

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Studium vlivu množství přidaného chelatačního činidla na
výsledek konjugace monoklonální protilátky**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Mgr. Adriana Janečková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Mgr. Adriana Janečková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podporovali v průběhu zpracování celé mé rigorózní práce. Největší poděkování patří mému školiteli Mgr. Pavlu Bártovi, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, odborné vedení, trpělivost a jeho vstřícný a přátelský přístup. Také bych chtěla poděkovat za veškerý čas, který mi věnoval v průběhu této práce. Velmi ráda bych také poděkovala celému pracovišti Radiofarmak za příjemné pracovní zázemí. V neposlední řadě patří velké poděkování mojí rodině za obrovskou podporu v průběhu mého studia.

Abstrakt v českém jazyce

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Mgr. Adriana Janečková

Školitel: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Název rigorózní práce: Studium vlivu množství přidaného chelatačního činidla na výsledek konjugace monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou v posledních několika desetiletích významným nástrojem nejenom pro terapii ale také pro diagnostiku infekčních, autoimunitních či nádorových onemocnění. Monoklonální protilátky se vedle svého terapeutického účinku staly i biologickými vektory pro látky s terapeutickým a diagnostickým významem. Vedle bakteriálních nebo rostlinných toxinů jsou monoklonální protilátky schopny doručit na místo jejich specifické vazby, tj. antigenu proti kterému byly připraveny, i radionuklidy, které jsou významné z hlediska radiodiagnostiky a radioterapie. Tyto emitory radioaktivního záření se mohou na molekulu vázat buď přímo například v případě halogenace nebo nepřímo. Posledně zmíněný způsob je nejrozšířenější z hlediska větší stability a většího počtu radionuklidů, které se tak mohou pomocí protilátek transportovat. Sloučeninami, které umožňují vazbu radionuklidu na molekulu monoklonální protilátky, jsou bifunkční chelatační činidla (BFC). Míra vazby, tj. konjugace, BFC na molekulu protilátky závisí na vlastnostech samotného chelátoru a také počtu a přístupnosti vazebných míst na molekule protilátky. Cílem předkládané práce bylo vyvinout postup pro kvantifikaci míry konjugace zvolené monoklonální protilátky cetuximab vybranými chelatačními činidly DTPA, DOTA a NOTA a také zjistit optimální poměr látkových množství protilátka:chelátor pro nejlepší výtěžek konjugace.

Monoklonální protilátka cetuximab byla konjugována s jednotlivými chelatačními činidly DTPA, DOTA a NOTA v následujících poměrech látkových množství 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 a 1:100 (cetuximab:BFC). Konjugace probíhala v konjugačním pufru NaHCO₃ o koncentraci 0,1 M po dobu 2,5 hodiny při teplotě 37 °C. Pomocí metody Bradford Protein Assay byla stanovena koncentrace konjugované protilátky a metodou Arsenazo III byl zjištěn počet molekul konjugovaného chelátoru na molekule protilátky cetuximab.

Výsledkem experimentální práce bylo úspěšné zavedení a ověření vhodnosti metody Arsenazo III pro kvantifikaci imunokonjugace a zjištění vlivu množství přidaného chelátoru na výslednou míru konjugace monoklonální protilátky cetuximab vybranými BFC. Pro testované chelátory byl pro poměry látkových množství 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 a 1:100 (cetuximab:chelátor) zjištěn následující počet molekul konjugovaného chelátoru na molekule protilátky, pro DTPA 14,8, 18,7, 15,3, 25,1 a 31,3; pro DOTA 3,3, 2,9, 3,3, 5,0 a 7,7 a pro NOTA: 1,2, 1,5, 12,6, 34,8 a 58,8. Navíc byl zjištěn optimální poměr látkových množství 1:5, 1:50 a 1:20 (cetuximab:BFC) pro chelátory DTPA, DOTA a NOTA v tomto pořadí.

Závěrem lze konstatovat, že byla úspěšně aplikována metoda Arsenazo III pro stanovení míry konjugace monoklonální protilátky. Metoda ve třech opakování pro zvolené chelátory a poměry látkových množství cetuximab:BFC reprodukovatelně kvantifikovala množství vázaného chelátoru.

Abstrakt v anglickém jazyce

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Mgr. Adriana Janečková

Supervisor: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Title of rigorosum thesis: Study of the effect of the amount of chelating agent addition on the result of monoclonal antibody conjugation

Monoclonal antibodies have become the important tool not only for the therapy, but also for the diagnosis of the infectious, autoimmune or cancer diseases in the last few decades. In addition to their own therapeutic effect, monoclonal antibodies are used as vectors for biological substances with therapeutical and diagnostic importance. Besides bacterial and plant toxins, monoclonal antibodies are also effective in their capability to deliver radionuclides to the site of their specific binding, i.e. the antigen against which they were prepared. The so called radioimmunoconjugates are then successfully used in radiodiagnostic and radiotherapeutical field. Radionuclides can be bound to antibody molecule either directly in the case of halogenation or indirectly. The latter method is the most common one due to a greater stability and suitability for more radionuclides, which can be transported by antibodies. Substances that allow the radionuclide binding to the monoclonal antibody molecule are called bifunctional chelators (BFC). The degree of BFC conjugation to an antibody molecule depends on the properties of the chelator as well as the number and accessibility of binding sites on a monoclonal antibody structure. The aim of the present experimental study was the development of an experimental procedure for the quantification of the conjugation degree of the monoclonal antibody cetuximab with the selected chelating agents DTPA, DOTA and NOTA. Furthermore, the study also aimed at the determination of the optimal substance amount ratio for antibody:chelator to achieve optimal conjugation yield.

Monoclonal antibody cetuximab was conjugated with the subsequent chelating agents DTPA, DOTA and NOTA in the following ratios: 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 and 1:100 (cetuximab:BFC). The conjugation proceeded in NaHCO₃ conjugation buffer (0,1 M) for 2,5 hours at 37 °C. The determination of the conjugated monoclonal antibody

concentration was made with the Bradford Protein Assay method and the amount of the conjugated chelator on cetuximab molecule was analysed with the Arsenazo III method.

The result of the experimental work comprised the successful application and validation of Arsenazo III method for the quantification of immunoconjugation degree. Furthermore, the found results determined the effect of the used chelator quantity on the resulting degree of monoclonal antibody conjugation by selected BFCs. There were found the numbers of conjugated BFC molecules per monoclonal antibody molecule for the tested ratios 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 and 1:100 (cetuximab:chelator) as follows 14,8, 18,7, 15,3, 25,1 and 31,3 for DTPA; 3,3, 2,9, 3,3, 5,0 and 7,7 for DOTA and 1,2, 1,5, 12,6, 34,8 and 58,8 for NOTA. Moreover, there were found the optimal substance amount ratios 1:5, 1:50 and 1:20 (cetuximab:BFC) for chelators DTPA, DOTA and NOTA respectively.

In conclusion, there was the successful application of the Arsenazo III method for the determination of the monoclonal antibody conjugation degree with BFC. The method made in triplicates for selected chelators and cetuximab:chelator ratios reproducibly quantified the amount of conjugated chelator.

Obsah

1. Seznam zkratk	10
2. Úvod.....	13
3. Teoretická část	15
3.1 Monoklonální protilátky a jejich obecná charakteristika.....	15
3.2 Radionuklidy a chelatační činidla.....	20
3.2.1 Radionuklidy	20
3.2.2 Makrocyclické a acyklické chelátory.....	21
3.2.3 Termodynamická stabilita.....	24
3.2.4 Kinetika – disociace kyselin a konkurenční radioaktivní značení	25
3.2.5 Příklady chelatačních činidel používaných v běžné praxi	26
3.3 Radioterapie	27
3.3.1 Techniky radioterapie.....	28
3.3.2 Radioimunoterapie	31
3.3.3 Značení monoklonálních protilátek prostřednictvím radionuklidů.....	33
3.3.4 Receptor pro epidermální růstový faktor	36
3.3.4.1 Cetuximab	36
3.3.5 Vaskulární endoteliální růstový faktor a jeho receptory	39
3.3.5.1 Ramucirumab	41
3.4 Radiodiagnostika.....	43
3.4.1 Technecium-99m.....	43
3.4.2 Rhenium-186 a rhenium-188	45
3.4.3 Radionuklidy india	46
3.4.4 Radionuklidy galia	46
3.4.5 Měď a její radionuklidy.....	46
3.4.6 Lutetium-177.....	47
3.4.7 Ostatní radionuklidy využívané v radiodiagnostice	47
4. Cíl práce	48
5. Experimentální část.....	49
5.1 Použité přístroje a software	49
5.2 Použitý materiál	49
5.3 Použité chemikálie	49
5.4 Pracovní postup.....	50

5.4.1	Příprava fosfátového pufru (PBS).....	50
5.4.2	Příprava konjugačního pufru NaHCO ₃ (0,1 M) a roztoku octanu sodného (0,15 M)	50
5.4.3	Konjugace monoklonální protilátky cetuximab vybranými chelatačními činidli	50
5.4.4	Metoda Bradford Protein Assay pro stanovení množství proteinu	52
5.4.5	Metoda Arsenazo III pro stanovení množství konjugovaného chelátoru na molekule protilátky	53
6.	Výsledky	55
6.1	Stanovení množství chelátoru DTPA konjugovaného na molekule monoklonální protilátky cetuximab	55
6.2	Stanovení množství chelátoru DOTA konjugovaného na molekule monoklonální protilátky cetuximab	57
6.3	Stanovení množství chelátoru NOTA konjugovaného na molekule monoklonální protilátky cetuximab	59
7.	Diskuse.....	61
8.	Závěr	65
9.	Literatura.....	66

1. Seznam zkratek

ADCC	na protilátkách závislá cytotoxická reakce, <i>angl.</i> antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
ADC	konjugát protilátka-léčivo, <i>angl.</i> Antibody Drug Conjugate
AKT	protein kináza B, <i>angl.</i> protein kinase B
BFC	bifunkční chelatační činidlo, <i>angl.</i> bifunctional chelator
CAT	chloramin T
cDNA	komplementární DNA, <i>angl.</i> complementary DNA
CDR	oblast určující komplementaritu, <i>angl.</i> complementarity determining region
CT	výpočetní tomografie, <i>angl.</i> computed tomography
DFO	deferoxamin, <i>angl.</i> desferrioxamine
DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>angl.</i> deoxyribonucleic acid
DOTA	tetraazacyklododekantetraoctová kyselina, <i>angl.</i> tetraazacyclododecane tetraacetic acid
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina, <i>angl.</i> diethylene triamine pentaacetic acid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina, <i>angl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermální růstový faktor, <i>angl.</i> epidermal growth factor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor, <i>angl.</i> epidermal growth factor receptor
ELISA	<i>angl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	Evropská léková agentura, <i>angl.</i> European Medicines Agency
Fab	fragment vázající antigen, <i>angl.</i> fragment antigen binding
Fc	krystalizující fragment, <i>angl.</i> fragment crystallizable
FcRn	Brambellův receptor
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, <i>angl.</i> Food and Drug Administration
FOLFIRI	kyselina folinová, fluorouracil a irinotekan
HAHA	lidské protilátky vytvořené proti lidským protilátkám, <i>angl.</i> human anti-human antibodies
HAMA	lidské protilátky vytvořené proti myším protilátkám, <i>angl.</i> human anti-mouse antibodies
HEU	vysoce obohacený uran, <i>angl.</i> highly enriched uranium

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, <i>angl.</i> high-performance liquid chromatography
CHX-A"-DTPA	cyclohexyldiethylenetriaminpentaoctová kyselina, <i>angl.</i> cyclohexyldiethylenetriaminepentaacetic acid
IGRT	radioterapie řízená obrazem, <i>angl.</i> image-guided radiotherapy
IMRT	intenzitou modulovaná radiační terapie, <i>angl.</i> intensity modulated radiation therapy
Ig	imunoglobulin, <i>angl.</i> immunoglobulin
K _{ML}	konstanta termodynamické stability, <i>angl.</i> thermodynamic stability constant
LEU	nízko obohacený uran, <i>angl.</i> low enriched uranium
LWR	lehkovodní reaktor, <i>angl.</i> light water reactor
mAb	monoklonální protilátka, <i>angl.</i> monoclonal antibody
MEK	mitogenem aktivovaná protein kináza, <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase
MW	molární hmotnost, <i>angl.</i> molar weight
NMR	nukleární magnetická rezonance, <i>angl.</i> nuclear magnetic resonance
NOTA	triazacyklononantrioctová kyselina, <i>angl.</i> triazacyclononanetriacetic acid
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok, <i>angl.</i> phosphate buffered saline
PET	pozitronová emisní tomografie, <i>angl.</i> positron emission tomography
PCR	polymerázová řetězová reakce, <i>angl.</i> polymerase chain reaction
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza, <i>angl.</i> phosphoinositide 3-kinase
PKC	protein kináza C, <i>angl.</i> protein kinase C
PIGF	placentární růstový factor, <i>angl.</i> placental growth factor
RAF	zrychlený fibrosarkom, <i>angl.</i> rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	kryší sarkom, <i>angl.</i> rat sarcoma
RIT	radioimunoterapie, <i>angl.</i> radioimmunotherapy
RNA	ribonukleová kyselina, <i>angl.</i> ribonucleic acid
SBRT	stereotaktická radiační terapie těla, <i>angl.</i> stereotactic body radiation therapy
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie, <i>angl.</i> single-photon emission computed tomography
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TGF- α	transformující růstový faktor- α , <i>angl.</i> transforming growth factor- α
TLC	tenkovrstvá chromatografie, <i>angl.</i> thin-layer chromatography

UV	ultrafialové záření, <i>angl.</i> ultraviolet light
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor, <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor, <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor receptor
VIS	viditelné světlo, <i>angl.</i> visible light
w%	hmotnostní procenta, <i>angl.</i> weight percent
3DCRT	3D konformní radioterapie, <i>angl.</i> 3D conformal radiotherapy

2. Úvod

V současné době se bohužel stále častěji setkáváme s rozvojem nejrůznějších civilizačních onemocnění. Příčinou můžou být genetické predispozice, vliv infekčního agens kolem nás, ale také vliv faktorů, které můžeme sami do jisté míry ovlivnit svým životním stylem jako např. eliminace stresu, zdravé stravování nebo dostatek pohybu. Největší problém z civilizačních chorob vedle obezitou způsobených kardiovaskulárních onemocnění představují nádorová onemocnění, která se rozvíjí často nekontrolovaně a postihují lidskou populaci po celém světě. Patří mezi hlavní příčiny úmrtí a jejich terapie a diagnostika je tedy stále více studována.

Terapie nádorových onemocnění pomocí cytostatik nepřinesla uspokojivé výsledky, a to zejména pro jejich nežádoucí účinky. Tyto látky poškozují i buňky zdravé, a proto se věda zaměřila na zkoumání látek, které jsou schopny odlišit právě buňky zdravé od těch nádorových. Díky intenzivnímu výzkumu byla objevena tzv. cílená terapie ovlivňující regulační a signální dráhy proteinů a na rozdíl od cytostatik tedy nedochází k nespecifickému poškození DNA. Tuto skupinu specificky zaměřených léčiv tvoří monoklonální protilátky a léčiva s malou molekulou jako fragmenty protilátek nebo peptidy. (Vorlíček et al. 2005)

Významnou součástí léčby nádorových onemocnění představuje také radioterapie, která je dnes využívána v kombinaci s imunoterapií a chemoterapií, čímž dochází ke zvýšení efektivity léčby. Aby bylo možné radionuklidy uplatnit ke specifickým biologickým aplikacím, je využíváno chelátorů, které spolu s biologickou molekulou vytváří radiofarmakum, na základě kovalentní vazby. Tato chelatační činidla pomáhají k oddělení volných radiokovových iontů od vodného roztoku a nemůže tak docházet k jejich hydrolýze nebo transchelataci. Hotové radiofarmakum lze využít pro efektivní léčbu pomocí radioaktivního zdroje k cílené terapii, a navíc také pro *in vivo* zobrazování. Radionuklid je pacientovi podáván bez téměř jakékoliv radionuklidové ztráty právě díky chelátoru. (Baskar et al. 2012; Price a Orvig 2014)

Pro diagnostické účely je využíváno zobrazování pomocí pozitronové emisní tomografie, kde se uplatňují perspektivní zářiče jako např. ytrium-86, galium-68, zirkonium-89, měď-64 a skandium-44. Kromě této zobrazovací metody lze použít také jednofotonovou emisní výpočetní tomografii, která je vývojově starší a hlavní využívaný izotop představuje technecium-99m. Vedle něj se v poslední době také používají další radiokovy jako lutecium-177, galium-67 a indium-111. K terapeutickým účelům se

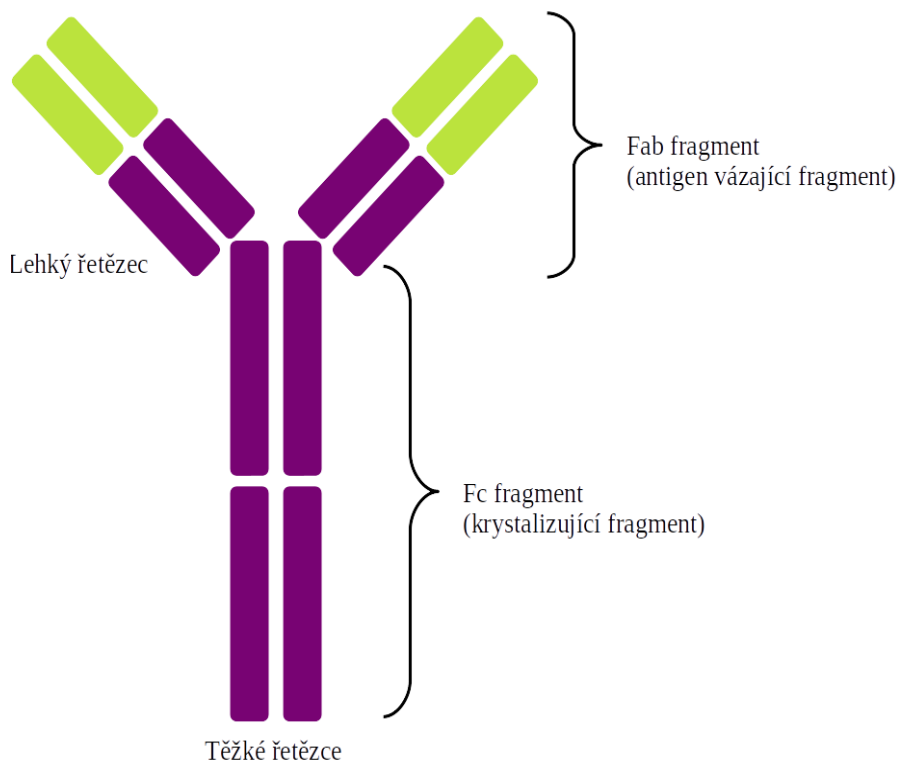
obvykle používají radionuklidy vázané na monoklonální protilátky nebo peptidy pomocí chelatačních činidel. Do této skupiny můžeme zařadit yttrium-90, indium-111, lutecium-177, actinium-225, olovo-212 a bismut-213. Nejběžněji využívaným chelátorem jak v terapii, tak v diagnostice je DOTA. Toto bifunkční chelatační činidlo vykazuje výjimečnou stabilitu *in vivo* a je komerčně běžně dostupné. Vedle něj našel uplatnění další chelátor, který na rozdíl od předchozího nepotřebuje pro radioaktivní značení zvýšenou teplotu, a tím je NOTA. Použití chelatačního činidla DTPA bylo zastíněno výše zmíněnými chelátory pro jeho nestabilitu *in vivo* avšak velkého významu dosáhly jeho deriváty. Tiuxetan, jakožto derivát DTPA, je součástí registrovaného léčivého přípravku Zevalin®. (Price a Orvig 2014)

3. Teoretická část

3.1 Monoklonální protilátky a jejich obecná charakteristika

Základ humorální imunity člověka představují monoklonální protilátky (mAbs, *angl.* monoclonal antibodies). Tyto protilátky mají stejnou antigenní specifitu v důsledku jejich produkce vycházející jen z jednoho klonu B-lymfocytů. Monoklonální protilátky nabízí obrovské terapeutické využití. Vedle jejich dlouholetého uplatnění v diagnostice mohou být používány od roku 1997 také v klinické praxi. V tomto roce byla schválena americkou agenturou FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, *angl.* Food and Drug administration) protilátka rituximab k terapii Non-Hodgkinova maligního lymfomu (Klener a Klener 2010). Protilátky jsou tedy především využívány v onkologii, ale vedle toho také v transplantologii, dále k léčbě infekčních chorob a různých onemocnění založených na autoimunitním podkladě. (Jílek 2008; Sobotková a Bartůňková 2008; Klener a Klener 2010; Nový 2014)

Monoklonální protilátky jsou také prezentovány jako specifické glykoproteiny, jejichž afinita je zacílena k určitému antigenu, a jsou označovány jako imunoglobuliny (Ig). Rozeznáváme pět tříd imunoglobulinů (IgA, IgD, IgE, IgG a IgM) lišících se stavbou konstantních domén těžkých řetězců. V léčbě onkologických onemocnění se nejvíce setkáváme s protilátkami třídy IgG₁, které jsou monospecifické – jejich dvě vazebná ramena jsou shodná. Tvar molekuly monoklonálních protilátek se může mnohým jevit jako tvar písmene Y (viz Obr. 1). Struktura protilátky je založena na propojení dvou řetězců lehkých a dvou řetězců těžkých pomocí disulfidických můstků. Specifitu imunoglobulinů mají na starost fragmenty variabilní neboli fragmenty vázající specifický antigen označované jako Fab (*angl.* fragment antigen binding), sestávající se ze dvou lehkých a dvou těžkých domén. Dalším fragmentem, kterým je molekula imunoglobulinů tvořena, je fragment konstantní též nazývaný jako Fc fragment (*angl.* fragment crystallizable) připojující se k fragmentu variabilnímu. Tento fragment je tvořen také z lehkého a těžkého řetězce a jeho úkolem je prostřednictvím fagocytózy aktivace komplementu nebo na protilátkách závislé cytotoxické reakce (ADCC, *angl.* antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) s cílem zničit cílovou buňku. (Stern a Herrmann 2005; Jílek 2008; Sobotková a Bartůňková 2008; Klener a Klener 2010; Nový 2014)



Obr. 1: Struktura monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky jsou proteiny, které jsou produkovány imunitním systémem jako obranná linie primárně proti infekcím a nemocem. Každá protilátka obsahuje dva těžké řetězce a dva lehké řetězce, které se vzájemně váží pomocí disulfidických můstků. Variabilní konce těžkého a lehkého řetězce jsou u jednotlivých protilátek odlišné, díky tomu každá protilátka rozpoznává specifický antigen. Zbytek, který je u všech protilátek konstantní, zajišťuje další specifické funkce protilátky (vazbu na fagocytující buňky apod.); podle (Bultas 2015)

Produkce monoklonálních protilátek prostřednictvím B-lymfocytů je závislá na stimulaci cílovým antigenem. V *in vitro* produkci monoklonálních protilátek není ovšem možné neomezeně kultivovat B-lymfocyty a zabezpečit tak tvorbu daného klonu protilátky. Řešení tohoto problému nastalo s představením tzv. hybridomové metody, kterou vyvinuli Milstein a Köhler (Köhler a Milstein 1975; Nový 2014) a díky níž vyřešili problém týkající se nemožnosti kultivace B-lymfocytů *in vitro*. Jejich práce se tak stala novým mezníkem v imunoterapii.

Podstatou jejich metody je fúze B-lymfocytu produkujícího protilátky a nesmrtelné nádorové buňky myelomové řady. Vzniklá hybridomová linie je nesmrtelná, neomezená v počtu dělení a zároveň tvoří monoklonální protilátku s jedinečnou specifitou. (Köhler a Milstein 1975; Pastan et al. 1986; Pai a Pastan 1993)

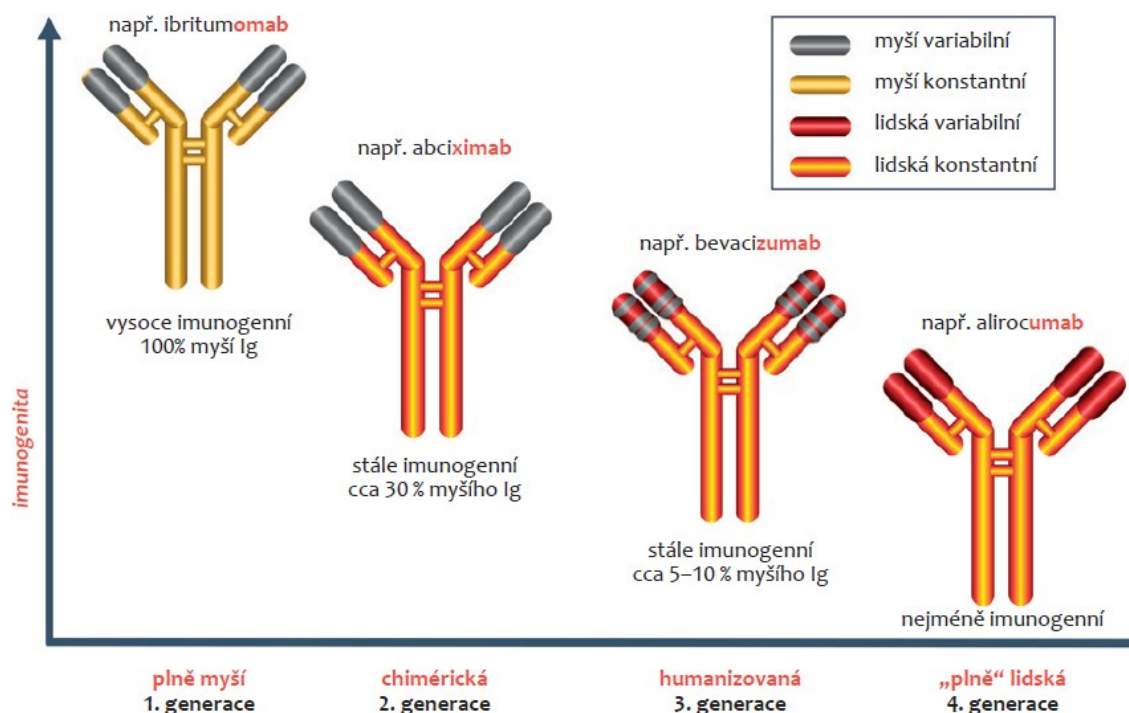
Při této tzv. hybridomové metodě dochází v podmínkách *in vitro* ke sloučení lymfocytů myši, které jsou stimulované určitým antigenem, s myšimi myelomovými

buňkami. Výsledkem tohoto sloučení je buňka, kterou nazýváme hybridom. Ta má vlastnosti obou sloučených buněk, umí vytvářet určitou monoklonální protilátku (myši) a je schopná se v podmínkách *in vitro* nekonečně množit. (Sobotková a Bartůňková 2008; Nový 2014)

Využití myších monoklonálních protilátek v klinické praxi s sebou ovšem nese riziko výskytu nežádoucích účinků ze strany příjemce. Zejména pak vytvářením lidských protilátek proti protilátkám myším (HAMA, *angl.* Human antimouse antibodies), které brání vazbě monoklonální protilátky k cílovému antigenu a může dojít až na anafylaktickou reakci nebo sérovou nemoc. (Sobotková a Bartůňková 2008; Nový 2014)

Důsledkem těchto zaznamenaných nežádoucích účinků byla snaha rozvíjet technologie, díky kterým by bylo možné snížit imunogenicitu připravených monoklonálních protilátek pomocí výše popsané hybridomové buněčné kultivace. Nově vyvinuté technologie umožnily vznik chimérických a humanizovaných protilátek, které snížily nebo téměř zcela eliminovaly riziko tvorby HAMA protilátek. (Morrison et al. 1988; Sobotková a Bartůňková 2008; Klener a Klener 2010)

Chimérické protilátky mají Fab úsek imunoglobulinu kódovaný myší DNA (deoxyribonukleová kyselina, *angl.* deoxyribonucleic acid), lidská DNA pak kóduje úsek konstantní. U protilátek humanizovaných došlo k nahrazení části molekuly (nekódující oblasti vázající antigen) úsekem lidského imunoglobulinu. Humanizované protilátky mají myšího původu jen CDR oblasti (*angl.* complementarity determining region) a ty reagují s antigenními epitopy (viz Obr. 2). Nicméně, v případě těchto protilátek může docházet k tvorbě tzv. HAMA protilátek (*angl.* Human anti-human antibody). (Morrison et al. 1988; Sobotková a Bartůňková 2008; Klener a Klener 2010)



Obr. 2: Typy monoklonálních protilátek. Vývoj monoklonálních protilátek zaznamenal čtyři fáze (čtyři generace). Prvé byly plně myší, monoklonální protilátky druhé a třetí generace obsahují jen menší část myší variabilní oblasti, naopak konstantní, imunologicky významnější je oblast lidská.

Současné biotechnologické postupy umožňují produkovat plně lidské protilátky, které mají nejnižší alergizující potenciál, jejich další výhodou je dlouhodobá účinnost; převzato z: (Bultas 2020)

Na počátku přípravy monoklonálních protilátek stojí získání hybridomové linie, která vytváří myší protilátky dané specifity a z ní se připraví RNA (ribonukleová kyselina, *angl.* ribonucleic acid) s následnou reverzní transkripcí cDNA (komplementární DNA, *angl.* complementary DNA). Metodou PCR (polymerázová řetězová reakce, *angl.* polymerase chain reaction) se namnoží úsek, který kóduje vazebné místo pro antigen, a ten nahradí příslušný úsek v genu pro syntézu lidského imunoglobulinu. Dále potom dochází ke vložení takto připraveného genu pro tvorbu lidského imunoglobulinu do vhodné savčí buňky, která následně vytváří chimérickou či humanizovanou protilátku. (Cwiertka et al. 2004; Harris 2004; Krejsek a Kopecký 2004)

Z názvosloví monoklonálních protilátek můžeme odvodit původ monoklonální protilátky podle její koncovky (viz). (Klener a Klener 2010)

Tab. 1: Názvosloví monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátka	Používaná koncovka
myší	-momab
chimérická	-ximab
humanizovaná	-zumab
lidská	-mumab

V dnešní době se setkáváme s technologiemi, které jsou schopny vyrobit plně lidské monoklonální protilátky a také připravit monoklonální protilátky tzv. bivalentní (bispecifické) tzn. mající dvě ramena s různou antigenní specifitou. Navíc, lze připravit i protilátky konjugované s další účinnou látkou (např. radionuklidem, cytostatikem nebo toxinem). (Cwierka et al. 2004; Harris 2004; Krejsek a Kopecký 2004; Klener a Klener 2010)

Příkladem takto modifikovaných mAbs jsou konjugáty protilátka-léčivo (ADC, *angl.* Antibody Drug Conjugate) a také imunotoxiny, které se staly předmětem intenzivního předklinického a klinického výzkumu v posledních letech. Jedná se buď o imunokonjugáty složené z protilátky a léčiva anebo je vazebná doména protilátky spojená se silným buněčným toxinem. Účinnost ADC je prezentována jejich mechanismem působení. Nejprve dochází k selektivní vazbě protilátky na receptor exprimovaný na povrchu nádorových buněk. Po tomto navázání dochází k internalizaci ADC do endozomálních a lysosomálních oddílů nádorové buňky s následným uvolněním léčiva, které způsobí buněčnou smrt působením důležitých intracelulárních cílů (např. tubulin nebo DNA). Aby se minimalizovala toxicita pro normální buňky a tkáně, musí být receptor nadměrně exprimován na cílených nádorových buňkách a také musí být následně internalizován po navázání ADC, aby došlo k úspěšnému doručení cytotoxického léčiva do intracelulárních prostor. Imunotoxiny jakožto proteinové toxiny fúzované s fragmenty protilátek (např. bakteriální difterický toxin nebo pseudomonas exotoxin) působí na intracelulárním substrátu katalyticky. Jsou tedy často účinné pro zabíjení buněk, i když došlo k internalizaci jen velmi malého množství molekul do cytosolu buňky. Imunotoxiny se uplatňují pro řešení cílů, které jsou exprimovány v nízkých úrovních a/nebo s potenciálně nízkou mírou internalizace. Velkou nevýhodou však zůstává jejich imunogenicita u lidí, vycházející z bakteriálního nebo rostlinného původu těchto proteinových toxinů. (Wang et al. 2015; Grawunder a Barth 2017)

3.2 Radionuklidy a chelatační činidla

3.2.1 Radionuklidy

Radionuklidy jsou nestabilní prvky, které podléhají radioaktivní přeměně, které lze využít v lékařské diagnostice i terapii jako je například léčba rakoviny. Aby bylo možné tyto radionuklidy použít pro specifické biologické aplikace, musí být tzv. „volné“ radiometalické ionty odděleny od vodného roztoku pomocí chelatačních činidel (chelátorů) a tím se zabrání jejich transchelataci a hydrolýze. Chelátory používané k těmto účelům jsou kovalentně vázány s biologicky aktivní molekulou a tvoří tak aktivní radiofarmakum. (Reilly 2010; Price a Orvig 2014)

Díky chelátoru se při podání pacientovi dodává radionuklid bez jakékoliv ztráty, což umožňuje efektivní lokálně specifický radioaktivní zdroj dostat do míst pro *in vivo* zobrazování nebo cílenou terapii. (Price a Orvig 2014)

Skupina radiokovů, které lze použít pro zobrazování pozitronovou emisní tomografií (PET, *angl.* positron emission tomography), zahrnuje následující perspektivní zářiče z hlediska jejich fyzikálních vlastností a možností zobrazování: galium-68, měď-64, ytrium-86, zirkonium-89 a skandium-44. PET zobrazování poskytuje citlivé, kvantitativní a neinvazivní obrazy různých molekulárních pochodů a cílových struktur. Vedle PET zobrazení lze využít i vývojově starší zobrazovací metodu, kterou je jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT, *angl.* Single Photon Emission Computed Tomography), kde hlavním izotopem používaným pro zobrazování je technecium-99m. SPECT se v praxi používá již od svého vzniku v šedesátých letech 20. století. V poslední době se stále více používají pro SPECT zobrazování radiokovy jako je galium-67, indium-111 a lutecium-177, kdy posledně zmíněný radionuklid je teranostickým prvkem, který má díky emisi β^- -záření terapeutický efekt a současně díky emitovaným γ -fotonům i diagnostický účel, což je novější koncept používaný v nukleární medicíně. (Koranda et al. 2014; Price a Orvig 2014)

K terapeutickým účelům se především používají emitory částicového záření zejména α -částic a β^- -částic, jako je indium-111 (emitor Augerových elektronů), dále ytrium-90 a lutecium-177 jakožto emitory β^- -částic, a konečně actinium-225, olovo-212 a bismut-213 jako emitory α -částic. Tyto radionuklidy jsou obvykle ve spojení přes chelatační činidla s biologicky aktivními látkami typu monoklonální protilátky (imunokonjugáty) nebo peptidy. (Reilly 2010; Price a Orvig 2014)

Každý iont radiokovu má jedinečné chemické vlastnosti. Pokud se tyto radiokovy mají bezpečně užívat v medicíně pro *in vivo* aplikace, musí být jejich použití řádně bezpečnostně ošetřeno ve smyslu splnění podmínek na apyrogenitu, sterilitu a čistotu. Hlavní rozdíl mezi radioaktivními a neradioaktivními ionty kovů je ten, že práce s radioaktivními látkami se obvykle provádí za extrémně zředěných podmínek, přičemž ionty radionuklidů se obvykle používají při koncentracích nM až pM. Jediné radiofarmakum může být radioaktivně označeno různými izotopy stejného prvku (např. ytrem-86 a ytrem-90) a poskytuje stejné náboje a fyzikální vlastnosti, a tedy i stejné biologické chování a distribuci *in vivo*. Tato třída radiofarmak, u kterých se využívají dva izotopy stejného prvku, jako je ytrem-86 pro PET zobrazování a ytrem-90 pro léčbu je označována jako teranostika, kdy tento pojem s ohledem na dvojí charakter záření (diagnostický versus terapeutický) byl již zmíněn výše v textu. Ytrem-90 jako částečný β^- -emitor umožňuje provádět biodistribuční, zobrazovací a dozimetrické studie pomocí rentgenového záření vzniklého při brzděném záření (bremsstrahlung), ale vzhledem k tomu, že získané prostorové rozlišení a kvalita obrazu jsou velmi špatné, obvykle se místo něj používá zobrazovací náhrada (např. indium-111 a ytrem-86). Nicméně, ytrem-90 je unikátní ve svých vlastnostech a za určitých okolností tak může být použit přímo pro PET zobrazování, protože emituje velmi malé množství pozitronů (0,003%), které lze použít ke sběru zobrazovacích údajů kvalitnějších než data získaná pomocí zobrazování rentgenovými paprsky doprovázející brzděné záření. (Lázníček a Komárek 1998; Reilly 2010; Price a Orvig 2014)

3.2.2 Makrocyclické a acyklické chelátory

Molekuly, které jsou součástí radiofarmak a slouží pro vazbu radiokovů, jsou svým charakterem bifunkční chelatační činidla (BFC, *angl.* bifunctional chelator). Tato chelatační činidla obsahují reaktivní funkční skupiny, které mohou být kovalentně spojeny (konjugovány) s cílenými vektory (např. peptidy, nukleotidy, protilátkami, nanočásticemi). Biokonjugační techniky obvykle využívají funkční skupiny jako jsou karboxylové kyseliny nebo aktivované estery (např. N-hydroxysukcinimid NHS-ester, tetrafluorfenyl TFP-ester) pro amidové vazby, isothiokyanáty pro thiomocovinové vazby a maleimidy pro thiolové vazby. (Cihlo a Lázníček 2008; Price a Orvig 2014)

Velký dopad na celkové farmakokinetické vlastnosti radiofarmaka mají struktura a fyzikální vlastnosti komplexu radiokov-chelátor. Mnoho těchto komplexů je velmi hydrofilních, což vede k rychlému vylučování ledvinami, jsou-li připojeny k malým

vektorům, jako jsou peptidy, nukleotidy anebo fragmenty protilátek. Molekuly radiofarmak ve své struktuře zahrnující radiokovy obsahují mnoho synteticky zaměnitelných složek, které lze rozdělit do různých modulů, jako je modul:

- radiokovu, který mění radioaktivní emisní vlastnosti a poločas (γ -záření pro SPECT, β^+ -záření pro PET a β^- , α -částice nebo Augerovy elektrony pro terapii)
- chelátoru, který musí být pevně spojen s radiokovem, aby byla zajištěna optimální stabilita radiofarmaka
- části vektoru/cílení umožňující výběr jakéhokoliv známého molekulárního cíle pro specifické doručení užitečné radioaktivní zátěže

Každý iont radionuklidu má různé chemické požadavky, včetně preferencí atomů donoru ligandu (např. N, O, S), koordinačního čísla a koordinační geometrie. Existuje však mnoho klíčových úvah o designu, které lze použít univerzálně. (Reilly 2010; Price a Orvig 2014)

Syntéza ligandu by měla být relativně jednoduchá a měla by se vyhnout stereoisomerům a diastereospecifickým reakcím. Při syntéze BFC by mělo být umožněno začlenění různých biokonjugačních úchytů a také vyladění fyzikálních vlastností změnou polaritativity a náboje chelátoru. Stupeň polaritativity se hodnotí pomocí rozdělovacích koeficientů oktanol – voda ($\log P$), kterým lze tedy upravit vlastnosti biodistribuce připraveného radiofarmaka. (Lázníček a Komárek 1998; Price a Orvig 2014)

V rámci navrhování nových chelátorů se potvrdilo, že makrocykly jsou obecně kineticky inertnější než acyklické chelátory. A to i přesto, že jejich termodynamické stability byly stanoveny tak, aby byly velmi podobné. (Price a Orvig 2014)

Makrocyklické chelátory umožňují snazší koordinaci kovových iontů, jelikož mají inherentně omezenou geometrii a částečně předem organizovaná vazebná místa pro kovové ionty, čímž snižují entropickou ztrátu, ke které dochází při koordinaci kovových iontů. Naopak acyklické chelátory musí podstoupit složitější změnu ve fyzikální orientaci a geometrii v roztoku kvůli zajištění donorových atomů a koordinaci s kovovým iontem. Následně u nich dochází k výraznějšímu poklesu entropie než u makrocyklů, což je termodynamicky nepříznivé. Termodynamická hnací síla směrem ke komplexní tvorbě je proto obecně u makrocyklů větší, což je fenomén nazývaný makrocyklický efekt. (Price a Orvig 2014)

Naproti tomu zásadní vlastností, kterou vyniká většina acyklických chelátorů, je koordinační kinetika a účinnost radioaktivního značení na rozdíl od makrocyklů. Běžnou

vlastností acyklických chelátorů je schopnost provést kvantitativní radioaktivní značení radiokovem za méně než 15 minut při pokojové teplotě. Makrocykly často vyžadují zahřívání na 60–95 °C po delší dobu tj. 30 až 90 minut. Rychlé značení při pokojové teplotě se stává rozhodující vlastností při práci s BFC-konjugáty molekul citlivých na teplo, jako jsou protilátky a jejich deriváty. Toto značení je také zásadní při práci s izotopy s krátkým poločasem rozpadu, např. galiem-68, bismutem-212/213, skandiem-44 a mědí-64. (Price a Orvig 2014; Tsionou et al. 2017)

Při syntéze nového chelátoru, nebo při znovu užití starého chelátoru s novým iontem radiokovu, se provádí počáteční screeningové experimenty obvykle jednoduchým radioaktivním značením. Tím se určí množství faktorů, jako např. zda chelátor může vázat iont radiokovu a efektivně provádět radioaktivní značení ve vysokých výtěžcích (nejlépe kvantitativní), dále jaká je požadovaná teplota značení (nejlépe při laboratorní teplotě), a v neposlední řadě jaká je požadovaná doba reakce (optimálně co nejkratší). (Lázníček a Komárek 1998; Price a Orvig 2014)

Izotopy s krátkým poločasem rozpadu, jako je např. galium-68, jsou ideálně spojeny s chelátory, které jsou schopny rychlého radioaktivního značení, tj. rychlá kinetika radioaktivního značení. Izotopy, které mají delší poločas rozpadu (např. indium-111 a lutecium-177) umožňují prodloužení reakční doby. I přesto je však výhodnější dokončit radioaktivní značení za méně než 10 až 15 minut. Co se týče teploty, je radioaktivní značení při pokojové teplotě zásadní pro citlivé protilátkové vektory, které jsou degradovány při zvýšených teplotách. (Lázníček a Komárek 1998; Price a Orvig 2014)

Pokud jde o navrhování a testování nových chelátorů, měla by být prioritou rychlá kinetika radioaktivního značení při pokojové teplotě. Nicméně rychlá kinetika inkorporace radiokovu a tudíž nízké energetické bariéry komplexu radiokov-chelátor mohou také znamenat rychlé vyčlenění a nízké energetické bariéry pro uvolnění radionuklidu. (Price a Orvig 2014)

Náročný vyrovnávací akt je nutný k získání nejlepší sady chelatačních vlastností pro každou aplikaci a každý iont radiokovu, což vyžaduje studii a dostupnost širokého výběru různých chelátorů s různými vlastnostmi, z nichž si lze vybrat. (Lázníček a Komárek 1998; Price a Orvig 2014)

Když je chelátor identifikován včasným screeningem z hlediska vlastností radioaktivního značení vhodného pro použití s konkrétním iontem radiokovu, musí být následně experimentálně stanovena jeho stabilita a inertnost. Následující experimenty

jsou prováděny s daným komplexem radiokov-chelátor za podmínek relevantních pro zjištění případné *in vivo* translace, aby se posoudil jeho chelatační potenciál jako hlavní složky radiofarmaka. Výsledkem případné ztráty (výpadku) radiokovu z radiofarmaka *in vivo* je totiž jeho nežádoucí necílená distribuce jakožto „volného“ iontu v těle, kdy jeho výsledná akumulace v organismu závisí na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech a biologickém chování. Např. je známo, že zirkonium-89 a galium-68 se hromadí v kostech, když jsou uvolněny z BFC. Oproti tomu v játrech se hromadí měď-64. Osud iontů radiokovů může být sledován pomocí zobrazování PET/SPECT u živého zvířete. Pro určení biodistribuce volných radiokovů, jsou prováděny experimenty s aplikací radionuklidu do laboratorních zvířat, kde jsou na konci experimentu zvířata usmrcena v předem určených časových bodech, jsou odebrány jejich orgány a změřeno a vypočteno rozdělení radioaktivity jako procento injikovaných dávek radioaktivity na gram tkáně (% ID/g). (Reilly 2010; Koranda et al. 2014; Price a Orvig 2014)

Každý iont radioaktivního kovu má své jedinečné vlastnosti, které je třeba vzít v úvahu při konstrukci zobrazovacího/terapeutického radiofarmaka, jako je chemie jeho vodné hydrolýzy, redoxní chemie a afinita k nativním biologickým chelátorům. (Price a Orvig 2014)

3.2.3 Termodynamická stabilita

Při hodnocení a výběru chelátoru vhodného pro spojení se specifickým iontem radiokovu a využitelného v radiofarmacii je rozhodujícím faktorem kinetická inertnost *in vivo*. A to i nad rámec absolutní termodynamické stability komplexu kov – chelátor. Termodynamická konstanta stability/formace ($K_{ML}=[ML]/[M]*[L]$), kde [ML] je koncentrace kov – chelátor, [M] charakterizuje koncentraci kovu a [L] koncentraci chelátoru, se obvykle experimentálně stanoví pomocí potenciometrických nebo spektrofotometrických titrací. Ovšem, hodnocení kinetické inertnosti za podmínek relevantních pro aplikace *in vivo* může být mnohem problematičtější. Ačkoliv, konstanty termodynamické stability by mohly být užitečné pro předběžná srovnání různých chelátorů s konkrétním kovovým iontem, nepředpovídají stabilitu *in vivo*. (Price a Orvig 2014; Paterson a Donnelly 2016)

Termodynamickým parametrem poskytující více biologicky relevantních informací než hodnoty K_{ML} je hodnota veličiny pM ($-\log [M_{\text{volné ionty}}]$). Hodnota pM je negativní dekadický logaritmus koncentrace volného kovového iontu, který se nevyskytuje v komplexu s daným chelátorem za daných specifických podmínek. Hodnota pM

vykazuje závislost na hodnotě, která se vypočítává ze standardní konstanty termodynamické stability ($\log K_{ML}$), zohledňující proměnné a podmínky, jako je zásaditost ligandu, hydrolýza kovových iontů, (fyziologické) pH a poměr ligand : kov. Konstanty stability a hodnoty pM udávají číslo určující směr a velikost rovnováhy v koordinační reakci kov – chelát za specifických podmínek, ale neposkytují žádné kinetické informace (např. o disociační rychlosti). (Reilly 2010; Price a Orvig 2014)

Kinetická informace je velmi důležitým faktorem, protože míra disociace *in vivo* řídí kinetickou inertnost komplexu radiokovu, bez ohledu na termodynamickou stabilitu. Tyto disociace jsou velmi ovlivněny vysokým ředěním, ke kterému dochází *in vivo*, když malé množství radiofarmaka (v řádu mikro nebo nanogramů) je ředěno do kapky krve. Ještě více komplikací však přináší velké zastoupení mnoha silných nativních biologických chelátorů a konkurenčních iontů, které mohou v těle transportovat radiokovy z BFC radiokonjugátů. Tyto konkurenční látky se často vyskytují ve vyšších koncentracích než radiofarmaka a řadíme mezi ně transportní proteiny (jako je transferrin, ceruloplasmin a metallothionein) a dále skladovací proteiny (jako je ferritin a enzymy obsahující kov – superoxiddismutáza). Tato rozsáhlá nabídka komplikujících faktorů znamená, že jeden test *in vitro* obvykle není přesný při predikci stability *in vivo*. (Lázníček a Komárek 1998; Reilly 2010; Price a Orvig 2014)

3.2.4 Kinetika – disociace kyselin a konkurenční radioaktivní značení

Ke zjištění a následnému hodnocení relativní kinetické inertnosti komplexu kovu vůči kyselému prostředí, lze použít experimenty disociace kyseliny. Bylo zjištěno, že většina komplexů radiokov-chelátor se oddělí poměrně rychle v prostředí o $pH < 2,0$. (Price a Orvig 2014; Paterson a Donnelly 2016)

Na základě těchto experimentů s disociací kyseliny lze v průběhu času pozorovat dekomplexaci pomocí technik, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, *angl.* high-performance liquid chromatography), chromatografie na tenké vrstvě (TLC, *angl.* thin-layer chromatography) a nukleární magnetická rezonance (NMR, *angl.* nuclear magnetic resonance) pro komplexy diamagnetických kovů. S výjimkou chelátorů mědi se experimenty disociace kyselin běžně neprovádějí, protože neposkytují přesnou predikci kinetické inertnosti *in vivo*, vzhledem k tomu, že nízké pH hodnoty nejsou v krvi ani ve většině orgánů (kromě žaludku) a disociace radiokovu obvykle nastává transchelatací na sérové proteiny a enzymy a není tedy zprostředkována kyselinou. (Koranda et al. 2014; Price a Orvig 2014; Paterson a Donnelly 2016)

Experimenty s radioaktivním značením mohou být provedeny přidáním přebytku neradioaktivních iontů, jako jsou Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} nebo Fe^{3+} do radioaktivně značené směsi a následným přidáním chelátoru pro vyhodnocení dopadu přítomnosti těchto iontů na výtěžky radioaktivního značení. Tyto experimenty nazýváme jako konkurenční. (Price a Orvig 2014)

Výše uvedené experimenty mohou zjistit selektivitu radioaktivního značení chelátoru pro specifický iont radiokovu v přítomnosti dalších biologicky relevantních konkurenčních iontů. Radiofarmaka na bázi chelátorů jsou obvykle radioaktivně značena v přísně nekovových podmínkách (např. deionizovaná ultračistá voda často zbavená kovů průchodem síta s chelexovou pryskyřicí zachycující kovy) a proto se nemusí tyto experimenty zdát zcela relevantní pro predikci stability a užitečnosti *in vivo*. Specifická aktivita iontů radiokovu se může značně lišit, stejně jako koncentrace nečistot iontů kovů v závislosti na metodě výroby a čištění radiokovů. Radiokovy se používají ve velmi malých množstvích a za extrémně zředěných podmínek, proto jakékoli přítomné kovové nečistoty (byť jen v řádu několika nanomolů) mohou skutečně překračovat koncentrace iontů radiokovu a konkurenční vazba by mohla být problematická. Skutečnost, zda jsou nečistoty z kovových iontů ve směsích radiokovu přítomny a v jakém množství závisí na zdroji iontu radiokovu, způsobu výroby a čištění. (Lázníček a Komárek 1998; Price a Orvig 2014)

3.2.5 Příklady chelatačních činidel používaných v běžné praxi

Významným a pravděpodobně nejběžněji používaným představitelem BFC je tetraazacyklododekantetraoctová kyselina (DOTA, *angl.* tetraazacyclododecane-tetraacetic acid) navzdory zvýšení teploty při radioaktivním značení v podstatě se všemi radiokovy, které chelatuje. Příkladem radiokovů, které DOTA chelatuje jsou skandium-44, indium-111, lutecium-177, yttrium-86/90 nebo actinium-225. DOTA se hojně uplatňuje v radiochemii již po celá desetiletí. Má výjimečnou stabilitu *in vivo* a je také komerčně dostupná v mnoha různých bifunkčních derivátech a vektorových konjugátech. Široké uplatnění DOTA v různých radiofarmakách vychází ze skutečnosti, že tento chelátor je schopen tvořit velmi stabilní komplexy s dvojmocnými i trojmocnými radionuklidy a lze jej tedy využít jak pro terapeutické účely, tak v diagnostice. (De León-Rodríguez a Kovacs 2008; Reilly 2010; Price a Orvig 2014; Szkop et al. 2019)

Dalším představitelem chelátorů, který zároveň patří k nejstarším je NOTA (triazacyklononantrioctová kyselina, *angl.* triazacyclononanetriacetic acid). Tento

chelátor se považuje za nejúspěšnější pro použití s mědí-64 a galiem-67/68. Využívá se jako makrocyclický chelátor při značení radionuklidů mědi a galia a díky jeho vynikajícím schopnostem chelatace lze provést značení při pokojové teplotě za 30-60 minut. V důsledku toho je také kompatibilní s vektory citlivými na teplo a vykazuje vynikající stabilitu *in vivo*. V posledních letech se věda zaměřila zejména na radionuklid galia-68 právě kvůli rychlé tvorbě stabilních komplexů s NOTA. (Reilly 2010; Price a Orvig 2014)

Chelátor DTPA (diethylentriaminpentaoctová kyselina, *angl.* diethylene triamine pentaacetic acid) je znám jako jeden z nejstarších a nejrozšířenějších acyklických chelátorů. Využívá se pro značení mnoha radionuklidů (např. měď-64, indium-111, lutecium-177 a ytrium-86/90) při pokojové teplotě a v řádech minut. Problémem je však jeho nestabilita *in vivo*, díky které bylo jeho použití zastíněno již výše zmíněnými makrocyclickými chelátory DOTA a NOTA. V důsledku tvorby stabilních komplexů našel v dnešní době využití derivát DTPA známý jako CHX-A"-DTPA (cyclohexyldiethylentriaminpentaoctová kyselina, *angl.* cyclohexyldiethylene-triaminepentaacetic acid) a také další derivát tohoto chelátoru – Tiuxetan, který je obsažen v registrovaném léčivém přípravku Zevalin[®]. (Reilly 2010; Price a Orvig 2014)

Deferoxamin (DFO, *angl.* desferrioxamine) reprezentuje acyklický chelátor schopný nativní vazby železitých iontů. Tento chelátor je jediný kompetentní pro radioaktivní značení a následnou *in vivo* aplikaci s radioaktivními ionty Zr^{4+} . Kromě chelatace zirkonia může být DFO využit také pro tvorbu komplexů s radioaktivním galiem. (Reilly 2010; Price a Orvig 2014)

3.3 Radioterapie

V posledních letech stále dochází k významným pokrokům ve vývoji přístupů pro léčbu nádorových onemocnění. I přesto, že byly objeveny modernější způsoby léčby, zůstává radioterapie důležitou součástí léčby této civilizační choroby. Radioterapie využívá ionizující záření, vytvářející elektricky nabitě částice – ionty a ukládá energii do buněčných tkání, skrze které prochází. Na základě působení této energie o vysoké hodnotě dochází ke smrti nádorových buněk nebo k nevratným genetickým změnám, které jsou často také smrtí těchto buněk následovány. (Baskar et al. 2012)

Vysokoenergetické záření poškozuje DNA buněk a tím zabraňuje jejich schopnosti se dále dělit a množit. Nevýhodou této léčebné metody zůstává fakt, že toto záření poškozuje

i buňky normální, tedy zdravé. Cílem radioterapie je maximalizace dávky záření pro buňky abnormální (nádorově transformované) při minimalizaci expozice záření buněk zdravých. Buňky normální jsou schopny opravy a udržení stavu normální funkce při poškození jako důsledku radiační léčby. Na rozdíl od buněk nádorových, u kterých dochází k diferenciálnímu zabíjení. (Baskar et al. 2012; Chen a Kuo 2017)

Kromě využití radioaktivního záření v terapii s cílem vyléčení je také využíváno jako velmi efektivní způsob paliativní léčby k úlevě od bolesti způsobené nádory. Dále je radioterapie indikována v kombinaci s jinými léčebnými přístupy. Může být využita před chirurgickým zákrokem jako neadjuvantní terapie s cílem zmenšit nádor. Při použití po operaci jako adjuvantní léčba má za cíl zničit mikroskopické nádorové buňky, jež zde mohly po zákroku zůstat. Kromě chirurgických zákroků bývá radioterapie také využívána v kombinaci s imunoterapií nebo chemoterapií. (Baskar et al. 2012; de Andrade Carvalho a Villar 2018)

Rozeznáváme dva způsoby doručení záření na místo jejího působení pro léčbu nádoru. Tím prvním je záření dodáváno z vnějšku prostřednictvím mířených vysokoenergetických paprsků (fotony, protony nebo další typy částicového záření) na nemocnou tkáň. Druhým způsobem je doručení, a tedy působení záření uvnitř těla. Toto vnitřní ozařování neboli brachyterapie představuje aplikaci radioaktivního zdroje uzavřeného v kovovém pouzdře pomocí katetru přímo do místa nádoru. Brachyterapie nachází využití zejména při léčbě gynekologických malignit, nádorů prostaty, ale také při opakované léčbě na krátkou vzdálenost. (Baskar et al. 2012; Moding et al. 2013)

3.3.1 Techniky radioterapie

Radioterapeutické techniky zahrnují následující postupy a modifikace:

a) Frakcionace – radioterapie prováděná v tomto režimu se zakládá na odlišných radiobiologických vlastnostech nádorů a okolní zdravé tkáně. Tyto režimy zvyšují výhodu přežití zdravých tkání před buňkami nádorovými. Zdravé buňky ve srovnání s buňkami nádorovými proliferují relativně pomaleji, a tudíž mají čas opravit poškození před svou replikací. Častý režim radioterapie se v dnešní době skládá z denních frakcí o dávce 1,5 až 3 Gy, které jsou podávány během několika týdnů.

b) Technologický pokrok – jak již bylo zmíněno výše, cílem radioterapie je zachování zdravé tkáně při dodání co nejoptimálnější dávky do místa nádoru. K tomu nepochybně přispěly technologické pokroky, ke kterým patří nové způsoby zobrazování, výkonnější

počítače a software, ale také nové doručovací systémy jako pokročilé lineární urychlovače.

c) 3D konformní radioterapie (3DCRT, *angl.* 3D conformal radiotherapy) – radioterapie založená na CT zobrazování, tedy umožňující přesnou lokalizaci nádoru a kritických normálních orgánových struktur, aby bylo dosaženo optimálního umístění paprsku a stínění. Tato technika má za cíl dodat záření do hlavního hrubého objemu nádoru včetně rezervy pro rozšíření mikroskopického nádoru nazývané klinický cílový objem.

d) Intenzitou modulovaná radiační terapie (IMRT, *angl.* intensity modulated radiation therapy) – umožňuje podávat dávky záření odpovídající nádoru a současně se vyhýbající kritickým orgánům. Nyní je k dispozici na mnoha klinických odděleních a díky tomu došlo ke zlepšení terapeutického poměru pro několik kritických míst v těle (hlava a krk, prostata, vaječníky a děloha).

e) Radioterapie řízená obrazem (IGRT, *angl.* image-guided radiotherapy) – tohoto způsobu lze využít, pokud jsou blízko nádoru kritické struktury a mohla by malá poziční chyba vést k neúmyslnému ozáření zdravé tkáně. IGRT umožňuje detekci takových chyb na podkladě informací, které získáváme zobrazením před radioterapií umožňujícím korekci. Příkladem může být denní CT (počítačová tomografie, *angl.* computer tomography) skenování kuželovým paprskem získávané před každým ošetřením. I u této techniky vedla vylepšená přesnost ke zlepšení terapeutického poměru.

f) Stereotaktická radiační terapie těla (SBRT, *angl.* stereotactic body radiation therapy) - technologický pokrok uvedený výše umožnil SBRT přesné dodání velmi vysoké jednotlivé dávky záření během několika frakcí léčby vedoucí k odstranění malých, dobře definovaných nádorů vyskytujících se kdekoliv v těle. Vzhledem k podávání vysoké dávky záření je poškození tkáně bezprostředně sousedící s nádorem pravděpodobné. Navzdory tomu je klinicky významná toxicita nízká, protože je množství normální tkáně v oblasti s vysokou dávkou malé. Tato metoda dosáhla vynikajících výsledků v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic v raném stádiu u těch pacientů, kteří nejsou způsobilí k chirurgickému zákroku. SBRT se také uplatnila v léčbě nádorů prostaty, hlavy a krku, jater, ledvin, páteře a slinivky. (Baskar et al. 2012; Moding et al. 2013; Chen a Kuo 2017)

V radioterapii se využívá různých druhů záření. Zatímco rentgenové paprsky generuje zařízení excitující termoelektrony (např. katodové trubice a lineární urychlovače), paprsky γ -záření získáváme z rozpadu radioaktivních látek (např. kobalt-60 a

cesium-137). Oba druhy záření patří k ionizujícímu záření, které je považováno za elektromagnetické paprsky s nízkým lineárním přenosem energie, složené z nehmotných částic energie nazývaných fotony. Proto se také můžeme setkat se zařazením γ a rentgenového záření mezi záření fotonová. (Lázníček a Komárek 1998; Baskar et al. 2012)

Dalším druhem využívaného záření, je záření částicové. Mezi tento druh záření patří paprsky elektronové, protonové a neutronové. Elektronové paprsky využíváme pro léčbu nádorů nacházejících se blízko povrchu těla, pro jejich ne příliš hluboký průnik do tkání. Paprsky protonové patří k novější formě částicového záření využívaného v onkologii. Toto záření nabízí díky svému absorpčnímu profilu ve tkáních, označovaného jako Braggův pík, uložení maximální ničící energie v místě potřeby, při minimálním poškození okolních zdravých tkání. Zdrojem protonového záření je produkce těchto částic z cyklotronů a synchrotronů. Neutronové částice jsou produkovány také z cyklotronů a neutronových generátorů. Tyto částice mají vysoký lineární přenos energie a mohou tedy způsobit větší poškození DNA než fotony. Částicové záření obecně má vyšší lineární přenos energie než fotony a také vyšší biologickou dostupnost. V důsledku toho jsou tato záření účinnější pro terapii nádorů, které jsou radiorezistentní, jako např. melanomy, glioblastomy, sarkomy a karcinomy ledvinných buněk. Problémem této léčby však zůstává vyšší pořizovací cena zařízení. Nicméně náklady na cyklotrony mají klesající tendenci, což by mohlo v budoucnu vést k širšímu využití léčby protonovým paprskem. (Baskar et al. 2012; Michalski 2015)

Z biologického hlediska cílíme radiaci v buňce na DNA a to buď přímo – interakcí radiace s buněčnou DNA a nebo nepřímo – prostřednictvím volných radikálů. Ke smrti nádorových buněk účinkem radiací terapie může docházet různými mechanismy, avšak se stejným cílem. Neopravitelně poškodit DNA a tím zabránit dalšímu dělení s následkem smrti. Zneškodnění nádorových buněk může trvat v řádech týdnů až měsíců po ukončení radiací terapie. (Baskar et al. 2012)

Rozlišujeme několik typů buněčné smrti indukované ionizujícím zářením, z nichž dva patří k nejrozšířenějším. Tím prvním je apoptóza neboli programovaná buněčná smrt. Jako hlavní mechanismus buněčné smrti, zahrnutý do léčby pomocí radiace, je vystihována smršťováním buněk a tvorbou apoptotických tělísek. Hlavní role při tomto procesu patří mitochondriím a buněčná membrána apoptotických buněk zůstává obecně neporušená. (Baskar et al. 2012; de Andrade Carvalho a Villar 2018)

Druhý typ buněčné smrti je zapříčiněn nesprávnou segregací chromozomů, která vede k tvorbě buněk s více jádry (aberantní jadernou morfologií). K tomuto procesu dochází během aberantní mitózy (buněčného dělení) či po ní, a proto tento typ nazýváme mitotická buněčná smrt neboli mitotická katastrofa. (Baskar et al. 2012; de Andrade Carvalho a Villar 2018)

Mezi další, ne až tak rozšířené, druhy buněčné smrti řadíme senescenci a autofagii. Senescence se vyznačuje trvalou ztrátou buněčné proliferační kapacity, což znamená, že buňky nesyntetizují DNA, tím se nedělí, nicméně stále zůstávají životaschopné. U senescentních buněk dochází k jejich zvětšení a zploštění vlivem buněčného stresu způsobeného poškozením DNA a tyto buňky následně umírají zejména procesem apoptózy. Autofagie se vyznačuje jako geneticky regulovaná forma programované buněčné smrti. Buňka se sama tráví a zahrnuje autofagický/lysozomální kompartment. Typická je tvorba vakuol s dvojitou membránou v cytoplazmě izolující ostatní buněčné organely. (Baskar et al. 2012; de Andrade Carvalho a Villar 2018)

3.3.2 Radioimunoterapie

Nádorová onemocnění často nekontrolovatelně, a především často náhodně postihují značnou část lidské populace po celém světě. Jsou jednou z hlavních příčin úmrtí, a proto je jejich terapii a tím související přípravě nových protinádorových léčiv věnována stále větší pozornost. Když se podíváme do historie této léčby, zjistíme, že po druhé světové válce se dostala do praxe alkylační cytostatika a poté také další skupiny cytostatik. Mechanismus účinku těchto látek je však nespecifické poškození DNA a vzhledem k tomuto nespecifickému působení i na buňky zdravé bylo potřeba vývoj zaměřit na jiné úrovně ovlivnění protinádorového působení. S následným rozvojem vědy byly vyvinuty látky, které působí v oblasti proteinů na jejich regulační a signální dráhy a které rozpoznávají buňky zdravé od nádorových. Tato skupina specificky zaměřených léčiv se označuje jako cílená terapie (*angl.* Targeted therapy) a patří sem monoklonální protilátky a tzv. small drugs, tj. léčiva s malou molekulou jako fragmenty protilátek nebo peptidy. (Vorlíček et al. 2005)

Vývoj monoklonálních protilátek pro radioimunoterapii (RIT, *angl.* radioimmunotherapy) byl poháněn potřebami vyřešit řadu komplikací v radioterapii jako např. nízké radiační dávky dodávané do nádorové tkáně bez významných účinků proti růstu nádorů a poškozující vliv terapie na zdravé buňky. Pokroky v DNA technologii vyústily ke schopnosti přizpůsobit molekulu imunoglobulinu specifickým vlastnostem a

funkcím *in vivo*. Výzkum monoklonálních protilátek jako nosičů pro radionuklidy uplatňující se v léčbě nádorových onemocnění probíhá již více než 60 let. Jako první v roce 1948 použili radioaktivně značenou protilátku Pressman a Keighley pro diagnostické zobrazování. Po následných deseti letech bylo publikováno první oficiální užití monoklonální protilátky s radionuklidem v radioimunodiagnostice. Konečně, v roce 1960 se radioaktivně značené protilátky prvně použily k selektivnímu podání terapeutických dávek radiace pro nádorovou tkáň. (Reilly 2010)

V oblasti onkologie je dnes většina léčiv podávána v dávkovacím schématu, které je založeno na velikosti povrchu těla. Předmětem diskuze se tedy staly fixní dávky léčiv pro všechny pacienty, protože nejsou k dispozici údaje z klinických studií potvrzující fakt, že dávkování založené na velikosti povrchu těla snižuje interindividuální variace expozice léčivu. (Hendriks et al. 2017)

Farmakokinetika monoklonálních protilátek se výrazně odlišuje od farmakokinetiky léčiv s malými molekulami. Cesta podání monoklonálních protilátek v onkologii je primárně intravenózní. Jejich distribuce probíhá pouze v krevní plazmě a extracelulárních tekutinách, tudíž distribuční objemy monoklonálních protilátek bývají nízké. Omezující faktory pro distribuci také představují jejich velikost a hydrofilita. Monoklonální protilátky nemohou být vylučovány z těla eliminačními cestami jako léčiva s malou molekulou, která podléhají renální clearance nebo jaterní eliminaci. (Keizer et al. 2010; Hendriks et al. 2017)

Vzhledem k jejich velké molekulové hmotnosti probíhá metabolizace prostřednictvím dvou mechanismů. Prvním z nich je proteolytický katabolismus, ke kterému dochází v buňkách po endocytóze protilátky. Po jejím pohlcení membránou buňky následuje katabolizace uvnitř buňky pomocí lysozomů. Tato cesta clearance se může jevit jako rychlý a jednoduchý způsob odstranění monoklonální protilátky z těla. Ovšem to vše by platilo za nepřítomnosti neonatálního Brambellova receptoru (FcRn). FcRn receptor exprimují buňky imunitního systému (např. dendritické buňky a makrofágy), vaskulární endotel, hepatocyty a intestinální epitel. Přes Brambellův receptor dochází k vazbě monoklonální protilátky a ta je následným transportem do extracelulární matrix odstraněna z buňky, tj. zpět do krevního systému. Monoklonální protilátka tak uniká lysozomální degradaci, a tak už nemůže docházet k jejímu intracelulárnímu rozpadu pomocí lysozomálního katabolismu. Tento děj zvyšuje biologický poločas mAbs v séru. Při terapii monoklonálními protilátkami ale zřejmě není tento mechanismus zcela

nasyčen, protože je udržována homeostáza mezi vazbou na receptor a intracelulárním rozpadem. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že mAbs jsou z těla eliminovány pomalou lineární clearance zprostředkovanou proteolytickým katabolismem. (Keizer et al. 2010; Hendriks et al. 2017)

Druhou, rychlejší cestou eliminace představuje vazba na cílovou strukturu. Následně dochází k internalizaci komplexu cílová struktura-mAb s navazující intracelulární degradací. Tato cesta je charakteristická svou obvyklou saturovatelností, protože ji velmi ovlivňuje afinita protilátky k cíli i exprese cílové struktury. Při terapii monoklonálními protilátkami, kdy jsou nastaveny jejich terapeutické plazmatické koncentrace, dochází ke kombinaci obou těchto cest eliminace. Tedy k lineární clearance mAb při plazmatických koncentracích, které jsou vyšší než minimální cílová inhibiční koncentrace důsledkem nasycení intracelulární degradace. Pokud plazmatická koncentrace monoklonálních protilátek poklesne pod minimální cílovou inhibiční koncentraci, už není nasycena intracelulární katabolická degradace a tím pádem je eliminace zajištěna prostřednictvím vazby na cíl. (Mould a Green 2010; Hendriks et al. 2017)

Faktory související s vazbou na cílovou strukturu na buněčném povrchu jsou nádorová zátěž, cílové hladiny exprese v nádorech versus endogenní exprese a afinita monoklonální protilátky. Tato vazba tedy nesouvisí s tělesnou hmotností, z čehož je také zřejmé, že proces intracelulární degradace monoklonálních protilátek zaměřených na antigeny na povrchu buňky nezávisí na hmotnosti těla. (Hendriks et al. 2017)

Na základě aktuálně dostupných informací o eliminaci monoklonálních protilátek a v souvislosti s veřejně dostupnými údaji z klinických studií existuje odůvodnění pro pevné dávkování těchto léků v terapii nádorů. Fixní dávkování u monoklonálních protilátek vede k širokému terapeutickému oknu, proto se může při dobře zvolené dávce zvýšit bezpečnost léčby a také snížit náklady na léčbu bez ztráty účinnosti. (Mathijssen et al. 2007; Hendriks et al. 2017)

3.3.3 Značení monoklonálních protilátek prostřednictvím radionuklidů

Monoklonální protilátky jsou značeny pomocí radionuklidů na základě dvou mechanismů reakce. Těmi jsou halogenace a chelatace. Pokud se jedná o halogenaci, tedy značení prostřednictvím radionuklidů patřících do skupiny halogenů, největší využití představuje jodace. Ve větší míře se uplatňuje jodace přímá pro její vysoký výtěžek a jednoduché provedení. Existuje však i jodace nepřímá, která je založena na jodaci výchozí látky následované konjugací jodované látky s molekulou protilátky. Vzhledem k většímu

využití přímé jodace je v následujícím odstavci popis dvou metod této jodace. (Nový 2014)

První metodou je metoda jodogenová, jejímž principem je vznik jodného kationtu (I^+) pro jodaci molekuly monoklonální protilátky, kdy jodace probíhá na aminokyselině tyrosinu. Pro metodu jodogenovou je charakteristický jodogen (1,3,4,6 – tetrachlor - 3 α , 6 α -difenyglykoluril) rozpuštěný v metylenchloridu. S tímto jodogenem se nechá reagovat mAb, kdy dochází k oxidaci radioaktivního jodidu (I^-) a vzniklý výše zmíněný jodný kation (I^+) se pak váže do molekuly tyrosinu značené protilátky. (Lázníček a Komárek 1998; Nový 2014)

Metoda chloraminu T je založena na oxidaci radioaktivního jodidu prostřednictvím chloraminu T. Chloramin T (CAT) reprezentuje sodnou sůl N-monochlor-p-toluensulfonamidu. Reakcí značené monoklonální protilátky s chloraminem T a roztokem radioaktivního jodidu vzniká radioaktivní kation I^+ , který se váže na aromatické jádro tyrosinu peptidového řetězce proteinu. (Lázníček a Komárek 1998; Nový 2014)

Druhý způsob pro značení monoklonálních protilátek představuje chelatace. Pro značení mAb pomocí radiokovů je zapotřebí bifunkčních chelatačních činidel. Nejprve musí dojít ke konjugaci monoklonální protilátky s vhodným chelátorem a až poté lze tuto modifikovanou protilátku značit radiokovem. Ideálním BFC je ta molekula, která je schopna vytvořit stabilní komplex radiokov-chelátor s vysokou termodynamickou stabilitou a kinetickou inertností, jak bylo popsáno výše. Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole 3.2.2, bifunkční chelátory můžeme rozdělit na acyklické a makrocyclické. Nejznámější zástupce acyklických chelátorů představují DTPA a EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina, *angl.* ethylenediaminetetraacetic acid) a významnými zástupci makrocyclických chelátorů jsou DOTA a NOTA. (Liu 2008; Reilly 2010)

Oblast radioimunoterapie je stále intenzivně zkoumána, avšak některé biomolekuly byly již úspěšně použity pro cílové specifické doručení radionuklidů. Nejvýznamnější milník pro použití radioaktivně značené monoklonální protilátky v radioimunoterapii představuje schválení mAb značené ytriem-90 pod komerčním názvem Zevalin[®] a cílené proti B-lymfocytárnímu antigenu CD20. Zevalin[®] byl prvním radioimunoterapeutickým přípravkem, který byl schválen FDA v roce 2002. O dva roky později byl také schválen českým SÚKLEM (Státní ústav pro kontrolu léčiv). Tento léčivý přípravek představuje

myší IgG₁ anti CD-20 protilátku ibritumomab, která je kovalentně navázaná na β^- -emitor ytrium-90 chelátorovým tiuxetanem. Zevalin[®] je využíván pro terapii non-Hodgkinova lymfomu a jeho intravenóznímu podání předchází aplikace rituximabu, který zajistí optimální využití radiofarmaka vysycením antigenů CD20 na periférii. Následně je sledována gama kamerou správná distribuce podaného ibritumomabu označeného indiem-111 a za 7 dnů může být podána terapeutická dávka ytriem-90 značeného ibritumomabu. (Marcus 2005; Nový 2014)

Dalším schváleným přípravkem v léčbě non-Hodgkinova lymfomu je Bexxar[®] neboli jodem-131 značený tositumomab. Tento přípravek byl schválen FDA v roce 2003 a v České republice doposud registrován není. Lymfomy můžeme označit jako nejradiosenzitivnější ze všech malignit a radioimunoterapie se zde ukázala jako vhodná cesta. Ukládá největší energii do nádoru, a tudíž omezuje poškození okolní zdravé tkáně. Radioaktivně značené anti-CD20 zaměřené monoklonální protilátky vykazují mnoho mechanismů účinků. Dodávají cytotoxické ionizující záření, indukují apoptózu a zprostředkovávají na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu, ale také buněčnou cytotoxicitu závislou na komplementu. Ve srovnání s nekonjugovanými protilátkami mohou být radioimunokonjugáty účinné, když není plně funkční imunitní systém hostitele a také mohou překonat špatnou penetraci protilátky do nádorů. (Vose 2004; Nový 2014)

Jod-131 byl prvním radioizotopem používaným pro radioimunoterapii. Výhodou je jeho snadná dostupnost a také snadná konjugace s protilátkami. Jako emitor β^- -částic a γ -fotonů může být využit jak pro zobrazování, tak pro terapii. Fyzikální poločas rozpadu tohoto radioizotopu je 8 dní a má relativně krátkou průměrnou délku dráhy beta emise (přibližně 1 mm), což je výhodné pro RIT, protože minimalizuje poškození sousední zdravé tkáně. Tositumomab značený jodem-131 (komerčně nazývaný Bexxar[®]) se váže na CD-20 a při jeho metabolizaci dochází k uvolňování volných metabolitů jodu-131 do krevního řečiště a k následnému vyloučení močí. Nicméně volný jod-131 v krvi může být absorbován štítnou žlázou, a proto se pacientům takto léčeným podává před a během terapie přesycený roztok jodidu draselného, aby se blokovala akumulace ve štítné žláze a nedošlo k jejímu poškození. I přesto byla asi u 5 % pacientů léčených přípravkem Bexxar[®] pozorována dysfunkce štítné žlázy. Dávkovací schéma začíná infúzí neznačené protilátky následované stopově značenou dozimetrickou dávkou pro kontrolní

snímkování gama kamerou. Následující terapeutická dávka pro konkrétního pacienta se poté vypočítá na základě účinného poločasu protilátky. (Vose 2004; Nový 2014)

3.3.4 Receptor pro epidermální růstový faktor

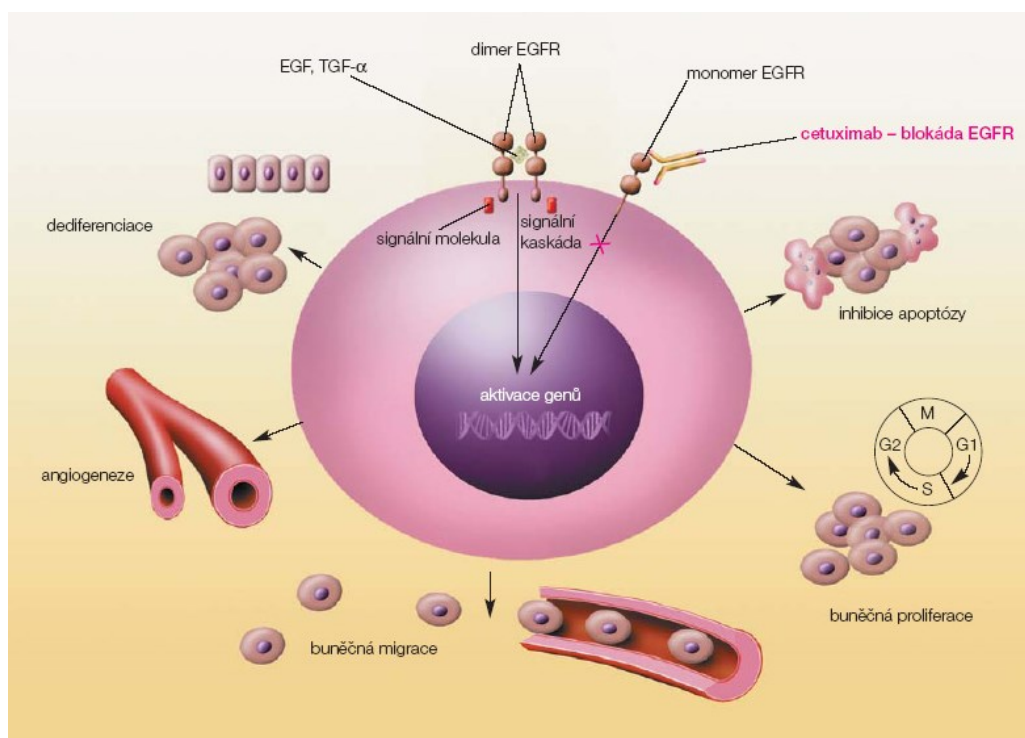
Jako jeden z cílů moderní terapie byl zkoumán receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR, *angl.* Epidermal growth factor receptor), protože je exprimován řadou nádorů a podílí se tak na jejich vzniku. Receptorová rodina epidermálních růstových faktorů (ErbB nebo také HER) zahrnuje receptor pro epidermální růstový faktor typu 1 (EGFR nebo HER1 anebo ErbB1), dále typu 2 (ErbB2 nebo HER 2/c-neu), typu 3 (ErbB3 nebo HER3) a typu 4 (ErbB4 nebo HER4). Celá tato skupina má zásadní vliv na regulaci řady procesů probíhajících na buněčné úrovni, dále pak na funkci tkání a následně celého organismu. Všechny tyto fyziologické procesy jsou v těle přísně kontrolovány. Problém pak představují patologické změny ve struktuře těchto receptorů nebo také případné změny způsobené mutací. Následně dochází k nekontrolované proliferaci buněk, genové amplifikaci a vysoké expresi EGF tyrosinkinázových receptorů s následnou tvorbou a rozvojem nádoru. (Bárta 2012)

K aktivaci receptoru pro epidermální růstový faktor dochází pomocí epidermálního růstového faktoru (EGF, *angl.* Epidermal growth factor) nebo transforming growth factor alpha (TGF- α) vazbou na receptorovou extracelulární (vnější) část. Vnitřní neboli intracelulární část tohoto receptoru je autofosforylována hned po aktivaci části extracelulární, neboť tato část vykazuje tyrosinkinázovou aktivitu. Důsledkem této fosforylace dochází k dimerizaci (párování) receptorů a spuštění signální kaskády, jejímž výsledkem je transkripce genů (vlivem přenesení signálu až do jádra buňky). (Vorlíček et al. 2005)

3.3.4.1 Cetuximab

Cetuximab reprezentuje chimérickou (lidská-myší) rekombinantní IgG₁ protilátku vázající se s vysokou afinitou na EGFR. Při této vazbě cetuximabu na receptor dochází k internalizaci komplexu receptor-protilátka s následným snížením (downregulací) exprese EGFR. Vazba protilátky na EGFR je zároveň kompetitivní, zabraňuje stimulaci receptoru pomocí endogenních ligandů EGF nebo TGF- α , dále způsobuje inhibici buněčné proliferace (inhibuje buněčný cyklus v G₁ fázi) a snižuje tím i angiogenezi (neokapilarizaci). Cetuximab také indukce apoptózu nádorových buněk (viz Obr. 3). Vědeckými studiemi byla také prokázána potenciační účinnost cetuximabu v oblasti

radioterapie, zejména při terapii pokročilých nádorů hlavy a krku. (Harding a Burtress 2005; Melichar 2007)



Obr. 3: Mechanismus účinku cetuximabu. Převzato z: (Melichar 2007)

Cetuximab je uchováván ve skleněných lahvičkách ve formě roztoku při teplotě 2-8 °C. Pacientovi se cetuximab aplikuje pomocí intravenózní infuze, přičemž připravený infuzní roztok vykazuje stabilitu při pokojové teplotě 8 až 12 hodin v chladu. První dávka 400 mg/m² je následována týdenní udržovací dávkou 250 mg/m². (Melichar 2007)

V České republice byl cetuximab zaregistrován v roce 2004 Státním ústavem pro kontrolu léčiv pod názvem Erbitux[®] (viz Obr. 4). Této české registraci však předcházelo schválení FDA v tomtéž roce s indikací cetuximabu pro léčbu kolorektálního karcinomu a pro léčbu nádorů hlavy a krku. Přípravek Erbitux[®] (5mg/ml) vyrábí německá firma Merck a dodává na trh dvě velikosti balení - 20 a 100 ml. (Nový 2014)



Obr. 4: Léčivý přípravek obsahující cetuximab. Převzato z: (Melichar 2007)

Kontraindikace při použití cetuximabu v terapii jsou minimální. Za absolutní kontraindikaci je považována přecitlivělost na cetuximab, která by se projevila tzv. infuzní reakcí. Tyto reakce jsou tedy nejzávažnějším nežádoucím účinkem. Jedná se o vzácný nežádoucí účinek, který se klinicky projeví zarudnutím kůže, dušností a který ovšem může vést až ke ztrátě vědomí a zástavě dechu i oběhu. Takové případy jsou po stabilizaci stavu léčeny na jednotkách intenzivní péče a po podání léčiv ze skupiny antihistaminik a kortikoidů je možné za přísného monitoringu pacienta pokračovat v infuzní léčbě cetuximabem bez dalších závažných komplikací. (Melichar 2007; Vincenzi et al. 2010)

Nejběžnějším relativně mírným nežádoucím účinkem, který byl pozorován, je kožní exantém připomínající akné (akneiformní exantém). Nejpostiženější místa kůže byla zaznamenána v oblasti obličeje a trupu. Jako další nežádoucí účinky byly zaznamenány i poklesy hladiny hořčíku v séru a vznik průjmových stavů. Vzácným nežádoucím účinkem, který byl také pozorován po podání cetuximabu, byla trichomegalie v oblasti řas. (Melichar 2007; Vincenzi et al. 2010)

Terapie cetuximabem v období těhotenství a kojení není doporučována. Jelikož hovoříme o protilátce IgG₁, předpokládá se její průnik placentou k plodu a rovněž během kojení do mateřského mléka. EGFR se významně podílí na organogenezi a jeho blokáda by mohla způsobit vývojové vady plodu. (Melichar 2007)

Cetuximab bývá v klinické praxi kombinován s cytotoxickým léčivem irinotekanem. Při této léčbě byla pozorována gastrointestinální toxicita (hlavně tzv. pozdní průjmy projevující se 24 hodin po podání léčiva), jelikož hlavním nežádoucím účinkem

irinotekanu je enterotoxická. V tomto případě je tedy důležitá hydratace pacienta. (Melichar 2007; Vincenzi et al. 2010)

Další využití v praxi přináší také kombinace cetuximabu s jinými účinnými látkami. Při terapii spinocelulárních karcinomů hlavy a krku byla standardní léčbou první linie kombinovaná chemoterapie na bázi platiny. V roce 2008 studie ukázala významné zlepšení výsledků léčby po přidání cetuximabu k cisplatině/karboplatině a 5-fluorouracilu v porovnání jen se samotnou chemoterapií. Výzkum se zaměřil na zkoumání takových kombinací účinných látek, které by měly potenciál vzájemné synergie působení a zároveň by nedocházelo ke kumulacím jejich toxicit. Jako vhodné zástupci této kombinace se ukázaly cetuximab, taxany a platina. Tyto tři účinné látky mají potenciál k synergickému působení pro dosažení maximální protinádorové aktivity. Jak již bylo zmíněno výše, cetuximab podporuje zastavení buněčného cyklu a aktivaci proapoptotických molekul. Taxany způsobí inhibici rozložení mikrotubulů a platina tvoří DNA adukty, což ve výsledku ukazuje na aditivní účinky, pomocí nichž lze napadat více cílů v heterogenním nádoru pomocí různých molekulárních drah. Mechanismem vzájemné spolupráce při protinádorovém působení mezi cetuximabem a taxanem se také ukázal jejich imunostimulační účinek. (Guigay et al. 2019)

Po selhání léčby na bázi platiny se jeví jako slibná možnost kombinované terapie cetuximab-paklitaxel nejen u pacientů s pokročilým karcinomem hlavy a krku, ale i u dalších druhů nádorových onemocnění. Paklitaxel jako diterpenoid izolovaný z rostliny tis (*Taxus brevifolia*) vykazuje schopnost indukce mitotické zástavy s následnou buněčnou smrtí. (Harada et al. 2014)

3.3.5 Vaskulární endoteliální růstový faktor a jeho receptory

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, *angl.* Vascular endothelial growth factor) je vysoce specifickým mitogenem pro vaskulární endoteliální buňky. Jeho isoformami jsou VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a PlGF a vyznačují se různou molekulovou hmotností a biologickými vlastnostmi, jako je například jejich schopnost vázat se na heparansulfát ve formě proteoglykanu exprimovaném na buněčném povrchu. Studie potvrdily, že proangiogenní faktor (VEGF-A), podporující dilataci a propustnost krevních cév, je nadměrně exprimován u mnoha nádorů. VEGF-A účinkuje jako ligand zejména pro dva tyrosinkinázové receptory – receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor VEGFR1 a VEGFR2. Exprese VEGF je potenciována jako odpověď na hypoxii prostřednictvím aktivovaných onkogenů a různých cytokinů. VEGF indukuje proliferaci

endoteliálních buněk, podporuje migraci buněk a inhibuje apoptózu. VEGF je vyjádřen v prostorovém a časovém spojení s fyziologickými událostmi angiogeneze *in vivo*. V podmínkách *in vivo* VEGF indukuje angiogenezi stejně jako permeabilitu cév a hraje centrální roli v regulaci vaskulogeneze. (Neufeld et al. 1999; Roskoski 2007; Lugano et al. 2020)

Neregulovaná exprese VEGF přispívá k rozvoji pevných nádorů podporou nádorové angiogeneze a k etiologii několika dalších onemocnění charakterizovaných abnormální angiogenezí. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že inhibice signalizace VEGF zabraňuje vývoji široké škály nádorů. I přesto, že jsou nádory složeny z nediferencovaných buněk a nevykazují organizovanou strukturu, z hlediska angiogeneze lze na rostoucí nádor pohlížet jako na vyvíjející se nový orgán. (Neufeld et al. 1999; Roskoski 2007)

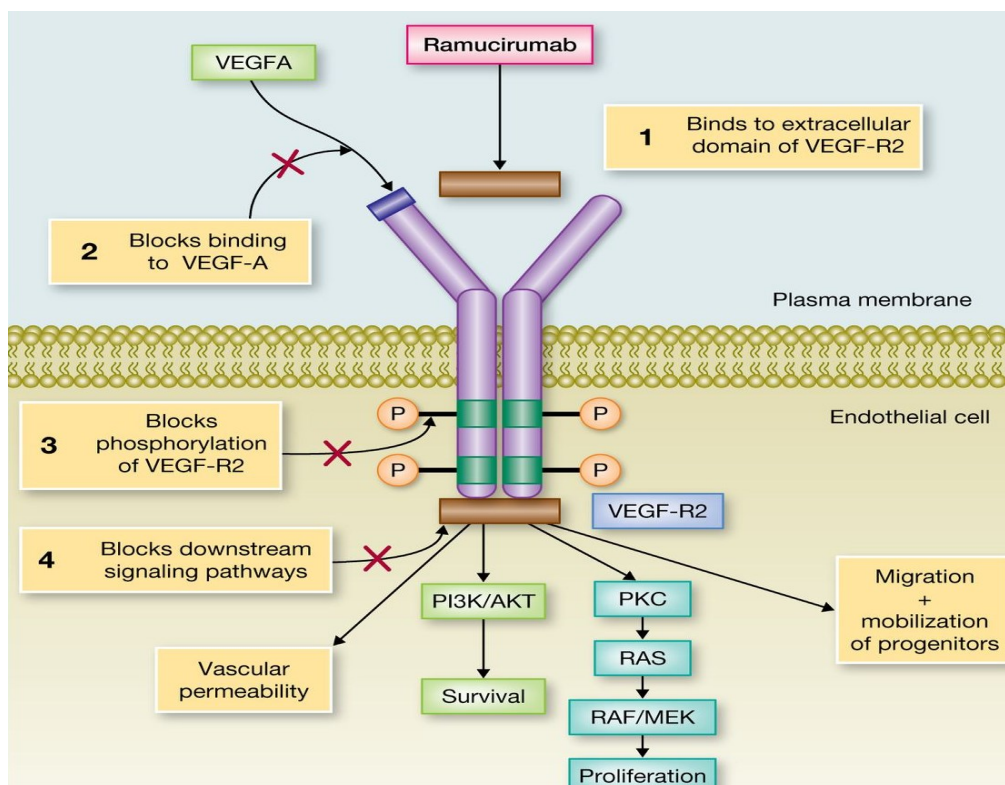
Dodávka živin přenášených krví do nádorových buněk je nezbytná pro jejich přežití stejně tak jako odstraňování zplodin metabolismu. VEGF přispívá k rozvoji nádorů kvůli své schopnosti zvýšit permeabilitu cévy a tím umožňuje šíření nádorových buněk. Indukuje tvorbu fenestrací v cévách a tvorbu organel tvořících kanály, skrze které mohou proteiny přenášené krví extravazovat. Tento proces vede k tvorbě extracelulárního fibrinového gelu, který poskytuje matici podporující růst endotelových buněk a nádorových buněk. Zároveň tato matrice umožňuje invazi stromálních buněk do vyvíjejícího se nádoru. (Neufeld et al. 1999; Lugano et al. 2020)

VEGF v rámci svého účinku tvoří vazby se dvěma tyrosinkinázovými receptory – VEGFR1 (*flt-1*) a VEGFR2 (*KDR/flk-1*), které jsou exprimovány téměř výhradně v endoteliálních buňkách. Tyto receptory se vyznačují přítomností sedmi domén podobných imunoglobulinům v jejich extracelulární části, a proto je lze považovat za podrodinu receptorů s tyrosinkinázovou aktivitou. (Neufeld et al. 1999)

Angiogenní vlastnosti VEGF byly také využívány k indukci *in vivo* angiogeneze pro léčbu nemocí spojených se zhoršeným krevním zásobením. V některých případech byl VEGF dodáván na místa potřeby jako protein, v jiných případech byly použity plazmidy obsahující VEGF cDNA nebo rekombinantní viry jako součást genové terapie. Úspěchy byly zaznamenány při indukci kolatelárních krevních cév u ischemické choroby srdeční (ICHS, *angl.* coronary artery disease) a kritické ischemie končetin. (Neufeld et al. 1999; Lugano et al. 2020)

3.3.5.1 Ramucirumab

Ramucirumab představuje plně lidskou IgG₁ monoklonální protilátku vázající se na extracelulární doménu VEGFR2 s následným snížením permeability, migrace a proliferace endoteliálních buněk. Ramucirumab svou vazbou na VEGFR2 (viz Obr. 5) působí jako antagonist vaskulárního endoteliálního růstového faktoru A (VEGF-A) a také VEGF-C a VEGF-D. Se silnějším přenosem signálu a zodpovědností za velké množství proangiogenních účinků VEGFA se pojí VEGFR2. Díky své vysoké vazebné afinitě umožňuje ramucirumab úplnější blokádu angiogeneze ve srovnání s ostatními cílenými monoklonálními protilátkami. Z farmakokinetických profilů vykazuje eliminaci v závislosti na dávce a nelineární expozici podle saturovatelné clearance. (Singh a Parmar 2015; De Luca et al. 2020)



Obr. 5: Mechanismus účinku ramucirumabu. Ramucirumab se váže specificky na VEGFR2 (část 1), blokuje interakci VEGF-VEGFR2 (část 2) a inhibuje fosforylaci receptoru stimulovanou VEGF v endoteliálních buňkách (část 3), což vede k narušení následné signalizace (část 4). AKT - protein kináza B; MEK - mitogenem aktivovaná protein kináza; PI3K - fosfatidylinositol-3-kináza; PKC - protein kináza C; RAF - zrychlený fibrosarkom; RAS - krysí sarkom. Převzato z :(Javle et al. 2014)

Toto relativně nové cílené léčivo zasahující do dráhy angiogeneze bylo vyvinuto pro nedostatek účinných možností léčby nádoru žaludku. Léčivý přípravek ramucirumab pod

komerčním názvem Cyramza[®], byl schválen FDA v dubnu roku 2014 jako první povolený lék pro terapii druhé linie pacientů s pokročilým karcinomem žaludku nebo adenokarcinomem gastroesofageálního spojení. Držitelem rozhodnutí o registraci léčivého přípravku Cyramza[®] je nizozemská firma Eli Lilly a na trh dodává tento přípravek ve velikosti balení 2x10 ml. Jedná se o koncentrát pro infuzní roztok o síle 10 mg/ml. (Singh a Parmar 2015)

Ramucirumab je schválen k terapii výše uvedeného onemocnění jak v monoterapii, tak v kombinaci s paclitaxelem u pacientů s progredujícím onemocněním nebo po předchozí chemoterapii fluoropyrimidinem nebo platinou. Následně FDA rozšířila schválení použití na nemalobuněčný karcinom plic (v kombinaci s docetaxelem) a také kolorektální karcinom. Pro léčbu pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem s progresí onemocnění během předchozí léčby bevacizumabem, oxaliplatinou a fluoropyrimidinem je schválená kombinace ramucirumabu s FOLFIRI (kyselina folinová, fluorouracil a irinotekan). (Singh a Parmar 2015)

Na základě výsledků randomizovaných studií byl také ramucirumab schválen FDA v květnu roku 2019 pro terapii hepatocelulárního karcinomu. Jedná se o léčivo druhé volby u pacientů s pokročilým nebo neresekovatelným hepatocelulárním karcinomem. Tato monoterapie je určena pro pacienty dříve léčené sorafenibem a zároveň ty, jejichž hodnota sérového alfa – fetoproteinu je ≥ 400 ng/ml. Doporučené dávkování ramucirumabu bylo stanoveno na 8 mg/kg každé dva týdny podávané 60 minut intravenózní infuzí. Léková evropská agentura EMA (*angl.* European Medicines Agency) v návaznosti na schválení přípravku FDA také povolila použití ramucirumabu v terapii následujících onemocnění: karcinomu žaludku, metastatického kolorektálního karcinomu, nemalobuněčného karcinomu plic a hepatocelulárního karcinomu. (Singh a Parmar 2015; European Medicines Agency 2019; De Luca et al. 2020)

Léčba touto monoklonální protilátkou by měla probíhat až do progresu onemocnění anebo být ukončena, pokud dojde k nepřijatelné toxicitě. Pacienti musí být před podáním intravenózní infuze ramucirumabu premedikováni intravenózně podaným antagonistou histaminu H₁ jako např. difenhydraminem. Zároveň, pokud se u pacientů objevila infuzní reakce musí být ještě k této premedikaci přidán dexamethason. (Singh a Parmar 2015)

Podávání ramucirumabu těhotným ženám není vhodné, lze předpokládat poškození plodu. FDA zařadilo toto léčivo do kategorie C pro užití v těhotenství. U kojících žen se také jeho podání nedoporučuje, protože se jedná o IgG₁ monoklonální protilátku a

předpokládá se její průnik do mateřského mléka. Je třeba zvážit poměr přínosu a rizika, a tudíž buď vysadit léčivo nebo přerušit kojení. (Singh a Parmar 2015)

Hlavními nežádoucími účinky, které byly po podání ramucirumabu pozorovány, jsou hypertenze, průjem, infuzní reakce, epistaxe, tromboembolické příhody arteriální i žilní, gastrointestinální krvácení, proteinurie a komplikace hojení ran. Špatné hojení ran vychází z fyziologické úlohy VEGF, který zprostředkovává tři účinky na hojení ran. Způsobuje vasodilataci pro snadnější dodávku živin a odstranění odpadu, má vliv na zvýšenou vaskulární permeabilitu pro extravazaci fibrinogenu a plazminogenu (poskytující substrát pro růst tkáně). Dále také ovlivňuje angiogenezi pro tvorbu a remodelaci tkáně. Pokud ovšem probíhá léčba antagonistou VEGFR2 ramucirumabem, jsou tyto procesy blokovány a dochází ke zhoršenému hojení ran. (Singh a Parmar 2015; Arnold et al. 2017)

3.4 Radiodiagnostika

3.4.1 Technecium-99m

V nukleární medicíně se pro diagnostické zobrazování nejčastěji využívá radionuklid technecium-99m, které je produktem rozpadu mateřského nuklidu molybden-99. Pro detekci onemocnění, studium struktury a funkce orgánů je hojně využíváno radioaktivní technecium díky výhodným fyzikálním vlastnostem. Symbol „m“ za hmotnostním číslem značí, že se jedná o izotop v metastabilním stavu. Jeho jádro vykazuje zvýšený energeticky nestabilní stav, což v případě radioaktivního technecia vede k uvolnění této energie v podobě γ -fotonu. Proces rozpadu označujeme jako izomerní přechod. Technecium-99m nachází své využití právě v nukleární medicíně, díky jeho schopnosti relativně snadné inkorporace do ligandů a proteinů s malou molekulou. Ty se poté injekční cestou aplikují do těla a koncentrují ve specifických tkáních nebo orgánech. Poločas rozpadu izotopu je uváděn na cca 6 hodin s emisí fotonů o energii 140 keV, která je nízká z hlediska radiační zátěže pacienta ale stále dostatečná pro diagnostické zobrazování vyšetřované tkáně. Metastabilní technecium se rozpadá na další dceřiný prvek technecium-99, který je též nestabilní a podléhá následné radioaktivní přeměně, nicméně fyzikální poločas této přeměny je cca 214 000 let. Gama záření uvolněné při radioaktivní přeměně metastabilního technecia je měřené pomocí scintilačních detektorů v přístrojích označovaných jako gama kamery. Na základě dat shromážděných pomocí

kamery dochází k jejich analýze a tvorbě detailních strukturálních a funkčních obrazů zobrazované tkáně. (National Research Council 2009; Raposio et al. 2019)

Uran vyskytující se v přírodě je reprezentován izotopem uranu-235 cca $w\% = 0,7$ a uranu-238 cca $w\% = 99,3$ společně s malým množstvím dalších izotopů uranu (např. uranu-234). Proces, který je využíván ke zvýšení koncentrace izotopu uranu-235 v porovnání s uranu-238 se nazývá jako tzv. obohacování. V literatuře se v souvislosti s touto tematikou setkáváme se dvěma zkratkami – HEU (vysoce obohacený uran, *angl.* highly enriched uranium) a LEU (nízko obohacený uran, *angl.* low enriched uranium). Jako HEU je definován uran obohacený na koncentrace rovné nebo vyšší 20% hmotnosti v uranu-235. Naopak LEU představuje uran, který je obohacený na koncentrace nižší než 20% hmotnosti v uranu-235. Celkem byly vyvinuty tři procesy obohacování, z nichž komerčně jsou využívány pouze dva. Starší proces byl vyvinut během druhé světové války a dodnes se používá v USA. Jedná se o proces plynné difúze, který je ale méně účinný (méně efektivnější) než druhý typ procesu obohacování uranu, tj. procesu odstředění plynu využívaný v Evropě a Rusku. Třetí proces obohacování laserem se komerčně nevyužívá. Pro výzkumné a komerční jaderné reaktory je obohacený uran využíván jako palivo a obyčejná voda jako chladiivo a také jako moderátor pro lehkovodní reaktory (LWR, *angl.* light water reactor). Tyto reaktory většinou využívají palivo LEU, které je obohacené o uranu-235 asi až do $w\% = 5$. Lehkovodní reaktory našly využití v komerční sféře, kdy představují produkci přibližně 16 % světové elektrické energie. (National Research Council 2009; Raposio et al. 2019)

Výroba technecia-99m probíhá vícestupňovým procesem. Nejprve dochází k ozařování uranu-235 obsaženého v HEU nebo v LEU pomocí neutronů v jaderném reaktoru s vyvoláním jeho následného štěpení. Tím dochází k produkci radioaktivního molybden-99 a vedle toho mnoha dalších štěpných produktů, včetně jodu-131 a xenonu-133. Další krok je charakterizován chemickým zpracováním s cílem oddělení molybden-99 od ostatních štěpných produktů. Tyto další štěpné produkty je možné regenerovat samostatně v případě potřeby. Oddělený mateřský prvek molybden-99 je součástí roztoku a je následně adsorbován na sloupec oxidu hlinitého, který je obsažen ve válcích o průměru asi velké tužky. Distribuce sloupců s mateřským molybdenem-99 do nemocnic nebo výzkumných center probíhá v kazetách známých pod názvem „generátory technecia“, které jsou tvořeny olověným obalem pro ochranu před emitovaným radioaktivním zářením. V generátorech se molybden-99 s fyzikálním poločasem 66 hodin

rozpadá na technecium-99m. Toto radioaktivní technecium se z generátoru získá pomocí procesu eluce většinou fyziologickým roztokem. Elucí rozumíme získání radioaktivního technecia průchodem solného roztoku přes kolonu s oxidem hlinitým v generátoru. Fyziologický roztok ponechá na místě na adsorbent silně vázaný molybden-99, ale slaběji vázaný dceřiný prvek technecia se vymyje s roztokem. Generátor technecia lze eluovat několikrát denně po dobu asi jednoho týdne, než je potřeba jej vyměnit za nový generátor z důvodu poklesu aktivity pod hodnotu, která je ještě vhodná pro přípravu radiofarmaka k radiodiagnostickému měření. Aby byla zajištěna nepřetržitá dostupnost generátoru ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$, musí být tento proces výroby generátoru zahrnující štěpení uranu opakován jednou týdně nebo i častěji. Mateřský prvek molybden-99 nemůže být kvůli jeho relativně krátkému fyzikálnímu poločasu přeměny skladován pro pozdější použití, a proto musí být procesy výroby generátorů ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a jejich dodávání na místa potřeby přesně časově naplánovány. Jakýkoliv výpadek ve výrobě, přípravě nebo dodávce by mohl mít špatný dopad na plánovaný harmonogram vyšetření pacientů. (National Research Council 2009; Pillai a Knapp 2012; Raposio et al. 2019)

3.4.2 Rhenium-186 a rhenium-188

Pro cílenou nádorovou radioterapii jsou užitečné dva radionuklidy rhenia – rhenium-186 a rhenium-188. Metody značení protilátek a peptidů pomocí radionuklidů rhenia byly vyvinuty z technik, které se používají pro značení technecia-99m v důsledku podobných chemických vlastností těchto prvků. Oba tyto radionuklidy mohou být vyrobeny bez přidaného nosiče. Hlavní výhodou rhenia-188 je, že se vyrábí pomocí generátorového systému $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ s vysokou specifickou aktivitou a ve vysoké čistotě. Naproti tomu se rhenium-186 vyrábí v reaktoru s nízkou specifickou aktivitou, ale v současné době jsou zkoumány možnosti jeho výroby v cyklotronu. (Reilly 2010; Lepareur et al. 2019)

Rhenium-188 je jedním z nejdostupnějších radionuklidů a využívá se k přípravě radiofarmak určených k terapii kostních metastáz, revmatoidní artritidy a primárních nádorů. Jeho poločas rozpadu je ale relativně krátký – 17 hodin, a proto může omezit proveditelnost značení IgG mAb pro radioterapeutické aplikace z důvodu jejich pomalé absorpce nádorem a clearance z krve a normálních tkání. V porovnání s rheniem-186 poskytuje trojnásobně delší dosah v tkáních, tudíž je užitečnější pro léčbu větších nádorů. Naopak rhenium-186 se rozpadá s fyzikálním poločasem přeměny 3,7 dne. Oba

radionuklidy rhenia vyzařují β^- - a také emitují γ -záření, čehož se využívá pro zobrazování. (Reilly 2010; Pillai et al. 2012; Lepareur et al. 2019)

3.4.3 Radionuklidy india

Indium-111 představuje radionuklid, který emituje γ -záření a jeho fyzikálního poločasu přeměny 67 hodin se běžně využívá pro SPECT zobrazování nádorů u značených mAb a peptidů. Tyto molekuly jsou značeny indiem-111 zavedením chelátoru DTPA prostřednictvím reakce na ϵ -amino skupinách lysinových zbytků nebo na N-koncovém aminu biomolekuly s reaktivními formami DTPA. Dalším radionuklidem india je emitor pozitronu indium-110m s poločasem přeměny 69 minut, který se využívá pro značení peptidů a k následnému PET zobrazení. Indium-114m a jeho dceřiný produkt indium-114 mají potenciál využití v cílené protinádorové terapii. Indium-114m se rozpadá s poločasem 49,5 dne na indium-114 a emituje přitom γ -záření. Následně se indium-114 rozpadá na kadmium-114 (0,5%) a cín-114 (99,5%) s poločasem 72 sekund emitující β^- -částice užitečné pro léčbu nádorů. (Reilly 2010; Nalla et al. 2011)

3.4.4 Radionuklidy galia

Galium-67 jako produkt cyklotronu s fyzikálním poločasem přeměny 78,2 hodin je už řadu let využíván v nukleární medicíně v chemické podobě jako galium-67 citrát pro zobrazování nádorů. Navzdory tomu, nejsou jeho vlastnosti pro zobrazování ideální vzhledem k vysoké energii jeho dvou fotonů, které způsobují problémy ve zobrazování s gama kamerou. Nicméně, pro radioaktivní značení mAb v cílené radioterapii se využívá galium-67 pro své četné emise Augerových elektronů. Velký zájem také vzbudil další radionuklid galium-68, použitý ke značení peptidů a využívaný pro PET zobrazování. Tento radionuklid však nelze použít pro značení mAb a PET zobrazování kvůli zejména zdlouhavé distribuci a eliminaci mAb z krve a normálních tkání, která není v souladu s jeho krátkým fyzikálním poločasem přeměny 68 minut. Galium-68 se vyrábí pomocí generátorového systému $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. (Reilly 2010; Bandara et al. 2016)

3.4.5 Měď a její radionuklidy

Existuje několik radionuklidů mědi, které jsou vhodné pro značení mAb nebo peptidů pro PET zobrazování (např. měď-60, měď-61 nebo měď-64). Měď-64 se rozpadá s poločasem 12,7 hodin třemi různými cestami. Elektronový záchyt emitující Augerovy elektrony (41 %), emise β^+ -částic (19 %) a emise β^- -částic (40 %). Díky emitaci β^- -záření

můžeme radionuklid považovat za atraktivní pro radioterapii nádorů, kromě jeho použití v PET zobrazování. Radionuklid mědi-67 lze použít pro značení mAb a peptidů v cílené radioterapii. Rozpadá se s fyzikálním poločasem 2,6 dne, vyzařuje β^- -částice a jeho produkce je zajištěna pomocí cyklotronu. (Reilly 2010; Bandara et al. 2016)

3.4.6 Lutetium-177

Lutetium-177 představuje radionuklid emitující β^- -záření a pro jeho fyzikální poločas přeměny 6,7 dnů se využívá pro značení monoklonálních protilátek a peptidů v cílené radioterapii.

Lutetium-177 má navíc schopnost emitovat γ -fotony a lze jej tedy využít i pro zobrazování. Tento radionuklid je vyráběn v jaderném reaktoru. (Reilly 2010; Maqsood et al. 2019)

3.4.7 Ostatní radionuklidy využívané v radiodiagnostice

Jak již bylo zmíněno výše, v radiodiagnostice se využívají také radionuklidy yttria (ytrium-86 a ytrium-90). Dále do této skupiny řadíme radionuklidy olova-212, bismutu-212 a actinia-225, které mají své využití v cílené terapii. Olovo-212 emituje α -částice a rozpadá se na bismut-212. Radionuklid actinium-225 také vyzařuje α -částice a rozpadá se na řadu dceřiných radionuklidů, které jsou α -emitory (francium-201, astat-217, bismut-213) nebo β^- -zářiče (polonium-213, thallium-209, olovo-209, bismut-209). (Reilly 2010; Morgenstern et al. 2018)

4. Cíl práce

Hlavními cíli práce bylo zavést a optimalizovat metodu Arsenazo III pro experimentální stanovení množství konjugovaného chelátoru na monoklonální protilátce cetuximab a tím následně kvantifikovat efektivitu imunokonjugace z hlediska látkového množství přidaného chelatačního činidla do reakce. S těmito hlavními cíli souvisely následující dílčí úkoly:

- a) Připravit imunokonjugáty monoklonální protilátky cetuximab s chelatačními činidly DTPA, DOTA a NOTA v poměrech látkových množství 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 a 1:100 (cetuximab:chelátor).
- b) Analyzovat množství konjugovaného chelátoru na molekule cetuximabu pro daný poměr látkových množství metodou Arsenazo III.
- c) Stanovit koncentraci konjugované monoklonální protilátky cetuximab metodou Bradford Protein Assay.
- d) Vyhodnotit získané výsledky pro analýzu optimálního poměru mezi látkovým množstvím chelátoru a látkovým množstvím monoklonální protilátky cetuximab v konjugační reakci na výsledný počet konjugovaných molekul chelátoru na molekule monoklonální protilátky.

5. Experimentální část

5.1 Použité přístroje a software

- Analytické váhy (Sartorius analytic)
- Centrifuga U-32 R (Boeco, Německo)
- Microsoft Office Excel (MS Office 365)
- pH metr (Eutech Instruments pH510)
- Předvážky (Kern PLB 200-3)
- Spektrofotometr TECAN INFINITE M 200 PRO (Rakousko)
- Třepačka (Vortex V1 plus Biosan)

5.2 Použitý materiál

- Centrifugační zkumavka (Vivaspin 6, membrána 50 000Da, Sartorius, UK)
- Magnetické míchadlo (IKA RTC basic)
- Mikrocentrifugační zkumavky 2 ml (Ependorf, Německo)
- Mikropipety (Ependorf Research Plus) o objemech: 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l
- 96 jamkové destičky (TPP, Švýcarsko)

5.3 Použité chemikálie

- Arsenaso III (Sigma Aldrich)
- Bradford Protein Assay (Bio-Rad, USA)
- Cetuximab (Erbitux[®] 5mg/ml, Merck, Německo)
- CH₃COONa (Sigma Aldrich)
- Coper Standard for AAS (Sigma Aldrich)
- C₂H₃NaO₂ (0,15M, Sigma Aldrich)
- DOTA (Macrocyclics, Inc., Texas, USA)
- DTPA (Macrocyclics, Inc., Texas, USA)
- γ – imunoglobuliny z bovinní krve (Sigma Aldrich)
- HCl (0,1M, Penta, Česká republika)
- Chelex 100 sodium form (Sigma Aldrich)
- KCl (Penta, Česká republika)
- NaCl (Penta, Česká republika)

- NaHCO₃ (0,1M; Penta, Česká republika)
- Na₂HPO₄ · 12H₂O (Penta, Česká republika)
- NaH₂PO₄ · 2H₂O (Penta, Česká republika)
- NaOH (1M; Penta, Česká republika)
- NOTA (Macrocyclics, Inc., Texas, USA)

5.4 Pracovní postup

5.4.1 Příprava fosfátového pufru (PBS)

PBS pufr, který se využívá k udržení konstantního pH v oblasti neutrální, popř. lehce zásadité, byl připraven pro experimentální část v objemu 1000 ml. K přípravě fosfátového pufru bylo na výše uvedený finální objem naváženo 1,56 g Na₂HPO₄, 8,01 g NaCl a následně rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. Další část roztoku byla připravena navážením 0,21 g KCl a 3,58 g NaH₂PO₄ do 200 ml destilované vody. Obě části byly smíchány a doplněny do celkového objemu 1000 ml destilovanou vodou. U připravené roztoku bylo přidavky roztoku NaOH (1 M) upraveno pH na hodnotu 7,4 za současné kontroly pH metrem. Do takto připraveného fosfátového pufru byl přidán Chelex pro odstranění přítomných iontů kovu a roztok byl uchováván v lednici.

5.4.2 Příprava konjugačního pufru NaHCO₃ (0,1 M) a roztoku octanu sodného (0,15 M)

Na přípravu konjugačního roztoku NaHCO₃ o molární koncentraci 0,1 M bylo naváženo 0,84 g NaHCO₃ do 100 ml destilované vody (bez přítomnosti iontu kovů). Po rozpuštění bylo změřeno pH roztoku a upraveno na hodnotu 9 pomocí NaOH (1 M) také bez přítomnosti iontů kovů.

Roztok 0,15 M octanu sodného (CH₃COONa) o pH = 7 byl připraven navážením 1,23 g bezvodého octanu sodného a jeho rozpuštěním ve 100 ml destilované vody. U připraveného roztoku bylo upraveno pH pomocí NaOH (1 M) a následovalo přidání Chelexu pro odstranění přítomných iontů kovu. Roztok byl uchováván v lednici.

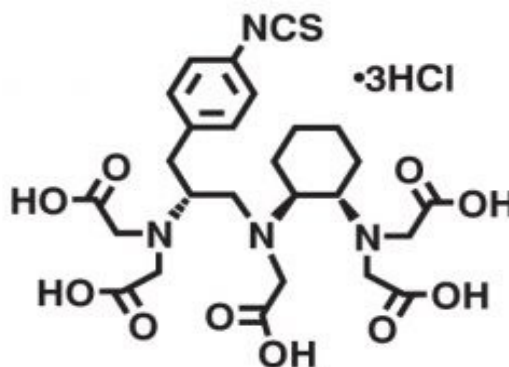
5.4.3 Konjugace monoklonální protilátky cetuximab vybranými chelatačními činidly

Zásobní roztok monoklonální protilátky cetuximab byl nejprve přečištěn z prostředí infuzního roztoku do konjugačního pufru NaHCO₃ (0,1 M, bez přítomnosti iontů kovu)

pomocí centrifugační zkušavky s filtrační membránou (15 ml, MW = 50 000 Da, Sartorius). Promytí monoklonální protilátky proběhlo celkem třikrát v objemu 6 ml konjugačního pufru, kdy stočení na centrifuze proběhlo po dobu 10 minut při maximálních otáčkách 10 000 RPM. Po skončení promývání byl odpipetován zbývající objem konjugačního roztoku s protilátkou do mikrozkušavky.

Následovalo stanovení koncentrace přečištěné protilátky pomocí metody Bradford Protein Assay a připravily se alikvótní části s protilátkou, které se konjugovaly s příslušným množstvím vybraných bifunkčních chelátorů DTPA ((R)-2-amino-3-(4-isothiokyanatofenyl)propyl-trans-(S,S)-cyklohexan-1,2-diamin-pentaoctová kyselina, MW = 704 g/mol) (viz Obr. 6), DOTA (S-2-(4-isothiokyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododekan tetraoctová kyselina, MW = 687,8 g/mol) (viz Obr. 7) a NOTA (2-S-(4-isothiokyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina, MW = 559,9 g/mol) (viz Obr. 8) v následujících poměrech látkových množství: 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 a 1:100 (mAb:BFC) v celkovém objemu 100 μ l. Konjugace probíhala při 37 $^{\circ}$ C za stálého míchání pomocí magnetického míchadla po dobu 2,5 hodin v temnu. Pro každý chelátor se provedly tři nezávislé konjugace pro daný poměr látkových množství.

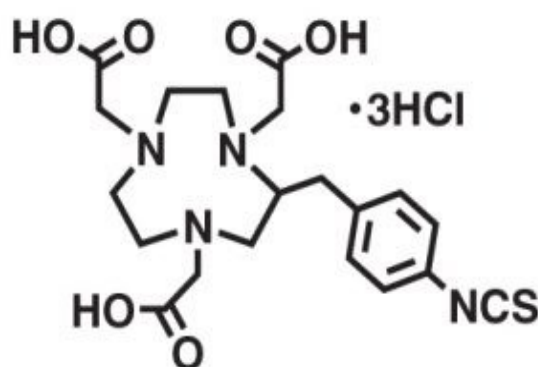
Po ukončení konjugace byly obsahy mikrozkušavek obsahující směs konjugovaná protilátka a vázaný/volný chelátor promyty do roztoku PBS za použití centrifugační zkušavky s filtrační membránou (MW = 50 000 Da). Promytí bylo provedeno vždy třikrát v objemu 6 ml roztoku PBS (bez přítomnosti iontů kovů) a centrifugace probíhala po dobu 10 minut při 10 000 RPM. Po skončení promývání byl nad filtrační membránou zbývající roztok obsahující konjugovanou protilátku odpipetován do mikrozkušavky. Obsah mikrozkušavek byl analyzován na množství monoklonální protilátky pomocí metody Bradford Protein Assay a množství konjugovaného chelátoru pomocí metody Arsenazo III.



Obr. 6: Molekula DTPA. Převzato z: (Macrocyclics 2021b)



Obr. 7: Molekula DOTA. Převzato z: (Macrocyclics 2021a)



Obr. 8: Molekula NOTA. Převzato z: (Macrocyclics 2021c)

5.4.4 Metoda Bradford Protein Assay pro stanovení množství proteinu

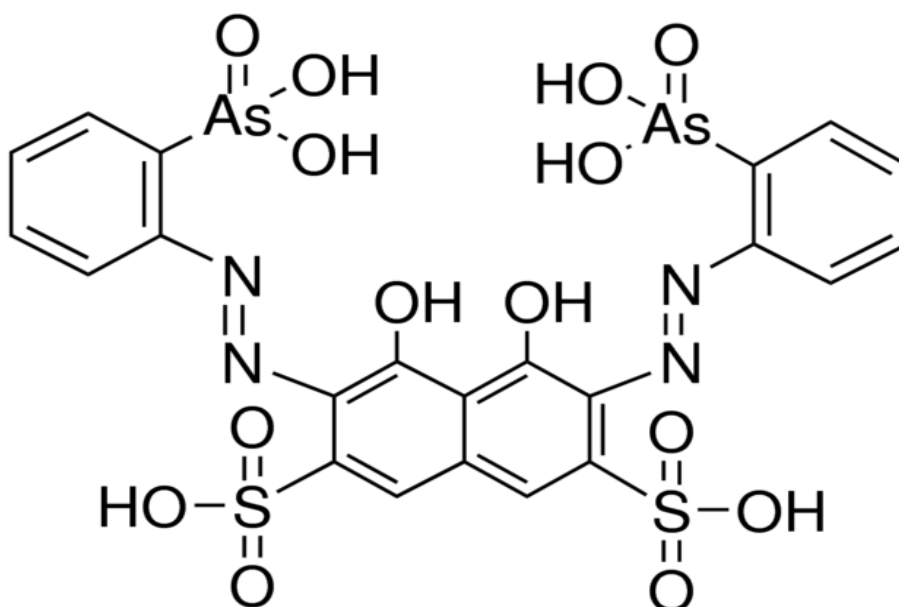
Metoda Bradford Protein Assay je vhodná pro stanovení i velmi nízkých koncentrací proteinů, jako jsou imunoglobuliny. Tato metoda byla proto použita i pro stanovení koncentrace konjugované monoklonální protilátky cetuximab, jelikož její koncentrace použitá pro konjugaci byla vždy kolem 200 μg .

Pro vlastní stanovení koncentrace konjugované protilátky se připravila kalibrační řada standardů bovinního gama globulinu o následujících koncentracích: 0, 25, 50, 100, 125, 250, 500, 750 a 1000 $\mu\text{g/ml}$. Standardy se následně v duplikátech pipetovaly do jamek 96jamkové mikrotitrační destičky v objemu 5 μl vzorku standardu na jamku. Stejným způsobem, tj. 5 μl vzorku na jamku a v duplikátech, se pipetovaly vzorky nekonjugované (po úvodním přečištění z infuzního roztoku) a konjugované protilátky pro všechny testované chelátory DTPA, DOTA a NOTA a zvolené poměry látkových množství. Následovalo přidání 250 μl Bradfordova činidla a provedla se inkubace po dobu 20 minut při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$.

Po inkubaci následovalo měření na spektrofotometru (TECAN) při vlnové délce 595 nm. Naměřená data byla analyzována v programu MS Office Excel.

5.4.5 Metoda Arsenazo III pro stanovení množství konjugovaného chelátoru na molekule protilátky

Metoda Arsenazo III byla použita pro stanovení množství vázaného, tj. konjugovaného, chelatačního činidla na molekule protilátky. Arsenazo III je zkratkou pro sodnou sůl 3,6-bis((E)-(2-Arsonofenyl)diazenyl)-4,5-dihydroxynaftalen-2,7-disulfonové kyseliny (viz Obr. 9).



Obr. 9: Molekula Arsenazo III. Převzato z: (Sigma Aldrich 2021)

Pro stanovení koncentrace chelátoru byla připravena kalibrační řada standardů chelátorů DTPA, DOTA a NOTA v následujících koncentracích: 0, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 μM v roztoku PBS.

Standardy byly v množství 10 μl /jamku pipetovány v triplikátech na 96jamkovou mikrotitrační destičku. Stejným způsobem, tj. 10 μl /jamku a v triplikátech, byly do jamek 96jamkové mikrotitrační destičky pipetovány vzorky konjugované monoklonální protilátky pro každý chelátor a každý poměr mAb:chelátor.

Dále byl připraven 40 μM roztok Arsenazo III v takovém objemu, aby se do každé jamky přidalo 190 μl tohoto roztoku. Navážené množství Arsenazo III bylo rozpuštěno v roztoku 0,15 M octanu sodného (pH = 7) a těsně před jeho pipetováním ke vzorkům a

standardům se do něho přidal roztok měděných iontů dle následujícího poměru: 1 ml roztoku Arsenazo III (40 μ M) + 2 μ l měděných iontů.

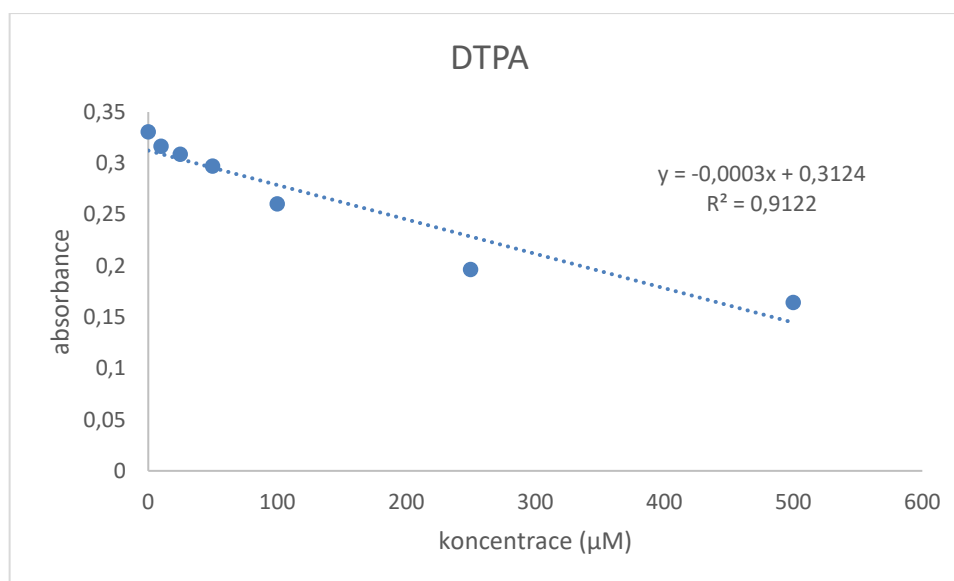
Výše připravený roztok se ihned pipetoval do jamek ke vzorkům a standardům v množství 190 μ l/jamku. Následovala inkubace za kontinuálního třepání po dobu 30 minut při 37 °C. Po ukončení inkubace se provedlo měření na spektrofotometru (TECAN) při vlnové délce 630 nm. Metoda Arsenazo III je založena na změně zbarvení v důsledku přítomnosti iontů mědi v roztoku. Jsou-li v roztoku ionty mědi, které mohou interagovat s Arsenazo III, roztok je modrý. V případě vychytání mědi pomocí přítomných chelátorů nedochází k reakci s Arsenazo III a roztok má barvu růžovou. (Janoušek 2019)

Změřená data se vyhodnotila v programu MS Office Excel, kdy se množství vázaného chelátoru. tj. počtu jeho molekul, přepočítlo na molekulu konjugované protilátky ve vzorku stanovené metodou Bradford Protein Assay.

6. Výsledky

6.1 Stanovení množství chelátoru DTPA konjugovaného na molekule monoklonální protilátky cetuximab

Bifunkční chelatační činidlo DTPA bylo konjugováno s monoklonální protilátkou cetuximab v různých poměrech látkových množství. Pomocí metody Bradford Protein Assay byla stanovena koncentrace monoklonální protilátky cetuximab v jednotlivých vzorcích a ve stejných vzorcích pak bylo stanoveno konečné množství DTPA vázaného na monoklonální protilátku metodou Arsenazo III. Koncentrace vázaného chelátoru se určila díky kalibrační křivce závislosti absorbance na koncentraci standardních roztoků DTPA. Z lineární závislosti se vypočetla rovnice přímky lineární závislosti a po dosazení hodnot absorbancí vzorků DTPA-cetuximab za y byla stanovena koncentrace konjugovaného chelátoru DTPA (x). Ilustrativní graf lineární závislosti absorbance na koncentraci pro standardy chelátoru DTPA analyzovaných metodou Arsenazo III je uveden v Obr. 10.



Obr. 10: Ilustrativní graf závislosti absorbance na koncentraci kalibračních roztoků standardů DTPA.

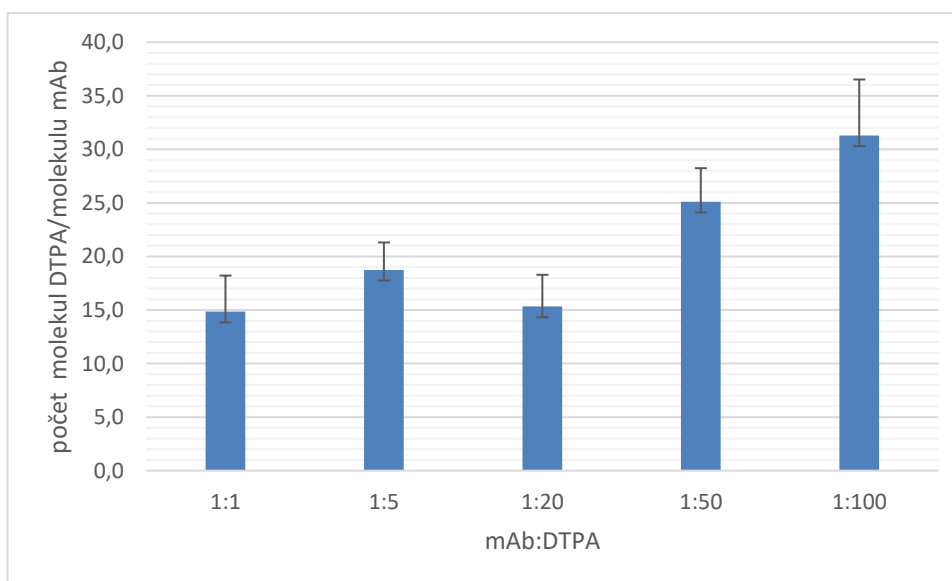
Zjištěná koncentrace chelátoru se přepočítala na změřenou koncentraci monoklonální protilátky. Konjugace byla zopakována pro každý poměr látkových množství třikrát a výsledné množství konjugovaného chelátoru je potom jejich průměrem s vypočítanou hodnotou směrodatné odchylky. Výsledky tří nezávislých měření jsou shrnuty v Tab. 2

s uvedením směrodatné odchylky. Data uvedená v Tab. 2 jsou graficky zpracována do sloupcového grafu v Obr. 11.

V Tab. 2 jsou uvedena pro poměry látkových množství 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 a 1:100 (mAb:DTPA) následující konjugovaná množství molekul chelátoru na jedné molekule protilátky: 14,8, 18,7, 15,3, 25,1 a 31,3.

Tab 2: Tabulka s výsledky měření množství konjugovaného chelátoru na molekule monoklonální protilátky cetuximab pro zvolené konjugační poměry látkových množství DTPA a mAb. Byla provedena tři nezávislá měření s uvedením průměru z těchto měření a směrodatné odchylky od tohoto průměru.

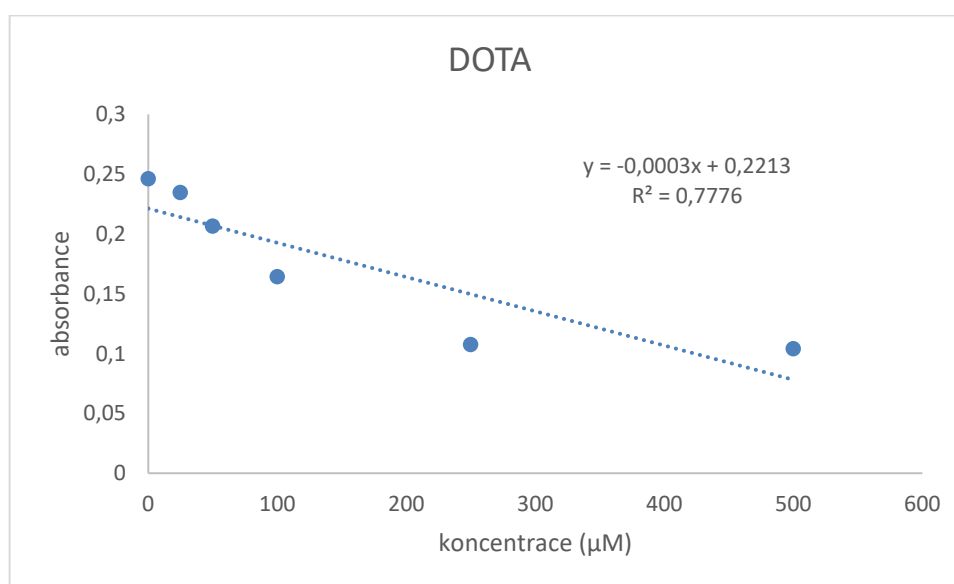
mAb:DTPA	1:1	1:5	1:20	1:50	1:100
1. měření	16,5	15,8	12,6	21,6	25,3
2. měření	17,1	19,8	14,8	26,0	33,8
3. měření	11,0	20,6	18,5	27,7	34,8
průměr	14,8	18,7	15,3	25,1	31,3
SD	3,4	2,6	3,0	3,1	5,2



Obr. 11: Sloupcový graf s výsledky měření množství konjugovaného chelátoru na molekule monoklonální protilátky cetuximab pro zvolené konjugační poměry látkových množství DTPA a mAb. Graf zobrazuje průměry ze tří nezávislých měření s uvedením směrodatné odchylky v podobě chybové úsečky.

6.2 Stanovení množství chelátoru DOTA konjugovaného na molekule monoklonální protilátky cetuximab

Bifunkční chelatační činidlo DOTA bylo konjugováno s monoklonální protilátkou cetuximab v různých poměrech látkových množství. Pomocí metody Bradford Protein Assay byla stanovena koncentrace monoklonální protilátky cetuximab v jednotlivých vzorcích a ve stejných vzorcích pak bylo stanoveno konečné množství DOTA vázaného na monoklonální protilátku metodou Arsenazo III. Koncentrace vázaného chelátoru se určila díky kalibrační křivce závislosti absorbance na koncentraci standardních roztoků DOTA. Z lineární závislosti se vypočetla rovnice přímky lineární závislosti a po dosažení hodnot absorbancí vzorků DOTA-cetuximab za y byla stanovena koncentrace konjugovaného chelátoru DOTA (x). Ilustrativní graf lineární závislosti absorbance na koncentraci pro standardy chelátoru DOTA analyzovaných metodou Arsenazo III je uveden v Obr. 12.



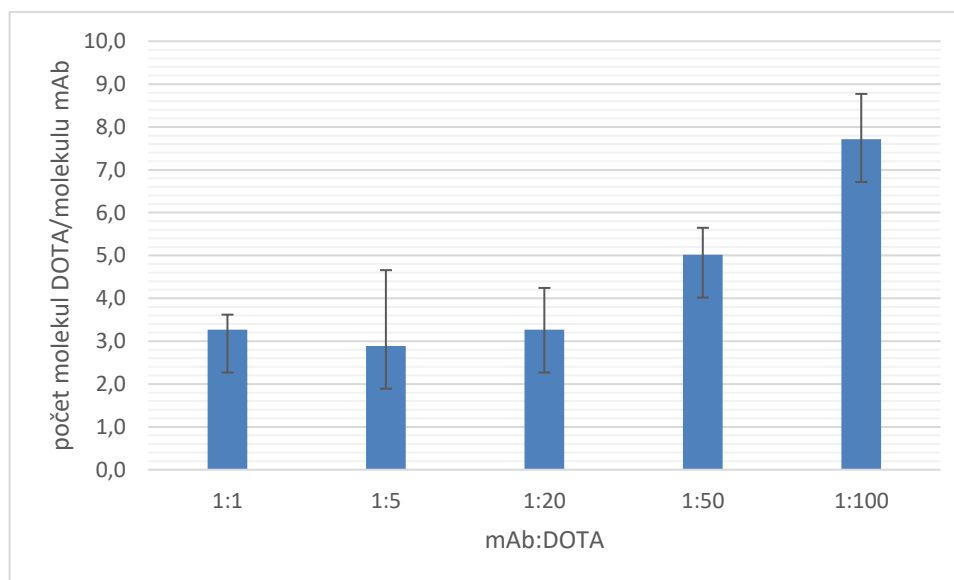
Obr. 12: Ilustrativní graf závislosti absorbance na koncentraci kalibračních roztoků standardů DOTA.

Zjištěná koncentrace chelátoru se přepočítala na stanovenou koncentraci monoklonální protilátky. Konjugace byla zopakována pro každý poměr látkových množství třikrát a výsledné množství konjugovaného chelátoru je potom jejich průměrem s vypočítanou hodnotou směrodatné odchylky. Výsledky tří nezávislých měření jsou shrnuty v Tab. 3 s uvedením směrodatné odchylky. Data uvedená v Tab. 3 jsou graficky zpracována do sloupcového grafu v Obr. 13.

V Tab. 3 jsou uvedena pro poměry látkových množství 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 a 1:100 (mAb:DOTA) následující konjugovaná množství molekul chelátoru na jedné molekule protilátky: 3,3, 2,9, 3,3, 5,0 a 7,7. U prvního opakování měření vzorků DOTA-cetuximab pro poměry 1:1, 1:5 a 1:20 nejsou uvedeny hodnoty množství konjugovaného chelátoru, jelikož byly při vyhodnocení nalezeny nízké hodnoty absorbancí a po výpočtu koncentrace z rovnice kalibrační přímky byly hodnoty záporné.

Tab. 3: Tabulka s výsledky měření množství konjugovaného chelátoru na molekule monoklonální protilátky cetuximab pro zvolené konjugační poměry látkových množství DOTA a mAb. Byla provedena tři nezávislá měření s uvedením průměru z těchto měření a směrodatné odchylky od tohoto průměru. Pro poměry 1:1, 1:5 a 1:20 u prvního opakování měření byla zjištěna záporná hodnota, proto jsou hodnoty nahrazeny symbolem NA a nebyly zahrnuty do výpočtu průměru a SD.

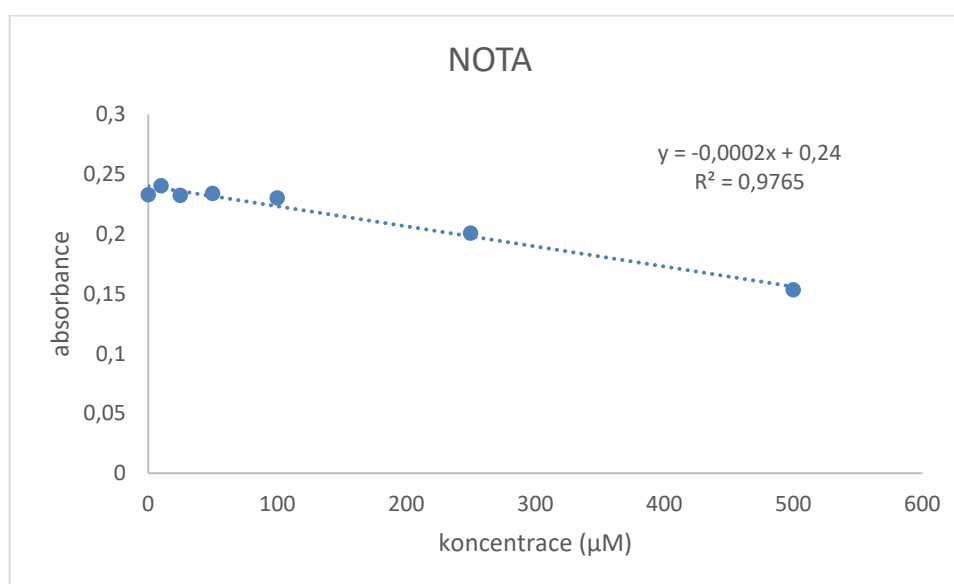
mAb:BFC	1:1	1:5	1:20	1:50	1:100
1. měření	NA	NA	NA	4,2	7,7
2. měření	3,0	1,6	2,6	5,4	8,8
3. měření	3,5	4,1	4,0	4,6	6,7
průměr	3,3	2,9	3,3	5,0	7,7
SD	0,4	1,8	1,0	0,6	1,1



Obr. 13: Sloupcový graf s výsledky měření množství konjugovaného chelátoru na molekule monoklonální protilátky cetuximab pro zvolené konjugační poměry látkových množství DOTA a mAb. Graf zobrazuje průměry ze tří nezávislých měření s uvedením směrodatné odchylky v podobě chybové úsečky.

6.3 Stanovení množství chelátoru NOTA konjugovaného na molekule monoklonální protilátky cetuximab

Bifunkční chelatační činidlo NOTA bylo konjugováno s monoklonální protilátkou cetuximab v různých poměrech látkových množství. Pomocí metody Bradford Protein Assay byla stanovena koncentrace monoklonální protilátky cetuximab v jednotlivých vzorcích a ve stejných vzorcích pak bylo stanoveno konečné množství NOTA vázaného na monoklonální protilátku metodou Arsenazo III. Koncentrace vázaného chelátoru se určila díky kalibrační křivce závislosti absorbance na koncentraci standardních roztoků NOTA. Z lineární závislosti se vypočetla rovnice přímky lineární závislosti a po dosažení hodnot absorbancí vzorků NOTA-cetuximab za y byla stanovena koncentrace konjugovaného chelátoru NOTA (x). Ilustrativní graf lineární závislosti absorbance na koncentraci pro standardy chelátoru NOTA analyzovaných metodou Arsenazo III je uveden v Obr. 14.



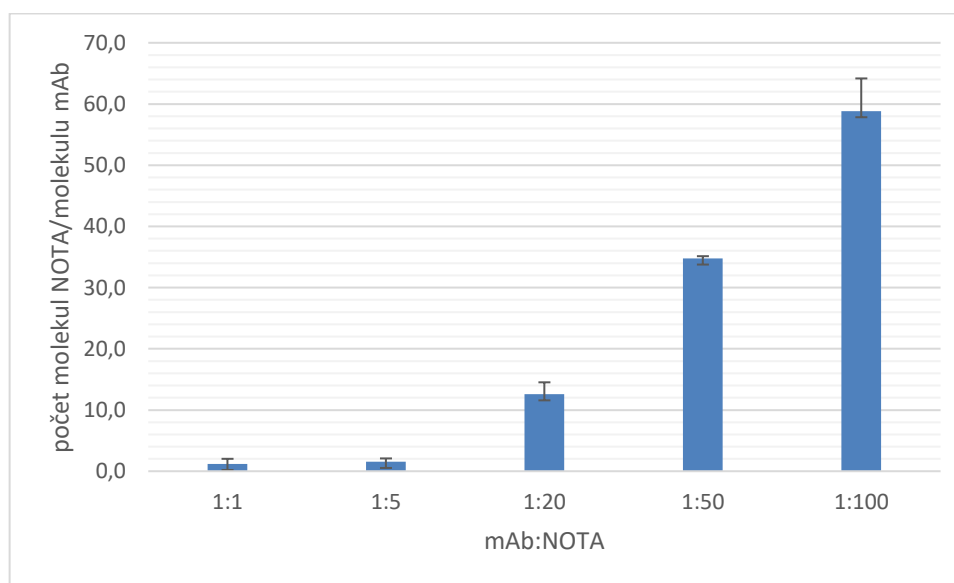
Obr. 14: Ilustrativní graf závislosti absorbance na koncentraci kalibračních roztoků standardů NOTA.

Zjištěná koncentrace chelátoru se přepočítala na analyzovanou koncentraci monoklonální protilátky. Konjugace byla zopakována pro každý poměr látkových množství třikrát a výsledné množství konjugovaného chelátoru je potom jejich průměrem s vypočítanou hodnotou směrodatné odchylky. Výsledky tří nezávislých měření jsou shrnuty v Tab. 4 s uvedením směrodatné odchylky. Data uvedená v Tab. 4 jsou graficky zpracována do sloupcového grafu v Obr. 15.

V Tab. 4 jsou pro poměry látkových množství 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 a 1:100 (mAb:NOTA) následující konjugovaná množství molekul chelátoru na jedné molekule protilátky: 1,2, 1,5, 12,6, 34,8 a 58,8.

Tab. 4: Tabulka s výsledky měření množství konjugovaného chelátoru na molekule monoklonální protilátky cetuximab pro zvolené konjugační poměry látkových množství NOTA a mAb. Byla provedena tři nezávislá měření s uvedením průměru z těchto měření a směrodatné odchylky od tohoto průměru.

mAb:BFC	1:1	1:5	1:20	1:50	1:100
1. měření	0,5	1,0	10,5	34,7	52,7
2. měření	1,0	1,5	14,4	35,2	61,1
3. měření	2,1	2,1	12,9	34,5	62,7
průměr	1,2	1,5	12,6	34,8	58,8
SD	0,8	0,6	1,9	0,4	5,3



Obr. 15: Sloupcový graf s výsledky měření množství konjugovaného chelátoru na molekule monoklonální protilátky cetuximab pro zvolené konjugační poměry látkových množství NOTA a mAb. Graf zobrazuje průměry ze tří nezávislých měření s uvedením směrodatné odchylky v podobě chybové úsečky.

7. Diskuse

Radiofarmaka se stala nedílnou součástí terapie i diagnostiky v oblasti onkologie. Pro vazbu radiokovů k biologickým vektorům, kterými mohou být monoklonální protilátky, peptidy nebo nanočástice, jsou zapotřebí molekuly nazývané jako bifunkční chelatační činidla. Tyto chelátory obsahují ve své struktuře reaktivní funkční skupiny, pomocí nichž dochází ke kovalentní vazbě s cílovým vektorem. Radioaktivní značení těchto radiofarmak obsahujících ve své komplexní struktuře chelátory musí probíhat pro některé radiokovy jako galium-68 nebo zirkonium-89 v přísně nekovových podmínkách, jelikož ionty kovu jako zejména všudypřítomného železa jsou chelátovány přednostněji. Značení monoklonálních protilátek prostřednictvím mechanismu chelatace je vhodnějším způsobem než přímá halogenace (nejčastěji jodace), protože vznikají stabilnější komplexy. (Price a Orvig 2014)

Jako méně výhodnější se jeví také proces značení prostřednictvím přímé vazby techneciem-99m. Tento způsob vazby technecia-99m na monoklonální protilátku její molekulu narušuje v důsledku rozpojení disulfidických můstků a tím vzniku nestability struktury. Naproti tomu chelátory jsou schopné vytvořit stabilní imunokomplexy i při pokojové teplotě konjugací reakce v poměrně rychlém čase. (Sakahara et al. 1993; Reilly 2010)

Značení monoklonálních protilátek však může způsobit ztrátu vazby na jejich cílové ligandy. Na základě této skutečnosti jsou procesy konjugace a radioaktivního značení doprovázeny hodnocením kontroly kvality radiofarmak zahrnující úplnou charakterizaci jejich vlastností. Tato charakterizace zahrnuje testy radiochemické čistoty, testy vazebných schopností radioimunokonjugátů pro specifické cílení antigenu *in vitro*, analýzu možného úbytku radioaktivní ztráty, biologickou distribuci *in vivo*, farmakokinetické, dozimetrické a zobrazovací studie a v neposlední řadě hodnocení homogenity. (Reilly 2010)

Pro stanovení úrovně substituce, tj. počtu molů chelátoru konjugovaných s jedním molekulou biomolekuly, existuje několik analytických metod, včetně námi zvolené spektrofotometrické metody. V této studii použítá chelatační činidla byla analyzována pomocí spektrofotometrického testu, který je založen na tvorbě barevného komplexu s Arsenazo III. Tato metoda je vhodná pro svou jednoduchost provedení a také nenáročnost z hlediska přístrojového vybavení pro analýzu. (Dadachova et al. 1999; Reilly 2010) Další test, který je široce využíván pro hodnocení konjugace je TLC. (Reilly

2004; Reilly 2010) Kromě této metody lze využít také techniku HPLC s detekcí UV záření, popř. elektroforézu na polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným. (Hnatowich et al. 1983) Další metodou, která se řadí mezi standardní techniky pro hodnocení kvality vazby na monoklonální protilátku je ELISA (*angl.* enzyme-linked immunosorbent assay). Postupem času byly zavedeny metody ELISA s některými modifikacemi pro charakterizaci připravovaných imunokonjugátů, jelikož stratifikace chelátorem konjugovaných protilátek od nekonjugovaných umožňuje výběr vhodných kandidátů pro další radioaktivní značení. Vědecká studie autorů Hantash et al. se dokonce zaměřila na modifikaci ELISA pro přípravu vysoce selektivního imunotestu k detekci mAb cetuximabu při nízkých koncentracích v lidském séru. (Hantash et al. 2009) Modifikaci molekul monoklonálních protilátek lze také zkoumat technikou peptidového mapování, která využívá nečinnosti proteázy. Proteázový enzym trypsin neštěpí lysin, který je modifikovaný konjugací, což vede k odlišné peptidové mapě. Následně dochází k porovnání chromatografických profilů peptidových produktů. (Wakankar et al. 2011; Abedi et al. 2019)

Aplikace metody Arsenazo III v námi provedené experimentální práci se osvědčila pro kvantifikaci konjugace protilátky cetuximab vybranými chelátory. Ve třech opakování pro zvolené poměry látkových množství protilátka:chelátor potvrdila tato metoda svou robustnost, což dokládají i hodnoty směrodatných odchylek od průměrné hodnoty počtu navázaných chelátorů na molekule protilátky. Ačkoliv se uspořádání a realizace v této práci provedených experimentů pro ověření metody Arsenazo III může zdát jako velmi časově a na spotřební materiál a použité chemikálie náročná, opak je pravdou. Vlastní aplikace při rutinním měření míry konjugace připravované monoklonální protilátky je pak jenom již zaběhlou záležitostí, která nezabere příliš času a která pomůže k rychlému ověření úspěšnosti konjugace před vlastním procesem radioaktivního značení.

Nejčastějším vhodným místem pro vazbu chelátorů na molekule monoklonální protilátky jsou primární aminoskupiny. Tyto funkční skupiny se nacházejí v molekule protilátky na aminokyselině lysin a také na N-konci protilátky. Nevýhodou této vazby chelátor-lysin nebo chelátor-N-konec může být situace, kdy se aminokyselina lysin nebo N-konec nachází na antigen-vázajícím místě monoklonální protilátky. Vazba chelátoru tak může zhoršit afinitu protilátky k cílovému antigenu, což se projeví i na výsledku zobrazování nebo terapeutického účinku. (Reilly 2010)

Na základě výsledků měření byla vyhodnocena míra vazby vybraných chelátorů na monoklonální protilátce cetuximab. Největší míra konjugace na molekule cetuximabu byla nalezena pro chelátor DTPA, a naopak nejméně se na monoklonální protilátku vázalo bifunkční chelatační činidlo NOTA z hlediska nejnižších konjugačních poměrů, tj. 1:1 a 1:5.

Jako neoptimálnější poměr pro konjugační reakci se jeví v případě DTPA poměr 1:5 (mAb:DTPA), jelikož vyšší poměry mAb:chelátor nejsou úplně vhodné z důvodu rostoucího nebezpečí vazby chelátoru na antigen vázající místo (Fab) monoklonální protilátky. Tímto by mohlo dojít ke zhoršení afinity mAb k cílové struktuře.

Pro chelátor DOTA se ukázal jako optimální poměr 1:50 (mAb:DOTA), protože pro nižší poměry byly naměřeny velmi nízké hodnoty množství konjugovaného chelátoru. Nicméně, z hlediska malého rozdílu v počtu konjugovaných chelátorů u poměrů 1:1, 1:5 a 1:20 v porovnání s poměrem 1:50 jsou pro běžnou praxi vhodné i nižší poměry, jelikož se od sebe výrazně neliší. A nižší poměry látkových množství přidávaného chelátoru DOTA mohou snížit také jeho spotřebu v reakci.

Pro chelátor NOTA byl vyhodnocen jako nejvíce použitelný poměr 1:20 (mAb:NOTA) z důvodu dostatečného množství vázaného chelátoru (12.6 molekul) a tím i snížení rizika vazby chelátoru na molekulu lysin či antigen vázající N-konec protilátky. U vyšších poměrů jako 1:50 a 1:100 (mAb:NOTA) byla zjištěna příliš vysoká míra konjugace, která by tedy mohla zhoršit afinitu cetuximabu k cílové struktuře a navíc by znamenala i vysokou spotřebu chelátoru v konjugační reakci.

Na závěr je nutno podotknout, že námi nalezené hodnoty počtu konjugovaných molekul vybraných chelátorů na molekule protilátky neznamenaají, že každá molekula monoklonální protilátky obsahuje zjištěný počet chelátorů. Vyhodnocený počet konjugovaných molekul chelátoru na monoklonální protilátce je pro tzv. pool směsi molekul protilátky, které jsou i méně a více konjugované, než je zjištěný průměr, anebo jsou zcela nekonjugované. Výsledná hodnota je tedy průměrem pro heterogenní směs molekul protilátky, která byla součástí konjugační reakce. Při hodnocení výsledku úspěšnosti konjugace je tedy nutno počítat s touto skutečností. (Reilly 2010) Z tohoto důvodu se potom může metoda Arsenazo III zdát jako méně přesnou v porovnání s technikou ELISA, která stratifikaci konjugovaných a nekonjugovaných protilátek dokáže. (Hantash et al. 2009) Nicméně, se záměrem pro rychlé otestování úspěšnosti

konjugace a z hlediska nenáročnosti na přístrojové vybavení a experimentální provedení lze metodu Arsenazo III doporučit.

8. Závěr

Stanovené cíle rigorózní práce byly splněny:

- Imunokonjugáty cetuximabu s jednotlivými chelátory DTPA, DOTA a NOTA byly úspěšně připraveny v poměrech látkových množství 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 a 1:100 (cetuximab:chelátor) ve třech opakování pro každý chelátor a zvolený poměr látkových množství. Výjimkou bylo jedno neúspěšné opakování pro imunokonjugát DOTA-cetuximab pro poměry 1:1, 1:5 a 1:20.
- Pomocí metody Bradford Protein Assay byla stanovena koncentrace konjugované protilátky a naměřená data pomocí spektrofotometru byla následně analyzována v programu MS Office Excel.
- Metodou Arsenazo III byla ve třech opakování stanovena koncentrace konjugovaných chelátorů (DTPA, DOTA a NOTA) na molekule protilátky cetuximab s vyhodnocením v programu MS Office Excel. Výsledky byly následně přepočítány na hodnoty koncentrace konjugované protilátky zjištěné v předchozím kroku.
- U chelátoru NOTA byla zjištěna nejvyšší míra konjugace na monoklonální protilátku cetuximab pro poměr 1:100 ze všech ostatních chelátorů. Pro bifunkční chelatační činidlo DTPA byl stanoven jako optimální poměr látkových množství pro konjugační reakci poměr 1:5, naopak pro chelátor DOTA to byl poměr 1:50 a pro chelátor NOTA poměr 1:20 (cetuximab:chelátor).
- Celkově se podařilo implementovat a reprodukovatelně ověřit metodu Arsenazo III pro kvantifikaci úspěšnosti konjugace BFC s monoklonální protilátkou.

9. Literatura

Abedi M, Ahangari Cohan R, Mahboudi F, Shafiee Ardestani M, Davami F. MALDI-MS: a Rapid and Reliable Method for Drug-to-Antibody Ratio Determination of Antibody-Drug Conjugates. *Iran Biomed J.* 2019;23(6):395–403.

de Andrade Carvalho H, Villar RC. Radiotherapy and immune response: the systemic effects of a local treatment. *Clinics.* 2018;73(Suppl 1).

Arnold D, Fuchs CS, Taberero J, Ohtsu A, Zhu AX, Garon EB, et al. Meta-analysis of individual patient safety data from six randomized, placebo-controlled trials with the antiangiogenic VEGFR2-binding monoclonal antibody ramucirumab. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017;28(12):2932–42.

Bandara N, Zheleznyak A, Cherukuri K, Griffith DA, Limberakis C, Tess DA, et al. Evaluation of Cu-64 and Ga-68 Radiolabeled Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists as PET Tracers for Pancreatic β cell Imaging. *Mol Imaging Biol.* 2016;18(1):90–8.

Bárta P. Studium interakce receptorově specifických radiofarmak s biologickým systémem na buněčné úrovni [Disertační práce]. [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové]: Univerzita Karlova v Praze; 2012.

Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci.* 2012;9(3):193–9.

Cihlo J, Lázníček M. Radiolabelled peptides in the diagnosis and therapy of tumours. *Ceska Slov Farm Cas Ceske Farm Spolecnosti Slov Farm Spolecnosti.* 2008;57(2):70–7.

Cwierotka K, Hajdúch M, Trojanec R, Špačková K. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klin Farmakol Farm.* 2004;18:s.165-170.

Dadachova E, Chappell LL, Brechbiel MW. Spectrophotometric method for determination of bifunctional macrocyclic ligands in macrocyclic ligand-protein conjugates. *Nucl Med Biol.* 1999;26(8):977–82.

De León-Rodríguez LM, Kovacs Z. The Synthesis and Chelation Chemistry of DOTA–Peptide Conjugates. *Bioconjug Chem.* 2008;19(2):391–402.

De Luca E, Marino D, Di Maio M. Ramucirumab, A Second-Line Option For Patients With Hepatocellular Carcinoma: A Review Of The Evidence. *Cancer Manag Res.* 2020;12:3721–9.

Grawunder U, Barth S. *Next Generation Antibody Drug Conjugates (ADCs) and Immunotoxins.* Springer; 2017.

Guigay J, Tahara M, Licitra L, Keilholz U, Friesland S, Witzler P, et al. The Evolving Role of Taxanes in Combination With Cetuximab for the Treatment of Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Evidence, Advantages, and Future Directions. *Front Oncol.* 2019;9:668.

Hantash J, Smidt M, Bowsher RR. The development, optimization and validation of an ELISA bioanalytical method for the determination of Cetuximab in human serum. *Anal Methods Adv Methods Appl.* 2009;1(2):144–8.

Harada K, Ferdous T, Kobayashi H, Ueyama Y. Paclitaxel in combination with cetuximab exerts antitumor effect by suppressing NF- κ B activity in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Oncol.* 2014;45(6):2439–45.

Harding J, Burtness B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today Barc Spain* 1998. 2005;41(2):107–27.

Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol.* 2004;5(5):292–302.

Hendrikx JJMA, Haanen JBAG, Voest EE, Schellens JHM, Huitema ADR, Beijnen JH. Fixed Dosing of Monoclonal Antibodies in Oncology. *The Oncologist.* 2017;22(10):1212–21.

Hnatowich DJ, Childs RL, Lanteigne D, Najafi A. The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metallic radionuclides: an improved method. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):147–57.

Chen HHW, Kuo MT. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget.* 2017;8(37):62742–58.

Janoušek J. Studium vlastností radioaktivně značených monoklonálních protilátek pro zobrazování v onkologii [Disertační práce]. [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové]: Univerzita Karlova; 2019.

Javle M, Smyth EC, Chau I. Ramucirumab: Successfully Targeting Angiogenesis in Gastric Cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(23):5875–81.

Jílek P. Základy imunologie. Praha: ve spolupráci se společností Ewopharma; 2008.

Keizer RJ, Huitema ADR, Schellens JHM, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49(8):493–507.

Klener P, Klener P. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Praha: Grada; 2010.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495–7.

Koranda P, Kamínek M, Ptáček J, Mysliveček M, Karhan P, Hušák V, et al. Nukleární medicína. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci; 2014.

Krejsek J, Kopecný O. Klinická imunologie. Hradec Králové: Nucleus HK; 2004.

Lázníček M, Komárek P. Základy radiofarmacie. Praha: Karolinum; 1998.

Lepareur N, Lacœuille F, Bouvry C, Hindré F, Garcion E, Chérel M, et al. Rhenium-188 Labeled Radiopharmaceuticals: Current Clinical Applications in Oncology and Promising Perspectives. *Front Med.* 2019;6.

Liu S. Bifunctional Coupling Agents for Radiolabeling of Biomolecules and Target-Specific Delivery of Metallic Radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(12):1347–70.

Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(9):1745–70.

Maqsood MH, Tameez Ud Din A, Khan AH. Neuroendocrine Tumor Therapy with Lutetium-177: A Literature Review. *Cureus.* 2019;11(1).

Marcus R. Use of ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan in non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol.* 2005;32:36–43.

Mathijssen RHJ, de Jong FA, Loos WJ, van der Bol JM, Verweij J, Sparreboom A. Flat-fixed dosing versus body surface area based dosing of anticancer drugs in adults: does it make a difference? *The Oncologist.* 2007;12(8):913–23.

Michalski JM. New Developments in Radiation Oncology. *Mo Med.* 2015;112(5):354.

Moding EJ, Kastan MB, Kirsch DG. Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(7):526–42.

Morgenstern A, Apostolidis C, Kratochwil C, Sathekge M, Krolicki L, Bruchertseifer F. An Overview of Targeted Alpha Therapy with ^{225}Ac and ^{213}Bi . *Curr Radiopharm.* 2018;11(3):200–8.

Morrison SL, Canfield S, Porter S, Tan LK, Tao MH, Wims LA. Production and characterization of genetically engineered antibody molecules. *Clin Chem.* 1988;34(9):1668–75.

Mould DR, Green B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* 2010;24(1):23–39.

Nalla A, Buch I, Hesse B. Easy and efficient (^{111}In)indium labeling of long-term stored DTPA conjugated protein. *Curr Radiopharm.* 2011;4(1):1–4.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1999;13(1):9–22.

Nový Z. Studium interakcí radionuklidy značených monoklonálních protilátek s receptorem pro epidermální růstový faktor in vitro. [Hradec Králové]: Univerzita Karlova v Praze; 2014.

Pai LH, Pastan I. The use of immunotoxins for cancer therapy. *Eur J Cancer.* 1993;29(11):1606–9.

Pastan I, Willingham MC, FitzGerald DJP. Immunotoxins. *Cell.* 1986;47(5):641–8.

Paterson BM, Donnelly PS. Chapter Five - Macrocyclic Bifunctional Chelators and Conjugation Strategies for Copper-64 Radiopharmaceuticals. In: van Eldik R, Hubbard CD, editoři. *Advances in Inorganic Chemistry*. Academic Press; 2016. s. 223–51. (Insights from Imaging in Bioinorganic Chemistry; roč. 68).

Pillai MRA, Dash A, Knapp FF. Rhenium-188: availability from the (188)W/(188)Re generator and status of current applications. *Curr Radiopharm*. 2012;5(3):228–43.

Pillai MRA, Knapp FFR. Molybdenum-99 production from reactor irradiation of molybdenum targets: a viable strategy for enhanced availability of technetium-99m. *Q J Nucl Med Mol Imaging Off Publ Ital Assoc Nucl Med AIMN Int Assoc Radiopharmacol IAR Sect Soc Of*. 2012;56(4):385–99.

Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*. 2014;43(1):260–90.

Raposio R, Thorogood G, Czerwinski K, Rozenfeld A. Development of LEU-based targets for radiopharmaceutical manufacturing: A review. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med*. 2019;148:225–31.

Reilly R. The immunoreactivity of radiolabeled antibodies--its impact on tumor targeting and strategies for preservation. *Cancer Biother Radiopharm*. 2004;19(6):669–72.

Reilly RM. *Monoclonal Antibody and Peptide - Targeted Radiotherapy of Cancer*. Canada: John Wiley & Sons, Inc.; 2010.

Roskoski R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;62(3):179–213.

Sakahara H, Saga T, Endo K, Hattori N, Hosono M, Kobayashi H, et al. In vivo instability of reduction-mediated ^{99m}Tc-labeled monoclonal antibody. *Nucl Med Biol*. 1993;20(5):617–23.

Singh AD, Parmar S. Ramucirumab (Cyramza): A Breakthrough Treatment for Gastric Cancer. *P T Peer-Rev J Formul Manag*. 2015;40(7):430–68.

Stern M, Herrmann R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;54(1):11–29.

Szkop M, Brygoła K, Janczewska M, Ciach T. A simple time-resolved fluorescence assay for quantitative determination of DOTA chelator. *Anal Biochem.* 2019;584:113384.

Tsionou MI, Knapp CE, Foley CA, Munteanu CR, Cakebread A, Imberti C, et al. Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. *RSC Adv.* 2017;7(78):49586–99.

Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O, Galluzzo S. Cetuximab: from bench to bedside. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(1):80–95.

Vose JM. Bexxar: novel radioimmunotherapy for the treatment of low-grade and transformed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *The Oncologist.* 2004;9(2):160–72.

Wakankar A, Chen Y, Gokarn Y, Jacobson FS. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *mAbs.* 2011;3(2):161–72.

Wang J, Shen W-C, Zaro JL, editoři. *Antibody-Drug Conjugates: The 21st Century Magic Bullets for Cancer.* Springer International Publishing; 2015. (AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series).

Elektronické zdroje

Bultas J. Monoklonální protilátky v kardiologii – téma stále aktuálnější – Aktuality – Články – Remedia – farmakoterapeutický časopis [Internet]. 2015 [citován 23. leden 2021]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Aktuality/Monoklonalni-protilatky-v-kardiologii-tema-stale-aktualnejsi/6-E-1Yd.magarticle.aspx>

Bultas J. Monoklonální protilátky a inhibující oligonukleotidy - téma stále aktuálnější [Internet]. Kapitoly online. 2020 [citován 10. květen 2021]. Dostupné z: <https://kapitoly-online.cz/archiv/clanek/monoklonalni-protilatky-inhibujici-oligonukleotidy-tema-stale-aktualnejsi>

European Medicines Agency. Cyramza [Internet]. European Medicines Agency. 2019 [citován 16. květen 2021]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/cyramza>

Macrocyclics D. p-SCN-Bn-DOTA [Internet]. Macrocyclics. 2021a [citován 1. červen 2021]. Dostupné z: <https://www.macrocyclics.com/online-catalog/bifunctional-chelators-bfcs/p-scn-bn-dota/>

Macrocyclics D. p-SCN-Bn-CHX-A²⁺-DTPA [Internet]. Macrocyclics. 2021b [citován 1. červen 2021]. Dostupné z: <https://www.macrocyclics.com/online-catalog/bifunctional-chelators-bfcs/p-scn-bn-chx-a-dtpa/>

Macrocyclics N. p-SCN-Bn-NOTA [Internet]. Macrocyclics. 2021c [citován 1. červen 2021]. Dostupné z: <https://www.macrocyclics.com/online-catalog/bifunctional-chelators-bfcs/p-scn-bn-nota/>

Melichar B. Cetuximab – Lékové profily – Články – Remedia – farmakoterapeutický časopis [Internet]. 2007 [citován 25. únor 2021]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Cetuximab/6-I-hg.magarticle.aspx>

National Research Council. Molybdenum-99/Technetium-99m Production and Use - Medical Isotope Production without Highly Enriched Uranium - NCBI Bookshelf [Internet]. 2009 [citován 27. únor 2021]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK215133/>

Sigma Aldrich. Arsenazo III [Internet]. 1668-00-4. 2021 [citován 23. květen 2021]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a92775>

Sobotková M, Bartůňková J. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě – 5/2008 – Ročník 2008 – Archiv ročníků – Remedia – farmakoterapeutický časopis. 2008 [citován 26. únor 2020];2008(5). Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/5-2008/Monoklonalni-protilatky-a-dalsi-biologiccka-leciva-uzivana-v-imunosupresivni-lecbe/e-9q-a5-jQ.magarticle.aspx>

Vorlíček J, Hájek R, Adam Z, Pour L, Koptíková J, Šmardová J. Cílená léčba v onkologii – Onkologie – Okruhy témat – Remedia – farmakoterapeutický časopis [Internet]. 2005 [citován 10. leden 2021]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Onkologie/Cilena-lecba-v-onkologii/8-1h-aZ.magarticle.aspx>