

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie



Biologické testování cetuximabu
značeného ^{89}Zr

Biological testing of cetuximab
labelled with ^{89}Zr

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracoval: Bc. Lucie Dobiášová
Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Červenák, Ph.D.
Rok: 2023

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Dobiášová** Jméno: **Lucie** Osobní číslo: **476650**
Fakulta/ústav: **Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská**
Zadávací katedra/ústav: **Katedra jaderné chemie**
Studijní program: **Jaderná chemie**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Biologické testování cetuximabu značeného 89Zr

Název diplomové práce anglicky:

Biological testing of cetuximab labelled with 89Zr

Pokyny pro vypracování:

1. Vývoj a optimalizace metody ELISA pro CTX-DFOSq a CTX-DFOSq-89Zr
2. Ověření stability konjugátů CTX-DFOSq a CTX-DFOSq-89Zr pomocí HPLC, SDS-PAGE a ELISA
3. Testování CTX-DFOSq-89Zr in vitro
4. Sepsání diplomové práce

Seznam doporučené literatury:

1. DERI, M. A., et al. PET imaging with 89Zr: From radiochemistry to the clinic. Nucl. Med. Biol., 2013, vol. 40, no. 1, p. 3–14.
2. ROUSSEAU, J., et al. Design, synthesis and evaluation of novel bifunctional tetrahydroxamate chelators for PET imaging of 89Zr-labeled antibodies, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2017, vol. 27, no. 4, p. 708–712.
3. TANG, Y., et al. A simple and convenient method for production of 89Zr with high purity. Appl. Radiat. Isot., 2016, vol. 118, p. 326–330.
4. TINIANOW, J. N., et al. Site-specifically 89Zr-labeled monoclonal antibodies for ImmunoPET. Nucl. Med. Biol., 2010, vol. 37, no. 3, p. 289–297.
5. ABOU, D. S., et al. In vivo biodistribution and accumulation of 89Zr in mice. Nucl. Med. Biol., 2011, vol. 38, no. 5, p. 675–681.
6. SUAREZ, I., et al. Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies. J. of Chromatography B, 2016, vol. 1032, p. 155–164.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Jaroslav Červenák, Ph.D. ÚJF AV ČR, Řež

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:

Datum zadání diplomové práce: **20.10.2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **03.05.2023**

Platnost zadání diplomové práce: **20.10.2024**

Ing. Jaroslav Červenák, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce

podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

doc. Ing. Václav Čuba, Ph.D.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomantka bere na vědomí, že je povinna vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

29-10-2022
Datum převzetí zadání

Podpis studentky

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze zdroje uvedené v příloženém seznamu.

V Praze dne

.....
Bc. Lucie Dobiášová

Poděkování

Chtěla bych velice poděkovat Ing. Jaroslavu Červenákovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Markétě Kleinové bez jejíž pomoci by experimenty nemohly proběhnout. Také bych chtěla poděkovat Ing. Kateřině Děcké, Ph.D. za pomoc s odpařováním chelátoru a Ing. Kateřině Kontrové, Ph.D. za zasvěcení do metody Dot Blot.

Bc. Lucie Dobiášová

Název práce:

Biologické testování cetuximabu značeného ^{89}Zr

Autor: Bc. Lucie Dobiášová

Studijní program: Jaderná chemie

Druh práce: Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Červenák, Ph.D.
ÚJF AV ČR, v.v.i.

Abstrakt: Tato práce se zabývá testováním cetuximabu značeného pomocí ^{89}Zr , ke značení byl použit chelátor desferrioxamin B squaramid (DFOSq). K přípravě konjugátu cetuximabu s DFOSq byly použity různé molární poměry. Stabilita konjugátů a konjugátů značených ^{89}Zr byla zjišťována pomocí HPLC a SDS-PAGE. Pro kvantifikaci biologické aktivity byla optimalizována metoda ELISA. Pro experimenty *in vitro* byly použity buněčné linie A431, PC3 a NIH3T3. Značená protilátka nevykazovala výrazné strukturální změny ani 120 h po značení, nedošlo k výraznému snížení její biologické aktivity. Na buněčných liniích A431 a PC3 dochází ke specifické kumulaci, bylo pozorováno buněčně vázané množství značené protilátky v čase.

Klíčová slova: cetuximab, ^{89}Zr , ELISA, SDS-PAGE, HPLC, *in vitro*

Title:

Biological testing of cetuximab labelled with ^{89}Zr

Author: Bc. Lucie Dobiášová

Abstract: This thesis deals with testing of cetuximab labelled with ^{89}Zr , for labelling, chelator desferrioxamin B squaramid (DFOSq) was used. Different molar ratios were used to prepare the conjugate of cetuximab with DFOSq. The stability of conjugates and ^{89}Zr -labelled conjugates was determined by HPLC and SDS-PAGE. The ELISA method was optimized for the quantification of biological activity. A431, PC3 and NIH3T3 cell lines were used for *in vitro* experiments. The labelled antibody did not show significant structural changes even 120 h after labelling, there was no significant reduction in its biological activity. A specific accumulation occurs on the A431 and PC3 cell lines, the cell-bound amount of labelled antibody over time was observed.

Key words: cetuximab, ^{89}Zr , ELISA, SDS-PAGE, HPLC, *in vitro*

Obsah

Úvod	8
1 Teoretická část	12
1.1 PET v onkologii	12
1.1.1 ImmunoPET	13
1.2 ^{89}Zr -cetuximab	16
1.2.1 Cetuximab	16
1.2.2 Zirkonium-89	18
1.2.3 Značení cetuximabu pomocí ^{89}Zr	20
1.3 Stabilita a biologická aktivita ^{89}Zr -DFOSq-CTX	22
1.3.1 ELISA	22
1.4 Testování ^{89}Zr -DFOSq-CTX <i>in vitro</i>	26
1.4.1 Buněčné linie	27
1.4.2 Stanovení míry exprese EGFR	27
1.4.3 Specifita vazby na EGFR	28
1.4.4 Množství navázaného farmaka v čase	29
1.5 Závěr z teoretické části	29
2 Experimentální část	30
2.1 Obecné informace	30
2.1.1 Použité materiály a přístroje	30
2.1.2 Stanovení koncentrace proteinu	34
2.2 Metodika	35
2.2.1 Optimalizace metody ELISA	35
2.2.2 Příprava cetuximabu značeného ^{89}Zr	36
2.2.3 Stabilita konjugátů DFOSq-CTX a ^{89}Zr -DFOSq-CTX	38
2.2.4 Biologická aktivita CTX-DFOSq a ^{89}Zr -CTX-DFOSq	38
2.2.5 Testování ^{89}Zr -CTX-DFOSq <i>in vitro</i>	39
3 Výsledky a diskuze	41
3.1 Optimalizace metody ELISA	41
3.2 Příprava cetuximabu značeného ^{89}Zr	44
3.2.1 Příprava DFOSq	44
3.2.2 Příprava a separace ^{89}Zr	44
3.2.3 Příprava DFOSq-CTX	45
3.2.4 Příprava ^{89}Zr -DFOSq-CTX	45
3.3 Stabilita konjugátů CTX-DFOSq	46

3.3.1	HPLC	46
3.3.2	SDS-PAGE	47
3.4	Stabilita ^{89}Zr -CTX-DFOSq	48
3.4.1	HPLC	48
3.4.2	SDS-PAGE	49
3.5	Biologická aktivita CTX-DFOSq	50
3.6	Biologická aktivita ^{89}Zr -CTX-DFOSq	51
3.7	Testování ^{89}Zr -CTX-DFOSq in vitro	53
	Závěr	56
	Literatura	57

Úvod

Několik let se chemik maďarského původu George de Hevesy bez úspěchu pokoušel o separaci RaD od olova. Zdarem toto snažení ani skončit nemohlo, jelikož, jak bylo později zjištěno, RaD je jedním z izotopů tohoto prvku. Zdánlivý neúspěch Hevesy transformoval do myšlenky využití radioizotopů jako stopovačů v chemických procesech, za kterou získal v roce 1943 Nobelovu cenu za chemii [1]. Indikátorové (stopovací) metody následně našly uplatnění v celé škále oborů, od hydrogeologie po medicínu.

Nukleární medicína se zabývá využitím otevřených radioaktivních zářičů pro diagnostiku a terapii. V terapii našly uplatnění zářiče α a β^- . Částice, které emitují, předají veškerou energii na relativně krátké vzdálenosti, čímž je dosaženo lokálního efektu. Pro diagnostiku jsou využívány radioizotopy s přeměnou gama nebo β^+ , přičemž po anihilaci pozitronu dochází k emisi dvou fotonů. Fotonové záření se vyznačuje nízkou hodnotou lineárního přenosu energie, což ho činí vhodným pro diagnostické použití. Distribuci radionuklidu v těle je možné sledovat pomocí vhodného detekčního systému. V případě využití pozitronových zářičů se jedná o pozitronovou emisní tomografii (PET), zářiče gama jsou zobrazovány pomocí jednofotonové emisní tomografie (SPECT).

Radiofarmaka, která jsou pacientům podávána pro zobrazování, jsou založena na různých principech. Některá z nich stojí na identickém chemickém chování izotopů daného prvku, příkladem mohou být radioizotopy jódu. Uvádí se, že 70-80 % jódu se kumuluje ve štítné žláze [2], čehož může být využito při zobrazování tohoto orgánu. Pro stejné vyšetření může být také použit ^{99m}Tc technecistan, protože chemické chování tohoto iontu se podobá jodidu. Další radiofarmaka mohou být v těle běžně se vyskytující molekuly, u kterých došlo k náhradě některého atomu za radionuklid. Příkladem je v současnosti nejpoužívanější radiofarmakum ^{18}F fluorodeoxyglukosa (FDG), jejíž metabolismus je do určitého kroku totožný s chováním glukózy, což ho činí univerzálním radiofarmakem pro různá diagnostická vyšetření. Daní za jeho všestrannost je však nespecifita vyšetření. Radiofarmaka spadající do immunoPET využívají značené protilátky nebo peptidy, které zajistí specifickou kumulaci farmaka.

Jedním z potenciálních radiofarmak pro immunoPET je cetuximab značený ^{89}Zr . Cetuximab je monoklonální protilátka, která je cílena na receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) a v následujícím textu pro něj bude používána zkratka CTX. Ke značení protilátek pomocí izotopů kovů jsou využívány bifunkční chelátory. V případě značení protilátek pomocí ^{89}Zr jsou diskutovány především deriváty

desferrioxaminu B (DFO). Jedním z nich je desferrioxamin squaramid ester, který bude v následujícím textu označován jako DFOSq.

Tato diplomová práce navazuje na mnou bakalářskou práci, jejíž téma bylo Značení protilátky cetuximab pomocí ^{89}Zr [4]. V bakalářské práci jsem připravila konjugát cetuximabu s DFOSq (dále DFOSq-CTX), který jsem označila pomocí ^{89}Zr . Tento značený konjugát bude označován jako ^{89}Zr -DFOSq-CTX.

Teoretická část této diplomové práce je věnována možnostem testování ^{89}Zr -DFOSq-CTX jako potenciálního radiofarmaka, které je cíleno na EGFR. První kapitola je věnována PET v onkologii, která si kladla za cíl zasadit tuto práci do kontextu. Jednotlivými součástmi potenciálního radiofarmaka ^{89}Zr -DFOSq-CTX a procesem značení se zabývá druhá kapitola. Tématem třetí kapitoly teoretické části této práce jsou možnosti ověření stability a biologické aktivity tohoto značeného konjugátu. Poslední kapitola představuje možnosti testování *in vitro*.

Tato diplomová práce si v experimentální části kladla za cíl ověření stability a biologické aktivity konjugátu DFOSq-CTX a značeného konjugátu ^{89}Zr -DFOSq-CTX. Pro stanovení biologické aktivity konjugátů a značených konjugátů byla použita imunologická metoda ELISA, jejíž optimalizace je také součástí experimentální části práce. Dalším cílem experimentální části bylo testování ^{89}Zr -DFOSq-CTX *in vitro*.

Seznam zkratek

ADCC Cytotoxická reakce závislá na protilátkách

ALP Alkalická fosfatáza

BCA Bicinchoninová metoda

BSA Hovězí sérový albumin

CT Výpočetní tomografie

CTX Cetuximab

DFO Desferrioxamin B

DFOSq Desferrioxamin B squaramid ester

EGF Epidermální růstový faktor

EGFR Receptor epidermálního růstového faktoru

ELISA z ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; imunologická analytická metoda

FDG [¹⁸F]fluordeoxyglukosa

Fab Fragment antigen-binding (fragment protilátky zajišťující vazbu na antigen)

Fc Fragment crystallizable region (fragment protilátky interagující s Fc receptory)

Fv Fragment variable region (fragment protilátky s variabilním úsekem)

HER Humánní epidermální receptor

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HRP Křenová peroxidáza

IgG Imunoglobulin třídy G

MR Magnetická rezonance

NFDM Odtučněné sušené mléko

OPD *o*-fenylendiamin dihydrochlorid

PBS Fosfátový pufr

PET Pozitronová emisní tomografie

pNPP p-nitrofenylfosfát

SDS-PAGE Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

SPECT Jednofotonová emisní výpočetní tomografie

TGF Transformující růstový faktor

TLC Chromatografie na tenké vrstvě

TMB 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin

VEGF Vaskulární endotelový růstový faktor

1. Teoretická část

1.1 PET v onkologii

Pozitronová emisní tomografie (PET) je zobrazovací metoda, která spočívá v lokalizaci pozitronového zářiče v těle pacienta. Podobnou metodou je jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT), která využívá radionuklidů s přeměnou gama. Obě tyto metody mohou poskytovat informace o metabolismu podané látky. Pro komplexní vyšetření, které zobrazuje i anatomickou strukturu, jsou využívány hybridní metody PET/CT, resp. SPECT/CT. Výpočetní tomografie (CT) je založena na rozdílném pohlcování rentgenova záření jednotlivými tkáněmi. Metody nukleární medicíny bývají také kombinovány s magnetickou rezonancí (MR).

Pro vyšetření pomocí PET je pacientovi podáno radiofarmakum, což je léčivý přípravek, který obsahuje jeden nebo více radionuklidů včleněných pro lékařské účely [5]. V případě PET se jedná o radionuklid s přeměnou β^+ , v jehož jádře dochází k přeměně protonu na neutron, pozitron a neutrino. Emitovaný pozitron se v prostředí zpomalí a anihiluje s elektronem z prostředí za vzniku dvou fotonů o energii 511 keV, jejichž směry pohybu jsou opačné. Pro detekci těchto fotonů jsou používány scintilační detektory z materiálů s vysokou hustotou. Tyto i další parametry splňuje například stále používaný materiál označovaný jako BGO (podvojný oxid bismutu a germania) [6].

Vzdálenost, kterou emitovaný pozitron urazí, je závislá na jeho energii. Použití radionuklidových zářičů s nižší energií pozitronu tak vede k vyššímu rozlišení snímku. Toto je jeden z parametrů výběru radionuklidu pro PET. Dále je třeba posoudit všechny linky přeměny radionuklidu a vlastnosti produktů těchto přeměn. Velice důležitým faktorem je poločas přeměny, který je volen na základě farmakokinetických vlastností značené látky. Neméně podstatným aspektem jsou chemické vlastnosti radionuklidu a možnosti jeho výroby.

Radionuklidy pro nukleární medicínu je možné vyrobit několika způsoby. Jedná se o jaderné reakce iniciované neutrony, jaderné reakce iniciované nabitými částicemi a využití přeměny radionuklidu vázaného v matici radionuklidového generátoru. Pozitronové zářiče, tedy neutron-deficitní radionuklidy, je nejvhodnější připravit ozářováním terčového materiálu pomocí urychlovače nabitých částic, nejčastěji cyklotronu. Cyklotron je kruhový urychlovač, ve kterém jsou nabitě částice urychlovány elektrickým polem a jejich trajektorie je ohýbána polem magnetickým. Urychlená částice se tak pohybuje ve spirále. Svazek protonů vystupuje z cyklotronu a do-

cháží k jaderným reakcím s terčovým materiálem. Pomocí cyklotronu je získáván i nejpoužívanější radionuklid pro PET ^{18}F a také ^{89}Zr .

V současnosti je nejčastěji používaným radiofarmakem pro PET [^{18}F]fluorodeoxyglukosa (FDG), která umožňuje v těle pacienta sledovat metabolismus glukózy. Glykolýza probíhá ve vyšší míře v nádorových buňkách, a tedy pomocí tohoto vyšetření lze ložisko lokalizovat. Na pořízeném snímku jsou však pozorovatelné i další nenádorové procesy, například probíhající zánět. Také je viditelná akumulace v metabolicky aktivních tkáních jako mozek nebo srdce. Vyšetření pomocí FDG tedy není selektivní. Pro více specifická vyšetření byly vyvinuty nové typy radiofarmak.

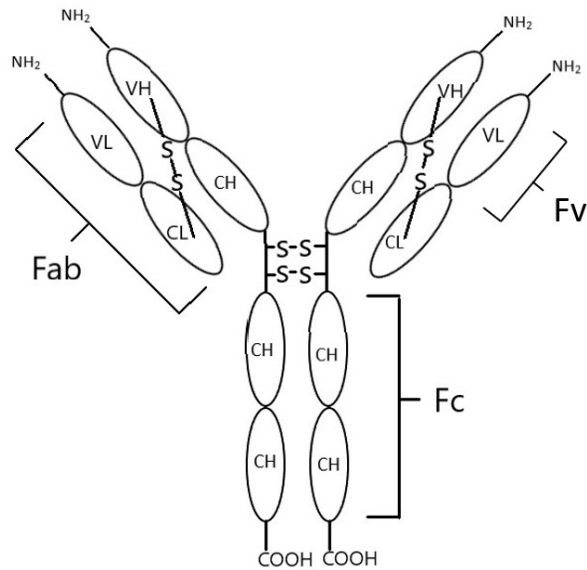
1.1.1 ImmunoPET

V metodě immunoPET jsou využívány látky s vysokou specifitou a afinitou ke konkrétním biomolekulám v organismu. Je třeba, aby se jednalo o látku co nejvíce inertní, stabilní a s vhodnými farmakokinetickými vlastnostmi. K cílení jsou využívány makromolekuly na bázi aminokyselin jako protilátky, jejich modifikace nebo malé proteiny označované jako affibody.

Zobrazování je vhodné provést ve chvíli, kdy je radiofarmakum distribuováno v místě působení a zároveň eliminováno ze zbytku těla. Poločasy radionuklidu jsou tak voleny v řádů dní v případě protilátek, u menších molekul může být použit radionuklid s kratším poločasem. Dále je třeba, aby radionuklid splňoval chemické předpoklady pro značení. V literatuře je nejčastěji zmiňováno použití ^{89}Zr (78,4 h), ^{64}Cu (12,7 h), ^{68}Ga (1,1 h), ^{124}I (4,18 d) a dalších. [7, 8].

Protilátky

Protilátky jsou imunoglobuliny, které se podílejí na imunitní odpovědi organismu a jsou produkovány B lymfocyty. Jsou tvořeny čtyřmi polypeptidovými řetězci - dvěma lehkými (L) a dvěma těžkými (H). Podle typu těžkého řetězce jsou rozlišovány třídy imunoglobulinů - IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Lehké a těžké řetězce jsou propojeny disulfidickými můstky tak, že na jednom konci se nachází skupiny $-\text{NH}_2$ (N konec) a na druhém $-\text{COOH}$ (C konec). Na N konci lehkých i těžkých řetězců se nachází variabilní oblast (Fv), kde dochází k vazbě na antigen. Antigenem se rozumí látka, na kterou imunitní systém reaguje, přičemž samotné reakce se účastní pouze jeho část - epitop. Strukturu protilátky lze také rozdělit na fragmenty Fc a Fab. Fab fragment odpovídá za vazbu antigenu a Fc fragment zprostředkovává další reakce imunitního systému [9]. Struktura imunoglobulinu je ilustrována na Obr. 1.1.



Obr. 1.1: Struktura imunoglobulinu (VL = variabilní doména lehkého řetězce, VH = variabilní doména těžkého řetězce, CL = konstantní doména lehkého řetězce, CH = konstantní doména těžkého řetězce), podle [9].

V organismu je odpověď na antigen polyklonální, což znamená, že se produkované protilátky liší ve struktuře variabilní oblasti. Protilátky produkované jedním klonem B lymfocytů mají stejnou variabilní oblast a jsou označovány jako monoklonální. Monoklonální protilátky cílené na konkrétní antigeny je možné uměle připravit a následně využít v různých odvětvích medicíny, např. v onkologii nebo při léčbě autoimunitních onemocnění [10].

K produkci monoklonálních protilátek je využíváno spojení myelomové buňky a zvířecího lymfocytu imunizovaného daným antigenem. Jelikož protilátky pouze zvířecího původu nejsou lidským organismem dobře přijímány, jsou v praxi používány především protilátky chimérické a humanizované. V genetickém kódu pro produkci těchto protilátek je část zvířecí informace nahrazena lidskou. Chimérické protilátky obsahují pouze variabilní část zvířecího původu. V případě humanizovaných protilátek je zvířecího původu pouze ta část protilátky, kde dochází k reakci s epitopy [10].

V imunitním systému mohou protilátky neutralizovat toxiny nebo podnítit další reakce imunitního systému. Mohou iniciovat cytotoxickou reakci, která může probíhat kaskádovou aktivací komplementu nebo s pomocí dalších buněk imunitního systému, které rozpoznají Fc fragment protilátky. Fc fragment také slouží jako poznávací znamení pro buňky imunitního systému, které jsou schopné fagocytózy.

Cílení a radiofarmaka

Pokrok v pochopení mechanismu vzniku a průběhu nádorového onemocnění na molekulární úrovni umožňuje vývoj nových zobrazovacích metod. Vznik nádorových buněk je vícestupňový proces mutací a selekcí, který vede k abnormální proliferaci a klonalitě. Pro většinu nádorových buněk je typická migrace v těle a následný vznik metastáz. Na rozvoji onemocnění se podílejí různé mechanismy a molekuly, často rozdílné od zdravých buněk. Molekuly, jejichž přítomnost a koncentrace jsou sledovány, jsou označovány jako markery a podle oblasti výskytu bývají rozdělovány na tkáňové a sérové. Analýza markerů může přinést bližší informace o povaze nádoru a pomoci předpovědět pravděpodobný vývoj (prognostické markery). Prediktivní markery mohou pomoci zhodnotit účinnost konkrétní léčby. Při diagnostice nádorového onemocnění bývá kromě lokalizace nádorových ložisek stanovení markerů nezbytné. Pro rozbor tkáňových markerů je možné tkáň odebrat a podrobit ji histologickému vyšetření. Nevýhodou biopsie je invazivita této metody a nepřesnosti plynoucí z heterogenity nádoru. Nepraktická je i v případě potřeby opakovaného stanovení. Neinvazivní alternativou je vyšetření pomocí immunoPET, které lze zároveň využít pro detekci metastáz specifičtěji než s využitím FDG. Pro predikci úspěšnosti léčby mohou být využívány také rakovinné buněčné linie nebo xenografy [7, 11, 12, 13].

Pravděpodobně nejvíce zkoumaným cílem pro immunoPET jsou tyrosinkinázové receptory exprimované na povrchu buněk, především rodina ErbB. Zvýšená exprese těchto proteinů se vyskytuje u mnoha typů nádorů a její znalost má prediktivní i prognostickou hodnotu. Mezi další zkoumané tyrosinkinázové receptory patří např. receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR), který hraje klíčovou roli při angiogenezi a vaskulogenezi. Protilátky cílené proti těmto receptorům jsou v literatuře zmiňovány především v souvislosti s radionuklidy ^{89}Zr a ^{64}Cu . [7, 8, 14]

Kromě tyrosinkinázových receptorů byly zkoumány i jiné možnosti cílení, např. na prostatický specifický membránový antigen (PSMA). Jeho nadměrná exprese se objevuje u většiny nádorů prostaty a přispívá k rychlejší proliferaci nádorových buněk. Jedním z nejpoužívanějších radiofarmak pro zobrazování tohoto markeru je ^{68}Ga PSMA-11. Jedná se o nízkomolekulární inhibitor PSMA na bázi močoviny [15]. Dalším příkladem může být antigen A33, glykoprotein zodpovědný za adhezi buněk a jehož exprese se objevuje u 95 % kolorektálních karcinomů. Je na něj cílena značená protilátka ^{124}I -huA33 [8].

Strategie značení protilátek je volena na základě chemických vlastností použitého radionuklidu. U kovových prvků bývají ke zprostředkování vazby využívány bifunkční chelátory, které s kovem tvoří koordinačně-kovalentní vazbu. Vazba chelátoru na protilátku bývá nejčastěji přes lysinová nebo cysteinová rezidua. Může se jednat o nespecifické reakce nebo reakce specifické, které mají za cíl eliminovat vazbu chelátoru na místa odpovědná za vazbu na antigen. Ke značení byly vyvinuty různé chelátory i metody, které vyžadují předchozí modifikace protilátky. V případě halogenů mohou být protilátky značeny přímo, především s využitím elektrofilní substituce [7, 16].

1.2 ^{89}Zr -cetuximab

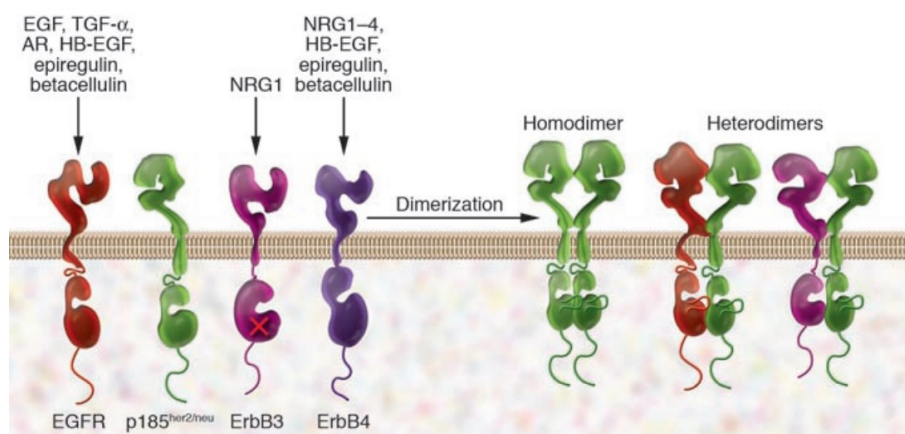
Radiofarmakum pro immunoPET obsahuje radionuklid s vhodnými jadernými, zobrazovacími a chemickými vlastnostmi a biologicky aktivní látku, která zajišťuje vazbu na cílovou strukturu, typicky protilátku. Tato kapitola se bude zabývat jednotlivými složkami potenciálního radiofarmaka ^{89}Zr -cetuximab a možnostmi značení.

1.2.1 Cetuximab

Cetuximab je monoklonální protilátka typu IgG cílená na receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR). Jedná se o chimérickou protilátku, jejíž Fv fragment je myšího původu [10].

EGFR

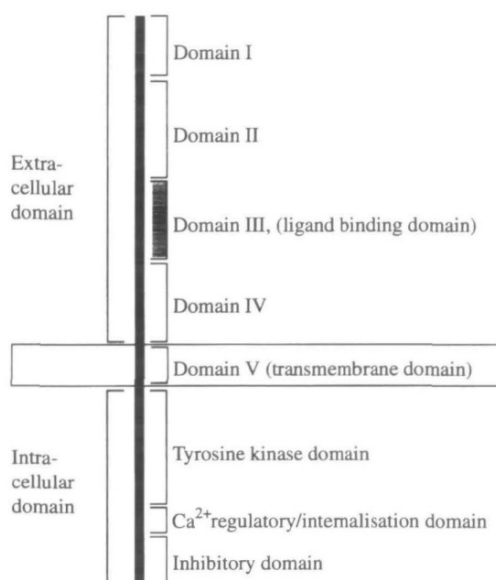
EGFR (označován také jako HER1) je tyrosinkinázový receptor z rodiny ErbB. Mezi receptory rodiny ErbB se řadí čtyři transmembránové glykoproteiny označované HER1-4, které se podílejí na proliferaci a diferenciaci buněk. Vazba ligandu na jejich extracelulární doménu vede k tvorbě homo- či heterodimerů s dalším receptorem z rodiny ErbB. Tvorba dimerů iniciuje fosforylaci na intracelulární doméně a aktivaci jedné ze signálních drah, jejíž výběr je podmíněn typem navázaného ligandu a složením vzniklých dimerů. U HER2 není znám žádný ligand a je preferovaným partnerem pro heterodimerizaci ostatních receptorů. Receptor HER3 nemá kinázovou aktivitu. Receptory rodiny ErbB a jejich vlastnosti jsou ilustrovány na Obr. 1.2. U zdravých buněk bývá exprese receptorů rodiny ErbB regulována. Se zvýšenou expresí těchto receptorů se setkáváme u buněk některých typů solidních nádorů. Hrají roli v jejich růstu a stávají se tak vhodnými cíli pro cílenou terapii [7, 14].



Obr. 1.2: Receptory rodiny ErbB: EGFR (HER1), p185^{her2/neu} (HER2), ErbB3 (HER3) a ErbB4 (HER4), jejich nejdůležitější ligandy (u HER2 nejsou známy) a některé z možností dimerizace. HER3 nemá kinázovou aktivitu [14].

Receptor epidermálního růstového faktoru se skládá ze intracelulární domény, transmembránové domény a extracelulární domény tvořené ze čtyř domén (Obr. 1.3). Po syntéze proteinové složky je receptor N-glykosylován v Golgiho aparátu. Elektroforeticky zjištěná molekulární hmotnost receptoru je 170 kDa [17].

EGFR se nachází na povrchu většiny buněk v lidském organismu. Sorkin, 2010 [17] uvádí, že na jedné savčí buňce bývá exprimováno přibližně 5000 (epiteliální buňky a fibroblasty) až 200000 (hepatocyty) těchto receptorů. U nádorových buněk udává počet $2 - 3 \cdot 10^6$ receptorů na buňku. EGFR hraje roli při proliferaci, diferenciaci a migraci buněk, ovlivňuje působení inhibitorů apoptózy a může tak přispívat k nekontrolovanému dělení nádorových buněk. Při embryogenezi hraje roli při vývoji pokožky a dozrávání vlasových folikulů. V dospívání se s ostatními ErbB receptory podílí na tvorbě mléčných žláz. Vysoká aktivita EGFR byla detekována ve většině částí centrální mozkové soustavy. U myši s absencí exprese EGFR byla pozorována úmrtnost v důsledku abnormalit v oblasti mozku, pokožky, plicích a gastrointestinálním traktu [18].



Obr. 1.3: Struktura EGFR, k vazbě ligandu dochází na doméně III[19].

Bylo popsáno sedm ligandů EGFR, přičemž největší pozornost byla věnována epidermálnímu růstovému faktoru (EGF) a transformujícímu růstovému faktoru alpha ($TGF-\alpha$). Vazba ligandu vede k internalizaci vzniklého komplexu endocytózou, a následně je buďto degradován v lysozomech nebo recyklován a navrácen do buněčné membrány. Tyto procesy se podílejí na regulaci množství EGFR na povrchu buněk. K vazbě ligandu dochází na třetí extracelulární doméně receptoru [18, 19].

Zvýšená exprese EGFR na nádorových buňkách může být doprovázena abnormální signalizací tohoto receptoru. Byly pozorovány mutace v genetické informaci pro syntézu ektodomény a kinázové domény EGFR a u proteinů signální kaskády. Mutace mohou mít za následek např. vyšší kinázovou aktivitu, aktivaci receptoru bez ohledu

na ligand nebo mohou ovlivnit regulaci exprese. Zvýšená exprese EGFR byla pozorována např. u kolorektálního karcinomu, nádorů plic a nádorů hlavy a krku. U nemalobuněčného karcinomu plic se zvýšená exprese vyskytuje u 40-80% onemocnění a typicky se zde vyskytuje mutace kinázové domény. V polovině případů kolorektálního karcinomu je pozorována amplifikace genu pro EGFR, která má za následek 3-5x zvýšený počet exprimovaných receptorů. Je uváděno, že 60-80% těchto nádorů vykazuje zvýšenou expresi EGFR. Zvýšená exprese byla zjištěna i u rakoviny prostaty. Zvýšená exprese EGFR je spojována s horší prognózou onemocnění, s jeho větší agresivitou a zvýšenou tendencí tvořit metastázy. Příkladem mutace proteinů signální kaskád je mutace genů RAS, která má za následek aktivaci signální dráhy bez ohledu na EGFR [14, 18, 20].

Cetuximab v onkologické terapii

Při léčbě cílené na EGFR jsou využívány monoklonální protilátky a tyrosinkinázové inhibitory. Monoklonální protilátky jsou cílené na extracelulární domény EGFR, tyrosinkinázové inhibitory se vážou na jeho intracelulární domény. Anti-EGFR terapie bývá využívána samostatně nebo v kombinaci s cytotoxickou chemoterapií nebo ozařováním [21].

Léčba cetuximabem je indikována v případě metastazujícího kolorektálního karcinomu, který vykazuje zvýšenou expresi EGFR a zároveň se zde nevyskytují mutace KRAS a NRAS. Používá se v kombinaci s irinotekanem nebo jako monoterapie v případě, že léčba irinotekanem a oxaliplatinou selhala. Dále je schválen pro léčbu spinocelulárního karcinomu hlavy, opět v kombinaci s chemoterapeutiky na bázi platiny nebo s radiační terapií. Pro cetuximab je používán obchodní název Erbitux [22].

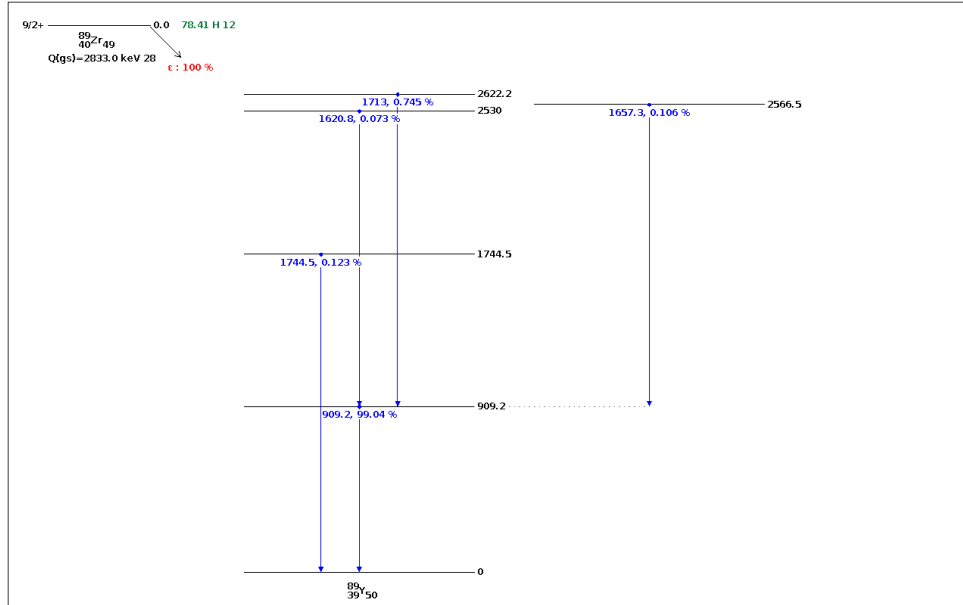
Cetuximab se váže na třetí doménu EGFR a působí jako kompetitivní inhibitor přirozených ligandů. Oproti EGF má cetuximab dvakrát větší afinitu k EGFR. Zamezením vazby přirozeného ligandu nedochází dimerizaci a ve svém důsledku ani k přenosu signálu. Dále iniciuje internalizaci a následnou degradaci receptoru, čímž přispívá ke snížení míry jeho exprese. Také bylo zjištěno, že vazba cetuximabu na receptor vyvolává ADCC a v menší míře i cytotoxicitu závislou na komplementu. Bylo také zjištěno, že cetuximab ovlivňuje míru exprese dalších receptorů, např. VEGF [21, 23, 24].

Cetuximab je podáván prostřednictvím infuze, počáteční dávkování tohoto léčiva je stanoveno na 400 mg/m². V tomto případě je biologický poločas protilátky 75,1 h [22, 25].

1.2.2 Zirkonium-89

Jedním z radionuklidů vhodných pro značení protilátek pro immunoPET je ⁸⁹Zr. Jedná se o neutron-deficitní izotop zirkonia s poločasem rozpadu 78,41 hodin, což koresponduje s jejich biologickým poločasem. Pravděpodobnost přeměny ⁸⁹Zr emisí částice β^+ je 22,74 %, zbylá procenta představuje elektronový záchyt. Střední energie

emitovaného pozitronu je relativně nízká a to 395,5 keV. Během přeměny jsou emitovány anihilační fotony o energii 511 keV, rentgenovo záření doprovázející elektronový záchyt a linky záření gamma, které odpovídají přechodům mezi energetickými stavy dceřiného ^{89}Y během přeměny na jeho základní stav [26]. Schéma transmutace ^{89}Zr je zobrazeno na Obr. 1.4.



Obr. 1.4: Schéma přeměny ^{89}Zr ; černě znázorněny energetické hladiny ^{89}Y (hodnoty v keV), modře linky přeměny včetně informace o energii (v keV) a intenzity [26].

Příprava a separace

K přípravě ^{89}Zr jsou využívány jaderné reakce iniciované protony nebo deuterony urychlené v cyklotronu. Terčovým materiálem je ^{89}Y , které je jediným stabilním izotopem tohoto prvku. Terč může být zhotoven v kovové formě a to jako kovová mince [27] nebo je vrstva ^{89}Y nanášena na minci z jiného kovu, např. mědi [28] nebo niobu [29]. Literatura také zmiňuje použití Y_2O_3 jako terčového materiálu [30, 31] nebo ozařování roztoku $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ [32].

Používanějším způsobem přípravy ^{89}Zr je ostřelování urychlenými protony, kde dochází k reakci $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$, jejíž excitační funkce dosahuje maxima okolo 13 MeV [33]. Výstupním kanálem $^{89}\text{Y}(p,2n)^{88}\text{Zr}$ vzniká další izotop zirkonia, práh této reakce je 13 MeV. Tato reakce je obzvláště nežádoucí, jelikož vzniká chemicky neodseparovatelná nečistota s dlouhým poločasem (83,4 dní, [26]). Probíhá také reakce $^{89}\text{Y}(p,pn)^{88}\text{Y}$ s prahem 12 MeV. Omara, 2009 [31] určil interval energií 9-14 MeV jako optimální pro přípravu ^{89}Zr . Tang, 2019 [28] ve své práci použil svazek protonů urychlený na energii 13 MeV, Holland, 2009 [27] pracoval s protony o energii 15 MeV.

Vodná chemie zirkonia je poměrně rozmanitá a její znalost je nápomocná při separaci od yttriového terče a při značení pomocí ^{89}Zr pro PET. Zirkonium se v roztoku nachází nejčastěji jako Zr^{4+} . Jedná se o kationt tvořící komplexy s vysokými koordinačními čísly. S fluoridovými anionty tvoří velmi stabilní aniontový komplex.

Kyselina fluorovodíková však není často používána pro rozpuštění terče, jelikož její přítomnost není vhodná pro další separační kroky [34]. Pro rozpuštění yttriového terče bývá podle typu separace volena HCl o různé koncentraci [16, 27, 30], případně H₂SO₄ [35].

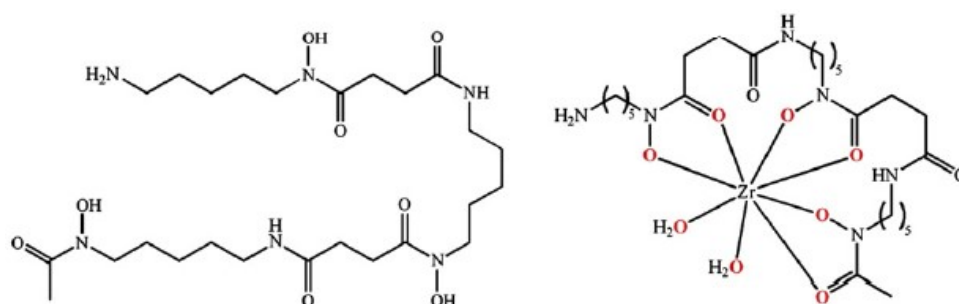
Zirkonium ve formě Zr⁴⁺ utváří stabilní komplexy především s kyslíkovými donory, například s vinany a citráty, které jsou stabilní i v zásaditém prostředí. Méně stabilní komplexy tvoří se šfavelany, které se v zásaditém prostředí rozkládají a zirkonium podléhá hydrolýze. Na silné vazbě s kyslíkovými donory je založena afinitní chromatografie pro separaci ⁸⁹Zr využívající hydroxamátové skupiny. Tuto kolonu lze připravit několika krokovou modifikací kationtově-výměnného sorbentu [27, 36] nebo zakoupit již hotovou. Po nanesení terče rozpuštěného v HCl je kolona promyta touto kyselinou a dochází k eluci Y³⁺ a některých případných nečistot. Zirkonium-89 je eluováno pomocí kyseliny šfavelové [34].

Byly také popsány metody založené na kapalinové extrakci [30, 35], kationtových měničích [28, 30, 37] a aniontových měničích [30].

1.2.3 Značení cetuximabu pomocí ⁸⁹Zr

Většina stanovení EGFR v nádorových tkáních bývá provedena pomocí biopsie [13]. Pro neinvazivní stanovení tohoto markeru je možné využít cetuximab značený ⁸⁹Zr. Pro značení jsou využívány aminové a thiolové skupiny protilátky [16]. Analýzou krystalické struktury Fab fragmentu cetuximabu bylo zjištěno, že obsahuje 23 lysinových skupin v lehkém a těžkém řetězci, pouze jedna se nachází ve vazebném místě protilátky [38].

Pro značení cetuximabu (i obecně protilátek) pomocí ⁸⁹Zr bývá nejčastěji jako chelátor využíván desferrioxamin B (DFO). Jedná se o bakteriální siderofor a mimo jiné je podáván jako léčivo při akutní otravě železem (pod názvem Desferal). DFO obsahuje tři hydroxamátové skupiny a se zirkoniem vytváří šest koordinačně-kovalentních vazeb (Obr. 1.5) [16, 39]. Jelikož bylo pozorováno, že vzniklý značený konjugát není dostatečně stabilní a dochází k uvolňování ⁸⁹Zr, byly syntetizovány nové deriváty DFO.

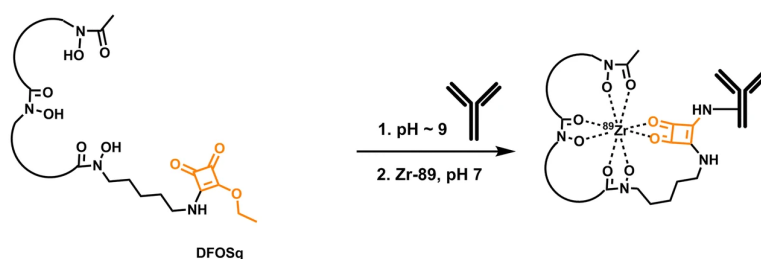


Obr. 1.5: Struktura desferrioxaminu B a schéma koordinační vazby na zirkonium [16].

Zirkonium se akumuluje především v kostní tkáni [40]. Nespecifická vazba kovů může snížit přesnost diagnostiky především kostních metastáz a zároveň se zvyšuje radiční zátěž pacienta. Reakcí primární aminové skupiny lze na DFO navázat nové funkční skupiny pro lepší chelataci ^{89}Zr a/nebo silnější vazbu na protilátku. Jedná se například o chelátor označovaný jako DFO* se čtyřmi hydroxamátovými skupinami [41]. Chelátory DFO i DFO* je možné připravit s dalšími funkčními skupinami jako p-isothiokyanatobenzyl-DFO/DFO* (DFO/DFO*-NCS) nebo DFO/DFO* squaramid ester (DFOSq/DFO*Sq) [42, 43, 44].

Rudd, 2016 [44] připravil DFO squaramid ester (DFOSq, Obr.1.6). Jedná se o osmi-vazný chelátor, avšak Noor, 2015 [45] určil, že s ^{89}Zr vytváří sedmivazný komplex. S aminovými skupinami protilátky vytváří amidovou vazbu. Nový chelátor připravil reakcí ekvimolárního množství DFO mesylátu a N,N-diisopropylethylaminu v ethanolu při 50 °C. Po jedné hodině přidal 3,4-diethoxy-3-cyclobutene-1,2-dion v ethanolu a za stálého míchání udržoval při 50 °C dalších 30 minut. Za sníženého tlaku oddestiloval rozpouštědlo, produkt promyl ethanolem a následně vysušil. Identifikaci produktu provedl pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (ESI MS). V případě ESI MS stanovoval fragmenty s molekulovou hmotností 685,3768 a 707,3589 [46].

Připravený chelátor využil při značení protilátky trastuzumab. Nejprve konjugoval protilátku s chelátorem. Rozpustil DFOSq v 10% DMSO/H₂O a v 20molárním nadbytku smíchal s roztokem protilátky. Konjugace probíhala v borátovém pufru (pH=9) za laboratorní teploty přes noc. Následně převedl konjugát do prostředí 0,9% NaCl. Pomocí hmotnostní spektrometrie stanovil, že na jednu protilátku je průměrně navázáno 4,5 molekuly chelátoru. Pro značení je ^{89}Zr rozpuštěno v 1M kyselině šťavelové (75 μl , 56 MBq), do tohoto roztoku byl přidáván 2M uhličitán sodný do dosažení slabě zásaditého pH (25 μl). Následně byl přidán 0,5M HEPES (pH=7, 100 μl) a po pěti minutách bylo potvrzeno neutrální pH. Byl přidán roztok trastuzumabu (4 μl , 225 μg protilátky). Reakce byla ukončena po 25 minutách a výtěžek dosahoval až k 100% [44].



Obr. 1.6: Struktura DFOSq a ilustrace značení protilátky pomocí ^{89}Zr [42].

1.3 Stabilita a biologická aktivita ^{89}Zr -DFOSq-CTX

Prvním krokem po přípravě nového potenciálního radiofarmaka je určení jeho radiochemické čistoty. Velmi často je využívána chromatografie na tenké vrstvě (TLC). V případě protilátek nebo peptidů značených ^{89}Zr může být použita jako mobilní fáze kyselina citronová o koncentraci 20 mM [36], 0,1 M [47] nebo 0,2 M [49]. Je možné také použít 50 mM EDTA [42] nebo 50 mM DTPA [50].

Pro určení radiochemické čistoty může být také použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) v kombinaci s radiometrickým a UV/VIS detektorem. Principem separace bývá rozměrově-vylučovací chromatografie. Tato metoda také může sloužit ke stanovení stability celého konjugátu. Je vhodné zjišťovat stabilitu po dobu, kterou je potenciální radiofarmakum přítomno v organismu. Verel, 2003 [36] zvolil gradientovou eluci, použitými mobilními fázemi byl 10 mM fosforečnan sodný (pH=6) a acetonitril. Pro detekci bílkovinných součástí značeného konjugátu měřil absorbanci při vlnové délce 280 nm. Damerow, 2022 [47] použil 0.05 M fosfátový pufr (pH=7) s 0,15M NaCl a 0,01M NaN_3 .

Další možností stanovení stability je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Jedná se o elektromigrační metodu, při které jsou vzorky smíseny s puforem obsahujícím dodecylsírany sodným. Tato látka se naváže na proteiny a vytvoří úměrnost velikosti záporného náboje a velikosti proteinu. Tuto metodu využili při své práci Verel, 2003 [36] a Garousi, 2016 [49].

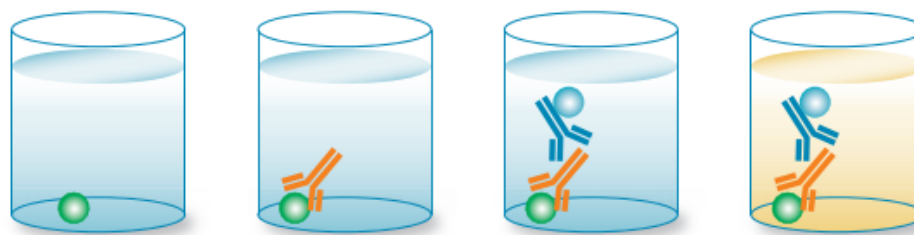
Dále je třeba stanovit biologickou aktivitu značeného protilátky. Je k tomu možné využít metodu ELISA.

1.3.1 ELISA

Biologickou aktivitu značené protilátky je možné stanovit pomocí metody ELISA (z anglického enzyme-linked immunosorbent assay). Tato metoda patří mezi imunologické analytické metody, tedy je založena na specifických reakcích protilátek s antigenem. Reakce probíhají na mikrotitrační destičce, kde dochází k ireverzibilní sorpci reaktantů. Podle uspořádání a stanovované makromolekuly (antigen/protilátka) je rozlišováno několik způsobů provedení metody ELISA - přímá, nepřímá a sendvičová. Pro stanovení biologické aktivity protilátky je volena nepřímá ELISA.

Prvním krokem nepřímé ELISA je nanesení antigenu na mikrotitrační destičku, ve stejném množství a koncentraci do každé z jamek. Po uplynutí reakční doby je destička promyta a nanesen blokovací roztok. Ten zajišťuje vysycení antigenem neobsazených míst na povrchu jamky a zamezuje tak vzniku nespecifických vazeb. Po promytí je pipetována primární protilátka, která se specificky naváže na přítomný antigen. Primární protilátkou může být značený konjugát a vzorky o známé koncentraci protilátky pro tvorbu kalibrační křivky. Jako blank je použit roztok, ve kterém je protilátka rozpuštěna. Po inkubaci a promytí je pipetována sekundární protilátka. Jedná se o protilátku konjugovanou s enzymem, která cílí na primární protilátku. Následně je přidán roztok tzv. chromogenního substrátu. Enzym katalyzuje reakci substrátu, při které vznikají produkty absorbující určité vlnové délky

elektromagnetického záření nebo schopné luminiscence. Produkty této enzymem katalyzované reakce je možné detekovat pomocí spektrofotometru UV/VIS. Schéma reakce je ilustrováno na Obr. 1.7.



Obr. 1.7: Schéma nepřímé ELISA; zeleně zobrazen antigen, oranžově primární protilátka, modře sekundární protilátka konjugovaná s enzymem. Oranžový roztok symbolizuje katalytickou reakci substrátu vedoucí ke změně zbarvení roztoku [51].

Enzymem konjugovaným se sekundární protilátkou je nejčastěji křenová peroxidáza (HRP) nebo alkalická fosfatáza (ALP). Peroxidáza je enzym, který oxiduje různé substráty pomocí peroxidu vodíku. Substrátem může v tomto případě být OPD (*o*-fenyldiamin dihydrochlorid) nebo TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin). Při reakci křenové fosfatázy s OPD za přítomnosti peroxidu vodíku je generováno žlutooranžové zbarvení, jehož intenzita je měřitelná při vlnové délce 450 nm [52]. V případě, že je reakce ukončena pomocí kyseliny sírové, je měřena absorbance při 490 nm. Substrát TMB je křenovou fosfatázou oxidován za vzniku modrého zbarvení, jehož absorbance je stanovována při vlnové délce 605 nm. Po ukončení reakce okyselením se zbarvení mění na žluté s absorbančním píkem při 450 nm [53]. Alkalická fosfatáza je enzym patřící do třídy hydroláz, jehož působením dochází ke štěpení monoesterů kyseliny fosforečné. Při použití substrátu pNPP (p-nitrofenylfosfát) je měřena absorbance při 405 nm [54].

ELISA - cetuximab

V literatuře je popisována nepřímá ELISA protilátky cetuximab [55, 56, 57, 58], která je schematicky zobrazena na Obr. 1.7.

Roztokem použitým k promývání destičky bývá většinou PBS (fosfátový pufr) s čínidlem, které zabraňuje nespecifickým reakcím. Promývací roztoky jsou shrnuty v Tab.1.1.

Tab. 1.1: Promývací roztoky.

zdroj	promývací roztok
Suárez, 2016 [55]	0,05% Tween/PBS
Cézé, 2009 [56]	0,05% Tween/PBS
Al-Shehri, 2018 [58]	0,5% Tween/PBS

Prvním krokem je nanesení antigenu EGFR do jamek mikrotitrační destičky. Srovnání tohoto kroku ve zmíněných studiích je shrnuto v Tab. 1.2. Hantash, 2009 [57] porovnal použití uhličitanového pufru a PBS (pH=7,4). Při použití PBS byla pozorována silnější odezva, přičemž nejlepší výsledky vykazovala imobilizace přes noc, avšak došlo pouze k mírnému zlepšení v porovnání s imobilizací trvajícím 1 hodinu.

Tab. 1.2: Koncentrace a objem roztoku EGFR naneseného na mikrotitrační destičku; rozpouštělo; podmínky reakce.

zdroj	c_{EGFR} [μ l/ml]	rozpouštědlo	V_{EGFR} [μ l]	T [$^{\circ}$ C]	t
Suárez, 2016 [55]	1	0,1M uhličitanový pufr	100	4	přes noc
Cézé, 2009 [56]	1,25	0,1M uhličitanový pufr	100	4	přes noc
Hantash, 2009* [57]	1,65	0,1M PBS	-	-	přes noc
Al-Shehri, 2018 [58]	0,5	50 mM uhličitanový pufr	50	37	2h

-neuveдено

* podmínky vedoucí k nejsilnější odezvě

Po inkubaci antigenu EGFR byly jamky saturovány blokovacím roztokem. Jako blokovací roztok jsou využívány roztoky proteinů jako BSA (hovězí sérový albumin) nebo NFDM (odstředěné odtučněné mléko) a také například Tween 20 [59]. Roztoky použité jako saturační jsou shrnuty v Tab. 1.3. Al-Shehri, 2018 [58] vyzkoušel různé koncentrace BSA/0,1M PBS, teploty a doby imobilizace. Optimálních výsledků dosáhl při použití 0,5% BSA/0,1M PBS a podmínkách imobilizace 37 $^{\circ}$ C a 30 minut.

Tab. 1.3: Blokovací roztoky a podmínky reakce.

zdroj	protein	rozpouštědlo	T [$^{\circ}$ C]	t
Suárez, 2016 [55]	2% NFDM	0,3% Tween/PBS	37	2 h
Cézé, 2009 [56]	1% BSA	PBS	lab.*	2 h
Hantash, 2009 [57]	Blocker Blotto + Blocker Casein (20:80 v/v)	TBS**	neuveдено	
Al-Shehri, 2018 [58]***	0,5% BSA	0,1M PBS	37	0,5 h

* laboratorní teplota

** fyziologický roztok pufovaný Tris

*** podmínky vedoucí k optimálním výsledkům

V dalším kroku byla nanášena primární protilátka - cetuximab. Suárez, 2016 [55] nanášel do každé jamky 100 μl roztoku protilátky ředěné v 0,1M uhličitanovém pufru a nechal inkubovat 45 minut při 37 °C. Cézé, 2009 [56] standardy cetuximabu o koncentracích 0,1-30 mg/ml ředil 1:100 v 1% BSA/PBS a do každé jamky nanášel 100 μl roztoku. Reakce probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Hantash, 2009 [57] použil k ředění krevní sérum. Následně všechny autoři jamky destičky promyli promývacím roztokem.

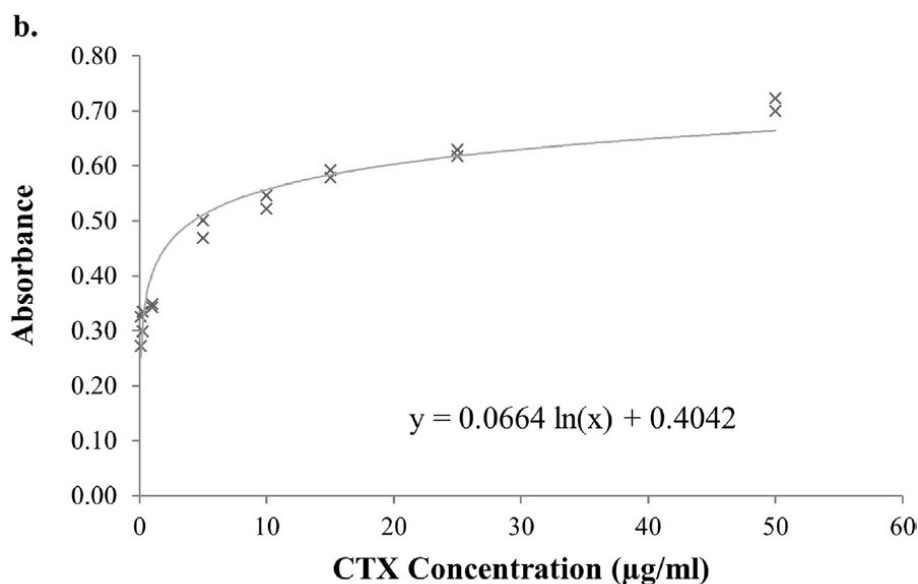
Následně byl napipetován roztok sekundární protilátky. Sekundární protilátka může být např. králičího [55], nebo kozího [56, 58] původu. Může se jednat o celou molekulu protilátky [55, 58] nebo např. $F(ab')_2$ (protilátku bez Fc fragmentu) [56]. Je možné použít protilátku cílenou proti lidské části protilátky [57] nebo použít protilátku proti myšímú fragmentu. Suárez, 2016 [55] porovnal obě tyto možnosti, přičemž ve svých experimentech dále pracoval s první zmíněnou, jelikož za stejných podmínek při jejím použití pozoroval vyšší absorbanci.

Suárez, 2016 [55] použil 100 μl roztoku sekundární protilátky o koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ředěno v uhličitanovém pufru), inkubace probíhala 30 minut při 37 °C. Al-Shehri, 2018 [58] použil koncentraci 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ředěno v 0,1M PBS), inkubace probíhala 1 hodinu při 37 °C. Následně všechny autoři jamky promyli promývacím roztokem a poté byl nanášen chromogenní substrát. Suárez, 2016 [55] a Cézé, 2009 [56] použili HRP jako enzym konjugovaný se sekundární protilátkou a následně OPD substrát. Reakci ukončili přidávkem kyseliny sírové (50 μl 1M [55], 50 μl 4M [56]). Hantash, 2009 [57] použil jako substrát TMB. Al-Shehri, 2018 [58] použil enzym TMB a jako substrát pNPP. Použité enzymy a substráty jsou shrnuty v Tab. 1.4.

Tab. 1.4: Enzymy a substráty použité v metodě ELISA.

zdroj	enzym	substrát
Suárez, 2016 [55]	HRP	OPD
Cézé, 2009 [56]	HRP	OPD
Hantash, 2009 [57]	HRP	TMB
Al-Shehri, 2018 [58]	ALP	pNPP

V absorbanci naměřené v závislosti na koncentraci cetuximabu lze pozorovat saturaci - Obr. 1.8 (Suárez, 2016 [55]). Hodnoty proložil logaritmickou křivkou ($A=f(\ln(c))$), přičemž jako rozmezí kvantifikace určil jako 0,01 - 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cézé, 2009 [56] jako spodní limit kvantifikace určil koncentraci 0,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a horní 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, přičemž vzorky 100x ředil. Hantash, 2009 [57] uvádí, že přesných a správných výsledků dosáhl v rozmezí koncentrací 0,3 - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Al-Shehri, 2018 [58] použil k vyhodnocení přímkou ($A=f(c)$) a to v rozmezí hodnot 5-6250 ng/ml, přičemž limit detekce stanovil jako 1,5 ng/ml.



Obr. 1.8: Kalibrační křivka - cetuximab [55].

1.4 Testování ^{89}Zr -DFOSq-CTX *in vitro*

Termínem *in vitro* jsou označovány experimenty, které probíhají v prostředí mimo živý organismus. Ke studiím jsou využívány mikroorganismy a buněčné kultury. Pro testování potenciálních radiofarmak *in vitro*, přípravu xenografů a další aplikace byly kultivovány buněčné linie, které pocházejí z nádorových ložisek pacientů. Tato kapitola se zabývá možnostmi testování radiofarmak cílených na EGFR, které mohou být využity při testování cetuximabu značeného ^{89}Zr *in vitro*.

Pro kultivaci buněk je třeba zajistit vhodné nutriční a fyzikálně-chemické podmínky. Buňky jsou pěstovány v kultivačních lahvích v kompletní kultivačním médiu. To se skládá ze samotného média, séra a může obsahovat antibiotika proti bakteriální kontaminaci. Médium obsahuje glukózu, anorganické soli, aminokyseliny a vitamíny. Sérum je přidáváno pro vysoký obsah růstových faktorů, jedná se např. o FBS (fetální hovězí sérum). Kultivační podmínky simulují prostředí *in vivo*, buňky jsou inkubovány při 37 °C a s obsahem vzdušného CO_2 5 %. Buněčné linie mohou být rozděleny na adherentní a suspenzní. Adherentní buňky při kultivaci potřebují povrch, ke kterému přilnou. Suspenzní buňky jsou rozptýlené v objemu média [48].

Buňky jsou získávány z tkání organismů, k čemuž jsou používány metody mechanické nebo enzymatické disagregace. Buňky izolované přímo z tkáně jsou označovány jako primární buněčná kultura. Po první subkultivaci (pasážování) se jedná o sekundární buněčnou kulturu. Pasážování je přenesení buněk do nové kultivační lahve s čerstvým kultivačním médiem. To je třeba uskutečnit v případě, že buňky dosahují vysoké konfluence a dochází tak k vyčerpání živin v kultivačním médiu, hromadění toxických metabolitů a kontaktní inhibici růstu. Buněčné linie jsou získávány cílenou selekcí z buněčných kultur. Mohou být schopnost prakticky nekonečného dělení [48].

1.4.1 Buněčné linie

Pro testování farmak, která jsou cílena proti EGFR, jsou využívány buněčné linie, které tento receptor exprimují. Tyto buňky se liší původem, mutacemi v genomu souvisejícími s funkcí EGFR a mírou jeho exprese. Často je volena buněčná linie A431 [38, 47, 49, 60], která pochází ze spinocelulárního karcinomu. Na povrchu jedné buňky se průměrně nachází $1,2 \cdot 10^6$ EGFR [61]. Jedná se o adherentní buňky.

Další používanou buněčnou linií je PC3, která byla odebrána z kostní metastázy karcinomu prostaty. Malmberg, 2011 [62] stanovila, že buňka z PC3 exprimuje $99\,000 \pm 3\,000$ EGFR/buňku. Shigeta, 2013 [63] zjišťoval citlivost na cetuximab u buněčných linií kolorektálního karcinomu. Vybral linii Caco-2, jelikož neobsahuje mutace KRAS, BRAF, PIK3CA ani mutace na ektodoméně. Pro negativní kontrolu použil linii HCT116, která obsahuje mutaci PIK3CA, která tyto buňky činí rezistentní na léčbu cetuximabem. Dalšími buněčnými liniemi používanými pro tyto účely jsou HT-29 [47], FaDu [50], DU-145 nebo LNCap [62].

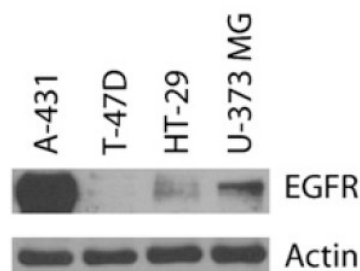
1.4.2 Stanovení míry exprese EGFR

Pro možnost zjištění korelace mezi mírou exprese EGFR a citlivostí na léčbu cetuximabem je třeba stanovit míru exprese EGFR v buněčných liniích. Shigeta, 2013 [63] inkuboval buňky s cetuximabem značeným biotinem, na který byla navázána protilátka konjugovaná s fluorescein isothiokyanátem (FITC). Míra exprese byla stanovena na základě intenzity fluorescence pomocí průtokové cytometrie. Malmberg, 2011 [62] zjišťovala aktivitu buněk pro inkubaci buněk s ^{111}In -cetuximabu a aktivitu buněk, jejichž receptory byly předtím satureovány pomocí neznačeného cetuximabu. Jelikož v případě saturace neznačeným cetuximabem byla pozorována výrazně nižší buňkami vázaná aktivita, došel k závěru, že je reakce specifická a buňky exprimují EGFR. Zhang, 2015 [61] využil k tomuto účelu zobrazování pomocí povrchové plazmonové rezonance (SPRi). Další možnost je využít metodu Western Blot nebo Dot Blot.

Western Blot

Western Blot je metoda, ve které jsou proteiny nejprve rozděleny na základě velikosti pomocí SDS-PAGE. Bendy jsou přebíjeny na membránu a následujícími kroky jsou blokování nespecifických interakcí, nanesení primární a příp. sekundární protilátky a nakonec vyhodnocení. Jedná se o obdobný postup jako při metodě ELISA. Obdobnou metodou je Dot Blot, která neobsahuje krok separace proteinů a roztok proteinu je nanesen přímo na membránu.

Míru exprese EGFR pomocí Western blotu stanovili např. Aerts, 2008 [64] a Benedetto, 2019 [50]. Oba autoři zjišťovali i přítomnost aktinu (Obr. 1.9). Tento protein se nachází téměř ve všech eukaryotických buňkách a jeho stanovení slouží pro kontrolu.



Obr. 1.9: Stanovení přítomnosti EGFR a aktinu v jednotlivých buněčných liniích [64].

1.4.3 Specifita vazby na EGFR

Specifita vazby značené protilátky/konjugátu může být zjištěna porovnáním aktivity navázané na buňky v porovnání s aktivitou, která byla na buňky navázána v případě předchozí saturace receptorů. Saturace receptorů slouží pro stanovení nespecifických vazeb a je jí docíleno předchozí inkubací s neznačenou protilátkou/proteinem o násobně vyšší koncentraci. V literatuře uváděné parametry experimentů jsou shrnuty v Tab. 1.4.3.

Benedetto, 2019 [50] zjišťoval specifitu vazby ^{89}Zr -DFO-NCS-cetuximabu na buněčné linii FaDu, u které vypěstoval rezistenci na cetuximab. U rezistentních buněk pozoroval šestkrát nižší příjem značené protilátky oproti nerezistentním buňkám a konstatoval tak specifitu vazby radiofarmaka. Nespecifické reakce určil pomocí předchozí saturace cetuximabem. Další autoři [49, 62, 65] porovnávali navázanou aktivitu s/bez předchozí saturace.

zdroj	linie	anti-EGFR protilátka/protein	t_i [h]	c_i [nM]	t_s [min]	c_s [μM]
Garousi, 2016 [49]	A431	^{89}Zr -DFO-Z _{EGFR:2377}	1	10	5	1
Benedetto, 2019 [50]	FaDu	^{89}Zr -CTX	3	5,5	-	2,75
Malmberg, 2011 [62]	PC*	^{111}In -CTX	1	1	-	-
Nordberg, 2007 [65]	A431	^{125}I -CTX	4	2,5	15	1,25

* buněčné linie karcinomu prostaty (PC3, DU145, LNCaP)

- neuvedeno

t_i doba inkubace se značenou protilátkou/peptidem

c_i koncentrace značené protilátky/peptidu

t_s doba saturace neznačenou protilátkou/peptidem

c_s koncentrace neznačené protilátky/peptidu pro saturaci

1.4.4 Množství navázaného farmaka v čase

Malmberg, 2011 [62] pozorovala interakci ^{111}In značeného cetuximabu s buněčnými liniemi rakoviny prostaty (PC3, DU145 a LNCaP). Sledovala množství navázaného ^{111}In -cetuximabu na buňkách v závislosti na době inkubace. Pro inkubaci buňky promyla, a smíchala s 0,5 ml 4M močoviny v 0,1M glycinovém pufru (pH=2,5) a z této kyselé frakce stanovila množství značené protilátky vázané na povrchu buněk. Následně buňky lyzovala přidavkem 1M NaOH a stanovila množství internalizovaného značeného cetuximabu. Množství buněčně vázaného ^{111}In -cetuximabu se s dobou inkubace monotónně zvyšovalo, nejdelší doba inkubace byla 24 h. Po 4 h inkubace dosahovala celková navázaná aktivita více než 50 % aktivity při inkubaci trvající 24 h. Nordberg, 2007 [65] pozoroval, že největší množství ^{125}I -cetuximabu bylo navázáno při době inkubaci 4-8 h, přičemž při delší inkubaci se množství buněčně vázaného ^{125}I -cetuximabu snižovalo. Po inkubaci trvající 24 h byla naměřena aktivita ^{125}I přibližně poloviční. Obdobným způsobem stanovil Garousi, 2015 [49] množství internalizovaného a povrchově vázaného konjugátu ^{89}Zr -DFO- $Z_{\text{EGFR}:2377}$.

1.5 Závěr z teoretické části

Byly zjištěny možnosti ověření stability a biologické aktivity, které by mohly být použity v případě testování cetuximabu značeného pomocí ^{89}Zr . Pro zjištění stability může být použita TLC, kde bývá nejčastěji použita kyselina citronová o různé koncentraci jako mobilní fáze. Dále se jedná o analýzu pomocí HPLC s kolonou založenou na rozměrově-vylučovacím principu. Vhodnou mobilní fází se jeví fosfátový pufr. Stabilita může být také zjištěna pomocí SDS-PAGE.

Biologickou aktivitu protilátek lze zjistit pomocí metody ELISA. Jedná se o nepřímou metodu ELISA, kde je sledována schopnost vazby na EGFR. K ověření, že se ^{89}Zr -DFOSq-CTX váže na buněčné receptory EGFR, jsou používány buněčné linie, které tento receptor exprimují. Vysokou expresi EGFR vykazují buňky linie A431, o něco méně ho exprimují buňky linie např. PC3 nebo HT-29. Ke stanovení míry exprese EGFR je možno využít metodu Western blot, příp. Dot Blot.

2. Experimentální část

2.1 Obecné informace

2.1.1 Použité materiály a přístroje

K výrobě ^{89}Zr byl použit cyklotron U-120M nebo TR-24 Ústavu jaderné fyziky Akademie věd ČR, použitým terčem bylo yttrium o čistotě 99,99 % a tloušťce 0,635 mm (American Elements). Bylo také použito ^{89}Zr od společnosti PerkinElmer (v 1M kyselině šťavelové, 169 MBq v době značení). K separaci byla použita kolona ZR Resin od společnosti Triskem. Aktivita značených konjugátů byla zjišťována pomocí přístroje Bqmetr4 (BQM).

Ke konjugaci a značení byla použita protilátka cetuximab od společnosti Selleckchem (5 mg/ml) a protilátka cetuximab pod obchodním názvem Erbitux (5 mg/ml, Merck). Pro analýzu připraveného DFOSq byl použit chromatografický systém Acquity Arc, jehož součástí byla pumpa (Quaternary Solvent Manager-R) a autosamplér (Sample Manager FTN-R). Použitou kolonou byla CORTECS C-18 2,7 mm. Pro hmotnostní spektrometrii byl použit ionizační systém ESI (ZsprayTM) a detektor SQ Detector 2. Pro ovládání chromatografického systému byl použit EmpowerTM Software. Vše od společnosti Waters. Během konjugace a značení byla použita centrifuga Eppendorf Centrifuge 54177 R a vivaspiny Vivaspin 500 10 kDa (GE Healthcare). Při TLC byl použit chromatografický papír Grade 17 CHROMA 220x25mm (Wathman). Pro HPLC analýzu konjugátů a značených konjugátů byl použit chromatografický systém Agilent Technologies 1200 Series, jehož součástí byla pumpa (Quaternary Pump) a autosampléru (Standard Autosampler). K ovládání chromatografického systému byl použit software Agilent ChemStation. Pro separaci byla použita kolona BioSep-SEC-s2000 (300 x 4,6 mm). Byl použit UV/VIS detektor (Waters 2489) a radiometrický detektor (Gabi Raytest).

Pro elektroforézu byla použita elektroforetická sada Cleaver Scientific Ltd CS-300V. Jako marker byl použit Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad). Pro zlepšení kinetiky byla použita kývačka Sunflower Mini-Shaker PS-3D.

Pro stanovení koncentrace proteinu byla použita mikrotitrační destička pureGrade s 96 jamkami od společnosti Brand. Pro stanovení dle Bradforda byl použit jako barvicí činidlo Protein Assay Dye Reagent concentrate (Bio-Rad). V případě BCA byla použita sada Bicinchonin Acid Protein Assay od společnosti Biosciences. Absorbance byla měřena na spektrofotometru Sunrise (Tecan).

Pro metodu ELISA byly použity 96 jamkové mikrotitrační destičky Microwell™ Plates od společnosti Nunc™. Použitým antigenem byl Recombinant Human EGFR/HER1/ErbB1 Protein od Sino Biological Inc. K vytvoření kalibrační křivky byl použit cetuximab (Selleckchem; 5 mg/ml). Sekundární protilátkou byla Anti-Human IgG (Fc specific) peroxidase antibody produced in goat (Sigma). Absorbance byla měřena na spektrofotometru Sunrise (Tecan). K promývání mezi jednotlivými kroky byla použita promývačka Columbus (Tecan).

Při Dot Blotu byla použita membrána Pre-Cut Nitrocellulose Membranes od společnosti Thermo Fisher Scientific. Pro detekci EGFR byla použita primární protilátka EGFR Monoclonal Antibody (0,2 mg/ml, Thermo Fisher Scientific), k detekci aktinu beta Actin Loading Control Monoclonal Antibody (BA3R, 1 mg/ml, Thermo Fisher Scientific). Jako sekundární protilátka byla použita Goat anti-mouse IgG (H+L) Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody, HRP (1 mg/ml, Thermo Fisher Scientific). Jako chemiluminiscentní substrát byl použit WesterSure PREMIUM Chemiluminiscent Substrate (LI-COR). Detekce probíhala na přístroji C-Digit (LI-COR).

K testování *in vitro* byly použity buněčné linie A431, PC3 a NIH3T3 získané od společnosti ATCC. Ke kultivaci buněk byla použita následující média, séra a roztoky:

- DMEM High Glucose (Biowest)
- F-12K (Corning)
- Fetal bovine serum (FBS, Biowest)
- Hank's Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich)
- Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich).

Byly připraveny kompletní růstová média DMEM a F-12K (500 ml média + 50 ml FBS). Buňky byly uchovávány v tekutém dusíku (-192 °C) v zamrazovacím médiu (50 % FBS, 40 % kompletní růstové médium dle typu buněk, 10 % DMSO). Buňky linie A431 a NIH3T3 byly kultivovány v kompletním růstovém médiu DMEM, buňky PC3 v kompletním růstovém médiu F-12K. K počítání buněk byl použit analyzátor a sklíčka (Cell counting slide) JuLI™ Br (NanoEntek). K detekci mykoplasmatické kontaminace v buněčných kulturách byl použit MycoAlert PLUS mycoplasma detection kit a přístroj Lucetta Luminometr od firmy Lonza. K inkubaci byl použit inkubátor Binder, který zajišťoval teplotu 37 °C a obsah vzdušného CO₂ 5 %. Četnost impulsů ⁸⁹Zr v médiu a v lyzátu buněk byla zjišťována pomocí přístroje HIDEX AMG Automatic Gamma Counter s verzí softwaru 1.8.1.0. K centrifugaci byla použita centrifuga Universal 320R (Hettich). Ke kultivaci buněk byly použity kultivační lahve Cell and Tissue Culture Flasks 25 cm² (Biofil) a Tissue Culture Flask 75 cm² (VWR). Pro experimenty *in vitro* byly použity 6 jamkové kultivační destičky MULTIWELL™ 6 Well (Falcon).

Veškerá použitá voda byla deionizovaná (stanice TKA Smart2pure). V případě požadavku na roztoky v kvalitě *ultra pure* byla tato voda dočištěna pomocí chelatačního činidla CHELEX 100 sodium form od společnosti Sigma-Aldrich.

V experimentech byly použity následující chemikálie:

- 2-merkaptoethanol (Sigma-Aldrich)
- 3,4-diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (98%, Sigma Aldrich)
- Albumin Bovine Serum (BSA) Protease Free (VWR)
- borátový pufr (0,5M, pH=9, Alfa Aesar)
- Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich)
- deoxycholan sodný ($\geq 97\%$, Sigma Aldrich)
- desferrioxamin B mesylát (95 %, Acros Organics)
- dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)
- ethanol ($> 99,7\%$, VWR)
- glycerol (Sigma-Aldrich)
- glycin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)
- H₂O₂ (30% w/w, Sigma-Aldrich)
- H₂SO₄ TraceSELECT ($\geq 95\%$, Fluka)
- HCl (34-37%, for trace metal analyses, Normatom)
- HEPES free acid ultrapure (Apollo scientific)
- kyselina citronová p.a. (Lach-Ner)
- kyselina octová (Sigma-Aldrich)
- kyselina šťavelová (99,999% trace metals basis, Sigma-Aldrich)
- o-Phenylenediamine dihydrochloride (2 mg/tbl; Sigma-Aldrich)
- methanol (VWR Chemicals)
- MOPS SDS Running Buffer (20X, Novex)
- NaHCO₃ p.a. (Penta)
- Na₂CO₃ (min. 99,8 %, Riedel-de Haën)
- Na₂HPO₄ · 12H₂O (Sigma-Aldrich)
- Na₂SO₄ bezvodý p.a. (min. 99%, Lach-Ner)
- NaOH (Sigma-Aldrich)

- NaCl (Sigma-Aldrich)
- NaN₃ (99,5% Sigma-Aldrich)
- N,N-diisopropylenamin (99,5%, Honeywell)
- PBS (Sigma-Aldrich)
- Protease Inhibitor Coctail (Sigma-Aldrich)
- SDS (10% v H₂O, Sigma-Aldrich)
- tris(hydroxymethyl)amino-methan (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Z výše uvedených chemikálií byly připraveny pufrы a roztoky:

- 0,05M citrát - 0,05M fosfátový pufr (pH=5,0)
- 0,5M HEPES (pH=7,0)
- 100mM uhličitanový pufr (pH=9,6)
- 20mM citrátový pufr (pH upraveno pomocí Na₂CO₃ na pH=5,02)
- 20mM PBS (pH=7,4)
- Tris-HCl (0,5 M Tris, pH upraveno pomocí HCl na 6,8)
- neredukující vzorkový pufr na SDS-PAGE (1,25 ml 0,5M Tris-HCl, 2 ml glycerolu, 3,5 ml deionizované vody, 2 ml 10% SDS, 0,5 ml 0,1% bromfenolová modř)
- redukující vzorkový pufr na SDS-PAGE (475 μ l neredukujícího pufru + 25 μ l 2-merkaptóethanol)
- barvicí roztok na SDS-PAGE (45% methanol, 10% kyselina octová + 0,625 g Coomassie Blue R-250/250 ml roztoku)
- odbarvovací roztok (25% methanol, 10% kyselina octová)
- lyzovací pufr (100 ml 0,01M PBS, 1 g deoxycholan sodný, 1 ml Triton X-100; alikvoty po 10 ml + 200 μ l Protease Inhibitor Coctail)
- promývací pufr pro přípravu buněčných lyzátů (10 ml 0,01M PBS, 200 μ l Protease Inhibitor Coctail)

2.1.2 Stanovení koncentrace proteinu

V průběhu experimentů bylo v různých krocích potřeba zjistit koncentraci proteinu. Bylo k tomu využito stanovení dle Bradforda a bicinchoninová metoda (BCA).

Stanovení dle Bradforda

Stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda využívá barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250. Barvivo v červené formě se naváže na aminokyseliny s bazickým postranním řetězcem, v menší míře také na ty obsahující aromatické jádro. Touto vazbou dojde ke vzniku modrého zbarvení, které je měřeno při vlnové délce 595 nm. K interferenci dochází, pokud stanovovaný roztok obsahuje detergenty jako dodecylsírán sodný nebo TritonX-100 a dále některé sacharidy [66].

Byla vytvořena kalibrační křivka cetuximabu o koncentracích 500 $\mu\text{l/ml}$, 250 $\mu\text{l/ml}$, 125 $\mu\text{l/ml}$, 62,5 $\mu\text{l/ml}$ a 31,25 $\mu\text{l/ml}$. K ředění bylo použito rozpouštědlo stanovovaného vzorku, stejný roztok byl použit jako blank. Konjugát byl ředěn 20x, značený konjugát byl ředěn 5x. Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno 10 μl standardu/vzorku/blanku a následně 200 μl činidla (ředěno 1:4). Vzorky byly nanášeny v tripletech. Po 5 minutách byla měřena absorbance při 595 nm. Byla zhotovena kalibrační křivka a dopočtena koncentrace proteinu ve vzorku.

Bicinchoninová metoda

Bicinchoninová metoda je založena na reakci sodné soli kyseliny bicinchoninové s ionty Cu^+ , které vznikají redukcí Cu^{2+} v přítomnosti peptidové vazby v zásaditém prostředí. Absorbance vzniklého komplexu je měřena při 562 nm. Stanovení nelze provést v přítomnosti redukčních a chelatačních činidel [67].

Kalibrační křivka byla připravena z roztoku cetuximabu o koncentraci 2000 $\mu\text{l/ml}$ ředěním dvojkovou řadou až do koncentrace 7,8125 $\mu\text{l/ml}$. K ředění bylo použito rozpouštědlo vzorku, které bylo použito i jako blank. Vzorek byl ředěný 20x. Na mikrotitrační destičku bylo nanášeno vždy 25 $\mu\text{l/ml}$ standardu/vzorku/blanku a následně 200 $\mu\text{l/ml}$ činidla (připraveno smísením roztoku B s roztokem A z použitého kitu v poměru 1:50). Mikrotitrační destička byla umístěna do inkubátoru udržující teplotu 37 °C. Po 30 minutách byla měřena absorbance při 562 nm. Byla zhotovena kalibrační křivka a zjištěna koncentrace proteinu ve vzorku.

2.2 Metodika

2.2.1 Optimalizace metody ELISA

Prvním krokem bylo promytí mikrotitrační destičky 0,01M PBS (200 μ l na jamku). K promývání byla použita promývačka, stejně tak v následujících krocích. Následně byl do každé jamky nanesen roztok antigenu (EGFR) - 50 ng/100 μ l. Reakce probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě a následně byly jamky 3x promyty (200 μ l) promývacím roztokem, kterým byl 0,01M PBS s 0,05% Tween 20. Dalším krokem bylo napipetování 3% BSA/0,01M PBS jako blokovacího roztoku, který byl ponechán imobilizovat 1 hodinu při laboratorní teplotě. Jamky byly 3x opláchnuty promývacím roztokem. Následně bylo do jamek napipetováno 100 μ l cetuximabu o koncentracích 0,19 ng/ml - 100 μ g/ml (ředěno v 1% BSA/0,01M PBS). Jako negativní kontrola bylo použito 1% BSA/0,01M PBS. Negativní kontrola i roztoky pro kalibrační křivku byly nanášeny v tripletech. Reakce probíhala 2 hodiny při laboratorní teplotě a následně byly jamky promyty promývacím roztokem. Dále bylo napipetováno 100 μ l sekundární protilátky (ředěno 1:20000), přičemž reakce probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě a jamky byly následně 3x promyty promývacím roztokem. Následně bylo přidáno 100 μ l chromogenního substrátu OPD o koncentraci 0,4 mg/ml (roztok byl připraven z 5 ml 0,05M citrát - 0,05M fosfátového pufru, 1 tablety OPD a 5 μ l 30% H₂O₂). Reakce probíhala 20 minut ve tmě a následně byla ukončena přidavkem 100 μ l 2M H₂SO₄. Byla měřena absorbance při 492 nm s referenční absorbancí při 630 nm. Následně byly provedeny experimenty, které si kladly za cíl optimalizaci metody. Testované parametry jsou shrnuty v následujících odstavcích.

Promývání

Byly vyzkoušeny následující modifikace:

- Promytí a nepromytí jamek destičky před nanesením antigenu 200 μ l 0,01M PBS.
- Složení promývacího roztoku. 0,01M PBS + 0,05% Tween 20 nebo pouze 0,01M PBS.

Blokovací roztok

Jako blokovací roztok byly vyzkoušeny koncentrace BSA 1% a 3% v 0,01M PBS. Byly vyzkoušeny následující podmínky imobilizace:

- 1 hodina při laboratorní teplotě,
- 2 hodiny při laboratorní teplotě,
- 2 hodiny při 37 °C.

EGFR

Antigen byl v různých experimentech nanášen v koncentracích 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a byly vyzkoušeny následující podmínky imobilizace:

- 1 hodina při laboratorní teplotě,
- 2 hodiny při laboratorní teplotě,
- 3 hodiny při laboratorní teplotě,
- 4 °C přes noc.

Primární protilátka

Byly vyzkoušeny následující reakční podmínky:

- 2 hodiny při laboratorní teplotě,
- 4 °C přes noc,
- 1 hodina při 37 °C,
- 45 minut při 37 °C.

Sekundární protilátka

Byly provedeny experimenty s ředěním sekundární protilátky 1:20000, 1:10000 a 1:5000. Dále následujícími podmínkami reakce:

- 1 hodina při laboratorní teplotě,
- 45 min při 37 °C,
- 30 minut při 37 °C.

Další modifikace

Pro ředění antigenu, primární a sekundární protilátky byl použit 100mM uhličitanový pufr namísto 0,01M PBS.

2.2.2 Příprava cetuximabu značeného ^{89}Zr

V bakalářské práci jsem připravila ^{89}Zr -DFOSq-CTX, ke konjugaci byl použit cetuximab (Merck). Ke značení bylo používáno ^{89}Zr připravené na cyklotronu U-120M nebo TR-24. Úspěšnost značení se pohybovala kolem 20 % (určeno poměrem aktivity ^{89}Zr v ^{89}Zr -DFOSq-CTX a aktivity ^{89}Zr použitého ke značení). Byly provedeny experimenty, které si kladly za cíl zvýšit úspěšnost značení.

Příprava DFOSq

Pro konjugaci byl připraven nový chelátor desferrioxaminem squaramid ester (DFOSq). Ekvimolární směs desferrioxaminu B mesylátu (0,20 g) a N,N-diisopropylenaminu (0,05 ml) byla v 6 ml ethanolu za stálého míchání zahřívána na 50 °C po dobu 1 h zahřívána. Následně bylo přidáno 0,1 ml 3,4-diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dionu v 9 ml ethanolu a směs byla při teplotě 50 °C promíchávána dalších 30 minut. Pomocí vakuové linky bylo z roztoku odpařeno rozpouštědlo, produkt byl 3x promyt 10 ml ethanolu a vysušen.

Pro detekci pomocí LC-MS byl připraven roztok DFOSq o koncentraci 1 mg/ml (rozpuštěno ve směsi ethanol:H₂O v poměru 1:1). Byly použity dvě mobilní fáze: A) H₂O+0,1% TFA a B) acetonitril+0,1% TFA. Eluce byla gradientová, na počátku byl obsah mobilní fáze B 10 %, který se zvýšil na 30 % během 10 minut. Nástrík byl 5 μ l a průtok 1 ml/min. Hmotnostní spektrometr byl použit v módu pozitivní ionizace se záznamem vybraných iontů. Byly vybrány kanály s m/z 685,4 a 707,4.

Příprava konjugátů DFOSq-CTX

Protilátka cetuximab (CTX) byla konjugována s desferrioxaminem squaramid esterem (DFOSq). Vzniklý konjugát bude v následujícím textu označován jako DFOSq-CTX. Byl zjišťován rozdíl při použití cetuximabu pod názvem Erbitux (Merck) a cetuximabu od firmy Selleckchem.

Příprava konjugátů DFOSq-CTX byla obdobná jako v bakalářské práci [4]. Při přípravě konjugátů byly použity molární nadbytky DFO 1:5, 1:10, 1:20 a 1:50. Konjugace probíhala přes noc při laboratorní teplotě v borátovém pufru, následně byly konjugáty uchovávány ve fyziologickém roztoku při teplotě 4 °C. Koncentrace protilátky v konjugátech byla zjištěna pomocí Bradfordovy metody.

Příprava a separace ⁸⁹Zr

Radionuklid byl připraven ostřelováním yttriového terče v cyklotronu. Terč byl rozpuštěn v 2M HCl. K separaci byla použita kolona ZR Resin, ⁸⁹Zr. Pro eluci ⁸⁹Zr byly porovnány eluční křivky při použití kyseliny šťavelové o koncentracích 0,05 M, 0,5 M a 0,1 M, byly jímány frakce po třech kapkách. Bylo vyzkoušeno komerčně dostupné ⁸⁹Zr.

Značení konjugátů DFOSq-CTX pomocí ⁸⁹Zr

Značení konjugátů DFOSq-CTX pomocí ⁸⁹Zr probíhalo obdobně jako v bakalářské práci [4]. Ke značení ⁸⁹Zr-DFOSq-CTX pro účely zjištění stability a biologické aktivity bylo použito 300 μ g protilátky v konjugátu a roztok ⁸⁹Zr o aktivitě 100 MBq.

Značení probíhalo po dobu 1 hodiny v neutrálním pH v pufru HEPES. Koncentrace protilátky ve značených konjugátech byla stanovena pomocí Bradfordovy metody.

Vzorky byly uchovávány ve 20mM roztoku PBS při 4 °C. Tento značený konjugát bude dále označován jako ^{89}Zr -DFOSq-CTX.

Paralelně probíhala optimalizace značení. Bylo zjišťováno, zda původ použitého ^{89}Zr ovlivňuje úspěšnost značení. Bylo vyzkoušeno použití nově připraveného chelátoru a cetuximabu od společnosti Selleckchem. Také bylo vyzkoušeno značení bez přidání pufru HEPES.

2.2.3 Stabilita konjugátů DFOSq-CTX a ^{89}Zr -DFOSq-CTX

Stabilita protilátky v konjugátu CTX-DFOSq byla zjišťována 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h a 168 hodin po konjugaci pomocí HPLC a SDS-PAGE. Stabilita protilátky ve značeném konjugátu ^{89}Zr -DFOSq-CTX byla zjišťována 0 h, 24 h, 48 h a 120 hodin po konjugaci pomocí HPLC a SDS-PAGE.

HPLC

Pro analýzu pomocí HPLC byla použita isokratická eluce. Byla použita mobilní fáze obsahující 0,1M Na_2HPO_4 , 0,1M Na_2SO_4 a 0,05% NaN_3 , průtok byl 0,4 ml/min. Byla měřena absorbance při 280 nm a byl použit radiometrický detektor (energetické okno 88-1000 keV).

K analýze byl připraven roztok protilátky cetuximab o koncentraci 0,5 mg/ml. Roztoky konjugátů byly naředěny 10x, nástrík byl v tomto případě 5 μl . Značené konjugáty byly pro analýzu zředěny 2x, nástrík byl 5 μl .

SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE byly připraveny roztoky cetuximabu, konjugátů značených konjugátů o koncentraci 267 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pro každý vzorek byl připraven roztok s redukujícím a neredukujícím pufrům (v obou případech 15 μl vzorku + 15 μl pufru). Připravené vzorky byly povařeny po dobu 5 minut.

Do jamek elektroforetického gelu bylo nanášeno 8 μl markeru a 15 μl od každého vzorku. Elektroforetická vana byla zalita pufrům MOPS. Elektroforéza probíhala 90 minut při napětí 130 V, následně 10 minut při napětí 110 V. Následně byl elektroforetický gel vyjmut z plastového pouzdra a barven pomocí barvicího roztoku s využitím kývačky (20 minut). Následně byl odbarvován pomocí odbarvovacího roztoku.

2.2.4 Biologická aktivita CTX-DFOSq a ^{89}Zr -CTX-DFOSq

Metodika ELISA vychází z optimalizovaného postupu, který vzešel z předchozích experimentů a je ilustrován na Obr. 3.1. Cetuximab, konjugáty i značené byly naředěny na koncentraci 25 ng/ml a následně ředěny dvojkovým ředěním až do koncentrace

0,39 ng/ml. Tyto roztoky byly nanесeny jako primární protilátka, vždy v tripletech. Jako negativní kontrola byl použit 1% BSA/0,01M PBS. V případě konjugátů byla biologická aktivita zjišťována 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h a 168 h od konjugace. Značené konjugáty byly testovány 0 h, 24 h, 48 h a 120 h po značení.

2.2.5 Testování $^{89}\text{Zr-CTX-DFOSq}$ in vitro

Byly použity buněčné linie A431, PC3 a NIH3T3. Linie A431 byla zvolena z důvodu vysoké exprese EGFR a linie PC3 byla použita, jelikož exprimuje EGFR, ale v menší míře. Linie NIH3T3 byly použity jako negativní kontrola. Veškerá manipulace s buňkami probíhala v laminárním boxu. K experimentu byl použit značený konjugát $^{89}\text{Zr-K3.2}$ (viz Tab. 3.3). Byl nařazen na koncentraci 10 nM/ml, k ředění bylo použito kompletní růstové médium DMEM.

Příprava buněk

Po rozmrazení byly buněčné linie A431 a NIH3T3 pěstovány v kompletním růstovém médiu DMEM, pro linii PC3 bylo použito kompletní růstové médium F-12K. Buňky byly inkubovány při 37 °C, obsah vzdušného CO_2 byl 5%. Pasážování probíhalo při dosažení konfluencie 80 %.

48 hodin před začátkem experimentu byly buňky všech buněčných linií inkubovány v kompletním růstovém médiu DMEM. 24 hodin před začátkem bylo potvrzeno, že buňky nejsou kontaminovány mykoplazmou. Buňky byly sklizeny, spočteny a připraveny do 6jamkových kultivačních destiček tak, že každá z jamek obsahovala $5 \cdot 10^5$ buněk. Pro každou dobu inkubace byla připravena jedna 6jamková destička pro každou z buněčných linií. Jeden triplet sloužil pro inkubaci samotného $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$, pro druhý inkubaci $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$ po předchozí saturaci cetuximabem.

Inkubace s $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$

1 hod před inkubací s $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$ byla část jamek s buňkami saturována 1 ml cetuximabu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ (ředěno v kompletním růstovém médiu DMEM). Před přidáním $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$ byla veškeré médium odtaženo, jamky byly promyty pufrem Hank's a inkubovány s 1 ml $^{89}\text{Zr-CTX-DFOSq}$ (10 nM). Doby inkubace byly 0,5 h, 1 h, 3 h, 12 h a 24 h. Po uplynutí této doby bylo médium přeneseno do šroubovací zkumavky. Jamky byly 3x propláchnuty pufrem Hank's. Buňky byly lyzovány pomocí 2x0,5 ml 2M NaOH. Lýza buněk trvala 10 minut při obou pipetovaných objemech a následně byla nepřítomnost buněk v jamkách potvrzena pomocí mikroskopu. Obě frakce lyzátů byly spojeny a přeneseny šroubovací zkumavky. Četnosti impulzů ^{89}Zr v jednotlivých zkumavkách byly zjišťovány pomocí přístroje HIDEK s nastaveným energetickým oknem 480-558 keV a normovány k času dokončení značení. Bylo změřeno pozadí ve stejném energetickém okně. V době ukončení každé doby inkubace byla ověřena stabilita $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$ pomocí TLC.

Detekce exprese EGFR pomocí Dot Blotu

Pro stanovení exprese EGFR byly připraveny buněčné lyzáty. Roztoky buněk A431, PC3 a NIH3T3 byly z kultivační lahve přeneseny do mikrozkušavky. Buňky byly 3x promyty pufrům Hank's s využitím centrifugace (2 min, 500 RPM, 4 °C) za účelem vymytí zbytků média a trypsinu. Následně byly centrifugovány 5 minut při 5000 RPM a 4 °C. Kapalná fáze byla odebrána a vzniklá peleta byla rozpuštěna v 0,5 ml 0,01M PBS obsahujícím inhibitory proteáz. Toto promytí společně s centrifugací bylo 2x zopakováno. Po odebrání kapalné fáze bylo pipetováno 0,5 ml lyzovacího pufru a po promíchání byl roztok inkubován po dobu 30 minut při 4 °C a průběžně promícháván na vortexu. Roztok byl centrifugován 10 minut, 10000 RPM a 4 °C. Supernatant obsahující lyzát buněk byl odebrán do šroubovací zkumavky. Koncentrace proteinu v lyzátech byla stanovena pomocí BCA.

Expresi EGFR u buněk A431, PC3 a NIH3T3 byla detekována pomocí metody Dot Blot. Na membránu byly naneseny 2 μ l buněčných lyzátů. Membrána byla saturována 1 h 3% roztokem BSA/0,01M PBS. Membrána byla promyta v 0,01M PBS a inkubována s primární protilátkou (anti-EGFR ředěna 1:200 v 1,5% BSA/0,01M PBS, anti-beta aktin ředěna 1:1000 v 1,5% BSA/0,01M PBS) přes noc při 4 °C. Poté byla membrána promyta a inkubována se sekundární protilátkou (ředěna 1:10000 v 1,5% BSA/0,01M PBS) 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po promytí 0,01M PBS byl na membránu byl nanesen chemiluminiscenční substrát, inkubace probíhala 2 minuty. Po osušení byly proteiny detekovány pomocí přístroje C-Digit.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace metody ELISA

Metoda byla optimalizována za účelem kvantifikace biologické aktivity konjugátů a konjugátů značených pomocí ^{89}Zr . Na kalibrační křivce byla při nižších koncentracích primární protilátky pozorována oblast, která by po lineární aproximaci byla vhodná pro zamýšlené účely. Účelem optimalizace bylo dosažení optimálních podmínek pro analýzu v tomto rozsahu koncentrací.

Promývání

Promývání jamek destičky před nanesením antigenu nepřineslo lepší výsledky než použití nepromyté destičky. Pro promývání jamek destičky mezi jednotlivými kroky bylo shledáno jako dostatečné použití 0,01M PBS, jelikož přídavek Tween 20 neposkytoval žádný rozdíl.

EGFR

Jako optimální koncentrace EGFR byla určena 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (tj. 100 ng/100 μl). Použití vyšší koncentrace nevedlo k vyšší odezvě, a naopak při použití nižších koncentrací docházelo ke zkrácení pseudolineárního úseku u nízkých koncentrací.

Imobilizace antigenu probíhající přes noc při 4 °C byla určena jako optimální. Poskytovala silnější odezvu než imobilizace trvající 1 hodinu při laboratorní teplotě a srovnatelnou jako 3 hodiny v laboratorní teplotě. Byla také vhodnější vzhledem k povaze experimentu.

Blokovací roztok

Bylo zjištěno, že 1% BSA/0,01M PBS je dostatečná koncentrace proteinu pro vysycení neobsazených míst na povrchu jamky. K tomuto procesu stačí 1 hodina při laboratorní teplotě.

Primární protilátka

Optimální podmínky reakce byly určeny jako 45 minut při 37 °C. Delší časový úsek při stejné teplotě nevedl ke zlepšení odezvy. Reakce probíhající přes noc při 4 °C poskytovala obdobné výsledky, avšak kratší čas reakce byl zvolen jako vhodnější vzhledem k povaze experimentu. V případě dvou hodin při laboratorní teplotě byla pozorována stejná odezva.

Sekundární protilátka

Jako optimální ředění sekundární protilátky bylo zvoleno 1:10000. Ředění 1:20000 poskytovalo nižší odezvu. Ředění 1:5000 sice poskytovalo mírně vyšší odezvu, avšak byla při něm naměřena vyšší odezva i v případě blanku.

Další modifikace

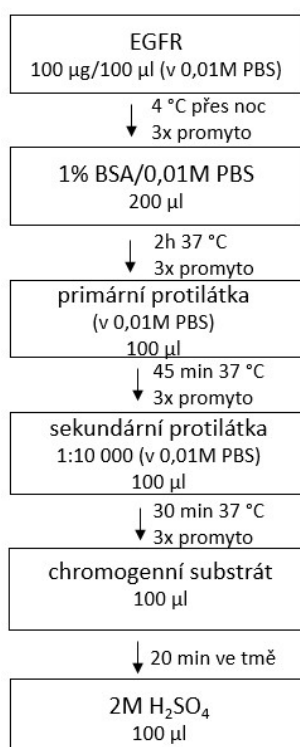
Použití uhličitanového pufru při ředění antigenu, primární a sekundární protilátky poskytovalo nižší odezvu než při použití 0,01M PBS. Tímto experimentem byly potvrzeny výsledky, které ve své práci uvádí Hantash, 2009 [57].

Optimalizovaný postup

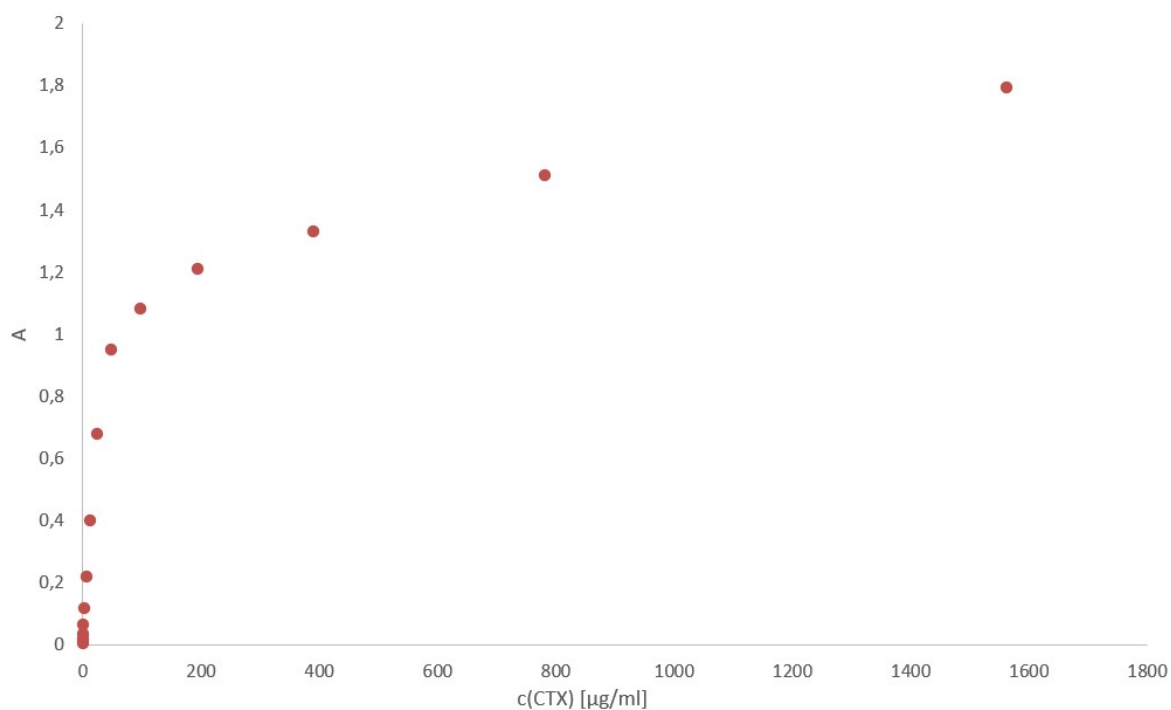
Na základě výše uvedených zjištění byl vypracován postup pro zjišťování biologické aktivity konjugátů a značených konjugátů. Je schematicky znázorněn na Obr. 3.1.

Na základě tohoto postupu byla zhotovena kalibrační křivka v rozmezí 0,09 ng/ml - 1,56 µg/ml, která se nachází na Obr. 3.2 . Je zde patrná saturace, která se podobá té, kterou ve své práci pozoroval Suaréz, 2016 [55] (Obr. 1.8). Vzhledem k tomu, že u vyšších koncentrací primární protilátky přesahuje naměřená absorbance hodnotu 1, dochází v této oblasti k negativní odchylce.

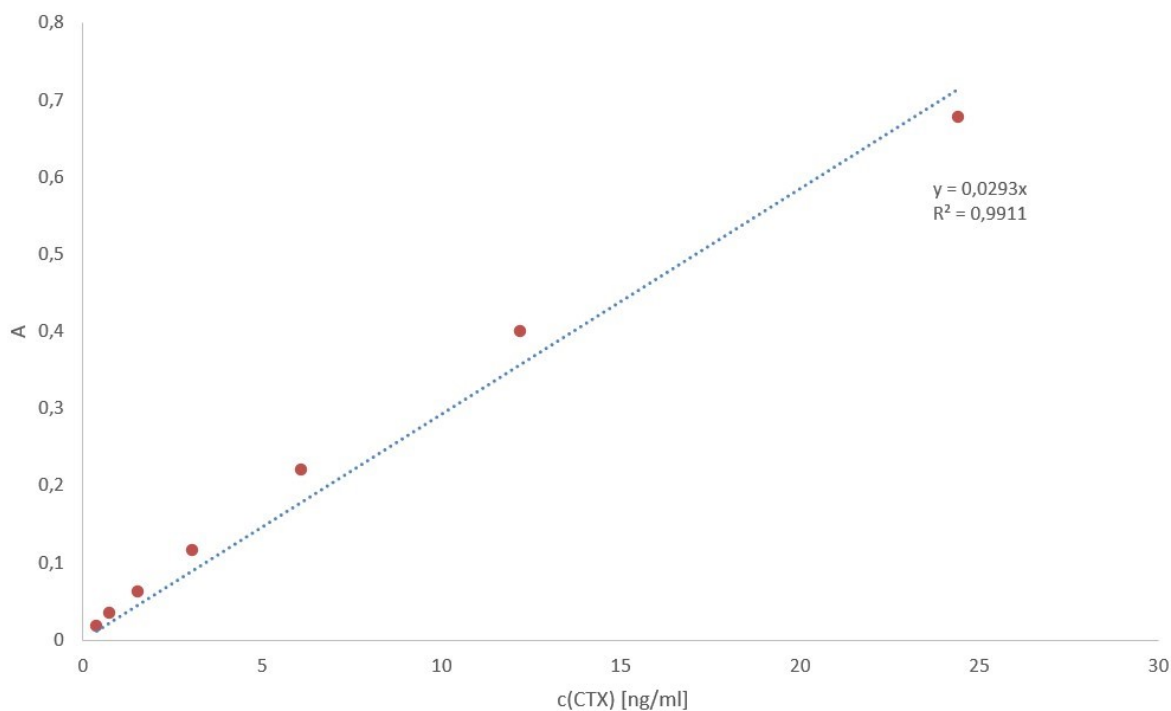
V kalibrační křivce byla stanovena oblast vhodná k lineární aproximaci, a to v rozsahu koncentrací 0,38 - 24,41 ng/ml. Tento rozsah koncentrací byl použit pro vyhodnocování biologických aktivit značených a neznačených konjugátů (0,39 - 25 ng/ml).



Obr. 3.1: Optimalizovaný postup metody ELISA pro zjišťování biologické aktivity konjugátů a značených konjugátů.



Obr. 3.2: Kalibrační křivka cetuximabu v rozsahu koncentrací 0,09 ng/ml - 1,56 µg/ml.



Obr. 3.3: Lineárně aproximovaná oblast kalibrační křivky cetuximabu (0,4 - 24,4 ng/ml).

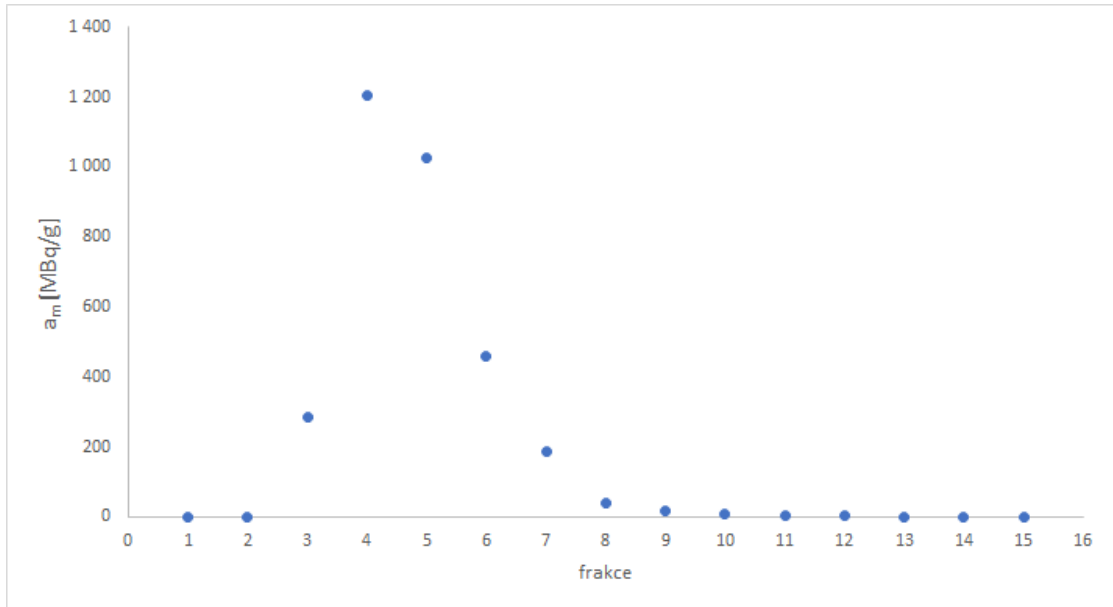
3.2 Příprava cetuximabu značeného ^{89}Zr

3.2.1 Příprava DFOSq

Byl získán bílý prášek o hmotnosti 0,1980 g. Přítomnost DFOSq byla ověřena pomocí LC-MS při m/z 685,4 a 707,4.

3.2.2 Příprava a separace ^{89}Zr

Při eluci byla vyhodnocena jako optimální koncentrace kyseliny šfavelové jako 0,5 M. V této eluční křivce se vyskytoval nejstrmější pík a ^{89}Zr tak bylo koncentrováno v nejmenším objemu. Eluční křivka pro koncentraci 0,5 M je na Obr. 3.4. Jedná se o hmotnostní aktivitu eluátu v jednotlivých frakcích. Pro značení byla použita frakce 4, jelikož její hmotnostní aktivita byla nejvyšší.



Obr. 3.4: Eluční křivka ^{89}Zr .

3.2.3 Příprava DFOSq-CTX

Byly připraveny konjugáty DFOSq-CTX, které byly označeny jako K1-K4 (dle Tab. 2.1). Koncentrace protilátky byla zjištěna pomocí Bradfordovy metody.

Tab. 3.1: Přehled označení připravených konjugátů a jejich koncentrace.

	$n_{\text{CTX}} : n_{\text{DFO}}$	c_{CTX} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
K1	1:5	5599
K2	1:10	6088
K3	1:20	5878
K4	1:50	5380

3.2.4 Příprava ^{89}Zr -DFOSq-CTX

Byly připraveny konjugáty K1-K4 značené ^{89}Zr , které byly nazvány ^{89}Zr -K1 - ^{89}Zr -K4. Příprava těchto konjugátů probíhala před optimalizací značení. Koncentrace protilátky v konjugátech byla zjištěna pomocí Bradfordovy metody a ve všech případech se pohybovala okolo 1,5 mg/ml. V Tab. 2.3 jsou zaznamenány aktivity ^{89}Zr navázaného na konjugáty a také množství cetuximabu, které tyto konjugáty obsahovaly. Bylo pozorováno, že čím větší nadbytek DFO byl použit ke konjugaci, tím větší množství aktivity se na protilátku navázalo. Molární nadbytek DFOSq 1:50 (K4) nezajišťoval výrazné zvýšení navázané aktivity ^{89}Zr oproti molárnímu nadbytku 1:20 (K3).

Tab. 3.2: Aktivita ^{89}Zr navázaného na jednotlivé konjugáty a hmotnost cetuximabu v konjugátech.

	A [MBq]	m_{CTX} [μg]
$^{89}\text{Zr-K1}$	8,73	245
$^{89}\text{Zr-K2}$	9,26	229
$^{89}\text{Zr-K3}$	19,6	259
$^{89}\text{Zr-K4}$	20,7	249

Při použití ^{89}Zr z obou zdrojů se množství ^{89}Zr navázaného na konjugát nelišilo. Nově připravený DFOSq také nezvyšoval úspěšnost značení. Značení v zásaditém prostředí (pH=9, bez přidání pufru HEPES) vedlo k úspěšnosti značení 10 %. Při použití cetuximabu od společnosti Selleckem se množství ^{89}Zr vázaného na konjugát zvýšilo na 40 %. Pro testování $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$ *in vitro* byla ke konjugaci zvolena tato protilátka.

Po studie *in vitro* byl připraven značený konjugát $^{89}\text{Zr-K3.2}$, jehož příprava se od $^{89}\text{Zr-K3}$ lišila použitou protilátkou ke konjugaci. V tomto případě byl použit cetuximab od společnosti Selleckem.

Tab. 3.3: Aktivita ^{89}Zr navázaného na konjugát a hmotnost cetuximabu v konjugátu.

	A [MBq]	m_{CTX} [μg]
$^{89}\text{Zr-K3.2}$	14,8	97

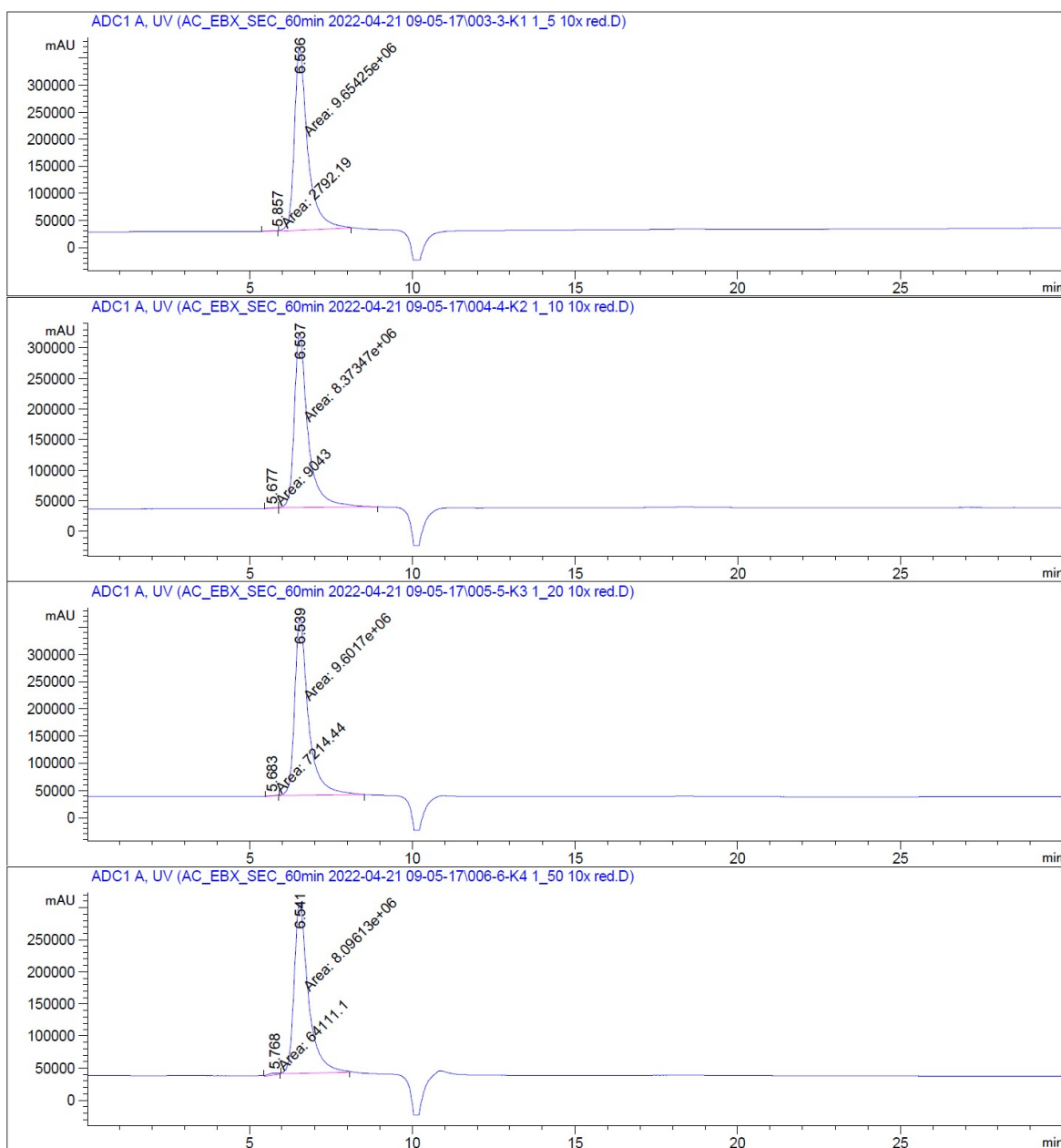
3.3 Stabilita konjugátů CTX-DFOSq

3.3.1 HPLC

Byly vyhotoveny chromatogramy konjugátů K1, K2, K3 a K4. Jedná se o závislost absorbance při $\lambda=280$ nm na retenčním čase. Analýza proběhla 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h a 168 h po konjugaci. Na všech chromatogramech se nachází pík s retenčním časem přibližně 6,5 min, který náleží cetuximabu. Dále je v chromatogramech patrný pík okolo času 5,75 minut. Pravděpodobně se jedná o agregát protilátky, jehož vznik zapříčinila konjugace. V čase 0 h po konjugaci je pík agregátu u konjugátů K1, K2 a K3 nepozorovatelný a v dalších analýzách nepřesahuje 0,3 %. U konjugátu K4 byl pík agregátu v čase 0 h pozorovatelný v analýzách 0 h - 168 h nepřesáhl 1 %.

Toto zjištění odpovídá faktu, že protilátky vytvářejí v nevyhovujících podmínkách agregáty. Tyto nevyhovující podmínky mohou být např. fyzikální (protilátky byly vystaveny centrifugaci), nepříznivé pH (konjugace probíhala v borátovém pufru o pH=9) nebo přítomnost dalších látek (DFOSq). Agregáty protilátek mohou být vázány kovalentními i nekovalentními vazbami. Může se jednat např. o dimery nebo větší shluky protilátek. Kovalentní a tedy ireverzibilní vazby mohou vznikat mezi samotnými protilátkami, ale také k jejich vazbě může přispívat DFO. Agregace protilátek nepříznivě ovlivňuje biologickou aktivitu protilátky [68]. Na Obr. 3.5 se nachází

chromatogramy všech konjugátů 168 hodin po konjugaci, na kterém jsou pozorovatelné výše zmíněné píky.

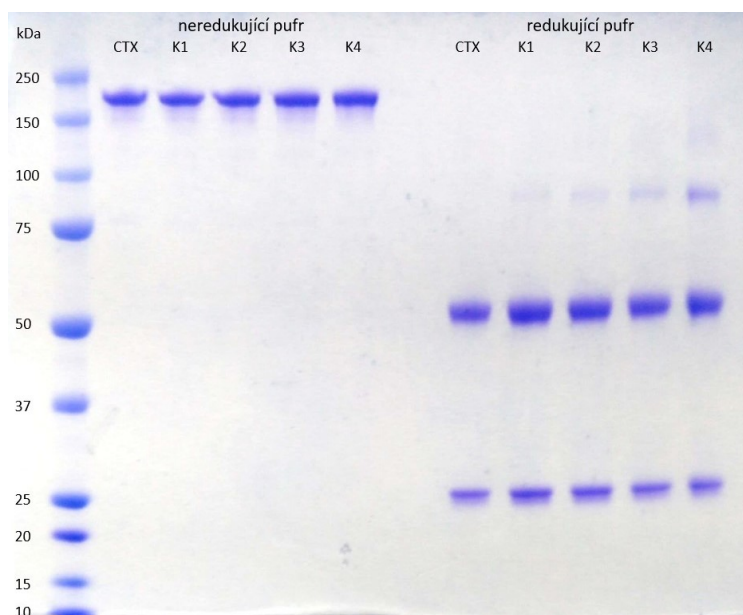


Obr. 3.5: Chromatogramy konjugátů K1, K2, K3 a K4 (shora), detekce pomocí UV/VIS ($\lambda=280$ nm).

3.3.2 SDS-PAGE

Výsledky zjištěné pomocí HPLC byly ověřovány pomocí SDS-PAGE. Na Obr. 3.6 se nachází sken elektroforetického gelu 168 hodin po konjugaci. Oproti SDS-PAGE probíhající ihned po konjugaci nedochází prakticky k žádným změnám. V neredukující části gelu se nachází s bendy s molekulovou hmotností přibližně 150 kDa,

které náleží celé protilátce. V neredukující části gelu se nacházejí bendy odpovídající lehkým (25 kDa) a těžkým (50 kDa) řetězcům. Kromě toho se zde nachází bend s molekulovou hmotností přibližně 75 kDa. Pravděpodobně by se mohlo jednat o spojení lehkého a těžkého řetězce. Vzhledem k tomu, že se jedná o redukující prostředí a nekovalentní vazby by měly být přerušeny, lze předpokládat, že tato vazba je kovalentní a mohla by být zprostředkována DFO. To také odpovídá zjištění, že intenzita tohoto bendu roste se zvyšujícím se množstvím DFO použitého ke konjugaci. Agregáty nebyly pozorovány v redukujícím ani neredukujícím prostředí. Je možné, že došlo k jejich disociaci při varu a vazbou SDS. Dalším možným vysvětlením je, že jejich velikost nedovolovala žádný pohyb, a tedy zůstaly v jamkách.

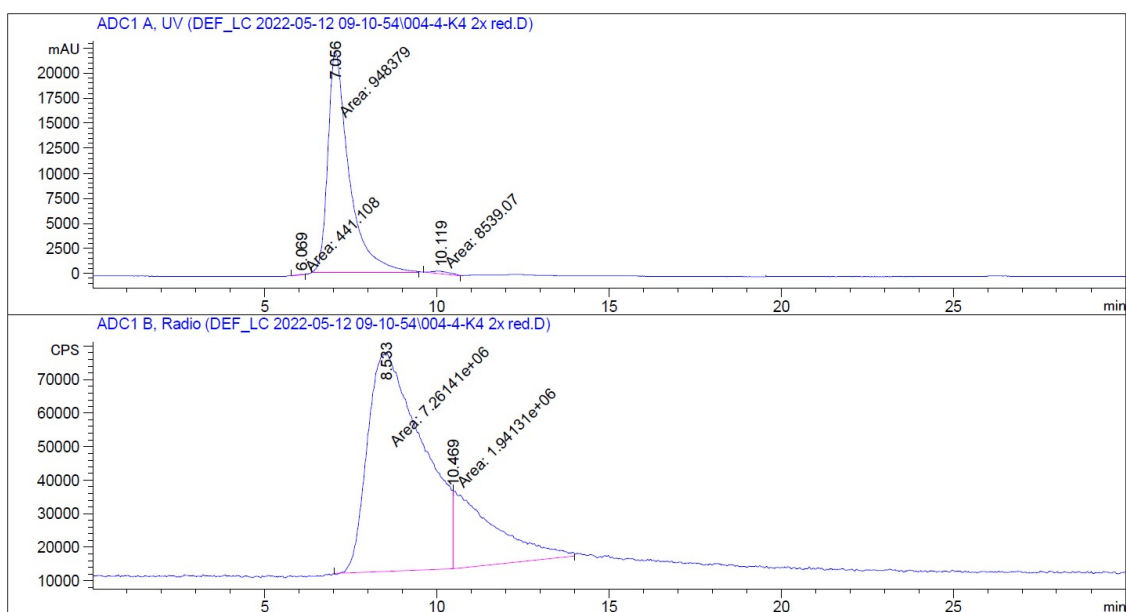


Obr. 3.6: Sken elektroforetického gelu 168 hodin po konjugaci.

3.4 Stabilita $^{89}\text{Zr-CTX-DFOSq}$

3.4.1 HPLC

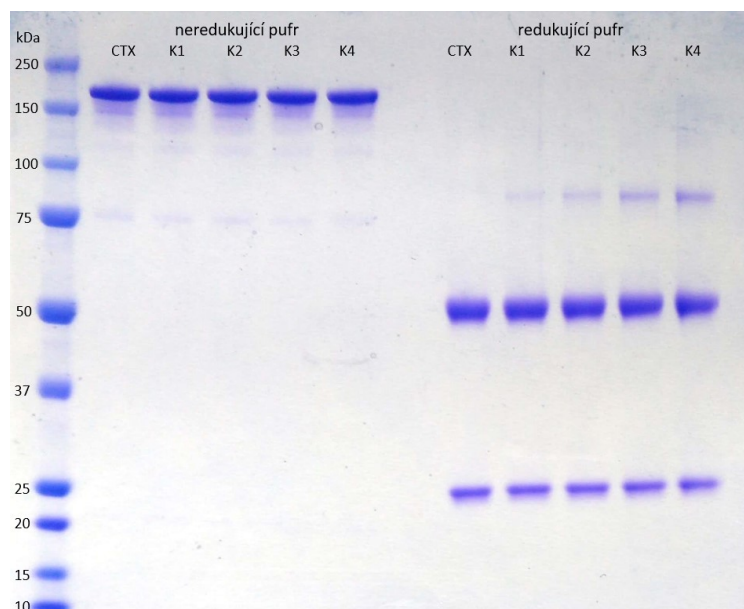
Oproti analýze neznačeného konjugátu se v UV/VIS chromatogramu vyskytují píky s retenčními časy v rozmezí 10,0 - 10,4 minut, které pravděpodobně odpovídají fragmentaci protilátky. Povaha těchto fragmentů se podle všeho u každého konjugátu liší vzhledem k rozdílnosti retenčních časů. Opět je zde nejvýraznější pík náležící cetuximabu (okolo 7 minut) a pík s kratším retenčním časem (okolo 6 minut) náležící agregátu protilátky. Agregace protilátky nepřesáhla 0,1 % u žádného ze značených konjugátů ani 120 h od značení. Fragmentace nepřesáhla 2 %. Dále byly zhotoveny chromatogramy s použitím radiometrického detektoru. Na všech těchto chromatogramech se nachází největší pík s retenčním časem okolo 8,5 minuty, který náleží cetuximabu ve značeném konjugátu. Na Obr. 3.7 se nachází chromatogramy značeného konjugátu $^{89}\text{Zr-K4}$.



Obr. 3.7: Chromatogramy značeného konjugátu K4, detekce pomocí UV/VIS ($\lambda = 280$ nm) (nahore) a pomocí radiometrického detektoru (dole).

3.4.2 SDS-PAGE

Výsledky SDS-PAGE se v jednotlivých dnech po značení prakticky neliší. Oproti neznačeným konjugátům jsou bendy při 75 kDa intenzivnější, což podporuje nález fragmentů protilátek v HPLC chromatogramu. Na Obr. 3.8 se nachází sken elektroforetického gelu 120 hodin po značení.

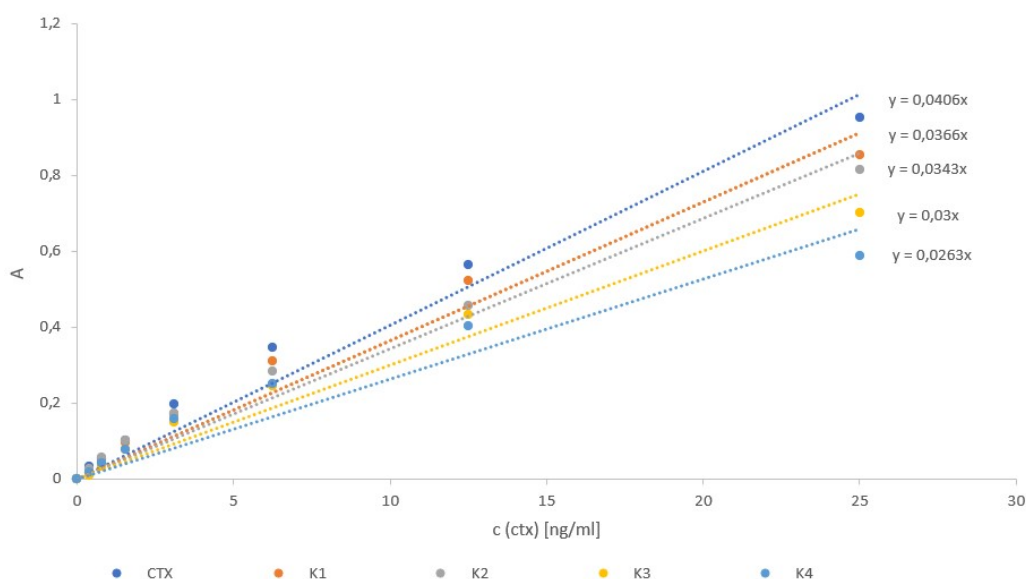


Obr. 3.8: Sken elektroforetického gelu 120 hodin po značení.

3.5 Biologická aktivita CTX-DFOSq

Byla vytvořena závislost absorbance na koncentraci všech konjugátů 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h a 168 h po konjugaci. Ve všech případech byl použit cetuximab jako referenční vzorek. Jednotlivé křivky byly proloženy přímkami. Biologická aktivita vzorku byla zjištěna podílem jeho směrnice a směrnice cetuximabu a vyjádřena v procentech. Odchylka byla zjištěna z Gaussova zákona o šíření chyb, přičemž odchylky směrnic byly zjištěny pomocí programu Gnuplot.

Na Obr. 3.9 se nachází ELISA 168 hodin po konjugaci, v grafu jsou patrné směrnice fitů pro cetuximab a konjugáty.



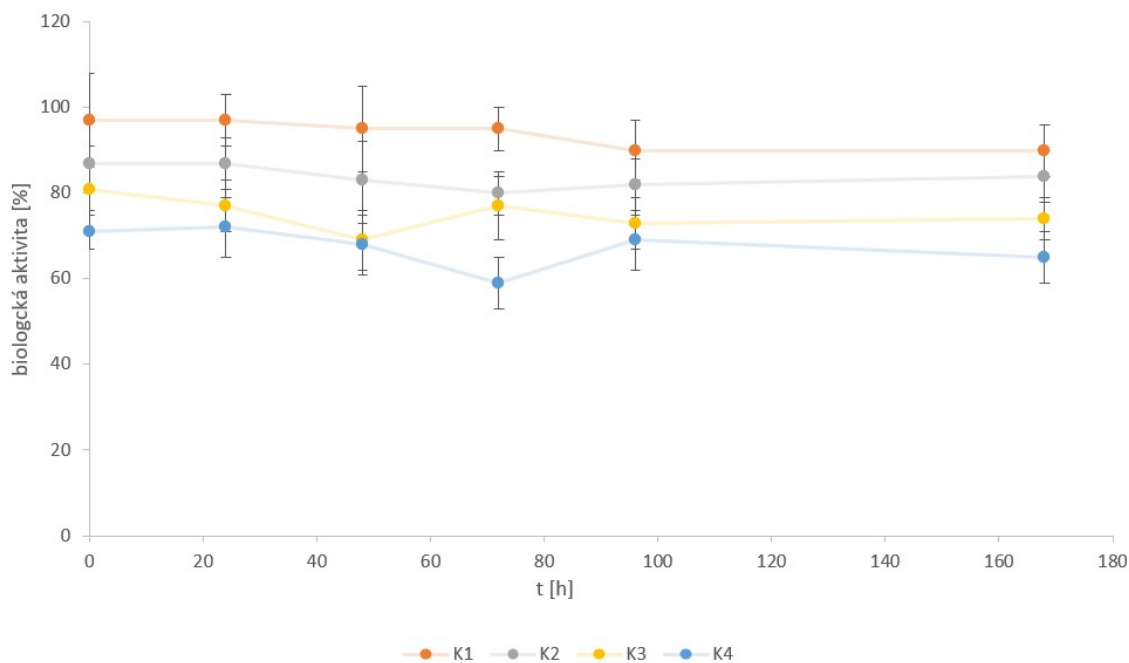
Obr. 3.9: ELISA 168 hodin po konjugaci pro všechny konjugáty, cetuximab jako referenční vzorek; lineární regrese.

V Tab. 3.4 se nachází zjištěné biologické aktivity konjugátů vůči cetuximabu. Bylo zjištěno že u konjugátů dochází k snížení biologické aktivity ihned po konjugaci. Bylo pozorováno, že čím větší byl použit nadbytek DFO oproti cetuximabu, tím k větší ztrátě biologické aktivity došlo. Toto zjištění koresponduje s výsledky z HPLC, kde byla pozorována agregace protilátky, která vede ke snížení biologické aktivity [68].

Tab. 3.4: Biologické aktivity konjugátů v jednotlivých časech po značení vzhledem v cetuximabu, v procentech.

t [h]	K1 [%]	K2 [%]	K3 [%]	K4 [%]
0	97 ± 11	87 ± 4	81 ± 6	71 ± 4
24	97 ± 6	87 ± 6	77 ± 6	72 ± 7
48	95 ± 10	83 ± 9	69 ± 7	68 ± 7
72	95 ± 5	80 ± 4	77 ± 8	59 ± 6
96	90 ± 7	82 ± 6	73 ± 6	69 ± 7
168	90 ± 6	84 ± 6	74 ± 5	65 ± 6

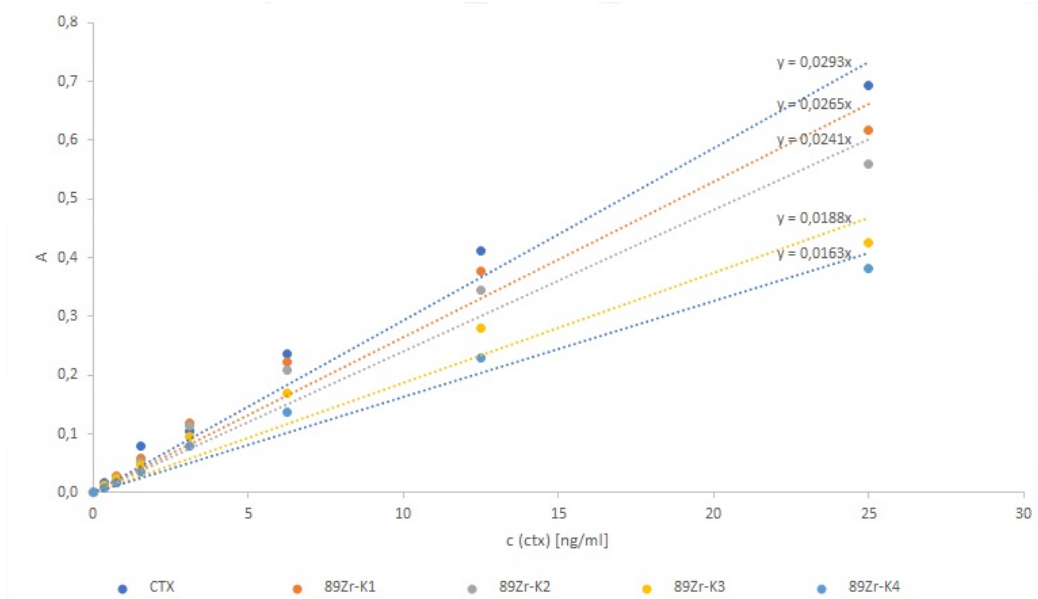
Data z Tab. 3.4 byly vyneseny do grafu na Obr. 3.10. Lze pozorovat, že nedošlo k výraznému snížení biologické aktivity v čase.



Obr. 3.10: Biologická aktivita konjugátu oproti cetuximabu v závislosti na době od konjugace.

3.6 Biologická aktivita $^{89}\text{Zr-CTX-DFOSq}$

Výhodnocení ELISA proběhlo obdobně jako u značených konjugátů, tedy jako procentuální podíl směrnice značeného konjugátu vůči směrnici cetuximabu. Na Obr. 3.11 se nachází příklad vyhodnocení pro značené konjugáty 120 h po značení.

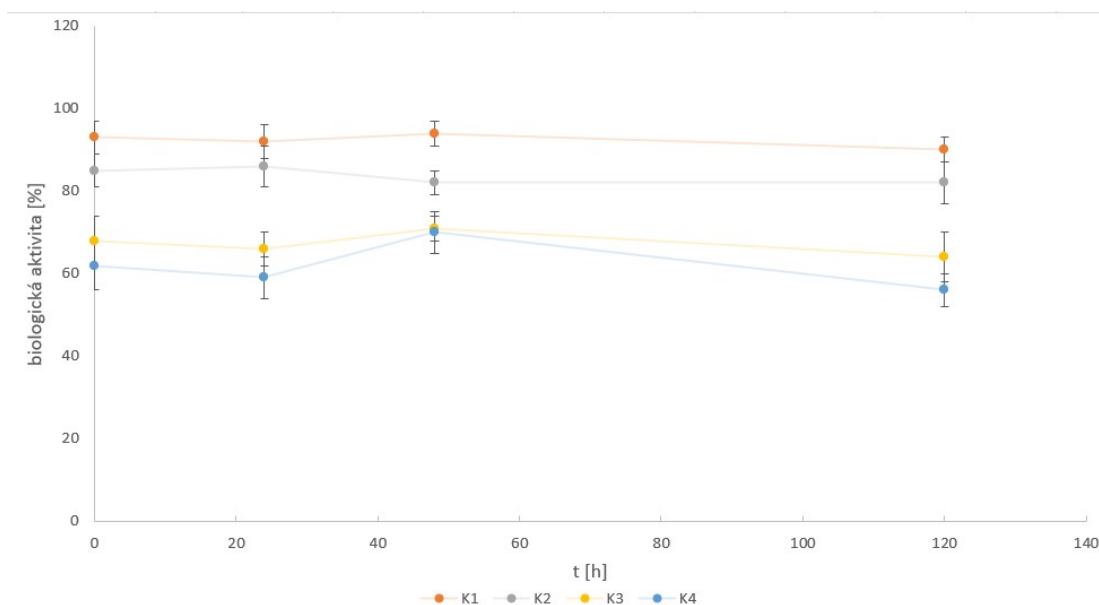


Obr. 3.11: ELISA 120 hodin po značení pro všechny značené konjugáty, cetuximab jako referenční vzorek; lineární regrese.

Zjištěné biologické aktivity jsou zaznamenány v Tab. 2.4. Oproti neznačeným konjugátům je zde patrné snížení biologické aktivity, které je nejvýraznější u konjugátů $^{89}\text{Zr-K3}$ a $^{89}\text{Zr-K4}$, na které bylo navázáno nejvíce ^{89}Zr (Tab. 2.3). Data z Tab. 2.4 byla vynesena do grafu na Obr. 3.12.

Tab. 3.5: Biologické aktivity značených konjugátů v jednotlivých časech po značení vzhledem v cetuximabu, v procentech.

t [h]	$^{89}\text{Zr-K1}$ [%]	$^{89}\text{Zr-K2}$ [%]	$^{89}\text{Zr-K3}$ [%]	$^{89}\text{Zr-K4}$ [%]
0	93 ± 4	85 ± 4	68 ± 3	62 ± 3
24	92 ± 4	86 ± 5	66 ± 3	59 ± 5
48	94 ± 6	82 ± 4	71 ± 3	70 ± 6
120	90 ± 6	82 ± 5	64 ± 5	56 ± 4



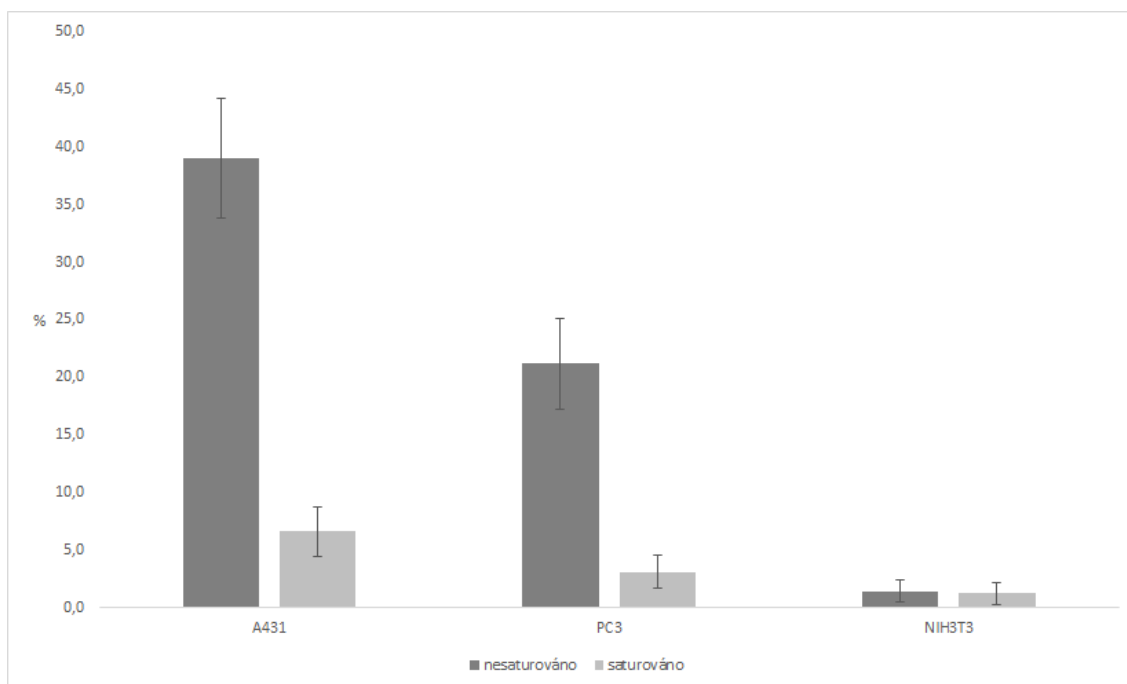
Obr. 3.12: Biologická aktivita značených konjugátů oproti cetuximabu v závislosti na době od značení.

3.7 Testování ^{89}Zr -CTX-DFOSq in vitro

Byly zjištěny četnosti impulzů ^{89}Zr v médiu a buněčných lyzátech (cpm) při dobách inkubace 0,5 h, 1 h, 3h, 12 h a 24 h v případě buněk při předchozí saturaci cetuximabem a bez předchozí saturace cetuximabem u buněk A431, PC3 a NIH3T3. Všechna stanovení probíhala v tripletech.

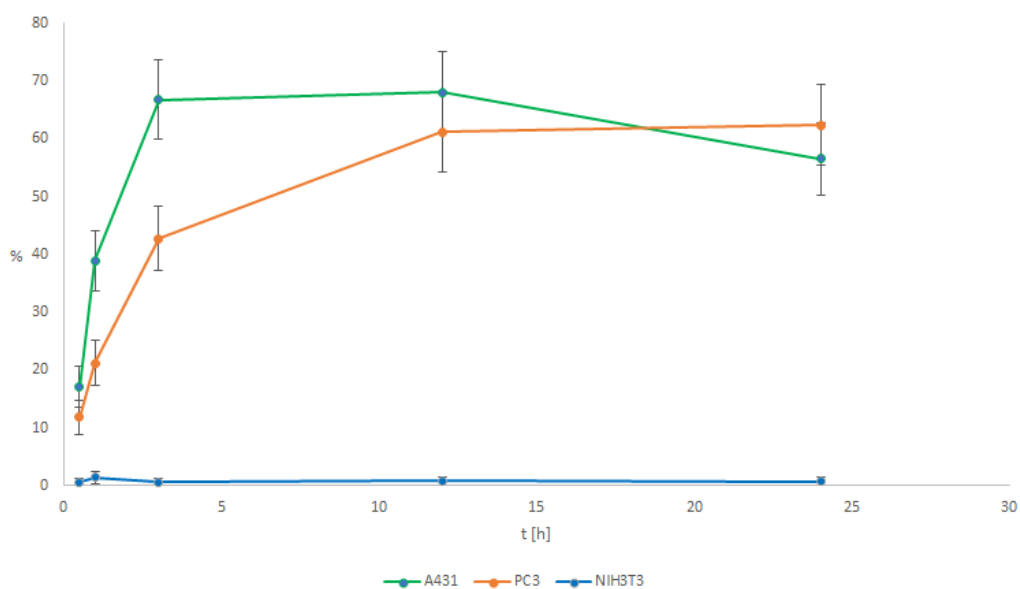
Triplety byly zprůměrovány a byla odečtena průměrná hodnota pozadí. Množství buněčně vázaného ^{89}Zr -CTX-DFOSq bylo zjištěno jako podíl četnosti impulzů lyzátu a součtu četnosti impulzů lyzátu a média, vyjádřeno v procentech. Odchytky byly zjištěny z Gaussova zákona o šíření chyb.

Specifita vazby ^{89}Zr -CTX-DFOSq na EGFR byla stanovena po 1h inkubaci. Při předchozí saturaci kleslo množství ^{89}Zr -CTX-DFOSq vázané v buňkách z $39,0 \pm 5,2\%$ na $6,6 \pm 2,1\%$ v případě A431, z $21,2 \pm 3,9\%$ na $3,1 \pm 1,5\%$ v případě PC3 a u NIH3T3 prakticky nedošlo ke změně (z $1,4 \pm 1,0\%$ na $1,2 \pm 0,9\%$). Tato data jsou znázorněna na grafu na Obr. 3.15. Linie NIH3T3 je myšího původu a tedy EGFR neexprimuje, což je v souladu se těmito výsledky. U A431 a PC3 je pokles při předchozí saturaci znatelný a lze tedy předpokládat, že se ^{89}Zr -CTX-DFOSq váže specificky k EGFR. U A431 bylo navázáno více ^{89}Zr -CTX-DFOSq u PC3, což je ve shodě se zjištěními z teoretické části.



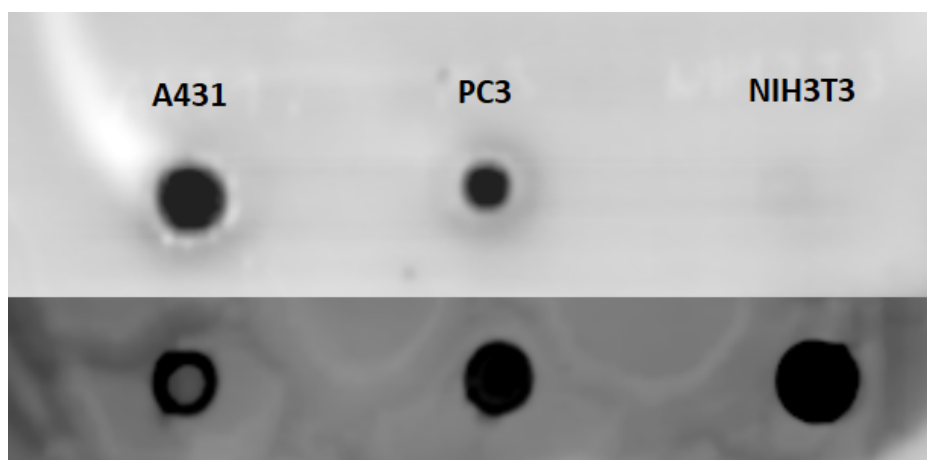
Obr. 3.13: Procento ⁸⁹Zr-CTX-DFOSq vázaného na buňkách při 1 h inkubaci.

Bylo pozorováno buněčně vázané množství ⁸⁹Zr-CTX-DFOSq v závislosti na době inkubace. U buněk A431 je patrná saturace mezi dobou inkubace 3 až 12 h. Podobnou závislost pozoroval Nordberg, 2007 [65], který ve své práci pozoroval reakci ¹²⁵I-cetuximabu a v jeho práci k saturaci docházelo při době inkubace 4-8 h. U PC3 dochází k monotónnímu růstu množství navázaného ⁸⁹Zr-CTX-DFOSq v čase. Toto pozorování se shoduje s prací Malmberg, 2011 [62].



Obr. 3.14: Procento buněčně vázaného ⁸⁹Zr-CTX-DFOSq v závislosti na době inkubace.

Expresa EGFR u buněk A431, PC3 a NIH3T3 byla stanovena pomocí Dot Blotu. U buněk A431 a PC3 byla potvrzena, u NIH3T3 nebyla detekována. Ke kontrole byla stanovena přítomnost beta aktinu, která byla pozorována u všech buněk. Zjištěné koncentrace proteinu v lyzátech jsou uvedeny v Tab. 3.6.



Obr. 3.15: Dot Blot buněčných lyzátů, primární protilátkou byla anti-EGFR (nahore) a anti-beta aktin (dole).

Tab. 3.6: Koncentrace proteinu v lyzátech.

lyzát	c [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
A431	9183
PC3	6496
NIH3T3	7473

Byla stanovena stabilita pomocí TLC ihned po konjugaci a také pro ověření stability ^{89}Zr -CTX-DFOSq v časech ukončení jednotlivých dob inkubace. Ve všech případech bylo detekováno 10 % volného ^{89}Zr . Jedná se o množství, které se nepodařilo odstranit při centrifugaci. V příštím experimentu by bylo vhodné inkubovat buňky s roztokem ^{89}Zr a zjistit, zda dochází k nespecifické vazbě na buňky.

Závěr

Byla vypracována literární rešerše, která shrnuje poznatky o možnostech testování značeného konjugátu $^{89}\text{Zr-CTX-DFOSq}$. Jedná se o ověření stability, biologické aktivity a testování *in vitro*.

Byla optimalizována metoda ELISA pro určení biologické aktivity konjugátů DFOSq-CTX a značených konjugátů $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$. K vyhodnocení byla použita lineární aproximace části kalibrační křivky v rozmezí koncentrací cetuximabu 0,39 - 25 ng/ml.

Byly připraveny konjugáty, při jejichž přípravě byl použit molární poměr cetuximabu a DFOSq 1:5 (K1), 1:10 (K2), 1:20 (K3) a 1:50 (K4). Pomocí HPLC bylo zjištěno, že dochází k částečné agregaci protilátky. V případě konjugátů K1-3 nepřesahuje agregace 0,3 %, u konjugátu K4 je to méně než 1 %. Analýza pomocí SDS-PAGE potvrdila, že největší strukturální poškození vykazuje konjugát K4. Pomocí metody ELISA byl pozorován úbytek biologické aktivity cetuximabu v konjugátu ihned po konjugaci, který závisel na molárním nadbytku DFOSq. S časem uplynulým od konjugace nedošlo k výraznému úbytku biologické aktivity.

Připravené konjugáty byly označeny pomocí ^{89}Zr . Na HPLC chromatogramech byla pozorována agregace (méně než 0,1 %) a fragmentace (méně než 2 %) protilátky. Pomocí metody ELISA bylo zjištěno, že dochází ke snížení biologické aktivity oproti neznačeným konjugátům. Tento trend je více patrný u konjugátů, na které bylo navázáno větší množství ^{89}Zr . V průběhu uplynulého času od značení nedocházelo k výraznému úbytku biologické aktivity.

Optimalizací značení bylo docíleno vyššího množství ^{89}Zr vázaného na konjugát (40 %). V další práci je třeba provést studii stability a biologické aktivity těchto konjugátů a značených konjugátů.

Byla potvrzena specifita vazby $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$ na buněčných liniích A431 a PC3. Expres EGFR těmito buňkami byla potvrzena pomocí metody Dot Blot. Na buňkách A431 bylo největší množství $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$ vázáno v rozmezí 4-12 h po počátku inkubace, následně dochází k poklesu. U buněk PC3 byl pozorován monotónní růst buněčně vázaného $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$ v čase. V další práci je třeba zjistit, zda dochází k nespecifickým vazbám ^{89}Zr na buňky a provést stanovení míry internalizace $^{89}\text{Zr-DFOSq-CTX}$.

Literatura

- [1] GARRETT, Alfred B. Radioactive tracers: George de Hevesy. *Journal of Chemical Education*. 1963, **40**(1), 36-37. ISSN 0021-9584.
- [2] CHUNG, Hye Rim. Iodine and thyroid function. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2014, **19**(1), 8-12. ISSN 2287-1012. Dostupné z: doi:10.6065/apem.2014.19.1.8
- [3] KOMAL, Sana, Sana NADEEM, Zahra FAHEEM, Arouma RAZA, Komal SARWER, Hijab UMER, Samina ROOHI a Syed ALI RAZA NAQVI. Localization Mechanisms of Radiopharmaceuticals. *Medical Isotopes*. IntechOpen, 2021, 2021-1-7. ISBN 978-1-83880-627-9.
- [4] DOBIÁŠOVÁ, Lucie. *Značení protilátky cetuximab pomocí Zr-89*. Praha, 2021. Bakalářská práce. České vysoké učení technické, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská. Vedoucí práce Ing. Jaroslav Červenák, Ph.D..
- [5] Český lékopis 2017. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-802-7105-007.
- [6] CHERRY, Simon R. a Magnus DAHLBOM. PET: Physics, Instrumentation, and Scanners. PET [online]. New York, NY: Springer New York, 2006, 1-117 [cit. 2023-02-02]. ISBN 978-0-387-32302-2.
- [7] WEI, Weijun, Zachary T. ROSENKRANS, Jianjun LIU, Gang HUANG, Quan-Yong LUO a Weibo CAI. ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem. Rev.* 2020, **120**(8), 3787–3851.
- [8] MANAFI-FARID, Reyhaneh et al. ImmunoPET: Antibody-Based PET Imaging in Solid Tumors. *Frontiers in Medicine*. 2022, 9. ISSN 2296-858X.
- [9] HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
- [10] SOBOTKOVÁ, Marta a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. *Remedia* . 2008, **18**(5), 356-364.
- [11] COOPER, Geoffrey M. The Development and Causes of Cancer. In: *The Cell: A Molecular Approach* [online]. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000 [cit. 2023-03-09]. ISBN 0-87893-106-6. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

- [12] KURILOV, Roman, Benjamin HAIBE-KAINS a Benedikt BRORS. Assessment of modelling strategies for drug response prediction in cell lines and xenografts. *Scientific Reports*.2020, **10**(1). ISSN 2045-2322.
- [13] RINNE, Sara S., Anna ORLOVA a Vladimir TOLMACHEV. PET and SPECT Imaging of the EGFR Family (RTK Class I) in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(7). ISSN 1422-0067.
- [14] ZHANG, Hongtao et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest*. 2007, **117**(8), 2051–2058.
- [15] HENNRICH, Ute a Matthias EDER. [68Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals*.2021, **14**(8). ISSN 1424-8247.
- [16] DERI, Melissa A., Brian M. ZEGLIS, Lynn C. FRANCESCONI a Jason S. LEWIS. : 89Zr: From radiochemistry to the clinic. *Nuclear Medicine and Biology*. 2013, **40**(1), 3-13. ISSN 09698051.
- [17] SORKIN, Alexander a Jason E. DUEX. Quantitative Analysis of Endocytosis and Turnover of Epidermal Growth Factor (EGF) and EGF Receptor. *Current Protocols in Cell Biology*. 2010, **46**(1). ISSN 1934-2500.
- [18] WEE, Ping a Zhixiang WANG. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*. 2017, **9**(5). ISSN 2072-6694.
- [19] RUDE VOLDBORG, B. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology*. 1997, **8**(12), 1197-1206. ISSN 09237534.
- [20] DAY, Kathleen C., Guadalupe Lorenzatti HILES, Molly KOZMINSKY, et al. HER2 and EGFR Overexpression Support Metastatic Progression of Prostate Cancer to Bone. *Cancer Research*.2017, **77**(1), 74-85. ISSN 0008-5472.
- [21] SESHACHARYULU, Parthasarathy et al. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2012, **16**(1), 15-31. ISSN 1472-8222.
- [22] Erbitux - Souhrn údajů o přípravku. SÚKL [online]. Praha [cit. 2023-03-13]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/erbitux-epar-product-information_cs.pdf
- [23] GARCÍA-FONCILLAS, Jesús, Yu SUNAKAWA, Dan ADERKA, Zev WAINBERG, Philippe RONGA, Pauline WITZLER a Sebastian STINTZING. Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Frontiers in Oncology*.2019, 9. ISSN 2234-943X.
- [24] PATEL, Dipa, Xuemei GUO, Stanley NG, et al. IgG isotype, glycosylation, and EGFR expression determine the induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro by cetuximab. *Human Antibodies*. 2010, **19**(4), 89-99. ISSN 1875869X.

- [25] TAN, Antoinette R., Dirk F. MOORE, Manuel HIDALGO, James H. DOROSHOW, Elizabeth A. POPLIN, Susan GOODIN, David MAURO a Eric H. RUBIN. Pharmacokinetics of Cetuximab After Administration of Escalating Single Dosing and Weekly Fixed Dosing in Patients with Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*.2006, **12**(21), 6517-6522. ISSN 1078-0432.
- [26] Nudat 2.8 [online]. National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: <https://www.nndc.bnl.gov/nudat2/>
- [27] HOLLAND, Jason P., Yiauchung SHEH a Jason S. LEWIS. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nuclear Medicine and Biology*.2009, **36**(7), 729-739. ISSN 09698051.
- [28] TANG, Yu, Shuntao LI, Yuanyou YANG, et al. A simple and convenient method for production of ^{89}Zr with high purity. *Applied Radiation and Isotopes*. 2016, 118, 326-330. ISSN 09698043.
- [29] QUEERN, Stacy Lee, Tolulope Aramide AWEDA, Adriana Vidal Fernandes MASSICANO, Nicholas Ashby CLANTON, Retta EL SAYED, Jayden Andrew SADER, Alexander ZYUZIN a Suzanne Elizabeth LAPI. Production of Zr-89 using sputtered yttrium coin targets. *Nuclear Medicine and Biology*.2017, 50, 11-16. ISSN 09698051.
- [30] KANDIL, S. A., B. SCHOLTEN, Z. A. SALEH, A. M. YOUSSEF, S. M. QAIM a H. H. COENEN. A comparative study on the separation of radiozirconium via ion-exchange and solvent extraction techniques, with particular reference to the production of ^{88}Zr and ^{89}Zr in proton induced reactions on yttrium. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2007, **274**(1), 45-52. ISSN 0236-5731.
- [31] OMARA, H. M., K. F. HASSAN, S. A. KANDIL, F. E. HEGAZY a Z. A. SALEH. Proton induced reactions on ^{89}Y with particular reference to the production of the medically interesting radionuclide ^{89}Zr . *Radiochimica Acta*. 2009, **97**(9). ISSN 0033-8230.
- [32] PANDEY, Mukesh K., Hendrik P. ENGELBRECHT, John F. BYRNE, Alan B. PACKARD a Timothy R. DEGRADO. Production of ^{89}Zr via the $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ reaction in aqueous solution: Effect of solution composition on in-target chemistry. *Nuclear Medicine and Biology*. 2014, **41**(4), 309-316. ISSN 09698051.
- [33] Recommended cross sections with estimated uncertainties for the $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ reaction. Nuclear Data Services: International Atomic Energy Agency [online]. c2007-2023, 2018 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://www-nds.iaea.org/medical/y9p89zr0.html>
- [34] *Multi-Agency Radiological Laboratory Analytical Protocols Manual (MARLAP) Volume II* . [online]. [cit. 2021-4-16]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/radiation/marlap-manual-and-supporting-documents>.

- [35] DEJESUS, O.T. a R.J. NICKLES. Production and purification of ^{89}Zr , a potential PET antibody label. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes*. 1990, **41**(8), 789-790. ISSN 08832889.
- [36] VEREL, Iris, Gerard W.M. VISSER, Ronald BOELLAARD, Marijke STIGTER-VAN WALSUM, Gordon B. SNOW a Guus A.M.S VAN DONGEN. ^{89}Zr Immuno-PET: Comprehensive Procedures for the Production of ^{89}Zr -Labeled Monoclonal Antibodies. *J Nucl Med*. 2003, **44**(8), 1271-1281.
- [37] ZWEIT, J., S. DOWNEY a H. L. SHARMA. Production of No-carrier-added Zirconium-89 for Positron Emission Tomography. *Appl. Radial. Isot.* 1991, **42**(2), 199-201.
- [38] AERTS, Hugo J.W.L., Ludwig DUBOIS, Tilman M. HACKENG, et al. Development and evaluation of a cetuximab-based imaging probe to target EGFR and EGFRvIII. *Radiotherapy and Oncology* . 2007, **83**(3), 326-332. ISSN 01678140.
- [39] YOON, Joon-Kee, Bok-Nam PARK, Eun-Kyoung RYU, Young-Sil AN a Su-Jin LEE. Current Perspectives on ^{89}Zr -PET Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(12). ISSN 1422-0067.
- [40] ABOU, Diane S., Thomas KU a Peter M. SMITH-JONES. In vivo biodistribution and accumulation of ^{89}Zr in mice. *Nuclear Medicine and Biology*. 2011, **38**(5), 675-681. ISSN 09698051.
- [41] PATRA, Malay, Andreas BAUMAN, Cristina MARI, Christiane A. FISCHER, Olivier BLACQUE, Daniel HÄUSSINGER, Gilles GASSER a Thomas L. MINDT. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. *Chem. Commun* . 2014, **50**(78), 11523-11525. ISSN 1359-7345.
- [42] CHOMET, Marion, Maxime SCHREURS, Maria J. BOLIJN, et al. Head-to-head comparison of DFO* and DFO chelators: selection of the best candidate for clinical ^{89}Zr -immuno-PET. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2021, **48**(3), 694-707. ISSN 1619-7070.
- [43] ROUSSEAU, Julie, Zhengxing ZHANG, Gemma M. DIAS, Chengcheng ZHANG, Nadine COLPO, François BÉNARD a Kuo-Shyan LIN. Design, synthesis and evaluation of novel bifunctional tetrahydroxamate chelators for PET imaging of ^{89}Zr -labeled antibodies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2017, **27**(4), 708-712. ISSN 0960894X.
- [44] RUDD, Stacey E., Peter ROSELT, Carleen CULLINANE, Rodney J. HICKS a Paul S. DONNELLY. A desferrioxamine B squaramide ester for the incorporation of zirconium-89 into antibodies. *Chemical Communications*. 2016, **52**(80), 11889-11892. ISSN 1359-7345.
- [45] NOOR, Asif, Jessica K. VAN ZUYLEKOM, Stacey E. RUDD, et al. Bivalent Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen Conjugated to Desferrioxamine B Squaramide Labeled with Zirconium-89 or Gallium-68 for Diagnostic

- Imaging of Prostate Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, **63**(17), 9258-9270. ISSN 0022-2623.
- [46] RUDD, Stacey. *Electronic Supplementary Material (ESI)* [online]. ChemComm, The Royal Society of Chemistry 2016 [cit. 2023-03-16]. 2016. Dostupné z: <http://www.rsc.org/suppdata/c6/cc/c6cc05961a/c6cc05961a1.pdf>
- [47] DAMEROW, Helen, Xia CHENG, Valeska VON KIEDROWSKI, Ralf SCHIRRMACHER, Björn WÄNGLER, Gert FRICKER a Carmen WÄNGLER. Toward Optimized ⁸⁹Zr-Immuno-PET: Side-by-Side Comparison of [⁸⁹Zr]Zr-DFO-, [⁸⁹Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)- and [⁸⁹Zr]Zr-DFO*-Cetuximab for Tumor Imaging. *Pharmaceutics*. 2022, **14**(10). ISSN 1999-4923.
- [48] BHATIA, Saurabh. Introduction to animal tissue culture science. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 3* [online]. IOP Publishing, 2019, [cit. 2023-04-29]. ISBN 978-0-7503-1347-6. Dostupné z: doi:10.1088/2053-2563/aafac0ch1.
- [49] GAROUSI, JAVAD, KEN G. ANDERSSON, BOGDAN MITRAN, MARIE-LOUISE PICHL, STEFAN STÅHL, ANNA ORLOVA, JOHN LÖFBLOM a VLADIMIR TOLMACHEV. PET imaging of epidermal growth factor receptor expression in tumours using ⁸⁹Zr-labelled ZEGFR: 2377 affibody molecules. *International Journal of Oncology*. 2016, **48**(4), 1325-1332. ISSN 1019-6439.
- [50] BENEDETTO, Raquel, Adriana V.F. MASSICANO, Bryant K. CRENSHAW, Renato OLIVEIRA, Rui M. REIS, Elaine B. ARAÚJO a Suzanne E. LAPI. ⁸⁹Zr-DFO-Cetuximab as a Molecular Imaging Agent to Identify Cetuximab Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2019, **34**(5), 288-296. ISSN 1084-9785. Dostupné z: doi:10.1089/cbr.2018.2616
- [51] ELISA: Types of ELISA. *Bio-Rad* [online]. [cit. 2022-05-30]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>
- [52] OPD Substrate Tablets (o-phenylenediamine dihydrochloride). *Termofisher* [online]. [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/34006>
- [53] TMB Substrate Solution. *Termofisher* [online]. [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N301>
- [54] P-Nitrophenyl Phosphate Substrate Buffer. Merck KGaA [online]. [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/p-Nitrophenyl-Phosphate-Substrate-Buffer,EMD_BIO-487664
- [55] SUÁREZ, Inmaculada, Antonio SALMERÓN-GARCÍA, José CABEZA, Luis Fermín CAPITÁN-VALLVEY a Natalia NAVAS. Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies. *Journal of Chromatography B*. 2016, 1032, 155-164. ISSN 15700232.

- [56] CÉZÉ, Nicolas et al. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Cetuximab. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2009, **31**(5), 597-601.
- [57] HANTASH, Jamil, Mary SMIDT a Ronald R. BOWSHER. The development, optimization and validation of an ELISA bioanalytical method for the determination of Cetuximab in human serum. *Analytical Methods*. 2009, **1**(2). ISSN 1759-9660.
- [58] AL-SHEHRI, Mona M., Manal A. EL-GENDY a Ibrahim A. DARWISH. Development of Specific New ELISA for Bioanalysis of Cetuximab: A Monoclonal Antibody Used for Cancer Immunotherapy. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2018, **14**(5), 519-525. ISSN 15734129.
- [59] STEINITZ, M. Quantitation of the Blocking Effect of Tween 20 and Bovine Serum Albumin in ELISA Microwells . *Analytical Biochemistry*. 2000, **282**(2), 232–238.
- [60] Ping Li, W., Meyer, L. A., Capretto, D. A., Sherman, C. D., & Anderson, C. J. (2008). Receptor-Binding, Biodistribution, and Metabolism Studies of ⁶⁴Cu-DOTA-Cetuximab, a PET-Imaging Agent for Epidermal Growth-Factor Receptor-Positive Tumors. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, **23**(2), 158–171.
- [61] ZHANG, Fenni, Shaopeng WANG, Linliang YIN, Yunze YANG, Yan GUAN, Wei WANG, Han XU a Nongjian TAO. Quantification of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Level and Binding Kinetics on Cell Surfaces by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Analytical Chemistry*. 2015, **87**(19), 9960-9965. ISSN 0003-2700.
- [62] MALMBERG, Jennie, Vladimir TOLMACHEV a Anna ORLOVA. Imaging agents for in vivo molecular profiling of disseminated prostate cancer - targeting EGFR receptors in prostate cancer: Comparison of cellular processing of [¹¹¹In]-labeled affibody molecule ZEGFR. *International Journal of Oncology*. 2011, **38**(4). ISSN 1019-6439.
- [63] SHIGETA, Kohei, Tetsu HAYASHIDA, Yoshinori HOSHINO, et al. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor Detected by Cetuximab Indicates Its Efficacy to Inhibit In Vitro and In Vivo Proliferation of Colorectal Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2013, **8**(6). ISSN 1932-6203.
- [64] AERTS, Hugo J.W.L., Ludwig DUBOIS, Lars PERK, Peter VERMAELEN, Guus A.M.S. VAN DONGEN, Bradly G. WOUTERS a Philippe LAMBIN. Disparity Between In Vivo EGFR Expression and ⁸⁹Zr-Labeled Cetuximab Uptake Assessed with PET. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009, **50**(1), 123-131. ISSN 0161-5505.
- [65] NORDBERG, Erika, Mikaela FRIEDMAN, Lovisa GÖSTRING, et al. Cellular studies of binding, internalization and retention of a radiolabeled EGFR-binding affibody molecule. *Nuclear Medicine and Biology*. 2007, **34**(6), 609-618. ISSN 09698051.

- [66] BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, (72), 248-254.
- [67] LOTTSPREICH, Friedrich a ENGELS, Joachim W., ed. *Bioanalytics: analytical methods and concepts in biochemistry and molecular biology*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2018. ISBN 978-3-527-33919-8.
- [68] LI, Wei, Ponraj PRABAKARAN, Weizao CHEN, Zhongyu ZHU, Yang FENG a Dimiter DIMITROV. Antibody Aggregation: Insights from Sequence and Structure. *Antibodies*. 2016, **5**(3). ISSN 2073-4468.