

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACETICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**In vitro saturačné štúdie ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu na
PC-3 bunkách**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: Mgr. Pavel Bárta, PhD

Konzultant: Mgr. Lucie Hyršová

Hradec Králové 2018

František Lach

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Literatúra a zdroje z ktorých som čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú riadne citované. Táto práca nebola použitá k dosiahnutiu rovnakého alebo iného titulu“.

V Hradci Králové dňa

František Lach

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa rád pod'akoval predovšetkým svojmu školiteľovi Mgr. Pavlovi Bártovi, PhD, za jeho odborné vedenie, poskytnutie cenných rád, trpezlivosť, ochotu a čas, ktorý mi venoval počas celej doby spracovania mojej diplomovej práce. Tiež by som rád pod'akoval celému oddeleniu Radiofarmak za ich priateľský prístup a príjemné pracovné prostredie. V neposlednej rade patrí veľké pod'akovanie mojej rodine, za ich pomoc a podporu počas celej doby štúdia.

Abstrakt v slovenskom jazyku

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Študent: František Lach

Školiteľ: Mgr. Pavel Bárta, PhD

Konzultant: Mgr. Lucie Hyršová

Názov diplomovej práce: In vitro saturačné štúdie ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu na PC-3 bunkách

V posledných rokoch sa zvyšuje počet zhubných nádorov v populácii. Z dôvodu častých vážnych nežiadúcich účinkov chemoterapeutických liečiv na celý organizmus sa do popredia dostáva cieleňá protinádorová terapia. Vďaka svojmu špecifickému účinku na regulačné a signálne dráhy proteínových štruktúr, sú k cieľovej protinádorovej terapii využívané monoklonálne protilátky. Medzi základné vlastnosti rastúceho nádoru patria vaskulogenéza (schopnosť novotvorby ciev z endoteliálnych prekursorov) a angiogenéza (proces vlastnej novotvorby ciev). Medzi endoteliálne progenitory nádoru patri vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF). VEGF svoj biologický účinok aktivuje prostredníctvom väzby na svoje transmembránové tyrozínkinázové receptory VEGFR. Práve inhibícia receptorov vaskulárneho endotelového faktoru je cieľom niektorých monoklonálnych protilátok. Ramucirumab je monoklonálna protilátka, ktorá selektívne inhibuje VEGF receptor typu 2 (VEGFR-2) a tým blokuje aktivačné a signalizačné dráhy.

Cieľom predkladanej diplomovej práce bolo zrealizovať nepriame rádioaktívne značenie monoklonálnej protilátky ramucirumab rádiodiagnostickým nuklidom ^{99m}Tc pomocou chelátoru succinimidyl-6-hydrazino-nicotinamidu (HYNIC). U pripraveného rádiofarmaka ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab sa overila rádiochemická čistota a stabilita po dobu 24 hodín. Rádiochemická čistota a stabilita bola overená pomocou metódy HPLC a iTLC. Rádiofarmakum sa otestovalo aj na biologické vlastnosti, teda zachovanie schopnosti sa viazať na cieľový receptor VEGFR-2 exprimovaného na nádorovej bunkovej línii ľudského prostatického karcinómu. *In vitro* experimenty boli zrealizované pomocou manuálnej saturačnej techniky a automatickej rádioimunoanalytickej metódy s detekciou v reálnom čase. Cieľom bolo zistenie hodnôt rovnovážnej disociačnej konštanty K_D , ktorá určuje afinitu skúmanej látky k cieľovej proteínovej štruktúre.

Výsledkom rádioaktívneho značenia monoklonálnej protilátky ramucirumab bola príprava stabilného rádiofarmaka ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab, kde jeho pripravené vzorky vykazovali rádiochemickú čistotu vyššiu ako 95 %, čo je požiadavka Európskeho liekopisu pre aplikáciu rádiofarmak pacientom. Ani po 24 hodinách od zrealizovania rádioaktívneho značenia nebola zistená významná prítomnosť voľného technécia, ktorá

by značila nestabilitu rádioaktívne značeného imunokomplexu. V *in vitro* experimentoch bola stanovená rovnovážna disociačná konštanta pre väzbu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na VEGFR-2 v hodnote $K_D = 9,99 \pm 2,06$ nM pre manuálnu saturačnú techniku a $K_D = 1,54 \pm 0,52$ nM pre automatickú radioimunoanalýzu. Získané hodnoty *in vitro* štúdie tak potvrdili zachovanie väzbovej schopnosti rádioaktívne značenej monoklonálnej protilátky k bunkovému VEGFR-2.

Výsledkom predkladanej diplomovej práce je potvrdenie možnosti rádioaktívne značiť monoklonálnu protilátku ramucirumab diagnostickým rádionuklidom ^{99m}Tc cez chelatačné činidlo HYNIC so súčasným zachovaním väzbových schopností pripraveného rádiofarmaka. Pripravený rádioaktívne značený komplex ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab by sa mohol stať sľubným ligandom pre vizualizáciu VEGFR-2 pozitívnych nádorových ochorení, ak by súčasne obstál aj v *in vivo* testovaní.

Abstrakt v anglickom jazyku

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Student: František Lach

Supervisor: Mgr. Pavel Bárta, PhD

Consultant: Mgr. Lucie Hyršová

Title of diploma thesis: In vitro saturation study of ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab on PC-3 cell line

The number of malignant tumours in the population has increased in recent years. Due to the frequent serious side effects of chemotherapeutic drugs on the whole organism, targeted antitumor therapy is at the forefront. Due to its specific effect on the regulatory and signal pathways of protein structures, monoclonal antibodies are used for the target anti-tumour therapy. The basic properties of the growing tumour include vasculogenesis (the ability to build new blood vessels from the endothelial precursors) and angiogenesis (the process of self-inducing formation of blood vessels). Endothelial tumour progenitors include vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF activates its biological activity by binding to its transmembrane tyrosine-kinase receptors VEGFR. Indeed, the inhibition of the vascular endothelial factor receptors is the target of some monoclonal antibodies. Ramucirumab is a monoclonal antibody that selectively inhibits VEGF receptor type 2 (VEGFR-2) and thereby blocking the activation and signaling pathways.

The aim of this diploma thesis was realised indirect radioactive labelling of the monoclonal antibody ramucirumab with the ^{99m}Tc radiodiagnostic nuclide using the succinimidyl-6-hydrazino-nicotinamide chelator (HYNIC). Radiochemical purity and stability of the prepared radiopharmaceuticals ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab was verified for 24 hours. Radiochemical purity and stability was verified by HPLC and iTLC. Radiopharmaceuticals were also tested for their biological properties, therefore their ability to bind to the target receptor VEGFR-2, expressed on the tumour cell line of human prostate cancer. *In vitro* experiments were performed by using manual saturation technique and real-time radioimmunoassay. The aim was to find values of the equilibrium dissociation constant K_D , which determines the affinity of the tested substance to the target protein structure.

The result of radiolabelling of the monoclonal antibody ramucirumab was a preparation of a ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab, of which prepared samples showed a radiochemical purity more than 95%, that is required in the European Pharmacopoeia for the application of radiopharmaceuticals to patients. No significant presence of free technetium was found to indicate the instability of the radiolabelled immunocomplex after 24 hours of the radioactive labelling. In *in vitro* experiments, the equilibrium

dissociation constant for the binding of ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab to VEGFR-2 was determined in values $K_D = 9.99 \pm 2.06$ nM for manual saturation technique and $K_D = 1.54 \pm 0.52$ nM for automatic radioimmunoassay. The values obtained for *in vitro* studies confirmed the binding ability of the radiolabelled monoclonal antibody to VEGFR-2.

The result of this diploma thesis is the confirmation of the possibility of radiolabelling the monoclonal antibody ramucirumab with the diagnostic radionuclide ^{99m}Tc through the HYNIC chelating agent, with maintained binding abilities of the prepared radiopharmaceuticals. The prepared radiolabelled ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab complex could become a promising ligand for visualizing VEGFR-2 of positive tumour diseases, if it also passed *in vivo* testing.

Obsah:

1	Zoznam použitých skratiek:	11
2	Úvod.....	15
3	Teoretická časť.....	17
3.1	Imunoterapia	17
3.1.1	Monoklonálne protilátky.....	18
3.1.2	Mechanizmus účinku a štruktúra monoklonálnych protilátok.....	18
3.1.3	Incidencia zhubných nádorov	22
3.1.4	Cielená protinádorová terapia – inhibícia angiogenézy.....	23
3.2	Rádiofarmaká	24
3.2.1	Výroba rádiofarmák	25
3.2.2	Rádionuklidy.....	26
3.2.3	Príprava rádionuklidov	26
3.2.4	Značenie monoklonálnych protilátok pomocou rádionuklidu	27
3.2.5	Farmakokinetika a farmakodynamika rádiofarmák	29
3.2.6	SPECT a PET.....	29
3.3	Vaskulárny endoteliálny rastový faktor a jeho receptory	30
3.3.1	VEGF typy	30
3.3.2	VEGF-A.....	31
3.3.3	VEGF-B	32
3.3.4	Receptor pre VEGF a antiangiogénna liečba.....	33
3.4	Ramucirumab a jeho farmakokinetické a farmakodynamické štúdie	36
3.5	<i>In vitro</i> štúdie väzieb na receptory	38
3.5.1	Saturačné štúdie	38
3.5.2	Kompetitívne štúdie	39
3.5.3	Internalizačné štúdie	40
3.5.4	Efluxné štúdie	40
3.5.5	Princíp technológie merania v reálnom čase interakcie medzi rádioaktívne značeným ligandom a cieľovou biologickou štruktúrou.....	40
4	Cieľ práce.....	43
5	Experimentálna časť	44
5.1	Použitý prístroje a software	44
5.2	Použitý materiál	44

5.3	Použité chemikálie	45
5.4	Použitý biologický materiál	45
5.5	Pracovný postup	46
5.5.1	Príprava fosfátového pufru	46
5.5.2	Príprava mobilnej fáze	46
5.5.3	Príprava citratového pufru	46
5.5.4	Príprava Krebs-Ringerova roztoku	46
5.5.5	Kultivácia bunkovej línie PC-3.....	47
5.5.6	Konjugácia ramucirumabu s chelatačným činidlom HYNIC	47
5.5.7	Rádioznačenie HYNIC-ramucirumabu rádionuklidom ^{99m}Tc	47
5.5.8	Zaisťovanie čistoty a stability značeného ramucirumabu pomocou iTLC48	
5.5.9	Zaisťovanie čistoty a stability značeného ramucirumabu pomocou metódy HPLC	48
5.5.10	Postup merania na prístroji LigandTracer Yellow za použitia bunkovej línie PC-3 buniek	48
5.5.11	Postup práce pri saturačných štúdiách zrealizovaných pomocou manuálnej techniky	49
5.5.12	Postup stanovenia koncentrácie bunkového proteínu.....	51
6	Výsledky práce	52
6.1.1	Stanovenie rádiochemickej čistoty a stability pripraveného rádioligandu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab	52
6.1.2	Stanovenie rádiochemickej čistoty a stability ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab pomocou metódy iTLC	55
6.1.3	Stanovenie kinetických parametrov ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab pomocou prístroja LigandTracer Yellow na bunkách PC-3.	59
6.1.4	Saturačné štúdie	60
7	Diskusia	63
8	Záver	66
9	Zoznam použitých zdrojov	68
10	Prílohy.....	73
10.1	Zoznám obrázkov:	73
10.2	Zoznam tabuliek:	75

1 Zoznam použitých skratiek:

ADCC	na protilátkach závislá cytotoxická reakcia, <i>angl.</i> antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
APC	antigén prezentujúce bunky <i>angl.</i> antigen presenting cells
BiTE	<i>angl.</i> bi-specific T-cell engagers
BCA	kyselina bicinchonínová, <i>angl.</i> bicinchoninic acid
BSA	hovädzí sérový albumín, <i>angl.</i> bovine serum albumin
CD	<i>angl.</i> cluster of differentiation
CDC	komplementom sprostredkovaná cytotoxicita <i>angl.</i> complement dependent cytotoxicity
CT	výpočetná tomografia, <i>angl.</i> computer tomography
CTL	cytotoxický T-lymfocyt, <i>angl.</i> cytotoxic T-cell
CEP	bunkový endoteliálny progenitor, <i>angl.</i> cell endothelial progenitor
EC	endoteliálna bunka, <i>angl.</i> endothelial cell
EDTA	kyselina ethyléndiamíntetraoctová, <i>angl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid
EDDA	kyselina etyléndiamíndioctová, <i>angl.</i> ethylenediaminediacetic acid
ED₅₀	minimálna dávka účinná pre 50 % populácie, <i>angl.</i> effective dose (median effective dose)
EGFR	receptor pre epidermálny rastový faktor, <i>angl.</i> epidermal growth factor receptor
EpCAM	<i>angl.</i> epithelial cell adhesion molecule
ERBB	<i>angl.</i> receptor tyrosine-protein kinase
Fab	fragment viažuci antigén, <i>angl.</i> fragment antigen binding
FBS	fetálne hovädzie sérum, <i>angl.</i> fetal bovine serum
Fc	kryštalizujúci fragment, <i>angl.</i> fragment crystallizable
FDA	Správa pre kontrolu potravín a liečiv, <i>angl.</i> Food and Drug Administration
FGF	rastový faktor fibroblastov, <i>angl.</i> fibroblast growth factor
FGFR	receptor pre rastový faktor fibroblastov, <i>angl.</i> fibroblast growth factor receptor
Flk	<i>angl.</i> fetal liver kinase
Flt	<i>angl.</i> fms-like tyrosine kinase

FWHM	<i>angl.</i> full width at half maximum
GMP	správna výrobná prax, <i>angl.</i> good manufacturing practise
HAHA	ľudské protilátky tvorené proti ľudským protilátkam, <i>angl.</i> human antihuman antibodies
HAMA	ľudské protilátky vytvorené proti myším protilátkam, <i>angl.</i> human anti-mouse antibodies
HER	receptor pre ľudský epidermálny rastový faktor, <i>angl.</i> human epidermal growth factor receptor
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, <i>angl.</i> high-performance liquid chromatography
HSC	hematopoetická kmeňová bunka, <i>angl.</i> hematopoietic stem cell
HYNIC	sukcinimidyl-6-hydrazínnonikotínamid, <i>angl.</i> succinimidyl-6-hydrazino-nicotinamide
IC₅₀	polovičná maximálna inhibičná koncentrácia, <i>angl.</i> half maximal inhibitory concentration
Ig	imunoglobulín, <i>angl.</i> immunoglobulin
IL	interleukín, <i>angl.</i> interleukin
INF γ	interferón γ , <i>angl.</i> interferon
ITLC	instantná tenkovrstevná chromatografia <i>angl.</i> instant thin-layer chromatography
ka	asociačná konštanta
kd	disociačná konštanta
K_D	rovnovážna disociačná konštanta
KDR	<i>angl.</i> kinase insert domain receptor
K_i	inhibičná disociačná konštanta
KIT	<i>angl.</i> receptor tyrosine kinase
L	ligand
LR	komplex ligand-receptor
LAK	zabíjači aktivovaní lymfokínom, <i>angl.</i> lymphokine-activated killers
MAb	monoklonálna protilátka, <i>angl.</i> monoclonal antibody
MAP	mitogénom aktivovaná proteinkináza, <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinases

mCRC	metastázujúci kolorektálny karcinóm, <i>angl.</i> metastatic colorectal cancer
MHC	hlavný histokompatibilný komplex <i>angl.</i> major histocompatibility complex
MEK	mitogénom aktivovaná proteinkináza, <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinases
MMP	matrix metalopeptidáza, <i>angl.</i> matrix metalloproteinase
MRI	magnetická rezonancia, <i>angl.</i> magnetic resonance imaging
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina, <i>angl.</i> messenger ribonucleic acid
NK	prirodzený zabijaci, <i>angl.</i> natural killers
NRP	neenzymatický koreceptor neuropilínu, <i>angl.</i> non-enzymatic neuropilin co-receptor
NSB	nešpecifická väzba, <i>angl.</i> non-specific binding
PBS	fosfátový pufr, <i>angl.</i> phosphate buffered saline
PC-3	bunky ľudského prostatického adenokarcinomu, <i>angl.</i> human prostate adenocarcinoma cells
PET	pozitronová emisná tomografia, <i>angl.</i> positron emission tomography
PIGF	placentárny rastový faktor, <i>angl.</i> placental growth factor
RAM	ramucirumab
scFv	jednoreťazcový variabilný fragment, <i>angl.</i> single-chain variable fragment
SPECT	jednofotonová emisná vypočetná tomografia, <i>angl.</i> single photon emission computed tomography
R	receptor
RCC	karcinóm obličkových buniek, <i>angl.</i> renal cell carcinoma
SVP	správna výrobná prax
Tb	biologický polčas, <i>angl.</i> time biological
Tef	efektívny polčas, <i>angl.</i> time effective
Tf	fyzikálny polčas, <i>angl.</i> time physical
TGF	transformujúci rastový faktor, <i>angl.</i> transforming growth factor
TK	tyrozínkináza, <i>angl.</i> tyrosine kinase
TNF	tumor nekrotizujúci faktor, <i>angl.</i> tumor necrosis factor

VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor, <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor
VEGFR	receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru, <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor receptor
VH	ťažký reťazec, <i>angl.</i> heavy chain
VHL gén	<i>angl.</i> von Hippel-Lindau gen
VL	ľahký reťazec, <i>angl.</i> light chain

2 Úvod

Za posledné roky sa zvyšuje počet zhubných nádorov v populácii. Príčiny vzniku nádorov sú rôznorodé. Zhoršovanie zdravotného stavu a tým aj vyšší počet zhubných nádorov, má zrejme na príčine nezdravý spôsob života, environmentálne a infekčné faktory. Dôležitú rolu samozrejme zohrávajú dedičné faktory. Po kardiovaskulárnych chorobách sú zhubné nádory druhou najčastejšou príčinou úmrtia v Českej republike (ČR). Medzi dlhodobo najviac zastúpeným zhubným nádorom v ČR je kolorektálny karcinóm. Medzi ďalšie rozšírené nádory v ČR patria zhubný nádor pľúc, zhubný nádor prsníka u žien, karcinóm prostaty a zhubný nádor kože.

Prvé zmienky o pokusoch medikamentózneho protinádorovej liečby sa datujú do 20. storočia. Zlom nastal v 50. rokoch, kedy sa začali v praxi používať k liečbe myeloidnej leukémie, alkylačné cytostatika. Podstatou účinku cytostatik je poškodiť nádorovú DNA. Cytostatika svojím pôsobením na celý organizmus, poškodzujú aj DNA zdravých buniek a môžu spôsobiť myelosupresiu, kardiotoxicitu, neurotoxicitu, nefrotoxicitu a mutagenitu. Aj napriek vážnym nežiadúcim účinkom, liečba pomocou cytostatik predlžuje dobu prežitia onkologických pacientov, sú stále vo vysokej miere používané a ich vývoj stále pokračuje. (Adam *et al.*, 2011)

Z dôvodu častých vážnych nežiadúcich účinkov cytostatik na celý organizmus, do popredia vstupuje cieľená protinádorová terapia. Vďaka svojmu špecifickému účinku na regulačné a signálne dráhy proteínových štruktúr, sú k cieľovej protinádorovej terapii využívané monoklonálne protilátky. Kvôli vynikajúcemu potenciálu pre systémovú liečbu rakoviny a iných patologických stavov sú v súčasnosti v klinickom vývoji, stovky monoklonálnych protilátok. (Vosjan *et al.*, 2010)

Monoklonálne protilátky sú preukázateľne účinnou terapeutickou modalitou u maligných nádorov. Koncept pre eradikáciu patogénov alebo nádorových buniek využívajúcich protilátky, bol navrhnutý už viac ako pred 100 rokmi. Objavenie hybridómnej technológie, spoločnosťou Kohler a Milstein v roku 1975, viedlo k tvorbe monoklonálnych protilátok. Technológia sa zaoberala fúziou normálnych B-lymfocytov s myšimi myelómovými bunkami. Vývoj genetického inžinierstva zaznamenal pokroky v profilovaní genetickej expresie, proteomike, sekvenovaní a dešifrovaní komplexných signalizačných dráh, ktoré odhalili nové terapeutické ciele monoklonálnych protilátok. (Pandey a Mahadevan, 2014)

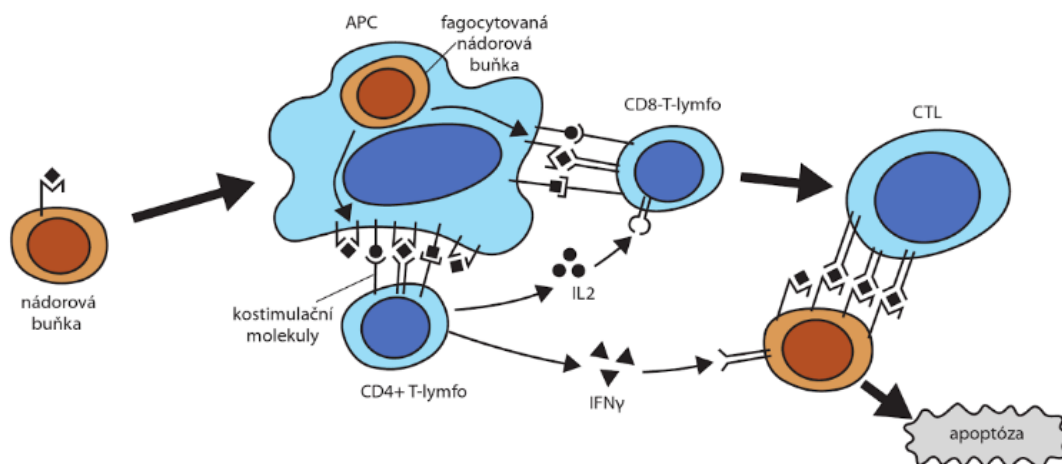
V terapii a diagnostike nádorových ochorení je dôležitým faktorom tiež nukleárna medicína. Naviazaním rádionuklidu na biologické liečivo, hovoríme o rádioimunoterapii. Výsledkom je kombináciou dvoch terapeutických účinkov: účinok žiarenia rádionuklidu na cieľovú štruktúru a inhibičný účinok monoklonálnej protilátky na aktivačné a signálne dráhy receptora nádorovej bunky. (Tomblyn *et al.*, 2013). Prvé značenie monoklonálnej protilátky bolo uskutočnené rádionuklidom ¹³¹I. Od tejto doby sa v *in vitro* štúdiách používajú rôzne rádionuklidy v kombinácií s rôznymi monoklonálnymi protilátkami. (Gansow, 1991)

Pri výskume nových monoklonálnych protilátok sa overuje schopnosť väzby na cieľovú štruktúru. *In vitro* saturačné štúdie sa zameriavajú na afinitu monoklonálnej protilátky značenej rádioaktívnym žiaričom k cieľovému bunkovému receptoru.

3 Teoretická časť

3.1 Imunoterapia

Imunitný systém hrá dôležitú rolu v boji proti nádorovým ochoreniam. Vedľa boja proti infekčným agens je jednou z hlavných roli imunitného systému eliminácia transformovaných buniek predtým, než budú schopné nádorového bujnenia. Cieľom imunoterapie je vyvolať alebo posilniť zložky protinádorovej imunity. Oproti chemoterapii imunoterapia má prednosť ničiť nádorové bunky vysoko selektívne. Bunečná populácia môže byť eradikovaná úplne, ak nie je príliš početná. Eliminácia nádorových buniek je sprostredkovaná hlavne CD8⁺ cytotoxickými T-lymfocyty (CTL). Cytotoxické T-lymfocyty rozpoznávajú nádorové antigénne epitopy len vo forme peptidov vystavených na povrchu nádorových buniek v komplexe s vlastnými MHC molekulami I. triedy (MHC restrikcia T-lymfocytov). Aktivácia cytotoxických T-lymfocytov vyžaduje kostimuláciu pomocnými CD4⁺ T-lymfocytmi. Pomocné T-lymfocyty sa najprv musia s nádorovým antigénom stretnúť na povrchu antigen prezentujúcich buniek (APC, antigen-presenting cells), ako sú napríklad dendritické bunky, B-lymfocyty, Langerhansové bunky a makrofágy. Tato tzv. skrížená prezentácia antigénu (cross-presentation) zaisťuje za normálnych okolností vysokú špecifitu imunitných reakcií. APC získavajú nádorový antigén tým, že fagocytujú nekrotické a apoptotické nádorové bunky. Nádorové antigény sú degradované v lyzozómoch APC a následne vystavené na bunečnej membráne MHC molekúl II. triedy a kostimulačných molekúl. Stimuláciou, tj. väzbou komplexu MHC + imunogén na T-bunečných receptor, a kostimuláciou, tj. väzbou kostimulačných molekúl na príslušné receptory na T-lymfocyte, dochádza k aktivácii pomocných CD4⁺ T-lymfocytov, ktoré aktivujú cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty, jednak produkujú radu interleukínov (TNF, IFN gama), ktoré majú priamy protinádorový účinok. MHC molekuly I. triedy na nádorových bunkách stimulujú zložky prirodzenej imunity (makrofágy a NK-bunky). Len správna sekvencia všetkých vyššie popísaných procesov adaptívnej imunity môže viesť k účinnej obrane proti nádorovým bunkám. Ďalšou významnou zložkou protinádorovej imunity sú NK-bunky (natural killers). NK-bunky môžu cielene likvidovať nádorové elementy so zníženou expresiou MHC molekúl I. triedy, čiže bunky, ktoré unikajú mechanizmom adaptívnej imunity sprostredkované cytotoxickými T-lymfocytmi. Cytokiny (IL2, IL12) vyvolávajú premenu NK buniek na tzv. LAK (lymphokine-activated killers), ktoré sa využívajú v adoptívnej imunoterapii. Ďalšou možnosťou imunitného systému k eliminácii tumoru sú makrofágy. Mechanizmus adaptívnej protinádorovej imunity zobrazuje **Obr. 1.** (Jílek, 2008)



Obr. 1: Mechanizmus protinádorovej bunkovej (adaptívnej) imunity. Prevzaté z: Klener a Klener 2010.

3.1.1 Monoklonálne protilátky

Monoklonálne protilátky (monoclonal antibodies, MAb) sú protilátky produkované jedným klonom plazmatických buniek, tj. potomstvom jedného B-lymfocytu. Pretože bunky jedného klonu produkujú štruktúrne identické molekuly protilátok, vyznačujú sa maximálnou homogenitou, tzn., že sú schopné viazať veľmi účinne jedinú antigénnu determinantu. Týmto sa odlišujú protilátky monoklonálne od protilátok polyklonálnych. (Jílek, 2008)

Monoklonálne protilátky sú využívané najmä v onkológii, ale tiež pri liečbe infekčných a autoimunitných chorôb a transplantológii. MAb majú schopnosť viazať sa na epitopy konkrétnych povrchových antigénov. Medzi najčastejšie antigény patria membránové proteíny (napr. CD20, CD52, CD33, CD40, CD80 a iné), rastové faktory (napr. VEGF), receptory (napr. EGFR/ERBB/HER, VEGFR), adhézne molekuly (napr. EpCAM, integríny) a ďalšie. MAb sa po dlhú dobu používali prevažne k diagnostickým účelom. V roku 1997 americká Správa pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) povolila klinické používanie historicky prvej monoklonálnej protilátky rituximab k liečbe nádorového ochorenia. Týmto sa začalo obdobie, kedy každým rokom pribúdajú desiatky nových MAb k liečebným účelom. MAb patria medzi imunoglobulíny (Ig), ktoré vykazujú afinitu k antigénu. (Klener a Klener, 2010)

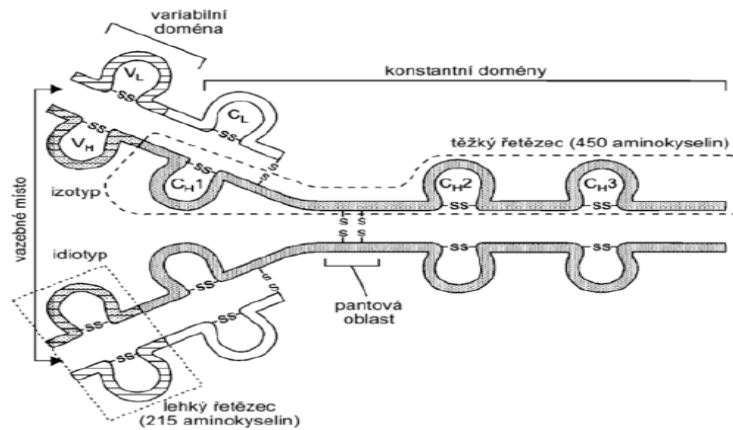
Imunoglobulíny rozdeľujeme do 5 skupín, na základe stavby konštantných domén ťažkých reťazcov: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. MAb používané v protinádorovej terapii patria väčšinou do triedy IgG. Môžu byť monošpecifické (obsahujú dve identické väzbové ramená), bišpecifické a trifunkčné protilátky. (Nový, 2014), (Sobotková a Bartůňková, 2008)

3.1.2 Mechanizmus účinku a štruktúra monoklonálnych protilátok

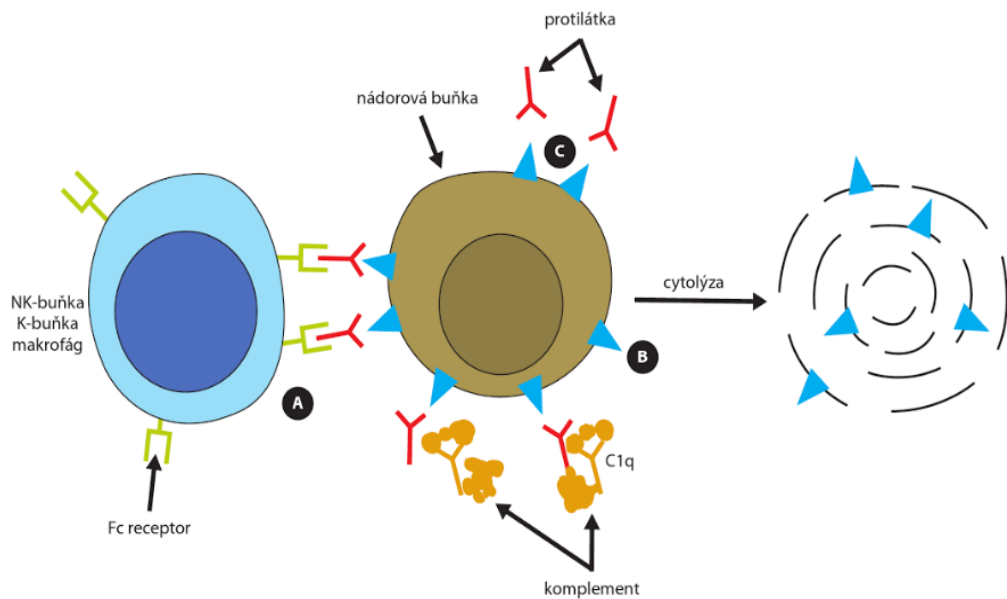
Molekuly imunoglobulínu sú tvorené dvoma ľahkými a dvoma ťažkými reťazcami, ktoré majú tvar Y a sú prepojené disulfidickými mostíkmi. Obsahujú variabilný a konštantný fragment. Za špecifiku imunoglobulínov sú zodpovedné

variabilné fragmenty, ináč nazývané fragmenty viažuce antigén (Fab, *angl.* fragment antigen binding). Tvoria ich dve ľahké a dve ťažké domény. K Fab fragmentu je pripojený konštantný fragment Fc (*angl.* crystallizable). Štruktúra je znázornená v **Obr. 2**. Fragmenty Fab slúžia k väzbe nádorového antigénu, zatiaľ čo fragment Fc umožňuje väzbu a aktiváciu buniek imunitného systému (makrofágy, NK-bunky, cytotoxické T-lymfocyty). (Sobotková a Bartůňková, 2008), (Stern a Herrmann, 2005), (Klener a Klener, 2010)

Väzba protilátky na príslušný nádorový antigén nasmeruje pomocné bunky imunitného systému do miesta nádoru, čo vedie k výraznému nárastu fagocytózy alebo indukcií apoptózy nádorových buniek cytotoxickými látkami, ktoré sú sekrétmi aktivovaných T-lymfocytov a NK-buniek. Tento mechanizmus protinádorového účinku MAb sa označuje ako protilátkami sprostredkovaná bunková cytotoxicita (ADCC, z anglického antibody dependent cellular cytotoxicity). Ďalším mechanizmom, ktorým monoklonálna protilátka vyvoláva smrť cieľových buniek, je aktivácia komplementu, takzvaná komplementom sprostredkovaná cytotoxicita (CDC, z anglického complement dependent cytotoxicity). MAb môžu vykazovať priamy cytotoxický účinok, ako napríklad agonistické protilátky proti smrteľným (*angl.* death) receptorom, ale aj anti-CD20 či anti-EGFR/ERBB1/HER1. Terapeutický účinok MAb môže spočívať v blokáde väzby ligandu na špecifický receptor buď neutralizáciou ligandu napr. anti-VEGF, alebo väzbou na extracelulárnu doménu receptoru ako napr. antagonistické mAb anti-EGFR/ERBB1/HER1 cetuximab, anti-ERBB2/HER2/NEU trastuzumab, alebo anti-VEGFR-2 ramucirumab. Monoklonálna protilátka blokuje aktiváciu príslušnej signálnej dráhy (transdukčnej kaskády), a preto zahrňujeme liečbu s MAb do cielenej liečby (*angl.* targeted therapy). MAb používané k liečbe maligných lymfómov vykazujú afinitu aj k normálnym bunkovým populáciám (lymfocytom) nesúcim príslušný povrchový znak ako napr. CD20, ktorý je exprimovaný nie len na lymfomových bunkách, ale aj na normálnych B-lymfocytoch, čo môže mať výrazný imunosupresívny účinok. Rekombinantnou technológiou sa dá pripraviť protilátka bišpecifická, ktorá obsahuje dva odlišné fragmenty Fab viažuce sa na dva odlišné antigény. Neskrátené (*angl.* full-size) bišpecifické protilátky sú trifunkčné, pretože dvoma odlišnými fragmentami Fab viažu dva odlišné antigény a fragment Fc sprostredkováva väzbu efektorových buniek imunitného systému. Zvláštnym typom monoklonálnej protilátky sú protilátky označované ako bi-specific T-cell engagers (BiTE). Tieto protilátky sú tvorené dvoma rôznymi protilátkovými fragmentami scFv (*angl.* single-chain fragment variable), z ktorých viaže antigén CD3 na povrchu T-lymfocytov a druhý antigén exprimovaný na nádorových bunkách. BiTE týmto spôsobom priťahujú T-lymfocyty do miesta rastu nádorov. Vyššie uvedené mechanizmy MAb na nádorovú bunku zobrazuje **Obr. 3**. (Klener a Klener, 2010), (Klener a Klener, 2013), (Stern a Herrmann, 2005)



Obr. 2: Štruktúra monoklonálnej protilátky, Prevzaté z: Ferenčík, 2005.



Obr. 3: Mechanizmus účinku monoklonálnych protilátok. (A) cytotoxicita závislá na protilátke (ADCC). (B) cytotoxicita závislá na komplemente (CDC). (C) Priamy cytotoxický účinok. Prevzaté z: Klener a Klener, 2010.

Klasická príprava monoklonálnych protilátok vyžaduje fúziu ľudských myelomových buniek so splenocytmi myši, ktoré boli imunizované požadovaným antigénom, kedy touto fúziou vzniká nesmrteľný klon hybridómu produkujúci myšie MAb proti danému antigénu. Tieto myšie protilátky pri humánnej aplikácii vyvolávajú tvorbu ľudských neutralizačných protilátok HAMA (human anti-mouse antibody), ktoré inhibovali biologickú účinnosť terapeuticky podávanej MAb. Okrem toho, Fc fragment myšej monoklonálnej protilátky neumožňoval optimálnu väzbu ľudských imunokompetentných buniek, čo výrazne znižovalo protinádorový účinok MAb sprostredkovaný cez ADCC. Moderné techniky génového inžinierstva umožnili konštrukciu protilátok obsahujúcich časť myšich a časť ľudských sekvencií aminokyselín, tzv. chimérické alebo humanizované MAb. Tiež je možné vyrábať aj čisté ľudské protilátky. Samozrejme, aj tieto protilátky môžu indukovať tvorbu

neutralizačných protilátok HAHA (human anti-human antibody). Štruktúrne typy MAb zobrazuje **Obr. 4**. (Klener a Klener, 2010), (Harris, 2004)

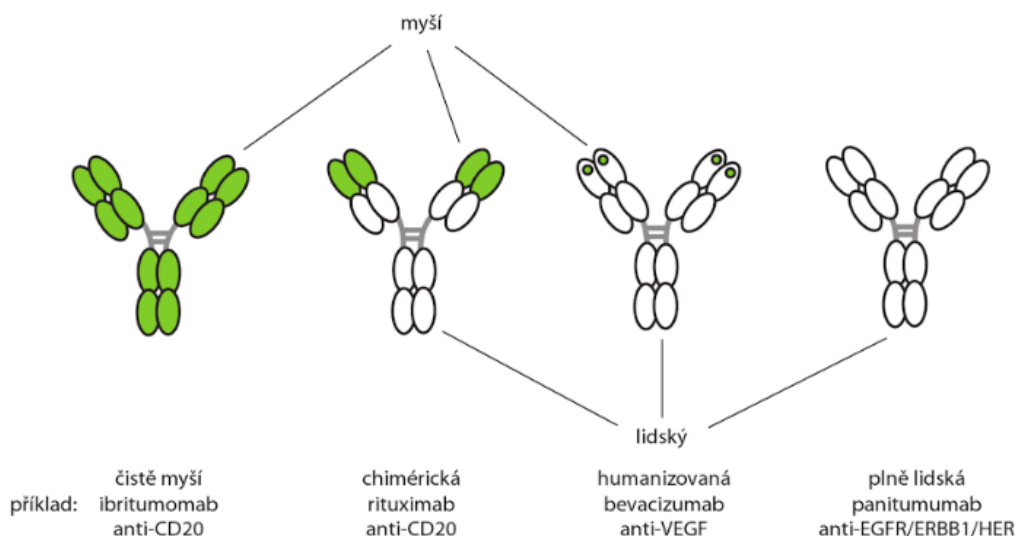
Z hľadiska pôvodu mAb sa v ich názvosloví zaviedli nasledujúce koncovky:

pre čisto myšie mAb **-momab**

pre chimerické mAb **-ximab**

pre humanizované mAb **-zumab**

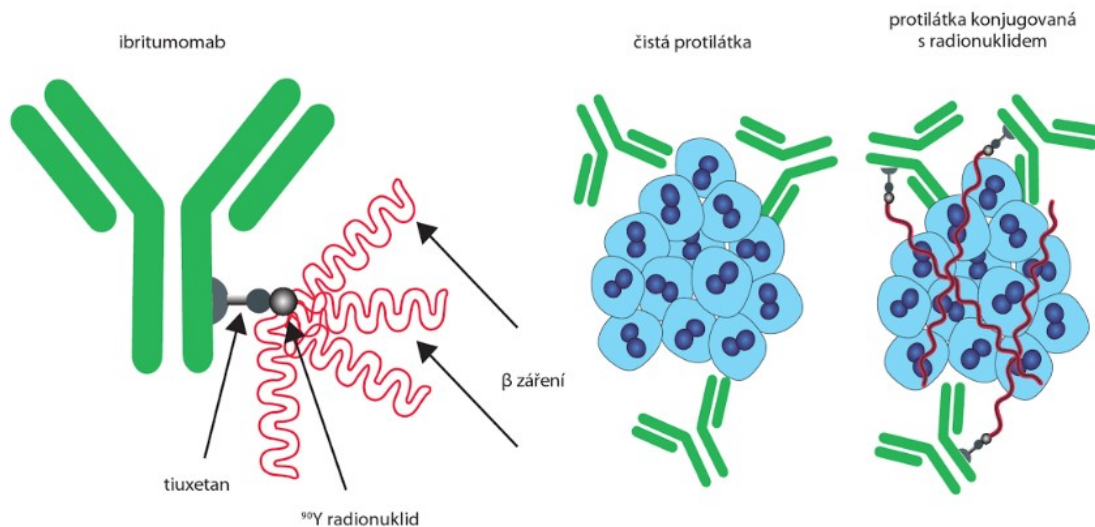
pre čisto ľudské **-mumab**



Obr. 4: Prehľad štruktúr monoklonálnych protilátok. Prevzaté z: Klener a Klener, 2010.

Čisto myšie protilátky sa používajú obmedzene, s výnimkou protilátok konjugovaných s rádionuklidom. Patria tu anti-CD20 protilátky ibritumomab tiuxetan (**Obr. 5**) s naviazaným rádionuklidom yttria (^{90}Y) pod komerčným názvom Zevalin a tositumomab s naviazaným rádionuklidom jódu (^{131}I) pod komerčným názvom (Bexxar) používaných k liečbe malígnych lymfómov. (Klener a Klener, 2010), (Krejsek a Kopecký, 2004), (Cwierka *et al.*, 2004)

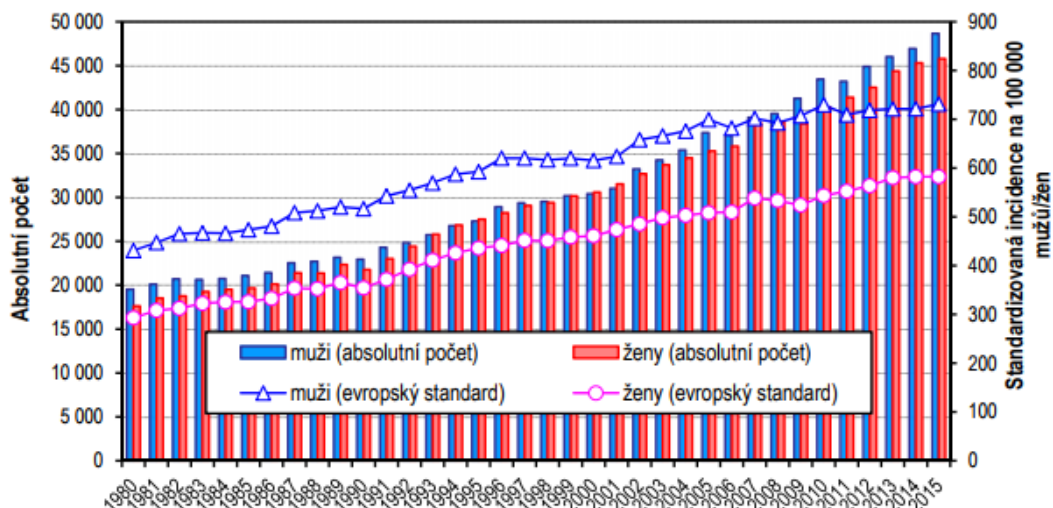
Potreba posilniť liečebnú účinnosť MAb, viedla ku konštrukcii konjugovaných protilátok, teda protilátok na ktorých je naviazaná terapeutická molekula a MAb, ktorá slúži ako terapeutický nosič. Konjugované protilátky môžu mať na svojej molekule naviazaný rádionuklid, cytostatikum, toxín alebo enzým. V praxi sa hlavne osvedčujú protilátky s naviazaným rádionuklidom. Rádionuklid sa pomocou protilátky dostane až k nádorovému tkanivu a vykazuje intenzívny cytotoxický účinok na nedostupné malígne elementy vo vnútri nádorovej hmoty. Oproti tomu, sa konjugácia monoklonálnej protilátky s cytostatikom využíva menej. (Sievers a Senter, 2013), (Klener a Klener, 2010)



Obr. 5: Znárodnenie účinku protilátky konjugovanej s rádionuklidom. Prevzaté z: Klener a Klener, 2010.

3.1.3 Incidencia zhubných nádorov

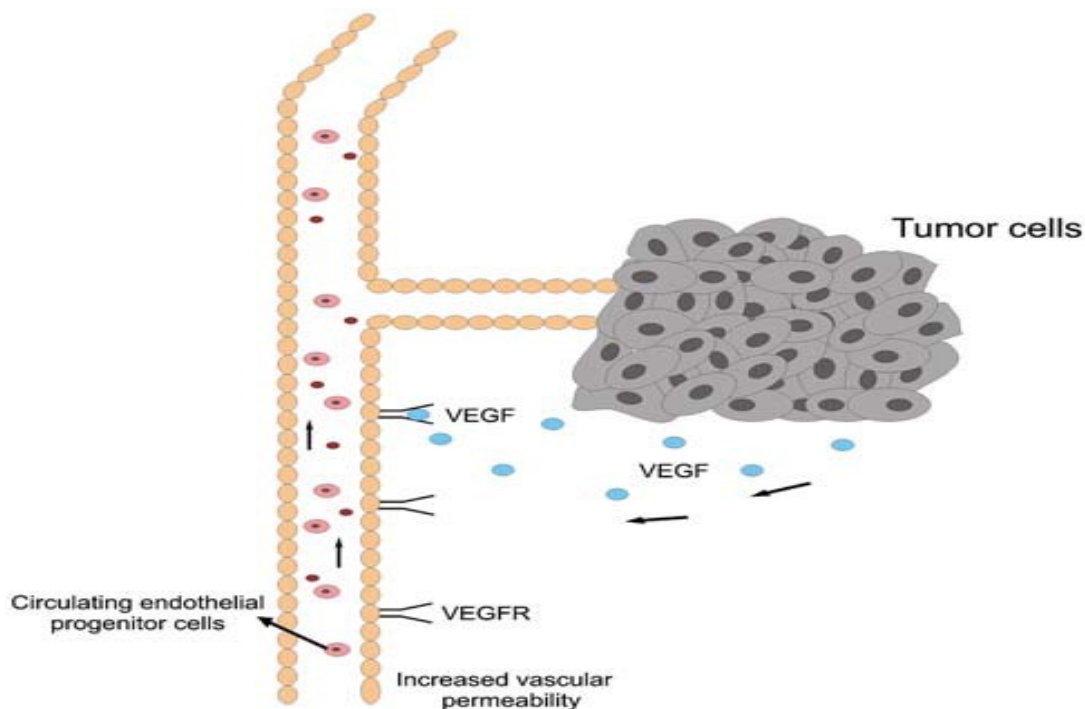
Incidenca zhubných novotvarov v ČR dlhodobom meradle rastie (**Obr. 6**). Pozitívne trendy stagnácie alebo dokonca mierneho poklesu u niektorých závažných diagnóz, ako je zhubný nádor pľúc u mužov alebo zhubný nádor kolorekta, vyvažuje nárast zhubného nádoru prsníka u žien a nárast incidence zhubného nádoru kože u oboch pohlaví. Úmrtnosť na zhubné nádory vykazuje v absolútnych číslach stagnáciu, v relatívnych ukazovateľoch, predovšetkým po štandardizácii k vekovej štruktúre obyvateľstva, pokles, ktorý je u oboch pohlaví od roku 2003 čoraz viac zreteľný. Po kardiovaskulárnych chorobách sú zhubné nádory druhou najčastejšou príčinou úmrtí v ČR. Rastúci počet hlásených prípadov zhubných nádorov môžeme čiastočne dávať do súvislosti so starnutím populácie v ČR. Ďalšími možnými vplyvmi na rastúcu incidenciu sú vyšší výskyt fyzikálnych a chemických kancerogénov, ktorý je spôsobený okrem iného znečistením životného prostredia a zmenami životného štýlu. Zhubný novotvar hrubého čreva a konečníka je jednou z najčastejšie onkologických diagnóz v ČR. V celosvetovom poradí štátov má Česká republika šiestu najvyššiu incidenciu tohto ochorenia. U oboch pohlaví je zhubný nádor kolorekta, po vylúčení "iného zhubného novotvaru kože", druhou najčastejšou onkologickou diagnózou po karcinóme prostaty u mužov a po karcinóme prsníka u žien. (<http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary>)



Obr.6 Graf: vývoj incidence zhubných nádorov a novotvarov u mužov a žien v ČR (1980-2015). Prevzaté z: <http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary>.

3.1.4 Cílená protinádorová terapia – inhibícia angiogenézy

Nádor potrebuje k svojmu rastu plynulý prísun kyslíka a živín. Medzi získané vlastnosti nádoru patrí schopnosť tvoriť cievy (angiogénny fenotyp), obdobne ako schopnosť tvoriť metastázy (metastatický fenotyp). Mikrovaskulárna denzita nádoru predstavuje významný prognostický znak pre vytvorenie vzdialených metastáz a pre celkové prežitie pacientov s karcinómom prs, pľúc, obličiek a kolorektálnym karcinómom. Vaskulogenéza je proces vývoja ciev z endoteliálnych prekursorov, nezávislý na už existujúcich cievach. Vznikajú ňou fyziologicky embryonálne cievy, ale uplatňuje sa aj pri novotvorbe ciev nádoru. Na svedomí ju majú cirkulujúce endoteliálne progenitory (CEP), ktoré pochádzajú z kostnej drene. Mobilizáciou CEP pôsobia faktory, ktoré hrajú kľúčovú rolu aj v angiogenézi. Je to predovšetkým VEGF a MMP9, významne sa uplatňuje tiež TGF- β . Cirkulujúce endoteliálne progenitory exprimujú na svojom povrchu obvykle receptory pre VEGF-B, KIT a CD133. Angiogenéza (**Obr. 7**) je proces vlastnej novotvorby ciev, ktorý sa uskutočňuje rôznymi mechanizmami. V prvom rade je to angiogenéza pučaním, tzv. sprouting angiogenéza. K iným mechanizmom novotvorby ciev patrí tzv. mozaikovitá cievy, u ktorých sú cievne steny tvorené čiastočne nádorovými bunkami. K ďalším alternatívnym mechanizmom patrí tzv. vaskulogénne mimikry, kedy nádorové bunky vytvárajú avaskulárne kanály, ktorými preteká krv, napojené na vlastné cievy. Koopcia ciev, sa nazýva proces, kedy nádor rastie pozdĺž už vytvorených ciev. (Klener a Klener, 2010), (Mashreghi *et al.*, 2017)



Obr. 7: Angiogenéza. Sekrécia VEGF je stimulovaná nádorom, hypoxiou, nízkym pH a mnohými ďalšími faktormi. VEGF sa viaže na jeho receptor (VEGFR) umiestnený na endoteliálnych bunkách (ECs) krvných ciev. ECs sa aktivujú a začínajú produkovať enzýmy a molekuly, ktoré povedú k šíreniu a rastu ECs. Medzi ďalšie účinky patrí mobilizácia endoteliálnych progenitorových buniek z kostnej drene, zvýšená vaskulárna permeabilita a indukcia tkanivového faktora. Prevzaté z : (Otrock et al., 2007).

Nadorová angiogenéza ja na rozdiel od fyziologickej novotvorby ciev proces dravý, nekontrolovaný. Kvôli tomu sú novovytvorené cievy nádoru nevyzreté, neusporiadané, chaotické, takmer bez vonkajšej vrstvy podporných stabilizačných buniek a bez súvislej bazálnej membrány. To má za následok vysoký prietok krvi do interstícia, časté krvácanie a trombózy, čo spôsobí zvyšovanie intratumorálneho tlaku. Dochádza k zlému prietoku krvi nádorom a často k hypoxickým nekrózom. Vplyvom zvýšeného tlaku v intersticiálnej tekutine klesá prienik chemoterapeutik do nádorového tkaniva. (Klener a Klener, 2013)

Kvôli týmto následkom sa angiogenéza nádorov, stala predmetom rozsiahleho výskumu a jej inhibícia sa objavuje ako racionálny a potenciálny prístup k liečbe nádorových ochorení. (Folkman, 2002)

3.2 Rádiofarmaká

Rádiofarmaká sú lieky obsahujúce chemické alebo biologicky aktívne látky, ktorých účinnou látkou je rádionuklid, ktorý je zdrojom ionizujúceho žiarenia. Používajú sa k diagnostike, terapií a poskytujú informácie o kinetike, orgánovej distribúcií, metabolizme a vylučovaní aplikovaných zlúčenín. Väčšina rádiofarmák sa podáva intravenózne, perorálne v roztokoch, želatínových tobolkách, inhalačne alebo lokálne. Rádiofarmaká obsahujú minimálne jeden včlenený rádionuklid, ktorý je určený svojim

fyzikálnym polčasom premeny, druhom a energiou žiarenia. Rádiofarmaká sú pripravované v podobe parenterálnych, perorálnych, inhalačných a topických prípravkov pre terapeutické a diagnostické účely. Sú vyrábané individuálne s použitím rádionuklidov s krátkym polčasom premeny alebo hromadne pripravované, ktoré obsahujú rádionuklid s dlhším polčasom rádioaktívnej premeny. V terapií sa uplatňuje len 5 % rádiofarmák. Zvyšných 95 % sa uplatňuje pre diagnostické účely. (Hanzalová, 2011), (Lázniček a Komárek, 1998)

Oproti iným liečivám majú rádiofarmaká vlastnosť, že obsah účinnej látky, ktorá je v prípade rádiofarmák včlenený rádionuklid, vplyvom rádioaktívnej premeny rádionuklidu sa exponenciálne s časom znižuje. Rádionuklidy používané pre diagnostiku patologických stavov by mali mať fyzikálny polčas premeny rádionuklidu primeraný dobe potrebnej pre klinické vyšetrenie. Rádionuklid by mal emitovať čisté žiarenie gama v rozmedzí 100-300 keV bez sprevádzajúceho korpuskulárneho žiarenia. V niektorých prípadoch môžu byť perspektívne pre diagnostické účely aj žiariče emitujúce časticové pozitronové žiarenie β^+ . Produktom rádioaktívnej premeny použitého rádionuklidu má byť stabilný nuklid. Rádionuklidy používané pre terapeutické účely musia emitovať žiarenie β^+ , kedy sú perspektívne aj niektoré žiariče alfa. Polčas premeny nemá byť príliš krátky ani dlhý, aby sa aplikácia nemusela častejšie opakovať. (Lázniček a Komárek, 1998)

3.2.1 Výroba rádiofarmák

Výroba rádiofarmák zahrňuje hromadnú prípravu v centrách pre prípravu rádiofarmák, alebo sa pripravujú priamo na oddeleniach nukleárnej medicíny. Rozdeľovacím faktorom medzi týmito typmi prípravy je polčas premeny použitého rádionuklidu. Rádiofarmakum, u ktorého je polčas premeny rádionuklidu dlhší než čas potrebný k jeho prevedeniu do liekovej formy, a doprava k odberateľovi je časovo i finančne výhodná, sa uskutočňuje jeho hromadná výroba. Hromadná príprava rádiofarmák má množstvo výhod, ako sú nižšie náklady, jednotnosť produktu, zaistenie akosti a možnosť využitia automatizácie a špeciálnych zariadení. Ako u ostatných liekov, sa výroba rádiofarmák musí tiež riadiť zásadami smerníc o správnej výrobnej praxi (SVP; *angl.* Good Manufacturing Practice - GMP). Smernice správnej výrobnej praxe sa uplatňujú ako súhrn opatrení a kontrolných postupov, ktoré zahrňujú oblasť farmaceutickej výroby a rešpektujú rádioaktivitu týchto prípravkov. Rádiofarmaká majú množstvo špecifik vo výrobe. Vyrábajú sa v pomerne malých šaržiach v súvislosti s polčasom premeny obsahujúceho rádionuklidu. Výroba musí prebiehať za dodržiavania podmienok radiačnej bezpečnosti a pravidlami ochrany pred nebezpečím ionizujúceho žiarenia. Zariadenia používané pri výrobných postupoch sú určené výhradne pre výrobu rádiofarmák. Aby sa zabránilo kontaminácií ovzdušia rádioaktivitou, nesmie byť vzduch, ktorý je odsávaný z pracovných priestorov recirkulovaný. Jedná sa o tzv. uzavretý systém výroby. Špecifiká sú aj v odlišných pracovných postupoch a dokumentačnej činnosti. Ďalším spôsobom prípravy je výroba kitov pre prípravu rádiofarmák. Z dôvodu uľahčenia prípravy a štandardizácie zloženia prípravkov značených krátkodobými rádionuklidmi, ktoré sa pripravujú na pracoviskách nukleárnej medicíny, boli zavedené kity. Kit

obsahuje nerádioaktívne zložky v sterilnej a lyofilizovanej forme, ktoré po pridaní roztoku rádionuklidu s ním vytvárajú požadovaný prípravok. Kit sa vyznačuje jednoduchou a rýchlou prípravou, štandardnosťou a reprodukovateľnosťou zloženia prípravku, chemickou čistotou, sterilitou, nepyrogeinitou a možnosťou dlhšieho skladovania jeho neaktívnej formy. Najčastejšie používané kity sú na prípravu ^{99m}Tc značených rádiofarmák. Kit pre prípravu rádiofarmaka značeného ^{99m}Tc obsahuje komplexotvornú látku (ligand), redukčné činidlo a ďalšie pomocné látky. (Lázniček a Komárek, 1998), (Hanzalová, 2011)

3.2.2 Rádionuklidy

Rádionuklidy sú atómy s nestabilným jadrom, ktoré podliehajú rádioaktívnym premenám. Rádionuklidy rozdeľujeme podľa typu premeny ich jadier do troch skupín na α , β a γ žiariče. Pri rádioaktívnych premenách musí byť zachovaná energia, hmotnosť a náboj rádionuklidu. (Kupka *et al.*, 2017), (Lázniček a Komárek, 1998)

Ťažšie atómové jadrá podliehajú hlavne α premene. U α premeny dochádza k emisií jadra hélia. Pri tejto premene sa protónové číslo rádioaktívneho jadra zmenšia o dve jednotky a jeho nukleónové číslo klesne o štyri jednotky. Príklady α žiaričov využívaných v nukleárnej medicíne sú ^{212}Bi , ^{213}Bi a ^{223}Ra . Beta žiariče rozdeľujeme do troch typov. U β^- žiaričov nastáva emisia záporne nabitých častíc (elektrónov), zároveň nastáva emisia antineutrína. Medzi príklady žiaričov uplatňovaných v nukleárnej medicíne, ktoré podliehajú typu tejto premeny, patria napr. ^{131}I , a ^{99}Mo . β^+ žiariče emitujú kladne nabité častice označované ako pozitrony. Pri tejto premene sa protónové číslo znižuje o jednotku. U β^+ žiaričov nastáva tiež emisia neutrína. Príklady β^+ žiaričov uplatňovaných v nukleárnej medicíne sú ^{64}Cu , ^{18}F , ^{15}O a ^{52}Fe . Tretí typ žiaričov sú žiariče elektrónového záchytu, kde jadro zachytí jeden z planetárnych elektrónov. V jadre nastáva zmena, kedy sa jeden nukleón zmení z protónového stavu na stav neutrónový za súčasnej emisie neutrína. Medzi príklady žiaričov elektrónového záchytu patria ^{67}Ga , ^{125}I a ^{111}In . (Reilly, 2010), (Koranda *et al.*, 2014), (Lázniček a Komárek, 1998)

Gama žiarenie nastáva, keď sa z jadra uvoľňuje nadbytok energie vo forme vysokoenergetického prúdu fotónov. Gama žiarenie sa môže vyskytovať ako vedľajšie žiarenie u niektorých β^- žiaričov v energeticky vzbudenom stave. Príkladom je ^{131}I , ktorý patrí medzi zmiešané β a γ žiariče a preto sa dá využiť ako pre diagnostické účely tak aj pre účely terapeutické. Žiarenie γ je veľmi prenikavé, preto sa používa najmä na diagnostické účely. Na diagnostické účely sa využíva aj žiarenie β^+ . Žiarenie β^- a α sú využívané prevažne k terapeutickým aplikáciám. Žiarenie γ emituje tiež najpoužívanejší rádionuklid v nukleárnej medicíne ^{99m}Tc . (Lázniček a Komárek, 1998), (Nový, 2014)

3.2.3 Príprava rádionuklidov

Na prípravu rádionuklidov používaných v nukleárnej medicíne sa používajú špeciálne zariadenia. Medzi tieto zariadenia patrí cyklotrón a jadrový reaktor. Pri príprave rádionuklidov sa umelo vyvolávajú jadrové reakcie. Princípom týchto reakcií je, že zo stabilných prvkov terčového materiálu vznikajú požadované rádionuklidy. V niektorých prípadoch sa využívajú aj produkty štiepenia ťažších atómových jadier. Ďalší spôsob

prípravy rádionuklidov je samovoľná rádioaktívna premena z materského prvku na dcérsky prvok, ktorý je rádioaktívny a má vhodné vlastnosti pre použitie v nukleárnej medicíne. Tieto premeny sa tvoria v rádionuklidových generátoroch. Hlavnou úlohou jadrových reaktorov je výroba energie, ale dá sa využívať aj ako zdroj neutrónov pre prípravu rádionuklidov. V jadrovom reaktore sú rádionuklidy pripravované ožarovaním stabilných jadier termálnymi neutrónmi. Termálne neutróny sú neutróny s malou energiou. V tomto zariadení sa uskutočňuje riadená reťazová štíepna reakcia. (Lázniček a Komárek, 1998)

Cyklotróny sú urýchľovače kladne nabitých častíc ako protóny, deuteróny, alfa častice a iné. Urýchlenie sa deje v elektrickom poli na takú energiu, že tieto častice sú schopné po dopade na vhodný terč pri interakcii s jadrami terču vyvolať požadovanú jadrovú reakciu. Dôležitým faktorom, ktorý ovplyvňuje pohyb urýchlených častíc je magnetické pole. Pri príprave rádionuklidu v cyklotróne dochádza k zmene protónového čísla, teda vzniká jadro iného chemického prvku než sú jadrá terčové. (Lázniček a Komárek, 1998)

Generátory rádionuklidov produkujú rádionuklidy s krátkym polčasom, tým minimálne zaťažujú vyšetrovaného pacienta radiáciou a umožňujú vysokú kvalitu zobrazenia. Generátorové systémy používané v nukleárnej medicíne sú založené na existencii dvojice rádioaktívnych prvkov, z ktorých materský sa premenou beta alebo elektrónovým záchyтом mení na dcérsky rádionuklid s krátkym polčasom premeny. Najpoužívanejším generátorom je generátor $^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$, pretože väčšina rádiofarmák pre diagnostiku tvoria rádiofarmaká značené $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Pre nukleárnu medicínu a jej potreby je to najdôležitejší generátor, pretože $^{99\text{m}}\text{Tc}$ má ideálne fyzikálne vlastnosti a jadrové charakteristiky. Emituje žiarenie gama o energií 140 keV, jeho polčas premeny je 6 hodín, takže radiačne zaťaženie organizmu pacienta je malé a informácie pre diagnostiku kvalitné. Veľkosť energie gama žiarenia je ľahko detekovateľná a teda zobraziteľná gama kamerami dostupnými vo všetkých zariadeniach nukleárnej medicíny. Jeho relatívne krátky polčas minimalizuje vystavenie žiareniu pacientov podstupujúcich zobrazovacie postupy, ale na druhú stranu z hľadiska práve jeho krátkeho fyzikálneho polčasu vyžaduje rýchle označovanie protilátok alebo peptidov. (Lázniček a Komárek, 1998), (Koranda *et al.*, 2014)

3.2.4 Značenie monoklonálnych protilátok pomocou rádionuklidu

Halogenácia a chelatácia sú dva základné mechanizmy, ktorými sa značia monoklonálne protilátky. Najpoužívanejší typ halogenácie je jodácia. Pri nepriamej jodácii sa jóduje zvolená látka a potom nasleduje jej konjugácia s protilátkou. Medzi metódy priamej jodácie patrí jódogenová metóda a metóda chloramínu T. (Nový, 2014) (Reilly, 2010)

Chloramín T je sodná soľ N-monochlór-p-toulénsulfonamidu, ktorá oxiduje rádioaktívny jodid. Výsledkom tejto reakcie je rádioaktívny monovalentný jódový kation, ktorý jóduje jadrá tyrozínu na peptidovom reťazci proteínu monoklonálnej protilátky. Týmto vzniká protilátka značená rádioaktívnym jódom. V jodogénovej metóde sa

k bielkovine značenej rádioaktívnym jodidom pridá jodogén (1,3,6-tetrachlor-3 α ,6 α -difenyglykoluril) rozpustený v metylchloride. A opäť týmto spôsobom nastáva jodácia aminokyseliny tyrozínu v molekule monoklonálnej protilátky. (Nový, 2014), (Reilly, 2010)

Chelatácia je proces náročnejší než priama jodácia. Najprv nastáva konjugácia monoklonálnej protilátky s chelatačným činidlom a následne sa značí protilátka s rádionuklidom a vzniká komplex s chelátorom. (Nový, 2014)

Technécium-99m (^{99m}Tc), ktoré je najrozšírenejší, najlacnejší a najčastejšie používaný rádionuklid v nukleárnej medicíne a je teda atraktívnym kandidátom na označovanie monoklonálnych protilátok, ich fragmentov a tiež peptidov na zobrazovanie nádorov. Existuje niekoľko prístupov k označovaniu molekúl s ^{99m}Tc . Tie zahŕňajú priame metódy, ktoré sa spoliehajú na väzbu ^{99m}Tc na endogénne thioly generované redukciou disulfidových väzieb v monoklonálnych protilátkach, alebo chemicky zavedené reakciou s thiolujúcimi činidlami, ako je napr. 2-iminothiolan. Nepriame metódy, zahŕňajú väzbu ^{99m}Tc na chelátotvorné činidlo, ktoré sa potom konjuguje s MAb alebo peptidom (prístup tzv. predformovaného chelatačného činidla) alebo s chelátorom už začleneným do biomolekuly. Existujú výhody a nevýhody každej z týchto stratégií s ohľadom na jednoduchosť použitia, stabilitu *in vivo* a prispôsobivosť formulácii súpravy.

Molekula MAb v rámci priameho značenia technéciom môže byť označená jednoducho pomocou redukcie malého podielu (<5%) inter- alebo intra-reťazových disulfidových väzieb na voľné thioly spracovaním s 2000-násobným molárnym prebytkom 2-merkaptoethanolu počas 30 minút. (REILLY, 2010)

Jedna z metód nepriameho značenia pomocou chelatačných činidiel využíva chelátotvornú zlúčeninu sukcinimidyl-6-hydrazínnonikotínamid (HYNIC). Ako koligandy reakcie, ktoré obsadia zostávajúce koordinačné väzby ^{99m}Tc pre zaistenie jeho stability v molekule chelátoru HYNIC sa môže použiť kyselina ethyléndiamíndioctová (EDDA), alebo kyselina ethyléndiamíntetraoctová (EDTA), či tricín alebo glukohexonát za výsledného vzniku stabilného ^{99m}Tc komplexu s biomolekulou. Táto metóda rádioaktívneho značenia bola opísaná Abramsom a spol. v roku 1990 (Abrams et al. 1990). HYNIC je konjugovaný na molekule MAb alebo na jej fragmentoch, alebo na peptidoch s použitím prebytku HYNIC-N-hydroxysukcinimidového esteru, alebo inej chemicky reaktívnej formy, ktorý tvorí amidovú väzbu s N-koncom alebo ϵ -aminoskupinami v lyzínoch. NHS ester ľahko tvorí amidovú väzbu s voľnou aminoskupinou proteínu. Po chromatografickom čistení sa konjugát HYNIC-protilátka označuje ^{99m}Tc počas inkubácie s $^{99m}\text{TcO}_4^-$ v prítomnosti redukčného činidla SnCl_2 a koligandu. Koligandy sú potrebné, pretože HYNIC zaberá iba jedno alebo dve zo šiestich koordinačných miest ^{99m}Tc . Cínaté ióny sú zahrnuté do reakcie rádioaktívneho značenia na zníženie oxidačného stavu technécia 7^+ do oxidačného stavu 4^+ , v ktorom je rádioaktívny technécium reaktívny a je následne schopný tvoriť komplex s molekulou HYNIC. (Meszaros *et al.*, 2010)

3.2.5 Farmakokinetika a farmakodynamika rádiofarmák

Správanie rádiofarmák v organizme závisí od ich distribúcie, metabolizmu a eliminácie. Distribúcia a eliminácia rádiofarmák sú závislé na mnohých faktoroch ako napr. väzba na krvné elementy, krvný prietok a permeabilita kapilár. Dĺžku pobytu látky v organizme ovplyvňuje transformácia vo vnútri bunky. Podľa dĺžky doby pretrvávania v cieľových orgánoch rozdeľujeme rádiofarmaká do dvoch skupín. V prvej skupine sa nachádzajú rádiofarmaká s dlhou dobou pretrvávania. Táto vlastnosť sa využíva pri statickej scintigrafii a jednofotónovej emisnej výpočtovej tomografii (SPECT, *angl.* Single Photon Emission Computed Tomography). Druhá skupina zahŕňa rádiofarmaká s plynulým transportom cieľovými organmi. Efektívny polčas T_{ef} , ktorý charakterizuje celkový pokles aktivity rádiofarmaká v organizme, závisí na biologickom polčase T_b (doba, za ktorú sa z organizmu vylúči polovica množstva podanej látky), a tiež na fyzikálnom polčase premeny T_f . (Koranda *et al.*, 2014) Rovnica vyjadrujúca tento vzťah je:

$$\frac{1}{T_{ef}} = \frac{1}{T_b} + \frac{1}{T_f}$$

3.2.6 SPECT a PET

Jednofotónová emisná počítačová tomografia je flexibilná a všeobecne dostupná zobrazovacia technika, ktorá je schopná vizualizovať a kvantifikovať zmeny v systéme cerebrálneho krvného toku a neurotransmitterových systémoch. (Newberg a Alavi, 2009).

SPECT bola predstavená začiatkom osemdesiatych rokov minulého storočia ako nástroj na hodnotenie regionálnych štúdií cerebrálnej perfúzie a hustoty receptorov. Indikátor prietoku alebo látka viažuca receptor, sa označuje rádionuklidom a následne sa aplikuje intravenózne. Rádionuklidy vhodné na označenie MAb alebo peptidov na zobrazovanie nádorov pomocou SPECT musia emitovať dostatočne silné γ žiarenie. Optimálne rozmedzie energií γ žiarenia pre zobrazenie SPECT sú 100 až 300 keV. Snímky SPECT sa generujú pomocou gama kamier alebo obrazových systémov kruhového typu, ktoré zaznamenávajú fotóny emitované sledovačom zachyteným v orgáne. SPECT má za následok lepšiu kvalitu obrazu ako dvojrozmerné alebo planárne zobrazovanie, pretože sa navzájom neprekrývajú. Výsledkom je výrazný nárast kontrastu medzi objektom a pozadím (pomer signálu k šumu). Zobrazenia trupu, orgánov alebo tkaniva, sa rekonštruujú pomocou spätnej extrapolácie detekčných línií získaných každou kamerovou hlavou. (Reilly, 2010)

V závislosti od typu zobrazovacieho systému a použitého indikátora sa rozlíšenie pohybuje od 14 do 17 mm plnej šírky pri polovici maxima (FWHM, *angl.* full width at half maximum) pre jednokomponentné gama kamery, ktoré sa dnes zriedka používajú na zobrazovanie mozgu. Ďalej môže byť rozlíšenie od 8 do 10 mm FWHM pre tri a štvorhlavých kamerových systémov a tiež od 7 do 8 mm FWHM pre špeciálne obrazové systémy s krúžkovým typom. Doba skenovania v SPECT závisí od zobrazovacieho systému, typu rádiofarmaká a požadovanej kvality obrazu. Zobrazenia s vysokým rozlíšením je možné získať súčasou technológiou za približne 20 až 30 minút. Objemová

zobrazovacia kapacita väčšiny systémov SPECT umožňuje rekonštrukciu pod ľubovoľným uhlom pre axiálne, koronálne a sagitálne roviny, alebo v rovnakom uhle zobrazenia získanom pomocou výpočtovej tomografie (CT) alebo magnetického rezonančného zobrazenia (MRI). (Phelps, 2007)

Najčastejšími rádionuklidy, ktoré sú vhodné na označovanie biomolekúl pre zobrazovanie nádorov pomocou SPECT sú ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{123}I a ^{131}I . (Reilly, 2010)

Ďalšia zobrazovacia metóda, ktorá využíva emisiu pozitronov z vhodných rádionuklidových žiaričov je pozitronová emisná tomografia (PET). Pozitrony sú β^+ častice, ktoré sú emitované, keď sa protón konvertuje na neutrón v rozpadovej schéme niektorých rádionuklidov na stabilné elementy. β^+ častice sa spoja s okolitými elektrónmi a tým dôjde k tzv. anihilácii („vynulovaniu“) s následným vznikom dvoch anihiláčnych fotónov s energiou 511 keV. Vyžiarení týchto fotónov z miesta anihilácie opačným smerom v tom istom okamžiku, dopadnú súčasne na detektory, ktoré zaznamenajú impulz, ktorý preposielajú do počítača. (Makaiova, 2006)

Konštrukcia PET skenera sa skladá z cylindrického prstenca detektorov s priemerom 80 až 100 cm s axiálnym rozsahom 10 až 20 cm. Detektory sú chránené pred vonkajším žiarením hrubými olovenými štítmami. Všetky komerčne dostupné PET skenery získavajú údaje pre 3D zobrazenie buď zobrazením celého objemu ako jednotky alebo pomocou ukladania susedných 2D rezov do jedného obrazu. Rádionuklidy vhodné na označenie biomolekúl pre zobrazenie nádorov pomocou PET sú napríklad: ^{124}I , ^{76}Br , ^{18}F , ^{94m}Tc , ^{110m}In , ^{86}Y , ^{68}Ga a ^{64}Cu . Z prístrojového hľadiska je PET až o 30-krát citlivejší ako SPECT a preto kvantifikuje obsah rádiofarmaka v tele presnejšie. (Ollinger a Fessler, 1997) (Reilly, 2010)

3.3 Vaskulárny endoteliálny rastový faktor a jeho receptory

3.3.1 VEGF typy

Inhibítory angiogenézy priniesli významný pokrok v liečbe niekoľkých nádorov ako sú kolorektálny, pľúcny, ovariálny a renálny karcinómov. Angiogenéza sa vyskytuje počas bežnej obmeny tkaniva, organogenézy vrátane embryonálneho vývoja u stavovcov, menštruácie a hojenia rán. Naopak, aberantná angiogenéza môže prispieť k rozvoju patogenézy u nie neoplastických porúch (napr. diabetická retinopatia) ako aj u neoplastických porúch. Angiogenéza sprevádzajúca nádorové ochorenie je základným procesom pre rast nádoru, pretože zabezpečuje zásobovanie kyslíkom a živinami na proliferáciu buniek prostredníctvom vývoja nových krvných ciev, ktoré môžu spôsobiť progresiu metastázy nádoru. (Fontanella *et al.*, 2014)

Rastový faktor vaskulárneho endotelu (VEGF) je prototyp veľkej rodiny angiogénnych a lymfangiogénnych rastových faktorov, ktoré zahŕňajú šesť štrukturálne homológických, sekretovaných glykoproteínov. Patria tu VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E a placentárny rastový faktor (PlGF). Je to skupina kľúčových proteínov zapojených do angiogénnej reakcie. VEGF-A (bežne označovaný ako VEGF)

bol prvý faktor, z týchto faktorov, ktorý bol identifikovaný na základe schopnosti indukovať cievnu permeabilitu. (Youssofian *et al.*, 2007)

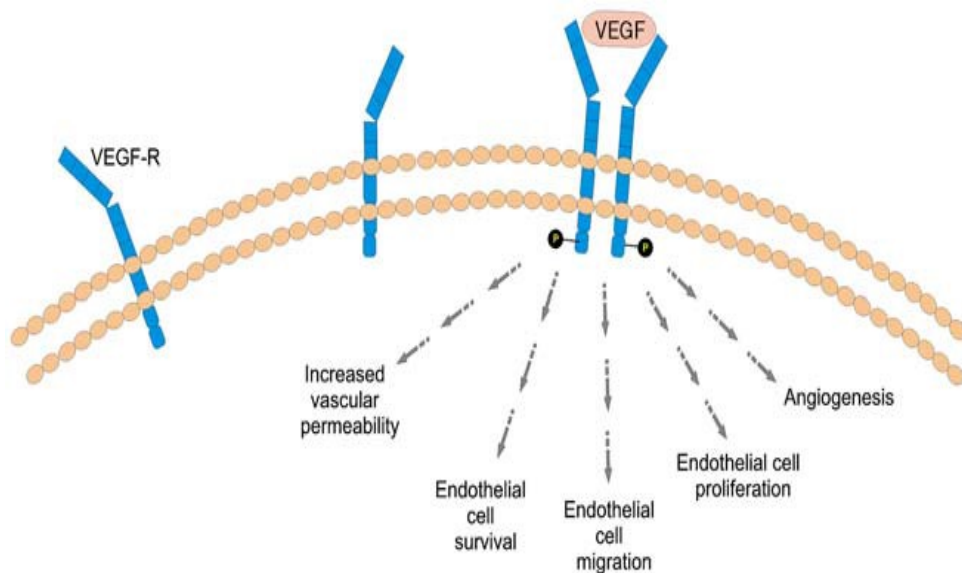
Následným klonovaním génu VEGF boli odhalené izoformy (121, 145, 165, 183, 189 a 206) rôznych veľkostí podľa počtu aminokyselín v biomolekule VEGF, ktoré sú výsledkom alternatívneho zostrihu. Najpočetnejšími boli VEGF₁₂₁ a VEGF₁₆₅. Rozdiely v expresii izoformiem VEGF sa môžu týkať odlišných úloh pri normálnej a abnormálnej angiogenézy. Okrem štrukturálnych a kvantitatívnych zmien izoformy VEGF, tiež vykazujú rozdiely v biologickej dostupnosti, väzbovej afinite k zvyškom v extracelulárnej matrici a mitogénnej účinnosti. Napríklad VEGF₁₂₁ je prítomný a ľahko vylučovaný v systémovom obehu, zatiaľ čo VEGF₁₈₉ a VEGF₂₀₆ sú izolované v extracelulárnom mikroprostredí a uvoľnené až po proteolytickom štiepení. Oligomerizácia VEGF izoformy zvyšuje biologickú zložitosť systému kontroly angiogenézy. VEGF ligandy môžu tvoriť buď homodiméry alebo heterodiméry, ktoré sa môžu diferencne viazať a aktivovať príbuzné receptory. Bohatá rôznorodosť týchto látok vedie v niektorých prípadoch k určitému stupňu nadbytočnosti, v iných prípadoch slúži na vytvorenie hranice medzi špecializáciou a funkciou normálnych fyziologických procesov, ako je napr. vytvorenie nových cievnych alebo lymfatických kanálov, udržanie cievneho tonusu a patologických procesov. (Youssofian *et al.*, 2007), (Fontanella *et al.*, 2014)

3.3.2 VEGF-A

VEGF-A bol najprv identifikovaný Sengerom a kol., ako faktor vaskulárnej permeability vylučovaný bunkami nádoru. (Senger *et al.*, 1983) Je to najlepšie charakterizovaný a najviac preskúmaný člen rodiny VEGF. Je to nádorovo vylučovaný cytokín s kritickým významom v normálnej aj nádorovej angiogenéze. Gén VEGF, ktorý je umiestnený na krátkom ramene chromozómu 6, je zložený z ôsmich exónov. Boli získané štyri zrelé izoformy :VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ a VEGF₂₀₆, kde číselné označenie izoformy označuje počet aminokyselín v molekule. Okrem toho boli identifikované aj niektoré menej bežne exprimované izoformy (VEGF₁₄₅ a VEGF₁₈₃). VEGF₁₆₅ je prevládajúca izoforma a je nadmerne exprimovaná v rôznych nádoroch. Nedávno sa ukázalo, že VEGF₁₆₅ môže byť významný biologický indikátor invazívnosti pooperačných recidív hepatocelulárneho karcinómu. Predpokladá sa, že VEGF₁₈₉ je najsilnejší pre vaskularizáciu v rôznych typov nádorov. VEGF-A má svoj biologický účinok prostredníctvom interakcie s povrchovými receptormi na bunkách. Tieto receptory sú transmembránové tyrozínkinázové receptory a zahŕňajú receptor VEGFR-1 a VEGFR-2 selektívne exprimovaných na cievnych endoteliálnych bunkách a ďalej neuropilínové receptory (NP-1 a NP-2) vyjadrené na cievnom endoteli a neurónoch. Po naviazaní VEGF-A na extracelulárnu doménu receptoru, sa po dimerizácií a autofosforylácií intracelulárneho tyrozínkinázového receptoru, aktivuje kaskáda downstream proteínov (**Obr. 8**). VEGFR-2 je hlavný receptor zodpovedný za sprostredkovanie proangiogénnych účinkov VEGF-A. (Otrock *et al.*, 2007)

VEGF-A je najsilnejší známy proangiogénny proteín. Indukuje proliferáciu, púčaním, tzv. sprouting, a tvorbu tubulov endotelových buniek. Je tiež silným faktorom prežitia pre endotelové bunky. Preukázalo sa, že vyvolávajú expresiu antiapoptotických

proteínov v týchto bunkách. VEGF-A tiež spôsobuje vazodilatáciu endotelu aktiváciou NO syntázy a tým zvyšuje produkciu oxidu dusnatého. VEGF-A viaže veľa receptorov buniek na hematopoetickom systéme (HSCs) u monocytov, osteoblastov a neurónov. To indukuje HSC mobilizáciu z kostnej drene, chemoatrakciu monocytov a osteoblastom sprostredkovanú tvorbu kosti. VEGF-A ovplyvňuje dôležité angiogénne procesy vrátane hojenia rán, ovulácie, udržiavania krvného tlaku, menštruácie a tehotenstva. Transgénne myši, nadmerne exprimujúce VEGF-A v koži, majú hojnú kožnú angiogénu a kožnú psoriázu. Nadmerná expresia VEGF-A v myšej pokožke tiež urýchľuje experimentálny rast nádorov. Avšak myši s mutovaným VEGF-A vykazujú oneskorené hojenie rán. VEGF-A sa exprimuje prakticky vo všetkých solídnych nádoroch ako aj pri niektorých hematologických malignitách. V poslednej dobe bol VEGFR-A (špecificky VEGF₁₈₉) nadmerne exprimovaný u pacientov s metastázujúcim adenokarcinóm pľúc. V skutočnosti boli nájdené korelácie medzi hladinou expresie VEGF-A, progresiou ochorenia a prežitie viacerých druhov nádorov.(Otrock *et al.*, 2007), (Roskoski, 2007)



Obr. 8: VEGF a jeho receptor. Naviazaním VEGF na jeho receptor vedie k dimerizácii receptora, k aktivácii receptorových tyrozínkináz autofosforyláciou. To vedie k ďalším biologickým účinkom na endotelové bunky. Receptory VEGF sú transmembránové tyrozínkinázy, ktoré po naviazaní ich ligandov na extracelulárnu doménu receptora a nasledujúcou dimerizáciou spustí proces vlastnej autofosforylácie intracelulárnych receptorových tyrozínkináz a tým aktivujú kaskádu syntézy intracelulárnych proteínov. Prevzaté z: (Otrock *et al.*, 2007).

3.3.3 VEGF-B

Ľudský gén VEGF-B obsahuje osem exónov a šesť intrónov a je umiestnený na 11. chromozóme. VEGF-B poskytuje alternatívnym spájaním dve polypeptidové formy, VEGF-B₁₆₇ a VEGF-B₁₈₆. Promótorová oblasť VEGF-B obsahuje niektoré dôležité rozdiely v porovnaní s VEGF-A a tie pravdepodobne vysvetľujú rozdiely v regulácii fyziologických stimulov. Hypoxia alebo chlad, ktoré môžu indukovať expresiu VEGF-A, neregulujú hladiny VEGF-B. Molekulárne mechanizmy, ktoré regulujú expresiu VEGF-B, nie sú ešte stále dostatočne vysvetlené. VEGF-B sa viaže na VEGFR-1, ale nie

na VEGFR-2 a VEGFR-3. Presná úloha VEGF-B *in vivo* nie je doposiaľ známa. VEGF-B je vysoko exprimovaný v priečne pruhovaných svaloch, myokarde a v hnedom tuku. U myši s deficitom VEGF-B sa zistilo, že majú menšie srdce a zhoršené zotavovanie sa po experimentálne indukovanom infarkte myokardu. To naznačuje, že regenerácia koronárnych ciev pomocou arteriogenézy, by mohla byť závislá na VEGF-B. VEGF-B môže mať určitú úlohu pri zápalovej angiogenéze, na základe zistenia u knockout myši, ktoré vykazovali znížené angiogénne odpovede v kolagénom vyvolanej artritíde. Mnoho experimentálnych dôkazov naznačuje, že VEGF-B môže modulovať proliferáciu buniek a rast ciev. Hladiny VEGF-B vzrastajú počas vývoja a po pôrode korelujú s progresiou srdcovej angiogenézy. U dospelých myši sa vyskytujú najvyššie hladiny transkriptov VEGF-B v mozgu, v srdci, v obličkách a semenníkoch, zatiaľ čo nižšie hladiny sa nachádzajú v pečeni, pľúcach a slezine. VEGF-B mRNA sa nachádza v niekoľkých ľudských novotvarov vrátane benígneho tymómu, karcinómu prsníka, fibrosarkómu, non-Hodgkinovom lymfóme a v primárnom a metastázujúcom melanóme. Zdá sa, že VEGF-B je veľmi potrebný pre normálnu srdcovú funkciu u dospelých jedincov, ale nie je potrebný na vývoj kardiovaskulárneho systému alebo pre angiogenézu. Avšak jeho expresia v ľudských nádoroch a jeho schopnosť aktivovať VEGFR-1 a neuropilín-1, predstavuje VEGF-B ako potenciálny protinádorový cieľ. (Otrock *et al.*, 2007), (Roskoski, 2007)

3.3.4 Receptor pre VEGF a antiangiogénna liečba

VEGF a jeho receptor sú vysoko exprimované v mnohých typoch nádorov vrátane nádoru tráviaceho traktu. Faktory ako hypoxia, zápalové cytokíny, nízke pH, ako aj tlmenie špecifických tumor supresorových génov alebo aktivácia onkogénov, majú za následok zvýšenú produkciu VEGF. Členovia rodiny VEGF sa viažu na tri rôzne typy tyrozínkinázových receptorov (TK), ktoré tak rozlišujeme na VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1-KDR) a VEGFR-3, ktorý sa exprimuje na lymfatických uzlinách a vaskulárnom endotele. VEGFR-2 predstavujúci transmembránový TK receptor typu II sa je exprimovaný na endotelových bunkách a na endoteliálnych progenitorových bunkách cirkulujúcej kostnej drene. VEGFR-2 je hlavným mediátorom VEGF-indukovanej angiogénnej signalizácie. Tento receptor obsahuje tri rôzne časti a to extracelulárnu doménu Ig oblasti, hydrofóbnú transmembránovú oblasť obsahujúcu TK doménu a intracelulárny koniec karboxylového reťazca. VEGFR-2 viaže všetky izoformy VEGF-A, VEGF-C a VEGF-D. Naopak, VEGFR-1 je selektívny ligand len pre VEGF-B a PlGF peptidy. VEGFR-2 má nižšiu afinitu k VEGF než VEGFR-1, ale má silnejšiu kinázovú aktivitu. Väzbová afinita VEGF ligandov k ich receptorom je zvýšená prítomnosťou dvoch neenzymatických koreceptorov neuropilínu typu 1 (NRP-1) a typu 2 (NRP-2). Vzhľadom k tomu, že expresia NRP receptorov je spájaná s agresivitou nádoru a zlou prognózou, sú tieto molekuly v súčasnosti skúmané ako potenciálne antiangiogénne ciele. (Youssoufian *et al.*, 2007), (Fontanella *et al.*, 2014)

Väzba VEGF-A na VEGFR-2 indukuje kaskádu rôznych signalizačných ciest. Dimerizácia receptora a nasledujúca autofosforylácia tyrozínových zvyškov v intracelulárnej TK doméne, vedú k súčasnej aktivácii PLC- γ -Raf kinase-MEK-MAP kinázy a PI3K-AKT dráhy, ktoré spôsobujú bunkovú proliferáciu a prežívanie

endotelových buniek. Štyri tyrozínové zvyšky Tyr951, Tyr996, Tyr1054 a Tyr1059 reprezentujú kritické autofosforylačné miesta a slúžia ako miesta s vysokou afinitou pre rôzne signalizačné proteíny. Interakcia signalizačných proteínov s VEGFR-2 môže viesť k zmenám v proliferácii buniek, k migrácii, diferenciácii, zvýšeniu vaskulárnej permeability a cievnej integrite. Rozpustná cirkulujúca forma VEGFR-2 sa môže nachádzať v ľudskej plazme. Medzi stratégie blokovania týchto ciest patrí použitie špecifických inhibítorov (protilátky alebo malé molekuly), ktoré sa môžu viazať na VEGF, alebo interferovať s inými doménami VEGFR. (Youssoufian *et al.*, 2007), (Fontanella *et al.*, 2014)

Receptory VEGFR-2 a VEGFR-1 sú exprimované prevažne v endotelových bunkách, ale niekoľko ďalších typov buniek exprimuje jeden alebo obidva tieto receptory. Receptor VEGFR-1 je exprimovaný v trofoblastových bunkách, monocytoch a renálnych mesangiálnych bunkách. VEGFR-2 je exprimovaný aj v hematopoetických kmeňových bunkách, megakaryocytoch a retinálnych progenitorových bunkách. V sietnici sú ako výsledok alternatívneho zostrihu vyjadrené dve funkčné formy VEGFR-2. Okrem toho existujú typy tumorogénnych buniek, ktoré exprimujú VEGFR-2 alebo VEGFR-1. Patria sem napríklad bunky malígneho melanómu. Obidva typy receptorov môžu transdukovať signály iných rastových faktorov patriacich do rodiny VEGF, ale iba VEGF-A izoformy sa môžu viazať na VEGFR-1 a na VEGFR-2. Transkripcia VEGFR-1, ale nie VEGFR-2, je zvýšená hypoxiou. Produkcia VEGFR-2 je tiež regulovaná za hypoxických podmienok, ale mechanizmus zodpovedný za indukciu sa zdá byť posttranskripčný. (Neufeld *et al.*, 1999)

Medzi mnohými dôvodmi na dosiahnutie úspechu v terapeutickom vývoji v tejto oblasti je, že sa takéto zlúčeniny pravdepodobne prejavujú s bezpečnejším profilom než konvenčné nešpecifické cytotoxické činidlá. Na rozdiel od nádorových buniek, endotelové bunky sú geneticky stabilné a teda menej pravdepodobne vyvinú odolnosť voči ich účinkom ako výsledok novozískaných somatických mutácií v tejto dráhe. (Youssoufian *et al.*, 2007)

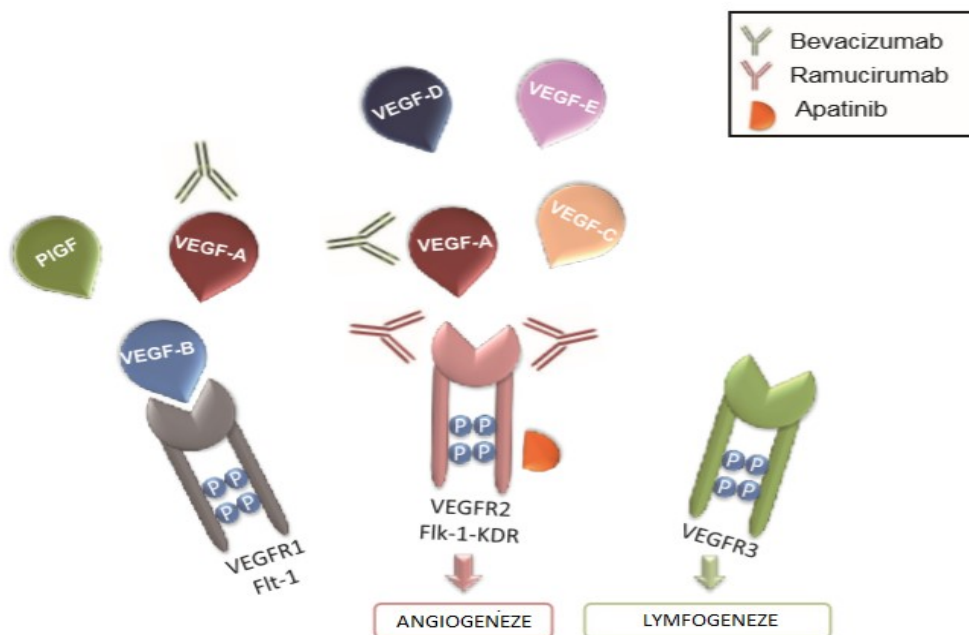
Za posledné desaťročie bolo objavených mnoho monoklonálnych protilátok a malých molekúl, ktoré sa špecificky zameriavajú na VEGF dráhu. VEGF a jeho receptory sú bohato zastúpené v mnohých ľudských nádoroch. Patria medzi nich karcinómy gastrointestinálneho traktu, pankreasu, prsníka, močového mechúra, obličiek, endometria a Kaposiho sarkóm. Okrem toho, je tiež zaznamenaná vyššia expresia vo von Hippel-Lindau syndróme a vo väčšine nádoroch obličkových buniek (RCC). Monoklonálne protilátky boli študované ako samostatné činidlá alebo v kombinácii s chemoterapiou alebo rádionuklidom. V roku 2005 sa konala preklinická štúdia s DC101, čo je krysia anti-myšia Flk1 (myšia verzia VEGFR-2) protilátka. DC101 bol široko študovaný na myšie modely angiogenézy, myšacie nádory a ľudské nádorové xenotransplantáty. Liečba DC101 dôsledne preukázala silnú inhibíciu šírenia a rast metastáz v niekoľkých modeloch. V jednom konkrétnom pokusnom experimente bol DC101 použitý v modeli pečene metastázy u myši. V tomto prípade boli nádorové bunky najlepšie nepriame ciele anti-VEGFR-2 terapie. Systémové podanie DC101 viedlo k apoptóze cievnych

endoteliálnych buniek, po ktorých nasledovala apoptóza buniek nádoru. Tieto pozorovania ukázali silný, hoci nepriamy účinok tejto stratégie sprostredkovej protilátkami zameranej na VEGFR. Dôležité je poznamenať, že na myšiach nebola pozorovaná žiadna zjavná toxicita pri dlhodobom účinku DC101. Tieto údaje naznačujú, že anti-VEGFR-2 protilátky sú vhodné na humánne použitie, môžu mať podobnú účinnosť a bezpečnostné charakteristiky s výrazným terapeutickým účinkom. (Youssoufian *et al.*, 2007)

Bevacizumab, je príklad humanizovanej IgG1 monoklonálnej protilátky, ktorá viaže VEGF a bola celosvetovo schválená pre liečbu v niekoľkých rôznych typoch nádorov, hlavne v asociácii so štandardnými chemoterapiami. (Fontanella *et al.*, 2014)

Ramucirumab je humánna IgG1 MAb, ktorá selektívne inhibuje VEGFR-2 a blokuje jeho signalizačné a aktivačné dráhy. Predklinické štúdie preukázali, že sa ramucirumab selektívne viaže na extracelulárnu doménu ľudského VEGFR-2 s polovičnou maximálnou inhibičnou koncentráciou 0,8 až 1,0 nM a má 8-násobne vyššiu afinitu k VEGFR-2 v porovnaní s jeho prirodzenými ligandami. Farmakokinetické hodnotenie ukázalo nelineárnu farmakokinetiku, pričom prírastkové dávky tohto činidla sú spojené so znížením clearance. Farmakodynamické hodnotenia potvrdili nárast ligandu VEGF spolu s poklesom VEGFR-2 po podaní ramucirumabu. (Fontanella *et al.*, 2014)

Mnoho malých molekúl môže tiež inhibovať VEGFR-2 aktivitu, aj keď ich inhibícia nie je špecifická. Medzi tieto molekuly patria molekuly zahrňované do skupiny tyrozinkinázových inhibítorov. Príkladom je sorafenib, ktorý je schválený pre liečbu RCC a hepatokarcinómu, ďalej sunitinib, ktorý je schválený pre RCC, gastrointestinálne stromálne nádory a v neposlednom rade pazopanib nedávno schválený pre RCC a pre sarkóm mäkkého tkaniva. Ďalšou malou molekulou, ktorá môže špecificky inhibovať VEGFR-2 je apatinib. Vyššie spomínané prirodzené ligandy, cieľové receptory a antiangiogenné zlúčeniny rodiny VEGF sú zobrazené v **Obr. 9**. (Fontanella *et al.*, 2014), (Choueiri *et al.*, 2008)



Obr. 9: Prirodzené ligandy, cieľové receptory a antiangiogénne zlúčeniny rodiny VEGF. VEGF-A, vaskulárny endoteliálny rastový faktor A; VEGF-B, vaskulárny endoteliálny rastový faktor B; VEGF-C, vaskulárny endoteliálny rastový faktor C; VEGF-D, vaskulárny endoteliálny rastový faktor D; VEGF-E, vaskulárny endoteliálny rastový faktor E; PlGF, placentárny rastový faktor; VEGFR-1, receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora typu 1; VEGFR-2, receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora typu 2; VEGFR-3, receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora typu 4. Prevzaté a upravené z: (Fontanella et al., 2014).

3.4 Ramucirumab a jeho farmakokinetické a farmakodynamické štúdie

Ramucirumab je plne humanizovaná IgG1 monoklonálna protilátka. Počas počiatočného predklinického vývoja, bola identifikovaná konzervatívna sekvencia variabilného ťažkého reťazca (VH). Tento VH bol rekombinovaný s variabilnými ľahkými reťazcami (VL). Výsledná konsenzuálna kombinácia VH / VL bola označená ako 1121. (Aprile et al., 2014)

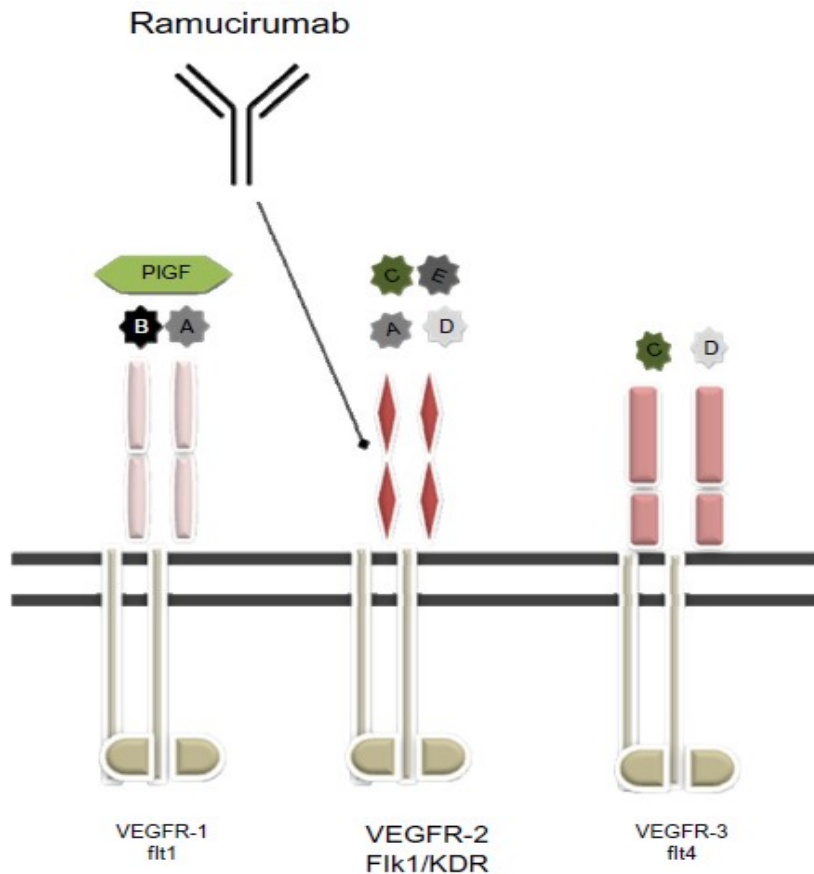
Na základe predklinických údajov *in vitro* sa stanovila väzbová afinita Fab 1121B na VEGFR-2 a výsledné ED₅₀ preukázala približne 0,1 až 0,15 nM. VEGF-A, primárny ligand pre VEGFR-2 má afinitu k VEGFR-2 v rozmedzí hodnôt 0,77 až 0,88 nM, teda približne 8-9 krát slabšiu ako monoklonálna protilátka (**Obr. 10**). Podrobná štruktúrna analýza komplexu ramucirumab - VEGFR-2 bola vykonaná Franklinom a kol. v roku 2011.(Franklin et al. 2011) Ukázala, že Fab časť protilátky sa viaže na doménu 3 VEGFR-2 blízko N-konca. Inhibícia väzby VEGF-A na VEGFR-2 je pravdepodobne sprostredkovaná stérickým blokovaním ligandu a indukciou zmeny konformácie v receptore pri kontakte s 1121B. (Clarke a Hurwitz, 2014)

V začiatkovej štúdií fázy I klinického testovania, ktorá sa týkala ramuciumabu, bolo celkovo 37 pacientov liečených dávkami v rozmedzí od 2 do 16 mg na kg hmotnosti týždenne formou infúzie. Získali sa priaznivé farmakokinetické údaje zo štúdie, keďže všetci pacienti preukázali najnižšie cieľové hladiny 20 µg/ml a biologický polčas v rovnovážnom stave sa pohyboval v rozmedzí 200 až 300 hodín pri dávkach 8 až 16 mg na kg hmotnosti. Nelineárna farmakokinetika ramucirumabu bola pozorovaná na základe miery clearance, naznačujúcej sýtosť mechanizmu clearance, ktorá bola pravdepodobne vo veľkej miere sprostredkovaná receptorom. Avšak v priebehu štúdie bola minimálna akumulácia lieku v sére. (Clarke a Hurwitz, 2014), (Reichert, 2014)

Farmakodynamické údaje z klinickej štúdie fázy I zahŕňali meranie sérových koncentrácií VEGF-A a rozpustného VEGFR-1 a VEGFR-2 v časových bodoch pred a počas každého liečebného cyklu. Po prvej infúzii došlo k okamžitému zvýšeniu VEGF o 1,5 až 3 krát nad hladinou stanovenou pred liečbou. Hladiny VEGFR-1 a VEGFR-2 sa okamžite znížili po počiatkovej infúzii ramucirumabu a potom sa vrátili na východiskové hladiny. Zmena VEGF a VEGFR-1 a VEGFR-2 nebola závislá od dávky, čo naznačuje nasýtenie receptora. Sekvenčné MRI meranie potvrdilo zníženú vaskulatúru nádoru u 69 % pacientov. Dôležité je, že na konci liečby sa u žiadneho z pacientov nezistili žiadne protilátky proti ramucirumabu. (Poole, 2014), (Clarke a Hurwitz, 2014)

Vo všeobecnosti bol ramucirumab v rámci bezpečnosti a znášanlivosti veľmi dobre tolerovaný. Približne 10 % pacientov prerušilo liečbu ramucirumabom v dôsledku nežiaducich účinkov v porovnaní so 6 % pacientov, ktorí dostávali placebo. Nežiaduce účinky ramucirumabu zahŕňali hypertenziu, bolesť brucha, únavu a hyponatrémiu. Riziká triedy VEGF, ktoré boli osobitným významom pre ramucirumab, boli mierne zvýšené v porovnaní s kontrolnou skupinou a boli všeobecne v súlade s tými, ktoré boli pozorované u iných inhibítoroch VEGF. Kombinovaná chemoterapia s ramucirumabom v II. fáze štúdie nepreukázala žiadnu významnú neočakávanú toxicitu. Zatiaľ čo sa dávkovacie režimy medzi štúdiami líšili s týždennými alebo každých 2 až 3 týždňovými infúziami. Z toho vyplýva, že miery toxicity sa zdajú byť nezávislé od dávky alebo frekvencie podávania. (Clarke a Hurwitz, 2014)

Ramucirumab je registrovaný pod firemným názvom Cyramza. Držiteľom registrácie je Eli Lilly (Nederland B. V., Utrecht). Cyramza v kombinácii s paklitaxelom je indikovaná na liečbu dospelých pacientov s pokročilým nádorom žalúdka alebo adenokarcinómom gastroezofageálneho spojenia s progresiou ochorenia, po predchádzajúcej chemoterapii na báze platiny a fluórpyrimidínu. V monoterapii je indikovaná pacientom, pre ktorých liečba v kombinácii s paklitaxelom nie je vhodná. Cyramza, v kombinácii s FOLFIRI (irinotekan, kyselina folínová a 5-fluóruracil), je indikovaná na liečbu pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom (mCRC). V kombinácii s docetaxelom je indikovaná na liečbu pacientov s lokálne pokročilým alebo metastázujúcim nemalobunkovým karcinómom pľúc s progresiou ochorenia po chemoterapii na báze platiny. (Poole, 2014)



Obr. 10: Zobrazenie efektu blokovania receptoru VEGFR-2 pomocou protilátky ramucirumab. VEGF ligandy sú prezentované ako: A pro VEGF-A, B pro VEGF--B, C pro VEGF-C, D pro VEGF-D a E pro VEGF-E. Prevzaté z: (Aprile *et al.*, 2014).

3.5 *In vitro* štúdie väzieb na receptory

Rádiofarmaceutické zlúčeniny obsahujúce vo svojej štruktúre rádionuklid sú používané za účelom terapie alebo stanovenia diagnózy. Mnoho rádiofarmák je smerovaných na špecifické miesto, na základe afinity väzby medzi receptorom a ligandom. To sa využíva v onkológií, kedy môže byť rádiofarmakum zacielené na špecifický receptor nádorovej bunky. *In vitro* experimentálne štúdie sú zamerané na stanovenie efektivity medzi rádioaktívne značením ligandom a receptorom, ktorý sa nachádza na povrchu buniek. Medzi tieto štúdie patria saturačné, kompetitívne, internalizačné a efluxné štúdie (Bigott-Hennkens *et al.*, 2008)

3.5.1 Saturačné štúdie

Úlohou saturačnej štúdie je stanoviť afinitu, ktorou sa viaže konkrétny ligand na receptor. Saturácia receptora ligandom sa vyjadruje pomocou rovnovážnej disociačnej konštanty (K_D), ktorá vyjadruje afinitu daného ligandu k receptoru. Väzbou ligandu (L) na receptor (R) dochádza k tvorbe komplexu. Rýchlosť vytvorenia tohto komplexu (LR) závisí na koncentrácií použitého rádioaktívne značeného ligandu, na počte receptorov (B_{max}) a rýchlostných konštant k_a pre asociačnú fázu a k_d pre disociačnú fázu. Rýchlosť vytvorenia komplexu LR vyjadruje konštantu k_a . Konštantu k_d naopak vyjadruje rýchlosť

vyviazania ligandu z tohto komplexu LR. Z tohto vyplýva, že nižšia hodnota k_d znázorňuje vyššiu väzbovú afinitu ligandu k receptoru. (Bigott-Hennkens *et al.*, 2008)

Saturačné štúdie sa uskutočňujú inkubáciou pevného počtu buniek exprimujúcich receptor s rôznymi koncentráciami rádioligandu po dobu potrebnú na dosiahnutie rovnováhy. Bunky majú na svojom povrchu receptor, na ktorý sa viaže pridávaný, radioaktívne značený ligand. Rádioligand sa pridáva postupne s rastúcou koncentráciou. Meranie K_D pre každú koncentráciu sa vykonáva, až kým sa nedosiahne rovnovážneho stavu medzi naviazaním a nenaviazaním ligandom. Po kultivácii sa odstráni kultivačné médium, bunky premyjú a meria sa rádioaktivita, ktorá odpovedá množstvu naviazaného rádioligandu na receptor. Rádioaktívne značený ligand sa okrem receptorov môže naviazať na povrch doštičiek a iné miesta v reakčnom prostredí, preto sa pre každú použitú koncentráciu rádioligandu stanoví aj nešpecifická väzba (NSB). Pri stanovení nešpecifickej väzby sa pridáva k reakcii neznačený kompetitívny ligand, ktorý sa naviaže a obsadí receptory buniek. Týmto sa nám určí množstvo značeného ligandu, ktorý sa naviazal na iné miesta, mimo receptorov. Rovnovážna disociačná konštanta K_D sa vypočíta z hodnoty rozdielu medzi aktivitou nešpecifickej väzby a aktivitou rádioligandu. (Bigott-Hennkens *et al.*, 2008)



$$\frac{k_d}{k_a} = \frac{[L] \times [R]}{[LR]} = K_D$$

3.5.2 Kompetitívne štúdie

Kompetitívne väzbové štúdie sa používajú na stanovenie koncentrácie požadovaného ligandu potrebného na zníženie špecifickej väzby rádioaktívne označeného štandardu o 50 % vyjadrované tiež ako IC_{50} (half maximal inhibitory concentration), čo je polovičná maximálna inhibičná koncentrácia. Nízka hodnota IC_{50} vyjadruje vysokú afinitu ligandu k receptoru. (Bigott-Hennkens *et al.*, 2008), (Whiteley, 2000)

Na stanovenie hodnoty IC_{50} sa bunky inkubujú do doby vytvorenia rovnováhy medzi rádioaktívne značeným ligandom o štandardnej koncentrácii a postupne zvyšujúcej sa koncentrácie neznačeného ligandu. Tým sa sleduje schopnosť neznačeného ligandu vytesniť rádioaktívne značený ligand. Po inkubácii sa médium odstráni, membrány sa premyjú a stanoví sa množstvo rádioaktívne značených ligandov viazaných na membrány buniek. Membránovo viazaná rádioaktivita je vynesená do grafu versus logaritmus koncentrácie ligandu a následne analýza s použitím nelineárneho regresného programu, určí koncentráciu ligandu, ktorá spôsobila polovičnú inhibíciu IC_{50} väzby rádioaktívne značeného ligandu na receptory (Bigott-Hennkens *et al.*, 2008).

Hodnoty IC_{50} a K_D rádioaktívne značeného ligandu môžu byť použité na vyjadrenie inhibičnej disociačnej konštanty K_i (rovnovážna disociačná konštanta neznačeného ligandu, tzv. kompetitor). Jej výpočet je vyjadrený pomocou Prusoffovho vzťahu:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \left(\frac{C_{\text{radioligandu}}}{K_D}\right)\right)}$$

Hodnota K_i nie je závislá na experimentálnom usporiadaní a je teda presnejšia než hodnota IC_{50} a je lepšie reprodukovateľná medzi rozličnými experimentálnymi usporiadaniami. (Bigott-Hennkens *et al.*, 2008), (Whiteley, 2000)

3.5.3 Internalizačné štúdie

Internalizačné štúdie merajú vychytávanie rádioligandu bunkovým receptorom. Tieto štúdie poskytujú prehľadný pohľad na množstvo a rýchlosť, s ktorou je rádioligand dodávaný do vnútra buniek. Efektívny účinok danej látky vyjadruje krátky čas internalizácie rádioligandu do bunky. Vyjadrenie rozsahu špecifickej internalizácie, ako funkcie času generuje internalizačnú krivku. Krivka ukazuje zvýšenie internalizovaného rádioligandu s časom, ktorý je často v počiatočných časových úsekoch lineárny. (Bigott-Hennkens *et al.*, 2008)

3.5.4 Efluxné štúdie

Efluxné štúdie merajú schopnosť buniek uvoľňovať internalizovaný rádioligand z bunky do okolia. Skúmaním množstva a rýchlosti, v ktorej sa rádioligand uvoľňuje z buniek, sa získava prehľad o bunkovej retencii rádioligandu. Rýchla strata rádioligandu z buniek môže naznačovať nízku retenciu cievného tkaniva *in vivo*, zatiaľ čo pomalé uvoľňovanie malého množstva rádioligandu z buniek by sa mohla prejaviť ako zadržiavanie rádioligandu v cieľovom tkanive. Z kultivačného média sa v určitých časových intervaloch odoberá vzorka a meria rádioaktivita. Zaznamenávanie množstva externalizovanej rádioaktivity, ako funkciu času, generuje externalizačná krivka. (Bigott-Hennkens *et al.*, 2008)

3.5.5 Princíp technológie merania v reálnom čase interakcie medzi rádioaktívne značeným ligandom a cieľovou biologickou štruktúrou

Súčasťou experimentálnej časti diplomovej práce bolo použitie prístroja nazývaného ako LigandTracer (LT), ktorý je schopný merať interakcie medzi rádioligandom (rádioaktívne značená MAb alebo peptid) v reálnom čase. LigandTracer sa používa na presné a jednoduché meranie farmakokinetických interakcií a následne stanovenie K_D , IC_{50} a K_i . Prístroj LT bol vyvinutý a patentovaný spoločnosťou Ridgeview Instruments AB vo Švédsku na pracovisku v Uppsale. V experimentálnej časti sa pracovalo s prístrojom typu LigandTracer Yellow (**Obr. 11**), ktorý je schopný detegovať aktivitu rádionuklidov s charakterom gama žiaričov ako napríklad ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{11}C a najpoužívanejší v nukleárnej medicíne $^{99\text{m}}\text{Tc}$. LigandTracer Yellow je k dispozícii pre rádioaktívne značené ligandy s emisiou γ žiarenia vyššou ako 10 keV. Ďalším typom je LigandTracer White, pre meranie rádioligandov značených rádionuklidmi emitujúcich β^- žiarenia nad 100 keV alebo LigandTracer Green pre detekciu fluorescenčne značených ligandov. Posledným typom je LigandTracer Grey,

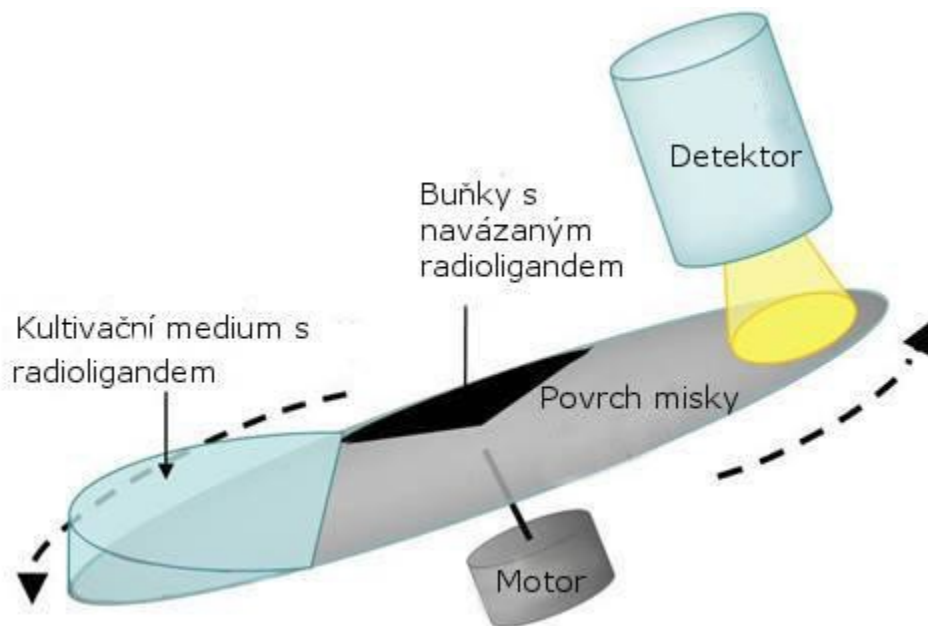
ktorý sa používa pre meranie žiarení gama o nízkych hodnotách energií, ako je napríklad ^{125}I . (<http://www.ridgeview.eu/instruments/yellow/>), (http://www.ridgeview.eu/docs/TechNote_LigandTracer.pdf)



Obr. 11: *Demonštratívny obrázok prístroja LigandTracer Yellow. Otočná platforma slúži k umiestneniu Petriho misky s bunkovou kultúrou. Vo viečku prístroja je umiestnený detektor rádioaktívneho žiarenia gama. Prevzaté z: <http://www.ridgeview.eu/docs/Product%20Specification%20LigandTracer%20Yellow%201.6.pdf>.*

Prístroj LigandTracer je určený na meranie v reálnom čase (real-time meranie) interakcií značeného ligandu najčastejšie s bunkovým cieľom, teda predovšetkým receptorom. Počas merania sa do Petriho misky nasadí adherentná bunková línia. V miske je menšia aktívna oblasť s bunkami, ktoré obsahujú cieľové receptory a tvorí miesto pre detekciu špecifickej väzby. Ďalej sa nachádza protiľahlá referenčná oblasť bez cieľových štruktúr, ktorá slúži pre detekciu prípadnej nešpecifickej väzby a slúži tak na korekciu výsledného signálu. Petriho miska je umiestnená na naklonenej, pomaly sa otáčajúcej platforme (**Obr. 12**). Následne sa pridá kultivačné médium, najprv bez rádioligandu a zrealizuje sa meranie signálu pre konštrukciu baseline. Následne sa pridá určité zvolené množstvo rádioaktívne značeného ligandu a spustí sa meranie. Platforma s Petriho miskou sa otáča a počas tohto pohybu dochádza k omývaniu buniek a referenčnej oblasti, kedy na úrovni buniek dochádza k interakcii značeného rádioligandu s receptorom buniek. Detektor gama žiarenia, nachádzajúci sa vo viečku prístroja deteguje aktivitu ligandu, ktorý je viazaný v komplexe ligand-receptor. Od tejto hodnoty aktivity sa odčíta aktivita z nešpecificky viazaného ligandu pro stanovení NSB v mieste misky, kde nie je nasadená bunková línia. Výsledný zobrazovací signál, je teda rozdiel aktivít špecificky a nešpecificky viazaného ligandu. Priebežné sledovanie signálu ligandu na bunkách

poskytuje presný odhad kinetiky interakcie. Merania sa môžu vykonávať počas a po inkubácii, a za zníženia požadovaného množstva činidiel. (Björke a Andersson, 2006)



Obr. 12: Schéma princípu merania pomocou prístroja *LigandTracer*. Prevzaté a modifikované z: http://www.ridgeview.eu/docs/TechNote_LigandTracer.pdf.

4 Cieľ práce

Primárnym cieľom práce bolo zamerať sa na možnosť nepriameho rádioaktívneho značenie ramucirumabu rádiodiagnostickým nuklidom ^{99m}Tc pomocou chelatačného činidla HYNIC. Následne sa stanovila čistota a stabilita rádioaktívne značeného ligandu pomocou metód iTLC a tiež pomocou metódy HPLC s rádiometrickou detekciou.

U pripraveného rádiofarmaka ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab sa stanovila afinita k VEGFR-2 na povrchu buniek ľudskeho karcinómu prostaty (PC-3) s využitím *in vitro* saturačnej štúdie. Saturačné štúdie boli realizované pomocou automatickej rádioimunoanalýzy s detekciou v reálnom čase, ale aj pomocou manuálnej techniky, kedy sa výsledky oboch metód následne porovnali.

Výsledky *in vitro* štúdie boli spracované v nasledujúcich programoch. Pre manuálnu techniku boli vyhodnocované v programe Excel a GraphPad Prism. Experimenty zamerané automatickou radioimunoanalýzou v reálnom čase boli vyhodnotené pomocou softwaru TraceDrawer.

Ďalším cieľom bolo v neposlednej rade sa naučiť vykonávať kultiváciu buniek, pripravovať pufry, mobilnú fázu a osvojiť si bezpečnosť práce s rádioaktívnymi žiaričmi v prostredí rádionuklidového laboratória.

5 Experimentálna časť

5.1 Použité prístroje a software

- Analytické váhy (Sartorius Analytic)
- Bunkový inkubátor (Sartorius Stedim Biotech - product Certomat)
- Bürkerová komôrka na počítanie buniek
- Detektor povrchovej kontaminácie (POLON)
- Detektor rádioaktívneho žiarenia: BQM 4 (BQM)
- iTLC- analyzátor RITA Star (Raytest)
- Laminárny box (Bio Air Instruments, model Top-Safe 1.8)
- Nesterilný inkubátor pre bunkové kultúry (MS MajorScience)
- Magnetická miešačka s ohrevom (IKA RCT Basic Safety Control)
- Magnetické miešadlo (IKA RTC basic)
- Mikroskop (XDS-IR, OPTICA)
- MS Office Excel (Microsoft)
- pH meter (Eutech Instruments pH510)
- Predvážky (Kern PLB 200-3)
- Prístroj Gama counter pre meranie gama žiarenia v biologických vzorkách (2480 Automatic Gamma Counter Wizard²™³'' Perkin Elmer)
- Prístroj LigandTracer Yellow (Ridgeview Instruments AB)
- Prístroj pre vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu (HPLC systém Agilent 1100 Series, Agilent Technologies Inc.) s rádiometrickou detekciou
- Program Gina Star pre vyhodnocovanie meraní z analyzátoru ITLC RITA Star (Raytest)
- Program LigandTracer Control 2.0 (Ridgeview Instruments AB)
- Program TraceDrawer (Ridgeview Instruments AB)
- Spetkofotometer Tecan (Schoeller)
- Suchá kúpeľ (MS MajorScience)
- Trepáčka (Vortex V1 plus Biosan)
- Ultrazvuková lázeň (Ecoson Ultrasonic Engineering)
- Vodná kúpeľ (Julabo TW12)

5.2 Použitý materiál

- Centrifugačná skúmavka 50 ml (TPP)
- Gravitačná kolónka na prečistenie biologických vzoriek (Illustra™ NAP™ – 5 Columns Sephadex™ G-25 DNA Grade)
- HPLC kolona BioRad Gel column BIO – Sil Sec 250, 300 × 7,8 mm
- HPLC vialky (Agilent Technologies)
- ITLC-SG- Glass microfiber chromatography paper impregnated with silica gel (Varian)
- Kultivačná fläša 75 cm² a 25 cm² (TPP)
- Mikrocentrifugačné skúmavky 1,5 ml (UWR)
- Mikrocentrifugačné silikonizované skúmavky 2ml (Sigma-Aldrich)

- Mikropipety (Eppendorf Research plus) s objemami: 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l a 100-1000 μ l
- Multikanálová pipeta 50-300 μ l (Eppendorf)
- Petriho misky 92 \times 17 mm (Nuclon Delta surface)
- Sérologické pipety o objemu 5, 10 a 25 ml (TPP)
- Špičky na pipety o objeme 10 μ l, 200 μ l , 1000 μ l (Eppendorf)
- Vialkové izerty o objeme 250 μ l (Agilent Technologies)
- 24 jamkové doštičky (Tissue culture testplate 24^F)
- 96 jamkové doštičky (Tissue culture testplate 96^F)

5.3 Použité chemikálie

- Argón (Linde Gas a.s.)
- Bovinné fetálne sérum (FBS, Sigma-Aldrich)
- Destilovaná voda (MilliPore)
- Dimethylformamid – bezvodný (DMF, Sigma-Aldrich)
- HEPES (Thermo Fisher Scientific)
- Chelatačné činidlo S-HYNIC (Synchem UG and Co. KG)
- CO₂ (Linde Gas a. s.)
- EDDA
- EDTA (Penta)
- KCl (Penta)
- Kultivačné médium F-12 Kaighn's modification + 10 % FBS (Hyclone)
- L-glutamin 200 mM (Sigma-Aldrich)
- NaCl (Penta)
- Na₂HPO₄ . 12H₂O (Penta)
- NaH₂PO₄ . 2H₂O (Penta)
- NaN₃ (Sigma-Aldrich)
- NaOH (Penta)
- Ramucirumab (Cyramza 10 mg/ml, Eli Lilly)
- Rádionuklid ^{99m}Tc (TcO₄⁻, GE HealthCare)
- Roztok neesenciálnych aminokyselín pre bunkovú kultiváciu (Sigma-Aldrich)
- Pierce BCA[®] Protein Assay A (Thermo Scientific)
- Pierce BCA[®] Protein Assay B (Thermo Scientific)
- Trypsín EDTA roztok (GE HealthCare)
- 70% Etanol (Penta)
- 0,5 % Triton X (Sigma Aldrich)

5.4 Použitý biologický materiál

- Bunková línia PC-3 (bunky izolované z adenokarcinómu prostaty, European Collection of Authenticated Cell Cultures)

5.5 Pracovný postup

5.5.1 Príprava fosfátového pufru

Na udržanie konštantného pH v neutrálnej prípadne ľahko zásaditej oblasti sa používa fosfátový pufr (PBS). Príprava spočívala v zmiešaní dvoch roztokov pre výsledný objem 1 litru.

- Prvý roztok bol pripravený navážením 8,01 g NaCl s 1,56 g NaH₂PO₄ a rozpustené v 200 ml destilovanej vody.
- V druhom roztoku sa navážilo 0,21 g KCl s 3,58 g Na₂HPO₄ a následne rozpustilo v 800 ml destilovanej vody.
- Oba roztoky boli zmiešané a doplnené na výsledný objem 1 litra. Výsledné pH roztoku bolo počas neustáleho miešania a kontroly pomocou pH metru upravené na hodnotu 7,4 prídávaním 1 M roztoku NaOH. Pripravený PBS sa uchovával v chladničke.

5.5.2 Príprava mobilnej fáze

Príprava mobilnej fáze pre detekciu pomocou HPLC spočívala navážením 2,92 g NaCl a 0,65 g NaN₃, ktoré boli rozpustené v 1 l destilovanej vody. Výsledná koncentrácia jednotlivých zložiek mobilnej fáze bola 0,05 M NaCl a 0,01 M NaN₃. Z dôvodu odvzdušnenia bol následne roztok umiestnený na 15 minút do ultrazvukového kúpeľa.

5.5.3 Príprava citrátového pufru

Ako mobilná fáza pre iTLC bol použitý 0,1 M citrátový pufr. Na prípravu tohto pufru boli pripravené dva roztoky, ktoré sa zmiešali v danom pomere.

- Navážením 2,101 g monohydrátu kyseliny citrónovej a rozpustením v 100 ml destilovanej vody bol pripravený zásobný roztok A
- Zásobný roztok B bol pripravený navážením 2,941 g dihydrátu citrátu trisodného a rozpustením v 100 ml destilovanej vody
- Citrátový pufr s výslednou koncentráciou 0,1 M bol pripravený zmiešaním 35 ml roztoku A a 65 ml roztoku B. Výsledné pH roztoku bolo 5. Roztok bol skladovaný v chladničke.

5.5.4 Príprava Krebs-Ringerova roztoku

Pre *in vitro* analýzu pomocou saturačných štúdií, bol použitý Krebs-Ringerov roztok. Pripravený bol 1 l tohto roztoku. Príprava roztoku spočívala v navážení 7,159 g NaCl (122,5 mmol/l), 0,403 g KCl (5,4 mmol/l), 0,133 g CaCl₂ (1,2 mmol/l) a 0,163 g MgCl₂ (0,8 mmol/l). Následne bolo navážené 0,287 g Na₂HPO₄ (0,8 mmol/l), 0,031 g NaH₂PO₄ (0,2 mmol/l) a 0,991 g glukózy (5,5 mmol/l). Na záver sa pridal 2,383 g Hepes (2-[4-(2 hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid) (10 mmol/l). Navážené zložky boli postupne za neustáleho miešania rozpúšťané v destilovanej vode do výsledného objemu 1 l. Hodnota pH 7,4 roztoku sa upravovala pomocou 1M NaOH alebo 1M HCl. pH bolo kontrolované pomocou pH metru.

5.5.5 Kultivácia bunkovej línie PC-3

V experimentálnej časti boli použité bunecné línie izolované z adenokarcinómu prostaty označované skratkou PC-3. Bunkové línie boli kultivované v kultivačných fľašiach s veľkosťou kultivačnej plochy 180 cm² pri 37°C a 5 % CO₂ v bunkovom inkubátore. Kultivačné línie boli presadzované zhruba jeden krát týždenne do nových inkubačných fľaši. Pre kultiváciu tejto bunkovej línie bolo použité kultivačné médium F-12 Kaighn's modification s obsahom 10 % fetálneho hovädzieho séra (FBS).

So 48 hodinovým predstihom pred realizáciou experimentu boli bunky v kultivačnej fľaši stryptinizované a následne nasadené do Petriho misky v množstve 1×10^6 buniek v objeme 3 ml kultivačného média. Aby došlo k prichyteniu buniek na určený výsek Petriho misky, boli bunky kultivované po dobu 24 hodín na naklonenej rovine. Po tejto dobe nastala výmena kultivačného média. Staré médium bolo odsaté a následne pridané nové médium s objemom 5 ml. Petriho miska s bunkami bola následne v horizontálnej polohe uložená do bunkového inkubátoru. Takto pripravené bunky boli uložené v inkubátore po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C v 5% atmosfére CO₂ k dispozícii pre meranie pomocou prístroja LigandTracer. Pre saturačné štúdie boli bunky presadené do 24 jamkových doštičiek v množstve 1×10^5 buniek v 0,5 ml kultivačného média na jednu jamku. Bunky boli tiež inkubované v inkubátore pri 37 °C, v 5% CO₂ atmosfére po dobu do uskutočnenia experimentu.

5.5.6 Konjugácia ramucirumabu s chelatačným činidlom HYNIC

- Konjugácia ramucirumabu (RAM) s HYNIC sa začala navážením 0,8 μg HYNIC, ktorý bol následne rozpustený v 100 μl bezvodného DMF.
- Ďalším krokom bolo prečistenie injekčného roztoku ramucirumabu (1 mg) cez kolónku (NAP-5 Columns Sephadex G-25) do 500 μl PBS.
- Ku konjugácii sa použilo 100 μg prečistenej monoklonálnej protilátky, ku ktorým sa po kvapkách pridávalo 8 μl chelatačného činidla HYNIC (1 mg/ml).
- Následne sa skúmavka obalila alobalom a nechala sa v temne opatrne miešať po dobu 2,5 hodiny pri laboratórnej teplote. Látkové množstvo HYNIC ($2,78 \times 10^{-3}$ μmol) muselo byť 4 × väčšie ako látkové množstvo ramucirumabu ($6,96 \times 10^{-4}$ μmol).
- V ďalšom kroku sa vzniknutý konjugát HYNIC-RAM opäť prečistoval cez kolónku (NAP-5 Columns Sephadex G-25) do 500 μl roztoku PBS za účelom odstránenia nenaviazanej molekuly HYNIC.

5.5.7 Rádioznačenie HYNIC-ramucirumabu rádionuklidom ^{99m}Tc

- Ku 100 μg HYNIC-RAM sa pridal roztok ^{99m}Tc (TcO₄⁻)o aktivite 20 MBq. Následne sa pridalo 250 μg SnCl₂ a 1 mg koligandu EDDA.
- Po dobu 30 minút sa nechala táto zmes v tme inkubovať pri teplote 37°C.
- Po 30 minútach sa pridalo 2 μl MgCl₂ pre stabilizáciu rádioaktívne značenej protilátky.

5.5.8 Zaisťovanie čistoty a stability značeného ramucirumabu pomocou iTLC

- Na chromatografický prúžok potiahnutý silikagélom o dĺžke približne 10 cm a šírke asi 1 cm bol vyznačený štart a na opačný koniec prúžku bol vyznačený cieľ.
- Na štart bol postupne v dávkovaných množstvách (do cca 2,5 μ l) pridávaný ^{99m}Tc -HYNIC-RAM.
- Nanosená vzorka na chromatografický prúžok bola vložená do 0,1 M citrátového pufru o pH 5.
- Vzorka sa nechala vyvíjať na chromatografickom prúžku, do kým sa mobilná fáza nedostala do polohy cieľa.
- Chromatografický prúžok bol analyzovaný v iTLC analyzátore Raytest RITA. Ako nosný plyn bol použitý argón. Doba merania bola stanovená na 2 minúty.
- Meranie bolo vyhodnocované v programe Gina Star Software.
- Pre analýzu sa vždy použili vzorky, ktoré boli ihneď odobrané po dokončení rádioaktívneho značenia a ďalej sa analyzovali vzorky, ktoré sa inkubovali v roztoku PBS pri 4°C po dobu 24 hodín od rádioaktívneho značenia MAb.

5.5.9 Zaisťovanie čistoty a stability značeného ramucirumabu pomocou metódy HPLC

- Vzorka ^{99m}Tc -HYNIC-RAM bola s mobilnou fázou o objeme 120 μ l napipetovaná do vialky. 80 μ l tvorila mobilná fáza a 40 μ l vzorka ^{99m}Tc -HYNIC-RAM. Použitá mobilná fáza bola zložená z NaCl (0,05 M) a NaN_3 (0,01 M).
- Následne bola vzorka z vialky nastrieknutá na kolónu. Prietoková rýchlosť bola 0,5 ml/min.
- Analýza na HPLC s UV/VIS a rádiometrickou detekciou trvala 45 minút. Pre separáciu voľného ^{99m}Tc a značenej monoklonálnej protilátky bola použitá kolóna BioRad Gel column BIO – Sil Sec 250, 300 \times 7,8 mm.
- Výsledný rádiochromatogram bol záznamom o čistote pripraveného rádiopreparátu.
- Pre analýzu sa vždy použili vzorky, ktoré boli ihneď odobrané po dokončení rádioaktívneho značenia a ďalej sa analyzovali vzorky, ktoré sa inkubovali v roztoku PBS pri 4°C po dobu 24 hodín od rádioaktívneho značenia MAb.

5.5.10 Postup merania na prístroji LigandTracer Yellow za použitia bunkovej línie PC-3 buniek

PC-3 bunky, ktoré boli nasadené na Petriho misky v množstve 1×10^6 , boli použité na merania pomocou prístroja LigandTracer Yellow. Pôvodné kultivačné médium bolo odsaté a namiesto neho boli pridané 3 ml Krebs-Ringerovho roztoku. Petriho miska bola umiestnená na rotujúcu platformu prístroja LT Yellow. Následne sa uzavrel prístroj, sklopením hornej časti prístroja nadol. V tejto časti merania sa meral signál bez prídavku značenej protilátky pre stanovenie baseline. Prvotné meranie trvalo 10 minút. Po 10 minútach bolo meranie prerušené a do Petriho misky sa pripipetoval prvý podiel

^{99m}Tc -HYNIC-RAM tak, aby výsledná koncentrácia rádioligandu bola 3 nM. Meranie trvalo 60 až 90 minút do doby, než pôvodne rastúca krivka zobrazujúca väzbu rádioligandu na cieľové receptory dosiahla bod ekvivalencie (krivka rovnobežná s osou x pre čas). Bodom ekvivalencie sa myslí stav, kedy sa vytvorí rovnováha medzi viazanou a neviazanou frakciou rádioligandu v reakčnom médiu. Počas tejto doby do ekvivalencie sa merala asociačná fáza, kedy dochádzalo k väzbe značeného ligandu na VEGFR-2 na PC-3 bunkách. Po dosiahnutí ekvivalencie nasledoval ďalší prídavok ^{99m}Tc -HYNIC-RAM, kedy finálna koncentrácia rádioligandu v médiu bola 9 nM. Inkubácia bola ukončená po dosiahnutí bodu ekvivalencie po zhruba ďalších 90 minútach merania, kedy sa opäť vytvorila rovnováha medzi rádioligandom naviazaním na VEGFR-2 a voľným nenaviazaním rádioligandom. Následne bolo vysaté médium s ^{99m}Tc -HYNIC-RAM, bunky sa opláchli kultivačným médiom. Do Petriho misky boli pridané 3 ml čistého kultivačného média, bez prítomnosti značeného rádioligandu, pre analýzu disociačnej fáze. Toto meranie trvalo 60 minút. Počas tejto doby prebiehalo meranie disociačnej fáze, kedy sa merala prípadne možná disociácia v asociačnej fáze naviazaného ligandu z väzby na receptore VEGFR-2.

Výsledky merania boli vyhodnotené v programe TraceDrawer. V tomto programe bolo možné spočítať hodnoty rovnovážnych disociačných konštánt K_D pomocou nameraných kriviek. V analýze boli zaznamenané kinetické krivky pre konkrétne koncentrácie značenej monoklonálnej protilátky. Simulácia interakcie protilátka-receptor bola realizovaná na základe modelu „OneToOne” („Jeden na Jeden“), teda jedna molekula značenej protilátky sa naviaže na jeden receptor. V našom prípade jedna molekula ramucirumabu sa naviazala na jeden receptor VEGFR-2.

5.5.11 Postup práce pri saturačných štúdiách zrealizovaných pomocou manuálnej techniky

Na začiatok experimentu boli pripravené 2 ependorfky pre každú zo zamýšľaných koncentrácií použitých pre saturačnú štúdiu. Do jednej bol napipetovaný rádioaktívne značený rádiokonjugát ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab pre meranie špecifickej väzby. Do druhej bol napipetovaný opäť značený rádiopreparát ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab spoločne s neznačenou protilátkou ramucirumab pre zaistenie nešpecifickej väzby. Značený rádiopreparát ^{99m}Tc -HYNIC-RAM (100 $\mu\text{g/ml}$) bol napipetovaný v nasledujúcich koncentráciách a množstvách, ku ktorým bol pridávaný Krebs-Ringerov roztok, ako je zhrnuté v nasledujúcej **Tab. 1**.

Tab. 1: Zhrnutie pridávaných objemov ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab do 24-jamkovej doštičky, kde sa pre každú koncentráciu pripravil triplikát jamiek.

Koncentrácia	Objem v jednej jamke	3 násobok jednej jamky	Objem Krebs-Ringerova roztoku
1 nM	0,36 μl	1,08 μl	\approx 1,50 ml
3 nM	1,1 μl	3,3 μl	\approx 1,50ml
9 nM	3,2 μl	6,6 μl	\approx 1,50ml
15 nM	5,4 μl	16,2 μl	\approx 1,84 ml
30 nM	10,8 μl	32,4 μl	\approx 1,20 ml
45 nM	16,2 μl	8,6 μl	\approx 1,05 ml

Následne boli odsaté kultivačné média z 24 jamkových doštičiek, v ktorých boli nasadené bunky v množstve 1×10^5 buniek na jednu jamku. Jamky boli prepláchnuté roztokom PBS (1 ml) a roztok bol následne odsatý. Prepláchnutie bolo zrealizované 1-krát.

Do prvých troch jamiek v prvom stĺpci bol z ependorfky, ktorá obsahovala značený konjugát s koncentráciou 1 nM, napipetovaný roztok, v množstve 500 μl /jamku. Následne boli týmto postupom napipetované aj ostatné jamky pre ďalšie koncentrácie 3 nM, 9 nM, 15 nM, 30 nM a 45 nM v rámci merania špecifickej väzby. Obdobný bol postup pre meranie nešpecifickej väzby, kde sa použili rovnaké koncentracie s výnimkou toho, že sa k rádioaktívne značenej protilátke pridala protilátka neznačená v množstve takom, aby bola jej koncentrácia v roztoku 1 μM .

Takto napipetovaná doštička bola inkubovaná 1 hodinu pri 37 °C. Po inkubácii bolo reakčné médium z jamiek odsaté a každá jamka 3-krát prepláchnutá roztokom PBS (1 ml). Potom bolo pridávaných 500 μl dezintegračného roztoku, ktorý obsahoval 0,5 % Tritonu X a 0,1 M NaOH. Nasledovala inkubácia 30 minút pri 37 °C. Z takto upravenej 24 jamkovej doštičky, kde sa bunky vplyvom dezintegračného roztoku zlyžovali, sa odpipetovalo vždy po 20 μl z každej jamky do dvoch jamiek v 96 jamkovej doštičke pre stanovenie koncentrácie bunkového proteínu. Tento postup bol rovnaký ako pre špecifickú tak i nešpecifickú väzbu. Zvyšný objem z jamky z 24 jamkovej doštičky bol zriedený s destilovanou vodou, zhomogenizovaný a prepipetovaný do novo pripravenej ependorfky. Ependorfky putovali do prístroja Gamma Counter, ktorý meral aktivitu rádionuklidu ^{99m}Tc (energia gama žiarenia v CPM jednotkách) pre lyzáty z doštičiek pre špecifickú a nešpecifickú väzbu. 96 jamkové doštičky boli použité na meranie stanovenia bunkového proteínu.

5.5.12 Postup stanovenia koncentrácie bunkového proteínu

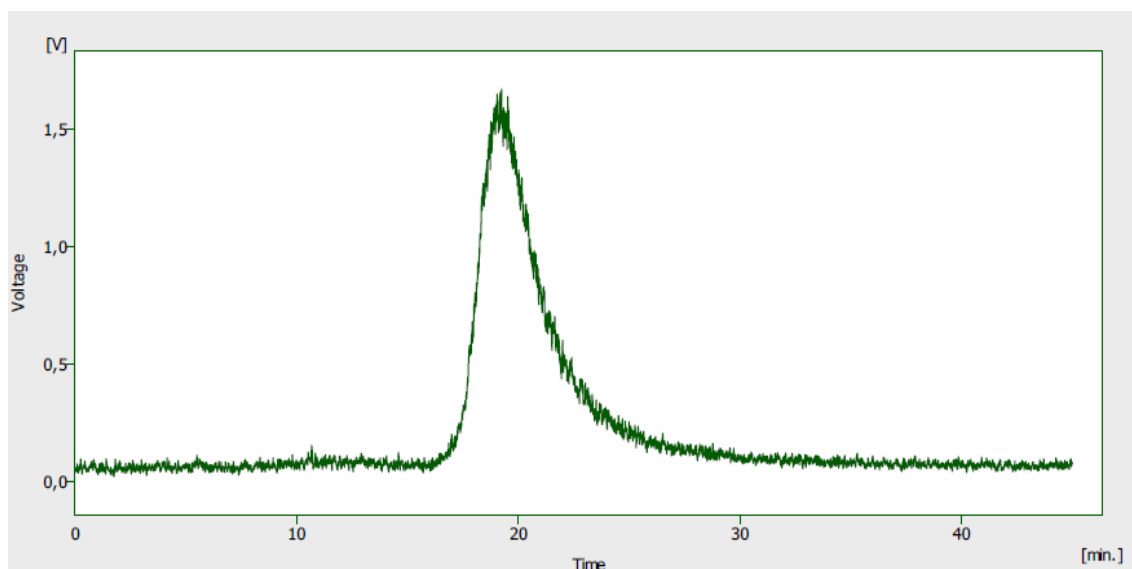
Stanovenie koncentrácie bunkového proteínu je metóda založená na kolorimetrickej detekcii a kvantifikácii celkového proteínu pomocou kyseliny bicinchonínovej (BCA). Tento spôsob spája redukciu Cu^{2+} na Cu^{+1} pomocou proteínu v alkalickom prostredí s vysoko citlivou a selektívnou kolometrickou detekciou katiónu medi (Cu^{+1}), použitím reakčného činidla obsahujúceho kyselinu bicinchonínovú. Fialovo sfarbený reakčný produkt tohto testu bol tvorený chelataciou dvoch molekúl BCA s jedným meďným iónom. Tento vo vode rozpustný komplex vykazuje silnú absorbciu pri 590 nm, ktorá je takmer lineárna so zvyšujúcimi sa koncentraciami proteínu v širokom rozmedzí koncentrácií (20 až 2000 $\mu\text{g/ml}$). Makromolekulárna štruktúra proteínu, počet peptidových väzieb a prítomnosť štyroch konkrétnych aminokyselín (cystein, cystín, tryptofán a tyrozín), sú zodpovedné za tvorbu farby s BCA. Štúdie s tri- a tetrapeptidmi naznačujú, že rozsah tvorby farieb je spôsobený viac než len súhrnom jednotlivých farebných funkčných skupín. Preto sa koncentrácie proteínov všeobecne určujú a uvádzajú s odkazmi na štandardy bežného proteínu, ako je hovädzí sérový albumín (BSA). Séria zriedení známej koncentrácie sa pripraví z proteínu a testuje sa spolu s neznámym pred tým, ako sa koncentrácia každého neznámeho vzorku stanoví na základe štandardnej krivky.

Ako prvé bola pripravená základná pracovná reagentia, ktorá bola pripravená zmiešaním BCA reagentie A a reagentie B v pomere 50:1. Následne bolo 20 μl štandardu (0, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, 1500 a 2000 $\mu\text{g/ml}$ BSA rozpúšťaného v lyzačnom roztoku TritonX a NaOH) napipetovaných v duplikáte do každej jamky v 96 jamkovej doštičke. Ku štandardu a ku vzorkám (20 μl) bolo napipetovaných 200 μl základnej pracovnej reagentie v danej jamke. Premiešavalo sa 30 sekúnd. Nasledovala inkubácia 30 minút pri 37°C. Po 30 minútach bola doštička chladená. Nakoniec bolo vykonané meranie absorbcie pomocou spektrofotometra Tecan pri vlnovej dĺžke 590 nm. Pomocou nameraných absorbancií, bola stanovená štandardná krivka. Štandardná krivka bola použitá na stanovenie koncentrácie bunkového proteínu.

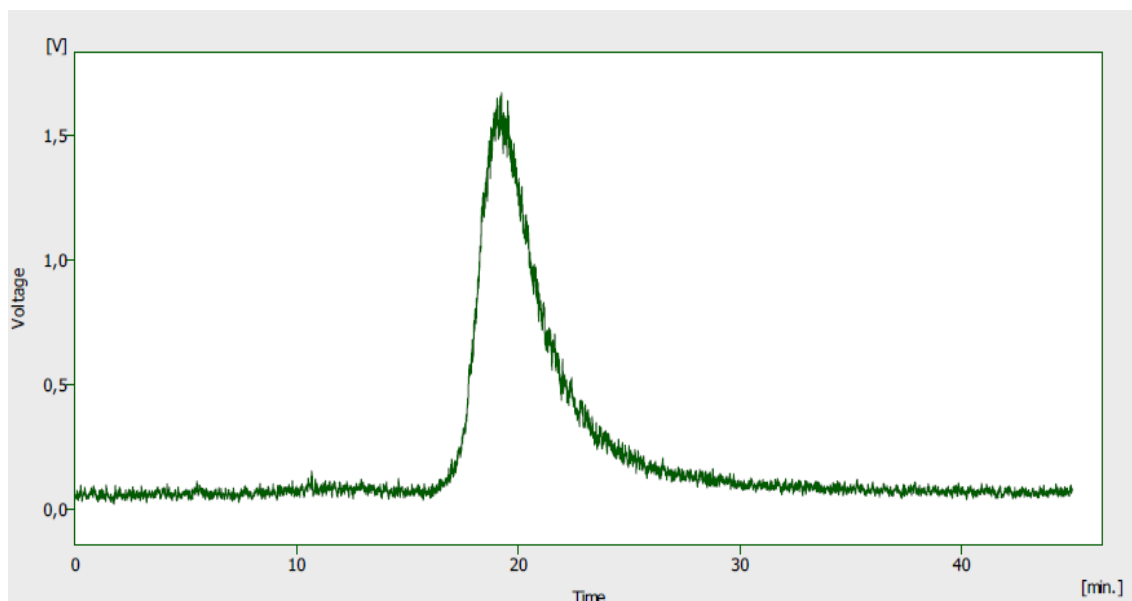
6 Výsledky práce

6.1.1 Stanovenie rádiochemickej čistoty a stability pripraveného rádioligandu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab

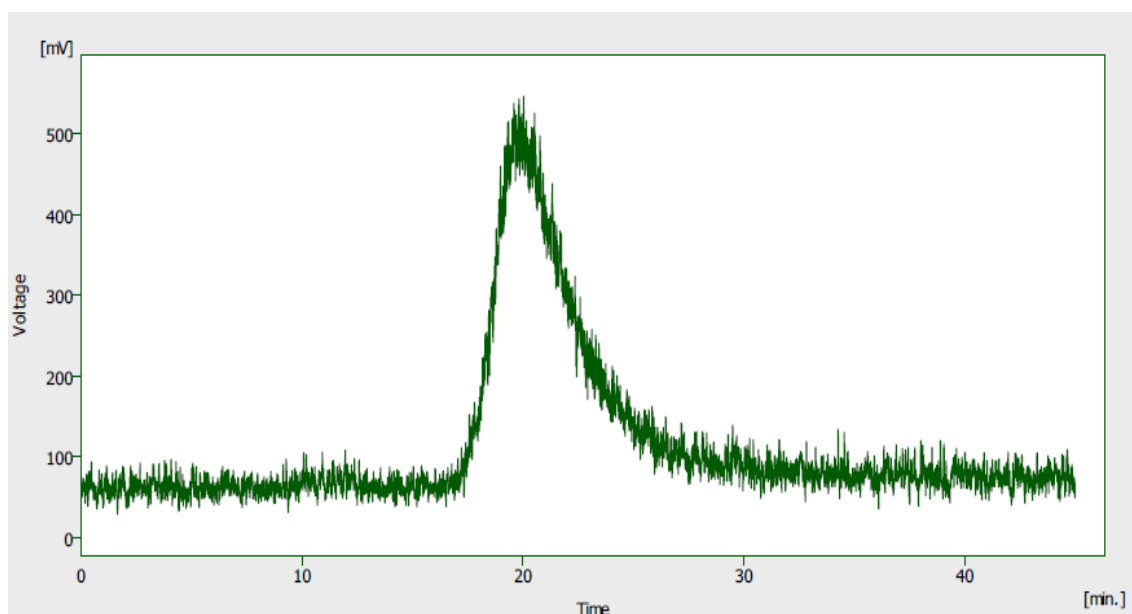
Hlavným cieľom analýzy bolo pozorovanie prítomnosti rádiochemickej nečistoty a prípadného uvoľňovania ^{99m}Tc s komplexu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM v závislosti na čase (inkubácia do 24 hodiny od značenia) pomocou HPLC analýzy s rádiometrickou detekciou. Kvôli tomu sa stanovenie rádiochemickej čistoty konalo v časových intervaloch 0, 2, 4, 6 a 24 hodín od radioaktívneho značenia monoklonálnej protilátky. Na **Obr. 13 – 17** sú uvedené chromatografické záznamy stanovenia rádiochemickej čistoty a sledovania prípadného uvoľňovania technécia z pripraveného rádiopreparátu na základe rádiometrickej detekcie. Značená monoklonálna protilátka eluuje okolo 19. minúty. Pre porovnanie je na **Obr. 18** uvedený rádiazáznam voľného ^{99m}Tc , ktorý eluuje okolo 23 minúty od začiatku merania.



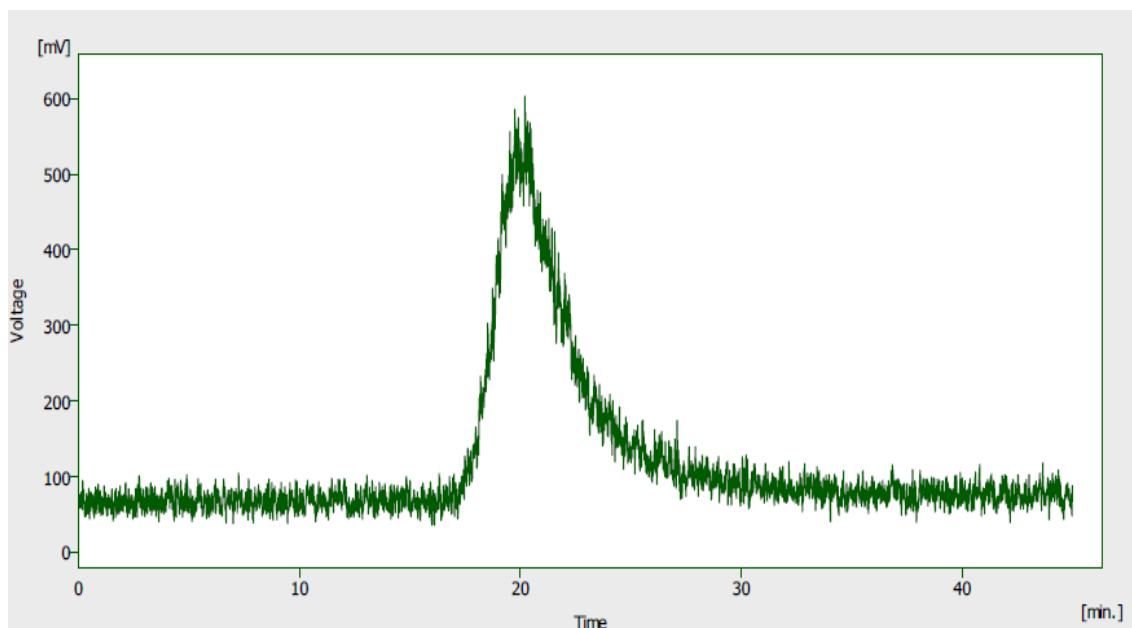
Obr. 13: HPLC rádiochromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného ihneď po rádioaktívnom značení.



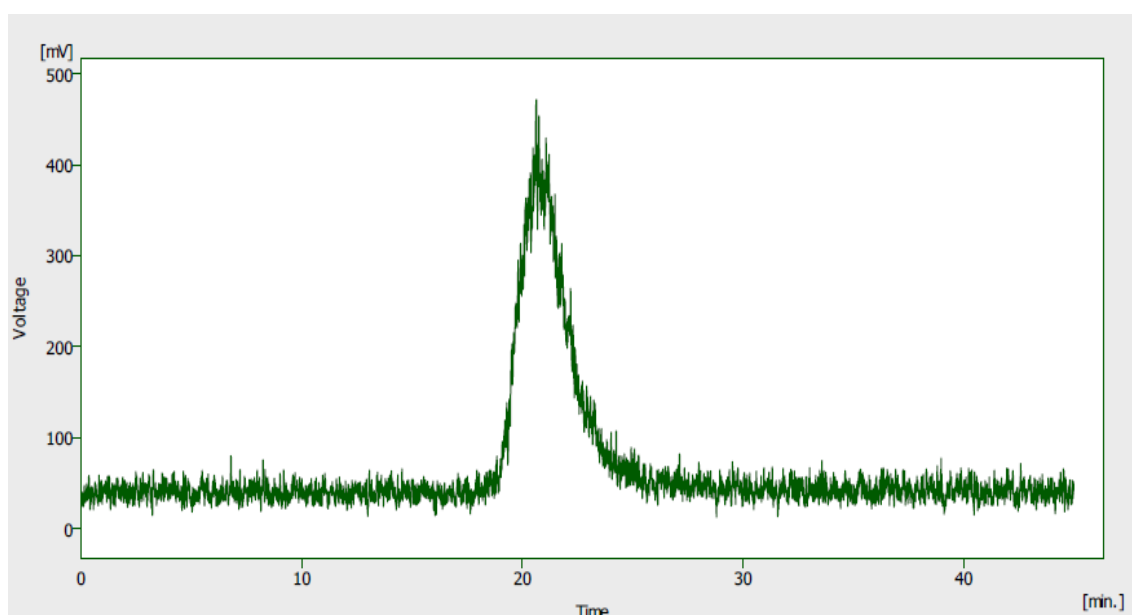
Obr. 14: HPLC rádiochromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného po 2 hodinách od rádioaktívneho značenia.



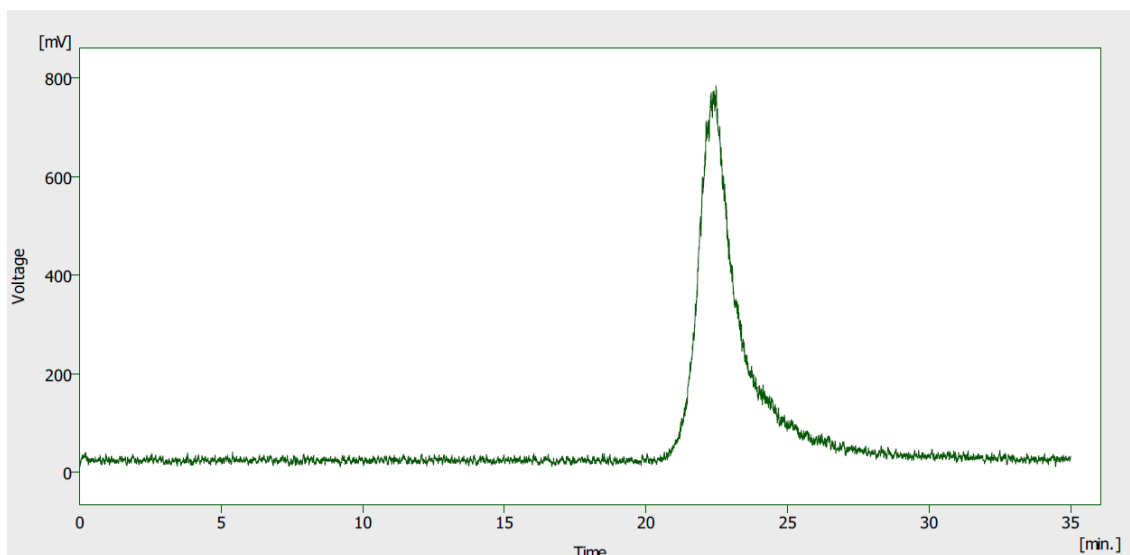
Obr. 15: HPLC rádiochromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného po 4 hodinách od rádioaktívneho značenia. Chromatogram vykazoval veľký šum v odozve. To značilo zoslabenie žiarenia rádionuklidu vplyvom krátkeho fyzikálneho polčasu rádioaktívneho technécia.



Obr. 16: HPLC rádiochromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného po 6 hodinách od rádioaktívneho značenia. Chromatogram vykazoval veľký šum v odozve. To značilo zoslabenie žiarenia rádionuklidu. Stále nebol pozorovaný ďalší pik ako forma nečistoty, ktorá by naznačovala uvoľnenie ^{99m}Tc z komplexu.



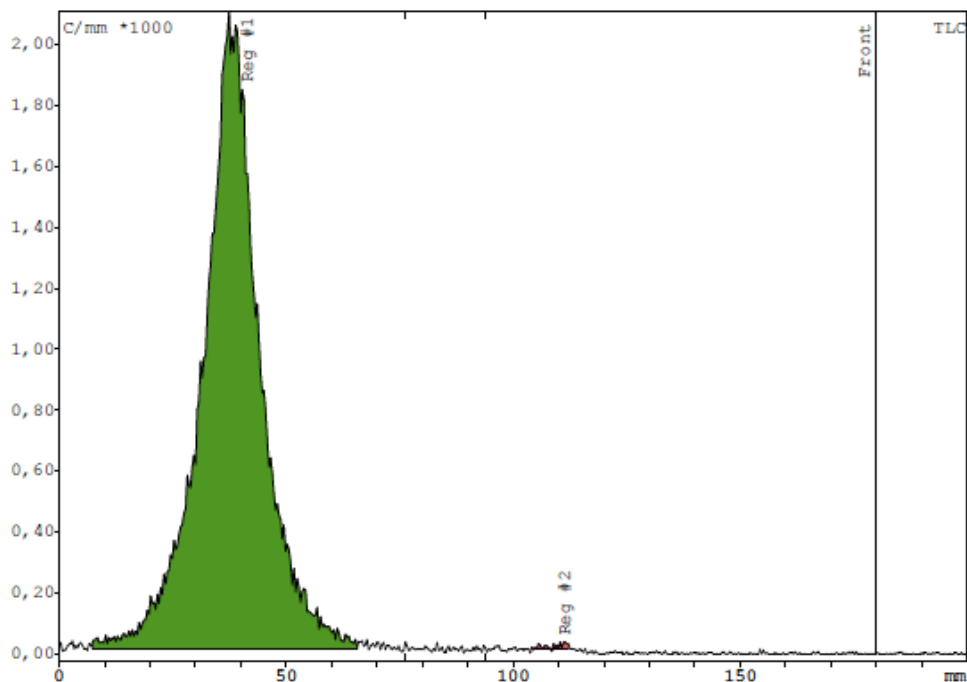
Obr. 17: HPLC rádiochromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného po 24 hodinách od rádioaktívneho značenia.



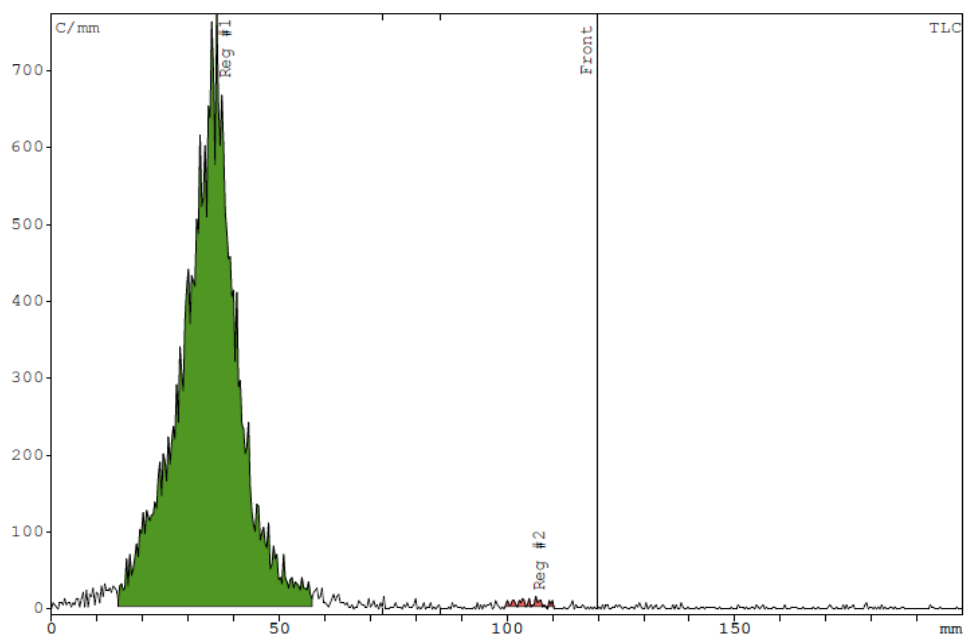
Obr. 18: HPLC rádiochromatogram samotného rádionuklidu ^{99m}Tc neviazaného na komplex HYNIC-ramucirumab. Rádiochromatograf deteguje rádionuklid ^{99m}Tc v 23 minúte.

6.1.2 Stanovenie rádiochemickej čistoty a stability ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab pomocou metódy iTLC

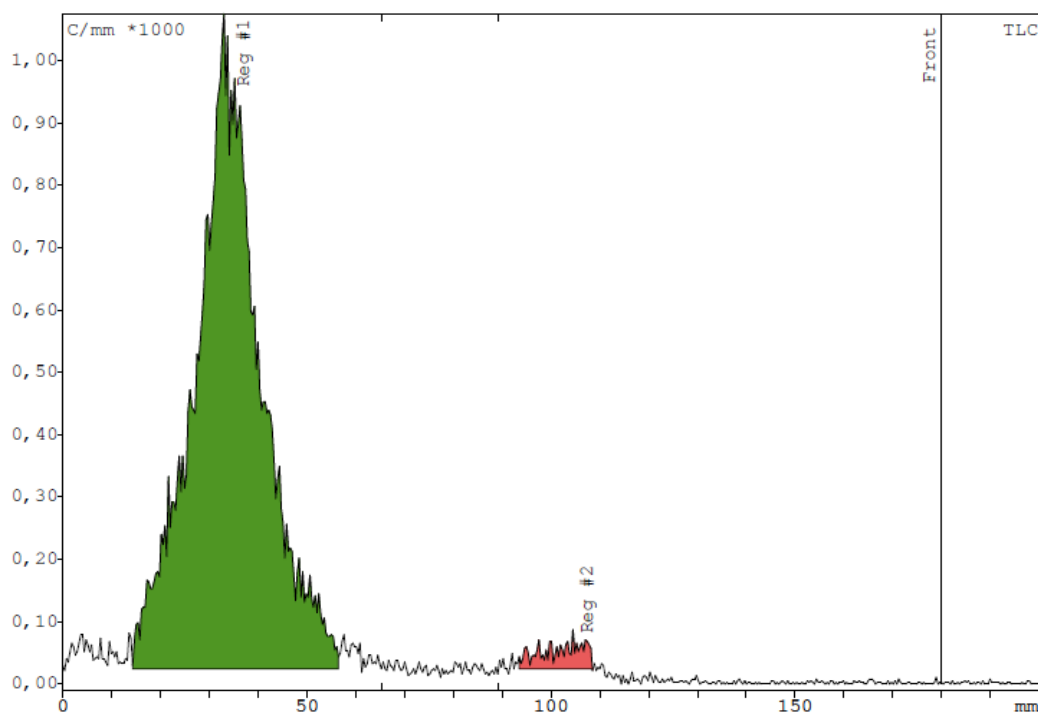
Ďalšou metódou pre overenie čistoty a stability bola určená metóda iTLC. Rádiochemická čistota bola meraná hneď po značení monoklonálnej protilátky ramucirumabu pomocou rádionuklidu ^{99m}Tc , teda v 0 hodine. Ďalšie meranie sa konalo po uplynutí 24 hodín. Výsledky merania sú zhrnuté v **Obr. 19 až 22**, kde prvý zelený pík značí aktivitu pochádzajúcu z komplexu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab, ktorý zostal na štarte chromatografického papierika. S čelom mobilnej fáze putovalo voľné technécium, ktoré je zobrazené ako červený pík na iTLC zázname. Rádiochemická čistota pripraveného rádiofarmaka bola vždy vyššia než 95 %, čo je jedna z podmienok Európskeho liekopisu pre možnú aplikáciu pripravených rádiofarmák pacientom. Na **Obr. 23** je pre demonštráciu uvedený prípad, kde sa rádioaktívne značenie ramucirumabu nepodarilo, keďže výsledok analýzy rádiochemickej čistoty bol len zhruba 76 %. **Obr. 24** ilustruje analýzu samotného ^{99m}Tc pre identifikáciu píku eluovaného neviazaného rádionuklidu.



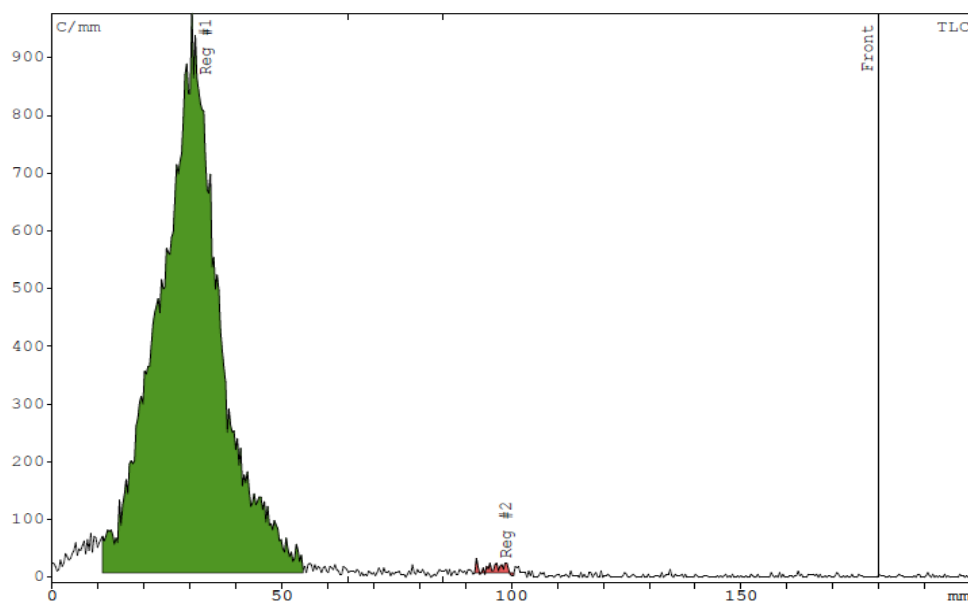
Obr. 19: Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM v 0 hodine z dňa 1.11. 2016. Aktivitu viazanú na komplex ^{99m}Tc -HYNIC-RAM znázorňuje zelený pík. Nečistotu znázorňuje červený pík. Výsledná čistota predstavovala 99,78 % a výsledná nečistota 0,22 %.



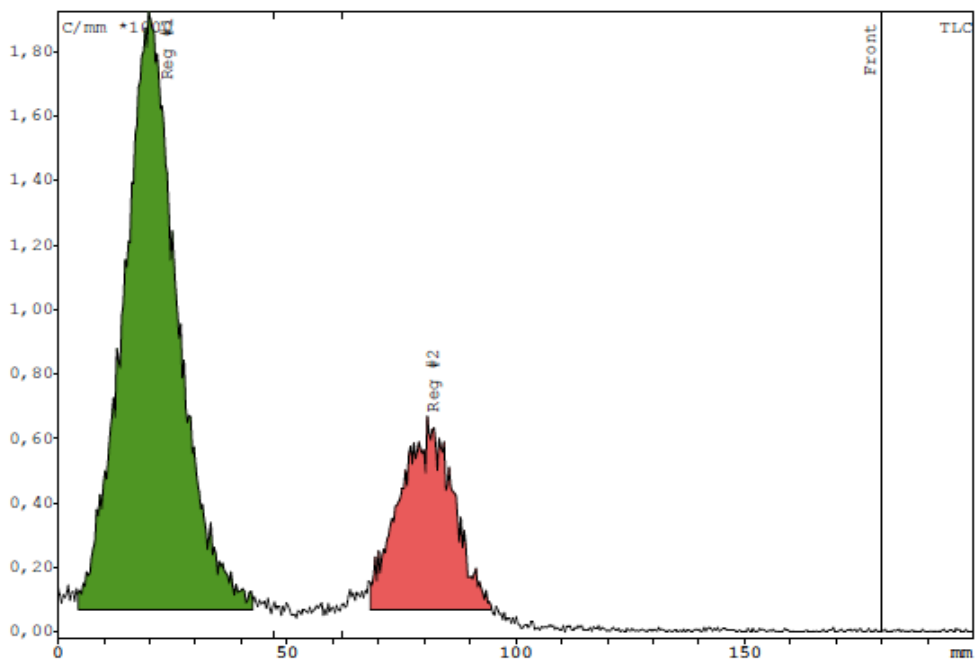
Obr. 20: Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM po 24 hodinách od rádioaktívneho značenia konaného dňa 1.11.2016. Zelený pík vykazuje šum signálu, čo naznačuje slabšiu aktivitu naviazaného rádiolinuklidu v komplexe. Plocha komplexu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM vykazuje 99,55 %.



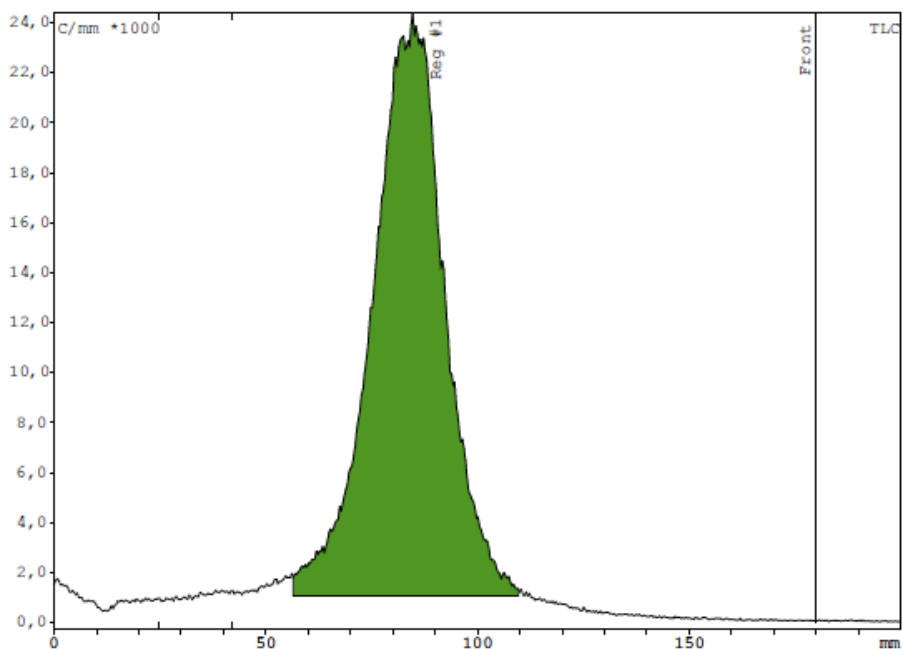
Obr. 21: Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM v 0 hodine od rádioaktívneho značenia konaného dňa 16.2.2017. Plocha zeleného piky vykazuje 97,29 % a plocha nečistoty (červený pik) 2,71 %.



Obr. 22: Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM v 0 hodine od rádioaktívneho značenia konaného dne 20.4. 2017. Plocha nečistôt (červený pik) tvorí len 0,44 %. Plocha vykazujúca aktivitu rádionuklidu v komplexe (zelený pik) tvorí 99,56 %.



Obr. 23: Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM v 0 hodine od radioaktívneho značenia, konaného dňa 2.3.2017. Na grafe je jednoznačne vidieť prítomnosť druhého píku (červený), ako nečistoty, ktorá predstavuje aktivitu nenasväzané rádionuklidu ^{99m}Tc . Tento červený pík predstavuje 23,89 %. Hlavný zelený pík predstavuje 76,11 %. Takto pripravený konjugát je nevyhovujúci ako rádiopreparát a nebol použitý pre meranie.



Obr. 24: Záznam iTLC merania samotného rádionuklidu ^{99m}Tc pre identifikáciu pozície voľného rádionuklidu.

6.1.3 Stanovenie kinetických parametrov ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab pomocou prístroja LigandTracer Yellow na bunkách PC-3.

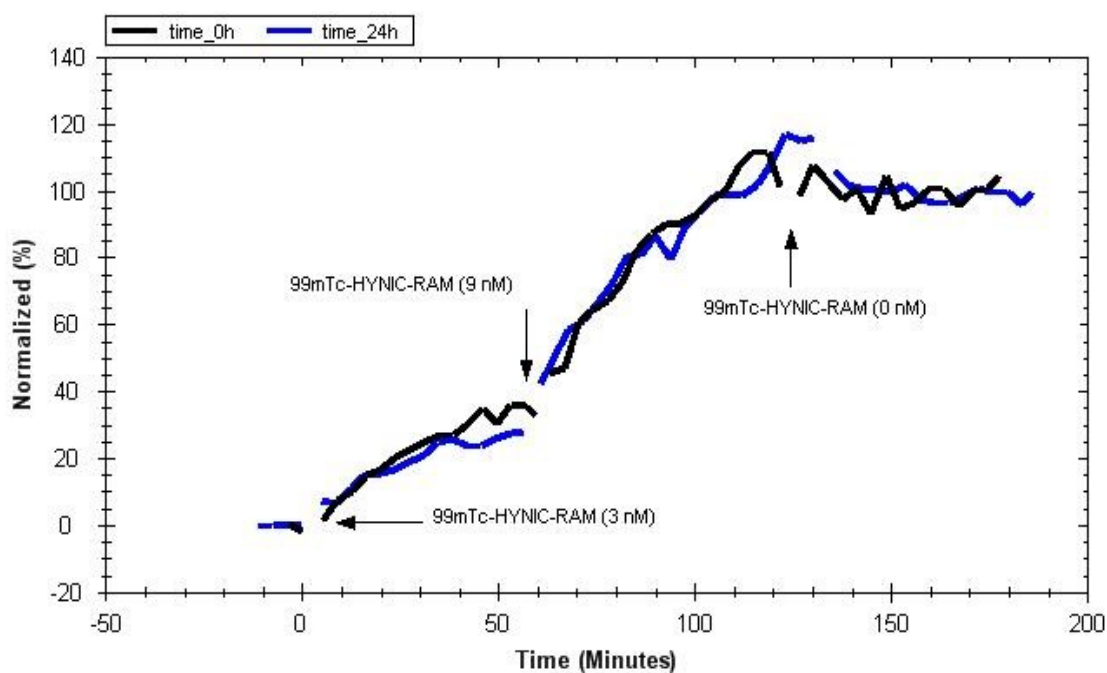
Meranie pomocou prístroja LigandTracer Yellow sa konalo v rámci stanovenia afinity rádioaktívne značenej protilátky ramucirumab k bunkovým (PC-3 bunky) receptorom VEGFR-2. Afinita bola stanovená pomocou rovnovážnej disociačnej- konštanty K_D . Analýza prebiehala hneď po rádioaktívnom značení komplexu HYNIC-ramucirumab pomocou rádionuklidu ^{99m}Tc a prípadne následne behom 24 hodín od značenia. Meranie spočívalo v pridávaní rádioaktívne značenej protilátky v dvoch prídavkoch so zvyšujúcou sa koncentráciou (3 a 9 nM) v rámci analýzy asociačnej fáze, kde nasledovalo stanovenie disociačnej fáze bez prítomnosti voľného rádiofarmaka v médiu. Získané hodnoty boli vyhodnotené pomocou programu TraceDrawer. Program stanovil hodnoty asociačnej a disociačnej konštanty, z ktorých spočítal hodnotu K_D .

$$K_D = \frac{kd}{ka}$$

ka asociačná konštantá

kd disociačná konštantá

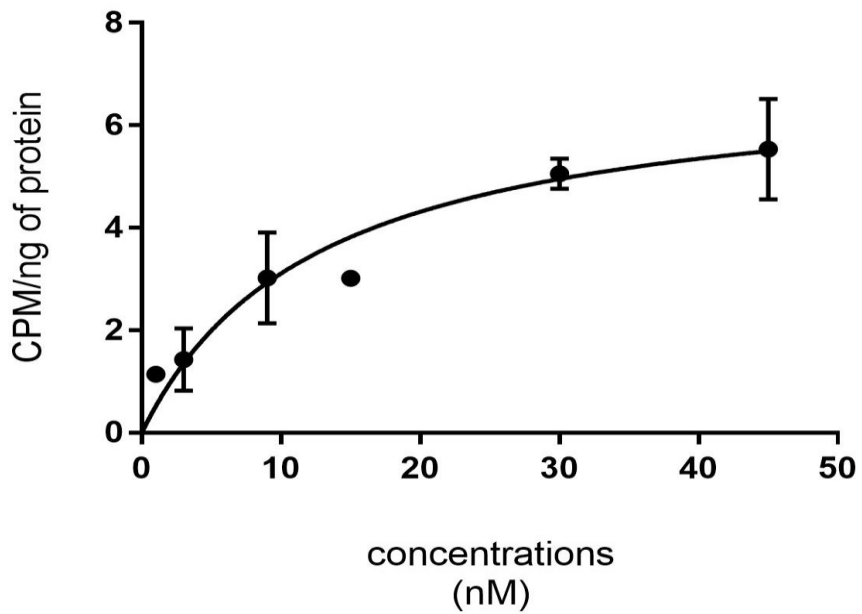
Na základe troch nezávislých meraní konaných v rôznych dňoch boli získané nasledujúce hodnoty K_D pre ^{99m}Tc -HYNIC-RAM: $K_D = 2,12$ nmol, $K_D = 1,37$ nmol a $K_D = 1,13$ nmol. Nízke hodnoty K_D naznačujú vysokú afinitu značenej protilátky k receptoru VEGFR-2. Príklad merania pomocí automatickej metódy stanovenia interakcie ligand – receptor v reálnom čase je uvedený v **Obr. 25**.



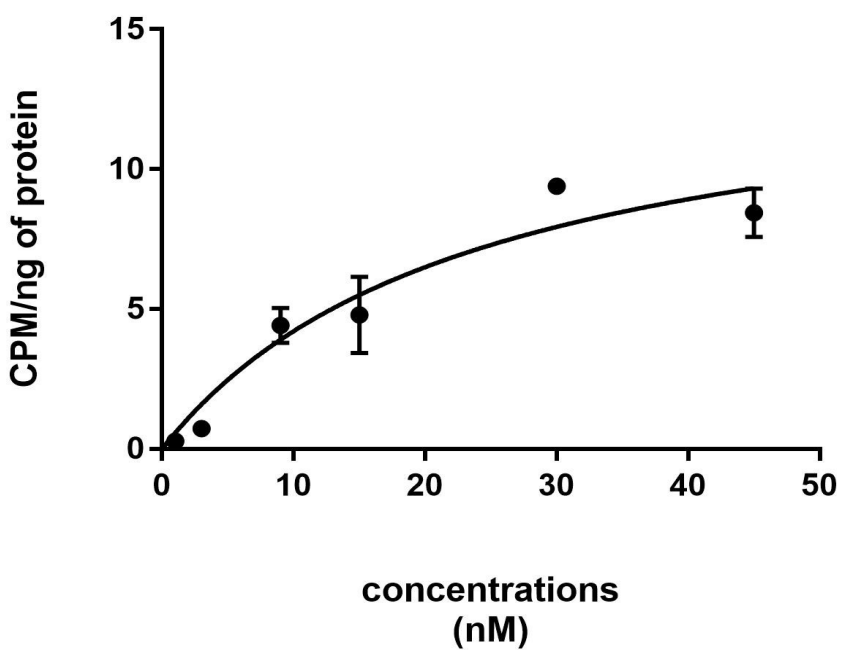
Obr. 25: Záznam merania interakcie $^{99m}\text{Tc-HYNIC-RAM}$ s bunkovým VEGFR-2 na prístroji LigandTracer Yellow. Čierna farba krivky znázorňuje meranie v 0 hodine. Modrá farba znázorňuje meranie v 24 hodine. Prvých 10 minút merania prebiehalo bez prídavku rádioligandu v rámci stanovenia tzv. baseline. Prvá šípka naznačuje prvé prídanie $^{99m}\text{Tc-HYNIC-RAM}$ (3 nM) a následný priebeh asociačnej fáze do prvej ekvivalencie. Druhá šípka naznačuje druhý prídavok $^{99m}\text{Tc-HYNIC-RAM}$ (9 nM) s následnou analýzou do druhej ekvivalencie. Tretia šípka naznačuje začiatok disociačnej fáze, kedy došlo k výmene média s voľným rádioligandom za médium bez značenej protilátky. Meranie trvalo 60 minút, počas ktorých dochádzalo k prípadnému vyvážovaniu rádiofarmaka z väzby na receptory.

6.1.4 Saturačné štúdie

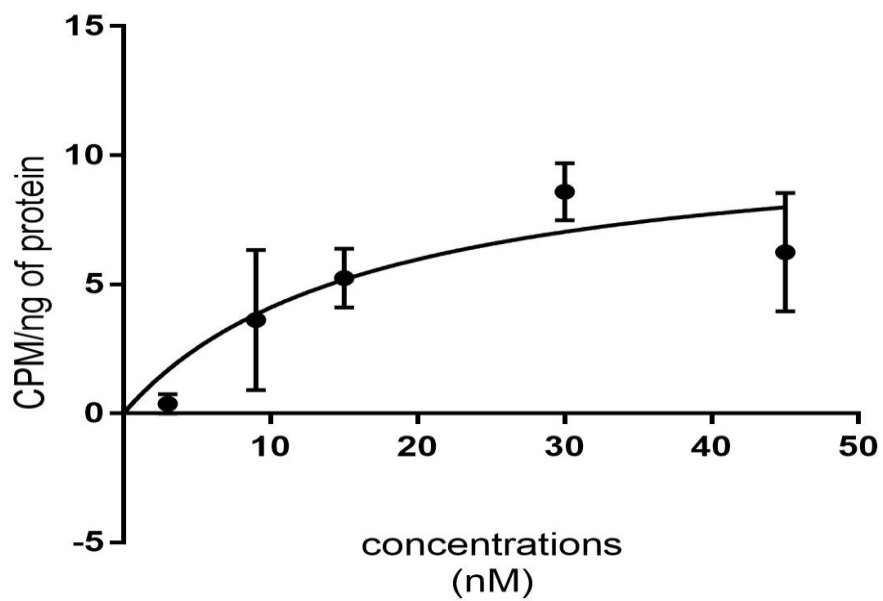
Manuálna technika stanovenia afinity $^{99m}\text{TcHYNIC-RAM}$ označovaná ako saturačné štúdie poskytla hodnoty rovnovážnej disociačnej konštanty K_D . Princíp stanovenia spočíval vo väzbe rádioligandu na bunkový VEGFR-2. Na **Obr. 26 až 28** sú uvedené výsledky troch nezávislých meraní spracovaných v programe GraphPad Prism spoločne so stanovenou hodnotou K_D . Aktivita stanovená v jednotlivých vzorkách bunkového lyzátu bola prepočítaná na množstvo bunkového proteínu a následne vynesená voči koncentrácii $^{99m}\text{Tc-HYNIC-RAM}$. Namerané hodnoty rovnovážnej disociačnej konštanty boli nasledujúce: 7,96 nM, 9,94 nM a 12,08 nM.



Obr. 26: Výsledný graf prvej saturačnej štúdie s výslednou hodnotou $K_D = 7,96$ nM.



Obr. 27: Výsledný graf druhej saturačnej štúdie s výslednou hodnotou $K_D = 9,94$ nM.



Obr. 28: Výsledný graf tretej saturačnej štúdie s výslednou hodnotou $K_D = 12,08$ nM.

7 Diskusia

S vysokým nárastom vzniku zhubných novotvarov v novodobej populácii sa posledné roky čoraz viac rozvíja cieleňá protinádorová terapia. Z dôvodu veľmi častých závažných nežiadúcich účinkov chemoterapeutických liečiv sa do popredia dostávajú monoklonálne protilátky. Monoklonálna protilátka ramucirumab je humánna IgG1 MAb, ktorá selektívne inhibuje VEGFR-2 a blokuje VEGFR-2 signalizačné a aktivačné dráhy.

Vaskulárny endotelový rastový faktor je silný angiogenný faktor, ktorý je spájaný s progresiou a schopnosťou tvoriť metastázy u mnohých solidných a hematopoetických malignít. (Fan *et al.*, 2005) Nadmerná expresia VEGF sa vyskytuje v mnohých typoch ľudských nádorov, čím sa stáva VEGF racionálnym cieľom antiangiogénnej terapie. To viedlo k záujmu o blokovanie signalizácie VEGF v ľudských nádoroch. Boli vynájdené protilátky viažuce sa na tento receptor a chemické molekuly, ktoré môžu blokovať funkciu tyrozínkinázy VEGF receptorov. (Nagengast *et al.*, 2007). Bevacizumab a ramucirumab sú monoklonálne protilátky zamerané na blokáciu signalizácie VEGF, ktoré viedli k zlepšeniu celkového prežitia pacientov u mnohých nádorových ochorení. (Hall *et al.* 2015) Mnoho štúdií sa zaoberá rádioaktívnym značením monoklonálnych protilátok pre maximalizáciu účinku. Práve preto, sme sa rozhodli v našej práci pracovať s monoklonálnou protilátkou ramucirumab, ktorá je relatívne novou terapeutickou látkou. Ramucirumab je cieleňý na VEGFR-2 receptor, ktorý je zodpovedný za angiogézu. V našom prípade sme túto protilátku značili diagnostickým rádionuklidom ^{99m}Tc zo zámerom, aby sa takto značená MAb ramucirumab mohla použiť pre rádiodiagnostické účely VEGFR-2 pozitívnych nádorov.

V príkladanej diplomovej práci bola overená metóda nepriameho rádioaktívneho značenia MAb ramucirumab pomocou rádionuklidu ^{99m}Tc . V rámci overenia metodiky značenia ramucirumabu sa urobila nasledovná kontrola čistoty pripraveného rádiopreparátu, jeho stability po dobu 24 hodín od značenia a ďalej *in vitro* overenie afinity rádioaktívne značenej protilátky k bunkovým receptorom VEGFR-2. Pre overenie rádiochemickej čistoty sa použili metódy HPLC s rádiometrickou detekciou a metóda iTLC. Metóda iTLC je všeobecne známa, ako najpoužívanejšia orientačná metóda pre stanovenie nečistôt rádiochemických zlúčenín. Pripravené rádioligandy, následne použité v experimentoch, ktoré boli popísane v tejto diplomovej práci, vykazovali čistotu nad 95 %. Stabilita pripraveného rádiofarmaka sa potom analyzovala v priebehu nasledujúcich 24 hodín. Rádioligand ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab, ktorý vykazoval rádiochemickú čistotu nižšiu ako 95 %, vykazoval nekvalitné výsledky väzby na cieľové bunkové receptory, a preto nebolo meranie s takto pripraveným rádiofarmakom použité pre výsledné hodnotenie. Prítomná nečistota bola voľný rádionuklid ^{99m}Tc , ktorý sa pri značení nenaviazal do HYNIC molekuly. HPLC analýza patrí medzi presnejšie metódy na overenie rádiochemickej čistoty. Na rádiokromatograme HPLC analýzy nebol vidieť žiaden zreteľne odlišný pík, ktorý by značil prípadnú prítomnosť voľného technécia uvoľneného z imunokonjugátu. Pribúdajúcim časom sa odozva rádiokromatogramu zhoršovala vplyvom rastúceho šumu z dôvodu poklesu rádioaktivity v rámci krátkeho fyzikálneho polčasu technécia. V

rámci vzájomného porovnania stanovenia rádiochemickej čistoty pripraveného ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu pomocou metód iTLC a HPLC analýzy boli výsledky porovnateľné.

Štúdia väzby rádioaktívne značenej monoklonálnej protilátky na VEGFR-2 bola analyzovaná na prístroji LigandTracer Yellow. Bola overená afinita značenej protilátky pomocou tejto automatickej techniky v reálnom čase. Technika prístrojom LigandTracer bola tiež porovnávaná s manuálnou technikou saturačnej štúdie, ktorá je zavedenou metódou v mnohých *in vitro* štúdiách pre stanovenia afinity rádioaktívne značené látky k cieľovým proteínovým štruktúram. (Bigott-Hennkens *et al.*, 2008) Zámerom experimentov bolo určiť hodnoty rovnovážnych disociačných konštánt (K_D), ktoré nám vypovedali výslednú afinitu rádioaktívne značeného ligandu k VEGFR-2 na PC-3 bunkách. Hlavný rozdiel medzi metódami je, že pri meraní technológiou LigandTracer, inkubácia rádioligandu prebieha súčasne s meraním, teda záznamom interakcie rádioligand – receptor v reálnom čase. Táto výhoda je pozorovateľná na grafe, kde sú znázornené reálne interakcie medzi značeným ligandom a bunkovým receptorom. Fáza asociačná, fáza rovnováhy medzi voľným a naviazaným ligandom na receptore teda tzv. ekvivalencia a fáza disociačná, sú zobrazované na monitore prístroja v reálnom čase.

Manuálna technika je tzv. end-point metóda, kde sa zisťuje prípadná väzba rádioligandu na cieľovú proteínovú štruktúru po inkubácii. Dá sa teda povedať, že ide o metódu „naslepo“, kedy po celú dobu inkubácie nevieme, či sa rádioligand viaže na cieľovú štruktúru alebo nie. Ďalšia nevýhoda manuálnej techniky spočíva vo vyšších nákladoch na zrealizovanie z dôvodu vyššej spotreby chemikálií a hlavne pomerne drahých ligandov ako napríklad práve MAb. Ďalšou hodnotnou výhodou v použití automatickej techniky oproti tej manuálnej je menšia časová náročnosť na jej uskutočnenie.

Lepšie výsledky K_D vykazovala automatická technológia analýzy v reálnom čase. Priemerná hodnota K_D pro automatickou techniku bola 1,54 ($\pm 0,52$) nM, kde hodnota K_D získaná manuálnou technikou bola o takmer rád vyššie teda 9,99 ($\pm 2,06$) nM. Rozdielnosť výsledkov mohla byť spôsobená chybami spojenými pri práci človeka v laboratóriu, hlavne v rámci manuálnej techniky, možnými genetickými zmenami buniek počas vykonávania meraní, rozdielnym nárastom buniek pri inkubácii a odchýlkach laboratórnej techniky zahrnujúci práve aj prístroj LigandTracer, kedy vyššie teploty merania a hlavne vyššia vlhkosť môžu spôsobovať menšie odchýlky v meraní aktivity rádiodetektorom. Na základe výsledkov práce je možné konštatovať, že obe metódy poskytlí takmer zrovnateľné výsledky afinity ^{99m}Tc -HYNIC-RAM k VEGFR-2. Z hodnotenia oboch použitých metód pre *in vitro* afinitné štúdie vyplýva podstatná výhoda prístroja LigandTracer, ktorá spočíva v jednoduchosti manipulácie a prípravy merania a presnosti výsledkov. Nevýhodou však stále ostáva vysoká obstarávacia cena tohto prístroja.

Podstatným záverom ale je, že možnosť nepriameho rádioaktívneho značenia monoklonálnej protilátky ramucirumab pomocou technécia prostredníctvom chelátoru HYNIC bolo úspešne zrealizované a *in vitro* overené z hľadiska zachovania väzbových

možností na cieľový receptor, pre ktorého blokáciu bola protilátka konštruovaná. Podľa dostupných informácií je afinita nekonjugovanej a neznačené protilátky ramucirumab k VEGFR-2 0,05 nM (Lu *et al.*, 2003). Afinita nami pripraveného rádiofarmaka ^{99m}Tc -HYNIC-RAM bola teda o dva rády nižšia. Tu môže svoju negatívnu rolu hrať proces značenia alebo samotný fakt väzby molekuly HYNIC na biomolekulu protilátky. Nič menej, rádioaktívne značenie prebiehalo vždy pri šetrných podmienkach, teda za fyziologického pH a pri teplote 37°C. Preto sa skôr domnievame, že negatívny vplyv na afinitu značenej protilátky mala vlastná konjugácia, konkrétne prípadná väzba molekuly HYNIC na väzbové Fab miesto na molekule ramucirumab. Ďalší možný vplyv na afinitu protilátky môže mať aj samotné použitie bunkovej línie z hľadiska bunkového povrchu, ako bolo publikované v odbornom článku, (Barta *et al.*, 2012), kde sa sledoval vplyv typu bunkovej línie na afinitu značeného rádioligandu. Rovnako aj v našom prípade mohli rôzne pomery na bunkovom povrchu zásadne ovplyvniť väzbu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu na bunkový VEGFR-2. Navyše, údaj o väzbe na VEGFR-2 prezentovaný v publikácii Lu *et al.*, 2003 vychádza z merania väzby neznačeného ramucirumabu na samotné receptory imobilizované na meracom chipe. Ide teda o metódu, kedy sa nepoužívajú na bunkách prezentované receptory, čo môže významne ovplyvniť výsledok merania K_D .

Záverom je možné teda konštatovať, že metóda značenia ramucirumabu prostredníctvom chelatačného činidla HYNIC prebehla úspešne s vysokou rádiochemickou čistotou nad 95 %. V *in vitro* testovaní väzby ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab bola dokázaná dostatočná afinita k cieľovému receptoru VEGFR-2 vyjadrená rovnovážnou disociačnou konštantou, avšak tato hodnota bola o dva rády nižšia, než je K_D pre neznačenú MAb ramucirumab.

8 Záver

Jednotlivé ciele, ktoré sme si na začiatku stanovili, sa nám podarilo dosiahnuť následne:

- Konjugácia monoklonálnej protilátky ramucirumabu pomocou chelatačného činidla HYNIC s následným rádioaktívnym značením pomocou rádionuklidu ^{99m}Tc prebehla úspešne. Stanovená rádiochemická čistota pomocou metódy iTLC analýzy bola vyššia než 95 %. Ak sa nepodarilo dosiahnuť túto hranicu rádiochemickej čistoty, rádiofarmakum nebolo použité pre *in vitro* experimenty.
- Bunková kultivácia buniek ľudského karcinómu prostaty (PC-3), ako aj presadzovanie buniek do kultivačných fľaši a jamkových platničiek boli úspešne zvládnuté.
- Prípravy fosfátového, citrátového a Krebs-Ringerovho pufru, HPLC mobilnej fázy a kultivačného média boli pripravené správne podľa publikovateľných postupov.
- Rádiochemická čistota ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab bola overovaná v závislosti na čase po dobu 24 hodín pomocou iTLC a HPLC metód. Bola dokázaná potrebná stabilita pripravovaného rádioligandu.
- Metódou automatickej rádioimunoanalýzy bola analyzovaná afinita monoklonálnej protilátky na receptoroch VEGFR-2 nachádzajúcich sa na povrchu PC-3 bunkách. Metóda bolo analyzovaná prístrojom LigandTracer Yellow. Pomocou programu TraceDrawer boli úspešne vyhodnotené rovnovážné disociačné konštanty. Hodnoty rovnovážnych disociačných konštánt boli dostatočne nízke a tým naznačovali vysokú afinitu rádioligandu k receptoru.
- Aktivity ^{99m}Tc v imunokomplexe ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab namerané pomocou prístroja Gamma counter boli zamerané pro metódu manuálneho stanovenia afinity rádioligandu k cieľovému bunkovému proteínu. Získane dáta boli vyhodnotené v programe MS Office Excel a GraphPad Prism pre stanovenie K_D rádionuklidu k VEGFR-2.
- Koncentrácia bunkového proteínu vo vzorkách v rámci saturačných štúdií bola určená pomocou metódy BCA a úspešne vyhodnotená v programe MS Excel.
- Hodnoty aktivít ^{99m}Tc a koncentrácií bunkového proteínu boli použité pre zrealizovanie grafu saturácie bunkových receptorov pomocou programu GraphPad Prism. Graf vykazoval exponenciálny rast aktivity (v jednotkách CPM) na ng proteínu v závislosti na koncentrácií rádioligandu.
- Výsledné rovnovážne disociačné konštanty určené pomocou manuálnej saturačnej metódy a automatickej metódy v reálnom čase (LigandTracer Yellow) vykazovali opakovateľné výsledné hodnoty stanovované K_D .
- Pri porovnaní výsledných K_D pomocou automatickej metódy v reálnom čase a ručnej metódy saturačných štúdií boli získané hodnoty o rádu nižšie v prípade automatickej imunoanalýzy.

- Stanovené kinetické parametre (K_D) potvrdili vhodnosť rádioaktívneho značenia MAb ramucirumab rádiodiagnostickým nuklidom ^{99m}Tc za účelom prípadnej vizualizácie VEGFR-2 pozitívnych nádorových ochorení. Rádiofarmakum ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab je tak vhodným kandidátom na prípadné nasledujúce *in vivo* testovanie u VEGFR-2 pozitívnych nádorových laboratórnych zvierat.

9 Zoznam použitých zdrojov

ABRAMS, M J, M JUWEID, C I TENKATE, D A SCHWARTZ, M M HAUSER, F E GAUL, A J FUCCELLO, R H RUBIN, H W STRAUSS a A J FISCHMAN, 1990. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* [online]. 1990, roč. 31, č. 12, s. 2022–8. ISSN 0161-5505. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2266401>

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie*. Praha: Galén, c2011. ISBN 9788072627158

APRILE, Giuseppe, Erika RIJAVEC, Caterina FONTANELLA, Karim RIHAWI a Francesco GROSSI, 2014. Ramucirumab: Preclinical research and clinical development. *OncoTargets and Therapy* [online]. 2014, roč. 7, s. 1997–2006. ISSN 11786930. Dostupné na: [doi:10.2147/OTT.S61132](https://doi.org/10.2147/OTT.S61132)

BARTA, Pavel, Jennie MALMBERG, Ludmila MELICHAROVA, John STRANDGÅRD, Anna ORLOVA, Vladimir TOLMACHEV, Milan LAZNICEK a Karl ANDERSSON, 2012. Protein interactions with HER-family receptors can have different characteristics depending on the hosting cell line. *International Journal of Oncology* [online]. 2012, roč. 40, č. 5, s. 1677–1682. ISSN 10196439. Dostupné na: [doi:10.3892/ijo.2011.1307](https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1307)

BIGOTT-HENNKENS, H. M., S. DANNOON, M. R. LEWIS a S. JURISSON, 2008. In vitro receptor binding assays: General methods and considerations. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* [online]. 2008, roč. 52, č. 3, s. 245–253. ISSN 18244785. Dostupné na: [doi:R39082077 \[pii\]](https://doi.org/10.1007/s12077-008-0007-7)

BJÖRKE, Henrik a Karl ANDERSSON, 2006. Automated, high-resolution cellular retention and uptake studies in vitro. *Applied Radiation and Isotopes* [online]. 2006, roč. 64, č. 8, s. 901–905. ISSN 09698043. Dostupné na: [doi:10.1016/j.apradiso.2006.03.002](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2006.03.002)

CLARKE, J M a H I HURWITZ, 2014. Targeted inhibition of VEGF Receptor-2: An update on Ramucirumab. *Expert Opinion In Biological Therapeutics* [online]. 2014, roč. 13, č. 8, s. 1187–1196. Dostupné na: [doi:10.1517/14712598.2013.810717](https://doi.org/10.1517/14712598.2013.810717). Targeted

CWIERTKA, K., R. TROJANEC, K. BOUCHALOVÁ a M. a HAJDÚCH. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. 2004, *Klinická farmakologie a farmacie* 18, 165–170

FAN, Fan, Jane S. WEY, Marya F. MCCARTY, Anna BELCHEVA, Wenbiao LIU, Todd W. BAUER, Ray J. SOMCIO, Yan WU, Andrea HOOPER, Daniel J. HICKLIN a Lee M. ELLIS, 2005. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* [online]. 2005, roč. 24, č. 16, s. 2647–2653. ISSN 09509232. Dostupné na: [doi:10.1038/sj.onc.1208246](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208246)

FERENČÍK, Miroslav. *Imunitní systém: informace pro každého*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1196-6

FOLKMAN, Judah, 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology* [online]. 2002, roč. 29, č. 6Q, s. a5002906q0015. ISSN 00937754. Dostupné na: [doi:10.1053/sonc.2002.37263](https://doi.org/10.1053/sonc.2002.37263)

FONTANELLA, Caterina, Elena ONGARO, Silvia BOLZONELLO, Michela GUARDASCIONE, Gianpiero FASOLA a Giuseppe APRILE, 2014. Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors. *Annals of translational medicine* [online]. 2014, roč. 2, č. 12, s. 123. ISSN 2305-5839. Dostupné na: doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.14

FRANKLIN, Matthew C., Elizabeth C. NAVARRO, Yujie WANG, Sheetal PATEL, Pinki SINGH, Yi ZHANG, Kris PERSAUD, Amtul BARI, Heather GRIFFITH, Leyi SHEN, Paul BALDERES a Paul KUSSIE, 2011. The structural basis for the function of two anti-VEGF receptor 2 antibodies. *Structure* [online]. 2011, roč. 19, č. 8, s. 1097–1107. ISSN 09692126. Dostupné na: doi:10.1016/j.str.2011.01.019

GANSOW, Otto A., 1991. Newer approaches to the radiolabeling of monoclonal antibodies by use of metal chelates. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation*. [online]. 1991, roč. 18, č. 4, s. 369–381. ISSN 08832897. Dostupné na: doi:10.1016/0883-2897(91)90063-Q

HALL, Richard D, Tri M LE, Daniel E HAGGSTROM a Ryan D GENTZLER, 2015. Angiogenesis inhibition as a therapeutic strategy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Translational lung cancer research* [online]. 2015, roč. 4, č. 5, s. 515–23. ISSN 2218-6751. Dostupné na: doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2015.06.09

HANZALOVÁ, L. *Stanovení radiochemické čistoty a porovnání stability dvou vybraných receptorově specifických radioaktivně značených peptidů*. 2011. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové

HARRIS, Marion, 2004. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *The lancet oncology* [online]. 2004, roč. 5, č. 5, s. 292–302. ISSN 14702045. Dostupné na: doi:10.1016/S1470-2045(04)01467-6

CHALABALA, Milan. *Technologie léků: galenika*. Praha: Galén, 1997. ISBN 80-85824-68-x

CHOUERI, Toni K., Anne PLANTADE, Paul ELSON, Sylvie NEGRIER, Alain RAVAUD, Stephane OUDARD, Ming ZHOU, Brian I. RINI, Ronald M. BUKOWSKI a Bernard ESCUDIER, 2008. Efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic papillary and chromophobe renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2008, roč. 26, č. 1, s. 127–131. ISSN 0732183X. Dostupné na: doi:10.1200/JCO.2007.13.3223

JÍLEK, Petr. *Základy imunologie. 2.*, preprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3

KLENER, Pavel a KLENER jr., Pavel, *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2808-7

KLENER, Pavel a KLENER jr. Pavel, *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4171-0

KORANDA, Pavel, M. KAMÍNEK, J. PTÁČEK, M. MYSLIVEČEK, P. KARHAN, V. HUŠÁK, I. MATELKOVÁ A DRYMLOVÁ J. *Nukleární medicína*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4031-6

KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-X

KUPKA, Karel, Jozef KUBINYI a Martin ŠÁMAL. *Nukleární medicína*. Praha: P3K, c2007. ISBN 9788090358492

LÁZNÍČEK, Milan a Pavel KOMÁREK. *Základy radiofarmacie*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-781-x

LU, Dan, Juqun SHEN, Marie D. VIL, Haifan ZHANG, Xenia JIMENEZ, Peter BOHLEN, Larry WITTE a Zhenping ZHU, 2003. Tailoring *in Vitro* Selection for a Picomolar Affinity Human Antibody Directed against Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 for Enhanced Neutralizing Activity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, roč. 278, č. 44, s. 43496–43507. ISSN 0021-9258. Dostupné na: doi:10.1074/jbc.M307742200

MAKAIJOVA, 2006. Miesto a prínos PET v onkologickej diagnostike. *Onkológia*, 2006, č.1, s. 29–32.

MASHREGHI, Mohammad, Hassan AZARPARA, Mahere R. BAZAZ, Arash JAFARI, Aria MASOUDIFAR, Hamed MIRZAEI a Mahmoud R. JAAFARI, 2017. Angiogenesis biomarkers and their targeting ligands as potential targets for tumor angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2017, č. June, s. 2949–2965. ISSN 10974652. Dostupné na: doi:10.1002/jcp.26049

MESZAROS, Levente K., Anica DOSE, Stefano C.G. BIAGINI a Philip J. BLOWER, 2010. Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) - Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorganica Chimica Acta* [online]. 2010, roč. 363, č. 6, s. 1059–1069. ISSN 00201693. Dostupné na: doi:10.1016/j.ica.2010.01.009

NAGENGAST, W. B., E. G. DE VRIES, G. A. HOSPERS, N. H. MULDER, J. R. DE JONG, H. HOLLEMA, A. H. BROUWERS, G. A. VAN DONGEN, L. R. PERK a M. N. LUB-DE HOOGE, 2007. In Vivo VEGF Imaging with Radiolabeled Bevacizumab in a Human Ovarian Tumor Xenograft. *Journal of Nuclear Medicine* [online]. 2007, roč. 48, č. 8, s. 1313–1319. ISSN 0161-5505. Dostupné na: doi:10.2967/jnumed.107.041301

NEUFELD, Gera, Tzafra COHEN, Stela GENGRINOVITCH a Zoya POLTORAK, 1999. Vascular endothelial growth factor and its receptors . *FASEB J* 13 : 9-22 *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. 1999, č. February, s. 9–22.

Newberg, A. B. a Alavi A., 2009. Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT): Technique. In: Squire LR (ed.) *Encyclopedia of neuroscience*, 2010, 8, s. 871-880. Oxford: Academic Press

Nový, Z. *Studium interakcí radionuklidu značených monoklonálních protilátek s receptorem pro epidermální růstový faktor in vitro*, 2014. B.m. Disertační práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové (FaF), Univerzita Karlova v Praze.

OLLINGER, John M. a Jeffrey A. FESSLER, 1997. Positron-emission tomography. *IEEE Signal Processing Magazine* [online]. 1997, roč. 14, č. 1, s. 43–55. ISSN 10535888. Dostupné na: doi:10.1109/79.560323

OTROCK, Zaher K., Jawad A. MAKAREM a Ali I. SHAMSEDDINE, 2007. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [online]. 2007, roč. 38, č. 3, s. 258–268. ISSN 10799796. Dostupné na: doi:10.1016/j.bcmed.2006.12.003

- PANDEY, Manjari a Daruka MAHADEVAN, 2014. Monoclonal antibodies as therapeutics in human malignancies. *Future Oncology* [online]. 2014, roč. 10, č. 4, s. 609–636. ISSN 1479-6694. Dostupné na: doi:10.2217/fon.13.197
- PHELPS, Michael E, 2007. *Emission Computed Tomography* [online]. B.m.: Elsevier Inc. Dostupné na: doi:10.1016/B978-0-12-088592-3.50078-5
- POOLE, Raewyn M., 2014. Nemonoxacin: first global approval. *Drugs* [online]. 2014, roč. 74, č. 12, s. 1445–1453. ISSN 00126667. Dostupné na: doi:10.1007/s40265-014-0270-0
- REILLY, Raymond. *Monoclonal antibody and peptide-targeted radiotherapy of cancer*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010. ISBN 978-0-470-24372-5
- REICHERT, Janice M., 2014. Antibodies to watch in 2014: Mid-year update. *mAbs* [online]. 2014, roč. 6, č. 4, s. 799–802. ISSN 19420870. Dostupné na: doi:10.4161/mabs.29282
- ROSKOSKI, Robert, 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. 2007, roč. 62, č. 3, s. 179–213. ISSN 10408428. Dostupné na: doi:10.1016/j.critrevonc.2007.01.006
- SENGER, D R, S J GALLI, A M DVORAK, C A PERRUZZI, V S HARVEY a H F DVORAK, 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1983, roč. 219, č. 4587, s. 983–5. ISSN 0036-8075. Dostupné na: doi:6823562
- SIEVERS, Eric L. a Peter D. SENTER, 2013. Antibody-Drug Conjugates in Cancer Therapy. *Annual Review of Medicine* [online]. 2013, roč. 64, č. 1, s. 15–29. ISSN 0066-4219. Dostupné na: doi:10.1146/annurev-med-050311-201823
- SOBOTKOVÁ, M. and BARTŮŇKOVÁ, J., 2008. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. *Remedia*, 2008, roč. 18, č. 5, s. 356–364.
- STERN, M. a R. HERRMANN, 2005. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: Present and promise. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. 2005, roč. 54, č. 1, s. 11–29. ISSN 10408428. Dostupné na: doi:10.1016/j.critrevonc.2004.10.011
- TOMBLYN, Michael B., Michael J. KATIN a Paul E. WALLNER, 2013. The new golden era for radioimmunotherapy: Not just for lymphomas anymore. *Cancer Control* [online]. 2013, roč. 20, č. 1, s. 60–71. ISSN 10732748. Dostupné na: doi:10.1177/107327481302000109
- VOSJAN, Maria J.W.D., Lars R. PERK, Gerard W.M. VISSER, Marianne BUDDÉ, Paul JUREK, Garry E. KIEFER a Guus A.M.S. VAN DONGEN, 2010. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nature Protocols* [online]. 2010, roč. 5, č. 4, s. 739–743. ISSN 17502799. Dostupné na: doi:10.1038/nprot.2010.13
- WHITELEY, C. G., 2000. Mechanistic and kinetic studies of inhibition of enzymes. *Cell Biochemistry and Biophysics* [online]. 2000, roč. 33, č. 3, s. 217–225. ISSN 10859195. Dostupné na: doi:10.1385/CBB:33:3:217

YOUSSEOUFIAN, Hagop, Daniel J. HICKLIN a Eric K. ROWINSKY, 2007. Review: Monoclonal antibodies to the vascular endothelial growth factor receptor-2 in cancer therapy. *Clinical Cancer Research* [online]. 2007, roč. 13, č. 18, s. 5544–5549. ISSN 10780432. Dostupné na: doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1107

Elektronické zdroje:

Novotvary 2015 ČR (2015). Novotvary/ÚZIS ČR [online]] [cit.2018-február-5]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary>.

Ridgeview Instruments AB, nedatované. Ridgeview Instruments AB-2 [online] [cit. 2018-marec-13]. Dostupné z: <http://www.ridgeview.eu/instruments/yellow/>.

LigandTracer for interaction analysis, nedatované. [online] Posledná verzia:11.9.2012 [cit. 2018-marec-14]. Dostupné z: http://www.ridgeview.eu/docs/TechNote_LigandTracer.pdf

Product specification LigandTracer Yellow 1.6, nedatované. [online] [cit. 2018-marec-14]. Dostupné z: <http://www.ridgeview.eu/docs/Product%20Specification%20LigandTracer%20Yellow%201.6.pdf>

10 Prílohy

10.1 Zoznam obrázkov:

Obr. 1: Mechanizmus protinádorovej bunkovej (adaptívnej) imunity. Prevzaté z: Klener a Klener 2010.

Obr. 2: Štruktúra monoklonálnej protilátky, Prevzaté z: Ferenčík, 2005.

Obr. 3: Mechanizmus účinku monoklonálnych protilátok. (A) cytotoxicita závislá na protilátke (ADCC). (B) cytotoxicita závislá na komplemente (CDC). (C) Priamy cytotoxický účinok. Prevzaté z: Klener a Klener, 2010.

Obr. 4: Prehľad štruktúr monoklonálnych protilátok. Prevzaté z: Klener a Klener, 2010.

Obr. 5: Znárodnenie účinku protilátky konjugovanej s rádionuklidom. Prevzaté z: Klener a Klener, 2010.

Obr. 6: Graf: vývoj incidencie zhubných nádorov a novotvarov u mužov a žien v ČR (1980-2015). Prevzaté z: <http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary>.

Obr. 7: Angiogenéza. Sekrécia VEGF je stimulovaná nádorom, hypoxiou, nízkym pH a mnohými ďalšími faktormi. VEGF sa viaže na jeho receptor (VEGFR) umiestnený na endoteliálnych bunkách (ECs) krvných ciev. ECs sa aktivujú a začínajú produkovať enzýmy a molekuly, ktoré povedú k šíreniu a rastu ECs. Medzi ďalšie účinky patrí mobilizácia endoteliálnych progenitorových buniek z kostnej drene, zvýšená vaskulárna permeabilita a indukcia tkanivového faktora. Prevzaté z : (Otrock et al., 2007).

Obr. 8: VEGF a jeho receptor. Naviazaním VEGF na jeho receptor vedie k dimerizácii receptora, k aktivácii receptorových tyrozínkináz autofosforyláciou. To vedie k ďalším biologickým účinkom na endotelové bunky. Receptory VEGF sú transmembránové tyrozínkinázy, ktoré po naviazaní ich ligandov na extracelulárnu doménu receptora a nasledujúcou dimerizáciou spustí proces vlastnej autofosforylácie intracelulárnych receptorových tyrozínkináz a tým aktivujú kaskádu syntézy intracelulárnych proteínov. Prevzaté z: (Otrock et al., 2007).

Obr. 9: Prirodzené ligandy, cieľové receptory a antiangiogénne zlúčeniny rodiny VEGF. VEGF-A, vaskulárny endoteliálny rastový faktor A; VEGF-B, vaskulárny endoteliálny rastový faktor B; VEGF-C, vaskulárny endoteliálny rastový faktor C; VEGF-D, vaskulárny endoteliálny rastový faktor D; VEGF-E, vaskulárny endoteliálny rastový faktor E; PlGF, placentárny rastový faktor; VEGFR-1, receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora typu 1; VEGFR-2, receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora typu 2; VEGFR-3, receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora typu 4. Prevzaté a upravené z: (Fontanella et al., 2014).

Obr. 10: Zobrazenie efektu blokovania receptora VEGFR-2 pomocou protilátky ramucirumab. VEGF ligandy sú prezentované ako: A pro VEGF-A, B pro VEGF-B, C pro VEGF-C, D pro VEGF-D a E pro VEGF-E. Prevzaté z: (Aprile et al., 2014).

Obr. 11: *Demonštratívny obrázok prístroja LigandTracer Yellow. Otočná platforma slúži k umiestneniu Petriho misky s bunkovou kultúrou. Vo viečku prístroja je umiestnený detektor rádioaktívneho žiarenia gama. Prevzaté z: <http://www.ridgeview.eu/docs/Product%20Specification%20LigandTracer%20Yellow%201.6.pdf>.*

Obr. 12: *Schéma princípu merania pomocou prístroja LigandTracer. Prevzaté a modifikované z: http://www.ridgeview.eu/docs/TechNote_LigandTracer.pdf.*

Obr. 13: *HPLC rádiokromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného ihneď po rádioaktívnom značení.*

Obr. 14: *HPLC rádiokromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného po 2 hodinách od rádioaktívneho značenia.*

Obr. 15: *HPLC rádiokromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného po 4 hodinách od rádioaktívneho značenia. Chromatogram vykazoval veľký šum v odozve. To značilo zoslabenie žiarenia rádionuklidu vplyvom krátkeho fyzikálneho polčasu rádioaktívneho technécia.*

Obr. 16: *HPLC rádiokromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného po 6 hodinách od rádioaktívneho značenia. Chromatogram vykazoval veľký šum v odozve. To značilo zoslabenie žiarenia rádionuklidu. Stále nebol pozorovaný ďalší pík ako forma nečistoty, ktorá by naznačovala uvoľnenie ^{99m}Tc z komplexu.*

Obr. 17: *HPLC rádiokromatogram analýzy rádiopreparátu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM meraného po 24 hodinách od rádioaktívneho značenia.*

Obr. 18: *HPLC rádiokromatogram samotného rádionuklidu ^{99m}Tc nenaviazaného na komplex HYNIC-ramucirumab. Rádiokromatograf deteguje rádionuklid ^{99m}Tc v 23 minúte.*

Obr. 19: *Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM v 0 hodine z dňa 1.11. 2016. Aktivitu viazanú na komplex ^{99m}Tc -HYNIC-RAM znázorňuje zelený pík. Nečistotu znázorňuje červený pík. Výsledná čistota predstavovala 99,78 % a výsledná nečistota 0,22 %.*

Obr. 20: *Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM po 24 hodinách od rádioaktívneho značenia konaného dňa 1.11.2016. Zelený pík vykazuje šum signálu, čo naznačuje slabšiu aktivitu naviazaného rádionuklidu v komplexe. Plocha komplexu ^{99m}Tc -HYNIC-RAM vykazuje 99,55 %.*

Obr. 21: *Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM v 0 hodine od rádioaktívneho značenia konaného dňa 16.2.2017. Plocha zeleného píku vykazuje 97,29 % a plocha nečistoty (červený pík) 2,71 %.*

Obr. 22: *Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM v 0 hodine od rádioaktívneho značenia konaného dne 20.4. 2017. Plocha nečistôt (červený pík) tvorí*

len 0,44 %. Plocha vykazujúca aktivitu rádionuklidu v komplexe (zelený pik) tvorí 99,56 %.

Obr. 23: Záznam iTLC merania rádiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-RAM v 0 hodine od radioaktívneho značenia, konaného dňa 2.3.2017. Na grafe je jednoznačne vidieť prítomnosť druhého píku (červený), ako nečistoty, ktorá predstavuje aktivitu nenašvanú rádionuklidu ^{99m}Tc . Tento červený pik predstavuje 23,89 %. Hlavný zelený pik predstavuje 76,11 %. Takto pripravený konjugát je nevyhovujúci ako rádiopreparát a nebol použitý pre meranie.

Obr. 24: Záznam iTLC merania samotného rádionuklidu ^{99m}Tc pre identifikáciu pozície voľného rádionuklidu.

Obr. 25: Záznam merania interakcie ^{99m}Tc -HYNIC-RAM s bunkovým VEGFR-2 na prístroji LigandTracer Yellow. Čierna farba krivky znázorňuje meranie v 0 hodine. Modrá farba znázorňuje meranie v 24 hodine. Prvých 10 minút merania prebiehalo bez prídavku rádioligandu v rámci stanovenia tzv. baseline. Prvá šípka naznačuje prvé prídanie ^{99m}Tc -HYNIC-RAM (3 nM) a následný priebeh asociačnej fázy do prvej ekvivalencie. Druhá šípka naznačuje druhý prídavok ^{99m}Tc -HYNIC-RAM (9 nM) s následnou analýzou do druhej ekvivalencie. Tretia šípka naznačuje začiatok disociačnej fázy, kedy došlo k výmene média s voľným rádioligandom za médium bez značenej protilátky. Meranie trvalo 60 minút, počas ktorých dochádzalo k prípadnému vyvážovaniu rádiofarmaka z väzby na receptory.

Obr. 26: Výsledný graf prvej saturačnej štúdie s výslednou hodnotou $K_D = 7,96 \text{ nM}$.

Obr. 27: Výsledný graf druhej saturačnej štúdie s výslednou hodnotou $K_D = 9,94 \text{ nM}$.

Obr. 28: Výsledný graf tretej saturačnej štúdie s výslednou hodnotou $K_D = 12,08 \text{ nM}$.

10.2 Zoznam tabuliek:

Tab. 1: Zhrnutie pridávaných objemov ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab do 24-jamkovej doštičky, kde sa pre každú koncentráciu pripravil triplikát jamiiek.