF229) odhalila největší počet identifikovaných peptidů ve vzorcích připravených s lyzačními činidly obsahující kys. mravenčení, deriváty kys. octové a trifluorethanolu, byly tyto roztoky zvoleny pro další přípravu vzorků bakterie *B. subtilis* (IF257). Použití těchto činidel zároveň představovalo potenciální způsob minimalizace nežádoucích formylací. Filtrace vzorků připravených s lyzačním pufrem obsahujícím trifluorethanol byla provedena na základě předchozí, podezřele vysoké výtěžnosti s cílem ověřit, že v minulosti nedošlo k nedostatečné sedimentaci nezlyzovaných bakterií a následnému nadávkování suspenze.

Dávkovaný objem vzorků bakterie *B. subtilis* (50% TFE, FA/AAH a FA/DFA) byl 2  $\mu$ L. Vzorky bakterie lyzované pomocí 100% kyselin (100% TFA, 100% DFA a 100% FA) byly dávkovány v objemu 10  $\mu$ L. V tabulce 9 jsou uvedeny počty identifikovaných peptidů u vzorků bakterie *B. subtilis*.

**Tabulka 9 – Počet identifikovaných peptidů u *B. subtilis* (třetí sada vzorků)**

označení vzorku	charakterizace (lyzační činidlo)	počet unikátních peptidů
50% TFE – normal	50% trifluoroethanol, centrifugace	0
50% TFE – syringe filtr	50% trifluoroethanol, filtrace přes stříkačkový filtr	0
50% TFE – via vials	50% trifluoroethanol, filtrace přes centrifugační filtr	0
FA/AAH	směs kys. mravenčí a acetanhydridu	8
FA/DFA	směs kys. mravenčí a DFA	10
100% TFA	100% TFA	0
100% DFA	100% DFA	2,5
100% FA	100% kys. mravenčí	4

V průběhu experimentu bylo zjištěno, že došlo k záměně bakterie *B. subtilis* za bakterii *E. coli*. Proto byly získaná LC-MS data vyhodnocen znovu v softwaru Byonic pro bakterii *E. coli*. Výsledky vyhodnocení skutečně potvrdily, že došlo k záměně bakterie na straně spolupracovníků z Fakultní nemocnice v Hradci Králové. To znamená, že výsledky jsou mnohem užitečnější a přínosnější, pokud jde o počet identifikovaných peptidů. V tabulce 10 jsou uvedeny počty získaných peptidů po analýze dat s FASTA sekvencemi bakterie *E. coli*. Vzhledem k záměně bakterií nebylo možné potvrdit, zda tato lyzační činidla účinně minimalizují nežádoucí formylace. Také nebylo možné ověřit, zda použití filtrů prokázalo dostatečnou separaci vzorků s trifluoroethanolem z předchozí sady.

**Tabulka 10 – Počet nalezených peptidů u *E. coli* (třetí sada vzorků)**

označení vzorku	počet unikátních peptidů
100% TFA	72
100% DFA	196,5
100% FA	330,5

Z výsledků je patrné, že největší množství identifikovaných peptidů bylo zaznamenáno u vzorku bakterie *E. coli* lyzované 100% kys. mravenčí. Následoval vzorek se 100% DFA a nejméně identifikovaných peptidů bylo zjištěno u vzorku se 100% TFA

#### 4.3.4 Čtvrtá sada vzorků bakterií (IF261)

Vzhledem k tomu, že vzorky bakterií lyzované kys. mravenčí opakovaně poskytovaly vysoký počet identifikovaných peptidů, byly v této sadě použity tři různé koncentrace kyseliny mravenčí s cílem zjistit, jestli snížená koncentrace kys. mravenčí nesníží nežádoucí formylace.

Vzorky bakterie *B. subtilis* lyzovány 75%, 80% a 85% FA byly dávkovány v objemu 20 µL. Analýza nevedla k uspokojivým výsledkům. Výsledné chromatogramy obsahovaly pouze šum a nečistoty z mobilní fáze. Z tohoto důvodu byly připraveny nové mobilní fáze a měření bylo opakováno. Při druhém pokusu byla kromě bakterie *B. subtilis* použita také i bakterie *E. coli*. Zároveň byly k analýze přidány vzorky z předchozích sad. Tabulky 11 a 12 shrnují výsledky analýzy, tedy počet identifikovaných peptidů u bakterií *B. subtilis* a *E. coli*.

**Tabulka 11 – Počet identifikovaných peptidů u *B. subtilis* (čtvrtá sada vzorků)**

označení vzorku	počet unikátních peptidů
75% FA	11
80% FA	9,5
85% FA	12
50% TFE_TCEP	0
50% TFE_normal	0
50% TFE_syringe	0
50% TFE_vials	0
FA/AAH	8
FA/DFA_mixture	7

**Tabulka 12 – Počet identifikovaných peptidů u *E. coli* (čtvrtá sada vzorků)**

označení vzorku	počet unikátních peptidů
75% FA	796,5
80% FA	821
85% FA	899
50% TFE_TCEP	nezbyl vzorek v HPLC vialce
50% TFE_normal	31,5
50% TFE_syringe	27,5
50% TFE_vials	28
FA/AAH	490
FA/DFA_mixture	607

Z výsledků uvedených tabulkách 11 a 12 vyplývá, že tato konkrétní metoda přípravy vzorků prokázala větší účinnost při analýze bakterie *E. coli* oproti *B. subtilis*. Nejvyšší počet peptidů byl identifikován u vzorků připravených v 85%, 80% a 75% kys. mravenčí. Dále byl pozorován vyšší počet identifikovaných peptidů u vzorků obsahující kys. mravenčí s acetanhydridem a směs kys. mravenčí s DFA ve srovnání s ostatními vzorky.

Dále bylo potvrzeno, že u bakterie *B. subtilis* lyzované 50% TFE v předchozích experimentech došlo k nedostatečné sedimentaci a následnému nadávkování suspenze do LC-MS systému. Tento problém byl identifikován použitím filtrů během přípravy vzorků (IF257), které měly za úkol tento nedostatek odhalit. V rámci nechtěného nadávkování bakteriální suspenze bylo odhaleno, že subkritická mobilní fáze dokázala bakterie v suspenzi dokonale dezintegrovat, protože během analýzy nedošlo k ucpání kolony ani k výraznému nárůstu zpětného tlaku v systému.

#### **4.3.5 Pátá sada vzorků bakterií (IF268)**

V předchozím experimentu vzorky lyzované kys. mravenčí prokázaly vysoký počet identifikovaných peptidů. V této sadě bakterií byly proto použity vyšší koncentrace kys. mravenčí s cílem zjistit, zda dojde ke zlepšení výtěžnosti. Dále byla také zahrnuta kys. trifluoroctová, která rovněž poskytovala vysoké hodnoty identifikovaných peptidů.

V této sadě byly použity tři druhy bakterií, a to *B. subtilis*, *E. coli* a *S. aureus*. Všechny tyto bakterie byly připraveny stejně a lyzovány pomocí 100% TFA a 100%, 90% a 85% kys. mravenčí. Vzorky v kys. mravenčí byly připravovány za minimální nemrznoucí teploty: 100% kys. mravenčí za laboratorní teploty, 90% kys. mravenčí při 0 °C a 85% kys. mravenčí při -20 °C. Dávkovaný objem byl 10 µL.

Měření byla opakována za použití filtru Viper Inline Filter s cílem zlepšit spolehlivost naměřených dat. Tento filtr slouží k filtraci vzorků po nadávkování a obecně chrání LC-MS instrumentaci před ucpáním a poškozením způsobeným nerozpuštěnými částicemi ve vzorcích. Výsledná data tak nemohou být ovlivněna nedokonalou sedimentací nezlyzovaných bakterií.

**Tabulka 13 – Počet identifikovaných peptidů u *E. coli* (pátá sada vzorků)**

označení vzorku	počet unikátních peptidů			
	celkový počet peptidů	počet formylací	celkový počet peptidů s filtrem	počet formylací s filtrem
85% FA	958,5	8,0	957,5	8,5
90% FA	985,5	8,5	1033,5	8,5
100% FA	1128,0	19,5	1040,5	14,0
100% TFA	651,0	0,5	0	0

**Tabulka 14 – Počet identifikovaných peptidů u *B. subtilis* (pátá sada vzorků)**

označení vzorku	počet unikátních peptidů			
	celkový počet peptidů	počet formylací	celkový počet peptidů s filtrem	počet formylací s filtrem
85% FA	42	0,5	36	0,5
90% FA	89,5	2,5	67	1
100% FA	238	7,5	213,5	6
100% TFA	253,5	0,5	0	0

**Tabulka 15 – Počet identifikovaných peptidů u *S. aureus* (pátá sada vzorků)**

označení vzorku	počet unikátních peptidů			
	celkový počet peptidů	počet formylací	celkový počet peptidů s filtrem	počet formylací s filtrem
85% FA	120,5	1,0	173,5	2,0
90% FA	221,5	3,0	215,5	3,0
100% FA	237,0	2,5	276,5	3,0
100% TFA	73,5	2,0	0	0

Tento postup přípravy vzorků znovu prokázal vyšší účinnost při identifikaci peptidů bakterie *E. coli* ve srovnání s *B. subtilis* a *S. aureus*. Obecně bylo zaznamenáno více identifikovaných peptidů ve vzorcích obsahující kys. mravenčí než TFA. Výjimkou byla situace u *B. subtilis*, kdy byl počet peptidů při použití TFA vyšší.

Mezi výsledky analýz s filtrem a bez filtru nebyl zaznamenán rozdíl, což naznačuje, že v tomto konkrétním případě nebyl filtr z hlediska výsledků efektivní. Pokud byly vzorky dobře připraveny a neobsahovaly významné množství kontaminantů, vliv filtrace byl zanedbatelný. Výjimkou byly vzorky se 100% TFA, kde nebyly při aplikaci filtru detekovány žádné peptidy. Tento nálezn se nepodařilo uspokojivě vysvětlit.

Z uvedených výsledků se zdá, že snížení koncentrace kys. mravenčí a použití minimální teploty účinně míru nechtěné formylace snížilo.

#### 4.3.6 Šestá sada vzorků bakterií (IF280)

Během analýz předchozích sad vzorků bakterií bylo opakovaně sledováno rychlé znečištění iontového zdroje hmotnostního spektrometru. V dalších experimentech jsme se proto soustředili na možnosti, jak proteiny v lyzátech bakterií přečistit a kontaminaci zdroje omezit.

V šesté sadě bylo zkoumáno přečištění proteinů bakterie *E. coli* lyzované kyselinou mravenčí pomocí extrakce na tuhé fázi při použití silného katexu (SCX, z angl. strong cation exchange). V proteomice se často využívá kombinace SCX chromatografie RPLC-MS k frakcionaci vzorků před jejich vlastní analýzou. SCX separuje peptidy na základě jejich náboje, zatímco RPLC je třídí podle jejich hydrofobicity. Tato kombinace umožňuje lepší identifikaci a kvantifikaci proteinů, včetně těch s posttranslačními modifikacemi a také zajišťuje vyšší rozlišení a citlivost při následné analýze pomocí hmotnostní spektrometrie. Peptidy a proteiny jsou nejprve injikovány do kolony, kde se ionty separují na základě síly jejich náboje. Poté jsou eluovány pomocí mobilní fáze, která mění iontovou sílu nebo pH, čímž se uvolňují molekuly podle jejich náboje.

K vytvoření SCX eluátů byly využity různé koncentrace guanidin hydrochloridu. Jedná se o silné denaturační činidlo, které narušuje strukturu proteinů. Zároveň napomáhá stabilizovat peptidy a proteiny během jejich zpracování. Zároveň nese náboj, a proto jej lze využít při SCX. Na závěr přípravy vzorků byl využit také chlorid draselný, který se pro SCX používá standardně.

V původních SCX eluátech nebyly identifikovány žádné peptidy. V kontrolním vzorku bylo identifikováno 818 a 881 peptidů, takže lyzace proběhla správně. Poté byly z tohoto

kontrolního vzorku vytvořeny SCX eluáty s vyšší koncentrací guanidinu. Dávkovaný objem byl 10 µL.

**Tabulka 16 – Počet identifikovaných peptidů u SCX eluátů bakterie *E. coli* s vyšší koncentrací GuaHCl (šestá sada vzorků)**

označení vzorku	charakterizace	počet unikátních peptidů
1M GuaHCl	frakce eluovaná z SCX 1M guanidinem	34,0
2M GuaHCl	frakce eluovaná z SCX 2M guanidinem	127,5
4M GuaHCl	frakce eluovaná z SCX 4M guanidinem	187,0
6M GuaHCl	frakce eluovaná z SCX 6M guanidinem	4,0
8M GuaHCl	frakce eluovaná z SCX 8M guanidinem	1,5
0,5 M KCl na závěr	frakce eluovaná z SCX 0,5M KCl	0
1 M KCl na závěr	frakce eluovaná z SCX 1M KCl	0

Podle těchto výsledků bylo efektivnější použít vyšší koncentrace guanidinu pro vytvoření SCX eluátů. Nejvyšší počet identifikovaných peptidů byl dosažen při koncentraci 4 M guanidinu. Naopak při koncentracích 6 M a 8 M guanidinu byl zaznamenán nejnižší počet identifikovaných peptidů. Nicméně tento způsob přečištění vzorků nezamezil kontaminaci iontového zdroje, což bylo prvotním smyslem jeho použití. Postup byl proto v další sadě optimalizován.

#### 4.3.7 Sedmá sada vzorků bakterií (IF287)

V této sadě bylo opět sledováno přečištění proteinů bakterie *E. coli* lyzované kys. mravenčí pomocí SCX kolonky. V předchozím experimentu bylo zjištěno, že největší množství peptidů bylo získáno při použití 4 M guanidinu, a proto byla tato koncentrace zvolena pro přípravu vzorku v této sadě. Dále byly připraveny eluáty pomocí kombinace KCl a guanidinu. Dávkovaný objem byl 10 µL. Tabulky 17 a 18 udávají počty identifikovaných peptidů u *E. coli* za použití subkritické okyselené mobilní fáze. V tomto pokusu byly využity opět obě metody štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi s cílem postihnou případný vliv těchto metod při použití komplexního vzorku.

**Tabulka 17 – Počet identifikovaných peptidů u *E. coli* (sedmá sada vzorků) za použití suché lázně**

označení vzorku	charakterizace	počet unikátních peptidů
C	kontrolní vzorek bez SCX	1135
KCl	frakce eluovaná 1M KCl	2
GuaHCl	frakce eluovaná 4M guanidinem	574
GuaHCl/KCl	frakce eluovaná 4M guanidinem s 0,5M KCl	534
GuaHCl/KCl/FA	frakce eluovaná 4M guanidinem s 0,5M KCl a 1% kys. mravenčí	507

**Tabulka 18 – Počet identifikovaných peptidů u *E. coli* (sedmá sada vzorků) za použití blokového termostatu**

označení vzorku	charakterizace	počet unikátních peptidů
C	kontrolní vzorek bez SCX	1256
KCl	frakce eluovaná 1M KCl	3
GuaHCl	frakce eluovaná 4M guanidinem	722
GuaHCl/KCl	frakce eluovaná 4M guanidinem s 0,5M KCl	678
GuaHCl/KCl/FA	frakce eluovaná 4M guanidinem s 0,5M KCl a 1% kys. mravenčí	538

Nejvíce peptidů bylo v obou případech identifikováno v kontrolních vzorcích. Naopak nejméně peptidů bylo nalezeno ve frakci eluované 1M KCl. Při analýze těchto SCX frakcí bylo identifikováno více peptidů při použití blokového termostatu v porovnání se suchou lázní. Nicméně to byl právě tento experiment, který odhalil, že kontaminace v ionizačním zdroji opakovaně pozorovaná během analýz bakteriálních vzorků byla patrně způsobena korodující kapilárou v blokovém termostatu. Toto podezření později Dr. Lenčo potvrdil mimo rámec této diplomové práce.



## 4.4 Využití online štěpení pro rychlou identifikaci bakterií

Aby bylo možné efektivně léčit pacienty, je klíčové správně identifikovat mikroorganismy, které způsobují infekci. Tradiční metody pro identifikaci patogenů zahrnují kultivaci mikroorganismů, sérologické testy a molekulárně biologické techniky, jako je amplifikace nukleových kyselin. Avšak ne všechny bakterie lze efektivně kultivovat v diagnostických laboratořích a amplifikace nukleových kyselin nemusí vždy detekovat nové nebo neznámé patogeny. Z tohoto důvodu byla vyvinuta moderní metoda MALDI-TOF pro rychlou a přesnou identifikaci mikroorganismů, včetně bakterií a plísní. Tato technologie se používá v mikrobiologii a klinických laboratořích [58][59].

V rámci proteomické analýzy se používá jako alternativa k MALDI-TOF online štěpení k analýze proteinových profilů bakterií. Různé bakterie mají specifické proteomové vzory, které mohou být identifikovány a charakterizovány pomocí online štěpení a hmotnostní spektrometrie [58][59].

Online štěpení v kombinaci s chromatografií a spektrometrií umožňuje rychlé a efektivní testování vzorků, což je užitečné při urgentní detekci bakterií v klinických nebo průmyslových prostředích [58][59].

## 5. Závěr

Proteiny jsou z mnoha pohledů velice zajímavé analyty. K jejich analýze se dnes využívají moderní metody analytické chemie. Mezi nimi mají přední postavení kapalinová chromatografie, a především hmotnostní spektrometrie, která v poslední dekádě prodělala velmi dynamický rozvoj. Díky pokroků v této analytické technologii je dnes možné identifikovat z jedné eukaryotní buňky několik tisíc proteinů a takových analýz provádět až několik desítek či stovek denně. V průchodnosti vzorků začíná být hlavní limitací čas potřebný k přípravě vzorků. Na tomto místě je nutné zdůraznit, že příprava vzorků pro proteomické analýzy, tedy štěpení proteinů na peptidy, se standardně provádí přes noc.

V roce 2023 tým Dr. Lenča zjistil, že proteiny lze štěpit chemicky přímo v mobilní fázi klasicky používané pro RPLC peptidů, pokud se zahřeje na 195 °C a proteiny jsou v ní inkubovány po dobu 35 s. Toho lze dosáhnout zahříváním smyčky z kapiláry o vnitřním průměru 0.5 mm instalovanou před chromatografickou kolonu, která vyvíjí dostatečný tlak, aby mobilní fáze zůstal v kapalném skupenství. Proteiny se tak štěpí v subkritické mobilní fázi. Tento způsob rychlé online přípravy vzorků byl úspěšně aplikován např. na rychlou detekci nebezpečného proteinového toxinu ricinu.

Náplní této diplomové práce bylo ověřit, jestli vyvinutá metoda nemůže najít uplatnění i v jiných oblastech, v kterých je analýza proteinů významná. Prvně se jednalo o oblast analýzy protilátkových léčiv, kde by metoda mohla být použita pro rychlé online monitorování produkce bioléciv v bioreaktorech. Experimentální výsledky skutečně potvrdily, že metoda dokáže velice rychle poskytnout informace o téměř celé primární struktuře vybraných protilátkových bioléciv, což může být využito k rychlému potvrzení správné sekvence aminokyselin produkovaného bioléciva. Nicméně kombinace vysoké teploty a nízkého pH kromě štěpení proteinů navozuje také některé chemické změny v postranních řetězcích aminokyselin, jejichž přítomnost u tak striktně kontrolovaných produktů není přípustná. Jejich tvorba během štěpení zamezuje odhalení jejich původu. Z tohoto pohledu je potenciál využití chemického online štěpení v subkritické mobilní fázi v této oblasti spíše omezený.

Jako další oblast pro potencionální využití metody se nabízí rychlá, sekvenčně specifická identifikace bakterií na základě jejich proteinového složení. Aby taková metoda měla smysl, musí být způsob přípravy bakterií velice rychlý a univerzální. Proto se v rámci tohoto možného uplatnění experimenty soustředily na nalezení optimálního způsobu lyzace bakterií, který bude plně kompatibilní s online chemickým štěpením v subkritické okyselené mobilní fázi. Jako nejúčinnější způsoby přípravy bakterií se ukázalo rozpuštění v kyselině mravenčí. Kyselina mravenčí je vysoce účinné a neprávem přehlížené rozpouštědlo pro rozpouštění proteinů. Svoji účinnost prokázalo i na velice odolné bakterii *B. subtilis*.

Kyselina mravenčí má bohužel velice reaktivní molekulu. Dokáže účinně formylovat amino- i hydroxyskupiny na peptidech, což výrazně komplikuje vyhodnocování dat kvůli exponenciálnímu nárůstu prohledávacího prostoru. Z tohoto důvodu byla značné část experimentů věnována možnostem, jak tyto nežádoucí formylace potlačit. Optimalizací rozpouštění bakterií v kyselině mravenčí se podařilo snížit výskyt formylací na peptidech pod hranic 5%, což je velice přijatelná míra.

Aby mohla být metoda chemického online štěpení proteinů v subkritické mobilní fázi široce použitelná, je nutné také vylepšit původní primitivní uspořádání k jeho provádění. Proto bylo v rámci diplomové práce porovnáváno původní provedení s provedením v blokovém termostatu. Nebyly zaznamenány výraznější rozdíly mezi původním a vylepšenou verzí aparatury k chemickému štěpení. Provedení v blokovém termostatu však výrazně zvýšilo bezpečnost metody a celkový dojem z jejího provádění.

V rámci diplomové práce se podařilo vylepšit přístrojové vybavení pro chemické online štěpení proteinů v subkritické mobilní fázi a potvrdit jeho potenciál pro rychlou identifikaci bakterií pomocí spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

## 6. Seznam zkratk

**DDA** – datově závislá analýza (z angl. data-dependent acquisition)

**DIA** – datově nezávislá analýza (z angl. data-independent acquisition)

**FDA** – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)

**FW** – oblast základní struktury

**HPLC** – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)

**IT** – iontová past

**LC** – Kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)

**mAb** – monoklonální protilátka

**MS** – hmotnostní spektrometrie

**NPLC** – chromatografie na normální fázi

**RPLC** – chromatografie na reverzní fázi

**Q** – jednoduchý kvadrupól

**TOF** – hmotnostní analyzátor doby letu

**QqQ** – trojitý kvadrupól

## 7. Seznam obrázků

Obrázek 1 – Vzorce základních aminokyselin .....	13
Obrázek 2 – Kvadrupól .....	22
Obrázek 3 – Orbitrap.....	23
Obrázek 4 – Struktura protilátky.....	26
Obrázek 5 – Schématické znázornění produkce monoklonální protilátky.....	28
Obrázek 6 – Schéma humanizace protilátky.....	29
Obrázek 7 – Chromatogram redukovaného trastuzumabu .....	43
Obrázek 8 – Srovnání LC/MS chromatogramů trastuzumabu po jeho štěpení v subkritické okyselené mobilní fázi pomocí blokového termostatu a suché lázně .....	45

## 8. Seznam tabulek

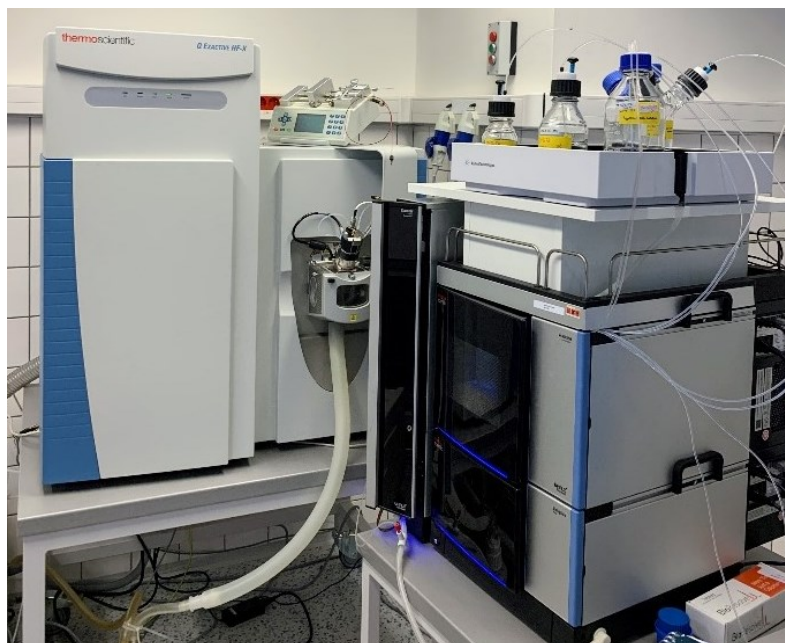
Tabulka 1 – Rozpis reagentů pro přípravu redukovaných protilátkových bioléciv.....	37
Tabulka 2 – Program gradientové eluce pro analýzu redukovaných monoklonálních bioléciv..	39
Tabulka 3 – Nastavení gradientové eluce u analýzy proteinů B. subtilis specificky štěpeného pomocí trypsinu .....	40
Tabulka 4 – Nastavení gradientové eluce u analýzy štěpení bakterií .....	41
Tabulka 5 – Porovnání použití blokového termostatu a suché lázně ke štěpení proteinů v subkritické okyselené mobilní fázi.....	44
Tabulka 6 – Počet identifikovaných peptidů u první sady bakterií (B. subtilis) po redukcii TCEP	47
Tabulka 7 – Počet identifikovaných peptidů B. subtilis specificky štěpené pomocí trypsinu .....	48
Tabulka 8 – Počet identifikovaných peptidů u B. subtilis (druhá sada vzorků).....	49
Tabulka 9 – Počet identifikovaných peptidů u B. subtilis (třetí sada vzorků) .....	50
Tabulka 10 – Počet nalezených peptidů u E. coli (třetí sada vzorků).....	50
Tabulka 11 – Počet identifikovaných peptidů u B. subtilis (čtvrtá sada vzorků).....	51
Tabulka 12 – Počet identifikovaných peptidů u E. coli (čtvrtá sada vzorků).....	51
Tabulka 13 – Počet identifikovaných peptidů u E. coli (pátá sada vzorků).....	53
Tabulka 14 – Počet identifikovaných peptidů u B. subtilis (pátá sada vzorků).....	53
Tabulka 15 – Počet identifikovaných peptidů u S. aureus (pátá sada vzorků).....	53
Tabulka 16 – Počet identifikovaných peptidů u SCX eluátů bakterie E. coli s vyšší koncentrací GuaHCl (šestá sada vzorků).....	55
Tabulka 17 – Počet identifikovaných peptidů u E. coli (sedmá sada vzorků) za použití suché lázně .....	56
Tabulka 18 – Počet identifikovaných peptidů u E. coli (sedmá sada vzorků) za použití blokového termostatu .....	56

## 9. Seznam příloh

Příloha 1 – Q Exactive HF-X mass spectrometer with H-ESI II ion source and Thermo Scientific™ Vanquish™ UHPLC System.....	64
Příloha 2 – Blokový termostat.....	64
Příloha 3 – Příprava suché lázně.....	65
Příloha 4 – Protokol IF229.....	65
Příloha 5 – Protokol IF246.....	66
Příloha 6 – Protokol IF257.....	67
Příloha 7 – Protokol IF261.....	67
Příloha 8 – Protokol IF268.....	68
Příloha 9 – Protokol IF280.....	69
Příloha 10 – Protokol IF287.....	70

## 10. Přílohy

***Příloha 1 – Q Exactive HF-X mass spectrometer with H-ESI II ion source and Thermo Scientific™ Vanquish™ UHPLC System***



***Příloha 2 – Blokovaný termostat***





### Příloha 3 – Příprava suché lázně



### Příloha 4 – Protokol IF229

Každý vzorek byl připraven ze 2 mL bakteriální suspenze (OD kolem 1), peleta byla lyzována ve 100  $\mu$ L činidla při 100 °C/5 min. Následně se vše stočilo při 10000g/5 min a supernatant byl odebrán jako lyzát.

činidla pro lyzu <i>Bacillus subtilis</i>	označení vialek
Trifluorocetová kyselina	TFA
Difluorocetová kyselina	DFA
Kyselina mravenčí/kyselina octová anhydrid (9:1)	FA AAH
Kyselina mravenčí/0,5 Tris	FA Tris
Kyselina octová	Ac acid
Kyselina propanová	Pro acid
6M guanidin thiokynát/200 mM TCEP	6M Guan
6M trichloracetát sodný	6M NaTCA
50% trifluoroethanol	50% TFE
100% 1-ethyl-3-methylimidazolium acetát	100% IL
90% 1-ethyl-3-methylimidazolium acetát	90% IL

## Příloha 5 – Protokol IF246

Bakterie *B. subtilis* byla odebrána z LB agaru a následně byl připraven roztok o koncentraci 1,5 OD v PBS s celkovým objemem 4 mL. Poté byl z tohoto roztoku odebrán 1 mL alikvoty, který byl zcentrifugován při otáčkách 4000g po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla peleta opětovně suspendována ve 200  $\mu$ L PBS a tyto suspenze byly spojeny a znovu zcentrifugovány při 4000g po dobu 5 minut. Lýza byla provedena pomocí TFA, kdy bylo smícháno 30  $\mu$ L pelety se 120  $\mu$ L TFA. Vzniklý lyzát byl ohřán na 70 °C po dobu 5 minut. Po této lýze následovala centrifugace po dobu 5 minut při otáčkách 14000 RPM a vzniklý supernatant byl přenesen do nové zkumavky. Pro neutralizaci TFA v lyzátu bylo přidáno 1200  $\mu$ L 2 M Trizma. 200  $\mu$ g lyzátu bylo přeneseno do 5 mL zkumavky a byla provedena redukce pomocí TCEP s konečnou koncentrací 10 mM při 37 °C po dobu 60 minut.

Poté byla provedena alkylace pomocí 20,5  $\mu$ L 800 mM IAA s konečnou koncentrací 40 mM po dobu 30 minut ve tmě. A následně potlačení IAA opakovaným přidáním TCEP po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Lyzát byl zředěn pomocí 291,5  $\mu$ L TFA/2M Trizma tak, aby dosáhl koncentrace proteinu 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ L a následně bylo přidáno 3638  $\mu$ L vody. Poté bylo přidáno 4  $\mu$ L roztoku trypsin/Lys-C (poměr enzymy k proteinu 1:50) a inkubováno přes noc při 37 °C. Ke štěpení bylo přidáno 87,7  $\mu$ L TFA (cca 2%), a následně bylo provedeno přečištění pomocí Empore C18-SD (4 mm/1 mL). Nakonec byl vzorek vysušen ve vakuovém koncentrátoru speed-vac a skladován při -80 °C.

Činidla pro lýzu <i>Bacillus subtilis</i>	označení vialek
Trifluoroctová kyselina Tris(hydroxymethyl)aminomethan	TFA + Tris

### **Příloha 6 – Protokol IF257**

Byla připravena bakteriální suspenze o koncentraci  $1,00 \pm 0,02$  OD s celkovým objemem 18 mL. Tato suspenze byla přenesena do eppendorfky a následně byla centrifugována při otáčkách 4000 RPM po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a provedena lýza ve 100  $\mu$ L činidla. Poté následovala další centrifugace při otáčkách 14000 RPM po dobu 5 minut a supernatant byl přenesen do nové eppendorfky. Lyzáty byly uchovány do analýzy při  $-80$  °C.

Pro vzorek s činidlem 50% TFE byl supernatant z nové eppendorfky znovu zcentrifugován a poté rozdělen na 3 x 100  $\mu$ L. Jeden vzorek byl ponechán bez dalšího zpracování, druhý byl přefiltrován pomocí stříkačky s filtrem a třetí byl přefiltrován pomocí filtrační nádoby s filtrem.

<b>činidla pro lýzu <i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>označení vialek</b>
Trifluorocotvá kyselina	100% TFA
Difluorocotvá kyselina	100% DFA
Kyselina mravenčí/kyselina octová anhydrid	FA AAH
Kyselina mravenčí	100% FA
Kyselina mravenčí/difluorocotvá kyselina (98:2)	FA/DFA
50% trifluoroethanol	50% TFE
50% trifluoroethanol - syringe filter	50% TFE syringe
50% trifluoroethanol - via vials	50% TFE vials

### **Příloha 7 – Protokol IF261**

Byla připravena bakteriální suspenze o koncentraci  $1,00 \pm 0,02$  OD (minimálně 8 mL). Suspenze byla přenesena do mikrozkušavky. Centrifugace při 4000 RPM po dobu 5 minut. Supernatant byl odsát a peleta vložena do lednice ( $-20$  °C) po dobu 10 minut. Peleta spolu s příslušným lyzačním pufrem byla z ledničky přenesena na led v digestoři. Peleta byla lyzována 100  $\mu$ L pufru. Bylo třeba pracovat rychle na ledu. Lyzáty byly znovu umístěny do lednice na 10 minut. Nakonec bylo přidáno 900  $\mu$ L vody. Centrifugace při 14000 RPM po dobu 5 minut a při pokojové teplotě. Lyzáty byly uchovány do analýzy při  $-80$  °C.

<b>činidla pro lýzu <i>B. subtilis</i></b>	<b>označení vialek</b>
85% kyselina mravenčí	85% FA
80% kyselina mravenčí	80% FA
75% kyselina mravenčí	75% FA

### **Příloha 8 – Protokol IF268**

V tomto postupu byly použity již tři bakterie – *B. subtilis*, *E. coli* a *S. aureus*. Byla připravena bakteriální suspenze o koncentraci  $1,00 \pm 0,02$  OD s celkovým objemem 12 mL. Tato suspenze byla přenesena do mikrokumavky a následně byla centrifugována při otáčkách 4000 RPM po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a provedena lýza ve 100  $\mu$ L činidla. Poté následovala další centrifugace při otáčkách 14000 RPM po dobu 5 minut a supernatant byl přenesen do nové mikrokumavky. Lyzáty byly uchovány do analýzy při  $-80$  °C.

<b>činidla pro lýzu bakterií</b>	<b>označení vialek</b>
Kyselina mravenčí (RT)	95% TFA
Kyselina mravenčí (ice bath)	90% TFA
Kyselina mravenčí (freezer)	85% TFA
Trifluoroctová kyselina (RT)	100% TFA

## Příloha 9 – Protokol IF280

*E. coli* byla odebrána z destičky uchované v lednici. Byla připravena suspenze o koncentraci  $OD\ 1,00 \pm 0,02$  (nejméně 6 mL). Tato suspenze byla přenesena do mikrozkušavky a následně byla centrifugována při otáčkách 4000 RMP po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a provedena lýza v 80  $\mu$ L činidla.

Nejprve byl připraven kontrolní vzorek. K supernatantu bylo přidáno 80  $\mu$ L 100% FA (RT). Zamíchání na vortexu a ponechání 10 minut při pokojové teplotě. Následovalo přidání 320  $\mu$ L  $H_2O$ . Centrifugace při otáčkách 14000 RPM po dobu 5 minut. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky.

Následně bylo přidáno 400  $\mu$ L 20% FA do SCX kolony se sběrnou zkumavkou. Centrifugace při 2000 RPM po dobu 5 min. Poté byl odstraněn odpad. Celý lyzát byl přenesen do kolony a centrifugován při 2000 RPM po dobu 5 min. Tekutina byla přenesena do nové mikrozkušavky, vznikl vzorek FT. Přidáním 400  $\mu$ L 20% FA do kolony, centrifugací 2000g/5 min a přenesením do nové mikrozkušavky vznikl vzorek W1. Stejným postupem vznikl vzorek W2. Nakonec byla přidána jednotlivá eluční činidla. Centrifugace při 2000 RPM po dobu 5 min. Lyzáty byly uchovány do analýzy při  $-80\ ^\circ C$ .

činidla pro lýzu <i>E. coli</i>	označení vialek
100% FA (RT) – control	C
100% FA (RT) + 400 $\mu$ L 20% FA + SCX	FT
100% FA (RT) + 400 $\mu$ L 20% FA + SCX	W1
100% FA (RT) + 400 $\mu$ L 20% FA + SCX	W2
10 mM GuaHCl	10
25 mM GuaHCl	25
50 mM GuaHCl	50
100 mM GuaHCl	100
200 mM GuaHCl	200
400 mM GuaHCl	400
600 mM GuaHCl	600
800 mM GuaHCl	800
1000 mM GuaHCl	1000

### **Příloha 10 – Protokol IF287**

Byla připravena suspenze o koncentraci  $1,00 \pm 0,02$  OD (minimálně 8 mL). Suspenze byla přenesena do mikrozkušavky. Centrifugace při 4000 RPM po dobu 5 min. Následovala resuspendace v PBS a všechny suspenze byly přeneseny do jedné mikrozkušavky. Opět následovala centrifugace. Odsátí supernatantu a lýza v 480  $\mu$ L 100% FA při pokojové teplotě. Promíchání na vortexu a ponechání 10 minut při pokojové teplotě. Přípravení 5 alikvotů po 80  $\mu$ L, do každého z nich bylo přidáno 320  $\mu$ L vody. Centrifugace 14000 RPM po dobu 5 minut. Přenesení do nové mikrozkušavky. Následně byl každý alikvot zpracován jiným způsobem. Jeden alikvot, označený „C“ byl pouze ponechán na ledu do zamrznutí na  $-80$  °C. K dalším alikvotům bylo přidáno 400  $\mu$ L 20% FA na SCX kolonku, centrifugace při 2000 RPM po dobu 5 min. Celé množství lyzátu bylo přeneseno na kolonu a centrifugována při 2000 RPM po dobu 5 min. Odstranění proteklé tekutiny. Následně bylo přidáno 400  $\mu$ L 20% FA na kolonu. Centrifugace při 2000 RPM po dobu 5 min. Odstranění proteklé tekutiny a zopakování. Přenesení SCX kolonky do nové mikrozkušavky. Nakonec bylo přidáno 400  $\mu$ L příslušného činidla. Centrifugace při 2000 RPM po dobu 5 min. Lyzáty byly uchovány do analýzy při  $-80$  °C.

<b>činidla pro lýzu <i>E. coli</i></b>	<b>označení vialek</b>
Kontrolní vzorek	C
1M chlorid draselný	KCl
4M guanidin hydrochlorid	GuaHCl
4M guanidin hydrochlorid/0,5M chlorid draselný	GuaHCl/KCl
4M GuaHCl/0,5M KCl/1% kyselina mravenčí	GuaHCl/KCl/FA

## 11. Použitá literatura

- [1] STOLLAR, Elliott J a David P SMITH. Uncovering protein structure. *Essays in Biochemistry* [online]. 2020, 2020-10-08, **64**(4), 649-680 [cit. 2024-02-20]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20190042
- [2] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. Third edition. Hoboken, [2010]. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [3] Koshland, DE a Haurowitz, . Felix. "protein." Encyklopedie Britannica , 29. ledna 2024. <https://www.britannica.com/science/protein>.
- [4] LENČO, Juraj, Tomáš ŠEMLEJ, Maria A. KHALIKOVA, Ivo FABRIK a František ŠVEC. Sense and Nonsense of Elevated Column Temperature in Proteomic Bottom-up LC–MS Analyses. *Journal of Proteome Research* [online]. 2021, 2021-01-01, **20**(1), 420-432 [cit. 2024-09-13]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.0c00479
- [5] Bílkoviny. In: E-ChemBook [online]. [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://e-chembook.eu/bilkoviny>
- [6] DIMITROV, Dimiter S. Therapeutic Proteins. *Therapeutic Proteins* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 2012-05-24, 1-26 [cit. 2024-09-12]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-920-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-921-1\_1
- [7] NGUYEN, Thoa Thi Kim, Khang-Yen PHAM a Simmyung YOON. Engineered therapeutic proteins for sustained-release drug delivery systems. *Acta Biomaterialia* [online]. 2023, **171**, 131-154 [cit. 2024-09-12]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2023.09.018
- [8] DONG, M. W. HPLC and UHPLC for practicing scientists. Second edition. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2019. ISBN 978-111-9313-762.
- [9] Protein Sample Preparation for Mass Spectrometry. In: *ThermoFisher SCIENTIFIC* [online]. př. n. l. [cit. 2024-09-12]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/sample-preparation-mass-spectrometry.html>

- [10] GUNDRY, Rebekah L., Melanie Y. WHITE, Christopher I. MURRAY, Lesley A. KANE, Qin FU, Brian A. STANLEY a Jennifer E. VAN EYK. Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. 2010, **90**(1) [cit. 2024-09-12]. ISSN 1934-3639. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb1025s88
- [11] NOVÁKOVÁ, Lucie, Pavel SVOBODA a Jakub PAVLÍK. Ultra-high performance liquid chromatography. *Liquid Chromatography* [online]. Elsevier, 2017, 719-769 [cit. 2024-09-12]. ISBN 9780128053935. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805393-5.00029-4
- [12] VITHA, Mark F. Chromatography: principles and instrumentation. New Jersey: John Wiley, [2017]. ISBN 978-111-9270-881.
- [13] VAILAYA, Anant a Csaba HORVÁTH. Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption? *Journal of Chromatography A* [online]. 1998, 829(1-2), 1-27 [cit. 2024-03-20]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)00727-4
- [14] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. Introduction to modern liquid chromatography. Third edition. Hoboken, [2010]. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [15] Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Spojené státy americké: Academic Press, 2005. Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science 1995 - 2006, 6. ISBN 978-012-0885-473.
- [16] GROSS, Jürgen H. Mass spectrometry: a textbook. Third edition. Cham: Springer, [2017]. ISBN 978-3-319-54397-0.
- [17] ISHIKAWA, Masaki, Ryo KONNO, Daisuke NAKAJIMA, et al. Optimization of Ultrafast Proteomics Using an LC-Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with Data-Independent Acquisition. *Journal of Proteome Research* [online]. 2022, 2022-09-02, 21(9), 2085-2093 [cit. 2024-04-14]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.2c00121
- [18] BEKKER-JENSEN, Dorte B., Ana MARTÍNEZ-VAL, Sophia STEIGERWALD, et al. A Compact Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with FAIMS Interface Improves



- Proteome Coverage in Short LC Gradients [online]. 2020, 19(4), 716-729 [cit. 2024-04-14]. ISSN 15359476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.TIR119.001906
- [19] LANE, C. S. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2005, **62**(7-8), 848-869 [cit. 2024-09-12]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-005-5006-6
- [20] CHEN, Chen, Jie HOU, John J. TANNER a Jianlin CHENG. Bioinformatics Methods for Mass Spectrometry-Based Proteomics Data Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(8) [cit. 2024-09-12]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21082873
- [21] SHARMA, Prerna, Rahul V. JOSHI, Robert PRITCHARD, Kevin XU a Maya A. EICHER. Therapeutic Antibodies in Medicine. *Molecules* [online]. 2023, **28**(18) [cit. 2024-02-05]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28186438
- [22] Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. "antibody." Encyclopedia Britannica, March 1, 2024. <https://www.britannica.com/science/antibody>.
- [23] QUINTEROS, Daniela A., José M. BERMÚDEZ, Soledad RAVETTI, Alicia CID, Daniel A. ALLEMANDI a Santiago D. PALMA. Therapeutic use of monoclonal antibodies: general aspects and challenges for drug delivery. *Nanostructures for Drug Delivery* [online]. Elsevier, 2017, 807-833 [cit. 2024-02-12]. ISBN 9780323461436. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-46143-6.00025-7
- [24] STERN, M. a R. HERRMANN. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. 2005, 54(1), 11-29 [cit. 2024-02-08]. ISSN 10408428. Dostupné z: doi:10.1016/j.critrevonc.2004.10.011
- [25] PELTOMAA, Riikka, Rodrigo BARDERAS, Elena BENITO-PEÑA a María C. MORENO-BONDI. Recombinant antibodies and their use for food immunoanalysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2022, 414(1), 193-217 [cit. 2024-02-09]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-021-03619-7
- [26] WILDE, Michelle I. a Karen L. GOA. Muromonab CD3. *Drugs* [online]. 1996, 51(5), 865-894 [cit. 2024-02-05]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-199651050-00010

- [27] BULTAS, CSC, Prof. MUDr. Jan. Monoklonální protilátky v kardiologii – téma stále aktuálnější. *Remedia* [online]. 2015, (26) [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://www.remedia.cz/rubriky/aktuality/monoklonalni-protilatky-v-kardiologii-tema-stale-aktualnejsi-7577/>
- [28] TSURUSHITA, Naoya, Paul R. HINTON a Shankar KUMAR. Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. *Methods* [online]. 2005, 36(1), 69-83 [cit. 2024-02-10]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2005.01.007
- [29] CRESCIOLI, Silvia, Hélène KAPLON, Alicia CHENOWETH, Lin WANG, Jyothsna VISWESWARAIAH a Janice M. REICHERT. Antibodies to watch in 2024. *MABs* [online]. 2024, 2024-12-31, 16(1) [cit. 2024-09-13]. ISSN 1942-0862. Dostupné z: doi:10.1080/19420862.2023.2297450
- [30] SMILEK, P., J. NEUWIRTHOVÁ a CSC K. R. Panitumumab. *Remedia* [online]. 2009 [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://www.remedia.cz/rubriky/aktuality/panitumumab-1181/>
- [31] KLENER, Pavel a Pavel KLENER. Principy systémové protinádorové léčby. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4171-0.
- [32] SICKMIER, E. Allen, Robert J. M. KURZEJA, Klaus MICHELSEN, Mukta VAZIR, Evelyn YANG, Andrew S. TASKER a Nils CORDES. The Panitumumab EGFR Complex Reveals a Binding Mechanism That Overcomes Cetuximab Induced Resistance. *PLOS ONE* [online]. 2016, 2016-9-22, 11(9) [cit. 2024-02-14]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0163366
- [33] KLENER, P. Bevacizumabum. *Remedia* [online]. 2009 [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://www.remedia.cz/rubriky/lekove-profily/bevacizumabum-669/>
- [34] CHRIST, D. a M. CHRISTIE. Structure of Bevacizumab Fab mutant in complex with VEGF. In: *PROTEIN DATA BANK* [online]. 2018 [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/6bft>
- [35] MELICHAR, B. Cetuximab. *Remedia* [online]. 2009 [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://www.remedia.cz/rubriky/lekove-profily/cetuximab-1070/>

- [36] LI, Shiqing, Karl R. SCHMITZ, Philip D. JEFFREY, Jed J.W. WILTZIUS, Paul KUSSIE a Kathryn M. FERGUSON. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* [online]. 2005, 7(4), 301-311 [cit. 2024-02-14]. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2005.03.003
- [37] PALÁCOVÁ, M. Trastuzumab. *Remedia* [online]. 2010, (21) [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://www.remedia.cz/rubriky/lekove-profily/trastuzumab-3225/>
- [38] KATO, Akifumi, Mitsuo KURATANI, Tatsuo YANAGISAWA, et al. Extensive Survey of Antibody Invariant Positions for Efficient Chemical Conjugation Using Expanded Genetic Codes. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2017, 2017-08-16, 28(8), 2099-2108 [cit. 2024-02-13]. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00265
- [39] KOUSAL, B. a B. KALVODOVÁ. Aflibercept z pohledu očního lékařství. *Remedia* [online]. 2014, (25) [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://www.remedia.cz/rubriky/lekove-profily/aflibercept-z-pohledu-ocniho-lekarstvi-6867/>
- [40] WALKER, Adam, Chun-Wa CHUNG, Margarete NEU, et al. Novel Interaction Mechanism of a Domain Antibody-based Inhibitor of Human Vascular Endothelial Growth Factor with Greater Potency than Ranibizumab and Bevacizumab and Improved Capacity over Aflibercept. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2016, 291(11), 5500-5511 [cit. 2024-02-14]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M115.691162
- [41] Structural Biology of Periplasmic Chaperones. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* [online]. 2009, (78), 51-97 [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: doi:10.1016/S1876-1623(09)78003-9
- [42] SU, Yuan, Chuan LIU, Huan FANG a Dawei ZHANG. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories* [online]. 2020, 19(1) [cit. 2024-02-18]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01436-8

- [43] ERRINGTON, Jeffery a Lizah T van der AART. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*. *Microbiology* [online]. 2020, 2020-05-01, 166(5), 425-427 [cit. 2024-02-18]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.000922
- [44] PRAMASTYA, H., Y. SONG, E.Y. ELFAHMI, S. SUKRASNO a W.J. QUAX. Positioning *Bacillus subtilis* as terpenoid cell factory. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2021, 130(6), 1839-1856 [cit. 2024-02-18]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.14904
- [45] RILEY, Lee W. a Ronald E. BLANTON. Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum* [online]. 2020, 2020-12-31, 8(4) [cit. 2024-02-25]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020
- [46] Etymologia: *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2015, 21(8), 1310-1310 [cit. 2024-02-25]. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid2108.ET2108
- [47] MARTINSON, Jonathan N. V., Seth T. WALK a Edward G. DUDLEY. *Escherichia coli* Residency in the Gut of Healthy Human Adults. *EcoSal Plus* [online]. 2020, 2020-12-31, 9(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2020 [cit. 2024-02-28]. ISSN 2324-6200. Dostupné z: doi:10.1128/ecosalplus.esp-0003-2020
- [48] YOSHIMURA, Jumpei, Hiroshi OGURA a Jun ODA. Can Gram staining be a guiding tool for optimizing initial antimicrobial agents in bacterial infections? [online]. 2023, 10(1) [cit. 2024-02-28]. ISSN 2052-8817. Dostupné z: doi:10.1002/ams2.862
- [49] BLOUNT, Zachary D. The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife* [online]. 2015, 2015-03-25, 4 [cit. 2024-02-29]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.05826
- [50] TUTTLE, Amie R., Nicholas D. TRAHAN a Mike S. SON. Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Current Protocols* [online]. 2021, 1(1) [cit. 2024-02-29]. ISSN 2691-1299. Dostupné z: doi:10.1002/cpz1.20
- [51] JENUL, Christian, Alexander R. HORSWILL, Vincent A. FISCHETTI, Richard P. NOVICK, Joseph J. FERRETTI, Daniel A. PORTNOY, Miriam BRAUNSTEIN a Julian I. ROOD. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiology*

- Spectrum [online]. 2019, 2019-04-12, 7(2) [cit. 2024-02-29]. ISSN 2165-0497.  
Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018
- [52] WÓJCIK-BOJEK, Urszula, Barbara RÓŻALSKA a Beata SADOWSKA. Staphylococcus aureus—A Known Opponent against Host Defense Mechanisms and Vaccine Development—Do We Still Have a Chance to Win? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, 23(2) [cit. 2024-04-15]. ISSN 1422-0067.  
Dostupné z: doi:10.3390/ijms23020948
- [53] TURNER, Nicholas A., Batu K. SHARMA-KUINKEL, Stacey A. MASKARINEC, Emily M. EICHENBERGER, Pratik P. SHAH, Manuela CARUGATI, Thomas L. HOLLAND a Vance G. FOWLER. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2019, 17(4), 203-218 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-018-0147-4
- [54] RICK, Wirnt. Trypsin. *Methods of Enzymatic Analysis* [online]. Elsevier, 1974, 1013-1024 [cit. 2024-09-13]. ISBN 9780120913022. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-091302-2.50099-2
- [55] Drawing A Better Map: Recent Advances in Protein Digestion and Peptide Mapping. *LCGC Europe*. 2018, **31**(12), 670-675.
- [56] CAMPERI, Julien, Alexandre GOYON, Davy GUILLARME, Kelly ZHANG a Cinzia STELLA. Multi-dimensional LC-MS: the next generation characterization of antibody-based therapeutics by unified online bottom-up, middle-up and intact approaches. *The Analyst* [online]. 2021, 2021-02-8, **146**(3), 747-769 [cit. 2024-09-13]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/D0AN01963A
- [57] LENČO, Juraj, Maria A. KHALIKOVA a František ŠVEC. Dissolving Peptides in 0.1% Formic Acid Brings Risk of Artificial Formylation. *Journal of Proteome Research* [online]. 2020, 2020-03-06, **19**(3), 993-999 [cit. 2024-09-13]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.9b00823

[58] SINGHAL, Neelja, Manish KUMAR, Pawan K. KANAUIA a Jugsharan S. VIRDI. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, 2015-08-05, **6** [cit. 2024-09-13]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.00791

[59] MORTIER, Thomas, Anneleen D. WIEME, Peter VANDAMME a Willem WAEGEMAN. Bacterial species identification using MALDI-TOF mass spectrometry and machine learning techniques: A large-scale benchmarking study. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. 2021, **19**, 6157-6168 [cit. 2024-09-13]. ISSN 20010370. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2021.11.004