

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Příprava a analýza konjugátu CTX-DFO jako potenciálního nosiče v nukleární medicíně

Petra Miškovičová
Hlavní město Praha

Praha 2021

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Příprava a analýza konjugátu CTX-DFO jako potenciálního nosiče v nukleární medicíně

A preparation and analysis of the CTX-DFO conjugate as a potential carrier in nuclear medicine

Autoři: Petra Miškovičová

Škola: Gymnázium, Praha 2, Botičská 1, Botičská 424, 128 01 Praha 2

Kraj: Hlavní město Praha

Konzultant: Markéta Kleinová, Mgr. Stanislav Luňák

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Praha 3. února 2021

.....
Petra Miškovičová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Oddělení radiofarmak Ústavu jaderné fyziky v Řeži pod vedením prof. Ing. Ondřeje Lebedy, Ph.D., za umožnění přístupu do laboratoří a provádění experimentů. Za vedení práce, pomoc s výběrem tématu a odbornou a metodickou pomoc při jejím zpracování děkuji Markétě Kleinové. Mé poděkování také patří Mgr. Stanislavu Luňákovi za cenné rady a dohled nad zpracováváním práce.

Anotace

Práce se zabývá problematikou přípravy radionuklidového nosiče, který se skládá z cetuximabu a squaramid ester derivátu deferoxaminu ve čtyřech různých molárních poměrech. Cílem práce je ověření neporušenosti struktury molekul cetuximabu po konjugaci se squaramid esterem deferoxaminu v připravených vzorcích a na základě toho stanovení optimálního molárního poměru ke konjugaci a následnému značení. Teoretická část obsahuje shrnutí základních informací o imunitním systému člověka, obecné informace o protilátkách a popis a princip použitých analytických metod (stanovení koncentrace proteinu podle Bradforda, elektroforéza – SDS-PAGE). Po několikanásobné optimalizaci lze konstatovat, že protilátka po konjugaci v žádném ze zvolených molárních poměrů nevykazuje významnější strukturní poškození.

Klíčová slova

nosič radionuklidu, cetuximab, squaramid ester deferoxaminu, metoda podle Bradforda, SDS-PAGE

Annotation

This study analyses the preparation of a radionuclide carrier consisting of cetuximab and squaramid ester derivative of deferoxamine in four different molar ratios. The aim of this work is to verify the structural integrity of the cetuximab molecules after conjugation with squaramide ester deferoxamine in prepared samples, as well as the determination of the ideal molar ratio for conjugation and subsequent labelling based on that. The theoretical part summarises the fundamental information concerning the human immune system, general information about antibodies and a description of used analytical methods (Bradford Protein Assay, electrophoresis – SDS-PAGE). After multiple optimizations of the experiment, it is safe to say that the antibody does not show any significant signs of damage in any of the four molar ratios.

Keywords

radionuclide carrier, cetuximab, squaramide ester derivative of deferoxamine, Bradford Protein Assay, SDS-PAGE

Obsah

1	Úvod	6
2	Přehled literatury	7
2.1	Radiofarmakum	7
2.2	Imunitní systém	7
2.2.1	Nespecifická (vrozená) imunita	7
2.2.2	Specifická (adaptivní) imunita	8
2.2.3	Chemická struktura protilátek	10
2.2.4	Prostorová struktura protilátek	11
2.2.5	Rozdělení a typy protilátek	12
2.2.6	Cetuximab	13
2.3	Chelátor	13
2.4	Stanovení koncentrace proteinu podle Bradforda	14
2.5	Elektroforéza	15
2.5.1	Gelová elektroforéza	15
3	Metodika	17
3.1	Příprava konjugátů	17
3.2	Stanovení koncentrace protilátky podle Bradforda	18
3.3	SDS-PAGE	19
3.3.1	Příprava roztoků pro SDS-PAGE a její průběh	19
3.3.2	Barvení polyakrylamidového gelu	20
4	Výsledky a diskuse	21
4.1	Stanovení koncentrace CTX v konjugátech metodou podle Bradforda	21
4.2	Elektroforéza	22
4.2.1	SDS-PAGE čistého cetuximabu a nimotuzumabu	23
4.2.2	SDS-PAGE konjugátů	23
4.3	Další opakování experimentu	24
5	Závěr	26
6	Seznam literatury	27
7	Seznam obrázků a tabulek	30

1 ÚVOD

Ve své středoškolské odborné činnosti se zabývám problematikou přípravy nosiče pro radionuklid ^{89}Zr . Radionuklid ^{89}Zr je v současné době díky svým specifickým vlastnostem diskutovaným v kapitole Přehled literatury velmi populárním a slibným radionuklidem. Onkologická onemocnění se se zvyšujícím věkem dožití moderní civilizace týkají čím dál vyššího procenta populace. Na tento celospolečenský problém nebylo dosud nalezeno jednoznačně účinné řešení, a proto je třeba tomuto oboru stále věnovat pozornost. Toto téma jsem si zvolila, protože bych se ráda jaderné chemii a radiofarmakům věnovala i v rámci svého vysokoškolského studia.

Příprava konjugátu cetuximabu (protilátka) a squaramid ester derivátu deferoxaminu (chelátor) zahrnuje množství kritických kroků, které mohou vést k poškození molekuly protilátky i samotného chelátoru. Cílem mé práce je stanovit ideální molární poměr obou složek, při kterém dochází k nejmenšímu poškození protilátky, které by mělo negativní vliv na její biologickou funkčnost.

Výsledkem mé práce je chemicky čistý konjugát cetuximabu a squaramid esteru deferoxaminu (dále jen DFO), u kterého je experimentálně potvrzeno zachování strukturní integrity protilátky a je připraven pro ověření zachování biologické aktivity a k následnému značení zirkoniem ^{89}Zr .

Na experimentu jsem pracovala pod vedením Markéty Kleinové v Ústavu jaderné fyziky AV ČR, v. v. i. na Oddělení radiofarmak. Součástí mé středoškolské odborné činnosti není práce se samotným radionuklidem, protože v době psaní práce nejsem podle Vyhlášky o radiační ochraně a zabezpečení radionuklidového zdroje (422/2016 Sb.) způsobilá k manipulaci s radioaktivními látkami. Při zpracovávání literatury jsem pracovala i se zdroji v anglickém jazyce, které jsem překládala sama.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Radiofarmakum

Radiofarmakum je radioaktivní léčivo, které se používá k diagnostice nebo terapii dříve zmíněných onkologických onemocnění. Drtivá většina radiofarmak (95 %) slouží k diagnostickým účelům. Cílicí molekula je při vývoji radiofarmak zvolena podle toho, pro diagnostiku jakého onemocnění a v jaké tkáni nebo orgánu bude využíváno. Molekula se označí vhodným radionuklidem a po podání radiofarmaka pacientovi je emitované záření detekováno pomocí zobrazovacích metod, např. PET (pozitronová emisní tomografie) nebo SPECT (*Single-Photon Emission Computed Tomography*, jednofotonová emisní výpočetní tomografie). (1)

Jedním z nejdůležitějších faktorů při vývoji radiofarmaka na bázi protilátek je, aby farmakokinetika dané protilátky a poločas rozpadu radionuklidu přibližně odpovídaly. Biologický poločas a z něj vyplývající farmakokinetické vlastnosti většiny protilátek se udává v řádu dní. Jedním z radionuklidů, kterými se značí protilátky, je ^{124}I s poločasem rozpadu 4,18 dní. Poločas rozpadu ^{124}I je téměř ideální, ovšem radiační zátěž pro pacienta, náklady na jeho výrobu a nízké rozlišení snímku získaného při diagnostice zobrazovacími metodami omezují vysoký potenciál jeho využití. ^{89}Zr má k výrobě radiofarmak založených na protilátkách také vhodný poločas rozpadu (78,4 hodin), jeho příprava je levnější a rozlišení snímků lepší než při použití ^{124}I . Nejvyšší potenciál ve využití ^{89}Zr mají protilátky, nosičem pro něj ale mohou být i další látky, např. nanočástice nebo peptidy. (2)

V rámci své práce se zabývám pouze přípravou nosiče pro radionuklid, který se skládá z protilátky a chelátoru, a proto se budu v Přehledu literatury dále zabývat touto problematikou.

2.2 Imunitní systém

Imunitní systém (dále jen IS) člověka zahrnuje mnoho typů buněk zajišťujících ochranu organismu před cizorodými strukturami. Základními třemi funkcemi IS jsou:

- tolerance – rozpoznávání a tolerance vlastních buněk organismu,
- dohled – rozpoznávání a likvidace vlastních patologicky změněných (mutovaných), starých a poškozených buněk,
- obranyschopnost – rozpoznávání cizorodých struktur a jejich likvidace. (3) (4)

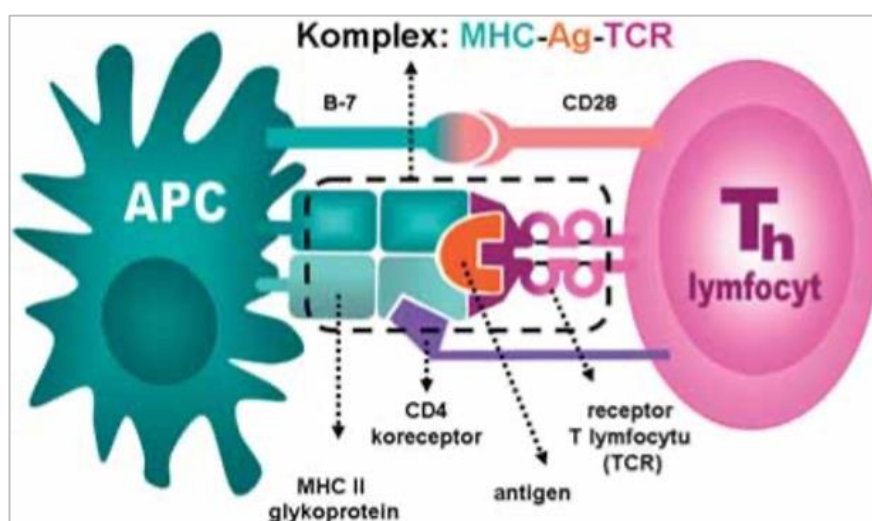
2.2.1 Nespecifická (vrozená) imunita

První reakcí na přítomnost cizorodé struktury v organismu je nespecifická imunitní odpověď. Součástí nespecifické imunity jsou bariéry jako kůže, kyselina chlorovodíková v žaludku nebo sliny. Na buněčné úrovni zajišťují vrozené mechanismy nespecifické imunitní odpovědi buňky,

kteře jsou v organismu již přítomny a jsou aktivovány po kontaktu s patogenem. Jedná se např. o buňky schopné fagocytózy (makrofágy, neutrofilů, dendritické buňky). (4)

2.2.1.1 APC (antigen presenting cells) buňky

Některé buňky nespecifické složky IS mají tzv. schopnost prezentovat antigen. Jedná se například o zmíněné fagocytující makrofágy nebo dendritické buňky. APC buňka patogen rozpozná, pohltí, rozštěpí a jeho fragmenty prezentuje na svém povrchu ostatním buňkám IS skrze glykoproteinovou strukturu MHC (*Major Histocompatibility Complex*) – Obrázek 1. Takto prezentované antigeny jsou rozpoznatelné pro buňky specifické složky IS, zejména B a T lymfocyty. (4)



Obrázek 1 Vazba APC-antigen-T lymfocyt (4)

2.2.2 Specifická (adaptivní) imunita

Druhou složkou IS jsou specifické imunitní mechanismy zajišťované lymfocyty. Zatímco nespecifická imunitní odpověď nastává v řádu hodin, navazující fáze obrany organismu zajišťovaná mechanismy specifické imunity se projeví až po několika dnech. Specifickou imunitní odpověď zajišťují v reakci na přítomnost antigenu B a T lymfocyty – po kontaktu s antigenem dochází k intenzivnímu dělení lymfocytů, proto trvá imunitní odpověď déle než v případě nespecifické imunity.

Antigen je makromolekula, která se svým složením liší od vlastních buněk organismu. Exoantigeny jsou antigeny, které se do organismu dostávají z vnějšího prostředí, např. infekční mikroorganismy. Existují také autoantigeny, které vznikají přímo v organismu.

Na každém antigenu se vyskytuje několik míst, na které se B a T lymfocyty navazují, tzv. epitopů. Po vazbě lymfocytárního receptoru na epitop dochází k aktivaci lymfocytu (u B lymfocytů k následné produkci protilátek). (4)

2.2.2.1 Lymfocyty

Buněčnou (T lymfocyty) a látkovou (B lymfocyty) složkou specifické imunity jsou lymfocyty. Na povrchu lymfocytů se vyskytují receptory BCR a TCR (B/T Cell Receptors) schopné rozpoznávat antigeny. Rozdíl mezi B a T lymfocyty tvoří právě jejich mechanismus rozpoznávání antigenu. B lymfocyty jsou antigeny schopny rozpoznávat přímo, kdežto T lymfocyty rozpoznávají pouze komplex MHC a peptidových fragmentů antigenu. Při rozpoznávání a vazbě antigenu tedy spolupracují s APC buňkami. (4)

2.2.2.2 T lymfocyty

T lymfocyty vznikají v kostní dřeni a dozrávají v brzlíku. V brzlíku prochází nezralé T lymfocyty dvěma typy selekce.

Buňky brzlíku prezentují T lymfocytům prostřednictvím vlastních MHC struktur peptidy, a pokud nejsou T lymfocyty schopny tyto komplexy vázat, zanikají. Tento proces se nazývá pozitivní selekce a vede k apoptóze T lymfocytů neschopných vázat MHC.

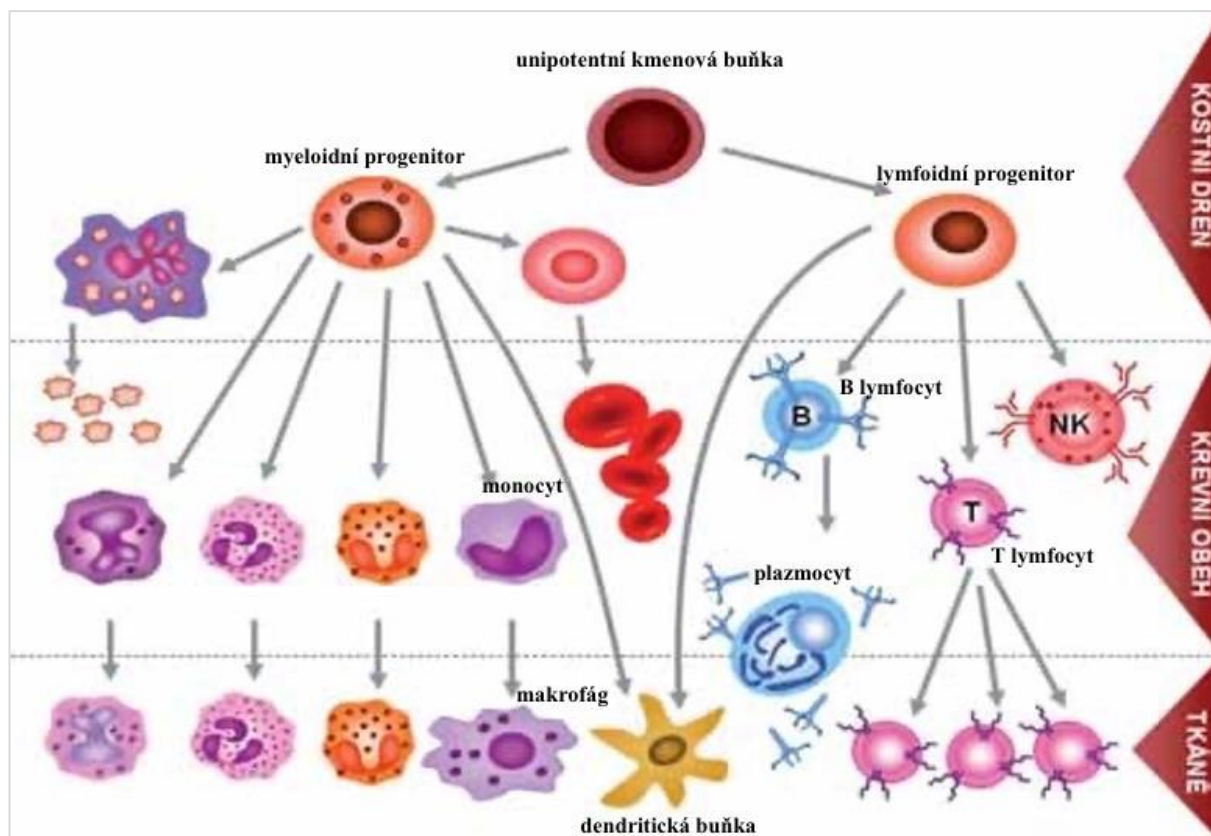
Druhým stádiem selekce je tzv. negativní selekce. Jsou při ní vyloučeny T lymfocyty, které se na MHC molekuly váží příliš silně. Rozpoznávají se takto T lymfocyty, které by potenciálně mohly napadat vlastní buňky organismu a způsobovat autoimunitní reakce. (5)

2.2.2.3 B lymfocyty

B lymfocyty vznikají a dále se vyvíjí v kostní dřeni. Při jejich vývoji dochází ke kombinování velkého množství genových úseků, které kódují polypeptidové řetězce BCR. Velký počet potenciálních kombinací podmiňuje vznik obrovského množství různých variant BCR, tedy klonů B lymfocytů. Zralé B lymfocyty putují z kostní dřene do lymfatických orgánů (slezina, lymfatické uzliny) a než dojde k jejich prvnímu kontaktu s antigenem, označují se jako naivní B lymfocyty.

Po kontaktu BCR s antigenem dochází k aktivaci B lymfocytu. Aktivovaný B lymfocyt se dělí, konečným stádiem jeho diference je vznik plazmatické buňky (plazmocyty) (3) a menšího množství paměťových lymfocytů. Životnost plazmocyty je pouze několik dnů a slouží k intenzivní produkci protilátek. Paměťové lymfocyty jsou při opakovaném kontaktu s daným antigenem schopny rychlejší a efektivnější produkce protilátek. (4)

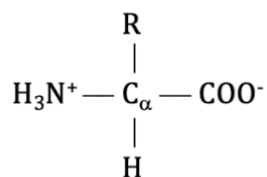
Vznik imunitních buněk zmíněných v této kapitole je znázorněn na Obrázku 2.



Obrázek 2 Schéma vzniku vybraných buněk IS (převzato a upraveno z (4))

2.2.3 Chemická struktura protilátek

Protilátky řadíme mezi proteiny. Jejich základní stavební jednotkou jsou aminokyseliny, deriváty karboxylových kyselin, které ve své molekule obsahují jednu nebo více aminoskupin $-\text{NH}_2$. Dvacet aminokyselin můžeme označit jako standardní, proteinogenní. Obecná struktura těchto dvaceti aminokyselin vypadá následovně:



Obrázek 3 Obecná proteinogenní aminokyselina (zdroj autorka, pokud není uvedeno jinak)

NH_3^+ představuje ionizovanou formu aminoskupiny, $-\text{COO}^-$ ionizovanou karboxylovou skupinu. C_α označuje uhlík karboxylové kyseliny, na kterém je navázána aminoskupina. Jedná se o první uhlík karboxylové kyseliny vůči aminoskupině. Na C_α je také navázán postranní řetězec R, který od sebe jednotlivé aminokyseliny odlišuje.

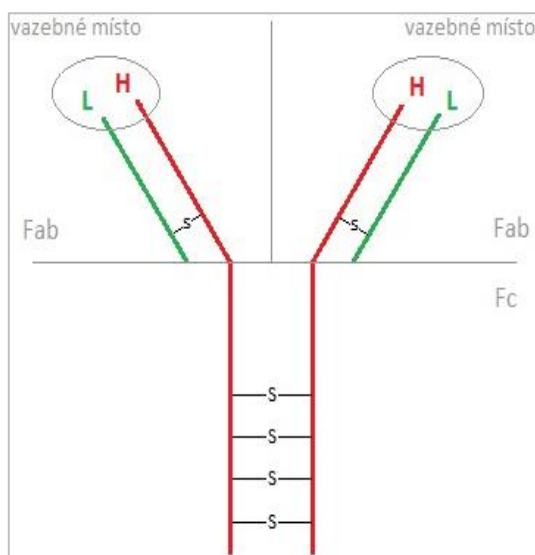
V molekule proteinu spojuje aminokyseliny peptidová vazba, která vzniká prostřednictvím kovalentní vazby mezi $-\text{NH}_3^+$ a $-\text{COO}^-$ skupinami. Spojením dvou nebo více aminokyselin

vzniká peptid. Oligopeptidy obsahují dvě až deset aminokyselin, polypeptidy deset a více. Látky obsahující sto a více aminokyselin se nazývají proteiny. (6)

2.2.4 Prostorová struktura protilátek

Protilátky jsou imunoglobuliny tvořené dvěma lehkými (L, *light*) a dvěma těžkými (H, *heavy*) peptidovými řetězci. (7) Rozlišujeme pět typů těžkých řetězců (α , δ , ϵ , γ , μ) a dva typy lehkých (χ , κ). (3) Každé molekule protilátky náleží dva stejné těžké a dva stejné lehké řetězce. (1)

Lehké a těžké řetězce jsou v molekule protilátky kovalentně spojeny disulfidickými můstky do tvaru písmena Y (Obrázek 4). (1) Molekulu protilátky lze rozčlenit do tří fragmentů. Část, ve které jsou spojeny těžké řetězce, se nazývá Fc (*fragment-crystallizable*) fragment či konstantní oblast. Z Fc fragmentu vychází dvě ramena, na kterých je ke každému těžkému řetězci připojen jeden lehký, tato místa nazýváme Fab (*fragment-antigen binding*) fragmenty. (7) Na koncích Fab fragmentů se nachází vazebné místo, které se označuje jako variabilní oblast. (3)



Obrázek 4 Struktura protilátky

Podle těžkého řetězce se protilátky dělí do pěti tříd (IgA, IgG, IgM, IgD a IgE). (3) Podrobněji jsem se věnovala třídě IgG, do které můžeme zařadit cetuximab, se kterým pracuji, a další čtyři skupiny protilátek jsem stručně shrnula do jednoho odstavce.

2.2.4.1 IgG

Většina protilátek v organismu (70-75 % (8)) patří mezi imunoglobuliny G. (3)

IgG protilátky zprostředkovávají některé obranné mechanismy nespecifické imunity. Jedním z nich je ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) – na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita. (8) Cytotoxickou buňkou je některá z buněk nespecifické imunity, např. NK (*natural-killer*) buňka. Vazbu mezi cytotoxickou buňkou a antigenem zprostředkovává IgG

protilátka. Ta antigen rozpozná, naváže se na něj a její Fc fragment je následně rozpoznán cytotoxickou buňkou, což vede k likvidaci antigenu. (3)

IgG protilátky iniciují také opsonizaci – umožnění (nebo zvýšení účinnosti) fagocytózy. Mechanismus tohoto procesu je analogický k ADCC s rozdílem, že IgG protilátka zprostředkovává vazbu mezi antigenem a fagocytem. (3)

IgG protilátky mohou jako jediné protilátky prostupovat placentární bariérou. (8)

2.2.4.2 IgA, IgD, IgE, IgM

IgA protilátky tvoří okolo 15 % všech protilátek a jsou obsaženy převážně v mateřském mléce, slinách či nosním hlenu. (8) V slizničních sekretech jsou zastoupeny nejvíce ze všech typů protilátek a poskytují první ochranu před požitými a vdechnutými exoantigeny. (9) IgD protilátky jsou v organismu zastoupeny málo. (8) Tvoří receptory pro rozpoznání antigenu na povrchu B lymfocytů. (3) IgE protilátky jsou v organismu nejméně koncentrované. Jejich koncentrace se prudce zvyšuje např. při alergických reakcích. (8) Přecitlivělost vůči neškodným alergenům spojená s produkcí IgE protilátek je označována jako atopie. (3) IgM protilátky se vyskytují ve formě pentameru (8) a stejně jako IgG protilátky mohou iniciovat ADCC. (3)

2.2.5 Rozdělení a typy protilátek

2.2.5.1 Polyklonální protilátky

Imunitní odpovědi založené na protilátkách bývají většinou polyklonální. Jsou při nich produkovány stovky až tisíce druhů imunoglobulinů. Polyklonální protilátky se získávají záměrným vyvoláváním imunitních reakcí u laboratorních pokusných jedinců, kterým je podán antigen nebo směs antigenů a látky způsobující zesílení imunitní odpovědi. Odpověď organismu pokusného jedince je směs různých protilátek specifických proti různým epitopům na povrchu antigenu. Polyklonální protilátky se poté izolují z krevního séra. (4)

Polyklonální protilátky jsou na rozdíl od monoklonálních heterogenní a mají nespecifickou povahu. (1)

2.2.5.2 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou produkovány pouze jedním klonem B lymfocytů. Všechny molekuly jednoho typu monoklonální protilátky jsou identické, mají stejné vlastnosti (10) a schopnost navázat se na jeden konkrétní typ epitopu. (4) V medicíně se tyto protilátky používají od 80. let 20. století. Dají se využít k léčbě různých nemocí, např. astmatu, roztroušené sklerózy, revmatoidní artritidy a onkologických onemocnění. (11)

Při léčbě onkologických onemocnění lze monoklonální protilátku konjugovat s jinými chemoterapeutickými nebo radioaktivními částicemi. Protilátka zajišťuje jejich transport

v organismu pacienta a váže se primárně na cílový antigen, čímž snižuje negativní dopad léčiva na okolní zdravou tkáň. (10)

2.2.5.3 Chimérické protilátky

V klinické praxi se zpočátku používaly myší monoklonální protilátky. Ty v těle pacienta iniciovaly imunitní reakci vůči jim samotným, která vedla k produkci HAMA protilátek (*human anti-mouse antibodies*). V důsledku toho se myší monoklonální protilátky nemohly navázat na antigen. Výsledkem vývoje monoklonální protilátky, na kterou by lidské tělo takto nereagovalo, byly chimérické protilátky. Variabilní oblasti myší protilátky byly ponechány, konstantní oblast myší protilátky byla nahrazena konstantní oblastí adekvátní lidské protilátky. (3) Chimérické protilátky jsou tedy uměle vytvořené protilátky skládající se z částí lidských protilátek a částí protilátek jiného živočišného druhu. (12)

Metodami genetického inženýrství vznikly chimérické protilátky, které jsou přibližně z 35 % myší a z 65 % lidské. Označují se názvy končícími příponou -ximab (např. cetuximab, rituximab). (10) Přípona -mab udává, že se jedná o monoklonální protilátku, a přípona -xi, že jde o chimérickou protilátku. (11)

2.2.6 Cetuximab

Cetuximab je monoklonální chimérická (myší-lidská) protilátka, která je specifická proti receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR – *Epidermal growth factor receptor*). (13) Růstové faktory jsou jedním z typů cytokinů, mediátorů, prostřednictvím kterých se buňky IS dorozumívají. (4) Na fyziologické lidské buňce se nachází 40-100 tis. receptorů epidermálního růstového faktoru. (13) Bylo prokázáno, že buňky mnoha zhoubných nádorů (např. nádory hlavy a krku, vaječníků, slinivky) EGFR exprimují ve zvýšeném množství, a cetuximab je tak má schopnost zacílit. (13) EGFR ovlivňuje množení, migraci a přilnavost buněk, čímž napomáhá růstu a rozvoji nádoru. (14)

Cetuximab je registrován jako léčivý přípravek pod obchodním názvem Erbitux. (14) Používat se začal v kombinaci s chemoterapeutickým léčivem Irinotecan v léčbě metastazujícího karcinomu tlustého střeva a konečníku u pacientů, jejichž stavu samotná chemoterapie nepřinesla zlepšení. (13) Bylo dokázáno, že cetuximab pomáhá obnovit citlivost vůči chemoterapii a radioterapii. (14) Fab fragmenty cetuximabu náleží myší monoklonální protilátce specifické proti EGFR, Fc fragment lidské protilátce třídy IgG. (13) Jako IgG protilátka může zprostředkovávat zánik nádorové buňky prostřednictvím ADCC, účinnost tohoto procesu stoupá s mírou exprese EGFR. (14)

2.3 Chelátor

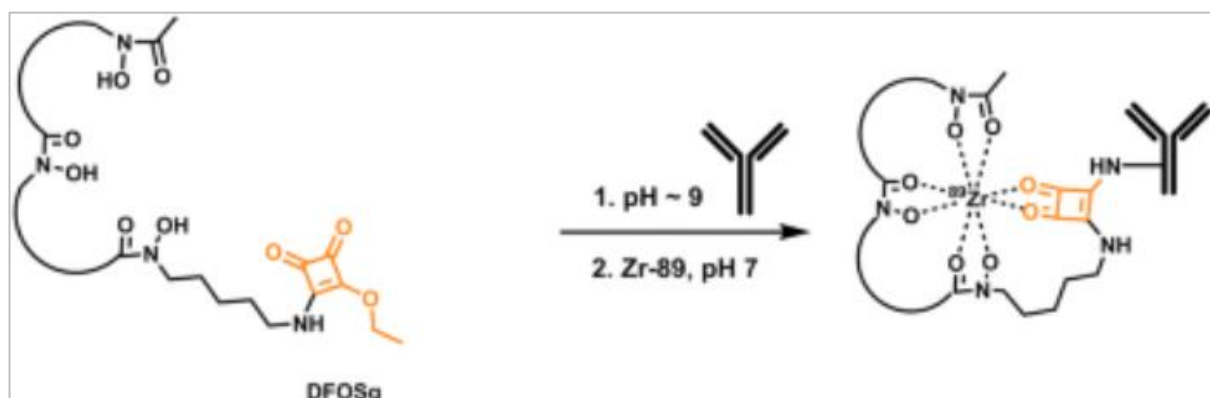
V případě radioaktivně značené protilátky zprostředkovává chelátor vazbu mezi protilátkou a kovovým radionuklidem. (15) Zirkonium je kov ze čtvrté skupiny periodické tabulky a vyskytuje se především jako Zr^{4+} kationt. V minulosti bylo pro vazbu ^{89}Zr

používáno množství chelátorů, z nichž nejvhodnějším se jeví deferoxamin. Deferoxamin patří mezi siderofory, což jsou přirozené chelátory produkované např. bakteriemi. Konjugace deferoxaminu s protilátkou je nejčastěji dosaženo prostřednictvím reakce aminového konce deferoxaminu a lysinového nebo cysteinového aminokyselinového zbytku obsaženého v molekule protilátky. (2)

Kvůli nestabilitě komplexu deferoxaminu a ^{89}Zr může dojít k akumulaci zirkonia v kostech. Squaramid ester deferoxaminu, se kterým pracuji v praktické části práce, vytváří s ^{89}Zr stabilnější komplex. (16)

Chelátor je nejprve konjugován s protilátkou a poté je na něj navázán radionuklid. Konjugace protilátky a chelátoru musí splňovat tři zásadní podmínky. Reakce musí probíhat za podmínek, které nenarušují strukturu protilátky, vazba protilátky a chelátoru musí být za fyziologických podmínek (pH, teplota) stabilní a nesmí ohrozit vaznost a specifitu protilátky. (17)

Konjugát squaramid esteru deferoxaminu a protilátky značený ^{89}Zr je zobrazen na Obrázku 5.



Obrázek 5 Konjugát squaramid esteru deferoxaminu a protilátky značený ^{89}Zr (16)

2.4 Stanovení koncentrace proteinu podle Bradforda

Metoda podle Bradforda je označení pro kvantitativní spektrofotometrickou metodu používanou pro stanovení koncentrace proteinu v roztoku. Principem metody, kterou poprvé popsal Marion M. Bradford v roce 1976, je vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (18) na postranní řetězce některých aminokyselin v molekule proteinu. (6) Při stanovení proteinů metodou podle Bradforda se používá Bradfordovo činidlo obsahující kyselinu fosforečnou, metanol a barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250. (19) Inkubace barviva a molekul proteinu trvá přibližně dvě minuty a vzniklý komplex zůstává v roztoku stabilní přibližně jednu hodinu. (18) Komplex barvivo-protein má modrou barvu, přičemž čím vyšší je koncentrace proteinu v roztoku, tím intenzivnější je i modré zbarvení. (6)

Tato metoda je založena na závislosti absorbance a koncentrace roztoků proteinu. Ze známé koncentrace roztoků proteinu a jejich naměřené absorbance je možné sestavit kalibrační křivku. (18)

2.5 Elektroforéza

Elektroforéza je jednou z elektromigračních separačních metod chemické analýzy. Využívá pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Může probíhat v elektrolytu nebo na nosiči.

Na částici nesoucí náboj (iont) působí po umístění do elektrického pole síla F_e , která je přímo úměrná náboji iontu (Q) a intenzitě elektrického pole (E).

$$F_e = QE$$

Kromě síly F_e působí na iont také síla vnitřního tření F_f , která závisí na viskozitě roztoku (η), poloměru částice (r) a rychlosti pohybu iontu (v).

$$F_f = 6\pi\eta rv$$

Při rovnoměrném pohybu působí tyto dvě síly na iont v opačném směru a jsou v rovnováze. Rychlost v , kterou se iont pohybuje, lze tedy definovat takto.

$$F_e = F_f$$

$$QE = 6\pi\eta rv$$

$$v = \frac{QE}{6\pi\eta r}$$

Rychlost, kterou se iont pohybuje, jestliže je intenzita elektrického pole jednotková, se nazývá elektroforetická pohyblivost. (20)

2.5.1 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza probíhá na nosiči, nejčastěji na polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu. (21) Využívá tzv. síťového efektu, molekuly se při průchodu gelem separují podle své velikosti na základě pórovitosti gelu. (20)

2.5.1.1 Aparatura pro gelovou elektroforézu

Aparatura se skládá ze zdroje stejnosměrného elektrického proudu a elektroforetické vany, ve které je umístěna destička obsahující elektroforetický gel. Destička je ponořena v pufro, který udržuje konstantní pH a umožňuje průchod elektrického proudu.

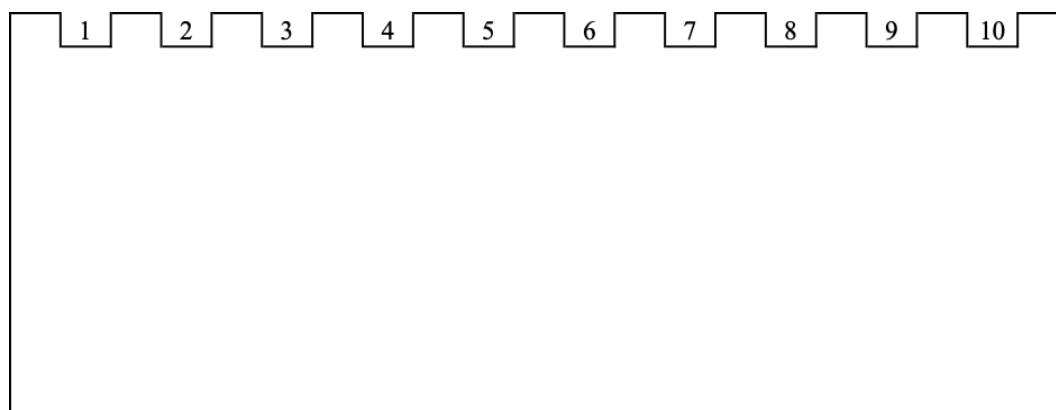
2.5.1.2 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamid gel electrophoresis)

Tato modifikace gelové elektroforézy využívá vazbu dodecylsíranu sodného (SDS) na molekuly protilátek. SDS, který je přidáván do vzorkového pufru, uděluje protilátce záporný náboj a přispívá ke ztrátě jejího prostorového uspořádání. Molekuly protilátky se tak gelem pohybují pouze na základě velikosti (nikoliv tvaru) a záporného náboje. (6)

Do vzorkového pufru lze přidat redukční činidlo (např. 2-merkaptoetanol), jehož působením dochází k redukci disulfidických můstků v molekule protilátky. Protilátka se tak rozdělí na jednotlivé lehké a těžké řetězce. (20)

Roztok proteinu (protilátky) se spolu s elektroforetickým činidlem (vzorkovým pufrem) nanáší do jamek elektroforetického gelu. Jednotlivé molekuly protilátky po zapnutí zdroje stejnosměrného elektrického proudu gelem migrují. (21)

Elektroforetický gel je schematicky zobrazen na Obrázku 6. Čísla označují jeho jednotlivé jamky.



Obrázek 6 Schematické zobrazení deseti jamkového elektroforetického gelu

Proteiny v elektroforetickém gelu se po ukončení elektroforézy fixují fixačním roztokem (např. kyselina trichloroctová). Gel se následně barví barvicím roztokem obsahujícím barvivo Coomassie Blue R-250, metanol, kyselinu octovou a destilovanou vodu. Jelikož se při barvení kromě proteinů zabarví i ostatní části gelu, odbarvuje se gel po obarvení roztokem obsahujícím metanol, kyselinu octovou a destilovanou vodu. (22)

Po obarvení elektroforetického gelu lze na základě vzniklých oddělených zón porovnáním s hmotnostním standardem určit jejich molekulovou hmotnost. (21)

Molekulová hmotnost jednoho těžkého řetězce protilátky je přibližně 50 kDa a molekulová hmotnost jednoho lehkého řetězce protilátky je přibližně 25 kDa. (8)

3 METODIKA

V praktické části své práce jsem se zabývala konjugací cetuximabu (CTX) a DFO. Stanovený reakční objem každého konjugátu byl 0,5 ml. Připravovala jsem čtyři konjugáty s různými molárními poměry CTX a DFO dle následující tabulky.

Tabulka 1 Molární poměr CTX:DFO

číslo konjugátu	molární poměr CTX:DFO	m_{CTX} [mg]	m_{DFO} [mg]
1	1:5	1	0,0243
2	1:10	1	0,0485
3	1:20	1	0,0970
4	1:50	1	0,2430

Z molekulové hmotnosti a hmotnosti CTX jsem spočítala látkové množství CTX, které je ve všech konjugátech stejné. Pomocí příslušného poměru CTX:DFO v příslušném konjugátu jsem získala látkové množství DFO. Hmotnost DFO jsem poté vypočítala pomocí látkového množství a molekulové hmotnosti DFO, vše za užití vzorce:

$$n = \frac{m}{M}$$

$$M_{\text{CTX}} = 145781,60 \text{ g/mol (23)}$$

$M_{\text{DFO}} = 707,36 \text{ g/mol}$ (hodnota ověřená na kapalinovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem v ÚJF)

3.1 Příprava konjugátů

Pro docílení pH vhodného ke konjugaci jsem centrifugací na vivaspinu (10 min, 20 °C, 2000 ot./min) oddělila protilátku od fyziologického roztoku, ve kterém je uchovávána ($c=5 \text{ mg/ml}$). 800 μl roztoku protilátky jsem nanesla do vivaspinu – vialky s filtrem, na kterém se při centrifugaci zachytily molekuly protilátky. Vivaspin jsem promyla 3x 400 μl borátového pufru o pH 9. Výsledný objem roztoku získaného centrifugací jsem doplnila na 400 μl . Získala jsem tak 4 mg protilátky ve 400 μl borátového pufru. Z tohoto objemu jsem napipetovala 100 μl do čtyř vialek.

Zásobní roztok DFO o $c=0,6075 \text{ mg/ml}$ jsem připravila rozpuštěním 2,5 mg DFO ve 4 ml vody a 120 μl dimethylsulfoxidu (DMSO). Tento roztok jsem použila k přípravě 4. konjugátu a k přípravě tří dalších jsem ho naředila borátovým pufrům podle Tabulky 1.

Pro přípravu všech roztoků jsem použila sterilní vodu pro injekci s přídavkem přípravku CHELEX, který na sebe navázal stopová množství kovů obsažených ve vodě, a tak nemohlo dojít k narušení experimentu interakcí chelátoru s těmito kovy. Ze stejného důvodu jsem vše připravovala pouze do plastových zkumavek a nádob a kovové lžičky použité k navažování chemikálií jsem obalila fólií Parafilm.

Samotná konjugace probíhala 12 hodin při laboratorní teplotě.

Po uplynutí této doby jsem z konjugátů odstranila volné molekuly DFO centrifugací na vivaspinu (10 min, 20 °C, 5000 ot./min). Protilátku zachycenou na filtrech vivaspinů jsem promyla dvakrát 400 µl fyziologického roztoku (0,9% NaCl), který jsem připravila rozpuštěním 0,36 g NaCl ve 40 ml vody, a poté obsahy všech vivaspinů převedla do vialek.

3.2 Stanovení koncentrace protilátky podle Bradforda

V připravených konjugátech jsem stanovila přesnou koncentraci CTX. Z ředění výchozího roztoku CTX o koncentraci 5 mg/ml fyziologickým roztokem jsem sestavila kalibrační křivku o šesti bodech (koncentrace 0–500 µg/ml). Výchozí roztok CTX jsem zředila v poměru 1:9, abych získala nejkonzentrovější roztok pro sestavení kalibrační křivky (koncentrace 500 µg/ml). Další čtyři roztoky byly výsledkem ředění dvojkovou řadou, tzn. každý již připravený roztok jsem zředila fyziologickým roztokem v poměru 1:1, koncentrace jednotlivých připravovaných roztoků tedy klesala vždy o polovinu (viz Tabulka 2). Posledním bodem je čistý fyziologický roztok, který je v tabulce uveden jako slepý vzorek.

Tabulka 2 Kalibrační přímka

číslo roztoku pro sestavení kalibrační přímky	koncentrace CTX v roztoku [µg/ml]
slepý vzorek	0,00
1	31,25
2	62,50
3	125,00
4	250,00
5	500,00

Roztoky kalibrační křivky jsem nanášela v tripletech na mikrotitrační destičku, pro zpracování dat jsou triplety vždy zprůměrovány kvůli eliminaci chyb měření. Do každé jamky destičky jsem napipetovala 10 µl kalibračních roztoků a ve stejném množství i čtyři stanovované konjugáty. Do všech jamek jsem přidala 200 µl Bradfordova činidla (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) zředěného v poměru 1:4 vodou.

Následně jsem pomocí spektrofotometru (Sunrise, Tecan) změřila absorbanci záření o vlnové délce 595 nm a hodnoty zpracovávala v programu Microsoft Excel. Každý bod kalibrační křivky vznikl jakožto závislost naměřené hodnoty absorbance na dané hodnotě koncentrace roztoku. Z rovnice regrese grafu jsem poté spočítala koncentraci analyzovaných konjugátů.

3.3 SDS-PAGE

V analýze konjugátů je elektroforéza základním krokem, lze pomocí ní určit míru strukturního porušení molekul protilátky. Na tuto metodu navazují další, např. ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) nebo testy na buněčných kulturách.

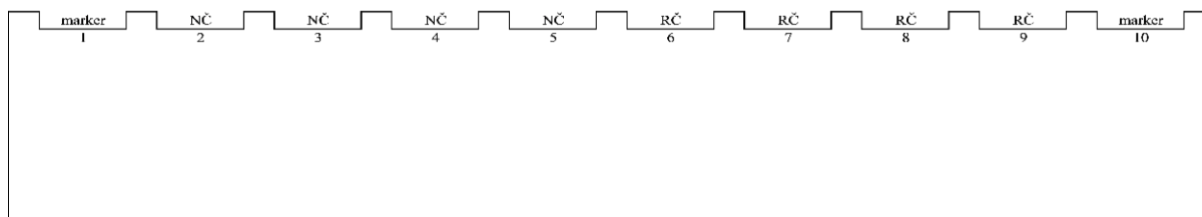
3.3.1 Příprava roztoků pro SDS-PAGE a její průběh

Vzorkový pufr pro elektroforézu jsem připravila smícháním 1,25 ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 2 ml glycerolu, 3,5 ml destilované vody, 2 ml 10% SDS a 0,5 ml bromfenolové modři. Chemikálie jsem přidávala přesně v tomto pořadí, a připravila jsem tak 9,25 ml neredukujícího činidla. Z tohoto objemu jsem odebrala 4,5 ml a přidala k němu 0,237 ml 2-merkaptoetanolu, čímž jsem připravila redukující činidlo.

Do každé jamky polyakrylamidového gelu jsem nanášela 15 μ l roztoku obsahujícího 2 μ g proteinu. Tento roztok obsahoval příslušně zředěný analyzovaný konjugát a vzorkový pufr v poměru 1:1. Každý vzorek jsem analyzovala s neredukujícím a redukujícím činidlem.

Jako elektroforetický pufr jsem použila MOPS SDS Running Buffer (NuPAGE) zředěný vodou v poměru 1:19. Pufr jsem nalila do elektroforetické vany před nanášením roztoků tak, aby byla destička s gelem ponořená.

Do první a desáté jamky polyakrylamidového gelu jsem nanasla 8 μ l markeru (hmotnostního standardu) Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad), do ostatních 15 μ l roztoků (7,5 μ l příslušně zředěného konjugátu + 7,5 μ l činidla) – do druhé až páté jamky analyzované konjugáty s neredukujícím činidlem, do zbývajících čtyř potom s redukujícím činidlem. Rozmístění vzorků při nanášení do gelu je zobrazeno na Obrázku 7. Vzorky jsou označeny poměry protilátky a chelátoru. Ty s neredukujícím činidlem jsou označeny zkratkou NČ a ty s redukujícím zkratkou RČ.



Obrázek 7 Schematické zobrazení nanášení vzorků do polyakrylamidového gelu

Na zdroji stejnosměrného elektrického proudu (Clever Scientific CS-300V) jsem nastavila konstantní napětí 135 V. Podmínky jsem později optimalizovala v závislosti na průběhu experimentu. Předpokládaná doba průběhu SDS-PAGE byla 1,5 hodiny.

3.3.2 Barvení polyakrylamidového gelu

Po ukončení elektroforézy jsem polyakrylamidový gel vyjmula a vložila ho do fixačního roztoku. Následně jsem ho nechala v barvicím roztoku barvit za stálého kývání 20 minut. Po uplynutí této doby jsem obarvený gel dvakrát propláchla odbarvovacím roztokem a poté ho nechala v tomto roztoku ponořený za stálého kývání přes noc.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Experiment jsem prováděla několikrát a v závislosti na jeho průběhu a výsledcích jsem optimalizovala postup uvedený v kapitole Metodika. V této kapitole uvádím experiment a jeho průběh v konečné podobě.

K první změně došlo při přípravě zásobního roztoku DFO. Zásobní roztok jsem používala k přípravě čtvrtého konjugátu a k přípravě ostatních tří jsem ho ředila borátovým pufrům. Mezi jednotlivými konjugáty vlivem tohoto ředění došlo k rozdílu v pH.

Minimalizovala jsme množství použité vody a zásobní roztok DFO jsem připravila tímto způsobem:

1. Rozpustila jsem 2,5 mg DFO v 1 ml vody a 120 μ l DMSO.
2. Do vzniklého roztoku jsme přidala 3 ml borátového pufru.

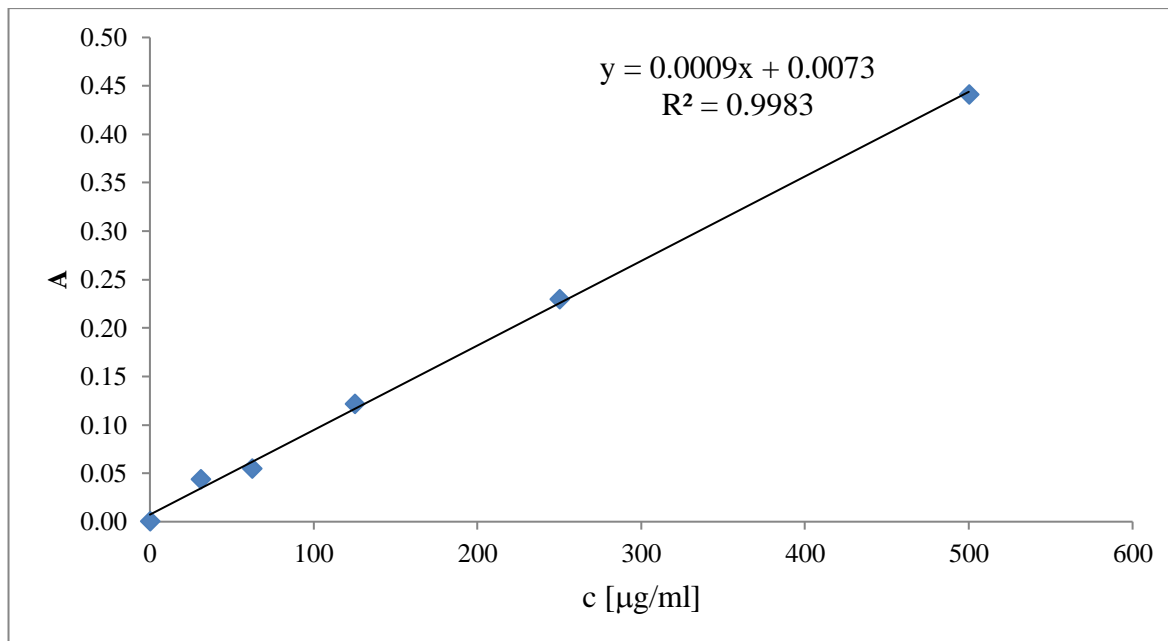
4.1 Stanovení koncentrace CTX v konjugátech metodou podle Bradforda

Na spektrofotometru jsem naměřila hodnoty uvedené v Tabulce 3.

Tabulka 3 Naměřené hodnoty absorbance

koncentrace CTX v roztoku [μ g/ml]	naměřená absorbance
0,00	0,0000
31,25	0,0433
62,50	0,0543
125,00	0,1213
250,00	0,2297
500,00	0,4410

Z těchto hodnot jsem sestavila následující kalibrační křivku (Graf 1).



Graf 1 Kalibrační křivka koncentrace CTX

Předpokládala jsem, že koncentrace CTX v konjugátech přesahuje 500 $\mu\text{l/ml}$, proto jsme provedla analýzu ředěných konjugátů. Každý konjugát jsem zředila v poměru 1:19 fyziologickým roztokem. Po naměření hodnot absorbance konjugátů jsem z rovnice regrese Grafu 1 vypočítala jejich koncentraci.

Tabulka 4 Koncentrace CTX v konjugátech

konjugát	naměřená absorbance ředěného konjugátu	koncentrace CTX v ředěném konjugátu [$\mu\text{g/ml}$]	koncentrace CTX v původním konjugátu [$\mu\text{g/ml}$]
1:5	0,1280	134,11111	2682,22
1:10	0,1247	130,40741	2608,15
1:20	0,1333	140,03704	2800,74
1:50	0,1000	103,00000	2060,00

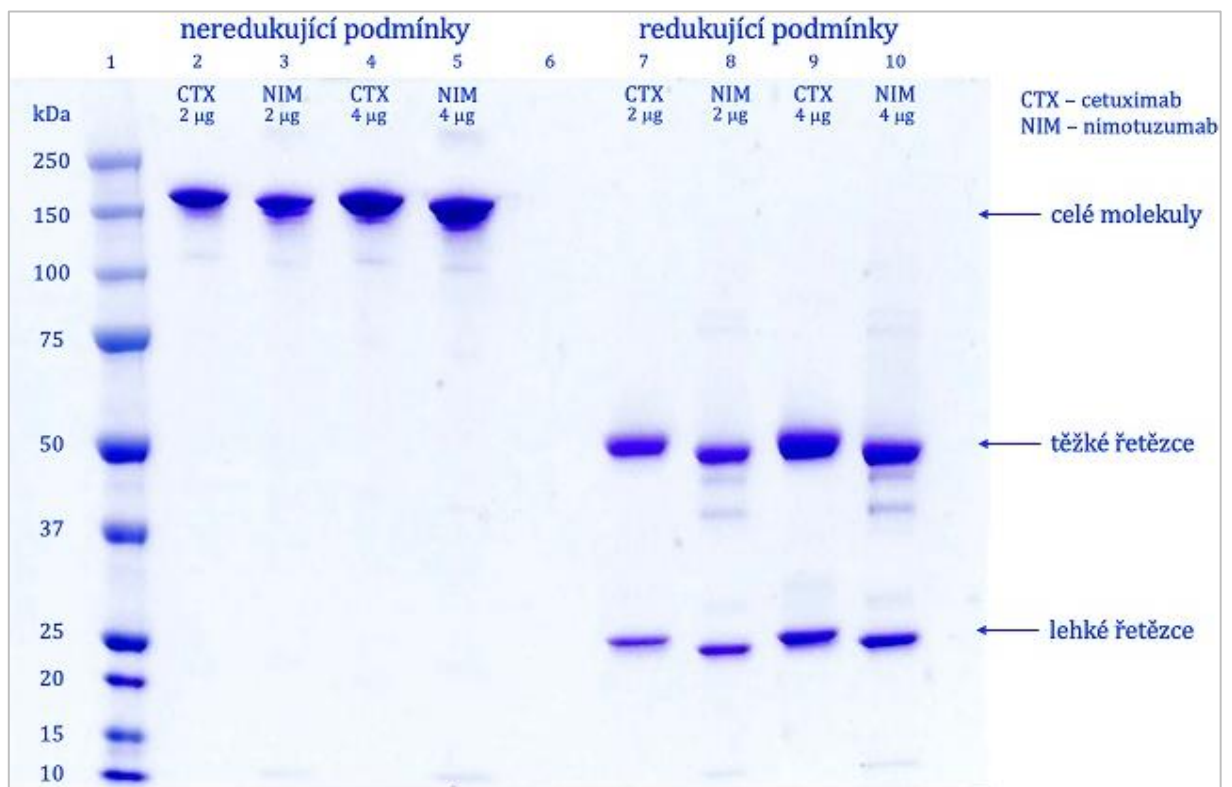
4.2 Elektroforéza

Do elektroforetického gelu jsem marker nanesla pouze do 1. jamky a 6. jamku jsem nechala volnou. Došlo tak k oddělení vzorků s neredukujícím činidlem od těch s redukujícím. 2-merkptoethanol v redukujícím činidle totiž gelem vzlínal a částečně redukoval i nejbližší konjugát s neredukujícím činidlem.

4.2.1 SDS-PAGE čistého cetuximabu a nimotuzumabu

Metoda SDS-PAGE pro cetuximab vychází z již ověřeného postupu SDS-PAGE pro jiný typ monoklonální protilátky, nimotuzumab. Oddělené zóny by v případě obou protilátek měly být stejně lokalizované, protože jejich těžké a lehké řetězce mají přibližně stejnou molekulovou hmotnost. Před analýzou konjugátů jsem tedy nejprve provedla SDS-PAGE čistého cetuximabu v porovnání s nimotuzumabem.

Obě protilátky jsou v gelu naneseny ve dvou koncentracích za účelem ověření, zda jsou zóny při nanesení stanovených 2 μg protilátky dostatečně viditelné.



Obrázek 8 Sken elektroforetického gelu, SDS-PAGE – čistý CTX + NIM

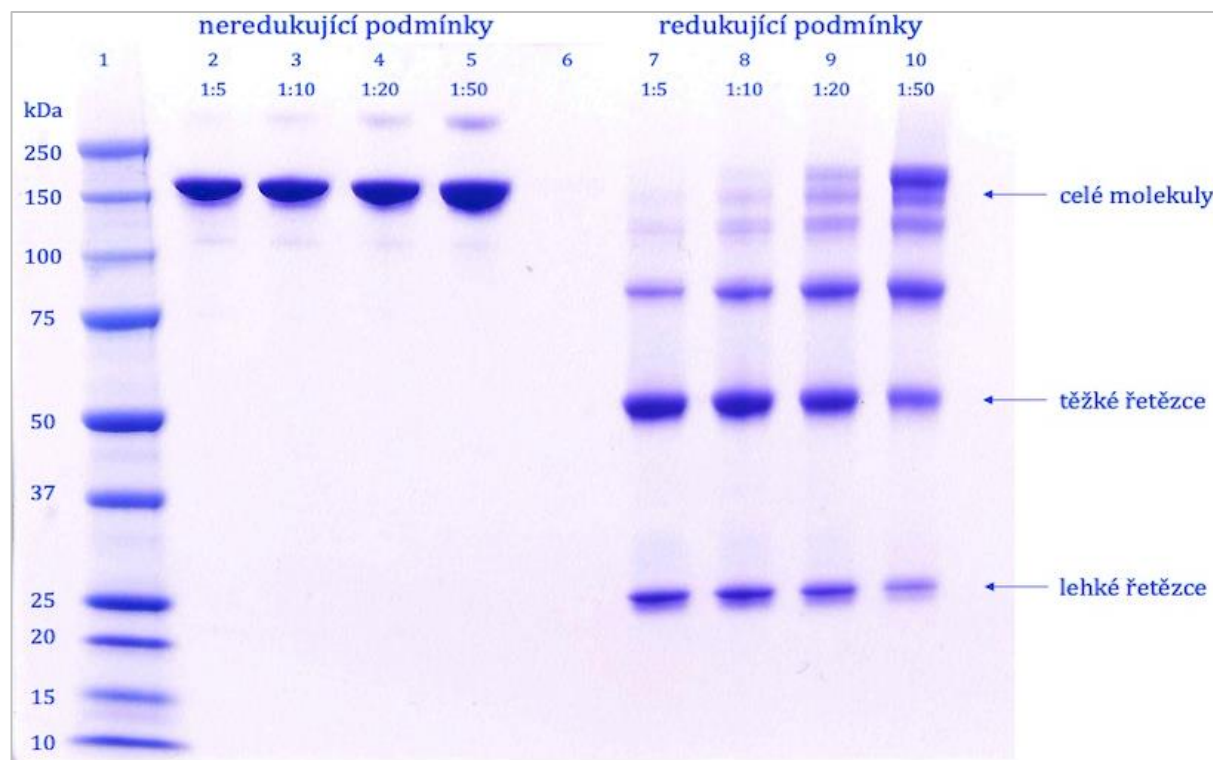
Oddělené zóny jsou v gelu na Obrázku 8 v případě obou protilátek stejně lokalizované. Výsledkem této části experimentu je zjištění, že metoda je na cetuximab přenositelná a nanášet do jamek elektroforetického gelu 2 μg protilátky je dostačující.

4.2.2 SDS-PAGE konjugátů

4.2.2.1 Neredukující SDS-PAGE

Výsledkem neredukující SDS-PAGE (levá část Obrázku 9) jsou oddělené zóny celých molekul protilátky (150 kDa). Na elektroforetickém gelu jsou také viditelné slabé zóny fragmentů cetuximabu o přibližné molekulové hmotnosti 110 kDa. Vyskytují se v zanedbatelném množství.

Výsledkem neredukující SDS-PAGE jsou také zóny o molekulové hmotnosti přibližně 300 kDa, které odpovídají dimerům cetuximabu. Dimery molekul protilátky jsou spojeny nekovalentními interakcemi, k jejichž úplnému porušení by mělo dojít varem. Podle stoupající intenzity těchto zón v závislosti na zvyšujícím se množství DFO v konjugátech lze usuzovat, že do vazby mezi molekulami protilátky zasahuje chelátor a zesiluje ji.



Obrázek 9 Sken elektroforetického gelu, SDS-PAGE – konjugáty

4.2.2.2 Redukující SDS-PAGE

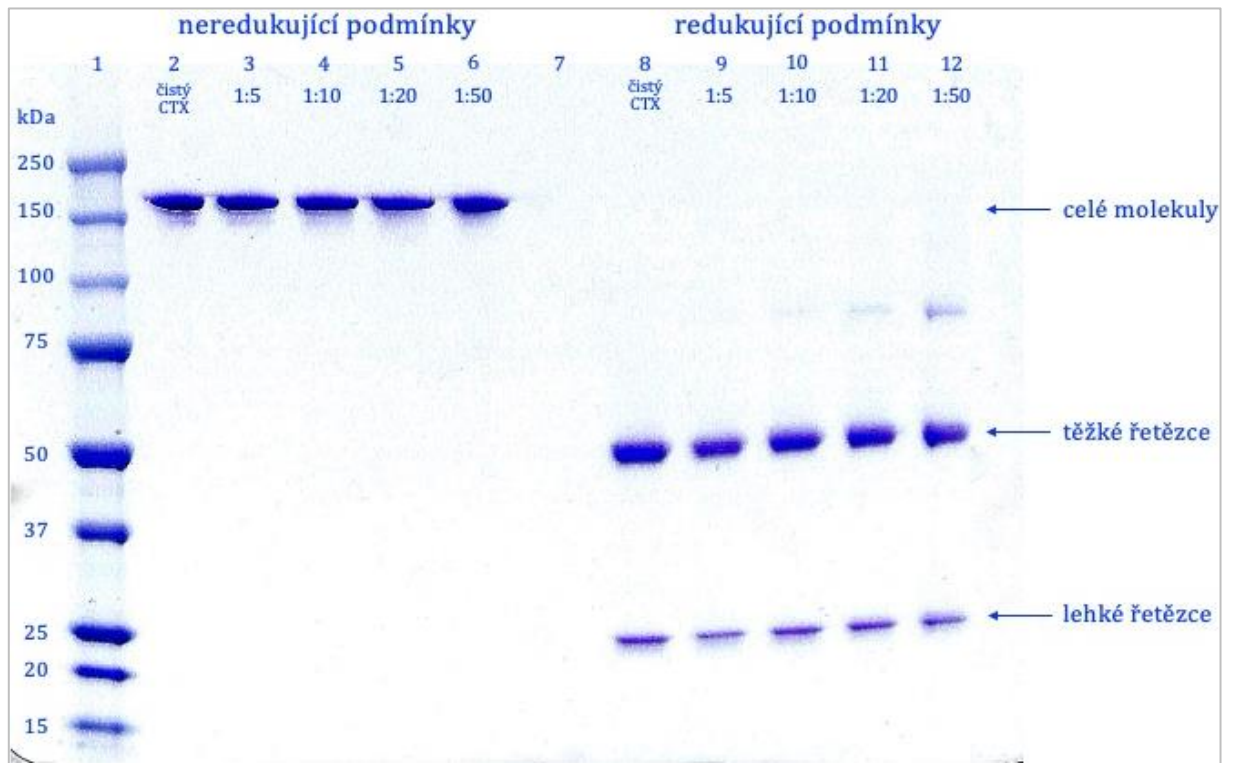
V pravé části gelu na Obrázku 9 můžeme popsat více oddělených zón. Kromě celých molekul cetuximabu jsou zde výrazněji viditelné zóny o molekulové hmotnosti 75 kDa. Tato molekulová hmotnost odpovídá součtu molekulových hmotností jednoho těžkého a jednoho lehkého řetězce protilátky. Jedná se tedy o polovinu molekuly – došlo k redukci disulfidických můstků mezi dvěma těžkými řetězci protilátky, ale disulfidické můstky mezi těžkými a lehkými řetězci zůstaly neporušené.

Redukce cetuximabu v konjugátech neproběhla kvantitativně. Podle zhoršujícího se trendu tohoto jevu lze usuzovat, že redukci protilátky ovlivňoval chelátor.

4.3 Další opakování experimentu

Dalším opakováním experimentu jsem dosáhla výsledku na Obrázku 10. Na tomto elektroforetickém gelu jsou viditelné oddělené zóny dle předpokladu. V neredukující části gelu

se vyskytují zóny odpovídající celým molekulám cetuximabu a v redukující části zóny odpovídající těžkým a lehkým řetězcům cetuximabu.



Obrázek 10 Scan elektroforetického gelu, SDS-PAGE – konjugáty a čistý CTX

Po několikanásobné optimalizaci lze konstatovat, že protilátka po konjugaci v žádném ze zvolených molárních poměrů nevykazuje významnější strukturální poškození.

5 ZÁVĚR

Připravila jsem čtyři konjugáty cetuximabu a squaramid esteru deferoxaminu ve stanovených molárních poměrech obou složek, které jsem následně analyzovala metodou podle Bradforda a pomocí SDS-PAGE. Některé kroky bylo třeba optimalizovat. Konečná podoba experimentů byla stanovena až v jejich průběhu, a mírně se tak liší od předpokládané podoby v kapitole Metodika.

Výsledkem mé práce je zjištění, že vazba se squaramid esterem deferoxaminu strukturně nepoškozuje molekuly cetuximabu. Všechny ze zvolených molárních poměrů protilátky a chelátoru jsou ke konjugaci vhodné.

Na experiment popsaný v mé práci navazuje analýza konjugátů metodou ELISA, která by odhalila případné negativní změny v biologické funkčnosti protilátky, zejména snížení její vaznosti k antigenu EGFR.

6 SEZNAM LITERATURY

1. SAHA, Gopal B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy, Fifth edition*. 5. New York: Springer-Verlag, 2004. ISBN 0-387-40360-4.
2. DERI, Melissa A., Brian M. ZEGLIS, Jason S. LEWIS a Lynn C. FRANCESCONI. PET imaging with ⁸⁹Zr: From radiochemistry to the clinic. *Nuclear Medicine and Biology* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2013, **40**(1), 3-14 [cit. 2019-12-30]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096980511200220X>
3. VRÁNA, Aleš, Ivana FELLNEROVÁ a Jarmila VRÁNOVÁ. *Imunologie a imunomodulační terapie* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011 [cit. 2020-01-03]. ISBN 978-80-244-2748-5. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/fyziolmed/images/files/Publikace_Imunologie_Olomouc2011.pdf
4. HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie: 6., aktualizované vydání*. 6. Praha: TRITON, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
5. HAGEL, Kimberly. Positive and Negative Selection of T Cells. In: *Immunobites* [online]. 2018-08-20 [cit. 2020-11-17]. Dostupné z: <https://immunobites.com/2018/08/20/positive-and-negative-selection-of-t-cells/>
6. KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
7. ZHIQIANG, An. *Therapeutic monoclonal antibodies: From bench to clinic*. Spojené státy americké: John Wiley, 2009. ISBN 978-0-470-11791-0.
8. DUTTA, Sanchari Sinha. Types of Antibodies. *News Medical: Life sciences* [online]. 2018-12-20 [cit. 2019-10-22]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Types-of-Antibodies.aspx>
9. WOOF, Jenny M. a Michael A. KERR. IgA function – variations on a theme. *Immunology* [online]. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2004, **113**(2), 175–177 [cit. 2019-12-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1782559/>
10. BAYER, Virginia. An Overview of Monoclonal Antibodies. *Seminars in Oncology Nursing* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2019, **35**(5) [cit. 2019-11-22]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749208119301093?via%3DiHub#>
11. MALÍČKOVÁ, Karin. Terapeutické monoklonální protilátky v klinické laboratoři. *Klinická biochemie a metabolismus: časopis České společnosti klinické biochemie* [online]. Praha: Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 2017, **25**(46), 101-107 [cit. 2019-12-29]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2017/2017-3/KBM_3_2017_Malickova.pdf
12. LIDDELL, Eryl. 3.1 Antibodies. WILD, David G. *The Immunoassay Handbook* [online]. 4. Velká Británie: Elsevier, 2013, s. 245-265 [cit. 2020-06-06]. ISBN 978-0-08-097037-0. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080970370000178?via%3Dihub>

13. WONG, Siu-fun. Cetuximab: An Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody for the Treatment of Colorectal Cancer. *Clinical Therapeutics* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2005, **27**(6), 684-694 [cit. 2019-11-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16117976>
14. LENZ, Heinz-Josef. Cetuximab in the management of colorectal cancer. *Biologics: Targets & Therapy* [online]. Macclesfield: Dove Medical Press, 2007, **1**(2), 77-91 [cit. 2019-11-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2721306/>
15. ROUSSEAU, Julie, Zhengxing ZHANG a kol. Synthesis and evaluation of bifunctional tetrahydroxamate chelators for labeling antibodies with ⁸⁹Zr for imaging with positron emission tomography. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2018, **28**(5), 899-905 [cit. 2019-12-31]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29426769>
16. CHOMET, Marion, Maxime SCHREURS a Maria J. BOLIJN. Head-to-head comparison of DFO* and DFO chelators: selection of the best candidate for clinical ⁸⁹Zr-immuno-PET. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* [online]. 2020, **47**(11) [cit. 2020-11-21]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00259-020-05002-7#citeas>
17. MORAIS, Mauricio a Michelle T. MA. Site-specific chelator-antibody conjugation for PET and SPECT imaging with radiometals. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2018, **30**, 91-104 [cit. 2019-12-31]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174067491830043X?via%3Dihub>
18. BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry* [online]. Amsterdam: Elsevier, 1976, 1976-01-29, **16**(72), 248-254 [cit. 2019-12-28]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>
19. BIO-RAD LABORATORIES, INC. QuickStart Bradford Protein Assay: Instruction Manual. In: *BIO-RAD* [online]. Hercules: Bio-Rad Laboratories, 2019 [cit. 2019-12-29]. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>
20. KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2006. ISBN 978-80-7080-586-2.
21. KOŽUSZNIKOVÁ, Eliška. *Gelová elektroforéza ve výuce analytické chemie*. Brno, 2014. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie. Vedoucí práce RNDr. Marta Farková, CSc.
22. WESTERMEIER, Reiner a Rita MAROUGA. Protein Detection Methods in Proteomics Research. *Bioscience Reports* [online]. Berlín: Springer Science+Business Media, 2005, **25**(1), 19-32 [cit. 2019-12-31]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222417>

23. HÜBNER, Juliane, Marian RASCHKE Isabel RÜTSCHLE a kol. Simultaneous evaluation of anti- EGFR-induced tumour and adverse skin effects in a microfluidic human 3D co-culture model. *Scientific Reports* [online]. Londýn: Nature Publishing Group, 2018, **8**(15010) [cit. 2021-01-08]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598>

7 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 Vazba APC-antigen-T lymfocyt (4).....	8
Obrázek 2 Schéma vzniku vybraných buněk IS (převzato a upraveno z (4)).....	10
Obrázek 3 Obecná proteinogenní aminokyselina (zdroj: autorka, pokud není uvedeno jinak)	10
Obrázek 4 Struktura protilátky	11
Obrázek 5 Konjugát squaramid esteru deferoxaminu a protilátky značený ⁸⁹ Zr (16)	14
Obrázek 6 Schematické zobrazení deseti jamkového elektroforetického gelu.....	16
Obrázek 7 Schematické zobrazení nanášení vzorků do polyakrylamidového gelu.....	20
Obrázek 8 Sken elektroforetického gelu, SDS-PAGE – čistý CTX + NIM.....	23
Obrázek 9 Sken elektroforetického gelu, SDS-PAGE – konjugáty.....	24
Obrázek 10 Scan elektroforetického gelu, SDS-PAGE – konjugáty a čistý CTX	25
Tabulka 1 Molární poměr CTX:DFO	17
Tabulka 2 Kalibrační přímka	18
Tabulka 3 Naměřené hodnoty absorbance.....	21
Tabulka 4 Koncentrace CTX v konjugátech.....	22