

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STUDIUM INTERAKCÍ RADIONUKLIDY ZNAČENÝCH
MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK S RECEPTOREM PRO
EPIDERMÁLNÍ RŮSTOVÝ FAKTOR IN VITRO**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí disertační práce:

Doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Hradec Králové, 2014

Mgr. Zbyněk Nový

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 15. 7. 2014.

.....

Na tomto místě bych rád velmi poděkoval především svému školiteli **Doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc.** za vedení mého doktorského studia, za jeho podporu a trpělivost. Prof. PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc., Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. a celému Oddělení radiofarmak Katedry farmakologie a toxikologie za spolupráci.

Děkuji všem pracovníkům a postgraduálním studentům Katedry farmakologie a toxikologie, kteří mi byli v průběhu mého postgraduálního studia nápomocni a vytvářeli příjemné pracovní prostředí, obzvláště pak mým spolužákům a přátelům Janě Mandíkové a Pavlu Bártovi.

Též velice děkuji Jean-Pierre Pougetovi z Institute de Recherche en Cancérologie de Montpellier (INSERM U896) za velmi milé přijetí v jeho laboratoři ve francouzském Montpellier a Karlu Anderssonovi ze švédské Uppsaly za konzultace k přístroji LigandTracer[®] Yellow.

Moje poděkování směřuje také Grantové agentuře Univerzity Karlovy (GAUK 124409/C), Fondu rozvoje vysokých škol (FRVŠ 405/G3/2009), Specifickému vysokoškolskému výzkumu (SVV 206 064) a programu Erasmus, které zajistily moji práci po stránce finanční.

Za rodinné zázemí, podporu a pohodu děkuji svým rodičům a manželce **Alici**.

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	8
Seznam zkratek	10
1 Úvod	14
2 Teoretická část	15
2.1 <i>Cílená radiofarmaka</i>	15
2.1.1 Přehled cílených radiofarmak dle struktury.....	15
2.2 <i>Monoklonální protilátky v nukleární medicíně</i>	19
2.2.1 Struktura monoklonálních protilátek.....	19
2.2.2 Produkce monoklonálních protilátek.....	20
2.2.3 Fragmenty protilátek.....	25
2.2.4 Radionuklidy pro značení protilátek.....	30
2.2.5 Způsoby značení protilátek radioizotopy.....	34
2.2.6 Chelátory používané pro značení protilátek.....	36
2.2.7 Radioimunodiagnostika a radioimunoterapie.....	40
2.2.8 Nežádoucí účinky radioimunoterapie.....	47
2.2.9 Pretargeting v radioimunoterapii.....	50
2.3 <i>Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR)</i>	52
2.3.1 Protilátky cílené na EGFR.....	55
3 Experimentální část	59
3.1 <i>Chemikálie</i>	59
3.2 <i>Buněčné linie</i>	60
3.3 <i>Použité přístroje</i>	60
3.4 <i>Použité metody</i>	62
3.4.1 Radiojodace.....	62
3.4.2 Značení protilátek radiokovy.....	63
3.4.3 Kontrola radiochemické kvality.....	64
3.4.4 Klasická saturační technika pro stanovení počtu receptorů.....	65
3.4.5 KEX metoda (kinetic extrapolation) stanovení počtu receptorů.....	67
3.4.6 Vazebnost protilátek <i>in vitro</i>	68
3.4.7 Stanovení koncentrace modifikovaných protilátek.....	69
3.4.8 Western blot analýza.....	69
3.4.9 Statistická analýza.....	70
4 Cíle práce	71
5 Výsledky	72
5.1 <i>Značení monoklonálních protilátek radioaktivním jódem</i>	72
5.2 <i>Kvantifikace exprese EGFR u vybraných buněčných linií pomocí značených protilátek</i>	74
5.3 <i>Značení monoklonálních protilátek radiokovy</i>	77
5.4 <i>Vazebnost modifikovaných protilátek na EGFR a porovnání vlivu chelátoru</i>	85
6 Diskuze	89
7 Závěr	100

8	Seznam použité literatury	102
9	Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací.....	118
9.1	<i>Publikace související s disertační prací</i>	<i>118</i>
9.2	<i>Další publikované práce</i>	<i>118</i>
9.3	<i>Prezentace na vědeckých konferencích</i>	<i>119</i>
10	Přílohy – odborné publikace s tematikou disertační práce.....	124

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Zbyněk Nový

Školitel: Doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Název disertační práce: Studium interakcí radionuklidu značených monoklonálních protilátek s receptorem pro epidermální růstový faktor *in vitro*

Řada typů karcinomů se ve srovnání se zdravou tkání vyznačuje zvýšenou expresí receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Tohoto fenoménu využívají pro léčbu některých onkologických onemocnění anti-EGFR monoklonální protilátky. Intenzivně studovanou oblastí je ověřování možností zvýšit využitelnost těchto protilátek inkorporací vhodných radionuklidů, což může sloužit pro radiodiagnostiku či radioterapii zmíněných malignit. Ačkoliv je EGFR receptor a s ním spojené signální intracelulární kaskády předmětem intenzivního výzkumu, není dostatečně prostudována řada faktorů, které mohou zkoumání a míru vazby radioaktivně značených protilátek na EGFR *in vitro* významně ovlivnit.

Cílem této disertační práce bylo v první fázi zavést metodiku pro značení anti-EGFR monoklonálních protilátek (cetuximab, panitumumab) jódem-131 a s pomocí takto označených protilátek stanovit míru exprese EGFR u čtyř zvolených buněčných linií (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2). V další fázi bylo úkolem provést s využitím těchto z hlediska exprese EGFR definovaných buněčných modelů vazebnostní studie s cetuximabem a panitumumabem značenými luteciem-177 a porovnat vazebnost těchto dvou protilátek na EGRF v relaci na buněčném modelu a typu použitého bifunkčního chelátoru vázajícího radiokov. Součástí práce byly i radiochemická charakterizace a ověření stability připravených radioaktivně značených protilátek.

Stanovení počtu receptorů bylo prováděno jak pomocí klasické manuální saturační techniky, tak pomocí nového poloautomatizovaného přístupu tzv. kinetické extrapolací metody (KEX). Míra exprese byla také porovnána s výsledky zjištěnými western blottingem. Stanovení míry exprese EGFR bylo prováděno u čtyř vybraných buněčných linií. Pro značení luteciem-177 byla využita modifikace obou protilátek třemi bifunkčními chelátory (DOTA, NOTA a PCTA).

Optimalizace značení anti-EGFR protilátek jódem-131 vedla k vysoké výtěžnosti a radiochemické čistotě. Testování stability připravených protilátek ukázalo, že pokles radiochemické čistoty během 24 h je v řádu jednotek procent. Obě metody stanovení počtu receptorů vykazovaly výsledky ve vzájemné shodě. KEX metodu lze tedy pokládat za srovnatelně využitelnou jako klasickou saturační techniku. Počet EGFR receptorů na buňku se pohyboval od $1,98 \times 10^6$ u linie A431, přes $0,91 \times 10^6$ pro HaCaT až po $0,15 \times 10^6$ pro HCT116 a $0,07 \times 10^6$ u linie HepG2. Celkově lze tedy podle exprese EGFR studované linie seřadit takto: A431 > HaCaT > HCT116 \approx HepG2. Míra exprese korelovala s výsledky získanými western blottingem.

Postupy zavedené pro značení cetuximabu a panitumumabu luteciem-177 vedly k preparátům značených protilátek s vysokou radiochemickou čistotou a stabilitou až po dobu jednoho týdne. Ve vazebnostních studiích se ukázalo, že podíl navázané protilátky je výrazně rozdílný v závislosti na použité buněčné linii a je ve shodě s mírou exprese cílového EGFR. Vazba luteciem-177 značených protilátek na buněčné modely byla vysoce specifická, neboť preinkubace s nadbytkem neznačené protilátky radikálně vazbu snížila. Při vyhodnocování vlivu použitého chelátoru na vazbu protilátek *in vitro* nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v akumulaci protilátek modifikovaných DOTA, NOTA či PCTA v příslušných buněčných liniích. Získané výsledky dokládají, že připravené protilátky značené luteciem-177 mají vhodné radiochemické a biologické parametry a jsou tak vhodnými kandidáty pro další výzkum směrem k jejich potencionálnímu využití.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department: Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Zbynek Novy, MSc.

Supervisor: Assoc. prof. PharmDr. Frantisek Trejtnar, PhD.

Title of doctoral thesis: *In vitro* study of interactions of radiolabeled monoclonal antibodies with epidermal growth factor receptor

Various types of cancer are characterized by overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) compared to normal tissue. Anti-EGFR antibodies utilize this phenomenon to treat certain oncological diseases. Intensively studied field is verifying of possibility to increase usability of these antibodies by incorporating suitable radionuclides into their structures, results can serve in radioimmunodiagnosis or radioimmunotherapy of mentioned malignities. Despite the fact that EGFR receptor and his signaling intracellular pathway is object of intense research, there is a lack of knowledge in the area of factors, which can significantly affect binding of radiolabeled antibodies to EGFR *in vitro*.

The aim of this doctoral thesis was to introduce method of radiolabeling anti-EGFR monoclonal antibodies (cetuximab, panitumumab) with iodine-131 and to use this radiolabeled antibodies to determine expression rate of EGFR in four selected cell lines (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2). Furthermore, the second aim was to perform cell binding studies with lutetium-177 labeled cetuximab and panitumumab in those EGFR-defined cell models and to estimate effect of used radiometal chelator to cell binding in relation with employed cell line. Radiochemical characterisation was also the part of the study as well as prove of stability of prepared radiolabeled antibodies.

Determination of number of receptors per cell was performed by classical manual saturation technique and by new semi-automatized approach, i. e. kinetic extrapolation method (KEX). Receptor expression levels were also compared to the results of western blot analysis. The determination of EGFR expression level was performed in four selected cell lines. The modification of both monoclonal antibodies with three bifunctional chelators (DOTA, NOTA, PCTA) was used for lutetium-177 radiolabeling. The optimization of anti-EGFR antibodies labeling with iodine-131 led to

high yield and high radiochemical purity. The stability testing of prepared antibodies showed decrease in radiochemical purity after 24 hours in units of percents. Both methods determining number of receptors revealed results in accordance. Therefore KEX method could be considered as comparably useful as the classical saturation technique. The numbers of EGFR receptors per cell were as follows: 1.98×10^6 for A431 cell line, 0.91×10^6 for HaCaT cells, 0.15×10^6 in the case of HCT116 and 0.07×10^6 for HepG2. Overallly, we can put studied cell lines in order according to decreasing number of expressed EGFR: A431 > HaCaT > HCT116 \approx HepG2. The expression rate correlated with results from western blot analysis.

Protocols introduced for labeling of cetuximab and panitumumab with lutetium-177 led to preparations with high radiochemical purity and high stability up to the period of one week. The cell binding studies showed, that the bound fraction of labeled antibody differs widely and is in relationship with used cell line and also is in accordance with its EGFR expression rate. The cell binding of lutetium-177 labeled antibodies was highly specific, whereas preincubation with cold antibody led to massive decrease of its binding. The evaluation of effect of chelator type to cell binding *in vitro* showed no significant difference in uptake among antibodies modified with DOTA, NOTA or PCTA in appropriate cell lines. Acquired results demonstrate suitable radiochemical and biological properties of prepared ^{177}Lu -labeled antibodies and they appear as proper candidates for further research towards their potential application in clinics.

Seznam zkratek

α -MSH	α -melanocyty stimulující hormon
Ab	protilátka, <i>angl.</i> antibody
ADCC	protilátkově závislá buňkami zprostředkovaná cytotoxicita, <i>angl.</i> antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
AMBA	DO3A-CH ₂ CO-Gly-(4-aminobenzoyl)-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂)
ANOVA	analýza rozptylu, <i>angl.</i> analysis of variance
ATCC	Americká sbírka typových kultur, <i>angl.</i> American Type Culture Collection
BASS	pNO ₂ -Phe-c(dCys-Tyr-dTrp-Lys-Thr-Cys)dTyrNH ₂
BC	rakovina prsu, <i>angl.</i> breast cancer
BCA	bicinchoninová metoda, <i>angl.</i> bicinchoninic acid assay
Biot	biotin
BSA	hovězí sérový albumin, <i>angl.</i> bovine serum albumin
BsmAb	bi-specifická monoklonální protilátka
BT	nádor mozku, <i>angl.</i> brain tumor
CBC	cross-bridged cyclam, (4,11-bis(karboxymetyl)-1,4,8,11-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan)
CC	kolorektální karcinom, <i>angl.</i> colorectal cancer
CCD	zařízení s vázanými náboji, <i>angl.</i> charge-coupled device
CDC	na komplementu závislá cytotoxicita, <i>angl.</i> complement dependent cytotoxicity
CEA	karcinoembryonální antigen, <i>angl.</i> carcinoembryonic antigen
CEAexp	nádory exprimující karcinoembryonální antigen, <i>angl.</i> carcinoembryonic antigen expression
CT	počítačová tomografie, <i>angl.</i> computed tomography
DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>angl.</i> deoxyribonucleic acid
DOTA	tetra-azacyklododekantetraoctová kyselina, <i>angl.</i> tetraazacyclododecane tetraacetic acid
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina, <i>angl.</i> diethylene triamine pentaacetic acid

EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina, <i>angl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermální růstový faktor, <i>angl.</i> epidermal growth factor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor, <i>angl.</i> epidermal growth factor receptor
ED-B	extradoména B
ErbB	gen kódující receptory rodiny HER, zkratka z <i>angl.</i> Erythroblastosis B
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza, <i>angl.</i> extracellular signal-regulated kinase
Fab	antigen vázající fragment, <i>angl.</i> Fragment antigen binding
Fc	krystalizující fragment, <i>angl.</i> Fragment crystallizable
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, <i>angl.</i> Food and Drug Administration
FDG	18F-fluorodeoxyglukóza
FET	18F-fluoroethyltyrosin
FCH	18F-fluorocholin
FLT	18F-fluorothymidin
fRIT	frakcionovaná imunoterapie
GC	rakovina žaludku, <i>angl.</i> gastric cancer
GEP	gastroenteropankreatický
GIM	gastrointestinální malignity
GIT	gastrointestinální trakt
GL	gliom
GLB	glioblastom
GLP-1	glucagon-like peptide 1
GRP	gastrin uvolňující peptid, <i>angl.</i> gastrin-releasing peptide
GST	gastrointestinální stromální nádor, <i>angl.</i> gastrointestinal stromal tumor
HAMA	lidské protimyšší protilátky, <i>angl.</i> human antimouse antibodies
HAT	hypoxantin-aminopterin-thymidin
HCC	hepatocelulární karcinom, <i>angl.</i> hepatocellular carcinoma
hdRIT	vysokodávková radioimunoterapie, <i>angl.</i> high-dose radioimmunotherapy
HER1	lidský receptor pro epidermální růstový faktor 1, <i>angl.</i> human epidermal growth factor receptor 1
HGPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza, <i>angl.</i> hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HNC	karcinomy hlavy a krku, <i>angl.</i> head and neck carcinoma

HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie, <i>angl.</i> high-performance liquid chromatography
IA	intraarteriální
IGFR	receptor pro inzulinu podobný růstový faktor, <i>angl.</i> insulin-like growth factor receptor
IMRT	radioterapie s modulovanou intezitou, <i>angl.</i> intensity-modulated radiotherapy
INS	insulinom
i.p.	intraperitoneální
IRC	intraresekční dutina, <i>angl.</i> intraresection cavity
ITLC	instantní tenkovrstvá chromatografie, <i>angl.</i> instant thin-layer chromatography
ITLC-SG	instantní tenkovrstvá chromatografie na silikagelu, <i>angl.</i> instant thin-layer chromatography-silica gel
i.v.	intravenózní
KEX	metoda extrapolace kinetiky, <i>angl.</i> kinetic extrapolation method
LET	lineární přenos energie, <i>angl.</i> linear energy transfer
M	melanoma
mAb	monoklonální protilátka, <i>angl.</i> monoclonal antibody
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza, <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinas
MEK	mitogenem extracelulárně aktivovaná kináza, <i>angl.</i> mitogen-extracellularly activated kinas
MET	methylnmethionin
MTC	medulární karcinom štítné žlázy, <i>angl.</i> medullary thyroid cancer
NCA-95	nespecifický zkříženě reagující antigen, <i>angl.</i> nonspecific cross-reacting antigen 95
NET	neuroendokrinní tumor
NOC	Nal ³ -oktreotid
NOTA	triazacyclononantrioctová kyselina, <i>angl.</i> triazacyclononanetriacetic acid
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic, <i>angl.</i> non-small-cell lung cancer
OC	rakovina vaječníků, <i>angl.</i> ovarian cancer
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok, <i>angl.</i> phosphate buffered saline
PET	pozitronová emisní tomografie

PC	rakovina prostaty, <i>angl.</i> prostate cancer
PCTA	tetraazabicyklopentadekatrientrioctová kyselina, <i>angl.</i> tetra-azabicyclopentadecatrienetriacetic acid
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid, <i>angl.</i> phenylmethylsulfonyl fluoride
pRIT	radioimunoterapie s pretargetingem, <i>angl.</i> pretargeted radioimmunotherapy
PVDF	polyvinyliden fluorid
RAF	rychle se rozvíjející fibrosarkom, <i>angl.</i> rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	potkaní sarkom, <i>angl.</i> rat sarcoma
RCC	karcinom ledvin, <i>angl.</i> renal cell carcinoma
RGD	sekvence arginin-glycin-aspartát
RIT	radioimunoterapie
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácené fázi, <i>angl.</i> reverse phase high performance liquid chromatography
RTG	rentgenové záření
SCCHN	spinocelulární karcinom hlavy a krku, <i>angl.</i> squamous-cell carcinoma of head and neck
SDS	dodecylsírán sodný, <i>angl.</i> sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, <i>angl.</i> sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SPECT	jednofotonová emisní výpočtní tomografie, <i>angl.</i> single-photon emission computed tomography
sst	podtyp somatostatinového receptoru, <i>angl.</i> somatostatin receptor subtype
Strept	streptavidin
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TATE	Tyr ³ -oktreotát
TBST	trisek pufrovaný fyziologický roztok s Tweenem 20, <i>angl.</i> Tris-Buffered Saline and Tween 20.
TLC	tenkovrstvá chromatografie, <i>angl.</i> thin-layer chromatography
TOC	Phe ¹ -Tyr ³ -oktreotid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 Úvod

Jedním z nejzávažnějších úkolů současné lékařské vědy je boj s nádorovými onemocněními, jejichž incidence bohužel neustále roste. Terapie tohoto často fatálního onemocnění je velmi obtížná. Mimo klasického chirurgického řešení a radioterapie je nejčastěji užívaným léčebným prostředkem chemoterapie. Ta je ovšem nucena využívat vysoce toxických látek, jejichž přítomnost v organismu může vyvolávat řadu závažných nežádoucích účinků. Tyto nežádoucí účinky často poškozují zdravé tkáně výrazněji než samotný nádor. Z tohoto důvodu se v posledních desetiletích klade stále větší důraz na hledání léčiv se specifitějším účinkem, která mají výraznější směřování („targeting“) do cílových tkání (Cuperlovic-Culf et al. 2012).

Velkým pokrokem v této oblasti byl objev monoklonálních protilátek a jejich produkce pomocí hybridomové technologie či transgenních myši (Laffly a Sodoyer 2005). Přes určité limity představují monoklonální protilátky velký pokrok v terapii některých onkologických onemocnění. V posledních letech se v klinické praxi objevil nový způsob léčby využívající protilátky ve spojení s radioaktivními izotopy – radioimunoterapie, která kombinuje vlastnosti dvou do té doby oddělených terapeutických přístupů (Tomblyn et al. 2013).

Naše experimentální výzkumná práce směřovala právě do oblasti monoklonálních protilátek spojených s radioaktivními nuklidy. Předmětem zkoumání byla oblast monoklonálních protilátek cílených na receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), který se exprimuje ve zvýšené míře u mnoha typů nádorů (Nicholson et al. 2001). V práci jsme se soustředili na posouzení několika faktorů, které mohou ovlivnit vazbu radioaktivně značených protilátek na EGFR, jako je např. typ protilátky, použitá strukturní modifikace či buněčný model. V první části experimentálního oddílu této práce jsou shrnuty výsledky týkající se kvantifikace exprese EGF receptoru u různých buněčných linií pomocí radiojodovaných protilátek. V další části práce jsou uvedeny výsledky ukazující vliv modifikace protilátek chelátory, optimalizované metody jejich značení pomocí lutecia-177 a následné *in vitro* vazebné studie využívající v předcházející studii charakterizované buněčné linie. Přestože práce byly prováděny na *in vitro* úrovni, zjištěné parametry studovaných protilátek a metody jejich *in vitro* hodnocení mohou být potenciálně využity v dalších fázích testování zkoumaných protilátek, které by směřovalo k jejich budoucímu klinickému využití.

2 Teoretická část

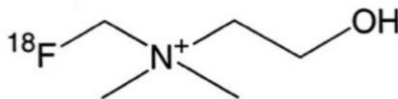
2.1 Cílená radiofarmaka

Léčiva využívající radioaktivní prvek ve své struktuře - radiofarmaka lze klasifikovat dle mnoha hledisek (Lázníček a Komárek 1998). Z hlediska této práce jsou nejdůležitější podskupinou radiofarmak tzv. cílená radiofarmaka. Jejich určující vlastností je vysoká afinita k cílové struktuře (receptoru, enzymu či transportéru). Jejich klinické využití závisí na typu použitého radionuklidu a může být jak diagnostické tak terapeutické či dokonce kombinované (tzv. teranostika). Stručný přehled a popis látek řazených mezi cílená radiofarmaka uvádí následující kapitola.

2.1.1 Přehled cílených radiofarmak dle struktury

¹⁸F-Fluorocholin (FCH)

Cholin je prekurzorem fosfatidylcholinu, který je hlavní složkou buněčných membrán. Během buněčné proliferace se aktivuje proteosyntéza stejně jako syntéza membránových lipidů. Proto nádorové buňky spotřebovávají cholin ve velkém množství (Yoshimoto et al. 2004, Zhu et al. 2011). FCH (viz Obr. 1) se používá pro zobrazování nádorů prostaty a jeho metastáz (DeGrado et al. 2001, Hara et al. 2002, Kwee et al. 2007, Zhu et al. 2011). Cholin i FCH je do buněk přenášen specifickým transportním systémem (Lockman et al. 2002, Hara et al. 2006, Inazu 2014).

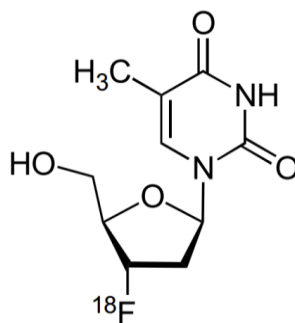


Obr. 1: Strukturální vzorec ¹⁸F-fluorocholinu.

¹⁸F-Fluorothymidin (FLT)

¹⁸F-Fluorocholin celým názvem 3'-deoxy-3'-fluorothymidin (Grierson a Shields 2000, Castellucci a Jadvar 2012). Nukleosidy a jejich analogy přecházejí do buňky difúzí kontrolovanou transportéry, FLT je jejich substrátem (Belt et al. 1993, Couturier et al. 2005a). Díky zvýšené spotřebě nukleosidů pro syntézu DNA je přednostně vychytáván v proliferující tkáni, a tudíž umožňuje zobrazit např. nádory mozku, které se

jinak pomocí běžně užívané ^{18}F -fluorodeoxyglukózy (FDG) obtížně vizualizují (Miyake et al. 2012). Struktura ^{18}F -fluorothymidinu viz Obr. 2.



Obr. 2: Strukturální vzorec ^{18}F -fluorothymidinu.

Aminokyseliny

^{18}F -fluoroethyltyrosin (FET) – Je známo, že transport aminokyselin do buněk je téměř výhradně zprostředkován přenašečem pro aminokyseliny typu 1-AA (Heiss et al., 1999, Götz a Grosu 2013). FET (^{18}F -fluoro-O-(2)-fluoroethyl-l-tyrosin) a **^{11}C -methylnmethionin (MET)** jsou látky používané pro diagnostiku maligních tumorů mozku. MET je běžná aminokyselina značená uhlíkem-11 o poločasu 20 minut. V klinické praxi se ukázaly FET a MET stejně specifické i citlivé (Weber et al. 2000, Grosu et al. 2011).

Peptidy

Látky tohoto typu tvoří rozsáhlou skupinu, členěnou na několik významných podskupin, jejichž základní charakteristiky jsou uvedeny v následujícím přehledu. Tabulka 1 uvádí proběhlé klinické studie s těmito látkami.

Analogy somatostatinu

^{111}In -DTPA-oktreotid (OC, OctreoScan®; Mallinckrodt Inc.), byl první registrovaný radiopeptid (oktapeptid), který je používán už dvacet let v diagnostice nádorů pozitivních na somatostatinové receptory a stal se v této indikaci zlatým standardem (Krenning et al. 1993, Ambrosini et al. 2011b).

^{68}Ga -značené analogy somatostatinu používané v klinice jsou založeny na třech oktapeptidech [^3Tyr]oktreotid (TOC), [^3Tyr , ^8Thr]oktreotid (TATE), a [^3Nal]oktreotid (NOC) ve spojení s DOTA (Ambrosini et al. 2011a). Jejich hlavní indikací jsou nádory neuroendokrinního původu resp. jejich zobrazení (Decristoforo et al. 2012).

Analogy cholecystokininu 2 (minigastriny)

Gastrinový receptor může být atraktivním cílem pro zobrazování a terapii pomocí radiopeptidů u několika typů nádorů. Autoradiografií bylo identifikováno, že gastrinový receptor se ve zvýšené míře exprimuje v nádorech dřeně štítné žlázy (92%), v malobuněčném karcinomu plic (57%), v astrocytomech (92%), ve stromálních nádorech vaječníků (100%) a gastroenteropankreatických tumorech (22%) (Reubi et al. 1997).

Analogy bombesinu (bombesiny)

Bombesin je tetradekapeptidový neurohormon, homolog savčího gastrin-releasing peptidu (GRP), který se vyskytuje u obojživelníků (Ambrosini et al. 2011b). Receptory pro GRP byly nalezeny v různých typech nádorů, konkrétně v nádorech prsu, nádorech prostaty, tumorech ledvinných buněk, v malobuněčném karcinomu plic a v stromálních nádorech GITu (Reubi et al. 2005).

Tabulka 1. Skupiny radiopeptidů dle cílových receptorů a jejich nejvýznamější zástupci.

Peptid	Receptor	Indikace	Radiopeptidová proba
Somatostatin	sst2	NETs,	^{111}In -DTPA-oktreotid*
		GEP-NETs	^{111}In -DOTA-lanreotid
			$^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}/^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC
			$^{177}\text{Lu}/^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE
			^{111}In -DOTA-BASS ⁺
			$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC/-TATE
			$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N ₄ -TATE
			$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotid
			^{18}F -deoxyfruktosyl-TATE
			^{68}Ga -DOTANOC
	sst2/sst3/sst5		

Peptid	Receptor	Indikace	Radiopeptidová proba
Bombesin	GRP receptor	PC, BC	^{99m}Tc -RP527
		GST	^{68}Ga -BZH3
			^{64}Cu -CBC-AR06
			$^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -AMBA
Cholecystokinin / gastrin	Cholecystokinin 2	MTC	^{111}In -DTPA-D-Glu-minigastrin ^{99m}Tc -demogastrin 2
RGD peptidy	$\alpha_v\beta_3$ integrin	různé	^{18}F -galakto-RGD ^{18}F -RGD-K5 ^{18}F -AH111585
Substance P	Neurokinin 1	GBM	^{213}Bi -DOTA-substance P $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ -DOTAGA-substance P
GLP-1/exendin	GLP-1 receptor	INS	^{111}In -[Lys ⁴⁰ (Ahx-DTPA)NH ₂]- exendin-4 ^{111}In -[Lys ⁴⁰ (Ahx-DOTA)NH ₂]- exendin-4
α -MSH	Melanokortin 1 receptor	melanom	^{188}Re -(Arg ¹¹)CCMSH
VIP	VPAC ₁₋₂	různé	^{99m}Tc -TP3654

* registrován jako léčivý přípravek

+ první klinicky použitý radioaktivně značený antagonistu somatostatinu

α -MSH (α -melanocyty stimulující hormon), AMBA (DO3A-CH₂CO-Gly-(4-aminobenzoyl)-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂), BASS (pNO₂-Phe-c(dCys-Tyr-dTrp-Lys-Thr-Cys)dTyrNH₂), BC (rakovina prsu, *angl.* breast cancer), CBC (cross-bridged cyclam, (4,11-bis(karboxymetyl)-1,4,8,11-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan), GEP (gastroenteropankreatické), GBM (*angl.* glioblastoma multiforme), GLP (*angl.* glucagon-like peptide 1), GRP (*angl.* gastrin-releasing peptide), GST (*angl.* gastrointestinal stromal tumor), INS (insulinom), NET (neuroendokrinní tumor), MTC (*angl.* medulary thyroid cancer), PC (rakovina prostaty, *angl.* prostate cancer), RGD (sekvence arginin-glycin-aspartát), sst (*angl.* somatostatin receptor), VIP (vazoaktivní intestinální peptid). Ambrosini et al. 2011b, Dong et al. 2014 a Fani et al. 2012.

Monoklonální protilátky a jejich fragmenty

Vlastnosti monoklonálních protilátek ve spojení s radionuklidy, stejně tak jako jejich fragmenty jsou podrobně charakterizovány v následující kapitole (2.2).

2.2 Monoklonální protilátky v nukleární medicíně

Monoklonální protilátky jakožto agens s vysokou afinitou a specifitou vůči svým cílovým antigenům jsou v nukleární medicíně po spojení s příslušnými radionuklidy využívány, jak pro **diagnostiku** (*radioimunodiagnostika*) tj. zobrazování, tak pro **terapii** různých typů onemocnění (*radioimunoterapie*). Než se budu věnovat popisu využívaných nuklidů, způsobům jejich připojení k molekule protilátky a dalším aspektům oboru radioimunoterapie/radioimunodiagnostiky, považuji za vhodné stručně osvětlit strukturu a původ monoklonálních protilátek jako takových.

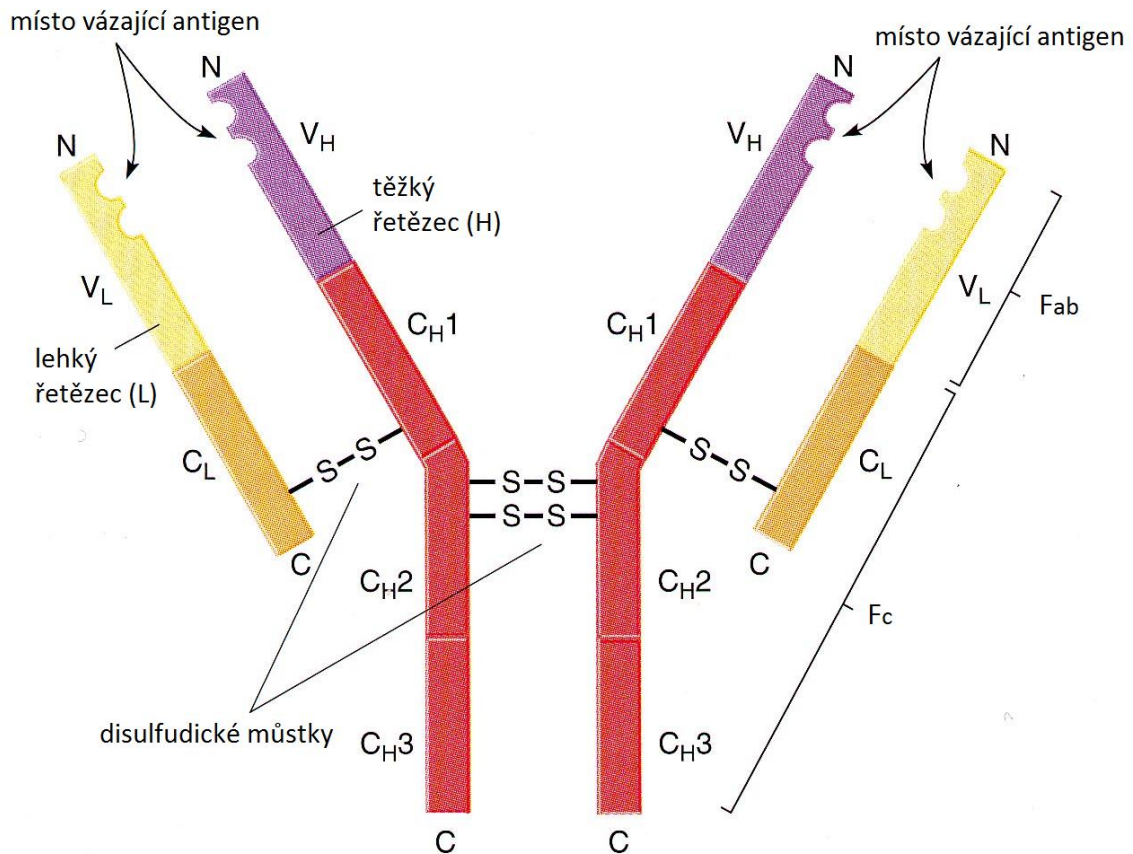
2.2.1 Struktura monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky (*angl.* monoclonal antibodies, mAb) jsou produkovány B-lymfocyty a jsou základem humorální imunity člověka. Jedná se o specifické glykoproteiny – imunoglobuliny (Ig) s vysokou afinitou cílenou na určitý antigen. Tvar jejich molekuly připomíná písmeno Y, přičemž se tato molekula skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých řetěců spojených disulfidickými můstky (viz Obr. 3).

Molekula protilátky má dvě hlavní funkční oblasti (fragmenty). První je variabilní fragment, který váže antigen (Fab, fragment antigen binding) a vyznačuje se dvěma vazebnými místy pro cílový antigen. Druhou částí je konstantní fragment (Fc, fragment crystallizable), který je zodpovědný za interakci s dalšími složkami imunitního systému (obr. X). Tato interakce může vést ke dvěma typům cytotoxické reakce (Reilly 2010):

1) komplement dependentní cytotoxicita (CDC, *angl.* complement dependent cytotoxicity)

2) protilátkově závislá buňkami zprostředkovaná cytotoxicita (ADCC, *angl.* antibody dependent cell-mediated cytotoxicity).



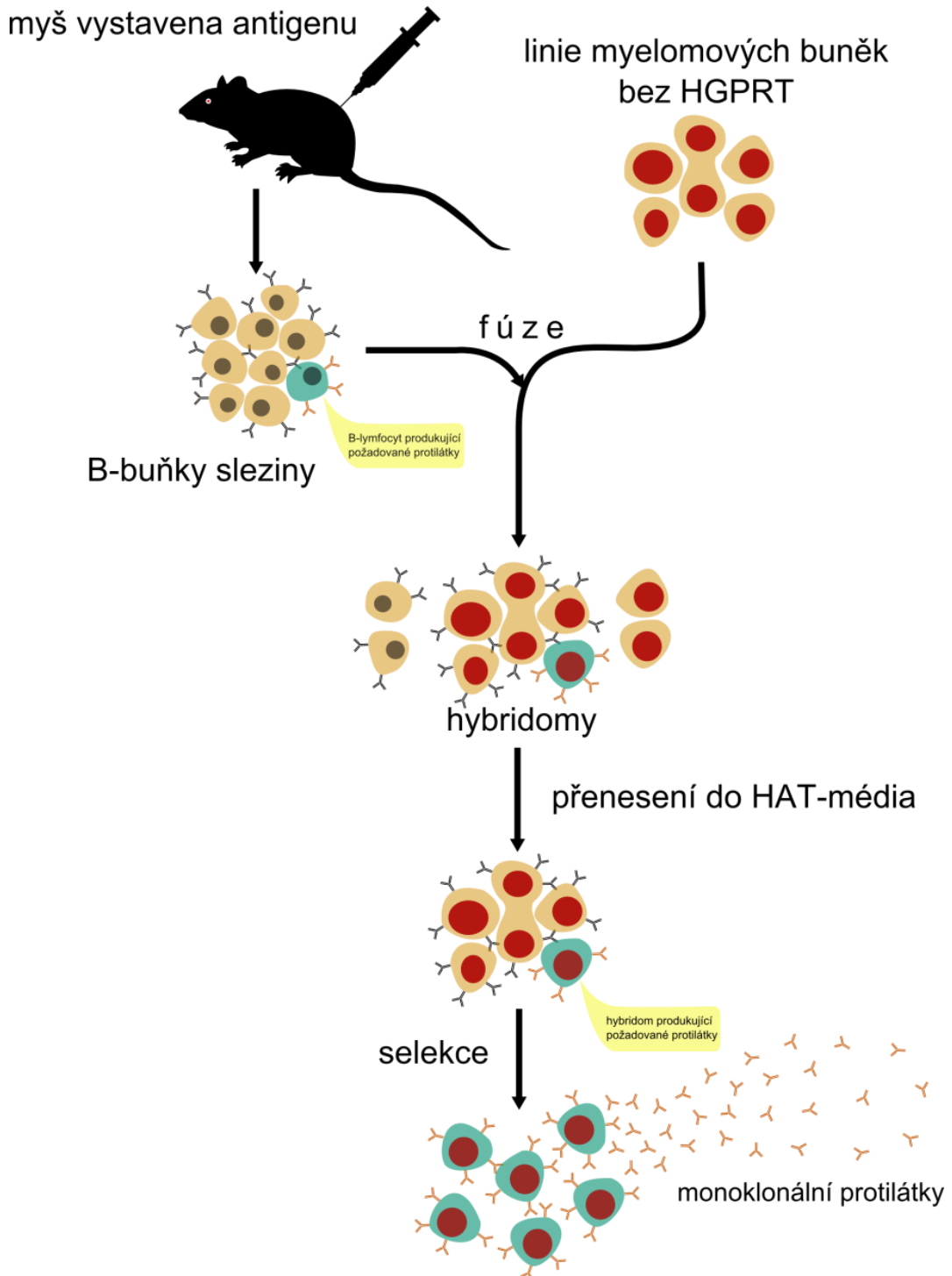
Obr. 3: Struktura monoklonální protilátky třídy IgG. Fab – antigen vázající fragment, Fc – konstantní fragment. Upraveno dle Thomson 2014.

Protilátky dělíme dle struktury konstantního fragmentu do pěti tříd: IgG, IgA, IgD, IgE a IgM. Nejvýznamnější a nejhojněji zastoupená třída je IgG, která se dělí do čtyř podtříd IgG₁₋₄. Protilátky užívané v radioterapii patří právě do IgG třídy (Kowalsky a Falen 2011).

2.2.2 Produkce monoklonálních protilátek

Určitou monoklonální protilátku začnou produkovat B-lymfocyty po stimulaci příslušným cílovým antigenem. Bohužel B-lymfocyty není možno kultivovat v *in vitro* podmínkách a tím si zajistit produkci žádané protilátky. Tento problém vyřešili Köhler a Milstein (Köhler a Milstein 1975) vyvinutím takzvané hybridomové metody. Ta spočívá v *in vitro* fúzi myších lymfocytů stimulovaných příslušným antigenem s myelomovými

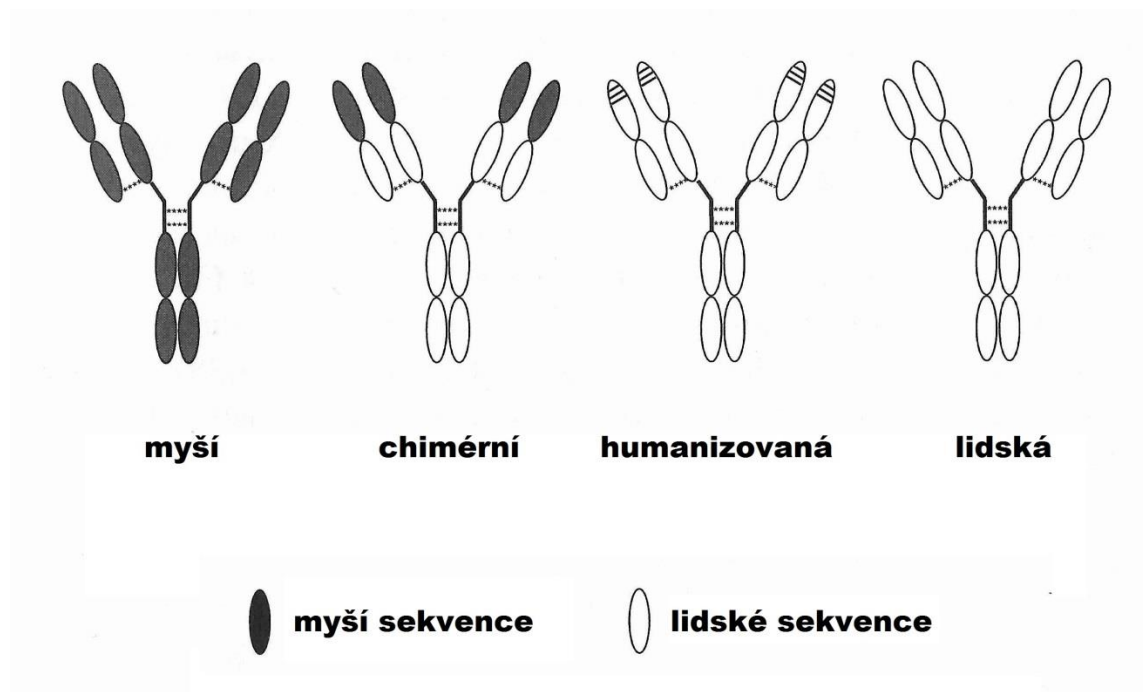
buňkami myši. Výsledná fúzní buňka se nazývá hybridom a má vlastnosti obou parentních buněk, neboť je schopna produkovat určitou monoklonální protilátku a zároveň se nekonečně množit *in vitro* podmínkách (viz Obr. 4). Hybridom pochopitelně produkuje pouze myší protilátky.



Obr. 4: Schéma hybridomové techniky produkce monoklonálních protilátek. HGPRT - hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza (*angl.* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) – enzym podílející se na recyklaci nukleotidů pro syntézu RNA, HAT-medium (*angl.* hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium), selekční medium, ve kterém přežijí pouze hybridomy s HGPRT získanou z B-buněk. Posledním krokem je selektce klonu produkujícího požadovanou protilátku. Ilustrace Martin Král.

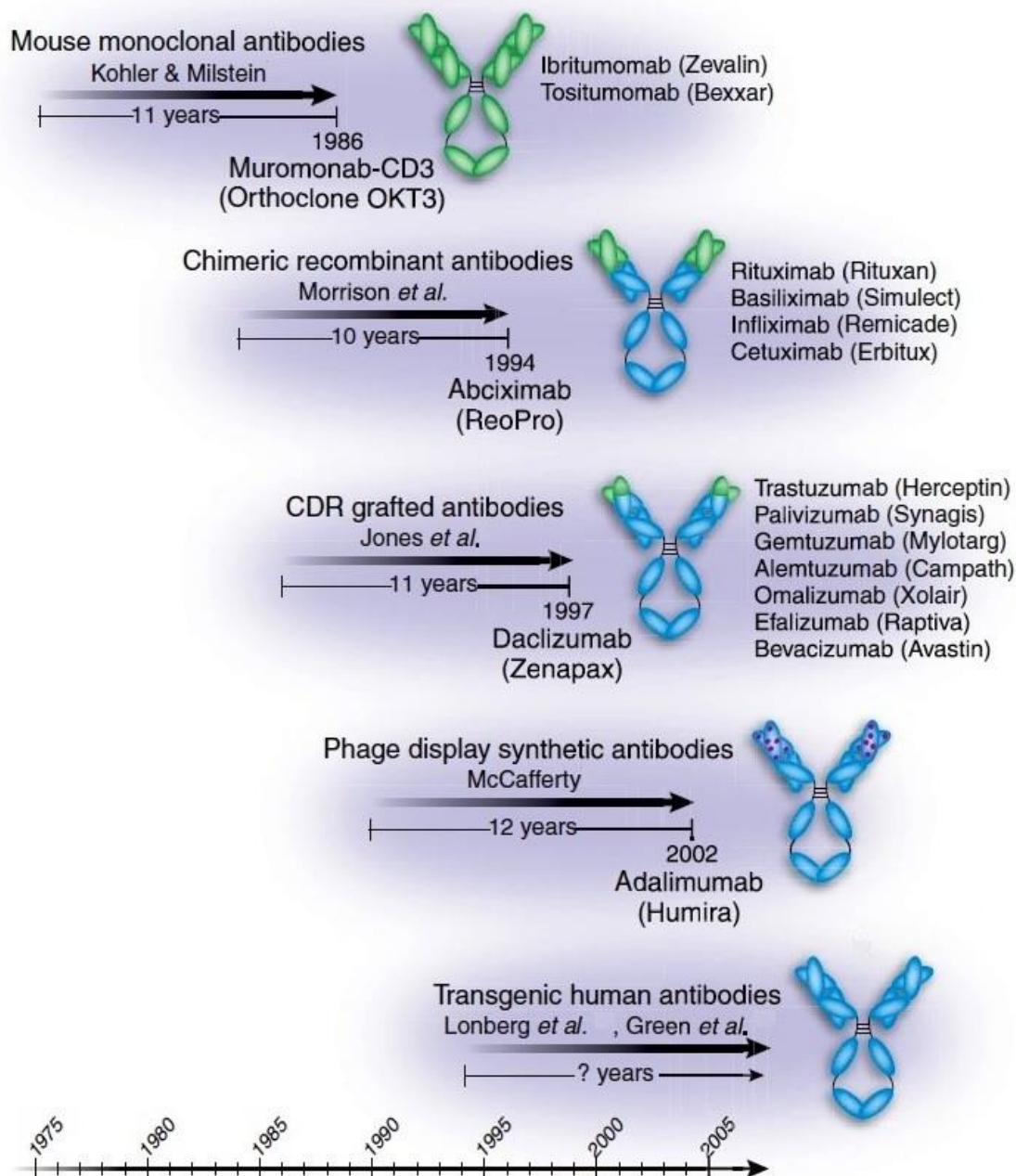
Bohužel užití myších protilátek v klinické praxi přineslo některé nežádoucí účinky, mezi nejvýznamnější se řadí vznik lidských protilátek proti myším protilátkám (*angl.* human antimouse antibodies, HAMA). Ve snaze snížit výskyt této nežádoucí reakce byly vyvinuty za využití rekombinantní DNA takzvané chimérické protilátky, které mají variabilní část kódovanou myší DNA, zatímco konstatní fragment je kódován lidskou DNA (Morrison et al. 1988).

Ještě o stupeň dál ve vývoji stojí plně lidské protilátky, které jsou produkovány pomocí transgenních myší (Lonberg a Huszar 1995). Schéma typů protilátek je na obrázku 5.



Obr. 5: Přehled typů monoklonálních protilátek dle původu jejich aminokyselinové sekvence (upraveno dle Reilly 2010)

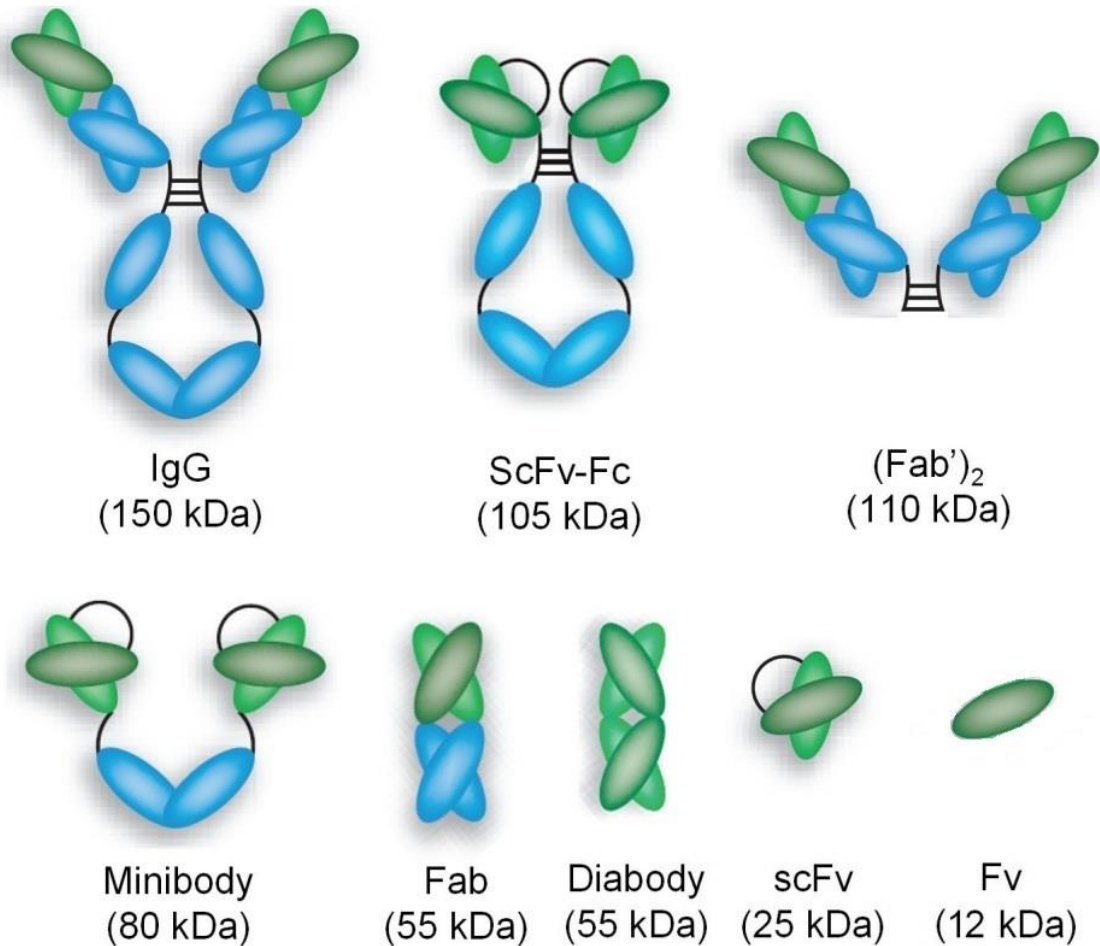
Vývoj produkčních technologií monoklonálních protilátek a jejich následné využití pro výrobu klinicky využívaných preparátů dobře ilustruje schéma na obr. 6.



Obr. 6: Vývoj metod produkce monoklonálních protilátek. Obecně lze říci, že preparáty schválené americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (*angl.* Food and Drug Administration, FDA) se objevily na trhu vždy 10-12 let po tom, co byla technologie jejich produkce popsána ve vědecké literatuře. Prvním způsobem produkce monoklonálních protilátek byla hybridomová technologie (Köhler a Milstein 1975), chimérické protilátky byly poprvé připraveny rekombinantní technikou v roce 1984 (Morrison *et al.* 1984). Protilátky s myším štěpem CDR (komplementaritu určující region, *angl.* complementarity-determining region), též nazývané humanizované, byly připraveny v druhé polovině 80. let (Jones *et al.* 1986). V roce 1990 byla zavedena metoda „fágový display“ produkující poprvé prakticky plně lidské protilátky (McCafferty *et al.* 1990). Doposud nejnovější a nejužívanější technikou, která produkuje plně lidské protilátky, je metoda využívající transgenních myší (Longberg *et al.* 1994, Green *et al.* 1994). Zelené úseky protilátek značí myší sekvence aminokyseliny, zatímco modré jsou lidského původu. Upraveno dle Longberg 2005.

2.2.3 Fragментy protilátek

Biotechnologicky získané monoklonální protilátky (třídy IgG) jsou pochopitelně v kompletní podobě, tj. dva lehké a dva těžké řetězce o celkové molekulové hmotnosti okolo 150 kDa. Pomocí enzymatického štěpení lze získat různé fragmenty (viz Obr. 7) parentní protilátky o menší molekulové hmotnosti a s odlišnou farmakokinetikou.



Obr. 7: Přehled možných fragmentací monoklonální protilátky IgG. IgG (imunoglobulin) – intaktní protilátka, ScFv-Fc (*angl.* single chain fragment variable-fragment crystallizable), Fab (*angl.* fragment antigen binding), scFv (*angl.* single chain fragment variable), Fv (*angl.* fragment variable). Upraveno dle Hong et al. 2008.

Jednořetězcový variabilní fragment-fragment krystalizující (*angl.* single-chain fragment variable-fragment crystallizable, ScFv-Fc)

Jedná se o největší z možných štěpů protilátek, jehož molekulová hmotnost se pohybuje okolo 105 kDa, což činí zhruba dvě třetiny původní protilátky. Tyto štěpy vznikají opětovným navázáním krystalizujícího fragmentu (Fc) na jednořetězcový

fragment (scFv). Biologický poločas těchto látek je oproti intaktním protilátkám kratší, tj. je v řádu desítek hodin (Olafsen a Wu 2010).

Dvojitý antigen vázající fragment (*angl.* fragment antigen binding, (Fab')₂)

(Fab')₂ fragment protilátky je produkován štěpením původní protilátky pepsinem, čímž dojde k oddělení většiny krystalizujícího fragmentu (Fc). (Fab')₂ fragmenty mají dvě antigen vazebné domény a jsou spojeny disulfidickými můstky, což z nich činí bivalentní molekuly s hmotností okolo 110 kDa. Dvojvazné fragmenty protilátek (Fab')₂ jsou menší než jejich parentní protilátky, díky tomu lépe pronikají do tkáně a mají kratší biologický poločas. Použitím (Fab')₂ fragmentů se též snižuje nescifická vazba na necílové buňky, za kterou je u celých protilátek odpovědný Fc fragment (Hong et al. 2008).

Antigen vázající fragment (*angl.* antigen binding fragment, Fab)

Štěpením pomocí papainu lze oddělit antigen vázající fragment (Fab) od zbytku protilátky. Takovýto štěp původní molekuly (cca 55 kDa) si zachovává původní specifitu vůči cílovému antigenu, avšak vykazuje změněné farmakokinetické vlastnosti – zejména vyšší clearance (Bowles et al. 1988).

Jednořetězcový variabilní fragment (*angl.* single-chain variable fragment, scFv, též scAb)

Jednořetězcový variabilní fragment je fúzní protein složený z variabilních oblastí těžkého (V_H) a lehkého řetězce (V_L) původní protilátky spojených krátkou peptidovou spojkou o deseti až pětadvaceti aminokyselinách. Celková hmotnost scFv se pohybuje okolo 25 kDa. Tento protein si zachovává specifitu původního imunoglobulinu navzdory absenci konstantních regionů a zavedení peptidové spojky. K produkci scFv je využívána např. bakterie *E. coli* (Bird et Walker 1991).

Nanobodies (též *angl.* single-domain antibodies, sdAb též *angl.* fragment variable, Fv)

Nanobodies představují fragmenty protilátek z jedné monomerní variabilní domény původní protilátky. Stejně jako původní protilátka jsou schopny se vázat na specifický antigen, avšak mají molekulovou hmotnost přibližně jedné desetiny původní

protilátky, čili cca 12-15 kDa. Poprvé byly studovány ve velbloudím séru (Hamers-Casterman et al. 1993, Kaur et al. 2012, Oliveira et al. 2013).

Minibodies

Minibody - fragment protilátky složený ze dvou variabilních domén (scFv) a jedné konstantní (V_L - V_H - C_{H3} , cca 80 kDa) je bivaletní molekula s vysokou vazebností k cílovému antigenu. Např. první anti-CEA minibody (CEA, *angl.* carcinoembryonic antigen) byla získána genetickou fúzí T84.66 (anti-CEA) jednořetězcové protilátky (scFv) s C_{H3} doménou lidské IgG1 protilátky (Hu et al. 1996).

Diabodies

Diabody tvoří dva scFv fragmenty se spojovacími peptidy, které jsou příliš krátké na to, aby dovolily spárování domén stejných řetězců, čili se spojují těžké a lehké řetězce (V_H - V_L). Hmotnosti diabodies se pohybují okolo 55 kDa (Holliger et al. 1993). Diabodies vykazují disociační konstanty až 40x nižší než odpovídající scFv fragmenty, mají tedy mnohem vyšší affinitu ke svému antigenu. Díky tomu mohou být diabodies podávány v daleko nižších dávkách než protilátky a přitom mají zachovanou vysokou specifitu k nádoru *in vivo* (Adams et al. 1998).

Monobodies

Monobodies jsou proteiny připravené pomocí genového inženýrství, které jsou schopné vazby na určitý antigen. Navzdory svému jménu nevychází z monoklonálních protilátek, což z nich činí zástupce skupiny „antibody mimetics“ (protilátková mimetika). Monobodies jsou složeny z 94 aminokyselin a mají molekulovou hmotnost okolo 10 kDa (Koide et Koide 2007).

Affibodies

Affibodies jsou malé proteiny navržené tak, aby se s vysokou afinitou vázaly na určité cílové antigeny a tak imitují funkci monoklonálních protilátek, což je stejně jako monobodies řadí do skupiny „antibody mimetics“. Molekula affibody je složena ze tří alfa helixů o 55 aminokyselinách a má molekulovou hmotnost okolo 6 kDa (Kaur et al. 2012). Jejich potenciál je jak v diagnostice nádorů (Orlova et al. 2006), tak v terapii (Tolmachev et al. 2007).

Jako názorný příklad odlišných farmakologických vlastností různých fragmentů jedné protilátky a způsobů jejich značení použitých v nukleární medicíně je uvedena Tabulka 2, která popisuje vlastnosti štěpů protilátky cílené na CEA (karcinoembriotický antigen, *angl.* carcinoembryonic antigen).

Tabulka 2. Přehled radioizotopově značených fragmentů cílených na CEA (karcinoembriotický antigen, *angl.* carcinoembryonic antigen)

Fragment	Izotopy	Fáze testování	Hlavní výhody	Hlavní nevýhody
Intaktní protilátka	^{131}I ^{111}In $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ^{64}Cu ^{124}I $^{94\text{m}}\text{Tc}$	klinická	vysoká afinita, dobrý terapeutický potenciál	dlouhý poločas, vysoká cena
Fab´	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ ^{123}I $^{94\text{m}}\text{Tc}$	klinická	vysoká clearance	přednostní vychytávání ledvinami, nízká funkční afinita
ScFv	^{123}I ^{125}I ^{111}In	klinická intraoperativní	vysoká clearance, nízká imunogenicita	vysoká clearance, nízké vychytávání nádorem
ScFv-Fc	^{125}I ^{111}In	preklinická	vysoký kontrast nádoru, dobrý terapeutický potenciál	nízká clearance, vysoké vychytávání játry
Diabody	^{64}Cu ^{124}I ^{18}F	preklinická	vysoká afinita, vysoký kontrast nádoru, přiměřená rychlost clearance	vysoké vychytávání ledvinami
Minibody	^{123}I ^{64}Cu	pilotní klinická	vysoká afinita, vysoký kontrast nádoru, vhodná rychlost clearance	komplikovaná farmakokinetika

Fragment	Izotopy	Fáze testování	Hlavní výhody	Hlavní nevýhody
Pretargeting	^{111}In $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ^{124}I ^{68}Ga	preklinická	vynikající kontrast v nádoru, vysoká citlivost	koplikovaná procedura, nevhodná pro terapii

Převzato z Hong et al. 2008.

2.2.4 Radionuklidy pro značení protilátek

Obecně radionuklidy dělíme dle druhu emitovaného záření na tři základní skupiny:

- a) **α -zářiče** – emitují α částice, tj. jádra helia (^4_2He)
- b) **β -zářiče** – se dělí na dvě podskupiny: **β^-** a **β^+** . β^- zářiče emitují negatrony (elektrony) a β^+ zářiče pozitrony¹.
- c) **γ -zářiče** – emitují vysokoenergetické fotony

Z hlediska nukleární medicíny dělíme radionuklidy dle jejich klinického účelu na **diagnostické** a **terapeutické**. Obecně lze říci, že jako diagnostické se využívají β^+ zářiče a γ zářiče, zatímco α a β^- zářiče se uplatňují v terapii. V případě smíšených zářičů je možné využít nuklidy k oběma zmiňovaným účelům (např. ^{111}In , ^{131}I , atd.) tj. jako takzvaná teranostika.

Důležitou kvantitativní veličinou popisující emitované záření příslušného radionuklidu je jeho energie (keV), resp. pro potřeby nukleární medicíny spíše **lineární přenos energie** (LET, *angl.* linear energy transfer). Hodnota LET udává energii, kterou částice předá během letu prostředí na jednotku délky její trajektorie. LET se uvádí v keV/ μm a právě z této veličiny lze usuzovat na skutečné biologické účinky záření daného radionuklidu. Obecně tedy nuklidy produkující záření s nižším LET působí menší cytotoxický efekt než ty s vyšší hodnotou lineárního přenosu energie (Couturier et al. 2005b).

¹Pozitron po svém vzniku urazí pouze velice krátkou vzdálenost (cca 1-2 mm) a jakožto antičástice po setkání s elektronem v řádu mikrosekund zaniká - anihiluje za vzniku dvou fotonů gama záření (511 keV), které opouští místo anihilace po přímce, avšak opačnými směry. Tyto gama fotony již lze pohodlně detekovat a tudíž využít pro zobrazování.

Velice důležitou vlastností každého radionuklidu je **poločas radioaktivní přeměny** ($T_{1/2}$) čili doba, za kterou se přemění polovina všech na počátku přítomných jader. Z hlediska radiofarmacie je důležité, aby poločas přeměny nuklidu dobře koreloval s biologickým poločasem radiofarmaka. A to v tom smyslu, že látky s krátkým biologickým poločasem (fragmenty protilátek, peptidy) by měly být značeny nuklidy s relativně podobným poločasem přeměny (desítky minut, hodiny), zatímco pro protilátky je vhodné použít izotopy s delším poločasem (desítky hodin, dny), (Reilly 2010).

V neposlední řadě hraje důležitou úlohu při volbě vhodného radioizotopu způsob jeho vazby k molekule radiofarmaka. Tento je popisován v kapitole 2.2.5.

Přehled základních radionuklidů používaných pro značení radiofarmak za účelem zobrazování je uveden v tabulce 3. Tabulka 4 uvádí přehled radionuklidů užívaných v radioterapii.

Tabulka 3. Radionuklidy nejčastěji používané v diagnostice.

Radionuklid	Poločas	Maximální energie (keV)
<i>β^+-zářiče</i>		
^{11}C	20,3 min	511
^{18}F	109,8 min	511
^{64}Cu	12,7 hod	511
^{68}Ga	67,7 min	511
^{86}Y	14,7 hod	511
^{89}Zr	78,5 hod	511
^{124}I	4,2 dne	511
<i>γ-zářiče</i>		
^{67}Ga	3,26 dne	394
^{111}In	2,8 dne	245
^{123}I	13,22 hod	159
^{125}I	59,4 dne	35
^{131}I	8,02 dne	637
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,02 hod	140,5
^{177}Lu	6,73 dne	210

Nuklidy ^{11}C a ^{18}F se z důvodu jejich krátkého poločasu přeměny prakticky nepoužívají pro značení monoklonálních protilátek, jsou jakožto základní PET izotopy uvedeny pro srovnání. Upraveno dle Kowalsky a Falen 2011.

Tabulka 4. Radionuklidy používané v radioimunoterapii

Radionuklid	Dceřiný izotop	Poločas	Maximální energie (keV)	Maximální dosah (μm)
<i>β^+-zářiče (LET 0,2 keV/μm)</i>				
^{90}Y	-	2,67 dne	2284	11300
^{131}I	-	8,04 dne	606	2300
^{177}Lu	-	6,73 dne	497	1800
^{67}Cu	-	2,58 dne	575	2100

Radionuklid	Dceřiný izotop	Poločas	Maximální energie (keV)	Maximální dosah (μm)
β^+-zářiče (LET 0,2 keV/μm)				
^{186}Re	-	3,78 dne	1077	4800
^{188}Re	-	17,0 hod	2120	10400
Augerovy elektrony (LET 4-26 keV/μm)				
^{125}I	-	60,1 dne	31	20
^{111}In	-	2,8 dne	26	17
^{67}Ga	-	3,3 dne	10	3
^{123}I	-	13,3 hod	31	20
$^{195\text{m}}\text{Pt}$	-	4,0 dne	64	76
α-zářiče (LET 20-30 keV/μm)				
^{225}Ac	-	10,0 dní	5830	48
	^{221}Fr	4,9 min	6341	55
	^{217}At	32 ms	7069	65
	^{213}Bi	45,6 min	5870	48
	^{213}Po	4,2 μs	8377	85
^{211}At	-	7,2 hod	586	48
	^{211}Po	516 ms	7450	70
^{213}Bi	-	45,6 min	5870	48
	^{211}Po	4,2 μs	8377	85
^{212}Bi	-	1,0 hod	6051	51
	^{212}Po	0,3 μs	8785	92
$^{212}\text{Pb}^*$	-	10,64 hod	-	-
	^{212}Bi	1,0 hod	6051	51

Radionuklid	Dceřiný izotop	Poločas	Maximální energie (keV)	Maximální dosah (μm)
<i>α-zářiče (LET 20-30 keV/μm)</i>				
²¹² Pb*	²¹² Po	0,3 μs	8785	92

*není α-zářičem, ale produkuje α-zářič ²¹²Bi

LET (lineární přenos energie, *angl.* linear energy transfer)

Převzato z Navarro-Teulon et al. 2013.

2.2.5 Způsoby značení protilátek radioizotopy

Značení monoklonálních protilátek radioizotopy lze z pohledu chemizmu reakce rozdělit do dvou základních skupin:

a) HALOGENACE - značení radionuklidy halogenů

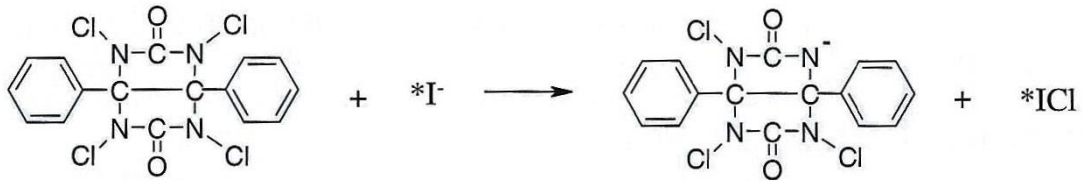
- přímé jodace
- nepřímé jodace

b) CHELATAČE - značení radiokovy

Halogenace monoklonálních protilátek obnáší v praxi v naprosté většině případů jodaci. Ostatní halogeny se pro značení protilátek užívají zcela minoritně. Radioizotop jódu lze k molekule protilátky v zásadě připojit dvěma způsoby – přímo či nepřímo. Nepřímý způsob obnáší nejdříve jodaci výchozí látky (např. N-sukcinimidyl-3(4-hydroxyfenyl)propionan) a poté její konjugaci s molekulou samotné protilátky přes volné aminoskupiny lysinových zbytků. Prakticky se však nejčastěji používají metody přímé jodace a to díky své jednoduchosti a relativně vysokému výtěžku. Dvě nejužívanější metody přímé jodace jsou jodogenová metoda a metoda chloraminu T.

Jodogenová metoda

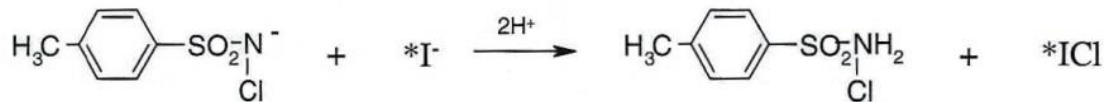
K oxidaci jodidu se využívá Iodo-Gen (1,3,4,6-tetrachlor-3 α ,6 α -difenyglykouril). Proces probíhá podle následující reakce:



Vzniklý ${}^*\text{I}^+$ pak joduje benzenová jádra tyrosinů v aminokyselinové sekvenci monoklonální protilátky (Lázníček a Komárek 1998).

Metoda chloraminu T

Chloramin T je sodná sůl N-monochlor-p-toluensulfonamindu, která má schopnost oxidovat radioaktivní jodid ${}^*\text{I}^-$ na ${}^*\text{I}^+$, jenž opět joduje tyrosinová benzenová jádra v molekule protilátky, jako je tomu v případě jodogenové metody. Reakce oxidace jodidu je následující:

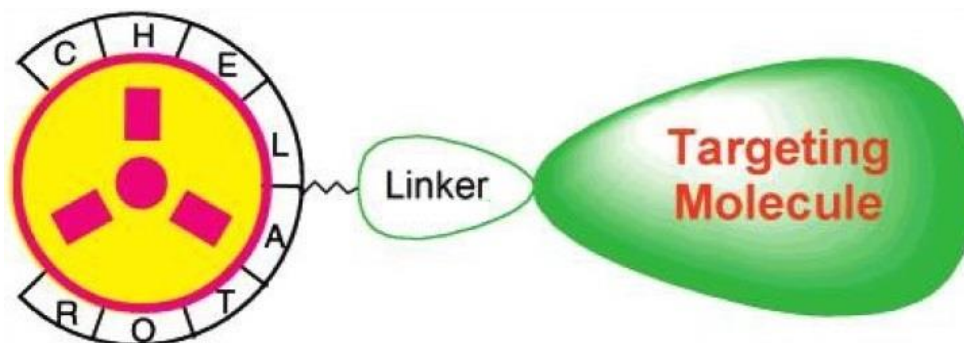


Značení radiokovy

Značení monoklonálních protilátek pomocí radiokovů je značně komplikovanější než výše popisované přímé radiojodace, jelikož radiokovy nelze k molekule protilátky jednoduše připojit klasickou kovalentní vazbou. Pro značení radiokovem je nutno protilátku nejprve modifikovat konjugací s vhodným bifunkčním chelatačním činidlem a až takto upravenou protilátku lze označit radiokovem, který utvoří komplex s již navázaným chelátorem. Chelátory a aspekty značení s jejich využitím jsou podrobněji probírány v následující kapitole.

2.2.6 Chelátory používané pro značení protilátek

Chelátory, přesněji bifunkční chelátory, mají schopnost na jedné straně vytvořit komplex se zvoleným radiokovem a zároveň disponují ve své struktuře reaktivní skupinou schopnou se kovalentně navázat na některou část proteinového řetězce. Funkce chelátoru je dobře patrná z obrázku 8.

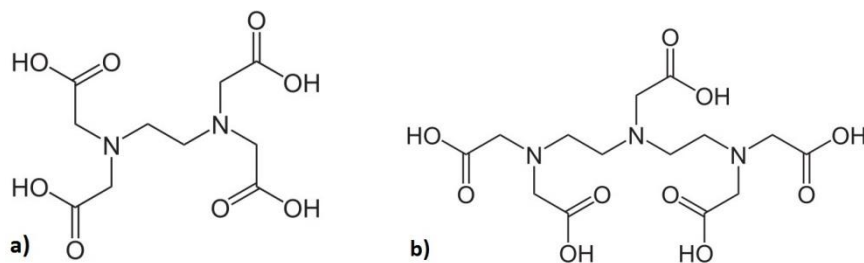


Obr. 8: Obecné schéma radiofarmaka s bifunkčním chelátorem, který váže radiokov. Linker = spojovník, Targeting Molecule = v našem případě monoklonální protilátka, která zajišťuje specifickou biodistribuci celého radiofarmaka. Převzato z Liu a Edwards 2001.

Bifunkční chelátory dělíme dle jejich chemické struktury na dvě základní skupiny:

- a) **acyklické**
- b) **makrocyclické**

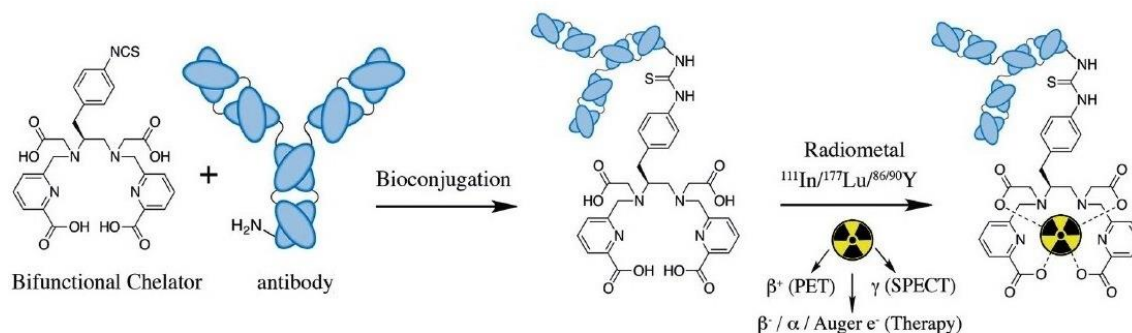
Nejtypičtějším a nejužívanějším zástupci **acyklických chelátorů** jsou EDTA a DTPA resp. jejich deriváty (chemické struktury viz Obr. 9). EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) se používá častěji jako pomocná látka v pufrch pro vychytání nenasazených radiokovů během procesu značení protilátek. DTPA (diethylentriaminpentaoctová kyselina) je klasickým a poměrně často užívaným acyklickým chelátorem pro značení monoklonálních protilátek. Základním rysem acyklických chelátorů je snadná a rychlá tvorba komplexu chelátor-kov za mírných podmínek, ovšem s tím se pojí i nižší termodynamická stabilita takového komplexu (Prince a Orvig 2014). Volný radiokov pak může být v organismu zdrojem radiotoxicity, která je blíže posána v kapitole 2.2.8.



Obr. 9: Acyklické chelátory. a) EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina, b) DTPA - diethylentriaminpentaoctová kyselina.

Makrocyclické bifunkční chelátory tvoří druhou významnou a relativně početnou skupinu komplexotvorných látek pro značení protilátek radiokovy. Obecně lze říci, že klasické makrocyclické chelátory (např. DOTA) tvoří komplexy s radiokovy pomaleji než acyklické chelátory a ke komplexaci je potřeba vyšší teploty. Naproti tomu vzniklé komplexy jsou stabilnější a to zejména v *in vivo* podmínkách (Liu a Edwards 2001). Zejména z důvodu vyšší termodynamické stability komplexu radikov-chelátor v biologických systémech jsme pro naši studii vybrali pouze makrocyclické chelátory.

Základní princip značení monoklonální protilátky radiokovem, tj. modifikace protilátky chelátorem a následná komplexace radiokovu, je znázorněn na obrázku 10. Nejčastější reaktivní skupinou používanou k derivatizaci bifunkčních makrocyclických chelátorů je skupina p-SCN-benzyl. Tato isothiokyanátová skupina v molekule chelátoru reaguje ve slabě bazickém prostředí s volnými aminoskupinami lysinových zbytků v aminokyselinové sekvenci protilátky za vzniku derivátu isothiomočoviny. Tím je chelátor kovalentně navázán na molekulu protilátky. Po přečištění reakční směsi je takto modifikovaná monoklonální protilátka připravena pro samotné označení radiokovem (Brouwers et al. 2004). Slabě bazické prostředí je velmi důležité pro průběh této konjugační reakce. V kyselém prostředí by aminoskupiny lysinů na protilátce byly protonovány a konjugační reakce by nemohla proběhnout. Naopak při extrémně alkalickém pH by hrozila denaturace monoklonální protilátky, proto většina zavedených protokolů doporučuje pH modifikačního pufru v hodnotách 8,0 – 9,0 (Cooper et al. 2006).



Obr. 10: Ilustrace základního principu značení monoklonálních protilátek radiokov pomocí bifunkčního chelátoru. Bifunkční chelátor, v tomto případě p-SCN-Bn-H₄-octapa, je nejprve konjugován s aminoskupinou lysinu v molekule protilátky. Poté následuje samotné označení protilátky zvoleným radiokovem, který tvoří komplex s navázaným chelátorem. Druh zvoleného radionuklidu potom určuje využití vzniklého komplexu. Převzato z Price a Orvig 2014.

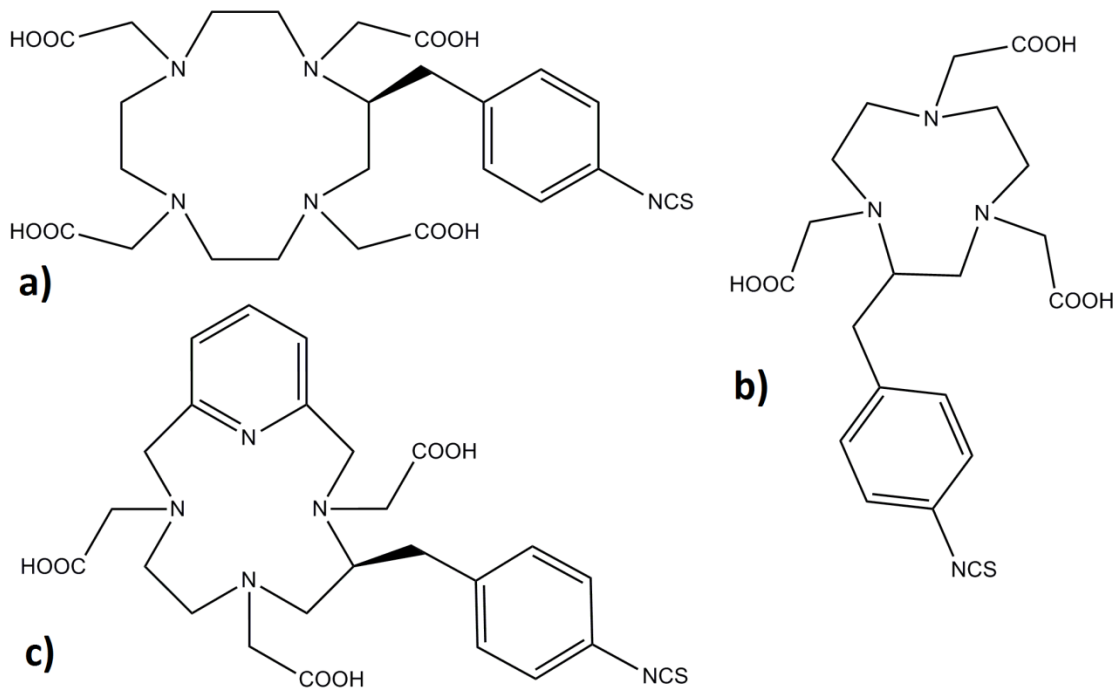
Vlastní značení protilátky radiokovem probíhá v kyselém pH. Pro vznik komplexu kov-chelátor je totiž nutné, aby se radiozotop v reakční směsi nacházel v čistě iontové podobě. Při pH vyšším než 6 totiž hrozí, že radiokov začne tvořit nerozpustný koloid a značení tak nebude úspěšné. Proto se pH pufru pro vlastní značení volí v rozmezí hodnot 5-6. Přičemž výrazně kyselější pH než 5 by hrozilo denaturací značené protilátky (Cooper et al. 2006).

V posledních dvaceti letech bylo připraveno mnoho nových makrocyclických chelátorů a jejich derivátů, které byly s různou úspěšností testovány jak v *in vitro*, tak v *in vivo* podmínkách (Price a Orvig 2014). Z početné palety těchto látek jsme pro naši studii zvolili tyto tři zástupce makrocyclických chelátorů: **DOTA**, **NOTA** a **PCTA**.

DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina) je nejdéle používaným makrocyclickým chelátorem v oblasti značení monoklonálních protilátek a jako takový ho lze považovat za zlatý standard (Stetter a Frank 1976). DOTA se používá při značení širokým spektrem radionuklidů, např. ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ⁶⁸Ga, ²²⁵Ac. Uplatnění tohoto chelátoru leží i v oblasti již klinicky používaných radiofarmak jako např. ¹¹¹In-DOTATOC (OctreoScan®). Mezi jeho nevýhody patří pomalá tvorba komplexu s radiokovem a nutnost použití zvýšené teploty pro průběh chelatace (Lewis et al. 1994, Price a Orvig 2014). Z několika různých modifikací je nejčastěji používán isothiokyanátobenzylový derivát DOTA, tj. 2-(4-isothiokyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina. Vzorec tohoto derivátu je uveden na Obr. 11.

NOTA (1,4,7-triazacyclononan-1,4,7-trioctová kyselina) byla poprvé syntetizována Coxem a spol. v roce 1990. NOTA je velice rozšířeným chelátorem schopným vázat širokou škálu radionuklidů (např. ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y). V případě ^{68}Ga je považována za zlatý standard. Nevyžaduje takové zvýšení teploty pro úspěšnou komplexaci jako DOTA a vykazuje i rychlejší kinetiku této reakce (Martell et al. 1996). Tento bifunkční chelátor je pro značení proteinů opět dostupný v isothiokyanatobenzylové modifikaci jako S-2-(4-isothiokyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononan-1,4,7-trioctová kyselina. Chemická struktura této modifikace je znázorněna na Obr. 11.

PCTA (3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]-pentadeka-1(15),11,13-trien-3,6,9-trioctová kyselina) byla poprvé syntetizována v roce 1995 jako kontrastní látka pro zobrazování v oboru nukleární magnetické rezonance, kde se využívá jejích komplexů s gadoliniem (Kim et al. 1995). Nově je tento chelátor využíván také pro značení protilátek radioaktivními ionty lanthanoidů a to nejvíce pro měď-64 a gallium-68, ale také např. pro lutecium-177 (Tircsó et al. 2006). Tento chelátor vykazuje rychlou komplexaci radiokovů za relativně nízkých teplot a komplex radiokov-PCTA disponuje vysokou sérovou stabilitou (Ferreira et al. 2010). Jedná se o poměrně nový chelátor, který není doposud široce prozkoumán. PCTA je pro značení radioaktivními kovy opět využívána v derivatizované formě s navázanou isothiokyanatobenzylovou skupinou, tj. jako 3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]-pentadeka-1(15),11,13-trien-4-(S)-(4-isothiokyanatobenzyl)-3,6,9-trioctová kyselina. Její chemická struktura je uvedena na Obr. 11.



Obr. 11: Vzorce makrocyclických chelátorů užívaných k modifikaci a značení monoklonálních protilátek. a) p-SCN-benzyl-DOTA b) p-SCN-benzyl-NOTA, c) p-SCN-benzyl-PCTA.

2.2.7 Radioimunodiagnostika a radioimunoterapie

Radioimunodiagnostika

Během posledních 15 let bylo do klinické praxe zavedeno několik diagnostických monoklonálních protilátek značených radioizotopy. Bohužel většina z nich byla stažena z trhu, většinou z ekonomických důvodů (Kowalsky a Falen 2011). Jediná diagnostická radioprotlátka, která zůstává v klinickém použití v USA je ¹¹¹In-capromab (**ProstaScint®**). Tato myší IgG₁ protilátka se váže na glykoprotein exprimovaný epitelem prostaty a používá se pro zobrazování metastáz karcinomu prostaty (Kowalsky a Falen 2011) pomocí jednofotonové emisní výpočetní tomografie (angl. single-photon emission computed tomography, SPECT). V České republice jsou Státním ústavem pro kontrolu léčiv registrovány pouze dva přípravky s diagnostickou protilátkou v oboru radiofarmak. Jedním z nich je přípravek **LeukoScan**, který obsahuje fragment (F_{ab}) myší monoklonální protilátky zvaný sulesomab, který je značený techneciem-99m (Skehan et al. 2003). Cílovou strukturou sulesomabu je antigen NCA-90 (nespecifický zkříženě reagující antigen 90, *angl.* nonspecific cross-reacting antigen 90) experimentovaný na povrchu granulocytů. Tento přípravek se používá především pro

zobrazení zánětu v kostech u pacientů se suspektní osteomyelitidou. Druhým přípravkem je **Scintimun**, jehož účinnou látkou je myší IgG₁ monoklonální protilátka besilesomab, značená též techneciem-99m. Besilesomab se váže na antigen NCA-95 (nespecifický zkříženě reagující antigen 95, *angl.* nonspecific cross-reacting antigen 95), který se vyskytuje na membránách granulocytů (Richter et al. 2011). Hlavní indikací Scintimunu je také suspektní osteomyelitida periferních kostí.

Žádná monoklonální protilátka označená pozitronovým zářičem tedy určená pro zobrazení pomocí pozitronové emisní tomografie není registrována pro klinické použití. Ovšem celá řada protilátek značených zirkoniem-89 je v preklinickém či klinickém testování (viz tabulka 5).

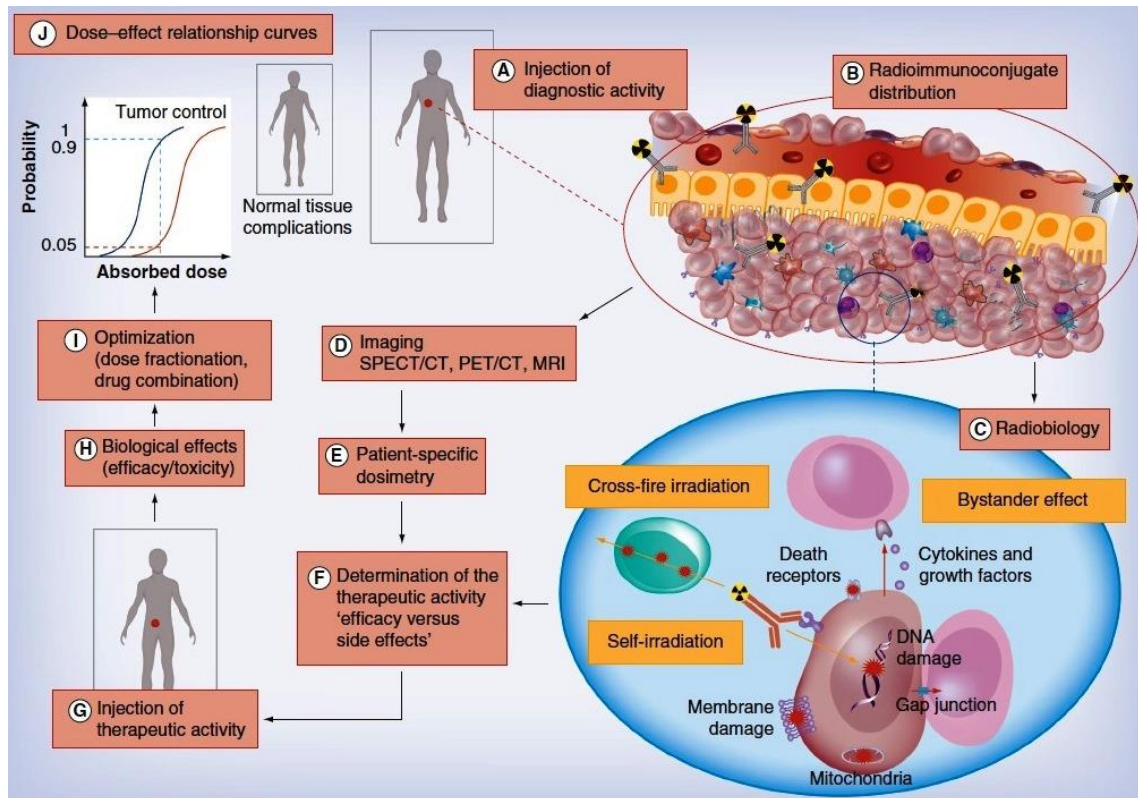
Tabulka 5. Přehled preklinických a klinických studií používajících zirkoniem-89 značené protilátky pro zobrazování příslušných typů tumorů pomocí pozitronové emisní tomografie (PET).

Karcinom	Cílový antigen	Nosný vector
Karcinom slinivky	CD147	059-053
Non-Hodgkinův lymfom	CD20*	ibritumomab tiuxetan
Karcinom hlavy a krku	CD44v6*	cmAb U36
Více typů tumorů	EGFR	cetuximab
Karcinom prostaty	EGP-1	hRS7
Karcinom jater	GPC3	αGPC3
Kolorektální karcinom	HER1	panitumumab
Karcinom prsu a vaječnicků	HER2*	trastuzumab
Trojité negativní karcinom prsu	IGF-1R	R1507
Karc. hlavy a krku, žaludku	MET	DN30
Renální karcinom	MN/CA IX	cG250
Karcinom prostaty	PSMA	7E11
Karcinom jater	PIGF	RO5323441
Karcinom hlavy a krku, vaječnicků	VEGF*	bevacizumab

*cílové antigeny hodnocené v klinických studiích. Převzato z van de Watering et al. 2014.

Radioimunoterapie

Princip radioimunoterapie (RIT) spojuje cytotoxické účinky monoklonálních protilátek jako takových, tj. komplementem zprostředkovanou cytotoxicitu, protilátkově závislou buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu a indukci apoptózy (Weiner et al. 2010) s radiačními účinky nuklidu připojeného na vlastní protilátku, tj. zejména poškození DNA (Kassis 2008). Základní principy radioimunoterapie popisuje obrázek 12.



Obr. 12: Schéma radioimunoterapie (RIT). Schéma znázorňuje nejdůležitější kroky během radioimunoterapie od plánování léčby po hodnocení její účinnosti/toxicity. (A) Aplikace diagnostické dávky radioimunokongugátu, která slouží k vypočtení terapeutického dávkování. (B) Celotělová kontrola biodistribuce diagnostické dávky pomocí (D) SPECT či PET zobrazování. Anatomické informace jsou poskytovány díky (D) CT (počítačová tomografie) nebo NMR (nukleární magnetická rezonance). (E) kalkulace dávky obdržené pacientem. (C) Radiobiologické účinky radioimunoterapie zahrnují přímé působení na buňku s navázanou protilátkou, tj. blokaci příslušného receptoru event. spuštění apoptózy, cytotoxicitu sprostředkovanou leukocyty a dále radiační účinky nuklidu vázaného na protilátku, tj. poškození jaderné DNA buňky, poškození buněčné membrány a mitochondrií. Mezi nepřímé účinky se řadí křížové ozáření buněk (cross-fire irradiation) v okolí a tzv. efekt přihlížejícího (bystander effect), tj. cytokiny spuštěná apoptóza buněk v blízkosti zasažené buňky. (E a G) Zahrnuje podání vypočtené terapeutické aktivity s přihlédnutím na vztah účinnosti léčby a nežádoucích účinků. (H & I) Je posuzován vztah mezi dávkou a účinkem, může dojít k racionalizaci terapie, včetně opakovaného podání dávky event. nasazení kombinace léčiv. (J) Zpracování křivek závislosti účinku na dávce s přihlédnutím k nežádoucím účinkům na zdravé tkáni. Převzato z Navarro-Teulon et al. 2013.

V případě terapeutických nuklidů se většinou jedná o beta-zářiče, smíšené beta/gama-zářiče či nejnověji zkoumané alfa-zářiče (Reilly 2010). Seznam užívaných terapeutických radionuklidů je uveden v tabulce 4. Tato oblast využití monoklonálních protilátek (RIT) je velice intenzivně studována, což dokládá přehled protilátek v různých fázích klinického zkoušení uvedený v tabulce 6.

Do standardní klinické praxe se dostaly zatím dva preparáty a to Zevalin[®] a Bexxar[®] (Navarro-Teulon et al. 2013).

Zevalin[®]

Ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]) byl americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (*angl.* Food and Drug Administration, FDA) schválen v roce 2002 ke klinickému použití. Pro Českou republiku byl schválen Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL) v roce 2004. Jedná se o IgG₁ myší protilátku ibritumomab modifikovanou tiuxetanem, což je derivát chelátoru DTPA. Protilátka je cílena na CD20 povrchový antigen B-lymfocytů, tudíž je využívána v terapii non-Hodgkinových lymfomů. Tato modifikovaná protilátka se značí indiem-111 nebo yttriem-90. Před podáním samotného Zevalinu[®] je nutno aplikovat dávku monoklonální protilátky rituximabu, která vysytí CD20 antigeny na periférii a zajistí tak optimální biodistribuci samotného radiofarmaka. Následuje podání ¹¹¹In-ibritumomabu a ověření jeho správné distribuce pomocí gama kamery. Po vyloučení abnormální biodistribuce může za 7 dní následovat samotná terapeutická dávka ⁹⁰Y-ibritumomabu (14,8 MBq/kg) opět s premedikací rituximabem (Kowalsky a Falen 2011).

Bexxar[®]

¹³¹I-tositumomab (Bexxar[®]) je myší IgG₂ monoklonální protilátka cílená na epitop CD20 antigenu na povrchu B-lymfocytů. Americký FDA ho schválil ke klinickému použití v roce 2003. V České republice zatím registrován není. Slouží k léčbě non-Hodgkinových lymfomů. Vzhledem k tomu, že jód-131 je smíšený zářič (β^- a γ), lze biodistribuci Bexxaru[®] monitorovat pomocí gama kamery. Dávkové schéma zahrnuje premedikaci vysycovací dávkou neznačeného tositumomabu následovanou monitorovací dávkou Bexxaru[®], která slouží k ověření správné biodistribuce a k nastavení optimální terapeutické dávky, která následuje za 7-14 dní po monitoringu (opět premedikace „studeným“ tositumomabem). Pacient užívá po celou dobu terapie

130 mg jodidu draselného denně jako ochranu štítné žlázy před jódem-131 uvolněným metabolizací protilátky (Kowalsky a Falen 2011).

Tabulka 6. Klinické studie s radioaktivně značenými protilátkami, stav k roku 2013.

Radionuklid-protilátka	Klinická fáze	Způsob podání	Indikace
CEA			
¹³¹ I-A5B7 a –CA4P	I	i.v.	GC
¹³¹ I-F6 F(ab') ₂	I	i.v.	CC
¹³¹ I-BsmAb-hMN14-734	I	i.v. (pRIT)	CEA _{exp}
⁹⁰ Y-hMN14	I	i.v. (hdRIT)	MTC
⁹⁰ Y-cT.84.66	I	i.v.	CEA _{exp} BC, CC
¹³¹ I-MN14 F(ab') ₂	I	i.v.	MTC
¹³¹ I-COL-1	I	i.v.	GIM
¹³¹ I-35/B7-25/F6	I	i.v.	CC
¹³¹ I CIGB-M3	I	i.v.	CC
¹³¹ I-Kab201	I/II	i.v., IA	PC
¹³¹ I-A5B7hDFM	I/II	i.v.	CC
¹³¹ I-MN14 F(ab') ₂	I/II	i.v.	MTC
¹³¹ I-hMN14	I/II	i.v.	OC
¹³¹ I-NP4 (IMMU-4)	I/II	i.v.	CEA _{exp}
¹³¹ I-BsmAb-F6-734 nebo ¹³¹ I-hMN14-734	II	i.v. (pRIT)	MTC
¹³¹ I-hMN14	II	i.v.	CC
¹³¹ I-BsmAb-hMN14-734	II	i.v. (pRIT)	MTC

Radionuklid-protilátka	Klinická fáze	Způsob podání	Indikace
<i>TAG-72</i>			
⁹⁰ Y-hCC49DCh2(IDEA-159)	I	i.v.	CC
⁹⁰ Y-Biot/-CC49-(scFv)4-strept	I	i.v. (pRIT)	GC
¹⁷⁷ Lu-CC49 nebo ⁹⁰ Y-CC49	I	i.p.	OC
⁹⁰ Y-CC49	I	i.v. (hdRIT)	GC
		i.v.	NSCLC
¹³¹ I-cB72.3	I	i.v. (fRIT)	CC
¹³¹ I-CC49	II	i.v.	PC
⁹⁰ Y-CC49 nebo ¹³¹ I-COL-1	II	i.v.	CC
<i>A33</i>			
¹²⁴ I-huA33	dozimetrie	i.v.	CC
¹²⁴ I-huA33	PET/CT	i.v.	CC
¹³¹ I-huA33	I	i.v.	CC
¹³¹ I-huA33 a ¹²⁵ I-huA33	I	i.v.	CC
¹³¹ I/ ¹²⁵ I-A33	I	i.v.	CC
¹²⁵ I-A33	I/II	i.v.	CC
<i>G250</i>			
¹²⁴ I-cG250	dozimetrie	i.v.	RCC
¹³¹ I-cG250	I	i.v. (fRIT)	RCC
¹³¹ I-mG250	I	i.v.	RCC
¹⁷⁷ Lu-cG250	I	i.v.	RCC
¹³¹ I-mG250	I/II	i.v.	RCC
¹³¹ I-cG250	II	i.v.	RCC

Radionuklid-protilátka	Klinická fáze	Způsob podání	Indikace
<i>TN-C</i>			
⁹⁰ Y-BC4	I	lokálně	GL
Biot-BC4/ ⁹⁰ Y-DOTA-Biot	I/II	i.v. (pRIT)	GL
²¹¹ At-ch81C6	II	IRC	BT
¹³¹ I-m81C6	II	IRC	GL, BT
<i>MUC1</i>			
⁹⁰ Y-m170	I	i.v. (hdRIT)	PC, BC
⁹⁰ Y-hPAM4	I	i.v. (fRIT)	GC
⁹⁰ Y-m170	II	i.v. (pRIT)	PC
<i>EGF receptor</i>			
¹²⁵ I-425	I/II	i.v.	GL
¹²⁵ I-425	II	i.v.	GL
¹²⁵ I-425	II	i.v.	GL
IMRT/h425	II	IMRT	HNC
<i>HMFG 1,2</i>			
⁹⁰ Y-HMFG-1	I/II	i.p.	OC
⁹⁰ Y-HMFG-1	III	i.p.	OC
<i>PSMA</i>			
¹¹¹ In-huJ591	I	i.v.	PC
¹⁷⁷ Lu-huJ591 nebo ⁹⁰ Y-huJ591	I	i.v. (fRIT)	PC
<i>Nucleus</i>			
¹²⁵ I-c17-1A	I	i.v.	CC
<i>Hab18/CD147</i>			
¹³¹ I-Hab18 F(ab') ₂	I/II	i.v.	HCC

Radionuklid-protilátka	Klinická fáze	Způsob podání	Indikace
GD2			
¹³¹ I-3F8	I	IT	BC
NaPi2b			
²¹¹ At-MX35 F(ab') ₁	I	i.p.	OC
EpCAM			
NR-LU-10-Strept a ⁹⁰ Y-DOTA-Biot	II	i.v. (pRIT)	CC
ED-B fibronectin			
¹³¹ I-L19SIP	I	i.v.	NSCLC
NG2/MCSP			
²¹³ Bi-cDTPA-9.2.27	I	i.v. (pRIT)	M

BC (nádor prsu, *angl.* breast cancer), Biot (biotin), BsmAb (bi-specifická monoklonální protilátka), BT (nádor mozku, *angl.* brain tumor), CC (kolorektální karcinom, *angl.* colorectal cancer), CEA_{exp} (nádory exprimující CEA), CT (počítačová tomografie, *angl.* computed tomography), DOTA (tetraazacyklododekantetraoctová kyselina), ED-B (extradoména B), fRIT (frakcionovaná radioimunoterapie), GC (rakovina žaludku, *angl.* gastric cancer), GIM (gastrointestinální malignity), GL (gliom), HCC (hepatocelulární karcinom), hdRIT (vysokodávková radioimunoterapie, *angl.* high-dose radioimmunotherapy), HNC (karcinomy hlavy a krku, *angl.* head and neck carcinoma), IA (intraarteriální), IMRT (*angl.* intensity-modulated radiotherapy), i.p. (intraperitoneální), IRC (*angl.* intraresection cavity), i.v. (intravenózní), OC (rakovina vaječníků, *angl.* ovarian cancer), M (melanom), MTC (*angl.* medullar thyroid cancer), NSCLC (nemalobuněčný karcinom plic, *angl.* non-small-cell lung cancer), PC (rakovina prostaty, *angl.* prostate cancer), pRIT (*angl.* pretargeted radioimmunotherapy), RCC (*angl.* renal cell carcinoma), Strept (streptavidin). Převzato z Navarro-Teulon et al. 2013.

2.2.8 Nežádoucí účinky radioimunoterapie

Nežádoucí účinky můžeme v případě radioimunoterapie rozdělit do dvou základních skupin:

- nežádoucí účinky spojené s vlastní protilátkou
- nežádoucí účinky spojené s radionuklidem – **radiotoxicita**

Nežádoucí účinky prvního typu jsou společné, jak pro biologickou léčbu pomocí neznačených monoklonálních protilátek, tak pro radioimunoterapii. Patří mezi ně především **HAMA** (*angl.* human anti-mouse antibodies) čili tvorba protilátek proti myším protilátkám. Tato imunitní reakce se objevuje zejména po opakovaném podání myší protilátky, může vést až k život ohrožující anafylaktické reakci a vážné hypotenzi. Výskyt HAMA je důvodem k přerušení terapie. Použití humanizovaných protilátek reakce imunitního systému pacienta snížilo, ale i v jejich případě se mohou vyvinout protilátky proti humanizovaným protilátkám tzv. HAHA (*angl.* human anti-humanized antibodies), (Mirick et al. 2004). Méně fatální nežádoucí účinky monoklonálních protilátek jako kožní reakce, svědění, změny na nehtech atd. jsou zmiňovány v kapitole 2.3.1. Jejich terapie je symptomatická.

Specifickým nežádoucím účinkem pro radioimunoterapii je **radiotoxicita**. Tu můžeme rozdělit do dvou podtypů:

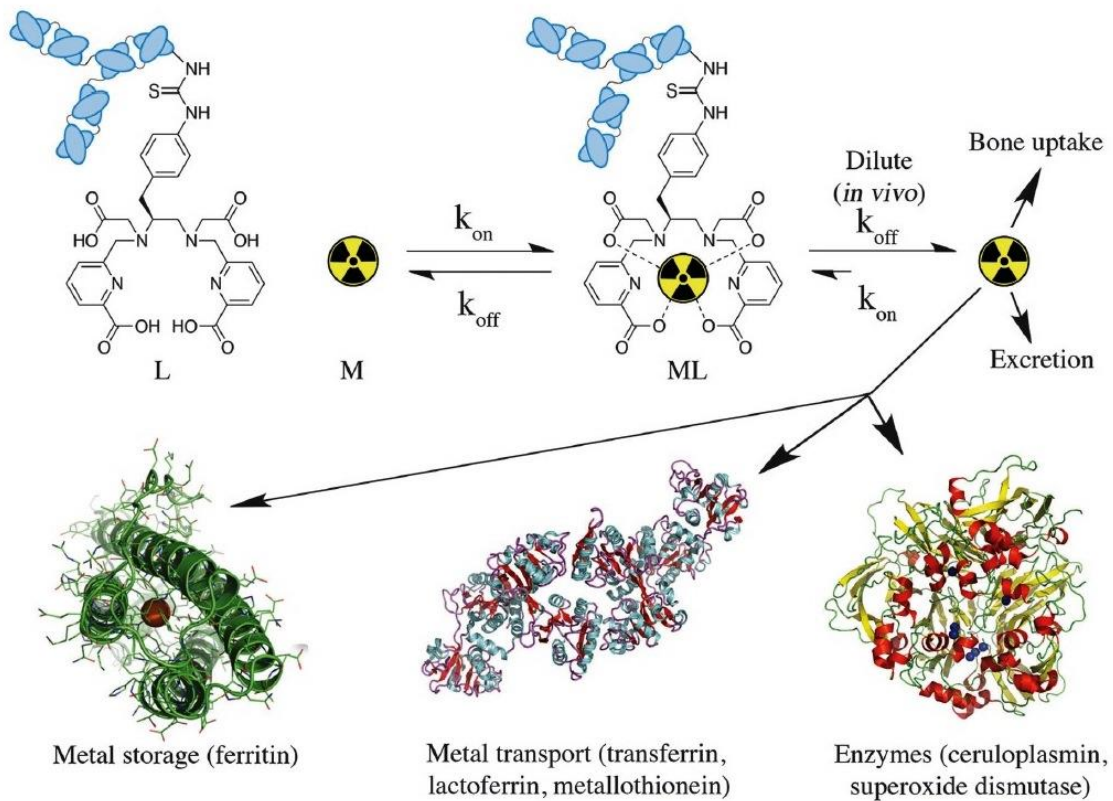
- 1) radiotoxicita způsobená biodistribucí radioaktivně značené protilátky
- 2) radiotoxicita způsobená radionuklidem uvolněným z protilátky

Nejznámějším a nejdiskutovanějším typem radiotoxicity cílených radiofarmak obecně je radionefrotoxicita, avšak ta se týká především malých molekul tj. fragmentů protilátek, které jsou většinou akumulovány zpětnou tubulární resorpcí v buňkách proximálního tubulu ledvin (Serengulam a Goldenberg 2010) a radiopeptidů (Bison et al. 2014). Pro radioaktivně značené protilátky je typická hematologická radiotoxicita, která je v klinické praxi faktorem limitujícím terapeutickou dávku. Hematotoxicita (myelotoxicita) může vést k anémii, trombocytopenii a neutropenii (Chamarthy et al. 2011), proto je nutné sledovat hematologický stav pacienta v průběhu radioimunoterapie. Ovšem je nutné poznamenat, že celková toxicita u radioimunoterapie je relativně nízká ve srovnání s klasickou chemoterapií např. antracykliny (Bodet-Milin et al. 2013).

V případě druhého podtypu radiotoxicity, tedy působení radionuklidu uvolněného z protilátky v organismu, záleží, jaký radionuklid byl pro terapii zvolen. U klinicky užívané terapeutické protilátky ¹³¹I-tositomumabu (Bexxar®) dochází během léčby k uvolnění jódu-131, a tím pádem hrozí jeho následná akumulace ve štítné žláze. Tomuto riziku se předchází podáváním jodidu draselného během celé terapie, tento

neradioaktivní jodid vysytí akumulární kapacitu štítné žlázy a tím ji ochrání před radiotoxickým působením jódu-131 (Andemariam a Leonard 2007).

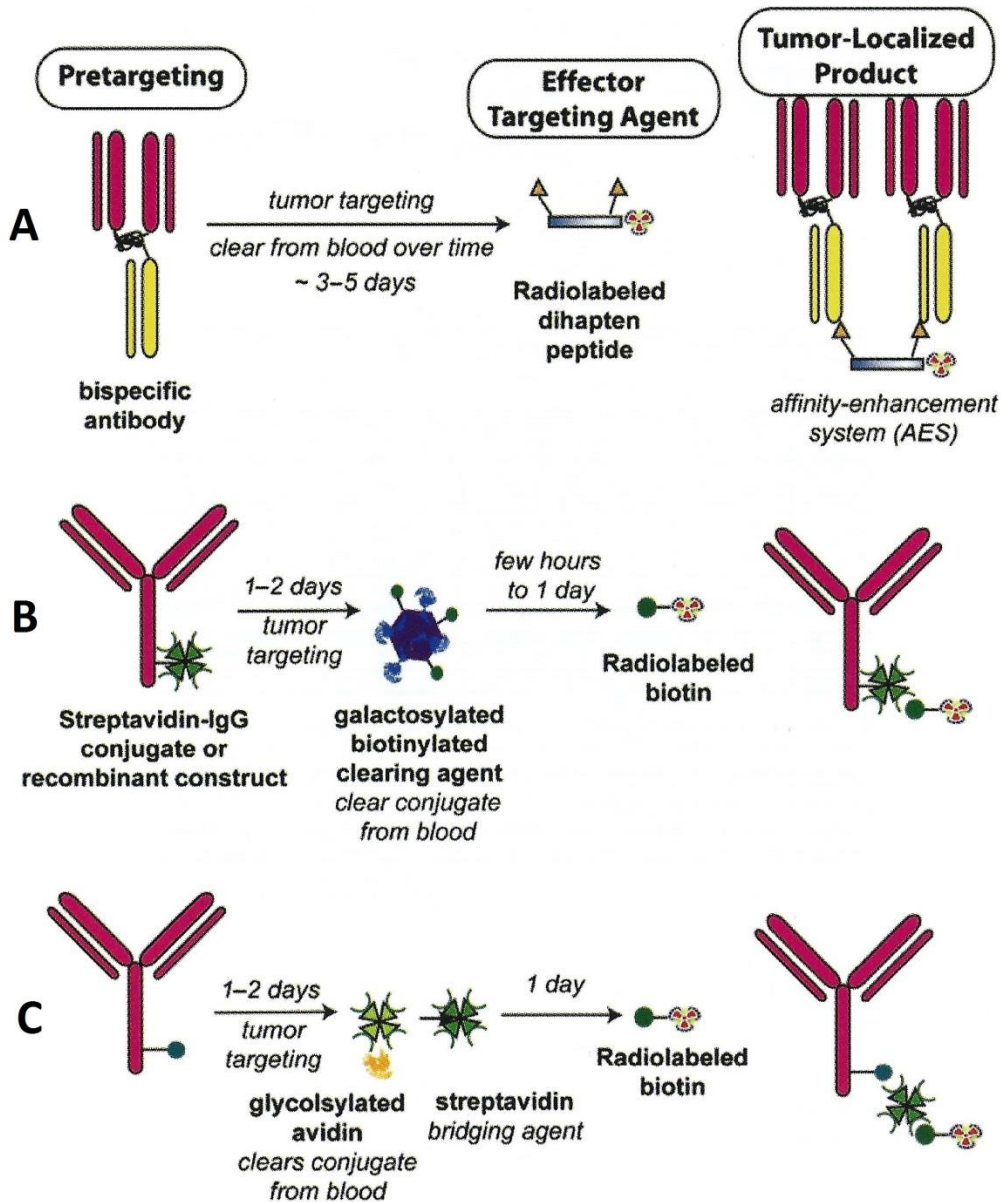
V případě terapeutických radiokovů uvolněných do organismu z monoklonální protilátky může docházet k jejich vychytávání v kostech jako např. u lutecia-177 (Müller et al. 1978). Možné osudy radiokovu uvolněného z protilátky dobře ilustruje obrázek 13. Jedná se zejména o akumulaci v kostech a s tím související myelotoxicitu. Nežádoucí účinky související s volným radiokovem v systémové cirkulaci lze eliminovat podáním samotného chelátoru jako např. DTPA, díky kterému je radiokov relativně rychle eliminován renální cestou ve formě komplexu s chelátorem (Breeman et al. 2003).



Obr. 13: Volný radiokov v organismu. Ilustrační znázornění koordinační kinetiky radiokovu (M) a protilátky s chelátorem (L) se zvýrazněnou dekomplexací radionuklidu v *in vivo* podmínkách a dále možné osudy volného radiokovu v organismu – vychytávání v kostech, exkrece, chelatace ve ferritinu (fyziologicky ferritin chelatuje Fe^{3+} a tvoří tak depo železa pro potřeby buňky), chelatace v ceruloplasminu (transportní protein pro Cu^{2+}) či vazba na transferin (transportní glykoprotein pro Fe^{3+}). Převzato z Price a Orvig 2014.

2.2.9 Pretargeting v radioimunoterapii

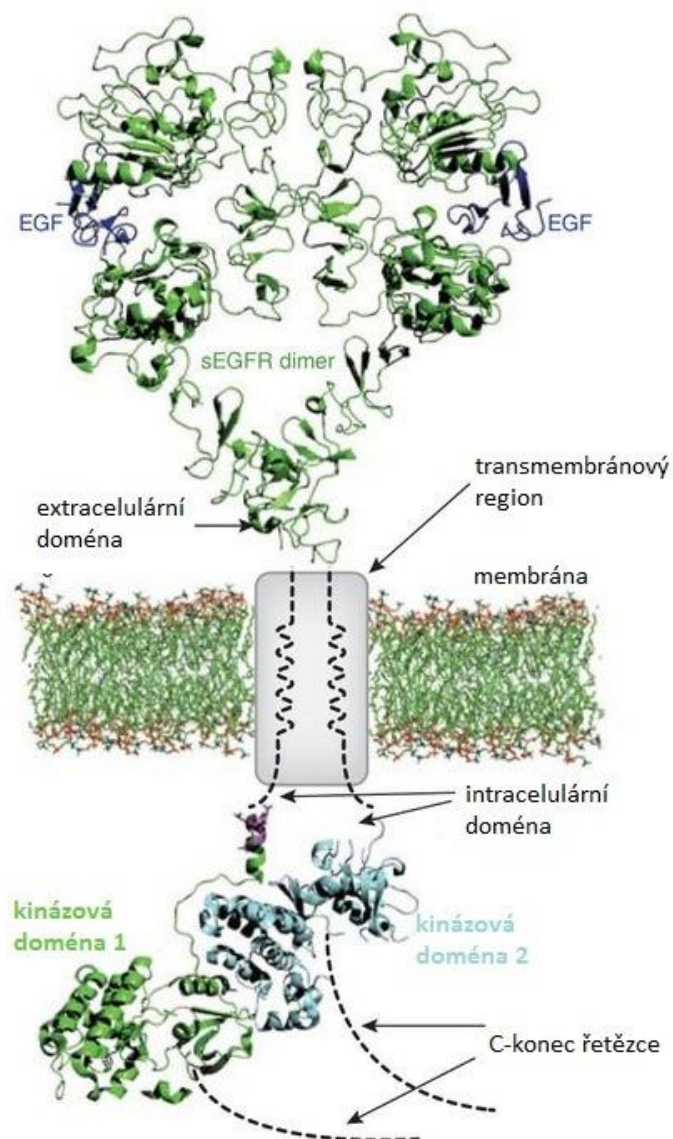
Snaha o snížení radiotoxicity protilátek v radioimunoterapii vedla k vytvoření celého nového léčebného přístupu zvaného „pretargeting“ čili předem cílená radioimunoterapie. Cílem „pretargetingu“ je specifičtější biodistribuce terapeutického radionuklidu a tím snížení nežádoucí radiotoxicity ve zdravé tkáni. Toho se dosahuje dvou až třikrokovým postupem, který spočívá nejprve v podání neradioaktivní monoklonální protilátky a až následně aplikaci terapeutického nuklidu. V první fázi se podává specifickým způsobem modifikovaná protilátka a až po jejím vychytání v cílové tkáni a poklesu její plazmatické koncentrace je podán radionuklid navázaný na příslušnou molekulu s relativně krátkým biologickým poločasem a s vysokou afinitou k modifikované protilátce (Goldenberg et al. 2006). Podrobněji principy „pretargetingu“ vysvětluje obrázek 14.



Obr. 14: Tři základní principy pretargetingu v radioimunoterapii. A) První princip využívá *bispecifické protilátky*, která je podána 3-5 dní před aplikací haptenu s navázaným radionuklidem. Po této době je už protilátka lokalizována v cílové tkáni a její plazmatická koncentrace je nízká. Hapten se pak váže zejména na dvě blízko sebe lokalizované protilátky na povrchu cílových buněk. Další dva přístupy využívají *systému avidin-biotin*. B) V takzvaném dvoukrokovém přístupu se nejprve podá protilátka konjugovaná se streptavidinem, 1-2 dny poté se aplikuje látka (biotinylovaná, galaktozylovaná), která vyčistí krevní oběh od nenavázané protilátky a nakonec se podá radioaktivně značený biotin, který se naváže na protilátku. C) Tříkrokový přístup, tj. nejprve se podá biotinylovaná protilátka, 1-2 dny poté následuje podání glykosilovaného avidinu, který volnou protilátku odstraní z krve. Pak je podán streptavidin, který se váže na biotinylované protilátky lokalizované na cílových buňkách a nakonec se aplikuje radioaktivně značený biotin, který se vychytává na streptavidin vázaný na protilátce v cílové tkáni. Upraveno dle Reilly 2010.

2.3 Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR)

Receptor pro epidermální růstový faktor (*angl.* epidermal growth factor receptor, EGFR též HER1) je membránový receptor a jeden ze čtyř členů receptorové rodiny ErbB (HER1-4). Jedná se o receptor spojený s tyrosinkinázovou aktivitou. EGFR byl popsán Stanleyem Cohenem v roce 1979 (Carpenter a Cohen 1979). Struktura EGFR je znázorněna na obrázku 15. EGFR je složen z extracelulární domény, která na sebe váže příslušný ligand, dále z transmembránové domény a z intracelulární domény, která má po aktivaci receptoru tyrosinkinázovou aktivitu. Celková molekulová hmotnost EGFR je 135 kDa. Jedním z přirozených ligandů EGFR je peptid zvaný epidermální růstový faktor (*angl.* epidermal growth factor, EGF), který vyvolává dimerizaci EGFR. Vzniklý homodimer aktivuje tyrosinkinázu umístěnou na intracelulární doméně EGFR, která katalyzuje autofosforylaci receptoru. Tato fosforylace spouští komplexní signální kaskádu nazývanou MAPK/ERK (mitogenem aktivovaná proteinkináza/extracelulárním signálem regulovaná kináza), která vede až k syntéze DNA, potažmo ke zvýšené proliferaci, migraci buňky, její diferenciaci, inhibici apoptózy, angiogenezi (Reilly 2010). Základními prvky této signální kaskády jsou na sebe postupně navazující enzymy RAS (zkratka *angl.* rat sarcoma), RAF (zkratka *angl.* rapidly accelerated fibrosarcoma), MEK (mitogenem extracelulárně aktivovaná kináza) a ERK (extracelulárním signálem regulovaná kináza), (Peipp et al. 2008). Podrobný popis této rozsáhlé signální kaskády je uveden např. v publikaci Bello et al. 2013.



Obr. 15: Struktura dimerizovaného receptoru EGFR. Dimerizovaný EGFR s navázaným epidermálním růstovým faktorem (*angl.* epidermal growth factor, EGF). EGF-indukovaný dimer extracelulární domény je k intracelulární kinázové doméně připojen transmembránovým α -helixem. Převzato z Bessman et al. 2012.

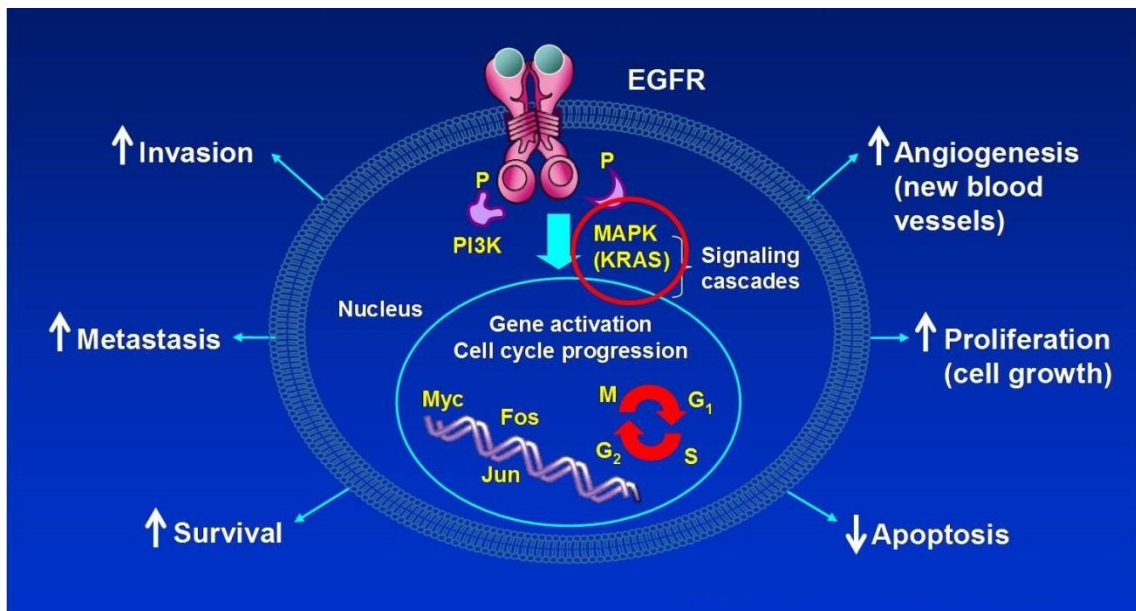
Zvýšená exprese EGFR byla zjištěna v mnoha typech nádorů, např. v nádorech prsu, vaječnicků, hlavy a krku, plic, močového měchýře, tlustého střeva a v glioblastomech (Ciardello a Tortora 2001). Přehled maligních onemocnění spojených se zvýšenou expresí EGFR je uveden v tabulce 7.

Tabulka 7. Frekvence studií (%) ukazujících na asociaci zvýšené nádorové exprese EGFR a snížené doby přežití sledovaných pacientů.

Karcinom	Asociace s PBR (%)	Asociace s CP (%)
EGFR - silný prognostický indikátor		
močový měchýř	60 (n=5)	63 (n=11)
děložní hrdlo	75 (n=4)	71 (n=7)
jícen	0 (n=1)	69 (n=13)
hlava a krk	75 (n=1)	82 (n=11)
vaječníky	80 (n=5)	67 (n=9)
Celkově		70 (n=51)
EGFR - středně silný prognostický indikátor		
mléčná žláza	N/A	55 (n=11)
střevo a rektum	N/A	67 (n=3)
žaludek	N/A	50 (n=6)
endometrium	N/A	40 (n=5)
Celkově		52 (n=25)
EGFR – slabý prognostický indikátor		
NSCLC	20 (n=10)	10 (n=10)

PBR = přežití bez relapsu. CP = celkové přežití. N/A – není k dispozici (*angl.* not available), NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic (*angl.* non-small-cell lung carcinoma). Převzato z Nicholson et al. 2001.

Aktivace EGFR v nádorových buňkách má pak za následek zvýšenou proliferaci, angiogenezi, tvorbu a uvolňování metastatických buněk (Brand et al. 2011). Mechanismus aktivace EGFR a jeho následky přehledně popisuje obrázek 16.



Obr. 16: Aktivace EGFR a její následky pro buňku. Aktivace EGFR vede ke zvýšení angiogeneze, proliferace, invazivnosti, metastázám, přežití a ke snížení apoptózy. EGFR po své aktivaci spouští intracelulární signální kaskádu zprostředkovanou kinázami PI3K (fosfoinozimid-3-kináza) a MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza), která vede k aktivaci regulačních genů (Myc, Fos, Jun) a ke zrychlení buněčného cyklu (M, G₁, S, G₂ – fáze buněčného cyklu). Upraveno dle Rowinsky 2004.

Díky své funkci v patofyziologii nádorových onemocnění se EGFR stal významným cílem pro jejich terapii. Jeho cílená inhibice je jedním ze způsobů omezení nádorového bujení. Inhibitory EGFR dělíme dle mechanismu účinku na dvě základní skupiny (Chi et al. 2013). První skupina látek se snaží inhibovat přímo fosforylaci intracelulární domény EGFR a tím zablokovat celou následnou signální kaskádu. Tyto látky se nazývají **tyrosinkinázové inhibitory**, jejichž nejtypičtějšími zástupci jsou gefitinib a erlotinib (Ulivi et al. 2013). Druhou skupinou jsou pak **monoklonální protilátky** cílené na extracelulární doménu EGFR. Vazbou těchto protilátek na receptor se brání jeho aktivaci přirozenými ligandy (např. EGF) a tím se taktéž blokuje signální kaskáda spouštějící proliferaci buňky. Dva nejdůležitější zástupci na EGFR cílených protilátek jsou cetuximab a panitumumab (Arnold a Seufflein 2010, Bouzid 2012). Tyto dvě terapeutické protilátky jsou podrobněji popsány v následující kapitole.

2.3.1 Protilátky cílené na EGFR

Do klinické praxe se u nás zatím dostaly pouze dvě monoklonální protilátky cílené na receptor pro epidermální růstový faktor. Jsou to **cetuximab** a **panitumumab** (Vacchelli et al. 2014). Dalším zástupcem anti-EGFR protilátek je **nimotuzumab**, který však není v ČR doposud registrován. Ve třetí fázi klinického testování se nachází

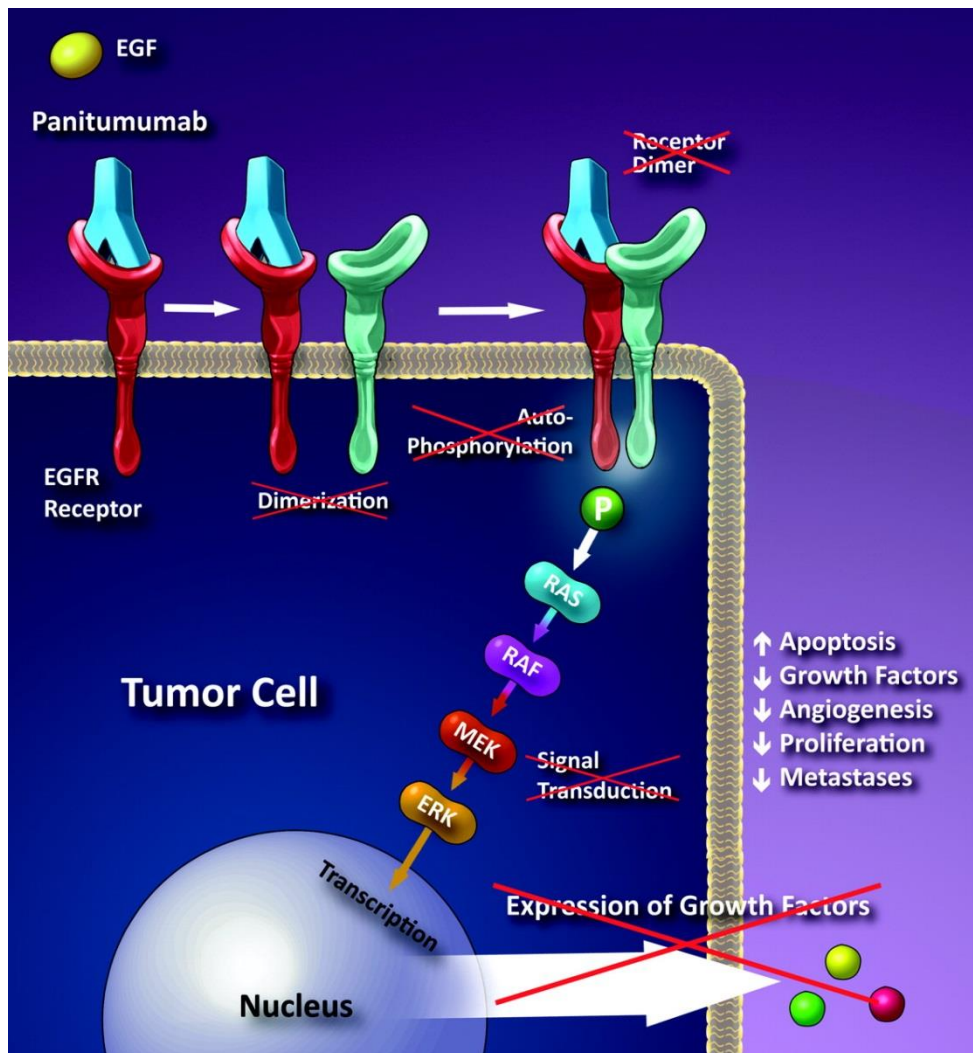
protilátky **zalutumumab** a **necitumumab**. Vývoj nadějného **matuzumabu** byl v roce 2008 opuštěn pro neuspokojivé výsledky v klinickém testování (Cohen 2014).

Cetuximab

Cetuximab (IMC-C225) je chimérická (myš-člověk) protilátka třídy IgG₁ cílená na lidský receptor pro epidermální růstový faktor. Tuto protilátku poprvé připravil tým Dr. Mendelshona v roce 1983 (Kawamoto et al. 1983). V roce 2004 byla americkým FDA schválena pro léčbu kolorektálního karcinomu a rakoviny hlavy a krku, v téže době ho zaregistroval i český SÚKL. Mechanismus jeho účinku spočívá jednak v blokádě EGFR, ale také ve vyvolání protilátkově závislé buňkami zprostředkované cytotoxicity (Brunton 2011). Cetuximab má relativně dlouhý eliminační poločas pohybující se v závislosti na podané dávce v rozmezí 4-7 dní (Baselga 2000, Fracasso et al. 2007), který je dán především jeho velkou molekulovou hmotností (145,7 kDa). Úvodní dávka cetuximabu je 400 mg/m² a je následovaná infuzemi 250 mg/m² jednou týdně. Nežádoucí účinky jsou u většiny případů zastoupeny vyrážkou připomínající akné (90%), která může nabývat různé intenzity od mírné až po velmi závažnou, dále se může vyskytnout svědění, změny na nehtech, bolest hlavy a průjem. Vzácně se může objevit kardiopulmonální selhání nebo hypomagnezémie či anafylaktoidní reakce (Agero et al. 2006, Hoq et al. 2009). Komerčně je cetuximab dostupný v přípravku Erbitux[®] (5 mg/ml) vyráběným firmou Merck (Německo).

Panitumumab

Panitumumab (ABX-EGF) je rekombinantní plně lidská monoklonální protilátka (třídy IgG₂) proti receptoru pro epidermální růstový faktor. Tato protilátka byla poprvé připravena ve firmě Abgenix v USA (nyní Amgen) Yangem a kolektivem v roce 1999 a to pomocí technologie transgenních myší (Yang et al. 1999). V roce 2006 byla schválena FDA pro léčbu kolorektálního karcinomu a o rok později tak učinil i český SÚKL. Mechanismus účinku (viz Obr. 17) má stejný jako dříve uvedená protilátka cetuximab, ale na rozdíl od něj nezpůsobuje protilátkově závislou buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu (Brunton 2011, Schneider-Merck et al. 2010). Biologický poločas panitumumabu je 7,5 dne. Dávkování této protilátky je 6 mg/kg podáváno intravenózně jednou za dva týdny. Nežádoucí účinky jsou obdobné jako u cetuximabu. Panitumumab je vyráběn pod komerčním názvem Vectibix[®] (20 mg/ml) firmou Amgen (USA).



Obr. 17: Mechanismus protinádorového účinku panitumumabu. Panitumumab vazbou na extracelulární doménu EGFR blokuje vazbu přirozeného ligandu (EGF), čímž brání v dimerizaci EGFR a tak nedochází ke spuštění intracelulární signální kaskády složené z kináz (RAS, RAF, MEK a ERK). Proto nedochází k pozitivnímu ovlivnění transkripce, což vede ke zvýšení apoptózy a naopak snížení syntézy růstových faktorů, snížené angiogenezi, proliferaci a snížené tvorbě metastáz. Převzato z Gemmete a Mukherji 2011.

Nimotuzumab

Nimotuzumab (h-R3) je humanizovaná monoklonální protilátka třídy IgG₁ cílená proti EGFR. Tato protilátka byla vyvinuta na Kubě v roce 1997 (Mateo et al. 1997). Nimotuzumab vykazuje sice nižší afinitu k EGFR než cetuximab a panitumumab, ale naproti tomu má nižší výskyt vedlejších účinků. Indikačními skupinami této látky jsou karcinom hlavy a krku a maligní gliom (Rivera et al. 2008). V České republice není tato léčivá látka registrována. V zahraničí je dostupná v podobě přípravku Theraloc (Oncoscience, Německo).

Zalutumumab

Zalutumumab (HuMax-EGFR) je plně lidská monoklonální protilátka třídy IgG₁ cílená na EGFR. Byla vyvinuta firmou Genmab v nizozemském Utrechtu v roce 2004 (Bleeker et al. 2004). Po vazbě na cílový receptor spouští protilátkově závislou cytotoxickou reakci imunitního systému (Rivera et al. 2008). Jedinou indikační skupinou této látky je spinocelulární karcinom hlavy a krku (SCCHN, *angl.* squamous-cell carcinoma of head and neck). Mezi vedlejší účinky zalutumumabu patří hlavně vyrážka (Agulnik 2012). Protilátka je právě ve třetí fázi klinického testování.

Matuzumab

Matuzumab (EMD 72000) je humanizovaná IgG₁ protilátka cílená na EGFR. Byla vyvinuta americkou firmou Merck Serono v roce 2003 (Burger et al. 2003). Taktéž spouští protilátkově závislou cytotoxickou reakci (Rivera et al. 2008). V klinických studiích byla nasazena proti nemalobuněčnému karcinomu plic a pokročilým adenokarcinomům jícnu a žaludku (Kollmannsberger et al. 2006, Rao et al. 2008). Avšak po roce 2008 bylo od jejího dalšího testování upuštěno pro neuspokojivé výsledky provedených klinických studií.

Necitumumab

Necitumumab (IMC-11F8) je plně lidská monoklonální protilátka třídy IgG₁, která je cílená na EGFR. Tato protilátka byla připravena americkou firmou ImClone v roce 2003 (Lu et al. 2004). Hlavní indikací necitumumabu je spinocelulární karcinom hlavy a krku. V současné době probíhá třetí fáze jejího klinického testování (Cohen 2014).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

V experimentech byly použity následující **monoklonální protilátky**: cetuximab ve formě léčivého přípravku Erbitux 5 mg/ml (Merck, Německo), monoklonální protilátka panitumumab ve formě léčivého přípravku Vectibix 20 mg/ml (Amgen, Irsko).

Z dalších sloučenin byly použity tyto **chemikálie**: chlorid sodný 99,5% (Sigma-Aldrich), uhličitan sodný bezvodý 99,95-100,05% (Sigma-Aldrich), hydrogenuhličitan sodný p.a. (Penta, ČR), čtyřsodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové dihydrát 99,5% (Sigma-Aldrich), sodná forma Chelexu 100 (Sigma-Aldrich), octan amonný 99,99% (Sigma-Aldrich), dihydrát citrátu sodného p.a. (Penta, ČR), kyselina citronová monohydrát 99,0-102% (Sigma-Aldrich), kyselina chlorovodíková 37% (Sigma-Aldrich), metanol p.a. (Penta, ČR), kyselina dusičná 70% (Sigma-Aldrich), hovězí gama globulin (Sigma-Aldrich), hovězí sérový albumin (*angl.* bovine serum albumin, BSA) (Sigma-Aldrich), Bradford reagent (Sigma-Aldrich), chloramin-T 99% (Sigma-Aldrich), disiřičitan sodný 98-100,5% (Sigma-Aldrich).

Z **chelátorů** byly použity tyto: DOTA - p-SCN-benzyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina (Macrocyclics, USA), NOTA - p-SCN-benzyl-1,4,7-triazacyclononan-1,4,7-trioctová kyselina (Macrocyclics, USA), PCTA - p-SCN-3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]-pentadeka-1(15),11,13-trien-3,6,9-trioctová kyselina (Macrocyclics, USA).

Byly použity následující **radiochemikálie**: radiozotop indium-111 ve formě chloridu inditého 99,9% (PerkinElmer, USA), radiozotop lutecium-177 ve formě chloridu lutecitého 99% (PerkinElmer, USA), radioizotop jód-131 ve formě jodidu sodného (PerkinElmer, USA a Institute of Isotopes, Maďarsko).

3.2 Buněčné linie

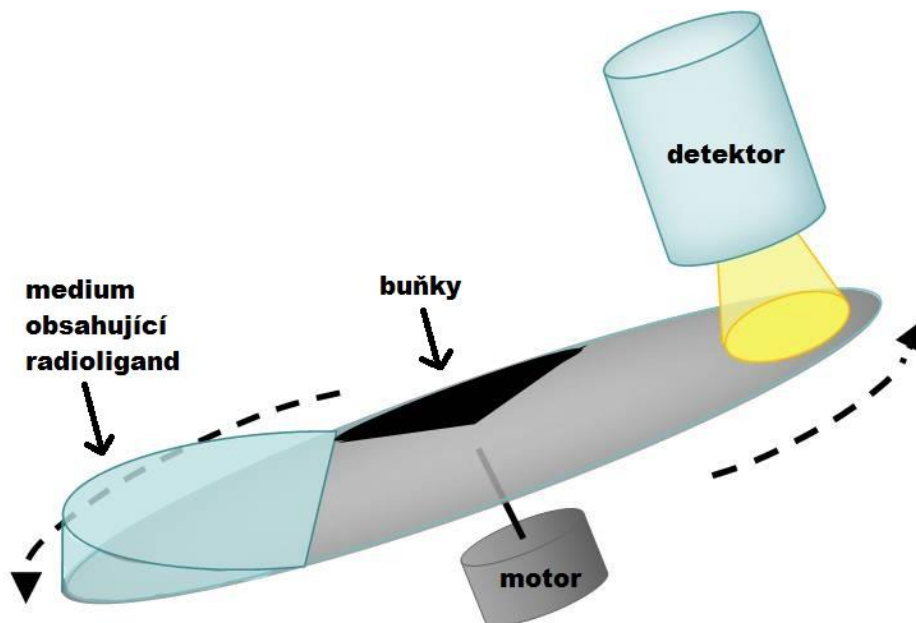
V experimentech byly používány čtyři buněčné linie, které v různé míře exprimují receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR). Jednalo se o linie A431, HaCaT, HCT116 a HepG2. **A431** jsou buňky skvamózního karcinomu izolované v roce 1973 z 85-tileté pacientky (Giard et al. 1973). Byly zakoupeny z americké tkáňové sbírky (ATCC, USA). Kultivovány byly v mediu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich) doplněném 10% fetálního hovězího séra (Sigma-Aldrich). Buněčná linie **HaCaT** byla vytvořena izolací keratinocytů z lidské kůže a jejich následnou immortalizací v německém Heidelbergu v roce 1988 (Boukamp et al. 1988). Kultivována byla v mediu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich) doplněném 10% fetálního hovězího séra (Sigma-Aldrich) a 2 mM L-glutaminu (Sigma-Aldrich). Tato buněčná linie byla pořízena z Německého centra pro výzkum rakoviny (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Německo). Buněčná linie **HCT116** byla izolována z lidského kolorektálního karcinomu na počátku 80. let minulého století (Brattain et al. 1981). Tato linie byla kultivována v McCoy's 5a mediu (Sigma-Aldrich) doplněném 10% fetálního hovězího séra (Sigma-Aldrich) a 2 mM L-glutaminu (Sigma-Aldrich). Buňky HCT116 byly zakoupeny v ATCC (USA). **HepG2** je buněčná linie hepatocelulárního karcinomu izolovaného z 15-tiletého pacienta v roce 1979 (Aden et al. 1979). HepG2 byly kultivovány v Eagle's Minimum Essential Medium (Sigma-Aldrich) doplněném o 10% fetálního hovězího séra (Sigma-Aldrich). Tato linie byla zakoupena rovněž u ATCC (USA). Všechny buněčné linie byly kultivovány v uzavřeném inkubátoru temperovaném na 37 °C s vlhčenou atmosférou obsahující 5% CO₂. Do kultivačních medií nebyla přidávána žádná antibiotika. Buněčné linie byly používány maximálně do třicáté pasáže.

3.3 Použité přístroje

Během experimentů byly použity mimo běžného laboratorního vybavení tyto speciální přístroje: automatický gama-spektrometr 2480 Wizard² (PerkinElmer, USA), dále TLC skener Rita Star (Raytest, Německo), HPLC systém Agilent 1100 series (Agilent Technologies, USA). Pro měření absorbance roztoků protilátek byl použit

destičkový analyzátor Infinite 200 Pro (Tecan, Švýcarsko). Pro manipulaci s monoklonálními protilátkami byly vždy používány silikonizované mikrozkušavky (Sigma-Aldrich), které vykazují nižší adsorbci protilátek než běžný plast.

Pro detekci akumulace radioligandů v buněčných kulturách *in vitro* byl použit přístroj LigandTracer[®] Yellow (Ridgeview Instruments, Švédsko). LigandTracer[®] je unikátní přístroj vyvinutý na univerzitě ve švédské Uppsale (Björke a Andersson 2006a), který pracuje na principu real-time měření radioaktivity vázané na buňky, které jsou nasazeny na část plochy Petriho misky. Tato miska je v šikmé poloze umístěna do přístroje, kde se otáčí a tak se buňky pravidelně omývají médiem obsahujícím zkoumaný radioligand viz Obr. 18. Při každé otáčce Petriho misky je detektorem umístěným nad horní částí misky změřena radioaktivita. Měření radioaktivity se děje ve dvou protilehlých oblastech misky, v jedné kde jsou nasazeny buňky akumulující radioligand a v druhé bez buněk, která slouží jako referenční bod (nespecifická vazba). Přístroj zaznamenává tyto dvě hodnoty, automaticky odečítá radioaktivitu vázanou na plast misky od té, která se váže na buňky, a výslednou hodnotu ihned vynáší do grafu na monitoru připojeného počítače. Dle přednastavené rychlosti otáčení misky (zpravidla 1 otáčka/min) se na obrazovce počítače vykresluje akumuláční křivka zkoumaného radioligandu. Měření lze kdykoliv pozastavit, zvýšit koncentraci radioligandu, opět spustit detekci a sledovat tak tvorbu další navazující akumuláční křivky v reálném čase (viz Obr. 19).



Obr. 18: Schématické znázornění funkce LigandTracer[®] Yellow. Petriho miska je otáčena rotorem tak, že se část plochy osazená buňkami dostane v dolní části do kontaktu s roztokem radioligandu a v horní části je detekována navázaná radioaktivita. Upraveno dle Andersson 2014.



Obr. 19: Vlevo – přidání radioligandu během měření. Vpravo – LigandTracer[®] Yellow s odklopeným víkem obsahujícím radiodetektor. Převzato z Andersson 2014.

3.4 Použité metody

3.4.1 Radiojodace

Pro značení monoklonálních protilátek jódem-131 byla zvolena klasická metoda s využitím chloraminu T (Greenwood et al. 1963). Ve zkumavce bylo smícháno 200 μg monoklonální protilátky (v původní koncentraci – tj. cetuximab 5 mg/ml, panitumumab 20 mg/ml) s 20-40 MBq roztoku izotopu jódu-131. K této směsi bylo přidáno 20 μl chloraminu T (4 mg/ml). Tato reakční směs byla inkubována 5 minut na ledu a poté byla jodace zastavena přidáním 40 μl disiřičitanu sodného (4 mg/ml). Pak byla směs přečištěna pomocí gelové chromatografie na koloně PD-10 (GE Healthcare, Velká Británie), eluce i presaturace kolony byly provedeny pomocí PBS. Výťažnost značení byla stanovena změřením radioaktivity jednotlivých komponent a vypočtena dle rovnice 1.

$$(1) \quad \text{výtěžek (\%)} = \frac{A_{Ab}}{A_{Ab} + A_K + A_{RZ}} \times 100$$

Kde A_{Ab} je aktivita přečištěné protilátky, A_K je aktivita gelové kolony a A_{RZ} je aktivita reakční zkumavky.

Finální specifická aktivita označené protilátky byla 100 MBq/mg proteinu.

3.4.2 Značení protilátek radiokovy

Při značení monoklonálních protilátek bylo dbáno především na dodržení maximální možné čistoty celého procesu s ohledem na stopy kovů (zejména iontů železa), jelikož veškeré přítomné kovy výrazně kompetují o chelátor připojený k protilátce a tím signifikantně snižují výtěžek značení. Proto byly všechny použité chemikálie zakoupeny v nejvyšším dostupném stupni čistoty (optimálně „metal free“ varianta). Veškeré chemické sklo bylo před použitím opláchnuto kyselinou dusičnou (30% v/v) a umyto ultračistou vodou (Mili-Q, Millipore Corporation, USA). Tato ultračistá voda byla též použita pro přípravu všech pufrů. Všechny pufrы byly taktéž ošetřeny přidáním Chelexu 100, který by měl zachytit téměř veškeré zbylé ionty kovů.

Vlastní postup: Nejprve byl připraven pufr pro modifikaci protilátky chelátorem („modifikační pufr“) o následujícím složení: 150 mM NaCl, 2 mM Na₂CO₃, 48 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA. Následně bylo pH tohoto pufru pomocí kyseliny chlorovodíkové upraveno na hodnotu 8,8. Dále bylo příslušné množství protilátky (typicky 2 mg) převedeno do tohoto pufru a to pomocí gelové kolony PD-10 takto - kolona byla nejprve „vysycena“ pomocí 30 ml PBS s hovězím sérovým albuminem (BSA, 1 mg/ml) a poté 30-ti ml modifikačního pufru. BSA v tomto případě pomáhá snižovat nespecifickou vazbu protilátky v koloně a tím zvyšuje výtěžek značení. Na takto připravenou kolonu byla nanášena vlastní protilátka a byla provedena eluce modifikačním pufrem. Eluční frakce obsahující protilátku byla identifikována měřením absorbance v 96-jamkové destičce (Corning, USA) na spektrofotometru Tecan Infinite 200 (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 280 nm.

K frakci obsahující protilátku byl přidán příslušný chelátor a to v molárním množství stokrát převyšujícím množství protilátky. Takto byla protilátka inkubována přes noc při 37 °C a za mírného třepání.

Poté byl připraven pufr pro značení („značící pufr“), tj. 0,1 M octan amonný v Mili-Q vodě, pH upraveno na 5,7 pomocí HCl (37%). Poté byla reakční směs protilátky a chelátoru přečištěna na koloně PD-10 takto - kolona byla „vysycena“ 30 ml PBS s BSA (1 mg/ml), následně 30 ml značícího pufru. Pak byla na kolonu nanášena reakční směs protilátky a chelátoru. Toto čištění bylo nutno ještě jednou až dvakrát opakovat, aby bylo dosaženo optimálního výtěžku vlastního značení.

Frakce obsahující protilátku byla opět identifikována na základě absorbance. Koncentrace protilátky po přečištění byla stanovena pomocí Bradfordovy metody

s využitím hovězího gama globulinu jako standardu, podrobněji viz kapitola 3.4.7. Takto připravená přečištěná protilátka byla smíšena s roztokem radioizotopu (typicky 37 MBq/mg proteinu). Směs modifikované protilátky a radionuklidu byla inkubována při 37 °C přes noc za mírného třepání. Po ukončení inkubace následovala kontrola radiochemické čistoty preparátu (viz následující kapitola).

3.4.3 Kontrola radiochemické kvality

Ihned po označení protilátky byla provedena kontrola kvality, tj. stanovení radiochemické čistoty preparátu. K tomuto účelu byly použity dvě analytické metody – instantní tenkovrstvá chromatografie na silikagelu (ITLC-SG) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

ITLC

Pro stanovení radiochemické čistoty byly v případě metody ITLC použity speciální chromatografické desky tvořené skleněnými mikrovláknými potaženými vrstvou silikagelu, tzv. ITLC-SG (Varian, USA), které byly v chromatografické komoře vyvíjeny příslušnou mobilní fází. V případě protilátek značených jódem-131 byl jako mobilní fáze použit fyziologický roztok tj. NaCl 0,9% (w/v) ve vodě. V této soustavě se volný jodid pohybuje s čelem mobilní fáze, zatímco označená protilátka zůstává na startu.

V případě značení protilátek radiokovy byla mobilní fáze pro ITLC tvořena citrátovým pufrem, tj. 0,1 M citrátem sodným, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 5,0 pomocí kyseliny citronové. V této soustavě zůstává označená protilátka na startu, volný izotop (resp. jeho citrát) a izotop navázaný na nekonjugovaný chelátor putují s čelem mobilní fáze. Pro odlišení podílu volného izotopu a izotopu navázaného na nekonjugovaný chelátor byl použit speciální pufr o tomto složení: 9 dílů metanolu a 1 díl citrátového pufru (pH 5,0). V tomto pufru putuje s čelem mobilní fáze nekonjugovaný chelátor s navázaným izotopem, zatímco označená protilátka a volný (nenavázaný) izotop zůstávají na startu.

Chromatogramy byly měřeny a vyhodnocovány na TLC skeneru Rita Star (Ray Test, Německo).

HPLC

Konfigurace HPLC metody byla stejná jak pro jodované protilátky, tak pro protilátky označené radiokovy. Analýzu zajišťoval HPLC systém Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA) s radiometrickou detekcí. Eluce byla izokratická mobilní fází, kterou tvořil 50 mM roztok NaCl o průtoku 0,8 ml/min. K separaci docházelo na gelové koloně BIO-Sil Sec 250 (300 x 7,8 mm) od firmy BioRad (USA). Detekce byla radiometrická. Kvantifikace naměřených chromatogramů byla provedena v programu Clarity 2003 (DataApex, ČR).

Stabilita značených protilátek

V případě protilátek značených I-131 byla stabilita ověřována po 24-hodinové inkubaci v příslušném kultivačním mediu za teploty 37 °C pomocí ITLC-SG metody. V případě protilátek s radiokovy byla stabilita zjišťována po 24-hodinách a 7 dnech za pokojové teploty ve značícím pufu a to jak pomocí ITLC-SG, tak pomocí HPLC.

3.4.4 Klasická saturační technika pro stanovení počtu receptorů

Tato metoda slouží jako zlatý standard při stanovení počtu receptorů exprimovaných danou buněčnou linií pomocí radioaktivně značeného ligandu (Hulme a Trevethick 2010). Klasická metoda stejně jako automatická technika (KEX metoda – viz následující kapitola) jsou založeny na interakci ligandu a jeho receptoru s dosažením rovnovážného stavu této interakce vyjádřené vztahem pro disociační konstantu K_D .

$$(2) \quad K_D = \frac{[L][R]}{[LR]}$$

Kde **[L]** je koncentrace radioligandu (značené protilátky), **[R]** koncentrace volného cílového receptoru a **[LR]** koncentrace komplexu ligand-receptor.

Praktické provedení: Vybraná buněčná linie byla nasazena do 24-jamkových destiček a kultivována až do dosažení přibližně 80% konfluence. Poté bylo kultivační médium odebráno a buňky byly opláchnuty pomocí PBS, který byl taktéž odsát. Následně bylo do triplikátů jamek přidáno kultivační médium obsahující vzrůstající

koncentrace značené protilátky (0,5, 1,5, 5, 15, 50 a 150 nM) v objemu 500 μ l na jamku.

Poté byly buňky inkubovány 4 hodiny při teplotě 4 °C. Nízkou teplotou se minimalizuje vliv aktivních procesů v buňce jako např. internalizace receptorů a jejich recyklace.

Po inkubaci následovalo odsátí kultivačního média s radioligandem a šest oplachů čistým kultivačním médiem (bez fetálního séra). Poté byly buňky trypsinem uvolněny z podkladu, trypsin inaktivován přidáním kultivačního média, buňky spočítány v Bürkerově komůrce a nakonec byla změřena jejich radiokativita pomocí gama-spektrometru. Taktéž byla změřena radioaktivita standardů označené protilátky pro výpočet její specifické aktivity.

Díky tomu, že známe specifickou aktivitu označené protilátky, její molární hmotnost, aktivitu aplikovanou na buňky, radioaktivitu vázanou na buňky po oplachích a počet buněk, můžeme vypočítat, kolik molekul protilátky se váže na jednu buňku, což odpovídá počtu receptorů na této buňce. Výpočet této hodnoty využívá rovnic 3 a 4.

$$(3) \quad NRPC = \frac{A_M n_{Ab}}{N_B A_{Ab}} \times N_A$$

$$(4) \quad n_{Ab} = \frac{c_{Ab} V_{Ab}}{M_{Ab}}$$

Kde **NRPC** (*angl.* number of receptors per cell) označuje počet receptorů na buňku (*angl.* number of receptors per cell), **A_M** je aktivita kultivačního média s buňkami po jejich trypsinaci, **N_B** je počet buněk v kultivačním médiu po trypsinaci, **A_{Ab}** je aktivita označené protilátky, **n_{Ab}** je molární množství označené protilátky, **N_A** je Avogadrova konstanta ($6,023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), **c_{Ab}** je koncentrace označené protilátky v g/l, **V_{Ab}** je objem označené protilátky v litrech a **M_{Ab}** je molární hmotnost protilátky (145781,6 g/mol pro cetuximab a 147000 g/mol pro panitumumab).

3.4.5 KEX metoda (kinetic extrapolation) stanovení počtu receptorů

KEX (extrapolace kinetiky, *angl.* kinetic extrapolation) metoda využívá unikátní přístroj LigandTracer® Yellow, který je blíže popsán v kapitole o použitých přístrojích (viz kapitola 3.3). V případě této metody byly zkoumané buňky nasazeny na Petriho misky a kultivovány až do konfluence přibližně 80%. Poté byly dvě třetiny misky zcela zbaveny buněk pomocí speciální škrabky „cell scraper“ (Corning, USA). Buněk prostá část misky sloužila jako referenční bod pro měření radioaktivity resp. nespecifické vazby radioligandu na plastový povrch misky. Buňky byly opláchnuty PBS a pak následovalo přidání 5 ml kultivačního média. Miska byla přenesena do LigandTraceru® a bylo započato měření, prvních 10 minut probíhalo bez přidání radioligandu a sloužilo k zjištění základní linie signálu (pozadí). Následovalo přidání příslušného radioligandu a to ve třech následných krocích tak, aby bylo dosaženo postupně těchto koncentrací ligandu: 3 nM, 15 nM a 30 nM. Inkubační časy jednotlivých kroků nebyly fixně stanoveny, ale byly voleny individuálně, vždy po dosažení rovnovážného stavu na základě aktuálně měřené akumulací křivky (plató fáze akumulací křivky). Po skončení měření byly buňky opláchnuty roztokem BSA (1% w/v) v PBS a poté ještě jednou čistým PBS. Buňky byly trypsinem uvolněny z misky, pomocí Bürkerovy komůrky byly spočítány a v automatickém gama počítači byla změřena jejich radioaktivita. Každá kombinace buněčné linie a radioligandu byla měřena pětkrát. Akumulací křivky naměřené LigandTracerem® Yellow byly zpracovány extrapolací modelem monovalentní kinetiky v programu TraceDrawer 1.2 (Ridgeviews Instruments, Švédsko) pro výpočet korekčního faktoru (Björkelund et al. 2011). Hodnoty S_{max} byly vypočteny dle následující rovnice:

$$(5) \quad S_R = S_{max} \times \left(\frac{c}{c + k_d/k_a} \right) \times [1 - \exp(-(k_a \times c + k_d) \times t)]$$

Kde S_R značí maximální naměřený signál během přidávání radioligandu, S_{max} reprezentuje teoretický signál při saturaci všech dostupných receptorů radioligandem, c je koncentrace radioligandu, k_d je rychlostní konstanta disociace, k_a je rychlostní konstanta asociace a t je čas (Barta et al. 2011). Díky tomuto přístupu je možno extrapolovat z jediné naměřené akumulací křivky, na které přitom nebylo dosaženo

plného saturování všech receptorů, hodnotu signálu odpovídající plně saturovanému rovnovážnému stavu. Poměr mezi S_R a S_{max} nazýváme korekčním faktorem (f_k).

$$(6) \quad f_k = \frac{S_R}{S_{max}}$$

Kalkulace počtu EGFR receptorů na buňku vycházela v případě metody KEX ze stejných výchozích parametrů (viz rovnice 3 a 4) jako u klasické saturační techniky, lišila se pouze v tom, že získaný počet receptorů byl dělen korekčním faktorem získaným pomocí rovnice 6 v programu TraceDrawer[®].

3.4.6 Vazebnost protilátek *in vitro*

Tato metoda byla použita při testování protilátek značených radiokovy. Příslušné buněčné linie byly nasazeny do šestijamkových destiček 24 hodin před samotným experimentem tak, aby v den experimentu dosáhly konfluence přibližně 70-90%. Polovina osazených jamek byla jednu hodinu inkubována s neznačeným cetuximabem, resp. panitumumabem, o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v příslušném kultivačním médiu. Tyto jamky tak představovaly buňky s blokováním EGFR. Následně bylo médium s protilátkou odstraněno a všechny buňky byly opláchnuty PBS. Poté na ně bylo aplikováno kultivační médium obsahující značený radioligand v koncentraci 10 ng/ml . Pro každou kombinaci buněčné linie a radioligandu bylo použito triplicátu jamek. Po 60-ti minutách inkubace bylo odebráno kultivační médium a změřeno na gama počítací. Buňky byly třikrát opláchnuty PBS a tyto oplachy byly přidány k odebranému médiu. Následně byly buňky 0,25% trypsinem odděleny z podkladu a přeneseny do scintilačních lahvíček. Jamky byly třikrát vypláchnuty PBS a tyto oplachy byly přidány k buňkám. Radioaktivita buněk byla změřena gama počítačem. Podíl navázané protilátky byl vypočítán dle rovnice 7.

$$(7) \quad \%(A_b) = \frac{A_b}{A_s} \times 100$$

Kde A_b představuje aktivitu vázanou na buňky a A_s průměrnou aktivitu standardu, tj. dávky aplikované na buňky.

3.4.7 Stanovení koncentrace modifikovaných protilátek

Před vlastním značením modifikovaných protilátek radiokovem bylo potřeba stanovit jejich přesnou koncentraci, která byla změněna průchodem přes několik gelových kolon PD-10 (GE Healthcare, Velká Británie). Koncentrace monoklonální protilátky modifikované chelátorem nemohla být v tomto případě stanovena pomocí standardní BCA metody z důvodu přítomnosti chelátoru v její molekule – docházelo by ke zkreslení výsledku vychytáním měďnatých kationtů. Proto byla pro toto stanovení zvolena Bradfordova metoda, která není ovlivněna chelatací kovových iontů. Ke stanovení bylo v triplicátu odebráno 5 μ l roztoku modifikované protilátky do 96-jamkové destičky. Jako proteinový standard pro tvorbu kalibrační křivky byl použit hovězí gama globulin (Sigma-Aldrich). Jako standard běžně užívaný hovězí sérový albumin (BSA) nebyl použit, protože by zkresloval stanovení koncentrace protilátky. Poté se ke vzorkům i ke standardům přidalo 250 μ l Bradfordova činidla (Coomassie reagent) a následovala inkubace 10 minut při pokojové teplotě. Pak byla změřena absorbance při 595 nm a pomocí kalibrační křivky vypočtena koncentrace stanovované protilátky.

3.4.8 Western blot analýza

Metoda Western blot byla použita pro ověření míry exprese receptorů pro epidermální růstový faktor. Buňky byly nejprve desintegrovány pomocí lyzačního pufru (0,5 % SDS, 10 mmol/l Tris/HCl, pH 7,4). Poté byly přidány následující komponenty: 0,5 μ g/ml leupeptinu, 2 μ g/ml aprotininu, 50 μ g/ml benzamidinu a 40 μ g/ml PMSF, vše od firmy SERVA (Německo). Po homogenizaci byla směs centrifugována při 6000xg po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Koncentrace proteinu ve vzorku byla určena metodou BCA pomocí BCA Protein Assay kitu (Thermo Scientific, USA). Proteiny (EGFR a β -aktin) byly separovány pomocí SDS-PAGE. Pro separaci byl použit 10% gel (5 μ g proteinu/pruh) a přístroj Power Pac HC (BioRad, Velká Británie). Následně byly proteiny přeneseny na PVDF (polyvinyliden fluorid) membránu (Sigma-Aldrich, USA). Úspěšnost přenosu proteinů byla ověřena barvením pomocí roztoku Ponceau S (SERVA, Německo). Následně byly proteiny blokovány po dobu jedné hodiny za laboratorní teploty 5% roztokem odtučného mléka (BioRad, Velká Británie) v Trisem pufovaném fyziologickém roztoku obsahujícím 0,05% Tweenu 20 (tj. TBST pufr). Imunoblotovací protilátky byly rozpuštěny v 5% TBST pufru obsahujícím 5% odtučného mléka. Membrána byla blotována přes noc anti-EGFR protilátkou

produkovanou myším klonem F4 (Sigma-Aldrich, USA) zředěnou 1:100 nebo myší anti- β -aktin protilátkou zředěnou 1:2000. Následně byla membrána čtyřikrát promyta TBST pufrem. Poté byla membrána inkubována jednu hodinu s „anti-mouse“ IgG protilátkou (Fab specifickou), což je s peroxidázou spojená protilátka zředěná v poměru 1:8000. Následovaly čtyři oplachy membrány TBST pufrem. Chemiluminiscence se vyvinula po aplikaci reagentu Super-Signal West Femto Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific, USA) v případě EGFR, zatímco pro β -aktin bylo použito reagentu SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific, USA). Imunoreaktivní pruhy zobrazené pomocí RTG negativů (Foma Bohemia, ČR) byly naskenovány kalibrovanou CCD kamerou Image Quant 400 (GE Healthcare, Švédsko) a následně byly kvantifikovány za pomoci softwaru NIS Elements verze 3.22 (Laboratory Imaging Prague, ČR), (Song et al 2009). Western blot analýza byla prováděna ve spolupráci s Mgr. Janou Mandíkovou.

3.4.9 Statistická analýza

Získaná data byla podrobena jednofaktorové analýze rozptylu (ANOVA) doplněné o Bonferroniho *post-hoc* test. Tato analýza probíhala s využitím softwaru GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, USA). Statistické hodnocení bylo prováděno na hladině významnosti $p=0.05$.

4 Cíle práce

1. Optimalizovat na pracovišti postupy pro značení monoklonálních protilátek radioizotopy jódu.
2. Charakterizovat vybrané modelové buněčné linie s deklarovanou přítomností receptoru pro epidermální růstový faktor z hlediska kvantity jeho exprese pomocí klasického a novějšího metodického přístupu s využitím radioaktivně značených protilátek, porovnat tyto metody.
3. Modifikovat vybrané monoklonální protilátky cílené na receptor pro epidermální růstový faktor zvolenými makrocyclickými chelátory a následně je označit vybraným radiokovem. Provést radiochemické hodnocení připravených protilátek.
4. Stanovit *in vitro* vazebnost radiokovem označených monoklonálních protilátek na vybrané buněčné linie exprimující receptor pro epidermální růstový faktor a posoudit vliv použitého chelátoru na tuto vazebnost.

5 Výsledky

Kapitola shrnující výsledky je dělena na čtyři části. První část představuje výsledky týkající se značení zvolených monoklonálních protilátek jódem-131, následné kontroly radiochemické čistoty připravených radiofarmak a stanovení jejich stability v *in vitro* podmínkách. V druhé části jsou prezentovány výsledky experimentů na čtyřech modelových buněčných liniích stanovující expresi receptoru EGFR vyjádřenou jako počet receptorů vztažených na buňku pomocí dvou odlišných metod a výsledky ověření této exprese metodou Western blot.

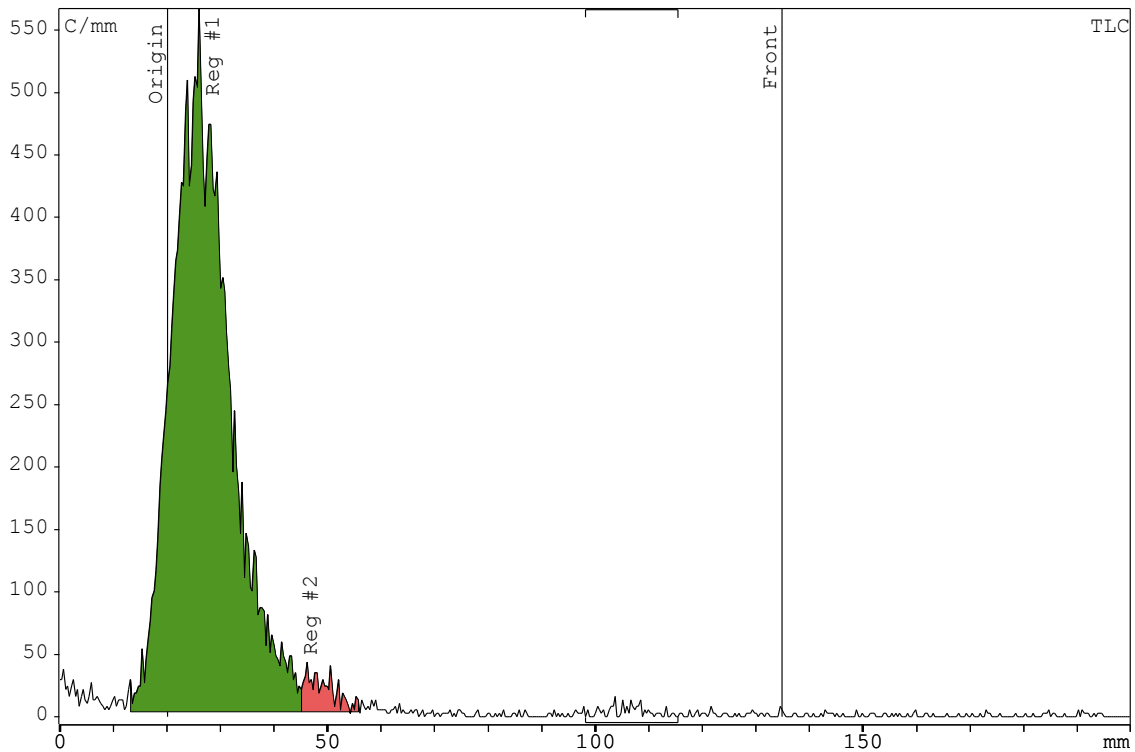
Třetí část shrnuje výsledky týkající se modifikace vybraných monoklonálních protilátek bifunkčními makrocyclickými chelátory, jejich značení luteciem-177 a *in vitro* stabilitu těchto připravených radiofarmak. Čtvrtá část představuje výsledky experimentů zkoumající vazebnost protilátek označených luteciem-177 na tři zvolené buněčné linie exprimující v různé míře cílový receptor.

5.1 Značení monoklonálních protilátek radioaktivním jódem

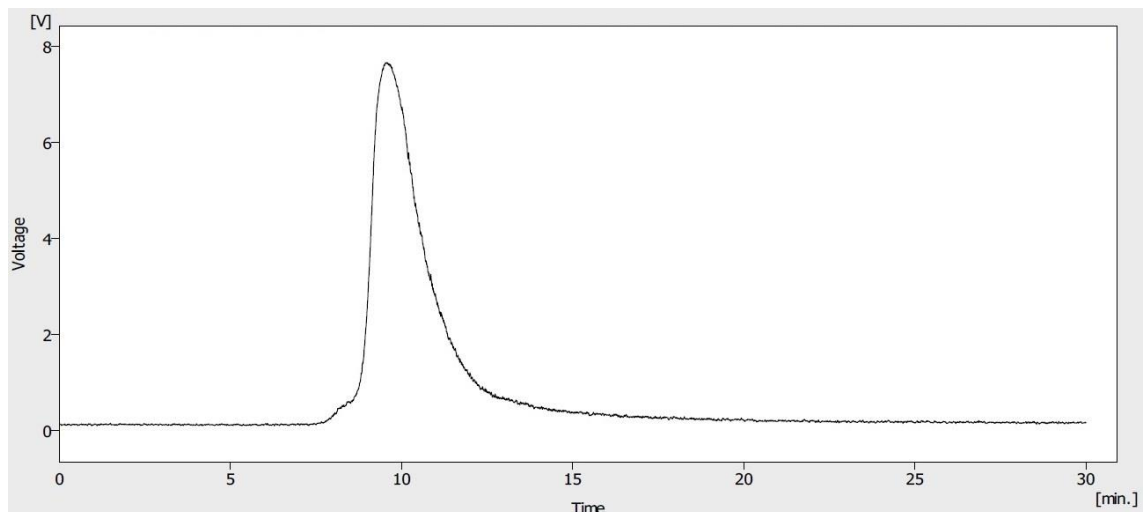
Celkem bylo provedeno pět radiojodací pro každou protilátku, tj. souhrnně deset radiojodací. Byly připraveny tyto dvě radioaktivně označené protilátky: ^{131}I -cetuximab a ^{131}I -panitumumab. Protilátky byly značeny s výslednou specifickou aktivitou 100 MBq/mg proteinu. Průměrný radiochemický výtěžek reakce byl $90,3\% \pm 4,2\%$ pro cetuximab a $52,0\% \pm 3,0\%$ pro panitumumab.

Označené protilátky byly před použitím v experimentu s buněčnými liniemi přečištěny na gelové koloně PD-10 (GE Healthcare), čímž se dosáhlo průměrné výsledné radiochemické čistoty $97,1\% \pm 1,5\%$ v případě cetuximabu a $98,3\% \pm 1,2\%$ v případě panitumumabu. Radiochemická čistota byla stanovována ihned po označení a přečištění orientačně pomocí ITLC a následně byla ověřována na HPLC systému (metodika podrobně viz kapitola 3.4.3). Typický ITLC chromatografický profil jodovaného cetuximabu ilustruje Obr. 20. Příklad HPLC chromatogramu ^{131}I -cetuximabu je uveden na Obr. 21.

Stabilita připravených protilátek byla testována v příslušných buněčných kultivačních mediích při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Průměrná radiochemická čistota po této inkubační době klesla v případě cetuximabu na $95,1\% \pm 1,6\%$ a na $96,5\% \pm 2,0\%$ v případě panitumumabu.



Obr. 20: Typický příklad analýzy radiochemické čistoty ^{131}I -cetuximabu pomocí ITLC chromatografie. Radiochromatogram zobrazuje příklad kontroly radiochemické čistoty jodovaného cetuximabu ihned po označení a přečištění. Zelený pík představuje aktivitu vázanou na protilátku (97%), červený pík tvoří nečistoty (3%). Mobilní fází byl fyziologický roztok. Vyvinutý ITLC proužek byl měřen pomocí přístroje RITA Star (Rayest, Německo).



Obr. 21: Typický příklad analýzy radiochemické čistoty ^{131}I -cetuximabu pomocí HPLC chromatografie. Radiochromatogram zobrazuje příklad kontroly radiochemické čistoty jodovaného

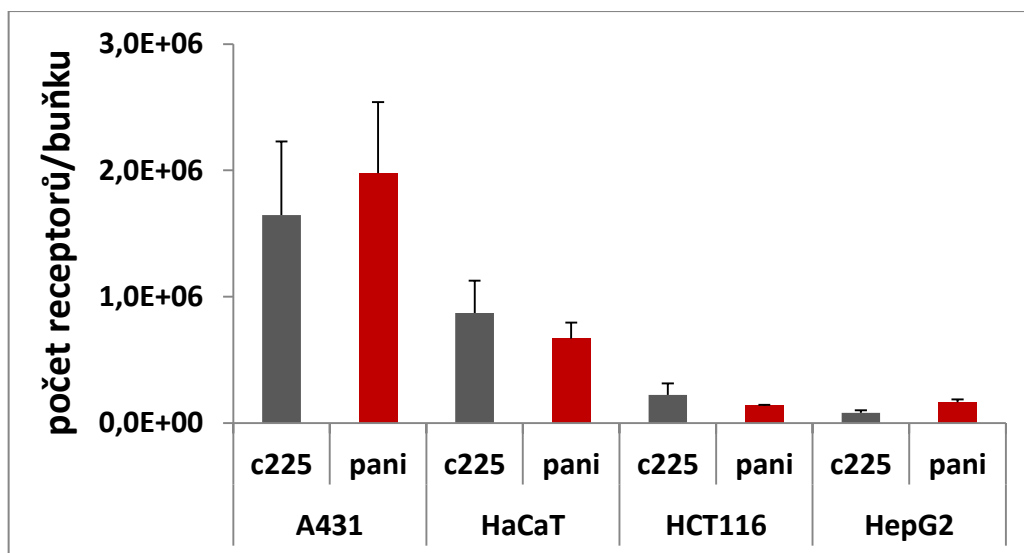
cetuximabu po označení a přečištění. Pík představuje aktivitu vázanou na protilátku (99%). Díky vysoké čistotě připravené protilátky není přítomen pík představující volný jód-131, který by se případně nacházel přibližně v retenčním čase 15 minut.

5.2 Kvantifikace exprese EGFR u vybraných buněčných linií pomocí značených protilátek

Optimalizovaný postup pro značení jódem-131 (viz část 5.1) byl následně použit pro experimenty kvantifikující expresi receptoru pro epidermální růstový faktor, resp. pro určení jejich průměrného počtu na buňku.

Klasická saturační technika

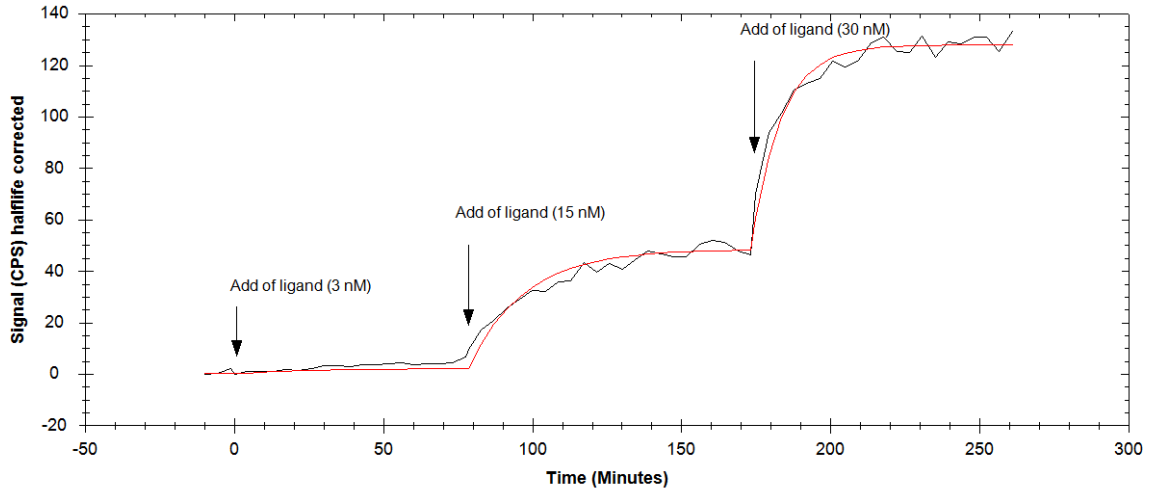
Pomocí klasické saturační techniky byly stanoveny počty receptorů EGFR vztažené na buňku ve čtyřech modelových buněčných liniích (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2). Tyto stanovené počty receptorů jsou uvedeny v grafu na obrázku 22.



Obr. 22: Stanovení počtu EGFR receptorů na buňku pomocí klasické saturační techniky. Data jsou vyjádřena jako průměrný počet EGFR receptorů/buňku pro čtyři buněčné linie (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2) pomocí dvou ligandů (c225=¹³¹I-cetuximab, pani=¹³¹I-panitumumab) ± směrodatná odchylka (n=5).

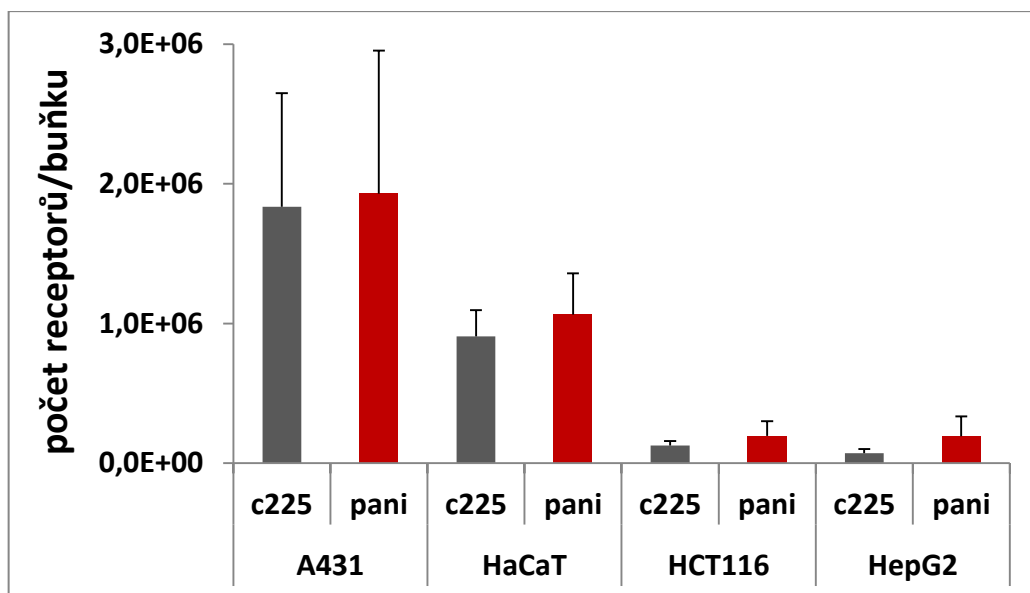
Kinetická extrapolační metoda (KEX)

Obrázek 23 ilustruje typický příklad akumulční křivky radioligandu získané při měření přístrojem LigandTracer[®] Yellow.



Obr. 23: Akumulační křivka ^{131}I -cetuximabu. Černá linie reprezentuje časovou závislost akumulace radioligandu (podíl radioaktivity vázané na buňky) naměřenou na přístroji LigandTracer[®] Yellow při akumulaci studii radioligandu ^{131}I -cetuximab na buněčné linii HaCaT. Šipky indikují časy přidání radioligandu a jeho výslednou koncentraci v buněčném mediu. Červená křivka je výsledkem matematického zpracování naměřených dat v programu TraceDrawer[®] a slouží jako podklad pro výpočet teoretického signálu S_{\max} resp. korekčního faktoru k_f (podrobněji viz kapitola 3.4.5).

Pomocí metody kinetické extrapolace (KEX), za využití přístroje LigandTracer[®] Yellow, byly stanoveny počty receptorů EGFR vztažené na buňku ve čtyřech modelových buněčných liniích (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2). Tyto stanovené počty receptorů jsou uvedeny v grafu na Obr. 24.



Obr. 24: Stanovení počtu EGFR receptorů na buňku pomocí KEX metody. Data jsou vyjádřena jako průměrný počet EGFR receptorů/buňku pro čtyři buněčné linie (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2) pomocí dvou ligandů ($c225=^{131}\text{I}$ -cetuximab, $pani=^{131}\text{I}$ -panitumumab) \pm směrodatná odchylka ($n=5$).

Cílem práce bylo též porovnat obě metody stanovení exprese receptoru pro epidermální růstový faktor. Proto uvádíme souhrně data z obou metod v Tabulce 8.

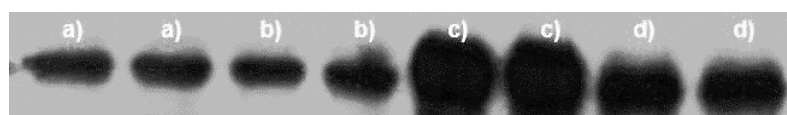
Tabulka 8. Počty receptorů pro epidermální růstový faktor vstažené na buňku stanovené klasickou saturační technikou („manual“) a pomocí metody KEX.

„manual“	A431	HaCaT	HCT116	HepG2
^{131}I -cetuximab	$1,64 \pm 0,58$	$0,87 \pm 0,25$	$0,22 \pm 0,09$	$0,08 \pm 0,02$
^{131}I panitumumab	$1,98 \pm 0,56$	$0,67 \pm 0,13$	$0,14 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,02$
KEX	A431	HaCaT	HCT116	HepG2
^{131}I -cetuximab	$1,84 \pm 0,81$	$0,91 \pm 0,19$	$0,13 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,03$
^{131}I panitumumab	$1,93 \pm 1,02$	$1,06 \pm 0,30$	$0,20 \pm 0,10$	$0,19 \pm 0,14$

Data jsou vyjádřena jako průměrný počet EGFR receptorů v milionech vztažený na buňku příslušné linie (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2) \pm směrodatná odchylka ($n=5$).

Western blot analýza

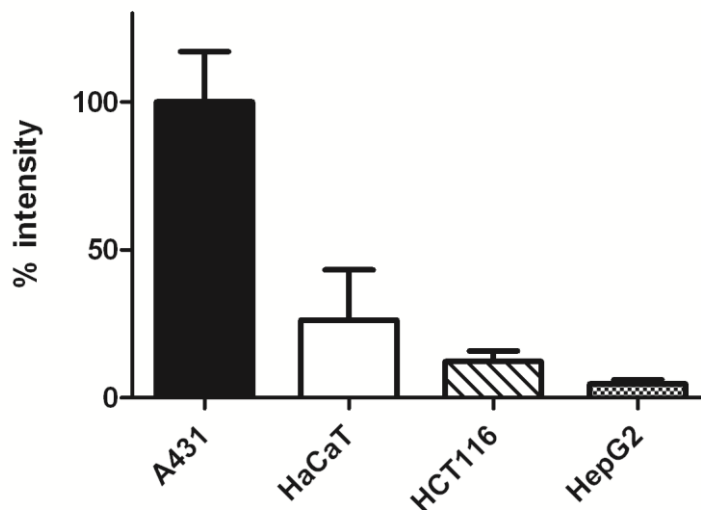
Vzorky jednotlivých buněčných linií (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2) byly taktéž zpracovány pro Western blot analýzu prokazující přítomnost receptoru pro epidermální růstový faktor. Ilustrační snímek kopie RTG negativu s imunoreaktivními skvrnami pro EGFR je uveden na obr 25.



Obr. 25: Fotokopie RTG negativu Western blot analýzy exprese EGFR. Imunoreaktivní skvrny příslušící vzorkům z jednotlivých buněčných linií (duplikáty): a) HepG2, b) HCT116, c) A431 a d) HaCaT.

Imunoreaktivní skvrny získané z této analýzy byly podrobeny densitometrické kvantifikaci v programu NIS Elements verze 3.22. Výsledky této kvantifikace skvrn

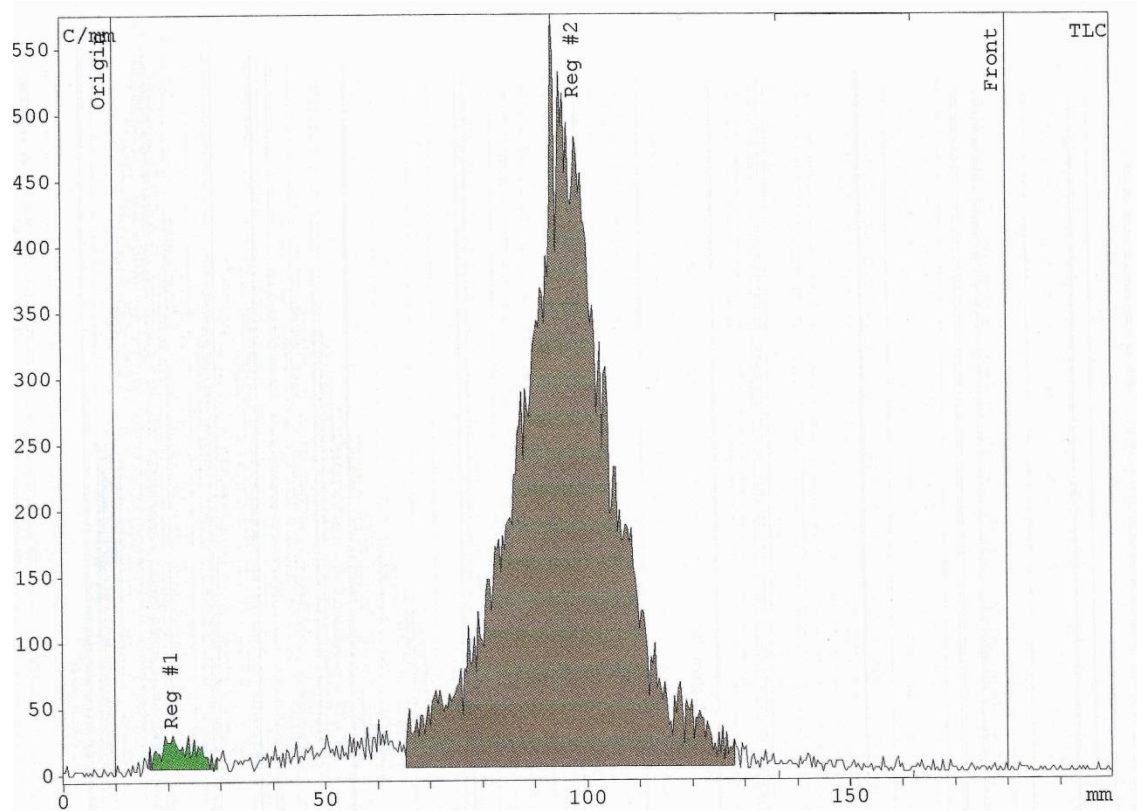
reprezentující detekci EGFR, vztahené vůči linií A431 (100%), jsou uvedeny v grafu na obrázku 26.



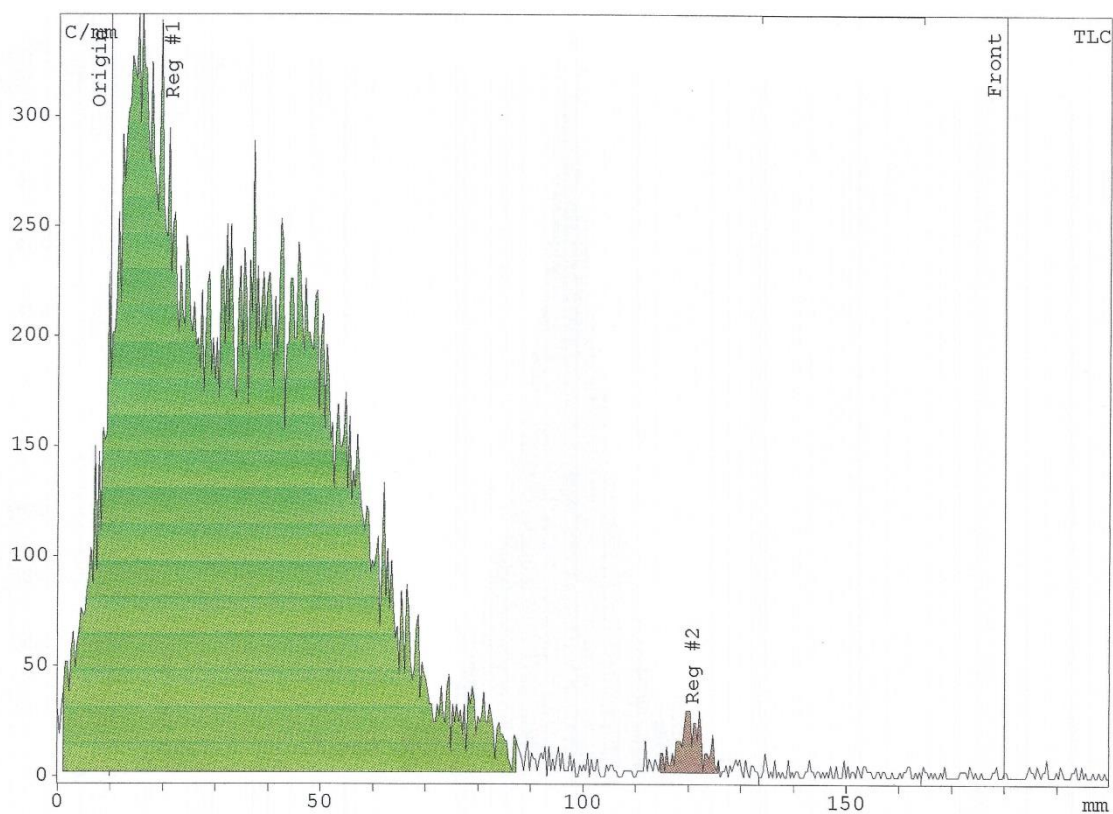
Obr. 26: Kvantifikace exprese receptoru EGFR ve čtyřech buněčných liniích pomocí metody Western blot. Data vyjadřují relativní expresi receptoru pro epidermální růstový faktor vstaženou k buněčné linii A431 (100%) \pm směrodatná odchylka (n=4). Kvantifikace dat z metody Western blot byla provedena v programu NIS Elements (verze 3.22).

5.3 Značení monoklonálních protilátek radiokovy

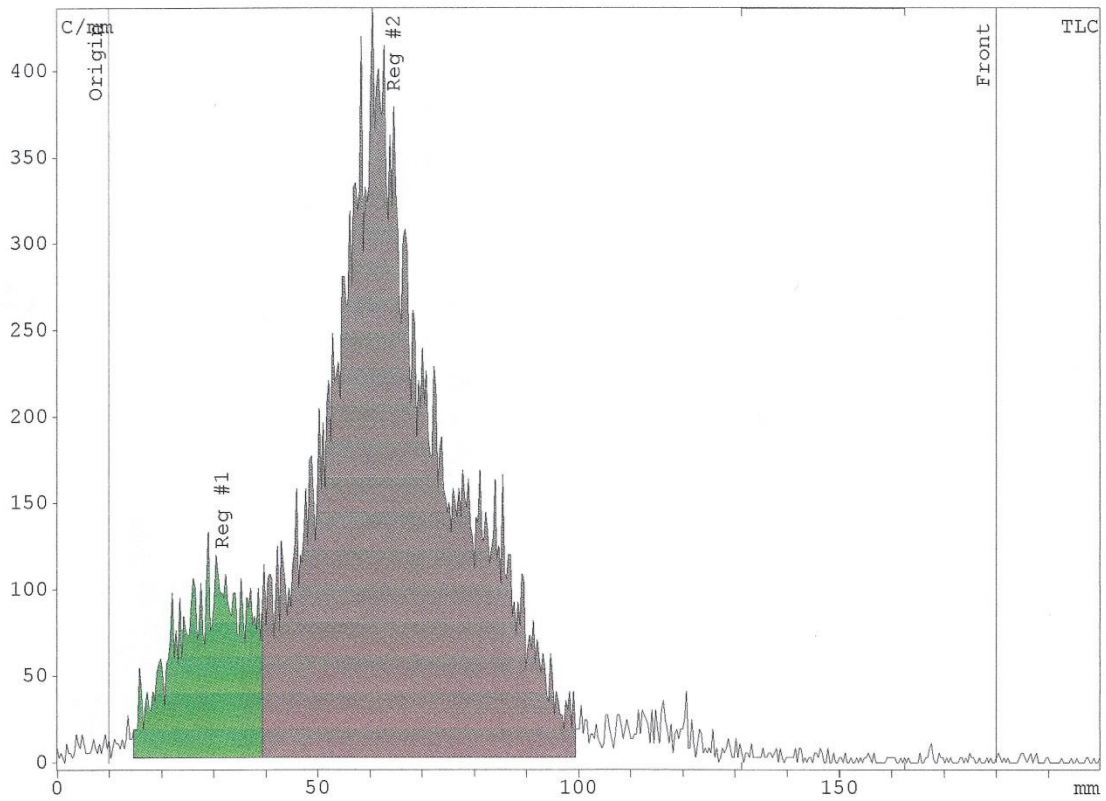
Před vlastním značením protilátek kovovými radionuklidy byl zaveden systém ITLC kontroly radiochemické čistoty, který umožnil odlišovat dva základní typy potencionálních radiochemických nečistot a to volný nuklid a nuklid vázaný na chelátor. Bylo provedeno ověření chování volného lutecia-177 a komplexu ^{177}Lu -chelátor při ITLC za použití dvou různých mobilních fází - citrátového pufru a metanol-citrátové směsi. Při užití citrátového pufru jako mobilní fáze má značená protilátka retenční faktor (R_f) okolo 0,1, volný radiokov vykazuje retenční faktor blízký 1, stejně tak komplex chelátor-radiokov, který může v roztoku zůstat následkem nedokonalého přečištění po modifikaci. Zatímco v metanol-citrátové směsi jako mobilní fázi má protilátka R_f okolo 0,1, volný radiokov okolo 0,2, avšak komplex chelátor-radiokov má R_f okolo 0,8, čímž je možné jej odlišit od volného kovu. Chování radiokovu a komplexu chelátor-radiokov ve zmiňovaných mobilních fázích při ITLC chromatografii dokumentují obrázky 27-30.



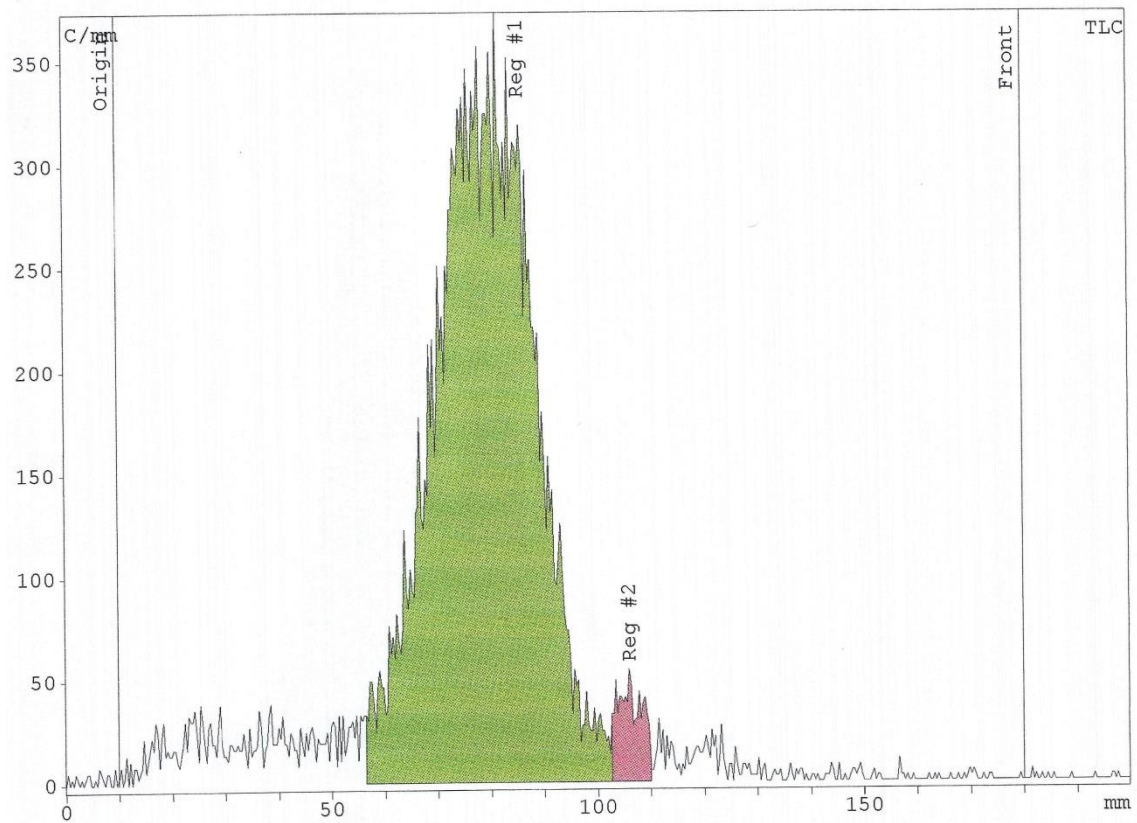
Obr. 27: ITLC chromatogram volného ^{177}Lu v citrátovém pufru. Zelený region představuje nečistotu, v tomto případě pravděpodobně ^{177}Lu -koloid. Hnědý region je volné lutecium-177 jdoucí s čelem mobilní fáze.



Obr. 28: ITLC chromatogram volného ^{177}Lu v metanol-citrátové směsi. Zelený region představuje volné lutecium-177 s retenčním faktorem okolo 0,25. Hnědý region představuje radiochemickou nečistotu.



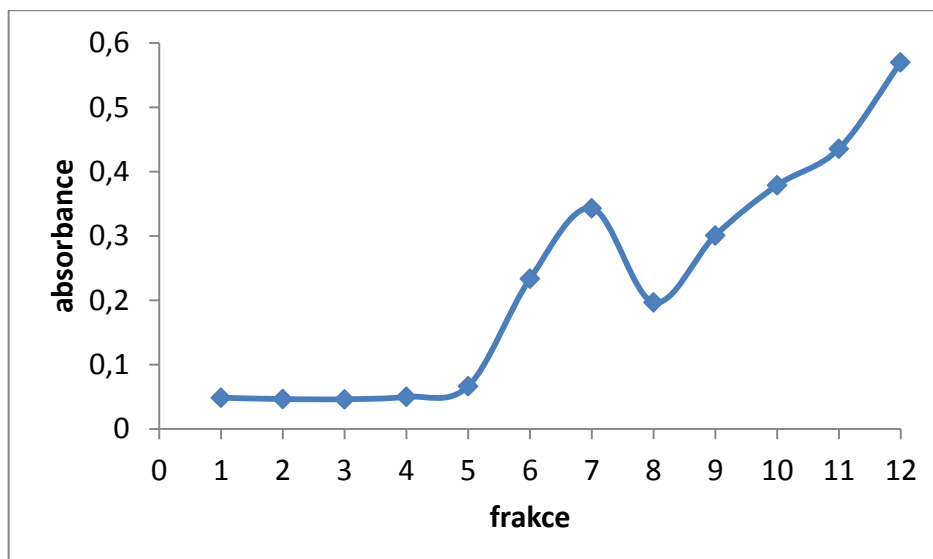
Obr. 29: ITLC chromatogram ^{177}Lu -DOTA v citrátovém pufru. Zelený region představuje nečistotu, zatímco hnědý region je komplex ^{177}Lu -DOTA s retenčním faktorem 0,7.



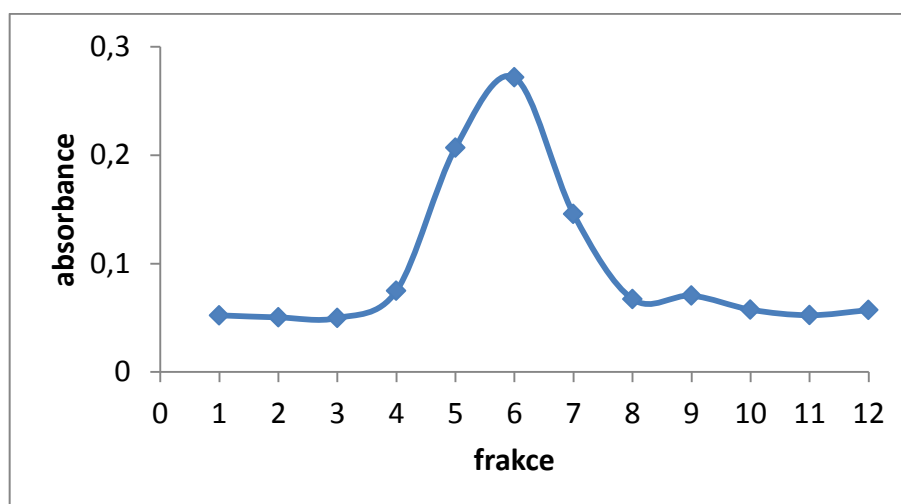
Obr. 30: ITLC chromatogram ^{77}Lu -DOTA v metanol-citrátové směsi. Zelený region představuje ^{177}Lu -DOTA, červený region nečistotu.

Každou ze dvou zvolených protilátek (cetuximab, panitumumab) jsme modifikovali vždy jedním ze tří vybraných bifunkčních chelátorů (DOTA, NOTA a PCTA). Tím jsme připravili celkem šest různých derivatizovaných protilátek, konkrétně jsou to tyto: DOTA-cetuximab, NOTA-cetuximab, PCTA-cetuximab, DOTA-panitumumab, NOTA-panitumumab a PCTA-panitumumab.

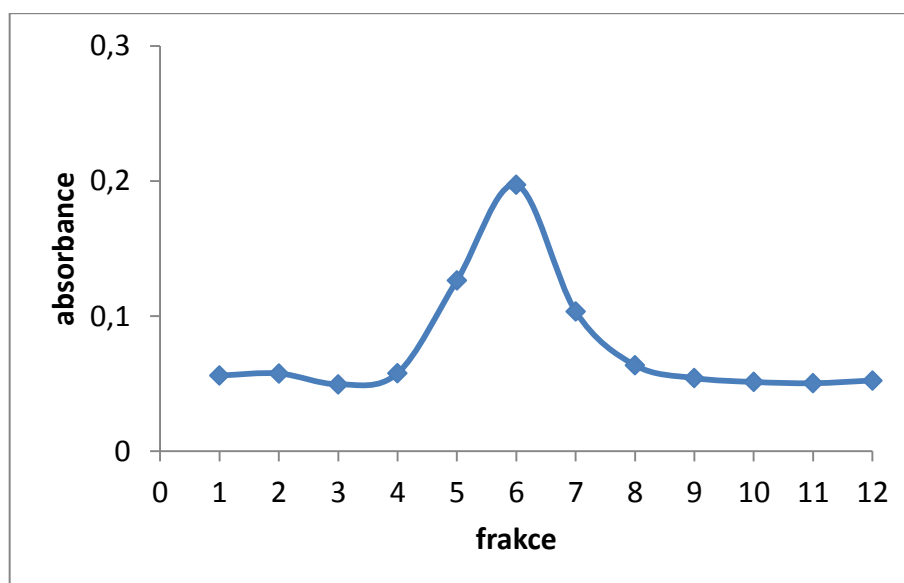
Po modifikaci protilátky příslušným chelátorem následovalo přečištění reakční směsi na dvou až třech sériově řazených gelových kolonách PD-10. Identifikace frakcí s největším podílem protilátky probíhala pomocí spektrometru měřením absorbance při 280 nm. Do dalšího kroku byly použity vždy maximálně dvě až tři frakce (0,5 ml/frakci) vykazující nejvyšší absorbanci. Monitorování průběhu čištění reakční směsi ukazují reprezentativní grafy na obrázcích 31-33.



Obr. 31: DOTA-panitumumab – eluční profil protilátky po přečištění na první gelové koloně PD-10. Do dalšího kroku čištění byly použity frakce 6 a 7. Vyšší absorbance frakcí 8-12 indikuje přítomnost volného chelátoru.



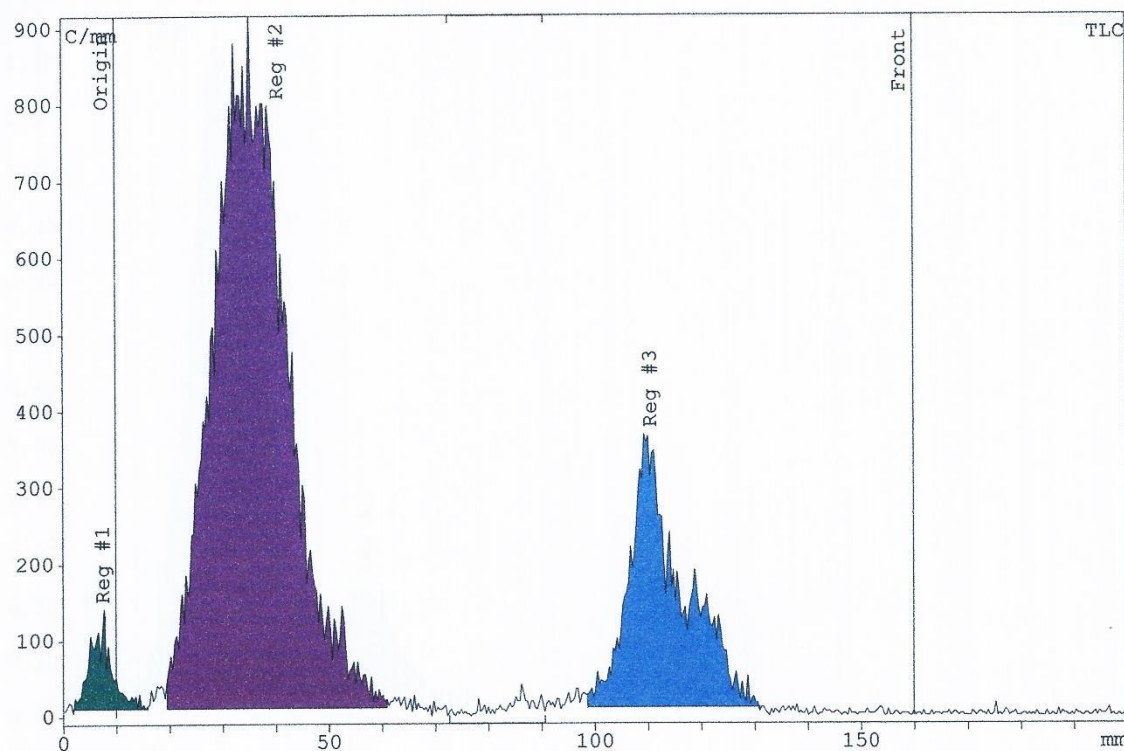
Obr. 32: DOTA-panitumumab – eluční profil protilátky po přečištění frakcí 6 a 7 z předcházejícího kroku uvedeného na Obr 31. Ačkoliv byla absorbance frakcí 8-12 již téměř na úrovni pozadí, byly spojené frakce 5 a 6 přečištěny ještě jednou.



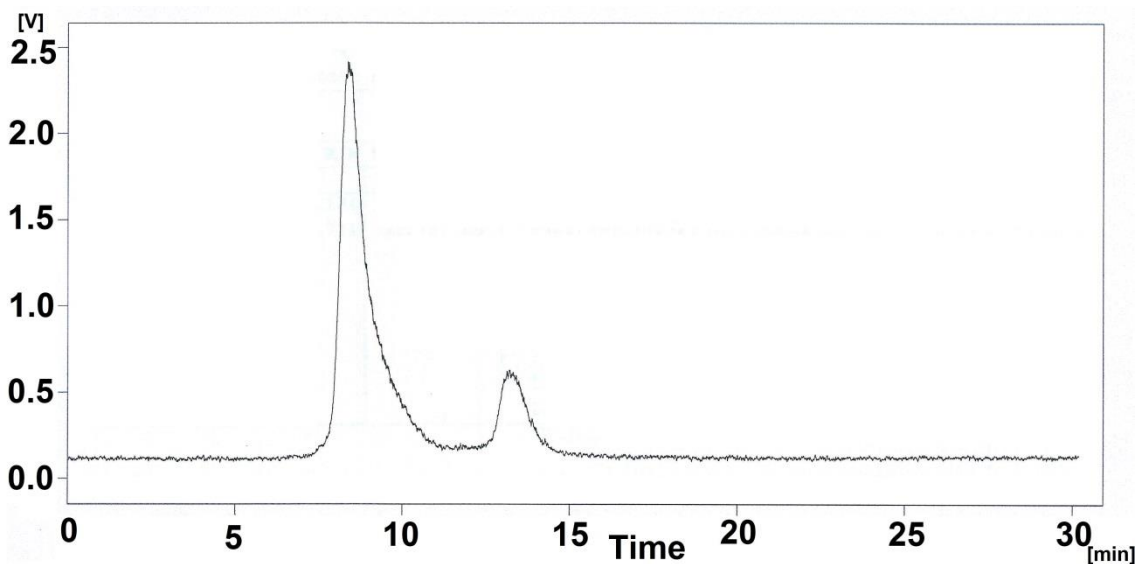
Obr. 33: DOTA-panitumumab – eluční profil frakcí 5 a 6 z předešlého grafu. Absorbance frakcí 8-12 je už zcela na úrovni pozadí. Frakce 5-7 byly spojeny a použity pro samotné značení luteciem-177.

Koncentrace modifikované protilátky ve sbíraných frakcích byla stanovena pomocí Bradfordovy metody. Následně bylo vypočteno množství protilátky po purifikaci. Po srovnání s úvodním množstvím protilátky vzatým do konjugační reakce vykazovalo použití dvou gelových kolon ztrátu 60% protilátky, zatímco v případě tří následných kolon činila finální ztráta protilátky 75%.

Po úspěšném přečištění reakční směsi následovalo samotné značení luteciem-177. Po přidání radionuklidu byla směs inkubována 12 hodin při 37 °C za mírného třepání. Ihned po ukončení inkubace následovala kontrola radiochemické čistoty preparátu. Nejprve pomocí metody ITLC. V případě nedokonalého přečištění po modifikaci protilátky vykazovalo značení nižší výtěžnost. Takový případ ilustruje Obr. 34 pro tenkovrstvou chromatografii či Obr. 35 pro výstup z HPLC.

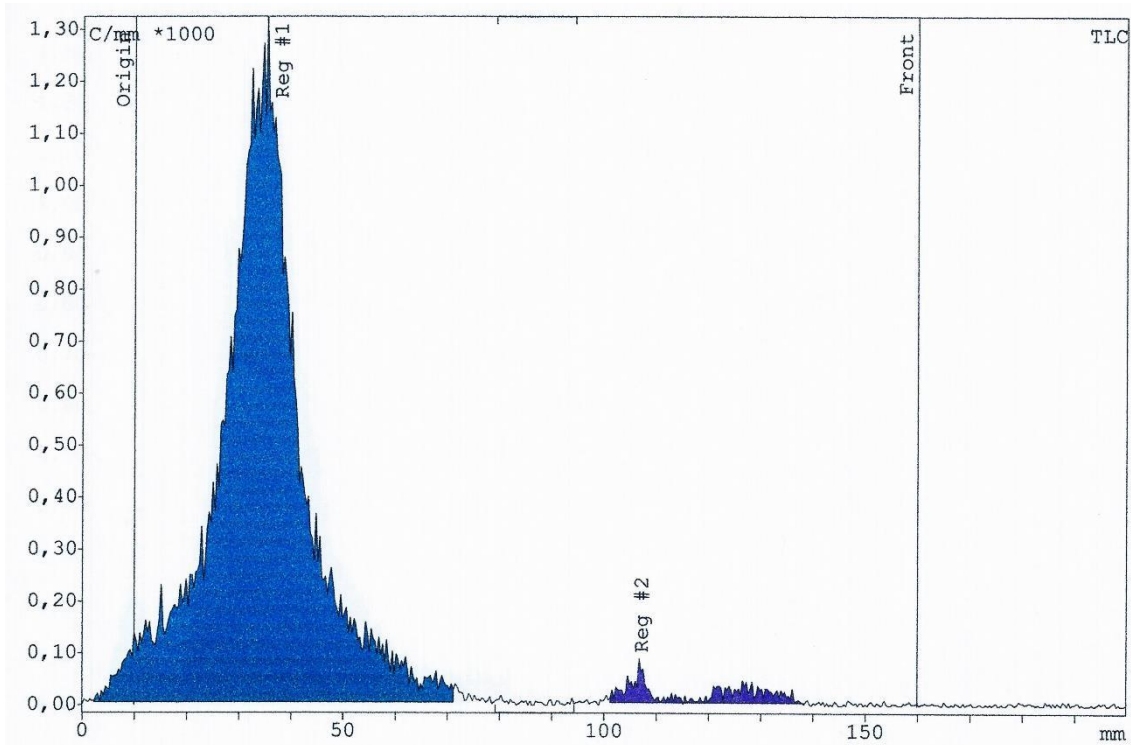


Obr. 34: Ukázka ITLC chromatogramu ^{177}Lu -PCTA-cetuximabu značeného po nedostatečném přečištění modifikované protilátky na dvou kolonách PD-10. Radiochemická čistota je v tomto případě 75,5%. Modrý pík představuje komplex chelátor-radiokov. Fialový pík reprezentuje označenou protilátku a zelený nečistotu.

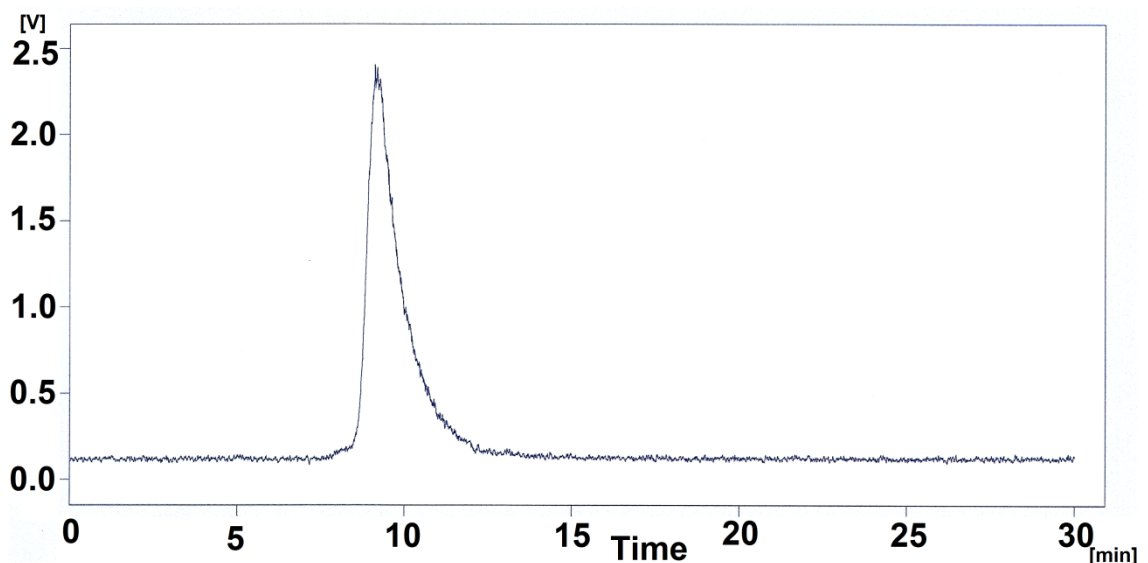


Obr. 35: Typický příklad radiochromatogramu ^{177}Lu -PCTA-panitumumabu s nízkou čistotou. Záznam je získaný z RP-HPLC s radiometrickou detekcí. Pík v čase 8 minut představuje označenou monoklonální protilátku, zatímco pík v čase 13 minut odpovídá komplexu ^{177}Lu -PCTA. V tomto případě je tedy radiochemická čistota preparátu 83 %.

V případě dobře přečištěné protilátky probíhalo značení s mnohem vyšší účinností, pohybující se většinou nad 95%. Takový případ ilustruje ITLC chromatogram na Obr. 36 či obdobný případ pro HPLC na Obr. 37.



Obr. 36: Ukázka ITLC chromatogramu ^{177}Lu -DOTA-cetuximabu značeného po přečištění modifikované protilátky na třech po sobě jdoucích kolonách PD-10. Radiochemická čistota je v tomto případě 96,8%. Region 1 představuje označenou protilátku, region 2 je ^{177}Lu -DOTA.



Obr. 37: Typický příklad radiochromatogramu ^{177}Lu -PCTA-panitumumabu. Záznam je získaný z RP-HPLC s radiometrickou detekcí. Pík v čase 10 minut představuje označenou monoklonální protilátku. V tomto případě se tedy radiochemická čistota preparátu blíží 100%.

V naprosté většině případů bylo při přečišťování protilátky použito tři gelových kolon. Radiochemické čistoty připravených protilátek shrnuje tabulka 9. Většina připravené protilátky byla ihned použita pro následnou studii *in vitro* vazebnosti, menší část byla využita pro stabilitní studii. Stabilita byla u všech protilátek ověřována 24 hodin po označení, výsledky těchto měření jsou v tabulce 9.

Tabulka 9. Radiochemická čistota připravených protilátek měřená pomocí HPLC metody

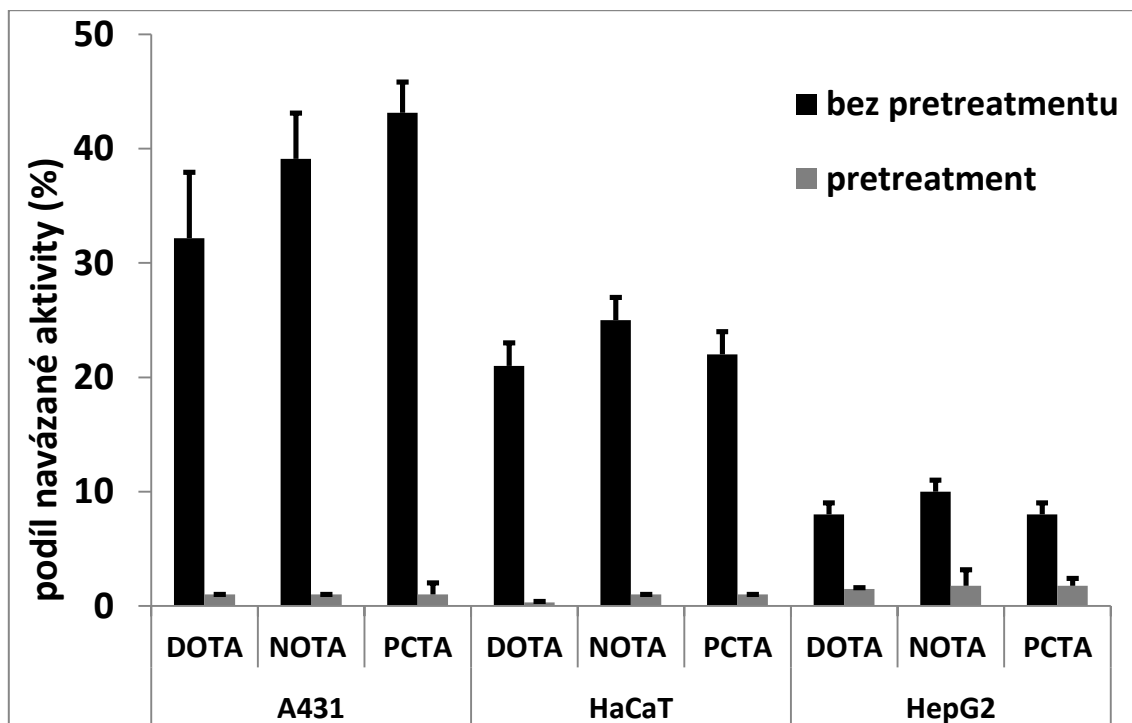
	Čistota po přípravě (%)	Čistota po 24 hodinách (%)
DOTA-cetuximab	96,0 ± 0,5	96,0 ± 1,0
NOTA-cetuximab	95,1 ± 0,9	94,5 ± 1,2
PCTA-cetuximab	95,0 ± 1,1	94,0 ± 1,5
DOTA-panitumumab	96,2 ± 1,0	96,1 ± 1,0
NOTA-panitumumab	93,8 ± 1,0	92,1 ± 1,2
PCTA-panitumumab	90,8 ± 0,7	90,1 ± 0,9

Data ve druhém sloupci reprezentují radiochemickou čistotu příslušných protilátek po 24 hod inkubaci za pokojové teploty (n=3).

Pro všechny tři modifikace cetuximabu (DOTA, NOTA i PCTA) byla stanovována stabilita ¹⁷⁷Lu-označené protilátky i po 7 dnech. V tomto případě došlo k průměrnému poklesu radiochemické čistoty o 5,2% ± 1,7.

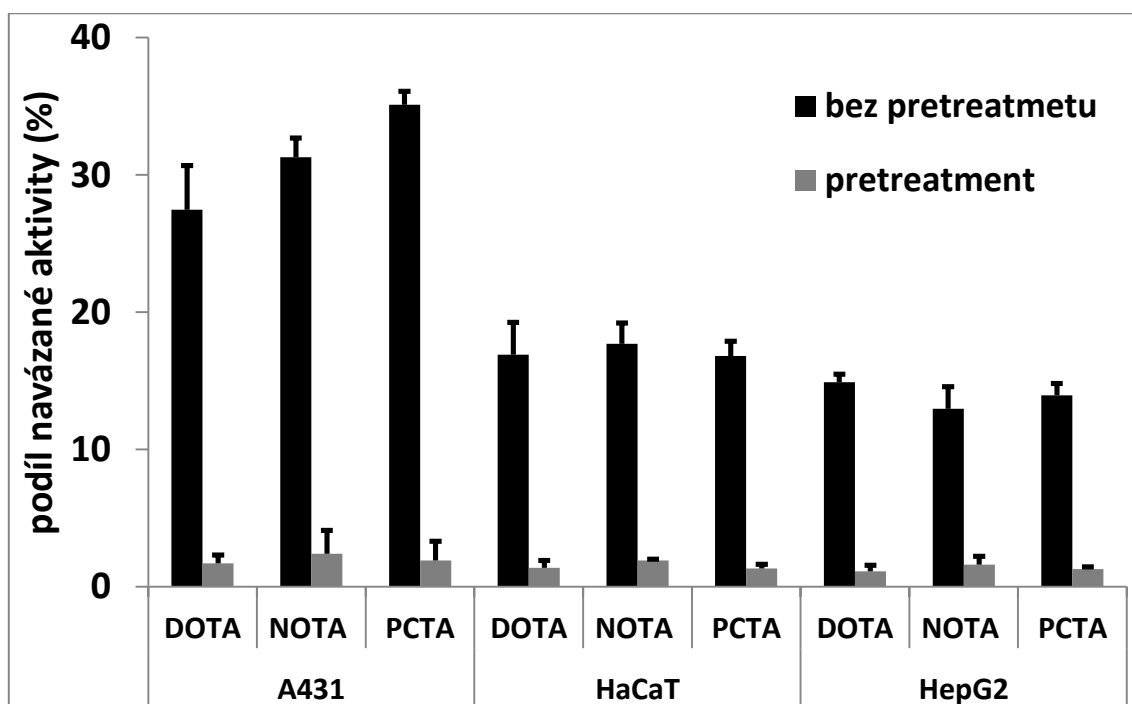
5.4 Vazebnost modifikovaných protilátek na EGFR a porovnání vlivu chelátoru

Monoklonální protilátky označené v předešlé části práce byly ihned po své přípravě využity pro studie vazebnosti na vybraných buněčných liniích exprimujících EGFR tj. A431, HaCaT a HepG2. Byl stanovován jednak podíl navázané značené protilátky na cílovou buněčnou linii a také vliv preinkubace těchto buněčných linií s neznačenou protilátkou na vazbu značené protilátky. Výsledky vazby radioaktivně značených derivátů cetuximabu uvádí graf na obrázku 38.



Obr. 38: Vazba ¹⁷⁷Lu-cetuximabu na buněčné linie. Data jsou vyjádřena jako podíl na buňky navázané radioaktivity ve formě značené protilátky vůči podané dávce ± směrodatná odchylka. K modifikaci protilátky byly použity tři různé chelátory (DOTA, NOTA a PCTA), n=5.

Stejným způsobem jako derivatizovaný cetuximab byly testovány i tři deriváty panitumumabu. Výsledky těchto studií jsou zachyceny v grafu na obrázku 39.



Obr. 39: Vazba ¹⁷⁷Lu-panitumumabu na buněčné linie. Data jsou vyjádřena jako podíl na buňky navázané radioaktivity ve formě značené protilátky vůči podané dávce ± směrodatná odchylka. K modifikaci protilátky byly použity tři různé chelátory (DOTA, NOTA a PCTA), n=5.

Pro lepší porovnání obou použitých protilátek tj. cetuximabu a panitumumabu uvádíme souhrnou tabulku naměřených hodnot vazby radioligandů. Viz Tabulka 10.

Tabulka 10. Porovnání vazby značeného cetuximabu a panitumumabu na vybrané buněčné linie (A431, HaCaT a HepG2).

	¹⁷⁷ Lu-DOTA- cetuximab	¹⁷⁷ Lu-DOTA- panitumumab	¹⁷⁷ Lu-NOTA- cetuximab	¹⁷⁷ Lu-NOTA- panitumumab	¹⁷⁷ Lu-PCTA- cetuximab	¹⁷⁷ Lu-PCTA- panitumumab
A431	32,16±5,79	27,47±3,20	39,12±4,00	31,29±1,40	43,14±2,70	35,10±1,02
HaCaT	21,00±2,00	16,90±2,35	25,00±2,00	17,70±1,51	22,00±2,00	16,80±1,08
HepG2	8,01±1,00	14,90±0,57	10,00±1,00	12,96±1,60	8,02±1,05	13,95±0,85

Vazba značené protilátky je vyjádřena v procentech podané radioaktivity navázané buňkami po 60 minutách inkubace při 37 °C. Data jsou ve tvaru průměru ± směrodatná odchylka (n=5).

Tabulka 11. Vazba značeného cetuximabu a panitumumabu na vybrané buněčné linie (A431, HaCaT a HepG2) s blokovaným receptorem pro epidermální růstový faktor.

	¹⁷⁷ Lu-DOTA- cetuximab	¹⁷⁷ Lu-DOTA- panitumumab	¹⁷⁷ Lu-NOTA- cetuximab	¹⁷⁷ Lu-NOTA- panitumumab	¹⁷⁷ Lu-PCTA- cetuximab	¹⁷⁷ Lu-PCTA- panitumumab
A431	1,00±0,00	1,70±0,60	1,00±0,20	2,40±1,70	1,10±1,00	1,90±1,40
HaCaT	0,30±0,10	1,83±0,52	1,10±0,00	1,91±0,10	1,00±0,00	1,33±0,29
HepG2	1,47±0,11	1,11±0,44	1,75±1,14	1,61±0,59	1,75±0,64	1,27±0,18

Vazba značené protilátky je vyjádřena v procentech podané radioaktivity navázané buňkami po 60 minutách inkubace při 37 °C. Data jsou ve tvaru průměru ± směrodatná odchylka (n=5). Buňky byly 60 minut před aplikací značené protilátky inkubovány s nezačleněným cetuximabem, resp. panitumumabem, o koncentraci 10 µg/ml v příslušném kultivačním médiu.

6 Diskuze

Řada typů maligních tumorů se vyznačuje oproti zdravé tkáni zvýšenou expresí receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), (Nicholson et al. 2011). Tento receptor je proto nádorovým markerem a cílovou strukturou, na kterou je zaměřena řada používaných léčiv a perspektivních terapeutik (Brand et al. 2011; Ulivi et al. 2013). Studium vazebnosti látek, které mohou tento typ receptoru ovlivnit je proto poměrně atraktivní a důležitou výzkumnou oblastí. Pro zkoumání vazby testovaných látek na EGFR *in vitro* se používá řada buněčných modelů. Abychom mohli studovat vazebné vlastnosti radioaktivně značených monoklonálních protilátek zaměřených na EGFR na relevantní úrovni, bylo nezbytné tyto modely vybrat a definovat z hlediska exprese sledovaných receptorů.

Míra exprese určitého receptoru na membráně buňky buněčné linie je velmi důležitý biologický parametr, který je hodnocen v mnoha různých cytologických a farmakologických studiích. Mimo jiné ve snaze omezit počty laboratorních zvířat využívaných v preklinickém výzkumu, jsou buněčné linie dnes velmi hojně užívaným experimentálním modelem při mnoha typech biomedicínských studií. A právě díky masivnímu rutinnímu využití mohou být tyto buněčné linie neúmyslně zaměněny, kontaminovány (jinou linií či patogenem) či mohou podlehnout v průběhu kultivace genetickým změnám (Alston-Roberts et al. 2010). Například často podceňovaný vliv počtu buněčných pasáží² může mít dramatický vliv na expresi receptorů u dané buněčné linie (Erac et al. 2014, Wakshull et al. 1985). V takovém případě může dojít k zásadním změnám v důležitých biologických parametrech buněčné linie, např. i ke změně počtu exprimovaných receptorů určitého typu (Blanco et al. 2012). Tyto změny vlastností či dokonce záměny buněčných linií nejsou ve výzkumné praxi nijak vzácnou záležitostí (Hughes et al. 2007) a vedou často k naprosto zavádějícím výsledkům a tím pádem i chybným závěrům. Proto máme za to, že by mělo být standardní součástí rutinních postupů při *in vitro* studiích také stanovení míry exprese zkoumaného receptoru. Takové stanovení by mělo být ideálně co nejefektivnější, časově nenáročné a co možná nejspolehlivější.

Ačkoliv prací popisující různé aspekty nádorového bujení, které využívají ve svých experimentálních modelech buněčné linie právě s EGFR je v literatuře popsáno již několik tisíc, doposud není k dispozici žádná práce, která by systematicky mapovala

² pasáž – uvolnění buněk z podkladu a přenesení do nové kultivační láhve s čerstvým médiem.

přesnou míru exprese tohoto receptoru v běžně užívaných buněčných liniích. Proto jsme pro naši práci zvolili čtyři široce využívané buněčné linie s různou mírou exprese receptoru EGFR. Navíc jsme se rozhodli porovnat tři různé metody (klasickou saturační techniku, kinetickou extrapolaci metodu a western blot) pro stanovení exprese tohoto receptoru. Cílem naší práce bylo nejen porovnat různé metody pro kvantifikaci EGFR, ale též získat data o četnosti tohoto receptoru ve zvolených buněčných liniích, která by byla získána v jedné laboratoři stejnou metodou. Tato data nebyla doposud v literatuře dostupná. Tedy mimo samotného srovnání metod kvantifikujících zkoumaný receptor, vidíme právě v nově získaných údajích o absolutním počtu EGFR na povrchu buněk hlavní přínos této části práce. Jako ligandy pro detekci receptoru pro epidermální růstový faktor jsme zvolili dvě již klinicky používané monoklonální protilátky – cetuximab a panitumumab, které terapeuticky cílí právě na tento receptor (Vacchelli et al. 2014). Pro využití v našich metodických přístupech je však bylo nutno nejprve radioaktivně označit.

Pro experimenty kvantifikující expresi receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) bylo nutno na pracovišti zavést metodu značení monoklonálních protilátek pomocí radioizotopu jódu (^{131}I), který byl zvolen především s ohledem na detekční parametry přístroje LigandTracer[®] Yellow. Literatura v oboru radiojodací protilátek popisuje nejčastěji dvě metody značení a to pomocí jodogenu a chloraminu T (Visser et al. 2001). Pro naši práci byla zvolena metoda chloraminu T, která je pro neklinické aplikace vhodnější díky své větší flexibilitě (Theobald 2011). S využitím této metody se podařilo označit zvolené protilátky s vysokou specifickou aktivitou a relativně vysokým výtěžkem. Díky přečištění na gelové koloně měly připravené preparáty velmi vysoké stupně radiochemické čistoty (nad 95%).

Ke kontrole radiochemické čistoty byly zvoleny dvě nejčastěji v radiofarmacii používané metody kontroly kvality – instantní tenkovrstvá chromatografie (ITLC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s radiodetekcí. Použití obou těchto technik v rámci jedné studie umožňuje jednak vždy potvrdit naměřené hodnoty radiochemické čistoty alternativní metodou, ale zároveň využít specifických předností každé z nich. Prakticky to znamená, že se vždy po označení protilátky nejprve přistoupilo k ITLC analýze, která vyniká svou rychlostí (řádově minuty) a jednoduchostí. Pokud tato metoda prokázala uspokojivou čistotu testovaného preparátu (obvykle přes 90%), bylo přistoupeno i k jeho HPLC analýze, která je sice citlivější, ale též časově nepoměrně náročnější než ITLC (řádově desítky minut).

Mimo samotné radiochemické čistoty je druhým zásadním kvalitu určujícím parametrem radiofarmaka jeho stabilita. Stabilita označených protilátek byla stanovována po 24 h inkubaci, což vzhledem k délce samotného biologického experimentu stanovení exprese EGFR (4 h) považujeme za dobu více než dostatečnou a průkaznou. Výsledky stabilitních studií ukazují ztrátu radiochemické čistoty po 24 h v jednotkách procent (okolo 2%). Stabilitní studie tak dokazují, že během samotného experimentu stanovení exprese EGFR byl detekován skutečně zamýšlený radioligand (jodovaná protilátka) a nikoliv uvolněný jód-131.

Expresí receptorů může být stanovena několika různými metodami, my jsme porovnávali novou poloautomatizovanou metodu (KEX) s klasickou manuální saturační technikou a western blottingem. Zatímco klasická saturační technika a western blot jsou považovány za známé a dobře popsané metody, KEX metoda byla vyvinuta poměrně nedávno (Bárta et al. 2011). Metoda KEX využívá unikátního přístroje LigandTracer[®] Yelllow, který byl speciálně vyvinut pro měření vazby radioligandů i na adherentní buňky kultivované na Petriho misce (Björke a Andersson 2006b). V případě použití vhodného radioligandu může být tento přístroj využit i pro měření akumulace látek *in vitro*, např. i v případě monoklonálních protilátek (Nestor et al. 2008). Ovšem byly také publikovány práce s LigandTracerem[®] Yellow popisující kvantifikaci exprese membránových receptorů na fixovaných tkáňových řezech (Gedda et al. 2010).

Výsledky našich experimentů stanovujících expresi EGFR ukazují velkou míru shody mezi klasickou saturační technikou a kinetickou extrapolací metodou u všech čtyř zkoumaných buněčných linií. Ačkoliv KEX metoda poskytuje v průměru o něco vyšší počty receptorů na buňku oproti saturační technice, nejsou tyto rozdíly signifikantní. Obě metody jasně určily linii A431 jako tu s nejvyšším počtem dostupných receptorů EGFR na buněčné membráně (téměř 2 miliony receptorů/buňku), linie HaCaT se vyznačuje zhruba poloviční expresí oproti buňkám A431. Linie HCT116 a HepG2 mají expresi EGFR na úrovni přibližně 10% linie HaCaT. Statistická analýza ukázala, že rozdíly mezi HCT116 a HepG2 v počtu zkoumaných receptorů nejsou signifikantní, tudíž dle míry exprese EGFR lze zkoumané linie seřadit takto: A431 > HaCaT > HCT116 ≈ HepG2.

Western blot analýza ukázala stejné pořadí buněčných linií dle míry exprese EGFR. Vzájemné poměry exprese EGFR mezi jednotlivými buněčnými liniemi nejsou v rámci této metody ve shodě s předešlými dvěma technikami. Tato diskrepance se dá

vysvětlit tím, že Western blot není metoda určená pro přesnou kvantifikaci, ale je pouze semikvantitativní.

Analýza rozdílů ve stanovování počtu EGFR receptorů pomocí ^{131}I -cetuximabu a ^{131}I -panitumumabu neukázala žádný signifikantní rozdíl, tj. oba ligandy poskytují prakticky stejné výsledky při stanovování počtu EGFR receptorů, kdy toto zjištění poukazuje na přesnost metody bez ohledu na použitý ligand cílený na studovaný receptor.

Jak již bylo zmíněno, v literatuře se nevyskytuje publikace popisující údaje o konkrétní míře exprese EGFR, s jedinou výjimkou a to linie A431, kdy Michel et al. (2004) uvádí hodnotu $1,8 \times 10^6$ receptorů na buňku, což je ve shodě s naším zjištěním. Údaj $1,20 \times 10^6 \pm 0,24 \times 10^6$ EGFR/buňku u linie A431, uvedený v práci Tichauer et al. 2012 je nižší, ale taktéž řádově odpovídá hodnotám zjištěným v našich experimentech.

Jelikož je kinetická extrapolační metoda (KEX) poměrně novou a doposud málo rozšířenou technikou považujeme za vhodné ji podrobněji popsat a objasnit její základní principy.

KEX metoda zahrnuje měření akumulace příslušného radioligandu rozložené do tří na sebe navazujících inkubací se stoupající koncentrací ligandu (typicky 3 nM, 15 nM a 30 nM). Měření během takovéto inkubace se nazývá „asociační fáze“. V určitých případech je možné pokračovat v měření po inkubaci s radioligandem a to tak, že se aktivní medium odstraní a nahradí novým tj. takovým, které neobsahuje radioligand. Tato část měření se označuje jako „disociační fáze“. Jak ukázal Nakajima et al. (2001) tvar bivalentní saturační křivky během asociační fáze se dá popsat pomocí čtyř různých kinetických rychlostních konstant: k_{on1} , k_{off1} , k_{on2} a k_{off2} .³ Což znamená, že je možné získat všechny kinetické a afinitní parametry včetně B_{max} (celkový počet vazebných míst tj. receptorů) jen z měření asociační fáze, za předpokladu, že saturační křivka bude dostatečně zakřivená, tj. není nutné měřit akumulaci i během disociační fáze. Pokud by se provedlo měření i v průběhu disociační fáze, pak by byly kinetické parametry určeny s vyšší přesností, což ale konkrétně v případě metody KEX není možné.

Data naměřená LigandTracerem[®] jsou zpracována v analytickém programu TraceDrawer[®] 1.2, který pomocí matematické integrace vypočítá teoretické bivalentní saturační křivky a nelineární interpolační algoritmus následně odvodí základní kinetické konstanty k_{on1} , k_{off1} , k_{on2} , k_{off2} a B_{max} tak, aby odpovídaly naměřeným datům. Díky tomu mohou být odhadnuty všechny kinetické konstanty za použití dat jen z jedné

³ $k_{on}=k_a$ (rychlostní konstanta asociace), $k_{off}=k_d$ (rychlostní konstanta disociace)

asociační fáze inkubace za předpokladu, že bylo použito více koncentrací radioligandu a akumulací křivka jeví zřetelné zakřivení. V případě metody KEX pro stanovení počtu zkoumaných receptorů využíváme z vypočtených dat pouze hodnotu B_{\max} .

Z dosažených výsledků můžeme odvodit, že KEX metoda je srovnatelně využitelnou technikou pro stanovení počtu receptorů jako je klasická saturační metoda a může tak sloužit jako efektivní nástroj v biologicky orientovaném výzkumu pro studium vazby ligandů na receptorové systémy. Mezi negativa této nové metody ovšem patří relativně vysoká pořizovací cena přístroje LigandTracer[®]. Na druhou stranu Bárta et al. (2011) ukázali, že časová náročnost a objem nezbytného spotřebního materiálu (zejména kultivační média a plast) je v případě KEX metody nižší o 60%, resp. o 90% ve srovnání s klasickou saturační technikou. Kinetická extrapolací metoda vyžaduje jen zlomek reagensů, buněk a pracovního času oproti manuální metodě. KEX metoda je samozřejmě univerzální a může být použita i pro stanovení exprese jiných receptorů než jen EGFR, např. somatostatinových (SST), cholecystokininových/gastrinových (CCK) a obecně řečeno všech těch, které se nacházejí na povrchu buňky a mají známý radioaktivně označitelný ligand.

Vzhledem k dosaženým výsledkům se použití KEX metody jeví jako přínosné. Mimo již zmiňované výhody metoda KEX ve srovnání s klasickou technikou snižuje radiační zátěž obsluhujícího personálu na minimum. Naproti tomu je nutné říci, že KEX metoda má i své limity. Díky využití rotující nakloněné Petriho misky je tato metoda vhodná pouze pro adherentní buněčné linie a fixované tkáně, ne pro suspenzní buňky. Buňky zamýšlené pro testy s využitím KEX metody musí být dostatečně pevně adherované na plastový povrch Petriho misky, aby vydržely rotační pohyb a neuvolnily se do media, což samozřejmě mimo všech suspenzních buněk vylučuje i některé slabě adherentní linie. Problém slabé adherence buněk by ovšem mohl být řešen použitím „coatingu“.⁴ Dalším potencionálním problémem může být odpařování kultivačního media při dlouhodobých studiích (řádově dny). V našem případě se inkubační časy pohybovaly do čtyř hodin, a jelikož správné fungování metody bylo již ověřováno až do inkubačního času 48 hodin (Björke et al. 2006a), nepovažujeme odpařování media v našem případě za významný problém.

V našich experimentech používaný přístroj LigandTracer[®] Yellow není konstruovaný specificky pouze pro detekci jódu-131, tento přístroj je schopen měřit

⁴ „coating“ – pokrytí povrchu kultivační misky např. kolagenem, želatinou, polylysinem nebo polyornitinem.

radioaktivitu i dalších gama zářičů s vyšší energií čili pro zamýšlené receptorové studie je možno použít i ligandy značené např. luteciem-177, indiem-111, techneciem-99m či jinými radionuklidy. Mimo tuto variatnu přístroje existují i další verze, které jsou schopny detekovat nízkoenergetické gama zářiče (např. ^{125}I), beta zářiče či fluorescenci (Dubois et al. 2013). Díky tomu lze pro metodu KEX použít i tyto zmiňované způsoby značení receptorových ligandů.

Pro úplnost je vhodné zmínit, že tři zde popisované metody pro kvantifikaci membránových receptorů nejsou kompletním výčtem dostupných metod. Další využitelnou možností, jak mapovat distribuci receptorů na buňkách, je například průtoková cytometrie s pomocí fluorescenčního značení (Tichauer et al. 2012).

Samotná modifikace protilátky bifunkčním chelátorem je jedнокroková chemická reakce a jako taková se může jevit jednoduše a bezproblémově. Ovšem při bližším pohledu se v této oblasti objevuje řada problematických bodů. Mezi prvními je to nemožnost zvýšit reakční teplotu nad 40 °C a to z důvodu hrozící denaturace modifikované protilátky. Proto většina prací uvádí reakční teplotu pro konjugaci chelátoru s protilátkou v rozmezí 4-37 °C (Brouwers et al. 2004, Cooper et al. 2012, Perk et al. 2005, Thakral et al. 2014). Díky této relativně nízké teplotě je nutno volit dlouhé reakční časy pro konjugaci, které se pohybují v širokém rozmezí od dvou do 24 hodin (Brouwers et al. 2004, Perk et al. 2005). Dalším důsledkem nízké reakční teploty a tím pádem i výtěžnosti je též nutnost použít značný molární přebytek chelátoru oproti protilátce. Do konjugační reakce obvykle vstupuje 50-100x větší látkové množství chelátoru než protilátky (Cooper et al. 2006, Lewis et al. 1994).

Výsledkem takového nastavení reakčních parametrů konjugačního kroku je ale mimo úspěšně modifikované protilátky také velké množství nenavázaného chelátoru v reakční směsi. Tohoto volného chelátoru je třeba se před vlastním radioizotopovým značením zcela zbavit, protože by s modifikovanou protilátkou velmi úspěšně kompetoval o vnesený radiokov, čímž by dramaticky snížil efektivitu značení. Resp. v případě, že by reakční směs po konjugaci nebyla vůbec přečištěna, pak by se během značení prakticky všechen radiokov vázal na volný chelátor, zatímco protilátka by zůstala v podstatě neoznačena. Tímto chceme zdůraznit význam přečištění protilátky po modifikaci jakožto jednoho z klíčových momentů celé metody. Většina prací uvádí v tomto bodě čištění směsi pomocí gelové filtrace (Lui et al. 2013) či preparativní HPLC (Schlesinger et al. 2008). My jsme zvolili metodu gelové filtrace s pomocí

Sephadexem G-25 plněné kolony PD-10 (GE Healthcare), která se pro tyto aplikace nejčastěji využívá.

Přestože na kolonu aplikovaný objem vzorku (1-1,5 ml) nepřesahoval maximální deklarovanou kapacitu kolony (2,5 ml), záhy se ukázalo, že přečištění reakční směsi po konjugaci na jedné koloně je naprosto nedostačující. Proto jsme zavedli systém sériového čištění na dvou a posléze i třech následných kolonách PD-10. Ilustrační eluční profily z čištění na třech po sobě jdoucích kolonách jsou uvedeny v kapitole 5.3. Teprve použití tří následných purifikačních kroků na gelových kolonách zajistilo dostatečnou čistotu roztoku protilátky pro značení s vysokou výtěžností.

Ovšem takovéto intenzivní přečišťování modifikované protilátky s sebou přináší několik negativních dopadů. A sice jednak zředění protilátky na koloně, ale především ztrátu modifikované protilátky vlivem adsorbce v koloně. Díky měření koncentrace protilátky Bradfordovou metodou po přečištění bylo možno vypočítat i její přesnou ztrátu na koloně. V případě použití dvou následných kolon se průměrná ztráta protilátky pohybovala okolo 60% původního množství, v případě tří kolon činila dokonce 75% a to navzdory předcházejícímu vysycení kolony roztokem hovězího sérového albuminu. Lze říci, že popsáný jev adsorbce v koloně je jedním z negativ této metody čištění, protože takto vysoká ztráta ligandu značně zvedá nároky na množství spotřebované protilátky, což může být v případě práce s malým výchozím množstvím protilátky limitující.

Při dobře modifikované a přečištěné protilátce nebývá značení radiokovy již tak obtížné. Samozřejmě je nutným předpokladem stále dodržovat maximální možnou čistotu celého procesu s ohledem na potencionální kontaminaci trojmocnými kovy (zejména Fe^{3+}). Označení protilátek modifikovaných chelátory NOTA a PCTA luteciem-177 poté probíhá poměrně rychle (60 minut), v případě chelátoru DOTA by bylo, z hlediska usnadnění komplexace, vhodné reakční směs zahřát na vyšší teplotu (Price a Orvig 2014). To je ovšem v případě monoklonálních protilátek vyloučeno z důvodu nebezpečí jejich denaturace, proto je nutno značně prodloužit reakční dobu (až 12 hodin) a teplotu zvýšit maximálně na 37 °C. Většina dostupné literatury (Cooper et al. 2006, Price a Orvig 2014) uvádí v případě chelatace za pomoci DOTA reakční dobu jen 1 hodinu, ovšem naše předběžné experimenty ukázaly, že to není optimální doba. Proto jsme nakonec protokol modifikovali na inkubaci po dobu 12 h.

Díky dostatečnému přečištění po modifikaci se při značení podařilo dosáhnout vysokých hodnot radiochemické čistoty (vždy přes 90%), což je základní podmínka pro správné provedení následných pokusů na buněčných liniích.

Druhou zásadní vlastností nutnou pro úspěšné testování v živých systémech je dostatečná stabilita označené protilátky. Tato byla ověřena jednak 24 hodin po označení a pak znovu i za 7 dní po přípravě. Vzhledem k tomu, že průměrný pokles radiochemické čistoty po 24 hodinách činil 0,1% a po 7 dnech 5%, lze říci, že stabilita námi připravených luteciem-177 značených protilátek je velmi vysoká a jsou tak vhodné pro biologické testování. Rozdíly ve stabilitě protilátek modifikovaných jednotlivými chelátory (DOTA vs. NOTA vs. PCTA) nebyly významné. Práce porovávající *in vitro/in vivo* stabilitu monoklonálních protilátek značených buď přímou jodací či chelatací radiokovu pomocí DOTA též ukazují na vysokou stabilitu protilátek s radiokovu a to vyšší než u jodovaných protilátek (Brouwers et al. 2004).

Radionuklid lutecium-177 díky emitovému záření, které má beta i gama složku, umožňuje mimo zobrazování cílových struktur též i terapeutické využití. V tomto směru byly již publikovány práce např. s protilátkou trastuzumabem, která je určena pro imunoterapii HER2 pozitivních nádorů prsu (Rasaneh et al. 2009, Rasaneh et al. 2010). Studované chelátory umožňují použít pro označení modifikovaných protilátek poměrně širokou paletu radionuklidů mimo popisovaného lutecia-177. DOTA je velice univerzální chelátor, který lze použít jak pro značení diagnostickými radionuklidy (např. ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{86}Y), tak i terapeutickými (^{90}Y , ^{213}Bi , ^{215}Pb , ^{225}Ac) (Price a Orvig 2014). NOTA je taktéž vhodným chelátorem zejména pro pozitronové zářiče ^{68}Ga a ^{64}Cu , ovšem lze jí chelatovat i $^{86/90}\text{Y}$, $^{212/213}\text{Bi}$ a ^{111}In (Price a Orvig 2014). V případě PCTA jsou velmi dobře chelatovatelné nuklidy ^{68}Ga a ^{64}Cu (Price a Orvig 2014).

V posledních letech se jeví jako velmi zajímavé využití právě pozitronových zářičů v kombinaci s monoklonálními protilátkami pro diagnostické použití *in vivo* pomocí pozitronové emisní tomografie (PET). V této aplikaci se námi použité chelátory resp. modifikované protilátky mohly využít v kombinaci s PET nuklidy jako ^{86}Y (Nayak et al. 2010, Pecking et al. 2012) či ^{64}Cu (Niu et al. 2010). Gallium-68 je sice díky komerčně vyráběnému generátoru Ge/Ga poměrně dobře dostupný PET nuklid, ovšem díky svému poločasu přeměny (68 min) není vhodný pro spojení s monoklonálními protilátkami. Pro úplnost je třeba zmínit, že PET nuklid ^{89}Zr je též užíván pro značení monoklonálních protilátek, ovšem pouze za využití specifického chelátoru desferrioxaminu (DFO) (van de Watering et al. 2014). Pro značení monoklonálních

protilátka je též vhodný pozitronový zářič jódu-124, který se ale váže na protilátku přímou jodací, tedy ne pomocí chelátoru (Poli et al. 2013).

Pro nukleární medicínu obecně nejvýznamější pozitronový zářič fluór-18 se ke značení monoklonálních protilátek nevyužívá a to pro jeho krátký poločas přeměny (110 min), který není v souladu s biologickým poločasem intaktních protilátek (desítky hodin). Ovšem u derivátů protilátek již své uplatnění má. Například v případě tzv. „affibodies“, které mají významně kratší biologický poločas než vlastní protilátky, lze značení fluorem-18 aplikovat (Kramer-Marek et al. 2008, Namavari et al. 2008).

Mimo radioizotopového značení lze protilátky vizualizovat i pomocí fluorescenčních značek a to jak *in vitro* (Gong et al. 2014), tak *in vivo* (Metildi et al. 2013). Dokonce existuje i duálně značená monoklonální protilátka, tj. zároveň fluorescenčně i radioizotopově (Lütje et al. 2014). Žádná fluorescenční metoda značení a detekce protilátek *in vivo* se ovšem zatím nedostala do klinické praxe.

Chelátorem modifikované a luteciem-177 označené protilátky byly po úspěšném testování radiochemických parametrů podrobeny následnému biologickému testování vazebnosti a to na třech vybraných buněčných liniích exprimující různá množství cílového antigenu, tj. receptoru pro epidermální růstový faktor. Mimo zjištění samotné vazebnosti značených protilátek bylo cílem studie i porovnat vliv zvoleného chelátoru na tuto vazebnost.

Vazebnost vyjádřená jako podíl navázané frakce k aplikované dávce se pohybovala u zvolených buněčných linií v rozmezí 8%-43% v závislosti na použitém ligandu a linii. Pro vyloučení nespecifické vazby byly provedeny experimenty s preinkubací buněk s nadbytkem neznačené parentní protilátky. U preinkubovaných buněk došlo k dramatickému poklesu následné vazby radioligandu a to přibližně na 1,1 - 2,4% podané dávky a to u všech studovaných kombinací chelátor-protilátka-buněčná linie.

Statistická analýza ukázala, že vždy v rámci dané linie (A431, HaCaT a HepG2) a protilátky (cetuximab či panitumumab) není signifikantní rozdíl v akumulaci radioligandu s různým chelátorem (DOTA, NOTA, PCTA) a to s jedinou výjimkou. ^{177}Lu -DOTA-panitumumab jevil signifikantně nižší akumulaci v linii A431 než ^{177}Lu -PCTA-panitumumab ($p=0,0125$).

Lze tedy říci, že jsme nepozorovali signifikantní vliv typu chelátoru na vazebnost značené protilátky *in vitro*, což by naznačovalo, že typ zvoleného chelátoru skutečně nemá vliv na vazebnost dané protilátky. Tento nálezný není v rozporu s údaji

publikovanými jinými autory. Vera et al. (2012), zkoumali vazbu luteciem-177 značeného nimotuzumabu na receptor pro epidermální růstový faktor a to v modifikaci s chelátorem DOTA a DTPA. Tyto experimenty studující akumulaci těchto radioligandů na myším modelu (tumorech tvořených buněčnou linií A431) ukázaly, že vazebnost těchto dvou derivátů nimotuzumabu se signifikantně neliší. Podobné zjištění bylo publikováno též pro protilátky DOTA-trastuzumab, oxo-DO3A-trastuzumab a PCTA-trastuzumab značené mědí-64. Tyto tři protilátky vykazovaly podobnou vazebnost na čtyřech buněčných liniích exprimujících různé úrovně receptoru HER2/neu (Ferreira et al. 2010). Samozřejmě, že podobná vazebnost na cílový receptor a vysoká stabilita radioligandů ještě nemusí nutně znamenat, že jejich chování v organismu bude podobně shodné jako *in vitro*. Použitý chelátor může *in vivo* ovlivnit významné biologické parametry značené protilátky, jako jsou biodistribuce a eliminace, což může vyústit v podstatné rozdíly v radiační zátěži různých orgánů. Dokumentovat to lze např. na studii mědí-64 značené protilátky ch14.18, která ukázala, že použitý chelátor významně změnil biodistribuci (Dearling et al. 2011).

Závěrem můžeme říct, že vazebný podíl zkoumaných protilátek odpovídá množství exprimovaných EGFR receptorů, které bylo zjištěno pomocí manuální saturační techniky a KEX metody v předešlých experimentech. To znamená, že relativně vysoká vazebnost byla pozorována u buněčných linií bohatých na EGFR. Rozdíl mezi vazbou na linií A431 a HaCaT též odpovídá rozdílu v expresi EGFR u těchto dvou linií, zatímco HepG2, tj. buněčná linie s nejnižší expresí tohoto receptoru vykazuje nejnižší vazebnost zkoumaných protilátek. Rozdíly ve vazebnosti protilátek na zkoumané buněčné linie dokazují správnou funkci těchto buněk ve smyslu exprese odpovídajícího počtu EGFR receptorů. Preinkubace s neznačenou protilátkou téměř zcela blokovala vazbu značené, což je též v souladu s dříve publikovanou prací (Ferreira et al. 2010). Toto zjištění potvrzuje zachování vazebné specifity připravených protilátek k EGFR receptorům.

Experimentální data prezentovaná v této práci mohou přispět k dalšímu vývoji v oblasti radioaktivně značených protilátek. Studované značené protilátky prokázaly jak vhodné radiochemické parametry, tak i nadějně biologické chování *in vitro*. Vysoká biologická stabilita komplexů lutecium-chelátor je v souladu s publikovanými údaji (Kam et al. 2012, Ju et al. 2010). Dobrý potenciál značeného cetuximabu jakožto diagnostického agens naznačuje preklinická práce, zkoumající biodistribuci této protilátky na myších nesoucích nádory tvořené buňkami A431 (Perk et al. 2005). Nově

publikované experimentální práce v této oblasti (např. Ingargiola et al. 2014, Liu et al. 2014) naznačují, že preklinické studie by mohly v budoucnosti potenciálně vyústit v další postup směrem ke klinickému užití studovaných protilátek.

7 Závěr

Tato disertační práce v teoretické části předkládá přehled v současné době využívaných cílených radiofarmak, do kterých se řadí i významná skupina radioizotopově značených monoklonálních protilátek. Využití specificky cílených monoklonálních protilátek ve spojení s radionuklidy – radioimunodiagnostika/radioimunoterapie – je v posledních letech poměrně intenzivně studovanou oblastí nukleární medicíny. V navazující části teoretické sekce disertační práce jsou podrobně popisovány monoklonální protilátky a to jak z pohledu jejich struktury a původu, tak zejména s ohledem na jejich využití v oboru nukleární medicíny, tj. jsou probírány způsoby zapojení různých radionuklidů do struktury protilátky, volba vhodného radionuklidu v závislosti na jeho využití, klinické aplikace takto modifikovaných protilátek v radioimunodiagnostice a radioimunoterapii. Závěrečný oddíl teoretické části práce se zabývá popisem receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), který představuje cílovou strukturu ve studiích popisovaných v experimentální části práce. Nedílnou součástí teoretické sekce disertační práce je též popis klinicky používaných monoklonálních protilátek, které terapeuticky cílí právě na receptor EGFR a jsou též využívány jako jeho ligandy v experimentální části této práce. Cílem této disertační práce bylo zavést na pracovišti metodiku pro značení monoklonálních protilátek izotopem jódu (^{131}I) s dostatečnou efektivitou a radiochemickou čistotou. S pomocí takto označených protilátek stanovit míru exprese receptoru pro epidermální růstový faktor u čtyř zvolených buněčných linií (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2) pomocí dvou různých metod se dvěma různými ligandy a porovnat tyto metody. Dalším cílem bylo modifikovat monoklonální protilátky cetuximab a panitumumab pomocí tří různých bifunkčních chelátorů, takto modifikované protilátky označit luteciem-177 v dostatečné radiochemické čistotě a následně ověřit vazebnost označených protilátek na v předcházejícím kroku ověřených buněčných liniích *in vitro*. V této souvislosti byl dále posouzen vliv typu použitého chelátoru na tuto vazebnost. Takto modifikované protilátky by mohly v budoucnu sloužit pro diagnostiku a terapii karcinomů se zvýšenou expresí receptoru EGFR.

První část oddílu výsledků uvádí, s jakou úspěšností se podařilo značení protilátek cetuximabu a panitimumabu jódem-131. Konkrétně dosahovalo výtěžnosti 90% resp. 52% a po přečistění se radiochemická čistota preparátů pohybovala v rozmezí 97-98%. Testování stability označených protilátek ukázalo, že pokles radiochemické

čistoty po 24 hodinách je v řádu jednotek procent. Takto označené protilátky byly využity při experimentech zaměřených na stanovení exprese receptoru EGFR, jakožto významného terapeutického cíle protinádorové léčby. Stanovení bylo prováděno, jak pomocí klasické manuální saturační techniky, tak pomocí nového poloautomatizovaného přístupu tzv. kinetické extrapolační metody (KEX) s využitím unikátního přístroje LigandTracer[®] Yellow. Obě zmiňované metody vykazovaly výsledky ve vzájemné shodě. Lze tedy říci, že nová KEX metoda je metodou ekvivalentní ke klasické saturační technice a lze ji v této aplikaci s úspěchem využít. Celkově lze dle míry exprese stanovovaného receptoru studované linie seřadit takto: A431 > HaCaT > HCT116 \approx HepG2. Tyto výsledky byly dále korelovány s expresí EGFR, které byly získány pomocí metody western blot. S výjimkou linie A431 nebyly tyto hodnoty exprese receptorů EGFR u zkoumaných linií v literatuře dosud popsány.

V další části práce jsme se zaměřili na modifikaci monoklonálních protilátek cetuximabu a panitumumabu bifunkčními chelátory DOTA, NOTA a PCTA, a na jejich značení luteciem-177. U těchto protilátek byla dosažena vysoká radiochemická čistota. Stabilita těchto preparátů byla velmi vysoká, pokles radiochemické čistoty po 24 hodinách byl velmi nízký. Experimenty zjišťující vazebnost těchto protilátek na buněčných liniích s ověřenou expresí EGFR ukázaly relativně vysokou míru specifity vazby protilátek, neboť po preinkubaci s nadbytkem neznačené protilátky tento vazebný podíl klesl na minimální hodnoty. Podíl navázané protilátky navázané protilátky byl ve shodě s mírou exprese cílového EGFR receptoru zjištěného v předešlé části práce. Při vyhodnocování vlivu chelátoru na vazbu protilátek nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl v jejich vazbě na použité buňky a lze tedy konstatovat, že typ použitého chelátoru nemá významný vliv na vazebnost modifikované protilátky *in vitro*. Tato práce může být východiskem pro další preklinické studie zaměřené na ověřování farmakologických vlastností radioaktivně značených protilátek *in vivo*.

8 Seznam použité literatury

Adams GP, Schier R, McCall AM, Crawford RS, Wolf EJ, Weiner LM, Marks JD. Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *Br J Cancer* 1998;77(9):1405-12.

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979;282(5739):615-6.

Agero AL, Dusza SW, Benvenuto-Andrade C, Busam KJ, Myskowski P, Halpern AC. Dermatologic side effects associated with the epidermal growth factor receptor inhibitors. *J Am Acad Dermatol* 2006;55(4):657-70.

Agulnik M. New approaches to EGFR inhibition for locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Med Oncol* 2012;29(4):2481-91.

Alston-Roberts C, Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kerrigan L, Kline MC, Kohara A, Los GV, MacLeod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Steuer AF, Storts DR, Sykes G, Taraporewala Z, Thomson J. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer* 2010;10(6):441-8.

Ambrosini V, Campana D, Tomassetti P, Grassetto G, Rubello D, Fanti S. PET/CT with 68Gallium-DOTA-peptides in NET: an overview. *Eur J Radiol* 2011;80(2):e116-9. (a)

Ambrosini V, Fani M, Fanti S, Forrer F, Maecke HR. Radiopeptide imaging and therapy in Europe. *J Nucl Med* 2011;52 Suppl 2:42S-55S. (b)

Andemariam B, Leonard JP. Radioimmunotherapy with tositumomab and iodine-131 tositumomab for non-Hodgkin's lymphoma. *Biologics* 2007;1(2):113-20.

Andersson K. Quantify biomolecular interactions in real-time using LigandTracer. In: Ridgeview Instruments AB. 2014. Dostupné na URL: <http://www.ridgeviewinstruments.com/download/>. Přístup 10. 7. 2014.

Arnold D, Seufferlein T. Targeted treatments in colorectal cancer: state of the art and future perspectives. *Gut* 2010;59(6):838-58.

Barta P, Björkelund H, Andersson K. Circumventing the requirement of binding saturation for receptor quantification using interaction kinetic extrapolation. *Nucl Med Commun* 2011;32(9):863-7.

Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S16-22.

Bello DM, Ariyan CE, Carvajal RD. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer Control* 2013;20(4):261-81.

Belt JA, Marina NM, Phelps DA, Crawford CR. Nucleoside transport in normal and neoplastic cells. *Adv Enzyme Regul* 1993;33:235-52.

Bessman NJ, Lemmon MA. Finding the missing links in EGFR. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19:1-3.

Blanco R, Cedeño M, González N, Rodríguez R, Sánchez J, Rengifo E. Phenotypic heterogeneity in the NCI-H125 cell line affects biological activity using the epidermal growth factor receptor as target. *Acta Pharm* 2012;62(4):581-91.

Bleeker WK, Lammerts van Bueren JJ, van Ojik HH, Gerritsen AF, Pluyter M, Houtkamp M, Halk E, Goldstein J, Schuurman J, van Dijk MA, van de Winkel JG, Parren PW. Dual mode of action of a human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy. *J Immunol* 2004;173(7):4699-707.

Bird RE, Walker BW. Single chain antibody variable regions. *Trends Biotechnol* 1991;9(4):132-7.

Bison SM, Konijnenberg MW, Melis M, Pool SE, Bernsen MR, Teunissen JJ, Kwekkeboom DJ, de Jong M. Peptide receptor radionuclide therapy using radiolabeled somatostatin analogs: focus on future developments. *Clin Transl Imaging* 2014;2:55-66.

Björke H, Andersson K. Automated, high-resolution cellular retention and uptake studies in vitro. *Appl Radiat Isot* 2006;64(8):901-5. (a)

Björke H, Andersson K. Measuring the affinity of a radioligand with its receptor using a rotating cell dish with in situ reference area. *Appl Radiat Isot* 2006 Jan;64(1):32-7. (b)

Bodet-Milin C, Ferrer L, Pallardy A, Eugène T, Rauscher A, Alain Faivre-Chauvet, Barbet J, Kraeber-Bodéré F. Radioimmunotherapy of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Front Oncol* 2013;3:177.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988;106(3):761-71.

Bouzid K, Bedairia N, Marty M. Therapeutic monoclonal antibodies in oncology. *Pathol Biol (Paris)* 2012;60(4):223-8.

Bowles M, Johnston SC, Schoof DD, Pentel PR, Pond SM. Large scale production and purification of paraquat and desipramine monoclonal antibodies and their Fab fragments. *Int J Immunopharmacol* 1988;10(5):537-45.

Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med* 2011;12(66):419-32.

Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 1981;41(5):1751-6.

Breeman WA, van der Wansem K, Bernard BF, van Gameren A, Erion JL, Visser TJ, Krenning EP, de Jong M. The addition of DTPA to [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate prior to administration reduces rat skeleton uptake of radioactivity. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30(2):312-5.

Brouwers AH, van Eerd JE, Frielink C, Oosterwijk E, Oyen WJ, Corstens FH, Boerman OC. Optimization of radioimmunotherapy of renal cell carcinoma: labeling of monoclonal antibody cG250 with 131I, 90Y, 177Lu, or 186Re. *J Nucl Med* 2004;45(2):327-37.

Brunton LL. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th edition. New York(USA):McGraw-Hill Professional, 2011:2084. ISBN: 0071624422.

Burger AM, Heiss NS, Kreysch H, et al. The humanized monoclonal anti-EGFR antibody EMD72000 potently inhibits the growth of EGFR-expressing human tumor

xenografts insensitive to chemotherapeutic drugs. Proc Am Assoc Cancer Res 44:1139, 2003 (abstr 5719).

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. Annu Rev Biochem 1979;48:193-216.

Castellucci P, Jadvar H. PET/CT in prostate cancer: non-choline radiopharmaceuticals. Q J Nucl Med Mol Imaging 2012;56(4):367-74.

Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res 2001;7(10):2958-70.

Cohen RB. Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Cancer Treat Rev 2014;40(4):567-77.

Cooper MS, Sabbah E, Mather SJ. Conjugation of chelating agents to proteins and radiolabeling with trivalent metallic isotopes. Nat Protoc 2006;1(1):314-7.

Cooper MS, Ma MT, Sunassee K, Shaw KP, Williams JD, Paul RL, Donnelly PS, Blower PJ. Comparison of (64)Cu-complexing bifunctional chelators for radioimmunoconjugation: labeling efficiency, specific activity, and in vitro/in vivo stability. Bioconjug Chem 2012;23(5):1029-39.

Couturier O, Leost F, Campone M, Carlier T, Chatal JF, Hustinx R. [Is 3'-deoxy-3'-[18F] fluorothymidine ([18F]-FLT) the next tracer for routine clinical PET after R [18F]-FDG?]. Bull Cancer 2005;92(9):789-98. (a)

Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, Davodeau F, Cherel M. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2005;32(5):601-14. (b)

Cox JL, Craig AS, Helps IM, Jankowski KJ, Parker D, Eaton MAW, Millican AT, Millar K, Beeley NRA, Boyce BA. Synthesis of C- and N-functionalized derivatives of 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (NOTA), 1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-1,4,7,10-tetra-yltetra-acetic acid (DOTA), and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA): bifunctional complexing agents for the derivatization of antibodies. J Chem Soc 1990, 2567-2576

Cuperlovic-Culf M, Culf AS, Touaibia M, Lefort N. Targeting the latest hallmark of cancer: another attempt at 'magic bullet' drugs targeting cancers' metabolic phenotype. *Future Oncol* 2012; 8(10):1315-30.

Dearling JL, Voss SD, Dunning P, Snay E, Fahey F, Smith SV, Huston JS, Meares CF, Treves ST, Packard AB. Imaging cancer using PET--the effect of the bifunctional chelator on the biodistribution of a (64)Cu-labeled antibody. *Nucl Med Biol* 2011;38(1):29-38.

Decristoforo C, Pickett RD, Verbruggen A. Feasibility and availability of 68Ga-labelled peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012;39 Suppl 1:S31-40.

DeGrado TR, Baldwin SW, Wang S, Orr MD, Liao RP, Friedman HS, Reiman R, Price DT, Coleman RE. Synthesis and evaluation of (18)F-labeled choline analogs as oncologic PET tracers. *J Nucl Med* 2001;42(12):1805-14.

Dong C, Liu Z, Wang F. Peptide-based radiopharmaceuticals for targeted tumor therapy. *Curr Med Chem* 2014;21(1):139-52.

Dubois L, Andersson K, Asplund A, Björkelund H. Evaluating real-time immunohistochemistry on multiple tissue samples, multiple targets and multiple antibody labeling methods. *BMC Res Notes* 2013;6:542.

Erac Y, Selli C, Filik P, Tosun M. Effects of passage number on proliferation and store-operated calcium entry in A7r5 vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2014;70(1):1-5.

Ferreira CL, Lamsa E, Woods M, Duan Y, Fernando P, Bensimon C, Kordos M, Guenther K, Jurek P, Kiefer GE. Evaluation of bifunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* 2010;21(3):531-6.

Fracasso PM, Burris H 3rd, Arquette MA, Govindan R, Gao F, Wright LP, Goodner SA, Greco FA, Jones SF, Willcut N, Chodkiewicz C, Pathak A, Springett GM, Simon GR, Sullivan DM, Marcelpoil R, Mayfield SD, Mauro D, Garrett CR. A phase 1 escalating single-dose and weekly fixed-dose study of cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing. *Clin Cancer Res* 2007;13(3):986-93.

Gedda L, Björkelund H, Andersson K. Real-time immunohistochemistry analysis of embedded tissue. *Appl Radiat Isot* 2010;68(12):2372-6.

Gemmete JJ, Mukherji SK. Panitumumab (Vectibix). *AJNR Am J Neuroradiol* 2011;32(6):1002-3.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51(5):1417-23.

Goldenberg DM, Sharkey RM, Paganelli G, Barbet J, Chatal JF. Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J Clin Oncol* 2006;24(5):823-34.

Gong H, Kovar JL, Cheung L, Rosenthal EL, Olive DM. A comparative study of affibody, panitumumab, and EGF for near-infrared fluorescence imaging of EGFR- and EGFRvIII-expressing tumors. *Cancer Biol Ther* 2014;15(2):185-93.

Götz I, Grosu AL. [(18)F]FET-PET Imaging for Treatment and Response Monitoring of Radiation Therapy in Malignant Glioma Patients - A Review. *Front Oncol*. 2013;25(3):104.

Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y, David NE, Sasai H, Garza D, Brenner DG, Hales JF, McGuinness RP, Capon DJ, Klapholz S, Jakobovits A. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 1994;7(1):13-21.

Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The Preparation of I-131-labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem J* 1963;89:114-23.

Grierson JR, Shields AF. Radiosynthesis of 3'-deoxy-3'-[(18)F]fluorothymidine: [(18)F]FLT for imaging of cellular proliferation in vivo. *Nucl Med Biol* 2000;27(2):143-56.

Grosu AL, Astner ST, Riedel E, Nieder C, Wiedenmann N, Heinemann F, Schwaiger M, Molls M, Wester HJ, Weber WA. An interindividual comparison of O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET)- and L-[methyl-11C]methionine (MET)-PET in

patients with brain gliomas and metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;81(4):1049-58.

Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993;363(6428):446-8.

Hara T, Bansal A, DeGrado TR. Choline transporter as a novel target for molecular imaging of cancer. *Mol Imaging* 2006;5(4):498-509.

Hara T, Kosaka N, Kishi H. Development of (18)F-fluoroethylcholine for cancer imaging with PET: synthesis, biochemistry, and prostate cancer imaging. *J Nucl Med* 2002;43(2):187-99.

Heiss P, Mayer S, Herz M, Wester HJ, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Investigation of transport mechanism and uptake kinetics of O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine in vitro and in vivo. *J Nucl Med* 1999;40(8):1367-73.

Hoag JB, Azizi A, Doherty TJ, Lu J, Willis RE, Lund ME. Association of cetuximab with adverse pulmonary events in cancer patients: a comprehensive review. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:113.

Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(14):6444-8.

Hong H, Sun J, Cai W. Radionuclide-Based Cancer Imaging Targeting the Carcinoembryonic Antigen. *Biomark Insights* 2008;3:435-451.

Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, Shively JE, Wu AM. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res* 1996;56(13):3055-61.

Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques* 2007;43(5):575, 577-8, 581-2 passim.

Hulme EC, Trevethick MA. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br J Pharmacol* 2010;161(6):1219-37.

Chamarthy MR, Williams SC, Moadel RM. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: from the 'magic bullets' to 'radioactive magic bullets'. *Yale J Biol Med* 2011;84(4):391-407.

Chi A, Remick S, Tse W. EGFR inhibition in non-small cell lung cancer: current evidence and future directions. *Biomark Res* 2013;1(1):2.

Inazu M. Choline transporter-like proteins CTLs/SLC44 family as a novel molecular target for cancer therapy. *Biopharm Drug Dispos* 2014. doi: 10.1002/bdd.1892.

Ingargiola M, Runge R, Heldt JM, Freudenberg R, Steinbach J, Cordes N, Baumann M, Kotzerke J, Brockhoff G, Kunz-Schughart LA. Potential of a Cetuximab-based radioimmunotherapy combined with external irradiation manifests in a 3-D cell assay. *Int J Cancer* 2014;135(4):968-80.

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986;321(6069):522-5.

Ju CH, Jeong JM, Lee YS, Kim YJ, Lee BC, Lee DS, Chung JK, Lee MC, Jeong SY. Development of a ¹⁷⁷Lu-labeled RGD derivative for targeting angiogenesis. *Cancer Biother Radiopharm* 2010;25(6):687-91.

Kam BL, Teunissen JJ, Krenning EP, de Herder WW, Khan S, van Vliet EI, Kwekkeboom DJ. Lutetium-labelled peptides for therapy of neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012;39 Suppl 1:S103-12.

Kassis AI. Therapeutic radionuclides: biophysical and radiobiologic principles. *Semin Nucl Med* 2008;38(5):358-66.

Kaur S, Venktaraman G, Jain M, Senapati S, Garg PK, Batra SK. Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Lett* 2012;315(2):97-111.

Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, Mendelsohn J. Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(5):1337-41.

Kim WD, Kiefer GE, Maton F, McMillan K, Muller RN, Sherry AD. Relaxometry, Luminescence Measurement, Electrophoresis, and Animal Biodistribution of Lanthanide(III) Complexes of Some Polyaza Macrocyclic Acetates Containing Pyridine. *Inorg Chem* 1995;34(8):2233–2243.

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

Koide A, Koide S. Monobodies: antibody mimics based on the scaffold of the fibronectin type III domain. *Methods Mol Biol* 2007;352:95-109.

Kollmannsberger C, Schittenhelm M, Honecker F, Tillner J, Weber D, Oechsle K, Kanz L, Bokemeyer C. A phase I study of the humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody EMD 72000 (matuzumab) in combination with paclitaxel in patients with EGFR-positive advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* 2006;17(6):1007-13.

Kowalsky RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. 3d edition. Washington (USA): American Pharmacists Association, 2011:741. ISBN: 1582121184.

Kramer-Marek G, Kiesewetter DO, Martiniova L, Jagoda E, Lee SB, Capala J. [18F]FBEM-Z(HER2:342)-Affibody molecule-a new molecular tracer for in vivo monitoring of HER2 expression by positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35(5):1008-18.

Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, van Hagen PM, van Eijck CH, Oei HY, Lamberts SW. 111In-octreotide scintigraphy in oncology. *Digestion* 1993;54 Suppl 1:84-7.

Kwee SA, DeGrado TR, Talbot JN, Gutman F, Coel MN. Cancer imaging with fluorine-18-labeled choline derivatives. *Semin Nucl Med* 2007;37(6):420-8.

Laffly E, Sodoyer R. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after ... *Hum Antibodies* 2005;14(1-2):33-55.

Lázníček M, Komárek P. Základy radiofarmacie. 1. vydání. Praha: Karolinum,1998:106. ISBN: 80-7184-781-X.

Lewis MR, Raubitschek A, Shively JE. A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjug Chem* 1994;5(6):565-76.

Liu S, Edwards DS. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* 2001;12(1):7-34.

Liu S, Li D, Park R, Liu R, Xia Z, Guo J, Krasnoperov V, Gill PS, Li Z, Shan H, Conti PS. PET imaging of colorectal and breast cancer by targeting EphB4 receptor with ⁶⁴Cu-labeled hAb47 and hAb131 antibodies. *J Nucl Med* 2013;54(7):1094-100.

Liu Z, Ma T, Liu H, Jin Z, Sun X, Zhao H, Shi J, Jia B, Li F, Wang F. ¹⁷⁷Lu-Labeled Antibodies for EGFR-Targeted SPECT/CT Imaging and Radioimmunotherapy in a Preclinical Head and Neck Carcinoma Model. *Mol Pharm* 2014.

Lockman PR, Allen DD. The transport of choline. *Drug Dev Ind Pharm* 2002;28(7):749-71.

Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Tronstine M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG, et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994;368(6474):856-9.

Lonberg N, Huszar D. Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol* 1995;13(1):65-93.

Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 2005;23(9):1117-25.

Lu D, Jimenez X, Witte L, Zhu Z. The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant human bispecific diabody. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318(2):507-13.

Lütje S, Rijpkema M, Franssen GM, Fracasso G, Helfrich W, Eek A, Oyen WJ, Colombatti M, Boerman OC. Dual-Modality Image-Guided Surgery of Prostate Cancer with a Radiolabeled Fluorescent Anti-PSMA Monoclonal Antibody. *J Nucl Med* 2014;55(6):995-1001.

Martell A, Motekaitis RJ, Clarke ET, Delgado R, Sun Y, Ma R. Stability constants of metal complexes of macrocyclic ligands with pendant donor groups. *Supramol Chem* 1996;3-4(6):353-363.

Mateo C, Moreno E, Amour K, Lombardero J, Harris W, Pérez R. Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology* 1997;3(1):71-81.

McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348(6301):552-4.

Metildi CA, Tang CM, Kaushal S, Leonard SY, Magistri P, Tran Cao HS, Hoffman RM, Bouvet M, Sicklick JK. In vivo fluorescence imaging of gastrointestinal stromal tumors using fluorophore-conjugated anti-KIT antibody. *Ann Surg Oncol* 2013;20 Suppl 3:S693-700.

Michel RB, Castillo ME, Andrews PM, Mattes MJ. In vitro toxicity of A-431 carcinoma cells with antibodies to epidermal growth factor receptor and epithelial glycoprotein-1 conjugated to radionuclides emitting low-energy electrons. *Clin Cancer Res* 2004;10(17):5957-66.

Mirick GR, Bradt BM, Denardo SJ, Denardo GL. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2004;48(4):251-7.

Miyake K, Shinomiya A, Okada M, Hatakeyama T, Kawai N, Tamiya T. Usefulness of FDG, MET and FLT-PET studies for the management of human gliomas. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:205818. doi: 10.1155/2012/205818.

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(21):6851-5.

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

Müller WA, Linzner U, Schäffer EH. Organ distribution studies of lutetium-177 in mouse. *Int J Nucl Med Biol* 1978;5:29-31.

Nakajima H, Kiyokawa N, Katagiri YU, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Mimori K, Ebata T, Saito M, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* 2001;276(46):42915-22.

Namavari M, Padilla De Jesus O, Cheng Z, De A, Kovacs E, Levi J, Zhang R, Hoerner JK, Grade H, Syud FA, Gambhir SS. Direct site-specific radiolabeling of an Affibody protein with 4-[18F]fluorobenzaldehyde via oxime chemistry. *Mol Imaging Biol* 2008;10(4):177-81.

Navarro-Teulon I, Lozza C, Pèlerin A, Vivès E, Pouget JP. General overview of radioimmunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy* 2013;5(5):467-87.

Nayak TK, Garmestani K, Baidoo KE, Milenic DE, Brechbiel MW. Preparation, biological evaluation, and pharmacokinetics of the human anti-HER1 monoclonal antibody panitumumab labeled with ⁸⁶Y for quantitative PET of carcinoma. *J Nucl Med* 2010;51(6):942-50.

Nestor M, Andersson K, Lundqvist H. Characterization of ¹¹¹In and ¹⁷⁷Lu-labeled antibodies binding to CD44v6 using a novel automated radioimmunoassay. *J Mol Recognit* 2008;21(3):179-83.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S9-15.

Niu G, Sun X, Cao Q, Courter D, Koong A, Le QT, Gambhir SS, Chen X. Cetuximab-based immunotherapy and radioimmunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16(7):2095-105.

Olafsen T, Wu AM. Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* 2010;40(3):167-81.

Oliveira S, Heukers R, Sornkom J, Kok RJ, van Bergen En Henegouwen PM. Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy. *J Control Release* 2013;172(3):607-17.

Orlova A, Magnusson M, Eriksson TL, Nilsson M, Larsson B, Höidén-Guthenberg I, Widström C, Carlsson J, Tolmachev V, Ståhl S, Nilsson FY. Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule. *Cancer Res* 2006;66(8):4339-48.

Pecking AP, Bellet D, Alberini JL. Immuno-SPET/CT and immuno-PET/CT: a step ahead to translational imaging. *Clin Exp Metastasis* 2012;29(7):847-52.

Peipp M, Dechant M, Valerius T. Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Curr Opin Immunol* 2008;20(4):436-43.

Perk LR, Visser GW, Vosjan MJ, Stigter-van Walsum M, Tjink BM, Leemans CR, van Dongen GA. (89)Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals (90)Y and (177)Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med* 2005;46(11):1898-906.

Poli GL, Bianchi C, Virota G, Bettini A, Moretti R, Trachsel E, Elia G, Giovannoni L, Neri D, Bruno A. Radretumab radioimmunotherapy in patients with brain metastasis: a 124I-L19SIP dosimetric PET study. *Cancer Immunol Res* 2013;1(2):134-43.

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

Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Daha FJ, Salouti M. Radiolabeling of trastuzumab with 177Lu via DOTA, a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl Med Biol* 2009;36(4):363-9.

Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Daha FJ. 177Lu labeling of Herceptin and preclinical validation as a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl Med Biol* 2010;37(8):949-55.

Reilly M. *Monoclonal Antibody and Peptide-Targeted Radiotherapy of Cancer*. 1st edition. New York (USA): John Wiley and sons, 2010:624. ISBN: 0470243724.

Reubi JC, Mäcke HR, Krenning EP. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med* 2005;46 Suppl 1:67S-75S.

Reubi JC, Schaer JC, Waser B. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res* 1997;57(7):1377-86.

Richter WS, Ivancevic V, Meller J, Lang O, Le Guludec D, Szilvazi I, Amthauer H, Chossat F, Dahmane A, Schwenke C, Signore A. ^{99m}Tc-besilesomab (Scintimun) in peripheral osteomyelitis: comparison with ^{99m}Tc-labelled white blood cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38(5):899-910.

Rivera F, Vega-Villegas ME, Lopez-Brea MF, Marquez R. Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. *Acta Oncol* 2008;47(1):9-19.

Rowinsky EK. The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med* 2004;55:433-57.

Serengulam VG, Goldenberg DM. New antibody conjugates in cancer therapy. *Scientific World Journal* 2010;10:2070-2089.

Schlesinger J, Koezle I, Bergmann R, Tamburini S, Bolzati C, Tisato F, Noll B, Klussmann S, Vonhoff S, Wuest F, Pietzsch HJ, Steinbach J. An ⁸⁶Y-labeled mirror-image oligonucleotide: influence of Y-DOTA isomers on the biodistribution in rats. *Bioconjug Chem* 2008;19(4):928-39.

Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, Beyer T, Lohse S, Bleeker WK, Peipp M, Parren PW, van de Winkel JG, Valerius T, Dechant M. Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol* 2010;184(1):512-20.

Skehan SJ, White JF, Evans JW, Parry-Jones DR, Solanki CK, Ballinger JR, Chilvers ER, Peters AM. Mechanism of accumulation of ^{99m}Tc-sulesomab in inflammation. *J Nucl Med* 2003;44(1):11-8.

Stetter H, Frank W. Complex formation with tetraazacycloalkane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acids as a function of ring size. *Angew Chem Int Ed Engl* 1976;15:686-686.

Thakral P, Singla S, Yadav MP, Vasisht A, Sharma A, Gupta SK, Bal CS, Snehlata, Malhotra A. An approach for conjugation of (¹⁷⁷Lu)-DOTA-SCN- Rituximab (BioSim) & its evaluation for radioimmunotherapy of relapsed & refractory B-cell non Hodgkins lymphoma patients. *Indian J Med Res* 2014;139(4):544-54.

Theobald T. Sampson's textbook of radiopharmacy. 4th edition. London (UK): Pharmaceutical Press, 2011:725. ISBN: 9780853697893.

Thomson JF. Austin Peay State University. In: *Human Anatomy and Physiology Exam Reviews*. 2014. Dostupné na URL: http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/Anatomy%20&%20Physiology/2020/2020%20Exam%20Reviews/Exam%202/CH21%20antibody_structure-giant-diagram.htm. Přístup 9. 7. 2014.

Tichauer KM, Samkoe KS, Sexton KJ, Hextrum SK, Yang HH, Klubben WS, Gunn JR, Hasan T, Pogue BW. In vivo quantification of tumor receptor binding potential with dual-reporter molecular imaging. *Mol Imaging Biol* 2012;14(5):584-92.

Tircsó G, Kovács Z, Sherry AD. Equilibrium and Formation/Dissociation Kinetics of some Lanthanide(III)-PCTA complexes. *Inorg Chem* 2006;5(23):9269–9280.

Tolmachev V, Orlova A, Pehrson R, Galli J, Baastrup B, Andersson K, Sandström M, Rosik D, Carlsson J, Lundqvist H, Wennborg A, Nilsson FY. Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a ¹⁷⁷Lu-labeled HER2-specific Affibody molecule. *Cancer Res* 2007;67(6):2773-82.

Tomblyn MB, Katin MJ, Wallner PE. The new golden era for radioimmunotherapy: not just for lymphomas anymore. *Cancer Control* 2013;20(1):60-71.

Tripier R. Coordination chemistry. In: *Université de Bretagne Occidentale*. 2014. Dostupné na URL: <http://www-tmp.univ-brest.fr/chasam/Research>. Přístup: 9. 7. 2014.

Ulivi P, Zoli W, Capelli L, Chiadini E, Calistri D, Amadori D. Target therapy in NSCLC patients: Relevant clinical agents and tumour molecular characterisation. *Mol Clin Oncol* 2013;1(4):575-581.

Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial Watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2014;3(1):e27048.

van de Watering FC, Rijpkema M, Perk L, Brinkmann U, Oyen WJ, Boerman OC. Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients. *Biomed Res Int* 2014;2014:203601.

Vera DR, Eigner S, Henke KE, Lebeda O, Melichar F, Beran M. Preparation and preclinical evaluation of ¹⁷⁷Lu-nimotuzumab targeting epidermal growth factor receptor overexpressing tumors. *Nucl Med Biol* 2012;39(1):3-13.

Visser GW, Klok RP, Gebbinck JW, ter Linden T, van Dongen GA, Molthoff CF. Optimal quality (¹³¹I)-monoclonal antibodies on high-dose labeling in a large reaction volume and temporarily coating the antibody with IODO-GEN. *J Nucl Med* 2001;42(3):509-19.

Wakshull E, Kraemer PM, Wharton W. Multistep change in epidermal growth factor receptors during spontaneous neoplastic progression in Chinese hamster embryo fibroblasts. *Cancer Res* 1985;45(5):2070-5.

Weber WA, Wester HJ, Grosu AL, Herz M, Dzewas B, Feldmann HJ, Molls M, Stöcklin G, Schwaiger M. O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine and L-[methyl-¹¹C]methionine uptake in brain tumours: initial results of a comparative study. *Eur J Nucl Med* 2000;27(5):542-9.

Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010;10(5):317-27.

Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG, Jakobovits A. Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. *Cancer Res* 1999;59(6):1236-43.

Yoshimoto M, Waki A, Obata A, Furukawa T, Yonekura Y, Fujibayashi Y. Radiolabeled choline as a proliferation marker: comparison with radiolabeled acetate. *Nucl Med Biol* 2004;31(7):859-65.

Zhu A1, Lee D, Shim H. Metabolic positron emission tomography imaging in cancer detection and therapy response. *Semin Oncol* 2011;38(1):55-69.

9 Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

9.1 Publikace související s disertační prací

Novy Z, Laznickova A, Mandikova J, Barta P, Laznicek M, Trejtnar F. The effect of chelator type on in vitro receptor binding and stability in ^{177}Lu -labeled cetuximab and panitumumab. *J Labelled Comp Radiopharm* 2014;57(7):448-52. IF₂₀₁₂=1,24.

Novy Z, Barta P, Mandikova J, Laznicek M, Trejtnar F. A comparison of in vitro methods for determining the membrane receptor expression in cell lines. *Nucl Med Biol* 2012;39(7):893-6. IF₂₀₁₁=3,02.

9.2 Další publikované práce

Petrik M, Vlckova A, **Novy Z**, Urbanek L, Haas H, Decristoforo C. Selected ^{68}Ga -siderophores versus ^{68}Ga -colloid and ^{68}Ga -citrate: biodistribution and small animal imaging in mice. *Mol Imaging* 2014. *V recenzním řízení*. IF₂₀₁₂=3,41.

Mattova J, Pouckova P, Kucka J, Skodova M, Vetric M, Stepánek P, Urbanek P, Petrik M, **Novy Z**, Hruby M. Chelating polymeric beads as potential therapeutics for Wilson's disease. *Eur J Pharm Sci* 2014;62C:1-7. IF₂₀₁₂=2,99.

Trejtnar F, Laznickova A, Laznicek M, **Novy Z**, Maina T, Nock BA, Behe M. Distribution, elimination, and renal handling of (99m)technetium-Demogastrin 1. *Cancer Biother Radiopharm* 2012;27(2):169-74. IF₂₀₁₁=1,79.

Novy Z, Mandikova J, Trejtnar F. Study on 99mTc-MAG3 and 99mTc-DMSA renal accumulation using in vitro cellular model. *Ceska Slov Farm* 2011;60(1):7-10.

Novy Z, Mandikova J, Trejtnar F. Comparison of renal accumulation of [DOTA⁰, 1-NaI³]-octreotide labelled with selected radiometals. *Ceska Slov Farm* 2009;58(5):205-208.

Trejtner F, **Nový Z**, Petrik M, Laznickova A, Melicharova L, Vankova M, Laznicek M. In vitro comparison of renal handling and uptake of two somatostatin receptor-specific peptides labeled with indium-111. *Ann Nucl Med* 2008;22(10):859-67. IF₂₀₀₈=1,10.

9.3 Prezentace na vědeckých konferencích

A) Prvoautorské prezentace:

Nový Z, Petrik M, Drymlova J. MicroPET/SPECT/CT: aplikace v základním výzkumu. XXXVI. pracovní dny radiofarmaceutické sekce ČSNM ČLS JEP, Strážnice. 11. -13. 6. 2014. *Ces Slov Farm* 2014. *K 15. 7. 2014 v redakční úpravě.* (ústní sdělení).

Nový Z, Petrik M, Drymlova J, Hajduch M. The application of microPET/SPECT/CT in biomedical research: a new field of experience. XIV Zjazd polskiego towarzystwy medycyny nuklearnej, Lublin, Polsko. 28. - 30. 5. 2014. *Nuclear Medicine Review* 2014,17(A):A35 (ústní sdělení).

Nový Z, Stepankova J, Urban M, Khoylou M, Petrik M. ¹²⁵I-labelled phenylalkyl malonic acid derivative for monitoring of tumor acidosis. IX. diagnostic, predictive and experimental oncology days, Olomouc. 21. - 22. 11. 2013. Abstract book, A31 (poster).

Nový Z, Laznickova A, Mandikova J, Laznicek M, Trejtner F. Influence of chelator type on in vitro receptor binding and stability in ¹⁷⁷Lu-labeled anti-EGFR monoclonal antibodies. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Lyon, Francie. 19. - 23. 10. 2013. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2013) 40 (Suppl 2):S429 (poster).

Nový Z, Laznickova A, Mandikova J, Laznicek M, Trejtner F. The effect of chelator on receptor binding and stability in ¹⁷⁷Lu-labeled anti-EGFR monoclonal antibodies in vitro. 63. česko-slovenské farmakologické dny, Olomouc. 11. - 13. 9. 2013. *Biomedical Papers*, str. 36 (poster).

Nový Z, Barta P, Mandikova J, Laznicek M, Trejtnar F. Two methods for determining the membrane receptor expression in vitro. 2. postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 31. 1. - 1. 2. 2012. Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae XLII (2014) (ústní sdělení).

Nový Z, Barta P, Mandikova J, Trejtnar F, Laznicek M. Determination of epidermal growth factor receptor (EGFR) number: comparison of two in vitro methods. Annual Congress of European Association of Nuclear Medicine, Birmingham, Velká Británie. 15. - 19. 10. 2011. Eur J Nucl Med Mol Imaging (2011), 38(Suppl 2):S302 (poster).

Nový Z, Barta P, Mandikova J, Trejtnar F, Laznicek M. Determination of epidermal growth factor receptor (EGFR) number: comparison of two in vitro methods. 61. česko-slovenské farmakologické dny, Brno. 14. - 16. 9. 2011. Sborník abstrakt, str. 115 (poster).

Nový Z, Mandikova J, Barta P, Volkova M, Trejtnar F. Radiolabeling, cytotoxicity and renal accumulation of radiolabeled cetuximab. 1. postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Hradec Králové. 1. - 2. 2. 2011. Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae XL-XLI (2013) (ústní sdělení).

Nový Z, Mandikova J, Trejtnar F, Laznickova A. In vitro comparison of renal accumulation of two gastrin analogs using two renal cell models. Annual Congress of European Association of Nuclear Medicine, Vídeň, Rakousko. 9. - 13. 10. 2010. Eur J Nucl Med Mol Imaging (2010), 34 (Suppl 2):S369 (poster).

Nový Z, Louzecka J, Trejtnar F, Mandikova J, Laznickova A. Renal accumulation of radiolabeled somatostatin and gastrin analogs in vitro. 60. česko-slovenské farmakologické dny, Hradec Králové. 15. - 17. 9. 2010. Acta Medica 2010,53(3):186-187 (poster).

Nový Z, Pouget JP, Piron B, Trejtnar F. ¹¹¹In labeling of cetuximab and its in vitro cytotoxicity. 59. česko-slovenské farmakologické dny, Bratislava, Slovensko. 2. - 4. 9. 2009. Farmakológia – Zborník prác, str. 105 (poster).

Novy Z, Vavrikova E, Trejtnar F, Vinsova J. Chitosan derivatives: in vitro determination of hepatotoxicity. 58. česko-slovenské farmakologické dny, Praha. 3. - 5. 9. 2008. Prague Med Rep 2008, 109 (Suppl.), s. 91-92, 2008 (poster).

B) Spoluautorské prezentace:

Mandikova J, Volkova M, **Novy Z**, Pavek P, Janeba Z, Trejtnar F. Interactions of antiviral agent PMEG and its prodrug with selected SLC transporters. 6th European Congress of Pharmacology, Granada, Španělsko. 17. - 20. 7. 2012. E-Journal of British Pharmacological Society (poster).

Mandikova J, Volkova M, **Novy Z**, Pavek P, Janeba Z, F. Trejtnar F. Interaction of antiviral agent PMEG with SLC transporters. 62. česko-slovenské farmakologické dny, Košice, Slovensko. 25. - 27. 6. 2012. Sborník abstraktů, str. 60 (poster).

Mandíkova J, Volkova M, **Novy Z**, Janeba Z, Pavek P, Trejtnar F. Interactions of selected antiviral drugs with human organic anion transporter 1 (hOAT1) in vitro and the influence of potential drug competitors. 2. postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 31. 1. – 1. 2. 2012 (ústní sdělení).

Mandikova J, **Novy Z**, Volkova M, Pavek P, Trejtnar F. Interactions of selected antivirals with human organic anion transporter 1 in vitro and potential influence of drug competitors. 17th North American Regional Meeting of International Society for the Study of Xenobiotics, Atlanta, USA. 16. - 20. 11. 2011. Drug Metabolism Review, 43(2):185 (poster).

Trejtnar F, **Novy Z**, Láznickova A, Laznicek M: Comparison of renal accumulation of gastrin DOTA-derivatives labeled with indium-111 in rat renal cells. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Birmingham, Velká Británie. 15. - 19. 10. 2011. J Nucl Med Mol Imaging 2011, 38 (S2): S241 (poster).

Barta P, **Nový Z**, Björkelund H, Andersson K, Laznicek M. A Novel Rapid and Simple Automatic Strategy for EGFR Quantification in A431 Cells. 61. česko-slovenské farmakologické dny, Brno. 14. - 16. 9. 2011. Sborník abstraktů, str. 34-35 (poster).

Trejtmar F, Volkova M, **Nový Z**, Mandikova J, Laznickova A, Laznicek M. Comparison of renal accumulation of radiopeptides from group of somatostatin and gastrin derivatives in vitro. 61. česko-slovenské farmakologické dny, Brno. 14. - 16. 9. 2011. Sborník abstraktů, str. 148 (poster).

Mandikova J, Volkova M, **Nový Z**, Pavek P, Janeba Z, Trejtmar F. In vitro study of potential of selected drugs to interact with antivirals on human organic anion transporter. 61. česko-slovenské farmakologické dny, Brno. 14. - 16. 9. 2011. Sborník abstraktů, str. 98 (poster).

Volkova M, Mandikova J, **Nový Z**, Lanickova A, Laznicek M, Trejtmar F. Study of renal transmembrane transport of somatostatin analogues in vitro. 61. Česko-slovenské farmakologické dny, Brno. 14. - 16. 9. 2011. Sborník abstraktů, str. 157 (poster).

Trejtmar F, **Nový Z**, Mandikova J, Laznickova A, Laznicek M. Renal accumulation of DOTA-conjugated minigastrin 11 labeled with indium-111 in vitro. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Vídeň, Rakousko. 9. - 13. 10. 2010. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2010, 37(S2):371 (poster).

Trejtmar F, Kubackova T, **Nový Z**, Mandikova J, Laznickova A, Laznicek M. Study on renal accumulation of radiolabeled receptor-specific minigastrin analogs in vitro. 60. česko-slovenské farmakologické dny, Hradec Králové. 15. - 17. 9. 2010. Acta Medica, 53(3):198 (poster).

Mandikova J, Stehnova O, Vavrikova E, **Nový Z**, Trejtmar F. Evaluation of cytotoxicity of newly synthesized chitosan derivatives using in vitro hepatic cell model. 60. česko-slovenské farmakologické dny, Hradec Králové. 15. - 17. 9. 2010. Acta Medica, 53(3):182-3 (poster).

Trejtner F, **Nový Z**, Mandikova J, Laznickova A, Laznicek M. Renal accumulation of two somatostatin analogs labeled with lutetium-177 in vitro. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 10. - 14. 10. 2009. Barcelona, Španělsko. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2009, 36(S2):309-S310 (poster).

Trejtner F, Mandikova J, **Nový Z**, Kroupova T, Popadicova L, Laznicková A. Differences in renal uptake of selected radiolabeled receptor-specific peptides. 59. česko-slovenské farmakologické dni, Bratislava, Slovensko. 2. - 4. 9. 2009. Farmakológia – Zborník prác, str. 122 (poster).

Mandikova J, Trejtner F, **Nový Z**, Laznickova A. In vitro uptake of radiolabeled receptor-specific peptides in porcine proximal tubular cells. 59. česko-slovenské farmakologické dni, Bratislava, Slovensko. 2. - 4. 9. 2009. Farmakológia – Zborník prác, str. 96 (poster).

Trejtner F, Laznickova A, Laznicek M, Melicharova L, **Nový Z**: Influence of selected potential inhibitors on renal uptake of somatostatin analogs in vitro. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2008, Mnichov, Německo. 15. - 6. 9. 2008. J Nucl Med Mol Imaging 2008, 35 (Suppl. 2): S319 (poster).

Trejtner F, **Nový Z**, Laznickova A, Melicharova L, Kroupova T, Popadicova L, Laznicek M: Renal accumulation of radiolabeled receptor-specific peptides. 58. česko-slovenské farmakologické dny. 3. - 5. 9. 2008, Praha. Prague Med. Rep. 109, (Suppl.), s. 118-119, 2008 (poster).

10 Přílohy – odborné publikace s tematikou disertační práce

A)

Novy Z, Laznickova A, Mandikova J, Barta P, Laznicek M, Trejtnar F. The effect of chelator type on in vitro receptor binding and stability in ¹⁷⁷Lu-labeled cetuximab and panitumumab. *J Labelled Comp Radiopharm* 2014;57(7):448-52. IF₂₀₁₂=1,24.

B)

Novy Z, Barta P, Mandikova J, Laznicek M, Trejtnar F. A comparison of in vitro methods for determining the membrane receptor expression in cell lines. *Nucl Med Biol* 2012;39(7):893-6. IF₂₀₁₁=3,02.