

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra fyziky a fyzikálnej chémie

Študentka: Nikola Holodňáková

Školiteľ: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Názov diplomovej práce: In vitro saturačné štúdie gáliom-67 a zirkóniom-89 značenej monoklonálnej protilátky ramucirumab na SKOV-3 bunkovej línii

Vývojom nových liečebných postupov v onkológii má čoraz väčšie postavenie cieľená biologická liečba, ktorá stimuluje imunitný systém k boju s nádorovými bunkami. Významným pokrokom v celení nádorov bolo zavedenie monoklonálnych protilátok, ktoré predstavujú jednu z novších možností využiteľných v diagnostike i terapii nádorov. Využíva sa schopnosť monoklonálnych protilátok rozpoznať a viazať sa špecificky na antigény nádorových buniek, akým je aj receptor pre VEGF typu 2 (VEGFR-2), na ktorý sa viaže monoklonálna protilátka ramucirumab. Blokáciou tohto receptora sa inhibuje angiogenéza, a tým sa zabráni rastu nádorov. Spojením monoklonálnej protilátky s inou molekulou (rádionuklid, toxín, cytostatikum) za tvorby konjugátov je možné zvýšiť jej protinádorový účinok, čo pre diagnostické i terapeutické účely využíva i odbor nukleárna medicína.

Cieľom predloženej práce bolo metódou nepriameho značenia pomocou chelátoru deferoxamínu (DFO) pripraviť rádioaktívnymi nuklidmi (^{67}Ga a ^{89}Zr) značený ramucirumab. U pripravených rádiofarmák sa zisťovala ich rádiochemická čistota a stabilita prostredníctvom analytických metód vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s rádiometrickou detekciou a instantnej tenkovrstvej chromatografie. Pomocou klasickej manuálnej saturačnej techniky sa na bunkovej kultúre SKOV-3 overila schopnosť rádioaktívne značenej protilátky zachovať si afinitu k receptoru VEGFR-2 pomocou stanovenia rovnovážnej disociačnej konštanty K_D tejto interakcie. Taktiež súčasťou biologickej štúdie zirkóniom-89 značeného ramucirumabu bolo analyzovať *in vivo* orgánovú biodistribúciu pripraveného rádiofarmaka a pomocou systému PET/CT zobrazit' indukované nádorové útvary exprimujúce VEGFR-2 u myší.

Výsledky stanovení rádiochemickej čistoty potvrdili, že sa podarilo pripraviť rádioimunokonjugáty s čistotou nad 95 % ako požaduje Európsky liekopis pre rádiofarmaká podávané pacientom. Pripravené rádiopreparáty si požadovanú rádiochemickú čistotu udržali aj po dobu troch dní. V *in vitro* saturačných štúdiách sa dosiahla pre tri opakované nezávislé merania priemerná hodnota disociačnej konštanty pre $^{67}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DFO-ramucirumab}$ $K_D = 35,94 (\pm 7,30)$ nM a pre $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-ramucirumab}$ $K_D = 27,44 (\pm 8,14)$ nM, z čoho vyplýva, že oproti neznačenému (natívnemu) RAM ($K_D = 1\text{-}2$ nM) sa o niečo málo znížila afinita k cieľovému receptoru, ale stále bola dostačujúca pre ďalšie potenciálne štúdie. V prípade *in vivo* testovania u $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}]\text{-DFO-ramucirumab}$ sa potvrdili dáta získané z *in vitro* meraní. *Ex vivo* biodistribučná štúdia preukázala hromadenie rádioaktívne značeného ramucirumabu v indukovanom SKOV-3 nádore už 1. deň od aplikácie, pričom maximum aktivity v nádore bolo namerané v 3. deň. Zároveň PET/CT zobrazovacia metóda podporila *ex vivo* experimenty zreteľným zobrazením nádoru na výsledných snímkach.

V závere môžeme zhodnotiť, že výsledky potvrdili potenciál ramucirumabu pre zobrazovanie VEGFR-2 pozitívnych nádorov vďaka úspešnému otestovaniu pripraveného ^{67}Ga - a ^{89}Zr -značeného ramucirumabu. Navyše, využitie ^{89}Zr pre rádioaktívne značenie podčiarkuje výhodu pripraveného rádiofarmaka pre zobrazovanie angiogénneho procesu v diagnostike a monitoringu liečby vďaka svojim perspektívnym zobrazovacím vlastnostiam PET žiariča. Avšak, nevýhodou stále zostáva jeho vysoká nákupná cena.

Kľúčové slová: gálium-67, *in vitro* saturačné štúdie, monoklonálna protilátka, PET/CT, rádioaktívne značenie, ramucirumab, SKOV-3, VEGFR-2, zirkónium-89