ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Jiří Janoušek
Školitel: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.
Konzultant: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.
Název disertační práce: Studium vlastností radioaktivně značených monoklonálních protilátek pro zobrazování v onkologii

Monoklonální protilátky patří mezi cílená biologická léčiva, která se v současnosti s úspěchem uplatňují v řadě oblastí medicíny, včetně onkologie. Schopnost protilátek vázat se specificky na antigeny vyskytující se v nádorové tkáni lze využít k zobrazení nádorů v nukleární medicíně. Mezi možné cíle protilátek patří receptory pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR) a epidermální růstový faktor (EGFR), které jsou charakteristické pro některé typy proliferující nádorové tkáně. Pro potenciální radiodiagnostické využití je třeba k molekule protilátky připojit vhodný radionuklid. Tato operace vyžaduje chemickou modifikaci její molekuly, která může ovlivnit její imunoreaktivitu a vazbu na cílový receptor.

Cílem této disertační práce bylo studovat vliv podmínek značení monoklonálních protilátek, potenciálně využitelných v onkologické radiodiagnostice, vybranými diagnostickými radionuklidy na jejich radiochemické parametry, *in vitro* receptorově specifickou vazebnost, orgánovou distribuci a kvalitu zobrazení experimentálních nádorů *in vivo*. Pro tyto účely byly vybrány anti-EGFR monoklonální protilátka cetuximab a anti-VEGFR2 protilátka ramucirumab. V případě cetuximabu byl zkoumán vliv metody při značení jódem-131 a zároveň byla testována možnost aplikace metody CTK (Concentration Through Kinetics) s využitím cílových receptorů exprimovaných na povrchu buněk. V případě ramucirumabu (RAM) byl zkoumán vliv značení vybranými radiokovy na radiochemické a biologické vlastnosti – afinitu protilátky k cílovému receptoru *in vitro* a *in vivo*.

Pro značení cetuximabu jódem-131 byla použita metoda s chloraminem T. Monoklonální protilátka ramucirumab byla značena pomocí přímých i nepřímých metod radionuklidy vhodnými pro radiodiagnostické zobrazování techneciem-99m (^{99m}Tc), galiem-67 (^{67}Ga) a zirkoniem-89 (^{89}Zr). Pro stanovení radiochemické čistoty a stability byla použita tenkovrstvá a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Afinita protilátek k cílovému

receptoru byla charakterizována jako disociační konstanta K_D, která byla stanovována pomocí klasické manuální saturační techniky a automatizované real-time metody. Jako experimentální model byly pro *in vitro* experimenty použity lidské nádorové buňky exprimující cílové receptory studovaných protilátek – A431 a HaCaT pro cetuximab a PC3 a SKOV3 pro ramucirumab. Biodistribuce značeného ^{89}Zr-ramucirumabu byla studována *ex vivo* po aplikaci myším s PC3 a SKOV3 nádory. Stejné myší nádorové modely sloužily k testování PET/CT zobrazení nádorů pomocí ^{89}Zr-ramucirumabu.

Ověření vlivu radiojodace metodou chloraminu T na kvalitu radiopreparátu cetuximabu ukázalo, že zkrácení reakční doby zásadně neovlivňuje radiochemickou čistotu, může mít ovšem vliv na afinitu k EGF receptoru a stabilitu této vazby. Zároveň byla pomocí ^{131}I-cetuximabu prokázána možnost a výhodné vlastnosti provádění CTK analýzy s využitím živých buněk, zejména při nízkých koncentracích protilátky. Optimalizace metody značení ramucirumabu vybranými radiokovy vedla k přípravě radiopreparátů s vysokou radiochemickou čistotu, stabilitou a minimálním snížením vazebnosti protilátky k buněčnému VEGFR2 *in vitro*. Testování vlivu různých metod značení techneciem-99m na afinitu značeného RAM k VEGFR2 ukázalo menší vliv nepřímého značení přes připojený chelátor, než byl nalezen při použití přímé metody značení. Tyto experimenty umožnily následně připravit adekvátně kvalitní radiopreparát ramucirumabu značený PET radionuklidem ^{89}Zr s pomocí chelátoru desferoxamin (DFO) pro *in vivo* experimenty. Aplikace ^{89}Zr-DFO-RAM laboratorním myším s VEGFR2 pozitivními nádory ukázala významnou akumulaci značené protilátky v nádorové tkáni s maximem 72 h po aplikaci (9,4 ± 0,9 %ID/g u PC3 nádoru a 13,4 ± 1,7 %ID/g u SKOV3 nádoru). Akumulace v nádorech byla však patrná již 24 h po podání. V souladu s *ex vivo* experimenty byl nález velmi dobrého zobrazení nádorů pomocí PET/CT v intervalu 24 h po aplikaci ^{89}Zr-DFO-RAM. Postupný pokles radioaktivního pozadí v necílových orgánech a současná retence radioaktivity v nádorech vedly k relativně čistému zobrazení nádorové léze 144 h po aplikaci.

Získaná experimentální data potvrdila ovlivnění kvality radiopreparátů testovaných monoklonálních protilátek v závislosti na metodě použité pro jejich značení, které se může projevit jak změnami radiochemických parametrů, tak snížením afinity k cílovým antigenům. Výsledky experimentů *in vivo* potvrzují význam volby radionuklidu s delším poločasem pro značení radiodiagnostických monoklonálních protilátek, neboť zobrazení v delších časových intervalech po podání umožňuje zřetelnější zobrazení nádorů a zvýšení relevance vyšetření.