

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biofyziky a fyzikální chemie



***In vitro* saturační studie radioaktivně značené
monoklonální protilátky carotuximab**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2023

Anežka Sladká

Čestné prohlášení:

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Anežka Sladká

Poděkování:

V první řadě patří mé poděkování školiteli, Mgr. Pavlu Bártovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, trpělivost, mnoho cenných rad, a za skvělou komunikaci v průběhu zpracovávání diplomové práce. Také děkuji svým blízkým za mnoho podpory, které se mi dostalo v průběhu psaní diplomové práce i během celého studia.

Abstrakt v českém jazyce

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Studentka: Anežka Sladká

Školitel: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Název diplomové práce: *In vitro* saturační studie radioaktivně značené monoklonální protilátky carotuximab

Angiogeneze neboli tvorba nových cév z již existujících je v současné době jedním z procesů, na které cílí onkologická léčba, protože vznik nových cév je podmínkou pro úspěšný růst nádoru a případnou expanzi v organismu v podobě metastáze. Jeden z receptorů, který se účastní signalizace vedoucí k angiogenezi, je endoglin (CD105). Na tento receptor cílí i chimérická monoklonální protilátka carotuximab.

Cílem této diplomové práce bylo provést nepřímé značení monoklonální protilátky carotuximab radionuklidem galium-67 pomocí bifunkčního chelátoru 1-glytaryl-4,7-diacetyl-1,4,7-triazocyclononanu (NODAGA). V rámci procesu konjugace byla provedena optimalizace molárního poměru NODAGA:carotuximab (1:20, 1:50 a 1:100). U připraveného radiofarmaka [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab byla následně zjištěna jeho radiochemická čistota pomocí HPLC s radiometrickou detekcí. Následovaly *in vitro* vazebné experimenty na buněčné kultuře lidských ledvinných nádorových buňkách zahrnující internalizační, saturační a kompetitivní studii. Vyhodnocoval se především kinetický parametr veličiny rovnovážné disociační konstanty (K_D), která vyjadřuje afinitu protilátky k receptoru CD105. Dále byla zjištěna hodnota inhibiční koncentrace (IC_{50}), které také nepřímo určuje afinitu ligandu k receptoru.

Optimalizací molárního poměru chelátoru NODAGA konjugovaného s protilátkou byl zjištěn nejvíce vyhovující poměr 1:20. Výsledky analýzy radiochemické čistoty po následujícím radioaktivním značení potvrdily vhodnost použitého chelátoru a metody konjugace a radioaktivního značení protilátky pro přípravu diagnostického radioimunokonjugátu [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab

v lékopisem požadované čistotě ($\geq 95\%$). Připravené radiofarmakum se následně testovalo v *in vitro* studiích. Při internalizaci byl zjištěn nejvýhodnější čas inkubace (150 až 180 minut) a dále byla zjištěna i nižší míra internalizace ^{67}Ga -značeného carotuximabu, protože na buněčných receptorech zůstala vázaná větší část, než byla internalizována. Z *in vitro* saturační studie byla stanovena rovnovážná disociační konstanta $K_D = 225 (\pm 6,6)$ nM, která je oproti neznačené protilátce výrazně nižší, ale stále významná. V kompetitivní studii byla stanovena hodnota $IC_{50} = 140,4 (\pm 0,4)$ nM, která opět potvrdila významnou afinitu značeného carotuximabu k receptoru CD105.

Závěrem lze shrnout, že se podařilo připravit potenciální diagnostické radiofarmakum [^{67}Ga]Ga-NODAGA-carotuximab, které si sice uchovalo afinitu k cílovému receptoru, ale ta byla ve srovnání s nativní formou protilátky nižší. Potenciálním důvodem tohoto stavu může být zjištěný vyšší počet chelátorů vázaných na protilátku (5,4 molekul NODAGA na molekule carotuximabu). Vazba ^{67}Ga -značené protilátky na CD105 je ale stále dostatečná, a proto by se v další fázi preklinického testování mohlo přistoupit k *in vivo* biodistribučním studiím s myšími xenografty.

Abstrakt v anglickém jazyce

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Student: Anežka Sladká

Supervisor: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Thesis title: In vitro saturation study of radiolabeled monoclonal antibody carotuximab

Angiogenesis, or the formation of new blood vessels from existing ones, is currently one of the processes targeted by cancer therapy, as the formation of new blood vessels is a prerequisite for successful tumor growth and eventual expansion in the body in the form of metastasis. One of the receptors involved in signalling leading to angiogenesis is endoglin (CD105). This receptor is also targeted by the chimeric monoclonal antibody carotuximab.

The aim of this thesis was to perform indirect labelling of the monoclonal antibody carotuximab with the radionuclide gallium-67 using the bifunctional chelator 1,4,7-triazacyclononane,1-glutaric acid-4,7-acetic acid (NODAGA). During the labelling process, the NODAGA:carotuximab molar ratio was optimized (1:20, 1:50 and 1:100). The prepared radiopharmaceutical [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab was subsequently determined for its radiochemical purity by HPLC with radiometric detection. This was followed by *in vitro* binding experiments on human renal tumor cell culture involving internalization, saturation and competition studies. In particular, the kinetic parameter of the equilibrium dissociation constant (K_D), which expresses the affinity of the antibody for the CD105 receptor, was evaluated. Furthermore, the inhibitory concentration (IC_{50}) value was determined, which also indirectly determines the affinity of the ligand for the receptor.

Optimization of the molar ratio of the NODAGA chelator conjugated to the antibody resulted in the most suitable ratio of 1:20. The results of the radiochemical purity analysis followed by radiolabelling confirmed the suitability of the chelator and the method of conjugation and radiolabelling of the antibody for the preparation of the diagnostic radioimmunoconjugate [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab at the pharmacopoeia-required purity ($\geq 95\%$). The prepared radiopharmaceutical was

subsequently tested in *in vitro* studies. The most suitable incubation time (150 to 180 minutes) was found for internalization, and a lower rate of internalization of ^{67}Ga -labeled carotuximab was also observed, because a larger fraction remained bound on the cell receptors than was internalized. From the *in vitro* saturation study, an equilibrium dissociation constant of $K_D = 225 (\pm 6.6)$ nM was determined, which is significantly lower compared to the unlabelled antibody but still significant. In a competitive study, $IC_{50} = 140.4 (\pm 0.4)$ nM was determined, which again confirmed the significant affinity of labelled carotuximab to the CD105 receptor.

In conclusion, we were able to prepare a potential diagnostic radiopharmaceutical [^{67}Ga]Ga-NODAGA-carotuximab, which retained affinity to the target receptor, but it was lower compared to the native form of the antibody. A potential reason for this could be the higher number of chelators bound to the antibody (5.4 NODAGA molecules per molecule of carotuximab). However, the binding of the ^{67}Ga -labelled antibody to CD105 is still sufficient and therefore *in vivo* biodistribution studies with mouse xenografts could be pursued in the next phase of preclinical testing.

Obsah

Abstrakt v českém jazyce.....	4
Abstrakt v anglickém jazyce	6
1 Seznam zkratk:.....	11
2 Úvod.....	14
3 Teoretická část	15
3.1 Imunitní systém.....	15
3.2 Nádorová onemocnění	16
3.3 Terapie nádorových onemocnění	16
3.4 Monoklonální protilátky.....	17
3.4.1 Historie monoklonálních protilátek.....	19
3.4.2 Výroba monoklonálních protilátek	19
3.4.3 Využití a modifikace monoklonálních protilátek	20
3.5 Angiogeneze.....	22
3.5.1 Fyziologická angiogeneze.....	22
3.5.2 Nádorová angiogeneze	24
3.5.3 Angiogenní switch (přepnutí)	24
3.5.4 Protinádorová terapie v prostředí nádorových cév.....	25
3.5.5 Antiangiogenní léčba	26
3.5.6 Angiogeneze a oční onemocnění	26
3.6 TGF- β	27
3.7 Endoglin	28
3.8 Carotuximab.....	30
3.8.1 Mechanismus účinku TRC105.....	31
3.8.2 Preklinické a klinické studie s TRC105	32
3.8.3 Klinická studie s DE122.....	33
3.9 Radionuklidy	33
3.9.1 Radioaktivní přeměna	33
3.9.2 Zdroje radionuklidů.....	35
3.9.3 Experimentálně použitý radionuklid galium-67.....	35
3.10 Radiofarmaka	37
3.11 Zobrazovací metody v nukleární medicíně	39
3.11.1 Scintigrafie	39
3.11.2 Pozitronová emisní tomografie	40
3.11.3 Jednofotonová emisní výpočetní tomografie	40

3.11.4	Hybridní zobrazování.....	40
3.12	Způsoby radioaktivního značení protilátek	41
3.12.1	Přímé značení protilátky jódem	41
3.12.2	Nepřímé značení protilátky	42
3.12.3	Chelátová činidla.....	42
3.13	In vitro vazebné studie.....	44
3.13.1	Saturační studie	44
3.13.2	Internalizace	44
3.13.3	Kompetitivní studie.....	45
3.13.4	Efluxní studie	45
3.13.5	Real-time analýza.....	45
4	Cíl a zadání práce.....	47
5	Experimentální část.....	48
5.1	Použité přístroje a software	48
5.2	Použitý materiál	49
5.3	Použité chemikálie	50
5.4	Použitý biologický materiál	51
5.5	Pracovní postup.....	52
5.5.1	Postup pro přípravu fosfátového pufru	52
5.5.2	Postup pro přípravu glycinového pufru.....	52
5.5.3	Postup pro přípravu Krebs-Ringerova roztoku	52
5.5.4	Postup pro přípravu dezintegračního roztoku	53
5.5.5	Kultivace buněčných linií	53
5.5.6	Konjugace carotuximabu s chelatačním činidlem NODAGA	54
5.5.7	Bradfordova metoda stanovení proteinu	54
5.5.8	BCA Protein Assay.....	55
5.5.9	Stanovení poměru protilátka:chelátor pomocí metody Arsenazo III	55
5.5.10	Značení imunokonjugátu NODAGA-carotuximab pomocí galia-67	56
5.5.11	Stanovení radiochemické čistoty pomocí HPLC	56
5.5.12	Internalizace	56
5.5.13	<i>In vitro</i> saturační studie	58
5.5.14	Kompetitivní studie – stanovení hodnoty IC ₅₀	59
6	Výsledky	60
6.1	Optimalizace počtu molekul chelátoru na molekule protilátky carotuximab ..	60
6.2	Stanovení radiochemické čistoty pomocí HPLC	60

6.3	Internalizační studie s [⁶⁷ Ga]Ga-NODAGA-TRC105	62
6.4	Saturační studie – stanovení disociační konstanty K _D [⁶⁷ Ga]Ga-NODAGA-TRC105.....	63
6.5	Kompetitivní vazebné studie – stanovení IC ₅₀	64
7	Diskuse.....	66
8	Závěr	70
9	Seznam použité literatury:	71

1 Seznam zkratek:

A	aktivita, veličina definující počet rozpadů radionuklidu za sekundu
ADCC	cytotoxicita závislá na protilátkách, <i>anglicky</i> antibody-dependent cellular cytotoxicity
AIDS	poslední stadium onemocnění vznikající po nákaze virem HIV, <i>anglicky</i> acquired immunodeficiency syndrome
ALK	kináza podobná aktivinovému receptoru, také synonymum pro TGFβR1, <i>anglicky</i> activin receptor like kinasa
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace, <i>anglicky</i> age-related macular degeneration
AMK	aminokyselina
ANGPT	angiopoietin
BCA	bicinchonní kyselina
BFC	bifunkční chelátor, <i>anglicky</i> bifunctional chelator
BFCs	bifunkční chelátory, <i>anglicky</i> bifunctional chelators
bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor
B _{max}	hodnota udávající množství receptorů exprimovaných na buňce přepočítaných na množství buněčného proteinu
BMP	kostní růstový faktor, <i>anglicky</i> bone morphogenetic protein
CAF	fibroblasty asociované s kancerogenezí, <i>anglicky</i> cancer associated fibroblast
CD 34, 31	markery na povrchu buněk, <i>anglicky</i> cluster of differentiation 34, 31
CD105	endoglin, <i>anglicky</i> cluster of differentiation 105
CH1-3	domény těžkého řetězce protilátky
CT	výpočetní tomografie, <i>anglicky</i> computed tomography
DE122	carotuximab využívaný u věkem podmíněné makulární degenerace
DFO	chelátor, deferoxamin
DLL-4	delta like ligand
DOTA	chelátor, 1,4,7,10- tetraazacyklododekan- 1,4,7,10- tetraoctová kyselina
ECFC	endoteliální buňky schopné tvořit kolonie, <i>anglicky</i> endothelial colony-forming cells

EDTA	chelátor, kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor, <i>anglicky</i> epidermal growth factor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor, <i>anglicky</i> epidermal growth factor receptor
Fab	vazebný fragment protilátky, <i>anglicky</i> antibody binding fragment
Fc	konstantní část protilátky, <i>anglicky</i> crystallisable fragment
FGF	fibroblastový růstový faktor, <i>anglicky</i> fibroblast growth factor
GDF	růstové a diferenační faktory, <i>anglicky</i> growth and differentiation factors
HAMA	protilátky proti myším protilátkám, <i>anglicky</i> human anti-murine antibodies
HAT	médium obsahující hypoxantin, aminopterin a pyridin
Hepes	kyselina 2-[4-(2 hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová
HGF	hepatický růstový faktor, <i>anglicky</i> hepatic growth factor
HGPRT	enzym hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferáza
IC ₅₀	inhibiční koncentrace standartního ligandu potřebná ke snížení specifické vazby testovaného ligandu o 50%
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
K _D	rovnovážná disociační konstanta
KEP-11	myší model karcinomu prsu
K _{off}	konstanta vyjadřující rychlost disociace
K _{on}	konstanta vyjadřující rychlost asociace
MF	mobilní fáze
MAb	monoklonální protilátka, <i>anglicky</i> monoclonal antibody
MAbs	monoklonální protilátky, <i>anglicky</i> monoclonal antibodies
MMP	enzym matrixmetaloproteináza
MR	magnetická rezonance
MX-DTPA	chelátor, kyselina 2-[[2-[bis(karboxymethyl)amino]-3-(4- isothiokyanatofenyl)propyl]-[2- [bis(karboxymethyl)amino]propyl]amino] octová
NIRF	fluorescenční zobrazování v blízké infračervené oblasti
NO	oxid dusnatý

NODAGA	chelátor, 1-glytaryl-4,7-diacetyl-1,4,7-triazocyklononan
NOTA	chelátor, kyselina 2-[4,7-bis(karboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl] octová
NSB	nespecifická vazba <i>anglicky</i> non-specific binding
PBS	fosfátový pufr
PDGF A, B	destičkový růstový faktor
PET	pozitronová emisní tomografie, <i>anglicky</i> positron emission tomography
PIGF	placentární růstový faktor, <i>anglicky</i> placental growth factor
sEng	rozpuštěný endoglin, <i>anglicky</i> soluble endoglin
solVEGFR	solubilní receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor, <i>anglicky</i> soluble vascular endothelial growth factor receptor
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie, <i>anglicky</i> single photon emission computed tomography
T _{1/2}	doba poločasu rozpadu radionuklidu
TETA	chelátor, N'-[2-(2-aminoethylamino)ethyl]ethan-1,2-diamin
TGFβR	receptor pro ligandy nadrodiny transformačního růstového faktoru beta
TGF-α/β	transformační růstový faktor alfa/beta, <i>anglicky</i> transforming growth factor α/β
TRAP	chelátor, kyselina 3-[[4,7-bis[[2-karboxyethyl(hydroxy)fosforyl]methyl]-1,4,7-triazonan-1-yl]methyl-hydroxyfosforyl]propanová
TRC105	carotuximab testovaný pro onkologické indikace
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor, <i>anglicky</i> vascular endothelial growth factor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor, <i>anglicky</i> vascular endothelial growth factor receptor
YM103	chelátor, maleimidový derivát

2 Úvod

Lidský imunitní systém je zodpovědný za ochranu organismu. Imunitní buňky, jejich produkty a bariéry lidského těla nás chrání před infekcemi a také před nádorovým bujením. Nádorová onemocnění jsou v současné době stále častější. Možnosti léčby jsou široké, zahrnují chirurgické odnětí nádorové tkáně, radioterapii, chemoterapii, imunoterapii, hormonální léčbu, imunomodulační léčbu a cílenou terapii. Mezi cílenou terapii řadíme léčbu monoklonálními protilátkami, která se v současné době dostává do popředí pro možnost cílit na specifické struktury nádorových buněk s nižší pravděpodobností negativního zásahu zdravé tkáně, než je tomu u konvenční onkologické terapie.

Monoklonální protilátky se úspěšně používají v onkologii pro terapeutickou a diagnostickou aplikaci. V terapii se používají buď v nativní formě, nebo jako konjugované protilátky s cytotoxickými molekulami nebo radionuklidy. Konjugovaná monoklonální protilátka zde působí především jako vektor, který transportuje účinnou molekulu do buněk nádoru, kde cytotoxická molekula působí.

V diagnostice onkologických onemocnění se běžně používají radiofarmaka, léčivé přípravky obsahující radionuklid. Radionuklidy jsou nestabilní nuklidy, které se rozpadají a při tom vyzařují radioaktivní záření, které je možné zobrazit pomocí zobrazovacích technik nukleární medicíny, jako je jednofotonová emisní výpočetní tomografie, pozitronová emisní tomografie a scintigrafie.

V současné době se používají i vyvíjí protilátky, které cílí na angiogenezi, tj. novotvorbu cév. Angiogeneze je jeden z klíčových dějů, které se podílí na vzniku nádorů, protože pro přežití a růst nádoru je potřeba, aby vznikaly nové cévy pro jeho zásobování živinami a pro odvod zplodin metabolismu. Obecně je při vývoji protilátek klíčové, aby připravené monoklonální protilátky vykazovaly silnou afinitu k cílové struktuře nejčastěji receptoru. Pro účely preklinického testování *in vitro* byly vyvinuty vazebné studie pro charakterizaci vyvíjených imunopreparátů jako jsou internalizační, saturační, kompetitivní a efluxní studie. Po dosažení slibných výsledků testované monoklonální protilátky se může v rámci preklinického testování přistoupit k testování *in vivo* zahrnujícího biodistribuční studie a vazbu na cílové orgány.

3 Teoretická část

3.1 Imunitní systém

Imunitní systém je zodpovědný za udržení homeostázy organismu, tedy schopnosti organismu zachovat si stabilní vnitřní prostředí. Hlavní funkcí imunitního systému je obrana organismu před patogeny a také před buňkami nádorů, zejména zhoubných. Imunita je zprostředkována buňkami imunitního systému, které se nazývají imunocyty, jejich produkty (zahrnující cytokiny, protilátky a komplement) a také pomocí bariér lidského těla (kůže, sliznice) a některými fyziologickými pochody, jako je například kašel. [1, 2]

Lidský imunitní systém se skládá ze dvou složek – vrozené a adaptivní imunity. Vrozená imunita je vývojově starší a vyskytuje se u většiny organismů včetně rostlin, hub a hmyzu. Vrozená imunita působí nespecificky proti patogenům. Patogen je rozpoznán podle toho, že se biochemicky liší od našeho těla, a následně je zlikvidován. Za vrozenou imunitu jsou zodpovědní makrofágové, dendritické buňky a NK buňky. Tyto buňky jsou schopny rozpoznat patogen nebo nádorovou buňku, následně ji rychle (v rámci hodin) zlikvidují a také vyvolají obrannou reakci – zánět. Adaptivní imunita je vývojově mladší a je přítomna u obratlovců. Adaptivní imunita je schopná rozpoznat konkrétní patogen a následně ho cíleně zlikvidovat. Adaptivní imunita je zprostředkována B- a T-lymfocyty, skládá se z humorální a buněčné imunity. Na rozdíl od vrozené imunity je specifická, což znamená, že po prvním kontaktu s antigenem ho již při příští infekci rozpozná. Reakce adaptivní imunity vzniká pomaleji než u vrozené imunity (5-6 dní až několik týdnů po infekci). B-lymfocyty produkují protilátky (humorální imunita) a T-lymfocyty se dělí na cytotoxické T-lymfocyty likvidující buňky (buněčná imunita) a pomocné T-lymfocyty, které optimalizují odpověď B-lymfocytů. V případě, že imunitní systém nefunguje správně, člověk je více náchylný k virovým, mykotickým i bakteriálním nákazám, mohou se u něj více vyskytovat nádorová onemocnění, nebo vznikají autoimunitní onemocnění. [2, 3, 4, 5]

3.2 Nádorová onemocnění

V současné době narůstá incidence nádorových onemocnění vinou životního stylu i životního prostředí, v České republice zemře na následky zhoubného nádoru každý 4. člověk. Vznik nádoru neboli kancerogeneze je víceukrový proces, který vzniká nakumulováním více změn v genetické informaci buňky, čímž dojde k tomu, že se zdravá buňka změní v nádorovou, která se nekontrolovatelně dělí. Nádory se dělí na maligní a benigní. Maligní nádory jsou více agresivní než benigní nádory. Maligní buňkou jsou soběstačné, protože si jsou samy schopné vytvářet růstové faktory, nereagují na cytokiny, které zastavují růst a dělení buněk, jsou schopné se množit nekonečně dlouho, jsou rezistentní vůči proapoptickým faktorům, vytváří nové cévy prostřednictvím procesu angiogeneze, a jsou invazivní, tedy jsou schopné se rozšířit do dalších tkání a metastazovat. [6, 7]

Mezi rizikové faktory pro vznik nádorů patří kouření, strava, sluneční záření, alkohol, infekce, expozice škodlivin z životního případně pracovního prostředí, nadváha a nedostatek pohybu. Tyto faktory mohou následně vést ke změně genů a tím dochází ke vzniku nádorových buněk. Mutace vedoucí ke vzniku nádorových genů vznikají na více genech. Jedná se o protoonkogeny, supresorové geny a geny regulující kontrolní mechanismy. Protoonkogeny se při mutacích aktivují, supresorové geny jsou naopak deaktivovány. Obě mutace vedou ke snížení apoptózy a ke zvýšení proliferace buněk. Geny regulující kontrolní mechanismy opravují chyby vzniklé v průběhu replikace genetické informace, a jejich nedostatečná funkce může být příčinou nádorové mutace. [6, 7, 8]

3.3 Terapie nádorových onemocnění

Podle léčebného cíle dělíme terapii nádorových onemocnění na kurativní a paliativní. Kurativní léčba má za cíl vyléčit pacienta. Paliativní léčba nemá za cíl vyléčit pacienta, její účel spočívá v prodloužení života a zlepšení jeho kvality. Mezi metody léčby v onkologii patří zejména chirurgická léčba, dále radioterapie, chemoterapie, hormonální léčba, imunoterapie aktivní a pasivní, imunomodulační léčba a cílená terapie. Chirurgická léčba spočívá v odstranění nádoru, radioterapie využívá ionizační záření ke zničení nádorových buněk, chemoterapie využívá ke zničení

nádorových buněk cytotoxické látky a hormonální terapie se využívá v léčbě hormonálně dependentních nádorů. Imunoterapie spočívá v obnovení správné funkce protinádorové imunity, pasivní imunoterapie je léčba za pomoci monoklonálních protilátek (MAbs), nebo autogenních či alogenních imunocytů – NK buněk, T-lymfocytů a dendritických buněk. Aktivní imunoterapie je realizována například skrze aplikaci BCG vakcíny, která se primárně používá pro vakcinaci proti tuberkulóze, ale její využití je širší – lze ji aplikovat jako léčbu vybraných druhů nádorů, například karcinomu močového měchýře. Imunomodulační léčba spočívá v aplikaci interferonů, interleukinů a hematopoetických cytokinů. Cílená terapie je léčba malými molekulami nebo MAbs, které jsou cílené přímo na konkrétní cíle – růstové faktory, angiogenní faktory atp. [6, 8]

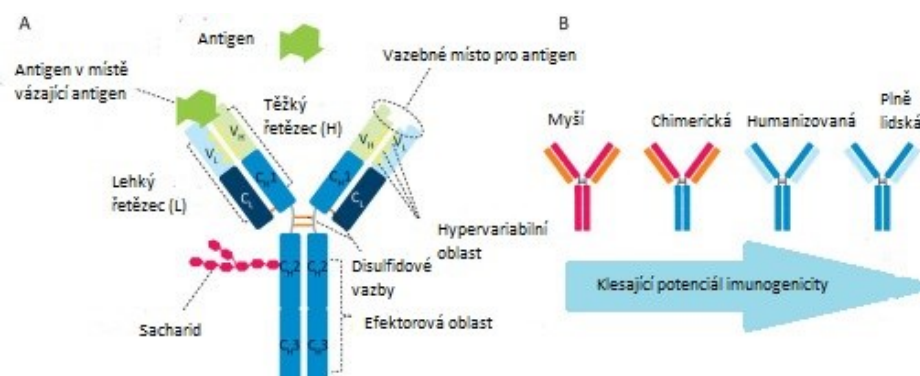
3.4 Monoklonální protilátky

Protilátky jsou imunoglobuliny (Ig) tvořené B-lymfocyty, které se formují v kostní dřeni, kde následně také dozrávají. Při napadení organismu patogenem vzniká řada různých protilátek proti různým částem patogenu. Místa, které protilátky na patogenu rozeznávají, se nazývají antigenní determinanty nebo také epitopy, a obvykle se skládají z 6-8 aminokyselin (AMK). Tyto protilátky se nazývají polyklonální, protože se jedná o protilátky vznikající z více B-lymfocytů. Každá protilátka je specifická pro jeden konkrétní epitop a je produktem jednoho klonu B-lymfocytů. MAbs jsou protilátky tvořené klonem jednoho B-lymfocytu, které produkují totožné protilátky. [1, 9, 10]

Lidské B-lymfocyty produkují pět typů protilátek – IgG, IgM, IgE, IgA, IgD. Při aktivaci B-lymfocytů nejprve vznikají IgM protilátky, které jsou spojeny s primární imunitní odpovědí. IgM se v séru vyskytují v podobě pentamerů. IgG je nejběžnější imunoglobulin, je zodpovědný za sekundární imunitní odpověď, a rozlišujeme jeho 4 podtypy IgG1-4. Pro tvorbu MAbs slouží zejména IgG1. IgA jsou zodpovědné za slizniční imunitu, nacházejí se zde ve formě monomerů a dimerů. IgD se nachází v séru v monomerní formě, v cirkulaci je ve velmi nízkých koncentracích a jeho funkce není zcela objasněná, ale je známo, že se podílí na udržení homeostázy. IgE je monomerní protilátka a je příčinou vzniku alergií a hypersenzitivity. [11]

Mezi funkce protilátek v organismu patří neutralizace toxinů a patogenů, dále zprostředkovávají fagocytózu, buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC, *anglicky* antibody-dependent cellular cytotoxicity) a komplementem zprostředkovanou lýzu patogenů nebo infikovaných buněk. Neutralizace patogenů může být realizována například navázáním protilátek na patogeny, čímž způsobí jejich agregaci, která usnadňuje jejich zneškodnění. Také se protilátky mohou navázat na ligandy patogenu, které jsou potřebné k navázání kontaktu s hostitelskou buňkou. [12]

Protilátky jsou složeny ze 2 těžkých (H, *anglicky* heavy) a ze 2 lehkých (L, *anglicky* light) řetězců polypeptidů (Obrázek 1). Těžké řetězce se skládají ze 3 domén, CH1, CH2, CH3 (CH, *anglicky* constant heavy domain). Lehké řetězce se skládají ze 2 domén, z konstantní domény (CL, *anglicky* constant light domain) a z variabilní domény (VL, *anglicky* variable light domain). Těžké řetězce jsou mezi sebou spojeny disulfidickými můstky a ke každému H řetězci je připojen opět disulfidickými můstky 1 lehký řetězec. Protilátka má vazebnou část (Fab, *anglicky* antibody binding fragment), která je zodpovědná za vazbu na antigen. Fab část se skládá z části těžkého i lehkého řetězce, jedná se o amino-terminální část polypeptidu. Další část protilátky je konstantní část (Fc, *anglicky* crystallisable fragment), která se skládá ze dvou karboxy-terminálních konců H řetězců a slouží jako efektor, který umožňuje interakci protilátky s imunitními buňkami nebo proteiny v séru. Fc část může být post-translačně modifikována glykosylací, čímž se zvyšuje její stabilita i vazba k Fc receptorům. IgG protilátky jsou bivalentní, mohou vázat 2 antigeny. [9, 10, 13]



Obrázek 1: Struktura protilátky (A) a potenciál imunogenicity (B), převzato a upraveno podle [13].

3.4.1 Historie monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky byly poprvé připraveny hybridomovou technologií Misterinem a Köhlerem z Univerzity v Cambridge, kteří za tento objev získali v roce 1984 Nobelovu cenu. MAbs byly připraveny hybridizací ze 2 typů buněk, tj. B-lymfocytů a nádorových buněk. B-lymfocyty pocházející z imunizovaných myší produkovaly protilátky. K hybridizaci s B-lymfocyty byly použity nádorové buňky, které měly neomezenou schopnost se množit. Z tohoto spojení se následně vyseletovaly buňky, které produkovaly protilátky, a zároveň byly schopny se neomezeně množit. Ze začátku byly používány myší B-lymfocyty produkující myší protilátky, které však byly u pacientů velmi imunogenní, proto se časem vytvořily technologie, které vedly k vytvoření chimérických, humanizovaných nebo plně humánních MAbs. [9, 13]

První MAb, která prošla klinickými studii a byla použita v terapii, byla protilátka muromonab (OKT 3). OKT 3 je myší imunopresivní protilátka proti CD3 receptoru na T-lymfocytech, která se používala při rejekci štěpu po transplantaci ledvin, srdce nebo jater. [1, 13]

3.4.2 Výroba monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky vznikají z plasmatického B-lymfocytu, který je *in vitro* immortalizovaný. Samotné B-lymfocyty rychle hynou, a proto se nedají využít k tvorbě protilátek. Prvním krokem výroby MAb je imunizace hlodavce (myši nebo krysy) imunogenem, tedy látkou vyvolávající imunitní reakci. Jako imunogen se používají proteiny, buňky nebo peptidy spojené s nosnými proteiny. S imunogenem se často podává adjuvans, které nespecificky zvyšuje imunitní odpověď. V reakci na imunogen vznikají B-lymfocyty produkující protilátky více tříd, pro přípravu MAb se dává přednost IgG, které jsou méně náchylné k degradaci. Následně se myším odeberou lymfatické uzliny nebo slezina obsahující B-lymfocyty. Druhým krokem je fúze a selekce. Hybridizace je založená na fúzi myších B-lymfocytů s myelomovými buňkami. Myelomové buňky jsou předem vybrány takové, které mají nedostatek enzymu hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferázy (HGPRT). B-lymfocyty se smísí s myelomovými buňkami a s fúzním činidlem, například s polyetylen glykolem. Následně nám vznikají hybridomy. Poté je potřeba vyselektovat nefúzované myelomové buňky, které se odstraní tak, že se buňky pěstují v médiu obsahující HAT (hypoxantin,

aminopterin a thymidin), ve kterém myelomové buňky kvůli nedostatku enzymu HGPRT hynou, ale hybridomy tento enzym získají od B-lymfocytů a přežijí. Z hybridomů je potřeba vybrat ty, které jsou stabilní. Vybrané hybridomy se následně množí a produkují MAbs. Třetím krokem je selekce. V této fázi se vybírají hybridomy, které produkují protilátky vhodné specifity, například pomocí imunocytochemického screeningu. Čtvrtým krokem je charakterizace. Je potřeba danou hybridomovou linií charakterizovat z hlediska reaktivity, specifity a zkřížené reaktivity. Zároveň se definuje třída a podtřída myších Ig – nejčastěji jde o IgG1. Také se určuje, zda je protilátka specifická na jeden antigen, nebo více různých antigenů a měří se afinita interakce protilátky a antigenu. Poslední fáze vzniku MAb jsou klinické studie, které jsou potřebné k tomu, aby bylo možné protilátky použít v diagnostice nebo pro léčbu pacientů. [10]

Rekombinantní technologií je možné připravit méně imunogenní protilátky, než jsou myší protilátky. Proti myším protilátkám si lidský organismus vytváří protilátky zvané HAMA (*anglicky* human anti-murine antibodies), které vedou ke snížení účinnosti a zvýšeným vedlejším účinkům. Chimérické MAbs mají myší Fc fragment nahrazený lidskou Fc doménou, proto jsou méně imunogenní než myší. Humanizované monoklonální protilátky mají nahrazený opět Fc fragment a také část spojených lehkých a těžkých řetězců, myší část je již jen přímo část vázající se na antigen. Plně lidská protilátka je protilátka plně odpovídající lidským protilátkám a je nejméně imunogenní. Jakou technologií je protilátka upravená je možné určit podle názvosloví – myší protilátka končí příponou -omab, chimérická protilátka končí na -ximab, humanizovaná končí na -zumab, plně lidská na -umab (Obrázek 1). [9, 10, 13]

Další zkoumaná možnost, jak vyrobit MAbs, spočívala v izolaci B-lymfocytů z lidské periferní krve a jejich následné transformaci například pomocí viru Epstein-Barrové na buňky schopné se neomezeně dělit. Tímto způsobem se ale nepodařilo připravit IgG, a navíc je v praxi neetické nakazit člověka, aby bylo možné izolovat lidské B-buňky. [9, 10]

3.4.3 Využití a modifikace monoklonálních protilátek

V současné době jsou monoklonální protilátky jedny z nejvíce se rozvíjejících a nejvýdělečnějších léčiv. Největší množství MAbs se využívá v onkologii a při terapii zánětlivých onemocnění, ale své místo mají i v léčbě jiných onemocnění, například

v léčbě astmatu, osteoporózy, hyperlipidemií nebo v ovlivňování srážlivosti krve. Jejich výhoda při využití v terapii spočívá v zaměření se na cílové struktury, díky čemu je velmi snížené riziko zasažení zdravé tkáně. Mimo léčbu onemocnění lze využít MAbs k diagnostice. V onkologii se například používají pro určení typu nádoru podle toho, jaké exprimuje markery a tím je možné odlišit i morfologicky podobné nádory. Dále lze zjistit původní tkáň, ze které vznikly metastáze. Pomocí MAbs je možné určit metastáze z menšího počtu buněk než z histopatologického barvení. V neposlední řadě slouží MAbs ke zjištění prognózy onemocnění pacientů a jejich pravděpodobné odezvy na léčbu. Protilátky v cirkulaci setrvávají přibližně 2-4 týdny, kvůli své proteinové povaze se aplikují intravenózně nebo subkutánně. Protilátky se mohou použít buď celé, nebo jen jejich části tzv. fragmenty MAbs, kdy se využívají Fab oblasti. [10, 13, 15]

Monoklonální protilátky se využívají ve svém nativním stavu, nebo se modifikují. Modifikované protilátky dělíme na prosté a konjugované. Prosté MAbs jsou modifikovány například změnou AMK v Fc části MAb. Konjugované MAbs se skládají z protilátky, spojovacího linkeru a cytotoxické molekuly, kdy v některých případech je cytotoxická molekula připojena na protilátku přímo, tj. bez linkeru. MAb je selektivní pro marker, který je exprimován například na nádoru. Protilátka je internalizována do nádorové buňky a uvnitř buňky se uvolní cytotoxická molekula. Stabilita linkeru v cirkulaci je důležitá pro účinnost i bezpečnost léčby a zároveň je potřeba, aby linker uvolnil molekulu v cílové buňce – používají se například disulfidové linkery, které se redukují uvnitř lysozymů buněk. Konjugované protilátky mohou nést například chemoterapeutikum, které je většinou velmi toxické, a tak se jeho konjugací s protilátkou zamezí jeho uvolnění do zdravých částí těla, nebo toxiny rostlinného nebo bakteriálního původu určené pro onkologické indikace. V neposlední řadě se konjugují MAbs s radionuklidy pro diagnostické účely nebo pro onkologickou terapii. Registrovaný je například Ibritumomab tiuxetan sloužící k léčbě lymfomů. Ibritumomab tiuxetan se skládá z myší IgG1 vážící se na CD20 buněčný protein nacházející se na B-buňkách a je navíc konjugovaný s MX-DTPA chelátorem (kyselina 2-[[2-[bis(karboxymethyl)amino]-3-(4-isothiokyanatofenyl)propyl]-[2-[bis(karboxymethyl)amino]propyl]amino] octová) vážící radionuklid yttrium-90. Další registrovaná MAb konjugovaná s radionuklidem je Tositumoman sloužící též k léčbě lymfomů. Skládá se z myší IgG1, který je konjugovaný s radionuklidem jód-131. Další

dělení MAbs je dle mechanismu účinku, například MAbs ovlivňující růst a proliferaci buněk, neutralizující toxiny atp. [13, 14, 15, 16]

3.5 Angiogeneze

U vícebuněčných organismů se vyvinuly cévní systémy a tím byly překonány nevýhody difúze – vzdálenost mezi buňkami a časová náročnost zásobení buněk. Ve vícebuněčných organismech je angiogeneze neboli formace nových krevních cév z již existujících cév nezbytný proces pro růst a vývoj. Na vzniku cév se podílejí mechanismy zvané vaskulogeneze a angiogeneze. Vaskulogeneze znamená tvorba cév *de novo* a pod pojmem angiogeneze se rozumí tvorba cév z již existujícího cévního systému. U mnoha patologických stavů, například u kancerogeneze, aterosklerózy, artritidy, psoriázy a endometriózy je přítomná angiogeneze, ale často bez mechanismů zpětné vazby, které za fyziologických okolností regulují tvorbu cév a jejich prostorové uspořádání. Slovo angiogeneze bylo poprvé použito Johnem Hunterem v roce 1787. [17, 18, 19]

Patologická angiogeneze může být zvýšená i snižená – zvýšená je přítomna u nádorů, psoriázy, slepoty, revmatoidní artritidy a u komplikací AIDS (*anglicky* acquired immune deficiency syndrome), nedostatečná může být přítomna u vředů, neplodnosti, cévní mozkové příhody, onemocnění srdce nebo u sklerodermie. Fyziologicky se angiogeneze vyskytuje během hojení ran, při obnovování endometria během menstruačního cyklu u žen a při hojení ischemie. [20]

3.5.1 Fyziologická angiogeneze

Cévní síť zajišťuje přívod živin a kyslíku a odvod metabolických odpadních produktů. Cévy dělíme na tepny, žíly a kapiláry, které mají odlišnou strukturu podle své funkce. Vnitřní vrstva cév je tvořena endotelem, který je tvořen endotelovými buňkami spojenými kadheriny a kladiny. Endoteliální buňky jsou vázány na bazální membránu a jsou obklopeny murálními buňkami, které dělíme na dva typy – pericyty a svalové buňky obklopující větší cévy. Tepny jsou tvořeny endotelovou vrstvou, která je obklopena několika vrstvami hladkých svalových buněk. Žíly jsou obklopeny menším množstvím svalových buněk než tepny, protože potřebují odolat menšímu tlaku než tepny. Cévy s menším průměrem (arterioly, venuly a kapiláry) jsou pokryty pericyty

podílejícími se na zrání a stabilizaci cév. Pericyty jsou také důležité při diferenciaci a proliferaci endotelových buněk. [18, 21]

Endotelové buňky jsou při angiogenezi řízené pomocí proangiogenních cytokinů, mezi které se řadí vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, *anglicky* vascular endothelial growth factor), angiopoietiny (ANGPT1 a 2), transformační růstový faktor α (TGF- α), transformační růstový faktor β (TGF- β), destičkový růstový faktor A a B (PDGF A a B), placentární růstový faktor (PIGF), interleukin 8 (IL-8), hepatický růstový faktor (HGF), epidermální růstový faktor (EGF) a bazický fibroblastový faktor (bFGF). Naopak angiogenezi potlačují antiangiogenní faktory, mezi které patří angiostatin, endostatin, trombospondin 1 a 2, interferon β , α a γ , interleukin 1, 4, 12, 18 a 21 (IL-1, 4, 12, 18 a 21), semaforin, solubilní receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor typu 1 (solVEGFR1), tkáňový inhibitor metaloproteináz 2 a vasostatin. [20]

První krok angiogeneze je narušení bazální membrány již vytvořených cév. Druhý krok je částečná degradace extracelulární matrix, endoteliální buňky ztrácí kontakt s bazální membránou a poté mohou infiltrovat místa bez kapilár a vznikají nové kapiláry. Částečná degradace matrix probíhá pomocí enzymu matrixmetaloproteinázy (MMP), který je vytvářen endotelovými buňkami. Delta like ligand (DLL4) se váže za klidového stavu na membránové MMP a tím zabraňuje nadbytečné angiogenezi a umožňuje zrání cév zajištěním migrace pericytů a buněk hladké svaloviny do oblasti tvorby nových cév. Při angiogenezi jsou důležité antiangiogenní faktory, protože vedou ke snížení proliferace endotelových buněk ve prospěch myofibroblastů a pericytů, a díky tomu mohou vzniknout fyziologická spojení buněk a vzniká lumen a bazální membrána. Jakmile se do nové cévy dostává krev, snižuje se hypoxie tkáně a tím se snižuje tvorba VEGF, a angiogeneze v dané oblasti je dokončena. [20]

U embryí vznikají cévy nejprve procesem vaskulogeneze. Při vaskulogenezi začíná tvorba cév pomocí cévních prekurzorových buněk tzv. angioblastů, které se formují do jednoduchých endoteliálních trubic. Na počátku vznikají krevní ostrůvky v embryonálním a extraembryonálním mezodermu. Tyto ostrůvky obsahují hemangioblasty, které se diferencují v angioblasty exprimující receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor typu 2 (VEGFR2, *anglicky* vascular endothelial growth factor receptor type 2), a ze kterých vzniká endotel, který vystylá cévní stěnu.

Propojením krevních ostrůvků vzniká prvotní cévní síť. V pozdějších stádiích vývoje vzniká pomocí angiogeneze cévní síť, která zásobuje vznikající tkáně a orgány. [19]

V dospělosti se za fyziologického stavu nové cévy vyvíjí daleko méně. Nové cévy vznikají nejvíce procesem angiogeneze za účelem opravy tkání, během hypoxie, nebo při některých onemocněních, například během kancerogeneze po expozici angiogenních růstových faktorů, které vznikly díky stimulaci onkogenních faktorů. Vaskulogeneze u dospělých jedinců je také možná. Nová céva vzniká z ECFC (*anglicky* circulation endothelial colony-forming cells), které se v periferní krvi vyskytují za normálních podmínek ve velmi nízkých koncentracích, ale při ischemii mohou tvořit nové cévy. Také se tyto buňky podílejí na vzniku nových cév pomocí stimulace proangiogenními faktory. ECFC buňky jsou však v současnosti málo prozkoumané. [18, 19]

3.5.2 Nádorová angiogeneze

Judah Folkman v roce 1971 zjistil, že vznik nádoru je závislý na angiogenezi. Nádor může bez cévního zásobení narůst jen do velikosti 1 mm, poté již potřebuje cévy k zásobování živinami. Do té doby je nádor zásobený difúzí. Proces angiogeneze je zahájený tzv. angiogenním přepnutím, kdy se v nádoru začne produkovat genotyp s větším množstvím angiogenních faktorů. [17, 19]

Angiogeneze je nutná pro růst solidních nádorů a pro jejich přežití. Na rozdíl od fyziologické angiogeneze nádorová nekončí vznikem cévy, ale pokračuje dál díky tomu, že je nádor hypoxický a vytváří angiogenní cytokiny. Mechanismy vzniku cév jsou stejné jako u fyziologické angiogeneze. Nádorové cévy jsou odlišné vzhledem, jsou zakroucené a cévní síť je neorganizovaná, nahodile uspořádaná a obsahuje místa s nadbytkem i nedostatkem cév. Cévy vykazují zvýšenou permeabilitu, která je zapříčiněná nezralostí cév a nedostatkem murálních buněk. Důsledek zvýšené permeability je intersticiální hypertenze, která se podílí na snížení účinnosti léčby. Mezi další důsledky zhoršené funkce nádorových cév patří horší perfúze, hypoxie v oblasti nádoru a snížená aktivita a infiltrace imunitních buněk do místa nádoru. [18, 22]

3.5.3 Angiogenní switch (přepnutí)

Aby mohl nádor růst, je potřeba, aby byl zásoben živinami. Spouštěčem angiogeneze v nádoru je hypoxie a nedostatek živin. Od velikosti 1 mm již nádor

potřebuje nové cévy, protože difúze je pro výživu nádoru nedostačující. Aby to bylo možné, tkáně, které jsou v bezprostředním okolí, začnou produkovat proangiogenní faktory, jako je například VEGF a fibroblastový růstový faktor (FGF, *anglicky* fibroblast growth factor). Tento proces, kdy obklopující buňky začnou produkovat proangiogenní faktory, se nazývá angiogenní switch. Protože je angiogeneze závislá na rovnováze proangiogenních i antiangiogenních faktorů, angiogenní switch závisí na tom, zda převládají proangiogenní faktory. Produkce proangiogenních faktorů je podporována také hypoxií (důsledek zvýšeného množství tkáně, dysfunkce cév, nebo ucpání cévy). V případě nádorů je často angiogenní switch také výsledkem aktivace onkogenu nebo mutace onkosupresoru, které vedou přímo nebo nepřímo k produkci angiogenních růstových faktorů. Jakmile dojde u nádorů k angiogennímu přepnutí, dochází ke vzniku nových cév, které podporují proliferaci dalších klonů nádorových buněk a zároveň podporují metastázování díky tomu, že se jimi mohou nádorové buňky dále šířit. [19, 20, 22]

3.5.4 Protinádorová terapie v prostředí nádorových cév

Nezralé nádorové cévy v kombinaci s nekontrolovatelnou proliferací nádorových buněk vedou ke zvýšené hypoxii a snížené perfúzi v oblasti nádoru. To následně vede ke snížení expozice protinádorové terapie v hypoxické oblasti, čímž se snižuje účinnost terapie. [18]

Mezi typy onkologické léčby, které jsou ovlivněny hypoxií, patří radioterapie, chemoterapie a imunoterapie. Radioterapie vystavuje nádorové buňky záření o vysoké energii, což vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku v aerobním prostředí. Reaktivní formy kyslíku následně poškozují DNA, a to vede ke smrti buněk. U hypoxických buněk je účinnost této terapie snížena. Chemoterapie je také ovlivněna nezralostí cév v nádoru několika mechanismy. Vzniklé hypoxické oblasti nejsou vystaveny expozici systémově podávaných chemoterapeutik. Chemoterapeutika, která se do oblasti nedostanou v dostatečné koncentraci, mají sníženou účinnost. Hypoxické buňky také daleko méně proliferují, proto na ně nepůsobí chemoterapeutika zaměřená na rychle se dělící buňky. Některá chemoterapeutika, například metotrexát nebo doxorubicin, potřebují ke své funkci kyslík, proto jsou v hypoxických místech málo účinná. Také se díky zvýšené propustnosti cév může dostávat chemoterapeutikum na periferii nádoru a centrum nádoru je málo vystaveno účinkům chemoterapeutika. Radioterapie

uskutečňovaná prostřednictvím označeného vektoru nebo protilátky, která se používá k cílenému a specifickému ozáření nádorových buněk, je méně účinná v místě hypoxie, protože potřebuje dobrou prostupnost do nádoru i dostatek kyslíku k zesílení účinku ionizujícího záření. Také imunoterapie vykazují sníženou terapeutickou účinnost v důsledku špatné perfúze nádoru, protože nefunkční cévy brání imunitním buňkám, aby pronikly do nádoru. Hypoxie a imunosupresivní faktory, které se v nádoru hromadí v důsledku hypoxie, uvnitř nádoru brání imunitním buňkám, aby ničily nádorové buňky. [19]

3.5.5 Antiangiogenní léčba

Antiangiogenní léčba normalizuje angiogenezi v nádoru, snižuje hypoxii a tím pomáhá v léčbě cytostatiky nebo radiofarmaky. [22]

Cílení na angiogenezi je v onkologii žádoucí z více důvodů. Zaprvé, angiogeneze je součástí patologického procesu u růstu všech solidních nádorů, je to tedy univerzální proces u široké škály nádorů. Za druhé, angiogenní cíle se nacházejí na povrchu endoteliálních buněk nebo v plasmě, jsou tedy snadno přístupné pro protilátky. Za třetí, angiogenní markery na endoteliálních buňkách jsou méně náchylné ke genetické mutaci než markery exprimované méně geneticky stabilními nádorovými buňkami. Antiangiogenní léčiva (například protilátka bevacizumab proti VEGF) vedou k zastavení růstu nádoru a k lepší odpovědi na další léčbu, ale jejich velická nevýhoda je vznik rezistence, kdy po několika týdnech až měsících dochází k vytvoření odolnosti nádoru a ten může opět růst. [20, 22]

3.5.6 Angiogeneze a oční onemocnění

Angiogeneze je charakteristický znak pro mnoho očních nemocí. Oční onemocnění spojené s angiogenezí se vyznačuje neovaskularizací sítnice, cévnatky, duhovky a rohovky. Mezi nejčastější onemocnění patří diabetická retinopatie a věkem podmíněná makulární degenerace (AMD, *anglicky* age-related macular degeneration). Diabetická retinopatie je vyvolaná diabetem a vede ke slepotě způsobené makulárním edémem a abnormální neovaskularizací sítnice. Vysoká hladina glukózy v krvi vede k tomu, že kapiláry v sítnici nefungují správně, což vede k hypoxii sítnice a následné produkci VEGF a tvorbě nových cév. [19]

Patofyziologie AMD je multifaktoriální, a zahrnuje environmentální, genetické a metabolické faktory. Má dvě různé formy – suchou a vlhkou. Vlhká AMD se vyznačuje neovaskularizací do vrstev pod sítnicí a do místa žluté skvrny (makuly), kde vede krvácení a únik tekutin z cév ke ztrátě zraku. Léčba se zaměřuje na snížení propustnosti cév sítnice a cévnatky inhibicí angiogeneze, například pomocí monoklonální protilátky proti VEGF nebo proti endoglinu. [19]

3.6 TGF- β

Transformační růstový faktor β (TGF- β , *anglicky* transforming growth factor β) je cytokin zodpovědný za proliferaci, migraci a za přežívání i apoptózu endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva. Člověk má dva typy transformačních růstových faktorů – α a β . TGF α se váže na EGFR (*anglicky* epidermal growth factor receptor), TGF- β na TGF β receptor. TGF- β je nejčastěji homodimerní cytokin složený ze dvou peptidů o molekulární hmotnosti 12,5 kDa spojených disulfidickým můstkem a hydrofobními interakcemi. U člověka je popsáno nejméně 23 genů pro TGF- β , ale tento cytokin byl nalezen v mnoha živočišných druzích včetně bezobratlých. TGF- β má tři podtypy, TGF- β 1, 2 a 3, a patří do nadrodiny TGF- β . Mezi další ligandy této nadrodiny patří kostní morfogenetický protein (BMP, *anglicky* bone morphogenetics protein), růstové a diferenciacní faktory (GDF, *anglicky* growth and differentiation factors) a aktiviny, inhibiny a neurotrofický faktor odvozený z gliových buněk (GDNF, *anglicky* glial cell linederived neurotrophic factor). [23, 24, 25]

TGF- β působí na buňky prostřednictvím vazby na receptory TGF β receptor 1 a 2 (TGF β R1 a TGF β R2), které patří mezi serin/threoninové kinázy. TGF β R1 v endotelových buňkách se konkrétně nazývá ALK 1 a 5 (*anglicky* activin receptor-like kinases). TGF β R1 a TGF β R2 jsou součástí komplexního receptoru pro TGF- β , kdy se jedná o heteromerní komplex, tj. tedy komplex složený ze dvou různých jednotek. Ligand se naváže na TGF β R2, tento komplex se spojí s TGF β R1. TGF β R1 se následně fosforyluje a tím se signál přenáší dále do buňky pomocí specifických efektorů Smads. Poměr mezi aktivací ALK 1 a ALK 5 receptorů je důležitý pro účinek TGF- β . V období angiogeneze dominuje aktivace ALK 1, v období nižší angiogeneze a zrání buněk naopak dominuje aktivace ALK 5. [23, 25]

TGF- β je zodpovědný za vývoj, diferenciaci, proliferaci a funkci více typů buněk. Podílí se na diferenciaci kmenových buněk, tkání, vývoji embrya, regulaci imunitní odpovědi a na udržení homeostázy. Účinky na buňky jsou různé, TGF- β je zodpovědný za inhibici růstu buněk, a zároveň může potencovat proliferaci buněk – tento účinek byl pozorován na chondrocytech, osteoblastech, mesenchymálních kmenových buněk, fibroblastech a endoteliálních buňkách zejména při patologických stavech. Jakým způsobem bude TGF- β fungovat, závisí i na dalších produkovaných cytokinech a okolních buňkách. Účinek TGF- β na endotelové buňky je závislý na dávce. Jeho vysoké dávky vedou k inhibici buněk endotelu, nízké dávky naopak vedou ke stimulaci buněk endotelu, stimuluje se proliferace a migrace endoteliálních buněk. TGF- β také kontroluje hojení ran, během kterého má vliv na migraci buněk, zánětu, proliferaci fibroblastů a remodelaci zjizvené tkáně. [24, 26]

TGF- β indukuje antiproliferativní odpověď v mnohých buňkách, například ve zdravých epiteliálních buňkách a u T-lymfocytů. V kancerogenezi v časně fázi TGF- β potlačuje vznik tumoru, v pozdějších fázích naopak nádory mohou produkovat více receptorů pro TGF- β i TGF- β cytokiny, což zhoršuje prognózu nádoru. Kancerogenezi TGF- β podporuje například stimulací angiogeneze, stimulací tkáňové fibrózy, narušením imunitní a zánětlivé reakce a dalšími procesy. [24]

3.7 Endoglin

Endoglin také označovaný jako CD105 (*anglicky* cluster of differentiation 105) je transmembránový glykoprotein o hmotnosti cca 180 kDa. Jedná se o koreceptor pro ligandy z nadrodiny TGF- β , hraje klíčovou roli při angiogenezi, tedy při tvorbě nových cév. Endoglin byl poprvé objeven na endotelových buňkách v roce 1990. Endoglin se skládá ze dvou stejných podjednotek (tedy je homodimerní) o hmotnostech cca 95 kDa, které jsou spojené disulfidickým můstkem. Endoglin se skládá z extracelulární (561 AMK), transmembránové (25 AMK) a cytoplasmatické (47 AMK) domény. Je exprimován ve dvou isoformách, L (long) a S (short). Toto označení se zakládá na délce cytoplasmatické domény. Endoglin disponuje krátkou cytoplasmatickou doménou, což poukazuje spíše na jeho funkci koreceptoru modulujícího proces angiogeneze než na to, že by měl iniciovat signální kaskádu. Gen pro endoglin je u člověka lokalizován na 9. chromozomu. Pokud je gen pro endoglin poškozený, vzniká Osler-Weber-Renduův

syndrom, jinak také hemoragická teleangiektázie 1. typu. Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, které je charakterizované cévním postižením, což dokazuje úlohu endoglinu ve vývoji cév. [22, 23, 27, 28, 29]

Endoglin je nejvíce exprimovaný v endotelu nově vznikajících cév. Mimo endotel je endoglin exprimován na hematopoetických kmenových buňkách, mesenchymálních kmenových buňkách, na monocytech, kde hraje roli při diferenciaci monocytů na makrofágy. Dále se endotel vyskytuje na epiteliálních buňkách a na keratocytech. Na těchto buňkách se ve vyšší míře exprimuje také během kancerogeneze. Také je endoglin jeden z regulátorů vasodilatace závislé na oxidu dusnatém (NO), protože zvyšuje syntézu NO, tedy podporuje vasodilataci. [23, 27, 30]

Endoglin se podílí na správně probíhající angiogenezi tím, že reguluje proliferaci a migraci endoteliálních buněk. Exprese endoglinu je regulována pomocí ligandů nadrodiny TGF- β a hypoxií. Hypoxie a TGF- β zvyšují expresi endoglinu, role BMP-9 je komplexní, inhibiční i aktivační. Přesný mechanismus, kterým endoglin moduluje přenos signálu TGF- β , není zatím příliš jasný. Endoglin se účastní signální kaskády TGF- β . TGF- β a stejně tak BMP a aktiviny) se váží na receptor TGF β R1 a TGF β R2. Endoglin se této signální kaskády účastní tím, že se váže na komplex TGF β R1 a TGF β R2a indukuje jejich signál. Při hypoxii dochází ke zvýšení angiogeneze zvýšením exprese endoglinu, ale také k indukci antiapoptické signální dráhy v endotelových buňkách. [23, 27]

Endoglin se díky svému výskytu na endotelu nově vznikajících cév stává vhodným cílem při zobrazování kancerogeneze, při které dochází k neovaskularizaci. Dále se také zkoumá využití zobrazování pomocí endoglinu u kardiovaskulárních onemocnění, jako jsou například infarkt myokardu, ateroskleróza a aneurysma, protože společný znak těchto onemocnění je právě vznik nových cév v procesu angiogeneze. U těchto onemocnění se dnes využívají především histologická vyšetření, proto je zobrazování pomocí endoglinu výhodné v tom, že je neinvazivní. [23, 30]

U nádorů se endoglin nejčastěji exprimuje v endotelu malých a nezralých cév. Jedním z prognostických markerů v onkologii je hustota kapilár nádoru, proto je významný v diagnóze solidních nádorů. Jedná se o diagnostický i prognostický marker, také je možné ho využít ke sledování účinnosti léčby. Endoglin se využívá v diagnostice glioblastomu, orálního a orofaryngeálního karcinomu, karcinomu hrtanu, plic, prsu, vaječníků, děložního čípku, děložního hrdla, endometria, prostaty, tlustého střeva,

konečníku, žaludku a také hepatocelulárního karcinomu. Prognóza pacientů s vyšší expresí endoglinu bývá méně dobrá, mají nižší míru přežití. Navíc, vyšší exprese endoglinu také souvisí s výskytem metastáz. Coby prognostický marker se endoglin jeví být lepším než tradiční markery – CD34 a CD31, které se nacházejí také na buňkách endotelu v nádorové tkáni. Ve srovnání s VEGFR je endoglin exprimován až 10x více, což z něj činí dobrý cíl pro diagnostické i terapeutické účely. Také je známo, že exprese endoglinu se podílí na vzniku rezistence vůči inhibitorům VEGF. [22, 30, 31]

Endoglin se zobrazuje nejčastěji pomocí pozitronové emisní tomografie (PET), dále je možné ho zobrazit pomocí jednofotonové emisní výpočetní tomografie (SPECT), fluorescenčního zobrazování v blízké infračervené oblasti (NIRF), magnetické rezonance nebo pomocí ultrazvuku. Na endoglin cílí značené protilátky, peptidy nebo nanočástice, které nám umožňují zobrazení *in vivo* v reálném čase. Ty také dokážou zobrazit novou vaskularizaci oproti té stávající, která neexprimuje tolik endoglinu jako nové cévy, což je potenciálně využitelné v diagnostice, kdy dokážeme rozlišit zdravou a patologickou tkáň. [30]

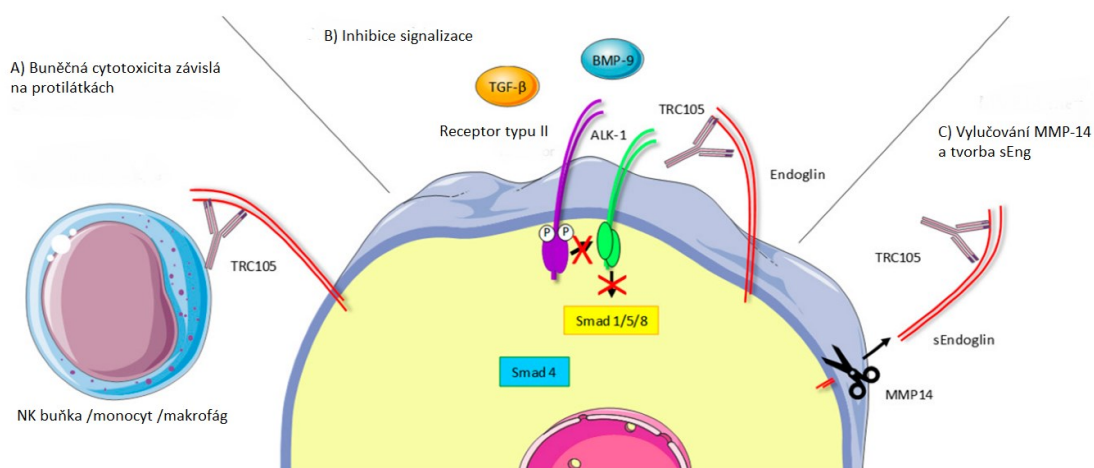
Kromě vazby ligandu je signalizace prostřednictvím endoglinu regulována štěpením jeho extracelulární domény pomocí MMP-14, čímž vzniká rozpustný endoglin (sEng, *anglicky* soluble endoglin). SEng inhibuje angiogenezi, jeho hladina je změněná u některých patologických stavů – preeklampsie, metabolických poruch a u kancerogeneze. Ale může angiogenezi inhibovat i aktivovat – záleží, zda se nachází jako monomerní nebo dimerní. [28]

3.8 Carotuximab

Carotuximab je chimérická protilátka neutralizující endoglin. V současnosti má carotuximab 2 varianty: TRC105, která je primárně zamýšlena na léčbu v onkologii, a DE122, která se klinicky testuje na léčbu AMD. Carotuximab je dobře snášen, velmi dobře se kumuluje ve tkáních, které nadměrně exprimují endoglin, jedná se tedy o potenciální terapeutickou i diagnostickou monoklonální protilátku. V tomto přehledu se budu více věnovat TRC105, protože byla použita v praktické části diplomové práce. [28, 30, 32]

3.8.1 Mechanismus účinku TRC105

TRC105 působí různými mechanismy. Vazbou na endoglin indukuje buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách, která je zprostředkována NK buňkami, neutrofilů a monocytů. Tyto imunitní buňky jsou schopny usmrtit buňku, na které je navázána protilátka, v tomto případě TRC105. Druhý mechanismus účinku spočívá ve vazbě TRC105 na endoglin, čímž dochází k zablokování receptoru pro vazby ligandů (například BMP-9 nebo TGF- β). Následně dochází k inhibici tvorby receptorového komplexu a k inhibici signalizace zprostředkované endoglinem. Třetí mechanismus účinku spočívá ve vylučování MMP-14 po navázání TRC105. MMP-4 je důležitá pro vznik rozpustného endoglinu (sEng). SEng může fungovat jako past na další ligandy, a tím se také sníží signalizace pomocí endoglinu (Obrázek 2). [28]



Obrázek 2: Mechanismus účinku TRC105, převzato a upraveno podle [28].

Při léčbě antiangienními protilátkami často dochází k aktivaci alternativních drah, tedy dochází ke vzniku rezistence na léčbu a obnovuje se angiogeneze. Například, když se bude pomocí TRC105 inhibovat endoglin a signální dráha TGF- β , nádorové buňky mohou provádět angiogenezi prostřednictvím dráhy VEGF a naopak. Kombinace protilátek proti endoglinu a VEGF zvyšuje účinnost terapie. Tato teorie byla ověřena na myším modelu karcinomu prsu KEP-11 a vedla ke snížení hustoty nádorových cév. Také bylo potvrzeno, že kombinace bevacizumabu (protilátka cílená proti VEGF) a TRC105 inhibuje signalizaci VEGF a tvorbu endotelových buněk *in vitro* a inhibuje růst nádoru, metastázování a s nádorem spojenou angiogenezi *in vivo*. [28]

3.8.2 Preklinické a klinické studie s TRC105

Souhrnně preklinické studie ukazují, že léčba pomocí TRC105, samostatně nebo v kombinaci, je účinná při inhibici růstu nádoru a prevenci metastazování v preklinických modelech rakoviny. TRC105 byl testován na široké škále modelů nádorových onemocnění, většina studií zaznamenala inhibici růstu nádoru a někdy i úplnou regresi, některé studie naopak pozitivní výsledky nezaznamenaly a byly objeveny rezistentní typy nádorů. Účinky léčby pomocí TRC105 vycházejí z cílení na nádorovou angiogenezi a také z cílení na další typy buněk jako jsou fibroblasty asociované s kancerogenezí (CAF, *anglicky* cancer-associated fibroblast), pomocné T-lymfocyty a myeloidní supresorové buňky. V preklinických studiích se též zjistilo, že kombinace TRC105 s inhibítozem VEGF mAb bevacizumabem vede ke snížení rezistence pacientů na bevacizumab. Léčba TRC105 také působí synergicky s radioterapií a imunoterapií u některých druhů nádorů. [22, 28]

První fáze klinických studií proběhla v roce 2008. Do této studie bylo zařazeno 50 pacientů s nádorovým onemocněním za účelem posouzení bezpečnosti a účinnosti. Doporučená dávka do fáze II byla stanovena na 10 mg/kg týdně nebo 15 mg/kg každé dva týdny. První studie ukázala, že léčba je bezpečná, že léčba vyvolává klinickou odezvu a TRC105 postoupila do další fáze výzkumu. [28]

Ve fázi 1b se klinicky testovala kombinace TRC105 s inhibitory VEGF u glioblastomu, karcinomu ledvin, karcinomu prsu a u hepatocelulárního karcinomu. Protože se zjistilo, že signální dráha endoglinu má vliv na signální dráhu VEGF, očekávalo se, že jejich kombinace bude mít silnější antiangiogenní účinky a také silnější protinádorový účinek. V letech 2011 až 2013 se provedly klinické studie fáze 1b, kdy se hledaly vhodné dávky bevacizumabu (inhibitor VEGF) v kombinaci s TRC105. Obě látky byly při doporučených dávkách pro obě jednotlivé dávky dobře snášeny i v kombinaci. Tato kombinace také vykazovala vyšší klinickou účinnost než jednotlivá léčiva samostatně. [28]

Po slibných výsledcích ze studie 1b se dále provedly 2 randomizované studie fáze 2 a 3 u metastatického renálního karcinomu a u angiosarkomu. Studie TRAXAR sledovala 150 pacientů s metastatickým karcinodem ledvin, polovina pacientů dostávala standardní dávku axitinibu, druhá polovina dostávala standardní dávku axitinibu v kombinaci s TRC105. Ve studii TAPPAS bylo přítomno 128 pacientů s angiosarkomem, polovina z nich dostávala standardní dávku pazopanibu, druhá

polovina dostávala pazopanib s TRC105. Ani v jedné studii se neprokázalo, že by přidání TRC105 vedlo ke zlepšení přežití bez progresu. Tato skutečnost vedla k ukončení dalšího vývoje TRC105 společností TRACON Pharmaceuticals v roce 2019. [28, 32]

Je možné, že by endoglin mohl mít slibnější výsledky, kdyby byl TRC105 testován u správných pacientů nebo u dřívějších stádií nádoru. Totéž je možné u nádorů, které vyvolávají silnou imunitní reakci, nebo které vytvářejí mnoho ligandů na povrchu buněk. [28, 33]

3.8.3 Klinická studie s DE122

DE122 je varianta carotuximabu, která se klinicky testovala na AMD. Licenci na vývoj DE122 měla nejprve společnost TRACON Pharmaceuticals, od roku 2014 společnost Santen. V roce 2020 byly klinické studie ukončeny po neuspokojivém výsledku z klinické studie 2a, která porovnávala účinnost DE122 ve srovnání s terapií Lucentis. [32, 34]

3.9 Radionuklidy

3.9.1 Radioaktivní přeměna

V roce 1896 objevil Henry Becquerel společně s Pierrem Curie a Marií Curie Sklodowskou existenci radioaktivity. Na jeho výzkum poté navázali Frederic Soddy a Ernest Rutherford, kteří přišli v roce 1902 s teorií radioaktivity, kterou popsali jako spontánní rozpad radioaktivního prvku, při kterém se z daného prvku uvolní částice a dojde ke vzniku nového prvku. [35]

Mezi základní veličiny radioaktivity patří poločas rozpadu ($T_{1/2}$) a aktivita (A). Poločas rozpadu je doba, za kterou se počet radioaktivních atomů sníží o jednu polovinu, tedy lze říct, že aktivita je v tomto bodě poloviční oproti počáteční hodnotě. Aktivita (A) je definována jako počet rozpadů za jednotku času. Jednotkou aktivity je 1 Bq (Becquerel), který odpovídá 1 rozpadu za 1 sekundu. Také je možné aktivitu vyjádřit jako hmotnostní nebo objemovou, vztaženou na 1 g nebo ml radiofarmaka, tedy 1 Bq/g, Bq/ml. [35, 36]

Při radioaktivní přeměně se přeměňuje nestabilní nuklid procesem samovolného radioaktivního rozpadu. Nestabilní nuklid se také nazývá radionuklid. Radionuklid je

atom, který obsahuje protony a neutrony s nestabilním poměrem, a proto se přeměňují na nuklidy se stabilní kombinací protonů a neutronů, anebo se jedná o atom s nadbytkem energie v jádře, která se uvolní formou emise vysokoenergetického γ -fotonu elektromagnetického záření. Počáteční nestabilní nuklid se označuje jako mateřský, výsledný nuklid se nazývá dceřiný. Výsledný nuklid již může být stabilní, nebo se může dále přeměňovat na konečný stabilní nuklid. Radioaktivní přeměna je doprovázená emisí lehkých částic a často elektromagnetickým zářením γ . [35, 36]

Radionuklidy se mohou přeměňovat následujícími procesy: α -rozpadem, β -rozpadem, vnitřní konverzí elektronu a izomerií jádra. Alfa přeměna znamená, že se při rozpadu jádra emituje záření v podobě kladně nabitých částic helia obsahujících 2 protony a 2 neutrony. Beta přeměna může probíhat trojím způsobem, tj. jako emise β^- -částice, β^+ -částice a jako elektronový záchyt, který je fyzikálně podobný β^+ -přeměně, ale některé literární zdroje ho označují jako samostatný typ záření. Při β^- -rozpadu se v jádře radionuklidu neutron přemění na proton za současné emise záporně nabitě částice (elektronu) a část energie si odnáší velmi lehká elektroneutrální částice neutrino. Při β^+ -rozpadu dochází k přeměně protonu na neutron a současně je z jádra emitována kladně nabitá částice (pozitron) a část uvolněné energie je odnášena opět neutrinem. Elektronový záchyt vzniká tím, že se do jádra dostane elektron z elektronové obalu atomu nejčastěji z K nebo L orbitalu, následně se v jádře sloučí tento elektron s protonem a tím vzniká neutron, který zůstává v jádře. Na uvolněné místo v obalu atomu přeskakují elektrony z vyšší vrstvy a současně se emituje nadbytečná energie v podobě Röntgenova záření nebo emisí Augerových elektronů. Mezi další typy radioaktivní přeměny patří například vnitřní konverze elektronu nebo izomerie jádra. Současně při radioaktivních α - a β -přeměnách často vzniká fotonové záření γ . Toto záření vzniká při deexcitaci jádra, tedy když jádro zaujímá nižší energetickou hladinu a nadbytečná energie se uvolní ve formě emitovaných γ -fotonů. Gama záření ale nemusí být pouze doprovodným zářením k částicovému záření a může probíhat samostatně jako v případě radioaktivní přeměny atomu technecia-99m. [35, 36, 37, 38]

Každý radionuklid je definován poločasem rozpadu, dále energií a druhem záření, které emituje. Pronikavost záření se liší dle jeho druhu a energie. Záření α má nejkratší dosah a nejmenší energii, β -záření má vyšší pronikavost než α záření a γ -záření má nejvyšší pronikavost. Na druhou stranu nejvíce ionizujícím zářením je α -záření,

o něco méně β -záření a nejméně γ -záření díky fyzikální vlastnosti lineárního přenosu energie. [35, 37]

3.9.2 Zdroje radionuklidů

Možností, jak získat radionuklid, je více. Jednou z možností je izolovat radionuklidy z vyhořelého paliva z jaderných reaktorů. Dalším způsobem je výroba radionuklidů pomocí jaderného reaktoru, ve kterém se vyrábí radionuklidy s dlouhým poločasem, například jod-131 nebo fosfor-32. Princip výroby radionuklidů v jaderném reaktoru spočívá v bombardování terčovými materiály neutrony. Tím vznikají nestabilní nuklidy s přebytkem neutronů, například částice emitující β^- -záření. Další možností získání radionuklidů je jejich výroba v cyklotronu, kde se vyrábí například galium-67. Princip výroby spočívá v bombardování terčovými materiály urychlenými částicemi, jako jsou například protony. Tím vznikají radioaktivní částice s nedostatkem neutronů nebo nadbytkem protonů, tedy vznikají například radionuklidy emitující β^+ -záření. Jako poslední se k výrobě radiofarmak používají generátory radionuklidů, kdy z mateřského radionuklidu vzniká dceřiný, taktéž nestabilní radionuklid. Mateřský radionuklid musí mít dostatečně dlouhý poločas, aby umožnil přepravu generátoru do místa, kde se bude využívat, například do zdravotnického zařízení. Vzniklý dceřiný radionuklid je chemicky odlišný od mateřského, proto je možné ho extrahovat elucí a poté použít. Generátory je možné použít k výrobě radionuklidů s krátkým poločasem, které jsou poté určeny k okamžitému použití. Nejvíce používaným radionuklidovým generátorem je molybden-techneciový (^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$) generátor, ze kterého se získává SPECT zářič technecium-99m. [35, 37, 39]

3.9.3 Experimentálně použitý radionuklid galium-67

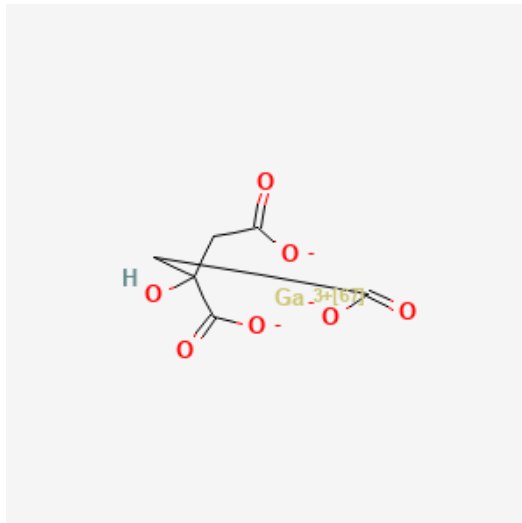
Galium-67 je radionuklid, který se využívá ve formě galium citrátu, $[\text{}^{67}\text{Ga}]\text{GaC}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (Obrázek 3) s poločasem rozpadu $T_{1/2} = 78,3$ hodin. Mechanismus účinku samotného citrátu galia v organismu je neznámý. Známe však je, že se koncentruje v lysozomech a váže se na rozpustné intracelulární proteiny v některých tumorech a v místech zánětu. [40, 41, 42]

V současné době známe 3 izotopy galia, které se řadí mezi galiové radionuklidy. Jedná se o galium-66, galium-67 a galium-68. Galium-66 se produkuje v cyklotronu (^{66}Zn - ^{66}Ga), má poločas rozpadu $T_{1/2} = 9,5$ hodin a emituje β^+ -záření, tj. pozitrony.

Galium-68 je produkováno pomocí germanium-galiového (^{68}Ge - ^{68}Ga) generátoru a má poločas rozpadu $T_{1/2} = 67,7$ minut a je to pozitronový zářič s možností využití pro PET zobrazení. [43]

Galium-67 se v současné době využívá v diagnostice, ale má potenciál i jako terapeutický radionuklid. Může se jím diagnostikovat přítomnost a rozsah Hodgkinova lymfomu a dalších lymfomů, bronchogenního karcinomu a také některých akutních zánětů. Galium-67 je produkováno v cyklotronu z mateřského nuklidu zinek-68. Galium-67 se následně rozpadá elektronovým záchytem na stabilní zinek-67. Energie emitovaného záření je 0,997 MeV. Současně se také emituje doprovodné γ -záření, které se dá využít pro zobrazování technikou SPECT nebo scintigrafie. Protože se galium-67 pomalu odstraňuje z tkání, je potřeba zobrazovat tkáně po 48–72 hodinách od podání, což vede k relativně vysoké radiační expozici pacienta. [39, 41, 42, 44]

Galium-67 se do organismu dostává stejným způsobem jako železo, respektive Fe^{3+} ionty. Tedy lze říct, že *in vivo* působí jako analog železa. V plasmě se váže na transferin, případně na vazebné struktury buněk imunitního systému, jako je laktoferin leukocytů. Galium-67 se vychytává v játrech, slezině a kostní dřeni. Vylučuje se ledvinami a též trávicím traktem. [39, 45, 46, 47]



Obrázek 3: Galium citrát, $[^{67}\text{Ga}]\text{GaC}_6\text{H}_8\text{O}_7$, převzato z [40].

3.10 Radiofarmaka

V medicíně se radioaktivita využívá buď k terapii některých onemocnění, anebo k diagnostice. K diagnostice se využívá zejména klinická diagnostická radiologie, mezi jejíž techniky pro zobrazování tkání patří například rentgen, ultrazvuk nebo magnetická rezonance. U těchto metod je zdroj záření umístěn mimo tělo pacienta a během vyšetření dochází k prozáření tkání. Dále je možné použít k diagnostice radiofarmaka. Radiofarmakum je definováno jako léčivý přípravek obsahující jeden nebo více radionuklidů navázaných na vektor, který transportuje radionuklid do cílového místa. Vektorem může být organická nebo biologicky aktivní molekula jako peptid nebo mAb. Radionuklidy se využívají v medicínském oboru nukleární medicíny k radiodiagnostice nebo k radioterapii ve velmi nízkých koncentracích. [36, 37]

Radiofarmaka se podávají pacientům parenterálně, perorálně nebo inhalačně a slouží k zobrazení nebo sledování činnosti orgánů, kdy je poté emitované záření detekováno externím zařízením jako jsou například gama kamery pro detekci γ -záření technikou SPECT. Pro radiodiagnostickou aplikaci se obecně používají radionuklidy emitující γ -záření (technika SPECT) nebo pozitronové záření (technika PET). Také je tedy možné použít radionuklidy k terapii některých onemocnění. V radioterapii se uplatňují zejména β^- -zářiče, emitory Augerových elektronů a poslední dobou se do centra zájmu dostávají i α -zářiče. Terapeutické radionuklidy se kumulují v postižené tkáni a pomocí emitovaného záření poškozují cílovou tkáň. Radionuklidy mohou být ve více formách. Mohou fungovat jako samostatný atom (například xenon-133), jako molekula ($[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$), iont ($[^{131}\text{I}]\text{I}^-$), nebo mohou být vázány na vektory jako peptidy, protilátky, buňky nebo větší molekuly. Radiofarmakum vázané na vektor obsahuje vazebnou nebo cílovou složku, která zajišťuje to, aby se radiofarmakum dostalo do cílového místa, a radioaktivní složku, která nám umožňuje stopování radiofarmaka nebo v terapii zajišťuje ozáření cíleného místa. Monoklonální protilátky mají vysokou selektivitu k danému cíli *in vivo*, a mohou být použity jako vektory, na která jsou navázána cytotoxická léčiva nebo radionuklidy, nebo obojí. Radioaktivně značené protilátky jsou povolené k použití od roku 2002. [36, 37, 39, 48, 49]

Parenterální radiofarmaka se nejčastěji používají ve formě tzv. kitů. Kit je neradioaktivní přípravek, který je určený k pozdějšímu spojení s radionuklidem. Jedná se o injekční lahvičku se zátkou, ke které se v čas potřeby přidá radiofarmakum.

Značení kitů často probíhá radionuklidy získanými z radionuklidových generátorů. Nejčastěji se v nukleární medicíně využívají ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a ^{68}Ge - ^{68}Ga generátory. Následně je možné připravit radiofarmakum smícháním radionuklidu s kitem. Příprava radiofarmak probíhá na odděleních nukleární medicíny nebo v prostorách lékárny schválených Státním ústavem pro jadernou bezpečnost. [36]

Jak bylo uvedeno výše, pro diagnostiku se využívají radionuklidy emitující γ - a β^+ -záření, pro terapii se využívají radionuklidy emitující α - a β^- záření nebo Augerovy elektrony. Elektronové zářiče jsou v terapii používány již od roku 1936. Prvním do praxe uvedeným byl radionuklid fosfor-32 a také sodík-24, které se aplikovaly v léčbě hematologických malignit. Mezi nejdéle používané β^- -zářiče patří jod-131, který je používán v terapii léčby Graves-Basedowy choroby štítné žlázy. Mezi další terapeuticky úspěšně aplikované β^- -zářiče patří lutecium-177 a ytrium-90. Mezi α -zářiči je v současné době nejpoužívanější radium-223, nejčastěji v podobě $^{223}\text{Ra}[\text{RaCl}_2]$, který se jako analog vápníku zabudovává do kostí a slouží k léčbě kostních metastáz u karcinomu prostaty. Před použitím radiofarmaka je potřeba ověřit radionuklidovou čistotu, radiochemickou čistotu a také určitou specifickou aktivitu. [35, 38, 44]

Výběr radionuklidu se řídí tím, jaké emituje záření, velikostí budoucího radiokonjugátu, poločasem radioaktivní přeměny, farmakokinetikou nosiče (protilátka, peptid, buňka) a množstvím emitovaných částic nebo fotonů. Tato kritéria jsou důležitá jak pro diagnostický nebo terapeutický efekt, tak pro ochranu pacienta a personálu. Záření s vyšším ionizujícím efektem je dobré k léčbě větších nádorů jako je pro β^- -zářič ytrium-90, nebo záření s nižším ionizujícím efektem k ozařování menších nádorů jako je pro β^- -zářič lutecium-177. Ačkoliv má α -záření vyšší ionizující efekt, α -částice putuje na kratší vzdálenost, a proto se α -zářiče hodí pro terapii nejmenších nádorů nebo metastáz. U velkých nádorů, které mají odlišený vnější obal nádoru od svého jádro, je lepší použít β^- -zářiče než α -zářiče, které by ozařily téměř jen obal a jádro tumoru by zůstalo nedotčeno. [35, 44]

Významným kritériem pro volbu vhodného radionuklidu jak pro terapii nebo diagnostiku je i poločas rozpadu. Pokud se radionuklid distribuuje v organismu delší dobu, což bývá například u radionuklidu navázaného na protilátku, je dobré použít radionuklid s delším poločasem a naopak. Zároveň je potřeba, aby poločas rozpadu radionuklidu nebyl ani příliš dlouhý ve srovnání s tím, jak dlouho bude setrvávat

radionuklid v nádoru. To by mohlo vést k jeho redistribuci do jiných než cílových tkání. [35, 44]

3.11 Zobrazovací metody v nukleární medicíně

Zobrazovací metody v nukleární medicíně využívají radionuklidy k tomu, aby prezentovaly funkčnost jednotlivých orgánů nebo lokalizovaly nádor či nějaký patologický stav a také pro monitoring progresu léčby onemocnění. Základní typy zobrazovacích metod jsou scintigrafie, výpočetní tomografie SPECT a PET, a hybridní zobrazování PET/CT, SPECT/CT a PET/MR. [38]

3.11.1 Scintigrafie

Scintigrafie je realizována pomocí přístroje zvaného gamakamera. Gamakamera je zařízení, které je schopné detekovat a lokalizovat γ -záření. Zobrazením γ -záření se vytváří obraz, ze kterého je zřejmé, jaké je rozložení radiofarmaka v těle pacienta. Nejdůležitější součástí gamakamery je detekční systém, který je zodpovědný za detekci signálu z γ -záření. Je tvořený kolimátorem, scintilačním krystalem, fotonásobičem a výpočetní elektronikou. Po aplikaci radiofarmaka se radionuklid (například technecium-99m, galium-67 nebo krypton-91m) zbavuje nadbytečné energie v podobě vyzářeného γ -fotonu. Část fotonů je poté zachycena gamakamerou. Kolimátor je deska z olova, která zachycuje fotony. Obsahuje spousty malých otvorů, které propouští kolmo letící fotony dále do kamery. Scintilační krystal je deska z NaI(Tl), je důležitá pro konverzi γ -fotonu na fotony viditelného světla nebo ultrafialového záření. Fotonásobiče slouží ke konverzi světla vzniklého pomocí scintilačního krystalu na elektrický signál. Výpočetní elektronika poté signál zpracuje do výsledného obrazu. [36, 42]

Scintigrafie se dělí na dynamickou, statickou a celotělovou. Při vyšetření pomocí statické scintigrafie vzniká snímek, který zobrazuje informaci o funkci daného orgánu. Například se dá tímto způsobem zjistit perfúze ledvin. Celotělová scintigrafie slouží k zobrazení celého těla, například je možné zobrazit celou kostru k detekci kostních metastáz. Dynamická scintigrafie slouží k zobrazení průběhu dějů, kdy gamakamera vytvoří více snímků dané oblasti v čase, kdy se mění aktivita s časem. Ke scintigrafickému vyšetření je možné použít jeden nebo více radionuklidů, při použití více radionuklidů můžeme zároveň získat více informací najednou, například při

vyšetření plic pomocí technecia-99m a kryptonu-81m zároveň zjistíme plicní perfúzi i plicní ventilaci. [38]

3.11.2 Pozitronová emisní tomografie

Pozitronová emisní tomografie tzv. PET je technika, která využívá pozitronových zářičů, tj. emitorů β^+ -záření a zobrazuje tkáň, ve kterých se akumuluje pozitronový radionuklid například fluor-18 nebo uhlík-11. Snímání probíhá v rozsahu úhlu 360° okolo pacienta. V momentě, kdy se pozitron spojí (anihiluje) s náhodným elektronem, vznikají 2 anihilační γ -fotony emitované v opačných směrech, které jsou následně současně detekovány prstencem detektorů PET přístroje. Poté se z naměřených signálů rekonstruuje obraz. Pro PET vyšetření se často využívá ^{18}F -značená fluorodeoxyglukóza ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), která se hromadí v místech se zvýšeným metabolismem glukózy, například v nádorech nebo v mozku. PET je možné využít i pro tvorbu dynamických snímků. Pro zobrazování pomocí technologie PET je možné použít například i galium-68, zirkonium-89, měď-64, ytrium-89 nebo skandium-44. [38, 48, 49]

3.11.3 Jednofotonová emisní výpočetní tomografie

Jednofotonová emisní výpočetní tomografie tzv. SPECT je metoda nukleární medicíny využívající γ -fotony uvolňující se při γ -přeměně k zobrazování tkání a orgánů. SPECT využívá stejné gamakamery jako scintigrafie, podmínkou je otočná gamakamera. Dnešní SPECT přístrojová technika obsahuje 2-3 gamakamery. SPECT snímání je založeno na vytvoření více snímků z různých úhlů, ze kterých se při zpracování vytvoří řez orgánu. SPECT je možné využít k dynamické tomografii. Pro zobrazování pomocí SPECT je možné využít například radionuklid technecium-99m, indium-111, galium-67 nebo i lutecium-177. [40, 50, 51]

3.11.4 Hybridní zobrazování

Hybridní zobrazování znamená, že se spojí obrazy vzniklé metodou nukleárního zobrazování s obrazem, který zachycuje například morfologickou strukturu daného orgánu, jelikož samostatné metody nukleární medicíny ukazují funkčnost daného orgánu, ale nedokáží nám zobrazit jejich morfologii nebo strukturu. V současné době se stále více dává přednost hybridnímu zobrazování, hlavně u PET, protože nám poskytuje

komplexnější pohled na oblast zájmu. Jedná se zejména o kombinaci výpočetní tomografie (CT, *anglicky* computed tomography) s PET nebo SPECT technikou označovaných jako PET/CT nebo SPECT/CT, případně o kombinaci magnetické rezonance (MR, *anglicky* magnetic resonance) s PET nebo SPECT technikou označovaných jako PET/MR nebo SPECT/MR. Výhody využití CT jsou v tom, že se dokáže přesně lokalizovat morfologie cílového místa, což pomáhá diagnostice. [38]

Magnetická rezonance je neinvazivní vyšetření, ze kterého získáme 3D detailní anatomické zobrazení tkáně nebo orgánu. MR se používá k diagnostice a monitorování léčby. MR obsahuje silné magnety, které vytváří silné vnější magnetické pole a tím způsobují celotělovou magnetizaci. Pomocí této technologie se excitují protony vodíku, které se nacházejí zejména ve vodě tvořící živé tkáně, a následně se detekuje energetická změna těchto protonů. [52]

Výpočetní tomografie je metoda, která k zobrazování používá rentgenové záření. Vytváří průřezové snímky, ze kterých je možné poskládat 3D obraz, který pomáhá lokalizovat například nádory. Během hybridního zobrazování SPECT/CT je CT v režimu nízkého ozáření pacienta, což zároveň znamená, že rozlišení je také nízké. PET/CT využívá standartní dávky ozáření, má tedy i lepší rozlišení obrazu. [38, 53]

3.12 Způsoby radioaktivního značení protilátek

Protilátka je možné spojit s radionuklidem dvojitým způsobem, tj. přímým nebo nepřímým navázáním. Nepřímé značení znamená, že se protilátka spojí s radionuklidem prostřednictvím ligandu, který má nejčastěji charakter bifunkčního chelátoru. Oproti tomu přímé značení znamená, že se radionuklid naváže kovalentní vazbou přímo do struktury MAb bez účasti linkeru. [50]

3.12.1 Přímé značení protilátky jódem

Pro přímé značení se nejčastěji využívají radiohalogeny a to především vybrané izotopy jódu jako jód-123, jód-125 a jód-131, které mají delší, a tedy vhodnou dobu poločasu rozpadu. Výhodou je i znalost chemických vlastností radionuklidů jódu. Radionuklidy jódu vytvářejí silné kovalentní vazby, které minimálně ovlivňují strukturu MAb. Značení probíhá přímou halogenací tyrozinových nebo histidinových zbytků za přítomnosti enzymatických nebo chemických oxidačních činidel, jako jsou jodogen

nebo chloramin T, které převedou jodid sodný na jodidový kationt, který se následně váže na tyrozinové nebo histidinové zbytky. [50]

3.12.2 Nepřímé značení protilátky

Nepřímé značení protilátky probíhá pomocí bifunkčních chelátorů (BFCs, *anglicky* bifunctional chelators), na které se naváže do jednoho vazebného místa protilátka a do druhého radionuklid. Nepřímé značení se využívá pro všechny radionuklidy ze skupiny kovů, jako je i v této práci použité galium-67. Výběr chelátoru závisí na fyzikálních vlastnostech a oxidačním stavu radionuklidu. Chelátor poskytuje donorové elektrony, které tvoří komplex s kovovým iontem. [50]

3.12.3 Chelátová činidla

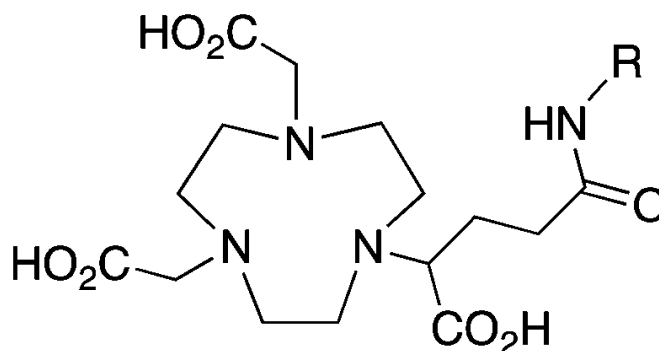
Chelátová činidla jsou chelatuující látky s oblibou využívané pro nepřímé značení zejména biologicky aktivních látek jako peptidů, MAbs, nukleotidů nebo nanočástic radionuklidy charakteru radiometalů. Chelátová činidla nejenom vážou radiometal pomocí minimálně jedné kovaletní vazby, ale navíc obsahují další funkční skupinu, kterou jsou navázána na vektor, tj. biomolekulu. Tento typ chelátových činidel se označuje jako BFC. Proces vazby BFC na biomolekulu se označuje jako konjugace. V případě MAb mluvíme o imunokonjugaci. Běžné konjugační techniky využívají funkční skupiny jako jsou karboxylové skupiny nebo aktivované estery (například N-hydroxysukcinimid ester), díky kterým BFC váže protilátku i radionuklid kovového charakteru. Aby byl výsledný komplex radioligand-chelátor stabilní *in vivo*, tedy aby se v *in vivo* prostředí neuvolňoval radiometal, je důležité, aby měl komplex vysokou termodynamickou i kinetickou stabilitu. Zároveň je nutné, aby vazba chelátoru negativně neovlivňovala vazbu protilátky na cíl. [50, 54]

Při konjugaci nejprve vzniká vazba mezi chelátorem a protilátkou. Kovalentní vazba mezi protilátkou a chelátorem většinou vzniká prostřednictvím Michaelovy adice, nejčastěji konjugací lysinu s karboxylovými kyselinami a isothiokyanátem nebo s thiolem a maleinimidem. Tyto reakce kvůli stabilitě protilátky probíhají v prostředí o pH 7-9, a za teploty 25-37°C. Je důležité, aby k vazbě chelátoru došlo v místě mimo vazebnou doménu. Čím je MAb větší, tím je větší pravděpodobnost, že se chelátor naváže na lysin mimo vazebnou doménu, případně je možné upravit MAb tak, aby se vytvořilo konkrétní vazebné místo mimo Fab části. Pro funkčnost imunokonjugátu je

důležité udržet množství navázaných chelátorů na protilátku v počtu 1-2, aby se nenarušila normální biodistribuce MAb. [49, 51, 54]

BFCs rozlišujeme podle struktury na makrocyclické a acyklické. Makrocyclické chelátory sice snáze vytvářejí vazby, z termodynamického pohledu vyžadují totiž nižší energii pro vznik vazby, nicméně značení bývá více účinné u acyklických chelátorů. Acyklické chelátory naváží kovový radionuklid i za 15 minut při pokojové teplotě, makrocyclické chelátory naváží radionuklid většinou za 60-95 minut při vyšší teplotě. Mezi nejčastěji užívané makrocyclické chelátory patří DOTA (kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová), TETA (N'-[2-(2-aminoethylamino)ethyl]ethan-1,2-diamin), NOTA (kyselina 2-[4,7-bis(karboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl]octová), TRAP (kyselina 3-[[4,7-bis[[2-karboxyethyl(hydroxy)fosforyl]methyl]-1,4,7-triazonan-1-yl]methyl-hydroxyfosforyl]propanová) a NODAGA (1-glytaryl-4,7-diacetyl-1,4,7-triazocyclononan) (Obrázek 4). Mezi acyklické chelátory se řadí například DTPA (kyselina diethylentriaminpentaoctová), DFO (deferoxamin) a maleimidový derivát YM103. V současné době jsou nejvíce v praxi používanými chelátory acyklický DFO a makrocyclická DOTA a NOTA. [51, 54, 15]

Zlatým standardem k chelataci galia-67 je chelátor NOTA, který umožňuje konjugaci při přijatelné teplotě (maximálně 37 °C) a při délce inkubace 30-60 minut. Výsledný konjugát vykazuje dobrou *in vivo* stabilitu. Galium-67 je stabilní při konjugaci s dalšími chelátory jako například DTPA nebo NODAGA (derivát NOTA). Při některých studiích [55] bylo vyzkoušeno, že NODAGA váže galium-67 oproti NOTA rychleji a při pokojové teplotě. Vyjma galia-67 se NODAGA chelátor v praxi využívá pro konjugaci s radiometaly galium-68, indium-111, měď-64 a technecium-99m. [54, 55, 56]



Obrázek 4: Struktura NODAGA chelátoru, převzato z [54].

3.13 In vitro vazebné studie

V rámci vývoje radiofarmak se testuje mnoho různých molekul zejména biologického charakteru. Protože je testování *in vivo* drahé, časově náročné, a především zahrnuje laboratorní zvířata, byly vyvinuty různé *in vitro* testy, které zkoumají interakce mezi radiofarmakem a cílovou strukturou zejména charakterem receptoru. *In vivo* se poté zkoumají ty molekuly, které vykazují nejlepší výsledky *in vitro*. Také je důležité, aby bylo dané radiofarmakum co nejlépe prozkoumané, než je poprvé podáno pacientovi z hlediska jeho bezpečnosti. Mezi *in vitro* vazebné studie zkoumaného radiofarmaka patří saturační studie, internalizační studie, kompetitivní studie a efluxní studie. [57]

In vitro studie nezaručují, že radiofarmakum bude účinné také *in vivo*, protože látka může být nestabilní, může mít nízkou biodostupnost, může se pomalu vylučovat nebo může kompetovat o receptor s jinými sloučeninami. Tyto záležitosti snižují vychytávání sloučeniny receptorem nebo zvyšují toxicitu radiofarmaka. [57]

3.13.1 Saturační studie

Při saturačních studiích se zkoumá specifické receptorem zprostředkované vychytávání radioligandu. Analyzuje se množství radioligandu, které je potřebné k saturaci receptoru. Tyto studie umožňují zjištění dvou parametrů, B_{max} a K_D . Parametr B_{max} je číslo udávající množství receptorů exprimovaných na buňce vyjádřených na množství proteinu, a parametr K_D je označením pro rovnovážnou disociační konstantu charakterizující afinitu radiofarmaka k cílové struktuře. K_D lze vyjádřit jako poměr mezi rychlostní konstantou disociace (K_{off}) a mezi rychlostní konstantou asociace (K_{on}) po dosažení rovnovážného stavu. Nižší hodnoty K_D znamenají vyšší afinitu k receptoru, protože je nižší míra disociace navázaného radiofarmaka z vazby na cílovou molekulární strukturu, a tedy je i vyšší pravděpodobnost *in vivo* afinity. [57]

$$K_D = \frac{K_{off}}{K_{on}}$$

3.13.2 Internalizace

Internalizační studie by měla předcházet saturační studii, jelikož se při ní zjišťuje čas potřebný pro receptorem zprostředkovanou vazbu a transport radiofarmaka do buněk. Zkoumá se tedy čas, za který proběhne internalizace bez dosažení rovnovážného

stavu radiofarmakum-receptor. Tato měření jsou vhodná proto pouze pro buňky, které internalizují radioligandy. Čím je internalizace *in vitro* rychlejší, tím je větší pravděpodobnost, že *in vivo* distribuce bude úspěšnější. [57]

3.13.3 Kompetitivní studie

Při kompetitivní studii zjišťujeme hodnotu inhibiční koncentrace (IC_{50}). Inhibiční koncentrace odpovídá koncentraci testovaného ligandu, která je potřebná ke snížení specifické vazby radioaktivně značeného standardu o 50 %. IC_{50} patří též mezi indikátory afinity ligandu k receptoru. Platí, že čím je IC_{50} nižší, tím je afinita ligandu k receptoru vyšší. [57]

3.13.4 Efluxní studie

Tato studie určuje množství radiofarmaka, které se po internalizaci zpětně uvolní z buněk. Díky zjištění rychlosti a množství uvolněného radiofarmaka se získá informace o tom, jak buňky zadržují radioligand. Rychlý eflux může značit, že se v *in vivo* prostředí zadrží málo radiofarmaka. Naopak pomalá ztráta radiofarmaka vede k tomu, že se radioligand v *in vivo* prostředí udrží dlouhou dobu v cílových buňkách. Efluxní studie probíhají po internalizačních studiích. [57]

3.13.5 Real-time analýza

Výše uvedené způsoby charakterizace nově připraveného radiofarmaka jsou manuálně prováděnou metodou, která se označuje jako end-point analýza. Její nevýhodou je nemožnost průběžného sledování prováděné analýzy, která se vyhodnocuje až po skončení inkubace. Tuto nevýhodu překonávají real-time analýzy. *In vitro* automatické analýzy umožňují sledování v reálném čase různých kinetických parametrů jako je asociace a disociace radioligandů pro stanovení K_D , rychlost internalizace a případného efluxu, nebo stanovení hodnoty inhibiční koncentrace. Nevýhodou těchto metod je finanční náročnost přístrojového vybavení. Měření může probíhat na buněčných kulturách, nebo jen samotných na platformy zakotvených cílových strukturách jako jsou receptory, nebo i na izolovaných živých tkáních. Mezi výhody měření v reálném čase patří jednodušší pracovní postup a přesnější určení vazebné rovnováhy, a tedy přesnější výsledky, které díky kontinuálnímu měření více přibližují *in vivo* podmínky. [57, 58]

Příkladem těchto real-time analýz jsou systémy od Biacore™ a Ridgeview reprezentovaný přístrojem LigandTracer™. Přístroj LigandTracer™ je přímo konstruován pro real-time analýzu interakce radioligandu s cílovou strukturou především proteinového charakteru. Modifikace LigandTracer™ umožňují analýzu s β -zářiči ve verzi White, nízkoenergetickými γ -zářiči ve verzi Grey a vysokoenergetickými γ -zářiči ve verzi Yellow. Vedle toho verze LigandTracer™ Green umožňuje analýzu v reálném čase pro fluorescenčně značené ligandy potažmo farmaka (Obrázek 5). [59, 60]



Obrázek 5: Varianty přístroje LigandTracer™ pro měření silného γ -záření (A), β záření (B), slabého γ -záření (C) a fluorescenčního záření (D), převzato a upraveno z [60].

4 Cíl a zadání práce

Tato práce se zabývala přípravou ^{67}Ga -značené monoklonální protilátky carotuximab s následnou analýzou její radiochemické čistoty a *in vitro* buněčnými studii pro charakterizaci interakce připraveného radiofarmaka [^{67}Ga]Ga-NODAGA-carotuximab s buněčným receptorem CD105, na který protilátka cílí. Cílem této práce bylo pomocí internalizačních, saturačních a kompetitivních studií určit, zda má ^{67}Ga -značená protilátka carotuximab po konjugaci s bifunkčním chelátorem a použitým radionuklidem stále silnou afinitu k angiogennímu receptoru CD105.

V rámci přípravy byla nejprve chimérická monoklonální protilátka carotuximab konjugována s chelatačním činidlem NODAGA a následně radioaktivně značena radionuklidem galium-67. Během konjugačního procesu bylo zjištěno průměrné množství molekul chelátoru NODAGA na jedné molekule protilátky. Po radioaktivním značení byla určena čistota radioimunokonjugátu pomocí HPLC analýzy s radiometrickou detekcí. Pokud čistota připraveného [^{67}Ga]Ga-NODAGA-carotuximabu nevyhovovala lékopisem předepsané čistotě ($\geq 95\%$), došlo k jejímu přečištění pomocí gravitační chromatografie.

Hlavní částí experimentální studie bylo stanovení afinity radioimunokonjugátu [^{67}Ga]Ga-NODAGA-carotuximab k buňkám, které ve velké míře exprimovaly receptor CD105. Konkrétně byla použita buněčná linie izolovaná z lidského renálního karcinomu (A498). Nejprve byla provedena internalizační studie, následně saturační studie a nakonec kompetitivní studie pro stanovení inhibiční koncentrace. Naměřená data byla zpracována v programu MS Office Excel a vyhodnocena v programu GraphPad Prism. Získané výsledky byly porovnány s hodnotami nalezenými v literatuře v diskusi diplomové práce.

5 Experimentální část

5.1 Použité přístroje a software

Analytické váhy (Sartorius analytic)

Automatické pipety (v pipetovacím rozsahu 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l; Ependorf Research plus)

Buněčný inkubátor (Sartorius Stedim Biotech product Certomat® CS-18)

Inkubátor (Sanyo Incubator MIR-153)

Bürkerova počítací komůrka pro kvantifikaci buněk (Brand)

Centrifuga U-32 R (Boeco)

Detektor povrchové kontaminace (Polon)

Digestoř (Polon)

Gamma Counter (Automatic Gamma Counter, Waltec Wizard2 3'', 2480 Perking Elmer)

HPLC systém (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies Inc.) s radiometrickou detekcí

Inkubátor (Sanyo Incubator MIR-153)

Nesterilní buněčný inkubátor dry-bath (MS Science)

Laminární box (Bio Air Instruments)

Magnetické míchadlo (IKA RTC basic)

Mikrocentrifuga (Sprout, Heathrow Scientific)

Mikroskop (XDS-IR, OPTICA)

Multidávkovací pipeta (pipetovací rozsah 50 ml; Handy step, Brand)

Multikanálová pipeta (Comfort)

Nesterilní buněčný inkubátor dry-bath (MS Science)

pH metr (Eutech Instruments pH510)

Program GraphPad Prism 9.51

Program Excel (Microsoft Office 365)

Předvážky (Kern PLB 200-3)

Spektrofotometr (TECAN INFINITE M200 PRO)

Třepačka (Vortex V1 plus Biosan)

Vodní lázeň (Julabo, TW12)

5.2 Použitý materiál

Gravitační kolonka na pročištění biologických vzorků (Illustra™ NAP™ – 5 Columns Sephadex™ G-25 DNA Grade)

HPLC kolona (BIOSil Sec 250, 300 x 7,8 mm, BioRad Gel column)

HPLC vialky (Agilent Technologies)

Kahan (Schuett Phoenix)

Kultivační lahve o objemu 75 cm² a 182 cm² (TPP)

Odměrná baňka o objemu 1 l (Simax)

Pipetovací špičky o objemu 10 µl, 200µl, 1000 µl (Eppendorf)

Skleněná Pasteurova pipeta (Brand)

Sérologické jednorázové pipety o objemu 5, 10, 25 ml (TPP)

Vialkové inserty o objemu 250 µl (Agilent Technologies)

Zkumavka na mikrocentrifugaci Corning Spin-X UF, objem 500 µl, cut-off objem 50 kDa (Corning)

Zkumavka na centrifugaci Vivaspin 6, objem 6 ml, cut-off objem 50 kDa (Sartorius)

Zkumavka na centrifugaci VectaSpin Micro, cut-off objem 20 kDa (Corning)

Zkumavka na centrifugaci Amicon ultra (Millipore)

24-jamková destičky (TPP)

96-jamkové destičky (TPP)

5.3 Použité chemikálie

70% ethanol (Penta)

37% HCl (Sigma-Aldrich)

Arsenaso III reagent (Sigma-Aldrich)

Bradford Protein Assay (Sigma-Aldrich)

CaCl₂ (Penta)

Carotuximab (TRC105) ve fyziologickém roztoku (TRACON Pharmaceuticals)

Cu²⁺ ionty (Sigma-Aldrich)

Destilovaná voda (Millipore)

DMSO (Sigma-Aldrich)

EDTA (Sigma-Aldrich)

Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich)

Galium-67 (citrát galia ([⁶⁷Ga]GaC₆H₈O₇), Curium)

Glukóza (Penta)

Glycin (Sigma-Aldrich)

Hepes (Thermo Fisher Scientific)

KCl (Penta)

Kultivační médium (Eagle's Minimum Essential medium, ATCC)

Kyselina boritá (Lachner)

Kyselina octová (Penta)

L-glutamin (Sigma-Aldrich)

MgCl₂ (Penta)

NaCl (Penta)

Na₂HP₄ · 12H₂O (Penta)

NaH₂PO₄ · 2 H₂O (Penta)

NaOH (Penta)

NODAGA (ChemaTech)

Octan amonný (Sigma-Aldrich)

Pierce BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Scientific)

Pierce BCA Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific)

Triton X (Sigma-Aldrich)

Trypsin EDTA roztok (Sigma-Aldrich)

5.4 Použitý biologický materiál

A498 buňky (buňky lidského renálního karcinomu), produkce American Type Culture Collection (ATCC)

5.5 Pracovní postup

5.5.1 Postup pro přípravu fosfátového pufru

Fosfátový pufr (PBS) se využívá pro udržení pH v oblasti 7,4 pro oplach buněk a také jako mobilní fáze (MF) pro HPLC s hodnotou pH 6,8.

Pro přípravu 1 litru roztoku PBS pufru se naváží 8,01 g NaCl, 0,21 g KCl, 3,58 g Na₂HPO₄ a 1,56 g NaH₂PO₄. Navážené suroviny se rozpustí v destilované vodě a doplní destilovanou vodou do objemu 1 l. Následně se upraví pH roztoku pomocí NaOH na pH 6,8 nebo 7,4. Pufr je třeba uchovávat v ledničce, aby nepodléhal bakteriální degradaci.

5.5.2 Postup pro přípravu glycinového pufru

Glycinový pufr se používá pro *in vitro* vazebné studie na buněčných kulturách. Glycinový pufr slouží k oplachu buněk a k uvolnění komplexu receptor-protilátka z buněčného povrchu.

Pro přípravu 200 ml glycinového pufru o pH 2,8 se připraví 50 ml roztoku glycinu v destilované vodě o molární koncentraci 0,2 M (celkové množství 3 g glycinu do 0,2 litru destilované vody). K 50 ml roztoku glycinu se přidá 3,4 ml 0,2 M HCl a doplní se destilovanou vodou na celkový objem 200 ml.

5.5.3 Postup pro přípravu Krebs-Ringerova roztoku

Krebs-Ringerův roztok se využívá u *in vitro* vazebných studií jako internalizační roztok pro studovaný ligand, v našem případě radioaktivně značenou protilátku. Jeho výhodou je, že je izotonický, nepoškozuje buňky, a naopak jim poskytuje zdroj energie (glukóza). Navíc neobsahuje potenciálně interagující látky, které by ovlivňovaly vazbu a transmembránový transport značeného ligandu. Jedná se tedy o vhodné prostředí pro *in vitro* studie. Pro přípravu 1 l Krebs-Ringerova roztoku se naváží 7,1589 g NaCl, 0,4026 g KCl, 0,1332 g CaCl₂, 0,1626 g MgCl₂, 0,2865 g Na₂HPO₄, 0,0312 g NaH₂PO₄, 0,9909 g glukózy a 2,383 g Hepes (kyselina 2-[4-(2 hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová). Navážky se rozpustí a doplní do 1 l destilovanou vodou. Následně se změří pH roztoku a jeho hodnota se upraví na hodnotu 7,4 pomocí 1 M NaOH nebo 1 M HCl.

5.5.4 Postup pro přípravu dezintegračního roztoku

Dezintegrační roztok se používá pro dezintegraci buněk po proběhlých *in vitro* studiích, tímto vzniká buněčný lyzát. Pro přípravu dezintegračního roztoku se naváží 0,8 g NaOH, navážka se rozpustí v destilované vodě a následně se přidá 1 ml Tritonu X. Výsledný roztok se doplní destilovanou vodou do celkových 200 ml.

5.5.5 Kultivace buněčných linií

Buňky A498 jsou buňky izolované z lidského karcinomu ledvin a na svém buněčném povrchu exprimují cílový receptor CD105.

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích o ploše 182 cm² nebo 75 cm². V buněčném inkubátoru byly nastavené tyto podmínky: teplota 37 °C a vlhčený vzduch, který obsahoval 5 % CO₂. Ke kultivaci buněk A498 bylo použito Eagle's Minimum Essential médium s přidavkem fetálního bovinního séra (finální koncentrace 10 %) a L-Glutaminu (10 mM).

Samotná práce s buněčnými kulturami v laminárním boxu probíhala za sterilních podmínek. Nástroje potřebné při práci v laminárním boxu byly před umístěním do laminárního boxu očištěny 70% ethanolem, aby se udrželo sterilní prostředí uvnitř laminárního boxu. Hrdla lahví byla sterilována před otevřením a zavřením plamenem z kahanu umístěného v laminárním boxu. Práce v laminárním boxu probíhala v rukavicích, které byly před prací v boxu vydesinfikovány 70% ethanolem.

Před nasazením buněk do 24-jamkové destičky, která byla použita při *in vitro* experimentech, bylo potřeba lahve s buňkami vyjmout z inkubátoru a zkontrolovat je, zda nejsou kontaminované, a jaká je jejich konfluence, která vyjadřuje, do jaké míry je povrch kultivační nádoby porostlý buňkami. Je-li konfluence vyšší než 80 %, je potřeba buňky přesadit neboli pasážovat, což dle rychlosti růstu buněk vychází na každých 5-6 dní. Také je možné tyto buňky nasadit do 24-jamkové destičky, ve které byly buňky použity pro plánované *in vitro* experimenty. Do kultivační lahve byl přidán trypsin, který umožňuje uvolnění buněk od dna kultivační lahve a jejich následné přemístění. Nasazení buněk na 24-jamkové destičky probíhá 48 hodin před experimentem, kdy do každé jamky přijde 1x10⁵ buněk. Přesný počet buněk po jejich uvolnění tryptinem bylo zjištěno pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Takto nasazené buňky se kultivují za podmínek shodných s běžnou kultivací buněčných linií.

5.5.6 Konjugace carotuximabu s chelatačním činidlem NODAGA

Konjugace monoklonální protilátky carotuximab s chelátorem probíhala v podmínkách bez přítomnosti kovových iontů (metal-free), kdy zejména železité ionty se přednostně vychytávají chelatačním činidlem místo radionuklidu galia-67. Infuzní roztok carotuximabu byl purifikován na NAP-5 koloně do 500 μ L konjugačního roztoku borátového pufru (0,1 M, pH 8,6). K purifikované monoklonální protilátce carotuximab byl přidán roztok chelátoru EDTA (o koncentraci 10 nM, v poměru 1:4 mAb:EDTA), který vychytil případné zbylé iontové nečistoty. Inkubace trvala 30 minut za stálého míchání. Následovalo odstranění chelátoru EDTA pomocí centrifugace na SpinX mikrozkuhavce s filtrem pro filtraci (cut-off) molekul s molární hmotností menší než 50 kDa.

Po centrifugaci bylo stanoveno množství proteinu v roztoku protilátky pomocí Bradfordovy metody.

Podle zjištěného množství protilátky pro konjugaci s chelátorem NODAGA bylo k mAb přidáno adekvátní množství roztoku chelátoru. Navážený chelátor byl rozpuštěn v DMSO tak, aby se k roztoku mAb přidal v maximálním objemu 5 μ l. Protilátka carotuximab s NODAGA chelátorem byla konjugována ve třech molárních poměrech 1:20, 1:50, 1:100 (mAb:NODAGA), aby bylo ověřeno, který poměr bude nejvhodnější z hlediska počtu molekul chelátoru navázaného na molekulu protilátky.

Přečištěný roztok protilátky (vždy po 1 mg mAb) byl s chelátorem NODAGA konjugován po dobu 12 hodin za stálého míchání a laboratorní teploty. Po inkubaci byly roztoky přečištěny od nenavázaného chelátoru centrifugací v mikrozkuhavce SpinX s cut-off 50 kDa do PBS pufru (pH 6,8, metal-free). Po přečištění bylo opět stanoveno množství proteinu pomocí Bradfordovy metody a množství konjugovaného chelátoru na molekule mAb pomocí metody Arsenazo III.

5.5.7 Bradfordova metoda stanovení proteinu

Bradfordova metoda se používá pro stanovení koncentrace proteinu. Do 96-jamkové destičky bylo v triplicátu napipetováno 5 μ l vzorku a následně přidáno 250 μ l Bradfordova reagentu. Inkubace probíhala 15 minut v temnu za laboratorní teploty. Následovalo měření jamek se vzorkem na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Koncentrace proteinu byla stanovena na základě porovnání s rovnicí kalibrační

křivky, která byla získána ze vzorků standardů γ -globulinů v koncentračním rozmezí 0-2000 $\mu\text{g/ml}$ sestrojené v sešitě Excel MS Office.

5.5.8 BCA Protein Assay

Tato metoda se používá pro stanovení buněčného proteinu. Je méně citlivá než Bradfordova metoda, ale je možné ji použít pro vyšší množství proteinu ve vzorku. Ke stanovení se používá bicinchonní kyselina (BCA). Z každé jamky 24-jamkové destičky se odebere 2 x 20 μl lyzátu, který se umístí do 96-jamkové destičky. Množství proteinu bylo stanoveno z rovnice lineární závislosti kalibrační řady, která byla připravena za použití bovinního séra coby standardu o koncentraci v rozmezí 0-2000 $\mu\text{g/ml}$.

Ke každému vzorku lyzátu bylo přidáno 200 μl roztoku BCA Protein Assay směsného reagentu. Roztok na BCA Protein Assay se skládá z Reagentu A a Reagentu B v poměru 1:50. Následovala inkubace s buněčným lyzátem (20 μl) a roztokem pro BCA Protein Assay (200 μl) po dobu 30 minut v inkubátoru při 37 °C. Po inkubaci byl obsah destičky proměřen na spektrofotometru při vlnové délce 590 nm a dle kalibrační křivky se počítalo množství buněčného proteinu.

5.5.9 Stanovení poměru protilátka:chelátor pomocí metody Arsenazo III

Pro každý poměr carotuximab:NODAGA (1:20, 1:50, 1:100) byla provedena tři opakování konjugace. Pro každé měření metodou Arsenazo III bylo do 96-jamkové destičky napipetováno 10 μl vzorku připraveného roztoku NODAGA-carotuximab a 190 μl směsi Arsenazo III reagentu, kdy následovala inkubace po dobu 30 minut při 37 °C. Arsenazo III reagent (40 μM) byl připraven ze zásobního roztoku pro Arsenazo III (6,4 mM), octanového pufru a roztoku Cu^{2+} iontů (2 μl na 1 ml 40 μM roztoku Arsenazo III). Princip metody spočívá v kompetici Arsenazo III a NODAGA o Cu^{2+} ionty, kdy čím více měďnatých iontů je vázáno do komplexu Arsenazo- Cu^{2+} , tím je vyšší intenzita fialového zabarvení měřené spektrofotometricky. Vyhodnocení měřených vzorků NODAGA-carotuximab proběhlo na základě porovnání s rovnicí lineární kalibrační křivky standardů chelátoru NODAGA v koncentracích: 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 2000 $\mu\text{g/ml}$ v roztoku reagentu Arsenazo III a Cu^{2+} iontů. Postup přípravy kalibračních vzorků byl totožný s přípravou vzorků popsanych výše. Vyhodnocení probíhalo v programu Excel MS Office.

Ze zjištěného molárního množství protilátky ve vzorcích pomocí Bradfordovy metody a z molárního množství chelátoru ve vzorku s mAb zjištěného pomocí metody Arsenazo III byl vypočítán průměrný počet molekul chelátoru připadajících na 1 molekulu protilátky carotuximab.

5.5.10 Značení imunokonjugátu NODAGA-carotuximab pomocí galia-67

K 1 mg protilátky NODAGA-carotuximab v PBS pufru byly přidány 2 MBq radionuklidu galia-67 ve formě citrátu galia ($[^{67}\text{Ga}]\text{GaC}_6\text{H}_8\text{O}_7$). Následovala 20minutová inkubace při pokojové teplotě v olovem stíněném místě (olověné destičky). Po proběhlé inkubaci byla stanovena radiochemická čistota radioimunokonjugátu pomocí HPLC s radiometrickou detekcí.

5.5.11 Stanovení radiochemické čistoty pomocí HPLC

Radiochemická čistota byla stanovena pomocí HPLC s radiometrickou detekcí. Použitá separační kolona BIOSil Sec 250, 300 x 7,8 mm se sestává z gelově-permeační stacionární fáze, na které dochází k dělení analytů podle jejich molární hmotnosti, kdy se nejprve eluují látky s vyšší molární hmotností. Jako mobilní fáze sloužil PBS pufr o hodnotě pH 6,8.

V rámci HPLC měření bylo do vialky napipetováno 60 μl radioimunoligandu a 60 μl mobilní fáze – PBS. Na kolonu bylo poté aplikováno 100 μl vzorku. Radioimunokonjugát se eluoval v čase 7,0 minut, volné galium-67 se elovalo v čase 10,0 minut. Každá analýza probíhala 20 minut. Pokud byla zjištěna přítomnost volného galia-67 více než 5 %, byl roztok radioimunokonjugátu přečištěn pomocí eluce na NAP-5 kolonce. V případě přečištění následovalo stanovení koncentrace mAb pomocí Bradfordovy metody, jelikož může docházet k menším ztrátám proteinu na kolonce.

5.5.12 Internalizace

Při studiích internalizace se určuje časová závislost receptorem zprostředkovaného vstupu radioimunokonjugátu do buňky.

Internalizační studie probíhaly ve 24-jamkové destičce. 48 hodin před experimentem byly buňky nasazeny do 24-jamkové destičky v množství 1×10^5 v jedné jamce. Celkem bylo použito všech 24 jamek, kdy pro každý čas byl připraven triplikát jamek a jedna jamka byla pro určení nespecifické vazby.

Po 48 hodinách od nasazení byly buňky připraveny k použití. Nejprve bylo odstraněno médium, ve kterém buňky rostly. Internalizace byla posuzována v čase 30, 60, 90, 120, 150 a 180 minut. Do každé jamky a pro každý časový interval byl k buňkám přidán Krebs-Ringerův roztok s radioimunokonjugátem [^{67}Ga]Ga-NODAGA-carotuximabem (45 nM) o celkovém objemu 500 μl na jednu jamku v triplicátu, tedy celkově 18 jamek. Dále byla pro každý časový úsek stanovena nespecifická vazba, kdy byla k radioimunokonjugátu v Krebs-Ringerově roztoku přidána neznačená protilátka carotuximab v násobně vyšší koncentraci (1 μM) opět ve finálním objemu 500 μl na jednu jamku. Tento roztok pro NSB byl připraven pro každý časový úsek v počtu jednoho opakování, tzn. celkově 6 jamek.

Buňky v 24-jamkové destičce byly inkubovány při 37 °C. Po 30 minutách byl první triplicát a první jamka pro stanovení NSB zpracována následujícím způsobem. Z každé jamky byl odpipetován roztok s radioimunokonjugátem. Následně byly buňky 2 x opláchnuty 500 μl chlazeným PBS (pH 7,4), aby se zastavila internalizace. Roztok PBS byl vždy odpipetován. Následně bylo k buňkám přidáno 500 μl glycinového pufru (0,1 M, pH 2,8), který se nechal působit 1 minutu. Tento glycinový oplach, který štěpí povrchové receptory i s radioaktivně značenou protilátkou, byl odpipetován do mikrozkušavek, a ty byly proměřeny na Gamma Counteru pro stanovení receptorově vázané aktivity. Poté bylo k buňkám přidáno 500 μl roztoku Tritonu X s NaOH, který slouží k lýze buněk, a v tomto roztoku byly buňky inkubovány po dobu 10 minut při 37 °C. Po inkubaci bylo z každého buněčného lyzátu odpipetováno 2 x 20 μl na stanovení buněčné koncentrace pomocí metody BCA Assay. Zbýlý buněčný lyzát se z každé jamky přepipetoval do mikrozkušavek (1 mikrozkušavka na každou jamku) a následně se změřil na buněčnou aktivitu pocházející z internalizovaného radioimunokonjugátu na přístroji Gamma Counteru. Výše popsáný postup byl zopakován pro každý časový úsek.

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu MS Office Excel, ve kterém byla výsledná aktivita glycinového oplachu (aktivita radioaktivně značené mAb vázaná na povrchové receptory buněk) a aktivita radioimunokonjugátu, který se internalizoval do buněk (roztok lyzovaných buněk) přepočtena na množství buněčného proteinu stanoveného pomocí BCA Protein Assay. To vše bylo korigováno na nespecifickou vazbu. Výsledky byly poté graficky vyhotoveny za pomoci programu GraphPad Prism.

5.5.13 *In vitro* saturační studie

In vitro saturační studie slouží ke stanovení disociační konstanty K_D , která určuje afinitu protilátky k příslušnému receptoru.

48 hodin před experimentem byly nasazeny buňky (použily se buňky A498) do 24-jamkové destičky v množství 1×10^5 buněk v 1 jamce. 24-jamková destička s nasazenými buňkami byla ponechána v inkubátoru při teplotě 37 °C a vlhčeném vzduchu s 5 % CO₂. Na začátku experimentu se odsálo živné médium, buňky se 2x opláchly PBS pufr (pH 7,4) pro odstranění odumřelých a volně plovoucích buněk, a následně se přidáný PBS pufr odsál. Tím byly buňky připraveny k použití.

Při saturační studii byla nejprve připravena směs Krebs-Ringerova roztoku s [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab pro určení specifické vazby. Koncentrace radioimunokonjugátu v roztocích byla 3, 15, 45, 90, 180 a 360 nM. Pro každou koncentraci byl připraven triplikát jamek s 500 µl roztoku, tedy od každé koncentrace byl připraven triplikát. Buňky s roztoky byly ponechány 3 hodiny v inkubátoru při 37 °C.

Vedle toho byla pro korekci na nespecifickou vazbu (NSB) připravena další destička s buňkami, ke kterým se přidal Krebs-Ringerův roztok s radioimunokonjugátem ve stejných koncentracích tj., 3, 15, 45, 90, 180 a 360 nM, a navíc obsahující neznačenou protilátku carotuximab v násobně vyšší koncentraci (1 µM).

Po inkubaci bylo z každé jamky (tedy od buněk, které se inkubovaly se značenými protilátkami, a také těch, které se inkubovaly se značenou i neznačenou protilátkou) odsáto médium s následným přidáním 1 ml chlazeného PBS pufru, kdy pufr byl chlazený proto, aby se zastavila vazba mAb na receptory buněk. Pufr se následně odpipetoval. Oplach vychlazeným PBS se opakoval ještě jednou. K buňkám bylo přidáno 500 µl dezintegračního roztoku Tritonu X s NaOH pro buněčnou lyzaci, ve kterém byly buňky ponechány po dobu 10 minut při 37 °C v buněčném inkubátoru. Po 10 minutách bylo z každé jamky odebráno 2 x 20 µl lyzátu pro stanovení množství buněčného proteinu metodou BCA Assay. Lyzát z každé jamky byl odpipetován do samostatné mikrozkušavky a následně změřen na Gamma Counteru pro stanovení buněčně asociované aktivity. Tím byla zjištěna v buňkách vázaná aktivita, tedy kolik [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab se dostalo za 3 hodiny do buněk, či zůstalo vázané na receptorech buněčného povrchu.

Výsledek saturační studie byl vyhodnocen v programu MS Office Excel, ve kterém se výsledná buněčně vázaná aktivita přepočítala na množství buněčného proteinu stanovené pomocí BCA Assay, kdy výsledky byly dále korigovány na nespecifickou vazbu. Výsledný výpočet disociační konstanty K_D a tvorba saturačních grafů proběhla v programu GraphPad Prism.

5.5.14 Kompetitivní studie – stanovení hodnoty IC_{50}

Při kompetitivních studiích stanovujeme hodnotu inhibiční koncentrace IC_{50} tj. schopnost neznačeného ligandu inhibovat vazbu radioaktivně značeného ligandu, v našem případě [^{67}Ga]Ga-NODAGA-carotuximabu.

Buňky linie A498 byly nasazeny 48 hodin před experimentem do 24-jamkové destičky v množství 1×10^5 v jedné jamce a ponechány kultivovat v buněčném inkubátoru při 37 °C. Po 48 hodinách bylo od buněk odpipetováno kultivační médium.

Bylo připraveno 6 vzorků, které obsahovaly fixní množství radioimunokonjugátu (45 nM) v Krebs-Ringerově roztoku, a ke kterým se přidala neznačená protilátka carotuximab ve vzrůstajících koncentracích 0; 0,1; 1; 10; 100 a 1000 nM.

Od každého roztoku bylo přidáno 500 μ l do jamek s buňkami vyvedených v triplikátech. Inkubace probíhala po dobu 3 hodin při 37 °C v buněčném inkubátoru. Po 2 hodinách byl odsán roztok radioimunokonjugátu z jamek. Následně byly buňky opláchnuty 2 x 1 ml chlazeného PBS (pH 7,4), který se nechal působit 1 minutu a následně odsál. Poté byly buňky zlyzovány pomocí roztoku Tritonu X s NaOH po dobu 10 minut při 37 °C. Z každé jamky se odebralo 2 x 20 μ l buněčného lyzátu na stanovení koncentrace buněčného proteinu pomocí metody BCA Assay. Lyzát byl přepipetován do mikrozkuumavek a proměřen na Gamma Counteru pro zjištění výsledné buněčně vázané.

Naměřené hodnoty byly zpracovány v programu MS Office Excel, ve kterém byla změřená aktivita buněčného lyzátu, tedy buněčně asociovaná aktivita, přepočítána na množství buněčného proteinu. Graf s výslednou hodnotou IC_{50} byl vytvořen v programu GraphPad Prism.

6 Výsledky

6.1 Optimalizace počtu molekul chelátoru na molekule protilátky carotuximab

Záměrem testování molárních poměrů carotuximab:chelátor byla optimalizace počtu chelátorů na molekule protilátky. V případě, že by bylo navázaných chelátorů zbytečně mnoho, vyvstává riziko snížení vazebnosti protilátky na cílové receptory. Výsledek optimalizace konjugačních poměrů je shrnut v Tabulce 1 a zahrnuje pro každý molární poměr 3 opakovaná měření. Ideálním množstvím jsou 1-2 molekuly chelátoru na jednu molekulu monoklonální protilátky. Tento počet zajistí požadovaný výtěžek radioaktivního značení a zároveň snižuje riziko navázání chelátoru do vazebného místa monoklonální protilátky. Z toho důvodu byl jako nejlepší možný konjugační poměr carotuximab:NODAGA zvolen 1:20, u kterého vycházelo množství konjugovaných molekul NODAGA v počtu 5,4 na jedné molekule mAb. Tento zjištěný poměr byl tedy použit v dalších experimentech.

Tabulka 1: Výsledné hodnoty konjugačních poměrů TRC105:NODAGA

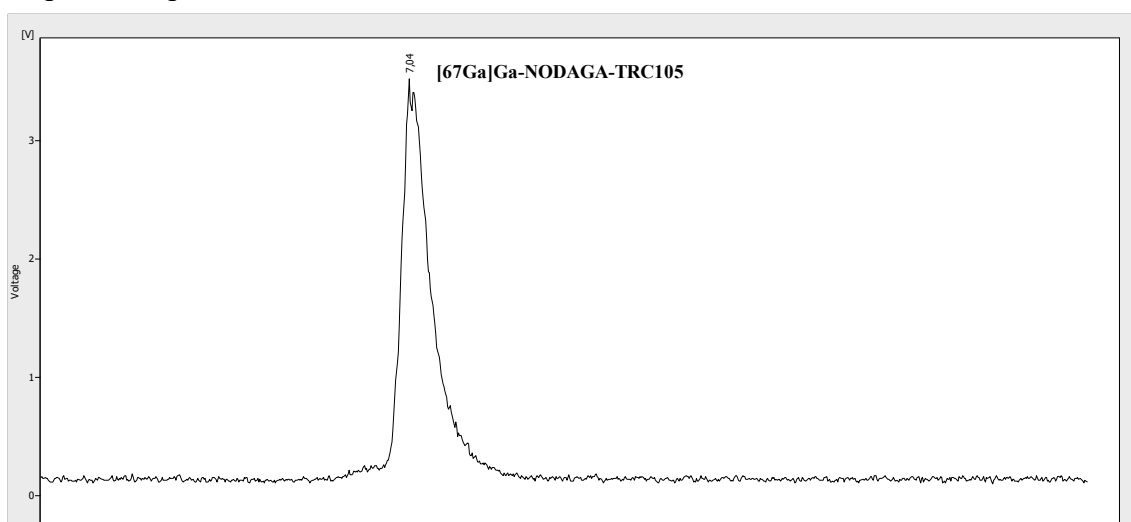
Testovaný konjugační poměr TRC105:NODAGA	1:20	1:50	1:100
Průměrné množství molekul NODAGA na jednu molekulu TRC105	5,4	6,8	8,2

6.2 Stanovení radiochemické čistoty pomocí HPLC

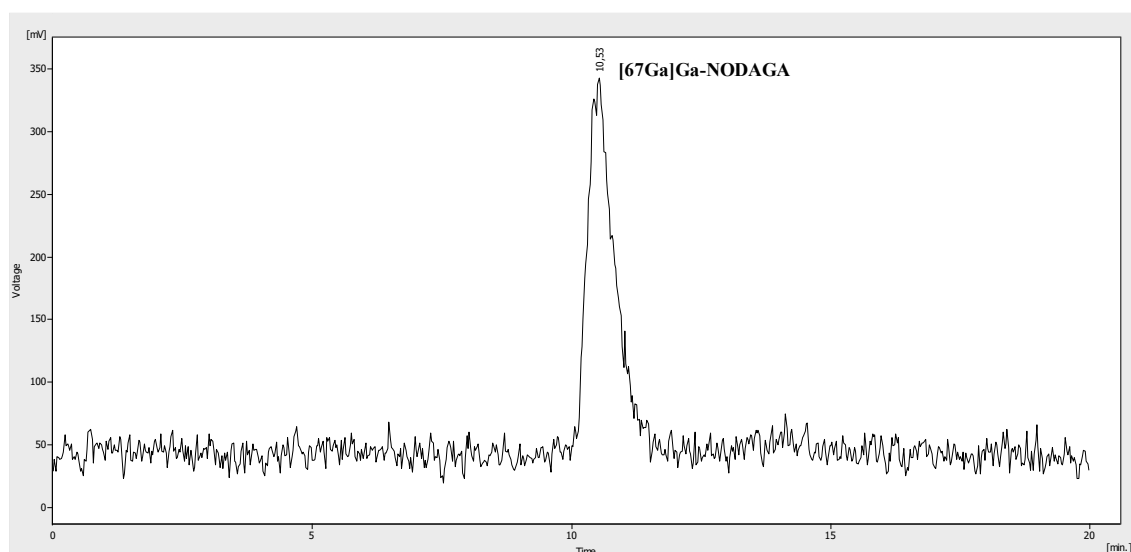
Stanovení radiochemické čistoty radioimunokonjugátu [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-TRC105 bylo realizováno pomocí HPLC s radiometrickou detekcí. Toto měření bylo podstatné, abychom měli pro následné *in vitro* testy ověřené, že se galium-67 v dostatečné míře (minimálně z 95 %) chelatovalo do imunokonjugátu

NODAGA-carotuximabu. A tedy že naopak v roztoku již není volné galium-67, které by mohlo negativně ovlivnit výsledek *in vitro* měření.

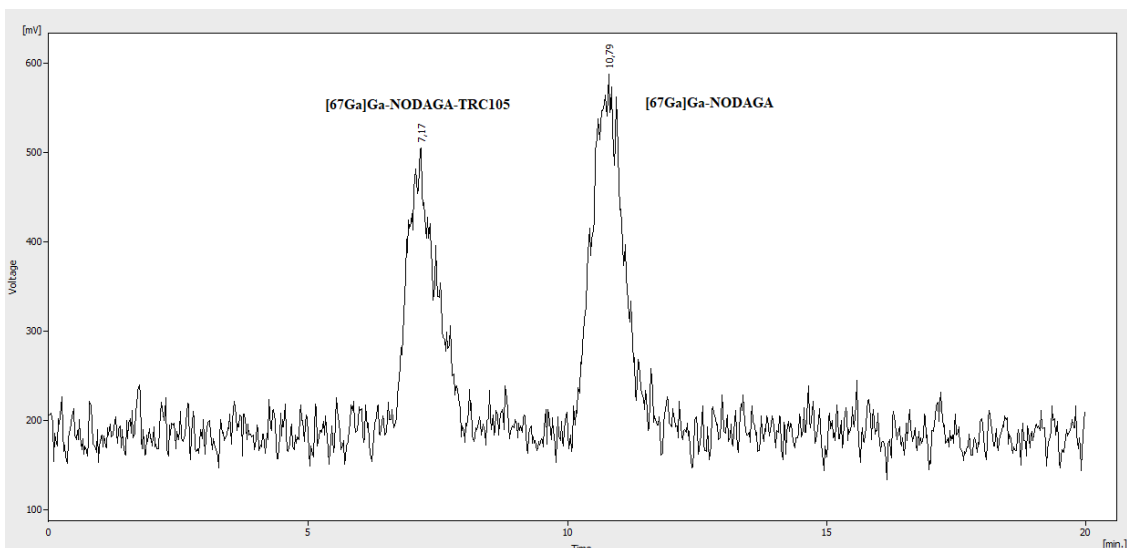
Radiochromatogram na Obrázku 6 znázorňuje radioimunokonjugát [^{67}Ga]Ga-NODAGA-TRC105, který eluoval v čase 7,04 minut. V tomto demonstrativním radiochromatogramu vzorek neobsahoval nečistoty v podobě volného galia-67. Radiochromatogram na Obrázku 7 demonstruje eluci nečistoty [^{67}Ga]Ga-NODAGA, která se eluovala v čase 10,53 minut. Na Obrázku 8 lze vidět radiochromatogram ^{67}Ga -značené mAb s přítomností radionečistoty v podobě na protilátku nenavázaného galia-67. Tento připravený radiopreparát byl před použitím přečištěn pro eliminaci volného radionuklidu.



Obrázek 6: Radiochromatogram znázorňující eluci radioimunokonjugátu [^{67}Ga]Ga-NODAGA-TRC105 bez obsahu radiochemických nečistot.



Obrázek 7: Radiochromatogram znázorňující volné galium-67 poutané v chelátoru NODAGA ([^{67}Ga]Ga-NODAGA) s elučním časem 10,53 minut.



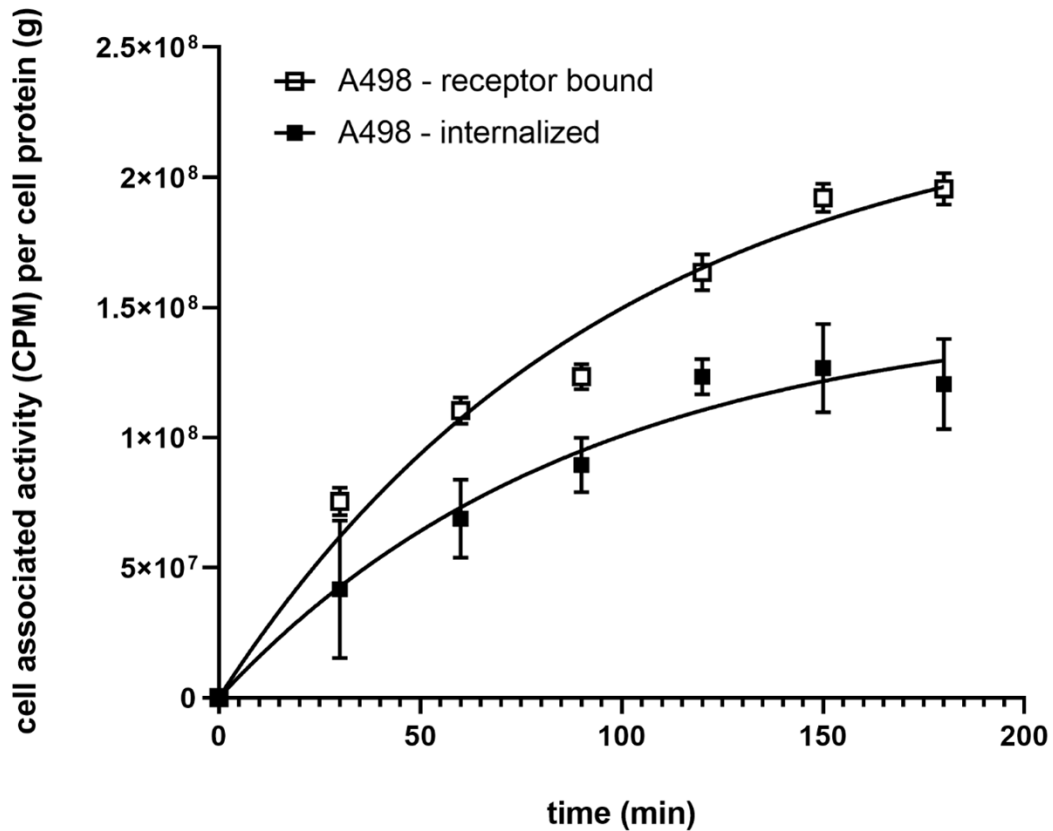
Obrázek 8: Radiochromatogram znázorňující $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-TRC105}$ ($\text{AUC} = 44.9\%$) společně radiochemickou nečistotou $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}$ ($\text{AUC} = 55.1\%$).

6.3 Internalizační studie s $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-TRC105}$

Při měření internalizace jsme sledovali, jak se $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-TRC105}$ v průběhu času (0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 minut) váže na buněčném povrchu na receptory CD150 (v grafu znázorněné jako prázdné čtverečky) a především transportuje do buněk (v grafu znázorněné jako plné čtverečky) z hlediska časového průběhu.

Z grafu je patrné, že ^{67}Ga -značená protilátka se v menším množství internalizovala do buněk a ve větším množství zůstávala navázána v komplexu protilátka-receptor na povrchu buněk. Též je zřejmé, že s časem narůstalo množství vázané protilátky na povrchu i v buňkách, avšak po přibližně 150 minutách bylo dosaženo rovnovážného stavu mezi vázanou a volnou frakcí značené protilátky, kdy se vytvořilo tzv. ekvilibrium, a aktivita se v čase 180 minut příliš nelišila od té ve 150. minutě, jak je zobrazeno v internalizačním grafu v Obrázku 9. Pro následující saturační studii a studii pro zjištění inhibiční koncentrace se jako inkubační čas použilo 180 minut.

$[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-TRC105}$

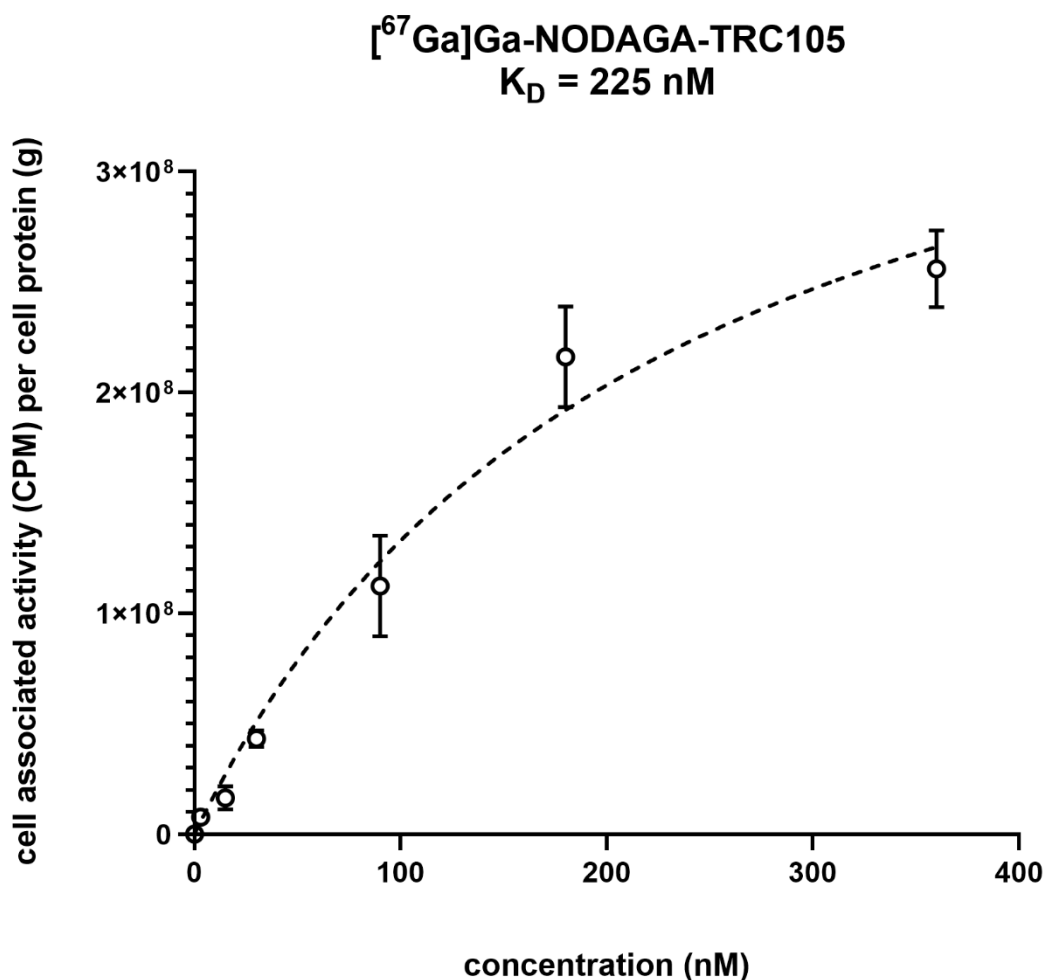


Obrázek 9: Graf internalizační studie $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-TRC105}$ znázorňující množství protilátky vázané na buněčných receptorech a internalizované do buněk v závislosti na čase ($n = 3$).

6.4 Saturační studie – stanovení disociační konstanty K_D $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-TRC105}$.

Při saturačních studiích bylo zjišťováno, jak se v závislosti na použitých koncentracích radioimunokongugátu (3, 15, 45, 90, 180 a 360 nM) váže ^{67}Ga -značená protilátka na cílové receptory s následnou buněčnou akumulací. Tím se zjistí, zda byla zachována afinita radioimunokongugátu k receptoru CD105. Změřená aktivita stanovená z buněčného lyzátu byla následně korigována na NSB a přepočítána na množství buněčného proteinu. Výsledné hodnoty byly zpracovány v programu GraphPad, který vypočetl hodnoty rovnovážné disociační konstanty K_D a konstruoval graf saturační křivky uvedené v Obrázku 10. Pro stanovenou K_D platí, že čím má nižší hodnotu, tím

vyšší je afinita radioimunokonjugátu k cílovému receptoru. Výsledkem třech opakovaných měření pro tři nezávislá radioaktivní značení imunokonjugátu NODAGA-carotuximab byla průměrná hodnota $K_D = 225 (\pm 6.6)$ nM.

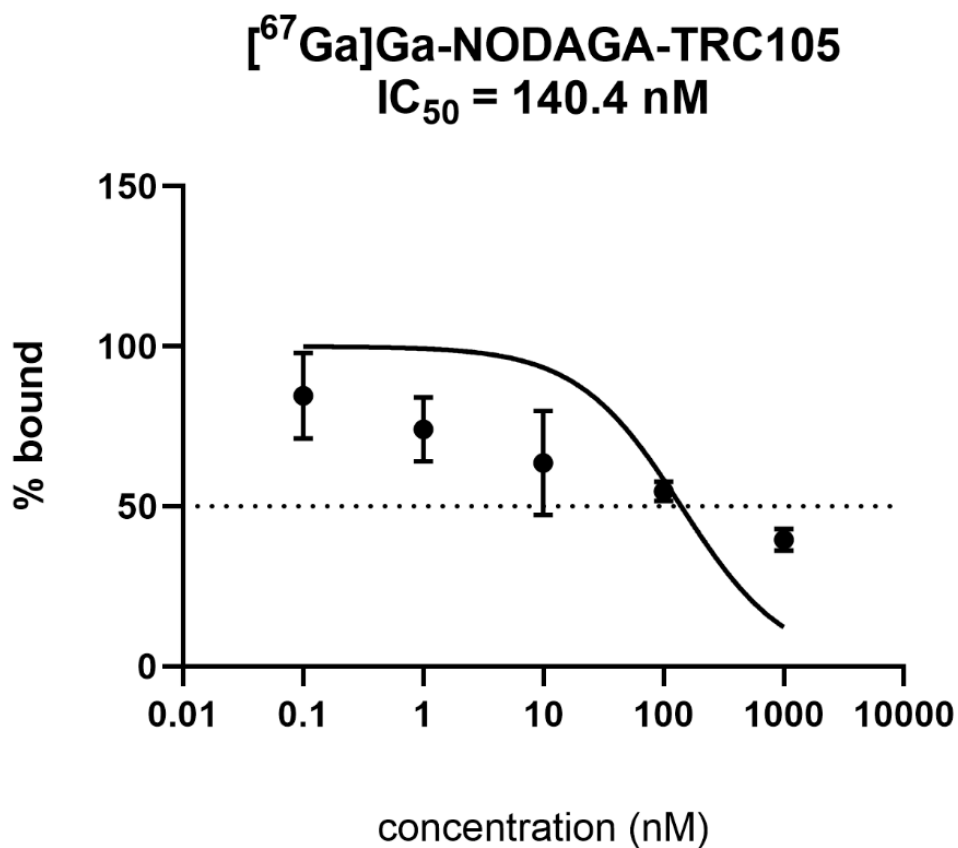


Obrázek 10: Graf saturační studie pro stanovení afinity [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-TRC105 k cílovému receptoru CD105 přítomnému na povrchu buněk A498 s výslednou hodnotou $K_D = 225 (\pm 6.6)$ nM ($n = 3$).

6.5 Kompetitivní vazebné studie – stanovení IC_{50}

Při kompetitivní studii určujeme hodnotu inhibiční koncentrace zkracovanou jako IC_{50} , tedy hodnotu koncentrace neznačené protilátky, která je potřeba k inhibici vazby [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-TRC105 na receptor CD105 z 50 %. Čím je hodnota IC_{50} nižší, tím je afinita radioimunokonjugátu k receptoru vyšší. Zjištěná hodnota inhibiční

koncentrace [^{67}Ga]Ga-NODAGA-TRC105 byla $\text{IC}_{50} = 140,4 (\pm 0,4)$ nM a výsledná křivka pro tři opakovaná měření je zobrazena v Obrázku 11.



Obrázek 11: Graf kompetitivní studie mezi neznačenou protilátkou carotuximab a její radioaktivně značenou formou [^{67}Ga]Ga-NODAGA-TRC105 s výslednou hodnotou $\text{IC}_{50} = 140,4 (\pm 0,4)$ nM ($n = 3$).

7 Diskuse

V současné populaci dochází vinou životního stylu a poškozeného životního prostředí ke zvyšující se incidenci nádorových onemocnění. Cílená léčba v podobě monoklonálních protilátek je v současnosti jedna z rozvíjejících se druhů cílené onkologické léčby. Mezi výhody léčby monoklonálními protilátkami se řadí jejich schopnost specificky zasahovat tkáně, které jsou předmětem zájmu, díky expresi proteinových struktur, jako jsou receptory, cílovými buňkami, proti kterým byly připraveny. Díky tomuto přístupu dochází k významnému snížení rizika zasažení okolní zdravé tkáně.

V této diplomové práci byla použita monoklonální protilátka carotuximab, která se váže na receptor CD105, který se podílí na regulaci angiogeneze. Angiogenní proces je důležitý pro růst nádorů, jejich zásobení živinami a případnou expanzi v podobě metastáz. Protilátka carotuximab byla úspěšně klinicky testována na dvě indikace, na věkem podmíněnou makulární degeneraci (AMD), a na některé typy nádorů (verze označovaná jako TRC105). V této práci byla použita monoklonální protilátka TRC105, která byla v minulosti testována pro onkologické indikace. Cílem předkládané diplomové práce bylo připravit [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab a následně s připraveným radioimunokonjugátem provést *in vitro* vazebné studie.

Carotuximab se dá stejně tak jako mnoho dalších MAbs využít pro radiodiagnostickou nebo radioterapeutickou aplikaci. V onkologii používané MAbs bývají velmi často radioaktivně značeny vybranými diagnostickými nebo terapeutickými radiometaly. K uskutečnění tohoto radioaktivního značení je potřeba protilátku modifikovat ligandem umožňujícím navázání radiometalu. Tento proces se označuje jako konjugace. Stejně tak byla i protilátka carotuximab konjugována s bifunkčním chelátorem NODAGA pro následné značení radionuklidem galium-67. Námí použitý chelátor NODAGA byl zvolen pro radioaktivní značení carotuximabu na základě své vhodnosti pro chelataci galia-67 potvrzenou dle dostupné literatury [55]. Nejprve tedy byla provedena optimalizace metody konjugace použitého chelátoru NODAGA s protilátkou TRC105, kdy bylo potřeba určit průměrné množství chelátorů, které se naváže na jednu molekulu protilátky. Ze tří testovaných poměrů nejlépe vyšel poměr 1:20 (TRC105:NODAGA), který vykazoval průměrně 5,4 chelátorů na molekulu protilátky. V literatuře publikované autory Chomet et al. [43] je uvedeno, že ideální množství chelátorů navázaných na molekule protilátky je v počtu jednoho až dvou.

Příliš nízké množství chelátorů poukazuje na to, že nebyly konjugovány všechny protilátky, což následně představuje riziko přítomnosti skupiny radioaktivně neznačených protilátek, které jsou významnou konkurencí radioaktivně značené formě protilátky ve vazbě na cílové struktury. Naopak příliš vysoké množství navázaných chelátorů představuje vyšší riziko snížené afinity radioaktivně značené protilátky k receptoru, protože chelátor se může navázat s vyšší pravděpodobností i na antigen vázající část protilátky Fab. Řešení tohoto problému může spočívat v modifikaci Fc části protilátky tak, aby se chelátor navázal na konkrétní upravené místo [43].

Po radioaktivním značení připraveného imunokonjugátu NODAGA-carotuximab galium-67 bylo pomocí analýzy HPLC s radiometrickou detekcí prokázána vysoká radiochemická čistota bez nutnosti dalšího přečištění radioimunokonjugátu. Výsledný radiochromatogram zaznamenal pouze eluci radioimunokonjugátu v očekávaném čase eluce. Množství radiochemické nečistoty volného galia-67 vyšší než 5 % by mohlo negativně ovlivnit výsledky *in vitro* testování. Výsledek analýzy radiochemické čistoty tedy potvrzuje i optimální podmínky konjugace a následného radioaktivního značení a též na vhodnost použitého chelátoru pro galium-67.

Radioimunokonjugát s vyhovující čistotou byl následně použit k *in vitro* vazebným experimentům zahrnujícím internalizační, saturační a kompetitivní studie provedené na buněčné kultuře A498 s potvrzenou expresí CD105 [61]. Internalizační studie analyzuje rychlost akumulace připraveného radioimunokonjugátu buňkami. Internalizační experiment umožnil sledovat, jak se [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab vázal na receptor CD105 na buněčném povrchu a jak se následně internalizoval do buněk. Výsledné hodnoty byly zpracovány do grafu v programu GraphPad Prism. Z výsledného grafu je patrné, že se ⁶⁷Ga-značené TRC105 internalizovalo do buněk v menší míře, než v jaké zůstalo navázáno na buněčných receptorech. To by mohlo poukazovat na pomalou nebo sníženou internalizaci komplexu carotuximab-CD105. Z výsledku měření internalizace byla zjištěna doba, která je potřebná k dosažení rovnováhy mezi receptorově vázanou a volnou frakcí [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab. Dle tvaru křivky tomu odpovídají časové úseky 150 až 180 minut. Pro následující saturační a kompetitivní studie byl vybrán inkubační čas 180 minut pro zajištění dostatečného času pro vazbu radioaktivně značené protilátky na receptory [57].

Při *in vitro* saturačních studiích byla zjištěna míra afinity $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-carotuximab}$ k receptoru. Z naměřených hodnot byla vypočítána hodnota rovnovážné disociační konstanty (K_D), pro kterou platí, že čím je její hodnota nižší, tím je afinita radioimunokonjugátu k CD105 vyšší, tj. tím nižší je pravděpodobnost zpětného vyvázání značené protilátky z vazby na receptor. Průměrná hodnota K_D z tří měření odpovídala hodnotě 225 ($\pm 6,6$) nM. Tato hodnota byla v porovnání s hodnotou neznačeného carotuximabu uvedenou v literatuře ($K_D = 0,014$ nM) [62] $1,6 \times 10^4$ větší, což značí zhoršenou afinitu radioimunokonjugátu k receptoru oproti neznačené protilátce. Tato skutečnost může být způsobena samotnou konjugací, protože vazba chelátoru může mít negativní vliv na schopnost protilátky tvořit vazbu s receptorem. V tomto případě mohl mít vliv počet chelátorů na molekulu protilátky (5,4 chelátorů na 1 molekulu protilátky), kdy se již může zvyšovat pravděpodobnost vazby chelátorů do Fab místa protilátky [43]. Další negativní vliv na afinitu radioimunokonjugátu může nastat při značení radioaktivní protilátkou. Tato skutečnost by však v této práci neměla být problém, jelikož značení bylo provedeno v prostředí PBS pufru a při teplotě 37 °C, což by mělo předcházet poškození protilátky a stále umožnit chelataci galia-67 chelátorem NODAGA. V publikovaných pracích autorů Zhang et al. a Egle et al. [63, 64], kteří značili TRC105 mědí-64 a galiem-66, nedošlo k výraznému zhoršení afinity vyjádřené hodnotou K_D po provedeném radioaktivním značení. Domníváme se, že nejpravděpodobnějším důvodem, proč v této práci došlo ke zhoršení afinity připraveného $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-carotuximab}$, byl relativně vysoký počet chelátorů NODAGA navázaných na protilátce. I tak byla afinita ^{67}Ga -značeného carotuximabu dostatečná pro případnou aplikaci v *in vivo* studii.

Při *in vitro* kompetitivních studiích byla stanovena hodnota inhibiční koncentrace, která určuje schopnost neznačeného ligandu inhibovat vazbu radioaktivně značeného ligandu. Její význam spočívá v tom, že čím nižší hodnota IC_{50} je, tím je afinita radioimunokonjugátu k CD105 vyšší. Průměrná naměřená hodnota inhibiční koncentrace ze tří opakování $\text{IC}_{50} = 140,4$ ($\pm 0,4$) nM dokazuje zachování dostatečné afinity k $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-carotuximab}$ k CD105.

Závěrem lze konstatovat, že se v této předkládané práci podařilo úspěšně připravit radiofarmakum $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-carotuximab}$, které ve svém *in vitro* testování na CD105 exprimujících buňkách potvrdilo z velké části zachování vazebného charakteru. ^{67}Ga -značená protilátka carotuximab by tak po případných nadějných

výsledcích i v *in vivo* testování mohla najít uplatnění při scintigrafii CD105 pozitivních nádorových onemocnění.

8 Závěr

Výsledkem předkládané experimentální práce bylo dosažení následujících výsledků:

- Při optimalizaci molárního množství přidávaného chelátoru pro konjugaci na cílovou protilátku carotuximab byly získány nejlepší výsledky pro konjugační poměr 1:20 (carotuximab:NODAGA). Tento poměr poskytoval množství molekul NODAGA vázaných na protilátku nejvíce se blížící údajům v literatuře.
- Optimalizací radioaktivního značení imunokonjugátu byla pro připravené radiofarmakum [⁶⁷Ga]Ga-NODAGA-carotuximab získávána hodnota radiochemické čistoty analyzovaná pomocí metody HPLC ve výši minimálně 95 %, což je v souladu s lékopisem.
- Z grafu internalizační studie bylo patrné, že zůstává větší množství radioimunokonjugátu ve vázané formě na buněčném receptoru CD105, než v jakém byl internalizován do buněk. Také byl z této studie určen optimální inkubační čas pro následnou saturační studii a kompetitivní studii. Jednalo se o čas 180 minut.
- Ze saturační studie provedené na buněčné kultuře A498 byla určena rovnovážná disociační konstanta $K_D = 225 (\pm 6.6)$ nM. Oproti K_D neznačeného carotuximabu se jednalo o cca $1,6 \times 10^4$ násobný rozdíl, který byl pravděpodobně způsoben přítomností stále vysokého počtu chelátorů na molekule protilátky, kdy se zde projevilo riziko vazby chelátoru do antigen-vázacího místa protilátky. Nicméně, i přes tento výsledek si ⁶⁷Ga-značená protilátka carotuximab zachovala afinitu k cílovému receptoru. Zjištěná hodnota inhibiční koncentrace ($IC_{50} = 140,4 (\pm 0,4)$ nM) potvrdila afinitu carotuximabu k receptoru CD105.

9 Seznam použité literatury:

- [1] JÍLEK, Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2019, s. 11, 14-15. ISBN 978-80-271-0595-3.
- [2] AHUJA, A. Immune System and Immunodeficiency. *Encyclopedia of Infant and Early Childhood Development* [online]. Elsevier, 2008, s. 137-140 [cit. 2023-07-04]. ISBN 9780123708779. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012370877-9.00083-9.
- [3] BIRON, Christine A. Innate Immunity. *Viral Pathogenesis* [online]. Elsevier, 2016, s. 41-55 [cit. 2023-07-04]. ISBN 9780128009642. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800964-2.00004-5.
- [4] KIRSCH, Donald R. Therapeutic Drug Development and Human Clinical Trials. *Biotechnology Entrepreneurship* [online]. Elsevier, 2020, s. 339-358 [cit. 2023-07-04]. ISBN 9780128155851. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815585-1.00024-3.
- [5] Molecules, cells, and tissues of immunity. *Immunology Guidebook* [online]. Elsevier, 2004, s. 1-2 [cit. 2023-07-04]. ISBN 9780121983826. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012198382-6/50025-X.
- [6] ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie*. Praha: Galén, 2011. s. 1-2, 84-86. ISBN 978-80-7262-715-8.
- [7] ERSON, Ayse E. a Elisabeth M. PETTY. Molecular and Genetic Events in Neoplastic Transformation. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3. Oxford: Oxford University Press, 2006, s. 47. ISBN 0199747970.
- [8] KLENER, Pavel. *Základy klinické onkologie*. Praha: Galén, 2011. s17, 35-64. ISBN 978-80-7262-716-5.
- [9] NAGY, Zoltan A. A *History of Modern Immunology* [online]. Elsevier, 2014, s. 10-11, 33, 37-38 [cit. 2023-07-05]. ISBN 9780124169746. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416974-6.00004-1.
- [10] NELSON, P N. Demystified.: Monoclonal antibodies. *Molecular Pathology* [online]. 53(3), s. 111-117 [cit. 2023-07-06]. ISSN 13668714. Dostupné z: doi:10.1136/mp.53.3.111.

- [11] SCHROEDER, Harry W. a Lisa CAVACINI. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2010, 125(2), s.41-52 [cit. 2023-07-07]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- [12] FORTHAL, Donald N., James E. CROWE JR., Diana BORASCHI a Rino RAPPUOLI. Functions of Antibodies. *Microbiology Spectrum* [online]. 2014, 2(4) [cit. 2023-07-07]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.AID-0019-2014.
- [13] SHEPARD, H Michael, Gail Lewis PHILLIPS, Christopher D THANOS a Marc FELDMANN. Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clinical Medicine* [online]. 2017, 17(3), s. 220-232 [cit. 2023-07-06]. ISSN 1470-2118. Dostupné z: doi:10.7861/clinmedicine.17-3-220.
- [14] MATALOVÁ, Petra. Vybraná biologická léčiva v neonekologických indikacích. *Praktické Lékárenství* [online]. Solen, 2019, 15(3), s. 15-27. [cit. 2023-07-01].
- [15] PubChem [online]. *National Institute of Health: National Library of Medicine* [cit. 2023-07-11]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [16] MILETÍN, Miroslav. Antibody Drug Conjugates. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2019, 32(4), 32-37 [cit. 2023-07-06]. ISSN 12127973. Dostupné z: doi:10.36290/far.2018.033.
- [17] DVOŘÁK, Josef, Veronika SITOROVÁ, Igor RICHTER, et al. Prognostický význam hustoty kapilár určované pomocí protilátky proti CD34 a CD105 u pacientů léčených pooperační adjuvantní radioterapií pro adenokarcinom rekta. *Onkologie* [online]. 2016, 10(4), s. 189-192 [cit. 2023-01-24]. ISSN 18024475. Dostupné z: doi:10.36290/xon.2016.041.
- [18] VIALARD, Claire a Bruno LARRIVÉE. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* [online]. 2017, 20(4), s. 409-426 [cit. 2023-06-19]. ISSN 0969-6970. Dostupné z: doi:10.1007/s10456-017-9562-9.

- [19] DUDLEY, Andrew C. a Arjan W. GRIFFIOEN. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis* [online]. [cit. 2023-06-20]. ISSN 0969-6970. Dostupné z: doi:10.1007/s10456-023-09876-7.
- [20] NOVOTNÝ, Jan a Michal ZIKÁN. Nádorová angiogeneze. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. Olomouc: Solen, 2010, 24(3), s. 124-126. [cit. 2023-06-19].
- [21] LIN, Alexander, Niridu Jude PEIRIS, Harkirat DHALIWAL, et al. Mural Cells: Potential Therapeutic Targets to Bridge Cardiovascular Disease and Neurodegeneration. *Cells* [online]. 2021, 10(3) [cit. 2023-07-10]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10030593.
- [22] ROSEN, Lee S., Michael S. GORDON, Francisco ROBERT a Daniela E. MATEI. Endoglin for Targeted Cancer Treatment. *Current Oncology Reports* [online]. 2014, 16(2) [cit. 2023-06-27]. ISSN 1523-3790. Dostupné z: doi:10.1007/s11912-013-0365-x.
- [23] KOPCZYŃSKA, Ewa a Roman MAKAREWICZ. Endoglin – a marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *Współczesna Onkologia* [online]. 2012, 1, s. 68-71 [cit. 2023-01-05]. ISSN 1428-2526. Dostupné z: doi:10.5114/wo.2012.27340.
- [24] MORIKAWA, Masato, Rik DERYNCK a Kohei MIYAZONO. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2016, 8(5) [cit. 2023-06-14]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a021873.
- [25] KUBICZKOVA, Lenka, Lenka SEDLARIKOVA, Roman HAJEK a Sabina SEVCIKOVA. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2012, 10(1) [cit. 2023-06-15]. ISSN 1479-5876. Dostupné z: doi:10.1186/1479-5876-10-183.
- [26] CLARK, David A a Robina COKER. Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF- β). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online].

1998, 30(3), 293-298 [cit. 2023-06-15]. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/S1357-2725(97)00128-3.

[27] SCHOONDERWOERD, Mark J.A., Marie-Jose T.H. GOUMANS a Lukas J.A.C. HAWINKELS. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules* [online]. 2020, 10(2) [cit. 2023-01-05]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10020289.

[28] LIU, Yingmiao, Madelon PAAUWE, Andrew B. NIXON a Lukas J.A.C. HAWINKELS. Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22(1) [cit. 2023-06-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22010147.

[29] ADAM, Z., G. CHLUPOVÁ, A. NEUMANN, et al. Teleangiectasia hereditaria haemorrhagica – syndrom Osler-Weber-Rendu. Popis případu a zkušeností s léčbou. *Vnitřní lékařství*. Olomouc: Solen, 2012, 58(6), s. 477-489. ISSN 1801-7592.

[30] SIER, Vincent Q., Joost R. VAN DER VORST, Paul H. A. QUAX, et al. Endoglin/CD105-Based Imaging of Cancer and Cardiovascular Diseases: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22(9) [cit. 2023-01-10]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22094804.

[31] GLEASON, Briana C. a Jason L. HORNICK. Vascular Tumors. *Practical Soft Tissue Pathology: a Diagnostic Approach* [online]. Elsevier, 2019, s. 341-390 [cit. 2023-07-19]. ISBN 9780323497145. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-49714-5.00013-2.

[32] New Releases: Tracon pharmaceuticals announces termination phase 3 Tapass. *TRACON Pharma* [online]. San Diego, 2019 [cit. 2023-07-10]. Dostupné z: <https://traconpharma.gcs-web.com/news-releases/news-release-details/tracon-pharmaceuticals-announces-termination-phase-3-tappas>.

[33] NCI Dictionary of Cancer Terms. *National Institute of Health: National Cancer Institute* [online]. United States [cit. 2023-06-26]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/hot-tumor>.

[34] New Releases: Santen and TRACON discontinue development of DE122. *TRACON Pharma* [online]. San Diego, 2020 [cit. 2023-07-10]. Dostupné z:

<https://ir.traconpharma.com/news-releases/news-release-details/santen-and-tracon-discontinue-development-de-122-wet-age-related>.

[35] MAGILL, Joseph a Jean GALY. *Radioactivity Radionuclides Radiation*. [online] Heidelberg, 2005 [cit. 2023-06-28]. ISBN 978-3-540-26881-9. s. 1-7, 43-44, 59-60.

[36] KOVÁČIK, Andrej, Barbora VRANÍKOVÁ a Kateřina ŽILKOVÁ. Technology and preparation of radiopharmaceutical preparations at the departments of nuclear medicine. *Praktické lékárenství* [online]. 2021, 17(3), s. 171-174 [cit. 2023-06-29]. ISSN 18012434. Dostupné z: doi:10.36290/lek.2021.035.

[37] Kapitola 6.2.3.: Radiofarmaceutické přípravky. *Český lékopis 1997*. Praha: Grada, 1997. ISBN 80-7169-625-0.

[38] KUPKA, Karel, Jozef KUBINYI a Martin ŠÁMAL. *Nukleární medicína*. [učební text]. Praha: P3K, 2007. ISBN 978-80-903584-9-2.

[39] CHACKO, Anna K., Rashmikant B. SHAH aj. Andrew CHACKO. Kapitola 12: Emergency Nuclear Radiology. *Emergency Radiology: The Requisites* [online]. United States: Mosby, 2009, s. 361-383 [cit. 2023-06-29]. ISBN 9780323054072.

[40] PubChem Compound Summary for CID 65430, Gallium citrate ga-67. *National Center for Biotechnology Information*. [online] [2023-06-29] dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallium-citrate-ga-67>.

[41] Gallium Citrate Ga-67. *Drugbank online* [online]. Canada: 2010 [cit. 2023-07-14]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06784>.

[42] Pubmed: Compound Summary: Gallium Citrate ga-67. *National Institute of Health: National Center for Biotechnology Information* [online]. 2010 [cit. 2023-07-14]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallium-citrate-ga-67>.

[43] CHOMET, Marion, Guus A. M. S. VAN DONGEN a Danielle J. VUGTS. State of the Art in Radiolabeling of Antibodies with Common and Uncommon Radiometals for Preclinical and Clinical Immuno-PET. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2021, 32(7), s. 1315-1330 [cit. 2023-07-03]. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/acs.bioconjchem.1c00136.

- [44] STOKKE, Caroline, Monika KVASSEIM a Johan BLAKKISRUD. Radionuclides for Targeted Therapy: Physical Properties. *Molecules* [online]. 2022, 27(17) [cit. 2023-06-29]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27175429.
- [45] ZIESSMAN, Harvey A., Janis P. O'MALLEY a James H. THRALL. Radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine* [online]. Elsevier, 2006, 2006, s. 3-19 [cit. 2023-06-30]. ISBN 9780323029469. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-02946-9.50006-4.
- [46] MASON, N. Scott, Brian J. LOPRESTI a Chester A. MATHIS. Imaging Inflammation. *Measuring Immunity* [online]. Elsevier, 2005, s. 445-452 [cit. 2023-06-30]. ISBN 9780124559004. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012455900-4/50301-9.
- [47] Kapitola 12 - Oncology. *Nuclear Medicine* [online]. Elsevier, 2014, s. 265-287 [cit. 2023-06-30]. ISBN 9780323082990. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-08299-0.00012-2.
- [48] MEREDITH, Ruby F., Jeffrey Y.C. WONG a Susan J. KNOX. Targeted Radionuclide Therapy—Expanded Content. *Clinical Radiation Oncology* [online]. Elsevier, 2012, s. 22 [cit. 2023-07-03]. ISBN 9781437716375. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4377-1637-5.00088-2.
- [49] MORAIS, Mauricio a Michelle T. MA. Site-specific chelator-antibody conjugation for PET and SPECT imaging with radiometals. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. 2018, 30, s. 91-104 [cit. 2023-07-03]. ISSN 17406749. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ddtec.2018.10.002.
- [50] GUPTA, Suprit, Surinder BATRA a Maneesh JAIN. Antibody Labeling with Radioiodine and Radiometals. *Drug Delivery System* [online]. New York, NY: Springer New York, 2014, s. 147-157 [cit. 2023-07-03]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-0362-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-0363-4_9.
- [51] CHOMET, Marion, Guus A. M. S. VAN DONGEN a Danielle J. VUGTS. State of the Art in Radiolabeling of Antibodies with Common and Uncommon Radiometals for Preclinical and Clinical Immuno-PET. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2021,

32(7), s. 1315-1330 [cit. 2023-07-03]. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/acs.bioconjchem.1c00136.

[52] Magnetic Resonance Imaging (MRI). *National Institute of Health: National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering* [online]. United States, Maryland [cit. 2023-07-03]. Dostupné z: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/magnetic-resonance-imaging-mri>.

[53] Computer Tomography (CT). *National Institute of Health: National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering* [online, upravené 2.7.2023]. United States, Maryland [cit. 2023-07-03]. Dostupné z: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/computed-tomography-ct>.

[54] PRICE, Eric W. a Chris ORVIG. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev* [online]. 2014, 43(1), s. 260-290 [cit. 2023-07-03]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C3CS60304K.

[55] XU, Jingli, Zheng QIAO, Rene GONZALEZ a Yubin MIAO. Facile preparation of a novel Ga-67-labeled NODAGA-conjugated lactam-cyclized alpha-MSH peptide at room temperature for melanoma targeting. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2020, 30(24) [cit. 2023-07-03]. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2020.127627.

[56] GHOSH, Sukhen C., Kenneth L. PINKSTON, Holly ROBINSON, Barrett R. HARVEY, Nathaniel WILGANOWSKI, Karen GORE, Eva M. SEVICK-MURACA a Ali AZHDARINIA. Comparison of DOTA and NODAGA as chelators for ⁶⁴Cu-labeled immunoconjugates. *Nuclear Medicine and Biology* [online]. 2015, 42(2), s. 177-183 [cit. 2023-07-10]. ISSN 09698051. Dostupné z: doi:10.1016/j.nucmedbio.2014.09.009.

[57] BIGOTT-HENNKENS, H., DANNOON, S., LEWIS, M.R. and JURISSON, S.S. In Vitro Receptor Binding Assays: General Methods and Considerations. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2008, 52(3), s. 245-253. ISSN 18244785.

[58] ZEILINGER, Markus, Florian PICHLER, Lukas NICS, Wolfgang WADSAK, Helmut SPREITZER, Marcus HACKER a Markus MITTERHAUSER. New

approaches for the reliable in vitro assessment of binding affinity based on high-resolution real-time data acquisition of radioligand-receptor binding kinetics. *EJNMMI Research* [online]. 2017, 7(1) [cit. 2023-06-08]. ISSN 2191-219X. Dostupné z: doi:10.1186/s13550-016-0249-9.

[59] Biacore. *Cytiva* [online]. 2023 [cit. 2023-07-19]. Dostupné z: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/about-us/our-brands/biacore>.

[60] Ligand Tracer. *Ridgeview Instruments* [online]. Sweden, 2023 [cit. 2023-07-19]. Dostupné z: <https://www.ligandtracer.com>.

[61] KIM, Jee Yeon, Junha HWANG, Seo Hyun LEE, et al. Decreased efficacy of drugs targeting the vascular endothelial growth factor pathway by the epigenetic silencing of FLT1 in renal cancer cells. *Clinical Epigenetics* [online]. 2015, 7(1) [cit. 2023-07-20]. ISSN 1868-7075. Dostupné z: doi:10.1186/s13148-015-0134-9.

[62] YANG, Yunan, Yin ZHANG, Hao HONG, Glenn LIU, Bryan R. LEIGH a Weibo CAI. In vivo near-infrared fluorescence imaging of CD105 expression during tumor angiogenesis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* [online]. 2011, 38(11), s. 2066-2076 [cit. 2023-06-27]. ISSN 1619-7070. Dostupné z: doi:10.1007/s00259-011-1886-x.

[63] ZHANG, Yin, Hao HONG, Jonathan W. ENGLE, et al. Positron Emission Tomography Imaging of CD105 Expression with a ⁶⁴Cu-Labeled Monoclonal Antibody: NOTA Is Superior to DOTA. *PLoS ONE* [online]. 2011, 6(12) [cit. 2023-06-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0028005.

[64] ENGLE, Jonathan W., Hao HONG, Yin ZHANG, et al. Positron Emission Tomography Imaging of Tumor Angiogenesis with a ⁶⁶Ga-Labeled Monoclonal Antibody. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2012, 9(5), s. 1441-1448 [cit. 2023-06-27]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp300019c.