

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakologie a toxikologie**



**MODIFIKACE FRAGMENTŮ PROTILÁTEK, JEJICH ZNAČENÍ NEKONVENČNÍMI  
POZITRONOVÝMI ZÁŘIČI A BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ PRO DIAGNOSTIKU PET**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Vedoucí disertační práce:

Prof. PharmDr. Ing. Milan Lázníček, CSc.

Konzultant:

Doc. Ing. Ondřej Lebeda, Ph.D.

**Hradec Králové, 2018**

**Mgr. Adam Čepa**



Tato disertační práce vznikla za podpory grantového projektu uděleného grantovou agenturou Univerzity Karlovy č. 45008, Technologickou agenturou České republiky projekty č. Alfa no. TA02010797 a TA03010878. Ozařování na cyklotronu bylo prováděno za podpory infrastruktury CANAM NPI CAS Řež podporované prostřednictvím projektu MŠMT č. LM2011019.

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

V Hradci Králové 28.6.2018

.....

Na tomto místě bych chtěl především poděkovat svému školiteli prof. PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc. a odbornému konzultantovi doc. Ing. Ondřeji Lebedovi, Ph.D. za vedení a trpělivost při realizaci této práce. Dále bych chtěl poděkovat kolegům z Oddělení radiofarmak Katedry farmakologie a toxikologie, dále kolegům z vývojového oddělení společnosti RadioMedic s. r. o. a z Oddělení radiofarmak Ústavu jaderné fyziky Akademie věd České republiky v. v. i. za pomoc v experimentální části této práce a poskytnuté odborné zázemí pro většinu experimentů.

Poděkování také patří Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt č. 45008) a Specifickému vysokoškolskému výzkumu (projekt č. 33905-3) za financování práce.

Za velkou podporu a trpělivost při psaní a realizaci této práce také děkuji své ženě Lucii a synovi Patrikovi.

## OBSAH

Abstrakt	9
Abstrakt (anglická verze)	10
Seznam zkratk	11
1. Úvod	12
2. Teoretická část	15
2.1. Pozitronová emisní tomografie v preklinickém výzkumu	15
2.2. Radiofarmaka pro nukleární onkologii	16
2.2.1. Radionuklidy	16
2.2.1.1. Radionuklidy pro onkologickou diagnostiku	16
2.2.1.2. Radionuklidy pro onkologickou terapii	18
2.2.2. Klinická radiofarmaka pro onkologickou diagnostiku PET	20
2.2.2.1. Zobrazování metabolismu glukosy	20
2.2.2.2. Zobrazování metabolismu cholinu	23
2.2.2.3. Zobrazení transportu aminokyselina syntézy proteinů	24
2.2.2.4. Zobrazení syntézy DNA	25
2.2.2.5. Zobrazení neurotransmiterů a receptorová vazba	27
2.2.2.6. Zobrazení Hypoxie nádoru	35
3. Experimentální část	42
3.1. Metody	42
3.1.1. Syntéza NCS-derivátu z NH <sub>2</sub> -derivátu chelátoru pro radionuklidy mědi	42
3.1.2. NMR, MS charakterizace chelátoru PHS	43
3.1.3. Příprava protilátky IgG M75 a jejího fragmentu scFv-Fc M75	43
3.1.3.1. Konstrukce vektoru pro fúzní protein scFv-Fc	43
3.1.3.2. Exprese	44
3.1.4. Konjugace protilátek	44
3.1.4.1. Konjugace protilátky IgG M75 a fragmentu scFv M75-hFc s chelátorem NCS-PHS	44
3.1.4.2. Konjugace protilátky Nimotuzumab s chelátory NCS-DOTA a NCS-DOTAPO	45
3.1.4.3. Lyofilizace konjugátů protilátek a fragmentů	46

3.1.5. Konjugace peptidů	46
3.1.5.1 Konjugace Pro-1-Tyr-4-Bombesinu s chelátorem NCS-DOTA a NCS-DOTAPO	46
3.2. Radiochemie	47
3.2.1.1. Příprava radionuklidu $^{61}\text{Cu}$	47
3.2.1.2. Příprava radionuklidu $^{64}\text{Cu}$	47
3.2.1.3. Separace beznosičových radionuklidů $^{61}\text{Cu}$ a $^{64}\text{Cu}$ z ozařované matrice	48
3.2.1.4. Radioaktivní značení konjugátů IgG M75-NCS-PHS a scFv M75-hFc-NCS-PHS	49
3.2.1.5. Radioaktivní značení konjugátů hR3-NCS-DOTA	49
3.2.1.6. Radioaktivní značení konjugátů BBN-NCS-DOTA a BBN-NCS-DOTAPO radionuklidem $^{64}\text{Cu}$	49
3.2.1.7. Radioaktivní značení konjugátů BBN-NCS-DOTAPO radionuklidem $^{68}\text{Ga}$	50
3.2.2. Stabilita radioaktivně značených imunokonjugátů	51
3.2.3 ELISA a RIA analýza značených imunokonjugátů	51
3.3. In vitro experimenty	52
3.3.1. In vitro testování značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64	52
3.3.2. In vitro testování značeného konjugátu hR3-NCS-DOTA-Cu-64	53
3.3.3. In vitro testování značeného konjugátu BBN-NCS-DOTA-Cu-64	54
3.4. In vivo experimenty a zobrazování	54
3.4.1. In vivo experimenty a zobrazování značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64	54
3.4.2. In vivo experimenty a zobrazování značeného konjugátu hR3-NCS-DOTA-Lu-177	55
3.4.3. In vivo zobrazování značeného konjugátu BBN-NCS-DOTA-Cu-64	56
3.5. Statistická analýza	56
4. Cíle práce	57
5. Výsledky	58
5.1. Gama spektra ozařovaných terčů	59
5.2. MS a NMR charakterizace NH <sub>2</sub> -derivátu chelátoru PHS	59
5.3. MS a NMR charakterizace NCS-derivátu chelátoru PHS	60
5.4. Konjugace a značení IgG M75-NCS-PHS radionuklidem Cu-64 a Cu-61	61
5.5. Konjugace a značení protilátky Nimotuzumab s chelátory NCS-DOTA a NCS-DOTAPO a jejich značení radionuklidy Cu-64 a Lu-177	62

5.6. Konjugace Pro-1-Tyr-4-Bombesinu s chelátorem NCS-DOTA a NCS-DOTAPO a jejich značení radionuklidem $^{64}\text{Cu}$ a $^{68}\text{Ga}$	64
5.7. Stabilita radioaktivně značených imunokonjugátů	65
5.8. ELISA a RIA analýza značených imunokonjugátů	66
5.9. In vitro testování značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64	66
5.10. In vitro testování značeného konjugátu hR3-NCS-DOTA-Cu-64	67
5.11. In vitro testování značeného konjugátu BBN-NCS-DOTA-Cu-64	68
5.12. In vivo experimenty a zobrazování	69
5.12.1. In vivo experimenty a zobrazování značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64, 61	69
5.12.2. In vivo experimenty a zobrazování značeného konjugátu hR3-NCS-DOTA-Lu-177	74
5.12.3. In vivo zobrazování značeného konjugátu BBN-NCS-DOTA-Cu-64	75
6. Diskuse	76
7. Závěr	79
Seznam použité literatury	81
Přílohy	96





## ABSTRAKT

Zvláštní onkologická diagnostika vyžaduje nové typy selektivních radiofarmak, zejména těch, které jsou vhodné pro molekulární PET zobrazování a terapii potažmo teranostiku. Cílem této práce je představit nová radiofarmaka s cílenou distribucí pro diagnostiku immunoPET a terapii založenou na monoklonální protilátce IgG M75 zaměřené na humánní karboanhydrázu IX, nimotuzumab (hR-3) cílicí receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) a jeden z derivátů bombesinu (BBN) cílicí GRP receptory. Tyto molekuly byly značeny radionuklidy  $^{64}\text{Cu}$  ( $t_{1/2}$  12,70 hod.),  $^{61}\text{Cu}$  ( $t_{1/2}$  3,33 hod),  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2}$  68 min) a  $^{177}\text{Lu}$  ( $t_{1/2}$  6,71 dne). Tato potenciální radiofarmaka byla hodnocena *in vitro* a *in vivo*. Protilátka IgG M75 a její fragment scFv-Fc M75, připravený genetickou modifikací, byly konjugovány s nekomerčním chelátorem specifickým pro měď tzv. "fosfinátem" (PHS) a následně značeny radionuklidy  $^{61,64}\text{Cu}$ . Stabilita značeného konjugátu byla testována v lidském séru. Imunoreaktivita značeného konjugátu byla hodnocena *in vitro* na vhodných buněčných kulturách kolorektálního karcinomu (HT-29) a jeho zobrazovací vlastnosti byly odhadnuty z *in vivo* experimentů na myším modelu s inokulovaným kolorektálním karcinomem HT-29 zobrazeným na  $\mu\text{PET}/\text{CT}$ . Testovaný radioimunokonjugát byl získán při specifické aktivitě 0,7 až 0,1 MBq/ $\mu\text{g}$ . *In vitro* vazné experimenty odhalily specifickou vazbu na buňky HT-29 ( $45 \pm 2,8$  % celkové přidané aktivity) a naměřená hodnota  $K_D$  byla zjištěna 9,2 nM. Zobrazení jednoznačně prokázalo signifikantní distribuci značené monoklonální protilátky v nádoru 18 hodin po aplikaci. Radioimunokonjugát IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 se zdá být vhodným kandidátem na PET diagnostiku hypoxických nádorů exprimujících lidskou karboanhydrázu IX. Dále byla konjugována protilátka nimotuzumab s komerčním chelátorem DOTA a nekonvenčním chelátorem DOTAPO, tyto konjugáty byly značeny radionuklidy  $^{64}\text{Cu}$  a  $^{177}\text{Lu}$  o specifických aktivitách 0,2 a 0,5 MBq/ $\mu\text{g}$  a následně hodnoceny *in vitro* na buněčných kulturách A431, včetně *in vivo* zobrazovacích experimentů na  $\mu\text{SPECT}/\text{CT}$ . Peptid BBN byl konjugován s chelátorem DOTA a značen radionuklidy  $^{64}\text{Cu}$  a  $^{68}\text{Ga}$  o specifických aktivitách 10 a 0,1 MBq/ $\mu\text{g}$ . Značené konjugáty byly hodnoceny *in vitro* na buněčných modelech s linií PC-3 a *in vivo* zobrazovány na  $\mu\text{PET}/\text{CT}$ .

## ABSTRACT

Special oncology diagnostics require new types of selective radiopharmaceuticals, especially those that are suitable for molecular PET imaging and therapy, respectively, theranostics. The aim of this work is to present a new target radiopharmaceutical for immunoPET diagnosis and therapy based on the monoclonal antibody IgG M75 directed to human carbonic anhydrase IX, nimotuzumab (hR3) target epidermal growth factor receptor (EGFR) and one of the bombesin derivatives (BBN) repeats. These molecules were labeled with radionuclides  $^{64}\text{Cu}$  ( $t_{1/2}$  12.70 hours),  $^{61}\text{Cu}$  ( $t_{1/2}$  3.33 hours),  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2}$  68 min),  $^{177}\text{Lu}$  ( $t_{1/2}$  6.71 days). These potential radiopharmaceuticals were evaluated *in vitro* and *in vivo*. The IgG M75 antibody and its scFv-Fc M75 fragment were prepared by the genetic modification were conjugated to a specific chelator specific phosphinate (PHS) and radiolabeled by the radionuclides  $^{61,64}\text{Cu}$ . The stability of the labeled conjugate was tested in human serum. Immunoreactivity of the labeled conjugate was evaluated *in vitro* on suitable colorectal carcinoma (HT-29) cell cultures and its imaging properties were estimated from *in vivo* and *in vitro* by HT-29 carcinoma experiments imaged by  $\mu\text{PET}/\text{CT}$ . The immunoconjugate was obtained at a specific activity of 0.7 to 0.1 MBq/ $\mu\text{g}$ . *In vitro* binding experiments revealed specific binding to HT-29 cells ( $45 \pm 2.8$  % of total activity added) and  $K_D$  values measured at 9.2 nM. Imaging unambiguously demonstrated a significant distribution of labeled monoclonal antibodies in the tumor 18 hours after administration. The radioimmunoconjugate IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 seems to be a suitable candidate for PET diagnosis of hypoxic tumors expressing human carbohydrate IX. hR3 was further conjugated to commercial DOTA chelator and unconventional chelator DOTAPo, these conjugates were labeled with radionuclides  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{177}\text{Lu}$  with specific activities of 0.2 and 0.5 MBq/ $\mu\text{g}$  and subsequently evaluated *in vitro* on A431 cell cultures including *in vivo* imaging experiments on  $\mu\text{SPECT}/\text{CT}$ . The BBN peptide was conjugated with the DOTA chelator and labeled with  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$  radionuclides with specific activities of 10 and 0.1 MBq/ $\mu\text{g}$ . Labeled conjugates were evaluated *in vitro* on PC-3 cell line models and imaged *in vivo* on  $\mu\text{PET}/\text{CT}$ .

## SEZNAM ZKRATEK

AMK	Aminokyseliny
AE	Augerovy elektrony
BBN	Pro-1-Tyr-4-Bombesin
CA IX	Karbonická anhydráza IX
ČMI	Český metrologický institut
EGF	Epidermální růstový faktor
EOB	Konec ozařování
FDG	Fluorodeoxyglukosa
FLT	Fluorothymidin
GLUT	Glukosový transportér
GPCR	Receptory spřažené s G-proteinem
GRP	Gastrin uvolňující peptid
HBSS	Hank's Balanced Salt
HIF 1 $\alpha$	Hypoxií indukovaný faktor 1 $\alpha$
hR3	Nimotuzumab
MAb	Monoklonální protilátka
NSCLC	Nemalobuněčný karcinom plic
PET	Pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography)
$\mu$ PET/CT	Zvířecí pozitronová emisní tomografie fúzovaná s výpočetní tomografií
PHS	Fosfinát
RIT	Radioimunoterapie
RNT	Radionuklidová terapie
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (Single Photon Emission Computed Tomography)
TK	Thymidinkináza

## 1. Úvod

Nádorové onemocnění je charakterizováno významnými změnami na molekulární úrovni, jako jsou látková a energetická deprivace, atypicky zvýšená exprese určitých typů receptorů, extracelulární acidóza (laktátová acidóza) a hypoxické stavy, které se liší podle metabolického stavu jednotlivých typů nádorů (1). Zvláštní parametry týkající se těchto charakteristik mohou nabídnout užitečný nástroj pro diagnostiku a terapii rakoviny. Přežití buněk v hypoxickém stavu závisí na zvýšené expresi genů podporujících anaerobní metabolismus a vznik nové vaskularizace. Aktivace těchto genů je řízena hypoxickým transkripčním faktorem (hypoxie indukovatelný faktor 1; HIF-1 ) (2). Vysoká exprese tohoto faktoru koreluje s vyšší agresí onemocnění, ale také se zvýšenou expresí karboanhydrázy IX (CA IX) (3).

CA IX je enzymatický glykoprotein integrovaný do buněčné stěny přítomný za fyziologických podmínek pouze v žaludeční sliznici, žlučníku, ve střevní sliznici a plicích. Jeho přítomnost byla zjištěna ve vysokém procentu (téměř 100 %) u některých typů lidských karcinomů, jako je rakovina děložního čípku, rakovina jícnu a karcinom ledvinových buněk. Nižší procento (60 %) bylo zjištěno u kolorektálního karcinomu a rakoviny hlavy, krku, plic a prsu (4). Monomer CA IX obsahuje 495 aminokyselin a tvoří funkční homodimer spojený disulfidovými vazbami mezi cysteinovými zbytky (5). Tento glykoprotein katalyzuje hydrataci  $\text{CO}_2$  na kyselinu uhličitou:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ . Hydrokarbonátový anion je transportován do buněk, kde kompenzuje intracelulární kyselé prostředí v nádoru (6).

Monoklonální protilátka M75 IgG je specifická proti proteoglykanové doméně CA IX (EC 4.2.1.1). Rozpoznává epitop na lineárním N-konci a kvůli této specifitě nevykazuje žádnou zkříženou reaktivitu s ostatními členy skupiny anhydridů uhličitanu, které mají podobnou oblast. Epitop se skládá ze šestinásobné opakující se aminokyselinové sekvence, která umožňuje vazbu více než jedné protilátky na stejné vazebné místo epitopu. Další výhodou je to, že M75 se váže na epitop, jak v nativním, tak v denaturovaném stavu. Kvůli pomalejší kinetice celé monoklonální protilátky (cca 140 kDa) může být užitečné použít fragment scFv-Fc M75 (cca 80 kDa) (7). Jako takové má monoklonální protilátka IgG M75 vysoký potenciál při diagnostice nebo dokonce léčbě některých typů hypoxických nádorů. Za tímto účelem je zobrazování pomocí pozitronové emisní tomografie (PET) metoda volby kvůli jeho dobrému rozlišení a snadné kvantifikaci. Existuje několik nových pozitronových emitorů kompatibilních s poměrně pomalou kinetikou makromolekul, včetně monoklonálních protilátek. Většina z nich jsou radiokovy. Exprese CA IX může být také prokázána sloučeninami s nízkou molekulovou

hmotností, které mají rychlejší kinetiku než MAb a snadnější produkci, nicméně jejich distribuce v nádorech může být nižší. Taková molekula [<sup>64</sup>Cu]XYIMSR-06 byla nedávno popsána a byl zkoumán její potenciál pro karcinom ledviny (8). Velká skupina sloučenin s nízkou molekulovou hmotností pro zobrazování exprese CA IX pomocí PET nebo SPECT představuje sulfonamidové deriváty používané primárně pro léčbu infekcí močových cest (9). Skutečný potenciál těchto sloučenin pro zobrazování CA IX a kritické srovnání s radioaktivně značenou MAb by měl být stanoven.

Cílem naší práce bylo modifikovat monoklonální protilátku M75 IgG a její fragment scFv vhodným pozitronovým emitorem a odhadnout jejich potenciál pro diagnostiku PET kolorektálního karcinomu. Vybrali jsme dva izotopy mědi: <sup>64</sup>Cu s poločasem přeměny 12,7 hod, dobrými zobrazovacími vlastnostmi a potenciálním <sup>61</sup>Cu, který má také dobré zobrazovací vlastnosti, ale jeho zkrácený poločas 3,3 hod je méně kompatibilnější s pomalejší farmakokinetikou protilátek.

Existuje mnoho běžně dostupných chelátorů mědi, jako je kyselina 1,4,7,10-tetraoctová (DOTA) (10) a 1,4,7-triazacyklonan-1,4,7-triazolové makrocyclické sloučeniny (NOTA) a její deriváty (11). Oba tyto komerčně dostupné chelátory vyžadují zvýšenou teplotu pro dosažení efektivního značení, což může mít negativní dopad na cílové biologické vlastnosti značených imunokonjugátů nebo to významně prodlužuje proces značení. Z tohoto důvodu jsme zvolili nový, nekomerční chelator "fosfinát", který má vynikající vlastnosti s ohledem na vysokou specifitu mědi a rychlé chelatační schopnosti při pokojové teplotě a mírném pH (12). Radioaktivně značená protilátka byla testována in vitro a in vivo k určení její farmakokinetických vlastností.

Další část práce měla za cíl značit protilátky cílicí EGFR. Receptor epidermálního růstového faktoru je cílem protinádorové léčby v důsledku jeho nadměrné exprese u různých maligních epiteliálních nádorů, což je doprovázeno špatnou prognózou. Ve fibroblastových buňkách se exprese EGFR pohybuje od 40 000 do 100 000 receptorů na buňku. EGFR je ve většině solidních nádorů nadměrně exprimován především u rakoviny prsu a vaječníků, rakoviny tlustého střeva, rakoviny hlavy a krku a nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC), přičemž některé typy rakoviny prsu exprimují až  $2 \times 10^6$  EGFR na buňku (13). Monoklonální protilátky navázané na specifické oblasti EGFR inhibují jeho dimerizaci a autofosforylaci (14). Nimotuzumab (TheraCIM, CIMher, Theraloc) je humanizovaná MAb (IgG1) získaná transplantací komplementárního genu určující oblasti myši monoklonální protilátky ior-egf/r3 ke struktuře, která rozpoznává vnější doménu EGFR s vysokou specifičností (15). Mnoho léků cílicí EGFR, například hR3 nevykazuje závažné nežádoucí účinky na klinickém použití,

například nebyly hlášeny žádné závažné kožní vyrážky (16). Ukazuje se, že hR3 má velmi dobré výsledky v terapii gliomů. Již se provádějí klinické studie u NSCLC ve fázi II s monoterapií hR3 v České republice. V Evropě probíhají klinické studie u pacientů s pokročilým metastatickým karcinomem pankreatu (17).  $^{188}\text{Re}$  značený hR3 vykazoval slibné výsledky ve fázi I pokusu o léčbu gliomů prostřednictvím terapie radiofarmakem aplikovaným katetrem do pooperační dutiny (18). Z  $\beta^-$  zářičů, vhodných pro značení hR3, by mohlo být potenciálně  $^{177}\text{Lu}$ , které se zdá být v poslední době favoritem pro radioimunoterapii (RIT) na bázi protilátek (19). Další výhodou je schopnost lutecia vytvářet stabilní komplexy s makrocyclickými a acyklickými ligandy (20–22). Poločas přeměny  $^{177}\text{Lu}$  6,71 dne je vhodný pro přípravu, transport a úspěšnou aplikaci a distribuci dávky značeného imunokonjugátu do nádoru. Dále má  $^{177}\text{Lu}$  dvě nízkoenergetické linky s energií 113 a 208 keV, které jsou vhodné i pro zobrazování na SPECT, a tedy lze vyhodnotit distribuci látky na místo určení. Jedním z dalších cílů této práce bylo značení hR3  $^{177}\text{Lu}$  pro terapii a  $^{64}\text{Cu}$  pro diagnostiku nádorů pozitivních na EGFR, *in vitro* testování této látky a následné zobrazování na  $\mu\text{SPECT/CT}$  a  $\mu\text{PET/CT}$ .

Poslední část práce byla zaměřena na konjugaci a značení peptidu bombesinu cílicího GRP receptory. GRPR je receptor spojený s G-proteiny, exprimované v různých orgánech savců, zejména v gastrointestinálním traktu a pankreatu. Po navázání ligandového peptidu uvolňujícího gastrin (GRP) může být GRPR aktivován a vyvolá určité exokrinní nebo endokrinní sekrece sloužící k regulaci fyziologických procesů (23). Je zřejmé, že nadměrná exprese GRPR je prezentována v několika typech nádorů, jako je prostata, močového traktu, gastrointestinálního traktu, prsu a plic a dále souvisí s proliferací a růstem těchto malignit (24). Zvláště GRPR je téměř 100 % exprimován v klinických vzorcích karcinomu prostaty zkoumaných pomocí PCR, imunohistochemie nebo radionuklidových vazebných testů, což činí GRPR atraktivním cílem pro zobrazování a terapii karcinomu prostaty (25).

Jako zajímavý analog vázající se na GRPR byl zjištěn peptid bombesin (BBN), který se váže na GRPR s vysokou afinitou. Po desetiletí byly deriváty BBN využívány při zobrazování nebo při radionuklidové terapii u nádorů s nadměrnou expresí GRPR (24). Například agonista GRPR BBN7-14, zkrácená forma BBN se sekvencí Gln-Trp -Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, byl zkoumán jako radiofarmakum pro PET nebo SPECT v předklinickém i klinickém výzkumu (26,27).

Tato práce se zaměřuje na konjugaci derivátu Pro-1-Tyr-4-Bombesinu s chelátory DOTA a DOTAPO a jejich následné značení radionuklidu  $^{68}\text{Ga}$  a  $^{64}\text{Cu}$ . Oba značené konjugáty byly testovány *in vitro* na vhodné línii PC-3 a následně zobrazovány na  $\mu\text{PET/CT}$ .

## 2. Teoretická část

### 2.1. Pozitronová emisní tomografie v preklinickém výzkumu

Neinvazivní zobrazování lidských chorob na zvířecích modelech je důležitým prostředkem pro zlepšení porozumění základní patofyziologie daného onemocnění, dále jejího odhalení a sledování progresu a monitorování terapie. V současné době je hlavním prvkem lékařského výzkumu tzv. „translační medicína“ nebo „translační výzkum“, tedy přenos preklinického výzkumu do klinické praxe. Preklinické zobrazování pomocí radionuklidů, kterými jsou značena příslušná výzkumná radiofarmaka, lze provádět na zvířecí jednofotonové emisní výpočetní tomografii ( $\mu$ SPECT) nebo zvířecí pozitronové emisní tomografii ( $\mu$ PET) (obr. 2.1.1), hraje klíčovou roli pro získávání dat o *in vivo* biologických procesech v intaktním organismu (28–30).



Obr. 2.1.1  $\mu$ PET/CT, MultiScan LFER od společnosti Mediso (31)

Nesporná výhoda u *in vivo* zobrazovacích studií oproti *ex vivo* pitvacím experimentům je použití stejného zvířecího modelu v několika časových bodech. Při *ex vivo* studiích musí být zvíře eutanazováno v každém časovém bodě, tudíž vnáší do experimentu chybovost v podobě individuálního modelu pro každý studovaný časový bod (32). Nukleárně medicínské zobrazovací modalita pro zvířecí experimenty mají především výhodu v použití malého množství zvířat pro experiment, obvykle hlodavce. Malé zorné pole a bližší umístění detekčních prvků vedou ke zlepšení prostorového rozlišení, lepšího než u klinických kamer. Porovnání klinických a zvířecích kamer je srovnáno v tabulce 2.1.1 (33).

Tab. 2.1.1 Porovnání fyzikálních vlastností zvířecích a klinických tomografických gamakamer (33)

	Zvířecí		Klinická	
	PET	SPECT	PET	SPECT
Senzitivita [%]	2 - 4	0,3	1 - 3	0,01 – 0,03
Prostorové rozlišení [mm]	1,5	1,2	5	10

Pro preklinické studie se častěji využívá  $\mu$ PET pro jeho vyšší citlivost, což usnadňuje detekci velmi nízkých úrovní radioaktivity. Tento benefit je vhodný pro výzkum v oblasti radiofarmakologie a dalších oborů vývoje nových léčiv.  $\mu$ PET je preferován pro dynamické zobrazování biomarkerů, protože tomografická data jsou získávána současně ze všech úhlů kolem zorného pole. Hodnocená data mohou být také kvantifikována, což umožňuje kompletní studium farmakokinetiky nově vyvíjeného radiofarmaka (34).

## 2.2. Radiofarmaka pro nukleární onkologii

### 2.2.1. Radionuklidy

#### 2.2.1.1. Radionuklidy pro onkologickou diagnostiku PET

Radioaktivní jádra bohatá na protony (ležící pod linií stability) dosahují svého stabilního stavu jadernou přeměnou, která vyžaduje emisi pozitronu. Formálně lze mechanismus popsat, jako přeměnu protonu ( $p^+$ ) na neutron ( $n^0$ ), za současné emise pozitronu ( $e^+$ ) a elektronového neutrina ( $\nu_e$ ). Radioaktivní přeměna  $\beta^+$  je doprovázena anihilací pozitronu s elektronem za vzniku dvou fotonů o stejné energii 511 keV.



$\beta^+$  přeměna se u jednotlivých radionuklidů liší v energii emitovaných pozitronů, což úzce souvisí s jejich doletem ve tkáni před následnou anihilací s elektronem. Fyzikální vlastnosti vybraných radionuklidů emitujících pozitrony je srovnán v tabulce č. 2.2.1.1.1. Tento typ radionuklidů je využíván ke značení celé řady radiofarmak pro PET diagnostiku. Vyšší energie pozitronů znamená jeho vyšší dolet v tkáni, což může negativně zkreslit výsledné PET zobrazení. Například u nízkoenergetických pozitronů emitovaných z radionuklidu  $^{18}\text{F}$  ( $E_{\beta^+}$  0,635 MeV) je dolet ve vodě 2,4 mm, oproti tomu u vysokoenergetických pozitronů emitovaných z  $^{82}\text{Rb}$  ( $E_{\beta^+}$  3,4 MeV) je dolet ve vodě 14,1 mm. Další důležitou vlastností



u radionuklidů pro PET zobrazování je jejich poločas přeměny, u radionuklidů s velmi krátkým poločasem přeměny, jako jsou  $^{11}\text{C}$  ( $t_{1/2}$  20,48 min),  $^{13}\text{N}$  ( $t_{1/2}$  9,97 min) a  $^{15}\text{O}$  ( $t_{1/2}$  2,04 min), musí být počítáno s tím, že značená molekula musí mít velmi rychlou farmakokinetiku, aby bylo možné patologický nebo fyziologický jev zobrazit.

Tab. 2.2.1.1.1 Radionuklidy používané pro diagnostiku pomocí PET (35,36)

Radionuklid	Poločas přeměny [min]	Přeměna [% $\beta^+$ ]	$E_{max}$ [MeV]
$^{11}\text{C}$	20,48	99,8	0,960
$^{13}\text{N}$	9,97	99,8	1,199
$^{15}\text{O}$	2,04	99,9	1,732
$^{18}\text{F}$	109,74	96,7	0,634
$^{68}\text{Ga}$	68,10	89,0	1,900
$^{82}\text{Rb}$	1,20	95,0	3,350
$^{61}\text{Cu}$	200,3	61,0	1,215
$^{64}\text{Cu}$	762,0	17,6	0,653
$^{124}\text{I}$	6019,2	23,0	2.146
$^{89}\text{Zr}$	4686,0	23,0	0.887
$^{86}\text{Y}$	88,2	33,0	0,660
$^{44}\text{Sc}$	238,2	94,3	0,632

### Cu-64

Měď-64 [ $t_{1/2}$  762 min;  $\beta^+_{max}$  653,0 keV (17,9 %);  $\beta^-_{max}$  579 keV (38,5 %)] má charakteristické fyzikálně-chemické vlastnosti, které jsou vhodné pro zobrazování PET a cílenou RNT rakoviny. Osvědčená koordinační chemie mědi umožňuje její reakci s celou řadou chelatačních systémů, které mohou být potenciálně spojeny s peptidy a jinými biologicky relevantními malými molekulami, dále protilátkami, proteiny a nanočásticemi. 12,7 hodinový poločas přeměny Cu-64 poskytuje flexibilitu pro zobrazování, jak menších molekul, tak větších kineticky pomalejších makromolekul. V praktickém smyslu je možné radiofarmaka značená tímto radionuklidem snadno použít pro PET zobrazovací studie na místech vzdálených od výrobního zařízení. V důsledku univerzálnosti Cu-64 se v této oblasti značení tímto radionuklidem již 20 let objevuje spousta nových výzkumných radiofarmak především v oblasti PET zobrazování, ale také pro cílenou radioterapii rakoviny (37).

## Cu-61

Měď-61 [ $t_{1/2}$  200 min;  $\beta^+_{max}$  1215,5 keV (61,0 %);  $\gamma_1$  283 keV (12,2 %);  $\gamma_2$  656 keV (10,8 %);  $\gamma_3$  1185 keV (3,7 %)] má vynikající potenciál pro aplikaci diagnostiky PET včetně molekulárním zobrazováním. Metody výroby Cu-61 byly optimalizovány pro radioaktivní značení biomolekul a dalších aplikací. Bylo zjištěno, že získávání tomografických snímků radiofarmak značených  $^{61}\text{Cu}$  jsou lepší než ty, které byly značeny  $^{64}\text{Cu}$  (38). Díky kratšímu poločasu tohoto radionuklidu se jeví jeho vhodnost spíše pro menší typy molekul, jako jsou oligopeptidy, malé fragmenty protilátek nebo oligonukleotidy.

## Ga-68

Gallium-68 je jeden z nejstarších známých radionuklidů emitujících pozitronů, které byly použity pro klinickou medicínu pocházející z počátku 60. let 20. století (39), tedy dlouho před [ $^{18}\text{F}$ ]fluorodeoxyglukózou (FDG) (40). Kvůli souběžného pokroku v PET diagnostice a radiosyntetické dostupnosti látek značených  $^{68}\text{Ga}$  za použití standardních a jednoduchých metod syntézy. V současné době se k získávání tohoto radionuklidu používá několik generátorových systémů  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , již komerčně dostupných v Rusku, Evropě, Spojených státech a dalších zemích včetně ČR. S dostupností a spolehlivostí komerčních generátorových systémů a efektivních a pohodlných kroků čištění má potenciál  $^{68}\text{Ga}$  stát se tak užitečným pro PET diagnostiku. Radiopeptidy na bázi  $^{68}\text{Ga}$  byly klinicky testovány pro cílení na somatostatinové receptory (41), bombesin (42) a receptor melanokortinu 1 (43). Vzhledem k tomu, že jejich farmakokinetika těchto látek je dobře přizpůsobena krátkému fyzikálnímu poločas tohoto radionuklidu, peptidy na bázi  $^{68}\text{Ga}$  jsou stále častěji skloňovány jako nová skupina radiofarmak, která vykazují velmi rychlou clearance a rychlou cílovou lokalizaci. Krátký fyzický poločas  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2}$  68 min) umožňuje vylepšit dozimetrii a opakované zobrazování, což činí z těchto radiofarmak ideální standard pro klinické použití (44).

### 2.2.1.2. Radionuklidy pro onkologickou terapii

Otevřené zářiče v nukleární medicíně lze využít také k tzv. radionuklidové terapii (RNT). Při tomto způsobu terapie jsou podávány pacientům radionuklidy emitující částice, které jsou schopny předat vysokou část své energie na cílenou tkáň. RNT se využívá z největší části pro onkologické aplikace, léčbu metastatických bolestí a léčbu zánětlivých procesů. Mezi klíčové příklady vývoje technologií využívajících terapeutická radiofarmaka patří léčba nemelanomového karcinomu kůže v citlivých oblastech, terapie hyperplazie, která se často objevuje po arteriální angioplastice. Pro RNT se používá široká škála radiofarmak zaměřených

na onemocnění, ke kterým jsou připojeny radionuklidy, které emitují částice  $\alpha$ , beta  $\beta^-$  nebo Augerovy elektrony (AE). Na rozdíl od konvenční terapie vnějších ozařování, v rámci radiační onkologie, se RNT praktikuje na odděleních nukleární medicíny a zaměřuje se na onemocnění na úrovni buněk, spíše než na hrubé anatomické úrovni (45,46). Tato koncepce je směsí radionuklidové části, která zprostředkovává akumulaci specifické pro danou oblast a následovanou indukci cytotoxicity s krátkodobým biologickým efektem částicového záření. Proximální kontakt mezi radionuklidem a buňkami určenými k destrukci umožňuje absorbovat záření na cílovém místě s minimálním poškozením adekvátní zdravé tkáně (47). Fyzikální vlastnosti některých terapeutických radionuklidů je popsáno v tabulce č. 2.2.1.1.2.

Tab. 2.2.1.1.2 Radionuklidy používané pro RNT (48)

Radionuklid	Poločas přeměny [d]	Přeměna [%]	$E_{max}$ [MeV]
$^{177}\text{Lu}$	6,65	$\beta^-$ (79,4)	0,498
		$\gamma$ (9,0)	0,113
		$\gamma$ (11,6)	0,321
$^{90}\text{Y}$	2,28	$\beta^-$ (100)	2,300
$^{89}\text{Sr}$	50,6	$\beta^-$ (99,99)	1,488
		$\gamma$ (0,01)	0,909
$^{153}\text{Sm}$	1,94	$\beta^-$ (18,4)	0,808
		$\gamma$ (49,4)	0,103
		$\gamma$ (31,3)	0,173
$^{186}\text{Re}$	3,72	$\beta^-$ (70,9)	1,070
$^{131}\text{I}$	8,0	$\gamma$ (21,5)	0,137
		$\beta^-$ (100)	0,606
$^{67}\text{Cu}$	2,6	$\gamma$ (85,0)	0,364
		$\beta^-$ (89,4)	0,577
		$\gamma$ (49)	0,185
$^{223}\text{Ra}$	11,43	$\gamma$ (23)	0,920
		$\alpha$ (89,4)	5,700
		$\gamma$ (9,5)	0,127
		$\gamma$ (52,5)	0,154
$^{225}\text{Ac}$	10,0	$\gamma$ (24,2)	0,269
		$\gamma$ (9,2)	0,338
		$\alpha$ (50,7)	5,800

## Lu-177

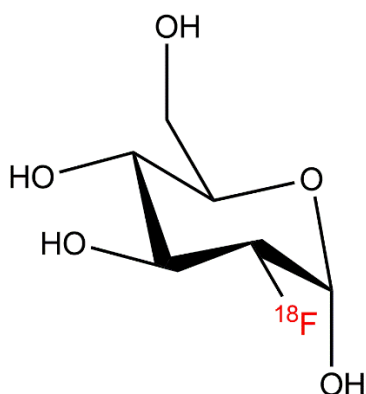
Lutecium-177 ( $t_{1/2}$  6,65 d) představuje terapeutický radioizotop s rychle rostoucí významností.  $^{177}\text{Lu}$  se přeměňuje nízko- až středně- energetické  $\beta^-$  emisí [ $(E_{\beta^-1}$  497 keV (78,6%),  $E_{\beta^-2}$  385 keV (9,1%)] a také emisí fotonů [ $E_{\gamma1}$  208 keV (11,0%);  $E_{\gamma2}$  113 keV (6,4%)], které umožňují zobrazování pomocí gama kamery. Lutecium-177 je také velmi atraktivní teranostický radionuklid, který může být použit v diagnostickém/terapeutickém zobrazování a vykazuje rozsah průniku měkkých tkání několik milimetrů. Poločas rozpadu 6,65 dne je dostatečný na přípravu biomolekul, které mají krátký nebo dlouhý biologický poločas a umožňují distribuci radiofarmaka pro použití v klinikách vzdálených od místa výroby. Nejčastější využití tohoto radionuklidu je pro léčbu neuroendokrinních nádorů (49,50) a zejména při bolestech kostí u metastatického karcinomu (51) a karcinomu jater (52).

### 2.2.2. Klinická radiofarmaka pro onkologickou diagnostiku PET

#### 2.2.2.1. Zobrazování metabolismu glukosy

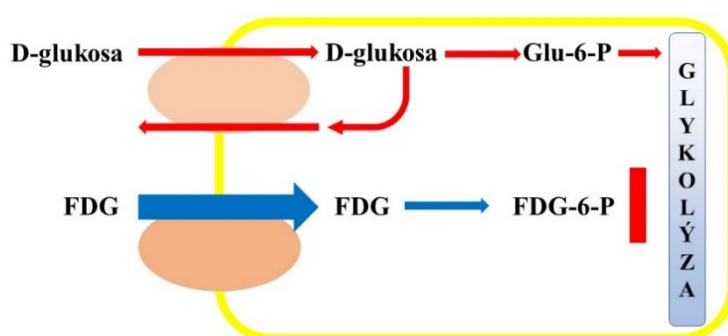
##### $^{18}\text{F}$ FDG

Oblast molekulárního zobrazování pomocí PET se jeví jako hnací síla pro zlepšení léčby pacientů s určitým typem rakoviny včetně vhodného plánování radioterapie (53). Nejznámějším a nejvíce užívaným radiofarmakem pro diagnostiku PET je  $^{18}\text{F}$ FDG (FDG), kterým lze hodnotit metabolické vlastnosti a stav zhoubných lézí. V molekule glukosy je hydroxylová skupina v poloze 2 nahrazena radionuklidem F-18, čímž je vytvořen fluorodeoxyglukosový analog s prospěšnými biochemickými vlastnostmi a velmi dobrými zobrazovacími vlastnostmi (obr. 2.2.2.1.1).



Obr. 2.2.2.1.1 Chemická struktura  $^{18}\text{F}$ FDG (54)

FDG akumuluje v buňkách se zvýšeným glykolytickým metabolismem, což je často spojeno s abnormální rychlostí růstu buněk a maligním potenciálem nádorů (55). FDG je do buněk transportována pomocí několika glukosových transportérů (GLUT) (v rakovinných buňkách jsou to GLUT-1 nebo GLUT-3) a následně je fosforylována hexokinasou za vzniku 6-fosfátového derivátu. Protože u molekuly hydroxylová skupina v poloze 2 chybí, následná reakce s glukosa-6-fosfat isomerasou neprobíhá nebo je zanedbatelná. Negativní náboj molekuly FDG-6-P zabraňuje migraci přes buněčnou membránu vně a hromadí se v buňce (obr. 2.2.2.1.2) (56).

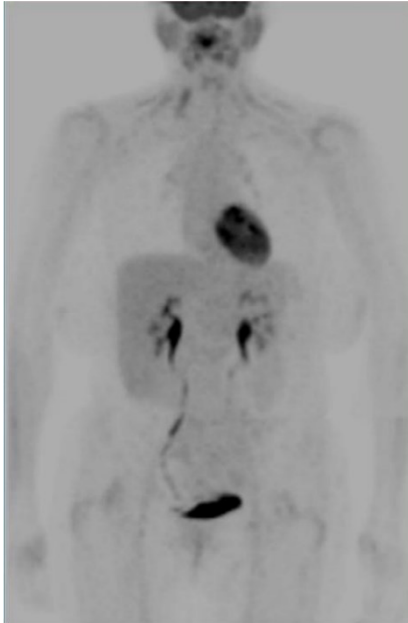


Obr. 2.2.2.1.2 Srovnání metabolismu D-glukosy a [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (57)

Základní premisu pro použití FDG v onkologii prokázal Warburg, který zaznamenal zvýšení glykolytické aktivity v rakovinných buňkách, a to jak v aerobních, tak anaerobních podmínkách (58–60). Neoplastická transformace buněk navíc určuje zvýšení aktivity glykolytických enzymů (např. hexokinasy) a glukosových transportérů (např. GLUT-1) (61). Buněčná hmota ovlivňuje glykolytickou aktivitu, zatímco proliferace buněk ovlivňuje zvýšení transportu glukosy. Akumulace glukosy může být také zvýšená u benigní patologie a zánětlivých onemocněních, kde jsou aktivovány zánětlivé buňky nebo makrofágy, které používají jako zdroj energie také glukosu. Klinická zánětlivá ložiska, sarkoidóza a aktivní tuberkulóza jsou často zobrazovány jako FDG pozitivní léze (62,63). Naopak, některé typy maligních nádorových buněk, jako jsou karcinoidní tumory a bronchioalveolární karcinom plic jsou na FDG negativní nálezy (64).

Klinická užitečnost FDG na PET může být omezena distribucí této molekuly v některých fyziologických tkáních, což může vést k nízkému nebo sníženému poměru nádoru k pozadí (obr. 2.2.2.1.3). Mozek má za normálních podmínek vysoký obrat glukosy, zatímco

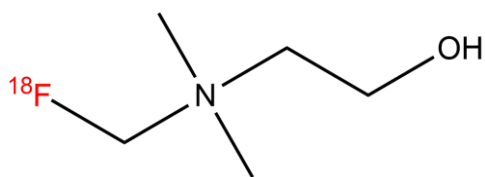
u většiny nádorů mozku je příjem FDG podobný nebo nižší než u normální tkáně. Vylučování FDG vytváří extrémě radioaktivní moč. Ačkoli jsou tumory močového měchýře a prostaty silně avidní k FDG, silně radioaktivní moč může způsobit problémy při diagnostice těchto novotvarů (65).



Obr. 2.2.2.1.3 Fyzilogické PET zobrazení [<sup>18</sup>F]FDG (57)

### 2.2.2.2. Zobrazování metabolismu cholinu

Všechny buňky využívají cholin jako prekurzor biosyntézy fosfolipidů, které jsou základními složkami buněčných membrán. V buňce se cholin fosforyluje, acetyluje nebo oxiduje. Fosforylace cholinu je katalyzovaná enzymem cholinkinázou (66). Fosforylovaný cholin je intracelulárním zásobníkem cholinu a je dále využit pro syntézu fosfatidylcholinu, hlavního fosfolipidu buněčných membrán. Karcinogeneze je charakterizována zvýšenou buněčnou prolyferací, což je spojeno s indukci cholinové kinázy a zvýšenému množství fosforylovaného cholinu. Bylo objeveno, že rychle proliferující nádory obsahují velké množství fosfolipidů, zejména fosfatidylcholinu. V roce 1998 byly provedeny zobrazení [ $^{11}\text{C}$ ]cholinu pro diagnostiku karcinomu mozku a prostaty. Problémem při zobrazování [ $^{11}\text{C}$ ]cholinu je jeho metabolismus v krvi, který ho transformuje na metabolit [ $^{11}\text{C}$ ]betain. Aby se zamezilo tvorbě metabolitů cholinu v krvi, byl vyvinut stabilní derivát [ $^{18}\text{F}$ ]fluoromethylcholin (obr. 2.2.2.2.1) a [ $^{18}\text{F}$ ]fluorocholin, které se používají v klinické praxi (67).



Obr. 2.2.2.2.1 Chemická struktura [ $^{18}\text{F}$ ]fluoromethylcholinu (68)

### **2.2.2.3. Zobrazení transportu aminokyselin a syntézy proteinů**

Růst a vývoj nádoru je charakterizován zvýšením rychlosti syntézy proteinů, od aminokyselin (AMK), které jsou stavebními kameny pro proteosyntézu, tak zprostředkování transportu AMK do buněk. AMK jsou následně převedeny na aminoacyl-t-RNA, který tvoří polypeptidový řetězec v ribozomech. AMK také podstupují metabolickým reakcím, jako je transaminace a dekarboxylace. Vznikající metabolity jsou prekurzory pro mnoho dalších endogenních biomolekul např. hormonů, neurotransmiterů aj.

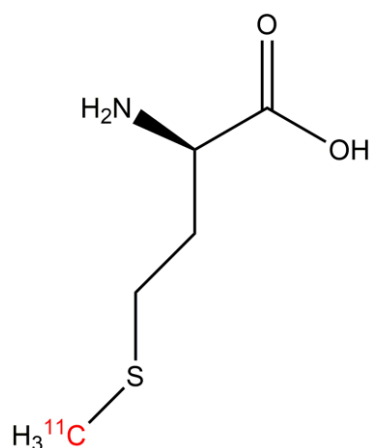
I když se AMK mohou do buněk dostávat prostou difuzí, jejich transport závisí na více než dvaceti ubiquitinových membránových transportních systémech. Většina AMK se do nádorových buněk dostává nejenom pomocí  $\text{Na}^+$  nebo energeticky nezávislého transportéru pro L-tyr AMK, ale pomocí  $\text{Na}^+$  dependentního transportního systému A a B<sup>o</sup> (69,70). Tento typ transportérů je vhodný pro AMK aromatické a s atypickým postranním řetězcem včetně valinu, leucinu, tyrosinu a fenylalaninu (71,72).

AMK jsou v nádorových buňkách zadržovány především kvůli jejich vyššímu metabolickému obratu oproti normálním buňkám. Maligní transformace metabolismu zvyšuje spotřebu aminů pro tvorbu energie, syntézu proteinů a buněčné dělení. Protože nádorové buňky často nadměrně exprimují transportní systémy pro AMK a zvyšují rychlost syntézy proteinů lze je využít jako markery proliferace.

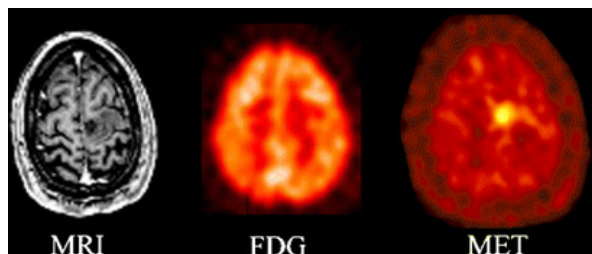


## [<sup>11</sup>C]methionin

K potenciálnímu zobrazování nádorů je [<sup>11</sup>C]methionin (obr. 2.2.2.3.1) vhodné agens, protože podléhá vysoké akumulaci v maligních typech nádorů oproti normálním buňkám (73–75). Pro zobrazování mozkových nádorů je tato látka mnohem lepší než FDG (obr. 2.2.2.3.2) (76).



Obr. 2.2.3.2.1 Chemická struktura [<sup>11</sup>C]methioninu

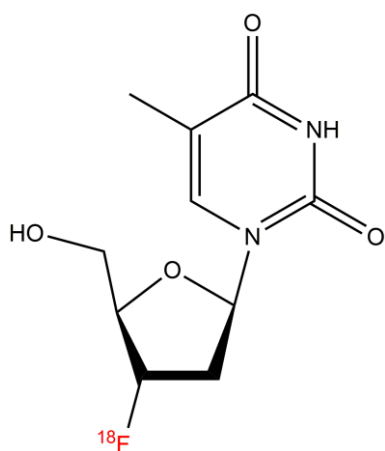


Obr. 2.2.2.3.2 Porovnání zobrazení [<sup>18</sup>F]FDG a [<sup>11</sup>C]methioninu při gliomu II. stupně (76)

### 2.2.2.4. Zobrazení syntézy DNA

Zvýšená míra mitózy, proliferace buněk a jejich nedostatečná diferenciaci byly považovány za hlavní faktory zodpovědné za zrychlení růstu maligních i benigních nádorů, ovšem následně bylo zjištěno, že většina zhoubných nádorů se rychle rozrůstá, někdy po dobu jednoho roku, nestabilním tempem. Počet buněk v S-fázi buněčného cyklu je vyšší v porovnání s normálními buňkami. Výsledkem tohoto procesu je zvýšený nárok pro vstupní substráty (nukleotidy) pro syntézu DNA. Intracelulárně je thymidin fosforylován thymidinkinázou (TK) na thymidin-fosfát, který je následně začleněn do DNA. Měřením inkorporace nukleotidu do

DNA v nádorové tkáni *in vitro* pomocí [ $^3\text{H}$ ]thymidine, je možné sledovat buněčnou proliferaci. [ $^{11}\text{C}$ ]thymidin byl vyvinut jako marker měření proliferace pro zobrazení na PET. Kvůli rychlému metabolismu tohoto indikátoru v krvi byla tato látka klasifikována jako nevhodná pro kvantifikaci, ovšem byly vyvinuty metabolicky stabilní značená analoga thymidinu, které slouží jako substráty pro TK (77,78). 3'-fluoro-3'-deoxythymidin ([ $^{18}\text{F}$ ]FLT) je transportován do buněk podobně jako thymidin a následně je fosforylován na [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-5-fosfát a nakonec je začleněn do DNA. Podobně lze využít uridinový analog [ $^{18}\text{F}$ ]fluorouridine, který ukazuje jeho akumulaci a proliferaci buňky, ovšem s tím rozdílem, že se začleňuje do RNA (79).



Obr. 2.2.2.4.1 Chemická struktura [ $^{18}\text{F}$ ] 3'-fluoro-3'-deoxythymidin

## 2.2.2.5. Zobrazení neurotransmiterů a receptorové vazby

### NEUROTRANSMITERY

Neurony v mozku komunikují tím, že uvolní chemické posly nazývané neurotransmitery, které mohou být buď excitační nebo inhibiční ve svém postsynaptickém efektu. Hlavní neurotransmitery v mozku jsou acetylcholin, dopamin, norepinefrin, serotonin (5-HT) a histamin. Navíc, určité aminokyseliny, jako je glutamát, aspartát, glycin, GABA a peptidy jako enkefalin, endorfin, substance P a bombesin. Životní cyklus systému neurotransmiterů má tři kroky:

- Syntéza a uložení neurotransmiteru ve vesikulách v presynaptickém neuronu
- Uvolnění neurotransmiteru z presynaptické buňky do synaptické štěrby a vazba na specifické receptory na postsynaptické neurony
- Rychle odstranění neurotransmiteru ze synaptické štěrby

Bylo vyvinuto mnoho RF pro PET na bázi analogů neurotransmiterů (tab. 2.2.2.5.1) (36)

Tab. 2.2.2.5.1 Souhrn RF na bázi neurotransmiterů

Neurotransmitter	Radiofarmakum	Mechanismus up-take a lokalizace
Dopamin	[ <sup>18</sup> F]-M-tyrosin	Syntéza dopaminu
	[ <sup>18</sup> F]DOPA	Analo L-DOPA
	[ <sup>11</sup> C]kokain	Selektivní vazba na dopaminové transportéry
	[ <sup>11</sup> C]WIN35, 428	Vazba na VMAT
	[ <sup>18</sup> F]FECNT	Vazba na VMAT
	[ <sup>18</sup> F]FP-CIT	Vazba na VMAT
	[ <sup>11</sup> C]NMSP	Vysoká afinita na D <sub>2</sub> rec.
	[ <sup>11</sup> C]racloprid	Vysoká afinita na D <sub>2</sub> rec.
	[ <sup>18</sup> F]fallyprid	Vysoká afinita na D <sub>2</sub> rec.
	[ <sup>11</sup> C]chlorgylin	Inaktivátor MAO
Serotonin	[ <sup>11</sup> C]-L-deprenyl	Agonista D <sub>1</sub> rec.
	[ <sup>11</sup> C]SCH23390	Agonista D <sub>1</sub> rec.
	[ <sup>11</sup> C]-5-HTP	Prekursor syntézy serotoninu
	[ <sup>11</sup> C]WAY 100635	5HT <sub>1A</sub> antagonist
	[ <sup>18</sup> F]altanserin	5HT <sub>2A</sub> antagonist
	[ <sup>18</sup> F]setoperon	Vazba na serotoninový rec.
	[ <sup>11</sup> C]-MDL-100907	Vazba na serotoninový rec.
Opiátový systém	[ <sup>11</sup> C]DSAB	Vazba na serotoninový rec.
	[ <sup>11</sup> C]citalopram	Vazba na serotoninový rec.
	[ <sup>11</sup> C]karfentanyl	Vysoká afinita na μ rec.
	[ <sup>11</sup> C]diprenorfin	Antagonista opiátových rec.
BDZ systém	[ <sup>18</sup> F]cyclofoxy	Vysoká afinita na μ a κ rec.
	[ <sup>11</sup> C]flumazenyl	Antagonista GABA <sub>A</sub>

	[ <sup>11</sup> C]iomazenil	Antagonista GABA <sub>A</sub>
	[ <sup>11</sup> C]PK11195	Antagonista periferní BDZ rec.
Cholinergní systém	[ <sup>11</sup> C]dexetimid	Antagonista muskarinových rec.
	[ <sup>18</sup> F]FP-TZTP	Agonista muskarinových M2 rec.
	[ <sup>11</sup> C]hydroxyfedrin	Transport sympatických presyn. vezikul v myokardu
Adrenergní systém	[ <sup>18</sup> F]fluorometaraminol	Transport sympatických presyn. vezikul v myokardu
	[ <sup>18</sup> F]fluorodopamin	Transport sympatických presyn. vezikul v myokardu

Množství hormonů a neurotransmiterů se váže na specifická vazebná místa nebo na receptory v buněčné membráně (př. somatostatinové receptory a dopamin receptory) nebo na receptory uvnitř buňky (př. estrogení receptory) za účelem zahájení konkrétních kroků. Pro měření receptoru jako funkce stavu onemocnění lze využít radioaktivně značené receptorové ligandy (př. peptidy nebo léčiva). Bylo vyvinuto mnoho radiofarmak použitelných pro zobrazení na PET. Vazba těchto radiofarmak na cílové místo (receptor) je vysoce specifická a závisí na afinitě ( $K_D$ ) RF k receptoru a počtu celkových receptorů ( $B_{max}$ ) dostupných pro vazbu. Počet receptorových míst je velmi omezený, proto je velmi důležité vyvíjet nové značené receptorové ligandy s vysokou specifickou aktivitou (1 až 10 Ci/ $\mu$ mol), aby bylo možné kvantifikovat expresi příslušných receptorů. Navíc značené ligandy mohou mít buď nízkou nebo vysokou afinitu k těmto receptorům a mohou být zachyceny v cílové tkáni (reverzibilně nebo nevratně). Protože agonisté jsou rychle metabolizováni (nebo inaktivováni) po navázání na receptory, jsou tato RF obecně vyvinuta za použití receptorově vazebného antagonismu. Široký rozvoj těchto RF byl vyvinut v posledních dvou desetiletích.

## PEPTIDY

Klasické receptorové cíle pro radiofarmaka na bázi peptidu jsou transmembránové receptory spřažené s G-proteinem (GPCR). Na tento typ receptorů cílí více než 50 % klinicky užívaných proteinů. Díky relativně nedávným pokrokům v oblasti proteomiky a genomiky bylo identifikováno několik stovek GPCR a řada z nich má určitý peptid jako endogenní ligand, který poskytuje při vývoji radiofarmak zajímavou sondu pro radioaktivní značení. Jedny z nejvýznamnějších receptorů, které je možné využít v onkologickém zobrazování a terapii jsou somatostatinové a bombesinové receptory. Několik příkladů receptorů a k nim

komplementárních peptidů, využívajících pro onkologické cílení je shrnuto v tabulce č. 2.2.2.5.2 (80,81).

Tab. 2.2.2.5.2 Souhrn peptidů a receptorů využívaných pro onkologické zobrazování a terapii (82)

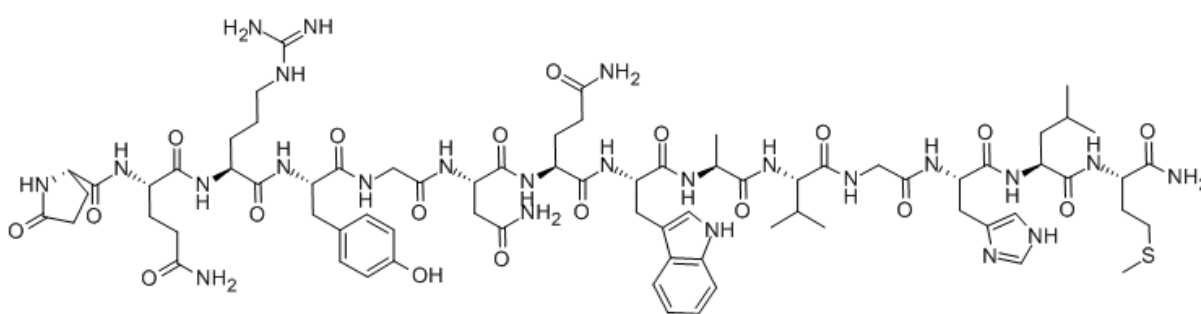
Peptid	GPCR (subtyp)	Možné místo cílení
Bombesin/GRP	GRP-R (BB2)	Karcinom Prostaty
Cholecystokinin	CCK2-R	Karcinom štítné žlázy
Glukagon-like peptide 1	GLP-1R	Insulinom
A-melanocyt stimulující hormon	MC1R	Melanom
Neurotensin	NTR1	Karcinom slinivky břišní
Neuropeptid Y	NPY1	Karcinom prsu
Somatostatin	SST2	Neuroendokrinní tumory
Substance P	NK1R	Glioblastomy
Vasoaktivní intestinální peptid	VPAC1	Kolorektální karcinom

## Bombesin

Nadměrná exprese peptidových receptorů v lidských nádorech má značný klinický význam. Za posledních deset let se ukázalo, že nadměrně exprimované somatostatinové receptory v lidských neuroendokrinních nádorech mohou být úspěšně cíleny. Dlouhodobá léčba oktreotidem u pacientů s neuroendokrinními nádory, které exprimují somatostatinový receptor, byla úspěšná při zmírnění symptomů spojených s nadměrnou produkcí hormonů nádory (83). Na druhé straně použití radioaktivně značených somatostatinových analogů nám umožnilo vizualizovat *in vivo* neuroendokrinní nádory a jejich metastázy. Nedávno bylo prokázáno, že neuroendokrinní nádory pozitivních na somatostatinový receptor mohou být cílené s analogy somatostatinu značené <sup>90</sup>Y jako terapeutická radiofarmaka. Podobné strategie cílení byly aplikovány na nadměrně exprimované receptory cholecystokininu-B u medulárních karcinomů štítné žlázy a na nadměrně exprimované vazoaktivní intestinální peptidové receptory v gastrointestinálních nádorech (84–86).

Bombesin a jeho lidský analog GRP2 patří do skupiny peptidů mozku-střeva, které kromě fyziologických účinků vykazují také důležitou roli u rakovinného onemocnění (87,88). Před několika lety bylo zjištěno, že rakovinné buněčné linie stejně jako primární lidské nádory mohou syntetizovat bombesin a GRP (89). Tyto peptidy pravděpodobně působí autokrinně k stimulaci růstu nádorových buněk, které pocházejí přes bombesinové receptory exprimované na membránách těchto buněk. Nedávno bylo také prokázáno, že proteiny receptoru GRP mohou být nadměrně exprimovány ve velkém množství v lidských nádorech,

včetně rakoviny prostaty, karcinomu prsu, karcinomu plic, stejně jako renálních karcinomech. Většina studií doposud byla schopna primárně identifikovat podtyp receptoru GRP, i když je známo, že rodina receptorů bombesinu zahrnuje alespoň čtyři různé podtypy, jmenovitě podtyp receptoru GRP (BB2), podtyp receptoru NMB (BB1) a podtypy BB3 a BB4 (90,91). Kromě GRP receptoru byly ostatní tři podtypy špatně charakterizovány, zejména pokud jde o jejich distribuci a funkci v lidských tkáních. Bylo vyvinuto velké množství radioaktivně značených derivátů bombesinu se selektivní afinitou k jednotlivým bombesinovým receptorům. Například derivát [<sup>64</sup>Cu]DOTA-[Pro<sup>1</sup>,Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin[1-14] (obr. 2.2.2.5.1), jehož neaktivní prekurzor je komečně dostupný pro značení různými radionuklidy (92).



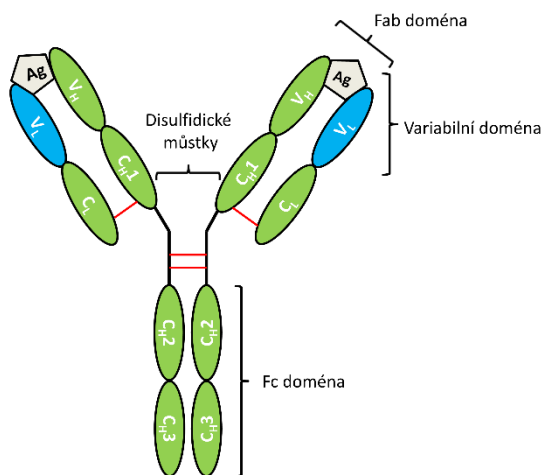
Obr. 2.2.2.5.1 Struktura [Pro<sup>1</sup>,Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin[1-14]

## PROTILÁTKY

Pokroky v technologii DNA vedly ke schopnosti manipulovat s připravovaným imunoglobulin (Ig), tím způsobem, aby vznikla molekula pro určité funkce *in vivo*. Průzkum monoklonálních protilátek, jako dopravníku pro radionuklidy používané k léčbě, probíhá již téměř 70 let. V roce 1948 Pressman a Keighley provedl první *in vivo* experiment s protilátkou značenou radionuklidem pro zobrazování. O deset let později byla podána první zpráva o radioaktivně značených protilátkách k použití při specifické radioimunodiagnostice nádoru a v roce 1960 byly radioaktivně značené protilátky použity pro selektivní doručení terapeutické dávky do nádorové tkáně. I při těchto raných fázích si výzkumníci uvědomovali, jaké jsou překážky spojené s využitím protilátek pro radioimunoterapii. Radiační dávky dodané do nádorů u pacientů byly příliš nízké na to, aby měly významný vliv na snížení růstu nádoru, a dlouhodobé uchování radioaktivně značené protilátky v krvi vedlo k toxickým komplikacím. Vlastní heterogenita ve specifitě a afinitě polyklonálních protilátek mělo za následek *in vivo* variabilitu. Příchod hybridomové technologie a schopnost generovat mono specifické monoklonální protilátky vedlo k velkému výzkumnému rozvoji. V roce 1980

literatura expandovala se zprávami o radioaktivně značených MAb a klinických hodnoceních, zpočátku v radioimunodiagnostických aplikacích. Následně byly provedeny RIT klinické studie a bylo zahájeno systémové, specifické podávání radioaktivního záření do nádorů, což ušetřilo normální tkáň před poškozením. Toto optimistické hledisko bylo rychle zmírněno tím, že samotná realizace má mnoho překážek, jejichž princip vychází z použití biologického činidla, které má xenogenní původ. V preklinické a klinické studii RIT bylo zjištěno, že dochází ke tvorbě humánních anti-myších imunoglobulinů protilátky (HAMA), dále byla zjištěna neadekvátní terapeutická hladina dávky záření dodané do nádorové léze, pomalá clearance radioaktivně značené MAb z krevního prostoru, nízká afinita a avidita MAb, nedostatečná penetrace do nádorové tkáně a také toxicita spojená s metabolismem (disociací radionuklidu) konjugovaných protilátek značených radionuklidu. Hlavním cílem bylo optimalizovat RIT prostřednictvím manipulace s MAb molekulou. Manipulace byla zpočátku provedena chemickými nebo biochemickými technikami pro generování různých imunoglobulinových forem, ale nyní převládá metodika pomocí genetického inženýrství.

K dnešnímu dni jsou pouze dvě radioaktivně značené myší monoklonální protilátky komerčně použitelné pro terapii, a to s cílením na CD20 receptor [ $^{90}\text{Y}$ ]Zevalin (Ibritumomab-tiuxetan), byl schválen v roce 2002 a je indikován pro relabující či refrakterní non-Hodgkinův lymfom (NHL). [ $^{131}\text{I}$ ]Bexxar (Tositumomab) byl schválen v roce 2003 pro léčbu non-Hodgkinova lymfomu B-buněk. Obecně platí, že lidská protilátka je směřována proti Fc části MAb molekuly (obr. 2.2.2.5.2).



Obr. 2.2.2.5.2 Schéma funkčních částí MAb

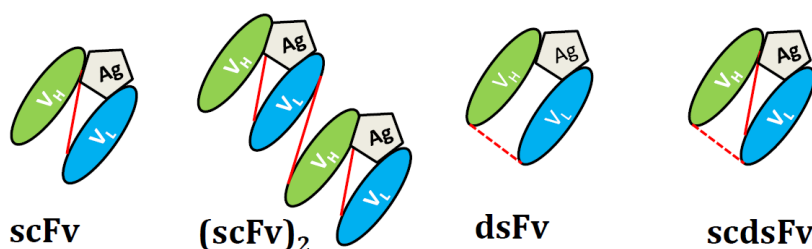
S postupem času a zejména po opakované infuzi se specifická reakce lidské protilátka optimalizuje a stává se stále více specifické pro variabilní oblasti MAb. V některých případech se anti-protilátkový variabilní region rozvíjí po jedné infuzi MAb. K řešení problémů

s terapii Mab bylo navrženo několik strategií na principu úpravy velikosti MAb molekuly. Tyto změny zahrnují snížení velikosti MAb molekuly, deglykosylaci nebo přidáním postranní skupiny. Snížení velikosti MAb molekuly bylo dosaženo prostřednictvím metod, jako je například enzymatické štěpení nebo genetického inženýrství. Štěpení protilátky pepsinem se odstraní Fc oblasti těžkého řetězce na terminálním karboxylu cysteaminu a tvoří se  $F(ab')_2$  fragmenty, které si zachovávají dvě antigenní determinanty a jejich molekulová hmotnost je okolo 100 kDa. Fab fragmenty vznikají štěpením protilátky pomocí papainu (enzym se specifitou k aminoskupině cysteinu). V tomto případě jsou disulfidové můstky mezi těžkými řetězci odstraněny a dále vzniká Fc fragment, který má molekulovou hmotnost okolo 50 kDa. Fab fragmenty jsou také produkovány redukcí a alkylací  $F(ab')_2$ . Klinické studie prokázaly, že  $F(ab')_2$  fragmenty mají kratší biologický poločas v séru, než neporušené monoklonální protilátky. Dále byly pozorovány některé pozitivní reakce na léčbu s radioaktivně značeným  $F(ab')_2$  fragmentem. Autoradiografické studie radioaktivně značených monoklonální protilátek podávaných myším, nesoucích lidské nádorové xenoimplantáty, ukázaly, že schopnost  $F(ab')_2$  fragmentů proniknout do nádorové tkáně je vyšší než u intaktní monoklonální protilátky. Farmakokinetika Fab nebo Fab' fragmentů je ještě rychlejší než  $F(ab')_2$  fragmentů. U Fab a Fab' fragmentů byla zjištěna menší imunogenní míra než u intaktní monoklonální protilátky. Jejich největší nevýhodou pro aplikace RIT je jejich vysoká a trvalá ledvinová lokalizace, která je způsobená velikostí molekuly, což výrazně zvyšuje riziko renální toxicity. Do jaké míry je značení fragment deponován v ledvinách závisí na radionuklidů a typu značení dané makromolekuly. U radioaktivního značení monoklonální protilátky pomocí jódu dochází k rychlé dehalogenaci a radioaktivní jod je vylučován do ledvin, žaludku a střev. Většina radiojódu je deponována ve štítné žláze, pokud je nedostatečně blokována stabilním jodem. Chelátující radiokovové nuklidy (např.  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , a  $^{177}\text{Lu}$ ) nejsou tak snadno vyloučeny z normálních tkání, pokud dojde k metabolické degradaci radioimunokonjugátu. Retence radiokovů v ledvinách je způsobena jednak reabsorpcí protilátkových fragmentů po jejich glomerulární filtraci a následnou degradací radioimunokonjugátů, čímž dojde k vychytání radioaktivních metabolitů do renálních tubulárních buněk. I když radiojód snadno odstraněn z těla, může také představovat toxické obavy pro renální tkáň, v závislosti na dávce podané radioaktivity. Účinným prostředkem, jak posílit renální vylučování radioimunokonjugátů je blokování jeho reabsorpce z lumenální tekutiny v proximálních tubulech podáváním základních aminokyselin, jako je lysin nebo arginin, a to před aplikací s radioaktivně značených MAb fragmentů. Je velmi obtížné generovat fragmenty MAb, které si zachovávají imunoreaktivitu, nicméně je lze připravit proteolytickým štěpením intaktní MAb za použití enzymů, což je



postup, který musí být optimalizován pro každou MAb a obvykle vyžaduje trojnásobné množství MAb pro získání konečného požadovaného množství fragmentu. Postup je neefektivní a nákladný při výrobě a pro klinické studie RIT.

Pomocí genetického inženýrství lze vytvořit také celou řadu fragmentů protilátek, které mají různé farmakologické vlastnosti, ale svou imunoafinitou se blíží intaktní protilátce. Možné příklady druhů fragmentů je ilustrováno na obr. 2.2.2.5.3 (93).



Obr. 2.2.2.5.3 Struktura možných druhů fragmentů protilátek připravovaných genetickým inženýrstvím

## Trastuzumab

Trastuzumab je humanizovaná monoklonální protilátka schválena pro léčbu (neo) adjuvantu a metastatické karcinomu u pacientů s HER2-pozitivním karcinomem prsu. Přidání trastuzumabu k chemoterapii má za následek prodloužení doby progresu onemocnění, vyšší míru objektivní odpovědi a delší celkové přežití. Přesná charakterizace exprese HER2 je nezbytná pro optimální léčbu. Proto by měl být status HER2 hodnocen u všech pacientů s karcinomem prsu k identifikaci HER2-pozitivních nádorů. Metody *ex vivo* pro určení stavu HER2 primárního nádoru jsou imunohistochemie (IHC) a fluorescence *in situ* hybridizace (FISH). Tyto metody vyžadují biopsie, které nejsou vždy možné. Navíc chybu vzorkování nelze vyloučit opakovanými biopsiemi. To je zvláště důležité z hlediska možné heterogenní exprese HER2. Heterogenita může existovat mezi primárním nádorem a metastázami, mezi různými metastázami a v rámci metastázy. Neshodnost exprese HER2 mezi primárními nádory a metastázami měřením pomocí FISH se pohybuje mezi 10 a 24 % (94,95). Ztráta nebo získání exprese HER2 může mít jasné terapeutické následky, neboť pacienti s HER2-pozitivními lézemi mají prospěch z terapie anti-HER2 (96). To zdůrazňuje nutnost přesně posoudit stav HER2 během průběhu metastatického karcinomu prsu. Neinvazivní stanovení exprese HER2 může být potenciálně provedeno pomocí molekulárního zobrazování. To by mohlo usnadnit

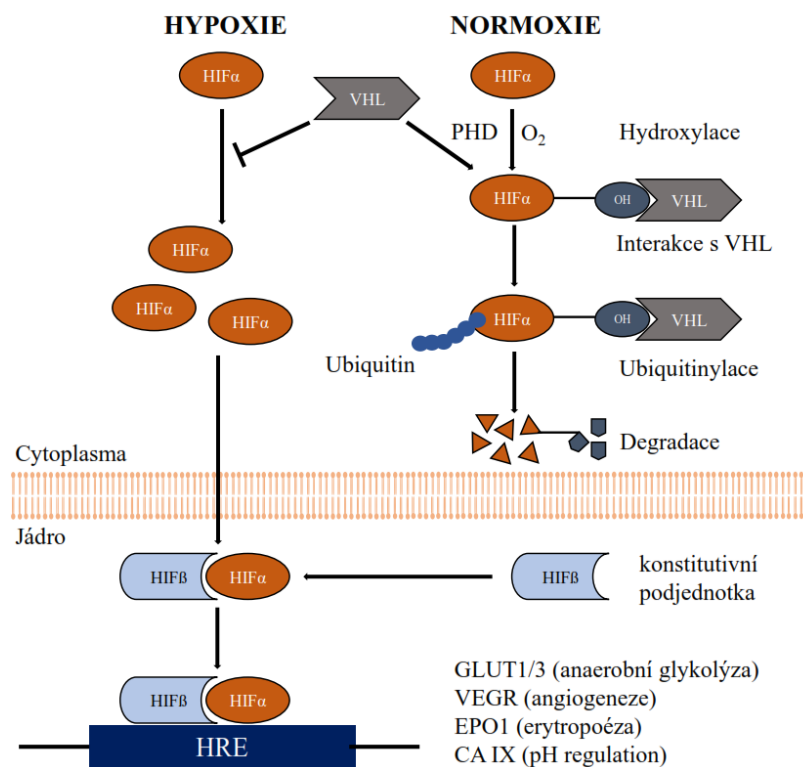
výběr pacientů pro léčbu cílenou na HER2 a posoudit okamžitou reakci na terapeutické intervence. V klinickém prostředí může být HER2 zobrazeno pomocí trastuzumabu radioaktivně značeného např.  $^{111}\text{In}$  pro SPECT  $^{89}\text{Zr}$  pro PET zobrazení. Pro terapii otevřeným zářičem cílícím na HER2 se zdá být ideálním kandidátem [ $^{177}\text{Lu}$ ]Trastuzumab (97–99).

## Nimotuzumab

Cílená terapie představuje hlavní trend v novém vývoji léků pro léčbu rakoviny, který je poháněn rostoucími znalostmi genetických změn vedoucích k maligní transformaci a progresi. Z molekulárních cílů, které jsou v současné době v klinickém hodnocení, byl epidermální růstový faktor (EGF), také známý jako HER1, široce validován na několik antagonistech EGFR, včetně inhibitorů tyrosinkinázy (TKI) a monoklonálních protilátek, které byly schváleny i FDA. V klinických studiích fáze II nebo fáze III bylo hodnoceno pět anti-EGFR mAb s pozitivními nebo příznivými výsledky. Mezi nimi např. cetuximab (chimérický IgG1 dříve známý jako C225) byl rozsáhle studován u různých typů nádorů. Dále panitumumab, matuzumab a zalutumumab byly testovány u několika různých typů EGFR-pozitivních nádorů. Nimotuzumab (humanizovaný IgG1 dříve známý jako hR3) byl zkoumán u pacientů s nádory hlavy, krku a gliomů (100,101). EGFR je běžně nadměrně exprimován v lidských epiteliálních nádorech ve srovnání s hladinami exprese pozorovanými v normálních tkáních, jako je kůže a ledviny. Nevýhodou terapie zaměřené na EGFR je závažná toxicita kožní vyrážky a další související nežádoucí účinky, které jsou vyvolávány v ledvinových buňkách a v gastrointestinální sliznici. Předpokládá se, že vedlejší účinky jsou způsobeny reakcí anti-EGFR cílených léčiv na receptor v jiných tkáních než v tumoru (102). hR3 se zdála jako vhodná molekula pro značení a následné zobrazování případně terapii EGFR pozitivních nádorů. První studie byly prováděny na [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]hR3, k použití detekce nádorů, které nadměrně exprimovaly EGFR, ale bohužel vykazovaly vysokou akumulaci v játrech a ledvinách pacientů (103). V jiné klinické studii byla zkoušena biologická distribuce [ $^{188}\text{Re}$ ]hR3 u pacientů s gliomy vysokého stupně, ovšem s negativním výsledkem (104). V pokračujícím úsilí vyvinout radioimunoterapeutické radiofarmakum, které může být použito v klinice pro radioimunoterapii nádorů, které nadměrně exprimují EGFR, byl poprvé hR3 značen  $^{177}\text{Lu}$  a byly zkoumány jeho biodistribuční vlastnosti u zdravých myší a myší nesoucích nádorové xenotransplantáty lidského karcinomu A431 (105).

### 2.2.2.6. Zobrazení hypoxie nádoru

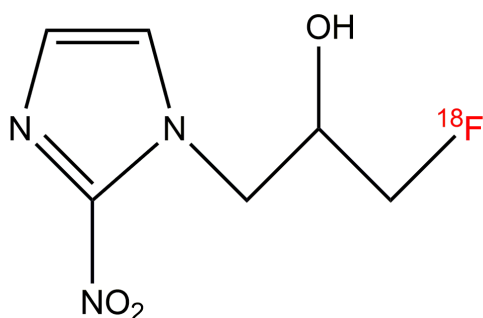
Hlavním rysem mnoha nádorů je fakt, že jsou hypoxické a kyselé ve srovnání s normálními tkáněmi stejného typu. Toto bylo známo po mnoho desetiletí jako Warburgův efekt (106,107). Ovšem celý proces byl na molekulární úrovni objasněn poměrně nedávno po objevu transkripčních faktorů regulace obou jevů, hypoxií indukovaný faktor 1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) (108). Mechanismus účinku je demonstrován na obrázku č. 2.2.3.6.1. Vzhledem k tomu, že terapeuticky modifikující hypoxie může mít u pacientů potenciál změnit výsledky léčby, je neinvazivní PET zobrazování pro identifikaci a kvantifikaci stavu hypoxie nádorů klíčový v předpovědi a sledování odpovědi na léčbu (109). Z neinvazivních zobrazovacích modalit hypoxie jsou radionuklidové studie používající PET markery nejvíce studovány (110). Je prokázáno, že parametrická PET zobrazení hypoxie tkáně při inhalaci  $^{15}\text{O}$  pomocí měření regionální extrakční frakce kyslíku a metabolické rychlosti jsou přesnější než invazivní metody (111). PET zobrazování s  $^{15}\text{O}$  je v současné době "zlatým standardem" pro neinvazivní zobrazování hladin kyslíku v tkáních; nicméně kvůli logistice a technickým problémům, jako je velmi krátký poločas rozpadu cca 2 min a drahým technologiím pro jeho přípravu není široce používán v experimentálních ani klinických podmínkách (112).



Obr. 2.2.2.6.1 Mechanismus účinku HIF $\alpha$

Nitroimidazoly prokázaly velmi vysokou selektivitu při cílení na hypoxickou tkáň a také mají radiosenzitizující vlastnosti (113). Deriváty nitroimidazolu, jako je pimonidazol nebo 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl) -N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl) acetamid (EF5) mohou být porovnány s inaktivními metodami typu imunohistochemická analýza. Jako nejstarší značené agens pro zobrazení PET je analog 2-nitroimidazolu. Intracelulární reduktázy přeměňují stopové množství těchto analogů na reaktivní meziproducty, jejichž akumulace vykazuje inverzní korelaci s úrovní oxygenace tkáně. Vznikající meziproduct vytváří kovalentní vazby s thiolovými skupinami intracelulárních proteinů a mají sklon k akumulaci v hypoxických buňkách. Mnoho nitroimidazolových sloučenin s různými vlastnostmi bylo vyvinuto a testováno pro zobrazování hypoxie (114,115).

$^{18}\text{F}$  značený fluoromisonidazol [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO (obr. 2.2.2.6.2) byl prvním markerem hypoxie pro PET, u kterého bylo zjištěno, že má nádorovou specifitu. To bylo využíváno, jak v preklinických, tak klinických studiích (116). Studie provedené na krysím modelu s rhabdomyosarcomem, bylo korelováno použití [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO s dalšími markery, jako je pimonidazole a karboanhydrázy IX (CA IX). Bylo zjištěno, že [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO zobrazování na PET dobře koreluje s hypoxickými imunochemickými markery pimonidazolem a CA IX (117). Klinické studie hodnotící roli [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO a [ $^{18}\text{F}$ ]FDG u pacientů s karcinomem hlavy a krku neodhalily žádnou korelaci mezi měřeními  $\text{pO}_2$  a vychytáváním [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, ale dobrou korelací s vychytáváním [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO. Nebyla zjištěna žádná korelace mezi [ $^{18}\text{F}$ ]FDG a [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO, což naznačuje různé mechanismy vychytávání nádoru (118,119).



Obr. 2.2.2.6.2 Chemická struktura [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO

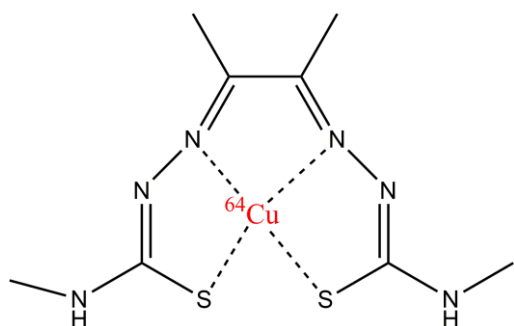
Další skupinou sloučenin, které lze použít pro diagnostiku hypoxie nádoru jsou dithiokarbazony. Dithiosemikarbazony byly zpočátku objeveny pro své antioxidační vlastnosti v komplexu s mědí. Z důvodu jednoduchosti chemie byla získána látka [ $^{64}\text{Cu}$ ]diacetyl-bis(N(4))-methylthiosemikarbazon ( $^{64}\text{Cu}(\text{II})\text{-ATSM}$ ) (obr. 2.2.2.6.3), která byla rychle přijata v diagnostickém zobrazování hypoxie (120).  $\text{Cu}(\text{II})\text{-ATSM}$  je velmi jednoduchá molekula

a navíc její biochemická interakce s buňkami je podobně jednoduchá. Mechanismus je založen hlavně na redoxní chemii. V živých buňkách dochází k redukci Cu(II)-ATSM a je rychle vylučována z aerobních buněk, přičemž se zachycuje v hypoxických buňkách, a tak může rozlišovat mezi hypoxickými, nefunkčními a životaschopnými tkáněmi (obr. 2.2.2.6.4) (121). Dále byl navržen zachycovací mechanismus ve dvou fázích. První fází je redukční/oxidační cyklus zahrnující thioly a molekulární kyslík. A to následuje sekundární fáze interakcí s proteiny v mitochondriích, což vede k trvalé retenci Cu(II)-ATSM (122).

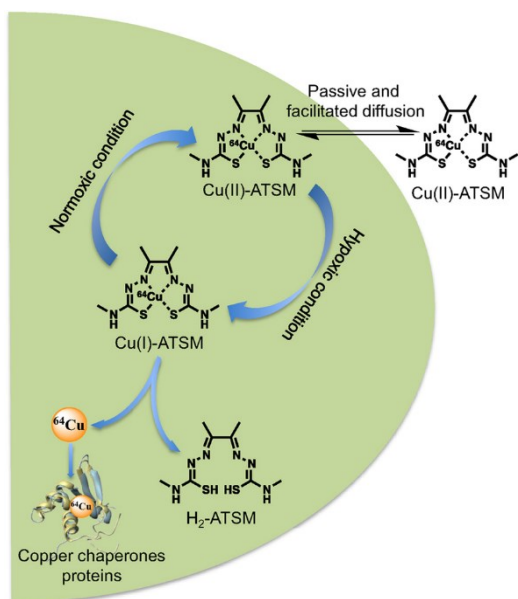
*In vitro* i *in vivo* údaje ukazují, že nádory se zvýšenou expresí MDR1 vykazují nižší akumulaci [<sup>64</sup>Cu]ATSM, což ukazuje, že exprese glykoproteinu MDR1 může ovlivnit retenci [<sup>64</sup>Cu]ATSM v nádorech (123). [<sup>64</sup>Cu]ATSM byl také aplikován jako marker intracelulárních stavů u poruch s mitochondriální dysfunkcí, jako je, Parkinsonova choroba a Alzheimerova nemoc. Kromě toho také inhibice syntézy mastných kyselin vedla k významnému zvýšení retence [<sup>64</sup>Cu]ATSM v nádorových buňkách prostaty *in vitro* v anoxii po dobu 60 minut. Tudíž translace [<sup>64</sup>Cu]ATSM pro zobrazování rakoviny prostaty může být omezena nadměrnou expresí syntézy mastných kyselin spojenou s prostatickými malignitami (124,125).

Studie na modelech zvířecích nádorů ukázaly dobré korelace mezi akumulací [<sup>64</sup>Cu]ATSM v nádoru a měřením obsahu kyslíku pomocí kyslíkové elektrody. Výsledky zobrazování byly rovněž srovnatelné s [<sup>18</sup>F]FMISO. Bylo však zjištěno, že vycytávání nádoru [<sup>64</sup>Cu]ATSM je méně citlivé na změnu hladiny kyslíku oproti [<sup>18</sup>F]FMISO, které bylo citlivější na měnící se hladiny hypoxie (126).

Akumulace [<sup>64</sup>Cu]ATSM v nádoru potvrzuje jeho použití, jako klinicky významného biomarkeru prognózy u několika lidských nádorů např. karcinomu plic (127).



Obr. 2.2.2.6.3 Chemická struktura [<sup>64</sup>Cu]ATSM

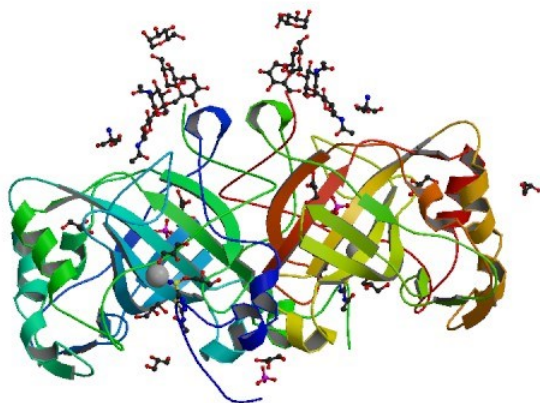


Obr. 2.2.2.6.4 Mechanismus zobrazování hypoxických buněk pomocí [ $^{64}\text{Cu}$ ]ATSM (128)

## KARBONICKÁ ANHYDRÁZA IX

Karbonická anhydráza IX (CA IX) (obr. 2.2.2.6.5) je povrchový buněčný enzym, který katalyzuje reverzibilní hydrataci oxidu uhličitého na bikarbonátové ionty a protony. Tato jednoduchá reakce je nezbytná pro mnoho biologických procesů. Reaktivita enzymu závisí na prostorově a časově regulovaném transportu iontů v různých subcelulárních oddílech a plazmatické membrány. Existuje 15 lidských isoformem, z nichž tři jsou neaktivní a 12 se pohybuje od slabé až po velmi silnou enzymovou aktivitu. Většina těchto izoenzymů je exprimována v diferencovaných buňkách a plní specializované role v různých tkáních a orgánech, zejména u těch, které jsou metabolicky vysoce aktivní, jako je mozek, ledviny, žaludek, pankreas atd. Velmi účinná cytoplazmatická CA II je tradičně vnímána jako hlavní enzym usnadňující dýchání a produkci různých tělesných tekutin, ale existují také jiné fyziologicky relevantní isoenzymy, jako jsou CA IV-VII a XII-XIV. Jejich abnormální exprese byla integrována do několika patologických stavů, včetně glaukomu, osteoporózy, edému, selhání ledvin apod. (4). Ačkoliv jsou rostoucí nádory charakterizovány abnormálními iontovými transportními toky a narušenými gradienty pH, pokusy sdružovat CA s rakovinou obecně selhaly. Na počátku devadesátých let byla identifikována transmembránová isoforma CA IX (129). CA IX je jediný izoenzym, který je převážně spojen s nádory a jen zřídka se vyskytuje ve zdravých tkáních (zejména v žaludeční sliznici a střevních kryptech). CA IX je široce exprimována v řadě pevných nádorů a její přítomnost v nádorových buňkách je často

spojena s agresivním nádorovým fenotypem. To je způsobeno jeho silnou regulací hypoxie na několika úrovních (130).



Obr. 2.2.2.6.5 Krystalová struktura CA IX (131)

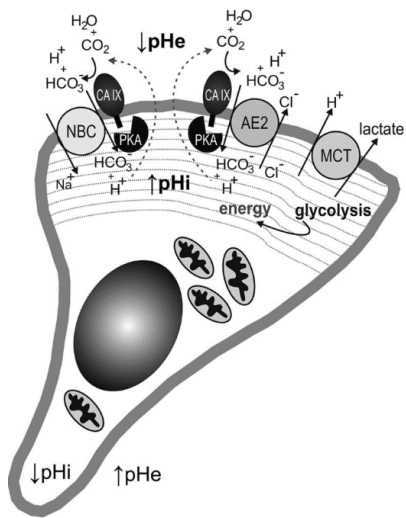
Transkripční aktivace CA IX závisí na HIF-1, který se váže k jádrovému promotoru bezprostředně před počátečním místem transkripce a je tedy hlavním transkripčním regulátorem genu CA9. To se odráží v typickém regionálním expresním vzorku CA IX v poměrně široké perinekrotické zóně ve většině hypoxických nádorů a difuzním vzorem exprese v renálních karcinomech s konstitutivní aktivací HIF po genetické inaktivaci jeho negativního regulátoru pVHL. V promotoru HIF-1 spolupracuje s nepravděpodobným transkripčním faktorem SP1, který je důležitý zejména při nízkých hladinách HIF-1. Transkripce genu CA9 je dále modulována acidózou a aktivací onkogenních metabolických drah. Hypoxie rovněž podporuje správný sestřih mRNA CA9, což vede k úplnému transkriptu. Tato varianta sestřihu je konstitutivně přítomná v nízké hladině v normoxii a v normálních tkáních (132). Navíc hypoxie aktivuje CA IX na funkční úrovni. K tomu dochází v důsledku hypoxie vyvolané zvýšením hladin cAMP a aktivace proteinové kinázy A, která fosforyluje Thr443 v intracelulárním ocasu CA IX. Fosforylace Thr443 pak zprostředkovává signalizaci dovnitř/ven do extracelulární katalytické domény, která vede k aktivaci CA IX. Hypoxie indukuje vylučování ektodomény (ECD) CA IX, která je jinak relativně stabilní protein s poločasem života přibližně 40 hodin v reoxygenovaných buňkách. Odštěpení ECD je prováděno TACE/ADAM17, které je samo o sobě regulováno těžkou hypoxií (133–135). Není

vyloučeno, že hypoxie ovlivňuje i další kroky v expresi a fungování CA IX, které však zůstávají k dalšímu výzkumu.

Pro nádorové buňky je hypoxie významným fyziologickým stresem, který vyžaduje selektivní tlak buď k adaptaci, nebo k úniku, nebo ke smrti. Adaptační mechanismy zahrnují mimo jiné schopnost odolávat acidóze, která je důsledkem více či méně rozsáhlého metabolického posunu od oxidační fosforylace k anaerobní glykolýze, která se často zachovává i v reoxygenovaných buňkách (známý jako Warburgův efekt). Přestože glykolýza vytváří méně energie ve formě ATP než oxidační fosforylace, je velmi důležitá pro nádorové buňky, neboť podporuje tvorbu biomasy, která je potřebná pro jejich proliferaci (136). Hlavním metabolickým produktem glykolýzy je kyselina mléčná, ale onkogenní metabolismus také generuje nadbytek protonů a  $\text{CO}_2$ . Za účelem zachování neutrálního nebo mírně alkalického intracelulárního pH ( $\text{pH}_i$ ), který je nezbytné pro účinné biosyntetické reakce a přežití buněk, vyvinuly buňky dopravní mechanismy, které spadají do dvou hlavních cest exportu laktátu a protonů a importu hydrogenuhličitanu. Export může být zprostředkován několika typy transmembránových transportérů, jako je monokarboxylový transportér (MCT4) a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  kanál 1 (NHE1), které jsou také ovlivněny hypoxií a acidózou. NHE1 je důležitý pro regulaci  $\text{pH}_e$  a  $\text{pH}_i$  v nádorech a přispívá k tvorbě a udržování reverzního protonového gradientu. Nicméně nedávné studie naznačují, že přenos kyseliny vně buňky představuje dynamickou reakci na kyselou zátěž, která se zvyšuje u určitých specifických typů buněk a ve většině buněk s vysokou normoxickou aktivitou je spíše inhibována hypoxií (137,138).

V určitých situacích (jako je chronická hypoxie) mechanismy přenosu kyseliny nejsou dostatečné pro stabilizaci klidové  $\text{pH}_i$  na mírně alkalické úrovni vedoucí k přežití a růstu buněk. Proto buňky využívají také bikarbonátové pumpy, rodinou bikarbonátových transportérů, zahrnujících  $\text{Na}^+$ -zprostředkované  $\text{HCO}_3^-$  ko-transportéry a  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (AE2) transportéry. Bikarbonátové transportéry jsou široce distribuovány, vyjádřené v různých isoformách a variantách. Hrají důležitou roli při udržování  $\text{pH}_i$  stejně jako přispívají k regulaci objemu buněk (139). Regulace pH v buňkách pomocí CA IX ilustruje obr. 2.2.2.6.6.





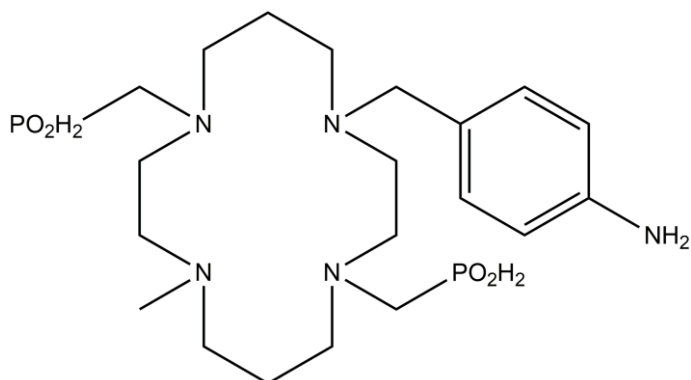
Obr. 2.2.2.6.6 Mechanismus regulace pH pomocí CA IX (140)

### 3. Experimentální část

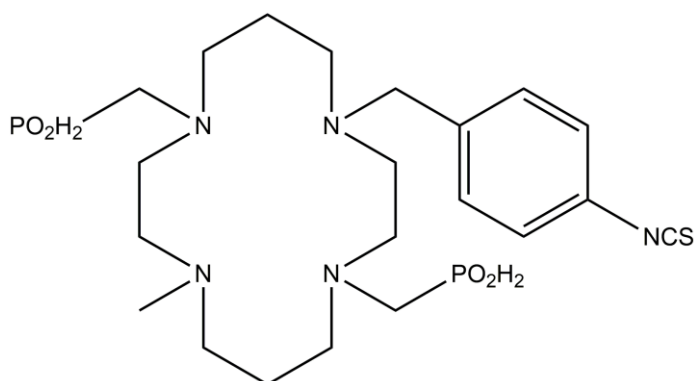
#### 3.1. Metody

##### 3.1.1. Syntéza NCS-derivátu z NH<sub>2</sub>-derivátu chelátoru pro radionuklidy mědi

Amino derivát nekomerčního chelátoru fosfinátu (1-NH<sub>2</sub>-PHS) (obr. 3.1.1.1) (180 mg, 35 mmol) byl rozpuštěn ve vodě (4 ml) a převrstven chloroformem (4 ml). Do směsi byl přidán thiofosgen (26  $\mu$ l, 5M přebytek), směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Chloroformová fáze byla odstraněna stříkačkou a vodná fáze s produktem byla odpařena na vakuové odparce do sucha. Výsledný produkt (1-NCS-PHS) (obr. 3.2.1.2) byl skladován při 4 °C.



Obr. 3.1.1.1 1-NH<sub>2</sub>-PHS



Obr. 3.1.1.2 1-NCS-PHS

### 3.1.2. NMR, MS charakterizace chelátoru PHS

Nekomerční chelátor 1-NH<sub>2</sub>-PHS (obr. 3.1.1.1) a jeho aktivní deriváty 1-NCS-PHS (obr. 3.1.1.2) byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI) (ACQUITY QDa, Waters, USA) a nukleární magnetickou rezonancí (Bruker Avance III<sup>TM</sup> HD 850MHz, Bruker USA) na <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR a NMR<sup>32</sup>P.

### 3.1.3. Příprava protilátky IgG M75 a jejího fragmentu scFv-Fc M75

Monoklonální protilátka IgG M75 připravena podle EP 2508596A2 (129).

#### 3.1.3.1. Konstrukce vektoru pro fúzní protein scFv-Fc

Fragment scFv odvozený z monoklonální protilátky M75, scFv 75, byl připraven pomocí postupu (141). Kódující sekvence Fc části a koncové oblasti byla získána podobně jako v literatuře (142). C-konec scFv M75 byl připojen k N-zakončení Fc přímo bez jakéhokoliv spaceru nebo linkeru. Byly použity následující primery:

Krok I

Primer 1F

5'- GCTAGCAAGCTTCCACCATGG-3'

Primer 1R

5'-CACAACTGCACTTCAGAGTGCACGCCGGT-3'

Krok II

Primer 2F

K' dovací řetězec produktu z kroku I

Primer 2R

5'-GCAGCTCTTAGGCTCACGTTTGATCTC-3'

Krok III

Primer 1F

5'-GCTAGCAAGCTTCCACCATGG-3'

## Primer 3R

5'-ATAATGCGGCCGCTATCACTTGCCGGGGGA-3'

Konstrukt scFv M75-hFc zahrnoval několik PCR reakcí vedoucích nejprve ke dvěma fragmentům DNA, které byly nakonec spojeny dohromady. V reakci prvního kroku se přibližně 100 bp dlouhý fragment obsahující 5' klonovací místo Hind III, signál těžkého řetězce IgG a prvních pět kodonů kostry těžkého řetězce 1 (FR1) IgG M75 byly získány za použití primerů 1F/1R a vhodného templátu nesoucího sekreční signál. Výsledný 100 bp dlouhý oligonukleotid sloužil jako přední primer v druhé PCR reakci za použití vektoru pro expresi scFv M75 (141), jako reverzního primeru 2R odpovídajících posledním čtyřem kodonům variabilního lehkého řetězce IgG M75 a prvních pět kodonů oblasti Fc fragmentů (142). Takto získaný fragment byl štěpen na 715 bp syntetické fragmenty za použití přímého primeru 1F a reverzního primeru 3R. Po ověření sekvence byl konečný produkt ligován do modifikovaného vektoru pCEP4 za použití klonovacích míst Hind III a NotI.

### 3.1.3.2. Exprese

Pro expresi v buňkách HEK 293 byl použit modifikovaný vektor pCEP 4 kódující sekvenci scFv-hFc předcházející sekreční signál sekvence umožňující translokaci produktu do média. Část Fc na C-konci polypeptidu zjednodušuje izolaci produktu a čištění afinitní chromatografií na kolonách proteinu A Econo-Pac (Bio-Rad). Konečné čištění bylo dosaženo pomocí vylučovací chromatografie na koloně Superdex 200 HR 10/30 (Ge HealthCare). Aminokyselinová sekvence trastuzumabu byla použita pro syntézu genů PMT lehkého (LC) a těžkého (HC) řetězce.

### 3.1.4. Konjugace protilátek

#### 3.1.4.1. Konjugace protilátky IgG M75 a fragmentu scFv M75-hFc s chelátorem NCS-PHS

Protilátky IgG M75 (140 µg v 100 µl 0,01 M PBS pufru, pH 7,4) a fragment scFv M75-hFc (110 µg ve 100 µl 0,01 M PBS pufru, pH 7,4) bylo smícháno s roztokem EDTA ve vodě (18,5 mg/ml) a 0,1 M EPPS puftrem, pH 8,9 (150 µl). Směs byla přečištěna ultrafiltrací přes 30 kDa MWCO membránu, za použití centrifugačních vialek Vivaspin 500 (GE Healthcare, UK). Roztok byl zakoncentrován na 70 µl a bylo přidáno (celkem 3-krát) 300 µl 0,1 M EPPS pufru, pH 8,9. Tímto způsobem byla výsledná směs rozpuštěna v požadovaném

pufu a pH roztoku bylo  $8,9 \pm 0,1$  pH. Koncentrace mAbs byla ověřena pomocí standardní metody dle Bradford assay (Sigma Aldrich, USA) (143). K roztoku protilátky a fragmentu 70  $\mu$ l byl přidán 40-molární nadbytek chelátoru NCS-PHS rozpuštěného v 0,2M EPPS o pH 8,5. Po smíchání směsi bylo proměřeno pH a roztok byl míchán 2 hodiny za laboratorní teploty a poté uložen v lednici při 4 °C po dobu 12 h. Po konjugaci byly imunokonjugáty purifikovány pomocí size-exclusion chromatografie pomocí odsolovací kolonky PD-10 (GE Healthcare, USA). Kolonka byla prekalibrována a vysycena roztokem 0,2M EPPS o pH 8,5 s přidavkem 0,01 % nativní protilátky IgG M75. Z kolonky byly sbírány frakce po 1 ml, 3.-4. frakce obsahovala purifikovaný konjugát, který byl jímán. Následně byl roztok zakonzentrován ultrafiltrací přes 30 kDa MWCO membránu, za použití centrifugačních vialek Vivaspin 500 (GE Healthcare, UK). Protilátka i fragment byly přeneseny do v 0,2M MES pufu, pH 5,5 (Sigma Aldrich, USA) pomocí ultracentrifugace dle postupu popsáno výše. Koncentrace konjugátů byla stanovena pomocí Bradford assay. Konjugáty byly uloženy při 4 °C (144). Výsledné konjugáty byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (UltrafleXtreme™ MALDI-TOF/TOF, Bruker, USA).

### **3.1.4.2. Konjugace protilátky Nimotuzumab s chelátory NCS-DOTA a NCS-DOTAPO**

Příprava konjugátů protilátky Nimotuzumab (hR3) (CIMAher, Center of Molecular Immunology, Cuba) s chelátory NCS-DOTA a NCS-DOTAPO (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triaceto-1-{methyl[(4-aminophenyl)methyl]fosfinová kyselina}), (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze). Postup konjugace byl obdobný jako postupy konjugací protilátky IgG M75 a jejího fragmentu s drobnou modifikací. Molární poměr protilátky a ligandů činil 1:50. Směs byla inkubována na Vortexu po dobu 2 h při laboratorní teplotě a mírném třepání (450 kmitů/min). Ihned po skončení konjugace byla provedena purifikace vzniklého konjugátu na kolonkách PD-10. Kolonka byla nejprve promyta 2 x 10 ml a 1 x 5 ml 0,05 M NH<sub>4</sub>OAc. Následně byla kolonka nasycena 1 ml nativní hR3 (5 mg/ml). Přebytek protilátky byl vypláchnut 2 x 10 ml a 1 x 5 ml 0,05 M NH<sub>4</sub>OAc. Pro záchyt jednotlivých frakcí byla připravena sada osmi čistých a sterilních 1,5 ml plastových zkumavek typu Eppendorf. Frakce z kolonky PD-10 byly jímány po 1 ml a jako výsledný purifikovaný konjugát byly požity frakce 3. – 5. Následně byl roztok zakonzentrován ultrafiltrací přes 30 kDa MWCO membránu, za použití centrifugačních vialek Vivaspin 500 (GE Healthcare, UK). Konjugáty byly přeneseny do v 0,2M MES pufu,

pH 5,5 (Sigma Aldrich, USA) pomocí ultracentrifugace dle postupu popsaného výše. Koncentrace konjugátů byla stanovena pomocí Bradford assay.

### 3.1.4.3. Lyofilizace konjugátů protilátek a fragmentů

Pro dlouhodobé skladování hotových konjugátů byla nalezena a ověřena metoda lyofilizace dle následujících postupů. Roztok konjugátu byl převeden do 10 ml skleněné lékovky. K roztoku byla přidána trehalóza v množství 200 mmol trehalózy na mg konjugátu a 2 ml vody. Lékovka s roztokem byla zmrazena kapalným dusíkem, umístěna do lyofilizátoru (LABONCO FreeZone 6, USA) a lyofilizována 12 h při  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po lyofilizaci byl získán produkt ve formě bílého lyofilizátu, který bylo možné následně použít pro značení. Lyofilizát byl skladován v lednici při  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Testování vlivu lyofilizace na imunoreaktivitu protilátky bylo provedeno s nativní hR3. Byla provedena ELISA metoda ve stejném uspořádání pro nativní hR3 v roztoku a pro hR3 po lyofilizaci a následnou rekonstitucí v ml  $0,05\text{ M NH}_4\text{OAc}$ .

### 3.1.5. Konjugace peptidů

#### 3.1.5.1. Konjugace Pro-1-Tyr-4-Bombesinu s chelátorem NCS-DOTA a NCS-DOTAPO

K roztoku peptidu Pro-1-Tyr-4-Bombesinu (BBN) o koncentraci 3-4 mg/ml bylo přidáno příslušné množství roztoku chelátu NCS-DOTAPO a NCS-DOTA ( $10,0\text{ mg/ml}$ ), tak aby molární poměr peptid ku ligandu činil 1:1. Směsi byly poté opatrně promíchány a byla ověřena hodnota pH, která by se pohybovala v rozmezí 8,4-8,6. Roztok byl uložen za laboratorní teploty na temné místo bez přístupu světla po dobu 5 h. Po uplynutí reakčního času byl roztok obsahující reakční směs aplikován na semipreparativní kolonu pro separaci konjugátu využívající systému frakcí. Jednotlivé frakce byly jímány po 1 ml optimalizovanou metodou pro semipreparativní sběr frakcí. Metoda je založená na gradientové eluci (tab. 3.1.5.1.1). Příslušná frakce s konjugátem je dále zpracována postupem uvedeným níže.

Tabulka 3.1.5.1.1 Metoda gradientové eluce semipreparativní separace konjugátů

Čas (min)	Voda s 0,04 % TFA (%)	Acetonitril s 0,04 % TFA (%)
0	95	5
20	50	50
21	30	70
25	30	70
27	95	5
30	95	5

Roztok přečištěného konjugátu byl následně vymražen kapalným dusíkem a lyofilizován 12 h při -45 °C. Lyofilizáty byly skladovány v lednici při 2-8 °C.

## **3.2. Radiochemie**

### **3.2.1.1. Příprava radionuklidu $^{61}\text{Cu}$**

Radionuklid  $^{61}\text{Cu}$  byl připraven ozařováním přírodního niklu s nízkým energetickými energetickými deuterony jadernou reakcí  $^{nat}\text{Ni}(d,x)^{61}\text{Cu}$ . Cílový materiál s vysokou čistotou ( $^{nat}\text{Ni}$ , 99,999 %, obsah Cu < 1 ppm) (GoodFellow, UK). Materiál byl obroběn do kotoučů o tloušťce 1 mm a průměru 24 mm (145). Disky byly umístěny do držáku COSTIS a ozařovány na cyklotronu Cylone 18/9 s kolmým deuteronovým paprskem o energii 8,6 MeV a proudem 10 - 15  $\mu\text{A}$  (hrubý cílový výtěžek byl cca 58 MBq/ $\mu\text{Ah}$ ). Aktivovaná tenká niklová cílová vrstva (<100  $\mu\text{m}$  na výrobní cyklus) byla leptána 20% kyselinou dusičnou v 50% molárním přebytku vzhledem k obsahu kovu v zařízení navrženém a vyrobeném na Ústavu jaderné fyziky CAS. Alikvotní část leptaného roztoku byla podrobena opakovaným měřením gama spektrometrie na spektrometru HPGe GMX45Plus (Ortec, USA), kalibrovaném na energii a účinnost za použití standardů dodávaných ČMI.

### **3.2.1.2. Příprava radionuklidu $^{64}\text{Cu}$**

Radionuklid  $^{64}\text{Cu}$  byl připraven jadernou reakcí  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$  na vysoce obohaceném  $^{64}\text{Ni}$  (99,09 %, natCu < 10 ppm, Isoflex). Obohacený  $^{64}\text{Ni}$  byl elektrolyticky nanesen na vysoce čistý zlatý terčový podklad z vodného roztoku síranu nikelnatého s pH upravým na 4,00 hydroxidem amonným. Cílová terčová vrstva byla umístěna v držáku COSTIS a ozařována kolmým protonovým paprskem na cyklotronu Cylone 18/9 po dobu 1 – 3 hod proudem 15 – 27  $\mu\text{A}$ . Ozařovaná vrstva  $^{64}\text{Ni}$  byla leptána 20% kyselinou dusičnou v 50% molárním přebytku vzhledem k obsahu kovu. Množství kyseliny potřebné pro rozpuštění bylo vypočteno z hmotnosti uloženého cílového materiálu. Leptání bylo provedeno ve stejném automatizovaném zařízení jako v případě přípravy radionuklidu  $^{61}\text{Cu}$ . Alikvotní část leptaného roztoku byla podrobena opakovaným měřením gama spektrometrie na spektrometru HPGe GMX45Plus (Ortec, USA), kalibrovaném na energii a účinnost za použití standardů dodávaných ČMI.

### 3.2.1.3. Separace beznosičových radionuklidů $^{61}\text{Cu}$ a $^{64}\text{Cu}$ z ozařované matrice

Beznosičové radionuklidy  $^{61}\text{Cu}$  a  $^{64}\text{Cu}$  byly separovány z niklového terče iontoměničovou sloupcovou chromatografií na kolonce s navázanou skupinou kyseliny iminodioxové IntersepME-1Mini (GLScience, Japonsko). Separace byla prováděna na automatizované jednotce navržené a konstruované na Ústavu jaderné fyziky CAS, která kombinuje komerční a nekonvenční komponenty (obr. 3.2.1.3.1). Roztoky leptaných terčů byly zředěny vodou na 0,1 M koncentraci příslušné kyseliny (HCl pro  $^{61}\text{Cu}$  a  $\text{HNO}_3$  pro  $^{64}\text{Cu}$ ) a roztoky byly naneseny na iontoměničovou kolonu. V případě separace  $^{61}\text{Cu}$  se kontaminanty iontů niklu a kobaltu eluovaly 0,1 M HCl (10 ml). Následně byl z kolonky eluován radionuklid  $^{61}\text{Cu}$  pomocí 2 M HCl (2 ml). Roztok byl odpařen do sucha mírným prouděním dusíku a zahříváním na 100 °C. Výsledný produkt byl rozpuštěn v příslušném pufru pro následná značení.

Separace  $^{64}\text{Cu}$  bylo prováděno podobně, s tím rozdílem, že místo HCl byla použita  $\text{HNO}_3$ . Alikvotní podíly konečných roztoků byly uloženy a podrobeny spektrometrii gama a analýze ICP-MS (Thermo Scientific, USA). Typické jednotlivé šarže radionuklidů obsahovaly 500 MBq  $^{61}\text{Cu}$  a 600 MBq  $^{64}\text{Cu}$ .



Obr. 3.2.1.3.1 Automatizovaná jednotka pro separaci radionuklidů  $^{61}\text{Cu}$  a  $^{64}\text{Cu}$



#### **3.2.1.4. Radioaktivní značení konjugátů IgG M75-NCS-PHS a scFv M75-hFc-NCS-PHS**

Typické radioaktivní značení imunokonjugátů s radionuklidem  $^{61}\text{Cu}$  bylo provedeno v 1,5 ml skleněných lahvičkách, které byly promyty 37% HCl (suprapur grade), MilliQ vodou a sušeny na vzduchu. Zásobní roztoky  $^{61}\text{CuCl}_2$  a imunokonjugátu byly rozpuštěny v 0,1 M octanu amonném, pH 5,5. Alikvot obsahující 100  $\mu\text{g}$  imunokonjugátu v 70  $\mu\text{l}$  pufru byl smíchán s alikvotem obsahujícím 75 MBq (2,03 mCi)  $^{61}\text{CuCl}_2$  v 60  $\mu\text{l}$  pufru a ponecháno reagovat po dobu 20 minut při 37 °C. Produkt byl purifikován z přebytku  $^{61}\text{Cu}$  inkubací s 5 mg chelex-100 po dobu 15 minut při 37 °C. Prskyřičné kuličky chelexu se nechaly sedimentovat na dně lahvičky a supernatant byl opatrně odstraněn. Radiochemická čistota produktu byla testována pomocí HPLC. Postup pro značení pomocí radionuklidu  $^{64}\text{Cu}$  byl analogický s postupem pro  $^{61}\text{Cu}$ . Minimální aktivita použitá pro značení pomocí  $^{64}\text{Cu}$  byla 37 MBq (1,0 mCi).

#### **3.2.1.5. Radioaktivní značení konjugátů hR3-NCS-DOTA**

Přečištěný konjugát v množství 0,5-1,0 ml byl převeden do plastové mikronádoby o objemu 1,5 ml a doplněn 0,1 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 5,5 tak, aby výsledný objem roztoku (včetně radionuklidu) činil 1 ml. Ke směsi byl přidán radioaktivní roztok chloridu měďnatého v 0,1 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 5,5, v množství odpovídajícím poměru 200 MBq Cu-64 na 1 mg konjugátu. Následně bylo zkontrolováno pH, jehož hodnota byla v rozmezí 5,5-6,0. Reakční směs byla posléze inkubována při teplotě 37 °C po dobu 1 hod. Po ukončení inkubace bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  askorbátu sodného (100 mg/ml). A následně byla provedena kontrola radiochemické čistoty. Obdobným způsobem bylo provedeno značení stejného konjugátu komerčním radionuklidem  $^{177}\text{Lu}$ .

#### **3.2.1.6. Radioaktivní značení konjugátů BBN-NCS-DOTA a BBN-NCS-DOTAPO radionuklidem $^{64}\text{Cu}$**

Lyofilizáty konjugátů BBN-NCS-DOTA a BBN-NCS-DOTAPO v množstvích 0,7-1,0 mg byly rozpuštěny v 500  $\mu\text{l}$  0,1 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  pH 5,5 a smíchány s roztokem  $^{64}\text{CuCl}_2$  v 0,1 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  pH 5,5 tak, že poměr aktivity činil 10 MBq/ $\mu\text{g}$  konjugátu. Následně bylo změřeno pH roztoku, jehož hodnota se pohybovala v rozmezí 5,5-6,0. Reakční směs byla inkubována po dobu 30 min při 95 °C. Po ukončení inkubace bylo k reakční směsi přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku askorbátu sodného (100 mg/ml). Radioaktivně značený produkt byl následně analyzován pomocí HPLC dle parametrů:

Kolona: C18 VYDAC 218 MS54; Aeris PEPTIDE 3.6 $\mu$ m XB-C18

Mobilní fáze: 0.04% TFA ve vodě (A), 0.04% TFA v Ac-N(B)

Eluce: Gradient, 95/5 (A/B) 0 min, 50/50 (A/B) 20 min, 30/70 (A/B) 21 min s koncovou výdrží 4 minuty

Průtok: 1,0 mL/min, vlnová délka: 280 nm

Experimenty byly prováděny ve spolupráci se společností RadioMedic s. r. o.

### **3.2.1.7. Radioaktivní značení konjugátů BBN-NCS-DOTAPO radionuklidem $^{68}\text{Ga}$**

Lyofilizát konjugátu (1 mg) BBN-NCS-DOTAPO byl rozpuštěn v 500  $\mu$ l 3 M NaOAc pufru pH 4,0 a smíchán s 500  $\mu$ l eluátu  $^{68}\text{Ga}$  z  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoru (Eckert & Ziegler Radiopharma GmbH, Německo) v roztoku 0,1 M HCl o aktivitě 100 MBq. Následně bylo změřeno pH roztoku, jehož hodnota byla v rozmezí 3,8-4,0. Reakční směs byla inkubována po dobu 10 min při 95 - 100 °C. Radioaktivně značený produkt byl následně analyzován pomocí HPLC dle parametrů:

Kolona: Aeris PEPTIDE 3.6 $\mu$ m XB-C18

Mobilní fáze: 0.04% TFA ve vodě (A), 0.04% TFA v Ac-N(B)

Eluce: Gradient, 95/5 (A/B) 0 min, 50/50 (A/B) 20 min, 30/70 (A/B) 21 min s koncovou výdrží 4 minuty

Průtok: 1,5 mL/min, vlnová délka: 280 nm

Experimenty byly prováděny ve spolupráci se společností RadioMedic s. r. o.

### 3.2.2. Stabilita radioaktivně značených imunokonjugátů

Imunokonjugáty IgG-M75-NCS-PHS značené  $^{61}\text{Cu}$  a  $^{64}\text{Cu}$  (v obou případech 200 MBq) byly inkubovány v 0,1 M PBS pufru pH 7,4 při 25 °C. Alikvotní podíly byly odebrány v časových intervalech 0, 1, 2, 3, 6, 12 a 24 hodin a podrobeny současně testu radiochemické čistoty pomocí SEC HPLC a odsolovacích kolonek PD-10 (GE Healthcare, UK). Ve druhém případě byly odebrány frakce 20  $\mu\text{l}$  a jejich aktivity byly měřeny na Wallac WIZARD Automatic Gamma Counter s 2 detektory (Perkin-Elmer, USA).

Imunokonjugát IgG-M75-NCS-PHS značený radionuklidem  $^{64}\text{Cu}$  byl inkubován v lidském séru při 37 °C po dobu 1, 2, 6, 12 a 24 hodin. Do 1 ml lidského séra stabilizovaného 5  $\mu\text{l}$  10%  $\text{NaN}_3$  bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  radioimunokonjugátu (přibližně 30 MBq). Jako blank bylo použito 100  $\mu\text{l}$  radioimunokonjugátu (asi 30 MBq) do 1 ml 0,2 M MES pufru, pH 5,5. Alikvoty (5  $\mu\text{l}$ ) byly odebrány z obou roztoků a analyzovány na SG-ITLC s mobilní fází octan amonný: methanol (1:1).

### 3.2.3. ELISA a RIA analýza značených imunokonjugátů

Koncentrace imunokonjugátů byly stanoveny metodou popsanou dle Bradford (143) modifikovanou pro mikrotitrační destičku s Bradfordovým proteinovým testem (Bio-Rad Laboratories, USA). Výpočet koncentrace proteinu byl založen na kalibrační křivce získané při 595 nm. Kalibrační křivka byla měřena pro každý smíšený zásobní roztok. Kalibrační křivka byla stanovena v koncentračním rozmezí 0-64  $\mu\text{g}/\text{ml}$  s 10 kalibračními body proti slepému vzorku. Absorbance byla měřena na snímači mikrodestiček Sunrise (TECAN, Švýcarsko). Nepřímé ELISA bylo provedeno na 96-jamkové destičce (PolysorbNuc) (146,147). Destička byla pětkrát promyta 1M roztokem fosfátového pufru. Pak bylo do každé jamky přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku 2 ng/ $\mu\text{l}$  antigenu karbonáthydázy [IX] a destička byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě. Následně byla destička byla pětkrát promyta PBS a do jamek (vždy 50  $\mu\text{l}$ ) byly přidány vzorky: kalibrační vzorky (nemodifikovaný IgG M75 o koncentracích v rozmezí od 1,0 do 0,001953  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), radioaktivně značený imunokonjugát IgG-M75-NCS-PHS-Cu-64,61, pozitivní kontrola (nemodifikovaný IgG M75) a negativní kontrola (1% bovinní sérový albumin v PBS). Všechny reakce byly prováděny trojmo. Každá destička byla inkubována po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Potom byla deska promyta pětkrát PBS a do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zředěné sekundární protilátky RAM/hPx (Sigma Aldrich, USA) a deska byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Destička byla pětkrát promyta PBS a do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  barevného roztoku (složení: 5 ml 0,01 M citrátového pufru, pH 6,5; 2 mg

*o*-fenylendiaminidichloridu a 7  $\mu$ l 30% peroxidu vodíku). Destička byla inkubována 10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 100  $\mu$ l 1M kyseliny sírové. Koncentrace primární protilátky byla stanovena z absorbance měřené při vlnové délce 495 nm na snímači mikrodestiček Sunrise (TECAN, Švýcarsko). Pro experiment RIA byly mikrotitrační pásy Polysorb promyty třikrát PBS. Do každé jamky byl přidán roztok antigenu P997 (100  $\mu$ l, 2 ng/ $\mu$ l) a inkubován 1 hodinu při 25 °C. Poté byla jamka třikrát promyta PBS. Blokovací roztok byl (200  $\mu$ l 1% BSA v PBS) byl pipetován do jamky a inkubován po dobu 1 hodiny při 25 °C. Jamka byla potom třikrát promyta PBS. Nakonec bylo přidáno 50  $\mu$ l radioaktivně značeného IgG-M75-NCS-PHS-Cu-64,61 (62,5 ng/ml) a destička byla inkubována 2 hodiny při 37 °C. Aktivita přidaná do jamky byla měřena na detektoru NaI (TI) NS 9502 E (Empos, Česká republika). Jamka byla potom třikrát promyta PBS a zbývající aktivita byla měřena na stejném přístroji.

### **3.3. In vitro experimenty**

#### **3.3.1. In vitro testování značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64**

##### **Buněčné kultury**

Pro experimenty byly použity buněčné linie lidského kolorektálního adenokarcinomu HT-29 (Sigma Aldrich, USA) a myší adherentní fibroblasty NIH/3T3 (ATCC, USA). Všechna kultivační média, antibiotika a pufry pro buněčné kultury (PAA, Austria). Buňky byly pasážovány v médiu RPMI 1640 s 10 % fetálním bovinním sérem a Penstrep (penicilin 100 UI/ml, streptomycin 100  $\mu$ g/ml). Buňky byly uloženy v inkubátoru při 37 °C a atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

##### **In vitro uptake assays**

Uptake IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 byl proveden na lidských kolorektálních adenokarcinomech (HT-29), které byly pozitivní na přítomnost karbanické ahydrázy IX, jako negativní kontrola byly použity buněčné linie NIH/3T3. Postup experimentu byl proveden dle (148). HT-29 a NIH/3T3 byly pipetovány do 6-well mističek (300 000 buněk/well) a inkubovány při 37 °C 24 hod. Poté bylo odstraněno médium a buňky byly promyty 3-krát roztokem Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 (6,74 nM, 50 kBq) v médiu RPMI-1640 bylo pipetováno do destiček s buňkami. Destičky byly inkubovány při 37 °C 1, 12 a 24 hod. Po časových intervalech bylo odstraněno médium z destiček a buňky byly promyty 5-krát pomocí

HBSS a následně byly buňky trypsinizovány přidáním 0,5 ml roztoku trypsinu a bylo přidáno 0,5 ml HBSS. Buňky v roztoku byly pipetovány do vialek, u kterých byla proměřena aktivita na  $\gamma$ -counteru Wallac WIZARD Automatic Gamma Counter (Perkin-Elmer, USA). Experiment byl prováděn v oktapletu a data byla vyjádřena jako procenta z celkového přídatku (149).

### **In vitro saturační experimenty**

Saturační experimenty byly provedeny pro zjištění disociační konstanty ( $K_d$ ) a maximální receptorové saturace imunokonjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 ( $B_{max}$ ). Buňky HT-29 byly pipetovány do 6-well místiček (500 000 buněk/well) a inkubovány při 37 °C 24 hod s 1 ml média, jako v předchozím experimentu. Následně bylo médium odstraněno a buňky byly promyty 3-krát roztokem HBSS. Poté byly buňky 4 hod inkubovány s 500  $\mu$ l značené IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 s jeho zvyšující se koncentrací 1 – 200 nmol/l. Roztok média a zbytku konjugátu odstraněn a byly promyty 3-krát pomocí HBSS a následně byly buňky trypsinizovány přidáním 0,5 ml roztoku trypsinu a bylo přidáno 0,5 ml HBSS. Buňky v roztoku byly pipetovány do vialek, u kterých byla proměřena aktivita na  $\gamma$ -counteru. Pro zjištění nespecifické vazby konjugátu byl proveden identický experiment ovšem s přidáním 200-násobného přebytku nativní IgG M75 před přidáním značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 (150).

### **3.3.2. In vitro testování značeného konjugátu hR3-NCS-DOTA-Cu-64**

#### **Buněčné kultury**

Buněčné kultury A431 byly kultivovány v médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Aldrich, USA) s přídatkem 10 % fetálního bovinního séra a 5 % neesenciálních aminokyselin v 37 °C a atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

#### **In vitro uptake assays**

Pro uptake experiment s konjugátem hR-3-NCS-DOTA-Cu-64 bylo do 12-well misek pipetováno 200 000 buněk A431 a inkubace 24 h. Poté byly buňky propláchnuty 2-krát pomocí HBSS a k buňkám byl přidán značený konjugát hR-3-NCS-DOTA-Cu-64 o koncentracích 0 – 200 nmol/l. hR-3-NCS-DOTA-Cu-64 o specifické aktivitě 200 MBq/mg byl přidáván buňkám A431, pro každou koncentraci byly provedeny kontrolní inkubace s přídatkem 100-násobku nativního neznačeného h-R3. Buňky byly ponechány 4 h při 37 °C. Po inkubaci byly všechny buňky promyty 3-krát roztokem HBSS a následně byly

lyzovány 0,5 ml 0,5 M NaOH s přidavkem 5 % SSD a všechny vzorky byly proměřeny pomocí  $\gamma$ -counteru. Experiment byl prováděn v tripletní soustavě.

### **3.3.3. In vitro testování značeného konjugátu BBN-NCS-DOTA-Cu-64**

#### **Buněčné kultury**

Buněčné kultury PC-3 byly kultivovány v médiu HAM F12 s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra a 5 % neesenciálních aminokyselin, buněčné kultury NIH/3T3 byly kultivovány v médiu DMEM s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra a 5 % neesenciálních aminokyselin. Buněčné kultury byly inkubovány v 37 °C a atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

#### **In vitro uptake assays**

Uptake experimenty s konjugátem BBN-NCS-DOTA-Cu-64 bylo do 6-well misek pipetováno 500 000 buněk PC-3 (pozitivní na GRP receptory) a jako negativní kontrolu NIH/3T3, i n k u b a c e 2 4 h. Poté byly buňky propláchnuty 2-krát pomocí HBSS a k buňkám byl přidán značený konjugát BBN-NCS-DOTA-Cu-64 (10 MBq/ $\mu$ g) o koncentracích 0,01 – 1000 nmol/l. Pro každou koncentraci byly provedeny kontrolní inkubace s přidavkem 40  $\mu$ g nativního neznačeného BBN. Buňky byly ponechány 3 h při 37 °C. Po inkubaci byly všechny buňky promyty 3-krát roztokem HBSS a následně byly lyzovány 0,5 ml 0,5 M NaOH s přidavkem 5 % SSD a všechny vzorky byly proměřeny pomocí  $\gamma$ -counteru. Experiment byl prováděn v tripletní soustavě.

### **3.4. In vivo experimenty a zobrazování**

#### **3.4.1. In vivo experimenty a zobrazování značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64**

##### **Biodistribuční studie**

Biodistribuční studie byly provedeny na 4 až 6 týdnů starých samčích athymických myších (Nude Foxn1NU, VELAZ ČR) s nebo bez subkutánně implantovaného lidského kolorektálního karcinomu (HT-29). U zdravých myší byla provedena biodistribuce <sup>61</sup>CuCl<sub>2</sub>, <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> a chelátoru NH<sub>2</sub>-PHS-Cu-61 a NH<sub>2</sub>-PHS-Cu-64. Myši s nádorem byly použity pro biodistribuci imunokonjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-61 a IgG M75-NCS-PHS-Cu-64. Pro inokulaci nádorových buněk byly myši anestetizovány chloroformem a buňky HT-29 (1 x 10<sup>6</sup>) byly subkutánně inokulovány do pravého boku. Nádory byly ponechány růst po

dobu 14 dnů, dosahovaly přibližné velikosti 2 až 3 mm<sup>3</sup>. Myši byly injikovány intravenózně 50 µl roztoku studovaných sloučenin. Aktivita na injekci činila přibližně 250 kBq. Myši byly pod anestézií eutanazovány cervikální dislokací. Údaje o biodistribuci byly získány v těchto časových bodech: 10 minut, 1 a 3 hodiny pro <sup>61</sup>CuCl<sub>2</sub>; 1, 4, 24, 48 h pro <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub>; 10 minut, 1 a 3 hodiny pro NH<sub>2</sub>-PHS-Cu-61; 1, 4, 24, 48 h pro NH<sub>2</sub>-PHS-Cu-64; 1, 3, 6 h pro IgG M75-NCS-PHS-Cu-61 a 18, 24, 48 h pro IgG M75-NCS-PHS-Cu-64. Resekovaná tkáň byla zvážena a aktivita byla měřena v γ-counteru vybaveném detektorem NaI (Tl) NS 9502 E. Výsledky byly vyjádřeny v procentech aplikované aktivity na gram tkáně (%ID/g) a představovaly průměr ±SD n=5 myší v časovém bodě. Celková aplikovaná aktivita na myš byla stanovena ze známého alikvotního podílu aplikovaného roztoku.

### **Zobrazování na µPET/CT kameře**

Myší modely byly připravovány ve zvěřinci Centra experimentálních biomodelů na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Do experimentu byly použity myši samci 3 týdny staří, athemické, holé. Subkutánně bylo inokulováno 1 × 10<sup>5</sup> buněk HT-29. Po třech týdnech došlo k nárůstu nádoru na 2 mm<sup>3</sup>. Při experimentu byly myši anestetizovány 1,5 % isofluranu. Myším bylo intravenózně aplikováno 20 MBq značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 (310 ng). Myši byly postupně snímány na uPET/CT Albira Si (Bruker Biospin, Ettlingen, SRN) v Centru pokročilého preklinického zobrazování 1. LF UK v časových intervalech 2, 4, 5, 6, 15 a 18 hodin po aplikaci (151).

### **3.4.2. In vivo experimenty a zobrazování značeného konjugátu hR3-NCS-DOTA-Lu-177**

#### **Biodistribuční studie**

Pro experiment byly použity imunodeficientní myši s nádorem BALB/c Nude Mice CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl, samci, stáří 6 týdnů (xenograft nude mouse), subkutánně byla aplikovaná lidská nádorová linie A431 (100 µl, 2x10<sup>6</sup> buněk/myš). Aplikovaná aktivita byla cca 15 MBq/myš (rozsah 8 – 20 MBq). Měření v 6 šesti časových intervalech 1, 4, 24, 48 a 96 hod od aplikace. Aktivita byla měřena v jednotlivých orgánech a přepočtena na 1 g orgánu/tkáň. Data byla naměřena v Centru pokročilého preklinického zobrazování (1. LF UK, Praha).

### **Zobrazování na $\mu$ SPECT/CT kameře**

Myší modely z biodistribuční studie byly zobrazovány na  $\mu$ SPECT/CT Albira Si (Bruker Biospin, Ettlingen, SRN), SPECT: FOV 80 mm, collimator multi-pinhole, 60 projekcí, délka trvání 45min, CT: HDHV - intenzity/dose 400  $\mu$ A, voltage 45kV, délka trvání 27min. Byly provedeny akvizice v časech 1, 4, 24, 48 a 96 hod od aplikace u dvou myší.

### **3.4.3. In vivo zobrazování značeného konjugátu BBN-NCS- DOTA-Cu-64**

#### **Zobrazování na $\mu$ PET/CT kameře**

Myší modely z biodistribuční studie byly zobrazovány na  $\mu$ PET/CT Albira Si (Bruker Biospin, Ettlingen, SRN), opakovaný náběr dat, 5 x 300 s, prodleva 1 s, délka trvání 25 min. CT: HDHV - intenzity/dose 400  $\mu$ A, voltage 45kV, délka trvání 27 min. Byly použity myší modely BALB/c Nude Mice CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl, samci, stáří 6 týdnů. Použitá nádorová linie byla PC3, aplikace v matrigelu Sigma (USA) (100  $\mu$ l,  $1 \times 10^7$  buněk/myš). Aplikace radiofarmaka v injekčním roztoku připraveného BBN-NCS-DOTA-Cu-64, který byl naředen a intravenosně aplikován do ocasní žíly laboratorních myší. Aplikovaný objem byl cca 100  $\mu$ l/myš, aplikovaná aktivita cca 10 MBq/myš (rozsah 8 – 12,5 MBq). Intervaly snímání se pohybovaly od 10 min, 1 hod. 2 hod. až po 4hod od aplikace.

Data byla naměřena ve spolupráci s Centrem pokročilého preklinického zobrazování (1. LF UK, Praha).

### **3.5. Statistická analýza**

Získaná data byla vyjádřena jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Data *in vitro* testování byla analyzována jednofaktrovou analýzou rozptylu (ANOVA). K analýze byl využit software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, USA).



## 4. Cíle práce

- A) Příprava a separace nekonvenčních radionuklidů  $^{61,64}\text{Cu}$  vhodných pro zobrazování PET.
- B) Příprava fragmentu protilátky IgG M75 (scFv M75-hFc) pomocí metod genetického inženýrství.
- C) Konjugace protilátky IgG M75 s nekomerčním chelátorem PHS.
- D) Konjugace fragmentu protilátky scFv M75-hFc s nekomerčním chelátorem PHS.
- E) Konjugace protilátky hR3 s nekomerčním chelátorem PHS s chelátory DOTA a DOTAPO.
- F) Konjugace peptidu Pro-1-Tyr-4-Bombesinu s chelátory DOTA a DOTAPO.
- G) Optimalizace značení jednotlivých chelátorů různými typy radionuklidů:
  - a.  $^{64}\text{Cu}$ : IgG M75-PHS; scFv M75-hFc-PHS; hR3-DOTAPO; hR3-DOTA; BBN-DOTA; BBN-DOTAPO
  - b.  $^{61}\text{Cu}$ : IgG M75-PHS; scFv M75-hFc-PHS
  - c.  $^{68}\text{Ga}$ : BBN-DOTAPO
  - d.  $^{177}\text{Lu}$ : hR3-DOTA
- H) Testování stability značených konjugátů v pufru a lidském séru.
- I) Stanovení *in vitro* vaznosti značených protilátek a peptidů na příslušných buněčných liniích.
- J) *In vivo* distribuční experimenty a zobrazování na  $\mu\text{SPECT}/\mu\text{PET}$  kamerách s vybranými značenými konjugáty na vhodných myších modelech:
  - a. IgG M75-PHS-Cu-64
  - b. hR3-DOTA-Cu-64
  - c. hR3-DOTA-Lu-177
  - d. BBN-DOTA-Cu-64

## 5. Výsledky

### 5.1. Gama spektra ozařovaných terčů

Radionuklidové složení ozařovaných terčů bylo odvozeno z hodnocených gama spektrálních spekter. Rozpuštěný ozařovaný  $^{nat}\text{Ni}$  terč obsahoval 93,5 %  $^{61}\text{Cu}$ , 4,8 %  $^{65}\text{Ni}$  ( $t_{1/2}$  2,5172 h), 1,5 %  $^{64}\text{Cu}$  a <0,1 %  $^{56}\text{Co}$  ( $t_{1/2}$  77,233 d) a  $^{58}\text{Co}$  ( $t_{1/2}$  70,86 d) konec ozařování (EOB). Separační proces nemohl odstranit  $^{64}\text{Cu}$ , nicméně snížil obsah  $^{65}\text{Ni}$ ,  $^{56}\text{Co}$  a  $^{58}\text{Co}$  pod detekční limit (<0,005 % celkové aktivity v konci ozařování).

Podobná situace byla pozorována u  $^{64}\text{Cu}$ , zatímco separace účinně odstranila radionuklidové nečistoty, které nejsou izotopové s  $^{64}\text{Cu}$  ( $^{55}\text{Co}$ ,  $^{61}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Ni}$ ), oddělený produkt stále obsahoval určité množství  $^{61}\text{Cu}$  (<3,0 % celkové aktivity na EOB). Poměr poločasů  $^{64}\text{Cu}$  a  $^{61}\text{Cu}$  je však příznivá a radionuklidová čistota produktu se časem zlepšuje.

Specifická aktivita odvozená z aktivity vyrobeného  $^{61}\text{Cu}$  a  $^{64}\text{Cu}$  v době značení a od maximálního obsahu  $^{nat}\text{Cu}$  odhadnutého z cílové a použité chemické čistoty a později stanovená měřeními ICP-MS přesáhla vždy 1 GBq/ $\mu\text{g}$ .

### 5.2. MS a NMR charakterizace $\text{NH}_2$ -derivátu chelátoru PHS

Elementární analýza:  $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_4\text{P}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $M_r = 520,5$ : C 46.52 (46.15), H 8.82 (8.52), N 13.43 (13.45), P 12.18 (11.90)

ESI-MS: (-): 474.3 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ , calc. 474.5)

$^1\text{H}$  NMR (600.2 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 7.5):  $\delta = 1.94\text{--}2.82$  (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.86 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.99–3.58 (br, 20H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NCH}_2\text{PO}_2\text{H}$ ), 4.28 (dd, 2H,  $\text{NCH}_2$  arom.), 6.47 (d, 1H,  $\text{NCH}_2\text{PO}_2\text{H}$ ,  $1\text{JPH} = 511.9$  Hz), 6.89 (d, 2H, arom.,  $3\text{JHH} = 8.4$  Hz), 7.31 (d, 2H, arom.,  $3\text{JHH} = 8.4$  Hz), 7.32 (d, 1H,  $\text{NCH}_2\text{PO}_2\text{H}$ ,  $1\text{JPH} = 511.9$  Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (150.9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 7.5):  $\delta = 22.8, 22.9$  (s, each 1C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 41.8, 42.4 (s, each 1C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 47.5 (d, 1C,  $\text{NCH}_2\text{PO}_2\text{H}$ ,  $1\text{JCP} = 42$  Hz); 47.8 (s, 1C,  $\text{NCH}_3$ ); 50.5 (d, 1C,  $\text{NCH}_2\text{PO}_2\text{H}$ ,  $1\text{JCP} = 42$  Hz); 52.3, 53.5, (s, each 1C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 54.2, 54.6, 55.9, 56.6 (s, each 1C,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 57.0 (s, 1C,  $\text{NCH}_2$  arom.); 117.1 (s, 2C, arom.); 118.5 (s, 2C, arom.); 133.9 (s, 1C, arom.); 148.9 (s, 1C, arom.).

$^{31}\text{P}$  NMR (121.4 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 7.5):  $\delta = 22.4$  (dt,  $1\text{JPH} = 552$  Hz); 26.6 (dt,  $1\text{JPH} = 552$  Hz)

### 5.3. MS a NMR charakterizace NHS-derivátu chelátoru PHS

ESI-MS (-): 517.3 ( $[M-H]^-$ , calcd 517.2).

ESI-MS (+): 519.5 ( $[M+H]^+$ , calcd 519.2).

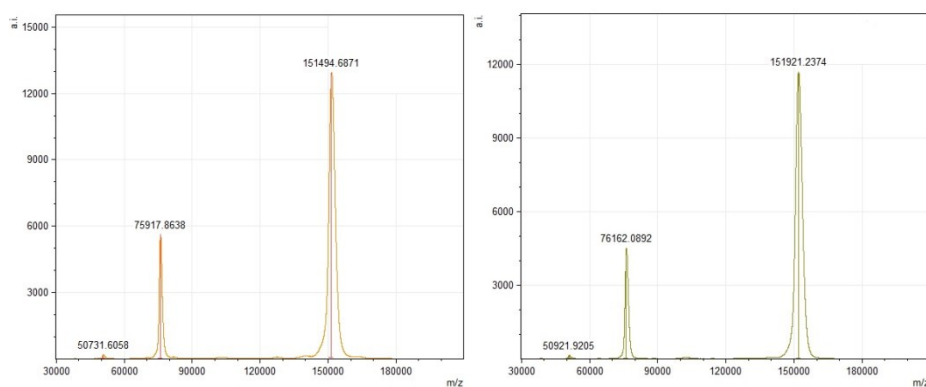
$^1H$  NMR (600.2 MHz, DMSO):  $\delta$  = 1.92–2.24 (m, 4H,  $CH_2CH_2CH_2$ ), 2.76 (s, 3H,  $NCH_3$ ), 2.80–3.65 (br, 16H,  $NCH_2CH_2N$ ,  $CH_2CH_2CH_2$ ,  $NCH_2PO_2H$ ), 4.28 (dd, 2H,  $NCH_2$  arom.), 6.71 (d, 1H,  $NCH_2PO_2H$ ,  $1J_{PH}$  = 546.1 Hz), 7.49 (d, 2H, arom.,  $3J_{HH}$  = 6.0 Hz), 7.62 (d, 1H,  $NCH_2PO_2H$ ,  $1J_{PH}$  = 546.1 Hz) 7.72 (d, 2H, arom.,  $3J_{HH}$  = 12.0 Hz).

$^{13}C\{^1H\}$  NMR (150.9 MHz, DMSO):  $\delta$  = 20.3, 20.6 (s, each 1C,  $CH_2CH_2CH_2$ ); 40.6 (s, 1C,  $NCH_3$ ); 48.0–52.3 (br, each 1C,  $CH_2CH_2CH_2$ ,  $CH_2CH_2CH_2$ ,  $NCH_2CH_2N$ ),  $NCH_2PO_2H$ ); 55.4 (s, 1C,  $NCH_2$  arom.); 126.2 (s, 2C, arom.); 129.3 (s, 1C, arom.); 131.0 (s, 1C, arom.); 133.1 (s, 2C, arom.); 134.3 (s, 1C, arom. NCS).

$^{31}P$  NMR (121.4 MHz,  $D_2O$ , pD = 1.4):  $\delta$  = 21.7 (dd,  $1J_{PH}$  = 510 Hz); 25.9 (dd,  $1J_{PH}$  = 510 Hz).

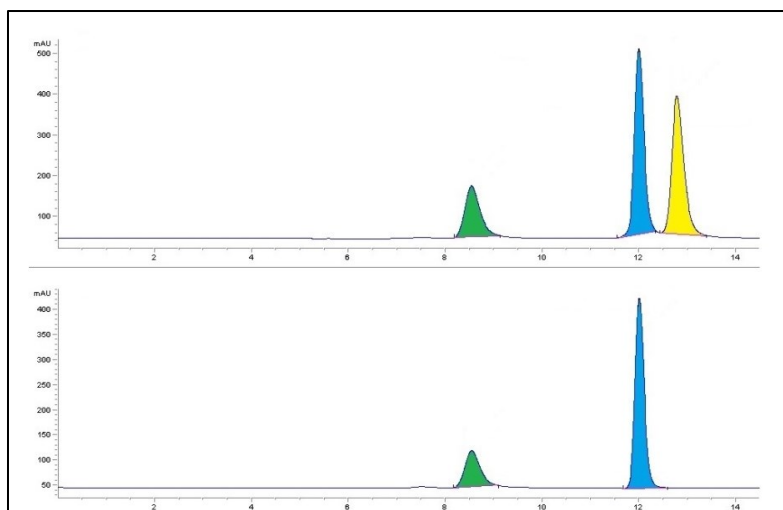
## 5.4. Konjugace a značení IgG M75-NCS-PHS radionuklidem Cu-64 a Cu-61

Chelátor PHS-NH<sub>2</sub> byl úspěšně derivován na PNS-SCN derivát s 80% výtěžkem a byl použit v dalším kroku bez dalšího čištění. Reakce s protilátkou IgG M75 s následným čištěním pomocí SEC vedla ke konjugátu IgG M75-NCS-PHS s čistotou vhodnou pro radioaktivní značení. Průměrný počet chelátorů připojených k jediné molekule IgG M75 byl odhadnut ze spektra MALDI-MS. Ve srovnání s nativní IgG M75 byl vrchol distribuce hmoty v MALDI-MS spektru konjugátu IgG M75-NCS-PHS posunut o 427 Da, což odpovídá asi 0,82 molekul chelátoru na proteinovou molekulu. Ve srovnání s nativním scFv-Fc M75 byl vrchol distribuce hmoty v MALDI-MS spektru konjugátu scFv M75-hFc-NCS-PHS posunut o 892 Da, což odpovídá asi 1,72 molekul chelatorotvorné na molekulu fragmentu (obr. 5.4.1).



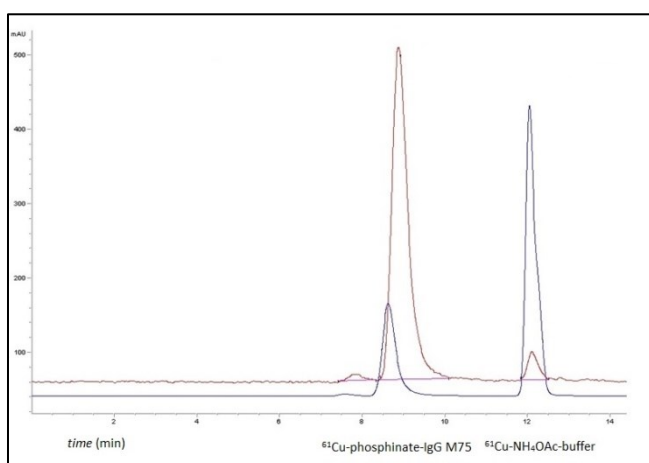
Obrázek 5.4.1 MALDI-MS spektra (vlevo-IgG M75, vpravo-IgG M75-NCS-PHS)

Separovaný konjugát z reakční směsi pomocí kolonky PD-10 účinně odstranil jakékoliv stopy nezreagovaného chelátoru, jak je demonstrováno pomocí SEC-HPLC analýzy konjugátu IgG M75-NCS-PHS před a po čištění (obr. 5.4.2).

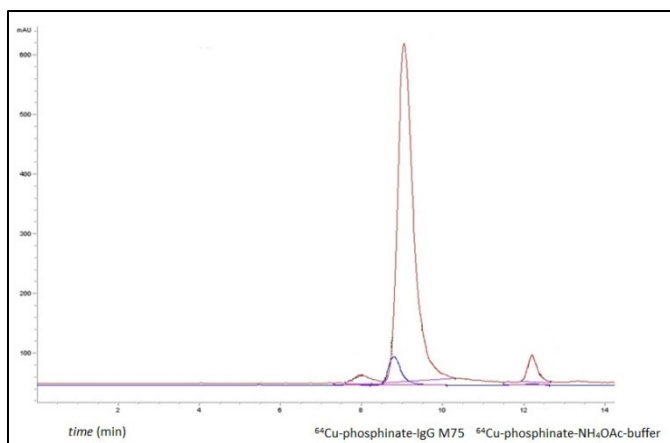


Obrázek 5.4.2 SEC-HPLC konjugátu IgG M75-NCS-PHS před (nahore) a po (dole) purifikaci (zelená – konjugát; modrá – pufr; žlutá – konjugát)

Radioaktivní značení imunokonjugátu s radionuklidy  $^{61}\text{Cu}$  a  $^{64}\text{Cu}$  bylo dosaženo za mírných podmínek vhodných pro biomolekulu (20 min,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Konjugát M75-NCS-PHS- $^{61}\text{Cu}$  byl značen s radiochemickým výtěžkem  $\geq 96\%$  a s  $^{64}\text{Cu}$  s radiochemickým výtěžkem  $\geq 97\%$ . Radiochemická čistota obou značených sloučenin přesáhla  $96\%$ . Radiokromatogramy a UV/VIS chromatogramy značených konjugátů naměřených současně jsou zobrazeny na obr. 5.4.3 a 5.4.4. Specifické aktivity M75-NCS-PHS- $^{61}\text{Cu}$  a M75-NCS-PHS- $^{64}\text{Cu}$  byly  $0,7$  a  $0,1\text{ MBq}/\mu\text{g}$ .



Obrázek 5.4.3 SEC-HPLC konjugátu M75-NCS-PHS- $^{61}\text{Cu}$  před (nahore) a po (dole) purifikaci (červená – radiodetekce; modrá – UV detekce 280 nm)



Obrázek 5.4.4 SEC-HPLC konjugátu M75-NCS-PHS-64-Cu před (nahore) a po (dole) purifikaci (červená – radiodetekce; modrá – UV detekce 280 nm)

## 5.5. Konjugace a značení protilátky Nimotuzumab s chelátory NCS-DOTA a NCS-DOTAPO a jejich značení radionuklidu Cu-64 a Lu-177

Konjugace chelátorů NCS-DOTA a NCS-DOTAPO s protilátkou hR3 a následným čištěním pomocí SEC vedla ke konjugátům hR3-NCS-DOTA a hR3-NCS-DOTAPO s čistotou vhodnou pro radioaktivní značení. Průměrný počet chelátorů připojených k jediné molekule hR3 byl stanoven z přepočtů radiochemických výtěžků. Radiochemická čistota byla u obou značených konjugátů větší než 95 %. Přehled reakčních podmínek a porovnání imunoreaktivit a počet molekul ligandu na molekulu protilátky jednotlivých konjugátů je uveden v tabulce 5.5.1.

Tabulka 5.5.1: Srovnání výsledků značení a imunoreaktivity přípravků hR3-NCS-DOTA-Cu-64 a hR3-NCS-DOTAPO-Cu-64

reakční čas [h]	teplota reakce [°C]	pH	hR3-NCS-DOTA		hR3-NCS-DOTAPO	
			imunoreaktivita [%]	počet navázaných molekul ligandu na molekulu protilátku	imunoreaktivita [%]	počet navázaných molekul ligandu na molekulu protilátku
2	20,5	8,56	36	2,3	40	2,3
10	20,5	8,57	18	7,6	30	7,9
2	20,5	8,55	44	2,6	60	1,8
2	37	8,56	26	8,3	41	6,9
1	37	8,54	36	3,9	56	3,9

Z výsledků je patrná dostatečná radiochemická čistota pro oba ligandy při všech sledovaných reakčních parametrech. Imunoreaktivita přípravku klesá dle očekávání s rostoucí teplotou a časem reakce. Přípravek konjugovaný s ligandem DOTAPO vykazuje ve všech sledovaných případech vyšší imunoreaktivitu než přípravek konjugovaný s ligandem *p*-SCN-*Bn*-DOTA při stejných reakčních podmínkách.

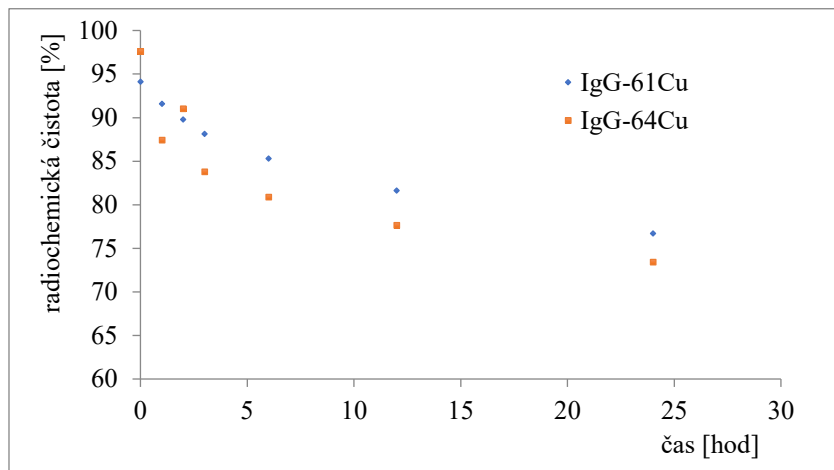
### 5.6. Konjugace Pro-1-Tyr-4-Bombesinu s chelátorem NCS-DOTA a NCS-DOTAPO a jejich značení radionuklidem $^{64}\text{Cu}$ a $^{68}\text{Ga}$

V rámci dalších experimentů byly připraveny nové konjugáty peptidu [Pro<sup>1</sup>, Tyr<sup>4</sup>]Bombesinu s makrocikly DOTAPO, DOTA. Konjugační směsi byly následně purifikovány pomocí semipreparativní-HPLC s vysokým výtěžkem vyšším než 75 %. Podle výsledků značení se ukázalo, že oba konjugáty byly značeny radionuklidem  $^{68}\text{Ga}$  s radiochemickou čistotou větší než 85 %. Pro značení konjugátu BBN-NCS-DOTA byla stanovena radiochemická čistota na hodnotu 89 %.

### 5.7. Stabilita radioaktivně značených imunokonjugátů

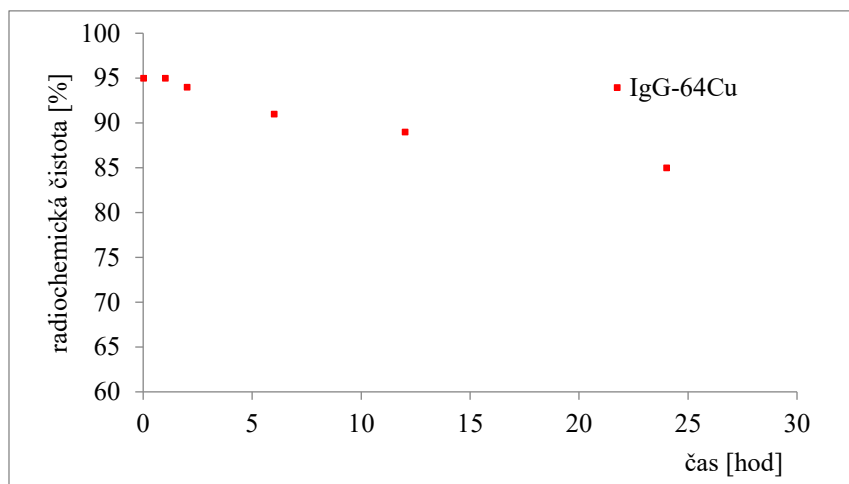
Byla testována stabilita konjugátů M75-NCS-PHS-61-Cu a M75-NCS-PHS-64-Cu ohledně potenciální uvolňování radiokovu nebo hydrolyzy SCN můstku. Konjugáty byly

inkubovány v 0,1 M PBS při 25 °C a obsah nízkomolekulárních nečistot byl sledován pomocí SEC-HPLC analýzy v pravidelných intervalech až do 24 hodin. Podíl aktivity zjištěný v oblasti SEC s nízkou molekulovou hmotností se postupně zvyšoval z 5,9 % ( $^{61}\text{Cu}$ ) a 2,4 % ( $^{64}\text{Cu}$ ) při 0 hodinách na 23,3 % ( $^{61}\text{Cu}$ ) a 26,6 % ( $^{64}\text{Cu}$ ) po 24 hodinách obr. 5.7.1.



Obrázek 5.7.1 Stabilita značených imunokonjugátů v pufru

Stabilita radioimunokonjugátu M75-NCS-PHS-64-Cu byla testována také v lidském séru. Radiochemická čistota měřená pomocí SG-ITLC ukázala podobné, ale méně výrazné zvýšení volného radiokovu z původních 5 % při 0 hodině na 15 % po 24 hodinách obr. 5.7.2.



Obrázek 5.7.2 Stabilita značeného M75-NCS-PHS-64-Cu v lidském séru

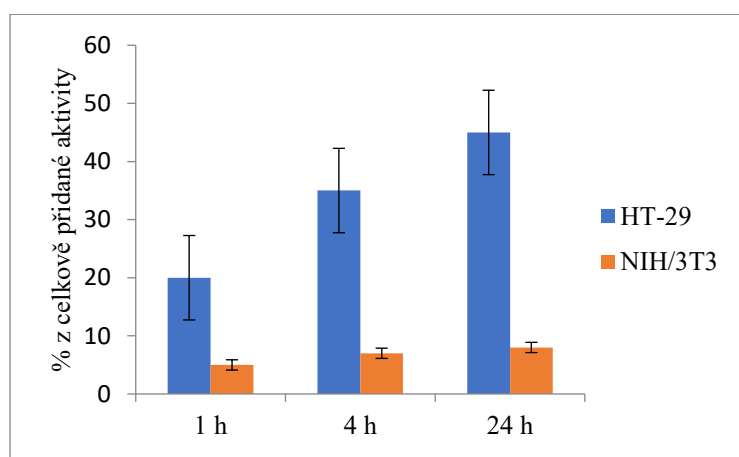


## 5.8. ELISA a RIA analýza značených imunokonjugátů

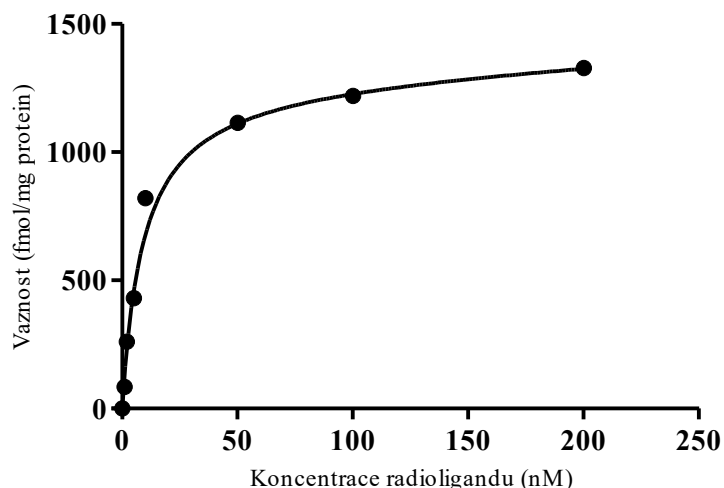
Imunoafinita konjugátu M75-NCS-PHS-61-Cu měřená pomocí ELISA byla 54 %, zatímco metoda RIA poskytla hodnotu 46 % pro stejný konjugát. U značeného konjugátu M75-NCS-PHS-64-Cu ELISA test ukázal imunoafinitu 82 %, ačkoliv metoda RIA poskytla imunoafinitní hodnotu pouze 46 %. Imunoafinita radioaktivně značeného fragmentu scFv-Fc M75 byla snížena na několik procent původní hodnoty. I přes několik variant optimalizace se nepodařilo u konjugátu s tímto fragmentem zvýšit imunoafinitu a proto jsme upustili od dalších experimentů.

## 5.9. In vitro testování značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64

Testování M75-NCS-PHS-64-Cu u dvou typů buněčných linií, HT29 a NIH 3T3, vykazovalo signifikantní rozdíly. 24 hodin dlouhá inkubace s buňkami HT-29 vedla k vaznosti  $45 \pm 2,8$  % celkové aktivity přidaného značeného imunokonjugátu, zatímco vaznost NIH 3T3 buňkami používané jako negativní kontrola byly za stejných podmínek pouze  $7,0 \pm 1,1$  %. Vaznost u obou buněčných linií po dobu 1, 4 a 24 hodin dlouhé inkubace je znázorněna na obr. 4.9.1. Saturační vazebné experimenty poskytly hodnotu  $K_d$  9,2 nM a  $B_{max}$  1 289 fmol/mg proteinu, viz obr. 5.9.1



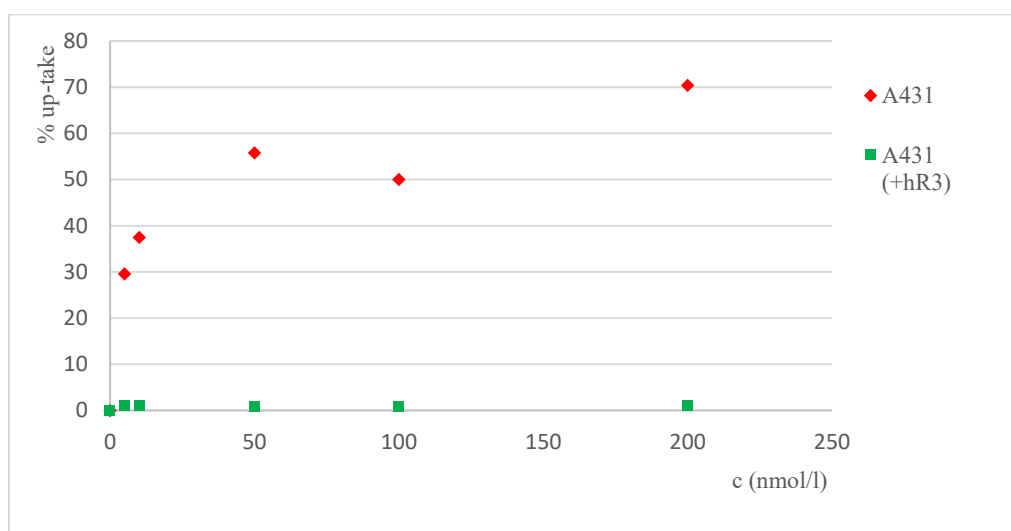
Obrázek 5.9.1 *In vitro* vaznost značeného M75-NCS-PHS-64-Cu (HT-29 – CA IX pozitivní; NIH/3T3 - CA IX negativní)



Obrázek 5.9.2 Graf *in vitro* saturačních vazebných experimentů s M75-NCS-PHS-64-Cu

## 5.10. In vitro testování značeného konjugátu hR3-NCS-DOTA-Cu-64

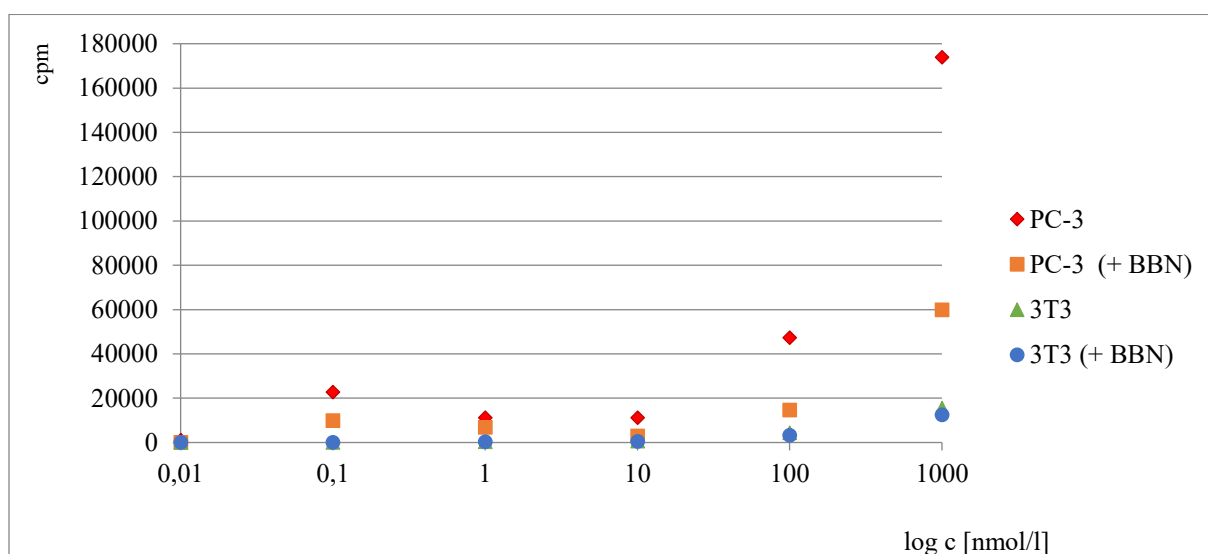
Ze získaných měření bylo patrné, že u buněk A431 došlo k vysokému % nárůstu vychytání značeného konjugátu. Pro potvrzení specifity vazby značeného konjugátu na EGF receptory a zároveň vyloučení EPR efektu byly u kontrolního experimentu nejprve vysycena vazba na EGFR přidavkem nadbytku nativního neznačeného hR3.



Obrázek 5.10.1 Graf *in vitro* up-také značeného hR3-NCS-DOTA-Cu-64 u buněk A431

### 5.11. In vitro testování značeného konjugátu BBN-NCS-DOTA-Cu-64

Ze získaných měření je patrné, že u buněk PC-3 došlo k vysokému % nárůstu vychytání značeného konjugátu. U kontrolních buněk NIH/3T3, které neexprimují GRP receptor došlo k mnohonásobně nižšímu up-taku. Pro potvrzení specifity vazby značeného konjugátu na GRP byly u kontrolního experimentu nejprve vysyceny vazby na GRP receptorech přidavkem nadbytku nativního neznačeného BBN (obr. 5.11.1). Z výsledků vyplývá výrazný pokles vazby značeného BBN na tomto kontrolním typu buněk. Celkově lze predikovat velmi vysokou specifitu takto značeného konjugátu k GRP receptorům.



Obrázek 5.11.1 Graf *in vitro* up-take značeného BBN-NCS-DOTA-Cu-64 u buněk PC-3 a NIH/3T3 (PC-3 – GRP pozitivní; NIH/3T3 – GRP negativní)

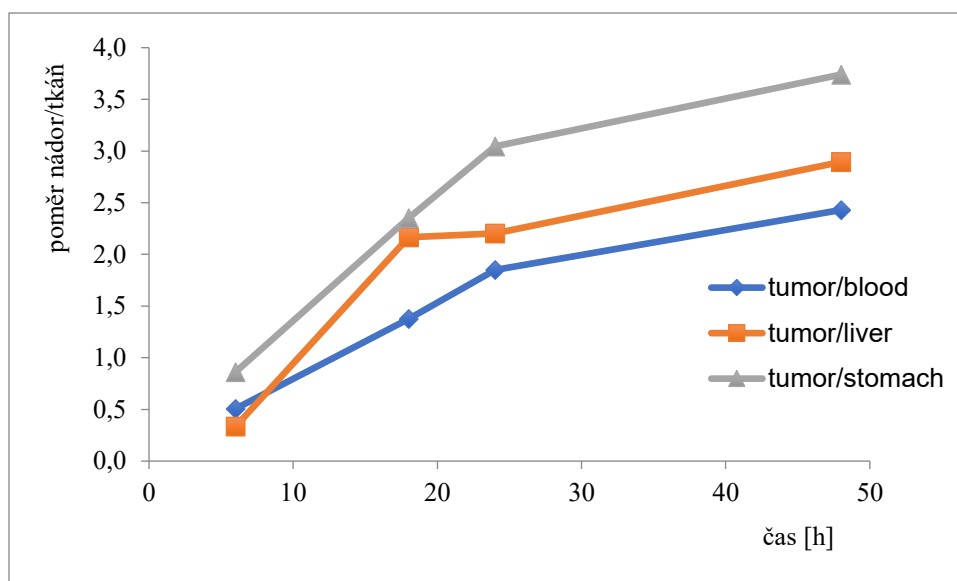
## **5.12. In vivo experimenty a zobrazování**

### **5.12.1. In vivo experimenty a zobrazování značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64, 61**

Biodistribuční studie IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 odhalila nejvyšší nárůst aktivity v nádorové tkáni po 24 hodinách po podání ( $22,6 \pm 2,6$  % ID/g). Nicméně nádor akumuloval  $18,4 \pm 2,0$  % ID/g aktivity už 18 hodin po podání (tab. 5.12.1.1). To naznačuje, že imunoafinita protilátky nebyla značně ovlivněna značením. Aktivita v krvi pomalu poklesla z 13,4 % ID/g za 6 hodin na 8,9 % ID/g po 24 hodinách po podání.

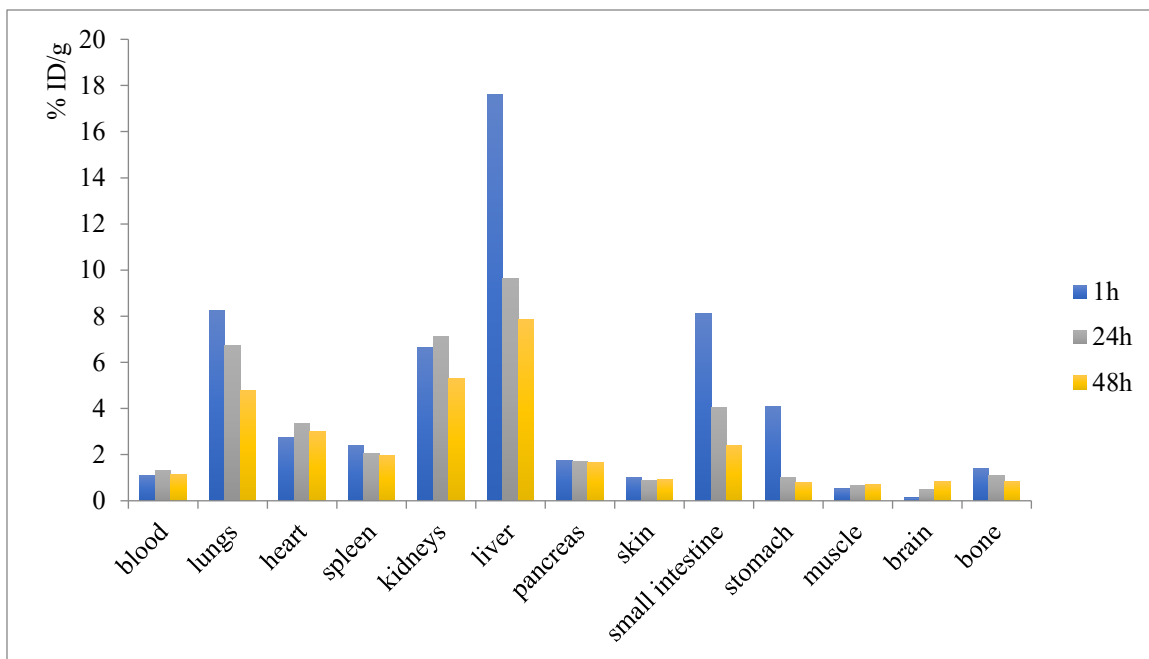
Tabulka 5.12.1.1 Biodistribuční data značených konjugátů IgG M75-NCS-PHS-Cu-61,64

Orgán	Akumulovaná aktivita (% ID/g)			
	6 h	18 h	24 h	48 h
<b>IgG M75-NCS-PHS-Cu-61</b>				
Krev	14,66 ± 0,34	–	–	–
Srdce	4,21 ± 0,75	–	–	–
Plíce	11,53 ± 0,81	–	–	–
Slezina	6,64 ± 0,46	–	–	–
Ledviny	8,22 ± 0,70	–	–	–
Játra	21,91 ± 1,81	–	–	–
Slinivka	2,92 ± 0,74	–	–	–
Žaludek	8,50 ± 0,33	–	–	–
Nádor	7,32 ± 0,74	–	–	–
<b>IgG M75-NCS-PHS-Cu-64</b>				
Krev	13,41 ± 0,49	13,35 ± 1,64	12,25 ± 0,80	8,94 ± 0,71
Srdce	4,85 ± 0,63	1,33 ± 0,21	1,44 ± 0,34	1,31 ± 0,17
Plíce	11,89 ± 0,76	11,31 ± 1,39	8,30 ± 1,00	7,59 ± 0,87
Slezina	7,36 ± 0,42	8,21 ± 0,69	4,59 ± 0,42	2,47 ± 0,39
Ledviny	7,95 ± 0,74	13,11 ± 0,22	6,82 ± 0,95	5,56 ± 0,36
Játra	19,89 ± 1,66	8,49 ± 0,32	10,29 ± 0,85	7,50 ± 0,36
Slinivka	2,70 ± 0,69	1,79 ± 0,19	1,29 ± 0,26	0,36 ± 0,08
Žaludek	8,64 ± 0,40	7,81 ± 0,45	7,44 ± 1,07	5,80 ± 0,39
Nádor	8,05 ± 0,81	18,37 ± 2,01	22,59 ± 2,64	21,71 ± 1,94

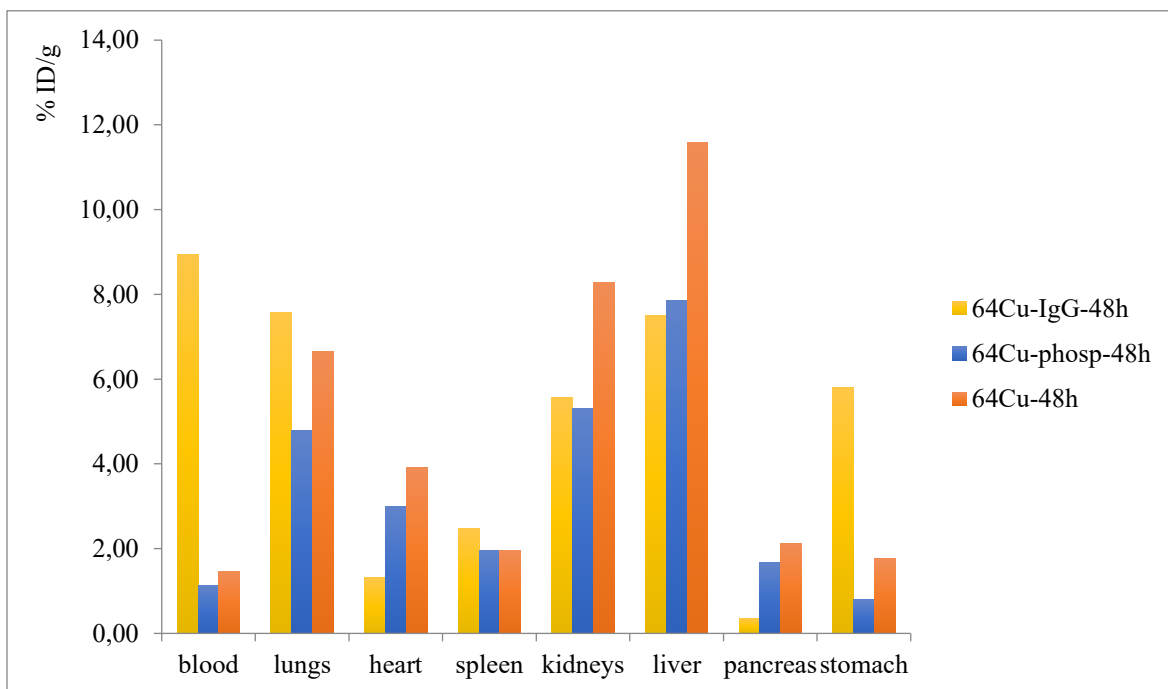


Obrázek 5.12.1.1 Zvýšení poměru nádor/ostatní tkáně u značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 (šedá – nádor/žaludek; oranžová – nádor/játra; modrá – nádor/krev)

Biodistribuční data samotného chelátoru s radioaktivním značením  $^{64}\text{Cu}$  u zdravých myší (obr. 5.12.1.2) ukazují jeho dominantní akumulaci v játrech a v menší míře v plicích, ledvinách, žaludku a tenkém střevě. Po 48 hodinách jsme zaznamenali významné snížení známky akumulace fosfinátu v játrech, plicích, žaludku a tenkém střevě, obsah v jiných orgánech se dramaticky nezměnil s výjimkou stálé akumulace mozku, která byla v každém případě spíše nízká. Při srovnání akumulace konjugátu, radioaktivně značeného chelátoru a volného radionuklidu zjistíme, že je významný rozdíl v obsahu těchto tří chemických forem  $^{64}\text{Cu}$ , zejména v krvi, žaludku a pankreatu po 48 hodinách (tab. 5.12.1.3). Všechny tři formy vykazují vysokou akumulaci v játrech a ledvinách. Je třeba poznamenat, že značený konjugát zůstává v žaludku ještě 48 hodin po podání, na rozdíl od volného radionuklidu a značeného chelátoru. Tento účinek je velmi pravděpodobně způsoben fyziologickou přítomností CA IX receptorů v žaludku. Vysoká absorpce značeného chelátoru jater, ledvin a plic může signalizovat nízkou *in vivo* stabilitu, na druhé straně nelze vyloučit také absorpci chelátoru na bílkovinách v séru, jako je albumin a jeho následného transportu v játrech.



Obrázek 5.12.1.2 Biodistribuce značeného chelátoru NH<sub>2</sub>-PHS-Cu-64 na 4 až 6 týdnů starých samčích athymických myších (Nude Foxn1NU)

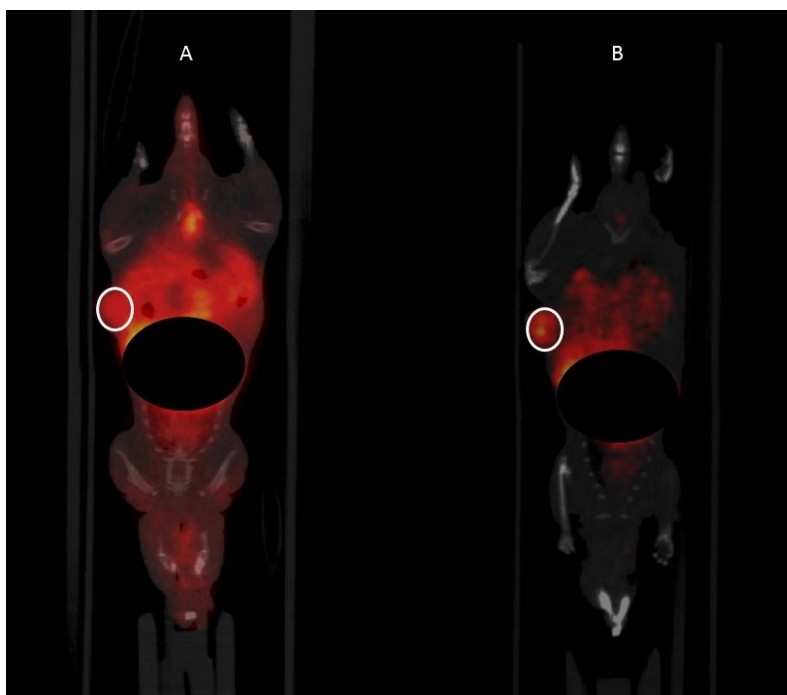


Obrázek 5.12.1.3 Porovnání biodistribuce značeného chelátoru NH<sub>2</sub>-PHS-Cu-64, konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 a <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> po 48 od aplikace na 4 až 6 týdnů starých samčích athymických myších (Nude Foxn1NU)

Poločas rozpadu <sup>61</sup>Cu ( $t_{1/2}$  3,339 hodin) nám neumožnil delší sledování radioaktivně značeného konjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-61. Intervaly pro měření biodistribuce byly

zvoleny podle tohoto omezení. Jak bylo očekáváno, 1 hodinu po podání jsme zaznamenali nejvyšší aktivity v krvi, játrech a plicích. Tento vzorek se ještě nezměnil 6 hodin po podání, výsledky pro myši nesoucí nádor jsou uvedeny v tabulce 4.12.1.1. Akumulace v nádoru po 6 hodinách byla již  $8,05 \pm 0,81$  % u IgG M75-NCS-PHS-Cu-61, což je hodnota blízká hodnotě dosažené pro IgG M75-NCS-PHS-Cu-64  $7,32 \pm 0,74$  %. Jedná se zhruba o třetinu maximální akumulace pozorované u IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 24 hodin po podání. To odpovídá biologickému poločasu IgG-M75, který je v pořadí dnů, nikoliv hodin.

Při porovnání výsledných snímků distribuce imunokonjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 na  $\mu$ PET/CT je patrný nárůst aktivity v nádoru s časovou korelací (obr. 5.12.1.4). Na obrázku jsou porovnány 2 snímky ze zobrazování v čase po 2 a 18 hodinách. Velká část značeného imunokonjugátu byla distribuována v játrech a následně metabolizována a vylučována přes střeva, toto mohlo být způsobeno aplikací relativně vysoké koncentrace imunokonjugátu.

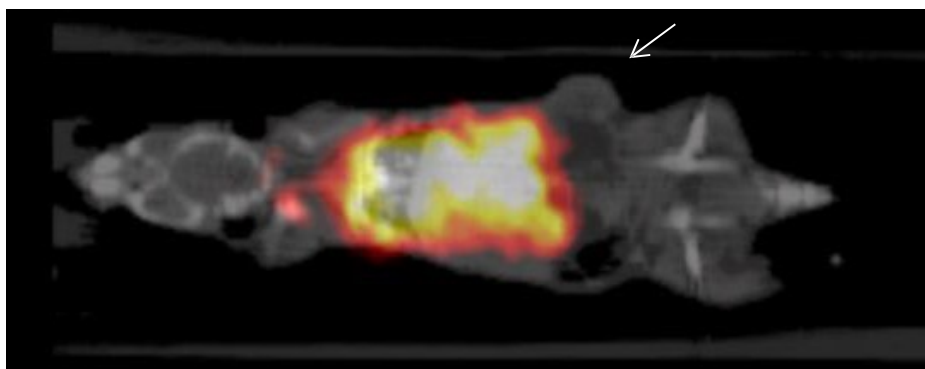


Obrázek 5.12.1.4  $\mu$ PET/CT snímky myšího modelu (Nude Foxn1NU) s HT-29 nádorovou linií po podání 20 MBq IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 (A – po 2 hodinách od aplikace; B – po 18 hodinách od aplikace)

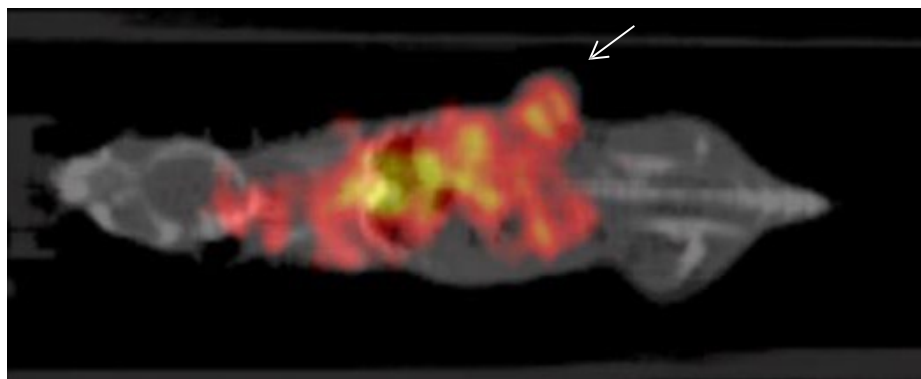


### 5.12.2. In vivo experimenty a zobrazování značeného konjugátu hR3-NCS-DOTA-Lu-177

U experimentů se značeným konjugátem hR3-NCS-DOTA-Lu-177 byla měřena aktivita v jednotlivých orgánech a přepočtena na 1 g orgánu/tkáně. Byl vyjádřen poměr aktivit nádor/krev (vztažených na gram) a poměr aktivit nádor/sval v jednotlivých časových intervalech. Výsledky biodistribuce na nádorových zvířatech jsou uvedeny v obrázku 4.12.2.1. Specifita vazby hR3-NCS-DOTA-Lu-177 na nádorové receptory byla hodnocena vyjádřením poměru aktivit nádor/sval a nádor/krev vztažených na 1 g tkáně. Snímání na  $\mu$ SPECT/CT bylo prováděno v intervalech (24, 48 a 96 h). Na obrázku 5.12.2.1 a 5.12.2.2 je prezentována distribuce značeného konjugátu v čase 1 a 48 h po aplikaci. Z výsledků je patrná postupná distribuce značeného konjugátu do nádoru.



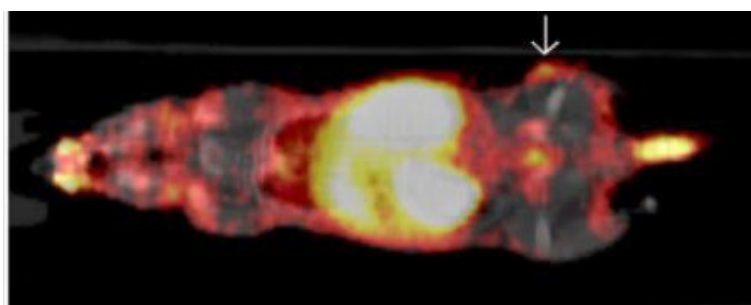
Obrázek 4.12.2.1 Snímek myši (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)  $\mu$ SPECT/CT 1 h od aplikace hR3-NCS-DOTA-Lu-177



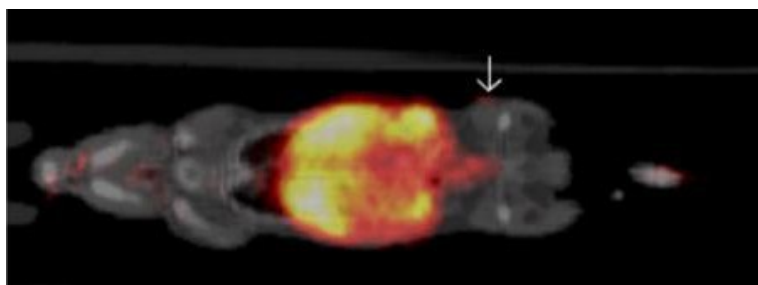
Obrázek 4.12.2.2 Snímek myši (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)  $\mu$ SPECT/CT 48 h od aplikace hR3-NCS-DOTA-Lu-177

### 5.12.3. In vivo zobrazování značeného konjugátu BBN-NCS- DOTA-Cu-64

Při zobrazování bylo dvěma myším aplikováno i.v. injekci 10 MBq BBN-NCS-DOTA-Cu-64. Byla provedena měření v časech 10 min, 1 hod., 2 hod. a 4 hod. po aplikaci. Pozice nádoru je označena šípkami v obrázku 5.12.3.1 a 5.12.3.2. Ze snímku je patrná časná akumulace značeného konjugátu. V intervalu 4 hodiny po aplikaci došlo k redistribuci značeného peptidu z nádoru.



Obrázek 5.12.3.1 Snímek myši (BALB/c Nude Mice) na  $\mu$ PET/CT v intervalu 10 min od aplikace BALB/c Nude Mice



Obrázek 5.12.3.2 Snímek myši (BALB/c Nude Mice) na  $\mu$ PET/CT v intervalu 4 h od aplikace

## 6. Diskuse

Efektivní cílení nádorových buněk radioaktivně značeným vektorem je klíčovým požadavkem specifického radiofarmaka pro PET zobrazování a terapii v onkologii. Makromolekulární vektory, jako jsou protilátky, se obvykle kombinují s pozitronovými emitory s delším poločasem přeměny, které umožňují zobrazení v době maximální akumulace aktivity v nádoru. V případě IgG M75 cílených na CA IX receptory a hR3 cílených na EGFR se zdá, že  $^{64}\text{Cu}$  odpovídá jeho farmakokinetice. Vzhledem k tomu, že pozitronové emitory s delším poločasem přeměny jsou převážně radiokovy, rozhodující je výběr vhodného chelátoru pro konjugace příslušné látky. Existuje několik komerčně dostupných makrocyclických chelatačních látek, jako je NOTA, NOGADA, které váží měď v dostatečně mírných podmínkách pro značení protilátek. V této práci jsme se zaměřili na nový, slibný chelátor "fosfinát", který již prokázal vysokou měrnou specifitu a chelatační stabilitu při značení v krátkém čase při pokojové teplotě (12). Testovali jsme jeho vhodnost pro konjugaci a značení protilátek pomocí modelu IgG M75 a předběžně odhadli jeho vhodnost pro *in vivo* zobrazování nádorů, které výrazně exprimovaly CA IX.

PET izotopy mědi ( $^{61,64}\text{Cu}$ ) připravené na cyklotronu byly separovány z terčů a charakterizovány na radionuklidovou a chemickou čistotu před použitím pro značení. Protilátka IgG M75 a její fragment scFv-Fc M75, který byl vytvořen metodou genetické modifikace, byly konjugovány s chelátorem "fosfinátem" za použití NCS-kaplingu, což vedlo ke konjugování 0,82 molekuly chelátoru a 1,72 na molekulu protilátky a fragmentu. Tento obsah chelátoru představuje malé riziko významné redukce imunoafinitace. Následné čištění konjugátů pomocí SEC vedlo k přípravě ligandů s čistotou vhodnou pro radioaktivní značení. V případě konjugace konvenčního chelátoru DOTA a nekomerčního DOTAPO při stejném typu konjugace na protilátku hR3, došlo k navázání cca 2,6 a 1,8 molekuly chelátoru. Oba konjugáty byly opět úspěšně přečištěny SEC a lyofilizovány v jednotlivých alikvotech připravených pro značení. Takto optimalizovaný postup konjugací a purifikací je výhodný především pro možnou hromadnou výrobu takovýchto konjugátů protilátek ve formě kitů. Lyofilizáty konjugátů byly snadno rozpustné a nedocházelo ke ztrátám biologické aktivity příslušných protilátek. Dále byl konjugován derivát BBN se stejným typem chelátoru, což bylo podrobně charakterizováno pomocí HPLC metody. Postupně byly metody konjugací a purifikací zoptimalizovány do takového stavu, že v případě konjugace hR3 s chelátorem DOTAPO byl ve společnosti RadioMedic s.r.o. sepsán odborný reglement pro případnou výrobu tohoto radiofarmaka v režimu Správné výrobní praxe. Všechny konjugáty byly snadno

a rychle značeny radionuklidy  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  a  $^{68}\text{Ga}$  ve výtěžcích vyšších od 80 po 98 %. Je to spíše dobrý výtěžek v porovnání s publikovanými údaji pro značení monoklonální protilátky cG250 cílené na CA-IX s  $^{89}\text{Zr}$ , kde byly popisovány výtěžky značení 55-70 % a  $^{124}\text{I}$  s výtěžky značení 73-82 (152). Další publikace (153) uvádějí výtěžnost značení fragmentu F (ab) 2-cG250 proti CA IX radionuklidem  $^{111}\text{In}$  okolo 95 % a radiochemická čistota po purifikaci byla > 99,9%. Po značení se imunoafinita radioaktivně značeného konjugátu M75 IgG snížila na 54 % ( $^{61}\text{Cu}$ ) a 46 % ( $^{64}\text{Cu}$ ). V literatuře nebyly nalezeny srovnatelné údaje o snížení imunoafinity. Imunoafinita radioaktivně značeného fragmentu byla výrazně snížena, a proto byla vyloučena z dalších experimentů.

V prvním kroku *in vitro* experimentů porovnááme vazbu konjugátu  $^{61,64}\text{Cu}$ -fosfinátu-IgG M75 na dva typy buněčných linií (HT 29 exprimujících CA IX a buňky NIH/3T3, které neexprimují CA IX). Po maximální době inkubace bylo k HT-29 vázáno asi 45 %  $^{64}\text{Cu}$ -fosfinát-IgG M75 (24 hodin) a asi 25 %  $^{61}\text{Cu}$ -fosfinát-IgG M75 (12 hodin), zatímco pro kontrolní NIH/3T3 buněk to bylo méně než 8 % u obou značených konjugátů. *In vitro* vazebné experimenty se značenou protilátkou hR3 vykazovaly signifikantní nárůst vaznosti značeného konjugátu na buněčné linie A431 oproti liniím kontrolním.

Studie biodistribuce byly provedeny u myši inokulovaných buňkami HT-29. Získané údaje prokázaly vysokou vaznost značené protilátky IgG M75 k nádoru s radionuklidem  $^{64}\text{Cu}$  po 24 hodinách (~ 22,6 %) a radioaktivně značené  $^{61}\text{Cu}$  po 6 hodinách (7,3 %). Výsledky jsou srovnatelné s protilátkou  $^{89}\text{Zr}$ -Df-cG250 proti CA-IX u myši modelu BALB/c a nu/nu s pozitivním nádorem CA-IX SK-RC-52, kde příjem dosáhl  $36,5 \pm 6,2\%$  ID/g sedm dní po intravenózním podání (152). Další práce (153) uváděla po dvou dnech po podání vycytávání protilátky  $^{111}\text{In}$ -DOTA-cG250 u myši nu/nu s nádorem HT-29  $20,1 \pm 4,8\%$  a jeho zvýšení na  $26,4 \pm 5,7\%$  ID/g po sedmi dnech. Obecně jsme pozorovali zvyšující se podíl aktivity v nádoru na aktivitu v orgánech, které většinou akumulují aktivitu  $^{64}\text{Cu}$ -fosfinátu-IgG M75 v krvi, játrech, ledvinách a plicích, klesly pod 10 % ID/g po 24 hodin.

Biodistribuční data samotného chelátoru značeného  $^{64}\text{Cu}$  u zdravých myši ukazují jeho dominantní akumulaci v játrech a v menší míře v plicích, ledvinách, žaludku a tenkém střevě. Po 48 hodinách bylo zaznamenáno významné snížení akumulace fosfinátu v játrech, plicích, žaludku a tenkém střevě, obsah v jiných orgánech se dramaticky nezměnil s výjimkou stálé akumulace v mozku, která byla v každém případě spíše nízká. Při srovnání akumulace konjugátu, radioaktivně značeného chelátoru a volného radionuklidu zjistíme, že je významný rozdíl v obsahu těchto tří chemických forem  $^{64}\text{Cu}$ , zejména v krvi, žaludku a pankreatu po 48

hodinách. Všechny tři formy vykazují vysokou akumulaci v játrech a ledvinách. Je třeba poznamenat, že značený konjugát zůstává v žaludku ještě 48 hodin po podání, na rozdíl od volného radionuklidu a značeného chelátoru. Tento účinek je velmi pravděpodobně způsoben fyziologickou přítomností CA IX receptorů v žaludku. Vysoká absorpce značeného chelátoru jater, ledvin a plic může signalizovat nízkou *in vivo* stabilitu, na druhé straně nelze vyloučit také absorpci chelátoru na bílkovinách v séru, jako je albumin a jeho následného transportu v játrech. Výsledné distribuční snímky imunokonjugátu IgG M75-NCS-PHS-Cu-64 na  $\mu$ PET/CT prezentují nárůst aktivity v nádoru s časovou závislostí a výraznou distribucí po 18 hodinách. Velká část značeného imunokonjugátu byla distribuována v játrech a následně metabolizována a vylučována přes střevo, což bylo pravděpodobně způsobeno aplikací relativně vysoké koncentrace imunokonjugátu.

Ze snímků  $\mu$ SPECT/CT značeného konjugátu hR3-NCS-DOTA-Lu-177 byla patrná časová distribuce této látky po 48 h od aplikace do nádoru.

V současné době dokončuje společnost Telix Pharmaceuticals GmbH III klinickou fázi testování protilátky Girentuximab (TXL250-Cdx) značené  $^{89}\text{Zr}$  a  $^{177}\text{Lu}$  se specifickou distribucí na CA IX. Je tedy předpoklad, že cílení na antigen CA IX je perspektivní z hlediska vývoje nových radiofarmak pro immunoPET.

U značeného peptidu BBN radionuklidem  $^{64}\text{Cu}$  a  $^{68}\text{Ga}$  byly získány radiochemické čistoty okolo 90 % a následné *in vitro* experimenty na PC-3 (GRP pozitivních) dokazovaly vysokou vaznost a stabilitu těchto látek, což koreluje s literaturou (154).

## 7. Závěr

Tato práce byla zaměřena na vývoj nových potenciálních cílících radiofarmak na bázi protilátek jejich fragmentů a peptidů. Jak vhodné radionuklidy pro značení byly použity jednak radioizotopy mědi ( $^{61,64}\text{Cu}$ ), ke kterým byl postupně optimalizován postup přípravy, separace a analýzy, dále komerčně dostupnému radionuklidu  $^{177}\text{Lu}$  a v současné době v ČR registrovaném  $^{68}\text{Ga}$ .

První z potenciálních nových radiofarmak byla vytipována komerční prottilátka proti EGFR Nimotuzumab, který byl konjugován s komerčním chelátorem DOTA a nekonvenčním DOTAPO. Postupy konjugace, purifikace, lyofilizace a značení byly v práci podrobně testovány. Výsledné produkty značení oběma radionuklidy dosahovaly vysokých radiochemických čistot na 90 %. Se značenými konjugáty byly nejprve provedeny prediktivní experimenty na zjištění vaznosti k EGFR na buněčných modelech a následně byly provedeny biodistribuční studie vykazující signifikantní vychytávání značené prottilátky v nádoru, což bylo prezentováno pomocí snímků z  $\mu\text{PET}$  a  $\mu\text{SPECT}$  kamery. Obdobné výsledky byly dosaženy s konjugací, značením, *in vitro* a *in vivo* testování peptidu BBN značeného  $^{64}\text{Cu}$ . Značený peptid vykazoval časnou zřetelnou distribuci do nádoru s postupným vymytím látky z nádoru.

Značení prottilátky IgG M75 a jeho fragmentu scFv specifického proti lidské karboanhydráze IX s radionuklidy  $^{64}\text{Cu}$  a  $^{61}\text{Cu}$  za použití nového nekomerčního chelátoru fosfinátu, specifického pro měď probíhalo za mírných reakčních podmínek vhodných pro značení protilátek. Radionuklidy s vysokou specifickou aktivitou byly získány na automatizovaném separačním modulu vyvinutém na Oddělení radiofarmak ÚJF AV ČR, v. v. i. Prottilátka IgG M75 a její fragment scFv byly připraveny metodami genetického inženýrství. Jejich konjugace s chelatačním činidlem je podrobně popsána. Chelátor vykazuje výjimečné vlastnosti ohledně rychlosti a účinnosti komplexování mědi. Konjugáty byly úspěšně značeny jak  $^{61}\text{Cu}$ , tak  $^{64}\text{Cu}$  s výtěžkem 96 % a radiochemickou čistotou > 95%. Specifická aktivita označených druhů byla 0,7 MBq/ $\mu\text{g}$  pro  $^{61}\text{Cu}$ -fosfinát-IgG M75 a 0,1 MBq/ $\mu\text{g}$  pro  $^{64}\text{Cu}$ -fosfinát-IgG M75. Studie stability ukázala pouze nepatrné uvolňování radionuklidů z označených protilátek dokonce i v časech přesahujících 24 hodin. Pokusy prováděné *in vitro* na buňkách exprimujících a neexprimujících CA IX odhalily specifickou vazbu radioaktivně značeného konjugátu k tomuto antigenu, což naznačuje, že nedošlo k žádné výrazné ztrátě imunoafinity této látky, což bylo potvrzeno také v RIA a ELISA imunoanalýzách. Studie biodistribuce u myši Nude Foxn1NU inokulované buňkami HT-29 a u zdravých myši prokázaly vysokou distribuci konjugátu  $^{64}\text{Cu}$ -fosfinát-IgG M75 v nádoru, který dosáhl po 24 hodinách po

podání více než 22% ID/g, stejně jako zvyšující se poměr mezi aktivitou nahromaděnou v nádoru a aktivitou uloženou v hlavních akumulčních orgánech činnosti (krev, žluč, žaludek, plíce, ledviny). Radioimunokonjugát  $^{64}\text{Cu}$ -fosfinátu-IgG M75 se zdá být slibným indikátorem pro PET zobrazování nádorů exprimujících CA IX.

Všechny studované látky v této práci vykazovaly velmi slibné výsledky při *in vivo* experimentech a potenciálně by se mohly stát novými radiofarmaky pro nuklerání onkologii v diagnostice i terapii nádorů se zvýšenou expresí EGRF, GRP a CA IX.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2004 Jul;14(3):198–206.
2. Burri P, Djonov V, Aebersold DM, Lindel K, Studer U, Altermatt HJ, et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Jun 1;56(2):494–501.
3. Costa A, Coradini D, Carrassi A, Erdas R, Sardella A, Daidone MG. Re: Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Aug 1;93(15):1175–7.
4. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Feb;7(2):168–81.
5. Robertson N, Potter C, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res.* 2004 Sep 1;64(17):6160–5.
6. Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, Bashford CL. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today.* 2000 Jan;6(1):15–9.
7. Chrastina A, Závada J, Parkkila S, Kaluz Š, Kaluzová M, Rajčáni J, et al. Biodistribution and pharmacokinetics of 125I-labeled monoclonal antibody M75 specific for carbonic anhydrase IX, an intrinsic marker of hypoxia, in nude mice xenografted with human colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 2003 Jul 20;105(6):873–81.
8. Minn I, Koo SM, Lee HS, Brummet M, Rowe SP, Gorin MA, et al. [64Cu]XYIMSR-06: A dual-motif CAIX ligand for PET imaging of clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016 Aug 30;7(35):56471–9.
9. Lau J, Zhang Z, Jenni S, Kuo H-T, Liu Z, Vullo D, et al. PET Imaging of Carbonic Anhydrase IX Expression of HT-29 Tumor Xenograft Mice with 68Ga-Labeled Benzenesulfonamides. *Mol Pharmaceutics.* 2016 Mar 7;13(3):1137–46.
10. Rossin R, Kohno T, Hagooley A, Sharp T, Gliniak B, Arroll T, et al. Characterization of 64Cu-DOTA-conatumumab: a PET tracer for in vivo imaging of death receptor 5. *J Nucl Med.* 2011 Jun;52(6):942–9.
11. Liu D, Overbey D, Watkinson LD, Smith CJ, Daibes-Figueroa S, Hoffman TJ, et al. Comparative evaluation of three 64Cu-labeled E. coli heat-stable enterotoxin analogs for PET imaging of colorectal cancer. *Bioconjug Chem.* 2010 Jul 21;21(7):1171–6.
12. Paúrová M, Havlíčková J, Pospíšilová A, Vetrík M, Císařová I, Stephan H, et al. Bifunctional Cyclam-Based Ligands with Phosphorus Acid Pendant Moieties for Radiocopper Separation: Thermodynamic and Kinetic Studies. *Chem Eur J.* 2015 Mar 16;21(12):4671–87.
13. Herbst RS, Langer CJ. Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol.* 2002 Feb;29(1 Suppl 4):27–36.



14. Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol*. 2009 Oct;158(1):1–9.
15. A phase I study of <sup>99m</sup>Tc-hR3 (DiaCIM), a humanized immunoconjugate directed towards the epidermal growth factor receptor. *Nuclear medicine communications* [Internet]. 2002 Dec 19 [cited 2018 Jun 17];23(12). Available from: <https://ora.ox.ac.uk/objects/uuid:054a81e4-f7ce-4bef-85f2-b4c3b5e2562d>
16. Allan DGP. Nimotuzumab: evidence of clinical benefit without rash. *Oncologist*. 2005 Oct;10(9):760–1.
17. Bayes M, Rabasseda X, Prous JR. Gateways to clinical trials. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007 Oct;29(8):547–83.
18. Casacó A, López G, García I, Rodríguez JA, Fernández R, Figueredo J, et al. Phase I single-dose study of intracavitary-administered Nimotuzumab labeled with <sup>188</sup>Re in adult recurrent high-grade glioma. *Cancer Biol Ther*. 2008 Mar;7(3):333–9.
19. Brouwers AH, van Eerd JEM, Frielink C, Oosterwijk E, Oyen WJG, Corstens FHM, et al. Optimization of radioimmunotherapy of renal cell carcinoma: labeling of monoclonal antibody cG250 with <sup>131</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu, or <sup>186</sup>Re. *J Nucl Med*. 2004 Feb;45(2):327–37.
20. Ehrhardt GJ, Ketring AR, Ayers LM. Reactor-produced radionuclides at the University of Missouri Research Reactor. *Applied Radiation and Isotopes*. 1998 Apr 1;49(4):295–7.
21. Mausner LF, Srivastava SC. Selection of radionuclides for radioimmunotherapy. *Med Phys*. 1993 Apr;20(2 Pt 2):503–9.
22. Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Sep;60(12):1347–70.
23. Guo M, Qu X, Qin X-Q. Bombesin-like peptides and their receptors: recent findings in pharmacology and physiology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2015 Feb;22(1):3–8.
24. Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug;1766(1):23–41.
25. Morgat C, MacGrogan G, Brouste V, Vélasco V, Sévenet N, Bonnefoi H, et al. Expression of Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Breast Cancer and Its Association with Pathologic, Biologic, and Clinical Parameters: A Study of 1,432 Primary Tumors. *J Nucl Med*. 2017 Sep;58(9):1401–7.
26. Smith CJ, Gali H, Sieckman GL, Hayes DL, Owen NK, Mazuru DG, et al. Radiochemical investigations of <sup>177</sup>Lu-DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH<sub>2</sub>: an in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells. *Nucl Med Biol*. 2003 Feb;30(2):101–9.
27. Smith CJ, Gali H, Sieckman GL, Higginbotham C, Volkert WA, Hoffman TJ. Radiochemical Investigations of <sup>99m</sup>Tc-N<sub>3</sub>S-X-BBN[7-14]NH<sub>2</sub>: An in Vitro/in Vivo Structure–Activity Relationship Study Where X = 0-, 3-, 5-, 8-, and 11-Carbon Tethering Moieties. *Bioconjugate Chem*. 2003 Jan 1;14(1):93–102.

28. Nekolla SG, Rischpler C, Paschali A, Anagnostopoulos C. Cardiovascular preclinical imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2017 Mar;61(1):48–59.
29. Papadimitriou L, Smith-Jones PM, Sarwar CMS, Marti CN, Yaddanapudi K, Skopicki HA, et al. Utility of positron emission tomography for drug development for heart failure. *Am Heart J*. 2016 May;175:142–52.
30. Chen IY, Wu JC. Cardiovascular molecular imaging: focus on clinical translation. *Circulation*. 2011 Feb 1;123(4):425–43.
31. Mediso. MultiScan LFER 150 PET/CT [Internet]. 2016. Available from: [http://www.mediso.hu/uploaded/MLFER\\_0816\\_web.pdf](http://www.mediso.hu/uploaded/MLFER_0816_web.pdf)
32. Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF. Justifying the number of animals for each experiment. *Nuclear Medicine and Biology*. 2007 Apr;34(3):229–32.
33. Jansen FP, Vanderheyden J-L. The future of SPECT in a time of PET. *Nuclear Medicine and Biology*. 2007 Oct;34(7):733–5.
34. Scheibe PO, Vera DR, Eckelman WC. What is to be gained by imaging the same animal before and after treatment? *Nuclear Medicine and Biology*. 2005 Oct;32(7):727–32.
35. *Physics in Nuclear Medicine - 4th Edition* [Internet]. [cited 2018 Jun 16]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/physics-in-nuclear-medicine/cherry/978-1-4160-5198-5>
36. Biersack H-J, Freeman LM, editors. *Clinical Nuclear Medicine* [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2007 [cited 2018 Mar 25]. Available from: [//www.springer.com/la/book/9783540280255](http://www.springer.com/la/book/9783540280255)
37. Anderson CJ, Ferdani R. Copper-64 Radiopharmaceuticals for PET Imaging of Cancer: Advances in Preclinical and Clinical Research. *Cancer Biother Radiopharm*. 2009 Aug;24(4):379–93.
38. Jager PL, de Korte MA, Lub-de Hooge MN, van Waarde A, Koopmans KP, Perik PJ, et al. Molecular imaging: what can be used today. *Cancer Imaging*. 2005 Nov 23;5(Spec No A):S27–32.
39. Anger HO, Gottschalk A. LOCALIZATION OF BRAIN TUMORS WITH THE POSITRON SCINTILLATION CAMERA. *J Nucl Med*. 1963 Jul;4:326–30.
40. Ido T, Wan C-N, Casella V, Fowler JS, Wolf AP, Reivich M, et al. Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and 14C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 14(2):175–83.
41. Froidevaux S, Hintermann E, Török M, Mäcke HR, Beglinger C, Eberle AN. Differential regulation of somatostatin receptor type 2 (sst 2) expression in AR4-2J tumor cells implanted into mice during octreotide treatment. *Cancer Res*. 1999 Aug 1;59(15):3652–7.
42. Schuhmacher J, Zhang H, Doll J, Mäcke HR, Matys R, Hauser H, et al. GRP receptor-targeted PET of a rat pancreas carcinoma xenograft in nude mice with a 68Ga-labeled bombesin(6-14) analog. *J Nucl Med*. 2005 Apr;46(4):691–9.

43. Froidevaux S, Calame-Christe M, Schuhmacher J, Tanner H, Saffrich R, Henze M, et al. A gallium-labeled DOTA-alpha-melanocyte-stimulating hormone analog for PET imaging of melanoma metastases. *J Nucl Med.* 2004 Jan;45(1):116–23.
44. Graham MM, Menda Y. Radiopeptide imaging and therapy in the United States. *J Nucl Med.* 2011 Dec;52 Suppl 2:56S-63S.
45. Cuaron JJ, Hirsch JA, Medich DC, Rosenstein BS, Martel CB, Hirsch AE. A proposed methodology to select radioisotopes for use in radionuclide therapy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009 Nov;30(10):1824–9.
46. Yeong C-H, Cheng M, Ng K-H. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2014 Oct;15(10):845–63.
47. Srivastava SC. Enabling simultaneous imaging and treatment with the theragnostic radionuclide Tin-117 m. *Nuclear Medicine and Biology.* 2014 Aug 1;41(7):640.
48. Baum RP, editor. *Therapeutic Nuclear Medicine* [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2014 [cited 2018 Jun 16]. (Radiation Oncology). Available from: [//www.springer.com/gp/book/9783540367185](http://www.springer.com/gp/book/9783540367185)
49. Gulenchyn KY, Yao X, Asa SL, Singh S, Law C. Radionuclide therapy in neuroendocrine tumours: a systematic review. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2012 May;24(4):294–308.
50. Kam BLR, Teunissen JJM, Krenning EP, de Herder WW, Khan S, van Vliet EI, et al. Lutetium-labelled peptides for therapy of neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012 Feb;39(Suppl 1):103–12.
51. Bodei L, Cremonesi M, Grana CM, Fazio N, Iodice S, Baio SM, et al. Peptide receptor radionuclide therapy with <sup>177</sup>Lu-DOTATATE: the IEO phase I-II study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011 Dec;38(12):2125–35.
52. Chakraborty S, Das T, Banerjee S, Sarma HD, Venkatesh M. Preparation and preliminary biological evaluation of <sup>177</sup>Lu-labelled hydroxyapatite as a promising agent for radiation synovectomy of small joints. *Nucl Med Commun.* 2006 Aug;27(8):661–8.
53. Grégoire V, Haustermans K, Geets X, Roels S, Lonneux M. PET-Based Treatment Planning in Radiotherapy: A New Standard? *J Nucl Med.* 2007 Jan 1;48(1 suppl):68S-77S.
54. Liu W, Truillet C, R. Flavell R, F. Brewer T, J. Evans M, M. Wilson D, et al. A reactivity-based [<sup>18</sup>F]FDG probe for in vivo formaldehyde imaging using positron emission tomography. *Chemical Science.* 2016;7(8):5503–7.
55. Plathow C, Weber WA. Tumor Cell Metabolism Imaging. *J Nucl Med.* 2008 Jan 6;49(Suppl 2):43S-63S.
56. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, et al. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1990 Jul 16;170(1):223–30.
57. Miele E, Spinelli GP, Tomao F, Zullo A, De Marinis F, Pasciuti G, et al. Positron Emission Tomography (PET) radiotracers in oncology – utility of <sup>18</sup>F-Fluoro-deoxy-glucose (FDG)-

- PET in the management of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC). *J Exp Clin Cancer Res.* 2008 Oct 17;27(1):52.
58. Som P, Atkins HL, Bandoypadhyay D, Fowler JS, MacGregor RR, Matsui K, et al. A Fluorinated Glucose Analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): Nontoxic Tracer for Rapid Tumor Detection. *J Nucl Med.* 1980 Jan 7;21(7):670–5.
  59. Bourguet P, Blanc-Vincent MP, Boneu A, Bosquet L, Chauffert B, Corone C, et al. Summary of the Standards, Options and Recommendations for the use of positron emission tomography with 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDP-PET scanning) in oncology (2002). *Br J Cancer.* 2003 Aug;89(Suppl 1):S84–91.
  60. Ung YC, Maziak DE, Vanderveen JA, Smith CA, Gulenchyn K, Lacchetti C, et al. 18 Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in the Diagnosis and Staging of Lung Cancer: A Systematic Review. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Dec 5;99(23):1753–67.
  61. Hatanaka M. Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 1974 Apr 29;355(1):77–104.
  62. Okumura W, Iwasaki T, Toyama T, Iso T, Arai M, Oriuchi N, et al. Usefulness of Fasting 18F-FDG PET in Identification of Cardiac Sarcoidosis. *J Nucl Med.* 2004 Jan 12;45(12):1989–98.
  63. Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Ido T, Tamahashi N. Microautoradiographic Study for the Differentiation of Intratumoral Macrophages, Granulation Tissues and Cancer Cells by the Dynamics of Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Uptake. *J Nucl Med.* 1994 Jan 1;35(1):104–12.
  64. Higashi K, Ueda Y, Seki H, Yuasa K, Oguchi M, Noguchi T, et al. Fluorine-18-FDG PET Imaging Is Negative in Bronchioloalveolar Lung Carcinoma. *J Nucl Med.* 1998 Jan 6;39(6):1016–20.
  65. Endo K, Oriuchi N, Higuchi T, Iida Y, Hanaoka H, Miyakubo M, et al. PET and PET/CT using 18F-FDG in the diagnosis and management of cancer patients. *Int J Clin Oncol.* 2006 Aug 1;11(4):286–96.
  66. Clary GL, Tsai C-F, Guynn RW. Substrate specificity of choline kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1987 Apr 1;254(1):214–21.
  67. Hara T. 18F-fluorocholine: a new oncologic PET tracer. *J Nucl Med.* 2001 Dec;42(12):1815–7.
  68. Challapalli A, Sharma R, Hallett WA, Kozlowski K, Carroll L, Brickute D, et al. Biodistribution and Radiation Dosimetry of Deuterium-Substituted 18F-Fluoromethyl-[1, 2-2H4]Choline in Healthy Volunteers [Internet]. [cited 2018 Mar 25]. Available from: <http://jnm.snmjournals.org>
  69. Langen K-J, Jarosch M, Mühlensiepen H, Hamacher K, Bröer S, Jansen P, et al. Comparison of fluorotyrosines and methionine uptake in F98 rat gliomas. *Nuclear Medicine and Biology.* 2003 May;30(5):501–8.

70. Jager PL, Vaalburg W, Pruim J, Vries EGE de, Langen K-J, Piers DA. Radiolabeled Amino Acids: Basic Aspects and Clinical Applications in Oncology\*. *J Nucl Med*. 2001 Jan 3;42(3):432–45.
71. Couturier O, Luxen A, Chatal J-F, Vuillez J-P, Rigo P, Hustinx R. Fluorinated tracers for imaging cancer with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004 Aug 1;31(8):1182–206.
72. Laverman P, Boerman OC, Corstens FH, Oyen WJ. Fluorinated amino acids for tumour imaging with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med*. 2002 May 1;29(5):681–90.
73. Herholz K, Hölzer T, Bauer B, Schröder R, Voges J, Ernestus RI, et al. 11C-methionine PET for differential diagnosis of low-grade gliomas. *Neurology*. 1998 May;50(5):1316–22.
74. Ribom D, Eriksson A, Hartman M, Engler H, Nilsson A, Långström B, et al. Positron emission tomography (11)C-methionine and survival in patients with low-grade gliomas. *Cancer*. 2001 Sep 15;92(6):1541–9.
75. Becherer A, Karanikas G, Szabó M, Zettinig G, Asenbaum S, Marosi C, et al. Brain tumour imaging with PET: a comparison between [18F]fluorodopa and [11C]methionine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003 Nov 1;30(11):1561–7.
76. Singhal T, Narayanan TK, Jain V, Mukherjee J, Mantil J. 11C-l-Methionine Positron Emission Tomography in the Clinical Management of Cerebral Gliomas. *Mol Imaging Biol*. 2008 Jan 1;10(1):1–18.
77. Grierson JR, Shields AF. Radiosynthesis of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine: [18F]FLT for imaging of cellular proliferation in vivo. *Nuclear Medicine and Biology*. 2000 Feb 1;27(2):143–56.
78. Shields AF, Grierson JR, Kozawa SM, Zheng M. Development of labeled thymidine analogs for imaging tumor proliferation. *Nuclear Medicine and Biology*. 1996 Jan 1;23(1):17–22.
79. Conti PS, Alauddin MM, Fissekis JR, Schmall B, Watanabe KA. Synthesis of 2'-fluoro-5-[11C]-methyl-1-beta-D-arabinofuranosyluracil ([11C]-FMAU): a potential nucleoside analog for in vivo study of cellular proliferation with PET. *Nucl Med Biol*. 1995 Aug;22(6):783–9.
80. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev*. 2003 Aug;24(4):389–427.
81. Klabunde T, Hessler G. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem*. 2002 Oct 4;3(10):928–44.
82. Monoclonal Antibody and Peptide-Targeted Radiotherapy of Cancer [Internet]. Wiley.com. [cited 2018 Jun 19]. Available from: <https://www.wiley.com/en-us/Monoclonal+Antibody+and+Peptide+Targeted+Radiotherapy+of+Cancer-p-9780470243725>
83. Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr Rev*. 1991 Nov;12(4):450–82.

84. Otte A, Mueller-Brand J, Dellas S, Nitzsche EU, Herrmann R, Maecke HR. Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. *Lancet*. 1998 Feb 7;351(9100):417–8.
85. Behr TM, Jenner N, Radetzky S, Béhe M, Gratz S, Yücekent S, et al. Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur J Nucl Med*. 1998 Apr;25(4):424–30.
86. Virgolini I, Raderer M, Kurtaran A, Angelberger P, Banyai S, Yang Q, et al. Vasoactive intestinal peptide-receptor imaging for the localization of intestinal adenocarcinomas and endocrine tumors. *N Engl J Med*. 1994 Oct 27;331(17):1116–21.
87. Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*. 1985 Sep 29;316(6031):823–6.
88. Kroog GS, Jensen RT, Battey JF. Mammalian bombesin receptors. *Med Res Rev*. 1995 Sep;15(5):389–417.
89. Moody TW, Pert CB, Gazdar AF, Carney DN, Minna JD. High levels of intracellular bombesin characterize human small-cell lung carcinoma. *Science*. 1981 Dec 11;214(4526):1246–8.
90. Spindel ER, Giladi E, Brehm P, Goodman RH, Segerson TP. Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor. *Mol Endocrinol*. 1990 Dec;4(12):1956–63.
91. Wada E, Way J, Shapira H, Kusano K, Lebacqz-Verheyden AM, Coy D, et al. cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron*. 1991 Mar;6(3):421–30.
92. ABX Datasheet Product Number 9715 [Internet]. [cited 2018 Jun 16]. Available from: <http://www.abx.de/chemicals/9715.html>
93. Santos-Oliveira R, editor. *Radiopharmaceuticals: Application, Insights and Future*. LAP LAMBERT Academic Publishing; 2016. 332 p.
94. Amir E, Miller N, Geddie W, Freedman O, Kassam F, Simmons C, et al. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012 Feb 20;30(6):587–92.
95. Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SL, et al. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol*. 2012 Feb 20;30(6):593–9.
96. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1659–72.
97. Ray GL, Baidoo KE, Keller LMM, Albert PS, Brechbiel MW, Milenic DE. Pre-Clinical Assessment of <sup>177</sup>Lu-Labeled Trastuzumab Targeting HER2 for Treatment and

- Management of Cancer Patients with Disseminated Intraperitoneal Disease. Pharmaceuticals (Basel). 2011 Dec 22;5(1):1–15.
98. Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG, Brouwers AH, Jager PL, de Jong JR, et al. Biodistribution of <sup>89</sup>Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 May;87(5):586–92.
  99. Perik PJ, Lub-De Hooge MN, Gietema JA, van der Graaf WTA, de Korte MA, Jonkman S, et al. Indium-111-labeled trastuzumab scintigraphy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006 May 20;24(15):2276–82.
  100. Rodríguez MO, Rivero TC, del Castillo Bahi R, Muchuli CR, Bilbao MA, Vinageras EN, et al. Nimotuzumab plus radiotherapy for unresectable squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biol Ther.* 2010 Mar 1;9(5):343–9.
  101. Crombet T, Osorio M, Cruz T, Roca C, del Castillo R, Mon R, et al. Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. *J Clin Oncol.* 2004 May 1;22(9):1646–54.
  102. Lacouture ME. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2006 Oct;6(10):803–12.
  103. Torres LA, Perera A, Batista JF, Hernández A, Crombet T, Ramos M, et al. Phase I/II clinical trial of the humanized anti-EGF-r monoclonal antibody h-R3 labelled with <sup>99m</sup>Tc in patients with tumour of epithelial origin. *Nucl Med Commun.* 2005 Dec;26(12):1049–57.
  104. Torres LA, Coca MA, Batista JF, Casaco A, Lopez G, García I, et al. Biodistribution and internal dosimetry of the <sup>188</sup>Re-labelled humanized monoclonal antibody anti-epidermal growth factor receptor, nimotuzumab, in the locoregional treatment of malignant gliomas. *Nucl Med Commun.* 2008 Jan;29(1):66–75.
  105. Vera DRB, Eigner S, Henke KE, Lebeda O, Melichar F, Beran M. Preparation and preclinical evaluation of <sup>177</sup>Lu-nimotuzumab targeting epidermal growth factor receptor overexpressing tumors. *Nucl Med Biol.* 2012 Jan;39(1):3–13.
  106. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 1956 Aug 10;124(3215):269–70.
  107. Alfarouk KO, Schwartz CTS and L. The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer [Internet]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2017 [cited 2017 Dec 8]. Available from: <http://www.eurekaselect.com/146858/article>
  108. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006 May 25;441(7092):437–43.
  109. Chitneni SK, Palmer GM, Zalutsky MR, Dewhirst MW. Molecular Imaging of Hypoxia. *J Nucl Med.* 2011 Feb;52(2):165–8.

110. Lopci E, Grassi I, Chiti A, Nanni C, Cicoria G, Toschi L, et al. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2014 Jun 7;4(4):365–84.
111. Carlin S, Humm JL. PET of Hypoxia: Current and Future Perspectives. *J Nucl Med*. 2012 Aug 1;53(8):1171–4.
112. Serganova I, Humm J, Ling C, Blasberg R. Tumor Hypoxia Imaging. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 15;12(18):5260–4.
113. Peeters SG, Zegers CM, Yaromina A, Van Elmpt W, Dubois L, Lambin P. Current preclinical and clinical applications of hypoxia PET imaging using 2-nitroimidazoles. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2015 Mar;59(1):39–57.
114. Jiang L, Tu Y, Shi H, Cheng Z. PET probes beyond 18F-FDG. *J Biomed Res*. 2014 Nov;28(6):435–46.
115. Sun X, Niu G, Chan N, Shen B, Chen X. Tumor Hypoxia Imaging. *Mol Imaging Biol*. 2011 Jun 1;13(3):399–410.
116. Mees G, Dierckx R, Vangestel C, Van de Wiele C. Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009 Oct;36(10):1674–86.
117. Dubois L, Landuyt W, Haustermans K, Dupont P, Bormans G, Vermaelen P, et al. Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by [18F]Fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry. *Br J Cancer*. 2004 Nov 29;91(11):1947–54.
118. Gagel B, Piroth M, Pinkawa M, Reinartz P, Zimny M, Kaiser HJ, et al. pO polarography, contrast enhanced color duplex sonography (CDS), [18F] fluoromisonidazole and [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography: validated methods for the evaluation of therapy-relevant tumor oxygenation or only bricks in the puzzle of tumor hypoxia? *BMC Cancer*. 2007 Jun 28;7:113.
119. Zimny M, Gagel B, DiMartino E, Hamacher K, Coenen HH, Westhofen M, et al. FDG—a marker of tumour hypoxia? A comparison with [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole and pO<sub>2</sub>-polarography in metastatic head and neck cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 Dec 1;33(12):1426–31.
120. Fujibayashi Y, Taniuchi H, Yonekura Y, Ohtani H, Konishi J, Yokoyama A. Copper-62-ATSM: a new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. *J Nucl Med*. 1997 Jul;38(7):1155–60.
121. Lewis JS, Herrero P, Sharp TL, Engelbach JA, Fujibayashi Y, Laforest R, et al. Delineation of hypoxia in canine myocardium using PET and copper(II)-diacetyl-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone). *J Nucl Med*. 2002 Nov;43(11):1557–69.
122. Dearing JJJ, Packard AB. Some thoughts on the mechanism of cellular trapping of Cu(II)-ATSM. *Nuclear Medicine and Biology*. 2010 Apr 1;37(3):237–43.



123. Liu J, Hajibeigi A, Ren G, Lin M, Siyambalapitiyage W, Liu Z, et al. Retention of the radiotracers <sup>64</sup>Cu-ATSM and <sup>64</sup>Cu-PTSM in human and murine tumors is influenced by MDR1 protein expression. *J Nucl Med.* 2009 Aug;50(8):1332–9.
124. Vāvere AL, Lewis JS. Examining the relationship between Cu-ATSM hypoxia selectivity and fatty acid synthase expression in human prostate cancer cell lines. *Nucl Med Biol.* 2008 Apr;35(3):273–9.
125. Yoshii Y, Yoneda M, Ikawa M, Furukawa T, Kiyono Y, Mori T, et al. Radiolabeled Cu-ATSM as a novel indicator of overreduced intracellular state due to mitochondrial dysfunction: studies with mitochondrial DNA-less ρ0 cells and cybrids carrying MELAS mitochondrial DNA mutation. *Nucl Med Biol.* 2012 Feb;39(2):177–85.
126. Matsumoto K-I, Szajek L, Krishna MC, Cook JA, Seidel J, Grimes K, et al. The influence of tumor oxygenation on hypoxia imaging in murine squamous cell carcinoma using [<sup>64</sup>Cu]Cu-ATSM or [<sup>18</sup>F]Fluoromisonidazole positron emission tomography. *Int J Oncol.* 2007 Apr;30(4):873–81.
127. Dence CS, Ponde DE, Welch MJ, Lewis JS. Autoradiographic and Small-Animal PET Comparisons Between <sup>18</sup>F-FMISO, <sup>18</sup>F-FDG, <sup>18</sup>F-FLT and the Hypoxic Selective <sup>64</sup>Cu-ATSM in a Rodent Model of Cancer. *Nucl Med Biol.* 2008 Aug;35(6):713–20.
128. Colombié M, Gouard S, Frindel M, Vidal A, Chérel M, Kraeber-Bodéré F, et al. Focus on the Controversial Aspects of (<sup>64</sup>)Cu-ATSM in Tumoral Hypoxia Mapping by PET Imaging. *Front Med (Lausanne).* 2015;2:58.
129. Pastorek J, Pastoreková S, Callebaut I, Mornon JP, Zelník V, Opavský R, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene.* 1994 Oct;9(10):2877–88.
130. Pastorekova S, Ratcliffe PJ, Pastorek J. Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia. *BJU Int.* 2008 Jun;101 Suppl 4:8–15.
131. vdsstream VDS - Target - Carbonic Anhydrase IX [Internet]. [cited 2018 Jun 16]. Available from: <https://vdsstream.wikispaces.com/Target+-+Carbonic+Anhydrase+IX>
132. Barathova M, Takacova M, Holotnakova T, Gibadulinova A, Ohradanova A, Zatovicova M, et al. Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumour phenotype. *Br J Cancer.* 2008 Jan 15;98(1):129–36.
133. Rafajová M, Zatovicová M, Kettmann R, Pastorek J, Pastoreková S. Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells. *Int J Oncol.* 2004 Apr;24(4):995–1004.
134. Zatovicova M, Sedlakova O, Svastova E, Ohradanova A, Ciampor F, Arribas J, et al. Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer.* 2005 Nov 28;93(11):1267–76.

135. Rzymiski T, Petry A, Kračun D, Rieß F, Pike L, Harris AL, et al. The unfolded protein response controls induction and activation of ADAM17/TACE by severe hypoxia and ER stress. *Oncogene*. 2012 Aug 2;31(31):3621–34.
136. Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol*. 2008 Oct;18(5):330–7.
137. Hulikova A, Harris AL, Vaughan-Jones RD, Swietach P. Regulation of intracellular pH in cancer cell lines under normoxia and hypoxia. *J Cell Physiol*. 2013 Apr;228(4):743–52.
138. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2005 Oct;5(10):786–95.
139. Romero MF, Fulton CM, Boron WF. The SLC4 family of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):495–509.
140. Svastova E, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX: a hypoxia-controlled “catalyst” of cell migration. *Cell Adh Migr*. 2013 Apr;7(2):226–31.
141. Král V, Mader P, Collard R, Fábry M, Hořejší M, Řezáčová P, et al. Stabilization of antibody structure upon association to a human carbonic anhydrase IX epitope studied by X-ray crystallography, microcalorimetry, and molecular dynamics simulations. *Proteins*. 2008 May 15;71(3):1275–87.
142. Komarova TV, Kosorukov VS, Frolova OY, Petrunia IV, Skrypnik KA, Gleba YY, et al. Plant-Made Trastuzumab (Herceptin) Inhibits HER2/Neu<sup>+</sup> Cell Proliferation and Retards Tumor Growth. *PLoS One* [Internet]. 2011 Mar 3;6(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048398/>
143. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976 May 7;72(1):248–54.
144. Hall MA, Kwon S, Robinson H, Lachance P-A, Azhdarinia A, Ranganathan R, et al. Imaging prostate cancer lymph node metastases with a multimodality contrast agent. *Prostate*. 2012 Feb 1;72(2):129–46.
145. Rogers BE, Anderson CJ, Connett JM, Guo LW, Edwards WB, Sherman ELC, et al. Comparison of Four Bifunctional Chelates for Radiolabeling Monoclonal Antibodies with Copper Radioisotopes: Biodistribution and Metabolism. *Bioconjugate Chem*. 1996 Jan 1;7(4):511–22.
146. Dowall SD, Richards KS, Graham VA, Chamberlain J, Hewson R. Development of an indirect ELISA method for the parallel measurement of IgG and IgM antibodies against Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus using recombinant nucleoprotein as antigen. *Journal of Virological Methods*. 2012 Feb 1;179(2):335–41.
147. Ye G, Oshins RA, Rouhani FN, Brantly ML, Chulay JD. Development, validation and use of ELISA for antibodies to human alpha-1 antitrypsin. *Journal of Immunological Methods*. 2013 Feb 28;388(1):18–24.

148. Li J, Shi L, Wang C, Zhang X, Jia L, Li X, et al. Preliminary biological evaluation of <sup>125</sup>I-labeled anti-carbonic anhydrase IX monoclonal antibody in the mice bearing Ht-29 tumors. *Nuclear Medicine Communications*. 2011 Dec 1;32(12):1190–3.
149. Hall MA, Pinkston KL, Wilganowski N, Robinson H, Ghosh P, Azhdarinia A, et al. Comparison of mAbs Targeting Epithelial Cell Adhesion Molecule for the Detection of Prostate Cancer Lymph Node Metastases with Multimodal Contrast Agents: Quantitative Small-Animal PET/CT and NIRF. *J Nucl Med*. 2012 Sep 1;53(9):1427–37.
150. Konishi S, Hamacher K, Vallabhajosula S, Kothari P, Bastidas D, Bander N, et al. Determination of Immunoreactive Fraction of Radiolabeled Monoclonal Antibodies: What Is an Appropriate Method? *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2004 Dec 1;19(6):706–15.
151. Čepa A, Ráliš J, Král V, Paurová M, Kučka J, Humajová J, et al. In vitro evaluation of the monoclonal antibody <sup>64</sup>Cu-IgG M75 against human carbonic anhydrase IX and its in vivo imaging. *Appl Radiat Isot*. 2017 Dec 16;133:9–13.
152. Stillebroer AB, Franssen GM, Mulders PFA, Oyen WJG, van Dongen GAMS, Laverman P, et al. ImmunoPET imaging of renal cell carcinoma with (<sup>124</sup>I)- and (<sup>89</sup>Zr)-labeled anti-CAIX monoclonal antibody cG250 in mice. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013 Sep;28(7):510–5.
153. Chopra A. [(111)In]-Labeled divalent Fab fragment of chimeric monoclonal antibody cG250 directed against carbonic anhydrase IX. In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45634/>
154. Cheng KT, Lewis JS, Biddlecombe GB. <sup>64</sup>Cu-DOTA-[Pro1,Tyr4]-Bombesin[1-14]. In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004 [cited 2018 Jun 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23640/>

# SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ

## Publikace související s disertační prací

**Cepa A.**, Ralis J., Kral V., Paurova M., Kucka J., Humajova J., Laznicek M., Lebeda O. In vitro evaluation of the monoclonal antibody  $^{64}\text{Cu}$ -IgG M75 against human carbonic anhydrase IX and its in vivo imaging. *Applied Rad Isotop* 2018; 133: 9-13. IF 1,128

**Cepa A.**, Ralis J., Maresova L., Kleinova M., Seifert D., Sieglova I., Kral V., Polasek M., Paurova M., Laznicek M., Lebeda O. Radiolabeling of the antibody IgG M75 for epitope of human carbonic anhydrase IX by  $^{61}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$  and its biological testing. *Applied Rad Isotop* 2018; v recenzním řízení. IF 1,128

Santos-Oliveira R., Kozempel J., **Cepa A.**, Vlk M. Radiopharmaceuticals: Application, Insights and Future. *Lamb Acad Publish* 2016; 142-205; kapitola v odborné knize.

## Další publikované práce

Prezentace na vědeckých konferencích

A) Prvoautorské prezentace

**Cepa A.**, Polasek M., Ralis J., M., Seifert D., Kotek J., Paurova M., Lebeda O. Testing novel radio-copper chelator with use of cyclotron-produced  $^{61}\text{Cu}$ . *EJNMMI* 2014; 41 suppl. 2.

**Cepa A.**, Ralis J., Pavelka A., Seifert D., Sieglova I., Polasek M., Paurova M., Lebeda O. Radiolabeling of antibody for human carbonic anhydrase IX by  $^{61}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$ . *Nucl Med (molecular research, diagnostics and therapy)* 2014; 3 Suppl. 3.

**Cepa A.**, Ralis J., Pavelka A., Seifert D., Sieglova I., Polasek M., Paurova M., Lebeda O. Radiolabeling of antibody IgG M75 for epitope of human carbonic anhydrase IX by  $^{61}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$ . *Czech and Slovak Pharmacy* 2015; Vol. 1-2

**Cepa A.**, Kropacek M., Melichar F., Ralis J., Becford Vera B., Hermann P. Radiolabelled bombesin derivatives by radionuclides  $^{177}\text{Lu}$ . *Czech and Slovak Pharmacy* 2015; Vol. 1-2.

**Cepa A.**, Kropacek M., Melichar F., Ralis J., Becford Vera B., Hermann P. Radioaktivní zančení derivátů bombesinu pomocí radionuklidu  $^{177}\text{Lu}$ . *Nukleární medicína* 2015; 4 S3.

**Cepa A.**, Lebeda O., Laznicek M., Buncova M. Potential of biological drugs in radiopharmacy. *Czech and Slovak Pharmacy* 2015; Vol. 1-2.

**Cepa A.**, Lebeda O., Laznicek M., Buncova M. Application of radiolabeled biological pharmaceuticals for nuclear medicine. Nuclear medicine (molecular research , diagnostics and therapy) 2015; 4 suppl. 3.

**Cepa A.**, Ralis J., Pavelka A., Maresova L., Kleinova M., Seifert D., Sieglova I., Kral V., Polasek M. Lebeda O., Paurova M., Laznicek M. Radiolabeling of antibody for epitope of human carbonic anhydrase IX (IgG M75) by  $^{61}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$  and biological testing. EJNMMI 2015; 4 suppl. 1. S465-S466.

**Cepa A.**, Ralis J., Maresova L., Kleinova M., Seifert D., Sieglova I., Kral V., Lebeda O., Laznicek M.  $^{61,64}\text{Cu}$ -(SCN)-fosfinát-imunoglobulin-G M75 a jeho in vitro testování. Czech Chem. Soc. Symp. 2016; 14 311–312.

**Cepa A.**, Ralis J., Lebeda O., Laznicek M. In vitro studie značené protilátky [ $^{64}\text{Cu}$ ]IgG M75 cílící proti lidské karboonické anhydráze IX. Nuclear medicine (molecular research , diagnostics and therapy) 2016; 3 suppl. 1.

**Cepa A.**, Seifert D., Kleinová M., Vlastnik P., Ralis J., Lebeda O., Laznicek M. Laboratoř na čipu z pohledu „techneciového“ radiofarmaceuta. Nukleární medicína 2017; 6 č. 3-S1.

**Cepa A.**, Seifert D., Cervenak J., Kleinová M., Vlastnik P., Ralis J., Lebeda O. Radiopharmaceutical laboratory on chip. WFNMB 2018; Melbourne.

## B) Spoluautorské prezentace

Lebeda O., Ralis J., Hradilek P., **Cepa A.**, Vrba T., Zyuzin A., Lier v E. Cyclotron-produced  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ : feasible quality and its control methods. EJNMMI 2014; 41 suppl. 2.

Maresova L., Ralis J., **Cepa A.**, Kral V. Radionuclides for PET – biological testing. Nucl Med (molecular research , diagnostics and therapy) 2014; 3 Suppl. 3.

Cervenak J., **Cepa A.** Preparation radionuclides in nuclear medicine, its current state and prospects. Czech and Slovak Pharmacy 2015; Vol. 1-2.

Buncova M., **Cepa A.**, Kubanek M., Krebsová A. The index of the maximum accumulation  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DPD in the myocardium of patients with transthyretin (TTR) cardiac amyloidosis and of older people without known heart disease. EJNMM 2015; 43 suppl. 1 S552-S552.

Cervenak J., **Cepa A.**, Ters J., Micolova P. In vivo generátory se zaměřením na generátor  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ . Nucl Med (molecular research, diagnostics and therapy) 2016; 3 Suppl. 1.

Cervenak J., **Cepa A.**, Mosa M., Micolova P., Lebeda O. Možné farmakodynamické a toxické efekty radiofarmak. Czech and Slovak Pharmacy 2016; 3 Vol. 1-2.

Komarek P., **Cepa A.** Regulační iniciativy EANM v kategorizaci radiofarmak. Czech and Slovak Pharmacy 2016; 3 Vol. 1-2.

Buncova M, Ters J, **Cepa A.**, Krebsová A., Kubanek M. The accumulation quantification of  $^{99m}\text{Tc}$ -DPD in the myocardium of patients with transthyretin (TTR) cardiac amyloidosis. *EJNMM* 2016; 43 suppl. 1.

Tomes M., Zimova J., Kontrova K., Kropacek M., **Cepa A.** [ $^{177}\text{Lu}$ ]-Nimotuzumab, výroba a *in vitro* experimenty radioimunokonjugátu s afinitou k EGF receptorům. *Nucl Med (molecular research , diagnostics and therapy)* 2016; 3 Suppl. 1.

Cervenak J., **Cepa A.**, Ralis J., Tomes M., Kozempel J., Vlk M., Seifert D., Lebeda O. Značení peptidů pomocí radionuklidů  $^{68}\text{Ga}$  a  $^{64}\text{Cu}$ . *Nukleární medicína* 2017; 6 č. 3-S1.

Buncova M, Kubanek M., Ters J., Krebsová A., **Cepa A.** Monitorace vývoje TTR kardiomyopatie pomocí  $^{99m}\text{Tc}$ -DPD, ECHO ukazatelů (IVS a ZS) a p-BNP. *Nukleární medicína* 2017; 6 č. 3-S1.

Cervenak J., **Cepa A.**, Ralis J., Tomes M., Kontrova K., Vlk M., Lebeda O. Conjugation, radiolabelling and *in vitro* studies of VAP-P1, a vascular adhesion protein-1 targeting peptide. *WFNMB* 2018; Melbourne.

## PŘÍLOHY

### 1) Publikace:

**Cepa A.**, Ralis J., Kral V., Paurova M., Kucka J., Humajova J., Laznicek M., Lebeda O. In vitro evaluation of the monoclonal antibody  $^{64}\text{Cu}$ -IgG M75 against human carbonic anhydrase IX and its in vivo imaging. Applied Rad Isotop 2018; 133: 9-13.

### 2) Manuskript:

**Cepa A.**, Ralis J., Maresova L., Kleinova M., Seifert D., Sieglova I., Kral V., Polasek M., Paurova M., Laznicek M., Lebeda O. Radiolabeling of the antibody IgG M75 for epitope of human carbonic anhydrase IX by  $^{61}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$  and its biological testing. Applied Rad Isotop 2018; v recenzním řízení.

### 3) Kapitola v knize:

Santos-Oliveira R., Kozempel J., **Cepa A.**, Vlk M. Radiopharmaceuticals: Application, Insights and Future. Lamb Acad Publish 2016; 142-205; kapitola v odborné knize.