

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biofyziky a fyzikálnej chémie



**In vitro saturačné štúdie gáliom-67 a zirkóniom-89
značenej monoklonálnej protilátky ramucirumab
na SKOV-3 bunkovej línii**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Nikola Holodňáková

Čestné vyhlásenie

„Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojim pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú v práci riadne citované. Táto práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 1.9.2020

Nikola Holodňáková

Pod'akovanie

V prvom rade by som sa rada pod'akovala svojmu školiteľovi Mgr. Pavlovi Bártovi, Ph.D. za jeho trpezlivosť, vedenie, odbornú pomoc, ochotu so mnou všetko konzultovať a cenné rady, ktoré mi pomohli pri spracovávaní diplomovej práce. Taktiež ďakujem PharmDr. Zbyňkovi Novému, Ph.D. a PharmDr. Milošovi Petříkovi, Ph.D., že mi umožnili podieľať sa na *in vivo* experimentoch na IMTM v Olomouci. V neposlednom rade patrí veľké ďakujem mojej rodine za podporu a pomoc počas celého štúdia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra fyziky a fyzikálnej chémie

Študentka: Nikola Holodňáková

Školiteľ: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Názov diplomovej práce: In vitro saturačné štúdie gáliom-67 a zirkóniom-89 značenej monoklonálnej protilátky ramucirumab na SKOV-3 bunkovej línii

Vývojom nových liečebných postupov v onkológii má čoraz väčšie postavenie cieľená biologická liečba, ktorá stimuluje imunitný systém k boju s nádorovými bunkami. Významným pokrokom v celení nádorov bolo zavedenie monoklonálnych protilátok, ktoré predstavujú jednu z novších možností využiteľných v diagnostike i terapii nádorov. Využíva sa schopnosť monoklonálnych protilátok rozpoznať a viazať sa špecificky na antigény nádorových buniek, akým je aj receptor pre VEGF typu 2 (VEGFR-2), na ktorý sa viaže monoklonálna protilátka ramucirumab. Blokáciou tohto receptora sa inhibuje angiogenéza, a tým sa zabráni rastu nádorov. Spojením monoklonálnej protilátky s inou molekulou (rádionuklid, toxín, cytostatikum) za tvorby konjugátov je možné zvýšiť jej protinádorový účinok, čo pre diagnostické i terapeutické účely využíva i odbor nukleárna medicína.

Cieľom predloženej práce bolo metódou nepriameho značenia pomocou chelátoru deferoxamínu (DFO) pripraviť rádioaktívnymi nuklidmi (^{67}Ga a ^{89}Zr) značený ramucirumab. U pripravených rádiofarmák sa zisťovala ich rádiochemická čistota a stabilita prostredníctvom analytických metód vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s rádiometrickou detekciou a instantnej tenkovrstvej chromatografie. Pomocou klasickej manuálnej saturačnej techniky sa na bunkovej kultúre SKOV-3 overila schopnosť rádioaktívne značenej protilátky zachovať si afinitu k receptoru VEGFR-2 pomocou stanovenia rovnovážnej disociačnej konštanty K_D tejto interakcie. Taktiež súčasťou biologickej štúdie zirkóniom-89 značeného ramucirumabu bolo analyzovať *in vivo* orgánovú biodistribúciu pripraveného rádiofarmaka a pomocou systému PET/CT zobrazit' indukované nádorové útvary exprimujúce VEGFR-2 u myší.

Výsledky stanovení rádiochemickej čistoty potvrdili, že sa podarilo pripraviť rádioimunokonjugáty s čistotou nad 95 % ako požaduje Európsky liekopis pre rádiofarmaká podávané pacientom. Pripravené rádiopreparáty si požadovanú rádiochemickú čistotu udržali aj po dobu troch dní. V *in vitro* saturačných štúdiách sa dosiahla pre tri opakované nezávislé merania priemerná hodnota disociačnej konštanty pre $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-ramucirumab}$ $K_D = 35,94 (\pm 7,30)$ nM a pre $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-ramucirumab}$ $K_D = 27,44 (\pm 8,14)$ nM, z čoho vyplýva, že oproti neznačenému (natívnemu) RAM ($K_D = 1\text{-}2$ nM) sa o niečo málo znížila afinita k cieľovému receptoru, ale stále bola dostačujúca pre ďalšie potenciálne štúdie. V prípade *in vivo* testovania u $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-ramucirumab}$ sa potvrdili dáta získané z *in vitro* meraní. *Ex vivo* biodistribučná štúdia preukázala hromadenie rádioaktívne značeného ramucirumabu v indukovanom SKOV-3 nádore už 1. deň od aplikácie, pričom maximum aktivity v nádore bolo namerané v 3. deň. Zároveň PET/CT zobrazovacia metóda podporila *ex vivo* experimenty zreteľným zobrazením nádoru na výsledných snímkach.

V závere môžeme zhodnotiť, že výsledky potvrdili potenciál ramucirumabu pre zobrazovanie VEGFR-2 pozitívnych nádorov vďaka úspešnému otestovaniu pripraveného ^{67}Ga - a ^{89}Zr -značeného ramucirumabu. Navyše, využitie ^{89}Zr pre rádioaktívne značenie podčiarkuje výhodu pripraveného rádiofarmaka pre zobrazovanie angiogénneho procesu v diagnostike a monitoringu liečby vďaka svojim perspektívnym zobrazovacím vlastnostiam PET žiariča. Avšak, nevýhodou stále zostáva jeho vysoká nákupná cena.

Kľúčové slová: gálium-67, *in vitro* saturačné štúdie, monoklonálna protilátka, PET/CT, rádioaktívne značenie, ramucirumab, SKOV-3, VEGFR-2, zirkónium-89

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Student: Nikola Holodňáková

Supervisor: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Name of the work: In vitro saturation study of gallium-67 and zirconium-89 labelled monoclonal antibody ramucirumab on SKOV-3 cell line.

Targeted biological treatment becomes more and more important with the development of a new therapy in oncology. It stimulates immune system to eliminate cancer cells. Significant progress has been made since the introduction of monoclonal antibodies. They represent one of the newest possibility used in diagnosis and treatment of tumours. The ability of the monoclonal antibody ramucirumab is to recognize and bind specifically to tumour cell antigens such as the VEGF type 2 receptor (VEGFR-2) and thus to suppress angiogenic process. Anti-angiogenic ramucirumab inhibits this receptor via blocking of VEGF binding sites, which prevents the growth of tumours. It is possible to increase antitumor effect of monoclonal antibodies by their combination with other molecules like radionuclides, toxins and cytostatics when forming the so called conjugates. Prepared immunoconjugates serve as diagnostic and therapeutic tools also in Nuclear Medicine.

The aim of the experimental work in was the preparation of radiolabelled monoclonal antibody ramucirumab with two radionuclides (^{67}Ga and ^{89}Zr) with the use of the chelating agent deferoxamine (DFO). The prepared radiopharmaceuticals were analyzed on their radiochemical purity and stability with the employment of the analytical methods high-performance liquid chromatography with radiometric detection and instant thin layer chromatography. The preserved binding affinity of radiolabelled antibody ramucirumab to VEGFR-2 receptor was verified on SKOV-3 cell culture with the use of the classical manual saturation technique. The equilibrium dissociation constant (K_D) for this interaction was determined too. The biological properties testing of zirconium-89 labelled ramucirumab also included the *in vivo* organ biodistribution and PET/CT imaging of the induced VEGFR-2 positive tumour formation in mice.

The results of the radiochemical purity determination demonstrated that the prepared radioimmunoconjugates had a purity above 95 % as required by the European Pharmacopoeia for radiopharmaceuticals administered in patients. Moreover, the prepared radiopreparations maintained the required radiochemical purity for three days. The results of *in vitro* saturation studies provided the mean value of the dissociation constant of three independent measurements for $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-ramucirumab}$ $K_D = 35.94 (\pm 7.30)$ nM, and for $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-ramucirumab}$ $K_D = 27.44 (\pm 8.14)$ nM. Although, the obtained K_D values were lower than for unlabelled (native) RAM ($K_D = 1\text{--}2$ nM), the affinity to the target receptor was still sufficient for further potential studies. *In vivo* testing with $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-ramucirumab}$ confirmed data obtained from *in vitro* measurements. An *ex vivo* biodistribution study demonstrated the accumulation of radiolabelled ramucirumab in the induced SKOV-3 tumours as early as day 1 after administration with maximal tumour activity measured on day 3. At the same time, the PET/CT imaging method supported *ex vivo* experiments with clear imaging of the tumour in the resulting images.

In conclusion, the obtained results confirmed the potential of ramucirumab for imaging of VEGFR-2 positive tumours thanks to the successful testing of the prepared ^{67}Ga - and ^{89}Zr -labelled ramucirumab. Besides, the use of ^{89}Zr for radiolabelling underscores the advantage of a prepared radiopharmaceutical for imaging of the angiogenic process in the diagnosis and monitoring of treatment due to its promising imaging properties as the PET emitter. However, the disadvantage remains in its high cost.

Key words: gallium-67, *in vitro* saturation study, monoclonal antibody, PET/CT, radiolabelling, ramucirumab, SKOV-3, VEGFR-2, zirconium-89

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	6
1. ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK.....	11
2. ÚVOD.....	15
3. TEORETICKÁ ČASŤ.....	17
3.1. Imunitný systém	17
3.2. Imunoterapia nádorových ochorení	18
3.3. Monoklonálne protilátky	21
3.3.1. História	21
3.3.2. Charakteristika a štruktúra monoklonálnych protilátok	21
3.3.3. Mechanizmus účinku monoklonálnych protilátok proti nádorom	23
3.3.4. Typy monoklonálnych protilátok	25
3.3.5. Príprava monoklonálnych protilátok	26
3.3.6. Farmakologické vlastnosti terapeutických monoklonálnych protilátok.....	29
3.3.7. Využitie monoklonálnych protilátok v praxi	30
3.4. Angiogenéza	31
3.4.1. Angiogenéza fyziologická a spojená s nádorom	33
3.4.2. Rodina vaskulárnych endoteliálnych rastových faktorov a ich receptorov....	34
3.4.3. Cieľená liečba zameraná na VEGF/VEGFR	38
3.4.4. Ramucirumab	40
3.5. Rádiofarmaká.....	41
3.5.1. Rádionuklidy a ich zdroje	42
3.5.2. Zobrazovacie metódy v nukleárnej medicíne.....	44
3.5.3. Experimentálne použité rádionuklidy	45

3.5.4.	Spôsohy rádioaktívneho značenia monoklonálnych protilátok.....	47
3.5.4.1.	Metóda priameho značenia monoklonálnej protilátky	48
3.5.4.2.	Metóda nepriameho značenia monoklonálnej protilátky	48
3.6.	In vitro testovanie väzieb na receptory	50
3.7.	Významné protilátky používané v praxi.....	51
4.	CIELE PRÁCE.....	54
5.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	55
5.1.	Použité prístroje a software	55
5.1.1.	Prístroje a software na pracovisku RIL pri Katedre farmakológie a toxikológie na Farmaceutickej fakulte UK	55
5.1.2.	Prístroje a software na pracovisku Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci	56
5.2.	Použitý materiál.....	56
5.2.1.	Použitý materiál na pracovisku RIL pri Katedre farmakológie a toxikológie na Farmaceutickej fakulte UK.....	56
5.2.2.	Použitý materiál na pracovisku Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci	57
5.3.	Použité chemikálie.....	57
5.3.1.	Použité chemikálie na pracovisku RIL pri Katedre farmakológie a toxikológie na Farmaceutickej fakulte UK.....	57
5.3.2.	Použité chemikálie na pracovisku Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci	58
5.4.	Použitý biologický materiál.....	58
5.5.	Metodika práce	59
5.5.1.	Príprava dezintegračného roztoku	59
5.5.2.	Príprava fosfátového pufru.....	59
5.5.3.	Príprava Krebs-Ringerovho roztoku	59
5.5.4.	Príprava mobilných fáz	60

5.5.5.	Príprava roztokov NaHCO ₃ a NH ₄ Ac	60
5.5.6.	Kultivácia bunkových línií SKOV-3.....	61
5.5.7.	Konjugácia DFO s protilátkou	62
5.5.8.	Značenie DFO-RAM rádionuklidmi ⁶⁷ Ga/ ⁸⁹ Zr	63
5.5.9.	Stanovenie rádiochemickej čistoty pomocou HPLC.....	64
5.5.10.	Stanovenie rádiochemickej čistoty pomocou iTLC	64
5.5.11.	Stabilitné štúdie.....	65
5.5.12.	In vitro stanovenie väzbovosti RAM na cieľový receptor manuálnou saturačnou metódou.....	66
5.5.13.	Tvorba SKOV-3 nádoru u myší	67
5.5.14.	Ex vivo biodistribučné štúdie.....	68
5.5.15.	Zobrazenie pomocou mikroPET/CT prístroja.....	68
6.	VÝSLEDKY PRÁCE.....	69
6.1.	Stanovenie rádiochemickej čistoty a stability ⁶⁷ Ga[Ga]-DFO-RAM pomocou HPLC metódy	69
6.2.	Stanovenie rádiochemickej čistoty metódou iTLC	73
6.3.	Zhodnotenie in vitro stability ⁸⁹ Zr[Zr]-DFO-RAM.....	75
6.4.	Výsledok in vitro saturačnej štúdie pripravených rádiofarmák ⁶⁷ Ga[Ga]-DFO- RAM/ ⁸⁹ Zr[Zr]-DFO-RAM	76
6.5.	Zhodnotenie ex vivo biodistribučnej štúdie.....	77
6.6.	Zobrazenie biodistribúcie in vivo pomocou PET/CT.....	78
7.	DISKUSIA	80
8.	ZÁVER.....	84
9.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	85

1. ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

2-ME	2-merkaptoetanol, z <i>angl.</i> 2-mercaptoethanol
ADC	konjugát protilátka-liečivo, z <i>angl.</i> antibody-drug conjugate
ADCC	bunková cytotoxicita závislá od protilátky, z <i>angl.</i> antibody dependent cellular cytotoxicity
AML	akútna myeloidná leukémia
APC	antigén prezentujúca bunka, z <i>angl.</i> antigen-presenting cells
BCA	kyselina bicinchoninová, z <i>angl.</i> bicinchoninic acid
BSA	bovinný sérový albumín, z <i>angl.</i> bovine serum albumin
BFC	bifunkčné chelatačné činidlo, z <i>angl.</i> bifunctional chelator
BiTE	bišpecifické T bunky, z <i>angl.</i> bispecific T cell engagers
B _{max}	maximálna väzbová kapacita receptorov na jednotku celkového proteínu
CDC	cytotoxicita sprostredkovaná komplementom, z <i>angl.</i> complement dependent cytotoxicity
CLL	chronická lymfocytárna leukémia
CT	výpočtová tomografia, z <i>angl.</i> computed tomography
CTL	cytotoxický T-lymfocyt, z <i>angl.</i> cytotoxic T lymphocyte
DFO	deferoxamín, z <i>angl.</i> p-SCN-Bn-deferoxamine)
DMSO	dimetylsulfoxid
DOTA	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
EDTA	kyselina ethyléndiamíntetraoctová
EGF	epidermálny rastový faktor, z <i>angl.</i> epidermal growth factor
EGFR	receptor pre epidermálny rastový faktor, z <i>angl.</i> epidermal growth factor receptor

ELISA	test enzymového imunosorbentu, z <i>angl.</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	Európska lieková agentúra, z <i>angl.</i> European Medicines Agency
Fab	fragment viažúci antigén, z <i>angl.</i> fragment antibody binding
FBS	bovinné fetálne sérum, z <i>angl.</i> fetal bovine serum
Fc	konštantný, kryštalizujúci fragment, z <i>angl.</i> fragment crystallizable
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv, z <i>angl.</i> Food and Drug Administration
FOLFIRI	chemoterapeutická trojkombinácia – leukovorin, fluoruracil, irinotekan
FOV	zorné pole, z <i>angl.</i> field of view
HAMA	ľudská antimyšia protilátka, z <i>angl.</i> human anti-mouse antibody
HAT	hypoxantín-aminopterín-tymidín médium
HER	receptor pre ľudský epidermálny rastový faktor, z <i>angl.</i> epidermal growth factor receptor
HGPRT	enzým hypoxantín-guanín fosforibosyltransferáza, z <i>angl.</i> hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HL	Hodkinov lymfóm
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, z <i>angl.</i> high performance liquid chromatography
IC ₅₀	polovičná maximálna inhibičná koncentrácia, z <i>angl.</i> half maximal inhibitory concentration
ID	podaná dávka, z <i>angl.</i> injected dose
Ig	imunoglobulín, z <i>angl.</i> immunoglobuline
IMTM	Ústav molekulárnej a translačnej medicíny
INF γ	interferón γ , z <i>angl.</i> interferon
iTLC	instantná tenkovrstvá chromatografia, z <i>angl.</i> instant thin-layer chromatography

K _D	rovnovážna disociačná konštanta
KRK	kolorektálny karcinóm
MAb	monoklonálna protilátka, z <i>angl.</i> monoclonal antibody
MAC	komplex membránového útoku, z <i>angl.</i> membrane attack complex
MHC	hlavný histokompatibilný komplex, z <i>angl.</i> major histocompatibility complex
MMAE	monometyl auristatín E
MRI	magnetická rezonancia, z <i>angl.</i> magnetic resonance imaging
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina, z <i>angl.</i> messenger ribonucleic acid
n.	nádor
NK	prirodzení zabijaci, z <i>angl.</i> natural killers
NOTA	1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina
NSCLC	nemalobunkový karcinóm pľúc, z <i>angl.</i> non-small cell lung cancer
NRP	neenzymatický koreceptor neuropilínu, z <i>angl.</i> non-enzymatic neuropilinco-receptor
PBS	fosfátový pufer, z <i>angl.</i> phosphate buffered saline
PET	pozitronová emisná tomografia, z <i>angl.</i> positron emission tomography
PlGF	placentárny rastový factor, z <i>angl.</i> placental growth factor
r.o.	retro-orbitálne
RAM	ramucirumab
RES	retikuloendoteliálny systém, z <i>angl.</i> reticuloendothelial system
RIL	rádioizotopové laboratórium pri Katedre farmakológie a toxikológie na Farmaceutickej fakulte UK
sALCL	systémový anaplastický veľkobunkový lymfóm
SCID	ťažká kombinovaná imunodeficiencia, z <i>angl.</i> Severe Combined Immunodeficiency Diseases

SKOV-3	ľudský ovariálny adenokarcinóm, z <i>angl.</i> Human caucasian ovary adenocarcinoma
SPECT	jednofotónová emisná počítačová tomografia, z <i>angl.</i> single photon emission computed tomography
TNF	tumor nekrotizujúci faktor, z <i>angl.</i> tumor necrosis factor
UV	ultrafialové žiarenie, z <i>angl.</i> ultraviolet radiation
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový factor, z <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor
VEGFR	receptor pre VEGF, z <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor receptor
VIS	viditeľné spektrum, z <i>angl.</i> visible radiation

2. ÚVOD

V ľudskom tele neustále dochádza k bunkovej diferenciácii či deštrukcii nepotrebných buniek. Odstránenie infikovaných, starých, malfunkčných alebo nádorovo transformovaných buniek sa účastní i niektorej zložky imunitného systému. Pokiaľ slabší imunitný systém jedinca nerozpozna poruchu delenia buniek a nezničí ju, hrozí vývoj nádorového ochorenia.

Onkologické ochorenia patrí vo vyspelej časti sveta medzi obávané a fyzické i psychické zdravie intenzívne poškodzujúce ochorenie, ktoré postihuje každú vekovú skupinu, a tým významne zasahujú do života nielen pacienta, ale i jeho okolia. Oneskoreným zistením rakoviny sa znižuje šanca na opätovné nadobudnutie plného zdravia. Preto sa v boji proti onkologickému ochoreniu vyvíjajú stále novšie metódy pre diagnostiku i terapiu nádoru s cieľom, aby použité analytické a liečebné metódy čo najmenej poškodili ešte zachované zdravie pacienta a zároveň definitívne zničili nádor bez možnosti relapsu.

Na problematike nádorového ochorenia sa podieľajú viaceré odbory medicíny. Liečba využíva v závislosti od pacienta i samotného nádoru rôzne metódy ničenia nádorových buniek, a to buď prostredníctvom chirurgického zásahu, hormonálna terapia, ďalej tiež pomocou rádioterapie a chemoterapie, ktoré predstavujú tradičnú liečbu, a taktiež i pomocou cielenej terapie alebo kombináciou spomenutých metód. Každá z liečebných metód má svoje výhody i nevýhody (napr. ovplyvnenie nielen nádorových buniek, ale vplyv aj na okolité zdravé bunky), ktoré sa zohľadňujú pri výbere ich aplikácie.

V súčasnosti veľký význam v onkológii zohrávajú biologické liečivá, ktoré sú usmernené na cieľové štruktúry (signálne dráhy, špecifické molekuly) v mieste zásahu. K takýmto molekulám patria aj monoklonálne protilátky pôsobiace proti špecifickým antigénom nádoru a ktoré sa v terapii využívajú samostatne ako nekonjugované alebo sa spájajú s inou molekulou (rádionuklid, toxín, cytostatikum) za tvorby konjugátu, čo využíva odbor nukleárna medicína.

Moderné metódy nukleárnej medicíny, ktorých výhodou je najmä minimálne zaťaženie pacienta, využívajú značené liečivo v podobe rádiofarmák, ktoré sa vpravuje do organizmu pacienta s cieľom rádiodiagnostiky a/alebo rádioterapie nádoru. Využitie

rádiofarmák v zobrazovaní nádorov metódami ako je PET a SPECT neustále napreduje, hlavne kvôli objavom nových cieľov protilátok a možnosťou značiť ich rádionuklidmi s rádiodiagnostickým potenciálom.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Imunitný systém

Imunitný systém je dôležitou súčasťou ľudského organizmu, pretože neustále dohliada a chráni človeka nielen pred cudzorodými látkami, ale aj vlastnými bunkami, ktoré podľahli infekcii alebo nádorovej transformácii. Škodliviny vnútorného i vonkajšieho pôvodu sú imunitným systémom eliminované, neškodlivého pôvodu sú tolerované. Na imunitnej reakcii sa podieľajú viaceré zložky imunitného systému. [2, 15]

Podľa toho, akým spôsobom imunitné zložky rozpoznávajú antigén, sú imunitné mechanizmy rozdelené do dvoch základných kategórií: nešpecifické (neadaptívne) a špecifické (adaptívne), pričom oba mechanizmy sú tvorené zložkami humorálnymi i bunkovými. Evolučne starším je nešpecifický mechanizmus taktiež označovaný ako neadaptívny, prirodzený alebo vrodenný, ktorý poskytuje prvú líniu obrany proti patogénom. Jeho reakcia na prítomnosť škodliviny je rýchla, rádovo v minútach a na rozdiel od špecifických zložiek nemá tzv. imunologickú pamäť, čo znamená, že nie je ovplyvnený predchádzajúcim stretnutím sa so škodlivinou. Fagocytujúce bunky a NK bunky (tzv. „prirodzení zabíjači“, z *angl.* natural killers) reprezentujú bunkové nešpecifické systémy, zatiaľ čo komplementový systém, interferóny, lektíny a iné sérové proteíny tvoria humorálne zložky nešpecifickej imunity. [16, 17]

Evolučne mladšie sú špecifické (adaptívne) mechanizmy, ktoré reagujú na každú cudzorodú štruktúru prostredníctvom vysoko špecifických molekúl a aktivujú sa až po stretnutí s daným antigénom, pričom k úplnému rozvoju špecifickej imunitnej reakcie dochádza po niekoľkých dňoch až týždňoch. Charakteristickým rysom je ich imunologická pamäť, ktorá pri opätovnom kontakte organizmu s imunitnou reakciou vyvolávajúcej antigénom zabezpečí rýchlejšiu a účinnejšiu imunitnú odpoveď. K humorálnej zložke patria protilátky tvorené B-lymfocytmi a bunková zložka je sprostredkovaná hlavne pomocou T-lymfocytov. [16]

Imunitné reakcie sú zaistené rôznymi druhmi buniek a molekúl a ich vzájomnými interakciami. Bunky imunitného systému spolu so spojivovými bunkami a ďalšími štruktúrami tvoria anatomické a funkčné celky – lymfatické orgány a tkanivá. Imunokompetentné bunky, ktoré zaistujú imunitné reakcie, vznikajú z kmeňovej bunky. Táto bunka sa ďalej diferencuje na lymfoidné a myeloidné bunkové línie. V kostnej dreni z myeloidnej línie vznikajú erytrocyty a trombocyty a dva druhy bielych krviniek,

monocyty a granulocyty. Z lymfoidnej línie vzniká ďalší druh bielych krviniek – lymfocyty a NK bunky. Časť lymfocytov, ktorá sa ďalej vyvíja v tymuse je označovaná ako T-lymfocyty a časť, ktorá sa vyvíja v kostnej dreni ako lymfocyty typu B. Z B-lymfocytov sa nakoniec stanú plazmatické bunky, ktoré sú schopné produkovať protilátky. Medzi imunokompetentné bunky sa radia taktiež dendritické bunky, ktorých hlavnou úlohou je pohltiť a spracovať antigén, vystaviť ho na svojom povrchu a prilákať príslušné B- a T-lymfocyty, ktoré potom rozvinú imunitnú reakciu. Týmto procesom sa prepája nešpecifický mechanizmus so špecifickým. [15]

Bez imunitného systému ako komplexného obranného mechanizmu, ktorý sa stará o ochranu organizmu pred cudzorodými bunkami (exogénne vplyvy) i bunkami tela vlastnými (endogénne vplyvy), ako napríklad bunkami infikovanými vírusmi alebo bunkami nádorovo transformovanými, by sme nemali žiadny spôsob ochrany, t.j. možnosti bojovať proti vyššie zmieneným poškodzujúcim faktorom nášho tela. V prípade nádorových buniek je hlavnou úlohou imunitná reakcia, rané rozpoznanie takýchto buniek a ich likvidácia. [1]

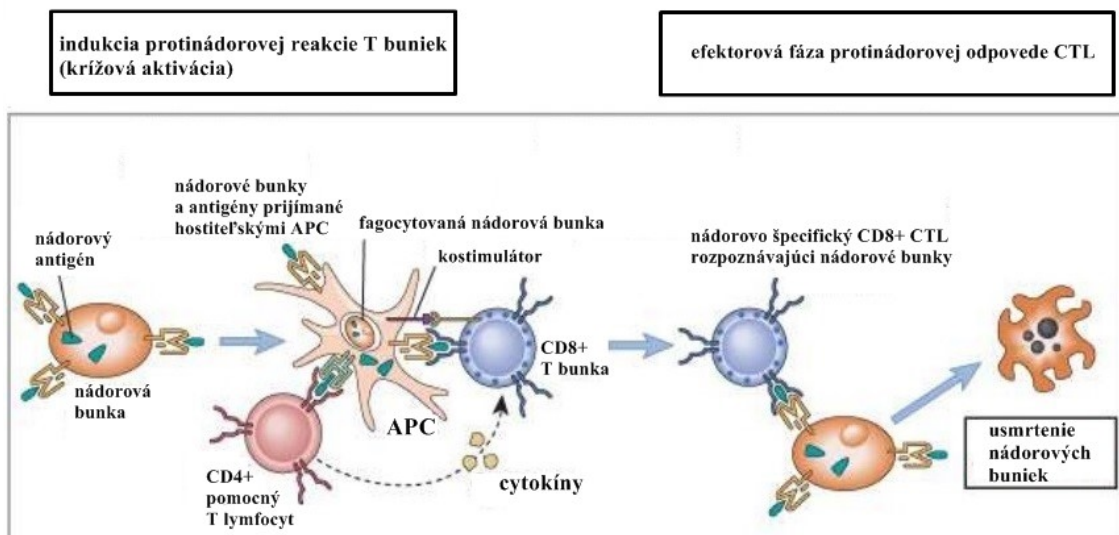
3.2. Imunoterapia nádorových ochorení

V 70. rokoch dvadsiateho storočia sa zrodila nová liečebná metóda vychádzajúca z použitia monoklonálnych protilátok zvaná imunoterapia. Zatiaľ čo tradičná chemoterapia zabíja nielen cieľové nádorové bunky prostredníctvom cytotoxických vlastností použitých látok, imunoterapia stimuluje celkovo imunitný systém hostiteľa k tomu, aby rozpoznal a zničil nádorové bunky obvykle nezávisle na ich generačnom cykle. Ak nie je populácia nádorových buniek príliš početná a ak bunky nesú špecifický nádorový antigén, proti ktorému je protilátka cieleňá, môže byť zlikvidovaná úplne. V tomto prípade nejde o odblokovanie utlmenej imunity nádorom, ale o využitie vyššej selektivity v ničení buniek nádoru za účelom ochrany zdravých buniek tela. [1, 2]

Na eliminácii buniek, ktoré tvoria nádor sa podieľajú hlavne CD8⁺ cytotoxické T-lymfocyty (CTL, z *angl.* cytotoxic T cell), ktoré ale dokážu rozpoznať nádorovú tzv. determinantnú skupinu alebo epitop iba ak je vo forme peptidov, ktoré sú vystavené na povrchu bunky nádoru a zároveň sú v komplexe s vlastnými MHC (hlavný histokompatibilný komplex, z *angl.* major histocompatibility complex) molekulami I. triedy. Ide o transmembránové molekuly, ktorých hlavnou úlohou je spracovanie

a prezentácia antigénov T-bunkám. Na povrchu antigén prezentujúcej bunky (APC, z *angl.* antigen-presenting cells) prítomných napríklad na B-lymfocytoch, makrofágoch, dendritických bunkách a iných, sa najskôr stretne nádorový antigén s pomocnými CD4⁺ T-lymfocytmi, bez ktorých by nedošlo k zaktivneniu cytotoxických T-lymfocytov. Týmto procesom tzv. skříženou prezentáciou antigénov sa za normálnych podmienok zaistí vysoko špecifická imunitná reakcia. Fagocytózou nádorovej bunky respektíve ich fragmentov získa APC nádorový antigén. APCs fagocytujú apoptotické a nekrotické nádorové bunky, ktoré sa do apoptického alebo nekrotického stavu môžu dostať po stimulácii imunitným systémom. Apoptóza je programovaná a vnútornými či vonkajšími signálmi vysoko kontrolovaná bunková smrť, ktorou zmrštením bunky dochádza k vzniku fagocytovateľných apoptotických teliesok a väčšinou nedochádza k zápalu. Zatiaľ čo nekróza je jej opakom. Nekróza predstavuje nekontrolovanú náhodnú smrť bunky, pričom bunka zväčšuje svoj objem až dochádza k jej prasknutiu, vyliatiu obsahu bunky a tvorbe zápalu. Spomínané antigény nádorovej bunky sú najskôr rozložené v lyzozómoch APC a potom vystavené na bunecnej membráne pomocou MHC molekúl II. triedy a súčasne stimulujúcich (kostimulujúcich) molekúl. [1, 66]

Pomocné CD4⁺ T-lymfocyty sa aktivujú za pomoci dvoch mechanizmov. Komplex MHC-imunogén sa naviaže na T-bunecný receptor, t.j. stimuláciou, a zároveň sa kostimulačné molekuly naviažu na náležité receptory na T-lymfocytoch, t.j. kostimuláciou. Po aktivácii CD4⁺ T-lymfocytov, ktoré produkujú radu interleukínov, ako napr. tumor necrosis factor (TNF) alebo interferón gamma (INF γ , z *angl.* interferon γ), s priamym protinádorovým účinkom, dochádza k aktivácii cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytov. Súčasne dochádza k zvýšeniu expresie MHC molekúl I. triedy na nádorových bunkách a k podnieteniu zložky prirodzenej imunity (NK-bunky, makrofágy). K efektívnej obrane imunity proti nádorovým bunkám vedie iba správna postupnosť popísaných procesov. Mechanizmus špecifickej protinádorovej bunkovej imunity popisuje **Obrázok 1**. [1]



Obrázok 1: *Odpoveď CD8+ T-lymfocytov na nádor indukovaný skříženou prezentáciou antigénu, pri ktorej sú nádorové bunky alebo nádorové antigény zachytené, spracovávané a prezentované T-bunkám pomocou profesionálnych antigén-prezentujúcich buniek (APCs). V niektorých prípadoch kostimulátory exprimované APCs poskytujú druhé signály na diferenciáciu CD8+ T-buniek. APCs môžu tiež stimulovať CD4+ T-bunky, ktoré poskytujú druhé signály pre vývoj CTL (cytotoxické T-lymfocyty) odpovede. Diferencované CTL ničia nádorové bunky bez potreby kostimulácie alebo pomocou T-buniek. Zdroj: prevzaté a upravené podľa [72]*

Od roku 1891 sa imunoterapia stala jedným z pilierov liečby rakoviny spolu s chemoterapiou, chirurgickým zákrokom, ožarovaním a cieľnou terapiou vďaka ich prvým významným a úspešným objavom pre použitie k prevencii a liečbe nádorového ochorenia. V dnešnej dobe sa štúdie zameriavajú na prevenciu a boj proti rezistencii na imunoterapiu s cieľom určiť, ako urobiť nádor „imunitne prít'azlivým“, aby sa dosiahla lepšia reakcia na imunoterapiu. [2]

Imunoterapia ešte nie je výhradným liečebným postupom na rakovinu, pretože nie všetky typy nádorov a nie všetci pacienti z hľadiska individuálneho charakteru nádorov sú plne responzibilné k imunoterapeutickej liečbe. Avšak pokračujúci výskum prináša sľubné výsledky a tak dáva nádej pre ďalší rozvoj imunoterapie, hlavne s ohľadom na jej vyššiu účinnosť. [2]

3.3. Monoklonálne protilátky

3.3.1. História

V roku 1890 sa po objavení protilátok Emíliom von Behringom zahájilo rozpoznávanie ich potenciálneho a praktického terapeutického významu najmä v oblasti cielenej liečby infekčných ochorení. O necelé dve desaťročia (1906) neskôr Paul Ehrlich okrem toho, že zaviedol pojem imunoterapia, navrhol koncept na selektívnu eradikáciu buniek využívajúcich protilátky. Avšak tieto postupy sa v klinickej praxi začali uplatňovať o takmer storočie neskôr. [5]

Objav Milsteina a Köhlera v roku 1974 sa stal míľnikom v imunoterapii, kedy títo dvaja vedci realizovali a publikovali pokus na myšiach s cieľom vytvorenia klonu buniek, tzv. hybridómu, ktorý bude vytvárať protilátky a zároveň bude nesmrteľný. Išlo o fúziu dvoch materských buniek – rýchlo sa množiacej nádorovej (myelómovej) bunky, ktorá stratila kontrolu nad svojim delením, a bunkou, ktorá tvorí protilátku proti určitému antigénu (B-lymfocyt). [3, 5]

Vynájdenním tejto hybridómovej línie bola umožnená neobmedzená produkcia monoklonálnych protilátok. Tým, že sa pochopila genetická podstata súvisiaca s antigénnou variabilitou protilátok, viedlo to k ich príprave pomocou rekombinantných DNA technológií. [5]

Dlhú dobu sa hneď po objavení používali predovšetkým za účelom diagnostickým a od roku 1997 aj liečebným, kedy americký Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (FDA, z *angl.* Food and Drug Administration) povolil použiť prvú chimerickú monoklonálnu protilátku (MAb) *rituximab* (anti-CD20) ku klinickej liečbe nádorového ochorenia non-Hodkinovho lymfómu. Jeho mechanizmus účinku pozostával z jeho naviazania na antigén CD20 na povrchu nezrelých B-buniek a označil ich na eradikáciu pomocou NK buniek. [2, 5]

3.3.2. Charakteristika a štruktúra monoklonálnych protilátok

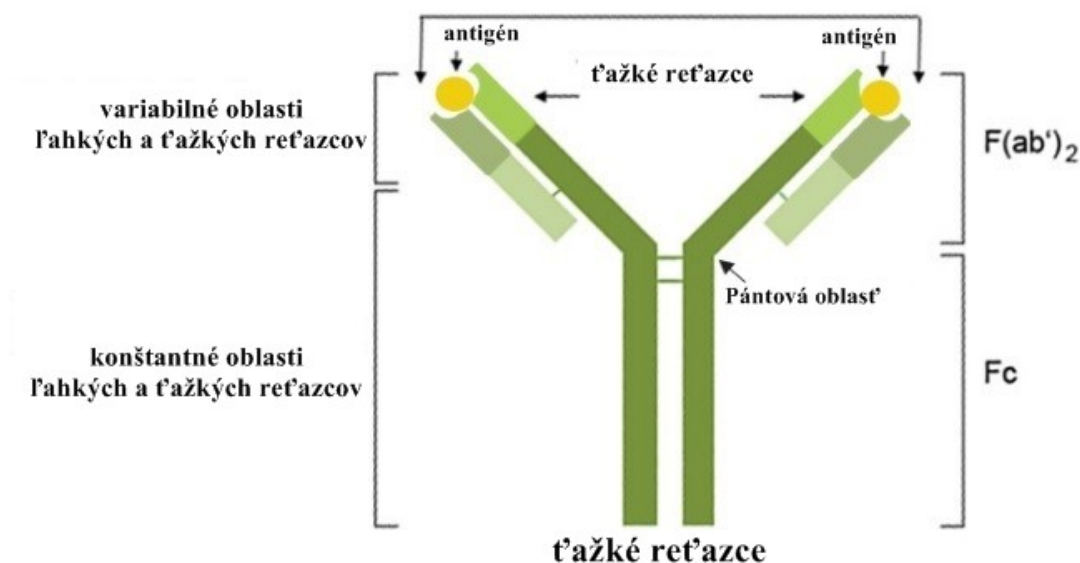
Monoklonálne protilátky (MAbs, z *angl.* monoclonal antibodies) sa od polyklonálnych protilátok odlišujú tým, že sú monošpecifické a homogénne (chemické individuá), vďaka čomu sú brané ako účinné nástroje v diagnostike i terapii v rade ochorení. U človeka sú základom humorálnej (látkovej) imunity. [4]

Monoklonálne protilátky sú protilátky produkované len jedným klonom buniek, konkrétne B-lymfocytov. Obsahujú jednotné variabilné oblasti a sú teda špecifické pre jeden epitop antigénu, tzn. cieľom je jediné miesto antigénu. Najčastejšími cieľovými antigénmi, na ktoré sa MAbs viažu, sú membránové proteíny (napr. CD20, CD40), rastové faktory (napr. VEGF), receptory (napr. VEGFR), adhezívne molekuly (napr. integríny) a iné. [1, 6]

MAbs sa zaraďujú na základe štruktúry k imunoglobulínom (Ig), ktoré navzájom môžeme odlíšiť podľa ťažkých reťazcov, ktoré sú tvorené konštantnými doménami a rozdeľujú sa do 5 tried alebo izotypov – IgM, IgA, IgE, IgD, IgG (zoradené podľa klesajúcej mol. hmotnosti). Medzi protilátkami nie sú odlišnosti len v ťažkých reťazcoch, ale líšia sa aj usporiadaním molekuly. [3]

Monoklonálna protilátka, ktorá sa klasicky využíva v terapii, sa z chemického hľadiska zaraďuje k proteínom, konkrétne glykoproteínom a dosahuje priemerne 150 kDa molekulovej hmotnosti, čo je zhruba 150x viac ako klasické cytostatiká. Celú molekulu tvoria dve odlišne funkčné jednotky skladajúce sa zo 4 kovalentne viazaných prvkov - z 2 ťažkých a 2 ľahkých reťazcov, ktoré sú spojené disulfidickými mostíkmi a pri správnom natočení pripomínajú symetrický tvar písmena Y. Spomínané funkčné jednotky sú tvorené z jedného tzv. konštantného fragmentu Fc („kryštalizujúci“, z *angl.* crystallizable fragment) a z dvoch identických častí Fab („viažúci antigen“, z *angl.* antibody binding fragment). [3]

Takzvaný Fc fragment obsahuje iba konštantné časti molekúl ťažkého reťazca. Stanovuje izotyp protilátky, sprostredkuje väzbu a umožní aktiváciu buniek imunitného systému (NK-bunky, makrofágy, CTL) a taktiež väzbu komplementu, čím môže zneškodniť cieľové bunky. Fab časť molekuly, obsahuje na dvoch ľahkých ramenách jedinečné variabilné domény a ktorými sa umožní väzba nádorového antigénu. Základnú štruktúru protilátky popisuje **Obrázok 2**. [3, 6, 8, 10]



Obrázok 2: Základná štruktúra monoklonálnej protilátky. Zdroj: Prevzaté a upravené podľa [73]

Veľká molekulová hmotnosť protilátok so sebou nesie aj zopár prekážok na dosiahnutie účinnosti ako je pomalšia kinetika distribúcie, či ohraničené penetračné vlastnosti. Preto majú protilátky nižšiu schopnosť preniknutia do nádoru či miesta zápalu. Najmä v prípade protinádorovej terapie v homogénnych nádoroch obmedzuje expresia antigénu a prísun krvi rovnomerné dodávanie protilátok. [4]

Podľa pôvodu štruktúry delíme MABs na myšie, humanizované, chimérické a čisto ľudské. Názvoslovie MABs sa odvíja od pôvodu protilátky. Už samotný názov nám pri základných znalostiach napovie, o aký typ MAB sa jedná, prípadne proti čomu bude pôsobiť. Prvá časť názvu je variabilná, druhá časť hovorí, na aký cieľ je MAB namierená napr. *-li(m)-* pre zložku imunitného systému, *-vi(r)-* pre vírový antigén, *-tu(m)-* ľubovoľný nádor. Ďalšie písmeno alebo slabika v názve poukazuje na pôvod MAB ako je napr. *-o-* pre myši pôvod, *-u-* označuje protilátky ľudského pôvodu, *-zu-* humanizované a *-xi-* chimerické MAB. Na konci názvu nájdeme vždy príponu *-mab*. [8, 12]

3.3.3. Mechanizmus účinku monoklonálnych protilátok proti nádorom

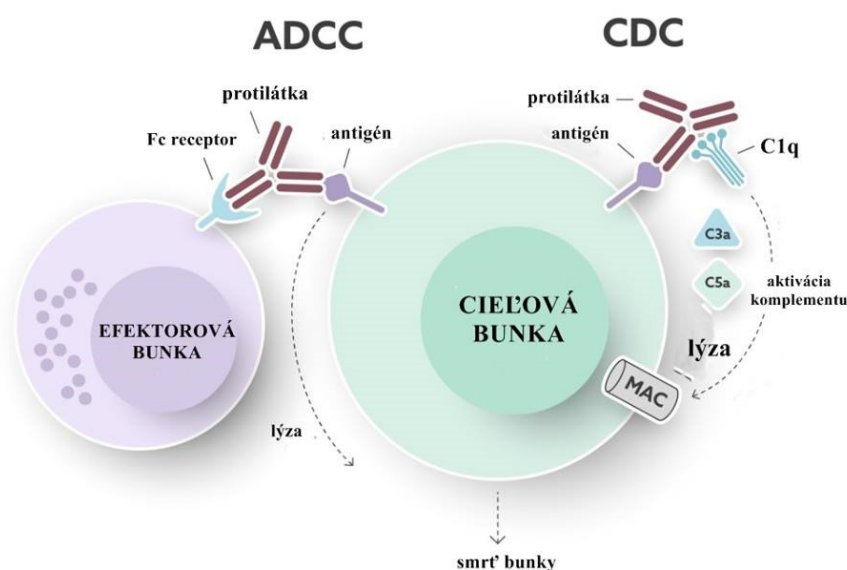
Hostiteľský organizmus je chránený proti nádorovým bunkám cirkulujúcimi protilátkami dvoma spôsobmi. Prvým spôsobom je priama väzba a neutralizácia toxínov. Druhý spôsob využíva aktiváciu imunitnej reakcie hostiteľa a to:

a) väzbou a aktiváciou komplementu na konštantný fragment Fc, čo bude viesť k tvorbe komplexu CDC (*„cytotoxicita sprostredkovaná komplementom“*, z angl. complement dependent cytotoxicity), ktorý degraduje cieľovú nádorovú bunku, pričom schopnosť protilátky viazať komplement sa líši v závislosti od izotypu Ig. [6, 9]

b) zahájením bunkovej odpovede ADCC (*„bunková cytotoxicita závislá od protilátky“*/cytotoxická reakcia závislá na protilátke, z angl. antibody dependent cellular cytotoxicity), kedy k nej dochádza po naviazaní Fc receptoru protilátky (CD16, CD 32 a CD64) na náležitý nádorový antigén, a tým sa nasmerujú tzv. zabíjačské bunky imunitného systému (monocyty a makrofágy) k usmrteniu opsonizovanej cieľovej bunky. Oba typy aktivácie imunitného systému sú znázornené na **Obrázku 3**. [9]

Rôzne izotopy a podtriedy protilátok sa líšia svojou schopnosťou aktivovať vyššie zmienenú reakciu, kedy ľudské IgM protilátky takmer výlučne aktivujú CDC, IgG izotopy (a najmä podtriedy IgG1 a IgG3) vedú k silnej ADCC. [9]

Mechanizmus, ktorým MAb dosahuje terapeutické účinky, nie je vždy úplne známy. Účinnosť MAb teda závisí od niekoľkých faktorov ako je funkcia a charakter cieľového antigénu, od toho koľko buniek sa nachádza na povrchu cieľového tkaniva a najmä od charakteru MAb ako je jej izotyp a špecifita. [4]



Obrázok 3: Mechanizmus účinku MAb pomocou **ADCC** a **CDC**. Protilátky môžu indukovať dva hlavné mechanizmy, ktoré vedú k smrti cieľových buniek: ADCC je indukovaná, keď protilátka viazaná na cieľ je rozpoznaná receptorom pre Fc na efektorových bunkách, ktoré spôsobujú bunkovú lýzu cieľovej bunky. CDC je indukovaná, keď protilátka viazaná na cieľ je rozpoznaná pomocou C1q, čo spôsobuje kaskádu udalostí, ktoré vedú k uvoľneniu rozpustného C3a a C5a a tvorbe komplexu membránového útoku (MAC, z angl. membrane attack complex), ktorý lýzuje cieľovú bunku. Zdroj: prevzaté a upravené podľa [18]

3.3.4. Typy monoklonálnych protilátok

Ako prvé protilátky pripravované a použité v klinike boli **myšieho pôvodu**. Išlo o myšiu proteín (t.j. produkt myších hybridómov), ktorý vyvolávala v pacientoch nežiadúcu imunitnú odozvu a behom krátkej doby sa myšia MAb stala neúčinnou. Došlo k jej vyviazaniu a likvidácii za účasti anti-myšej protilátky pacienta (HAMA, z angl. human anti-mouse antibody). Tvorba HAMA má dve nevýhody. Jednak ich opakovaná tvorba môže mať za následok navodenie alergií až anafylaktického šoku, a jednak opakovaná liečba môže byť menej účinná ako predchádzajúca. Vznikom HAMA vznikla hlavná prekážka v ďalšom používaní a v terapii za pomoci myších MAbs. Myšie monoklonálne protilátky nevykazovali teda ideálne vlastnosti pre klinickú použiteľnosť kvôli ich schopnosti navodiť tvorbu ľudských anti-protilátok (imunogenite) a ďalej kvôli

zlej schopnosti indukovať ľudské imunitné efektorové reakcie, kvôli premenlivej schopnosti myšacej časti interagovať s Fc receptormi ľudských buniek [3, 4, 6].

Problémy s myšími MAbs sa riešili objavom techniky génového inžinierstva, kedy sa variabilné oblasti myšej MAbs kombinovali s ľudskou alebo sa produkovala iba čisto **ľudská protilátka** s potlačením imunitnej odpovede inou terapiou. **Humanizované protilátky** sú teda geneticky upravené myšacie protilátky, v ktorých proteínová sekvencia bola modifikovaná tak, aby napodobňovala ľudskú protilátku, to znamená, že sa skombinovali konštantné domény ľudského Ig s variabilnou doménou myšacej MAb. Chimerizáciou vznikli **chimérne protilátky**, ktoré sú kódované génmi z viac ako jedného druhu, obvykle s konštantnými oblasťami z génov ľudských a s antigén viažúcimi oblasťami z myšacích génov, čím sa zvýšila ich stálosť v ľudskom obehovom systéme. Cieľom oboch procesov je zabrániť reakcii ľudských protilátok proti myšiam u pacientov podstupujúcich imunoterapiu. [3, 4,10]

Chimerické, humanizované a predovšetkým plne humánne protilátky majú menšiu imunogenicitu ako predtým pripravené myšie protilátky a umožňujú tak opakované podávanie protilátok, zvýšenú stabilitu v obehovom systéme a zlepšenú kapacitu na získavanie komplementu a cytotoxických buniek. To všetko prispelo k zvýšeniu terapeutickkej účinnosti MAbs. [11]

3.3.5. Príprava monoklonálnych protilátok

V roku 1975 bola prvýkrát publikovaná metóda, ktorou boli derivácie bunkových línií schopné produkcie špecifickej protilátky namierenej proti vopred definovanému imunogénu. Táto metóda bola založená na splynutí (t.j. fúzii) dvoch typov buniek – myelómovej (nádorovej) bunky a buniek sleziny (B-lymfocyty) imunizovaného zvierat'a. Proces splynutia prebiehal v prostredí propylénglykolu vo zvieracom tele, pretože pre podmienky výskumu nie je možné kultivovať B-lymfocyty v podmienkach *in vitro*. Kultivácia nemusí prebiehať len v slezine, ale dá sa pre ňu využiť i iný lymfatický orgán zvierat'a. [13]

Za bežných podmienok kultivácie tkanív a počas procesu splynutia jadier oboch typov buniek sú v roztoku propylénglykolu prítomné nielen hybridómové bunky (tzv. mutanty), ktoré produkujú požadované MAbs, ale aj hybridómy produkujúce iné protilátky, a ďalej neviazané myelómové bunky a neviazané bunky sleziny. Preto sa celá

kultúra buniek prenáša do HAT (hypoxantín-aminopterín-tymidín) média. HAT médium je selekčné médium pre kultiváciu cicavčích buniek. Opiera sa o kombináciu liečiv aminopterínu, ktorý pôsobí ako silný inhibítor metabolizmu kyseliny listovej inhibíciou enzýmu dihydrofolát reduktázy, a tým bráni produkcii hypoxantínu (derivát purínu) a tymidínu (deoxynukleozid). Dve posledné zmieňované látky sú medziproduktmi v syntéze DNA. [13, 14]

Bunky sleziny zanikajú v relatívne krátkom čase a keďže sa v kultúre nereplikovali, môžu sa ľahko oddeliť. Avšak myelómové bunky sa prispôbia na rast v kultúre, kedy neviazané myelómové bunky sa selektujú práve pomocou HAT média. Úlohou aminopterínu v HAT médiu je blokácia syntézy nukleotidov *de novo* a tým, že je táto cesta zablokovaná, využije sa na alternatívnu replikáciu tzv. záchranná cesta, u ktorej však musí byť prítomný hypoxantín a tymidín. Keďže tieto neviazané myelómové bunky nemajú enzým hypoxantín-guanín fosforibosyltransferáza (HGPRT, z *angl.* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase), nedokážu sa v kultúre replikovať a využívať z HAT média deriváty purínov, tým umierajú a vďaka tomu ich môžeme oddeliť od hybridómov. [13, 14]

V dôsledku použitia HAT média prežijú len splynuté bunky (hybridómy), ktoré prosperujú vďaka obsahu látok v tomto médiu. Naviac získali zdedením zo slezinových buniek enzým HGPRT, ktorý im umožňuje stále využívať cestu záchrany na ich replikáciu, aj keď je *de novo* dráha zablokovaná. Tieto hybridómy vykazujú „nesmrteľnú“ vlastnosť a tie klony, ktoré vytvárajú požadované protilátky, v tomto prípade MAbs namierené na špecifické antigény, sa môžu špeciálnymi testami izolovať od ostatných buniek. [13] Vlastný postup prípravy monoklonálnych protilátok zahŕňa dva hlavné kroky:

A) Imunizácia zvierat

Jednotlivé druhy zvierat sú rôzne citlivé na rôzne chemické zložky zmesi, preto je potrebné tento fakt vziať do úvahy pri výbere zvierat a pre prípravu monoklonálnych protilátok. Pri konečnom výbere by sa mal zväziť aj druh a kmeň rodičovského myelómu. Najlepšie by bolo, aby myelóm bol rovnakého druhu ako imunizované zviera, čo umožní ľahký rozvoj nádorov. Najjednoduchšími zvieratami pre prípravu MAbs sú myši a potkany. Hlavne potkany, keďže sú väčšie, ľahšie sa s nimi manipuluje a sú lepšie pre prípravu väčšieho množstva protilátky. Bez ohľadu na konečný výber myelómu, pre

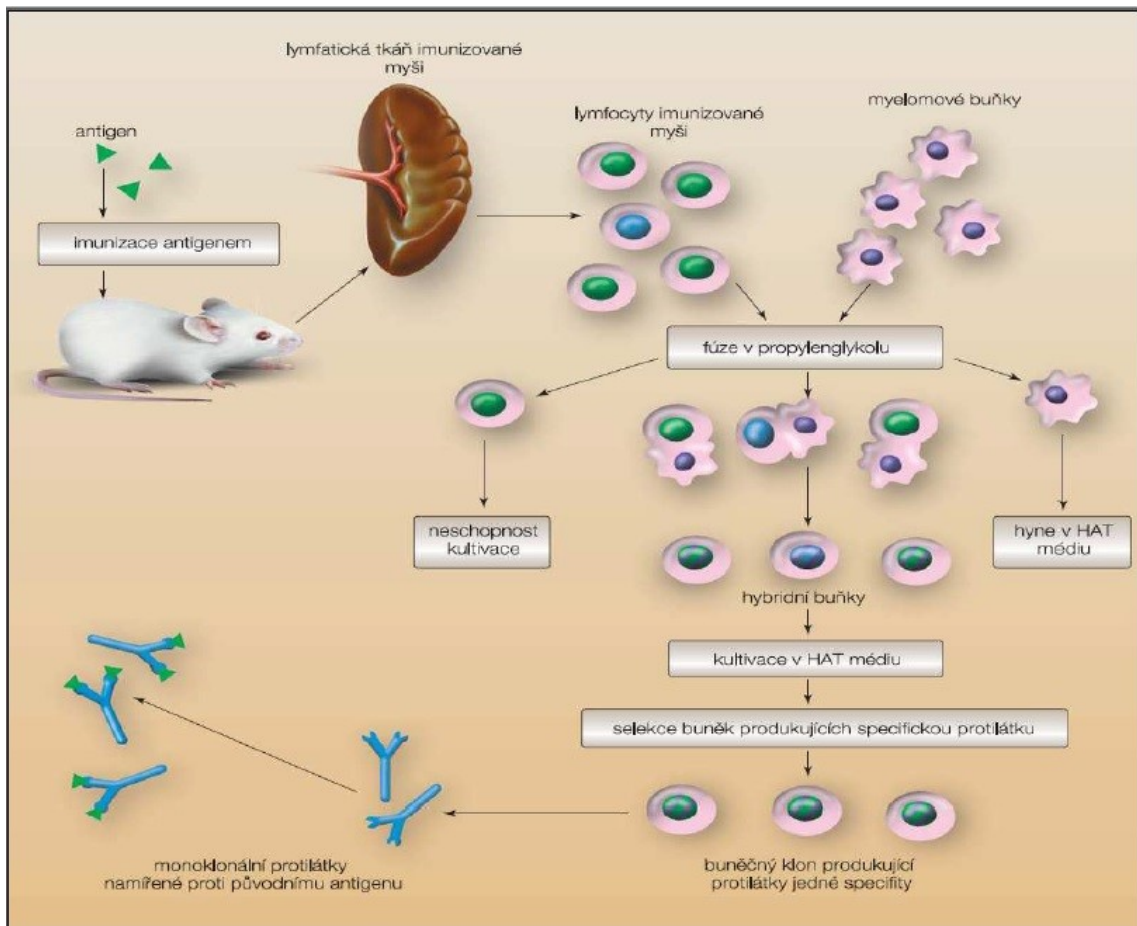
úspešnú deriváciu je najdôležitejším faktorom to, akým spôsobom sa myelómová kultúra udržiava pred fúziou. [13]

Pri príprave sa antigén rozpustný v proteíne aplikuje pomocou striekačky do viacerých miest laboratórneho zvierat'a. Injekcie môžu byť aplikované subkutánne na 3 až 4 rôznych miestach a to napríklad do chrbta blízko nôh a spodnej časti chvosta. Po 10 dňoch od aplikácie injekcie sa z chvosta odoberie kvapka krvi a tá sa použije na testovanie prítomnosti špecifických protilátok. Na fúziu sa vyberú tie zvieratá, ktoré dávajú najlepšie antisérum. Po mesiaci sa intravenózne podá proteínový roztok, ktorý už nezahŕňa adjuvans a po 3 až 4 dňoch sa po usmrtení pokusných zvierat izolujú bunky sleziny. [13]

Na približne 2 minúty sa mŕtve zviera umiestni do komory s CO₂, potom sa ponorí do 70% alkoholu a následne sa mu vyberie slezina za sterilných podmienok. Slezina sa na Petriho miske prepláchne roztokom a potom sa nakrája na 3 až 4 kusy a vloží do roztoku v skúmavke s okrúhlym dnom. Týmto postupom sa vytvorila z buniek sleziny a roztoku suspenzia. Po troch dňoch sedimentovania sa bunková suspenzia preniesie do inej skúmavky a nechá sa odstred'ovať pri pokojovej teplote. Niekoľkokrát sa resuspenduje, pričom sa tzv. supernatant (t.j. vodná časť nad scentrifugovanými bunkami) môže vyliat' a znova rozptýliť v už novom médiu. [13]

B) Príprava myelómových buniek na fúziu

Rovnakým postupom ako sa pripravili bunky sleziny sa postupuje u myelomových buniek. Tie sa v rámci spracovania izolujú z nádoru, následne sa centrifugujú, resuspendujú a nakoniec počítajú. Získané nádorové bunky z laboratórneho zvierat'a sú rýchlo deliace a od rodičov majú zdedenú dlhú životnosť. Myelomové bunky sa fúzujú so zvieracími lymfocytmi v propylénglykole a hybridne bunky sa kultivujú v HAT médiu, ako bolo popísané vyššie a ako je zhrnuté na **Obrázku 4**. [13]



Obrázok 4: *Príprava monoklonálnych protilátok podľa Milsteina a Köhlera. Z krvi imunizovaných myší sa izolujú jednotlivé B-lymfocyty a spoja sa s bunkami myelomu, ktoré im poskytnú nesmrteľnosť. Takto vzniknutý hybridom môže tvoriť ďalšie monoklonálne protilátky. Zdroj: prevzaté z [7]*

3.3.6. Farmakologické vlastnosti terapeutických monoklonálnych protilátok

Terapeutické MAbs sa podávajú parenterálne intravenóznou, subkutánnou alebo intramuskulárnou cestou. Intravenózna cesta je doteraz pre MAb najbežnejšia a je výhodná vzhľadom na rýchlosť systémového dodávania, úplnú biologickú dostupnosť a schopnosť aplikovať vysoké objemy. Má však nedostatky týkajúce sa pohodlia, nákladov a možnosti vyvolania alergických reakcií na infúziu. Tieto obmedzenia vyvolali záujem o podávanie extravaskulárnymi cestami, väčšinou pri subkutánnom a intramuskulárnom podaní. Tieto metódy majú nižšiu biologickú dostupnosť v rozmedzí 24%-95%, ale

poskytujú výhody samoaplikácie v domácom prostredí a nižšiu mieru nežiadúcich udalostí súvisiacich s infúziou liečiva. [22]

MAbs sa vylučujú z obehu primárne 2 spôsobmi. Prvým typom je na antigéne nezávislá (nešpecifická) postupná eliminácia prostredníctvom fagocytárnych buniek a endoteliálnych buniek RES (retikuloendoteliálneho systému, z *angl.* reticuloendothelial system). RES čistí MAbs viazané na antigén, tak i voľné MAbs, a keďže nie je saturovateľný, prebieha lineárne. Druhým typom je eliminácia sprostredkovaná cieľovou štruktúrou (antigénom). Mechanizmus cieleného sprostredkovania je závislý od väzby protilátky na antigén a následne dochádza k odstráneniu komplexu prostredníctvom endocytózy a degradácie lyzozómov. Pretože druhý typ eliminácie je závislý od väzby antigénu, ktorý je primárne viazaný na membránu, je proces saturovateľný a teda nelineárny. V závislosti od protilátky a jej cieľa sa tieto dva mechanizmy eliminácie vyskytujú paralelne. [22]

V závislosti od vlastností protilátky a od jej biologického cieľa, MAbs nesú riziko imunitných reakcií a nepriaznivých účinkov. S liečbou MAbs ako takých je spojená aj ich veľká toxicita. Toxicita, spojená s cieľom je založená na väzbe MAb-antigén. Príkladom je protilátka proti tumor nekrotizujúcemu faktoru alfa (anti-TNF α), môže vyvolať imunosupresiu a viesť k infekciám. Na druhej strane toxicita spojená s modalitou je nezávislá od cieľa a môže sa vyskytnúť akútne v čase injekcie alebo sa vyvinie dlhodobým pôsobením protilátky. Zahŕňa rôzne typy akútnych imunitných reakcií, ako sú zriedkavé prípady reakcií z precitlivelosti alebo syndrómu uvoľnenia cytokínov a častejšie udalosti, ako sú reakcie súvisiace s infúziou a reakcie v mieste vpichu. Imunogenita predstavuje oneskorenú precitlivelosť, čo môže mať vplyv na terapeutickú účinnosť MAbs. [22]

3.3.7. Využitie monoklonálnych protilátok v praxi

Objav a použitie MAbs spôsobilo zásadný zlom vo vedeckom výskume. Poskytujú takmer nekonečný zdroj diagnostických a terapeutických látok. Vďaka ich špecifite proti jednému epitopu a homogénosti sú i dôležitými nástrojmi používanými v biomedicínskom výskume, mikrobiologickom výskume a diagnostike vírusových a bakteriálnych chorôb napr. chrípky, herpes simplex, AIDS, hepatitídy, chlamýdiových infekcií atď. MAbs tvoria základ mnohých diagnostických testov *in vitro*. Diagnostické

MAbs sa čoraz viac používajú na identifikáciu prenosných chorôb vrátane infekcií prenosných transfúziou. Okrem diagnostiky našli uplatnenie aj na detekciu kľúčových proteínov v krvi alebo moči. Príkladom je včasné odhalenie vysokej hladiny prostatického antigénu v krvi vďaka jeho interakcii s MAb za tvorby detekovateľného imunokomplexu, ktorý poskytne varovanie o možnom rozvoji nádoru prostaty. Ďalšími zaujímavými príkladmi využitia MAbs v praxi sú krvné testy, tehotenské testy, a ďalej použitie MAbs ako výskumných nástrojov v imunohistochemii, v imunologickej metóde ELISA (test enzymového imunisorbentu, z *angl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), v prietokovej cytometrii a fluorescenčnej mikroskopii. [20, 21]

K liečebným účelom sa monoklonálne protilátky využívajú od 80. rokov 20. storočia. Transformovali sa z vedeckých nástrojov na silné ľudské liečivá. Ich aplikácia v klinickej praxi má obrovský potenciál. Hlavnou doménou ich využitia je terapia v oblasti nádorových ochorení. Okrem nej sú tiež neoddeliteľnou súčasťou liečby i v transplantológii a liečbe chorôb patriacich do systémov kardiovaskulárneho, respiračného, obličkového, imunologického a hematologického. V neposlednej rade sa MAbs používajú pre terapiu rôznych neurologických chorôb, a rovnako tak i bežných infekcií. [19]

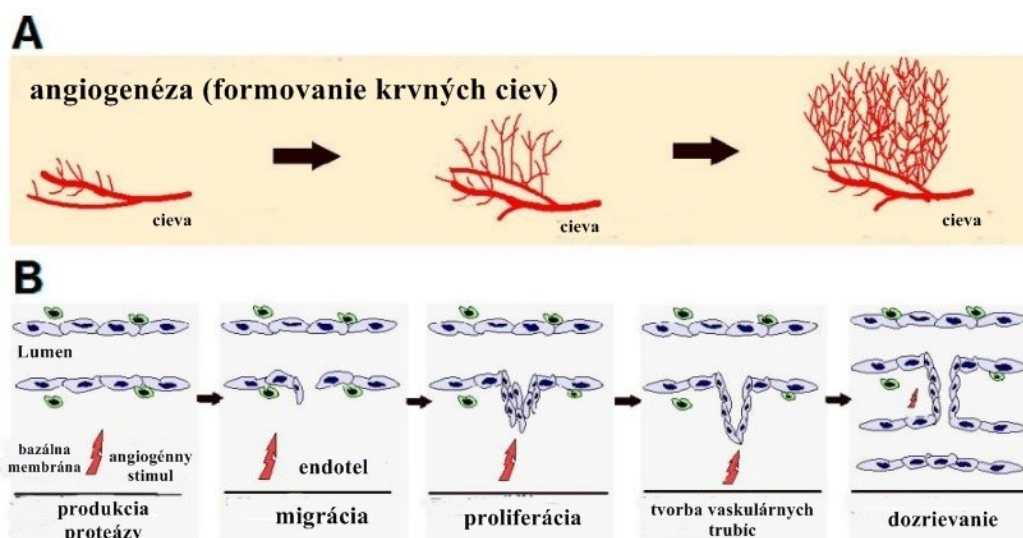
S použitím zcela ľudských MAbs sa zlepšila účinnosť a bezpečnosť, a taktiež sa znížila imunogenita a zlyhanie liečby. Najväčším obmedzujúcim faktorom pre ich použitie sú vysoké náklady, najmä v rozvojových krajinách. [19]

3.4. Angiogenéza

Na prepravu živín, kyslíka a signalizačných molekúl do buniek, tkanív a orgánov a zároveň na odstraňovanie oxidu uhličitého a konečných metabolických produktov z nich je nevyhnutná zložitá rozvetvená obehová sieť vaskulárnych endotelových a podporných buniek. Neovaskularizácia resp. nové formovanie krvných ciev sa uskutočňuje pomocou dvoch dejov: angiogenézou a vaskulogenézou. [23]

Embryonálna t.j. “klasická” vaskulogenéza je proces tvorby úplne nových krvných ciev v dospelom organizme z hemangioblastov, ktoré sa diferencujú na zrelé endoteliálne bunky a krvinky. Agregáciou angioblastov sa vyvíjajú počiatočné krvné cievy, tvorí sa tak primitívna sieť jednoduchých endotelových trubíc. Takto tvorené cievy

prechádzajú lokalizovanou proliferáciou a regresiou, ako aj migráciou a vetvením a pretvárajú sa na fungujúci obehový systém. Na rozdiel od toho je angiogenéza proces formovania nových krvných ciev, ale z už predtým existujúcich cievnych sietí prostredníctvom kapilárneho vetvenia. Počas tohto angiogénneho rastu sa zrelé endotelové bunky delia a sú následne začlenené do novovznikajúcich ciev a kapilár. Dôležité kroky v angiogenéze charakterizované odlišnými funkciami endotelových buniek zobrazuje **Obrázok 5**, pričom každý krok zahŕňa viac rastových faktorov, molekúl a receptorov, čo spôsobuje rôznorodosť signálnych dráh, ktoré ovplyvňujú patogenitu angiogenézy pri rôznych chorobách. Na úplné vykonanie vaskulogenézy a angiogenézy je nutná signalizácia prostredníctvom vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora (VEGF, z *angl.* vascular endothelial growth factor). [23, 26]



Obrázok 5: Znáznornenie angiogenézy. **A)** Proces formovania nových krvných ciev z predtým existujúcich ciev, ktorý umožňuje progresiu nádoru. **B)** Kroky smerom k angiogenéze zahŕňajú produkciu proteázy, t.j. proteolytického enzýmu, ktorý sa uvoľní po aktivácii endotelových buniek angiogénnymi stimulmi, čím dochádza k degradácii extracelulárnej matrix a bazálnej membrány; migráciu endotelových buniek a proliferáciu, t.j. vytvorenie „primárnych kličkov“, ktorých následná lumácia vedie k tvorbe vaskulárnych trubíc; anastomózu novovytvorených trubíc; syntézu novej bazálnej membrány a inkorporáciu pericytov a buniek hladkého svalstva, čím sa dokončia trubicové štruktúry, cez ktoré môže prúdiť krv. Zdroj: prevzaté a upravené podľa [24]

Angiogenéza je normálnym a komplexným procesom riadeným určitými biomolekulami, ktoré sa produkujú v tele, ale je súčasne kritická v mnohých procesoch, pri ktorých sa tkanivá rozširujú. Princípy tvorby krvných ciev sa značne líšia v závislosti od toho, či sa krvné cievy tvoria počas embryogenézy (vaskulogenézy), počas fyziologických procesov, ako je rast endometria, reprodukcia alebo hojenie rán (regulovaná angiogenéza), alebo počas patológií, ako je zápal a rakovina (patologická angiogenéza). Fyziologické procesy angiogenézy sú rozhodujúce pre zlepšenú perfúziu orgánov. Abnormálne zrýchlené procesy angiogenézy alebo patologická angiogenéza sú však spojené s rôznymi poruchami, ako je napríklad strata zraku pri očnej neovaskularizácii. [24, 25]

3.4.1. Angiogenéza fyziologická a spojená s nádorom

Fyziologická angiogenéza je prísne kontrolovaná komplexnou rovnováhou medzi endogénnymi proangiogénnymi (aktivujúce) a antiangiogénnymi (inhibujúce) faktormi. Nefyziologická je prítomná v celom rade chorôb, vrátane retinopatie, aterosklerózy, endometriózy, artritídy a rakoviny. Za fyziologických podmienok je angiogenéza stimulovaná širokým spektrom endogénnych molekúl ako sú rastové faktory, adhézne faktory (integríny, kadheríny), proteíny extracelulárnej matrix, proteínázy, transkripčné faktory a signálne molekuly. Existuje niekoľko desiatok známych endogénnych proangiogénnych faktorov, z ktorých sú najznámejšie rastové faktory zahrňujúce epidermálny rastový faktor (EGF, z *angl.* epidermal growth factor), tumor nekrotizujúci faktor (TNF, z *angl.* tumor necrosis factor) a hlavne rodinu vaskulárnych endoteliálnych rastových faktorov (VEGF, z *angl.* vascular endothelial growth factor), ktorá je bližšie popísaná v nasledujúcej kapitole. K najviac študovaným endogénnym antiangiogénnym faktorom patria angiostatiny, endostatiny, trombospodín a cytokíny (interferón- α , interferón- β , interleukíny). Vo väčšine fyziologických podmienok prevláda pôsobenie týchto negatívnych regulátorov a angiogenéza je utlmená. Na strane druhej pri určitých patologických stavoch, ako je progresia nádoru, prevláda pôsobenie pozitívnych regulátorov, a tým je angiogenéza aktívna. Úroveň expresie angiogénnych faktorov odrážajú agresivitu nádorových buniek. Objav a ďalšie skúmanie funkčnosti angiogénnych inhibítorov by mal pomôcť k zníženiu chorobnosti a úmrtnosti na karcinómy. [23, 28]

Cievy vytvorené počas fyziologických procesov sa odlišujú v niekoľkých znakoch od tých patologických. Zatiaľ čo cieva nádoru je morfoloicky abnormálna a dezorganizovaná, zdravé cievy sú usporiadané hierarchicky (tepny, kapiláry a žily). Nádorové cievy vykazujú čiastočné alebo úplné oklúzie, ktoré vedú k zlému prietoku krvi. Pericyty, ktoré obsahujú zdravé kapiláry, môžu byť voľnejšie asociované s nádorovými cievami alebo môžu úplne chýbať. Ďalším znakom patologicky vzniknutých ciev je nesúvislá základná vaskulárna membrána. Nádorové cievy sú netesné, čiastočne kvôli nedostatočnej perivaskulárnej podpore, ale tiež kvôli hojnej expresii VEGF-A v rastúcom nádore. Priesak vedie k nárastu intersticiálneho tlaku a tým aj k zhoršenému dodaniu liečiva. Tieto charakteristické znaky nádorových ciev sú do značnej miery pripisované zvýšenej intratumorálnej produkcii VEGF-A. [27]

3.4.2. Rodina vaskulárnych endoteliálnych rastových faktorov a ich receptorov

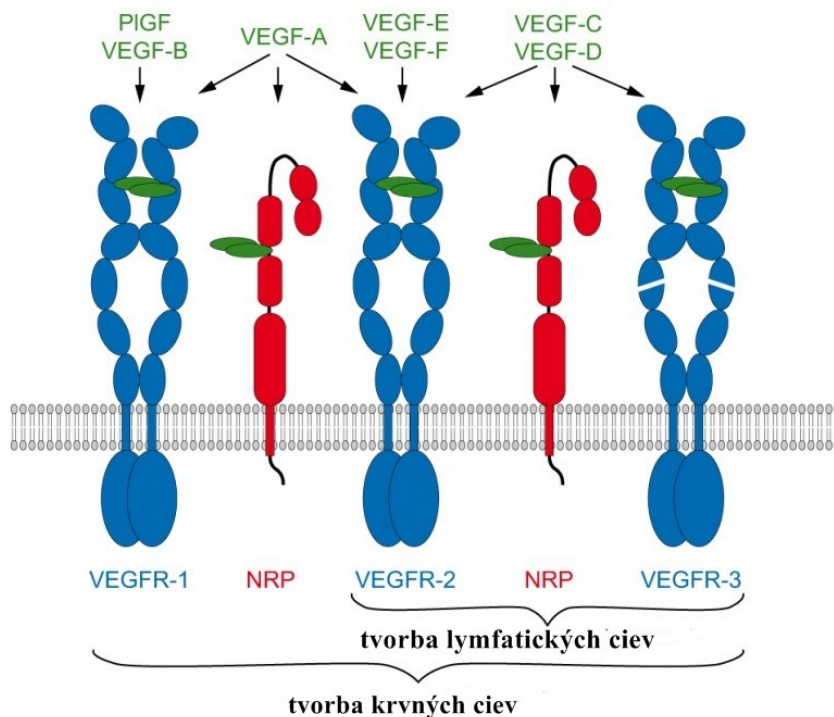
Rodina VEGF a ich receptorov (VEGFR) hrá kľúčovú rolu v mnohých patologických stavoch vrátane rakoviny a zároveň je najštudovanejším regulátorom vaskulárneho vývoja. Členovia rodiny VEGF sú dôležitými mediátormi angiogenézy nádoru. Viacnásobné funkcie VEGF sú sprostredkované komplexnými a selektívnymi interakciami medzi ligandmi, ich vysokoafinitnými receptormi skupiny VEGFR a koreceptormi (neuropilíny). [23, 29]

Alternatívnym zostrihom mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina, z *angl.* messenger ribonucleic acid) sa z jedného génu VEGF získalo 5 rôznych izoform VEGF, pričom sa líšia svojou molekulovou hmotnosťou, počtom aminokyselín a biologickými vlastnosťami, ako je napríklad schopnosť viazať sa na heparín a heparan-sulfátové proteoglykany na povrchu buniek. Produkcia VEGF je zvýšená v reakcii na hypoxiu, aktivované onkogény a rôzne cytokíny. Jeho hlavnou úlohou je indukcia proliferácie endoteliálnych buniek, podpora migrácie buniek a inhibícia apoptózy. VEGF indukuje *in vivo* angiogenézu, zvýši priepustnosť krvných ciev a hrá významnú rolu v regulácii vaskulogenézy. Neregulovaná tvorba VEGF prispieva k rozvoju nádorov a k etiológii ďalších chorôb vyznačujúcich sa abnormálnou angiogenézou. Vďaka jeho biologickým účinkom, ktoré zahŕňajú reguláciu vývoja hematopoetických kmeňových buniek,

remodelovanie extracelulárnej matrix a regeneráciu zápalových cytokínov, sa VEGF ukázal ako dôležitý cieľ pre antiangiogénnu terapiu. [30,31]

Ľudský genóm kóduje 5 VEGF génov (A, B, C, D a PlGF). Dva gény VEGF sú kódované u vírov (E) a hadov (F). Všetky existujú ako diméry a po naviazaní na VEGFR indukujú jeho dimerizáciu a následne iniciujú transmembránovú signalizáciu, ktorá vedie k aktivácii intracelulárnej domény tyrozínkinázy. VEGF-A, VEGF-B a placentárny rastový faktor (PlGF) sa podieľajú najmä na angiogenéze, pričom VEGF-C a VEGF-D namiesto toho regulujú lymfangiogenézu. [33]

Táto rodina rastových faktorov pôsobí prostredníctvom troch transmembránových tyrozínkinázových receptorov – VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3. Rôzne izoformy VEGF sa vyznačujú rôznou afinitou k daným receptorom (**Obrázok 6**). Isoformy VEGF-B a PlGF interagujú výlučne s VEGFR-1, izoforma VEGF-A je schopná aktivovať VEGFR-1 aj VEGFR-2, pričom posledný spomenutý receptor je považovaný za dominantný efektor proangiogénnych aktivít v zdravých aj chorých tkanivách. VEGF-C a VEGF-D sa viažu výlučne na VEGFR-3. Všetci členovia rodiny VEGF interagujú s neuropilínmi (NRP-1 a/alebo NRP-2, z *angl.* non-enzymatic neuropilin co-receptor), ktorým chýba cytoplazmatická enzýmová aktivita a pôsobia ako ko-receptory VEGFR. Vymenované angiogénne faktory sú homodimérne glykoproteíny, aj keď VEGF-A môže tiež vytvárať heterodiméry s PlGF. [32]



Obrázok 6: Ligandy VEGF a ich interakcie s VEGFR a NRP, ktorých väzobná špecifita je vyznačená šípkami. Ligandová väzba vyvoláva transmembránovú signalizáciu. Dimerizácia receptorov vyvolaná ligandom vedie k aktivácii vnútornej aktivity tyrozínkinázy, čo vedie k autofosforylácii receptorov a následne k aktivácii interagujúcich proteínov, ako aj k iniciovaniu downstream signalizácie. Zdroj: prevzaté a upravené podľa [33]

VEGF-A (tiež značený ako **VEGF**) je centrálny proangiogénny a vysoko špecifický mediátor, ktorý pomáha sprostredkovať účinok ďalších zapojených faktorov. Ide o silný angiogénny peptid viažúci heparin, ktorý je na základe svojej schopnosti nazývaný aj ako faktor vaskulárnej permeability. Podieľa sa na vaskulogenéze a neoangiogenéze, kde zohráva dôležitú rolu a spôsobuje radu účinkov ako je novotvorenie buniek, zabránenie apoptózy buniek, zvýšenie permeability ciev atď. Nie je produkovaný len endotelovými bunkami, ale aj bunkami nádorovými, krvnými doštičkami, makrofágmi, leukocytmi, astrocytmi, aktivovanými T-bunkami a mnoho ďalšími. Ľudský VEGF-A má rôzne izoformy, z ktorých sú najviac exprimované VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ a VEGF₁₈₉, pričom VEGF₁₆₅ je najväčšia a najviac aktívna izoforma vo vaskulogenéze. Izoformy vznikli na základe alternatívneho zostrihu mRNA ako bolo spomínané vyššie a každá z nich má špecifickú rolu pri špecializácii buniek a vývoji vaskulárneho systému. [5, 30, 35]

VEGF-B je exprimovaný v ranom embryonálnom živote, u dospelých sa nachádza najmä v kostrovom svale, myokarde a pankrease. Napomáha tvorbe myokardu v embryonálnom štádiu a k rozvoju kardiovaskulárneho systému. Zostrih génov viedol k dvom izoformám: VEGF-B₁₆₇ a VEGF-B₁₈₆. VEGF-B₁₆₇ má afinitu k VEGFR-1 a ľahko interaguje s NRP-1. [35]

VEGF-C je dôležitou molekulou, ktorá riadi lymfatické endotelové bunky počas embryogenézy a u dospelých jedincov sa produkuje v srdci, placente, štítnej žľaze, vaječníkoch, tenkom čreve atď. Má zvýšenú afinitu k receptoru VEGFR-3. Táto aktivácia signalizácie v lymfatických endotelových bunkách zvyšuje proliferáciu a tvorbu lymfatických ciev a siete, čo vedie k zvýšeniu lymfatických metastáz nádorových buniek. Okrem toho sa podieľa na regulácii imunitnej tolerancie a supresie. Z tohto dôvodu sa inhibícia tejto osi ukázala ako ďalšia významná terapeutická stratégia na liečbu rakoviny. [34, 35]

VEGF-D sa viaže rovnako ako VEGF-C na receptor VEGFR-3, ktorý je rozhodujúci pre lymfangiogenézu, a preto má podobné vlastnosti. Gén kódujúci VEGF-D je počas vývoja a v dospelých tkanivách exprimovaný v celom rade tkanív s výraznou expresiou v pľúcach a koži. [34]

VEGF-E je podtyp, ktorý bol objavený v genóme parapoxvírusu (vírus Orf), ktorého gén kódujúci proteín sa nenachádza v ľudskom genóme, ale môže sa do genómu infikovaných jedincov začleniť po získaní vírusovej infekcie a pôsobiť tak ako proangiogénny faktor. Viaže sa na VEGFR-2, pretože má k nemu špecifickú afinitu. Vykazuje rovnaké hladiny mitotickej aktivity na endoteliálnych bunkách a aktivitu vaskulárnej permeability ako VEGF₁₆₅. [35, 36]

VEGF-F ako siedmy člen rodiny VEGF je získaný z hadieho jedu. Pozostáva z dvoch proteínov príbuzných VEGF označených ako vamin či ako VR-1, ktoré majú 50% indentitu primárnej štruktúry s VEGF-A₁₆₅ a selektívne sa viažu na VEGFR-2. [36]

PlGF označovaný ako rastový faktor placenty je súčasťou rodiny VEGF. Prvýkrát bol identifikovaný v ľudských placentárnych tkanivách, následne bol nájdený aj v srdci, koži, pľúcach. Všetky jeho štyri izoformy: PlGF₁₃₁, PlGF₁₅₂, PlGF₂₀₃ a PlGF₂₂₄ majú afinitu k VEGFR-1, zároveň sa PlGF₁₅₂ viaže na neuropilíny a heparín v extraelulárnej matrix. PlGF nemá priamy mitogénny účinok a nezvyšuje vaskulárnu permeabilitu, ale zasahuje skôr v patologických podmienkach (zápal, ischémia, rakovina). Viaže sa na

VEGFR-1, vytesňuje VEGF-A z VEGFR-1 a umožní tak väzbu VEGF-A na VEGFR-2. Synergickým nepriamym pôsobením s VEGF-A, zvýši účinky VEGF-A ako je zvýšená vaskulárna permeabilita, migrácia, novotvorba buniek, atď. [35]

3.4.3. Cílená liečba zameraná na VEGF/VEGFR

V súčasnosti je niekoľko schválených anti-VEGF-A alebo anti-VEGFR látok, ktoré pomáhajú s potlačením až zastavením rastu nádorov. Anti-angiogénne činidlá sa pri klinickom použití dajú rozdeliť do dvoch kategórií: 1) inhibítory tyrozínkináz, ktoré sú chemickými látkami a inhibujú kinázovú aktivitu tyrozínkinázových receptorov a 2) proteínové biologické látky. Tieto anti-angiogénne biologické proteínové činidlá, ktoré sa v súčasnosti používajú v klinickom odbore, brzdia účinky členov rodiny VEGF (**Obrázok 7**). Pôsobia proti signalizácii sprostredkovanej oboma VEGFR-2 a VEGFR-1 alebo výlučne VEGFR-2. Mechanizmus účinku je založený na neutralizácii angiogénnych faktorov alebo sa viažu na VEGFR, čím bránia ich interakcii s ligandami. [32, 39]

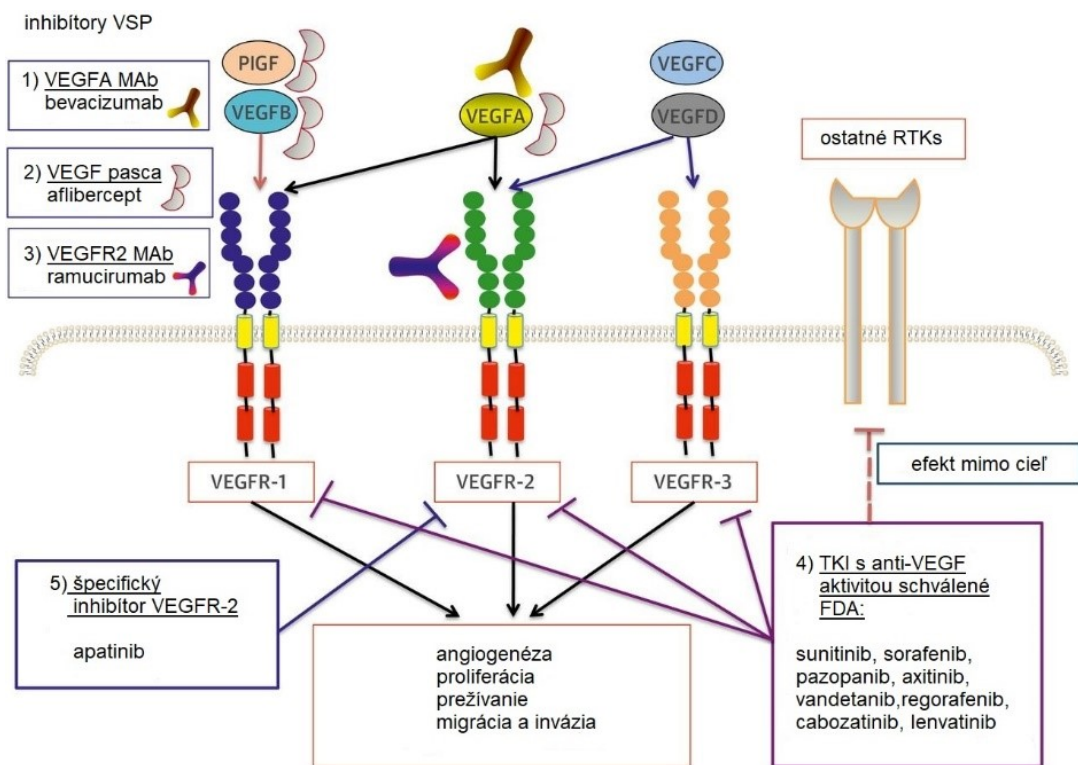
Príkladom vyššie popísaných látok je **bevacizumab** (Avastin®), ktorý je humanizovanou monoklonálnou protilátkou zameranou na všetky izoformy VEGF-A a tým brániaci aktivácii membránových receptorov VEGFR-1 a VEGFR-2. Navyiac, bevacizumab inhibuje tiež fyziologickú angiogézu. Bol schválený na liečbu pokročilých metastatických pevných nádorov vrátane rakoviny hrubého čreva a konečníka, nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC, z *angl.* non-small cell lung cancer), rakoviny prsníka, vaječníkov a krčka maternice v kombinácii s inými látkami (t.j. chemoterapiou). Medzi jeho indikácie patrí aj opakujúci sa glioblastóm, na ktorý sa používa v monoterapii a bol schválený iba FDA. [32]

Ramucirumab (Cyramza®) je plne ľudská monoklonálna protilátka antagonisticky pôsobiaca na VEGFR-2 a ktorá je bližšie popísaná v nasledujúcej kapitole 3.4. [32]

Aflibercept (Zaltrap®) je chimérický rekombinantný proteín, ktorý obsahuje ligand viažúce domény ľudskej VEGFR-1 (doména D2) a VEGFR-2 (doména D3) fúzované s Fc časťou ľudskeho IgG₁. Pôsobí ako návnadový receptor a je schopný sekvestrovať všetky izoformy VEGF-A, PlGF a VEGF-B. Ovplyvňuje patologickú aj fyziologickú angiogézu. Prostredníctvom EMA (Európska lieková agentúra, z *angl.*

European Medicines Agency) získal schválenie pre aplikáciu v liečbe metastatického nádoru hrubého čreva a konečníka. [32]

Existujú aj inhibítory kinázy s malou molekulou, ktoré inaktivujú všetky VEGFR a považujú sa za viaccieľové látky, pretože inhibujú niekoľko receptorov rastového faktora tyrozínkinázy. K takýmto molekulám patria **sorafenib** (Nexavar®), ktorý bol schválený FDA na liečenie pacientov s hepatocelulárnym karcinómom a pokročilým karcinómom obličiek a **sunitinib** (Sutent®), ktorému FDA udelil súhlas na liečbu gastrointestinálneho stromálneho nádoru a na pokročilý karcinóm obličiek. [32, 37, 38]



Obrázok 7: Grafické znázornenie biologických anti-angiogénnych činidiel zameraných na rodinu VEGF/VEGFR. Cicavčia rodina VEGF je tvorené piatimi izoformami, ktoré viažu a aktivujú tri štruktúrne podobné receptorové tyrozínkinázy. Inhibícia VEGF zahŕňa: 1) MAb zacielenú na VEGF-A, 2) návnadový VEGF, 3) MAb zacielená na VEGFR-2, 4) inhibítor tyrozínkinázy s anti-VEGF aktivitou a 5) špecifické inhibítory VEGFR-2. Zdroj: prevzaté a upravené podľa [42]

3.4.4. Ramucirumab

Ramucirumab (Cyramza®) je rekombinantná, úplne ľudská IgG1 monoklonálna protilátka, vyvinutá spoločnosťou Eli Lilly pre liečbu niektorých typov nádorov, ktorá sa viaže na ligandové miesto VEGFR-2 a bráni aktivácii tohto tyrozínkinázového receptora. Inhibuje ligandom stimulovanú aktiváciu VEGFR-2 a tým inhibuje proliferáciu a migráciu ľudských endotelových buniek. Súťažením s VEGF-A o väzbové miesto na receptore blokuje transdukciu signálu VEGFR-2 a preto pôsobí ako anti-VEGFR-2. [19, 32]

Ramucirumab získal v USA v roku 2014 prvý súhlas na použitie v monoterapii pri liečbe pokročilého alebo metastatického karcinómu žalúdka alebo adenokarcinómu gastroezofágového spojenia u pacientov, u ktorých došlo k progresii ochorenia po chemoterapii obsahujúcej fluorpyrimidín alebo platínu. [41]

Schválenie Cyramzy bolo založené na výsledkoch štúdie REGARD. Išlo o randomizovanú dvojito zaslepenú a placebo kontrolovanú štúdiu, pri ktorej sa celkové prežitie a prežitie bez progresie významne zlepšili u pacientov liečených ramucirumabom. Podobné výsledky sa pozorovali v kontrolnej štúdiu s paklitaxelom. FDA rýchlo rozšírila indikácie ramucirumabu na základe multicentrickej klinickej štúdie s názvom REVEL, v ktorej sa ramucirumab podával v kombinácii s docetaxolom a vďaka výhodám sa stal liečbou druhej línie u pacientov s metastatickým NSCLC štvrtého stupňa. V roku 2015 schválila FDA kombináciu ramucirumabu s chemoterapiou FOLFIRI (irinotecan v kombinácii s 5-fluorouracilom a leukovorinom) v liečbe metastatického kolorektálneho karcinómu, kvôli významnému zlepšeniu celkového prežitia pacientov. [19, 41, 43]

O niečo neskôr bol ramucirumabu udelený štatút lieku na ojedinelé ochorenia liečby rakoviny žalúdka a hepatocelulárneho karcinómu agentúrami EMA a FDA. Indikácie ramucirumabu boli rýchlo schválené FDA, pretože toto liečivo má špecifický cieľ, nižšiu toxicitu a vykazuje menej negatívnych účinkov oproti vyššie uvedeným látkam v antiangiogénnej terapii. V súčasnej dobe prebieha výskum pre možnú aplikáciu protilátky ramucirumab v terapii ďalších typov solídneho nádoru. [41, 43]

3.5. Rádiofarmaká

Rádiofarmaká sú farmaká značené rádionuklidom. Radionuklid je charakteristický svojím poločasom premeny a energiou a druhom žiarenia. Akékoľvek liečivé prípravky, ktoré sú používané pre lekárske účely a obsahujú jeden alebo i viac rádionuklidov inkorporovaných do inak neaktívnej zlúčeniny sa označujú ako rádiofarmaká. Kvôli tejto skutočnosti sa od ostatných liečiv zvlášť vyčleňujú. Zaobchádza sa s nimi rovnako ako s inými prípravkami, ale zároveň pri výrobe, príprave, manipulácii a používaní týchto rádioaktívnych látok je potrebné brať ohľad na určité zvláštne požiadavky, ktoré vyplývajú z hľadiska rádioaktívneho značenia. Pretože sa rádiofarmaká podávajú hlavne intravenóznou cestou, musia sa dôkladne overiť na sterilitu, apyrogenitu a všetky parametre kontroly kvality. Vyrábajú sa individuálne i hromadne. Pre individuálne pripravované rádiofarmaká sa používajú rádionuklidy s krátkym poločasom premeny (sekundy až hodiny) a pre hromadne vyrábané s dlhším poločasom (dni až týždne). Využívajú sa najmä v diagnostike, ale i terapii nádorových ochorení, respektíve ich kombináciou zobrazenia a terapie, čo sa označuje ako teranostika. [44, 59, 60]

Rádiofarmaká sú tvorené dvoma podstatnými časťami. Prvá časť je väzbová inak označovaná ako biologická alebo cieľová časť (napr. chemické zlúčeniny, farmaká), ktorá sa viaže na určité tkanivové alebo bunkové štruktúry, poznáme jej farmakokinetiku a vieme, ako sa v tele chová. Druhá časť je signálna (zahrňuje rádionuklid), a viaže sa na väzbovú časť molekuly a signalizuje jej polohu a množstvo v určitom mieste. Prípadnou treťou časťou môže byť linker, ktorý tvorí chemické prepojenie medzi spomínanými dvoma časťami. V rádiofarmakách na báze rádiokovov je ako linker potrebný bifunkčný chelátor, čo je chelát s reaktívnou funkčnou skupinou. Zaistí tak kovalentnú väzbu s molekulou vektora a tiež tvorí stabilný komplex s rádiokovom. [44, 64]

Rádiodiagnostické zobrazovanie je neinvazívny a rýchly postup, pri ktorom sa veľmi nízke koncentrácie rádiofarmaka zavádzajú do ľudského tela bez toho, aby spôsobovali akýkoľvek farmakologický účinok a poskytujú hodnotenie fyziológie, včasné odhalenie choroby a monitorovanie účinkov liečby v reálnom čase. [60]

3.5.1. Rádionuklidy a ich zdroje

Nevyhnutnou súčasťou rádiofarmák je rádionuklid, tiež nazývaný ako rádioaktívny izotop, v požadovanej rádiochemickej forme, ktorý je zdrojom ionizujúceho žiarenia. Sú obmedzene použiteľné v čase, pretože vplyvom rádioaktívnej premeny sa obsah rádionuklidu v rádiofarmaku exponenciálne znižuje s časom, čo ich odlišuje od ostatných liekov. [44]

Ide o prvky, ktoré majú prebytok jadrovej energie alebo nevýhodný obsah či pomer jadrových subatomárnych častíc a to je príčinou ich nestability. V dôsledku nestability v atómovom jadre prvku môže dôjsť k emisii častíc (α , $\beta^{+/-}$) a/alebo k emisii elektromagnetického žiarenia (fotóny γ lúčov). Rádionuklidy sa môžu vyskytovať v prirodzenom stave alebo pre potreby nukleárnej medicíny sa využívajú umelo pripravené pomocou cyklotrónov, v jadrových reaktoroch alebo sa získavajú z rozpadu iného rádionuklidu. [64]

V súčasnosti je dostupná široká paleta rádionuklidov, ktoré sa líšia v poločasoch, typom emisií žiarenia a energiou, čo umožní starostlivo vybrať najvhodnejší rádionuklid pre aplikáciu. V závislosti od rozpadových vlastností rádionuklidu sa môže použiť na diagnostiku a/alebo na terapeutickú aplikáciu. Celkovo sa pre diagnostické účely využívajú rádionuklidy s krátkou životnosťou emitujúce γ a β^+ žiarenie, pričom je dôležité dodržať i zásadu, aby mal rádionuklid dostatočný poločas premeny potrebný pre klinické vyšetrenie, zatiaľ čo pre terapiu sa podávajú α a β^- žiariče s poločasom premeny, ktorý nemá byť ani dlhý ani krátky, ale dostatočný na to, aby sa aplikácia nemusela často opakovať. [59, 60, 64]

Tým, že rádiofarmaká v sebe nesú rádioaktívny prvok, musia sa okrem požiadaviek aké sú kladené na ostatné liečivá podrobiť i ďalším skúškam, ktoré charakterizujú špecifické vlastnosti rádioaktívne značenej látky. K týmto skúškam patria chemické, fyzikálno-chemické metódy a biologické skúšky a tiež nukleárne metódy, ktoré zahrňujú stanovenie rádioaktivity, rádionuklidové a rádiochemické čistoty. [59]

Relatívne novým a stále sa rozvíjajúcim smerom nukleárnej medicíny je teranostika. Ide o lekársky prístup zavedený od deväťdesiatych rokov, ktorý kombinuje diagnostické a terapeutické účinky pomocou rádionuklidov o vhodnom žiarení. Teranostika poskytuje personalizovaný medicínsky prístup, ktorý umožňuje ušetriť čas

a náklady a navyiac umožňuje vyhnúť sa nežiadúcim biologickým efektom, ktoré by mohli nastať v prípade separovane aplikovaných diagnostických a terapeutických metód. [65]

Pre účely nukleárnej medicíny sa rádionuklidy pripravujú umelo. Primárnym zdrojom je výroba pomocou jadrového reaktoru alebo cyklotrónu a pre krátkodobé rádionuklidy sa využíva i sekundárny zdroj v podobe rádionuklidového generátoru. [40]

Jadrový reaktor

Rádionuklidy môžu v jadrových reaktoroch vznikáť dvoma spôsobmi. Prvý spôsob zahŕňa ožiarenie terčového materiálu neutrónmi, a tým prebieha aktivácia látok. Druhým spôsobom je vznik požadovaného rádionuklidu pomocou izolácie zo štípných produktov. Výhodou je pomerne lacná produkcia z dôvodu možného ožarovania veľkého množstva materiálu. Týmto postupom sa získavajú napr. ^{99}Mo a ^{131}I . [40, 44]

Cyklotrón

Spomedzi urýchľovačov nabitých častíc je cyklotrón najčastejšou voľbou pri výrobe rádionuklidov. Dokážu zrýchliť rôzne častice ako sú protóny, deuteróny a iné, ktoré potom dopadajú na terč s cieľovým prvkom, ktorý sa po dopade stáva rádionuklidom. Táto metóda umožňuje tvorbu širokého spektra izotopov. Častica s elektrickým nábojom je urýchľovaná pôsobením elektrického poľa, na ktoré je zvislo orientované magnetické pole. Úlohou magnetického poľa je kruhovo po špirále s rastúcim polomerom stáčať dráhu urýchľovanej častice, ktorá potom získa požadovanú rýchlosť, v ktorej sa zrazí s cieľovým prvkom. Na konci tejto dráhy dôjde k premene cieľového neaktívneho prvku na rádionuklid. Príkladom rádionuklidov pripravených v cyklotróne je napr. ^{11}C , ^{18}F a ^{111}In . [44, 65]

Rádionuklidový generátor

Využíva sa samovoľná premena materského rádionuklidu s dlhším fyzikálnym poločasom (pripraveného buď v jadrovom reaktore alebo v cyklotróne) na dcérsky rádionuklid s kratším poločasom premeny, pričom bude tiež rádioaktívny a s vhodnými vlastnosťami pre použitie v nukleárnej medicíne. Vďaka týmto generátorovým systémom je na oddelení nukleárnej medicíny umožnené mať zásobu rádionuklidu pre prípravu rádiofarmaka alebo priamo pre vyšetrenie. Najbežnejším rádionuklidovým generátorom je ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátor a ^{68}Ge - ^{68}Ga generátor. [40, 44]

3.5.2. Zobrazovacie metódy v nukleárnej medicíne

Schopnosť včasného odhalenia chorôb, zobrazenia a monitorovania špecifických biochemických procesov v reálnom čase, vrátane proliferácie, hypoxie, angiogenézy a odolnosti voči viacerým liečivám, predstavuje relevantné aspekty v prístupe molekulárneho zobrazovania, kde sa skúma konkrétny cieľ. Nukleárna medicína je založená hlavne na dvoch zobrazovacích prístupoch, ktoré pracujú na rovnakom základnom princípe, ktorým je detekcie emitovaného fotónu gama žiarenia. Jednofotónová emisná počítačová tomografia (SPECT, z *angl.* single photon emission computed tomography) pracuje s gama žiarením emitovaným priamo z rádionuklidu a pozitronová emisná tomografia (PET, z *angl.* positron emission tomography) je zameraná na detekciu dvoch fotónov žiarenia vzniknutého anihiláciou rádionuklidom emitovaného pozitronu s náhodným elektrónom. Hybridná technológia kombinuje PET či SPECT s výpočtovou tomografiou (CT, z *angl.* computed tomography) za vzniku kombinácií PET/CT, SPECT/CT alebo PET/SPECT/CT, a poskytuje tak informácie z dvoch či troch rôznych zobrazovacích metód korelované, čo umožňuje presnú anatomickú lokalizáciu funkčných abnormalít. [60, 62]

V SPECT zobrazovaní sa emituje γ žiarenie, ktorého uvoľnená energia z podaného rádiofarmaka je medzi 30 a 300 keV a detekuje sa pomocou gamma kamery, čo umožňuje vizualizáciu lúčov. PET využíva rádiofarmakum označené izotopom emitujúcim pozitron (tiež β^+ častice). Pozitron je častica s približne rovnakou hmotnosťou ako elektrón, ale opačne nabitá. Po krátkej vzdialenosti emitované β^+ častice reagujú s elektrónmi v tele a keď sa tieto dve častice spoja, navzájom sa anihilujú, čím sa vytvorí malé množstvo energie vo forme dvoch fotónov, t.j. niekoľko γ lúčov s energiou 511 keV, ktoré sa pohybujú v opačných smeroch a potom sú detekované radou detektorov. Registrované udalosti, ktoré sa generujú pri synchronnom spustení dvoch súhlasných detektorov sa v závislosti od času prevádzajú na 3D obraz distribúcie rádionuklidov v tele. [60, 63]

Techniky PET a SPECT sú najcitlivejšími metódami molekulárneho zobrazovania, ktoré umožňujú vykonávať diagnostické a základné klinické vyšetrenia. Zobrazovanie PET môže navyše poskytovať informácie o kinetike, toxicite a distribúcii pre tento účel rádioaktívne značených liekov, čím viac prispieva k liečebným stratégiám a vývoju liekov. Obe metódy ponúkajú kvantitatívny opis trojrozmerných štruktúr v hlbokých tkanivách a biochemických procesov na molekulárnej úrovni *in vivo*. Medzi

diagnostické rádionuklidy pre SPECT zobrazenie sa najčastejšie používajú ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{67}Ga a pre PET zobrazenie ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{82}Rb , ^{86}Y , ^{89}Zr a ^{124}I . Niektoré z najrozšírenejších rádionuklidov na diagnostické zobrazovanie sú uvedené v **Tabuľke 1.** spolu s ich poločasmi rozpadu. Aj keď zobrazovanie PET poskytuje vyššiu citlivosť a rozlíšenie, zobrazovanie SPECT má pomerne nižšie náklady v dôsledku používania ľahšie dostupných izotopov s dlhšou životnosťou. [60]

V súčasnosti je zvýšený záujem o vysoko synergickú kombináciu SPECT a PET s technikami výpočtovej tomografie (CT) alebo magnetickej rezonancie (MRI, z *angl.* magnetic resonance imaging).

Rádionuklid	Poločas rozpadu	Spôsob detekcie
^{64}Cu	12,7 hodín	PET
^{68}Ga	68,1 minút	PET
^{124}I	4,17 dní	PET
^{82}Rb	76,4 sekúnd	PET
^{86}Y	14,7 hodín	PET
^{89}Zr	78,4 hodín	PET
^{67}Ga	78,3 hodín	SPECT
^{111}In	67,2 hodín	SPECT
^{99m}Tc	6,0 hodín	SPECT

Tabuľka 1.: Najbežnejšie rádionuklidy používané pre SPECT a PET. Upravené a preložené z [60]

3.5.3. Experimentálne použité rádionuklidy

Gálium-67

V nukleárnej medicíne sa z rádionuklidov gália uplatňujú jeho tri izotopy: ^{66}Ga , ^{67}Ga a ^{68}Ga . Najviac sa využíva rádionuklid ^{67}Ga vo forme citrátovej soli, s ktorým boli uskutočnené experimenty i v tejto diplomovej práci. [49]

^{67}Ga je produkovaným cyklotrónom pomocou protónového bombardovania tenkej elektrochemicky nanesej vrstvy ^{68}Zn na terči. Získava sa po 15-20 hodinách

cyklotrónového lúča a pomocou rozpustenia kyseliny sa oddelí od spoluproduktov s vysokou čistotou. Pripravený rádionuklid ^{67}Ga prostredníctvom elektrónového záchytu emituje niekoľko γ fotónov s rôznou energiou žiarenia v rozsahu 93-394 keV, čím sa stabilizuje na ^{67}Zn . Jeho dostatočne dlhý fyzikálny poločas ($\tau_{1/2} = 78,3$ h) umožňuje prepravu na veľké vzdialenosti a široké použitie v nukleárnom zobrazovaní, najmä ako citrát- ^{67}Ga . Ako rádiofarmakum sa spája s chelátormi, ktoré majú aniónový donor kyslíka, ako je napríklad NOTA alebo DFO. [60]

Aj keď mechanizmus jeho hromadenia v nádore nie je úplne známy, experimenty v minulosti ukázali, že injekčne podaný sa spája s transferínom. Tkanivovo viazaný je tiež asociovaný s najmenej štyrmi proteínmi viažúcimi železo ako je transferín, laktoferín, feritín a siderofóry. Po podaní sa ^{67}Ga koncentruje v lyzozómoch a je viazaný na rozpustný intracelulárny proteín v určitých nádoroch a miestach infekcie. Gálium sa z tela vylučuje pomerne pomaly. Najskôr dochádza k jeho zvýšenej koncentrácii v lymfatických uzlinách a v kostiach, neskôr v slezine a pečeni. Využíva sa pri detekcii niektorých akútnych zápalových lézií, pre zobrazenie infekcií a u niektorých nádorov mäkkých tkanív. [54, 55]

Vďaka svojim γ emisiám sa ^{67}Ga využíva pre scintigrafiu a SPECT zobrazovanie a zároveň má potenciál ako terapeutický rádionuklid. [56, 57]

Zirkónium-89

V relatívne nedávnej dobe sa zvýšil záujem o použitie rádioizotopu zirkónia produkovaného cyklotrónom pre lekársku diagnostickú techniku PET. To stimulovalo výskum chémie Zr^{4+} a návrh nových ligandov na dosiahnutie stability požadovanej pre ich použitie *in vivo* na zobrazovanie. Z rádioizotopov zirkónia našlo uplatnenie iba ^{89}Zr , pretože ide o pozitronový žiarič s dostatočným dlhým fyzikálnym poločasom ($\tau_{1/2} = 78,4$ h). Za účelom dodania ^{89}Zr k danému cieľu *in vivo* je najprv potrebné vytvoriť komplex zirkónia s ligandom a pripojiť cieľiaci vektor na komplex, aby sa poskytla špecifita k určenej štruktúre. Nevýhodou je, že z celkovej radiácie emituje iba 23 % pozitronového žiarenia a zvyšok tvorí žiarenie γ . [49, 57]

V súčasnosti je značenie MAb s ^{89}Zr intenzívnym predmetom výskumu z hľadiska prípravy potenciálnych diagnostických látok. Príkladom môže byť preparát Zevalin® s účinnou monoklonálnou protilátkou ibritumomab tiuxetan značenou yttriom-90, ktorý

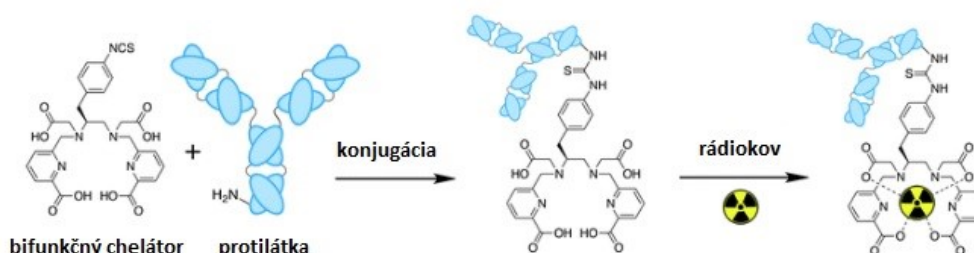
sa podáva pacientom s non-Hodgkinovým lymfómom. Zevalin sa v pilotných štúdiách klinického výskumu značil ^{89}Zr a demonštroval veľmi podobnou biodistribúciou akú má ^{90}Y -Zevalin.[57, 60, 61, 68]

3.5.4. Spôsoby rádioaktívneho značenia monoklonálnych protilátok

V posledných desaťročiach neustále rastie úloha rádioaktívne značených protilátok, najmä pri stanovovaní a lokalizovaní rôznych novotvarov. Je to hlavne kvôli dostupnosti týchto výrobkov vo farmaceutických množstvách, ako aj relatívne nízkemu výskytu nežiadúcich reakcií po intravenóznom podaní protilátok pacientom. [46]

Kombinácia monoklonálnej protilátky s rádionuklidom má v biomedicínskom výskume a praxi dôležitú rolu. Vďaka rádioaktívne značenej MAb vieme selektívne zacieliť nádorové antigény, čo sa využíva v rádioimunodiagnostike a rádioimunoterapii. Našli uplatnenie aj pri kvantitatívnom odhade biomarkerov v sére ako kritické činidlo v rádioimunoanalýzach. [47]

Na začlenenie rádionuklidu do protilátky sú k dispozícii rôzne stratégie rádioaktívneho značenia. Pre štúdie *in vivo* existuje niekoľko metód. Jedným zo spôsobov značenia je priame zavedenie daného rádionuklidu do funkčných skupín a to bez použitia chemických spacerov. Ďalšou možnosťou je nepriame značenie, tzv. využitie bifunkčných chelátotvorných činidiel, ktoré sú schopné tvoriť komplex s rádiokovom a viazať sa na proteíny. Princíp značenia pomocou bifunkčných chelátorov popisuje **Obrázok 8**. [48]



Obrázok 8: Grafické znázornenie väzby bifunkčného chelátoru na protilátku za následnej konjugácie s rádiokovom. Zdroj: prevzaté a upravené podľa [52].

3.5.4.1 Metóda priameho značenia monoklonálnej protilátky

Ide o jednoduchú techniku priameho naviazania rádionuklidu na MAb, ktorá sa môže použiť na detekciu vysoko exprimovaných antigénov. V praxi sa osvedčila halogenácia s využitím jódu, tzv. jodácia, pri ktorej dochádza k elektrofilnej substitúcii výmenou I^+ za H^+ . Priama rádiojodácia na histidínových alebo tyrozínových zvyškoch sa môže uskutočniť generovaním *in situ* zmiešaním druhov halogénjódchloridov z jodidu sodného alebo draselného a oxidačného činidla. Najbežnejšími zlúčeninami, ktoré sa využívajú ako oxidačné činidlá pri priamej metóde jodácie sú chloramín-T (N-chlór-4-metylbenzén-1-sulfonamid) a jodogén (1,3,4,6-tetrachlór-3 α ,6 α -difenyglykoluril). Oxidáciu monovalentného katiónu jodidu na jód je možné dosiahnuť aj enzymatickým prístupom pomocou laktoperoxidázy v prítomnosti peroxidu vodíka. Enzým vytvára jodizačné prostredie šetrnejšie než priame pridávanie chemických oxidantov ako je jodogén a chloramín-T. [45, 48]

Pokiaľ sú aminokyseliny histidín a tyrozín, na ktoré sa viaže jód, nutné pre správnu aktivitu a funkciu protilátky a ich zámennou by mohlo dôjsť k zmene až strate funkcie monoklonálnej protilátky, je výhodnejšie uskutočniť nepriamu jodáciu. Nepriama jodácia pozostáva z dvoch po sebe nasledujúcich krokov. Najprv sa malá molekula najoduje a potom sa pripojí k monoklonálnej protilátke konjugačnou reakciou. [49]

Ďalšou možnosťou okrem halogenácie je využitie rádionuklidu ^{99m}Tc pre priame značenie MAbs. ^{99m}Tc je vďaka dobrým fyzikálnym vlastnostiam, dostupnosti a nízkym nákladom optimálny rádionuklid pre zobrazovanie v nukleárnej medicíne. Touto metódou sa ^{99m}Tc viaže priamo na endogénne donorové sulfhydrylové skupiny na protilátke. Ide o jednoduchý spôsob, ktorý ale vykazuje nestabilitu *in vivo*. Pridaním slabého redukčného činidla 2-merkaptoetanolu (2-ME, z *angl.* 2-mercaptoethanol) sa v MAb redukujú disulfidické mostíky, ktoré sú nevyhnutné na udržanie štrukturálnej integrity imunoglobulínov a preto redukciami určitých strategických disulfidických mostíkov môže dôjsť k zníženiu imunoreaktivity. [50, 51]

3.5.4.2. Metóda nepriameho značenia monoklonálnej protilátky

Je ideálnou metódou pre aplikáciu zahŕňajúcu antigény, ktoré nie sú jasne exprimované. Použitím značených sekundárnych protilátok sa môže získať väčšia citlivosť v dôsledku amplifikácie signálu, ktorá je výsledkom väzby viacerých

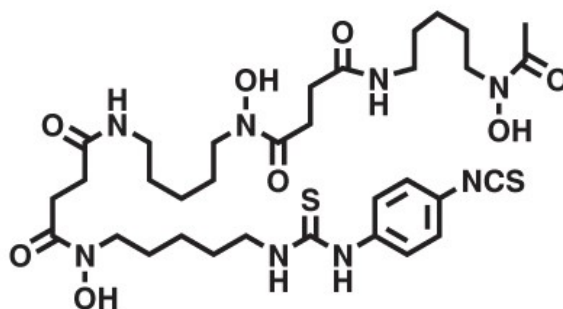
pomocných protilátok na primárnu protilátku. Na rozdiel od jodácie, konjugácia kovových rádionuklidov ako sú napríklad ^{111}In , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y na protilátky vyžaduje chelátotvorné činidlo. Všeobecne ide o náročnejší proces, ktorý začína výberom chelatačného činidla. Výber do určitej miery závisí od fyzikálnych vlastností a oxidačného stavu rádioaktívneho iónu, ktorý sa má konjugovať, aby sa dosiahla optimálna stability. Chelátor (systém ligandov) poskytuje donorové atómy a viaže sa na rádioaktívny ión, čím tvorí pevne stabilný koordinačný komplex, takže môže byť správne nasmerovaný na požadovaný molekulárny cieľ *in vivo*. Zvyčajne sa používa bifunkčné chelatačné činidlo (BFC, z *angl.* bifunctional chelator), ktoré sa bez ovplyvnenia termodynamickkej a kinetickej stability môže na jednej strane kovalentne viazať na biologicky aktívnu zameriavaciu molekulu akou je MAb a na druhej strane vytvoriť komplex s rádiokovom. [45, 47, 52]

Na celkové farmakokinetické vlastnosti rádiofarmaka majú veľký vplyv štruktúra a fyzikálne vlastnosti komplexu rádiokov-chelát. Podľa chemickej štruktúry delíme bifunkčné chelátory na dve základné skupiny: **acyklické** s lineárnou molekulou a **makrocyclické** s molekulou tvoriacou kruh. [52]

Acyklické chelátory na rozdiel od makrocyclických vynikajú svojou vlastnosťou kvantitatívne rádioaktívne označiť/koordinovať rádiokov za menej ako 15 minút pri izbovej teplote. Táto vlastnosť sa využíva pri práci s chelátormi a tvorbe konjugátov chelátoru s molekulami citlivými na teplo (napr. protilátky a ich deriváty) alebo pri práci s izotopmi s krátkym polčasom rozpadu (napr. ^{62}Cu , ^{68}Ga a ^{44}Sc). [52]

Najdlhšie známym acyklickým chelátorom je DTPA (dietyléntriaminpentaocťová kyselina), ktorá môže byť značená širokým spektrom rádioaktívnych iónov ako sú $^{64}\text{Cu}^{2+}$, $^{67/68}\text{Ga}^{3+}$, $^{111}\text{In}^{3+}$, $^{177}\text{Lu}^{3+}$, $^{44/47}\text{Sc}^{3+}$, $^{86/89}\text{Y}^{3+}$ a $^{89}\text{Zr}^{4+}$. Keďže ide o chelátor prvej generácie, v *in vivo* podmienkach s rôznymi rádiokovmi nie je stabilný. [52]

V experimentálnej časti tejto diplomovej práce sa použil chelátor DFO (deferoxamín), ktorý sa natívne viaže na železité ióny a vo veľkej miere sa používa pre chelataciu izotopov zirkónia a gália. Pre ^{89}Zr je DFO ako jediný kompetentný chelátor, ktorý je k dispozícii aj pre *in vivo* aplikáciu. Štruktúra DFO je znázornená na **Obrázku 9**. [52]



Obrázok 9: Štruktúra acyklického chelátoru deferoxamínu (*p*-SCN-Bn-deferoxamine).

Zdroj: prevzaté z [53]

Skupina makrocyclických chelátorov zahŕňa DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina), ktorý je v súčasnosti jedným z najpoužívanejších z tejto skupiny a je považovaný za jeden zo zlatých štandardov pre množstvo izotopov vrátane ^{111}In , $^{67/68}\text{Ga}$, ^{64}Cu , ^{177}Lu , $^{44/47}\text{Sc}$ a $^{86/90}\text{Y}$. Síce disponuje nevýhodou pomalšej tvorby komplexu s rádiokovom, ku ktorej je potrebné dodať vyššiu teplotu, ale nakoniec sú tieto komplexy v *in vivo* podmienkach stabilnejšie. [52]

Ďalším makrocyclickým chelátorom je NOTA (1,4,7-triazacyclononan-1,4,7-trioctová kyselina). Považuje sa za zlatý štandard pre tvorbu komplexu s $^{67/68}\text{Ga}$. Oproti chelátoru DOTA má rýchlejšiu kinetiku tvorby komplexu a nie je potrebná zvýšená teplota, čo je výhoda pre väzbu s termolabilnými proteínmi. [52]

3.6. *In vitro* testovanie väzieb na receptory

Za účelom rádiodiagnostiky a rádioterapie cieľime rádiofarmaká na určité miesto v tele pacienta. V mnohých chorých tkanivách sú nadmerne exprimované receptory, ktoré sú cieľom záujmu onkológie. Predtým než sa rádiofarmakum použije u ľudského pacienta, musí sa vykonať prísne testovanie, rad experimentov. [58]

Pre potenciálny výskum *in vivo* existujú početné kombinácie zlúčenín a ligandov, a preto na štúdium interakcií medzi cieľovým receptorom a požadovaným ligandom pre rýchle a nenákladné zúženie spektra a identifikáciu hlavnej zlúčeniny pre ďalšie skúmanie sa používajú *in vitro* testy. Tieto experimentálne štúdie sú zamerané na receptory pre vyhodnotenie potenciálu nového agens pred tým, než sa pristúpi k experimentom na zvieratách a nakoniec na ľudských modeloch. Na meranie interakcií

ligand-receptor sú opísané štyri experimentálne metódy: saturačná a kompetitívna väzba a internalizačné a efluxné štúdie. Tieto testy väzby na receptor jednotlivu alebo spolu, sú užitočnými nástrojmi pri vývoji rádiofarmák. [58]

V saturačných väzbových štúdiách sa meria a analyzuje množstvo rádioligandu potrebné na saturáciu špecifického receptora. Tieto experimenty sa používajú na stanovenie rovnovážnej disociačnej konštanty rádionuklidu (K_D), ktorá vyjadruje schopnosť väzby ligandu na receptor, a taktiež pre stanovenie celkového počtu receptorov exprimovaných na bunkách, ktorý vyjadruje maximálnu väzbovú kapacitu receptorov na jednotku celkového proteínu (B_{max}). Nižšie hodnoty K_D naznačujú vysokú afinitu k receptorom pre rádioligandy. [58]

V kompetitívnych väzbových štúdiách sa sleduje kompetentný ligant, ktorý súťaží o dostupné receptorové miesta so štandardným rádioligandom so známou vysokou afinitou k receptoru. Údaje o kompetícii sa analyzujú, aby nám poskytli ďalší indikátor afinity k receptoru, ktorý sa nazýva hodnota IC_{50} (inhibičná koncentácia 50%, z *angl.* half maximal inhibitory concentration), ktorý sa môže použiť na klasifikáciu relatívnych väzbových afínít k receptorom pre sériu ligandov. Čím je hodnota IC_{50} ligandu nižšia, tým je vyššia jeho väzbová afinita k receptoru. [58]

V internalizačných a efluxných štúdiách sa meria rýchlosť a rozsah množstva rádioligandu, ktorý sa dostáva do buniek (internalizácia) a prípadne sa z nich následne uvoľňuje (eflux), čo je väčšinou sprostredkované receptorom a poskytuje tým prehľad o bunkovom vychytávaní/zadržiavaní rádioligandu. [58]

3.7. Významné protilátky používané v praxi

V posledných desaťročiach nastal rozmach v používaní monoklonálnych protilátok, ktoré sa javia ako mimoriadne všestranné platforma pre vývoj nových liečiv. Nielen v terapii onkologických ochorení, ale i v rade ďalších liečebných postupov o ne pretrvávajú obrovský záujem ako v lekárskej tak farmaceutickej spoločnosti. [4, 19, 71] V súčasnosti existuje mnoho spôsobov ako sa MAbs používajú v terapii nádoru, vrátane konjugátov protilátka-liečivo, zacielenie na pro-tumorigénne zlúčeniny, prostredníctvom bišpecifických T-buniek (BiTE, z *angl.* bispecific T cell engagers) a inhibítorov imunitného kontrolného bodu. [71]

Jednou zo skupín sú nekonjugované tiež nazývané „holé“ protilátky, ktoré fungujú samy o sebe, hoci niektoré z nich majú malú protinádorovú aktivitu. Zameriavajú sa na špecifický protinádorový antigén, ktorý iniciuje imunologickú odpoveď závislú od imunitných mechanizmov hostiteľa, aby zničil cieľovú bunku. [69, 70]

Vďaka špecifite pre nádorový antigén sa stali nekonjugované protilátky navyiac i užitočnými na dodávanie cytotoxických zlúčenín priamo do nádorových buniek. Prostredníctvom konjugácie MAb s rôznymi efektorovými molekulami, ktoré po väzbe protilátky a jej internalizácii spôsobujú smrť cieľových buniek, bol získaný klinicky prospešný nástroj pre protinádorovú liečbu. Ide o kombináciu vlastného účinku MAb s účinkom naviazanej bunky poškodzujúcej látky, kedy konjugovaná MAb cirkuluje v tele pacienta, kým nenájde zamýšľaný cieľový antigén, a tým sa pomáha minimalizovať poškodenie zdravých buniek. Na MAb naviazané efektorové molekuly môžu zahŕňať cytotoxické liečivá, imunotoxíny a už vyššie v texte uvedené rádionuklidy. Najdôležitejším hľadiskom pri navrhovaní konjugátu je výber cieľa, ktorý je hlavným determinantom protinádorovej aktivity a selektivity. Navyše ciele musia byť pripravený imunokonjugát schopný internalizácie po naviazaní protilátky na cieľovú štruktúru, aby sa liečivo uvoľnilo. [69, 71]

Prvým konjugátom protilátka-liečivo (ADC, z *angl.* antibody-drug conjugate) sa stal brentuximab vedotín. Ide o MAb zameranú na CD30 exprimovaný lymfómovými bunkami spojenými s mikrotubulovým činidlom monometyl auristatín E. Ďalšou je adotrastuzumab emtansín, ktorý sa viaže na receptor HER2 (receptor pre ľudský epidermálny rastový faktor, z *angl.* epidermal growth factor receptor) a je zložený z trastuzumabu a cytotoxického tubulárneho jedu mertansinu, ktorý bol schválený pre pacientov s metastatickým karcinómom prsníka. [71]

Druhou skupinou cytotoxických činidiel, ktoré využívajú pre konjugáciu s MAb, sú biologické toxíny. K dnešnému dňu bol schválený americkou FDA pre klinickú aplikáciu iba moxetumomab pasudotox, čo je CD22 cieleňá MAb spojená s pseudomonas exotoxínom A pre vlasatobunkovú leukémiu. [71]

Poslednou kategóriou cytotoxických látok konjugovaných s protilátkami sú rádionuklidy. Do súčasnosti boli schválené dve rádioimunoterapeutické MAb ako formu cielenej rádioterapie, t.j. ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan a ^{131}I -tozitumomab. Oba

rádioimunokonjugáty používajú MAb špecifickú pre CD20 na dodanie buď ^{90}Y alebo ^{131}I do lymfómových buniek. [71]

Výskum ADC pokračuje s cieľom lepšieho pochopenia mechanizmu aktivity ADC, ktorý umožňuje racionálny návrh kombinácii protilátka-liečivo. Komplexný zoznam FDA schválených MAb v onkológii je uvedený v **Tabuľke 2.** [71]

Nekonjugované MAb				
Generický názov (obch. názov)	Pôvod	Izotyp a formát	Cieľ	Indikácia
Trastuzumab (Herceptin)	Humanizovaná	ľudský IgG1	HER2	n. pŕs
Rituximab (Rituxan)	Chimerická	ľudský IgG1	CD20	CLL
Cetuximab (Erbix)	Chimerická	ľudský IgG1	EGFR	KRK
Bevacizumab (Avastin)	Humanizovaná	ľudský IgG1	VEGF	KRK, NSCLC, n. pŕs, ľadvín, vaječníkov
Alemtuzumab (Campath-1H)	Humanizovaná	ľudský IgG1	CD52	CLL
Imunokonjugáty				
Generický názov (obch. názov)	Pridaná látka		Cieľ	Indikácia
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)	izotop ^{90}Y		CD20	lymfóm
^{131}I Tositumomab (Bexxar)	izotop ^{131}I		CD20	lymfóm
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)	cytotoxické antibiotikum N-acetyl gama kalicheamicín		CD33	AML
Trastuzumab emtasin (Kadcyla)	tubulárny jed		HER2/ <i>neu</i>	n. pŕs, žalúdk
Brentuximab vedotin (Adcetris)	cytostatikum MMAE		CD30	HL, sALCL

AML (akútna myeloidná leukémia), CLL (chronická lymfocytárna leukémia), HL (Hodkinov lymfóm), KRK (kolorektálny karcinóm), MMAE (monometyl auristatín E), n. (nádor), NSCLC (nemálobunkový pľúcny karcinóm), sALCL (systémový anaplastický veľkobunkový lymfóm)

Tabuľka 2.: Prehľad vybraných MAb schválených FDA pre použitie v onkológii. Prezaté a upravené podľa [19, 67]

4. CIELE PRÁCE

Cieľom predloženej diplomovej práce bolo pripraviť gáliom-67 a zirkóniom-89 rádioaktívne značený ramucirumab prostredníctvom metódy nepriameho značenia pomocou chelátoru deferoxamínu.

Následnou úlohou bolo overiť pripravené rádioimunokonjugáty $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}/^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ na rádiochemickú čistotu pomocou analytických metód HPLC s rádiometrickou detekciou a iTLC, a súčasne zmerať stabilitu pripravených rádiopreparátov.

Po overení rádiochemickej čistoty bolo ďalšou úlohou overiť afinitu rádioaktívne značenej protilátky k receptoru VEGFR-2 exprimovaného na SKOV-3 bunkách pomocou *in vitro* manuálnej techniky pre stanovenie rovnovážnej disociačnej konštanty ligand receptorovej interakcie.

V rámci práce s rádiopreparátom $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ bolo ďalšou úlohou analyzovať výsledky *in vivo* biodistribúcie a PET/CT zobrazenie SKOV-3 nádorov v myšiach v časových intervaloch 1, 3 a 6 dní po aplikácii rádiofarmaka.

Neoddeliteľnou súčasťou experimentálnej práce bolo praktické vykonanie bunkovej kultivácie, manipulácia s otvorenými rádioaktívnymi žiaričmi, príprava roztokov a vzoriek k analýze a v neposlednom rade zoznámenie sa s *in vivo* experimentálnou prácou a meraním na mikroPET/SPECT/CT systéme.

5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1. Použité prístroje a software

5.1.1. Prístroje a software na pracovisku RIL pri Katedre farmakológie a toxikológie na Farmaceutickej fakulte UK

- analytické váhy (Sartorius Analytic)
- automatické pipety (v pipetovacom rozsahu 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l; Eppendorf Research plus)
- bunkový inkubátor (SANYO MIR-153)
- bunkový inkubátor (Sartorius Stedim Biotech, Certomat® CS-18)
- Bürkerova počítacia komôrka pre kvantifikáciu buniek (Brand)
- detektor povrchovej kontaminácie (POLON)
- detektor rádioaktívneho žiarenia (Bq Metr 4, BQM)
- digestor (POLON)
- Gamma Counter pre meranie gama žiarenia v biologických vzorkách (Automatic Gamma Counter, Waltec Wizard²™3'', 2480 Perkin Elmer)
- HPLC system (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies Inc.) s rádiometrickou detekciou (URL-2 POLON)
- iTLC-analyzátor RITA Star (Raytest)
- laminárny box (Bio Air Instruments)
- magnetické miešadlo (IKA RTC Basic)
- Microsoft Office Excel (MS Office 365)
- mikroskop (XDS-IR, OPTICA)
- multidávkovacia pipeta (v pipetovacom rozsahu 0,5-50 ml, Handy step, Brand)
- multikanálová pipeta (v pipetovacom rozsahu 1-200 μ l, Comfort)
- nesterilný bunkový inkubátor (Dry-Bath, MS Science)
- pH meter (Eutech Instruments pH510)
- program Clarity version 4.0.3.876 na ovládanie rádiodetektoru (DataApex LTD., Praha, ČR)
- program Gina Star pre vyhodnotenie meraní z analyzátoru iTLC Stat (Raytest)
- program GraphPad Prism 8.4.3 (San Diego, CA)

- program OpenLab CDS ChemStation Edition for LC & LC/MS Systems (Agilent Technologies) na ovládanie HPLC systému
- predvážky (Kern PLB 200-3)
- sklenená Pasteurová pipeta (Brand)
- spektrofotometer (TECAN INFINITE M200 PRO)
- trepačka (Vortex V1 plus Biosan)
- ultrazvuková kúpeľ (Ecoson Ultrasonic Engineering)
- vodná kúpeľ (Julabo, TW12)

5.1.2. Prístroje a software na pracovisku Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

- iTLC-analyzátor Cyclone[®] Plus Storage Phosphor System (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA)
- program PMOD (PMOD Technologies, Zürich, Švajčiarsko)
- software Albira (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, USA)
- software OptiQuant 5.0 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA)
- zobrazovací systém mikroPET/SPECT/CT Albira pre malé zvieratá (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA)

5.2. Použitý materiál

5.2.1 Použitý materiál na pracovisku RIL pri Katedre farmakológie a toxikológie na Farmaceutickej fakulte UK

- centrifugačná falkónka Vivaspin 6, Membrane 50 000 (Sartorius, Spojené kráľovstvo Veľkej Británie a Severného Írska)
- centrifugačná skúmavka (50 ml, TPP)
- HPLC kolona (BIOSil Sec 250, 300 x 7,8 mm, BioRad Gel column)
- iTLC-SG (Glass microfiber chromatography paper impregnated with silica gel, Varian)
- kultivačná fľaša (75cm² a 182 cm², TPP)
- pipetovacie špičky (Eppendorf)
- sérologické jednorázové pipety (o objemoch 5, 10, 25 ml; TPP)
- 24-jamkové doštičky (TPP)
- 96-jamkové doštičky (TPP)

5.2.2. Použitý materiál na pracovisku Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

- iTLC-SG (Glass microfiber chromatography paper impregnated with silica gel, Varian)
- kultivačná fľaša (75cm² a 182 cm², TPP)
- pipetovacie špičky (Eppendorf)
- sérologické jednorázové pipety (o objemoch 5, 10, 25 ml; TPP)
- 24-jamkové doštičky (TPP)
- 96-jamkové doštičky (TPP)

5.3. Použité chemikálie

5.3.1. Použité chemikálie na pracovisku RIL pri Katedre farmakológie a toxikológie na Farmaceutickej fakulte UK

- argón (Linde Gas a.s.)
- BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)
- bovinné fetálne serum (FBS-Merck)
- bovinný γ -globulín (G5009, Merck)
- Bradford Protein Assay (Bio-Rad, USA)
- CaCl₂ (Penta)
- CH₃COONH₄·3H₂O (Penta)
- destilovaná voda (MilliPore)
- 70% etanol (Penta)
- fosfátový pufer (PBS)
- gentisová kyselina (Penta)
- glukóza (Penta)
- 37% HCl (Merck)
- HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid; Merck)
- chelátotvorné činidlo DFO (p-SCN-Bn-deferoxamine) (Macrocyclics, USA)
- KCl (Penta)
- kultivačné médium pre SKOV-3 bunky (McCoy 5 A, Merck)
- L-glutamín (200 mM; Merck)
- MgCl₂ (Penta)

- NaCl (Penta)
- NaHCO₃ (Penta)
- Na₂HPO₄·12H₂O (Penta)
- NaH₂PO₄·2H₂O (Penta)
- NaN₃ (Merck)
- NaOH (1 M, Penta)
- rádionuklid ⁶⁷Ga – ⁶⁷Ga[Ga]gálium citrát s aktivitou 205 MBq (M.G.P spol. s.r.o., Zlín, ČR)
- ramucirumab – infúzny roztok (Cynamza 10 mg/ml, Eli Lilly)
- roztok neesenciálnych aminokyselín pre bunkovú kultiváciu (Merck)
- TritonX (Merck)
- Trypsín EDTA roztok (Merck)

5.3.2. Použité chemikálie na pracovisku Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

- 2% izofluran (Forane, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)
- fyziologický roztok
- ľudské sérum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- matrica Matrigel Matrix (Corning, Corning, NY, USA)
- rádionuklid ⁸⁹Zn – ⁸⁹Zn[Zn]C₄H₄O₈ v prostredí 0,05 M kyseliny šťavelovej o aktivite 2 GBq (Inštitút Nukleárnej Fyziky Českej akadémie Vied, Husinec – Řež, ČR)

5.4. Použitý biologický materiál

- bunková línia SKOV-3 (z *angl.* Human Caucasian Ovary Adenocarcinoma, bunky ľudského ovariálneho adenokarcinómu), produkcia ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Spojené kráľovstvo Veľkej Británie a Severného Írska)
- samice myší SCID (Harlan, Indianapolis, IN, USA)

5.5. Metodika práce

Pokiaľ nebude uvedené inak, nižšie popísaný pracovný postup bol realizovaný v rádioizotopovom laboratóriu (RIL) pri Katedre farmakológie a toxikológie na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové a tiež v Ústave molekulárnej a translačnej medicíny (IMTM), Lekárskej fakulty, Palackého Univerzity v Olomouci.

5.5.1. Príprava dezintegračného roztoku

Úlohou dezintegračného roztoku, ktorý bol použitý v saturačnej štúdiu, je rozpustiť bunky na jednotlivé elementy a tým pripraviť ich bunkový lyzát, ktorý sa ďalej analyzuje. Príprava roztoku bola vykonaná rozpustením 0,8g NaOH v destilovanej vode a následným pridaním 1 ml Tritonu X. Celkový objem roztoku činil 200 ml.

5.5.2. Príprava fosfátového pufru

Fosfátový pufer (PBS) sa použil pre udržanie stabilného pH v neutrálnej, prípadne ľahko bázičkej oblasti. Roztok sa pripravil zmiešaním dvoch vopred pripravených roztokov. Pre roztok A sa navážilo 8,01 g NaCl (0,137 M) a 1,56 g NaH₂PO₄ (0,01 M) a následne sa tieto navážky rozpustili v 200 ml destilovanej vody. Roztok B obsahoval nasledujúce navážky použitých chemikálií 0,21 g KCl (0,0027 M) a 3,58 g Na₂HPO₄ (0,01 M), ktoré boli rozpustené v 800 ml destilovanej vody. Zmiešaním roztokov A a B do celkového objemu 1 liter bol získaný výsledný fosfátový pufer, ktorého pH bolo upravené pridávaním roztoku NaOH (1 M) po malých objemových podieloch za konštantného miešania a súčasného monitorovania pH pomocou pH metru. Výsledné pH roztoku sa vždy upravilo na hodnotu 7,4. Takto pripravený roztok PBS bol uchovávaný v chladničke, aby nepodľahol degradácii.

5.5.3. Príprava Krebs-Ringerovho roztoku

Pre *in vitro* experiment bol využitý Krebs-Ringerov roztok, ktorý bol v experimentálnej práci aplikovaný ako bunkové internalizačné médium, v ktorom bola k SKOV-3 bunkám pridávaná rádioaktívne značená protilátka RAM. Krebs-Ringerov roztok poskytoval bunkám vodné prostredie a živiny v podobe esenciálnych anorganických iontov a glukózy. K príprave sme použili 7,16 g NaCl (122,5 mM), 0,40

g KCl (5,4 mM), 0,13 g CaCl₂ (1,2 mM), 0,16 g MgCl₂.6H₂O (0,8 mM), 0,29 g Na₂HPO₄.12H₂O (0,8 mM), 0,03 g NaH₂PO₄.2H₂O (0,2 mM), 0,99 g glukózy (5,5 mM) a 2,38 g Hepes (10 mM). Jednotlivé zložky roztoku boli postupne navážené a rozpustené v destilovanej vode za stáleho miešania. Po doplnení na objem 1 liter bola vykonaná kontrola pH pomocou pH metru a jeho prípadná úprava prebehla pomocou prídavku NaOH (1 M) na výslednú hodnotu pH 7,4. Pripravený Krebs-Ringerov roztok bol pred degradáciou uchovávaný v chladničke.

5.5.4. Príprava mobilných fáz

Pre stanovenie čistoty pomocou analytickej metódy HPLC sa pripravila mobilná fáza, ktorá bola prichystaná navážením 6 g NaH₂PO₄ (0,05 M), 7,1 g Na₂HPO₄ (0,05 M), 8,8 g NaCl (0,15 M) a 0,65 g NaN₃ (0,01 M). Uvedené navážky látok sa rozpustili v 1 litri destilovanej vody a za stáleho miešania sa pridával NaOH pre dosiahnutie požadovaného pH 6,8. Pripravený roztok sa skladoval v chladničke do doby realizácie experimentu.

Pre účely vykonania analýzy rádiochemickej čistoty metódou iTLC bol pripravený citrátový pufer (0,1 M, pH 5,0) ako mobilná fáza. Najprv sa pripravil roztok A navážením a rozpustením 21,01 g kyseliny citrónovej v 1 l destilovanej vody. Nasledovala príprava roztoku B navážením a rozpustením 29,41 g dihydrátu citrátu sodného v 1 l destilovanej vody. Pre prípravu 0,1 M roztoku citrátového pufru o pH 5,0 sa zmiešalo 20,5 ml roztoku A s 29,5 ml roztoku B nasledované doplnením do celkového objemu 100 ml destilovanou vodou. U takto pripraveného roztoku sa nemuselo upravovať pH.

5.5.5. Príprava roztokov NaHCO₃ a NH₄Ac

Roztok hydrogénuhličitanu sodného o koncentrácii 0,1 M bol pripravený navážením a rozpustením 0,84 g NaHCO₃ v 100 ml destilovanej vody. V prípade potreby bolo upravené pH na hodnotu 9,0 pomocou roztoku NaOH (1 M).

Roztok octanu amónneho (0,25 M) s gentisovou kyselinou (5 mg/ml) bol pripravený navážením a rozpustením 3,4 g NH₄Ac.3H₂O a 0,5 g gentisovej kyseliny v 100 ml destilovanej vody. Hodnota pH roztoku bola upravená prídavkom koncentrovanej kyseliny octovej na výsledných 5,5.

5.5.6. Kultivácia bunkových línií SKOV-3

Pred samotnou bunkovou kultiváciou bolo pripravené pracovné miesto, čo pozostávalo z vysvietenia laminárneho boxu baktericídnym a virucídnym UV žiarením. V laminárnom boxe prebiehala všetka práca s bunkami, čo zahrňovalo manipuláciu so samotnými bunkami a všetkými chemikáliami určenými pre bunkovú kultiváciu. Chemikálie, ktoré zahrňovali bunkové médium a trypsín, boli vopred predhriate vo vodnej lázni na cca 37° C. Všetky použité nástroje a nádoby s chemikáliami potrebné k práci s bunkovými líniami boli pred použitím a umiestnením do laminárneho boxu dezinfikované 70% etanolom, aby sme zachovali sterilné prostredie a predišli infikovaniu buniek. Po každom otvorení či znova uzatvorení nádob s chemikáliami boli hrdlá týchto fliaš sterilizované ohňom.

V experimentálnej časti diplomovej práce boli vykonané práce s bunkami označovanými skratkou SKOV-3. Ide o bunky izolované z ľudského ovariálneho karcinómu, ktoré exprimujú na svojom povrchu receptor pre VEGF typu 2 označovaného skratkou VEGFR-2. Tieto bunky sa najskôr kultivovali s použitím kultivačného média McCoy 5A obohatenom o L-glutamín (2mM) a FBS (10 %) v sterilných plastových kultivačných fľašiach s obsahom plochy 75 alebo 182 cm². Inkubácia bunkovej kultúry prebiehala v uzavretom bunkovom inkubátore pri nastavenej teplote (37 °C) so vlhčenou atmosférou s obsahom CO₂ (5 %), čo sú vhodné podmienky pre rast a proliferáciu buniek. Bunkové línie SKOV-3 boli používané maximálne do pasáže 25, kedy si zachovávali svoje bunkové vlastnosti z hľadiska expimácie VEGFR-2.

Po vybratí buniek z inkubátora sa pod mikroskopom skontrolovalo, či nie sú bunky kontaminované, a ďalej sa zhodnotila tzv. konfluencia, čo je miera porastaného povrchu kultivačnej nádoby bunkami. V prípade konfluencie 80 % a viac bolo vykonané presadenie bunkovej línie či už do novej kultivačnej nádoby alebo na kultivačný plast používaný v experimentoch (24-jamková doštička). Po prenesení kultivačnej nádoby s bunkami do laminárneho boxu bolo najprv odsaté médium a pridaním 2 ml trypsínu bol vykonaný oplach buniek od zbytkového kultivačného média. Pridaný trypsín sa následne odsal, znova sa do kultivačnej nádoby pridal trypsín (4 ml pre 75 cm² alebo 6 ml pre 182 cm² kultivačnú nádobu) a kultivačná nádoba s bunkami bola presunutá späť do bunkového inkubátora na cca 5 minút, aby pridaný trypsín narušil väzby medzi

bunkami a medzi bunkami a kultivačnou nádobou. Po inkubácii sa k bunkám pridalo 5 ml kultivačného média, ktoré inaktivovalo trypsín, bunky sa premiešali pomocou sérologickej pipety a odpipetoval sa 1 ml bunkovej suspenzie do novej kultivačnej nádoby, do ktorej sa predom napipetovalo nové médium (12 ml pre 75 cm² alebo 24 ml pre 182 cm² kultivačnú nádobu). Pripravená nová kultivačná nádoba s nasadenými resuspendovanými bunkami pre kultiváciu bola skontrolovaná pod mikroskopom, či je v nádobe dostatočný počet buniek a bola prenesená do inkubátora. Pasážovanie SKOV-3 buniek bolo vykonávané jedenkrát týždenne.

V prípade využitia buniek pre experiment, bola v procese vyššie popísanej kultivácie bunkovej línie vzatá podstatná ostávajúca časť ztrypsinizovaných buniek a nasadená do 24-jamkových doštičiek v množstve 1×10^5 buniek na 1 jamku. Presný počet buniek bol počítaný pomocou *Bürkerovej* komôrky. Nasadené bunky boli inkubované za rovnakých podmienok ako bunky bežne kultivované, t.j. v bunkovom inkubátore s vlhčenou atmosférou s obsahom CO₂ (5 %) a pri teplote 37 °C.

5.5.7. Konjugácia DFO s protilátkou

Všetka experimentálna práca prebiehala za prísnych podmienok bez prítomnosti iontov kovov, hlavne iontu železa, ktoré sa viaže mnohokrát silnejšie do chelatačného činidla DFO než použitý rádionuklid. Rovnako tak boli roztoky pripravované tým spôsobom, aby sa v nich zamedzilo vzniku prítomnosti iontov kovov. Všetky nádoby, pipetovacie špičky, skúmavky atď. boli oplachované slabým roztokom HCl (0,1 M) a následne destilovanou vodou pre umytie od kyseliny. Všetky použité roztoky boli pripravené z deionizovanej vody predom inkubovanej s chelatačným materiálom Chelex pre vychytenie iontov kovov.

Úplne na začiatku konjugácie MAb ramucirumab s chelátorom bolo vykonané prečistenie protilátky z infúzneho roztoku, v ktorom bola protilátka uchovávaná. K prečisteniu bola použitá centrifugačná metóda s využitím centrifugačnej skúmavky vybavenej filtračnou membránou do molekulovej hmotnosti 50 kDa (15 mL, VIVASPIN), kedy sa príslušné množstvo protilátky (1 – 10 mg) premývalo do konjugačného roztoku NaHCO₃ (0,1 M, pH 9,0). Po prečistení sa stanovila presná koncentrácia proteínu pomocou Bradfordovej metódy stanovenia koncentrácie proteínu, keďže mohlo dôjsť k strate určitého množstva protilátky jej väzbou na povrch

centrifugačnej skúmavky. Bradfordova metóda stanovenia koncentrácie proteínu spočívala v odpipetovaní 5 μ l vzorky a rovnako tak roztokov štandardov (roztok bovinného γ -globulínu o koncentráciách 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 a 2000 μ g/ml) do jamiek v 96-jamkovej doštičke a následným pridaním 150 μ l roztoku Bradford Protein Assay. Zmes sa nechala inkubovať po dobu 30 minút pri 37 °C a následne sa na spektrofotometri zmerala absorbancia pri 595 nm. V programe MS Office Excel bola z kalibračnej priamky štandardov zostrojená lineárna závislosť a z nej zistená rovnica priamky, z ktorej bola vypočítaná koncentrácia proteínu.

Následne bolo navážené a rozpustené príslušné množstvo chelatačného činidla DFO-Bn-SCN v takom množstve dimetylsulfoxidu (DMSO), aby sa potrebné množstvo chelátoru pridávalo k protilátke RAM v maximálnom množstve 20 μ L. Množstvo DFO použitého pre konjugáciu bolo také, aby odpovedalo molárnym pomerom k molárnemu množstvu RAM 3:1 (DFO:RAM). K protilátke RAM v roztoku NaHCO₃ (0,1 M, pH 9,0) sa po kvapkách pridávali príslušné množstvo DFO rozpusteného v DMSO a následne sa nechala reakčná zmes inkubovať 1 hodinu za temna pri 37°C a stáleho miešania na magnetickom miešadle. Po ukončení inkubácie bola zmes DFO-RAM prečistená pomocou centrifugačnej skúmavky (15 ml, VIVASPIN) za účelom zbavenia sa nekonjugovanej frakcie DFO a súčasného prevedenia konjugovanej protilátky do roztoku NH₄Ac (0,25 M, pH 5,5, + gentisová kyselina o c = 5 mg/ml). Do novej ependorfky bol prepipetovaný zachytený supernatant s pripraveným imunokonjugátom DFO-RAM, ktorý sa ďalej použil k vlastnému rádioaktívnemu značeniu.

5.5.8. Značenie DFO-RAM rádionuklidmi ⁶⁷Ga/⁸⁹Zr

Rovnako ako v prípade imunokonjugácie, prebiehalo rádioaktívne značenie v podmienkach s vylúčením prítomnosti iontov kovov, hlavne iontu železa. Podmienky, ktoré sa dodržiavali, boli analogické tým, ktoré sú uvedené v postupe práce konjugácie DFO s MAb ramucirumab. Rádioaktívne značenie s gáliom-67 prebiehalo na pracovisku RIL a so zirkóniom-89 na pracovisku IMTM.

Do mikroskúmavky sa pridalo príslušné množstvo rádionuklidu ⁶⁷Ga (⁶⁷Ga[Ga]C₆H₈O₇) alebo ⁸⁹Zr (⁸⁹Zr[Zr]C₄H₄O₈), tak aby výsledná aktivita bola 20 MBq. Nasledovalo pridanie 300 μ l pufru HEPES (0,5 M, pH 7,1) pre ustálenie hodnoty pH v neutrálnej oblasti, aby nedošlo k poškodeniu následne pridávanej protilátky.

K pripravenej rádioaktívnej zmesi sa pripipetoval imunokonjugát DFO-RAM (1 mg v NH_4Ac o $c = 0,25 \text{ M}$, $\text{pH } 5,5$, + gentisová kyselina o $c = 5 \text{ mg/ml}$) v takom objeme, aby sa na rádioaktívne značenie použil 1 mg protilátky pre 20 MBq rádionuklidu. Nasledovala inkubácia po dobu 1,5 hodiny za neustáleho miešania pri 37°C . Pre odstránenie nenaviazaného rádionuklidu sa po ukončení inkubácie pridal roztok EDTA (10 mM) v takom objeme, aby bola výsledná koncentrácia EDTA 1 mM. Zmes sa nechala po dobu 5 minút inkubovať pri laboratórnej teplote. Následne sa overila rádiochemická čistota $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}/^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ pomocou analytických metód HPLC a iTLC, ako je popísané ďalej.

5.5.9. Stanovenie rádiochemickej čistoty pomocou HPLC

Rádiochemická čistota $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ bola analyzovaná pomocou HPLC s rádiometrickou detekciou na pracovisku RIL. Do vialky so vzorkou na analýzu bolo napipetované 60 μl vzorky a 60 μl mobilnej fázy. Ako mobilná fáza bol použitý pripravený roztok PBS ($\text{pH } 6,8$). Pripravená vzorka bola vložená do samplera, spustila sa analýza a následne bola vzorka o objeme 100 μl nastreknutá z vialky na kolónu. Vlastná analýza prebiehala na gélovo-permeačnej kolóne BIO-Sil Sec 250,300x7,8, kde je vnútorné gélové sito s pórmami určitej veľkosti a zachytáva molekuly na základe ich veľkosti, pričom sa molekuly s nižšou molekulovou hmotnosťou zadržiavajú v póroch kolónky dlhšie než molekuly s vyššou molekulovou hmotnosťou, ktoré sa eluujú skôr. Izokratická elúcia prebiehala pri prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min po dobu 20 minút. Behom chromatografickej analýzy dochádzalo k eluovaniu rádioaktívne značenej protilátky a prípadne rádiochemických nečistôt, ktorými mohli byť voľný rádionuklid viazaný na EDTA alebo voľný rádioaktívne značený chelátor DFO. Eluované látky boli analyzované pomocou UV/VIS detektoru a rádiometrického detektoru. Výsledné píky na UV/VIS chromatogramu a rádiochromatogramu boli vyhodnotené pomocou OpenLAB a Clarity v tomto poradí.

5.5.10. Stanovenie rádiochemickej čistoty pomocou iTLC

K stanoveniu čistoty bola použitá aj metóda instantnej tenkovrstvej chromatografie. Pre vlastné vykonanie sa použili chromatografické prúžky s nanosenou vrstvou silikagélu, po ktorých sa vyvíjala mobilná fáza tvorená citrátovým pufrom (0,1

M, pH 5,0). Na prúžok o veľkosti približne 10x2 cm bol vyznačený štart a cieľ vždy vo vzdialenosti približne 1 cm od okraja prúžku. Na štart bolo pomocou mikropipety nanosených 5 µl vzorky ($^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ alebo $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$). Po aplikácii vzoriek sa počkalo do doby, než nanosené kvapky uschli a následne sa chromatografické prúžky vložili do chromatografickej komory s mobilnou fázou. Pre analýzu sa použili vzorky odobraté ihneď po ukončení rádioaktívneho značenia protilátky.

Analýza chromatografického prúžku s eluovanou vzorkou ($^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ na pracovisku RIL) prebiehala princípom ionizácie inertného plynu argónu v prístroji iTLC skener RITA Raytest. V programe Gina Star Software boli následne vyhodnotené namerané dáta.

K stanoveniu rádiochemickej čistoty u rádiopreparátu $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ (na pracovisku IMTM) sa pomocou metódy iTLC vyvinuté chromatografické iTLC-SG pásiky analyzovali na prístroji Cyclone Plus a výsledné záznamy boli kvantifikované prostredníctvom softwaru OptiQuant 5.0.

5.5.11. Stabilitné štúdie

Pre stanovenie *in vitro* stability rádiopreparátu $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ sa využila metóda HPLC a iTLC. Rádioaktívne značená protilátka sa od pripravenia uchovávala tri dni v PBS pufri pri teplote 4°C a analyzovala sa v určitých časových intervaloch (0, 24, 48 a 72 hod pre HPLC a 0 a 72 hod pre iTLC). Primárne bola pre analýzu stability využitá presnejšia HPLC metóda s rádiometrickou detekciou.

Stabilita $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ *in vitro* bola hodnotená len na pracovisku IMTM v dvoch rôznych prostrediach - vo fosfátom pufre a v ľudskom sére. Všetky vzorky boli inkubované pri izbovej teplote v časových intervaloch od 1 hodiny do 6 dní. Po príslušnom inkubačnom čase boli vzorky analyzované pomocou iTLC-SG, ako je opísané vyššie.

5.5.12. *In vitro* stanovenie väzbovosti RAM na cieľový receptor manuálnou saturačnou metódou

Táto metóda sa využíva k stanoveniu disociačnej konštanty (K_D), ktorá určuje mieru interakcie rádioaktívne značenej protilátky RAM s VEGFR-2 exprimovaného na povrchu SKOV-3 buniek, t.j. mieru afinity protilátky k cieľovému receptoru.

Dva dni pred realizáciou experimentu sa do 24-jamkových doštičiek nasadili bunky v množstve 1×10^5 v 0,5 ml kultivačného média na 1 jamku a do doby experimentu boli za predpísaných podmienok pre kultiváciu ponechané v bunkovom inkubátore. Na tretí deň sa z každej jamky odstránilo kultivačné médium, pridalo sa po 1 ml PBS, aby sa opláchli neprilnuté bunky a zbytok média, a následne sa PBS odsalo. V ďalšom kroku sa do každej jamky pridalo 0,5 ml Krebs-Ringerovho roztoku s rádioaktívne značeným RAM o zvolenej koncentrácii. Celkovo bolo použitých 6 zvyšujúcich sa koncentrácií rádiofarmaka (3, 9, 15, 30, 45 a 90 nM). Pre každú koncentráciu bol pripravený triplikát jamiek, v ktorom sa rádiofarmakum inkubovalo po dobu 2 hodín pri 37 °C. Obdobným spôsobom bola pripravená 24-jamková doštička s bunkami pre stanovenie nešpecifickej väzby protilátky, kde sa k rádioaktívne značenému RAM v Krebs-Ringerovom roztoku pridalo niekoľkonásobne vyššie množstvo natívneho (neznačeného) RAM (1 μ M). Po ukončení inkubácie sa odsal Krebs-Ringerov roztok a bunky sa dvakrát dôkladne prepláchli po 1 ml roztoku PBS pre odstránenie na receptor nenaviazanej protilátky. Následne pripipetovaním 0,5 ml dezintegračného roztoku TritonX do každej jamky na dobu 30 minút pri teplote 37 °C bolo vykonané zlyzovanie buniek. Pripravený lyzát buniek sa pre stanovenie množstva bunkového proteínu odpipetoval z každej jamky v duplikáte po 20 μ l do 96-jamkovej doštičky. Zbytok lyzátu, ktorý zostal v 24-jamkových doštičkách bol zhomogenizovaný a prepipetovaný do mikrocentrifugačných skúmaviek o objeme 2 ml. Každá jamka bola ešte oplachnutá 0,5 ml destilovanej vody, ktorý sa pridala k bunkovému lyzátu v mikroskúmavke pre príslušnú jamku. Bunkový lyzát bol následne umiestnený do prístroje Gamma Counteru, kde prebehlo zmeranie veľkosti aktivity v každej mikrocentrifugačnej skúmavke. Celý vyššie uvedený postup sa opakoval trikrát pre každé rádiofarmakum a bol rovnaký pre špecifickú i nešpecifickú väzbu. Výsledná hodnota aktivity pre príslušný bunkový lyzát sa prepočítala na koncentráciu bunkového proteínu stanoveného pomocou metódy BCA (viď nižšie).

S využitím roztoku bicinchoninovej kyseliny (BCA) sa zrealizovalo stanovenie koncentrácie bunkového proteínu. Roztok BCA bol pripravený zmiešaním reagentov A a B v pomere 50:1 na základe výrobcom priloženého protokolu. Do spodnej rady jednej z 96-mikrotitračných doštičiek bolo v duplikáte napipetované po 20 μ l referenčného proteínu (štandardu), ktorý predstavoval bovinný sérový albumín (BSA) v koncentráciách 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 a 2000 μ g/ml a ktorý bol určený pre konštrukciu kalibračnej krivky. Po 200 μ l pripraveného roztoku BCA bolo pripipetované do každej jamky so vzorkou aj so štandardom a nechalo sa po dobu 30 minút inkubovať pri 37 °C. V závislosti od koncentrácie proteínu vytvára BCA s proteínmi komplex s rozdielnou intenzitou sfarbenia. Na základe sfarbenia bola s použitím spektrofotometra Tecan zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke $\lambda = 590$ nm. Podľa zostrojenej kalibračnej krivky s využitím štandardu pre kalibračnú radu s rovnicou lineárnej regresie boli v programe MS Office Excel urobené výpočty pre stanovenie koncentrácie bunkového proteínu v jednotlivých vzorkách.

Na množstvo proteínu prítomného v jamkách bola vztiahnutá rádioaktivita, ktorá bola zmeraná pomocou prístroja Gamma Counter, ako je uvedené vyššie. Od celkovo naviazanej aktivity v bunkách, ktorá prezentovala špecifickú väzbu rádioaktívne značeného RAM na VEGFR-2, sa odčítala nešpecifická väzba z jamiek, ktoré obsahovali okrem rádioaktívne značeného RAM tiež i natívny RAM. V programe GraphPad Prism 8.4.3 bola vynesená závislosť zmeranej a na koncentrácii bunkového proteínu prepočítanej aktivity (CPM/ng of cell protein) na použitej koncentrácii (nM) rádioaktívne značeného RAM. Program ďalej podľa protokolu Nelineárna Regresia \rightarrow Väzbovosť – Saturácia \rightarrow Jedno miesto – Špecifická väzba (*z angl.* Nonlinear regression \rightarrow Binding – Saturation \rightarrow One site – Specific binding) zkonštruoval exponenciálnu saturačnú krivku v grafe a ďalej vypočítal hodnotu rovnovážnej disociačnej konštanty.

5.5.13. Tvorba SKOV-3 nádoru u myší

Príprava nádorových myší prebiehala len na pracovisku IMTM. Samice SCID myší vo veku 8 týždňov boli subkutánne injikované do ich pravého boku bunkovou suspenziou SKOV-3 buniek (v počte 5×10^6 /dávku) zmiešanými s matricou Matrigel Matrix v pomere 1:1. Rast nádoru sa neustále monitoroval pomocou kaliperu a keď objem nádoru dosiahol 100 - 300 mm^3 (t.j. 6 - 8 týždňov po naočkovaní buniek), myši sa použili na *ex vivo* štúdie biodistribúcie a/alebo na zobrazovanie mikroPET/CT.

Experimentálne zvieratá boli umiestnené v zariadení pre zvieratá s vylúčením prítomnosti patogénu. Všetky pokusy na zvieratách sa uskutočňovali v súlade s príslušnými právnymi normami, ku ktorým má povolenie IMTM, UP Olomouc. Počet zvierat sa pri všetkých pokusoch *in vivo* čo najviac znížil (použili sa 3 myši na 1 časový interval). Aby sa minimalizovalo utrpenie zvierat a zabránilo sa ich pohybu. Injekčná aplikácia i PET/CT zobrazovanie sa uskutočňovalo pod účinkom 2% izofluranovej anestézie.

5.5.14. Ex vivo biodistribučné štúdie

Na účely *ex vivo* štúdie biodistribúcie, ktoré prebiehali výlučne na pracovisku IMTM, sa pripravený rádioaktívne značený indikátor zriedil 1,8 ml fyziologickým roztokom. Pripravené roztoky sa do myši aplikovali retro-orbitálne v dávke 250 kBq na myš, čo zodpovedalo 50 µg protilátky. Myši sa usmrtili dislokáciou krčných stavcov v 1., 3. a 6. deň po injekcii a jednotlivé časti tela myši (krv, slezina, pankreas, žalúdok, črevo, obličky, pečeň, srdce, pľúca, sval, kosť a nádor) boli pitvou následne odobraté do samostatných nádob. Odobrané biologické vzorky sa zväžili a ich rádioaktivita sa merala pomocou automatického prístroja Gamma Counter. Výsledná aktivita nahromadeného rádioaktívneho indikátoru v študovaných orgánoch sa vypočítala ako percento injikovanej dávky na gram tkaniva (% ID/g).

5.5.15. Zobrazenie pomocou mikroPET/CT prístroja

Nádorové útvary SKOV-3 pôvodu sa u študovaných SCID myši zobrazovali pomocou systému mikroPET/SPECT/CT Albira na pracovisku IMTM. Myši boli pred aplikáciou rádiofarmaka a vlastným zobrazovaním v stanovený deň inkubácie uspané podaním 2% isofluranu. Rádiofarmakum $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ v dávke 3-6 MBq (t.j. 200-400 µg RAM) na zviera bolo aplikované retro-orbitálnou injekciou.

PET/CT zobrazovanie prostredníctvom prístroja Albira sa uskutočnilo 1, 3 a 6 dní po injekcii rádioaktívne značenej protilátky. Vykonalo sa 10-minútové skenovanie PET (axiálne FOV 148 mm), nasledovalo dvojité CT skenovanie (axiálne FOV 2x65 mm, 45 kVp, 400 µA, pri 400 projekciách). Údaje získané skenovaním sa rekonštruovali pomocou softwaru Albira a do podoby 2D obrazu sa použil program PMOD.

6. VÝSLEDKY PRÁCE

V tejto kapitole diplomovej práce sa nachádzajú výsledky rádioaktívneho značenia protilátky ramucirumab pomocou dvoch rádionuklidov (^{67}Ga a ^{89}Zr), výsledky analýzy pripravených rádiofarmák a ich následné *in vitro* a *in vivo* experimentálne merania uskutočnené v laboratóriu na pracovisku RIL a IMTM.

Jednotlivé podkapitoly reprezentujú výsledky z vykonaných metód popísaných v experimentálnej časti. Výsledky slovne zhŕňajú a v priložených chromatogramoch demonštrujú stanovenie rádiochemickej čistoty a stability pomocou metód HPLC a iTLC. Predložené grafy zobrazujú priebeh saturačných kriviek interakcie rádiofarmák s cieľovými receptormi s výsledným stanovením hodnôt rovnovážnej disociačnej konštanty (K_D). Ku koncu kapitoly sú uvedené výsledné dáta z biodistribučných štúdií vykonávaných *ex vivo* a výsledky PET/CT zobrazení VEGFR-2 pozitívnych indukovaných nádorov u laboratórných myší.

6.1. Stanovenie rádiochemickej čistoty a stability $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]-\text{DFO-RAM}$ pomocou HPLC metódy

Pred samotným meraním čistoty pripraveného rádioimunokonjugátu sa najskôr vykonalo chromatografické meranie pre voľné gárium-67 vo forme $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]-\text{EDTA}$, ktorého elúciu na kolóne s elučným časom 10 minút demonštruje **Obrázok 10**.

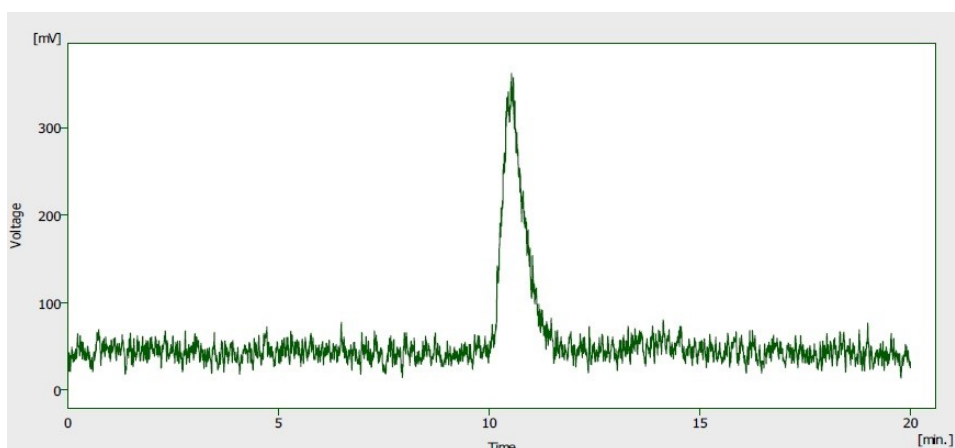
Ihneď po príprave $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]-\text{DFO-RAM}$ sa pomocou separačnej metódy HPLC s UV/VIS a s rádiometrickou detekciou stanovovala rádiochemická čistota a overovali sa prípadne prítomné nečistoty. **Obrázok 11** znázorňuje UV/VIS záznam neznačenej protilátky ramucirumab pre zistenie jej retenčného času. **Obrázok 12 A)** zobrazuje reprezentatívny chromatogram $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]-\text{DFO-RAM}$ meraný ihneď po skončení rádioaktívneho značenia protilátky ramucirumab, t.j. v čase 0 h.

Pre zhodnotenie stability bol pripravený PBS roztok s rádioimunokonjugátom, ktorý bol skladovaný pri teplote 4°C . Kontrola stability a teda i rádiochemickej čistoty prebiehala meraním na HPLC systéme v intervaloch 24, 48 a 72 h po značení, kedy sa zisťovalo prípadné uvoľňovanie rádionuklidu z rádiofarmaka. Výsledné rádiochromatogramy sú uvedené na **Obrázkoch 12 B), C) a D)**. Na

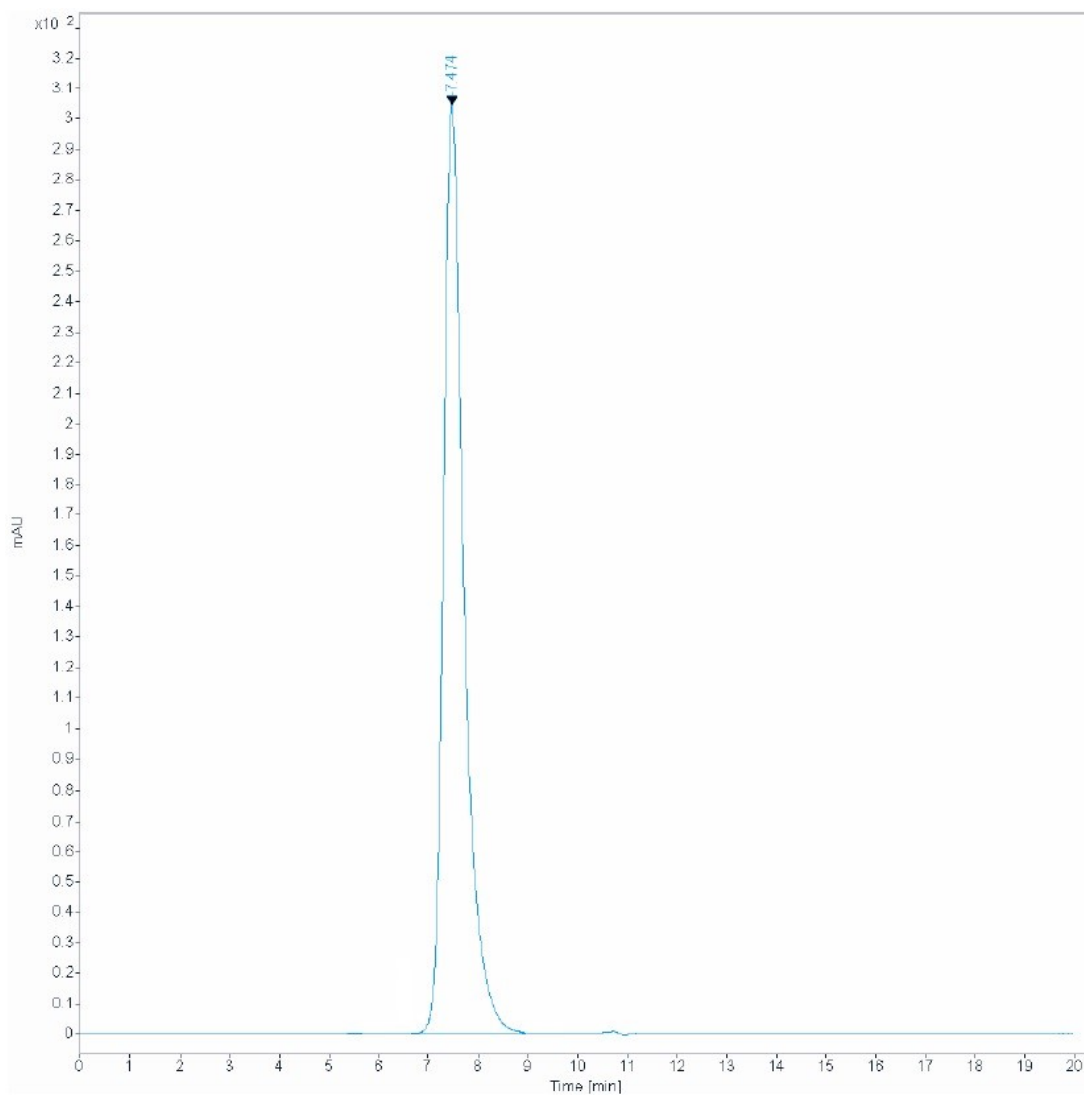
rádiochromatogramoch je retenčný čas rádiofarmaka vždy v čase elúcie 7,5 min od začiatku analýzy, čo korešponduje s retenčným časom UV/VIS záznamu pre nekonjugovaný RAM (**Obrázok 11**).

Vedľa vyššie popísaných analýz sa na HPLC systéme vykonalo meranie zmesi voľného rádionuklidu gália ($^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-EDTA}$) s $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ pre získanie chromatogramu ich spoločnej elúcie. Na získanom chromatograme (**Obrázok 16**) sa ukázali dva píky predstavujúce značený RAM (7,5 min) a voľné $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-EDTA}$ (11,5 min).

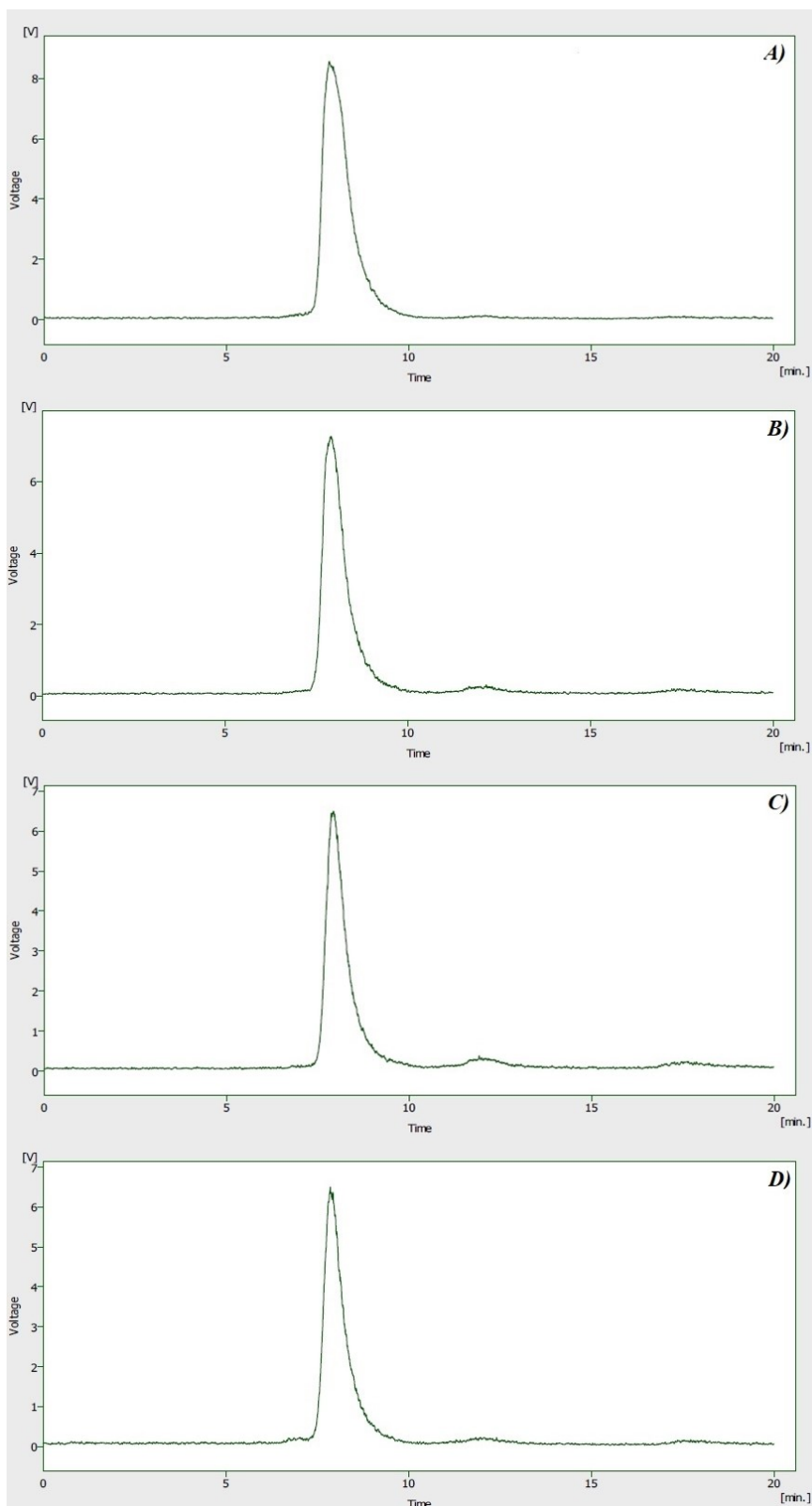
Na základe meraní vzoriek zo stability štúdie reprezentovanej na **Obrázku 12** v porovnaní s meraniami na **Obrázku 10** a **16** sa dá usudzovať, že s pribúdajúcim časom inkubácie narastá množstvo uvoľňovaného voľného rádioaktívneho gália. Avšak množstvo ^{67}Ga uvoľneného z chelátoru je vždy veľmi nízke v porovnaní s veľkosťou píku a teda aktivity študovaného rádiofarmaka.



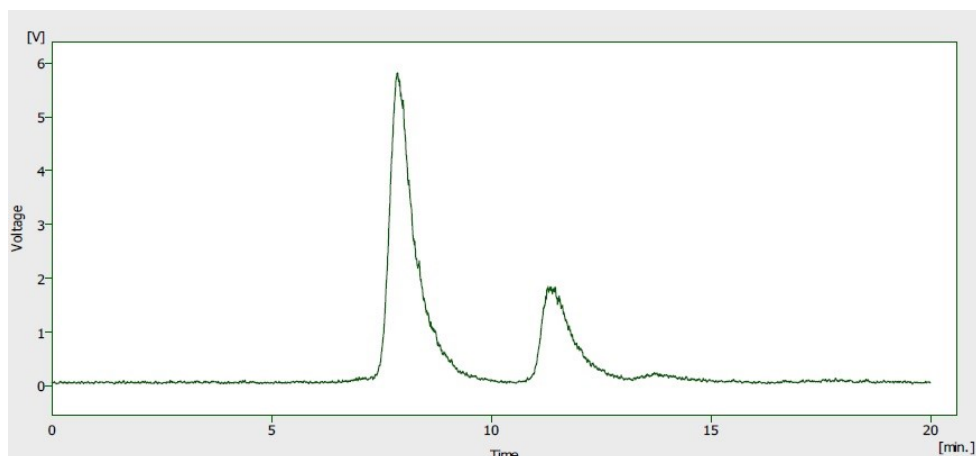
Obrázok 10: Reprezentatívny HPLC rádiochromatogram zobrazujúci elúciu samotného gália-67 ($^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-EDTA}$) v 10. minúte.



Obrázok 11: Reprezentatívny UV/VIS HPLC chromatogram neznačeného RAM s elučným časom 7,5 min.



Obrázok 12: Reprezentatívne HPLC chromatogramy $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-}\text{RAM}$ analyzujúce rádiochemickú čistotu rádiofarmaka ihneď po značení (**A**) a kontrolujúci jeho stabilitu po 24 h (**B**), 48 h (**C**) a 72 h (**D**). Elučný čas rádiofarmaka bol v 7,5 min a voľného ^{67}Ga ($^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-EDTA}$) v 11,5 min.

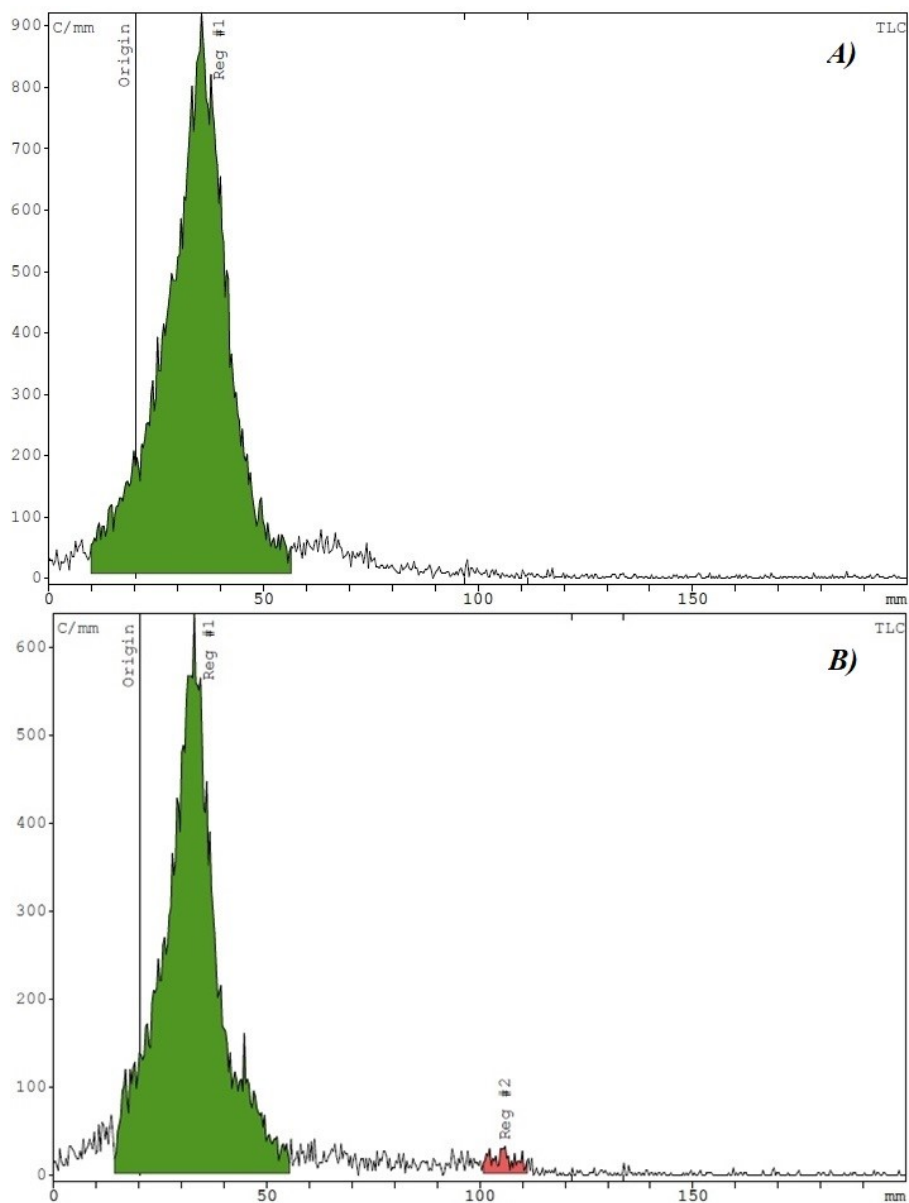


Obrázok 13: Reprezentatívny HPLC chromatogram pre zmes $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ a $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-EDTA}$ pre overenie elučných časov. Prvý pík s retenčným časom 7,5 min reprezentuje značenú protilátku a druhý pík s retenčným časom 11,5 min voľné ^{67}Ga .

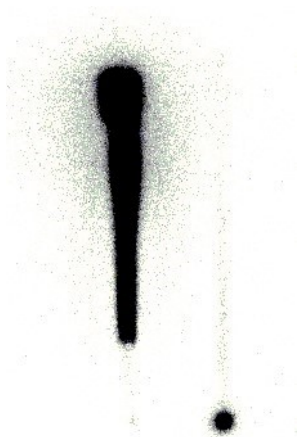
6.2. Stanovenie rádiochemickej čistoty metódou iTLC

Ďalšou metódou, ktorá sa použila pre overenie rádiochemickej čistoty rádiofarmaka $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ bola iTLC metóda, ktorú sme kvôli jej menšej citlivosti a nižšej separačnej účinnosti použili skôr pre orientačné stanovenie čistoty. Meranie sa konalo rovnako ako aj pri HPLC metóde, ihneď po príprave rádiopreparátu, tj. v 0 h. Pre overenie stability sa ďalšie meranie vykonalo po 72 hodinách. Výsledky merania z časov 0 a 72 h sú demonštrované v **Obrázok 14 A)** a **B)**. Na iTLC zázname v čase 0 h (**Obrázok 14 A)** bol na začiatku chromatogramu prítomný len jeden pík ($R_f = 0$), ktorý predstavuje aktivitu z $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$. Na zázname po 72 h (**Obrázok 14 B)** sú viditeľné dva píky, z ktorých zelený pík ($R_f = 0$) zobrazuje aktivitu rádiofarmaka a červený pík ($R_f = 1$) predstavuje rádiochemickú nečistotu pochádzajúcu z voľného rádionuklidu ^{67}Ga .

Rovnakým spôsobom bola kontrolovaná rádiochemická čistota zirkóniom-89 značeného RAM na pracovisku IMTM. Čistota sa merala ihneď po pripravení konjugátu a jej výsledok zobrazuje **Obrázok 15**. Voľný rádionuklid (škvrna vľavo) putuje s čelom mobilnej fázy a rádionuklid viazaný v komplexe s RAM (škvrna vpravo) ostáva na mieste aplikácie vzorky (štart).



Obrázok 14: iTLC záznam rádiokonjugátu $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ (zelený pík) po značení v čase 0 h (**A**) s rádiochemickou čistotou 100,0 % a po značení v čase 72 h (**B**) s rádiochemickou čistotou 97,7 % a nečistotou 2,3 % (voľné ^{67}Ga , červený pík).



Obrázok 15: Reprezentatívny obrázok chromatogramu získaného metódou iTLC pre $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$. Vľavo je zobrazený voľný $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-šťavelan}$ a vpravo konjugát $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ v citráte sódnom (0,1 M, pH 5,0).

6.3. Zhodnotenie *in vitro* stability $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$

Na základe analýzy vzoriek $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ pomocou iTLC-SG, kedy rádiofarmakum bolo inkubované v roztoku PBS pri laboratórnej teplote, stabilitné štúdie nepreukázali žiadne zníženie rádiochemickej čistoty. Naproti tomu vzorky rádiofarmaka, ktoré bolo inkubované v ľudskom sére, po 6 dňoch vykazovalo pokles rádiochemickej čistoty z 97,6% až na 91,1%. Úplné hodnoty *in vitro* testov stability rádiochemickej čistoty meraných v určených časových intervaloch sú uvedené v **Tabuľke 4**.

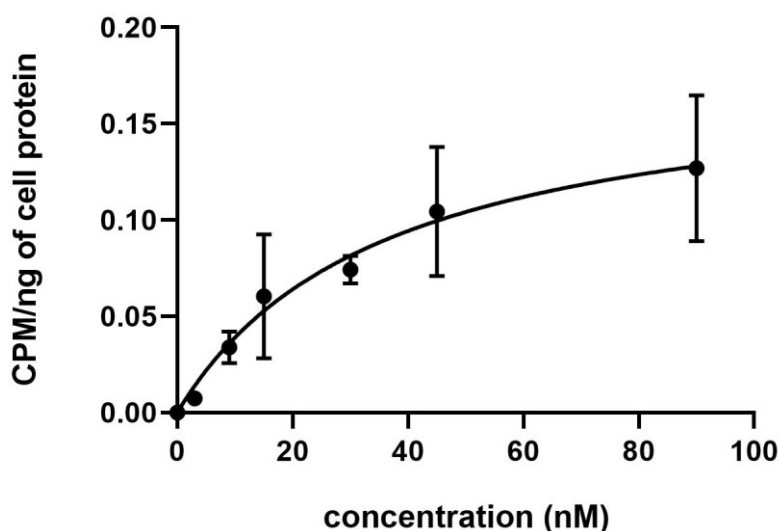
čas prostredie	1 hodina	1. deň	2. deň	3. deň	6. deň
PBS	95.6	95.8	96.0	95.8	96.0
ľudské sérum	97.6	97.6	94.8	92.6	91.1

Tabuľka 4: *In vitro* stabilita $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$. Stabilita je vyjadrená ako rádiochemická čistota (%) po vhodnej inkubačnej dobe vo fosfátovom tlmivom roztoku (PBS) alebo v ľudskom sére pri laboratórnej teplote.

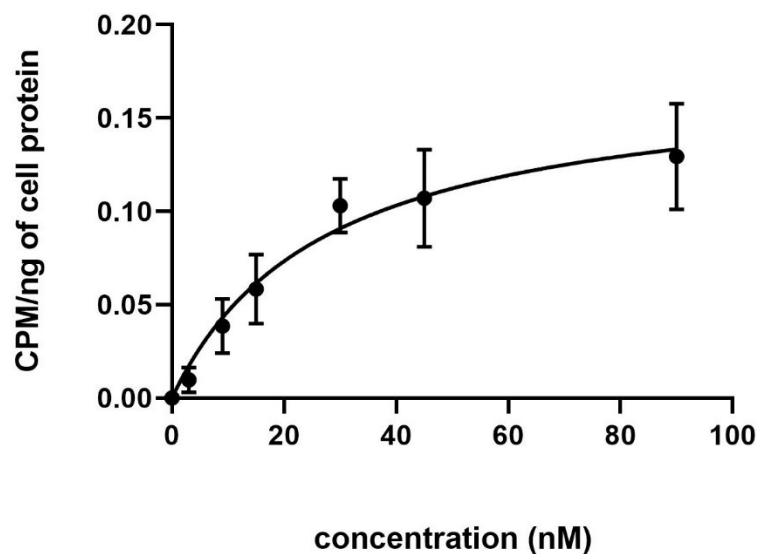
6.4. Výsledok in vitro saturačnej štúdie pripravených

rádiofarmák $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}/^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$

Pomocou manuálnej techniky saturačnej štúdie bola stanovená afinita pripravených rádiokonjugátov k cieľovému receptoru VEGFR-2, ktorý bol exprimovaný na bunkovom povrchu u SKOV-3 bunkovej línie. Výsledkom bolo získanie hodnoty rovnovážnej disociačnej konštanty (K_D), pre ktorú platí, že čím nižšie hodnoty dosiahne, tým vyššia je afinita študovanej značenej MAb k cieľovému bunkovému receptoru. Na **Obrázku 16** je graficky znázornený sumárny výsledok merania afinity $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ k receptoru VEGFR-2 zahrňujúci tri nezávislé stanovenia. Rovnakým spôsobom z troch nezávislých meraní sa graficky zhodnotil pripravený rádioimunokonjugát $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ uvedený na **Obrázku 17**. Pomocou programu GraphPad Prism bola okrem spracovaných grafov saturačnej štúdie stanovená aj hodnota rovnovážnej disociačnej konštanty pre oba rádiokonjugáty, ktorá vychádza zo závislosti zmeraných hodnôt aktivity prepočítanej na koncentráciu bunkového proteínu (os y) na použitej koncentrácii rádioaktívne značeného RAM (os x). Priemerná hodnota K_D pre $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ činila $35,94 (\pm 7,30)$ nM a pre $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ $27,44 (\pm 8,14)$ nM.



Obrázok 16: Reprezentatívny sumárny graf saturačnej štúdie znázorňujúci interakcie $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ s VEGFR-2 s výslednou hodnotou $K_D = 35,94 (\pm 7,30)$ nM.

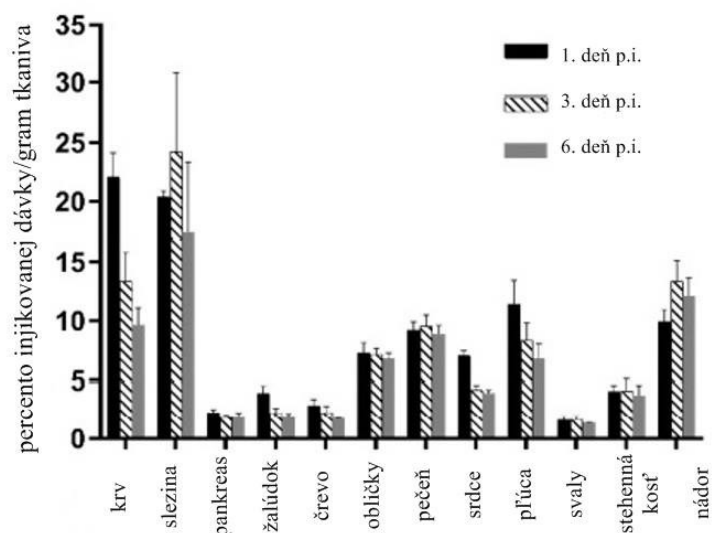


Obrázok 17: Reprezentatívny sumárny graf saturačnej štúdie znázorňujúci interakcie $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO- RAM}$ s VEGFR-2 s výslednou hodnotou $K_D = 27,44 (\pm 8,14)$ nM.

6.5. Zhodnotenie *ex vivo* biodistribučnej štúdie

Pre analýzu vzoriek *ex vivo* biodistribučných štúdií $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO- RAM}$ na zvieracích SKOV-3 modeloch boli vzhľadom k dlhému poločasu rádionuklidu a k farmakokinetike protilátky zvolené doby merania 1, 3 a 6 dní po aplikácii protilátky.

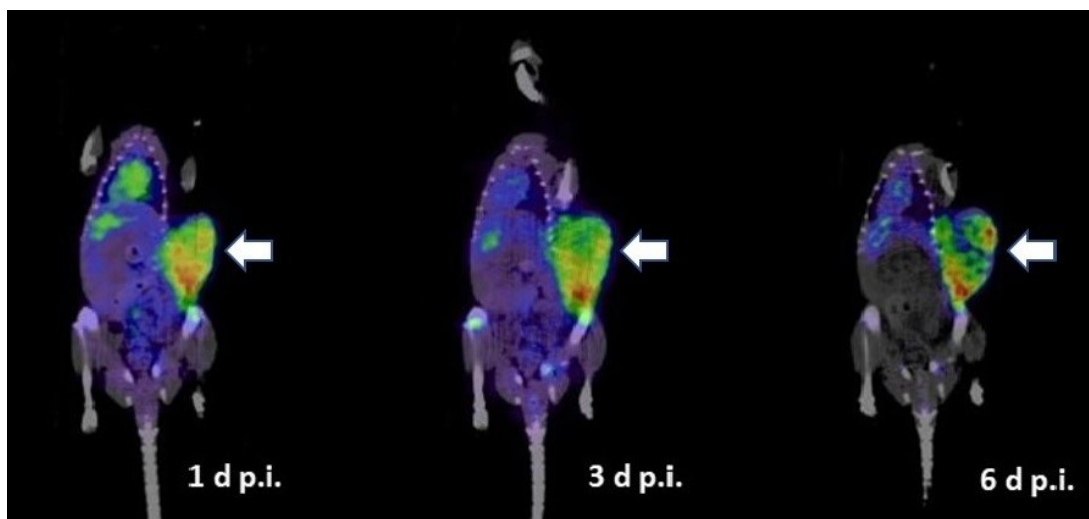
V prezentovanom grafe (**Obrázok 18**) je znázornená miera akumulácie zirkóniom-89 značenej protilátky RAM v jednotlivých odobratých častiach myší. Meraním aktivity po 24 hodinách je zreteľné jej hromadenie v nádore. Najvyššia akumulácia bola zistená v krvi a slezine dokonca aj 6 dní po aplikácii rádioaktívne značeného RAM. Stredná akumulácia protilátky zistená v niektorých orgánoch (obličky, srdce, pľúca) a nádoroch ostala konštantná vo všetkých troch intervaloch merania. Najnižšia akumulácia bola zistená v pankrease, žalúdku, čreve, srdci, svaloch a kostiach.



Obrázok 18: Grafické znázornenie *ex vivo* biodistribúcie r.o. injikovaného $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ u SCID myši nesúcich nádory SKOV-3 v troch časových intervaloch. (n = 3).

6.6. Zobrazenie biodistribúcie *in vivo* pomocou PET/CT

S využitím PET/CT zobrazovacej metódy sa podarilo v určených časových intervaloch zobraziť aktivitu v indukovanom myšom nádore. V 1. a 3. deň po aplikácii bol najsilnejší signál detekovaný v srdci, pečeni, slezine a nádore, pričom zobrazením posledného intervalu zreteľne prevažuje aktivita v nádore nad aktivitou v iných orgánoch. Malá akumulácia rádioaktivity bola pozorovaná so zvyšujúcim sa časom vo veľkých kĺboch. 2D reprezentatívne snímky SCID myši so SKOV-3 nádorom získané pomocou mikroPET/CT sú znázornené na **Obrázku 19**.



Obrázok 19: Snímky získané z mikroPET/CT po r.o. injikovani $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ u SCID myši 1, 3 a 6. deň po aplikácii. Šípkou sú označené nádory SKOV-3 na pravom boku myši.

7. DISKUSIA

Nádorové bunky vykazujú schopnosť vyhnúť sa dohľadu imunitného systému a nereagovať tak na signály pre potlačenie ich rastu. Veľkú rolu pri vzniku nádorového ochorenia zohráva tvorba nových krvných ciev, ktoré vyživujú nádor, prinášajú mu kyslík a odvádzajú splodiny metabolizmu. Na rozvoji nádorového ochorenia sa tiež podieľa pomer inhibičných a aktivačných faktorov angiogenézy. Kľúčovú funkciu v angiogenéze zohráva najviac preštudovaná rodina vaskulárnych endoteliálnych rastových faktorov, ktorá je prezentovaná ako silný angiogénny regulátor novotvorby cievneho zásobenia nádorov a ktorá sa v mnohých typoch nádorov preukázala jej nadmernou expresiou. Preto sa vedecký výskum zameriava na signálne molekuly a ich receptory, aby sa aktiváciou endoteliálnych buniek netvorili nové cievy podporujúce vývoj a rast nádoru. Skúmanie funkčnosti v terapii už používaných liečiv a neustále hľadanie nových anti-angiogénnych terapeutík by malo pomôcť znížiť úmrtnosť na karcinómy.

Čoraz väčšie uplatnenie v protinádorovom výskume nachádza cieleňá terapia, konkrétne monoklonálne protilátky, ktoré vyhľadávajú a cieľia na špecifické proteínové štruktúry na nádorových bunkách s minimálnym zásahom nenádorového okolitého tkaniva. Môžu sa cieľiť priamo na VEGF molekuly ako napríklad bevacizumab alebo na spomínané väzbové miesta receptorov. Protilátkou, ktorá priamo cieľi na jeden z receptorov angiogénnych signálnych dráh je aj ramucirumab, ktorá patrí k novším MAbs a ktorá bola použitá v predkladanej diplomovej práci pre svoj možný potenciál v rádiodiagnostickom zobrazovaní. Práve vďaka vývoju technológií sa začali viac skúmať monoklonálne protilátky v spojení s inou molekulou, v prípade tejto práce rádionuklidom, ktorým sa MAbs značia priamo či nepriamo, za účelom zlepšenia diagnostiky a/alebo terapie nádorov.

Cieľom práce bolo pripraviť rádiofarmakum, ktoré by sa dalo použiť pre rádiodiagnostiku nádorových buniek exprimujúcich VEGFR-2. Pomocou chelátotvorného činidla deferoxamínu bola zisťovaná možnosť nepriamo značiť ramucirumab dvoma rádioaktívnymi nuklidmi (^{67}Ga a ^{89}Zr) potenciálnymi pre zobrazovanie nádorov. Po vytvorení príslušných rádioimunokonjugátov bola následne zisťovaná ich rádiochemická čistota a boli testované aj na chemickú stabilitu po dobu až 72 hodín.

Výsledky testovania rádiochemickej čistoty pre $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ preukázali 100% čistotu pripraveného rádiopreparátu. Avšak s pribúdajúcim inkubačným časom v rámci stabilitej štúdie dochádzalo k postupnému uvoľňovaniu ^{67}Ga z väzby na DFO, čo je dokázané ako pomocou HPLC analýzy, tak i orientačnou analýzou iTLC v 72. hodine od prípravy. Príčinou tejto nestability bol najskôr typ použitého chelátoru. DFO nie je úplne ideálnym chelátorom pre ^{67}Ga , čo je potvrdené v štúdiu autorov Price and Orvig [52]. I ďalšia štúdia konaná v minulosti poukazuje na možnú nestabilitu gália-67 viazaného s chelatačným činidlom DFO [74]. Naproti tomu iná štúdia zase uvádza opak s tvrdením, že existuje len malá alebo žiadna nestabilita [75]. Naším dôvodom výberu DFO ako chelátora pre väzbu s gáliom-67 v experimentálnej práci bolo vyskúšanie a overenie postupov rádioaktívneho značenia ramucirumabu cez DFO pre nasledujúcu prácu s pozitronovým žiaričom ^{89}Zr , kedy podmienky rádioaktívneho značenia pre oba rádionuklidy sú totožné.

V prípade pripraveného rádiofarmaka $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ bola potvrdená vhodnosť použitia bifukčného chelatačného činidla DFO práve v študovanej rádiochemickej čistote a následnej stabilitej štúdiu. Nielen, že bola rádiochemická čistota pripraveného zirkónium-89 značeného rádiofarmaka takmer 100%, ale i stabilita rádiopreparátu v prostredí PBS sa držala na stálej hodnote $\pm 96\%$. O niečo horší výsledok stabilitej štúdie bol pre prostredie ľudského séra, kde sa dá počítať s vplyvom sérových proteínov na stabilitu rádioimunokonjugátu. Ničmenej, i 6. deň od značenia bola rádiochemická čistota vyššia ako 90%. Vyššie popísané dokazuje optimálnosť použitého chelátora DFO pre značenie biologicky aktívnych látok ako je monoklonálna protilátka ramucirumab rádionuklidom zirkónia-89.

Súhrnne môžeme povedať, že pripravené $^{67}\text{Ga}/^{89}\text{Zr}$ -rádiopreparáty boli dostatočne čisté a preukazovali stabilitu väzby rádionuklidu na chelátor DFO viazaný na protilátku a tým boli teda vhodné pre následné *in vitro* a *in vivo* (iba $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$) testovania.

Po kontrole rádiochemickej čistoty boli následne použité rádioimunokonjugáty pre *in vitro* saturačné štúdie pre preukázanie zachovania schopnosti špecifickej väzby rádioaktívne značenej MAb ramucirumab na cieľový receptor VEGFR-2 na nádorovej bunkovej línii SKOV-3.

Afinita značenej protilátky k receptorom bola vyjadrená zistenými hodnotami rovnovážnej disociačnej konštanty. Pre rádiofarmakum $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-RAM}$ bola zistená hodnota $K_D = 35,94 (\pm 7,30)$ nM a pre $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ $K_D = 27,44 (\pm 8,14)$ nM. V porovnaní s neznačeným (natívnym) RAM ($K_D \approx 1\text{-}2$ nM) [76] došlo cca k 10-20 násobnému poklesu afinity rádioaktívne značenej protilátky. Zmena väzbovej afinity mohla byť spôsobená samotnou konjugáciou alebo procesom rádioaktívneho značenia. Ako pre konjugáciu, tak i pre samotné rádioaktívne značenie boli typické menej priaznivé podmienky vplyvom použitého pH. Pre konjugáciu bolo potrebné zásaditejšie prostredie a pre rádioaktívne značenie mierne kyslé, čo mohlo negatívne ovplyvniť kvartérnu štruktúru protilátky. Zhoršenie väzbovosti mohol spôsobiť aj DFO ako pridaný chelátor, ktorý sa mohol naviazať na lyzín, ktorý je súčasťou väzbovej časti protilátky a spôsobiť následne jej menšiu väzbovosť na cieľový receptor. Na základe získaných K_D môžeme povedať, že rozdiel v afinite značeného a natívneho RAM nebol stále ešte príliš vysoký a že málinko vyššiu väzbovosť protilátky RAM na cieľový VEGFR-2 preukazoval rádionuklid ^{89}Zr .

Druhá časť biologických štúdií s rádiofarmakom $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ sa orientovala na štúdie *in vivo* s použitím myších nádorových modelov, v ktorých sa indukovala tvorba ovariálneho karcinómu charakterizovaného expresiou VEGFR typu 2.

Ex vivo biodistribučná štúdia preukázala hromadenie zirkóniom-89 značeného RAM v nádore. Distribúcia ^{89}Zr v každom odobratom tkanive sa vyjadrila ako percento injikovanej dávky na gram tkaniva (% ID/g). Po podaní látky a jej meraní v dané intervaly dochádzalo k postupnému úbytku jej aktivity v krvi, čo odpovedá hodnotám v skôr publikovanej štúdii [77], v ktorej sa experimentálne zistil poločas IgG1 protilátky kalkulovaný na 6-8 dní, čo potvrdil i náš experiment. Už po 1 dni po aplikácii rádiokonjugátu bola viditeľná vysoká aktivita látky v nádore, ktorá v 3. deň dosiahla namerané maximum, čo potvrdzuje i merania iných autorov [68]. V srdci, obličkách a pľúcach, čo sú orgány s vyšším prekrvením a fyziologickou expresiou VEGFR-2, bola nameraná relatívne vyššia aktivita, než v iných orgánoch, pričom najvyššiu hodnotu aktivity zo všetkých odobratých častí mala slezina, ktorá je jedným z orgánov eliminovania Ig z tela. Je relatívne obtiažne porovnávať aktivitu v nádore i ostatných tkanivách, keďže hromadenie rádioaktívne značeného RAM môže byť ovplyvnené tým, v akej miere sa vytvorili receptory v študovaných odobratých tkanivách i od podaného látkového množstva.

Nádory indukované v myšiach boli vizualizované od 1. po 6. deň od aplikácie rádiokonjugátu a aj po 6 dňoch ostali jasne pozorovateľné. PET/CT zobrazovanie ukázalo zvýšené hromadenie aktivity rádionuklidu v kĺboch, ktoré súvisí s preukázanou vlastnosťou ^{89}Zr , že má vyššiu afinitu ku kostnému tkanivu [57]. Podobnou publikovanou prácou s využitím RAM pre zobrazenie VEGFR-2 pozitívnych nádorov *in vivo* bol experiment konaný s rádionuklidom ^{64}Cu . Avšak pre použitý rádionuklid je nevýhodou jeho krátky poločas rozpadu ($\tau_{1/2} = 12,7$ hod) a preto autori odbornej publikácie navrhli použiť pre značenie RAM nuklidu s dlhším poločasom ako má i nami použité ^{89}Zr [78].

In vivo PET/CT zobrazenie VEGFR-2 pozitívnych nádorov podporila výsledky namerané pri biodistribúcii *ex vivo* a získané dáta naznačujú, že ^{89}Zr -značený RAM má potenciál pre zobrazovanie nádorov.

Na záver môžeme povedať, že sa nám podarilo nepriamou chelataciou pomocou DFO pripraviť čisté rádioaktívne preparáty s použitím RAM a zároveň poukázať na ich zachovanú afinitu k receptoru VEGFR-2, hoci v porovnaní s natívnym RAM bola nižšia. Ďalej sme preukázali, že ^{89}Zr je skutočne perspektívny PET žiarič pre rádiodiagnostické zobrazovanie a z tohto hľadiska je pripravený $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ taktiež perspektívnym rádiodiagnostickým farmakom, ktoré by sa mohlo prípadne podrobiť ďalšiemu testovaniu na aplikáciu v klinickej praxi ako zobrazovacie činidlo pre detekovanie nádorov a monitorovanie protinádorovej liečby.

8. ZÁVER

Pred samotnou prácou s protilátkou a rádionuklidmi bolo potrebné naučiť sa praktickej manipulácii s bunkovými kultúrami a ich pravidelnej kultivácii, ktorú sa podarilo osvojiť si a zautomatizovať. Následným cieľom bolo oboznámiť sa a pracovať s otvorenými rádioaktívnymi žiaričmi, ktoré vyžadovali špeciálne zaobchádzanie pod odborným dohľadom.

Pred vlastným *in vitro* experimentom sa podarilo kultivovať a následne nasadiť si SKOV-3 bunky v potrebnom množstve do testovacích 24-jamkových doštičiek.

Metódou nepriameho značenia monoklonálnej protilátky pomocou použitého bifunkčného chelatačného činidla DFO sa úspešne podarilo pripraviť rádionuklidmi ^{67}Ga a ^{89}Zr značený ramucirumab. Ďalej sa obe pripravené rádiofarmaká podrobili overeniu rádiochemickej čistoty a overeniu zachovania stability za použitia metód HPLC s rádiometrickou detekciou a iTLC, pričom ihneď po príprave rádioimunokonjugátov oba vykazovali 100% čistotu a len malú stratu aktivity preukázanú po 72 hodinách.

V nadväzujúcom *in vitro* experimente sa pomocou manuálnej saturačnej metódy zhodnotila afinita väzby rádionuklidmi značeného RAM k cieľovému receptoru VEGFR-2, ktorý bol exprimovaný na bunkovom povrchu SKOV-3 bunkovej línie, pričom oba rádioimunokonjugáty podľa priebehu saturačných kriviek v grafickom znázornení a na základe výsledných hodnôt K_D preukázali zachovanú interakciu s cieľovým receptorom.

Na základe výsledkov testov rádiochemickej čistoty a *in vitro* saturačnej štúdie, kvalita pripraveného rádiopreparátu $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-RAM}$ umožnila pokračovať v *in vivo* testovaní, kedy sa výsledkami na myších modeloch z *ex vivo* biodistribučnej štúdie i *in vivo* PET/CT zobrazenia potvrdila akumulácia zirkóniom-89 značeného RAM v SKOV-3 indukovaných nádoroch v súlade s výsledkami z *in vitro* meraní, čo poukazuje na vysoký potenciál pripraveného rádiofarmaka.

Záverom môžeme skonštatovať, že protilátka si po rádioaktívnom značení vybranými rádionuklidmi zachovala schopnosť významne interagovať s cieľovým receptorom a že oba pripravené rádiofarmaká vykazujú potenciál pre ďalšie skúmanie a použitie ako rádiodiagnostické činidlá, či už pre SPECT (^{67}Ga) alebo pre PET (^{89}Zr) zobrazovanie.

9. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] Klener, P. a Klener jr., P. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-6988-2
- [2] Abbott, M., & Ustoyev, Y. (2019). Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Seminars in Oncology Nursing*, 150923. Dostupné na: doi:10.1016/j.soncn.2019.08.002
- [3] Jílek, P. Základy imunologie. 2., preprac. Vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3
- [4] Breedveld, F. (2000). Therapeutic monoclonal antibodies. *The Lancet*, 355(9205), 735–740. Dostupné na: doi:10.1016/s0140-6736(00)01034-5
- [5] Fussek, M. a kol. Biologická léčiva: Teoretické základy a klinická praxe. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-7931-7.
- [6] Simpson, A., & Caballero, O. (2014). Monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *BMC Proceedings*, 8(Suppl 4), O6. Dostupné na: doi:10.1186/1753-6561-8-s4-o6
- [7] Sobotková, M., Bartůňková, J. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. *Remedia*. 2008; 5: 356-364. Dostupné na: <http://www.remédia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Monoklonalni-protilatky-a-dalsi-biologicka-leciva-uzivana-v-imunosupresivni-lecbe/6-F-jQ.magarticle.aspx>
- [8] Klener, P., Klener jr. P. Principy systémové protinádorové léčby. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4171-0
- [9] Stern, M., & Herrmann, R. (2005). Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 54(1), 11–29. Dostupné na: doi:10.1016/j.critrevonc.2004.10.011
- [10] Weiner, L. M., Surana, R., & Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 10(5), 317–327. Dostupné na: doi:10.1038/nri2744
- [11] Harris, M. (2004). Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *The Lancet Oncology*, 5(5), 292–302. Dostupné na: doi:10.1016/s1470-2045(04)01467-6
- [12] Sobotková, M., Bartůňková, J. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. *Remedia*. 2008; 5: 356-364.
- [13] Galfrè, G., & Milstein, C. (1981). [1] Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. *Immunochemical Techniques: Part B*, 3–46. Dostupné na: doi:10.1016/0076-6879(81)73054-4
- [14] Pham, P. V. (2018). Medical Biotechnology. *Omics Technologies and Bio-Engineering*, 449–469. Dostupné na: doi:10.1016/b978-0-12-804659-3.00019-1
- [15] Bartůňková, J. Vyšetřovací metody v imunologii. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 2011. 168 s. ISBN 978-80-247-3533-7

- [16] Hořejší, V., Bartůňková, J. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha, Triton 2009, ISBN 978-807387-280-9
- [17] Howell, M., & Shepherd, M. (2018). The immune system. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. Dostupné na: doi:10.1016/j.mpaic.2018.08.014
- [18] Immuneed, Functional Assays, Immuneed AB, 2014 Dostupné na: <https://immuneed.com/service-functional-assays/> (21.3.2020)
- [19] Singh, S., Kumar, N., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, Preeti, & Chugh, V. K. (2017). Monoclonal Antibodies: A Review. *Current Clinical Pharmacology*, 12. Dostupné na: doi:10.2174/1574884712666170809124728
- [20] Saleem, M., Kamal, M.: Monoclonal antibodies in clinical diagnosis: A brief review application. *African Journal of Biotechnology*, 2008, 7, 8, 923-925.
- [21] The Antibody Company, History of Monoclonal Antibodies. The Antibody Company, 2020 Dostupné na: <http://theantibodycompany.com/web/about-us/history-of-monoclonalantibodies> (25.3.2020)
- [22] Foltz, I. N., Karow, M., & Wasserman, S. M. (2013). Evolution and Emergence of Therapeutic Monoclonal Antibodies: What Cardiologists Need to Know. *Circulation*, 127(22), 2222–2230. Dostupné na: doi:10.1161/circulationaha.113.002033
- [23] Roskoski, R. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 62(3), 179–213. Dostupné na: doi:10.1016/j.critrevonc.2007.01.006
- [24] Rajabi, M., & Mousa, S. (2017). The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. *Biomedicines*, 5(4), 34. Dostupné na: doi:10.3390/biomedicines5020034
- [25] Tugues, S., Koch, S., Gualandi, L., Li, X., & Claesson-Welsh, L. (2011). Vascular endothelial growth factors and receptors: Anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(2), 88–111. Dostupné na: doi:10.1016/j.mam.2011.04.004
- [26] Sajib, S., Zahra, F. T., Lionakis, M. S., German, N. A., & Mikelis, C. M. (2017). Mechanisms of angiogenesis in microbe-regulated inflammatory and neoplastic conditions. *Angiogenesis*, 21(1), 1–14. Dostupné na: doi:10.1007/s10456-017-9583-4
- [27] Claesson-Welsh, L. (2012). Blood vessels as targets in tumor therapy. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 117(2), 178–186. Dostupné na: doi:10.3109/03009734.2012.660550
- [28] Musumeci, F., Radi, M., Brullo, C., & Schenone, S. (2012). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors: Drugs and New Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(24), 10797–10822. Dostupné na: doi:10.1021/jm301085w
- [29] Wey, Jane & Stoeltzing, Oliver & Ellis, Lee. (2004). Vascular endothelial growth factor receptors: Expression and function in solid tumors. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O*. 2. 37-45.

- [30] Pradeep, C. R., Sunila, E. S., & Kuttan, G. (2005). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptors in Tumor Angiogenesis and Malignancies. *Integrative Cancer Therapies*, 4(4), 315–321. Dostupné na: doi:10.1177/1534735405282557
- [31] Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*, 13(1), 9–22. Dostupné na: doi:10.1096/fasebj.13.1.9
- [32] Lacal, P. M., & Graziani, G. (2018). Therapeutic implication of vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) targeting in cancer cells and tumor microenvironment by competitive and non-competitive inhibitors. *Pharmacological Research*, 136, 97-107. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.023>
- [33] Berger P, Ballmer-Hofer K. The reception and the party after: how vascular endothelial growth factor receptor 2 explores cytoplasmic space. *Swiss Med Wkly*. 2011;141:w13318. Published 2011 Dec 15. Dostupné na: doi:10.4414/smw.2011.13318
- [34] Hsu, M.-C., Pan, M.-R., & Hung, W.-C. (2019). Two Birds, One Stone: Double Hits on Tumor Growth and Lymphangiogenesis by Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3. *Cells*, 8(3), 270. Dostupné na: doi:10.3390/cells8030270
- [35] Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-467.
- [36] Roy, H., Bhardwaj, S., & Ylä-Herttuala, S. (2006). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Letters*, 580(12), 2879–2887. Dostupné na: doi:10.1016/j.febslet.2006.03.087
- [37] Abdelgalil, A. A., Alkahtani, H. M., & Al-Jenoobi, F. I. (2019). Sorafenib. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Dostupné na: doi:10.1016/bs.podrm.2018.11.003
- [38] Tridente, G. (2017). Sunitinib. Adverse Events and Oncotargeted Kinase Inhibitors, 199–219. Dostupné na: doi:10.1016/b978-0-12-809400-6.00009-3
- [39] Falcon, B. L., Chintharlapalli, S., Uhlik, M. T., & Pytowski, B. (2016). Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 164, 204–225. Dostupné na: doi:10.1016/j.pharmthera.2016.06.001
- [40] Koranda, P., Kamínek, M. a kol. *Nukleární medicína*, Olomouc, Univerzita Paleckého v Olomouci, 2014, ISBN 978-80-244-4031-6
- [41] Poole, R. M., & Vaidya, A. (2014). Ramucirumab: First Global Approval. *Drugs*, 74(9), 1047–1058. Dostupné na: doi:10.1007/s40265-014-0244-2
- [42] Li, W., Croce, K., Steensma, D. P., McDermott, D. F., Ben-Yehuda, O., & Moslehi, J. (2015). Vascular and Metabolic Implications of Novel Targeted Cancer Therapies. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(10), 1160–1178. Dostupné na: doi:10.1016/j.jacc.2015.07.025

- [43] Huang, M., Chen, M., Ye, W., & Zhang, D. (2019). VEGFR Inhibitors as Sensitizing Agents for Cancer Chemotherapy. *Protein Kinase Inhibitors as Sensitizing Agents for Chemotherapy*, 29–43. Dostupné na: doi:10.1016/b978-0-12-816435-8.00003-1
- [44] Kupka, K., Kubinyi, J., Šámal, M. *Nukleární medicína*. 6. ed. Praha: Nakladatelství P3K, s.r.o.; 2015. 161 p. ISBN: 978-80-87343-54-8
- [45] G-Biosciences, *Antibody Labeling: Which Method Should You Use?*, G-Biosciences, Geno Technology Inc., 2019 Dostupné na: <https://info.gbiosciences.com/blog/antibody-labeling-which-method-should-you-use> (19.7.2020)
- [46] Nabi, H. A., & Doerr, R. J. (1992). Radiolabeled monoclonal antibody imaging (immunoscintigraphy) of colorectal cancers: Current status and future perspectives. *The American Journal of Surgery*, 163(4), 448–456. Dostupné na: doi:10.1016/0002-9610(92)90053-t
- [47] Gupta, S., Batra, S., & Jain, M. (2014). Antibody Labeling with Radioiodine and Radiometals. *Drug Delivery System*, 147–157. Dostupné na: doi:10.1007/978-1-4939-0363-4_9
- [48] Edelmann, M. R., Kettenberger, H., Knaupp, A., Schlothauer, T., & Otteneder, M. B. (2019). Radiolabeled IgG Antibodies - Impact of Various Labels on Neonatal Fc Receptor Binding. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. Dostupné na: doi:10.1002/jlcr.3793
- [49] Janoušek, J. *Studium vlastností radioaktivně značených monoklonálních protilátek pro zobrazování v onkologii*. Hradec Králové, 2019. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie. Vedoucí práce Trejtnar, František.
- [50] Bian, H. J., Chen, Z. N., & Deng, J. L. (2000). Direct technetium-99m labeling of anti-hepatoma monoclonal antibody fragment: a radioimmunoconjugate for hepatocellular carcinoma imaging. *World journal of gastroenterology*, 6(3), 348–352. Dostupné na: doi:10.3748/wjg.v6.i3.348
- [51] Reilly, R. M. (1993). Immunoscintigraphy of tumours using ⁹⁹Tcm-labelled monoclonal antibodies. *Nuclear Medicine Communications*, 14(5), 347–359. Dostupné na: doi:10.1097/00006231-199305000-00002
- [52] Price, E. W., & Orvig, C. (2014). Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.*, 43(1), 260–290. Dostupné na: doi:10.1039/c3cs60304k
- [53] p-SCN-Bn-Deferoxamine. In: *Macrocyclics* [online databáza]. *Macrocyclics*, 2020 Dostupné na: <https://www.macrocyclics.com/online-catalog/bifunctional-chelators-bfcs/p-scn-bn-deferoxamine/> (22.7.2020)
- [54] PubChem Gallium citrate Ga-67 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallium-citrate-ga67#section=Drug-Indication> (22.7.2020)
- [55] Hoffer, P. (1980). Gallium: mechanisms. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 21(3), 282–285.

- [56] Othman, M. F. bin, Mitry, N. R., Lewington, V. J., Blower, P. J., & Terry, S. Y. A. (2017). Re-assessing gallium-67 as a therapeutic radionuclide. *Nuclear Medicine and Biology*, 46, 12–18. Dostupné na: doi:10.1016/j.nucmedbio.2016.10.008
- [57] Dilworth, J. R., & Pascu, S. I. (2018). The chemistry of PET imaging with zirconium-89. *Chemical Society Reviews*, 47(8), 2554–2571. Dostupné na: doi:10.1039/c7cs00014f
- [58] Bigott-Hennkens, H. M., Dannoon, S., Lewis, M. R., & Jurisson, S. S. (2008). In vitro receptor binding assays: general methods and considerations. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of...*, 52(3), 245–253.
- [59] Lázníček, M., Komárek, P. *Základy rádiofarmacie*. 1. ed. Praha: Karolinum; 1998. 106p ISBN:80-7184-781-X
- [60] Elisa Crestoni, M. (2018). Radiopharmaceuticals for Diagnosis and Therapy. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Dostupné na: doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.14205-2
- [61] European Medicine Agency, Zevalin, European Medicine Agency Science Medicines Health, 2020 <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zevalin> (26.7.2020)
- [62] Okarvi, S. M., & Maecke, H. R. (2016). Radiometallo-Labeled Peptides in Tumor Diagnosis and Targeted Radionuclide Therapy. *Advances in Inorganic Chemistry*, 341–396. Dostupné na: doi:10.1016/bs.adioch.2015.11.003
- [63] National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, Nuclear Medicine, National Institute of Health, Reviewed July 2016 <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/nuclear-medicine> (26.7.2020)
- [64] Vermeulen, K., Vandamme, M., Bormans, G., & Cleeren, F. (2019). Design and Challenges of Radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*. Dostupné na: doi:10.1053/j.semnuclmed.2019.07.001
- [65] Boschi, A., Martini, P., Costa, V., Pagnoni, A., & Uccelli, L. (2019). Interdisciplinary Tasks in the Cyclotron Production of Radiometals for Medical Applications. The Case of ⁴⁷Sc as Example. *Molecules*, 24(3), 444. Dostupné na: doi:10.3390/molecules24030444
- [66] Brouckaert, G., Kalai, M., Krysko, D. V., Saelens, X., Vercammen, D., Ndlovu, `Matladi, ... Vandenabeele, P. (2004). Phagocytosis of Necrotic Cells by Macrophages Is Phosphatidylserine Dependent and Does Not Induce Inflammatory Cytokine Production. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1089–1100. Dostupné na: doi:10.1091/mbc.e03-09-0668
- [67] Adams, G. P., & Weiner, L. M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1147–1157. Dostupné na: doi:10.1038/nbt1137

- [68] Perk, L. R., Visser, O. J., Stigter-van Walsum, M., Vosjan, M. J. W. D., Visser, G. W. M., Zijlstra, J. M., ... van Dongen, G. A. M. S. (2006). Preparation and evaluation of ^{89}Zr -Zevalin for monitoring of ^{90}Y -Zevalin biodistribution with positron emission tomography. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 33(11), 1337–1345. Dostupné na: doi:10.1007/s00259-006-0160-0
- [69] Bayer, V. (2019). An Overview of Monoclonal Antibodies. *Seminars in Oncology Nursing*, 150927. Dostupné na: doi:10.1016/j.soncn.2019.08.006
- [70] Australian Government, Cancer Australia: Monoclonal antibodies, Queensland University of technology, Commonwealth of Australia 2020 Dostupné na: <http://edcan.org.au/edcan-learning-resources/supporting-resources/targeted-therapies/categories/monoclonal-antibodies> (6.8.2020)
- [71] Zahavi, D., & Weiner, L. (2020). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies*, 9(3), 34. Dostupné na: doi:10.3390/antib9030034
- [72] Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). Cellular and molecular immunology E-book. Elsevier Health Sciences. Dostupné na: https://www.pki.unibe.ch/unibe/portal/fak_medizin/ber_vkhum/inst_pharm/content/e54292/e54293/e177941/e177967/e784780/Handout_TumorImmunology_R.Ra dpour2019_ger.pdf (5.3.2020)
- [73] Sompayrac Lauren M. How the Immune system works. 4. vydání, WileyBlackWell, 2012, ISBN-10: 0470657294. Dostupné na: <https://labguide.cz/protilatky/> (7.3.2020)
- [74] Govindan, S. V., Michel, R. B., Griffiths, G. L., Goldenberg, D. M., & Mattes, M. J. (2005). Deferoxamine as a chelator for ^{67}Ga in the preparation of antibody conjugates. *Nuclear Medicine and Biology*, 32(5), 513–519. Dostupné na: doi:10.1016/j.nucmedbio.2005.04.009
- [75] Koizumi, M., Endo, K., Kunimatsu, M., Sakahara, H., Nakashima, T., Kawamura, Y., Watanabe, Y., Saga, T., Konishi, J., & Yamamuro, T. (1988). ^{67}Ga -labeled antibodies for immunoscintigraphy and evaluation of tumor targeting of drug-antibody conjugates in mice. *Cancer research*, 48 5, 1189-94 .
- [76] Miao, H.-Q., Hu, K., Jimenez, X., Navarro, E., Zhang, H., Lu, D., ... Zhu, Z. (2006). Potent neutralization of VEGF biological activities with a fully human antibody Fab fragment directed against VEGF receptor 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(1), 438–445. Dostupné na: doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.119
- [77] Vieira, P., & Rajewsky, K. (1988). The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *European Journal of Immunology*, 18(2), 313–316. Dostupné na: doi:10.1002/eji.1830180221
- [78] Luo, H., England, C. G., Graves, S. A., Sun, H., Liu, G., Nickles, R. J., & Cai, W. (2015). PET Imaging of VEGFR-2 Expression in Lung Cancer with ^{64}Cu -Labeled Ramucirumab. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(2), 285–290. Dostupné na: doi:10.2967/jnumed.115.166462