

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakologie a toxikologie

Kandidát **Mgr. Pavel Bárta**

Školitel **Prof. PharmDr. Ing Milan Lázníček, CSc.**

Název disertační práce **Studium interakce receptorově specifických radiofarmak s biologickým systémem na buněčné úrovni**

Cílení nádorových buněk receptorově specifickými peptidy nebo protilátkami patří k významnému diagnostickému a někdy i terapeutickému nástroji v boji proti nádorovým onemocněním.

Receptorově specifické peptidy jsou především odvozené od tělu vlastních peptidových hormonů, proto o nich mluvíme jako o peptidových analozích. Analogy peptidů obsahují ve svém peptidovém řetězci vazebné místo shodné s přirozeným peptidem umožňující jejich specifické navázání na cílový receptor. Peptidové analogy se používají místo přirozených peptidů zejména z důvodu jejich lepších biologických vlastností usnadňujících jejich distribuci v organismu do místa jejich působení nebo z důvodu jejich ochrany před biologickou degradací. Vazba a internalizace peptidového ligandu do buňky většinou sama o sobě nenavozuje terapeutický efekt, proto peptidový analog nese aktivní látku jako je cytotoxin nebo radioizotop, která má terapeutický účinek anebo i diagnostický v případě radioaktivního izotopu. Terapeutický efekt radioizotopu pak zahrnuje poškození DNA nádorové buňky vedoucí ke ztrátě jejich proliferačních schopností a k zániku buňky. Vedle terapeutického efektu je častější použití radioaktivně značených peptidů pro zobrazovací účely. Zobrazovací schopnost gama záření emitujících izotopů usnadňuje nalezení ložiska nádoru.

Terapeuticky využívané receptorově specifické monoklonální protilátky jsou schopné bránit přenosu signálu vzniklého z interakce přirozeného ligandu na cílovém receptoru tím, že blokují vazebná místa na receptorech. Terapeutický účinek také spočívá v zabránění přenosu signálu z receptoru na efektorové proteiny uvnitř buňky a tím vzniku buněčné odpovědi. Monoklonální protilátky nemusejí mít sami o sobě dostatečný terapeutický účinek, proto se častěji používají ve formě transportních látek pro cytotoxická léčiva nebo radionuklidy, které působí zánik cílených buněk. Radioaktivní značení monoklonálních protilátek má stejně jako u peptidových analogů i diagnostický účel. Nevýhodou protilátek bývá velikost jejich molekuly. Zatímco peptidy o krátkém peptidovém řetězci snadněji pronikají do místa působení, protilátky se jen pomalu distribuují a rychleji podléhají biodegradaci v játrech. Řešení této komplikace z posledních let spočívá ve vytvoření fragmentů protilátek, které se postupně „poskládají“ na cílové struktuře receptoru, mluví se o tzv. pre-targeting metodě. Vedle snadné distribuce v organismu se navíc snižuje riziko cytotoxické nebo radiologické zátěže pacienta.

Cíl publikované práce v kapitole I byl zaměřen na případné ovlivnění biologických vlastností peptidu minigastrin11 (MG11) radioaktivním značením, kdy se testovala jeho schopnost interakce na specifickém cholecystokininovém receptoru typu 2 (CCK2r) a míra jeho internalizace do pankreatických nádorových buněk AR42J. Minigastrinový analog byl značen radionuklidy ^{177}Lu a ^{111}In , kdy prvně uvedený má v onkologii terapeutické využití a druhý diagnostické. Vazba komplexu ^{111}In -DOTA-MG11 na receptor byla pomalá a nedosáhla rovnováhy mezi asociací a disociací reakce ligandu na receptoru ani po třech hodinách inkubace. Na druhou stranu, interakce komplexu ^{177}Lu -DOTA-MG11 na CCK2r dosáhla rovnováhy po jedné hodině inkubace včetně vyššího internalizovaného podílu radiopeptidu z celkového přidaného množství, než tomu bylo v případě ^{111}In -DOTA-MG11. Radiofarmakum ^{177}Lu -DOTA-MG11 je tedy schopno se efektivně vázat na cílový CCK2r a má tak slibné předpoklady pro své uplatnění v terapii radionuklidem značenými receptorově specifickými peptidy (PRRT). Výše zmíněná radiofarmaka se použila i pro zjištění případné radionefrotoxicity, která bývá častou doprovodnou komplikací aplikace radioaktivně značených peptidových analogů. Komplikace s poškozováním ledvin v případě radioaktivně značených peptidů je zapříčiněna zpětnou tubulární resorpcí, která kumuluje radioaktivní izotopy v ledvinných buňkách proximálního tubulu.

Pro otestování případné kumulace ^{111}In - a ^{177}Lu -ligandu se použila buněčná linie izolovaná z proximálního tubulu ledvin vačice oposum (OK buňky). Výsledky experimentu byly příznivé, neboť neprokázaly významnou kumulaci radioligandů v ledvinných buňkách. Internalizace radiopeptidů vykazovala maximálních hodnot kolem 0.1 % z celkově přidaného množství aktivního ligandu k buňkám.

Publikace v kapitole II se zaměřila na zlepšení způsobu kvantifikace receptorů na buňkách (NRPC). Studie porovnávala možnosti nabízené klasickou manuální technikou pro NRPC s novým způsobem kvantifikace receptorů na automatickém zařízení nesoucí název LigandTracer® určeného pro real-time měření interakce radioligandu s cílovým receptorem na buněčném povrchu. Nový způsob stanovení počtu receptorů dostal označení KEX metoda. Název je odvozen od základního principu metody, který spočívá v extrapolaci dat kinetické reakce vazby ligandu na receptor, tedy ve výpočtu teoretické hodnoty B_{max} , která odpovídá signálu kompletně saturovaného množství cílených receptorů na povrchu buňky. Manuální metoda se řadí mezi techniky kvantifikace receptorů na povrchu buněk osvědčené mnohaletým užíváním a je tak zlatým standardem NRPC technik. Naměřené hodnoty kvantifikovaných receptorů manuální metodou a technikou KEX vykazaly shodu, pouze KEX technika v některých případech vykazovala mírné nadhodnocení počtu receptorů oproti klasické metodě. KEX technika se i přesto dá zařadit mezi metody umožňující kvantifikaci cílených buněčných receptorů s využitím v biologických vědách a s následným uplatněním v nukleární medicíně. Rychlé ověření množství receptorů a schopnosti radioligandu se vázat na zamýšlenou strukturu na povrchu nádorové buňky zefektivní výzkum nových terapeutických nebo diagnostických molekul pro onkologickou léčbu. Možný význam plynoucí z KEX techniky byl opakovaně ověřen i v další experimentální studii uvedené v kapitole V. Zde se porovnávaly hodnoty počtu receptorů na testovaných buněčných liniích měřených technikou KEX, klasickou manuální technikou a metodou western blottingu. Výsledek studie opětovně potvrdil uvedení KEX techniky mezi spolehlivé metody stanovení NRPC.

Možnost ovlivnění afinity receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) pro ligand 125I-EGF prostřednictvím tyrozin kinázového (TK) inhibitoru gefitinibu byla prozkoumána a popsána v odborné publikaci v kapitole III. Výsledkem práce je zjištění indukujícího vlivu gefitinibu na tvorbu EGFR dimerů. Tvorba receptorového dimeru ovlivňuje charakteristiku interakce EGFR s jeho přirozeným ligandem epidermálním růstovým faktorem (EGF). Prevalence receptorových monomerů, homodimerů a heterodimerů je odlišná mezi buněčnými liniemi a závisí především na míře exprese EGFR a HER2 receptoru na povrchu buněk. EGF se váže na monomerní a dimerní formy EGFR s rozdílnými vazebnými vlastnostmi. Výsledek studie poukazuje na kladný vliv gefitinibu na tvorbu EGFR dimerů, které pak mají vyšší afinitu k 125I-EGF.

Publikovaná studie uvedená v kapitole IV se zaměřila na prokázání hypotézy, že afinita receptoru a kinetika reakce mezi ligandem a jeho receptorem se liší napříč buněčnými liniemi. Například přirozený ligand EGF se tak váže s rozdílnou vazebnou silou na ten samý receptor (EGFR) exprimovaný na rozdílných buněčných liniích. Tato zjištění byla ověřena pro protilátku 131I-cetuximab, která se vázala na EGFR s rozdílnou afinitou pro tři buněčné linie. Faktor rozdílu v afinitě protilátky k ligandu měl napříč buněčnými liniemi hodnotu až 10. Možnou příčinou rozdílu v afinitě receptoru k ligandu je jeho různý stupeň glykosylace, nebo tvorba homodimerů či heterodimerů a v neposlední řadě možná mutace receptoru. Uvedené možnosti ovlivnění afinity receptoru pak vedou k případům, kdy velmi dobrý vazebný partner receptoru testovaný in vitro vykazuje velmi nízkou afinitu vazby na cílový receptor v biologickém testování. Podobného zjištění se dosahuje i v aplikaci terapeutických a diagnostických činidel v populaci pacientů, kdy část pacientů neodpovídá na léčbu. Výsledky prací charakterizující úspěšnost in vitro aplikací zkoumaného receptorového ligandu by neměly být generalizovány pro všechny buňky nesoucí zkoumaný receptor, ale měl by být brán zřetel na možné difference mezi buněčnými liniemi. Podobně by měla být vedena i léčba pacientů, která by měla mít individuální přístup.

Poslední publikovaná studie zařazená do kapitoly VI si kladla za cíl ověřit, jaký je vliv zvoleného radioizotopu a způsobu radioaktivního značení na chování radioligandu v in vivo a in vitro podmínkách. Výsledek práce uvádí, že zvolené izotopy ^{131}I a ^{177}Lu a stejně tak metody jejich vazby na transportní protilátku nimotuzumab cílenou proti EGFR nevedly k ovlivnění internalizační charakteristiky radioligandu u buněčných kultur. Opak prokázaly výsledky experimentů provedených in vivo, které poukázaly na některé odlišnosti v distribučních profilech v závislosti na použitých metodách radioaktivního značení. ^{131}I -

nimotuzumab vykazoval nejnižší míru vychytávání v játrech a nejdelší čas krevní eliminace ze všech zkoumaných radioligandů. Protilátka nimotuzumab s izotopem ^{177}Lu navázaným prostřednictvím chelatačních činidel (DOTA, DTPA) byla charakterizována poklesem eliminačního času a mnohonásobně zvýšenou retencí v játrech. Uvedené in vivo výsledky potvrdily vliv typu použitého izotopu a způsobu jeho vazby na biologické vlastnosti značené protilátky nimotuzumab v případě testových faktorů, jako byla krevní clearance, vychytávání játry a následná kumulace v játrech.