

SMLOUVA O VÝVOJI KLINICKÝCH TESTŮ

Smluvní strany:

BioVendor – Laboratorní medicína, a.s.

se sídlem: Karásek 1, 621 00 Brno

IČO: 63471507

DIČ: CZ63471507

zapsaná v obchodním rejstříku u Krajského soudu v Brně, odd. B, vložka 3917

zastoupená MUDr. Viktorou Růžičkou, předsedou představenstva

(dále jen „**společnost BioVendor**“)

a

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

se sídlem: Praha 4, Vídeňská 1083, PSČ 142 20

IČO: 61388971

DIČ: CZ61388971

zapsaný v rejstříku veřejných výzkumných institucí vedeném Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy

bankovní spojení: 2246660227/0100

jednající prof. RNDr. Martinem Bilejem, DrSc., ředitelem

(dále jen „**MBÚ**“)

vzhledem k tomu, že dospěly k úplnému konsensu v dále uvedených skutečnostech, rozhodly se uzavřít tuto

smlouvu o vývoj klinických testů:

1. Úvodní ustanovení

1 Vzhledem k tomu, že

- a) Společnost BioVendor je biotechnologická společnost vyvíjející nové klinické testy vhodné pro in vitro diagnostiku a aktivně hledá nové oblasti a technologie pro budoucí adaptaci do diagnostiky, a
- b) **Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.** aktivně vyvíjí technologii pro afinitní chromatografii a obohacování biologicky zajímavých látek pomocí techniky Direct Immuno-Affinity Desorption/Ionization (DIADI), a tedy
- c) Společnost BioVendor má zájem na společném vývoji klinických testů, které budou založeny na hmotnostně spektrometrické detekci imunoafinitně nabohacených antigenů z tělních tekutin,

dohodly se strany na provedení činností, jak jsou popsány dále v této smlouvě.

2. Předmět smlouvy

2.1 MBÚ se zavazuje provést pro Společnost BioVendor sérii experimentů, které prozkoumají možnosti a potenciál aplikace imobilizace protilátek technikou

reaktivního přistávání iontů na vodivé a polovodivé povrchy. Pro tento účel bude využito zmlžovací, ionizační a depoziční zařízení, které bylo na MBÚ vyvinuto pro imobilizaci oxidů titánu a zirkonia. V projektu, který je předmětem této smlouvy, se budou s využitím stejného zařízení charakterizovat klíčové aspekty reaktivního přistávání protilátek. Zároveň MBÚ provede srovnání efektivity imunoafinitního nabohacení antigenu z tělních tekutin metodou reaktivního přistávání iontů s technikou iMALDI, která využívá kovalentní imobilizaci protilátky na magnetické kuličky. MBÚ se zavazuje k provedení výše zmíněných experimentů, sběru dat z těchto experimentů, jejich analýzu, vyhodnocení a přehledné zpracování (grafy, tabulky a vysvětlující text). MBÚ se dále zavazuje provést a dodat experimentálně prověřenou analýzu tělních tekutin technikou imobilizaci protilátek reaktivním přistáváním - práce zahrnuje přípravu vodivých povrchů funkcionalizovaných protilátkami a testování jejich schopností selektivně navázat a zkoncentrovat sledovaný antigen z tělních tekutin. MBÚ zároveň provede ověření nově vyvinutých technik standardními přístupy (western blot, ELISA/Elispot, nativní elektroforesa a jiné) a detekci selektivně nabohaceného antigenu hmotnostní spektrometrií. Přesná technická specifikace činností MBÚ na vývoji klinických testů pro společnost BioVendor dle této smlouvy (dále jen „Vývoj“) je uvedena v Příloze č. 1. MBÚ předá výsledky Vývoje společnosti BioVendor a BioVendor zaplatí za provedení Vývoje odměnu ve výši a způsobem uvedeným v této smlouvě.

- 2.2 MBÚ se zavazuje zahájit provádění Vývoje do 1 týdne po uzavření smlouvy a dokončit je, včetně předání závěrečné zprávy, nejpozději do **30. 6. 2019**.
- 2.3 Vývoj bude prováděn v laboratořích MBÚ na adresách Vídeňská 1083, Praha 4 a BIOCEV, Průmyslová 595, Vestec u Prahy. Vývoj budou za MBÚ provádět následující vědečtí pracovníci: RNDr. Petr Novák, Ph.D., RNDr. Petr Pompach, Ph.D., Michael Volný, Ph.D., Ing. Jana Nováková, Mgr. Petra Darebná a Mgr. Michal Rosůlek (dále jen „Výzkumný tým“). Změna v personálním složení Výzkumného týmu je možná pouze ze závažných důvodů, společnost BioVendor musí být vždy o takovéto změně v obsazení Výzkumného týmu písemně informována a bude vždy udělovat souhlas s každým novým pracovníkem navrženým do Výzkumného týmu.
- 2.4 Dílčí výsledky Vývoje shrnující stav projektu a dosažené výsledky (dále jen „Dílčí výsledky Vývoje“) budou předány společnosti BioVendor formou písemné zprávy v elektronické podobě vždy za kalendářní čtvrtletí, a to do deseti (10) dnů po skončení kalendářního čtvrtletí, za které jsou předávány. Jednou za kalendářní čtvrtletí bude také pořádán společný seminář zástupců MBÚ a společnosti BioVendor, na kterém bude upřesněn další postup (z jednání bude vždy pořízen zápis, odsouhlasený oběma stranami). Předání Dílčích výsledků Vývoje ke konci kalendářního roku bude podkladem pro vystavení jednotlivých faktur dle článku 3 smlouvy.
- 2.5 MBÚ bere na vědomí a souhlasí s tím, že výsledky Vývoje mohou být ze strany společnosti BioVendor použity jako podpůrná dokumentace, která se bude přikládat k žádosti o registraci diagnostické soupravy, dle příslušných právních předpisů, která byla nebo stále je předmětem laboratorního vývoje prováděného MBÚ dle této smlouvy.

3. Odměna a platební podmínky

- 3.1 Společnost BioVendor se zavazuje zaplatit MBÚ za činnost dle této smlouvy odměnu v celkové výši **2,700,000,- Kč** (slovy: dva miliony sedm set tisíc korun českých) + DPH v zákonné výši („Odměna“).

Odměna bude zaplacená na základě dílčích faktur s náležitostmi daňového dokladu vystavených MBÚ, a to ve čtyřech částech.

- a) fakturu na první část ceny ve výši **600.000,- Kč** (slovy: šest set tisíc korun českých) + DPH v zákonné výši je MBÚ oprávněn vystavit po uzavření této smlouvy;
 - b) fakturu na druhou část ceny ve výši **800.000,- Kč** (slovy: osm set tisíc korun českých) + DPH v zákonné výši je MBÚ oprávněn vystavit po předání Dílčích výsledků Vývoje společnosti BioVendor k 31.1. 2017;
 - c) fakturu na třetí část ceny ve výši **800.000,- Kč** (slovy: osm set tisíc korun českých) + DPH v zákonné výši je MBÚ oprávněn vystavit po předání Dílčích výsledků Vývoje společnosti BioVendor k 31.1. 2018.
 - d) fakturu na čtvrtou část ceny ve výši **500.000,- Kč** (slovy: pět set tisíc korun českých) + DPH v zákonné výši je MBÚ oprávněn vystavit po předání Dílčích výsledků Vývoje společnosti BioVendor k 31.1. 2019.
- 3.2 MBÚ podpisem této smlouvy potvrzuje, že bankovní účet MBÚ uvedený v záhlaví této smlouvy je účtem, který je podle § 96 zákona č. 235/2004 Sb. o dani z přidané hodnoty, v platném znění, zveřejněn správcem daně způsobem umožňujícím dálkový přístup, tj. jako údaj v Registru plátců DPH (dále jen „**Registrovaný účet**“). MBÚ podpisem této smlouvy dále potvrzuje, že faktury jím vystavené na základě této smlouvy budou obsahovat pouze Registrovaný účet, nebude-li mezi Smluvními stranami výslovně sjednáno jinak.
- 3.3 V případě, že kterákoliv faktura nebude splňovat výše uvedené zákonné náležitosti nebo bude obsahovat nesprávné nebo nedostatečné údaje nebo jiný bankovní účet než je Registrovaný účet, je objednatel oprávněn ji před uplynutím lhůty splatnosti zhotoviteli vrátit a její doba splatnosti se tak prodlužuje o dobu, než bude objednateli doručena faktura bezchybná.
- 3.4 Faktury vystavené MBÚ jsou splatné do 30 dnů od doručení řádně vystavené faktury společnosti BioVendor, a to bezhotovostním převodem na Registrovaný účet uvedený na faktuře.
- 3.5 Pro vyloučení veškerých pochybností, společnost BioVendor prohlašuje, že nebude po MBÚ požadovat vrácení již vyplacené odměny (či její části) uhrazené v souladu s pravidly stanovenými touto smlouvou, pro případ, že by došlo k předčasnému ukončení této smlouvy v souladu s článkem 7. této smlouvy., Strany berou na vědomí, že v případě předčasného ukončení této smlouvy v souladu s článkem 7. nemá společnost BioVendor povinnost hradit MBÚ jakékoliv jemu vzniklé náklady či doplácet zbytek ceny, na jehož fakturaci ještě nevznikl právní nárok.

4. Práva a povinnosti stran, způsob provádění Vývoje

- 4.1 Smluvní strany se zavazují postupovat při plnění této smlouvy s odbornou péčí, v souladu s vědeckými a etickými standardy a zavazují se vynaložit při plnění této smlouvy veškerou možnou součinnost. MBÚ se zavazuje postupovat při provádění Vývoje v souladu se zák. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, v platném znění a vyhlášky č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat a zákona č. 78/2004 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty ve znění pozdějších předpisů.
- 4.2 Společnost BioVendor se zavazuje poskytnout MBÚ veškerou součinnost včetně poskytnutí potřebných informací, kterou MBÚ potřebuje k řádnému zavedení provedení Vývoje.
- 4.3 Společnost BioVendor prohlašuje, že je oprávněno poskytnout informace nezbytné k provedení Vývoje, neporušuje tímto práva žádné třetí osoby ani žádných obecně závazných právních předpisů a nedojde k takovému porušení, ani pokud s těmito informacemi bude v souladu s touto smlouvou nakládat MBÚ.
- 4.4 MBÚ se zavazuje neprodleně písemně oznámit společnosti BioVendor skutečnost, že dle jejích poznatků nebude schopna dosáhnout smluvených výsledků Vývoje či, že je takový Vývoj nemožný či proti dobrým mravům anebo etickým zásadám.
- 4.5 Při provádění Vývoje budou strany postupovat způsobem popsáném v Příloze č. 1.
- 4.6 MBÚ se zavazuje neprodleně po skončení této smlouvy předat společnosti BioVendor veškeré výstupy vzniklé v souvislosti s Vývojem po dobu trvání této smlouvy, a to ve lhůtě 4 týdnů po datu jejího ukončení.
- 4.7 Společnost BioVendor je oprávněna postoupit či převést jakékoliv právo (práva) či povinnost (povinnosti) vyplývající jí či vztahující se k ní na základě této smlouvy na třetí osobu, a to bez dalšího svolení MBÚ.
- 4.8 Strany pro vyloučení pochybností konstatují, že smlouva ani jednotlivá práva či povinnosti z ní vyplývající ve vztahu k MBÚ nejsou bez předchozího písemného souhlasu společnosti BioVendor převoditelná nebo postupitelná na třetí osobu.
- 4.9 MBÚ tímto prohlašuje, že je oprávněn platně tuto smlouvu uzavřít. Je-li vyžadováno interními či jinými právními předpisy získání souhlasu orgánu MBÚ s podpisem této smlouvy, MBÚ prohlašuje, že jej před podpisem této smlouvy získal.

5. Důvěrnost informací

- 5.1 S ohledem na charakter Vývoje, jakož i materiálu použitého k provedení Vývoje, jsou strany povinny veškeré informace, které si poskytnou na základě této smlouvy, považovat za důvěrné („**Důvěrné informace**“). Důvěrnými informacemi ale nejsou informace veřejně přístupné, jakož i samotný text této smlouvy včetně přílohy. Strany se zavazují, že důvěrné informace uchovají v tajnosti a nezpřístupní je bez souhlasu druhé smluvní strany žádné třetí osobě, ani je nepoužijí ve svůj prospěch, pokud jim zveřejnění či odtajnění nebudou výslovně ukládat právní předpisy či pravomocné rozhodnutí soudu či správního orgánu. Strany výslovně berou na vědomí, že řada informací může být chráněna jako duševní vlastnictví. Publikace výsledků (formou publikace v odborném časopise, příspěvek na konferenci) bude možná po písemném schválení oběma stranami. MBÚ nebo společnost BioVendor se

zavazuje zaslat rukopisy prací a podklady ke konferenčním příspěvkům (postery, presentace) (dále jen „**Materiály**“) kontaktní osobě společnosti BioVendor nebo kontaktní osobě MBÚ. Pokud se společnost BioVendor nebo MBÚ nevyjádří do 40ti dní po obdržení Materiálu, bude je možno publikovat. Strany se zavazují při publikaci Materiálů dodržovat mezinárodně, obecně uznávaná a ve vědeckém světě respektovaná a dodržovaná pravidla zveřejňování informací, zejména úplné informace o autorovi či autorech a informace o skutečnosti, že výsledky jsou financovány ze strany společnosti BioVendor.

- 5.2 Jakákoliv komunikace ve věci komentování výsledků Vývoje ve vztahu k prostředkům masové komunikace, tj. jak klasická masová média (např. televize, rozhlas, tisk), tak prostředky elektronické komunikace – veřejně přístupná internetová média (např. různé webové stránky, blogy, diskusní fóra, sociální sítě Facebook, Twitter, Linked-In atp.) na která lze umísťovat vlastní texty nebo jakékoliv audiovizuální záznamy (dále jen „**média**“), bude probíhat vždy po vzájemném odsouhlasení obou stran, tedy žádná ze stran není oprávněna sama poskytovat jakékoliv vyjádření ve vztahu k Vývoji či výsledkům Vývoje do médií, totéž je povinna zaručit i u svých zaměstnanců.
- 5.3 Společnost BioVendor je oprávněna využít k vlastním interním a externím PR či marketingovým účelům informace o jednotlivých členech Výzkumného týmu a spolupráci s MBÚ včetně obecné informace o laboratorním vývoji, včetně skutečnosti, že spolupráce je financována společností BioVendor. MBÚ se zavazuje poskytnout potřebné informace o jednotlivých členech Výzkumného týmu a zároveň zajistit jejich souhlas se zveřejněním těchto informací včetně osobních údajů, v souladu se zákonem č. 101/2000 Sb., o ochraně osobních údajů, v platném znění. MBÚ se zavazuje informace o členech Výzkumného týmu pravidelně aktualizovat.
- 5.4 MBÚ se zavazuje, zajistit závazek mlčenlivosti ve vztahu k Důvěrným informacím také od všech členů Výzkumného týmu, a to v písemné podobě ještě před započítím plnění podmínek této smlouvy a toto na vyžádání společnosti BioVendor prokázat.
- 5.5 Závazek stran dle tohoto článku trvá po dobu účinnosti této smlouvy a i po jejím zániku.

6. Majetek a práva k duševnímu vlastnictví

- 6.1 Smluvní strany se dohodly na následujících pravidlech při nakládání s technickými řešeními, patenty, užitnými vzory a dalšími hmotnými a nehmotnými statky (či dalšími majetkovými právy), které budou nově vytvořeny jako výsledek činnosti dle této smlouvy (dále jen „**Výsledek činnosti**“).
- 6.2 Strany souhlasí, že nedohodnou-li se v konkrétním případě jinak nebo není-li dále ve smlouvě stanoveno jinak, veškeré Výsledky činnosti (a to jak hmotný majetek či nehmotný majetek, majetková či jiná práva) se stanou výlučným majetkem společnosti BioVendor.
- 6.3 V případě, kdy povaha Výsledku činnosti neumožňuje, aby byl tento ve vlastnictví či obdobném vztahu, má společnost BioVendor výlučný nárok na výnosy z užití takového Výsledku činnosti. Pokud by Výsledek činnosti měl povahu autorského díla, poskytuje MBÚ tímto výhradní, neodvolatelnou, časově a územně neomezenou licenci společnosti BioVendor k využití Výsledků činnosti, a to ke všem způsobům

užití a v neomezeném rozsahu. BioVendor může oprávnění podle předchozí věty poskytnout i třetí osobě. Úplata za takovou licenci je již zahrnuta v odměně dle čl. 3 této smlouvy. Zpracovaný Výsledek činnosti včetně závěrečné zprávy podléhá ochraně dle zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), a ve smyslu ust. § 58 tohoto zákona je lze považovat za zaměstnanecké dílo, k němuž majetková práva vykonává MBÚ, který v této souvislosti zavazuje smluvně vypořádat veškeré uplatněné nároky případných původců, a to na vlastní náklady.

- 6.4 Náklady vynaložené za účelem následného využití Výsledku činnosti nad rámec Vývoje (např. při podání patentové přihlášky apod.) nese výlučně společnost BioVendor.
- 6.5 Ustanovení tohoto článku přiměřeně platí i po skončení účinnosti této smlouvy.

7. Doba trvání, ukončení a porušení smlouvy

- 7.1 Tato smlouva se uzavírá na dobu určitou, a to do **30.6.2019**. Strany se dohodly, že ustanovení obsažená v člancích 5. a 6. této smlouvy přetrvávají v platnosti i po skončení platnosti této smlouvy, nedohodnou-li se strany jinak.
- 7.2 MBÚ je oprávněn vypovědět tuto smlouvu písemnou výpovědí doručenou společnosti BioVendor v následujících případech:
- a) Společnost BioVendor bude v prodlení s úhradou odměny nebo jakékoli její části pod dobu delší než 30 dnů, a to i přes písemnou výzvu MBÚ k úhradě dlužné částky;
 - b) ohledně společnosti BioVendor bude soudem vydáno rozhodnutí o úpadku.
- 7.3 Společnost BioVendor je oprávněna vypovědět tuto smlouvu písemnou výpovědí doručenou MBÚ v následujících případech:
- a) MBÚ nepředá Dílčí výsledky Vývoje ani do 2 měsíců po termínu uvedeném v odst. 3.1 písm. a) až c) této smlouvy;
 - b) dle Dílčích výsledků Vývoje předaných MBÚ společnosti BioVendor nebude dle uvážení společnosti BioVendor pokračování Vývoje pro společnost BioVendor přínosné;
 - c) ohledně MBÚ bude soudem vydáno rozhodnutí o úpadku;
 - d) bude-li z chování MBÚ nebo z jiných okolností nepochybně vyplývat ještě před dobou stanovenou pro plnění smluvní povinnosti, že tato povinnost bude ze strany MBÚ porušena podstatným způsobem a MBÚ neposkytne po vyzvání společnosti BioVendor bez zbytečného odkladu dostatečnou jistotu naplnění svých závazků.
- 7.4 Společnost BioVendor je oprávněna vypovědět tuto smlouvu dle článku 7.3 bodu b) pouze do třiceti (30) kalendářních dnů od doručení Dílčích výsledků Vývoje k 31.12. příslušného kalendářního roku v souladu s článkem 2.4 této smlouvy. V případě prodlení MBÚ s předáním Dílčích výsledků vývoje k 31.12. příslušného kalendářního roku se o dobu prodlení prodlužuje lhůta pro výpověď smlouvy dle tohoto článku 7.4. V případě doručení výpovědi dle článku 7.3 bodu b) ve lhůtě dle

tohoto článku 7.4 zaniká povinnost společnosti BioVendor uhradit další splátky Odměny dle článku 3 a povinnost MBÚ provádět Vývoj.

- 7.5 V případě prodlení společností BioVendor s úhradou ceny nebo její části je MBÚ oprávněn požadovat úrok z prodlení ve výši 0,03 % z dlužné částky denně.
- 7.6 V případě prodlení MBÚ s předáním výsledků a výstupů Vývoje či jakékoliv její části, včetně Dílčí výsledků Vývoje ve lhůtách dle odst. 3.1 písm. a) až c) této smlouvy, je společnost BioVendor oprávněna požadovat smluvní pokutu ve výši 500,- Kč za každý den prodlení s jejich předáním.
- 7.7 MBÚ se zavazuje neprodleně po skončení této smlouvy předat společnosti BioVendor veškeré výsledky a výstupy Vývoje vzniklé v souladu s plněním poskytovaným na základě této smlouvy, po dobu jejího trvání, a to ve lhůtě 4 týdnů po datu jejího ukončení.

8. Závěrečná ustanovení

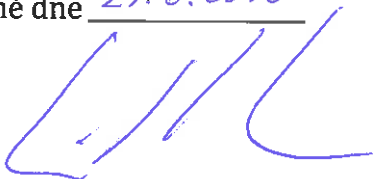
- 8.1 Tato smlouva nabývá platnosti a účinnosti podpisem obou smluvních stran a je vyhotovena ve dvou stejnopisech, z nichž každá strana obdrží po jednom.
- 8.2 Tato smlouva se řídí právním řádem České republiky, zejména příslušnými ustanoveními zák. č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku.
- 8.3 Tuto smlouvu je možné měnit pouze písemnými dodatky podepsanými oběma smluvními stranami.
- 8.4 Jestliže se některé z ustanovení této smlouvy ukáže jako nedovolené, neplatné, nebo nevymahatelné, nebude tím dotčena účinnost smlouvy jako celku ani jejích zbývajících ustanovení. V takovém případě strany změní nebo přizpůsobí takové nedovolené, neplatné nebo nevymahatelné ustanovení písemnou formou tak, aby bylo dosaženo úpravy, které odpovídá účelu a úmyslu stran v době uzavření smlouvy, a která je hospodářsky nejbližší neplatnému, nedovolenému nebo nevymahatelnému ustanovení, popřípadě podniknou kroky k realizaci původního účelu takového ustanovení.
- 8.5 Osoby oprávněné jednat jménem MBÚ a společnosti BioVendor:
MBÚ:
kontaktní osoba RNDr. Petr Novák, Ph.D., tel.: 241062631, email: pnovak@biomed.cas.cz
na vědomí: RNDr. Martin Bilej, DSc., email: mbilej@biomed.cas.cz
BioVendor:
kontaktní osoba RNDr. Michal Kostka., tel.: 549 124 135, email: kostka@biovendor.cz
- 8.6 Spory mezi stranami, které vzniknou v souvislosti s realizací této smlouvy, budou řešeny vzájemnou dohodou smluvních stran. V případě, že se nepodaří vyřešit takový spor smírnou cestou, může se kterákoli ze smluvních stran obrátit na příslušný soud.

8.7 Nedílnou součástí této smlouvy jsou následující přílohy:

a) Příloha č. 1 – Vývoj

8.8 Strany prohlašují, že si tuto smlouvu přečetly a že tato smlouva tak, jak byla sepsána, odpovídá jejich pravé vůli, kterou si vzájemně projevily vážně, srozumitelně a zcela svobodně, a na důkaz toho připojují své podpisy.

V Brně dne 27.6.2016



BioVendor – Laboratorní medicína a.s.
MUDr. Viktor Růžička
předseda představenstva

V Praze dne 29-06-2016



Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.
RNDr. Martin Bilej, DrSc.
ředitel

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.
Videňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč

Příloha č. 1 Specifikace činností MBÚ (Vývoj)

Řešitel: RNDr. Petr Novák, PhD.

Instituce: Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

Project title: Příprava funkcionalizovaných povrchů metodou reaktivní depozice pro imunodiagnostiku.

Trvání projektu: 3 a 1/2 roku

Popis techniky

Moderní biochemické testy, používané ve zdravotnictví, veterinární praxi, výzkumu i v průmyslu, jsou velmi často založeny na interakci bílkoviny s jejím biologickým partnerem. V případě, že je bílkovinou protilátka a stanovovaným analytem příslušný antigen, hovoří se většinou o imunotestech respektive imunoesejích. V běžném provedení je bílkovina ukotvena na pevný povrch (například na destičku nebo kuličku), což umožňuje manipulaci po té, co došlo k navázání analytu na bílkovinu. Je možné kuličky s komplexem bílkovina-analyt vyjmout z roztoku směsného vzorku nebo zbytek vzorku z destičky před detekcí omýt, zatímco analyt zůstává ukotven na povrchu díky interakci s bílkovinou. Zásadní výhodou této kategorie testů je velká specifita a obohacení sledovaného analytu, jenž významným způsobem napomáhá zlepšení limitu detekce a limitu stanovitelnosti.

Pro stanovení analytu specificky obohaceného pomocí interakce s bílkovinou může být použita celá řada metod a technik. Jednou z klíčových podmínek je kompatibilita s použitým povrchem, který slouží jako substrát pro analýzu. Významnou alternativou ke stávajícím metodám detekce jakými jsou například chemiluminiscence, fluorescence nebo radiace je použití desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrie. Při této technice je analyt z povrchu desorbován za současné ionizace, zaveden do hmotnostního analyzátoru a následně detekován. Energetickým impulsem pro desorpční ionizaci je nejčastěji laserový paprsek, ale může být použit například i svazek nabitých či neutrálních částic, plazma či elektrický výboj, elektrické pole, proud horkých par rozpouštědla nebo svazek nabitých kapiček rozpouštědla. Výhodou desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrie v porovnání s převládající fluorescenční či radiační detekcí je její vysoká specifita a možnost získat větší množství informací o detekovaném iontu, vzniklém ionizací molekuly analytu, v porovnání s klasickými detekčními technikami.

První technologie modifikovaných povrchů pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii byla pojmenována SELDI (Surface-enhanced laser desorption/ionization) (Hutchens TW and Yip TT. "New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules." *Rapid Commun Mass Spectrom* 7: 576-580 (1993)). Méně specifické SELDI povrchy, které vážou celé skupiny analytů, byly vyvinuty s různými organickými materiály na povrchu ((a) Tang N, Tornatore P, Weinberger SR (2004). "Current developments in SELDI affinity technology". *Mass spectrometry reviews* 23 (1): 34-44; (b) Law K.P, Larkin J.R.: *Anal Bioanal Chem* (2011) 399:2597-2622), s celou řadou komerčních označení (například CM10 - slabý iontoměnič, Q10- silný iontoměnič, H50 - hydrofobní reverzní chromatografický povrch, IMAC30 - fosfopeptidy vázající povrch). Více specifické SELDI povrchy s navázanými bílkovinami, včetně protilátek, jsou potom založené na použití zlaté vrstvy, která je díky reaktivitě zlata schopna navázat celou řadu biologických molekul (US6579719; US6844165; US 6881586). Nevýhodou tohoto řešení je nespecifická vazba všech bílkovin ve vzorku na původní zlatý povrch, což vede ke snížení specifické detekce příslušného analytu, protože na povrch se naváže nejen

příslušný partner ukotvené bílkoviny, ale také řada dalších molekul schopných reakce se zlatým povrchem. Alternativním způsobem navázání molekuly na povrch je například derivatizace povrchu N-Hydroxysukcinimidem, který je schopen vazby s biologickou molekulou skrze libovolnou nechráněnou aminoskupinu (US20070059769 A1, WO2005088310A2, WO2005088310A3, WO2005088310A9). Další chemickou modifikací povrchu, která umožňuje navázání bílkovin, je modifikace substrátu kyselinou fenyloboritou, karboxyaryloboritou nebo aminofenyloboritou. Takto modifikované povrchy jsou použitelné jako substráty i pro imunosece. (Liu and Scouten, *J Mol Recognit.* 1996 September-December; 9(5-6):462-7; Lee et al, *J Am Soc Mass Spectrom.* 2005 September; 16(9):1456-60, Farah et al, *Biochim Biophys Acta.* 2005 Oct. 10; 1725(3):269-82). Povrchy modifikované kyselinou fenyloboritou nebo karboxyaryloboritou byly použity pro navázání glykosilovaných bílkovin ze vzorku s následnou detekcí pomocí desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrie, konkrétně MALDI-MS (Gontarev et al. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007, 21(1): 1-6 and Shmanai *Journal of Mass Spectrometry* 2007 November, 42 (11): 1504-1513 a US 20080116367 A1). Pro použití v kombinaci s desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrií je ale z důvodů lepšího přenosu náboje a tím i účinnější ionizace výhodné používat postupy, které umožňují navázání bílkoviny přímo na kovový povrch (který představuje substrát pro měření hmotnostní spektrometrií) bez nutnosti použít chemickou mezivrstvu. Většinu kovů (například nerezovou ocel nebo hliník) ale není možné modifikovat bílkovinami přímo, protože za běžných podmínek v roztoku nedochází k žádné povrchové reakci. Pro modifikaci povrchů z nerezové oceli bílkovinami použil Volny (Volny M. et al. *Anal Chem* 2005 Aug;77(15):4890-6) metodu takzvaného reactive landing. Tento postup úpravy povrchu se odehrává ve vakuu a povrch je bombardován desolvatovanými ionty, které byly získány měkkou elektrosprejovou ionizací příslušných bílkovin z roztoku. Nabitě ionty bílkoviny, které v metodě reactive landing podle Volny et al. (Volny M. et al. *Anal Chem* 2005 Aug;77(15):4890-6) narážejí do povrchu a modifikují jej, se pohybují ve vakuu v prostředí s dostatečně dlouhou střední volnou dráhou na to, aby mohly být externím elektrostatickým polem urychleny na výrazně hypertermální energii až napětím 20V, což by při dopadu odpovídalo více než tisícinásobku průměrné translační kinetické energie při laboratorní teplotě (dle aproximace založené na kinetické teorii plynů). K modifikaci povrchu tak dojde v důsledku energie iontu při dopadu na povrch – jedná se tedy o kinetickou energii indukovanou reakci. Metoda poskytuje kvalitní a mechanicky stálou modifikaci povrchu. Nevýhodou tohoto postupu je nepřiměřená délka celého procesu přípravy povrchu – až několik hodin a malá účinnost převodu do vakua, která vede k velké spotřebě roztoku bílkoviny. K provedení je navíc zapotřebí zkonstruovat speciální přístroj, do kterého se vloží povrch určený k modifikaci. Přístroj se potom vypumpuje tak, aby v něm bylo vakuum, které se musí udržovat po celou dobu modifikace. Po dosažení vakua se na povrch kolizně přistávají ionty o hypertermální energii po dobu přibližně tří hodin. V přístroji tak lze připravit jen několik vzorků denně a tomu odpovídá i potenciální cena jedné modifikace.

Zde předkládaný způsob modifikace povrchu pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii bílkovinami je také založen na elektrosprejové depozici suchých iontů, ale nevyžaduje vakuovou aparaturu a desolvatace elektrosprejovaných iontů je dosaženo nikoliv převodem do vakua, ale při atmosférickém tlaku teplem vysušením elektrosprejového aerosolu ve speciálně vyhřívaném odpařovacím prostoru. Od postupu použitým v metodě dle Volny M. et al. výše se tedy tato nová technika liší jak v mechanismu modifikace povrchu, tak i v technickém provedení.

V PCT/CZ2011/000118 (WO/2012/079549); a Krasny et al. J Mass Spectrom 2012 Oct;47(10):1294-302, je popsána metoda modifikace povrchu substrátů pro stanovení fosfopeptidů pomocí desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrie, přičemž se povrch substrátu modifikuje roztokem organokovových sloučenin prvků skupiny 4B, a to Ti, Zr a Hf, pomocí elektrosprejování.

MBÚ metoda používá pro modifikaci povrchu podobný postup jako je uveden v (PCT/CZ2011/000118 (WO/2012/079549); a Krasny et al. J Mass Spectrom 2012 Oct;47(10):1294-3021), avšak místo elektrosprejování organokovových sloučenin prvků 4B skupiny se používají molekuly bílkovin jakými jsou enzymy, lektiny a protilátky, které i po navázání na povrch zůstávají stabilní a vykazují biologickou aktivitu. Tím je dosaženo úplně jiného použití předmětného vynálezu. V (PCT/CZ2011/000118 (WO/2012/079549); a Krasny et al. J Mass Spectrom 2012 Oct;47(10):1294-3021) je použito anorganického povrchu k detekci analytu – fosfopeptidů, tedy stavebních kamenů fosforylovaných bílkovin. Naopak u naší technologie je povrch modifikován bílkoviny a analytem je vždy příslušný afinitní partner dané bílkoviny. Ke změnám došlo také v podmínkách elektrosprejování (napětí, průtok kapaliny s bílkovinou, teplota vyhřívání, zvýšená teplota nosného plynu v důsledku jeho případného přehřívání, čas depozice). Hlavní konstrukční změnou je kapilární uspořádání a použití mikroelektrospreje s průměrem mikrosprejovací jehly v rozmezí 1-100 μm.

Technika vyvinuta na MBÚ se odlišuje od elektrosprejových kapičkových depozic, které byly uvedeny například v přehledových článcích (Jaworek et al. J Mater Sci (2007) 42:266–297 a Morozov Adv. Biochem Eng. Biotechnol. 2010, 119: 115-1620), protože v předkládaném vynálezu na povrch dopadají vysušené ionty. Nejbližšími technikami k MBÚ technice jsou tak vakuové metody reaktivního přistávání iontů na povrchu (reactive landing), termín použitý ve Volny et al Anal. Chem. 2005, 77, 4846-4853 a uvedený například v přehledném textu Cyriac et al. Chem Rev 2012 Chem. Rev. 112, 5356-5411. Zatímco při elektrosprejových depozicích na povrch dopadají nabitě kapičky nebo mikrokapičky, při reaktivním přistávání dopadají na povrch suché ionty, v daném případě mnohonásobně nabitě bílkoviny zbažené solvatačního obalu. Na rozdíl od reaktivního přistávání se však celý proces podle MBÚ metody odehrává při atmosferickém tlaku a zbavení rozpouštědla (desolvatace) je dosaženo rychlým ohřevem kapiček v odpařovacím prostoru.

Elektrosprejová depozice bílkovin z nabitých kapiček (znovu Jaworek et al. J Mater Sci (2007) 42:266–297) nevytváří sama o sobě dostatečně stabilní vrstvu bílkoviny na povrchu a tato potom vyžaduje další úpravy, například fixaci 70% roztokem glutaraldehydu (Lee et al. Biomaterials 24 (2003) 2045–2051). K uchování aktivity bílkovin při kapičkové elektrosprejové depozici se pak často používá přidání podpůrných činidel, například disacharidů (Morozov Anal. Chem., 1999, 71 (7), pp 1415–1420).

Milníky projektu

- 1) Vývoj a uvedení do klinické praxe kitu pro fenotypizaci Haptoglobinu
- 2) Vývoj a uvedení do klinické praxe kitu pro relativní kvantifikaci sialylace serostransferinu
- 3) Vývoj a uvedení do klinické práce kitu pro detekci bodových mutací Apolipoproteinu E
- 4) Vývoj povrchů pro univerzální immobilizaci protilátek

Časový plán:

1. rok

Optimalizace experimentálního uspořádání metody pro selektivní nabohacení haptoglobinu z lidského séra, příprava uživatelské brožury, stabilitní testy kitu, vývoj softwarové aplikace pro automatizaci fenotypizace haptoglobinu hmotnostní spektrometrii.

2. rok

Nalezení nebo příprava vhodné protilátky pro selektivní nabohacení serotransferinu nebo glykopeptidu ze serotransferinu lidského séra, příprava uživatelské brožury, stabilitní testy kitu, vývoj softwarové aplikace pro automatizaci kvantifikaci sialylace serotrasferinu hmotnostní spektrometrii.

3. rok

Nalezení nebo příprava vhodné protilátky pro selektivní nabohacení Apolipoproteinu E nebo peptidů z Apolipoproteinu E lidského séra, příprava uživatelské brožury, stabilitní testy kitu, vývoj softwarové aplikace pro automatizaci identifikace mutací Apolipoproteinu E hmotnostní spektrometrii.

4. rok

Funkcionalizace vodivých povrchů avidinem (popřípadě streptavidin nebo neutravidin) metodou reaktivní depozice, sledování vazby biotinilovaných bílkovin. Funkcionalizace vodivých povrchů proteinem A nebo G a sledování adheze protilátek

Rozpočet projektu

1. rok

Mzdy	220 tis. Kč
Odvody	80 tis. Kč
Dohoda o prac. činnosti	70 tis. Kč
Režie	120 tis. Kč
Materiál	90 tis. Kč
Cestovné	20 tis. Kč

2. rok

Mzdy	270 tis. Kč
Odvody	100 tis. Kč
Dohoda o prac. činnosti	60 tis. Kč
Režie	160 tis. Kč
Materiál	190 tis. Kč
Cestovné	20 tis. Kč

3. rok

Mzdy	270 tis. Kč
Odvody	100 tis. Kč
Dohoda o prac. činnosti	60 tis. Kč
Režie	160 tis. Kč
Materiál	190 tis. Kč
Cestovné	20 tis. Kč

4. rok

Mzdy	180 tis. Kč
Odvody	65 tis. Kč
Dohoda o prac. činnosti	30 tis. Kč
Režie	100 tis. Kč
Materiál	100 tis. Kč
Cestovné	25 tis. Kč