

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra organické chemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Medicinální chemie



Andrea Stránská

Syntéza, charakterizace a studium vlastností funkčních konjugátů  
protilátek

Synthesis, characterization and study of the properties of functional antibody  
conjugates

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: prof. Mgr. Martin Hrubý, Ph.D., DSc.

Praha, 2024



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis .....



## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala všem, kteří mi v průběhu bakalářského studia pomohli, ať už nabytím nových zkušeností či získáním dat, díky kterým mohla být sepsána tato práce.

Největší poděkování patří mému školiteli prof. Mgr. Martinu Hrubému, Ph.D., DSc. za poskytnutí velmi naplňující příležitosti, obrovskou vstřícnost, za odborné vedení a korektury mé bakalářské práce a také Mgr. Miroslavu Vetríkovi, Ph.D. a RNDr. Janu Kučkovi, Ph.D. za skvělou supervizi v rámci experimentální části. Zároveň bych chtěla poděkovat všem lidem na Ústavu makromolekulární Akademie věd ČR, a zvláště celému týmu vědeckého oddělení „Nadmolekulárních polymerních systémů“ za možnost pracovat ve skvělém kolektivu, jejich pomoc a cenné rady.

Výsledky této práce by nemohly být sepsány bez pomoci následujících pracovníků: doc. RNDr. Jána Kozempela, Ph.D, a RNDr. Martin Vlka, Ph.D. z ČVUT, kteří mi poskytlí radioaktivní terbium-161 a za pomoc RNDr. Martina Vlka, Ph.D. při radioznačení konjugátu. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Martině Kabešové z 1. lékařské fakulty na Univerzitě Karlově a Mgr. Leaně Vratovič z týmu „Nadmolekulárních polymerních systémů“ za pomoc při *in vitro* experimentech s radioimunokonjugáty a fluorescenčně označenými protilátkami; dále Ing. Zuzaně Walterové z laboratoře analytické chemie pod vedením RNDr. Olgy Kočkové, Ph.D. za poskytnutí výsledků z MALDI-TOF. V neposlední řadě bych velmi ráda poděkovala Ing. Pavle Francové z Centra pokročilého preklinického zobrazování v rámci 1. lékařské fakulty pod vedením RNDr. Lud'ka Šefce, CSc. za možnost účastnit se *in vivo* experimentů a Ing. Martinovi Dušovi za zpracování výsledků z biodistribuce radioimunokonjugátu ve zdravé myši ze SPECT/CT ve vysoké kvalitě ve formě obrázků a videí. Poděkování patří také vědeckým pracovníkům z Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR RNDr. Janu Petráškovi, Ph.D. a Mgr. Janu Martínkovi za poskytnutí dat z experimentů konjugátu AuNP-protilátka.

Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a svým přátelům za podporu při studiu na Karlově univerzitě.

## ABSTRAKT

Radioimunoterapie spojuje biologickou léčbu s využitím vysoce účinného radioaktivního záření, což umožňuje efektivnější a šetrnější terapii nádorových onemocnění. Tato bakalářská práce se zaměřuje na využití terapeutického radioizotopu  $^{161}\text{Tb}$ , který se vyznačuje emisí nízkoenergetických elektronů a gama záření umožňující monitorování terapie a cílení na nádorové buňky, metastázy a celé nádory. Tento teranostický přístup nabízí zvýšenou účinnost léčby, zejména v raných stádiích onemocnění. Práce se zabývá modelovou studií konjugátů monoklonální protilátky rituximab, které byly fluorescenčně označeny za použití fluoresceinové značky. Kovalentní vazba mezi imunoterapeutickým konjugátem a fluorescenční značkou byla realizována za využití volných aminoskupin lysinů a pomocí bioortogonální chemie. Byl vyvinut biologicky aktivní konjugát protilátky s fluorescenční značkou, který umožnil přímé sledování vazby konjugátu na buňky s expresí CD20 pomocí konfokálního mikroskopu. Následně byl testován radioaktivní konjugát rituximabu, modifikovaný chelátorem *p*-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA, označený radioizotopem  $^{161}\text{Tb}$ . Biologická aktivita radioimunokonjugátu byla stanovena pomocí *in vitro* experimentů. Biodistribuce radioimunokonjugátu byla sledována po intravenózním podání, přičemž *in vivo* testy prokázaly retenci látky v těle pokusného laboratorního zvířete. Dále byly modifikovány nanočástice zlata protilátkami isotypu IgG s fluorescenčními značkami, které lze využít pro zobrazování rostlinných tkání pomocí fluorescenční a transmisní elektronové mikroskopie.

## ABSTRACT

Radioimmunotherapy combines biological treatment with the use of highly effective radioactive radiation, which allows for more effective and gentle cancer therapy. This bachelor thesis focuses on the use of the therapeutic radioisotope  $^{161}\text{Tb}$ , which is characterized by the emission of low-energy electrons and gamma rays that allow monitoring of therapy and targeting of cancer cells, metastases and whole tumors. This theranostic approach offers increased treatment efficacy, especially in the early stages of the disease. This thesis focuses on a model study of rituximab monoclonal antibody conjugates that have been fluorescently labelled using a fluorescein tag. Covalent binding between the immunotherapeutic conjugate and the fluorescent label was accomplished using free amino groups of lysines and bioorthogonal chemistry. A biologically active antibody conjugate with a fluorescent label was developed that allowed direct monitoring of the conjugate binding to CD20-expressing cells using confocal microscopy. Subsequently, a radioactive conjugate of rituximab, modified with the p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA chelator and radiolabeled with the  $^{161}\text{Tb}$  radioisotope, was tested. The biological activity of the radioimmunoconjugate was determined by in vitro experiments. Biodistribution of the radioimmunoconjugate was monitored after intravenous administration, and in vivo tests showed retention of the substance in the body of the experimental laboratory animal. Furthermore, gold nanoparticles were modified with isotype IgG antibodies with fluorescent labels that can be used for imaging plant tissues by fluorescence and transmission electron microscopy.

## SEZNAM ZKRATEK

ADC	konjugát protilátka-léčivo ( <i>antibody-drug conjugate</i> )
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na antigenu ( <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> )
ADCP	buněčná fagocytóza závislá na protilátkách ( <i>antibody-dependent cell phagocytosis</i> )
AE	Augerovy elektrony
Ala	alanin
Arg	arginin
AuNPs	zlaté nanočástice
BCA	kyselina bicinchoninová ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BCN	bicyklonon
BCR	B-buněčný receptor ( <i>B-cell receptor</i> )
BFC	bifunkční chelátor
BTRT	biologicky cílená radionuklidová terapie ( <i>biologically targeted radionuclide therapy</i> )
CD20	B-lymfocytární antigen CD20
CDC	cytotoxicita závislá na komplementu ( <i>complement-dependent cytotoxicity</i> )
CE	konverzní elektrony ( <i>conversion electrons</i> )
Cit	citrulin
CT	výpočetní tomografie ( <i>computed tomography</i> )
CuAAC	azid-alkin cykloadice katalyzovaná mědí
Cys	cystein
DAR	hodnota udávající poměr protilátka-léčivo ( <i>drug-antibody ratio</i> )
DIBAC	azadibenzocyklooktyn
DIBO	4-dibenzocyklooktynol
DLBCL	difúzní velkobuněčný B-lymfom
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyseliny ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklodekán-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina



DTT	dithiothreitol
EBRT	teleterapie, ozařování z vnějšího zdroje ( <i>external beam radiotherapy</i> )
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EM	elektronová mikroskopie
Fab	fragmentová oblast vázající antigen ( <i>fragment antigen binding</i> )
Fc	<i>fragment crystalline</i>
FcRn	neonatální Fc receptor ( <i>neonatal Fc receptor</i> )
FITC	fluorescein isothiokyanát
FL	folikulární lymfom
FM	fluorescenční mikroskopie
GFP	zelený fluorescenční protein ( <i>green fluorescein protein</i> )
Glu	glutamin
Gly	glycin
HACA	lidské antichimérické protilátky ( <i>human anti-chimeric antibody</i> )
HAMA	protilátky proti myším protilávkám ( <i>human anti-mouse antibody</i> )
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
CHX-DTPA	[( <i>R</i> )-2-amino-3-(4-isothiokyanátofenyl)propyl]- <i>trans</i> -( <i>S,S</i> )-cyclohexan-1,2-diaminpentaoctová kyselina
IEDDA	inverzní Diels-Alderova reakce ( <i>inverse electron demand Diels-Alder reaction</i> )
Ig	imunoglobulin
i.m.	intramuskulární aplikace
i.v.	intravenózní aplikace
LET	lineární přenos energie ( <i>linear energy transfer</i> )
Lys	lysin
mAb	monoklonální protilátka ( <i>monoclonal antibody</i> )
MAC	komplex membránového útoku ( <i>membrane attack complex</i> )
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací s průletovým analyzátozem ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry</i> )
m.f.	mobilní fáze

MHC	hlavní histokompatibilitní komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MIRD	lékařská dozimetrie vnitřního ozáření ( <i>medical internal radiation dosimetry</i> )
MRI	zobrazení magnetickou rezonancí ( <i>magnetic resonance imaging</i> )
MS	hmotnostní spektrometrie ( <i>Mass Spectrometry</i> )
NCS	isothiokyanát
NHL	non-Hodgkinův lymfom
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NIH	Národní onkologický ústav ( <i>National Cancer Institute</i> )
NK buňka	<i>natural killer cell</i> („přirozený zabiják“, typ imunitní buňky)
NP	nanočástice
PBS	fyziologický roztok pufovaný fosfátem ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PET	pozitronová emisní tomografie ( <i>Positron Emission Tomography</i> )
Phe	fenylalanin
PP	plán pokusu
p-SCN-Bz-DTPA	4-isothiokyanatobenzyl-diethyl-triamin-pentaoctová kyselina
r.f.	retenční faktor
RIT	radioimunoterapie
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku ( <i>reactive oxygen species</i> )
RVO	rotační vakuová odparka
s.c.	subkutánní aplikace
SCMM	sukcinimidyl-4-( <i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexan-1-karboxylát
SEC	rozměrově vylučovací chromatografie ( <i>size exclusion chromatography</i> )
s.f.	stacionární fáze
SNMMI	Společnost nukleární medicíny a molekulárního zobrazování ( <i>Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging</i> )
SPAAC	Azid-alkyn cykloadice bez použití katalyzátoru ( <i>copper-free azide-alkyne cycloaddition</i> )
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie ( <i>single-photon emission computed tomography</i> )

TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TCO	transcyklookten
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TFP	tetrafluorfenyl
TLC	tenkovrstvá chromatografie ( <i>thin layer chromatography</i> )
Val	valin
WR	pracovní roztok pro BCA esek ( <i>working reagent</i> )

## OBSAH

1. ÚVOD .....	15
2. LITERÁRNÍ ČÁST.....	17
2.1 Radionuklidy pro medicínu .....	17
2.1.1 Historie a vývoj nukleární medicíny .....	17
2.1.2 Terapeutické přístupy v nukleární medicíně .....	18
2.1.3 Volba vhodného radionuklidu ke klinické praxi .....	19
2.1.4 Vlastnosti jednotlivých radionuklidů a jejich využití pro terapii .....	20
2.2 Biologická léčba .....	22
2.2.1 Struktura protilátek a jejich klasifikace.....	23
2.2.2 Farmakokinetika protilátek.....	24
2.2.3 Rituximab a další anti-CD20 protilátky .....	26
2.3 Konjugační strategie – chelátory, bioortogonální chemie.....	29
2.3.1 Konjugáty protilátka-léčivo (ADC) – úvod a mechanismus účinku .....	29
2.3.2 Linkery .....	31
2.3.3 Konstrukce radioimunofarmak a výběr vhodného chelátoru .....	33
2.3.4 Konjugační strategie.....	36
2.3.5 Bioortogonální chemie .....	39
2.4 Radioimunoterapie .....	43
2.4.1 Radioimunoterapie cílená na CD20+ non-Hodgkinovy lymfomy .....	44
2.5 Použití kovových nanočástic jako značek pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM).....	47
3. CÍLE PRÁCE .....	49
4. MATERIÁLY A METODIKA .....	50
4.1 Použité chemikálie .....	50
4.2 Příprava fluorescenčně a radioznačených konjugátů s rituximabem – charakterizace a biologické experimenty .....	51

4.2.1	Příprava konjugátu rituximab-FITC .....	51
4.2.2	Stanovení obsahu přečištěného rituximabu pomocí UV-VIS spektrofotometrie .....	52
4.2.3	<i>In vitro</i> experimenty za využití fluorescenční spektroskopie (FS) .....	54
4.2.4	Příprava konjugátu rituximab-TCO-tetrazin-FITC .....	54
4.2.5	Izolace ligandu tetrazin-FITC pomocí sloupcové chromatografie.....	55
4.2.6	Bioortogonální reakce – <i>in vitro</i> experiment.....	56
4.2.7	Příprava konjugátu rituximab- <i>p</i> -SCN-Bn-CHX-A''-DTPA- <sup>161</sup> Tb.....	56
4.2.8	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	57
4.2.9	Stanovení obsahu protilátky v konjugátu rituximab- <i>p</i> -SCN-Bn-CHX-A''-DTPA pomocí UV-VIS spektrofotometrie .....	58
4.2.10	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací s průletovým analyzátozem (zkr. MALDI-TOF; <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass spectrometry</i> ) .....	59
4.2.11	<i>In vitro</i> experiment s radioimunokonjugátem .....	59
4.2.12	<i>In vivo</i> biodistribuce radioimunokonjugátu ve zdravé myši .....	60
4.3	Modifikace zlatých nanočástic protilátkami – biologické experimenty.....	60
4.3.1	Modifikace zlatých nanočástic protilátkou fluorescenčně označenou 555 Alexa fluor barvivem .....	60
4.3.2	Modifikace zlatých nanočástic protilátkou fluorescenčně označenou 488 Alexa fluor barvivem .....	61
4.3.3	Fluorescenční mikroskopie .....	61
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	62
5.1	Příprava, charakterizace a biologické experimenty fluorescenčně a radioznačitelných konjugovaného rituximabu .....	62
5.1.1	Stanovení koncentrace přečištěné protilátky a protilátky v připraveném konjugátu .....	62
5.1.2	Stanovení hodnoty DAR metodou MALDI-TOF .....	64
5.1.3	Konjugát rituximab-FITC .....	66

5.1.4	Konjugát rituximab-TCO-tetrazin-FITC.....	67
5.1.5	Konjugát rituximab- <i>p</i> -SCN-Bn-CHX-A''-DTPA- <sup>161</sup> Tb.....	72
5.2	Modifikace zlatých nanočástic protilátky a biologické experimenty.....	79
5.2.1	Modifikace zlatých nanočástic protilátkou fluorescenčně označenou 555 Alexa fluor barvivem .....	79
5.2.2	Modifikace zlatých nanočástic protilátkou fluorescenčně označenou 488 Alexa fluor barvivem .....	80
6.	ZÁVĚR.....	82
7.	SEZNAM LITERATURY .....	83

# 1. ÚVOD

Mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí se stále řadí nádorové onemocnění. V průběhu let byla vyvinuta řada strategií k jejich léčbě, mezi které se řadí například velmi úspěšná chemoterapie, avšak její nevýhodou je, že způsobuje velmi závažné nežádoucí účinky způsobené necílenou toxicitou. Proto byla vyvinuta nová strategie terapeutického přístupu léčby onkologických onemocnění, která využívá konjugáty protilátka-léčivo. Jedná se o skupinu kancerostatik, kdy se na biologickou molekulu kovalentně naváže malá molekula pomocí vhodné konjugační metody. Jeden z těchto přístupů je nescifická konjugace volné nukleofilní  $\epsilon$ -aminoskupiny s elektrofilem, například isothiokyanátem (NCS), kdy vzniká kovalentní thiomocovinová vazba. Velmi zajímavým konjugačním přístupem je využití tzv. „click“ reakce. Tato bioortogonální reakce je vysoce selektivní, neovlivňuje biologickou aktivitu biomolekul ani biologické procesy a lze ji tak provádět na živých buňkách nebo v živých systémech. Tímto způsobem připravené konjugáty umožňují selektivní doručení silné cytotoxické nálože do cílových buněk, zvyšuje se tak účinnost terapie a výrazně se snižuje toxicita ve srovnání s volnou formou léčiva.

Mezi biologicky cílenou terapii onkologických onemocnění se řadí systémová radioimunoterapie, která kombinuje použití radionuklidů, které emitují vysoce cytotoxické ionizující záření s biologicky cílenou léčbou, nejčastěji v podobě protilátek, jakožto nosičových molekul, které dopraví radionuklid do cílové nádorové buňky. Jedním z nejúspěšnějších cílů doposud je antigen CD20. Jedná se o transmembránový protein na povrchu B-buněčných imunitních buněk, který není exprimován na jiných normálních buňkách těla, proto je tento antigen relativně bezpečný a účinný protinádorový cíl.

Velmi důležitou volbou při vývoji nového radioimunofarmaka mimo jiné hraje roli výběr radionuklidu. Perspektivní alternativou k osvědčenému  $^{177}\text{Lu}$  by mohl být nově zkoumaný radionuklid  $^{161}\text{Tb}$ . Díky svým charakteristickým vlastnostem by mohl být využit pro ozařování jednotlivých nádorových buněk a mikrometastáz. Tyto dva radionuklidy sdílejí stejné chemické vlastnosti a lze tedy pro oba využít stejné metody radioznačení. Výhodou  $^{161}\text{Tb}$  je jeho potenciální využití v teranostice.

V této práci byl připraven radioimunokonjugát, jehož nosičovou molekulou byl rituximab, což je protilátka, která se váže na CD20 antigen exprimovaný na B-buňkách a B-lymfomech, k přípravě konjugátu s perspektivním novým radionuklidem  $^{161}\text{Tb}$ .

Druhá část práce je zaměřena na modifikování zlatých nanočástic fluorescenčně označenými protilátkami. Zlaté nanočástice mají pozoruhodné vlastnosti a kovové nanočástice lze využít

jako značky pro zobrazování tkáňových struktur. Jednou z jejich vlastností je silná afinita k thiolům, přes které je lze modifikovat protilátkami s fluorescenčními značkami. Lze tak propojit fluorescenční mikroskopii k lokalizaci zlatých nanočástic s protilátkami navázané na konkrétní tkáňové struktury a zároveň využít transmisní elektronovou mikroskopii pro detailnější studium.



## 2. LITERÁRNÍ ČÁST

### 2.1 Radionuklidy pro medicínu

#### 2.1.1 Historie a vývoj nukleární medicíny

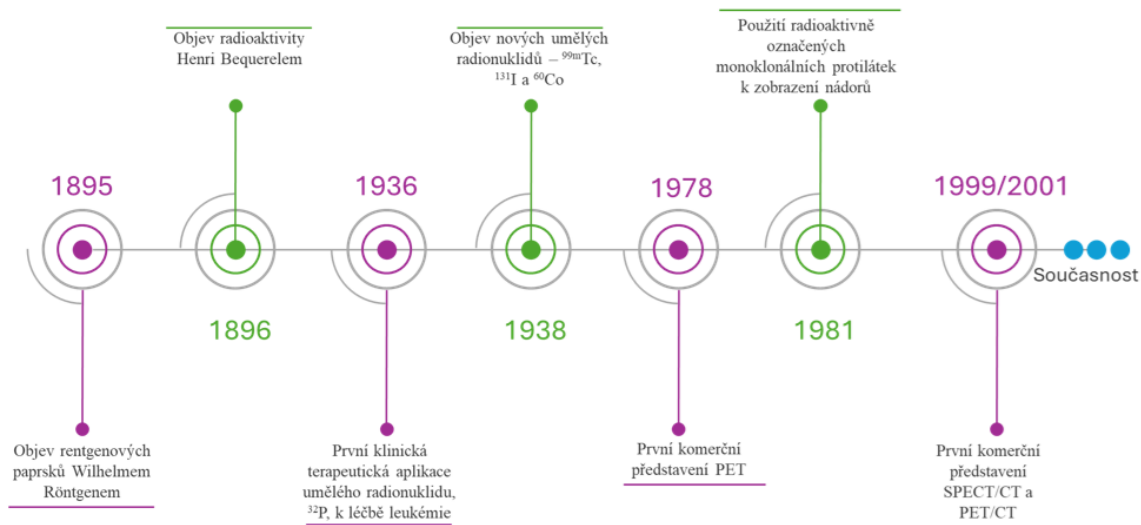
Objev radioaktivity a následné zkoumání vlastností radionuklidů významně ovlivnil důležitý rozvoj medicíny. Úplné počátky se datují od roku 1896, kdy Henri Becquerel objevil radioaktivitu, necelý rok po objevu rentgenových paprsků („záření X“) Wilhelmem Röntgenem. Bequerel se zabýval nově objeveným rentgenovým zářením a studiem jejich efektů a efektů světla na uranové soli. Během experimentů náhodou zaznamenal pronikavé záření vyzařující z uranových solí na fotografické desce, čímž se mu podařilo zachytit nový jev, radioaktivitu. Marie a Pierre Curieovi (v roce 1898 Marie Curie objevila radium, přirozený zdroj  $\gamma$  záření), spolu s Henrim Bequerelem, byli v roce 1903 oceněni Nobelovou cenou za fyziku za objev radioaktivity<sup>1,2</sup>.

V roce 1934 se manželům Fredericovi Joliot a Irene Curie (dceři Marie Curie) podařilo připravit první umělý radionuklid, a popsat tak umělou radioaktivitu, což otevřelo cestu k produkci nových radionuklidů s širokým spektrem využití. V roce 1937 Carlo Perrier a Emilio Segrè uměle připravili technecium, prvek bez stabilního isotopu. Dnes vůbec nejvyužívanějším radionuklidem pro nukleární medicínu je technecium ( $^{99m}\text{Tc}$  se využívá jako radionuklid pro SPECT)<sup>1,3</sup>.

S objevem radia vznikla klinická radioterapie, která se začala rychle rozvíjet. Již v roce 1896 Emil Grubbe využil záření X k léčbě rakoviny prsu, čímž zavedl první radioterapeutickou léčbu. Od roku 1936 se pro léčebné účely začaly využívat  $\beta^-$  zářiče, mezi prvními byly  $^{24}\text{Na}$  a  $^{32}\text{P}$  k léčbě hematologických onemocnění<sup>4</sup>. V 50. letech 20. století se v klinické praxi začaly používat nové umělé radionuklidy, jako například  $^{60}\text{Co}$ , které přispěly k rozvoji teleterapie s vysokoenergetickými zářiči. V 50. a 60. letech 20. století vznikl nový koncept pro molekulární zobrazování pomocí metod jednofotonové emisní počítačové tomografie (SPECT) a pozitronové emisní tomografie (PET). Tyto techniky umožňují sledovat distribuci a akumulaci radioaktivně označených látek v těle, což má významné využití v diagnostice a výzkumu léčby různých onemocnění, včetně nádorových onemocnění<sup>5,6</sup>.

Dlouho zkoumaným  $\beta$  zářičem byl radionuklid  $^{131}\text{I}$ , díky jeho schopnosti cíleně se hromadit v diferenciováných buňkách štítné žlázy. Pozdější vývoj nosičových molekul otevřel nový směr v terapii – cílenou terapii, která využívá nové radionuklidy, jako je  $^{177}\text{Lu}$  a  $^{90}\text{Y}$ <sup>4</sup>. Radioisotopy

jódu ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$  a  $^{124}\text{I}$ ) zahájily počáteční éru teranostiky, léčebné strategie, která spojuje diagnostické přístupy s biologicky cílenou radioterapií<sup>7,8</sup>.



**Obr. č. 1:** Historická časová osa vývoje radionuklidů a nukleární medicíny, inspirována podle historické osy SNMMI<sup>9</sup> a ze zdroje<sup>7</sup>

### 2.1.2 Terapeutické přístupy v nukleární medicíně

Využití radionuklidů v nukleární medicíně spočívá v terapii určitých typů onemocnění, zejména rakoviny, a v zobrazovacím metodách, které mimo jiné umožňují získat informace o specifické činnosti jednotlivých orgánů pacienta. Podle Světové jaderné asociace (*World Nuclear Association*) se v Evropě každoročně uskuteční přibližně 10 milionů procedur v oblasti nukleární medicíny, z nichž kolem 2 milionů připadá na terapeutické zákroky<sup>10</sup>.

Terapeutický efekt ionizujícího záření spočívá v cílené likvidaci nádorových buněk v organismu. Některá rakovinná bujení lze inaktivovat, popřípadě i eliminovat, velmi přesným vysokodávkovým ozářením malého cíleného objemu. Tento postup obvykle zahrnuje použití více cíleně nasměrovaných paprsků ionizujícího záření a je znám jako **radiochirurgie**<sup>8,10</sup>.

Mezi terapeutické přístupy se dále řadí teleterapie, kdy se využívá ozařování z vnějšího zdroje (např. pomocí  $\gamma$  paprsku z radioaktivního zdroje  $^{60}\text{Co}$ ), která se označuje zkratkou **EBRT** (*external beam radiotherapy*). Naopak, protikladným přístupem je „vnitřní“ ozařování pomocí vloženého uzavřeného radionuklidového zářiče (obvykle  $\gamma$  nebo  $\beta$  zářiče), metoda se nazývá **brachyterapie**. Tento terapeutický postup způsobuje menší celkové ozáření těla, protože je zaměřen více na cílový nádor, podmínkou však musí být mechanická dostupnost a známá lokalizace nádorového ložiska<sup>8,10</sup>.

Dalším terapeutickým přístupem je biologicky cílená radionuklidová terapie (označována jako **BTRT**, *Biologically Targeted Radionuclide Therapy*), kdy se do organismu systémově

aplikuje radionuklid navázaný na nosičovou molekulu. Tímto způsobem je možné selektivně dopravit radiofarmakum do cílové nádorové buňky bez nutnosti znát její přesnou lokalizaci, což je výhodné zejména u mnohočetných metastatických rozsevů. Další výhodou je možnost vizualizovat biodistribuci radionuklidů, což je využitelné v koncepci **teranostiky**<sup>8</sup>.

### 2.1.3 Volba vhodného radionuklidu ke klinické praxi

Pro klinické využití radionuklidů v terapii je nezbytné zohlednit jejich vlastnosti. Požadavky na terapeutický radionuklid lze rozdělit do dvou hlavních kategorií, a to fyzikální a biochemické vlastnosti<sup>11</sup>. Další podmínkou je praktická vyrobiteľnosť v dostatečných aktivitách za rozumných ekonomických podmínek (to je chronický problém např. <sup>67</sup>Cu, jinak vlastnostmi excelentního teranostického zářiče).

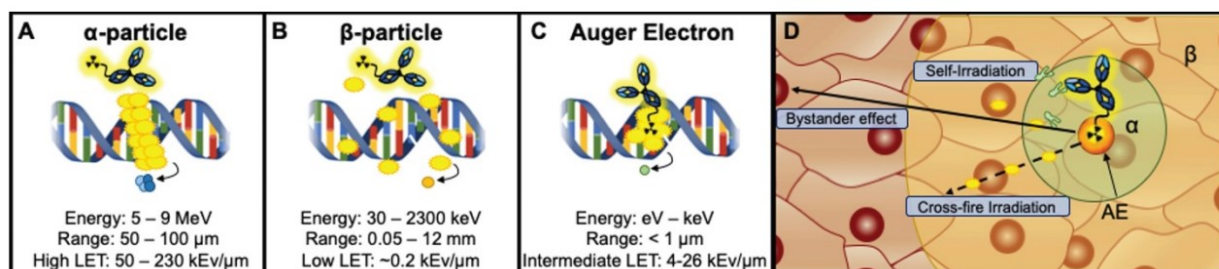
Mezi fyzikální vlastnosti patří poločas rozpadu, typ emitovaného záření, energie záření, dceřiné radionuklidy, způsob výroby a následná čistota radionuklidů. Jedním z klíčových fyzikálních faktorů je **efektivní poločas** radiofarmaka, který zohledňuje fyzikální poločas nuklidu ( $T_f$ ) a biologický poločas eliminace radiofarmaka ( $T_b$ ). Efektivní poločas ( $T_e$ ) lze stanovit pomocí komplexní výpočetní metody nazývané zkratkou MIRD (*medical internal radiation dosimetry*), která kombinuje fyzikální vlastnosti radionuklidu a biologické faktory, jako je biodistribuce radiofarmaka, clearance, jeho metabolismus a vylučování [konečným výrazem shrnuta jako  $T_e = T_p T_b / (T_p + T_b)$ ]. Vhodný rozsah poločasu rozpadu terapeutického radionuklidu je obvykle mezi 6 hodinami až 7 dny a měl by odpovídat kinetice cílového ligandu. Pro terapeutické využití je také vhodné záření s vysokým lineárním přenosem energie (**LET**, *linear energy transfer*; tzn. velikostí ztráty energie na jednotku dráhy), což umožňuje velmi vysokou ionizaci na jednotku dráhy. Důležité je také uvážit **dceřiný produkt** radionuklidu, kterým by měl být v ideálním případě stabilní isotop, popřípadě dceřiné produkty přeměnové řady by měly mít krátký poločas rozpadu bez významné redistribuce do necílových oblastí<sup>8,11</sup>.

Biochemické aspekty zahrnují cílení na tkáň, zadržování radioaktivity v nádoru a *in vivo* toxicitu. Klíčovým parametrem je míra akumulace radiofarmaka, která by měla být co nejvyšší v cílových tkáních, aby byla minimalizována dávka záření dodaná okolním zdravým tkáním. Důležitá je i velikost nosičové molekuly vzhledem k její cílové destinaci, aby například nepronikala kapilárním řečištěm do jiných orgánů, pokud by byla moc malá, ale zároveň by měla být dostatečně malá, aby pronikla cévním řečištěm nádoru dostatečně hluboko. Mezi další biochemické vlastnosti patří nízká toxicita, vhodné pH a optimální clearance<sup>11</sup>.

## 2.1.4 Vlastnosti jednotlivých radionuklidů a jejich využití pro terapii

Využití radionuklidů pro radioimunoterapii a radioterapii spočívá v jejich cytotoxickém efektu. Radionuklidy emitují ionizující záření, které indukuje ionizaci a tvorbu volných radikálů, zejména reaktivních forem kyslíku (ROS). Tento proces vede k poškození tkáně na subcelulární úrovni. Oxidační stres způsobuje poškození DNA, může dojít k transverzi, bodové mutaci, kdy dochází k záměně purinové báze za pyrimidinovou, nebo obráceně, a k typickému poškození oxidací guaninových nukleobází na 8-oxoguaninové, což nakonec vede k buněčné smrti<sup>12</sup>.

Pro radioterapii se využívají  $\alpha$ ,  $\beta$  radionuklidy, a také emitory Augerových elektronů (AE). AE jsou elektrony s extrémně nízkou energií (1–10 keV), které vznikají při elektronovém záchytu během rozpadu radionuklidů. Tyto částice mají středně vysoký LET (4–26 keV/ $\mu$ m) a dosah do tkáně menší než průměr jedné buňky<sup>13</sup>. Vzhledem k jejich krátkému dosahu způsobují AE optimální poškození DNA, pokud jsou lokalizovány v těsné blízkosti jádra nádorové buňky. Proto je vhodné využít emitory AE pro BTRT a jako nosičové molekuly využít monoklonální protilátky (mAb) s internalizačními vlastnostmi. AE vyvolávají vedlejší účinky, nazývané „bystander“ efekt, které způsobují smrtelné biologické poškození sousedních buněk uvolněním mediátorů buněčné smrti<sup>14</sup>.



**Obr. č. 2:** Základní radionuklidy využívané v terapii jsou  $\alpha$ ,  $\beta$  zářiče a emitory Augerových elektronů (AE), které vykazují jedinečné charakteristiky rozpadu vedoucí k různým energiím a rozsahům v cílové tkáni známým jako lineární přenos energie (LET). **A.**  $\alpha$ -Zářiče mají nejvyšší LET způsobený vysokými energiemi částic (MeV) a střední délkou dráhy ( $\mu$ m). **B.**  $\beta$ -Zářiče mají střední energie (keV–MeV) s velkou délkou dráhy (mm) a produkují záření s nízkým LET, které může projít skoro 50 průměry buněk. **C.** Zářiče AE mají střední LET, díky nízkým energiím a vzdálenosti obvykle menší než 1  $\mu$ m. **D.** Znárodnění potenciálního rozsahu typu záření ( $\beta$  - žlutě;  $\alpha$  - zeleně a AE – oranžově). Kromě toho mohou radiofarmaka vyvolávat toxicitu u necílených okolních buněk crossfire“ efektem, případně může docházet k „bystander“ efektu. Obrázek převzat ze zdroje<sup>14</sup>.

Záření  $\alpha$  je neškodlivějším částicovým zářením a má dosah ve tkáni menší až srovnatelný dosah jako je průměr buňky, nedochází tak k cross-fire efektu. K vyvolání buněčné smrti může docházet již při zasažení buněk 1–4 částicemi  $\alpha$ , což umožňuje využití  $\alpha$  zářičů k léčbě reziduálních nádorů a leukémie. Avšak značnou nevýhodou je vyšší požadavek na efektivní účinný průnik léčiva do buněk<sup>12</sup>.

Více využívanými radionuklidy jsou proto  $\beta$  zářiče, které mají nižší toxicitu než  $\alpha$  zářiče, a jejich terapeutický efekt je způsoben především „crossfire“ efektem („efektem křížové palby“). Díky tomuto efektu mají  $\beta$  zářiče dosah penetrace až několik milimetrů, což lze využít k léčbě poměrně velkých solidních tumorů a ke zničení i nádorových buněk s necílovým fenotypem – velké nádory jsou vesměs fenotypově heterogenní (př.  $\beta$  zářičů:  $^{90}\text{Y}$  nebo  $^{188}\text{Re}$ ). Avšak nevýhodou vyšší penetrace je zvýšená pravděpodobnost poškození okolní zdravé tkáně<sup>12</sup>. Obr. č. 2 shrnuje emitované částice radionuklidů používaných pro terapii.

**Tab. č. 1:** Příklady radionuklidů pro terapeutické využití a jejich fyzikální vlastnosti

Radionuklid	$T_{1/2}$	Rozpadové vlastnosti [MeV]	Délka dráhy tkání
<b><math>\alpha</math>-zářiče</b>			
$^{225}\text{Ac}$ (aktinium-225)	9,9 d <sup>14</sup>	5,8–8,4 ( $\alpha$ ) <sup>14</sup>	47–85 $\mu\text{m}^{14}$
$^{212}\text{Bi}$ (bismut-212)	60,6 min <sup>14</sup>	6,05 (a, 36 %), 0,834 (b <sup>-</sup> , 64 %) <sup>14</sup>	51–92 $\mu\text{m}^{14}$
$^{212}\text{Pb}^*$ (olovo-212)	10,6 h <sup>14</sup>	6,05 ( $\alpha$ ) <sup>14</sup>	0,6 mm <sup>11</sup>
$^{223}\text{Ra}$ (radium-223)	11,4 d <sup>14</sup>	0,57 ( $\beta^-$ ) <sup>12</sup>	46–68 $\mu\text{m}^{14}$
$^{227}\text{Th}$ (thorium-227)	18,7 d <sup>14</sup>	5,8–7,53 ( $\alpha$ ) <sup>14</sup>	‡
<b><math>\beta</math>-zářiče</b>			
$^{67}\text{Cu}$ (měď-67)	2,6 d <sup>14</sup>	0,395( $\beta^-$ ) <sup>14</sup>	2,1 mm <sup>14</sup>
$^{131}\text{I}$ (jód-131)	8,0 d <sup>11</sup>	0,606 ( $\beta^-$ ) <sup>11</sup>	2,4 mm <sup>11</sup>
$^{177}\text{Lu}$ (Lutecium-177)	6,7 d <sup>14</sup>	0,497 ( $\beta^-$ ) <sup>11,14</sup>	1,8 mm <sup>14</sup>
$^{188}\text{Re}$ (Rhenium-188)	17 h <sup>14</sup>	2,12 ( $\beta^-$ ) <sup>11,14</sup>	10,4 mm <sup>14</sup>
$^{90}\text{Y}$ (yttrium-90)	2,7 d <sup>14</sup>	2,28 ( $\beta^-$ ) <sup>11,14</sup>	11,3 mm <sup>14</sup>
<b>Augerovy elektrony</b>		<b>Uvolněná/rozpadová energie AE [keV]</b>	
$^{64}\text{Cu}$ (měď-64)	12,7 h <sup>14</sup>	2 (AE, 41 %) <sup>14</sup>	126 nm <sup>14</sup>
$^{111}\text{In}$ (indium-111)	2,8 d <sup>14</sup>	6,8 (AE) <sup>14</sup>	2–500 nm <sup>14</sup>
$^{67}\text{Ga}$ (galium-67)	3,26 d <sup>14</sup>	6,3 (AE) <sup>14</sup>	0,002–2,1 $\mu\text{m}^{14}$

\* $^{212}\text{Pb}$  je  $\beta$ -zářič, ale produkuje dceřinný nuklid  $^{212}\text{Bi}$ , často se používá pro cílenou  $\alpha$ -terapii vzhledem ke krátkému poločasu rozpadu  $^{212}\text{Bi}$

‡  $^{227}\text{Th}$  nemá definovaný dosah  $\alpha$ -emisí v důsledku po sobě jdoucích  $\alpha$ -emitujících dceřiných isotopů

BTRT čelí dvěma výzvám: heterogenitě v případě velkých nádorů a úniku energie z mikroskopických nádorů. Heterogenita může být řešena použitím  $\beta$  zářičů se střední nebo vysokou energií díky „crossfire“ efektu, naproti tomu dodávají většinu energie okolním buňkám, čímž může být dávka nedostatečná pro eradikaci mikrometastáz a jednotlivých nádorových buněk. Každý radionuklid má dle jeho charakteristických vlastností optimální velikost nádoru, kterou může „vyléčit“. Například u  $^{90}\text{Y}$  se předpokládá, že je účinnější proti velkým nádorům (28–42 nm), zatímco  $\beta$ -částice emitované  $^{177}\text{Lu}$  jsou vhodnější k eliminaci

nádorů o průměru přibližně 1,2–3 mm, díky vysoké energii, to však nestačí k léčbě mikrometastáz<sup>15</sup>.

Nově zkoumaný radionuklid <sup>161</sup>Tb by mohl být perspektivní alternativou k <sup>177</sup>Lu pro ozařování jednotlivých buněk a mikrometastáz. <sup>161</sup>Tb vyzařuje středně energetické β–spektrum a mnohem větší počet AE s velmi nízkou energií než <sup>177</sup>Lu, spolu s konverzními elektrony (CE) s nízkou energií (většinou ≤ 40 keV) a malým procentem fotonů, což může být užitečné pro zobrazování pomocí SPECT/CT. Tím pádem může být aplikován v teranostice. <sup>177</sup>Lu a <sup>161</sup>Tb spolu sdílí společné chemické vlastnosti (oba jsou ze skupiny lanthanoidů) a lze tedy pro oba použít podobné vlastnosti radioaktivního značení. Navíc, <sup>161</sup>Tb může být užitečný i pro léčbu velkých nádorů s vysokou heterogenitou (nekróza, fibróza, stromální tkáň), která snižuje účinek „crossfire“ efektu<sup>15</sup>.

## 2.2 Biologická léčba

Podle Národního onkologického ústavu (*NIH, National cancer institute*) se k biologické léčbě používají látky vyrobené z živých organismů, které mohou buď přirozeně existovat v těle, nebo mohou být vytvořeny v laboratoři. Tyto látky mohou cíleně ovlivňovat imunitní systém, stimulovat, nebo potlačovat jeho reakce, aby pomohly tělu bojovat proti rakovině. Některé biologické terapie také přímo útočí na nádorové buňky, buď brzdí jejich růst, nebo je ničí. Mohou být také využity k zmírnění vedlejších účinků jiných léčebných metod používaných v onkologii<sup>16</sup>.

Na počátku 20. století se začala šířit myšlenka, že imunitní systém rozpoznává nádorové buňky jako cizorodé a reaguje na ně. Tato myšlenka vedla k formování hypotézy o protinádorovém imunitním dohledu, která by však naznačovala, že imunodeficitní jedinci mají vyšší frekvenci vzniku nádorových onemocnění. Teorie imunitní editace, též známá jako Teorie 3E, představuje vztah mezi imunitním systémem a nádory jako dynamický proces, ve kterém vzájemně interagují a ovlivňují se. Důležitý důsledek této interakce je postupná ztráta schopnosti (imunogenicity) nádorových buněk aktivovat imunitní systém, což znamená, že tyto buňky se adaptují tak, aby odolávaly účinkům imunitního systému<sup>17</sup>.

Novější třídy protinádorových léčiv se zaměřují na modulaci imunitního systému, a v tomto směru sehrají významnou roli monoklonální protilátky. Jejich hlavními výhodami jsou stabilita, minimální toxicita oproti cytostatikům a žádoucí farmakokinetické vlastnosti, jako je specifita a vysoká afinita k cílovému antigenu. Hlavním cílem vývoje exogenních monoklonálních protilátek je umožnit lidskému organismu rozpoznat patogeny nebo nádorové antigeny, které by jinak mohl přehlédnout<sup>18</sup>.

Součástí adaptivního imunitního systému jsou B-buňky, které rozpoznávají antigeny prostřednictvím B-buněčného receptoru (BCR). Po stimulaci CD4 pomocnými T-buňkami sekretují B-buňky kopie protilátek s jedinečným vazebným místem, které se specificky vážou na tyto cizorodé antigeny. B-buňky mají schopnost vytvářet obrovský soubor protilátek (odhaduje se, že až  $10^{11}$ ) a podléhají procesu selekce buněk, které produkují protilátky s vysokou specifitou a afinitou bez autoreaktivity vůči organismu, aby nezpůsobovaly autoimunitní onemocnění. Cirkulující protilátky (imunoglobuliny IgG) jsou schopny eliminovat antigeny dvěma mechanismy: buď přímým navázáním a neutralizací, nebo přilákáním dalších složek vrozené imunity, jako jsou proteiny komplementu, NK buňky, dendritické buňky a makrofágy<sup>18,19</sup>.

Výroba monoklonálních protilátek je založena právě na schopnosti B-buněk a jejich klonů produkovat stejnou protilátku. První metodou získávání velkého množství protilátek specifických pro vybrané antigeny byla technologie hybridomů. Tato metoda spočívá ve fúzi myelomových buněk s B-buňkami imunizovanými myši nebo potkany za vytvoření hybridomů. Výsledkem jsou monoklonální protilátky s nehumánním původem, což omezuje jejich klinické využití, protože myší protilátky mohou způsobit značnou imunogenicitu. Navíc v lidském těle nemohou interagovat s ostatními složkami imunitního systému. Tyto nedostatky byly částečně překonány vývojem chimérických a humanizovaných protilátek z hybridomových klonů, které nahradily části sekvence myší protilátky sekvencemi lidských protilátek. První schválenou chimérickou protilátkou pro klinické využití byl rituximab<sup>18,19</sup>.

### 2.2.1 Struktura protilátek a jejich klasifikace

Protilátky lze rozdělit do pěti hlavních tříd imunoglobulinů – IgG, IgA, IgD, IgE a IgM. Třídy IgG a IgA se dále dělí do 6 isotypů – IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 a IgA2. Každá protilátka má dvě funkční domény, a to Fab (*fragment antigen binding*), který zprostředkovává vazbu na cílový antigen, a Fc konec (*fragment crystalline*), který spojuje protilátku s efektorovými dráhami imunitního systému. Fc konec určuje efektorové funkce protilátky a může ovlivnit funkční kapacitu terapeutických protilátek. Z hlediska farmakokinetiky je klíčový vybrat vhodný isotyp protilátky<sup>18,20</sup>.

Pro vývoj terapeutických látek se velmi často využívá IgG1. IgG1 a IgG3 mají ze všech podtříd nejsilnější efektorové funkce vůči aktivním složkám imunitního systému (NK buňkám, makrofágům nebo dendritickým buňkám) a mohou je rekrutovat proti cíli (nádoru). IgG3 však byl z vývoje do značné míry vyloučen kvůli jeho sklonu k proteolýze, což snižuje jeho stabilitu, a kratšímu poločasu rozpadu oproti IgG1 (endogenní IgG1 má poločas rozpadu ~21 dní,

zatímco endogenní IgG3 má poločas rozpadu ~7 dní). Pokud je cílem neutralizace rozpustných antigenů, jsou efektorové funkce protilátek méně důležité a lze použít IgG1, IgG2 nebo IgG4. Příkladem úspěšných IgG1 protilátek na trhu je trastuzumab pro léčbu HER2+ karcinomu prsu. Nicméně konečné rozhodnutí o účinnosti dané protilátky je ovlivněno účinností *in vivo*, což je z velké části dáno farmakokinetickými parametry<sup>18,20</sup>.

Pro personalizaci terapie se dnes často využívá molekulární diagnostika pro personalizaci terapie, kdy se pacientovi před aplikací protilátky odebere vzorek nádorové buňky a zjistí se, zda pacientovy nádorové buňky exprimují konkrétní cíl, a tedy zda má zvolená terapie šanci na úspěch.

### 2.2.2 Farmakokinetika protilátek

Protilátky se výrazně odlišují od tradičních chemoterapeutik jak velikostí (~ 700 Da vs. ~150 kDa), tak i farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnostmi.

Většinou se protilátky podávají intravenózně (i.v.), mezi monoklonální protilátky schválené FDA se mimo jiné řadí pembrolizumab, ipilimumab, nivolumab a rituximab. U některých protilátkových preparátů se uvažuje o subkutánním (s.c.) nebo intramuskulárním (i.m.) podání, což by snížilo náklady na léčbu, protože by odpadla potřeba aktivní účasti zdravotnického personálu. Extravaskulárního podání má dvě **absorpční** cesty: difúzi přes cévy v blízkosti místa podání a konvekci lymfatickým systémem. Díky velké molekulární hmotnosti je však rychlost difúze nízká, a proto pravděpodobně převažuje konvekce<sup>18</sup>.

Protilátky skupiny IgG mohou interagovat s FcRn (*neonatal Fc receptor*), který má strukturu podobnou MHC glykoproteinům I. třídy. Tato vazba zprostředkovává „záchranný“ mechanismus, když je protilátka endocytována do buňky, a nedochází tak k lysozomální degradaci. FcRn je exprimován na různých typech buněk, včetně endoteliálních buněk, hepatocytů, střevních makrofágů, mononukleárních buněk periferní krve a dendritických buněk. IgG se váže na FcRn prostřednictvím Fc konce v závislosti na pH: při fyziologickém pH (pH 7,4) se neváže, ale v kyselém prostředí lysozomů (pH 5,5-6,5) se váže s vysokou afinitou. V časném endosomu se protilátky váží na FcRn a jsou dopraveny zpět na povrch buňky, čímž jsou „zachráněny“. Interakce s FcRn významně ovlivňuje biologickou dostupnost a prodlužuje poločas rozpadu protilátky. FcRn hraje také roli při absorpci protilátek cestou SC/IM, ale není zcela jasné, zda aktivně zprostředkovává transport protilátky do systémové cirkulace, nebo pouze brání jejímu katabolismu v místě injekce. Nižší počet protilátek podaných SC/IM může být způsoben sníženou biologickou dostupností a obavami z imunogenicity<sup>18,21</sup>.



**Distibuce** protilátek ve tkáních je ovlivněna jejich vazbou na cílové buňky, následnou endocytózou a odstraněním z tkání. Existují různé mechanismy, které mohou ovlivňovat distribuci protilátek z cévního do extravaskulárního systému, jako je pasivní difúze, konvekce a aktivní transcytoza. Pasivní difúze pravděpodobně nehraje zásadní roli kvůli velké velikosti protilátek. Z větší části se protilátky do tkání dostávají konvekcí, která je poháněna rozdílem tlaku mezi cévami a tkáněmi, záleží však na velikosti a počtu cévních pórů. Příklad transcytozy je například obousměrný transport protilátek přes membránu prostřednictvím interakce s FcRn receptorem. Po vstupu do nádoru se protilátka může distribuovat v intersticiálním prostoru prostřednictvím difúze, konvekce a vazby na cílové struktury. Protilátky jsou posléze odstraňovány z orgánů, a nemusí se tak ustanovit rovnováha mezi orgány a plazmou<sup>18,22</sup>.

Mezi hlavní cesty **eliminace** léčiv se řadí renální clearance (filtrace), biliární sekrece a biotransformace (metabolismus a katabolismus). Mezní molekulová hmotnost pro renální filtraci je <50 kDa, a protože jsou protilátky o dost větší, tak téhle formě eliminace nepodléhají. Protilátky podléhají především cílovému nebo necílovému katabolismu. Když se protilátka váže na svůj cíl pomocí Fab domény, podléhá receptorem zprostředkované endocytóze. Po internalizaci protilátky často podléhají katabolismu uvnitř lysozomu (pokud v cílových buňkách není přítomný FcRn). Tato hlavní cesta distribuce i eliminace se označuje jako cílově zprostředkovaná likvidace léčiv. Protilátky mohou podléhat i nespecifické endocytóze v případě IgG cirkulujících v plasmě, které podléhají endocytóze v endoteliálních buňkách. FcRn však „zachraňuje“ významnou část (> 90 %) IgG v periferní cirkulaci, které podléhají nespecifické endocytóze. Tento mechanismus souvisí s tím, proč mají protilátky neobvykle dlouhý poločas rozpadu, který se pohybuje od 2-3 dnů po 2-3 týdny. Typická plazmatická koncentrace IgG je přibližně 10 mg/ml a terapeutické protilátky se podávají v dávkách, které by změnily celkovou koncentraci IgG o < 2 %<sup>18,22</sup>.

Jakékoliv exogenně podané terapeutické protilátky do organismu mohou být imunogenní. První generace monoklonálních protilátek odvozených od hlodavců byly vysoce imunogenní, protože je lidský imunitní systém rozpoznal jako cizorodé. Chimérické protilátky, které mají lidskou Fc doménu a myší Fab domény, výrazně snížily imunogenicitu. V současné klinické praxi je většina protilátek humanizována, nebo se jedná o lidský IgG. Stále však i tyto protilátky mohou vyvolat imunitní reakci kvůli vloženým variabilním glykosylačním vzorcům, posttranslačním modifikacím a potenciální agregaci<sup>18,22</sup>.

### 2.2.3 Rituximab a další anti-CD20 protilátky

Rituximab je rekombinantní chimérická myší/lidská monoklonální protilátka IgG se specifickou vazbou proti CD20 proteinu. Byla to první terapeutická protilátka schválená ke klinickému využití. Od svého prvního schválení v roce 1997 se zlepšily výsledky léčby všech B-buněčných malignit. Kromě onkologických aplikací je rituximab také využíván k léčbě autoimunitních onemocnění, kde B-buňky sehrávají významnou roli. Mezi nově schválené anti-CD20 protilátky se řadí: ofatumumab, který váže odlišný epitop CD20, a obinutuzumab, mAb odvozená od rituximabu s modifikací Fc části a její glykosylací. Obě protilátky jsou plně humanizované a mají odlišnou aktivitu od rituximabu<sup>23</sup>.

#### 2.2.3.1 Cílová molekula anti-CD20 protilátek

CD20 je transmembránový protein (33-37 kDa) skládající se ze 4 hydrofobních domén, jedné intracelulární s N- a C- koncovou oblastí a dvěma extracelulárními smyčkami, které se označují jako malá a velká smyčka a představují část peptidu, na kterou jsou zaměřeny dnešní mAb. Exprese CD20 začíná v časném stádiu nezralých B-buněk, před tímto stádiem buněk (diferenciace a vývojová stadia B-buněk budou probrány níže) tento antigen není exprimován, také není známo, že by byl exprimován na jiných normálních buňkách těla, což udělalo z tohoto antigenu relativně bezpečný a účinný protinádorový cíl. Existují 3 izoformy CD20 antigenu, které jsou výsledkem různé fosforylace. Bylo zjištěno, že fosforylace CD20 je vyšší u proliferujících maligních B-buněk. U B-buněčných malignit je úroveň exprese CD20 velmi variabilní v závislosti na konkrétním nádoru. Exprese CD20 se ztrácí v terminálně diferencovaných plasmablastů a plasmatických buňkách.<sup>23,24</sup>

O jeho skutečné biologické funkci se toho ví málo. Je známo, že se podílí na influxu  $Ca^{2+}$  a ztráta cytoplasmatické části CD20 inhibuje aktivovaný příjem vápníku zprostředkovaný BCR. Předpokládá se, že hraje roli ve vývoji a aktivaci B-buněk prostřednictvím vtoku vápníku, zůstává však nejasné, zda tento protein je sám o sobě iontovým kanálem, nebo jaké další signální dráhy aktivuje, aby tuto funkci vyvolal<sup>23</sup>.

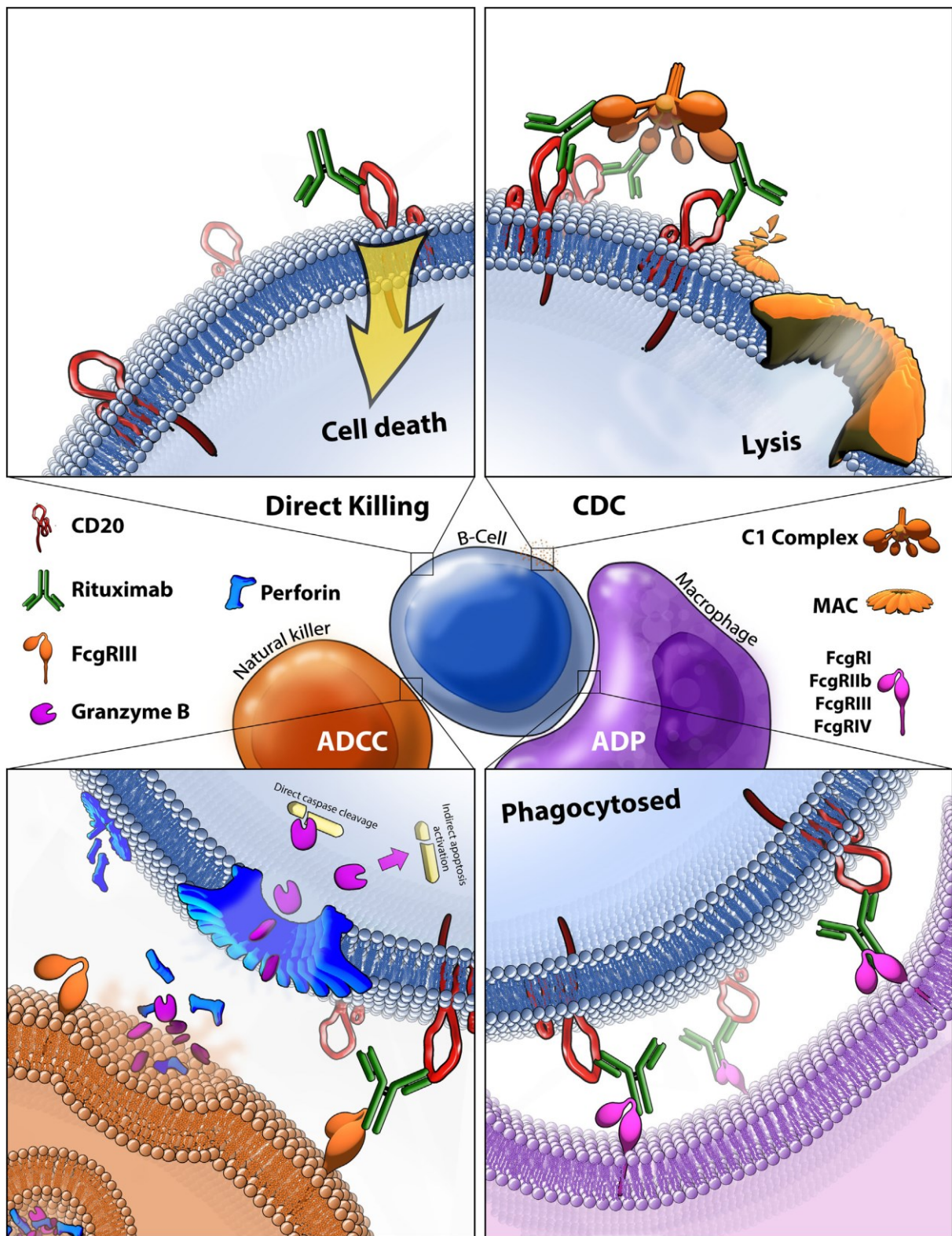
#### 2.2.3.2 Mechanismus účinku a odpovědi na Rituximab

Spojení rituximabu s antigenem CD20 vyvolá lýzi B-buňky prostřednictvím mechanismu buněčné cytotoxicity závislé na antigenu (ADCC) a cytotoxicity závislé na komplementu (CDC). Mechanismus ADCC zahrnuje zapojení cytotoxických imunitních buněk, jako jsou makrofágy, neutrofilů a NK buňky, což vede k destrukci B-buňky vázané na rituximab. Co se týče CDC, Tak komplex rituximab-CD20 aktivuje proteinovou kaskádu komplementu,

prostřednictvím chemotaktivity malých částí komplementu, ty přitáhnou makrofágy a neutrofilů, dále zvyšují fagocytózu a způsobují lýzi buněk. Navíc zvyšuje influx  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky, a indukují tak apoptózu. I když literatura ohledně mechanismů je stále rozporuplná. Lymfoidní kmenové buňky antigen CD20 neexprimují, proto je deplece zdravých, zralých B-buněk po léčbě dočasná a hematopoetické kmenové buňky zůstanou nedotčeny léčbou. Populace B buněk se obnoví během 6-9 měsíců<sup>25</sup>.

Rituximab by mohl k protinádorovým účinkům přispívat i přímým zabíjením buněk, a to buď kaspázově závislou, nebo nezávislou cestou. Anti-CD20 protilátky I. typu navázáním na CD20 způsobují přeskupení lipidových raftů a mění lokalizaci CD20. Toto přeskupení neznámým mechanismem vede k apoptóze zprostředkované kaspázou (kinázou rodiny src). Anti-CD20 protilátky II. typu vyvolávají buněčnou smrt reorganizací aktinu vedoucí k lysozymem zprostředkované smrti, nezávisle na kaspázových drahách. Studie, která potvrzuje tento přímý mechanismus buněk, aplikovala rituximab přímo do mozkomíšního moku, kde je k dispozici jen omezená imunitní odpověď. Avšak tento mechanismus nebude hrát významnou roli vzhledem k ostatním mechanismům<sup>23,26</sup>.

Nejméně prozkoumaným mechanismem ze čtyř známých efektorových mechanismů je fagocytóza závislá na protilátkách (ADCP). Je usnadněna rozpoznáním navázaného rituximabu makrofágy prostřednictvím receptorů  $\text{Fc}\gamma$ <sup>23,27</sup>. Intravenózní podání exogenních protilátek s sebou nese riziko, že mohou být rozpoznány imunitním systémem hostitele jako proteiny cizorodé, což vede k tvorbě protilátek proti myším (HAMA, z angl. *human anti-mouse antibody*). Tvorba HAMA zabraňuje potenciální re aplikaci léčby, protože by docházelo k rychlému odstranění monoklonálních protilátek z organismu hostitele. Výrazné zlepšení přinesly chimérické monoklonální protilátky, u kterých je část, která je rozpoznávána imunitním systémem humanizována, a je tak méně pravděpodobné, že vyvolá imunitní odpověď, která by způsobila tvorbu lidských antichimérických protilátek (HACA, z angl. *human anti-chimeric antibody*). Uváděná míra tvorby HACA je 1,1 %. Další nevýhodou je, že kolem 50 % pacientů má vrozenou rezistenci na rituximab a u dalších 60 % se rezistence vyvine po léčbě. Jednou ze strategií, jak zlepšit účinnost léčby je kombinace radioisotopů s anti-CD20 protilátkami<sup>25,28</sup>.



**Obr. č. 3:** Rituximabem zprostředkované zabíjení B-buněk exprimujících CD20. (Vlevo nahoře) Vazba rituximab-CD20 může přímo spustit apoptózu vlivem mechanismů závislých i nezávislých na kaspáze. Tento mechanismus však není plně charakterizován. (Vpravo nahoře) Komplex rituximab-CD20 může navázat C1 komplex a spustit klasickou komplementovou kaskádu, jejíž výsledkem je sestavení komplexu membránového útoku (MAC), póru, který vede k lýzi buněk. Tento mechanismus je známý jako cytotoxicita závislá na komplementu (CDC). (Vlevo dole) Navázaný rituximab může rekrutovat NK buňky, které rozpoznají komplex prostřednictvím receptoru FcγRIII, což vede k cytotoxicitě závislé na protilátkách (ADCC). (Vpravo dole) Makrofágy rozpoznávají komplex rituximab-CD20 prostřednictvím Fcγ, což vede k fagocytóze cílové buňky závislé na protilátce (ADCP). Obrázek převzat ze zdroje<sup>23</sup>.

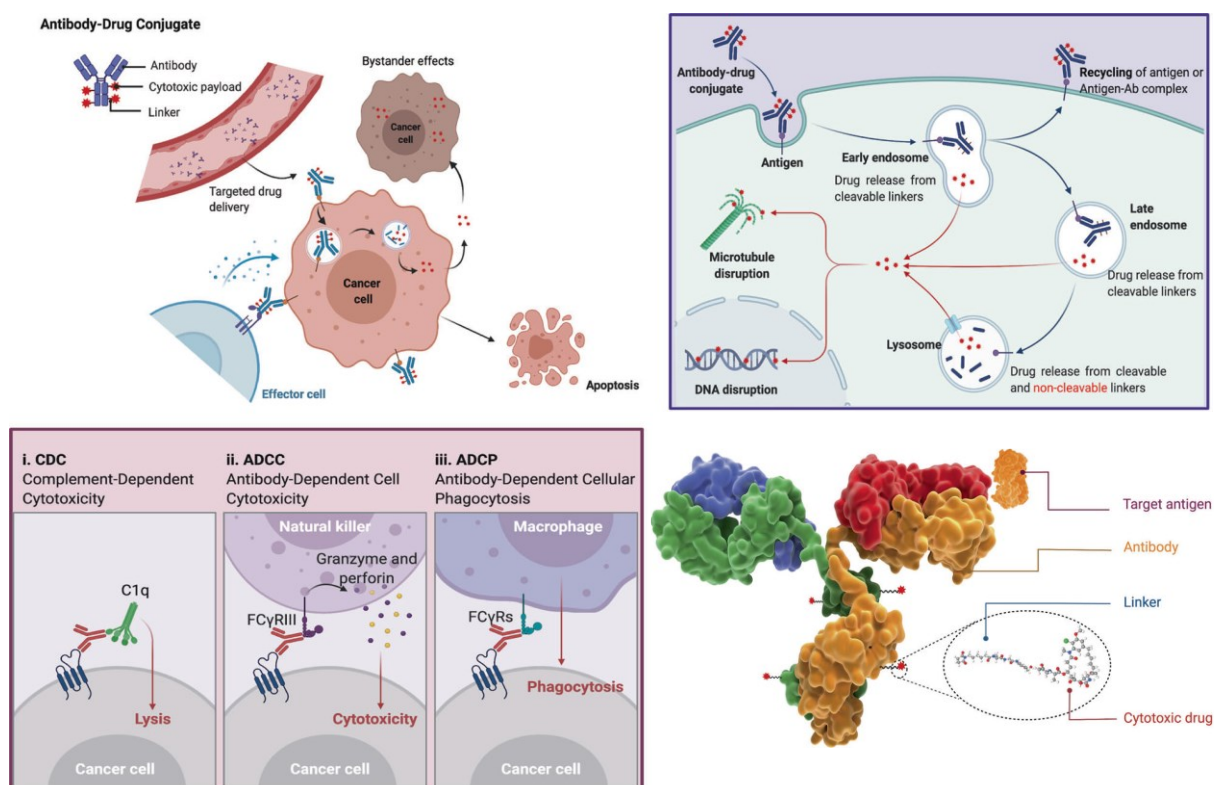
## 2.3 Konjugační strategie – chelátory, bioortogonální chemie

### 2.3.1 Konjugáty protilátka-léčivo (ADC) – úvod a mechanismus účinku

Nádorová onemocnění stále představují nejčastější příčinu úmrtí a současné léčebné postupy často spoléhají na chemoterapii, tedy využití malých molekul k likvidaci nádorových buněk<sup>29</sup>. Nicméně tato metoda má své nevýhody, jako je postupný vývoj rezistence a závažné nežádoucí účinky způsobené necílenou cytotoxicitou, což brání efektivní léčbě rakoviny pomocí silně účinných cytotoxických látek. Nová strategie terapeutického přístupu onkologických onemocnění se začala rozvíjet objevem unikátního složení povrchu nádorových buněk a porozuměním silné a selektivní interakce mezi protilátkami a antigeny na povrchu buněk. Tato nová cesta spočívá ve využití konjugátů protilátka-léčivo (ADC, z angl. *antibody-drug conjugates*), skupině kancerostatik synergicky kombinující vysoce cytotoxickou malou molekulu (tzv. „payload“ nebo „warhead“) s velkou molekulou, zejména pak monoklonální protilátkou (mAb), především isotypu IgG. Biomolekula je přes vhodný linker kovalentně spojena s léčivem pomocí řady různých biokonjugačních metod. Výsledná konjugační forma umožňuje selektivní doručení silné cytotoxické nálože do cílových nádorových buněk, čímž se zvyšuje účinnost a výrazně snižuje toxicita ve srovnání s volnou formou léčiva<sup>29-31</sup>.

Množství léčivé látky v cytosolu je určeno počtem povrchových antigenů na buňce, počtem molekul léčivé látky na ADC (tzv. poměr léčiva a protilátky, DAR) a dobou, za kterou se antigen vrátí na povrch buňky<sup>29</sup>. Počet konjugovaných malých molekul se může lišit a udává se pomocí statického rozptylu, což znamená, že na jednu molekulu mAb v léčivém přípravku průměrně připadá 1-8 molekul léčiva (hodnota DAR, drug-antibody ratio). Na celkovou účinnost přípravku má vliv několik faktorů, včetně sekvence aminokyselin a posttranslačních modifikací mAb, pozice konjugace léčivo-linker, struktura linkeru a jeho stabilita a průměrné zatížení mAb léčivem (hodnota DAR)<sup>30</sup>.

Na obrázku č. 4 je zobrazen obecný mechanismus účinku ADC molekul. Poté, co je ADC léčivo podáno do krevního oběhu, protilátková složka ADC rozpozná antigen a silnou vazbou se naváže na antigeny na buněčném povrchu, které jsou vysoce exprimovány v cílových nádorových buňkách. Po internalizaci komplexu ADC-antigen prostřednictvím endocytózy je komplex zpracován v lysozomech, čímž se cytotoxická látka uvolní v biologicky aktivní formě uvnitř buňky a způsobuje poškození buňky v podobě narušení DNA vláken nebo mikrotubulů, popřípadě způsobuje inhibici topoizomerázy nebo RNA polymerázy, což nakonec vede k buněčné smrti<sup>31</sup>.



**Obr. č. 4:** Přehled mechanismů ADC pro zabíjení nádorových buněk pomocí různých přístupů: (Vlevo nahoře) Mechanismus účinku ADC léčiva. (Vpravo nahoře) Hlavní mechanismus účinku ADC molekul. (Vlevo dole) Protilátková složka ADC se spojuje s imunitními efektorovými buňkami a vyvolává protinádorovou imunitu pomocí CDC, ADCC a ADCP efekty. (Vpravo dole) Struktura ADC a jeho hlavní složky: cílový antigen; protilátka, linker, cytotoxické léčivo. Obrázek převzat ze zdroje<sup>32</sup>.

Vzhledem k mechanismu účinku musí mít ideální protilátka dostatečnou afinitu k antigenu a dostatečnou specifitu. Nicméně protilátky s extrémně vysokou afinitou k antigenu mohou vést ke snížené účinnosti průniku do solidních nádorů, což může ovlivnit klinickou účinnost ADC přípravků. Důležité je také, aby antigeny byly exprimovány na cílových buňkách a minimálně exprimovány na zdravých buňkách, aby bylo dosaženo selektivní likvidace nádorových buněk. Hustota nádorových antigenů pravděpodobně přímo souvisí s účinností ADC, přičemž tato korelace závisí na typu nádorů<sup>31</sup>.

Pokud jde o typ protilátek, použití chimérických protilátek, které obsahují variabilní část z jiného organismu než lidského a lidskou kontaktní oblast, postupně upadá. Místo toho jsou stále více využívány humanizované protilátky, které obsahují hypervariabilní úseky ze zvířete, nebo zcela humánní protilátky. Tyto protilátky mají výrazně nižší imunogenicitu než chimérické protilátky, navíc mají delší biologický poločas (v případě IgG až 3 týdny<sup>31</sup>) a zlepšené efektorové funkce díky vysoké specifitě pro cílové buňky<sup>30</sup>.

Úspěšný vývoj ADC léčiva představuje zajímavou výzvu. Je nezbytné vzít v úvahu biologii a mechanismus účinku, což zahrnuje volbu vhodné nosičové molekuly, kterými jsou protilátka

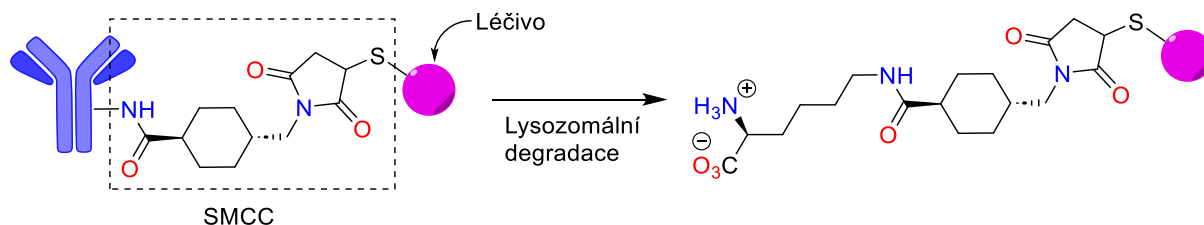
nebo peptid. Mezi další otázky zejména patří: kam a jak připojit vhodný linker, jaký druh chemického linkeru použít, kolik molekul léčiva připojit na jednu biomolekulu, a která biokonjugační strategie je pro konkrétní biokonjugát optimální<sup>29</sup>.

### 2.3.2 Linkery

Linker je různě dlouhý a funkčně optimalizovaný molekulární řetězec, který slouží jako kovalentní spojka mezi protilátkou a léčivem a zároveň se jedná o klíčový prvek v cílené farmakoterapii. Jeho začlenění by nemělo vyvolávat agregace, mělo by zajistit přijatelné farmakokinetické vlastnosti a zároveň omezit předčasné uvolňování v plasmě a umožnit účinné uvolňování aktivní molekuly v cílovém místě účinku. Linkery se dělí na štěpitelné a neštěpitelné<sup>29,30</sup>.

#### 2.3.2.1 Neštěpitelné linkery

ADC na bázi neštěpitelného linkeru musejí být internalizovány, přičemž protilátková část je následně degradována proteázami v lysozomu a cytosolu. Tím dochází k uvolnění malé molekuly navázané na aminokyselinový zbytek pocházející z degradované protilátky. Neštěpitelné linkery se skládají ze stabilních vazeb, které jsou odolné vůči proteolytické degradaci, což zajišťuje větší stabilitu než u štěpitelných linkerů. Výsledkem může být ovlivnění finálních vlastností konjugované malé molekuly, například zvýšení její hydrofility, což může zvýšit protinádorovou účinnost. Příkladem ADC léčiva je konjugát trastuzumab-emtansine, který využívá neštěpitelný linker známý pod zkratkou SCMM, tedy sukcinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát. Katabolismus tohoto léčiva vede ke vzniku Lys-SMC-DM1, hlavního nádorového metabolitu (inhibitoru tubulinu). Léčiva navázaná na tento linker většinou nemohou vyvolat „bystander“ efekt. Současný výzkum se však spíše zaměřuje na štěpitelné linkery<sup>29–31</sup>.



**Obr. č. 5:** Neštěpitelné linkery: Chemická stabilita linkeru (zde příklad SMCC linkeru) odolává proteolytické degradaci. Po lysozomální degradaci se uvolňuje malá molekula s aminokyselinovým zbytkem (v tomto případě lysinu) pocházející z degradované mAb

### 2.3.2.2 Štěpitelné linkery

Použití štěpitelných linkerů je možné jak pro internalizované, tak i neinternalizované ADC, protože uvolňování léčiva je vyvoláno povahou místa štěpení. Štěpitelné linkery jsou víceméně stabilní v extracelulárním prostředí, avšak v prostředí nádorové buňky se stávají nestabilními, a to díky závislosti na pH, redoxním potenciálu, nebo díky přítomnosti lysozomálních enzymů<sup>29-31</sup>.

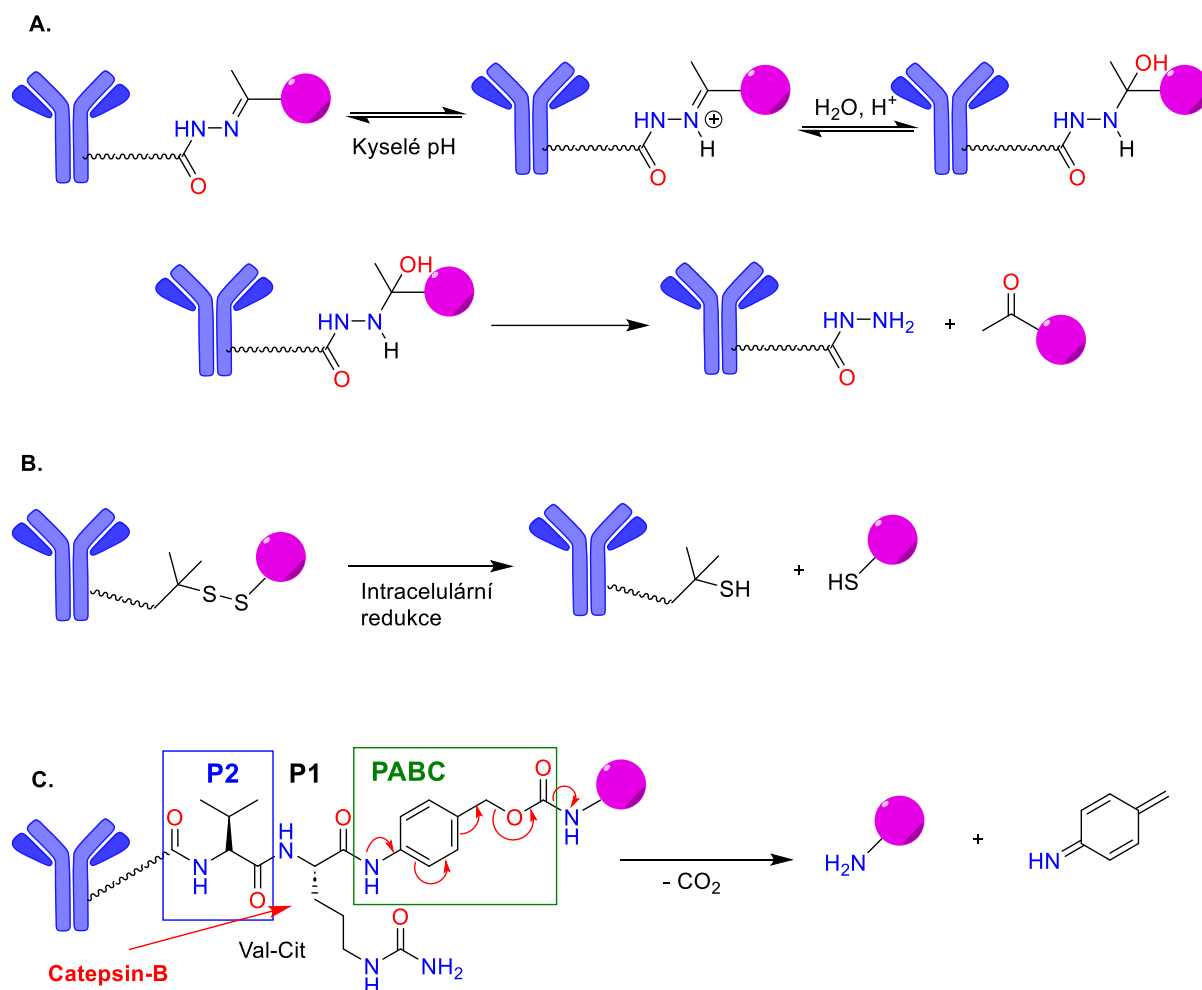
Jako příklad lze uvést hydrazonový linker, jehož stabilita je závislá na pH. Tento typ linkeru je stabilní při neutrálním pH (v krevním řečišti), k hydrolýze však dochází v kyselém prostředí lysozomů (pH 4,8) nebo endozomů (pH 5,0-6,0) a vzniká příslušný keton a hydrazin. ADC léčiva s hydrazonovým linkerem za fyziologických podmínek podléhají pomalé hydrolýze, což vede k pomalému uvolňování toxického payloadu a zvýšení celkové systémové toxicity<sup>29-31</sup>.

Dalším používaným štěpitelným linkerem je disulfidový linker, jenž je citlivý na redukcí vedoucí ke štěpení disulfidu na dva thioly. Tato strategie využívá toho, že disulfidové vazby podléhají redukcí v cytoplasmě za přítomnosti vyšší koncentrace redukovaného glutathionu (1–10 mmol·l<sup>-1</sup>) obsahujícímu jednu thiolovou skupinu ve srovnání s extracelulárním prostředím (kde je glutathionu kolem 5 μmol·l<sup>-1</sup> a navíc převážně v oxidované – disulfidové formě). Disulfidy tedy podléhají nukleofilnímu ataku redukovaného glutathionu (tripeptidu, Glu-Cys(SH)-Gly) a odolávají redukčnímu štěpení v krevním oběhu (zde se nachází redukovaná forma albuminu s thiolovou skupinou, avšak jeho reaktivita vůči velkým molekulám je nízká). Reaktivitu disulfidové vazby lze modulovat sterickými překážkami, jako jsou například methylové skupiny vedle disulfidové vazby<sup>29-31</sup>, nebo prostřednictvím tautomerie (např. 2-thiopyridon *versus* pyridin-2-thiol).

Příkladem linkeru, který podléhá enzymatickému štěpení je dipeptidový linker, jenž je štěpen katepsinem B. Katepsin B, lysozomální proteasa, je nadměrně exprimován u savců v pozdních endozomech a lysozomech a v různých typech nádorových buněk, kde se podílí na řadě onkogenních procesů u člověka. Katepsin B preferenčně rozpoznává určité sekvence, jako jsou Phe-Lys a Val-Cit, a štěpí peptidovou vazbu na C-koncové straně těchto sekvencí. V poloze P1 se nachází hydrofilní část (Cit nebo Arg), zatímco lipofilní část v poloze P2 zvyšuje stabilitu v plazmě (Phe, Val nebo Ala). Spojení linkerů s Val-Cit nebo Val-Ala se spojkou *p*-aminobenzylkarbonylem (Val-Cit-PABC a Val-Ala-PABC) je velmi úspěšná strategie vývoje štěpitelného linkeru. Výhodou je snadnější přístup enzymů se spoji mezi protilátkou a léčivem, zároveň se snižuje sterické bránění „payloadu“, což zvyšuje efektivitu



uvolňování léčiva, navíc  $\beta$ -eliminací se zcela odstraní *p*-aminobenzylkarbonylový spacer (viz Obr. č. 6).<sup>29–31</sup>



**Obr. č. 6:** Štěpitelné linkery: A. Hydrazonový linker a jeho hydrolyza v kyselém prostředí. B. Disulfidový linker. Disulfidová vazba je redukována intracelulárními redukujícími molekulami (například glutathionem). C. Příklad dipeptidového linkeru Val-Cit se spacerem *p*-aminobenzylkarbonylem (PABC) a mechanismus uvolňování „payloadu“ z konjugátu Val-Cit-PABC.

### 2.3.3 Konstrukce radioimunofarmak a výběr vhodného chelátoru

Ke konstrukci radiofarmak založených na radionuklidech se obvykle využívají ligandy nazývané jako bifunkční chelátory (BFC). Tyto chelátory disponují dvěma reaktivními funkčními skupinami, kdy jednu funkční skupinu lze kovalentně spojit (konjugovat) s cílovými vektory, jako jsou peptidy, nukleotidy, protilátky nebo nanočástice. Druhou funkční skupinou je chelatační jednotka, která nese radionuklid<sup>12,33</sup>.

Běžné biokonjugační techniky využívají různé funkční skupiny, jako jsou karboxylové kyseliny nebo aktivované estery (např. *N*-hydroxysukcinimid – NHS-ester, nebo tetrafluorfenyl – TFP-ester) využívané pro tvorbu amidových vazeb s aminoskupinami, dále isothiokyanáty reagující s aminoskupinami na thio-močovinové vazby a maleimidy pro konjugaci na thioly.

V biokonjugační chemii je také populární „click“ chemie, která zahrnuje tradiční Cu(I)-katalyzovanou azid-alkinovou 1,3-dipolární cykloadici, azid-alkinovou cykloadici bez použití katalyzátoru na stericky napjaté alkiny, nebo „click“ reakci založenou na Diels-Alderově mechanismu<sup>30,33</sup>. Tyto biokonjugační techniky budou detailněji probrány níže.

Struktura a fyzikální vlastnosti komplexu radionuklid-chelát mají zásadní vliv na celkové farmakokinetické vlastnosti radiofarmaka. Stejně jako ADC molekuly, i radiofarmaka se skládají z několika zaměnitelných složek; radionuklidu, jehož výběrem lze zvolit vhodné vlastnosti radioaktivního záření a poločas rozpadu; chelátoru a vhodně zvolené biokonjugační metody pro spojení s vektorovou molekulou, která umožňuje cílené doručení radioaktivního „payloadu“ na specifické místo v organismu<sup>19</sup>.

BFC musí vykazovat vysokou kinetickou stabilitu *in vivo*, aby minimalizovaly transchelataci s jinými proteiny v organismu a odolávaly radiolýze, aniž by měnily biologické vlastnosti a specifčnost protilátky. Záměna chelátového ligandu může mít výrazný vliv na biodistribuci, protože mnoho komplexů radionuklidů je velmi nestabilních a mohou být rychle vyloučeny ledvinami, pokud jsou navázány na malé vektory, jako jsou peptidy nebo nukleotidy. Není však žádný univerzální BFC kvůli různorodosti kovových radionuklidů. Při vytváření termodynamicky stabilního a kineticky inertního komplexu je třeba zvážit chemické požadavky, včetně preferencí donorového atomu ligandu, koordinační chemie a velikosti kovu. Koordinační číslo BFC je určeno velikostí, nábojem a elektronovou konfigurací radionuklidů a nabývá hodnot 2-8<sup>12,14,33</sup>.

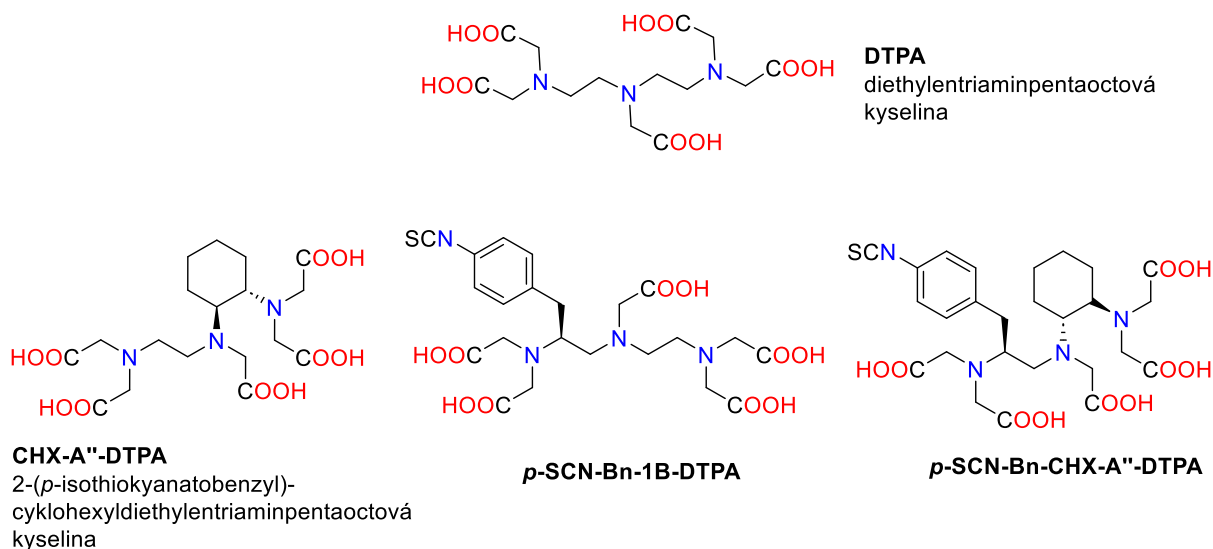
Současně dostupné chelátory se dělí do dvou hlavních kategorií: acyklické a makrocyklické chelátory. Strategie radioaktivního značení jsou často závislé na teplotě a čase, což vyžaduje optimalizaci procesu. Acyklické chelátory mají velkou výhodu v tom, že jsou schopné kvantitativně radioaktivně označit/koordinovat radionuklid za méně než 15 minut při pokojové teplotě. Tato rychlost a nízká teplota je zvláště výhodná pro konjugáty s bifunkčními chelátory citlivými na teplo, jako jsou monoklonální protilátky (mAb), nebo radionuklidy s krátkým poločasem rozpadu. Naopak, makrocykly obvykle vyžadují zahřátí na 60-90 °C po delší dobu (30-90 min), aby proběhlo kvantitativní značení, což může nepříznivě ovlivnit kvarterní strukturu mAb. Avšak jsou kineticky stabilnější, což omezuje dekomplexaci radionuklidu *in vivo* a je minimalizována toxicita mimo cílové buňky<sup>14,33</sup>.

#### 2.3.3.1 Acyklické chelátory

První chelatační činidla vyvinutá pro spojení radionuklidů s biomolekulami byla acyklická chelatační činidla. Zástupcem této skupiny je diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA) a

její deriváty, která je odvozena od běžného chelátoru kovu ethyldiamintetraoctové kyseliny (EDTA). DTPA se vyznačuje účinnou komplexační účinností a lze dosáhnout vysokých výtěžků při pokojové teplotě během několika minut. Použití postranních řetězců derivátů DTPA umožňuje lepší vazbu na proteiny, jako je tomu například u *p*-isothiokyanatobenzyl-diethyltriampentaoctové kyseliny (*p*-SCN-Bz-DTPA). Nicméně DTPA vykazuje poměrně nízkou stabilitu *in vivo* v důsledku disociace radionuklidu od chelatačního činidla, což může vést k poškození kostní dřeně citlivé na záření. To vedlo k vývoji acyklických chelátorů se stabilizovanou strukturou, která zabraňuje této disociaci a vede ke snížení akumulace radionuklidu v krevním řečišti a ke zvýšenému vychytávání v místě nádorů<sup>12,14,33</sup>.

Příkladem je [(*R*)-2-amino-3-(4-isothiokyanátofenyl)propyl]-*trans*-(*S,S*)-cyclohexan-1,2-diaminopentaoctová kyselina (CHX-DTPA), která obsahuje *trans*-hexylenový můstek, který zabraňuje rotaci. CHX-DTPA má dva isomery a ukazuje se, že CHX-A00-DTPA je mnohem více stabilní *in vivo* než CHX-B00-DTPA. Radionuklid je stabilizován v systému chelátového kruhu, což vede ke snížení pravděpodobnosti disociace. Ve srovnání s DTPA má CHX-DTPA až o 2-3 řády vyšší stabilitu *in vivo* a je preferován pro značení s mAb. I přes to, že má CHX-DTPA rychlejší kinetiku než DOTA, stále jsou oba značně pomalejší než DTPA a často potřebují i vyšší teploty (37-60 °C) a delší reakční čas (30-60 min) k dosažení rozumných výtěžků<sup>12,14,33</sup>.

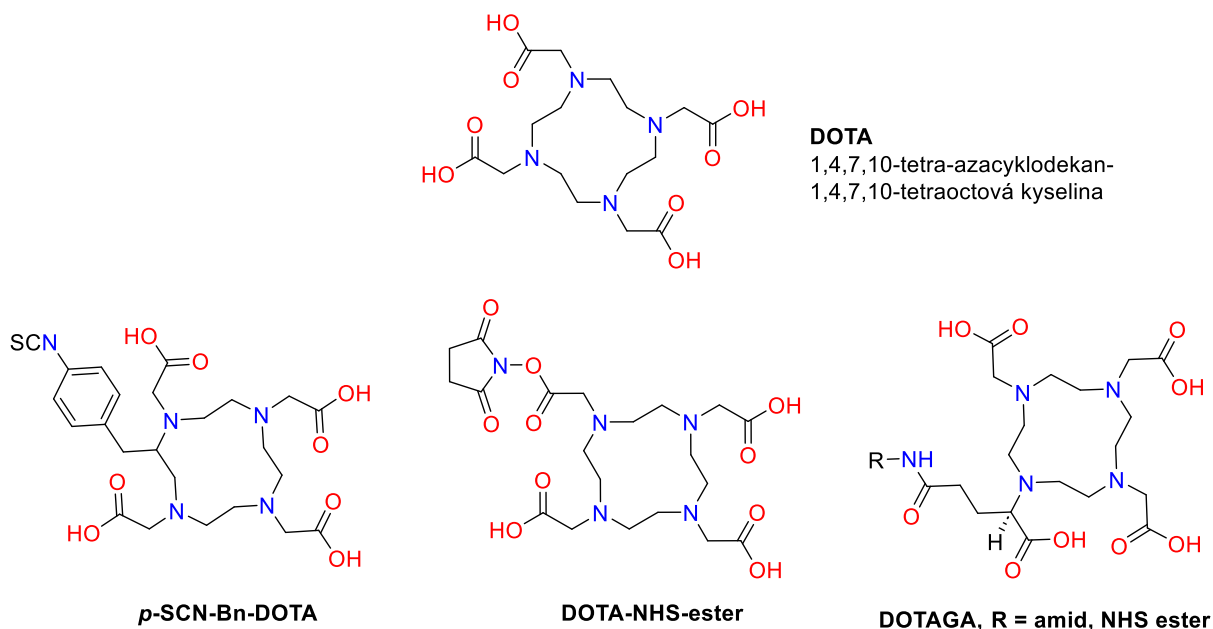


**Obr. č. 7:** DTPA a její funkční deriváty.

### 2.3.3.2 Makrocyclické chelátory

Makrocyclické chelátory se skládají z tetraza- nebo triazamakrocyclického kruhu, který umožňuje tvorbu vysoce stabilních komplexů s kovy, které jsou charakterizovány vysokou

kinetickou inertností<sup>12</sup>. Jedním ze zlatých standardů pro radioznačení je 1,4,7,10-tetraazacyklodekán-1,4,7,10-tetraoctová kyselina, známá zkratkou DOTA, která se používá pro širokou škálu dvojmocných a trojmocných isotopů, včetně <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu (s podmínkami značení: 25-100 °C, 15-60 min, pH 4,0-6,0), <sup>225</sup>Ac nebo <sup>90</sup>Y, i přes pomalou kinetiku radioaktivního značení a nutnosti zahřívání. Některé běžné bifunkční deriváty DOTA využívají jedno z ramen karboxylové kyseliny jako místo konjugace vektoru, čímž efektivně blokují jedno z koordinujících karboxylátových ramen (pro 3<sup>+</sup> radiokationty, jako jsou lanthanoidy, se pro vazbu nuklidu využívají právě 3 ramena). Proto byly syntetizovány deriváty jako DOTAGA, DOTASA a různé isothiokyanátové deriváty, které tento problém řeší konjugací s vektory prostřednictvím uhlíkového skeletu a funkcionalizace postranních ramen. Tyto deriváty si zachovávají stejnou termodynamickou stabilitu a kinetickou inertnost jako výchozí DOTA. Zajímavou volbou je kombinace  $\alpha$ -zářiče <sup>225</sup>Ac s DOTOu. Dlouhý poločas rozpadu (9,9 dní) je vhodný pro uplatnění v radioimunoterapii, avšak nevýhodou pro konjugaci s mAb je potřebná vysoká teplota ke značení. Proto se preferovaná metoda syntézy konjugátu <sup>225</sup>Ac-DOTA-mAb taková, že se nejprve radioaktivně označí BFC p-SCN-Bn-DOTA při 60 °C, a poté následuje konjugace s protilátkou za vzniku thiomocovinové vazby s následným čištěním<sup>12,33</sup>.



Obr. č. 8: DOTA a její bifunkční deriváty

### 2.3.4 Konjugační strategie

Konjugace tedy představuje chemickou strategii pro spojení malé molekuly ( $M_r = 300-1000$ ) s biomolekulou. Na protilátce jsou vhodnými místy pro konjugaci

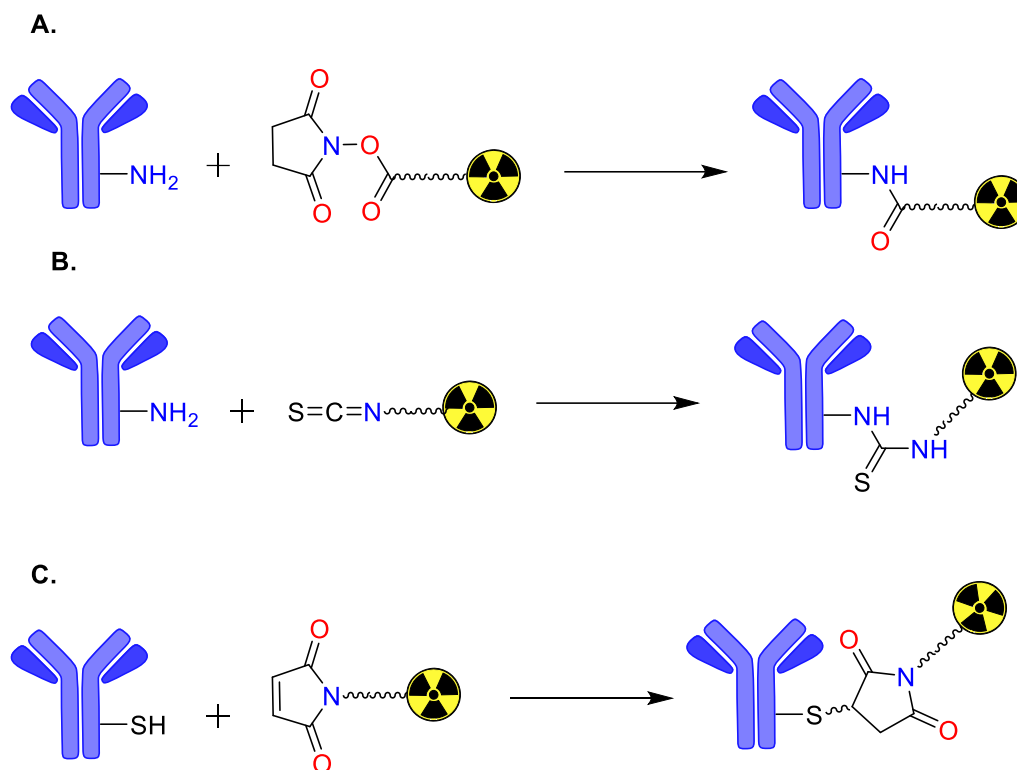
aminokyseliny nacházející se na vnějším povrchu proteinové molekuly, zejména aminokyseliny s ionizovatelnou skupinou v postranním řetězci, jako jsou lysin, cystein, histidin nebo tyrosin (konkrétně skupiny  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{NH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NC}(\text{NH}_2)_2$  atd.). V závislosti na zvolené metodě chemické konjugace dochází k vytvoření směsi ADC molekul s různým poměrem malé molekuly a protilátky (DAR) s různými místy vazby. Vysoké hodnoty DAR mohou zvýšit nejenom účinnost, ale také riziko agregace, rychlost clearance a předčasné uvolnění toxické nálože během cirkulace, také se zvyšuje pravděpodobnost, že se malá molekula naváže na aminokyselinu v aktivním vazném místě, a tím ztratí biologickou specifitu. Toto riziko lze však snížit použitím hydrofilních a dostatečně stabilních linkerů, proto je důležité pro každé ADC určit optimální hodnotu DAR<sup>30,31</sup>.

#### 2.3.4.1 Konjugace prostřednictvím $\epsilon$ -aminoskupin lysinů

Jedna ze nejběžnějších strategií pro konjugaci BFC (nebo cytotoxického léčiva) s mAb využívá nukleofilní skupinu  $-\text{NH}_2$  u lysinu, která reaguje s elektrofilem v podobě isothiokyanátu (NCS) nebo aktivovaných esterů za vzniku thiomocovinové nebo amidové vazby mezi malou molekulou a biomolekulou. Jedná se o nespecifickou konjugaci, protože počet molekul lysinových zbytků v typickém IgG je v průměru 80 a z toho pouze 10 je přístupných pro modifikační reakce. Reakce tudíž bývají nekontrolované a nespecifické. Nelze ani s jistotou zaručit, že nebudou modifikovány lysiny nezbytné pro interakci antigenu a protilátky. Tvorba heterogenních konjugátů může dramaticky změnit farmakokinetiku konečného léčiva<sup>14,30</sup>.

#### 2.3.4.2 Konjugace s cysteinovými zbytky

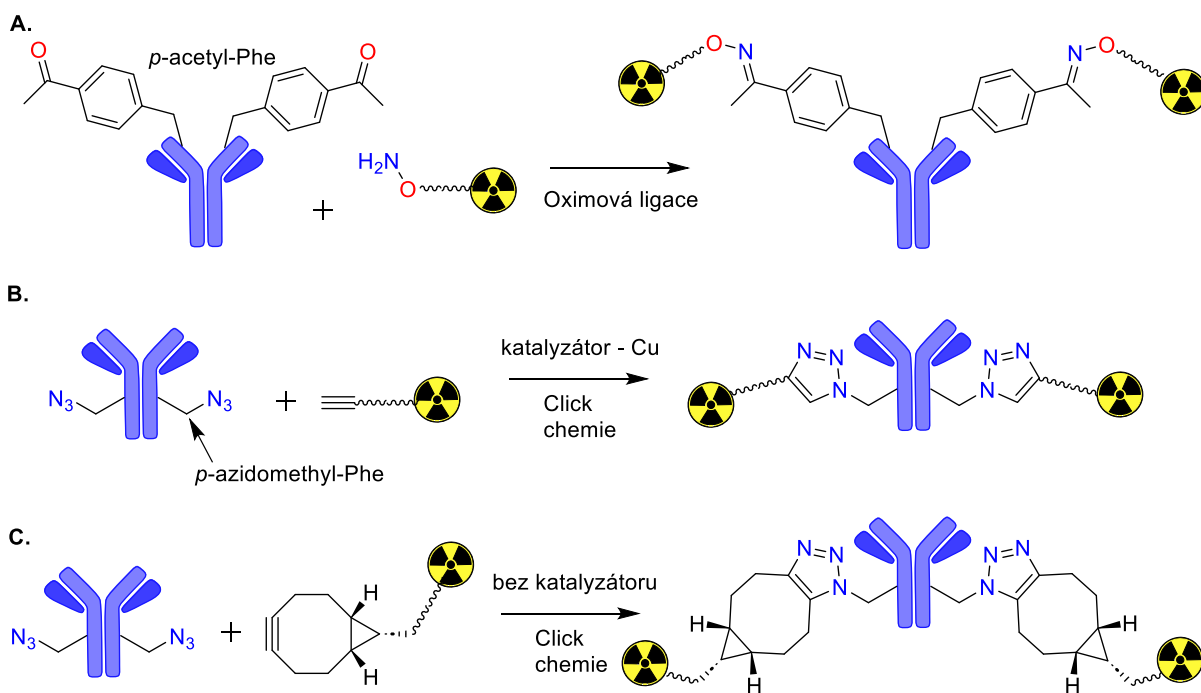
Další nespecifickou konjugací je reakce sulfanylové skupiny ( $-\text{SH}$ ) z dostupných cysteinů s maleimidem. Obecně protilátky nemají volné thioly a všechny cysteinové zbytky tvoří disulfidové vazby, které lze redukovat např. dithiothreitem (DTT) nebo tris(2-karboxyethyl)fosfinem (TCEP). V lidském IgG1, který se používá nejčastěji v moderních ADC, jsou 4 meziřetězcové a 12 vnitřetězcových disulfidických vazeb. Ty 4 meziřetězcové obecně nejsou kritické pro strukturní stabilitu protilátky a mohou být redukovány za vzniku až 8 dostupných vazeb pro konjugaci na jednu protilátku. Tento typ konjugace poskytuje mírnější kontrolu konjugace vzhledem k omezenému počtu míst ve srovnání s lysinovými konjugacemi. Avšak nevýhodou je omezená stabilita *in vivo*. Výhodou obou těchto konjugačních metod je jejich jednoduchost, a proto byly zkoumány v konjugacích protilátek s léčivem<sup>14,31</sup>.



**Obr. č. 9:** Příklady biokonjugace s lysinovými a cysteinovými zbytky: **A.** Reakce aminokyselinové zbytku lysinu s aktivovaným esterem (NHS) za tvorby amidové vazby. **B.** Reakce aminokyselinové zbytku lysinu s isothiokyanátovou skupinou (SCN) za tvorby thiomočovinné vazby. **C.** Maleimidová alkylace. Maleimidová část reaguje s redukováným cysteinovým zbytkem mAb.

#### 2.3.4.3 Specifické konjugace

Novějšími přístupy k chemické konjugaci je konjugace specifických míst na protilátkách, které vedou k homogenním konjugátům, a zahrnují 4 hlavní přístupy, mezi ně patří: specifické aminokyseliny; neproteinogenní aminokyseliny; krátké peptidové značky a glykany. Příkladem mohou být inženýrsky upravené protilátky obsahující zbytky *p*-acetylfenylalaninu, kdy zavedená karbonylová skupina reaguje s linkery s alkoxyaminovou skupinou za vzniku konjugátů s oximem. Také lze do aminokyseliny inkorporovat azidovou skupinu (*p*-azidomethyl-L-fenylalanin), na které lze aplikovat bioortogonální reakci, mědi katalyzovanou Huisgenovu cykloadici za vzniku triazolové vazby, popřípadě reakcí s cyklooktynem, které nevyžadují použití cytotoxické mědi. Avšak strategie založené na neproteinogenních kyselinách by mohly potenciálně vyvolat nežádoucí imunologickou reakci<sup>14,31</sup>.



**Obr. č. 10:** Inkorporace neproteinogenních aminokyselin pomocí genové inženýrství do mAbs a následná chemická konjugace. **A.** Oximová ligace. **B.** Mědi katalyzovaná **C.** nebo bez mědi azid-alkinová cykloadice.

### 2.3.5 Bioortogonální chemie

Bioortogonální chemie je odvětvím organické syntézy zaměřujícím se na reakce probíhající v biologickém prostředí, které díky své vysoké selektivitě neovlivňují biologickou aktivitu biomolekul a biologické procesy. Díky tomu je možné provádět samotnou syntézu organických molekul přímo v živých buňkách, nebo dokonce v živých organismech, namísto při laboratorních podmínkách. Jednou z hlavních výhod bioortogonálních reakcí je možnost provádět kovalentní modifikace biomolekul za biologických podmínek. Na druhou stranu však tuto metodu nelze aplikovat k přípravě produktů ve větším měřítku<sup>34</sup>.

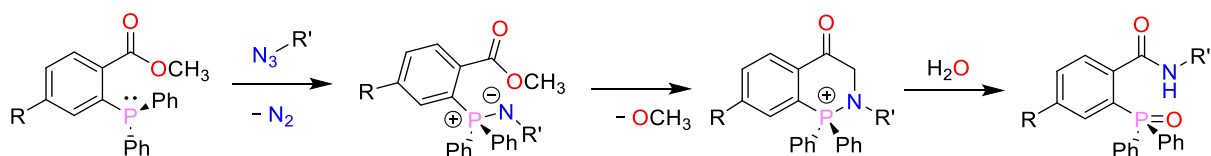
Bioortogonální reakce by ideálně měly splňovat následující kritéria:

- musí probíhat ve vodném prostředí za laboratorní teploty (nanejvýš při 37 °C) a při pH blízkém hodnotě fyziologickému prostředí,
- reakce musí probíhat selektivně vůči ostatním potenciálním reaktivním funkčním skupinám přítomným v biomolekulách,
- reakce musí probíhat rychle a ve vysokých výtěžcích za použití reaktantů o nízkých koncentracích,
- reakce by měla být založena na funkčních skupinách, které se běžně nevyskytují v biologických systémech<sup>34,35</sup>.

Termín „bioortogonální chemie“ byl poprvé zaveden výzkumnou skupinou Carolyn Bertozzi v roce 2003. Jako první bioortogonální reakce se uvádí Staudingerova ligace, která je založena na tvorbě amidové vazby pomocí reakce azidu s triarylfosfinem v sousedství methylesterového prekurzoru. Při této chemoselektivní reakci dochází k nukleofilnímu útoku fosfinem na azid za vzniku aza-ylidového meziprojektu. Fosfin a azid reagují s vysokou selektivitou a intramolekulárně acylační krok je dostatečně rychlý, aby reakce mohla probíhat mezi složitými biomolekulami ve vodném prostředí na povrchu živých buněk<sup>36,37</sup>.

Nukleofilní atom dusíku azidy napadá karbonylovou skupinu methylesteru, který funguje jako elektrofilní past a dochází k tvorbě amidové vazby. Následně hydrolyzou dochází k přeskupení aduktu a fosfinoxidu<sup>36</sup>.

Výhodou Staudingerovy reakce je vysoká selektivita mezi azidem a fosfinem, intramolekulární cyklizace probíhá rychle i ve vodném prostředí. Nicméně nevýhodou je pomalá kinetika, a proto jsou potřeba vysoké koncentrace obou výchozích produktů. Navíc jsou fosfiny náchylné na oxidaci za fyziologických podmínek, ale použití triarylfosfinů zvyšuje jejich stabilitu<sup>37</sup>.



**Obr. č. 11:** Schéma Staudingerovy ligace, prvně popsány bioortogonální reakce

### 2.3.5.1 Azid-alkin cykloadice katalyzovaná mědí (CuAAC)

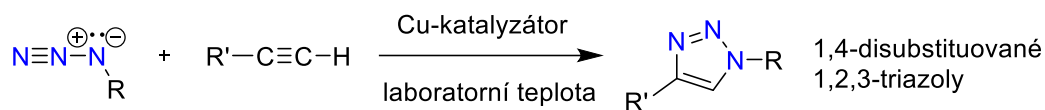
V roce 1960 představil Rolf Huisgen nový koncept 1,3-dipolárních cykloadic, kdy 1,3-dipól reaguje jako  $4\pi$  systém s dipolarofilem (dodávajícím  $2\pi$  elektrony – systémy s dvojnou a trojnou vazbou) v (3+2) cykloadici za vzniku pětičlenných heterocyklů<sup>38</sup>.

1,3-Dipolární cykloadice, známé též jako Huisgenovy reakce, se staly za posledních 60 let důležitým nástrojem syntetických chemiků a využívají se na přípravu heterocyklů. V roce 2002 byly poprvé publikovány azid-alkinované cykloadice katalyzované mědí (CuAAC), které se staly průlomovými v oblasti „click“ chemie. Jejich výhodou jsou mírné reakční podmínky a vysoké výtěžky jednoho regioisomeru, zatímco klasické Huisgenovy reakce jsou za fyziologických teplot pomalé a za vyšších teplot poskytují směs regioisomerů<sup>38</sup>.

Využití katalyzátorů na bázi mědi v aplikacích v biologických systémech má však podstatnou nevýhodu z důvodu cytotoxicity mědi, díky ní vznikají Fentonovou reakcí cytotoxické reaktivní formy kyslíku. Proto jsou vyvíjeny ligandy, které stabilizují



Cu-katalyzátory, a snižují tak cytotoxicitu buněk, aby mohly být využívány v bioortogonální chemii v živých systémech<sup>34,37</sup>.

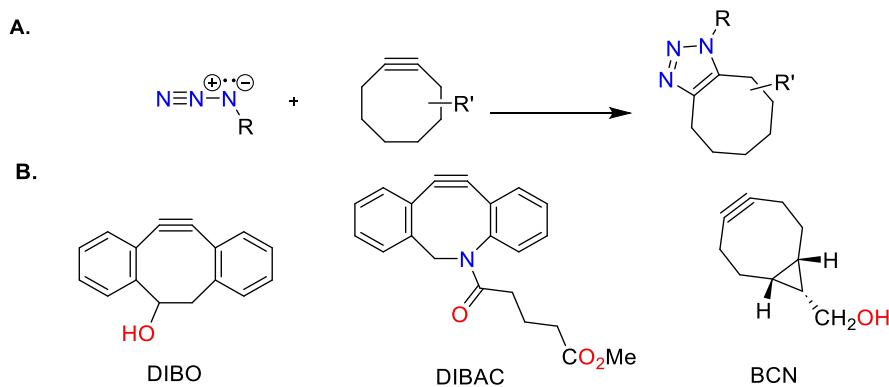


**Obr. č. 12:** Reakční schéma „click“ reakce katalyzované mědí, kdy vzniká 1,4-disubstituovaný 1,2,3-triazol

### 2.3.5.2 Azid-alkin cykloadice bez použití katalyzátoru (*copper-free azide-alkyne cycloaddition, SPAAC*)

Výrazný zlepšením rychlosti kinetiky azid-alkinových cykloadic bez použití Cu-katalyzátorů (C. Bertozzi v roce 2004) se podařilo odstranit z reakcí potenciálně toxickou Cu (která zároveň může i vysycovat chelátory zamýšlené k vazbě radionuklidu). Zkráceně se tato reakce označuje SPAAC (*Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*). Terminální alkyne používané při CuAAC jsou v této reakci nahrazeny cyklickými alkyne, nejčastěji cyklooktyny. Cyklické alkyne mají poměrně významné sterické pnutí trojných vazeb, protože uhlíky mezi trojnou vazbou jsou sp-hybridizované a běžně jsou orientovány pod úhlem 180°. V cyklických alkynech jsou však odtahovány, aby tvořily kruh, a výsledné pnutí pak zvyšuje rychlost dané reakce<sup>34</sup>.

Reakční kinetika nesubstituovaných cyklooktynů je stále výrazně pomalejší než u CuAAC reakcí. Proto byly vyvinuty strategie na zvýšení rychlosti této reakce, jako je zavedení elektron-odtahujících skupin do cyklooktynového kruhu, například fluoru, nebo kruhy s dusíkem a použití kondenzovaných kruhů, které se podílejí na zvýšení kruhového napětí, a tím i zvýšení rychlosti reakce. Příkladem mohou být 4-dibenzocyklooktynol (DIBO) a azadibenzocyklooktyn (DIBAC). Nevýhodou těchto kruhů je jejich velikost, která může ztěžovat, ne-li zcela znemožňovat, jejich začlenění do biomolekul. Bicklonony (BCN) jsou vysoce reaktivní a mají menší sterický objem a snadněji se začleňují do proteinů a glykanů<sup>34</sup>.



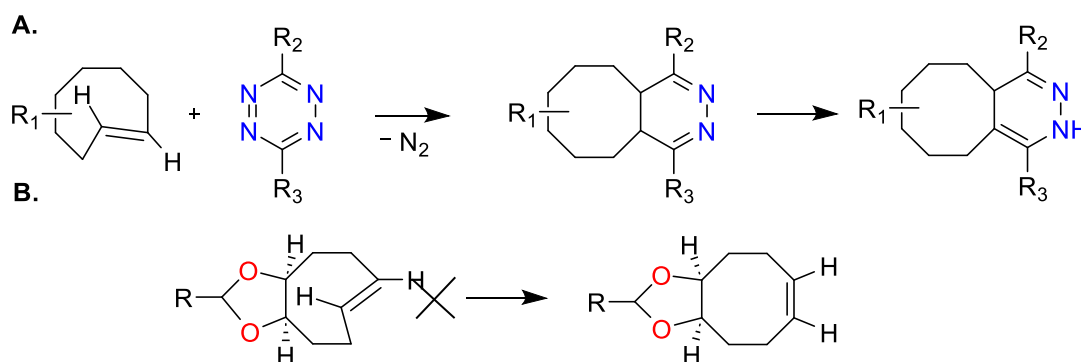
**Obr. č. 13:** A. Reakční schéma SPAAC. B. Příklady molekul derivátů cyklooktynů zvyšující rychlost SPAAC reakcí

### 2.3.5.3 Ligace tetrazinu

Ligace tetrazinu je rychlá bioortogonální reakce, která probíhá mechanismem inverzní Diels-Alderovy reakce (*inverse electron demand Diels-Alder reaction* – IEDDA) mezi tetrazinem a dienofilem. Následně při retro-Diels-Alderově reakci dochází k eliminaci plynného dusíku a vzniká kondenzovaný dihydropyridazinového produkt<sup>34</sup>.

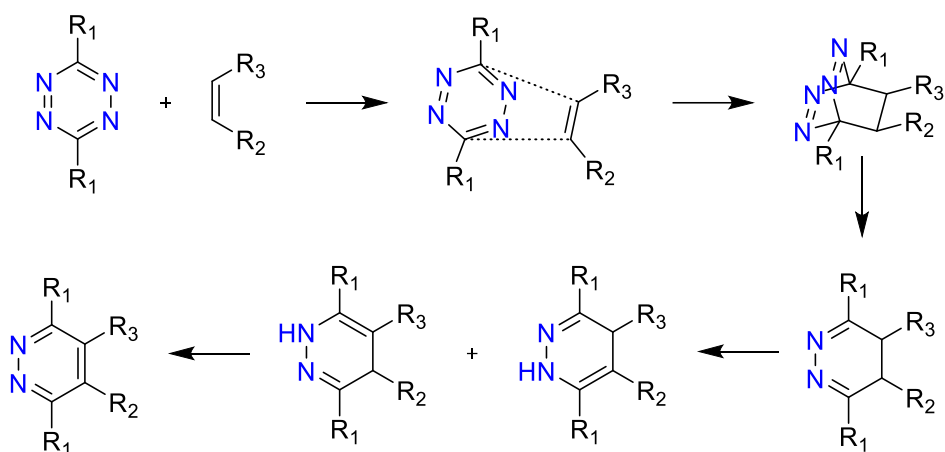
Tetraziny mají různou stabilitu ve vodném prostředí, přičemž nejreaktivnější tetraziny jsou obvykle nejméně stabilní. Disubstituované tetraziny, zejména monomethyltetraziny, vykazují lepší stabilitu bez ztráty reaktivity. Alternativou jsou také 1,2,4-triaziny, které se ukázaly jako uspokojivá volba pro reakci IEDDA s dienofily<sup>34</sup>.

Dienofily, jako reaktanty v této reakci, mohou také ovlivňovat stabilitu a reaktivitu. Nejvíce studovanými dienofily jsou *trans*-cyklookteny, které ale mohou isomerizovat na *cis*-cyklookteny, které jsou sice stabilnější, ale za to jsou méně reaktivní. Použití kondenzovaných dioxolanových *trans*-cyklooktenů (d-TCO) však výrazně snižuje sklony k isomeraci a zajišťuje vyvážení mezi stabilitou a reaktivitou<sup>34</sup>



**Obr. č. 14:** A. Schéma ligace tetrazinu pomocí IEDDA a retro-Diels-Alderovy reakce, při které se eliminuje molekula plynného dusíku B. Molekula d-TCO.

Mechanismus IEDDA reakce byl poprvé popsán Blackmannem v roce 2008 a je považován za nejrychlejší bioortogonální reakci vůbec<sup>39</sup>. Diels-Alderova [4+2] cykloadice popisuje reakci mezi dienem (1,2,4,5-tetrazinem) a dienofilem (alkenem/alkinem) za vzniku šestičlenného kruhu. V klasické EDDA reakci probíhá s elektronově bohatým dienem a elektronově chudým dienofilem, zatímco v případě inverzní EDDA reaguje elektronově bohatý dienofil s elektronově chudým dienem. Dienový systém tetrazinu podléhá Diels-Alderovy reakci prostřednictvím 1,4-adice, což vede k vytvoření vysoce napnutého bicycklického meziprojektu. Po uvolnění molekulárního dusíku prostřednictvím retro-Diels-Alderově reakce vzniká 4,5-dihydropyridazinového produktu, který může isomerizovat na odpovídající 1,4-dihydroisomery, nebo se oxidovat za vzniku pyridazinového produktu<sup>35</sup>.



**Obr. č. 15:** Schématické znázornění IEDDA mechnismu mezi dienofilem a tetrazinem.

Reakce mezi tetrazinem a TCO je vysoce specifická a nereaguje s thioley, aminy, ani dalšími nukleofily přítomnými v biomolekulách. Lze ji sledovat spektrofotometricky sledováním vymizením absorpčního pásu mezi 510 a 550 nm a reakční rychlost se uvádí až  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Díky těmto vlastnostem je IEDDA považována za nejúčinnější bioortogonální reakci, která byla doposud popsána<sup>39</sup>.

## 2.4 Radioimunoterapie

Před více než 80 lety byly hematologické malignity, jako je chronická myeloidní a lymfoidní leukémie, mezi prvními onemocněními, které byly léčeny volnými radioaktivními látkami. Tyto rané pokusy o léčbu nádorových onemocnění zahrnovaly intravenózní podávání farmak, konkrétně  $^{32}\text{P}$  ve formě fosforečnanu sodném ( $\text{Na}_3^{32}\text{PO}_4$ ), a byly založeny na nespecifickém vychytávání v hyperproliferujících buněk. Systémová radioimunoterapie (RIT), která využívá interakce mezi protilátkami a antigeny, se začala rozvíjet v druhé polovině 20. století, kdy byly pacientům poprvé podávány králičí mAb označené isotopem  $^{131}\text{I}$ <sup>40,41</sup>.

RIT spojuje synergické účinky radio- a imunoterapie za využití protilátkových konjugátů s navázaným radionuklidem. Tato terapie je využívána především k léčbě hematologických malignit, jako je např. non-Hodgkinův lymfom. Bohužel není možné aplikovat RIT k léčbě solidních tumorů kvůli její nízké schopnosti pronikání do nádorových buněk a nižší radiosenzitivitě, což ji činí nevhodnou pro nádory větší než 3-4 cm. Pro léčbu velkých tumorů by byly nutné vysoké dávky radioaktivně označených protilátek, avšak ty mají poměrně nízký clearance z krve, což by mohlo vést k potenciálnímu vystavení tkání citlivých na radiční záření<sup>12</sup>.

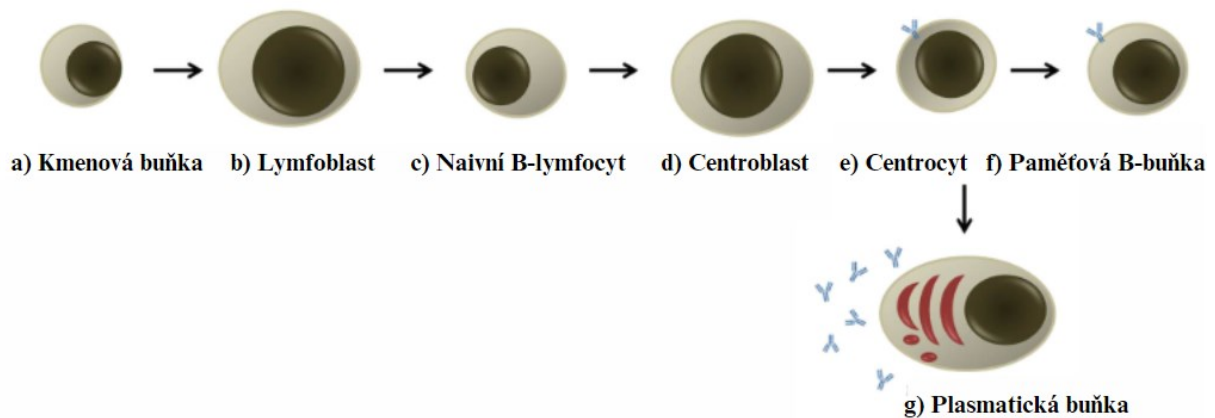
## 2.4.1 Radioimunoterapie cílená na CD20+ non-Hodgkinovy lymfomy

Non-hodgkinovy lymfomy (NHL) patří mezi dvě skupiny lymfomů, solidních nádorů lymfatických tkání. NHL označují heterogenní skupinu lymfoidních nádorů, a to buď B-buněčného (B-NHL), T-buněčného nebo NK (T/NKNHL; z angl. *natural killers* – „přirození zabijáci“) původu, přičemž první z těchto kategorií (B-NHL) tvoří až 90 % všech případů NHL. Nejčastějším typem NHL je difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), následovaný folikulárním lymfomem (FL), které dohromady tvoří 50-60 % všech případů NHL. NHL je charakterizován rozsáhlou škálou projevů, klinických průběhů a odpovědí na léčbu. Konvenční klasifikace NHL zahrnuje analýzu genetických markerů, imunofenotypu, morfologie a klinických příznaků. Je klíčové porozumět diferenciaci a každému vývojovému stadiu B-buněčného lymfocytu, neboť v každém stadiu zdravého lymfocytu může docházet k maligní klonální expanzi<sup>25,42</sup>.

### 2.4.1.1 Vývoj B-buněčných lymfocytů a maligní transformace

Začátek vývoje lymfocytů začíná diferenciací nezralých pluripotentních hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni. Brzy dochází k přestavbě genů pro imunoglobulinové nebo T-buněčné receptory. V této rané fázi jsou B-buňky velké, rychle se množí a diferenciaci je nezávislá na antigenu (v této fázi se označují jako lymfoblasty). V kostní dřeni se lymfoblasty dále diferencují na malé, zralé, ale imunologicky naivní lymfocyty, odtud putují do lymfatických uzlin a posléze i do lymfatických tkání, kde dokončují svůj vývoj<sup>25,43</sup>.

Po kontaktu s antigenem se z lymfocytů stávají velké proliferující buňky (centroblasty) v zárodečném centru lymfatických uzlin. Ve variabilních oblastech přestavěných imunoglobulinových genů dochází k somatické hypermutaci (výskytu mnoha bodových mutací), jejímž výsledkem jsou buňky s antigenní specifitou. V této fázi dochází také k přepínání tříd imunoglobulinů. V zárodečném centru se nakonec vytvoří malé neproliferující lymfocyty (centrocyty) a ve dřeni se nahromadí plazmatické buňky produkující IgG. Za pomoci pomocných T-buněk centrocyty, které neprojevují afinitu k antigenu, spáchají apoptózu (programovanou buněčnou smrt), zatímco ty, které afinitu k antigenu vyjadřují, se diferencují právě v paměťové B-buňky, nebo v plazmatické buňky produkující protilátky<sup>25,43</sup>.



**Obr. č. 16:** Fáze diferenciacie B-buněk: Kmenové buňky (a) se diferencují v rychle se množící lymfoblasty (b) v kostní dřeni. Po opětovné diferenciaci v imunologicky naivní lymfocyty (c) migrují do lymfatických uzlin a tkání. Po prezentaci antigenu buňky opět proliferují (d) a získávají antigenní specifitu. Centrocyty (e), které exprimují membránový imunoglobulin s afinitou k antigenu, jsou pozitivně selektovány a stávají se buď paměťovými B-buňkami (f) nebo plasmatickými buňkami produkující protilátky (g). Obrázek byl převzat a upraven ze zdroje<sup>25</sup>.

Mezi antigeny na povrchu B-buněčných lymfocytů patří: CD19, CD20 a CD22 podílející se na signalizaci; CD40 podílející se na interakci s T-buňkami; CD45 a CD79a, který se podílí na přenosu signálu<sup>43</sup>.

Agresivní B-buněčné NHL nádory jsou výsledkem maligní transformace proliferativních lymfoblastů (nebo centroblastů), zatímco lymfomy nízké maligní (indolentní) jsou výsledkem transformace centrocytů nespecifických pro antigen, které nepodléhají apoptóze. Agresivní NHL jsou obvykle velmi citlivé a dobře reagují na chemoterapeutika, to však neplatí pro indolentní NHL, které jsou smrtelné a nevléčitelné<sup>25</sup>.

Heterogenita B-buněčných NHL z nich činí velmi komplikovanou a zahrnující skupinu nádorů, kterou je třeba léčit. Více než 95 % těchto malignit však exprimuje neglykosylovaný fosfoprotein CD20, který je exprimován na povrchu nezralých a zralých B-lymfocytů. Tento transmembránový protein hraje roli v iniciaci a diferenciaci buněčného cyklu a slouží také jako vápníkový kanál v plasmatické membráně B-buněk. Přítomnost CD20 na B-buňkách je homogenní s počtem  $>10^5$  exprimovaných kopií na buňku. Proto je CD20 atraktivním cílem pro imunoterapii využívající monoklonální protilátky anti-CD20 k léčbě širokého spektra malignit NHL<sup>25</sup>.

#### 2.4.1.2 Radioimunoterapie proti CD20+ lymfomům za využití radionuklidů $^{90}\text{Y}$ a $^{131}\text{I}$

Nejúspěšnějším cílem RIT je dosud antigen CD20. V roce 2003 byly na trh uvedeny dva radioimunokonjugáty, konkrétně  $^{90}\text{Y}$ -Ibritumomab-tiuxetan (Zevalin<sup>®</sup>) a  $^{131}\text{I}$ -tositumomab (Bexxar<sup>®</sup>), určených pro léčbu indolentních nebo transformovaných NHL<sup>41</sup>.

Ibritumomab je myší IgG1, která byla dále modifikována vytvořením chimérické mAb proti CD20, známé jako rituximab. Chelátor tiuxetan je schopen vázat radionuklid  $^{90}\text{Y}$ , což je vysoce energetický  $\beta$ -zářič. Kombinace tohoto konjugátu chelátoru a rituximabu s radionuklidem vytváří radioimunofarmakum, které je komerčně známé pod názvem Zevalin. Na druhou stranu, tositumomab je myší mAb IgG2a, která interaguje s jiným epitopem CD20. Pokud je označena  $^{131}\text{I}$ , získá se léčivo známé jako Bexxar.  $\beta$ -Zářiče, jako jsou  $^{90}\text{Y}$  a  $^{131}\text{I}$ , pronikají několika stovkami buněčných vrstev a díky „crossfire“ efektu mohou vyvolat apoptózu v nádorových buňkách, které nejsou přímo navázány na radioimunokonjugát. To umožňuje cílení na objemné nebo špatně vaskularizované nádorové masy<sup>41,44</sup>.

Před samotným zahájením RIT léčby je možné pacientovi podat volnou mAb, která vyčerpá populaci zdravých B-lymfocytů. Tímto způsobem se nasytí vazebná místa mimo cíl a optimalizuje se poměr mezi nádorem a pozadím. Tímto postupem se zlepšuje cílení radioaktivně označených protilátek anti-CD20 na nádor a následně se snižuje nespecifická celotělová absorbovaná dávka<sup>25,41</sup>.

Několik studií naznačuje, že hlavní toxicita radioimunokonjugátů je hematologická<sup>44,45</sup>, což je jeden z faktorů omezující dávku. Ozáření červené kostní dřeně vede ke snížení počtu krevních buněk, což může vyústit v neutropenii a trombocytopenii až k tvorbě myelodyplastického syndromu<sup>23</sup> (heterogenní skupině chorob, jejímž společným rysem je klonální porucha krvetvorby. Dochází k poruše diferenciaci pluripotentní kmenové buňky a nejčastějším projevem je anémie, leukopénie, trombocytopenie a jejich vzájemná kombinace<sup>46</sup>).

Vzhledem k tomu, že  $^{90}\text{Y}$  je téměř čistý  $\beta$ -zářičem, je zobrazování po léčbě Zevalinem<sup>®</sup> náročné. Množství pozitronů emitovaných  $^{90}\text{Y}$  v aplikované dávce není dostatečné, ani dostatečně fokusované, aby umožnilo přímé PET zobrazení. Lze však předpokládat, že  $^{111}\text{In}$ -ibritumomab má v lidském těle stejnou biodistribuci a lze ho tak využít pro zobrazování a dozimetrii před léčbou. Obvykle se injikuje stopové množství (185 MBq)  $^{111}\text{In}$ -ibritumomabu a v několika časových bodech se zobrazuje v průběhu následujícího týdne. Pozdější studie zvolily jako metodu zobrazování SPECT/CT namísto planárního zobrazování, které se ukazují jako lepší dozimetrické metody než metody založené na odběru vzorku krve. Nejčastějším

nežádoucím je přechodná myelotoxicita (poškození kostní dřeně) v důsledku standardní léčby  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab, kterou lze predikovat zobrazovacími metodami<sup>41</sup>.

#### 2.4.1.3 Radioimunoterapie proti CD20+ lymfomům za využití radionuklidu $^{177}\text{Lu}$

Mezi nově zkoumané radioimunokonjugáty se řadí  $^{177}\text{Lu}$ -lilotomab satetraxetan (Betalutin<sup>®</sup>), který se skládá z anti-CD37 IgG1 myší monoklonální protilátky lilotomabu konjugované satetraxetanem (*p*-SCN-benzyl-DOTA), který chelatuje  $\beta$ -zářič  $^{177}\text{Lu}$ . CD37 je vysoce glykosylovaný transmembránový protein selektivně exprimovaný zdravými B-buňkami a většinou B-buněčných lymfomů. Komplex protilátky a antigenu CD37 je po navázání internalizován, což umožňuje dopravit radioaktivitu do blízkosti jádra<sup>41</sup>.

Při přípravě radioimunokonjugátu musí být též kladen důraz na výrobu radionuklidu s dostatečnou čistotou a kvalitou. Například v začátcích výroby  $^{177}\text{Lu}$  byl jeden z přístupů neutronové ozařování terčů  $^{176}\text{Lu}$ . Tyto výrobní techniky poskytovaly výtěžky s nízkou specifickou aktivitou, s makrokvantitou  $^{176}\text{Lu}$  a s dlouho žijícími radionuklidovými nečistotami ( $^{177\text{m}}\text{Lu}$ ), které jsou problematické při radioaktivním značení biologických molekul, jako je rituximab. Novější vývoj v oblasti výroby  $^{177}\text{Lu}$  neutronovým ozařování  $^{176}\text{Yb}$  zlepšil kvalitu výtěžků a zvýšil specifickou aktivitu<sup>25</sup>.

Výhodou použití  $^{177}\text{Lu}$  je jeho emise  $\gamma$  záření, která umožňuje použít diagnostické zobrazování pro mapování biodistribuce. Radioimunokonjugáty s nuklidy  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{111}\text{In}$  a  $^{90}\text{Y}$  se *in vivo* hromadí v játrech a ledvinách, kde jsou katabolizovány a vyloučeny. V těchto orgánech dochází k nespecifickému zadržování radioaktivity v důsledku přenosu radioaktivního kovu na endogenní metaloproteiny. Toto nežádoucí chování lze například minimalizovat vložením štěpitelných linkerů. Renální retenci lze snížit podáváním lysinu (kationtové aminokyseliny)<sup>25,47</sup>.

## 2.5 Použití kovových nanočástic jako značek pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Nanočástice jsou částice malých rozměrů (jednorozměrných, 2D, nebo 3D) s velikostí od 1 do 100 nm s různorodými fyzikálními a chemickými vlastnostmi, a to díky jejich velkému povrchu. Obrovský zájem přitahují kovové nanočástice, zejména zlaté (AuNPs), díky pozoruhodným vlastnostem, jako je vysoký koeficient absorpce rentgenového záření, silná vazebná afinita k thiolům, disulfidům a aminům a jedinečné optické a výrazné elektronické vlastnosti<sup>48,49</sup>.

AuNPs lze označit fluorescenčními značkami nebo proteiny (např. zeleným fluorescenčním proteinem – GFP) a lze tak pomocí standardní fluorescenční mikroskopie (FM) zobrazit jejich lokalizaci a pomocí emisní mikroskopie (EM) určit jejich ultrastrukturu<sup>50,51</sup>.

Při transmisní elektronové mikroskopii (TEM) prochází paprsek elektronů tenkým vzorkem a vzájemnou interakcí lze vizualizovat vnitřek vzorku. Díky krátké vlnové délce elektronového svazku, která je 100 000× kratší než fotony ve viditelném spektru, lze získat subnanometrové rozlišení odpovídající hodnotě až 0,2 nm, avšak příprava, či tloušťka biologických vzorků může rozlišení snížit. Lze získat pouze statické informace v důsledku fixace, což znemožňuje dynamické studie. TEM lze využít pro studium interakcí nanokonstrukcí s biologickým prostředím<sup>52</sup>.



### 3. CÍLE PRÁCE

#### 1) Příprava, charakterizace a studium *in vitro* chování fluorescenčně označených konjugátů a radioimunokonjugátu a jeho sledování *in vivo* biodistribuce ve zdravé myši:

- Příprava konjugátu rituximab-FITC prostřednictvím volných  $\epsilon$ -aminoskupin lysinů a konjugátu rituximab-TCO-tetrazin-FITC bioortogonální reakcí
- Příprava konjugátu rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA a následné označení  $^{161}\text{Tb}$
- Stanovení obsahu přečištěného rituximabu VID spektrofotometrií za využití BCA eseje a koncentrace konečného konjugátu UV-VIS spektrofotometrií
- Charakterizace konjugátů rituximab-TCO a rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA pomocí metody MALDI-TOF a stanovení hodnoty DAR
- Ověření specifické vaznosti konjugátů *in vitro* experimenty a sledování *in vivo* biodistribuce radioimunokonjugátu na myším modelu

#### 2) Modifikace kovových nanočástic protilátkou pro zobrazení rostlinné tkáně:

- Modifikace zlatých nanočástic fluorescenčně označenými protilátkami typu IgG
- Vizualizace rostlinné tkáně fluorescenční mikroskopií a vizualizace nanočástic pomocí metody TEM

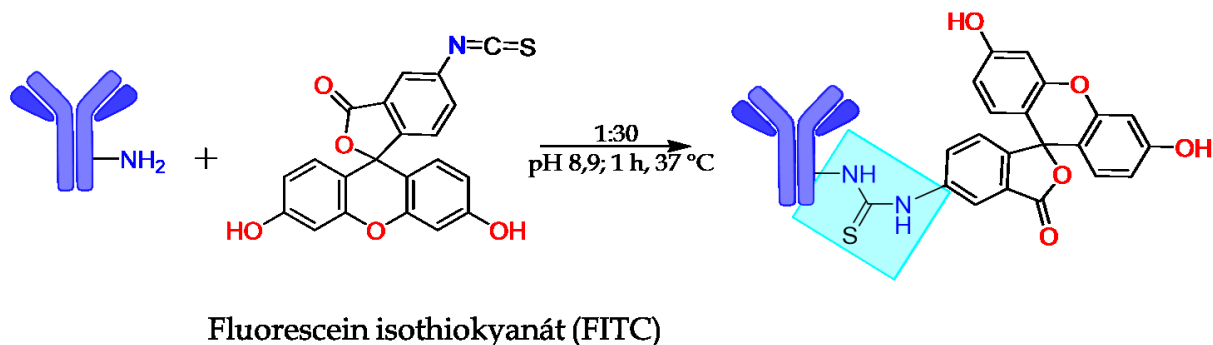
## 4. MATERIÁLY A METODIKA

### 4.1 Použité chemikálie

CHEMIKÁLIE	DODAVATEL
2-merkapt ethanol	Sigma Aldrich Co.
(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)fenyl)methanamin·HCl	Sigma Aldrich Co.
aceton	Lach-Ner, s.r.o.
acetonitril (HPLC kvalita)	Fischer Scientific
Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG	Fischer Scientific
Alexa Fluor™ 555 donkey anti-rabbit IgG	Fischer Scientific
azid sodný	Sigma Aldrich Co.
dichlormethan (DCM)	Lach-Ner, s.r.o.
<i>N,N</i> -dimethylformamid (DMF)	Lach-Ner, s.r.o.
dimethylsulfoxid (DMSO; HPLC kvalita)	Macron Fine Chemicals™
Fluorescein isothiokyanát (FITC)	Sigma Aldrich Co.
fyzilogický roztok pufrovaný fosfátem (PBS) ve formě tablet	Sigma Aldrich Co.
hydrogenuhličitan sodný	Lach-Ner, s.r.o.
hydroxid sodný	Lach-Ner, s.r.o.
chlorid sodný	Lach-Ner, s.r.o.
MabThera – Riruximab (100 mg/10 ml)	F. Hoffmann-La Roche AG
methanol	Lach-Ner, s.r.o.
NanoXact Gold Nanorods 660 nm	NanoComposix
ninhydrin	Honeywell Fluka
<i>p</i> -SCN-Bn-CHX-A''-DTPA	Macrocyclics
RPMI 1640 medium (pro buněčné kultury)	Sigma Aldrich Co.
silicagel (40–75 µm)	Sigma Aldrich Co.
TCO-PEG(4)-NHS	Iris Biotech GmbH
uhličitan sodný	Lach-Ner, s.r.o.

## 4.2 Příprava fluorescenčně a radioznačených konjugátů s rituximabem – charakterizace a biologické experimenty

### 4.2.1 Příprava konjugátu rituximab-FITC

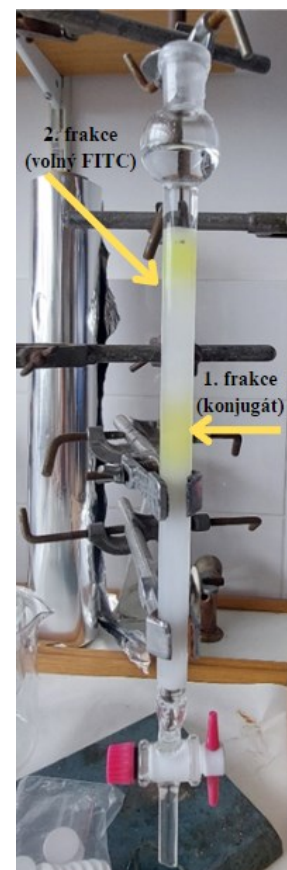


Obr. č. 17: Schématické znázornění přípravy konjugátu rituximab-fluoresceinisothiokyanát (FITC)

Pro přípravu fluorescenčně označené protilátky dle schématu, viz Obr. č. 17, bylo 0,2 ml (~2 mg) rituximabu z farmaceutického přípravku přečištěno do formy čistého proteinu v roztoku PBS pufru (pH 8,90, pH bylo upraveno 0,1M roztokem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) pomocí centrifugace na přístroji CENTRIFUGE 5430R (Eppendorf) s rotorem FA-45-30-11 v centrifugačních zkumavkách s filtrem (Amicon® Ultra-0,5 ml; 50 000 cut-off) po dobu 10 min při 5000 rpm a 15 °C. Následně byl stanoven obsah přečištěné protilátky v roztoku pufru pomocí UV-VIS spektrofotometrie za využití BCA eseje pro stanovení koncentrace proteinů. K 700  $\mu\text{l}$  protilátky ( $7,27 \cdot 10^{-6}$  mol; 1 ekv.; 1,5 mg/ml) bylo přidáno 0,8 mg FITCu ( $2,18 \cdot 10^{-4}$  mol, 30 ekv.) rozpuštěného v 10  $\mu\text{l}$  DMSO. Reakční směs byla inkubována po dobu 1 hodiny na vodní lázni při 37 °C. K ukončení reakce byl konjugát promyt celkem  $3 \times 300$   $\mu\text{l}$  roztoku PBS pomocí centrifugace v centrifugační zkumavce s filtrem se stejným protokolem jako u čištění rituximabu před reakcí.

Před samotným čištěním konjugátu od nenavázaného fluoresceinu pomocí rozměrově vylučovací chromatografie (SEC) byla stacionární fáze (s.f.) Sephadex G-25 sanitována, aby bylo sníženo riziko kontaminace. Postupovalo se podle uživatelské příručky Sephadex™, návodu 56-1190-96 AC od GE Healthcare. Stacionární fáze byla kvantitativně převedena z kolony do kádinky a celkem 3× dekantována 300 ml 0,2M roztoku NaOH. Sephadex byl následně nechán v kontaktu s 0,2M roztokem NaOH po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Následně byla stacionární fáze celkem 3× dekantována mobilní fází (m. f.) 0,9% roztoku NaCl, převedena na kolonu a promyta 100 ml m.f.

Reakční směs byla přečištěna za využití SEC chromatografie (s.f. – Sephadex, m.f. – 0,9% NaCl) frakce byly jímány po 1 ml (bylo zřetelné rozdělení konjugátu – první pruh – od nenavázaného fluoresceinu, viz Obr. č. 18). Následně byly první čtyři frakce (světle žlutého zbarvení) zakoncentrovány za pomoci centrifugačních zkumavek (Eppendorf) s filtrem na centrifuze.



**Obr. č. 18:** SEC kolona pro přečištění konjugátu rituximab-FITC, první pruh: konjugát, druhý pruh: volný fluorescein

#### 4.2.2 Stanovení obsahu přečištěného rituximabu pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Ke stanovení koncentrace protilátky byla využita Pierce™ BCA Protein Assay Kit od Thermo Scientific™, která je založena na principu kyseliny bicinchoninové (BCA) pro kolometrické stanovení a kvantifikaci celkové bílkoviny. Tato metoda kombinuje biuretovou reakci, při které dochází k redukci  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$  za přítomnosti proteinů v alkalickém prostředí, s vysoce citlivou selektivní kolometrickou detekcí  $\text{Cu}^+$  kationtu za použití činidla s bicinchoninovou kyselinou. Chelatací dvou molekul BCA s  $\text{Cu}^+$  kationtem vzniká fialově zbarvený, ve vodě rozpustný komplex, který vykazuje silnou absorpenci při 562 nm, jež je téměř lineární se zvyšující se koncentrací proteinu v širokém rozsahu (20-2000  $\mu\text{g/ml}$ ). Avšak tato metoda není metodou konečného bodu, což znamená, že výsledné zbarvení roztoku se dále vyvíjí. Po inkubaci je pokračující rychlost vývoje barvy dostatečně pomalá na to, aby bylo možné provést analýzu velkého počtu vzorků současně.

Za tvorbu barvy pomocí BCA je zodpovědná makromolekulární struktura bílkovin, počet peptidových vazeb a přítomnost 4 konkrétních aminokyselin (cysteinu, cystinu, tryptofanu a

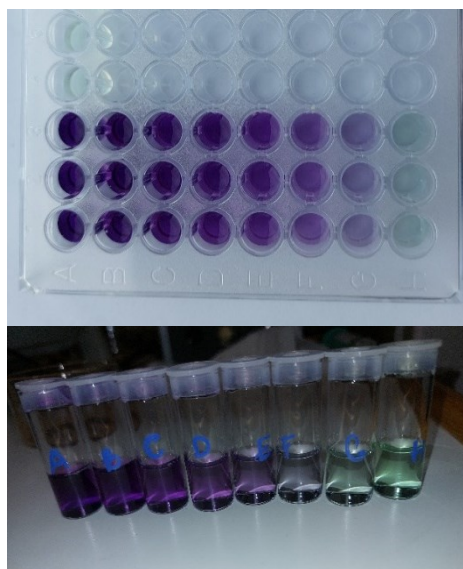
tyrosinu)<sup>53</sup>. Proto byla kalibrační křivka modifikována za využití standardu lyofilizátu rituximabu, aby zjištěná koncentrace, co nejvíce korelovala se skutečnou hodnotou.

Pro lyofilizát byl přes PD-10 kolonu promyt 1 ml rituximabu (~10 mg) z farmaceutické vialky, frakce byly jímány po 1 ml do ependerovek. Detekčním činidlem ninhydrinem byly na TLC destičce (ALUGRAM® SIL G/UV<sub>254</sub>; MACHEREY-NAGEL) detekovány frakce, ve kterých se nacházela protilátka. Tyto frakce byly lyofilizovány.

K proměření kalibrační křivky a stanovení koncentrace přečištěného rituximabu bylo postupováno podle manuálu k přiložené eseji metodou za využití 96 jamkových mikrotitračních destiček (ANICRIN S.R.L.). Bylo připraveno pracovní činidlo (WR) smícháním 50 dílů činidla A s 1 dílem činidla B. Následně byla ze zásobního roztoku rituximabu (2 mg/ml) připravena série A-I standardních roztoků (viz Tab. č. 2) na přípravu kalibrační křivky. Poté bylo do každé mikrotitrační jamky napipetováno 25 µl jednotlivých standardních roztoků a neznámých vzorků a multikanálovou pipetou k nim bylo přidáno 200 µl WR. Všechny standardní roztoky a vzorky byly měřeny v triplicátu. Ihned byla mikrotitrační destička umístěna do inkubátoru a za stálého míchání byla inkubována po dobu 30 min při 37 °C. Následně byla změřena absorbance jednotlivých roztoků při 562 nm na microplate readeru (Agilent BioTek Synergy H1 Microplate Reader®) ovládaném programem BioTek Gen5® (Agilent, Version: 3.12) a byla sestavena kalibrační křivka.

**Tab. č. 2:** Příprava standardních roztoků na kalibrační křivku

	V <sub>PBS</sub> [mg]	V <sub>RIT</sub> [ml]	c [mg/ml]
A		300 ze zás. roztoku	2000
B	125	375 ze zás. roztoku	1500
C	325	325 ze zás. roztoku	1000
D	175	175 z B	750
E	325	325 z C	500
F	325	325 z E	250
G	325	325 z F	125
H	400	100 z G	25
I	400	0	0



**Obr. č. 19:** Nahore: rozložení standardních roztoků na přípravu BCA kalibrační křivky (poměr vzorku ku WR = 1:8). Dole: Standardní roztoky ve 2 ml, po 30 minutách inkubace při 37 °C (poměr vzorku ku WR = 1:20)

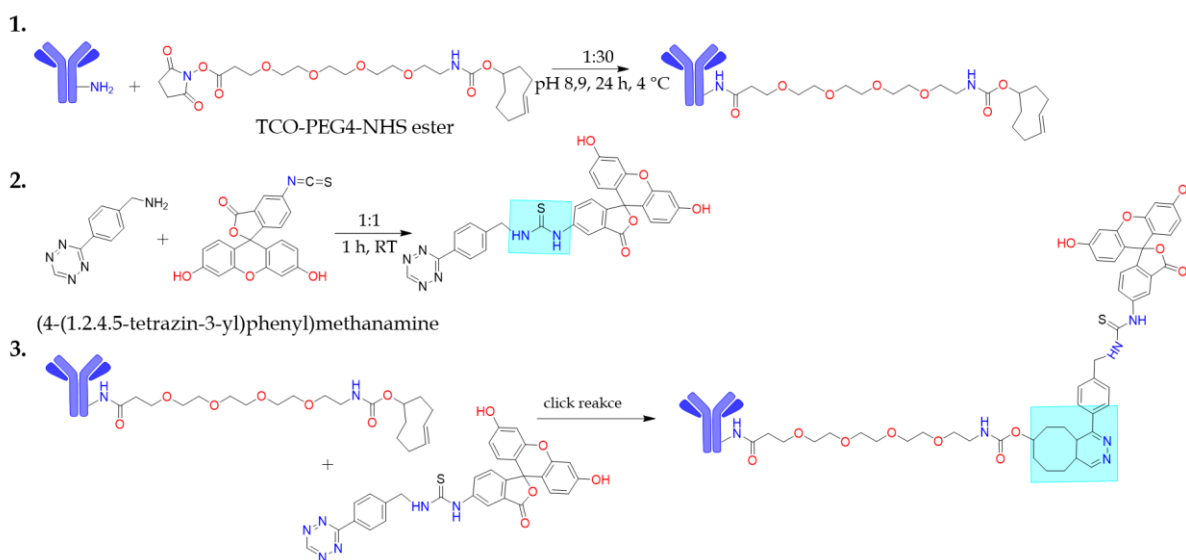
### 4.2.3 *In vitro* experimenty za využití fluorescenční spektroskopie (FS)

K *in vitro* experimentům byly použity 3 typy buněk. Lidské B-buňky, které na svém povrchu exprimují CD20 antigen: Raji a Ramos sloužící jako pozitivní kontrola a zvířecí T-buňky, které nemají CD20 receptor: EL 4 sloužící jako negativní kontrola.

V UV sterilizačním boxu byl odpipetován do 5ml plastových zkumavek 1 ml roztoku média s buňkami Raji, Ramos, respektive EL 4 ( $10^6$ /ml), bylo k nim přidáno 10  $\mu$ l konjugátu rituximab-FITC ( $\sim 1$  mg/ml) a byly nechány inkubovat při 37 °C po dobu 30 min. Následně byly centrifugovány na přístroji CENTRIFUGE 5424 (Eppendorf) s protokolem – 3 min, 1500 rpm, 15 °C. V UV sterilizačním boxu byl od pelety buněk oddělen roztok média a ihned k buňkám byl přidán 1 ml roztoku PBS, čímž byl odstraněn nenavázaný konjugát, který by zvyšoval pozadí. Několik kapek roztoků buněk v PBS byly napipetovány na konfokální misky.

Fluorescenční mikroskopie byla měřena na IX83 konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu (Olympus, Tokyo, Japan). Vzorky byly excitovány polovodičovým laserem o vlnové délce 488 nm. Emitovaná fluorescence následně prošla objektivem, konfokálními aperturami a emisními filtry (520/35 Bright Line). Obraz byl zpracován v programu OLYMPUS FLUOVIEW (Olympus, Version: 4.2c). Data naměřil Mgr. Miroslav Vetrík, Ph.D. z vědeckého oddělení „Nadmolekulární polymerní systémy“ Ústavu makromolekulární chemie Akademie Věd ČR.

### 4.2.4 Příprava konjugátu rituximab-TCO-tetrazin-FITC



**Obr. č. 20:** Schématické znázornění přípravy konjugátu rituximab-TCO-tetrazin-FITC skládající se ze tří dílčích reakcí. 1) Konjugace reakcí aminokyselinového zbytku lysinu u rituximabu s NHS aktivovaným esterem u TCO za tvorby amidové vazby. 2) Reakce aminoskupiny u tetrazinu s SCN skupinou fluoresceinu za tvorby thioamocovinové vazby. 3) Bioortogonální reakce rituximab-TCO s molekulou tetrazin-FITC.

Příprava konjugátu dle schématu, viz Obr. č. 20, se skládá ze 3 dílčích kroků. **Prvním reakčním krokem** je příprava konjugátu rituximab-TCO. Přes PD-10 bylo přečištěno 0,1 ml rituximabu z farmaceutické vialky (~1 mg; doplněn na objem 1 ml m.f.) za využití mobilní fáze 0,1M roztoku uhličitanového pufru (25:1 NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 8,90). Byly jímány frakce po 0,5 ml do ependorovek. Následně bylo zjištěno, ve kterých frakcích se nachází protein detekcí na TLC destičce pomocí detekčního činidla ninhydrinu (4.-5. frakce). Byla zjištěna koncentrace rituximabu ve frakci č. 5 pomocí BCA stanovení, které je popsáno výše. K nasazení reakce bylo odpipetováno 69 µl (0,1 mg) roztoku rituximabu v uhličitanovém pufru a k němu přidáno 10,6 µg TCO-PEG<sub>4</sub>-NHS esteru rozpuštěného v 5 µl DMSO (standární roztok TCO: 3,20 mg v 1509 µl DMSO). Takto připravená reakční směs byla ponechána do druhého dne, aby reagovala při 4 °C. K ukončení reakce byl konjugát přečištěn od nenavázaného TCO linkeru přes PD-10 kolonu s mobilní fází PBS, kdy frakce byly jímány po 0,5 ml. Zjištění kolik molekul se průměrně navázalo na 1 molekulu rituximabu (hodnoty DAR) ve frakcích bude popsáno níže.

**Druhou reakcí** je spojení derivátu tetrazinu s fluoresceinem tvorbou kovalentní vazby mezi aminoskupinou derivátu tetrazinu s isothiokyanátovou skupinou fluoresceinu. Bylo odváženo 5,05 mg (4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)fenyl)methanaminu ( $2,7 \cdot 10^{-5}$  mol) a 10,50 mg FITCu ( $2,7 \cdot 10^{-5}$  mol) a k navážkám bylo přidáno 100 µl DMF (tetrazin se nerozpouští). Do reakce byl také přidán 1 ekv. triethylaminu (bazické prostředí) tak, že k roztoku s derivátem tetrazinu bylo přidáno 3,7 µl roztoku triethylaminu (0,5 ekv.,  $1,4 \cdot 10^{-5}$  mol), čímž se zlepšila rozpustnost derivátu tetrazinu a po přidání 100 µl TCO linkeru v DMF byla přidána druhá polovina triethylaminu. Reakční směs byla ve tmě míchána po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Směs následně byla odpařena na vakuové odparce, celkem 2× suspendována v methanolu a znovu odpařena.

#### 4.2.5 Izolace ligandu tetrazin-FITC pomocí sloupcové chromatografie

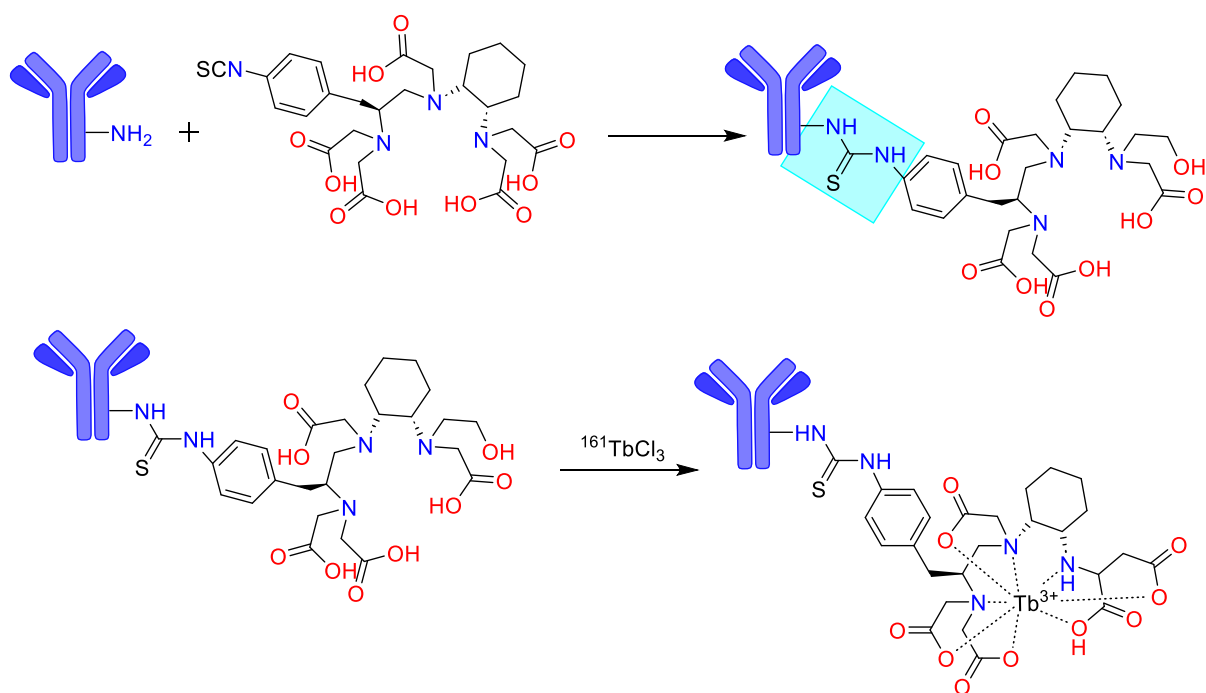
Před samotnou izolací produktu tetrazin-FITC od nezreagovaných výchozích látek byla pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC na silikagelu) nalezena vhodná mobilní fáze k oddělení produktu od výchozích látek. Následně byla připravena kolona, která byla naplněna silikagelem (~50 cm<sup>3</sup>) o velikosti částic 40-75 µm a byla promývána před vlastní chromatografickou separací směsí rozpouštědel, které byly zvoleny pro počáteční krok gradientové eluce, tj. DCM a aceton v poměru 3:1 (m.f.). Vzorek byl rozpuštěn v malém objemu mobilní fáze a byl nanesen na kolonu. Frakce byly jímány po dobu dvou hodin do 15ml skleněných zkumavek v průběhu byl měněn gradient na 100% aceton, a poté bylo postupně

zvyšován obsah methanolu na čistý methanol. Dle TLC vyhodnocení a barvy roztoků byly frakce spojeny do kulatých odměrných baněk, ze kterých byla organická rozpouštědla odpařena na RVO. Odparky byly analyzovány hmotnostní spektrometrií (MS).

#### 4.2.6 Bioortogonální reakce – *in vitro* experiment

Nejprve bylo do plastových zkumavek Eppendorf odpipetováno 500  $\mu$ l roztoku média s buňkami (Raji, Ramos a EL4 –  $10^6$ /ml) a roztoky byly zcentrifugovány (3 min, 1500 rpm, 15  $^{\circ}$ C). Po zcentrifugování bylo odebráno RPMI médium a k peletě buněk bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku konjugátu rituximab-TCO z frakce č. 5 (~0,08 mg/ml) a buňky byly inkubovány po dobu 37  $^{\circ}$ C v inkubátoru po dobu 30 min, aby došlo k nasycení receptorů. Během inkubace bylo 0,01 mg tetrazin-FITCu rozpuštěno v 1,5 ml pufru PBS. Po 30 minutách bylo k reakčním roztokům přidáno 250  $\mu$ l roztoku s rozpuštěným tetrazin-FITCem a inkubace pokračovala dalších 30 min. Následně byly roztoky buněk promyty celkem 2 $\times$  od nenávaných látek centrifugací (přídavek 580  $\mu$ l PBS). Několik kapek bylo přidáno na konfokální misky a byla měřena fluorescenční mikroskopie na konfokálním fluorescenčním mikroskopu, stejným postupem popsaným výše. *In vitro* experiment a data naměřili Mgr. Miroslav Vetrík, Ph.D. a Ing. Leana Vratović z vědeckého oddělení „Nadmolekulární polymerní systémy“ Ústavu makromolekulární chemie Akademie Věd ČR.

#### 4.2.7 Příprava konjugátu rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA- $^{161}$ Tb



**Obr. č. 21:** Schématické znázornění přípravy konjugátu rituximab-CHX-A''-DTPA- $^{161}$ Tb.



Pro konjugaci protilátky chelátorem *p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA (zkr. CHX-A''-DTPA) dle schématu, viz Obr. č. 21, bylo 0,1 ml (~1 mg) rituximabu z farmaceutické viálky přečištěno do formy čistého proteinu v roztoku uhličitanového pufru (pH 8,90, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a NaHCO<sub>3</sub>) přes PD-10 kolonu. Celkem bylo jímáno 10 frakcí po 1 ml a rituximab v jednotlivých frakcích byl detekován na TLC destičce pomocí roztoku ninhydrinu (rozpuštěném v methanolu). Následně byl stanoven obsah přečištěné protilátky v roztoku pufru pomocí UV-VIS spektrofotometrie za využití BCA stanovení koncentrace proteinů. Do reakce bylo k 1 ml přečištěné protilátky ( $8,30 \cdot 10^{-9}$  mol; 1 ekv., 1,2 mg/ml) přidáno 0,175 mg *p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA ( $2,49 \cdot 10^{-7}$  mol, 30 ekv.) rozpuštěného v 6,7  $\mu$ l DMSO. Reakční směs byla inkubována po dobu 1 hodiny na vodní lázni při 37 °C. K ukončení reakce byl konjugát separován přes PD-10 kolonu (s m.f. PBS, pH 7,4) a frakce byly jímány po 1 ml. Frakce, ve kterých se nacházel konjugát rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA byly znovu detekovány pomocí ninhydrinu. K určení koncentrace protilátky v roztoku byla použita UV-VIS spektrometrie při 280 nm a byly stanoveny hodnoty DAR pomocí hmotnostní spektrometrie.

K radioaktivnímu značení bylo k 500  $\mu$ l konjugátu (~300  $\mu$ g) v PBS pufru přidáno 3,5  $\mu$ l roztoku <sup>161</sup>Tb v 0,05M HCl (30 MBq). Reakční směs byla inkubována po dobu 1 h při 37 °C za mírného míchání. Po 1 hodině bylo provedeno TLC (m. f. – 10% roztok CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> v methanolu; s.f. – iTLC SG; silikagel naimpregnovaný na vrstvě skleněných vláken; 12x1 cm, Agilent Technologies) pomocí Radio-TLC scanneru na přístroji Bioscan AR-2000 Imaging Scanner s detektorem GABI (Elysia Raytest). Následně byl připravený konjugát přečištěn přes PD-10 s m.f. PBS a frakce byly jímány po 1 ml (celkem bylo získáno 10 frakcí). Byl stanoven radiochemický výtěžek. Pomoc s radioznačením a data z TLC scanneru naměřil RNDr. Martin Vlk, Ph.D. z fakulty FJFI. Radioznačení probíhalo v laboratoři ČVUT.

#### 4.2.8 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Pro sledování průběhu reakce rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA a tetrazin-FITC byl použit přístroj DIONEX UltiMate3000 (Thermo Fisher Scientific) opatřený pumpou LPG3400RS a detektorem diodového pole DAD-3000 ovládaný programem Chameleon Client (Dionex Corporation, Version 6.80, SR16 Build 5387 (291597)). Vzorky byly rozpuštěny v mobilní fázi A (H<sub>2</sub>O:ACN = 95:5) a následně byly nastříknuty do šesticestného ventilu RHEODYNE<sup>®</sup> pomocí 20  $\mu$ l mikrostříkačky Hamilton. Vzorky byly separovány na C<sub>18</sub> koloně Chromolith<sup>®</sup> Performance RP-18e 100-4,6 mm s celkovým elučním časem 10 minut. Průtok a gradient je znázorněn v Tab. č. 3.

**Tab. č. 3:** Gradient mobilních fází pro HPLC

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0,10	1,0	95	5
0,50	1,0	95	5
8,00	1,0	5	95
9,00	1,0	5	95
9,10	1,0	95	5
9,90	0,5	95	5
9,91	0,1	95	5

Stacionární fáze: Kolona C<sub>18</sub> Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm

Mobilní fáze A: 95 % H<sub>2</sub>O, 5 % ACN, 0,1 % TFA (v/v/v)

Mobilní fáze B: 5 % H<sub>2</sub>O, 95 % ACN, 0,1 % TFA (v/v/v)

#### 4.2.9 Stanovení obsahu protilátky v konjugátu rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Na UV-VIS spektrofotometru Evolution™ 220 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ovládaném programem Thermo INSIGHT (Thermo Fisher Scientific, Version: 1.4.40) byla proměřena kalibrační křivka ze zásobního roztoku lyofilizovaného rituximabu (2 mg/ml; rozpuštěný v PBS) s 8 kalibračními body. Měření bylo provedeno v duplikátu. Příprava kalibračních roztoků je ukázána v Tab. č. 4. Absorbance byly měřeny v křemenné kyvetě s šířkou 10,00 mm při 280 nm. Koncentrace protilátky v přečištěných konjugátech byly stanoveny dosazením do rovnice kalibrační křivky.

**Tab. č. 4:** Příprava kalibračních roztoků na kalibrační křivku při 280 nm

	V <sub>PBS</sub> [mg]	V <sub>RIT</sub> [μl]	c [mg/ml]
A		1000	2000
B	250	750	1500
C	250	750	1125
D	250	750	844
E	250	750	633
F	500	500	316
G	500	500	158
H	500	500	79

#### 4.2.10 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací s průletovým analyzátozem (zkr. MALDI-TOF; *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass spektrometry*)

Ke stanovení počtu malých molekul (TCO, DTPA) průměrně navázaných na jednu molekulu protilátky, tedy hodnoty DAR, byla použita metoda MALDI-TOF. Hmotnostní spektrum bylo naměřeno v pozitivním reflektroevém módu na spektrometru UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) vybaveném Nd:YAG laserem (355 nm, 2000 Hz). Spektrum bylo získáno akumulací cca 5 000 pulzů laseru. Byla použita opožděná extrakce a vnější kalibrace. Vzorky byly připraveny metodou dvojité vrstvy. Byly připraveny 3 roztoky: roztok č. 1 byl nasycený roztok kyseliny sinapové (3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)prop-2-enová kyselina, matrice) v ethanolu, roztok č. 2 byl nasycený roztok kyseliny sinapové (3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)prop-2-enová kyselina, matrice) ve 30 : 70 acetonitril : voda s přídávkem 0,1% TFA a roztok č. 3 byl připraven rozpuštěním vzorku ve vodě s přídávkem 0,1% TFA. Jeden µl roztoku č. 1 byl nanesen na ocelovou terčíkovou destičku a ponechán vyschnout za laboratorní teploty. Následně byla nanesena směs, která se skládala z 0,5 µl roztoku č. 2 a 0,5 µl roztoku č. 3 (poměr 1:1) a vše bylo ponecháno vyschnout za laboratorní teploty. Data naměřila Ing. Zuzana Walterová ze servisně výkonné skupiny „Laboratoře analytické chemie“ na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR.

#### 4.2.11 *In vitro* experiment s radioimunokonjugátem

Do 50ml plastových zkumavek bylo odpipetováno 25 ml buněk v médiu a byly zcentrifugovány na centrifuze (5 min, 1500 rpm). Roztok média byl vyměněn za 3 ml PBS a po 1 ml byly roztoky napipetovány do plastových ependorovek. Posléze byly zcentrifugovány ještě jednou a supernatan byl vyměněn za 100 µl PBS pufru. K takto připraveným buňkám bylo přidáno 20 µl konjugátu rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA-<sup>161</sup>Tb z frakce č. 5 a byly inkubovány po dobu 1 h při pokojové teplotě. Poté byly zcentrifugovány a na ionizační komoře (Wiper) byla změřena radioaktivita supernatanu, buněk s novým přídávkem 100 µl PBS a prázdné reakční zkumavky. *In vitro* experiment byl proveden s pomocí Mgr. Miroslav Vetríka, Ph.D. z vědeckého oddělení „Nadmolekulární polymerní systémy“ Ústavu makromolekulární chemie Akademie Věd ČR a Mgr. Martiny Kabešové z 1. lékařské fakulty na Univerzitě Karlově.

#### 4.2.12 *In vivo* biodistribuce radioimunokonjugátu ve zdravé myši

Biodistribuce radioaktivně značeného konjugátu byla provedena na myším modelu (kmen C57Bl/L, albinotická verze). Do ocasní žíly bylo aplikováno 100  $\mu$ l roztoku připraveného radioimunokonjugátu v PBS pufru (pH 7,4) o aktivitě 24 MBq. Biodistribuce byla sledována pomocí trimodálního preklinického skeneru Albira SPECT/PET/CT (Albira Imaging System, Bruker BioSpin; Rheinstetten, Německo) v anestezii pomocí 2% isofluranu ve vzduchu. SPECT/CT myši byl proveden po 60 minutách, 6 a 24 hodinách po aplikaci. Nastavení všech akvizic bylo shodné, byl použit multipinhole kolimátor, 90 s / projekce a na závěr vyšetření bylo provedeno High Resolution CT (125  $\mu$ m rozlišení). Analýza a koregistrace obrazu byla provedena pomocí analytického softwaru PMOD (PMOD Technologies LLC; Zürich, Švýcarsko).

Po posledním SPECT/CT byla myši (ještě v anestezii) odebrána krev z retroorbitálního plexu heparinizovanou kapilárou, načež bylo zvíře v souladu s Plánem pokusu (PP) usmrceno cervikální dislokací, a byly odebrány vybrané orgány (zváženy, zaměřena radioaktivita). Měření radioaktivity  $^{161}\text{Tb}$  bylo provedeno na ionizační komoře (Veenstra VDC 404 Dose Calibrator). Radioaktivita byla normalizována na hmotnost orgánů a byla vypočtena %ID/g (procento aplikované dávky na gram, *percent injected dose per gram*).

*In vivo* experimenty provedli RNDr. Jan Kučka, Ph.D. z vědeckého oddělení „Nadmolekulární polymerní systémy“ Ústavu makromolekulární chemie Akademie Věd ČR a Ing. Pavla Volesak Francova z Centra pokročilého preklinického zobrazování v rámci 1. lékařské fakulty a Ing. Martin Duša, který zpracoval výsledky ze SPECT/CT. *In vitro* a *In vivo* experimenty byly provedeny na fakultě 1. lékařské a na CAPI.

### 4.3 Modifikace zlatých nanočástic protilátkami – biologické experimenty

#### 4.3.1 Modifikace zlatých nanočástic protilátkou fluorescenčně označenou 555 Alexa fluor barvivem

Ke 100  $\mu$ l ( $1,33 \cdot 10^{-9}$  mol, 1 ekv., 0,2 mg) oslímu anti-králičímu IgG označeným 555 Alexa fluor barvivem bylo přidáno 93  $\mu$ l 0,0143M roztoku 2-merkptoethanolu ( $1,33 \cdot 10^{-6}$  mol, 1000 ekv.) k redukci disulfidických vazeb. Reakce probíhala 30 min při pokojové teplotě za mírného míchání. K ukončení reakce byla reakční směs promyta přes PD-10 kolonu s m.f. PBS. Frakce, ve kterých byla protilátka, byly světle růžové (detekce pod UV vykazuje fluorescenci). Frakce č. 5 a 6 byly centrifugovány v Amicon centrifugačních zkumavkách s filtrem po dobu 10 minut při 5000 rpm a 15 °C, k zakoncentrování frakcí č. 5 a 6. Ke 160  $\mu$ l roztoku IgG bylo

přidáno 100  $\mu$ l zlatých nanočástic. A reakční směs byla inkubována po dobu 4 h při pokojové teplotě za stálého míchání. Následně byla reakční směs promyta přes PD-10 kolonu a frakce byly jímány po 0,5 ml (m.f. – PBS).

#### **4.3.2 Modifikace zlatých nanočástic protilátkou fluorescenčně označenou 488 Alexa fluor barvivem**

Ke 100  $\mu$ l ( $1,33 \cdot 10^{-9}$  mol, 1 ekv., 0,2 mg) kozího anti-králičího IgG označeným 488 Alexa fluor barvivem bylo přidáno 93  $\mu$ l 0,0143M roztoku 2-merkaptoethanolu ( $1,33 \cdot 10^{-6}$  mol, 1000 ekv.) k redukci disulfidických vazeb. Reakce probíhala 30 min při pokojové teplotě za mírného míchání. K ukončení reakce byla reakční směs promyta přes PD-10 kolonu s m.f. PBS. Frakce, ve kterých byla protilátka byly světle žluté (detekce UV fluorescencí). Frakce č. 6 a 7 byly zcentrifugovány v centrifugačních zkumavkách s filtrem po dobu 10 minut při 5000 rpm a 15 °C, k zakoncentrování frakce č. 6 a 7. Ke 140  $\mu$ l roztoku IgG bylo přidáno 100  $\mu$ l zlatých nanočástic. Reakční směs byla inkubována po dobu 4 h při pokojové teplotě za stálého míchání. Následně byla reakční směs promyta přes PD-10 kolonu a frakce byly jímány po 0,5 ml (m.f. – PBS). K frakcím s nanočásticemi modifikovanými protilátkou (frakce č 3,4) bylo přidáno 0,25 mg  $\text{NaN}_3$  (0,02% roztok) k bakteriální sterilizaci.

#### **4.3.3 Fluorescenční mikroskopie**

K experimentům byly využity tabákové buňky, které exprimují GFP-tubulin (beta-tubulin6), z těch byly vytvořeny protoplasty, kdy enzymaticky byla odstraněna buněčná stěna enzymy celulasou a pectolyasou. Poté byly nechány adherovat na sklíčkách pokrytých poly(L-lysinem) (polykationt interagující s buněčnými membránami) tak, aby následně praskly. Tímto procesem byly získány kusy plasmatické membrány a asociovaných proteinů nalepených na sklíčku označované jako „ghosty“.

Po lyzování protoplastů byly ghosty fixovány v 3,2% paraformaldehydu (PFA) v PBS. Pro imuno experiment byla použita primární protilátka proti GFP (Agrisera králičí anti-GFP) v látkovém poměru 1:500 v PBS s 0,5% BSA a byly inkubovány po dobu 30 minut. Jako sekundární protilátky byly využity protilátky modifikované nanočásticemi zlata, jejichž příprava byla popsána výše, smíšené v poměru 1:150 v PBS s 0,5% BSA. Data byla změřena pomocí fluorescenční mikroskopie. Vzorčky byly excitovány laserem o vlnové délce 488 nm. Standard zlatých nanočástic byl vizualizován pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Experimenty provedli a data naměřili vědečtí pracovníci z Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR RNDr. Jan Petrášek, Ph.D. a Mgr. Jan Martínek.

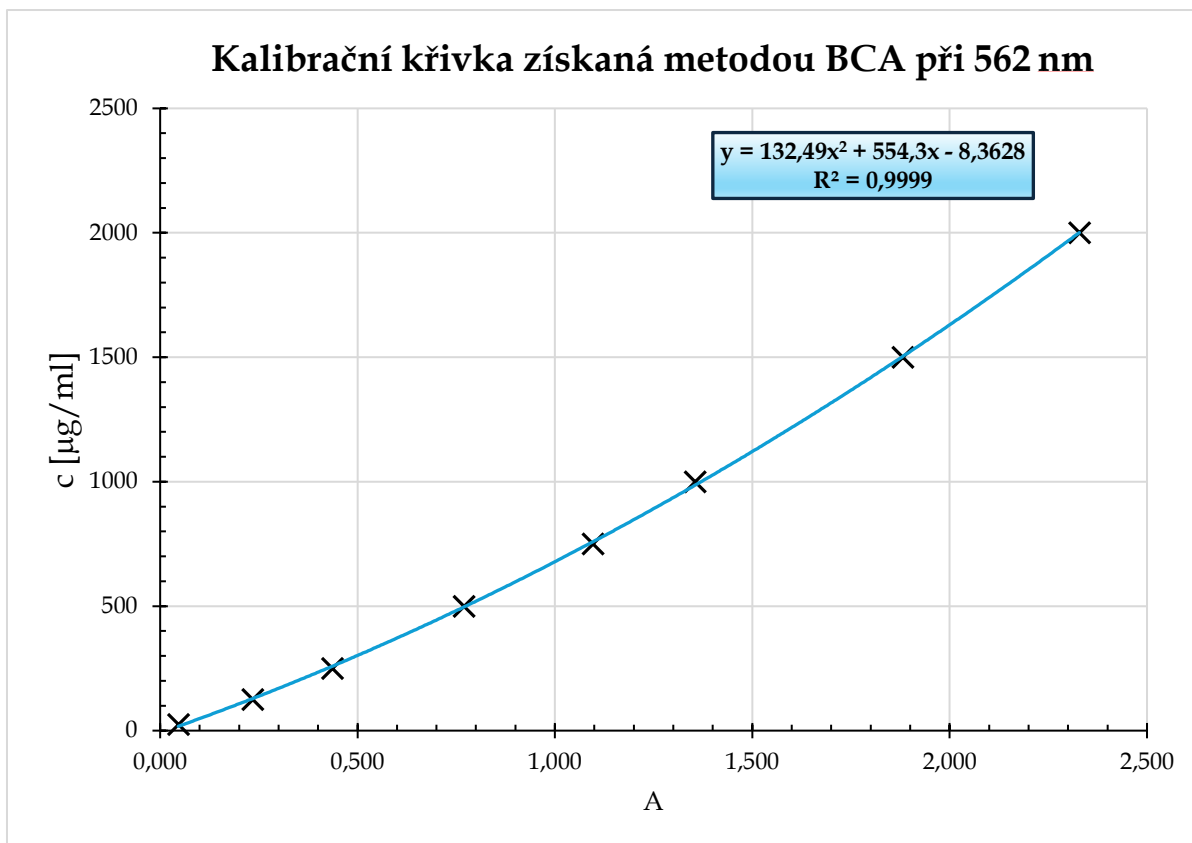
## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Příprava, charakterizace a biologické experimenty fluorescenčně a radioznačitelných konjugovaného rituximabu

#### 5.1.1 Stanovení koncentrace přečištěné protilátky a protilátky v připraveném konjugátu

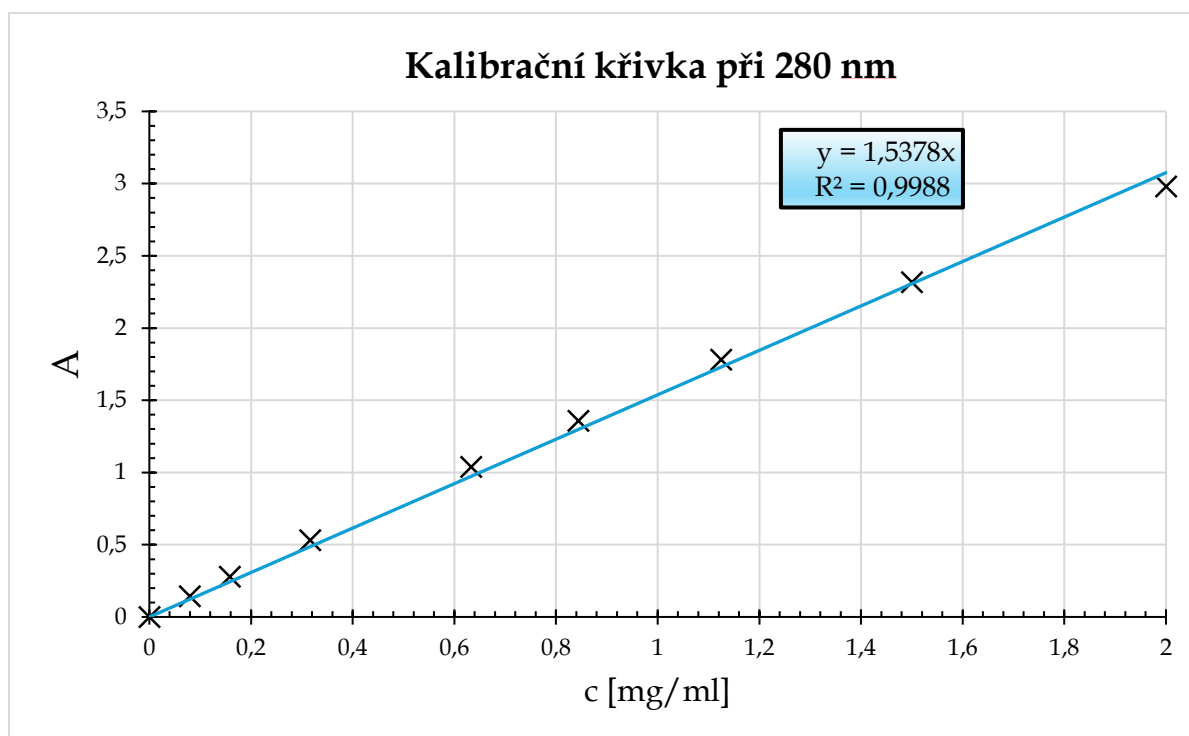
Ke stanovení obsahu přečištěného rituximabu do vhodného pufru a ke stanovení vstupní navážky malé molekuly (linkeru TCO, FITCu, nebo derivátu DTPA) pro konjugaci, byla vybrána metoda Pierce™ BCA Protein Assay. Tato metoda byla optimalizována, aby naměřená hodnota co nejlépe odpovídala skutečné koncentraci. Protože u této spektrofotometrické metody závisí na makromolekulární struktuře proteinu, počtu peptidových vazeb a přítomnosti konkrétních aminokyselin, byly kalibrační roztoky připraveny z lyofilizovaného rituximabu, ze kterého byl připraven zásobní roztok o koncentraci 2 mg/ml. Rituximab byl před lyofilizací přečištěn do miliQ vody přes PD-10 kolonu a přes noc byl lyofilizován. Byla použita metoda za využití microplate readeru, která umožňuje použití malých množství vzorků (25 µl). Bylo postupováno podle návodu od výrobce Thermo Fisher a také kalibrační křivka byla sestavena podle jejich doporučení. Standardní vzorky pro kalibrační křivku byly připraveny v triplicátu.

Tato metoda je vynikajícím nástrojem pro odhad koncentrace proteinů ve vzorku, protože intenzity vzniklého barevného reakčního produktu jsou přímou funkcí množství proteinu, které lze určit porovnáním hodnoty absorbance se standardní křivkou, avšak nejedná se o úplně lineární závislost. Prohozením os, kde jako závisle proměnná (osa Y) bude koncentrace a nezávisle proměnou (osa X) bude absorbance se z rovnice:  $y = ax^2 + bx + c$ , stanoví obsah proteinu mnohem snadněji. Výsledný graf kalibrační křivky a jeho závislost je zobrazen na Obr. č. 22.



**Obr. č. 22:** Kalibrační křivka pro měření koncentrace přečištěného rituximabu za využití Pierce™ BCA Protein Assay Kitu. Standardní roztoky byly připraveny ze zásobního lyofilizovaného rituximabu rozpuštěném v PBS v rozmezí 25-2 000 µg/ml a absorbance byla měřena při 562 nm.

Po konjugaci s *p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA nelze využít tuto metodu, protože by chelátor interferoval s Cu<sup>2+</sup> kationty přítomnými v roztoku, a tak pro stanovení proteinu byla zvolena UV/VIS spektrofotometrie při 280 nm. Tato metoda využívá toho, že proteiny vykazují silný pík způsobený absorbcí tryptofanových a tyrosinových zbytků, kdy lze uplatnit Lambert-Beerův zákon. Nevýhodou této metody je relativně nízká přesnost na rozdíl od velmi přesné BCA metody. Kalibrační křivka při 280 nm byla měřená v křemenné kyvetě, protože mikrotitrační destičky užívané při BCA eseji byly z materiálu, který absorbuje světlo v UV oblasti, a tak poskytuje vysoké pozadí a znemožňuje je využít při měření absorbance při 280 nm.



**Obr. č. 23:** Kalibrační křivka při 280 nm pro přibližné zjištění koncentrace protilátky v připraveném konjugátu po konjugaci.

Pro ověření přesnosti kalibrační křivky byl přečištěn (~1 mg) protilátky (celkem 3×) a byla stanovena koncentrace metodou BCA a měřením A při 280 nm. Koncentrace při stanovení pomocí BCA stanovení byla vypočtena jako průměr z triplikátu, ale při měření A při 280 nm objem připravené přečištěné protilátky vystačil pouze na jedno měření.

**Tab. č. 5:** Porovnání stanovené koncentrace po přečištění rituximabu (navážka: ~1 mg) pomocí UV-VIS spektrofotometrie s BCA stanovením a při 280 nm

Označení	c(z BCA) [mg/ml]	c(280) [mg/ml]
1	1,2	1,0
2	1,1	0,9
3	1,1	1,0

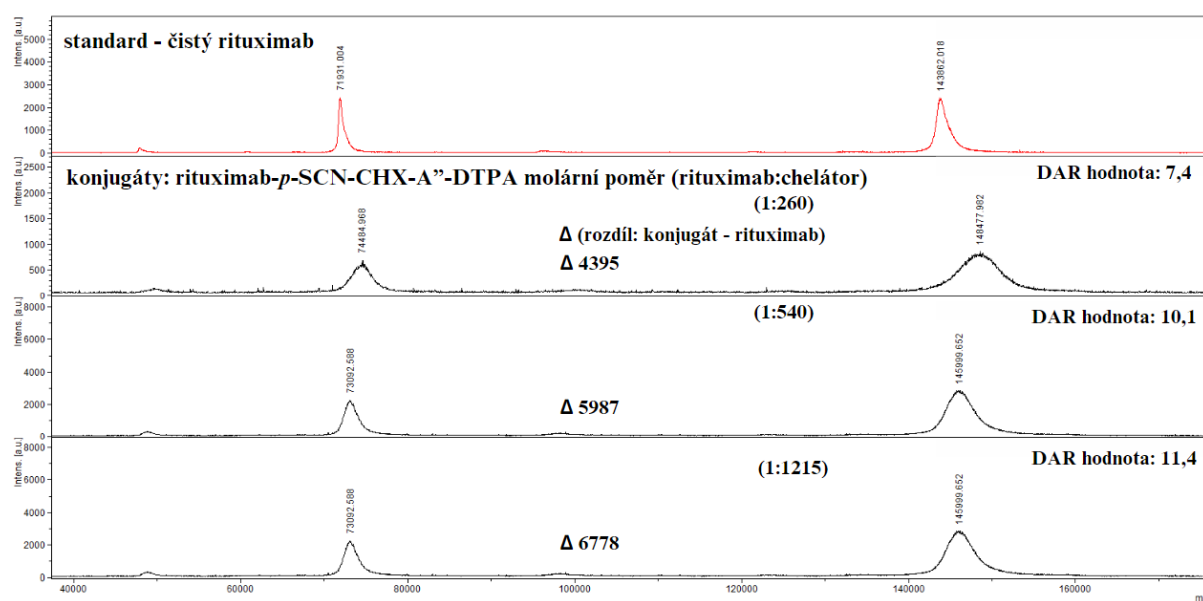
### 5.1.2 Stanovení hodnoty DAR metodou MALDI-TOF

K určení, kolik malých molekul (*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA, TCO) bylo průměrně konjugováno na 1 molekulu protilátky, tedy určení hodnoty DAR, byla zvolena metoda MALDI-TOF. Jedná se o šetrnou ionizační techniku, při které dochází k tvorbě iontů bez fragmentace molekul. Skládá se ze tří hlavních komponent: iontového zdroje (laseru), který ionizuje molekuly vzorku a ionty přeměňuje do plynné fáze, hmotnostního analyzátoru, který separuje molekuly v závislosti na jejich hmotnosti a detektoru, který monitoruje separované ionty.



Výhodou této metody je nenáročnost, co se týče přípravy vzorku, a také její rychlá doba zpracování a široký rozsah molekulových hmotností ( $MW$ , *molecular weight*), které lze analyzovat. Avšak nejlépe se využívá pro stanovení  $MW > 1$  kDa. Tato metoda umožňuje porovnáním molekulové hmotnosti konjugátů s molekulovou hmotností čistého čistého rituximabu určit přibližnou hodnotu DAR. Avšak vypočtený počet navázaných chelátů je pouze statisticky zprůměrovaný, a to z toho důvodu, že malé molekuly nejsou na protilátce rozděleny rovnoměrně.

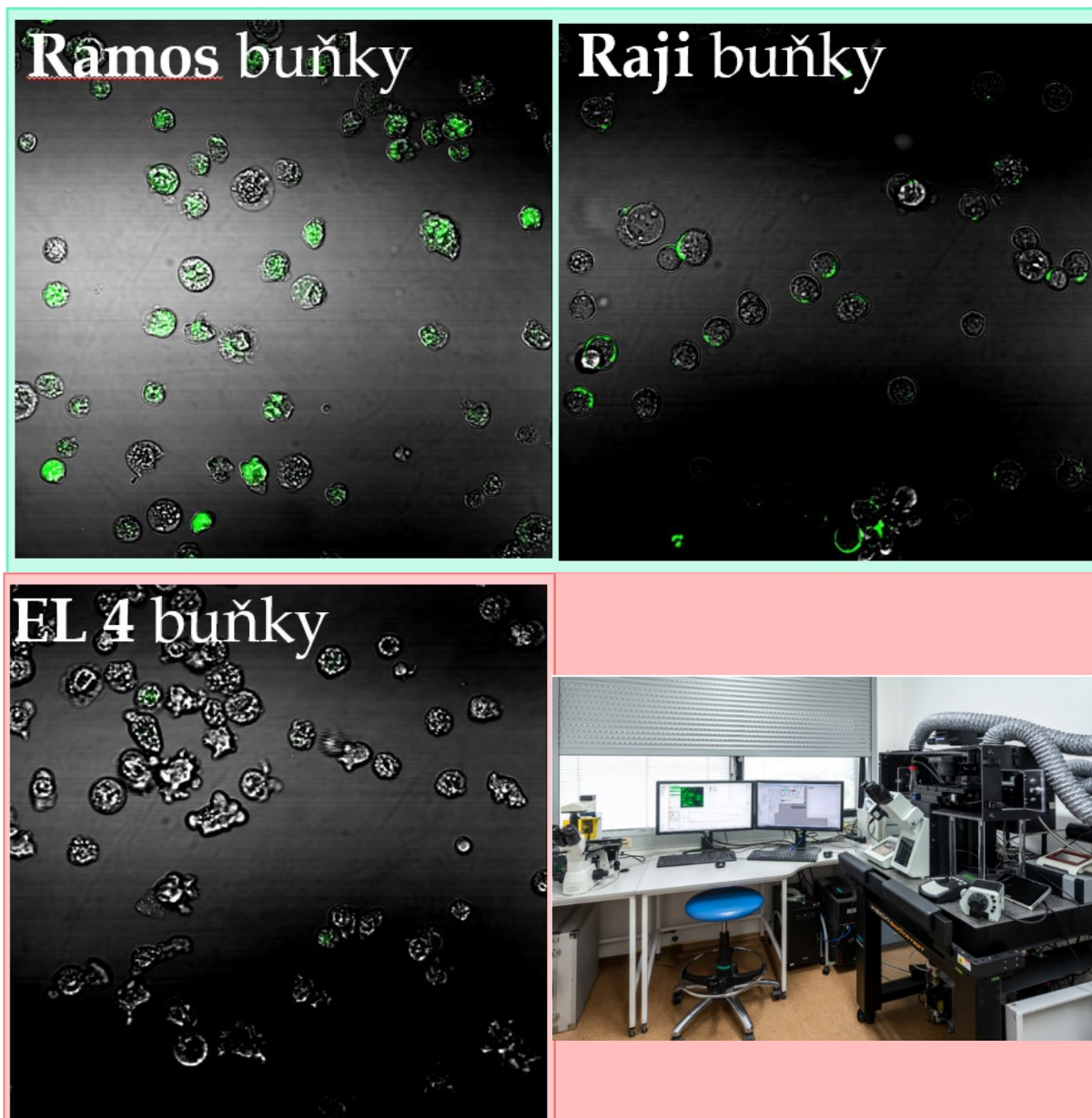
Nejprve byly úspěšně připraveny konjugáty rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA se zvyšujícím se molárním nadbytkem chelátoru oproti protilátce v následujících poměrech rituximab:chelátor v reakční směsi: 1:~260, 1:~540 a 1:1215, viz obrázek č. 24. Pro následující konjugační reakce rituximabu s chelátorem nebo s fluorescenčním činidlem byly zvoleny analogické reakční podmínky s nižším nadbytkem modifikačního činidla (molární poměr 1:30 rituximab:chelátor/fluorescenční činidlo, 1 h, 37°C, pH 8,90). Hodnota DAR pro zvolené konjugáty byla stanovena pomocí metody MALDI-TOF a vypočtena z rozdílů píku rituximabu (standardu) a konjugátu vydělenou molární hmotností *p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA ( $M_r = 594$ ) a hodnota DAR pro připravené konjugáty byla stanovena následovně: 7,4; 10,4 a 11,4. Tento trend naznačuje, že zvyšující vstupní poměr vede k efektivnější konjugaci chelátoru s molekulou rituximabu, což potvrzuje i literatura<sup>54</sup>. Nevýhodou však může být, že se zvýšenou hodnotou DAR se může měnit farmakokinetika protilátky, čímž se může snížit její biologická aktivita, nebo ji protilátka může dokonce úplně ztratit.



**Obr. č. 24:** Chromatogram z MALDI-TOF: stanovení hodnoty DAR (průměrná hodnota počtu navázaných malých molekul na 1 molekulu protilátky) konjugátů rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA s různými vstupními poměry chelátoru

### 5.1.3 Konjugát rituximab-FITC

Úspěšně byl připraven konjugát rituximab-FITC se vstupním poměrem 1:30 se stejnými reakčními podmínkami jako při přípravě konjugátu rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA. Navážka FITCu byla určena po stanovení koncentrace přečištěného rituximabu (za využití centrifugace) metodou UV-VIS spektrofotometrie za využití BCA stanovení dosazením naměřené absorbance (po odečtení blanku) do rovnice z grafu na Obr. č. 22. Reakce běžela po dobu 1 h při 37 °C (pH 8,90) na vodní lázni. K ukončení reakce byl roztok reakční směsi (o pH 8,90) přečištěn za využití SEC chromatografie (s m. f. 0,9% NaCl) a produktem (tedy konjugát: rituximab-FITC) byla první jímaná žlutě zbarvená frakce (viz Obr. č. 18). Konjugát rituximab-FITC byl testován *in vitro* na třech typech buněk. Byly použity 2 typy lidských B-buněčných lymfocytů – Raji a Ramos, které na svém povrchu exprimují CD20 antigen specifický pro rituximab (pozitivní kontrola) a myší T-buněčný lymfom EL4 bez CD20 antigenu (negativní kontrola). K experimentu ověřující biologickou aktivitu konjugátu bylo k roztokům s buňkami přidáno 10 µl roztoku konjugátu a roztoky byly inkubovány po dobu 30 min při 37 °C, aby mohlo dojít ke specifické vazbě rituximab-CD20. Po 30 minutách byly buňky promyty od nenavázaného konjugátu PBS roztokem, aby se snížilo pozadí. K zobrazení byla využita konfokální fluorescenční mikroskopie (viz Obr. č. 25). Na obrázku č. 25 je šedou barvou vizualizován transmisní mód, kterým se získá absorpční mapa (prosvícením celého objemu vzorku), která dovoluje lokalizovat buňky. Fluorescenční mód (zelená barva) lokalizuje konjugát rituximab-FITC v řezu obrazu. Tyto módy se dají proložit, čímž se získají výsledné obrazy. Pomocí *in vitro* experimentu se dokázalo, že takto připravený konjugát neztrácí biologickou aktivitu.

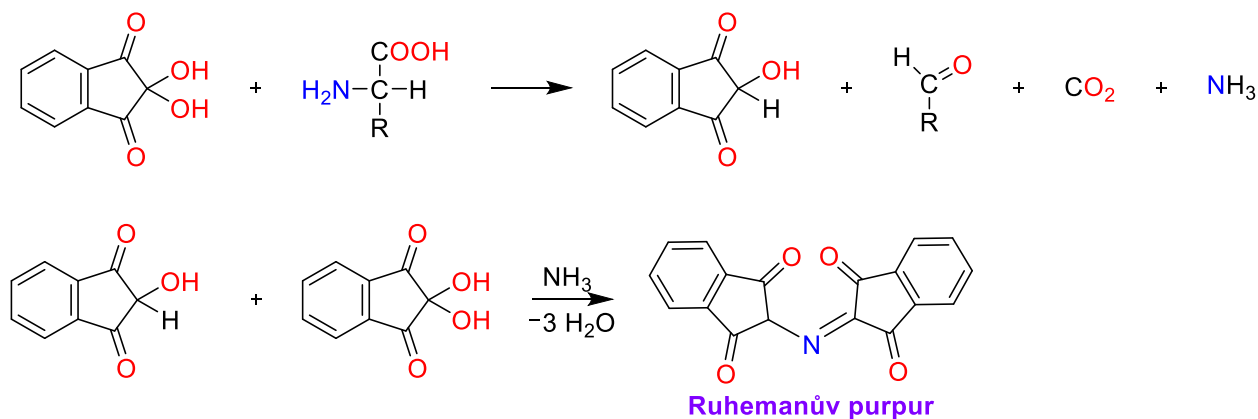


**Obr. č. 25:** Obrázek konfokálního mikroskopu a zobrazení tří typů buněk po 30 minutách inkubace s konjugátem rituximab-FITC a následném vymytí volného konjugátu metodou konfokální fluorescenční mikroskopie. Ramos a Raji jsou B-buňky, které na svém povrchu exprimují CD20 antigen a po 30 minutách je vidět uptake buněk konjugátu u obou typů kultur (pozitivní kontrola). EL 4 je myší T-buněčný lymfom bez CD20 antigenu, proto není vidět téměř žádná fluorescence (negativní kontrola)

#### 5.1.4 Konjugát rituximab-TCO-tetrazin-FITC

Příprava konjugátu se skládala ze tří dílčích kroků, viz schéma Obr. č. 20. **Prvním reakčním krokem** byla příprava konjugátu rituximab-TCO. Po přečištění rituximabu za využití SEC chromatografie bylo nutné identifikovat, ve kterých frakcích se nacházela protilátka. K tomu bylo využito detekční činidlo roztok ninhydrinu (rozpuštěném v methanolu). Ninhydrin je oxidační činidlo, se kterým volné aminokyseliny podléhají oxidační deaminaci za vzniku molekuly  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , aldehydu a hydridantinu (redukovanou formou ninhydrinu). Amoniak dále reaguje s další molekulou ninhydrinu za vzniku diketohydrinu, fialově zbarveném komplexu,

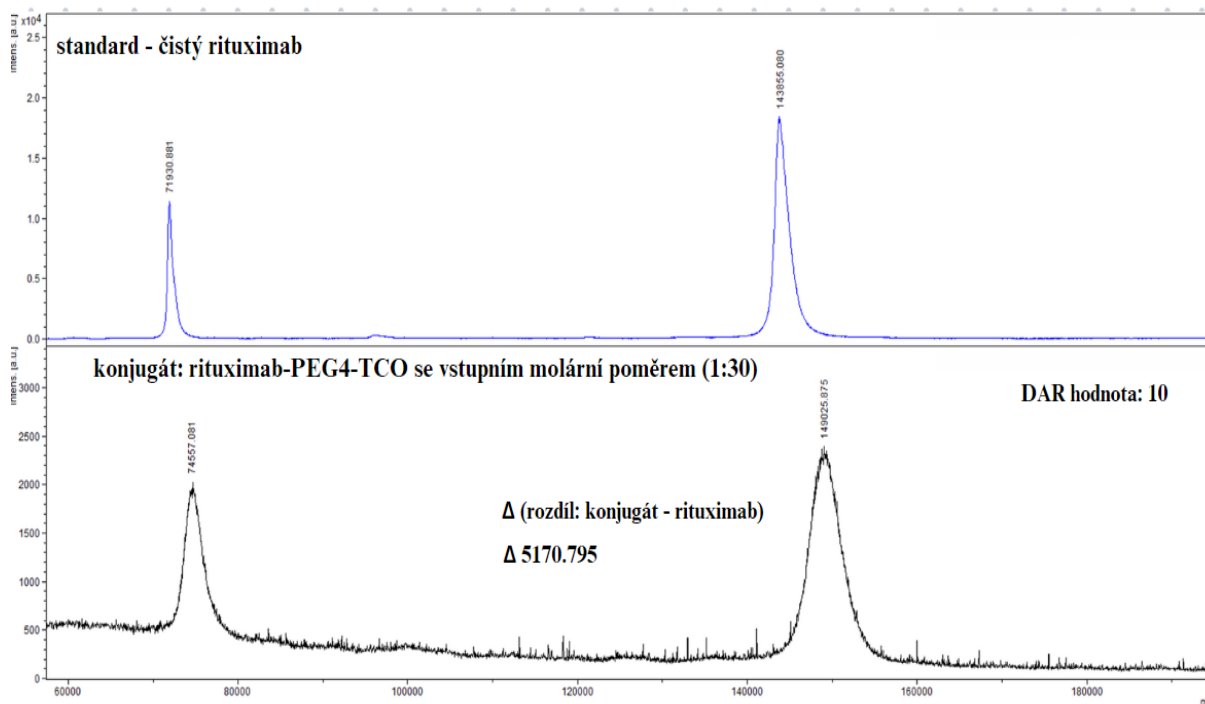
známém jako Ruhemanova purpuru (v případě převahy prolinu vznikají žluté komplexy a asparaginu zase hnědé komplexy). Schéma reakce je znázorněno na Obr. č. 26. Tato důkazová reakce byla provedena na TLC destičce, na kterou byly nanесeny 2-3 kapky roztoku z dané frakce a po zaschnutí na ní byl nanесen roztok ninhydrinu. TLC destička byla následně vysušena za vyšší teploty.



**Obr. č. 26:** Reakční schéma důkazové reakce aminokyselin za využití ninhydrinu. Konečným produktem je fialově zbarvený komplex.

Detekcí s ninhydrinem bylo zjištěno, že protein se nachází ve frakcích č. 4 a 5. Následně byla stanovena koncentrace rituximabu ve frakci č. 5 pomocí BCA stanovení. Z naměřené hodnoty absorbance byl vypočten obsah rituximabu v roztoku dosazením do rovnice kalibrační křivky na Obr. č. 22. Reakce byla nasazena reakce ve vstupním látkovém poměru 1:30 (rituximab:TCO) při 4 °C do druhého dne. K ukončení reakce byl konjugát přečištěn od nenavázaného TCO linkeru přes PD-10 kolonu s mobilní fází PBS. I přestože koncentrace protilátek byla tak nízká, že ji nebylo možno detekovat BCA, k další reakcím byla vybírána frakce č. 5, kde se běžně konjugát nachází po předchozích zkušenosti z čištění vyššího množství protilátky.

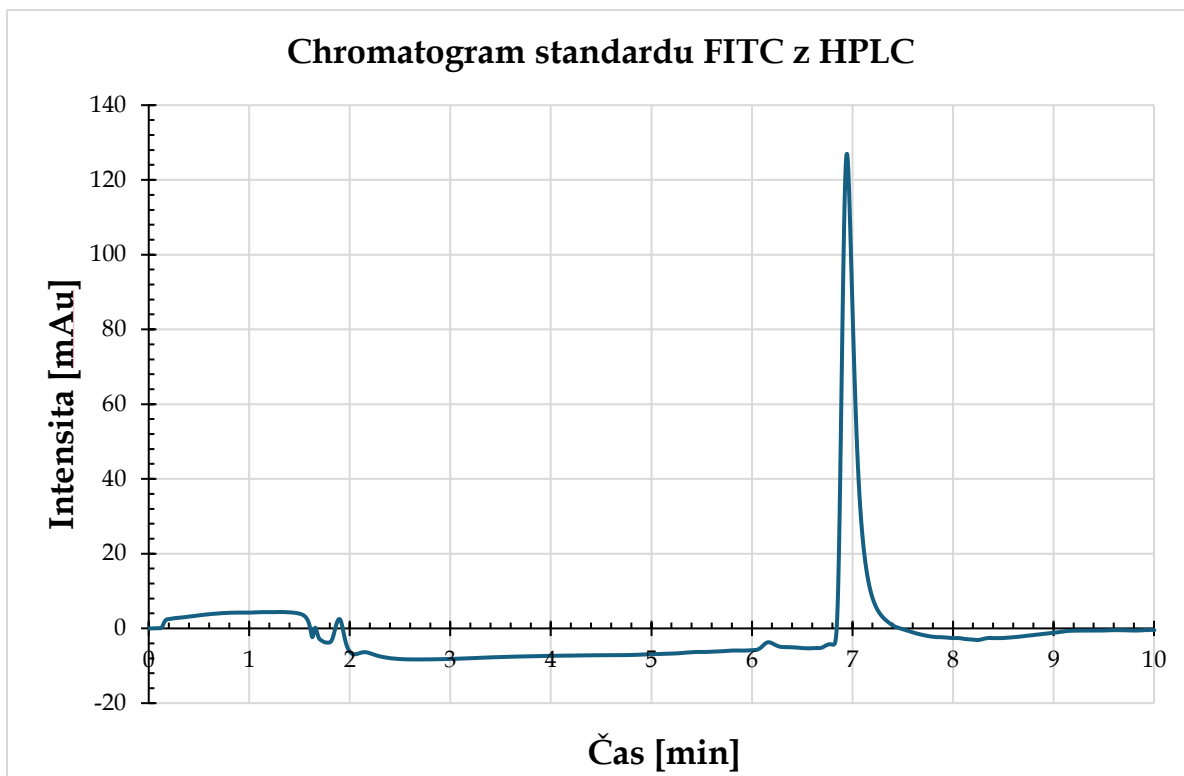
Detekce protilátky byla také potvrzena stanovením hodnoty DAR (tedy kolik molekul se průměrně navázalo na 1 molekulu rituximabu ve frakci č. 5) pomocí metody MALDI-TOF. Na Obr. č. 27 je znázorněn chromatogram čistého rituximabu a konjugátu rituximab-PEG<sub>4</sub>-TCO z frakce č. 5. DAR hodnota byla vypočtena z rozdílů píků  $[M+H]^+$  standardu a konjugátu a vydělením molekulovou hmotností TCO linkeru ( $M_r = 515$ ). DAR hodnota konjugátu byla stanovena ve frakci č. 5 na 10.



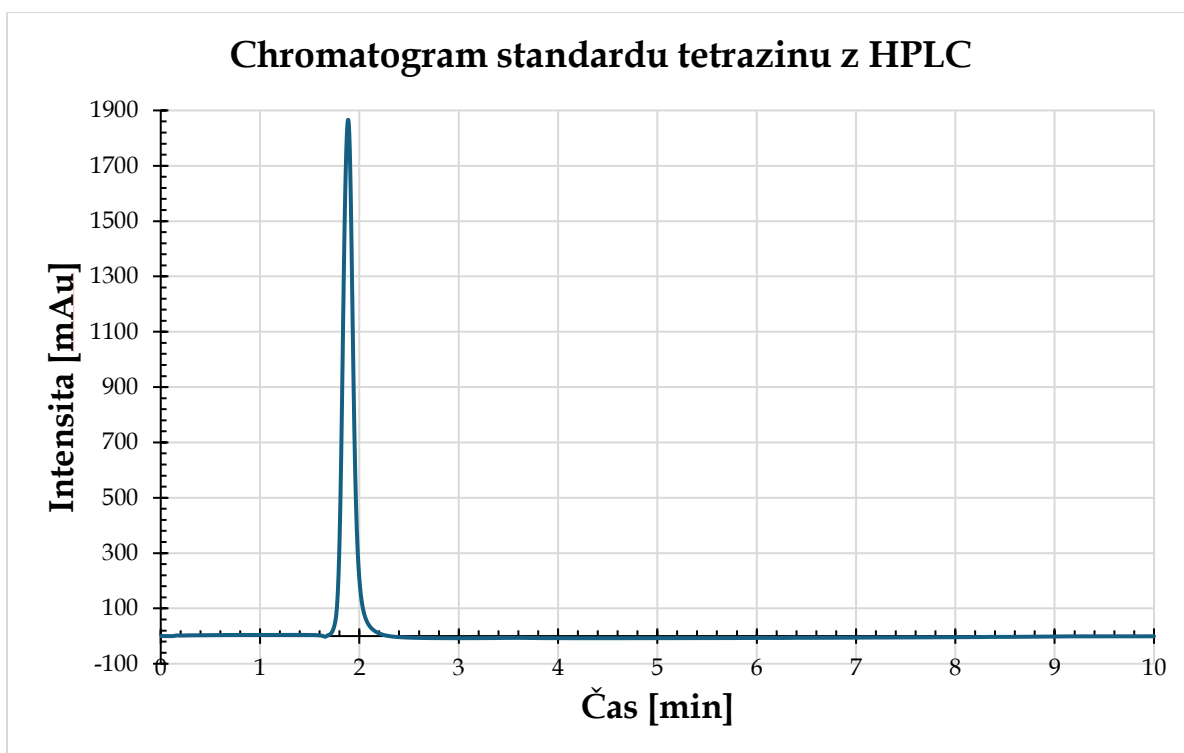
**Obr. č. 27:** Chromatogram z MALDI-TOF: stanovení hodnoty DAR konjugátu rituximab-PEG<sub>4</sub>-TCO se vstupním molárním poměrem 1:30 (rituximab-linker+TCO) a porovnáním píků standardu rituximabu s konjugátem určení hodnoty DAR na 10 (tzn. průměrně 10 molekul TCO je navázaných na 1 molekulu rituximabu).

**Druhou reakcí** bylo spojení derivátu tetrazinu s fluoresceinem tvorbou kovalentní vazby mezi aminoskupinou derivátu tetrazinu s isothiokyanátovou skupinou fluoresceinu. Reakce probíhala v molárním poměru 1:1 v roztoku DMF s přidavkem 1 ekv. triethylaminu k nastavení bazického prostředí. Reakční směs probíhala ve tmě a byla míchána po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Směs následně byla odpařena na vakuové odparce, celkem 2× suspendována v methanolu a znovu odpařena. Poté byla reakční směs přečištěna za využití SEC sloupcové chromatografie s gradientovou elucí a produkt byl odpařen na RVO. Bylo získáno 9,46 mg (4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)fenyl)methanamin-FITC (60,8 %). Reakční produkt byl potvrzen píkem (m/z 577) pomocí hmotnostní spektrometrie.

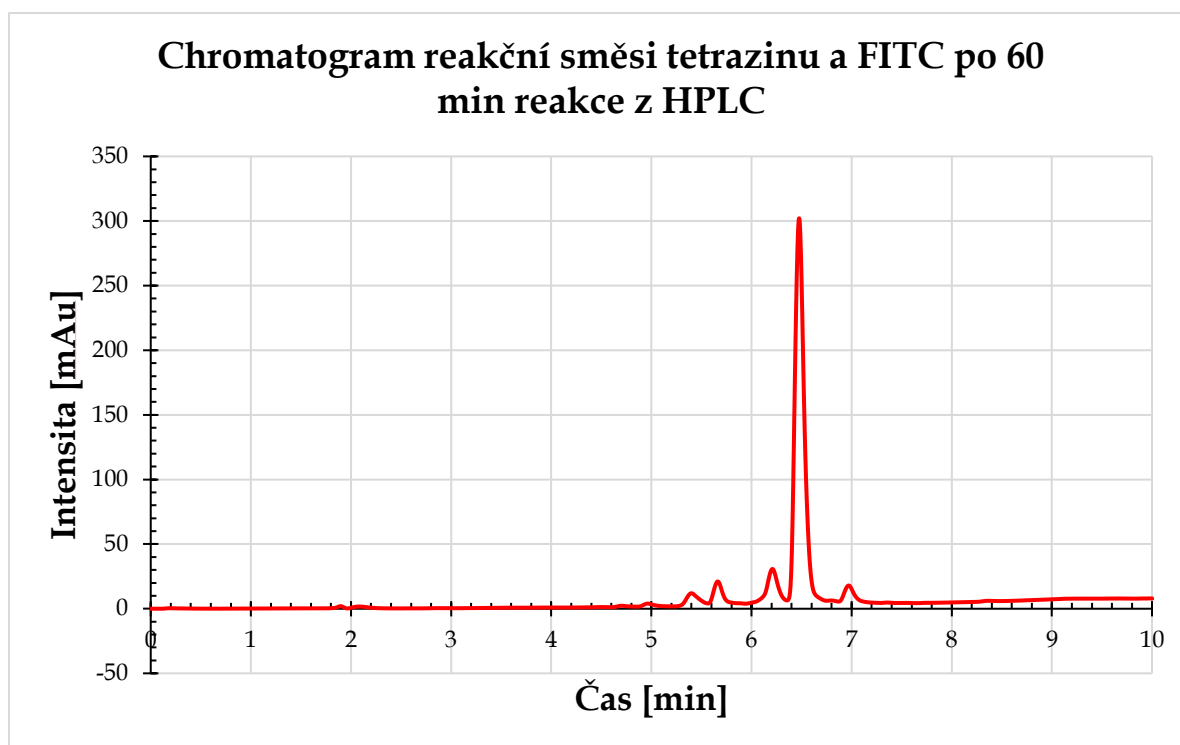
Ke sledování průběhu reakce bylo naměřeno HPLC standardů FITCu a derivátu tetrazinu (viz Obr. č. 28 a 29) a následně byla změřena reakční směs po 30 a 60 min. Na Obr. č. 30 je znázorněna reakční směs po 60 min, je pozorovatelné vymizení píku ve 2. min a zvýšení počtu píků a posunutí maximálního píku ze 7. min k 6,5 min.



Obr. č. 28: Chromatogram standardu FITCu z HPLC (pík 7 min).



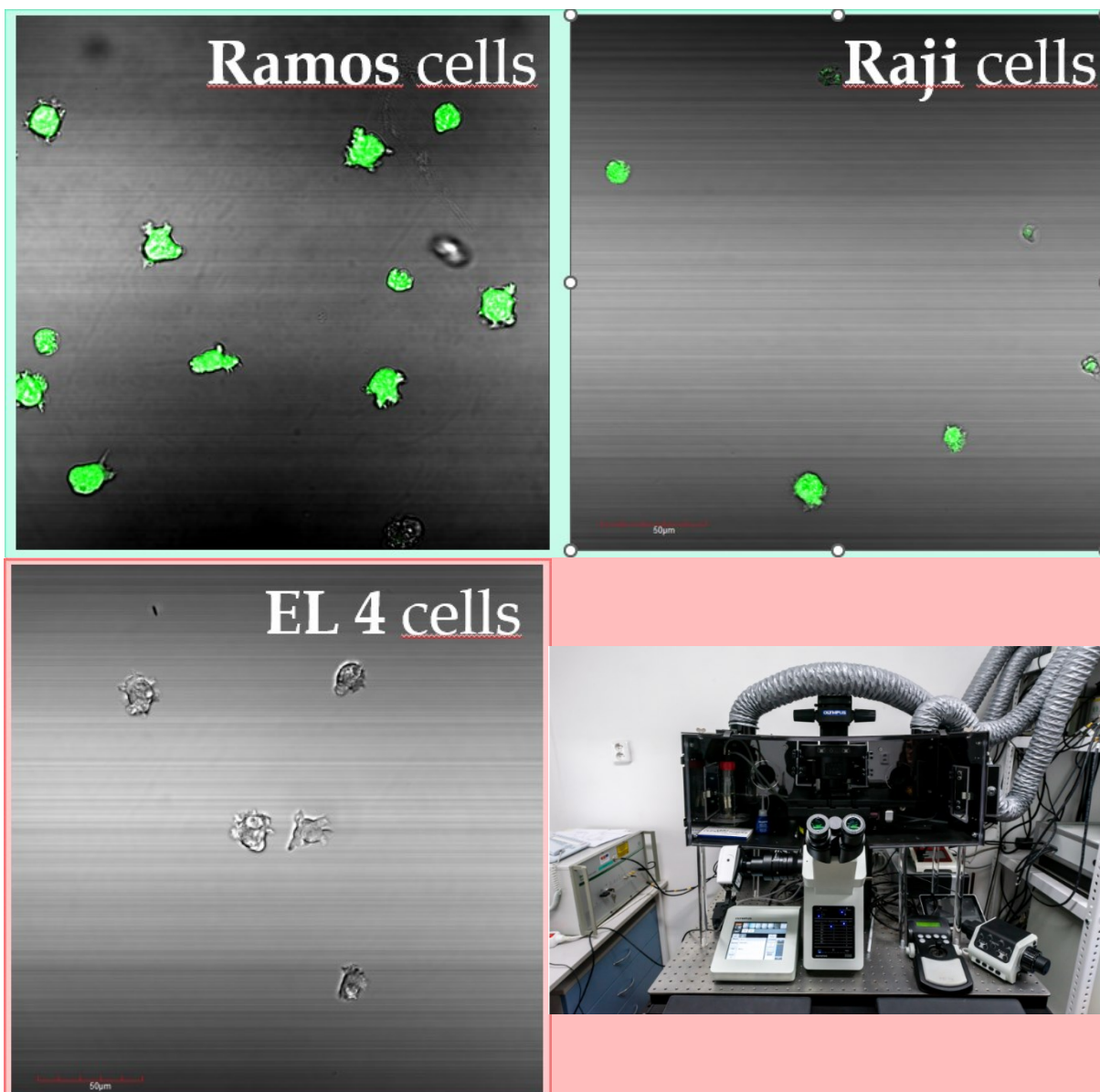
Obr. č. 29: Chromatogram standardu tetrazinu z HPLC (pík 1,9 min).



**Obr. č. 30:** Chromatogram reakční směsi FITCu a tetrazinu z HPLC po 60 minutách reakce. (pík 6,5 min; pík tetrazinu vymizel).

Jednou z výhod bioortogonálních reakcí je, že jsou vysoce selektivní a lze je provádět v živých systémech. Biortogonální reakce byla provedena na 3 typech buněk – Ramos a Raji (B-buňky s CD20 receptorem; pozitivní kontrola) a EL4 (T-lymfomy bez CD20 antigenu; negativní kontrola). K roztokům s buňkami bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku konjugátu rituximab-TCO linker z frakce č. 5 a reakční roztoky byly inkubovány po dobu 30 min při 37 °C, aby došlo ke specifické vazbě rituximab-CD20 na B-buňkách. Následně k reakčním roztokům bylo přidáno 250  $\mu$ l roztoku s produktem derivátu tetrazinu-FITC a reakční směsi byly inkubovány dalších 30 minut během níž došlo k bioortogonální reakci *in vitro*.

K zobrazení úspěšného provedení bioortogonální reakce byla využita konfokální fluorescenční mikroskopie (viz Obr. č. 31). Na obrázku č. 31 je šedou barvou vizualizován transmisní mód, kterým byla získána absorpční mapa (prosvícení celého objemu vzorku), která dovoluje lokalizovat buňky. Fluorescenční mód (zelená barva) lokalizuje konjugát rituximab-TCO-FITC v řezu obrazu. Tyto módy se dají proložit, čímž se získají výsledné obrazy. Pomocí *in vitro* experimentu se dokázalo, že takto připravený konjugát rituximab-TCO linker neztrácí biologickou aktivitu a úspěšně byla provedena bioortogonální reakce.



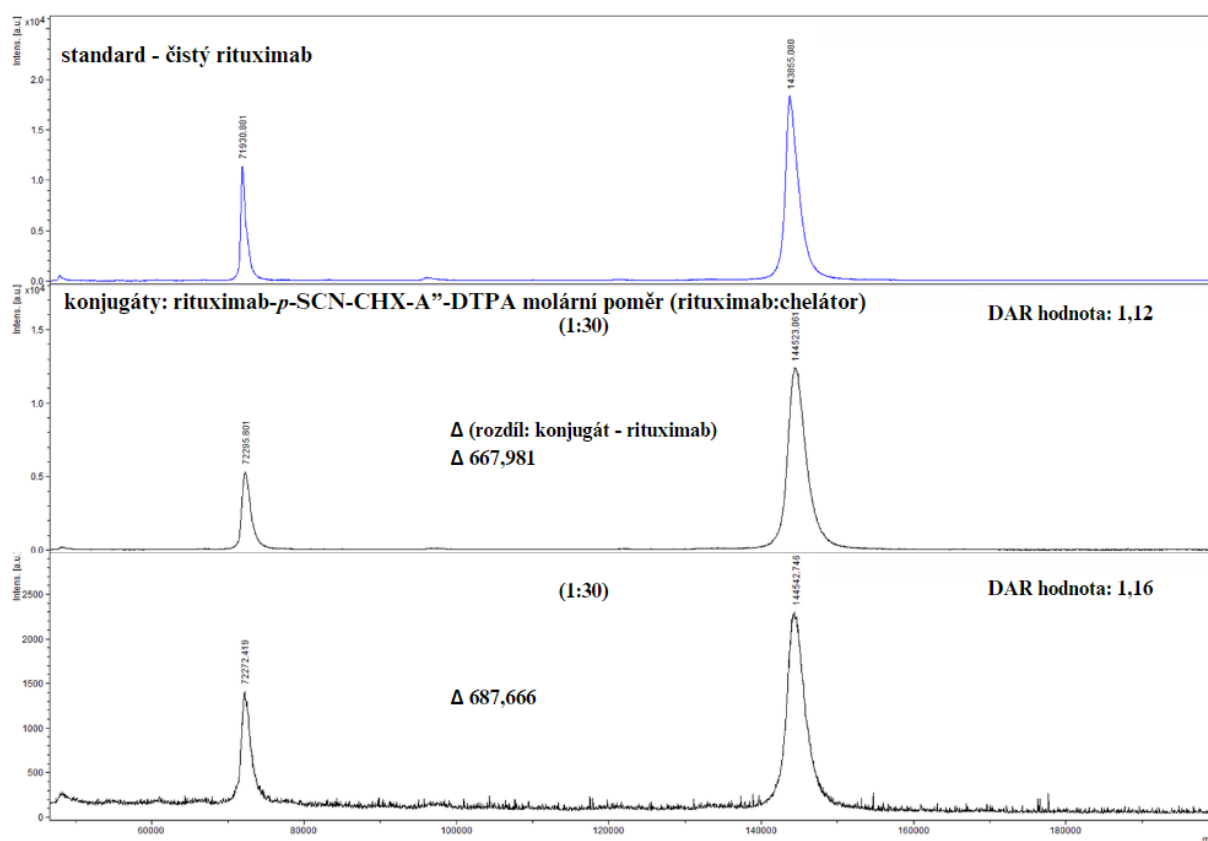
**Obr. č. 31:** Zobrazení tří typů buněk po 30 minutách nasycení CD20 receptorů konjugátem rituximab-TCO u Raji a Ramos buněk (EL 4 nemají receptory pro rituximab) a následné bioortogonální reakci s ligandem tetrazin-FITC po 30 min a následném vymytí volného ligandu, aby se snížilo pozadí. Buňky byly zobrazeny metodou konfokální fluorescenční mikroskopie. Ramos a Raji jsou B-buňky, které na svém povrchu exprimují CD20 antigen a po 30 min je vidět uptake buněk konjugátu u obou typů kultur (pozitivní kontrola). Také je vidět, že bioortogonální reakce takto připraveného konjugátu probíhá i přes vysokou konjugaci rituximabu s hodnotou DAR téměř 10. EL 4 jsou myší T-lymfomy bez CD20 antigenu, proto není vidět skoro žádná fluorescence (negativní kontrola).

### 5.1.5 Konjugát rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA-<sup>161</sup>Tb

Jednou z rizik použití nescifické konjugace je, že není možnost ovlivnit kolik molekul chelátoru se naváže na jednu molekulu protilátky a také nelze ovlivnit, zda se nějaká z molekul nenaváže na vazebné místo, čímž by mohla být snížena nebo dokonce úplně ztracena biologická aktivita. Z výše zmíněných obav o biologickou aktivitu, a co nejvíce zachování protilátkové struktury k zachování farmakokinetických vlastností byl zvolen vstupní molární poměr 1:30 a stejné reakční podmínky jako při přípravě konjugátu rituximab-FITC, u kterého bylo *in vitro*

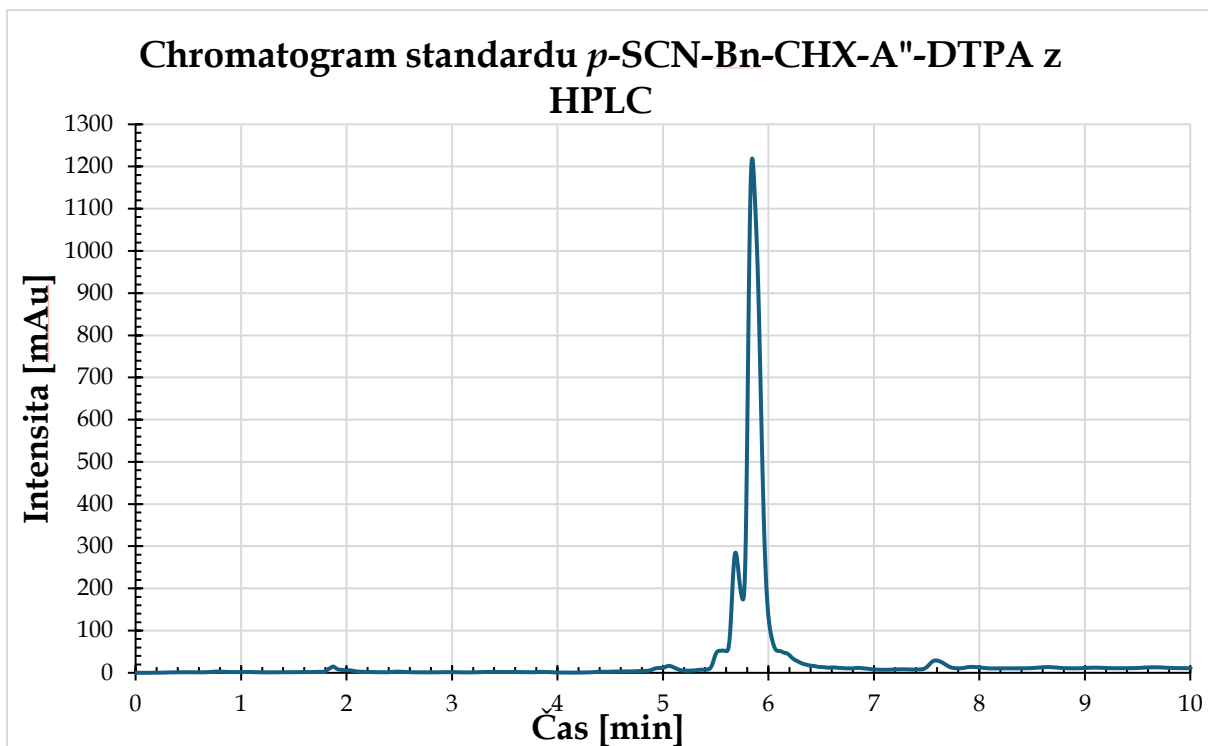


ověřeno zachování schopnosti tvorby specifické vazby protilátky pomocí fluorescenční mikroskopie. Metodou popsanou v oddělení 4.2.7. v „Přípravě konjugátu rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A<sup>''</sup>-DTPA DTPA-<sup>161</sup>Tb“ byl úspěšně připraven konjugát rituximab s chelátorem se vstupním poměrem 1:30. Stejným postupem byly takto připraveny dva konjugáty a následně byl stanoven průměrný počet molekul chelátoru (hodnota DAR) pomocí metody MALDI-TOF. Hodnoty DAR pro dva konjugáty byly stanoveny v rozmezí 1,12-1,16, což znamená, že průměrně byla navázána 1 molekula chelátoru na jednu molekulu rituximabu. Chromatogram je znázorněn na Obr. č. 32.

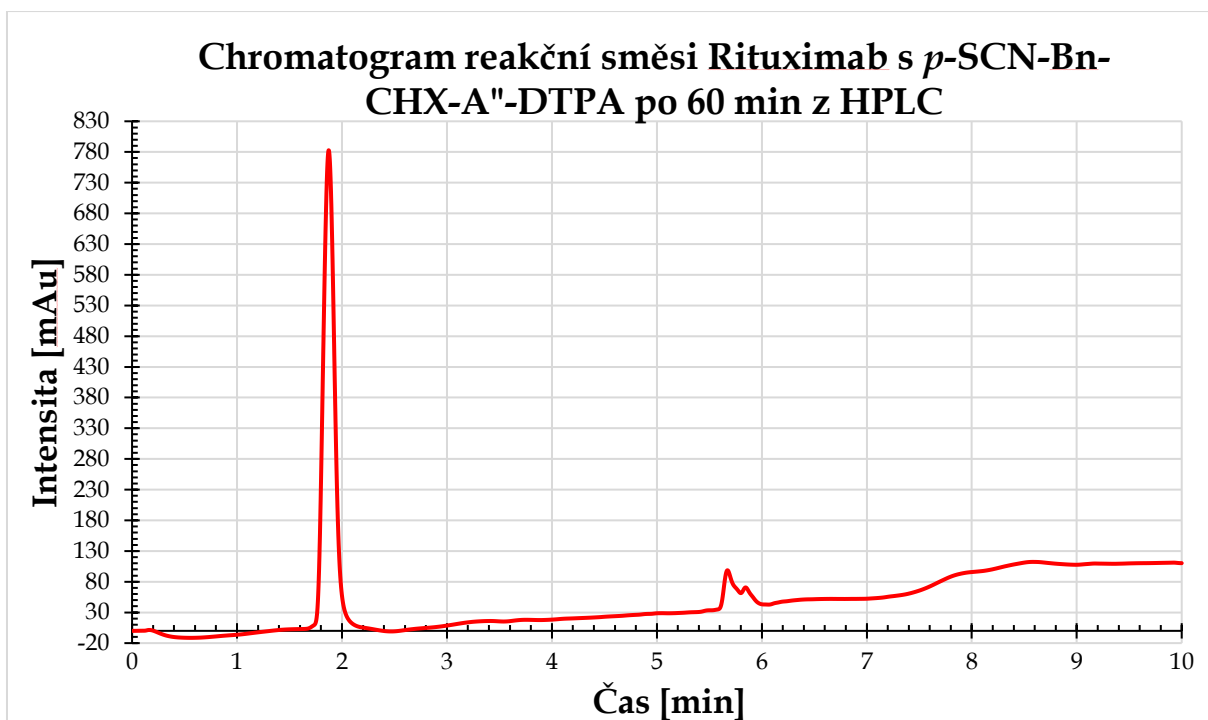


**Obr. č. 32:** Chromatogram z MALDI-TOF: stanovení hodnoty DAR konjugátů rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A<sup>''</sup>-DTPA se vstupním molárním poměrem 1:30 (rituximab-chelátor).

Při přípravě konjugátu rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A<sup>''</sup>-DTPA byl změřen standard chelátoru, který byl rozpuštěn v roztoku mobilní fáze A (H<sub>2</sub>O:ACN = 95:5), metodou HPLC. Poté byla změřena metodou HPLC reakční směs po 60 min, je vidět snížená intenzita píku v 5,8-5,9 min (chelátoru), kdy se část chelátoru navázala na protilátku. Chromatogramy standardu chelátoru a reakční směsi jsou znázorněny na Obr. č. 33 a 34.



**Obr. č. 33:** Chromatogram standardu *p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA z HPLC (pík 5,9 min).



**Obr. č. 34:** Chromatogram reakční směsi rituximabu s *p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA z HPLC po 60 minutách reakce. Je vidět, že pík v 5,9 min se ztrácí ubývajícím množstvím volného konjugátu.

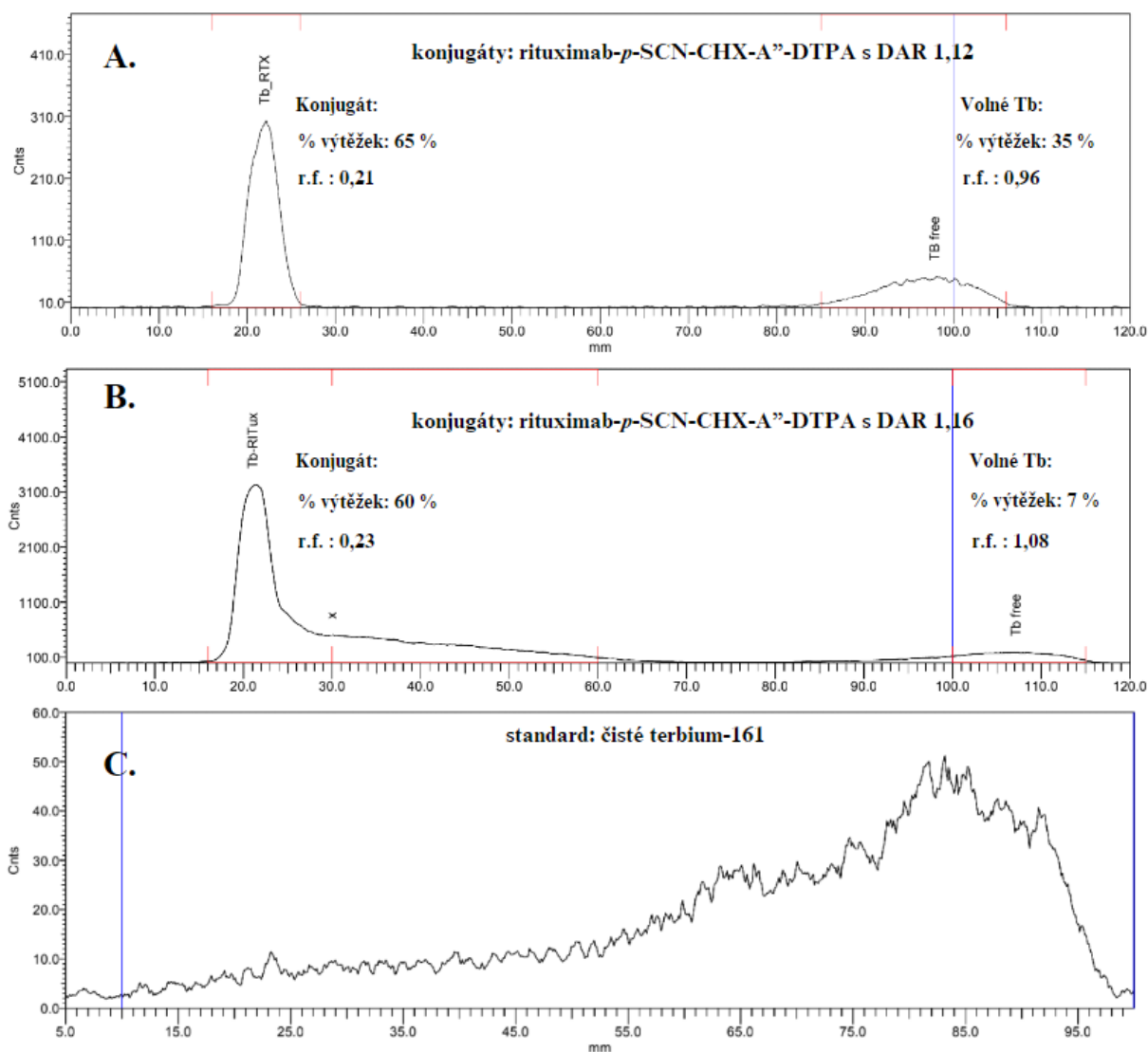
Po přípravě konjugátu rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA následovalo radioznačení radionuklidem <sup>161</sup>Tb. Metodika radioznačení je popsána v oddělení 4.2.7. „Příprava konjugátu rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA-<sup>161</sup>Tb“.

Pro zjištění procentuálního výtěžku radioznačení radionuklidem <sup>161</sup>Tb byla použita metoda TLC. Kdy roztok reakční směsi (2-4 µl) byl nanesen na stacionární fázi iTLC SG, poté byla stacionární fáze ponořena do roztoku mobilní fáze (1-2 ml). TLC bylo vyvíjeno v mobilní fázi 10% roztoku CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> v methanolu. Po skončení bylo TLC vyhodnoceno pomocí Radio-TLC scanneru. Označeny byly dva shodně připravené konjugáty rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA se vstupním poměrem 1:30. Na TLC skenu označeném A. (viz Obr. č. 35) byl měřen konjugát (s přidavkem 30 MBq TbCl<sub>3</sub> v 0,05M HCl) se stanovenou hodnotou DAR 1,12 a procentuální výtěžek z ploch píku byl vypočten na 65 % (tedy 35 % z celkové radioaktivity je nenavázané terbium, které bude v dalším kroku odstraněno čištěním od konjugátu přes PD-10 kolonu). Na skenu B. je vidět pík označeného konjugátu s DAR hodnotou stanovenou na 1,16 (s přidavkem 40 MBq TbCl<sub>3</sub> v 0,05M HCl) s výtěžkem 60 %. TLC bylo u obou konjugátů provedeno po 1 hodině značení při fyziologickém pH a pokojové teplotě. Na TLC skenech jsou vidět dva píky, první pík s retenčním faktorem (r.f.) 0,21-0,23 pro terbiem označený konjugát a druhý pík s r.f. 0,96-1,08 pro volné terbium. Na TLC skenu označeném C. je vidět chování nenavázaného terbia na iTLC SG papírku, kdy terbium se v průběhu vyvíjení rozmývá a nejvyšší koncentrace jde s čelem, na základě této informace, lze určit, co který pík představuje.

Následně byla reakční směs přečištěna od nenavázaného <sup>161</sup>Tb metodou přes PD-10 kolonu (m.f. – PBS, pH 7,4). Frakce byly jímány po 1 ml a následně byla proměřena radioaktivita jednotlivých frakcí a kolony měřením na ionizační komoře. V tabulce č. 6 jsou zobrazeny naměřené hodnoty radioaktivity pro připravený konjugát s DAR hodnotou 1,12. Tento terbiem označený konjugát byl následně testován *in vitro*.

**Tab. č. 6:** Naměřená radioaktivita <sup>161</sup>Tb v jednotlivých frakcích po přečištění přes PD10 kolonu, kolony po přečištění a prázdné reakční víálky

Označení	Aktivita [MBq]	Označení	Aktivita [MBq]
Frakce č. 1	0	Frakce č. 7	1,9
Frakce č. 2	0	Frakce č. 8	2,8
Frakce č. 3	7,3	Frakce č. 9	2,9
Frakce č. 4	16,7	Frakce č. 10	1,6
Frakce č. 5	1,4	Kolona	2,6
Frakce č. 6	1,1	Prázdná reakční víálka	0,5



**Obr. č. 35:** Radio-TLC skeny ze značení. A. a B. TLC skeny po 1 h značení při pH 7,4 a laboratorní teplotě konjugátů rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A<sup>22</sup>-DTPA s určenou hodnotou DAR: 1,12 pro sken A a 1,16 pro sken B. Sken C. ukazuje chování nenavázaného terbia, které se v průběhu separace rozmývá a největší koncentrace jde s čelem.

Připravený radioimunokonjugát byl testován *in vitro* na třech typech buněk – Raji a Ramos (pozitivní kontrola) a EL4 (negativní kontrola). Po přidavku 20  $\mu$ l roztoku radioimunokojugátu z frakce č. 5 k roztokům s buňkami byly takto připravené roztoky inkubovány po dobu 1 h při pokojové teplotě. Následně byly zcentrifugovány a na ionizační komoře (Wiper) byla změřena radioaktivita supernatanu, buněk s novým přídatkem 100  $\mu$ l PBS a prázdné reakční zkušavky. Naměřené hodnoty radioaktivit a vypočítaný obsah radioaktivity přichycený na buňkách je zobrazen v Tab. č. 7.

**Tab. č. 7:** Naměřené hodnoty radioaktivity po *in vitro* experimentu radioimunokonjugátu k CD20+ buňkám (pozitivní kontrola) a T-buňkám bez receptoru CD20 (negativní kontrola) a vypočítaný obsah radioaktivního konjugátu na buňkách.

Typ buněk Aktivita [kBq]	Raji (CD20+ B-buňky)	Ramos (CD20+ B-buňky)	Raji (T-buňky)
Celková aktivita	85,0	89,0	86,0
Prázdná reakční zkumavka	6,4	7,9	6,9
V buňkách	11,3	11,4	6,8
V supernatanu	60,3	58,1	59,9
Procentuální obsah konjugátu navázaného na buňkách	13,2 %	12,8 %	8,0 %

Dále byla sledována biodistribuce radioaktivně značeného konjugátu na *in vivo* myším modelu. Byly provedeny celkem tři SPECT/CT myši po 60 min, 6 h a 24 h od aplikace. Výsledky ze SPECT/CT jsou uvedeny na Obr. č. 36.

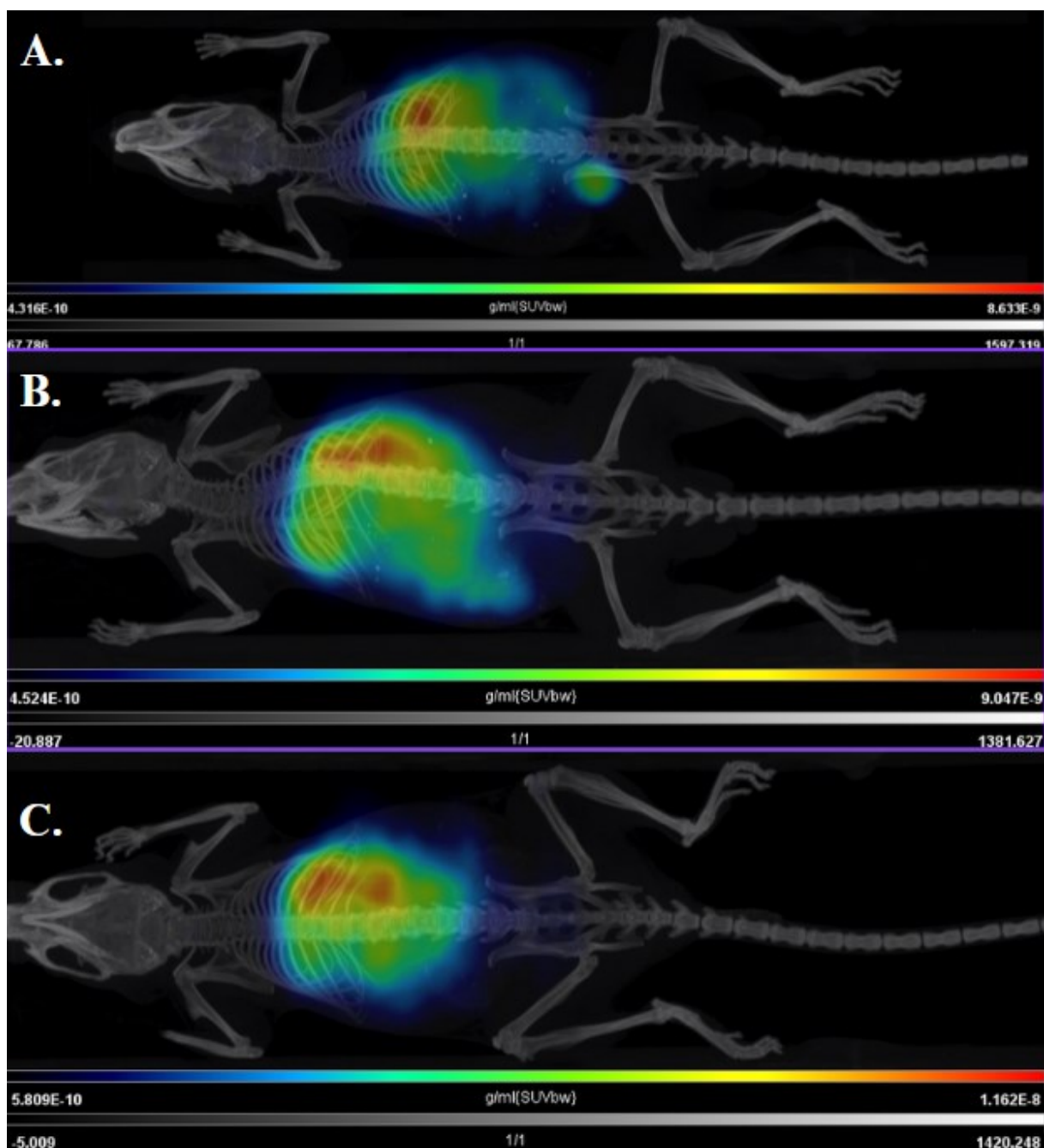
U odebraných orgánů byla změřena radioaktivita na ionizační komoře a jednotlivé orgány byly zváženy. Radioaktivita byla normalizována na hmotnost orgánů ( $A/g$ ) a byla vypočtena % ID/g podle následujícího vzorce (kde  $A$  značí radioaktivitu a  $m$  hmotnost):

$$\% \text{ ID/g} = \frac{A_{\text{v orgánu}}}{A_{\text{aplikovaná}} \cdot m_{\text{orgánu}}} \cdot 100$$

Výsledky *ex vivo* jsou shrnuty v Tab.č. 8 a  $A_{\text{aplikovaná}}$  nebyla přepočtena se zohledněním na poločas rozpadu radionuklidu, protože má relativně dlouhý poločas rozpadu.

**Tab. č. 8:** *Ex vivo* změřená radioaktivita a hmotnost vybraných orgánů, vypočtená aktivita vztažená na hmotnost a %ID/g.

Název orgánu	m [g]	A [MBq]	A/g [MBq/g]	%ID/g [%]
Krev	0,9082	0,270	0,297	1,239
Ledviny	0,4242	1,070	2,522	10,510
Slezina	0,0450	0,395	8,778	36,574
Srdce	0,1838	0,021	0,114	0,476
Plíce	0,1620	0,002	0,012	0,051
Mozek	0,4407	0,018	0,041	0,170
Žaludek	0,7307	0,000	0,000	0,000
Játra	0,9759	12,170	12,471	51,961
Tlusté střevo	1,1247	0,403	0,358	1,493
Slepé střevo	0,7332	0,492	0,671	2,796
Tenké střevo	0,3387	0,135	0,399	1,661
Sval	0,9829	0,149	0,152	0,632

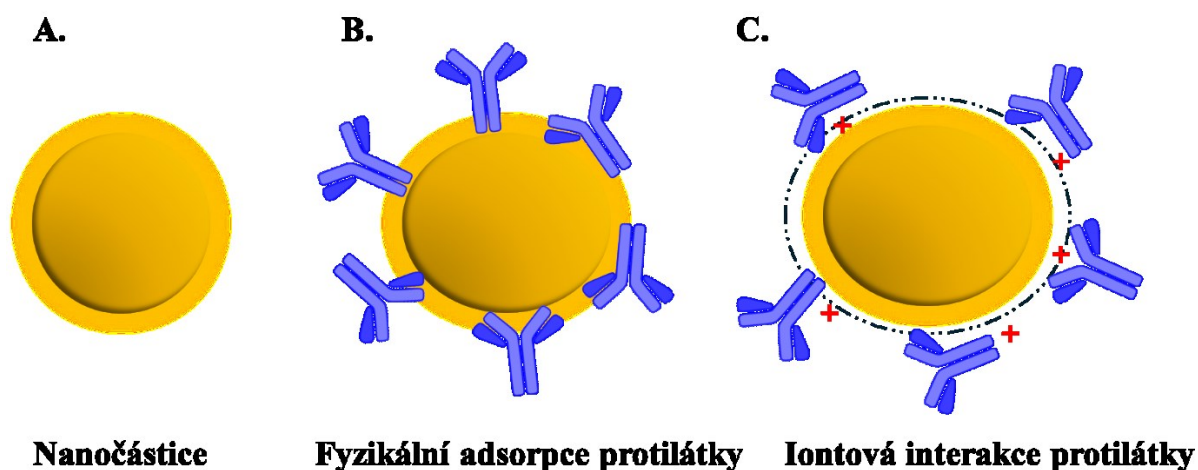


**Obr. č. 36:** Zobrazení biodistribuce radioimunokonjugátu ve zdravé myši pomocí metody SPECT/CT. A. Snímek po 60 min od intravenózní aplikace. B. Snímek po 6 h od aplikace. C. Snímek po 24 h od aplikace.

## 5.2 Modifikace zlatých nanočástic protilátky a biologické experimenty

Kovové nanočástice (NP) mají specifické vlastnosti, jako je obrovský povrch, či silná vazebná afinita k thiolům a aminům, a lze je tak konjugovat s biomolekulami pro zlepšení účinnosti cílení farmak, nebo k zobrazování tkáňových struktur, pokud tyto protilátky budou označeny fluorescenční značkou. V závislosti na metodě funkcionalizace protilátky na povrch NP se protilátky imobilizují buď náhodně, nebo orientovaně. Povaha interakcí mezi NP a protilátkami závisí na povrchovém náboji nanočástice a typu funkčních skupin přítomných na NP, tato interakce pak mění její morfologii NP.

Jednou z metod konjugace je fyzikální adsorpce protilátek na povrch NP. Jedná se o reverzibilní nekovalentní vazbu zprostředkovanou buď hydrofobními nebo elektrostatickými vodíkovými interakcemi, nebo slabými Van der Waalssovými interakcemi mezi protilátkou a povrchem NP. Výhodou této metody je jednoduchost a často časová nenáročnost. Má však i řadu nevýhod. Jedná se o nejméně stabilní metodu konjugace, kdy elektrostatické interakce mezi opačně nabitými funkčními skupinami aminokyselinových zbytků protilátky a povrchu NP jsou slabé a v důsledku malých změn pH může docházet k jejich oddělení<sup>55</sup>. **Kvůli stabilitě produktu byla v této práci zvolena chemická konjugace založená na redukci disulfidických vazeb protilátky 2-merkptoethanolem, přečištění od nadbytečného 2-merkptoethanolu gelovou filtrací a následně vazbě takto vytvořených thiolů na povrch zlata.**



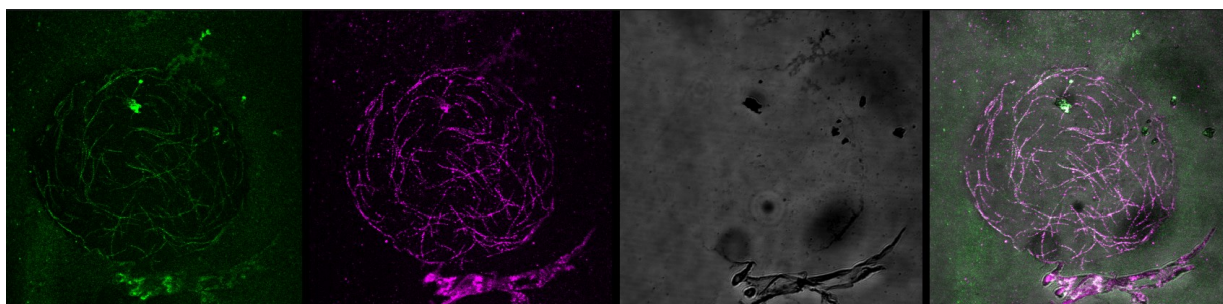
**Obr. č. 37:** Funkcionalizace NP protilátky nekovalentní interakcí. **A.** Nanočástice (NP), **B.** fyzikální adsorpce protilátky na povrch NP, **C.** elektrostatická interakce protilátky a povrchu NP.

### 5.2.1 Modifikace zlatých nanočástic protilátkou fluorescenčně označenou 555 Alexa fluor barvivem

Úspěšně byly modifikovány zlaté nanočástice oslí anti-králičí protilátkou isotypu IgG označenou fluorescenční značkou Alexa Fluor™ 555, která sloužila jako sekundární protilátka

v imunoexperimentu. Na sklíčka byly připraveny membránové „ghosty“ – kusy plasmatické membrány a asociovaných proteinů přilepených na sklíčku – z tabákových buněk, které exprimují GFP tubulin ( $\beta$ -tubulin6). K fluorescenčnímu zobrazení GFP-tubulinu byly využity primární králičí anti-GFP protilátky, které se navázaly na GFP na tubulinu. Následně byly použity sekundární protilátky – nano-couplované oslí anti-králičí – které se specificky navázaly na primární protilátky.

K zobrazení tohoto experimentu byla použita fluorescenční mikroskopie. Zeleným kanálem (na Obr. č. 38 zleva) je vidět zeleně fluoreskující GFP na tubulinu6, magenta (purpurový) kanálem je viditelná sekundární protilátka navázaná na primární protilátku na GFP-tubulinu. Mikroskopií ve světelném poli (*brightfield*) je zobrazen „ghost“ v důsledku průchodu/odrazu světelného paprsku a vpravo na Obr. č. 38 jsou proloženy všechny 3 módy do jednoho obrázku.



**Obr. č. 38:** Zobrazení GFP-TUB6 v „ghostech“ fluorescenční mikroskopií. (Zleva) zeleným kanálem zobrazený GFP protein v tubulinu, (2.) magenta kanálem zobrazená sekundární protilátka s Alexa Fluor 555 fluorescenční značkou, (3.) brightfield, (4.) proložené 3 módy do jednoho obrázku.

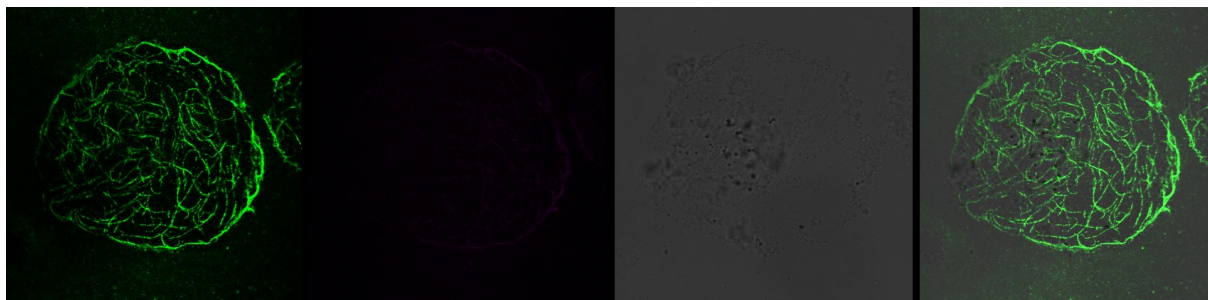
### 5.2.2 Modifikace zlatých nanočástic protilátkou fluorescenčně označenou 488 Alexa fluor barvivem

Úspěšně byly modifikovány zlaté nanočástice kozí anti-králičí protilátkou isotypu IgG označenou fluorescenční značkou Alexa Fluor™ 488, která sloužila jako sekundární protilátka v imunoexperimentu. Na sklíčka byly připraveny membránové „ghosty“ z tabákových buněk, které exprimují GFP tubulin ( $\beta$ -tubulin6). K fluorescenčnímu zobrazení GFP-tubulinu byly využity primární králičí anti-GFP protilátky, které se navázaly na GFP na tubulinu. Následně byly použity sekundární protilátky – nano-couplované kozí anti-králičí – které se specificky navázaly na primární protilátky.

K zobrazení tohoto experimentu byla použita fluorescenční mikroskopie. Zeleným kanálem (na Obr. č. 39 zleva) je vidět zeleně fluoreskující GFP na tubulinu6 a sekundární protilátky, kdy fluorescence se navzájem sčítá, magenta (purpurový) kanál (2. obrázek, zde není viditelná žádná fluorescence). Brightfield mikroskopií (mikroskopií ve světelném poli) je

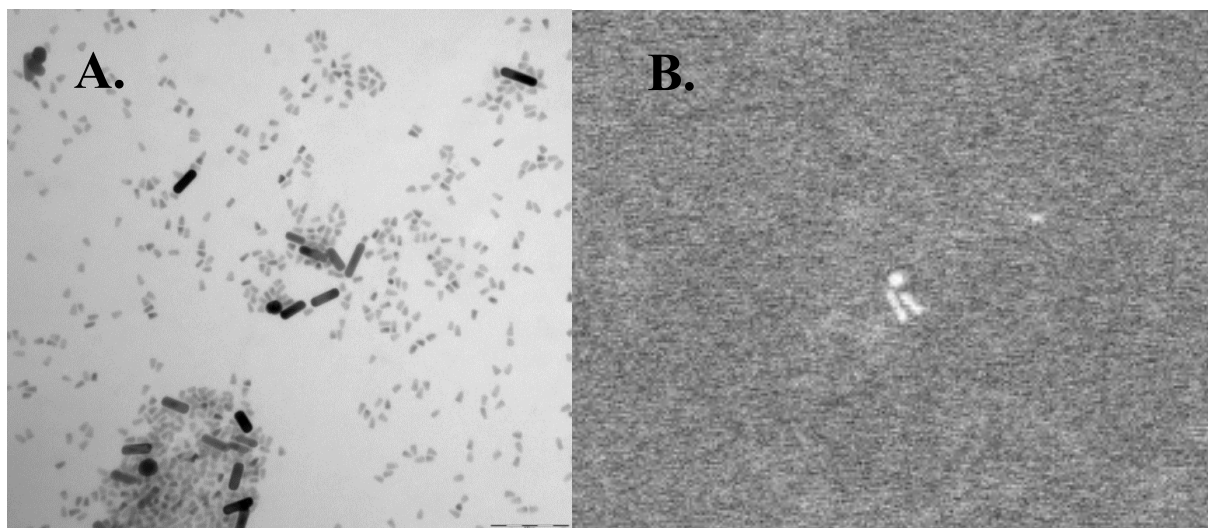


zobrazen „ghost“ v důsledku průchodu/odrazu světelného paprsku a vpravo na Obr. č. 39 jsou proloženy všechny 3 módy do jednoho obrázku.



**Obr. č. 39:** Zobrazení GFP-TUB6 v „ghostech“ fluorescenční mikroskopií. (Zleva) Zeleným kanálem zobrazený GFP protein v tubulinu a sekundární protilátka s Alexa Fluor 488 fluorescenční značkou, (2.) magenta kanál, (3.) brightfield, (4.) proložené 3 módy do jednoho obrázku.

Byl proveden pokus o duální korelační zobrazení zlatých NPs pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a enviromentální skenovací elektronové mikroskopie (ESEM) v „ghostech“ (Obr. č. 40), zatím však nebyly tyto dvě metody sjednoceny pro zobrazení NPs a fluorescence najednou.



**Obr. č. 40:** A. Zobrazení zlatých NPs pomocí TEM, B. zobrazení zlatých NPs v „ghostech“ pomocí metody ESEM.

## 6. ZÁVĚR

V této práci byl úspěšně připraven konjugát rituximab-FITC, jehož biologická aktivita byla ověřena *in vitro* experimentem pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie. Poté byl za využití bioortogonální chemie připraven fluorescenčně značený konjugát rituximab-PEG<sub>4</sub>-TCO-tetrazin-FITC. Tato reakce proběhla *in vitro* přímo na povrchu buněk a následně byla vizualizována pomocí fluorescenční mikroskopie. Ke stanovení obsahu přečištěného rituximabu ke konjugaci byla vyvinuta a modifikována UV-VIS spektrofotometrická metoda za využití BCA stanovení. Pro zjištění, kolik malých molekul se průměrně naváže na jednu molekulu protilátky (hodnoty DAR), byla využita metoda MALDI-TOF. Bylo zjištěno, že se zvyšujícím se vstupním molárním přídatkem chelátoru se zvyšuje stanovená hodnota DAR. V neposlední řadě byl vyvinut radioimunokonjugát rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA-<sup>161</sup>Tb, jehož biologická aktivita byla testována *in vitro* na B-buněčných liniích s CD20 receptorem a na T-buněčných liniích bez CD20 receptoru. Následně byla *in vivo* sledována biodistribuce radioimunokonjugátu na myším modelu pomocí SPECT/CT a *ex vivo* stanovením radioaktivity vybraných orgánů vztažených na hmotnost a biodistribuční hodnotou %ID/g.

Druhá část práce se zabývala modifikací zlatých nanočástic fluorescenčně označenými protilátkami isotypu IgG. Nanočástice byly modifikovány poprvé oslí anti-králičí protilátkou s fluorescenční značkou Alexa Fluor™ 555 a podruhé s kozí anti-králičí protilátkou s fluorescenční značkou Alexa Fluor™ 488. Takto modifikované nanočástice s protilátkami byly využity jako sekundární protilátky pro imunoexperimenty, kdy byl fluorescencí vizualizován GFP-mikrotubulin 6 pomocí fluorescenční mikroskopie.

## 7. SEZNAM LITERATURY

- (1) Ice, R. D. History of Medical Radionuclide Production. *Health Phys.* **1995**, *69* (5), 721–727. <https://doi.org/10.1097/00004032-199511000-00007>.
- (2) *The Nobel Prize in Physics 1903*. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1903/becquerel/facts/> (accessed 2024-03-15).
- (3) *Radionuclides from Discovery to Modern Medical Imaging*. Open Medscience. <https://openmedscience.com/radionuclides-from-discovery-to-modern-medical-imaging/> (accessed 2024-03-15).
- (4) Stokke, C.; Kvasheim, M.; Blakkisrud, J. Radionuclides for Targeted Therapy: Physical Properties. *Molecules* **2022**, *27* (17), 5429. <https://doi.org/10.3390/molecules27175429>.
- (5) Uhl, P.; Fricker, G.; Haberkorn, U.; Mier, W. Radionuclides in Drug Development. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (2), 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.027>.
- (6) Davis, K. M.; Ryan, J. L.; Aaron, V. D.; Sims, J. B. PET and SPECT Imaging of the Brain: History, Technical Considerations, Applications, and Radiotracers. *Semin. Ultrasound CT MRI* **2020**, *41* (6), 521–529. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2020.08.006>.
- (7) van der Meulen, N. P.; Strobel, K.; Lima, T. V. M. New Radionuclides and Technological Advances in SPECT and PET Scanners. *Cancers* **2021**, *13* (24), 6183. <https://doi.org/10.3390/cancers13246183>.
- (8) Ulmann, V. *Jaderná fyzika, radiační fyzika, radioisotopy*. <https://astronuklfyzika.cz/strana2.htm> (accessed 2024-03-12).
- (9) *Historical Timeline*. SNMMI. <https://www.snmmi.org/AboutSNMMI/Content.aspx?ItemNumber=4175> (accessed 2024-03-19).
- (10) *Radioisotopes in Medicine*. Nuclear Medicine - World Nuclear Association. <https://world-nuclear.org/information-library/non-power-nuclear-applications/radioisotopes-research/radioisotopes-in-medicine.aspx> (accessed 2024-03-11).
- (11) Yeong, C. H.; Cheng, M.; Ng, K. H. Therapeutic Radionuclides in Nuclear Medicine: Current and Future Prospects. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2014**, *15* (10), 845–863. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400131>.
- (12) Sugiura, G.; Kühn, H.; Sauter, M.; Haberkorn, U.; Mier, W. Radiolabeling Strategies for Tumor-Targeting Proteinaceous Drugs. *Molecules* **2014**, *19* (2), 2135–2165. <https://doi.org/10.3390/molecules19022135>.

- (13) Holik, H. A.; Ibrahim, F. M.; Elaine, A. A.; Putra, B. D.; Achmad, A.; Kartamihardja, A. H. S. The Chemical Scaffold of Theranostic Radiopharmaceuticals: Radionuclide, Bifunctional Chelator, and Pharmacokinetics Modifying Linker. *Molecules* **2022**, *27* (10), 3062. <https://doi.org/10.3390/molecules27103062>.
- (14) White, J. M.; Escorcia, F. E.; Viola, N. T. Perspectives on Metals-Based Radioimmunotherapy (RIT): Moving Forward. *Theranostics* **2021**, *11* (13), 6293–6314. <https://doi.org/10.7150/thno.57177>.
- (15) Alcocer-Ávila, M. E.; Ferreira, A.; Quinto, M. A.; Morgat, C.; Hindié, E.; Champion, C. Radiation Doses from <sup>161</sup>Tb and <sup>177</sup>Lu in Single Tumour Cells and Micrometastases. *EJNMMI Phys.* **2020**, *7*, 33. <https://doi.org/10.1186/s40658-020-00301-2>.
- (16) *Definition of biological therapy – NCI Dictionary of Cancer Terms*. NCI. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biological-therapy> (accessed 2024-04-24).
- (17) Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špíšek, R. *Základy Imunologie*, 6.; 2017.
- (18) Khanna, V.; Panyam, J.; Griffith, T. S. Exploiting Antibody Biology for the Treatment of Cancer. *Immunotherapy* **2020**, *12* (4), 255–267. <https://doi.org/10.2217/imt-2019-0118>.
- (19) Zola, H.; Engel, P. Monoclonal Antibodies. In *Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons, Ltd, 2015; pp 1–9. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001205.pub4>.
- (20) Salfeld, J. G. Isotype Selection in Antibody Engineering. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (12), 1369–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt1207-1369>.
- (21) Roopenian, D. C.; Akilesh, S. FcRn: The Neonatal Fc Receptor Comes of Age. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7* (9), 715–725. <https://doi.org/10.1038/nri2155>.
- (22) Gibson, C. R.; Sandhu, P.; Hanley, W. D. Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. In *Therapeutic Monoclonal Antibodies*; An, Z., Ed.; Wiley, 2009; pp 439–460. <https://doi.org/10.1002/9780470485408.ch19>.
- (23) Pierpont, T. M.; Limper, C. B.; Richards, K. L. Past, Present, and Future of Rituximab - The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 163. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00163>.
- (24) Pavlasova, G.; Mraz, M. The Regulation and Function of CD20: An “Enigma” of B-Cell Biology and Targeted Therapy. *Haematologica* **2020**, *105* (6), 1494–1506. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.243543>.
- (25) Read, E. D.; Eu, P.; Little, P. J.; Piva, T. J. The Status of Radioimmunotherapy in CD20+ Non-Hodgkin's Lymphoma. *Target. Oncol.* **2015**, *10* (1), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s11523-014-0324-y>.

- (26) Weiner, G. J. Rituximab: Mechanism of Action. *Semin. Hematol.* **2010**, *47* (2), 115–123. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.01.011>.
- (27) Golay, J.; Introna, M. Mechanism of Action of Therapeutic Monoclonal Antibodies: Promises and Pitfalls of in Vitro and in Vivo Assays. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *526* (2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.011>.
- (28) *MabThera*. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mabthera> (accessed 2024-04-21).
- (29) Kostova, V.; Désos, P.; Starck, J.-B.; Kotschy, A. The Chemistry Behind ADCs. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (5), 442. <https://doi.org/10.3390/ph14050442>.
- (30) Kratochvíl, B.; Benešová, E. Konjugáty protilátka-léčivo, spojení velkých a malých terapeutických molekul. *Chem. Listy* **2023**, *117* (5), 319–329. <https://doi.org/10.54779/chl20230319>.
- (31) Tsuchikama, K.; An, Z. Antibody-Drug Conjugates: Recent Advances in Conjugation and Linker Chemistries. *Protein Cell* **2018**, *9* (1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0323-0>.
- (32) Fu, Z.; Li, S.; Han, S.; Shi, C.; Zhang, Y. Antibody Drug Conjugate: The “Biological Missile” for Targeted Cancer Therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7* (1), 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00947-7>.
- (33) Price, E. W.; Orvig, C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (1), 260–290. <https://doi.org/10.1039/C3CS60304K>.
- (34) Bird, R. E.; Lemmel, S. A.; Yu, X.; Zhou, Q. A. Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32* (12), 2457–2479. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00461>.
- (35) Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (16), 4895–4950. <https://doi.org/10.1039/C7CS00184C>.
- (36) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.* **2000**, *2* (14), 2141–2143. <https://doi.org/10.1021/ol006054v>.
- (37) Mitry, M. M. A.; Greco, F.; Osborn, H. M. I. In Vivo Applications of Bioorthogonal Reactions: Chemistry and Targeting Mechanisms. *Chem. – Eur. J.* **2023**, *29* (20). <https://doi.org/10.1002/chem.202203942>.

- (38) Breugst, M.; Reissig, H. U. The Huisgen Reaction: Milestones of the 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (30), 12293–12307. <https://doi.org/10.1002/anie.202003115>.
- (39) Handula, M.; Chen, K. T.; Seimbille, Y. IEDDA: An Attractive Bioorthogonal Reaction for Biomedical Applications. *Molecules* **2021**, *26* (15), 4640. <https://doi.org/10.3390/molecules26154640>.
- (40) DeNardo, G. L. Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) With Radiolabeled Antibodies (mAbs). *Semin. Nucl. Med.* **2005**, *35* (3), 202–211. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2005.02.006>.
- (41) Cicone, F.; Santo, G.; Bodet-Milin, C.; Cascini, G. L.; Kraeber-Bodéré, F.; Stokke, C.; Kolstad, A. Radioimmunotherapy of Non-Hodgkin B-Cell Lymphoma: An Update. *Semin. Nucl. Med.* **2023**, *53* (3), 413–425. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2022.12.006>.
- (42) Szymańska, K.; Park, S. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2018; p B9780128012383652716. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65271-6>.
- (43) Hennessy, B. T.; Hanrahan, E. O.; Daly, P. A. Non-Hodgkin Lymphoma: An Update. *Lancet Oncol.* **2004**, *5* (6), 341–353. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01490-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01490-1).
- (44) Kaminski, M. S.; Tuck, M.; Estes, J.; Kolstad, A.; Ross, C. W.; Zasadny, K.; Regan, D.; Kison, P.; Fisher, S.; Kroll, S.; Wahl, R. L. 131I-Tositumomab Therapy as Initial Treatment for Follicular Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352* (5), 441–449. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041511>.
- (45) Jacene, H. A.; Filice, R.; Kasecamp, W.; Wahl, R. L. Comparison of 90Y-Ibritumomab Tiuxetan and 131I-Tositumomab in Clinical Practice. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (11), 1767–1776. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.043489>.
- (46) Vondráková, J. Myelodysplastický syndrom, diagnostika a léčba. *Interní Med.* **2012**, *12* (11), 535–539.
- (47) Boswell, C. A.; Brechbiel, M. W. Development of Radioimmunotherapeutic and Diagnostic Antibodies: An inside-out View. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (7), 757–778. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.04.001>.
- (48) Khan, M. A. R.; Al Mamun, M. S.; Habib, M. A.; Islam, A. B. M. N.; Mahiuddin, M.; Karim, K. M. R.; Naime, J.; Saha, P.; Dey, S. K.; Ara, M. H. A Review on Gold Nanoparticles: Biological Synthesis, Characterizations, and Analytical Applications. *Results Chem.* **2022**, *4*, 100478. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100478>.

- (49) Elahi, N.; Kamali, M.; Baghersad, M. H. Recent Biomedical Applications of Gold Nanoparticles: A Review. *Talanta* **2018**, *184*, 537–556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>.
- (50) Beales, C. T.; Medalia, O. Gold Nanomaterials and Their Potential Use as Cryo-Electron Tomography Labels. *J. Struct. Biol.* **2022**, *214* (3), 107880. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2022.107880>.
- (51) Mohsin, M. A. S.; Choudhury, H. S. Label-Free Quantification of Gold Nanoparticles at the Single-Cell Level Using a Multi-Column Convolutional Neural Network (MC-CNN). *Analyst* **2024**, *149* (8), 2412–2419. <https://doi.org/10.1039/D3AN01982A>.
- (52) Malatesta, M. Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (23), 12789. <https://doi.org/10.3390/ijms222312789>.
- (53) Cortés-Ríos, J.; Zárate, A. M.; Figueroa, J. D.; Medina, J.; Fuentes-Lemus, E.; Rodríguez-Fernández, M.; Aliaga, M.; López-Alarcón, C. Protein Quantification by Bicinchoninic Acid (BCA) Assay Follows Complex Kinetics and Can Be Performed at Short Incubation Times. *Anal. Biochem.* **2020**, *608*, 113904. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113904>.
- (54) Karczmarczyk, U.; Sawicka, A.; Garnuszek, P.; Maurin, M.; Wojdowska, W. Does the Number of Bifunctional Chelators Conjugated to a mAb Affect the Biological Activity of Its Radio-Labeled Counterpart? Discussion Using the Example of mAb against CD-20 Labeled with  $^{90}\text{Y}$  or  $^{177}\text{Lu}$ . *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (9), 6419–6430. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02044>.
- (55) Kumari, M.; Acharya, A.; Krishnamurthy, P. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Target-Specific Drug Delivery of Chemotherapeutics. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2023**, *14*, 912–926. <https://doi.org/10.3762/bjnano.14.75>.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obr. č. 1:** Historická časová osa vývoje radionuklidů a nukleární medicíny, inspirovaná podle historické osy SNMMI<sup>9</sup> a ze zdroje<sup>7</sup> ..... 18

**Obr. č. 2:** Základní radionuklidy využívané v terapii jsou  $\alpha$ ,  $\beta$  zářiče a emitory Augerových elektronů (AE), které vykazují jedinečné charakteristiky rozpadu vedoucí k různým energiím a rozsahům v cílové tkáni známým jako lineární přenos energie (LET). **A.**  $\alpha$ -Zářiče mají nejvyšší LET způsobený vysokými energiemi částic (MeV) a střední délkou dráhy ( $\mu\text{m}$ ). **B.**  $\beta$ -Zářiče mají střední energie (keV–MeV) s velkou délkou dráhy (mm) a produkují záření s nízkým LET, které může projít skoro 50 průměry buněk. **C.** Zářiče AE mají střední LET, díky nízkým energiím a vzdálenosti obvykle menší než 1  $\mu\text{m}$ . **D.** Znárodnění potenciálního rozsahu typu záření ( $\beta$  - žlutě;  $\alpha$  - zeleně a AE – oranžově). Kromě toho mohou radiofarmaka vyvolávat toxicitu u necílených okolních buněk crossfire“ efektem, případně může docházet k „bystander“ efektu. Obrázek převzat ze zdroje<sup>14</sup>. ..... 20

**Obr. č. 3:** Rituximabem zprostředkované zabíjení B-buněk exprimujících CD20. (Vlevo nahoře) Vazba rituximab-CD20 může přímo spustit apoptózu vlivem mechanismů závislých i nezávislých na kaspáze. Tento mechanismus však není plně charakterizován. (Vpravo nahoře) Komplex rituximab-CD20 může navázat C1 komplex a spustit klasickou komplementovou kaskádu, jejíž výsledkem je sestavení komplexu membránového útoku (MAC), póru, který vede k lýzi buněk. Tento mechanismus je známý jako cytotoxicita závislá na komplementu (CDC). (Vlevo dole) Navázaný rituximab může rekrutovat NK buňky, které rozpoznají komplex prostřednictvím receptoru Fc $\gamma$ RIII, což vede k cytotoxicitě závislé na protilátkách (ADCC). (Vpravo dole) Makrofágy rozpoznávají komplex rituximab-CD20 prostřednictvím Fc $\gamma$ , což vede k fagocytóze cílové buňky závislé na protilátce (ADCP). Obrázek převzat ze zdroje<sup>23</sup>. ..... 28

**Obr. č. 4:** Přehled mechanismů ADC pro zabíjení nádorových buněk pomocí různých přístupů: (Vlevo nahoře) Mechanismus účinku ADC léčiva. (Vpravo nahoře) Hlavní mechanismus účinku ADC molekul. (Vlevo dole) Protilátková složka ADC se spojuje s imunitními efektorovými buňkami a vyvolává protinádorovou imunitu pomocí CDC, ADCC a ADCP efekty. (Vpravo dole) Struktura ADC a jeho hlavní složky: cílový antigen; protilátka, linker, cytotoxické léčivo. Obrázek převzat ze zdroje<sup>32</sup>. ..... 30

**Obr. č. 5:** Neštěpitelné linkery: Chemická stabilita linkeru (zde příklad SMCC linkeru) odolává proteolytické degradaci. Po lysozomální degradaci se uvolňuje malá molekula s aminokyselinovým zbytkem (v tomto případě lysinu) pocházející z degradované mAb..... 31



<b>Obr. č. 6:</b> Štěpitelné linkery: A. Hydrazonový linker a jeho hydrolýza v kyselém prostředí. B. Disulfidový linker. Disulfidová vazba je redukována intracelulárními redukujícími molekulami (například glutathionem). C. Příklad dipeptidového linkeru Val-Cit se spacerem <i>p</i> -aminobenzyloxykarbonylem (PABC) a mechanismus uvolňování „payloadu“ z konjugátu Val-Cit-PABC. ....	33
<b>Obr. č. 7:</b> DTPA a její funkční deriváty. ....	35
<b>Obr. č. 8:</b> DOTA a její bifunkční deriváty.....	36
<b>Obr. č. 9:</b> Příklady biokonjugace s lysinovými a cysteinovými zbytky: <b>A.</b> Reakce aminokyselinové zbytku lysinu s aktivovaným esterem (NHS) za tvorby amidové vazby. <b>B.</b> Reakce aminokyselinové zbytku lysinu s isothiokyanátovou skupinou (SCN) za tvorby thiomocovinové vazby. <b>C.</b> Maleimidová alkylace. Maleimidová část reaguje s redukováným cysteinovým zbytkem mAb.....	38
<b>Obr. č. 10:</b> Inkorporace neproteinogenních aminokyselin pomocí genové inženýrství do mAbs a následná chemická konjugace. <b>A.</b> Oximová ligace. <b>B.</b> Mědí katalyzovaná <b>C.</b> nebo bez mědi azid-alkinová cykloadice.....	39
<b>Obr. č. 11:</b> Schéma Staudingerovy ligace, prvně popsány bioortogonální reakce .....	40
<b>Obr. č. 12:</b> Reakční schéma „click“ reakce katalyzované mědí, kdy vzniká 1,4-disubstituovaný 1,2,3-triazol .....	41
<b>Obr. č. 13:</b> <b>A.</b> Reakční schéma SPAAC. <b>B.</b> Příklady molekul derivátů cyklooktinů zvyšující rychlost SPAAC reakcí .....	41
<b>Obr. č. 14:</b> <b>A.</b> Schéma ligace tetrazinu pomocí IEDDA a retro-Diels-Alderovy reakce, při které se eliminuje molekula plynného dusíku <b>B.</b> Molekula d-TCO.....	42
<b>Obr. č. 15:</b> Schématické znázornění IEDDA mechanismu mezi dienofilem a tetrazinem. 43	
<b>Obr. č. 16:</b> Fáze diferenciaci B-buněk: Kmenové buňky (a) se diferencují v rychle se množící lymfoblasty (b) v kostní dřeni. Po opětovné diferenciaci v imunologicky naivní lymfocyty (c) migrují do lymfatických uzlin a tkání. Po prezentaci antigenu buňky opět proliferují (d) a získávají antigenní specifitu. Centrocyty (e), které exprimují membránový imunoglobulin s afinitou k antigenu, jsou pozitivně selektovány a stávají se buď paměťovými B-buňkami (f) nebo plazmatickými buňkami produkující protilátky (g). Obrázek byl převzat a upraven ze zdroje <sup>25</sup> .....	45
<b>Obr. č. 17:</b> Schématické znázornění přípravy konjugátu rituximab-fluoresceinisoithiokyanát (FITC) .....	51
<b>Obr. č. 18:</b> SEC kolona pro přečištění konjugátu rituximab-FITC, první pruh: konjugát, druhý pruh: volný fluorescein .....	52

<b>Obr. č. 19:</b> Nahoře: rozložení standardních roztoků na přípravu BCA kalibrační křivky (poměr vzorku ku WR = 1:8). Dole: Standardní roztoky ve 2 ml, po 30 minutách inkubace při 37 °C (poměr vzorku ku WR = 1:20).....	53
<b>Obr. č. 20:</b> Schématické znázornění přípravy konjugátu rituximab-TCO-tetrazin-FITC skládající se ze tří dílčích reakcí. 1) Konjugace reakcí aminokyselinového zbytku lysinu u rituximabu s NHS aktivovaným esterem u TCO za tvorby amidové vazby. 2) Reakce aminoskupiny u tetrazinu s SCN skupinou fluoresceinu za tvorby thioočovinové vazby. 3) Bioortogonální reakce rituximab-TCO s molekulou tetrazin-FITC.....	54
<b>Obr. č. 21:</b> Schématické znázornění přípravy konjugátu rituximab-CHX-A"-DTPA- <sup>161</sup> Tb. ....	56
<b>Obr. č. 22:</b> Kalibrační křivka pro měření koncentrace přečištěného rituximabu za využití Pierce™ BCA Protein Assay Kitu. Standardní roztoky byly připraveny ze zásobního lyofilizovaného rituximabu rozpuštěném v PBS v rozmezí 25-2 000 µg/ml a absorbance byla měřena při 562 nm.....	63
<b>Obr. č. 23:</b> Kalibrační křivka při 280 nm pro přibližné zjištění koncentrace protilátky v připraveném konjugátu po konjugaci. ....	64
<b>Obr. č. 24:</b> Chromatogram z MALDI-TOF: stanovení hodnoty DAR (průměrná hodnota počtu navázaných malých molekul na 1 molekulu protilátky) konjugátů rituximab- <i>p</i> -SCN-Bn-CHX-A"-DTPA s různými vstupními poměry chelátoru.....	65
<b>Obr. č. 25:</b> Obrázek konfokálního mikroskopu a zobrazení tří typů buněk po 30 minutách inkubace s konjugátem rituximab-FITC a následném vymytí volného konjugátu metodou konfokální fluorescenční mikroskopie. Ramos a Raji jsou B-buňky, které na svém povrchu exprimují CD20 antigen a po 30 minutách je vidět uptake buněk konjugátu u obou typů kultur (pozitivní kontrola). EL 4 je myší T-buněčný lymfom bez CD20 antigenu, proto není vidět téměř žádná fluorescence (negativní kontrola) .....	67
<b>Obr. č. 26:</b> Reakční schéma důkazové reakce aminokyselin za využití ninhydrinu. Konečným produkem je fialově zbarvený komplex.....	68
<b>Obr. č. 27:</b> Chromatogram z MALDI-TOF: stanovení hodnoty DAR konjugátu rituximab-PEG <sub>4</sub> -TCO se vstupním molárním poměrem 1:30 (rituximab-linker+TCO) a porovnáním píků standardu rituximabu s konjugátem určení hodnoty DAR na 10 (tzn. průměrně 10 molekul TCO je navázaných na 1 molekulu rituximabu). ....	69
<b>Obr. č. 28:</b> Chromatogram standardu FITCu z HPLC (pík 7 min).....	70
<b>Obr. č. 29:</b> Chromatogram standardu tetrazinu z HPLC (pík 1,9 min). ....	70

- Obr. č. 30:** Chromatogram reakční směsi FITCu a tetrazinu z HPLC po 60 minutách reakce. (pík 6,5 min; pík tetrazinu vymizel). ..... 71
- Obr. č. 31:** Zobrazení tří typů buněk po 30 minutách nasycení CD20 receptorů konjugátem rituximab-TCO u Raji a Ramos buněk (EL 4 nemají receptory pro rituximab) a následné bioortogonální reakci s ligandem tetrazin-FITC po 30 min a následném vymytí volného ligandu, aby se snížilo pozadí. Buňky byly zobrazeny metodou konfokální fluorescenční mikroskopie. Ramos a Raji jsou B-buňky, které na svém povrchu exprimují CD20 antigen a po 30 min je vidět uptake buněk konjugátu u obou typů kultur (pozitivní kontrola). Také je vidět, že bioortogonální reakce takto připraveného konjugátu probíhá i přes vysokou konjugaci rituximabu s hodnotou DAR téměř 10. EL 4 jsou myši T-lymfomy bez CD20 antigenu, proto není vidět skoro žádná fluorescence (negativní kontrola)..... 72
- Obr. č. 32:** Chromatogram z MALDI-TOF: stanovení hodnoty DAR konjugátů rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA se vstupním molárním poměrem 1:30 (rituximab-chelátor)..... 73
- Obr. č. 33:** Chromatogram standardu *p*-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA z HPLC (pík 5,9 min). ..... 74
- Obr. č. 34:** Chromatogram reakční směsi rituximabu s *p*-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA z HPLC po 60 minutách reakce. Je vidět, že pík v 5,9 min se ztrácí ubývajícím množstvím volného konjugátu. .... 74
- Obr. č. 35:** Radio-TLC skeny ze značení. A. a B. TLC skeny po 1 h značení při pH 7,4 a laboratorní teplotě konjugátů rituximab-*p*-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA s určenou hodnotou DAR: 1,12 pro sken A a 1,16 pro sken B. Sken C. ukazuje chování nenavázaného terbia, které se v průběhu separace rozmývá a největší koncentrace jde s čelem..... 76
- Obr. č. 36:** Zobrazení biodistribuce radioimunokonjugátu ve zdravé myši pomocí metody SPECT/CT. A. Snímek po 60 min od intravenózní aplikace. B. Snímek po 6 h od aplikace. C. Snímek po 24 h od aplikace. .... 78
- Obr. č. 37:** Funkcionalizace NP protilátky nekovalentní interakcí. **A.** Nanočástice (NP), **B.** fyzikální adsorpce protilátky na povrch NP, **C.** elektrostatická interakce protilátky a povrchu NP..... 79
- Obr. č. 38:** Zobrazení GFP-TUB6 v „ghostech“ fluorescenční mikroskopii. (Zleva) zeleným kanálem zobrazený GFP protein v tubulinu, (2.) magenta kanálem zobrazená sekundární protilátka s Alexa Fluor 555 fluorescenční značkou, (3.) brightfield, (4.) proložené 3 módy do jednoho obrázku. .... 80
- Obr. č. 39:** Zobrazení GFP-TUB6 v „ghostech“ fluorescenční mikroskopii. (Zleva) Zeleným kanálem zobrazený GFP protein v tubulinu a sekundární protilátka s Alexa Fluor 488

fluorescenční značkou, (2.) magenta kanál, (3.) brightfield, (4.) proložené 3 módy do jednoho obrázku. .... 81

**Obr. č. 40:** **A.** Zobrazení zlatých NPs pomocí TEM, **B.** zobrazení zlatých NPs v „ghostech“ pomocí metody ESEM. .... 81

## SEZNAM TABULEK

**Tab. č. 1:** Příklady radionuklidů pro terapeutické využití a jejich fyzikální vlastnosti..... 21

**Tab. č. 2:** Příprava standardních roztoků na kalibrační křivku ..... 53

**Tab. č. 3:** Gradient mobilních fází pro HPLC ..... 58

**Tab. č. 4:** Příprava kalibračních roztoků na kalibrační křivku při 280 nm..... 58

**Tab. č. 5:** Porovnání stanovené koncentrace po přečištění rituximabu (navážka: ~1 mg) pomocí UV-VIS spektrofotometrie s BCA esejí a při 280 nm..... 64

**Tab. č. 6:** Naměřená radioaktivita  $^{161}\text{Tb}$  v jednotlivých frakcích po přečištění přes PD10 kolonu, kolony po přečištění a prázdné reakční vialky..... 75

**Tab. č. 7:** Naměřené hodnoty radioaktivity po in vitro experimentu radioimunokonjugátu k CD20+ buňkám (pozitivní kontrola) a T-buňkám bez receptoru CD20 (negativní kontrola) a vypočítaný obsah radioaktivního konjugátu na buňkách ..... 77

**Tab. č. 8:** *Ex vivo* změřená radioaktivita a hmotnost vybraných orgánů, vypočtená aktivita vztažená na hmotnost a %ID/g ..... 77