



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

OPONENTSKÝ POSUDEK

disertační práce Ing. Kateřiny Ondrák Fialové „Příprava preparátu ^{68}Ga a značení HER2 cílicích protilátek“

Charakterizace disertační práce

Předložená disertační práce z oblasti jaderné chemie je souborem několika souvisejících experimentálních studií, zaměřených na vývoj nového způsobu přípravy diagnostického radionuklidu galia-68 a ověření jeho radiofarmaceutické aplikace v kombinaci s terapeutickým alfa-zářičem. Součástí práce byl tedy jak radiochemický vývoj přípravy daného radionuklidu, tak vývoj značení vybraných biomolekul a jejich biologické *in vitro* a *in vivo* testování. Cílem této poslední části práce bylo ověřit možnosti využití vypracovaných radiochemických postupů v oblasti značení anti-HER2 monoklonálních protilátek. Při řešení uvedené problematiky byl použit rozsáhlý aparát analytických, radiochemických a biologických metod. Všechny provedené studie mají povahu experimentálních výzkumných prací.

Zhodnocení disertační práce

Předložená disertační práce je tvořena teoretickým úvodem, komentářem popisujícím výsledky publikované autorkou a přílohou obsahující soubor textů čtyř publikovaných prací doktorandky. Ve všech uvedených vědeckých článcích je uchazečka prvním autorem. První publikace má charakter přehledového článku a skládá se ze dvou částí zveřejněných v recenzovaném časopise. Ostatní tři publikace byly publikovány v odborných vědeckých časopisech s impaktním faktorem mezi 1.6-3.1. Zaměření a obsah všech připojených publikací přímo souvisí s tématem předložené disertační práce. K uvedenému souboru odborných prací je dále připojen i text přijatého užitého vzoru registrovaného u Úřadu pro průmyslové vlastnictví, kde je doktorandka uvedená jako druhý autor. Uchazečka publikovala i další vědecké práce, které přímo nesouvisejí s tematikou disertační práce, jejich zaměření je však také radiochemické.

Oblast vědecké tematiky, kterou se autorka ve své práci zabývala, plně odpovídá oboru. Cíle práce jsou v předložené disertační práci jasně deklarovány, logicky na sebe navazují a publikované studie tyto cíle naplňují. Zaměření práce na vývoj modifikované metody přípravy galia-68 a navazující aplikaci při zkoumání teranostických možností ve spojení s alfa-zářičem actiniem-225 je vzhledem k vývoji v oblasti nukleární medicíny a intenzivnímu nástupu nových radionuklidů charakteru alfa-zářičů vysoce aktuální. Disertační práce splňuje po formální stránce předepsané požadavky, výskyt formálních chyb či nedostatků je minimální.

V úvodu autorka popisuje současný stav poznání v dané oblasti a shrnuje základní teoretická východiska provedených experimentálních studií. Poměrně přehledně a názorně zde charakterizuje využití monoklonálních protilátek v současné terapii, shrnuje základní metody přípravy radioimunokonjugátů a aplikaci těchto biomolekul při radiodiagnostice a radioterapii HER2-pozitivních nádorů. Obsah přehledu umožňuje čtenářům vytvořit si dostatečný teoretický základ pro pochopení v práci uvedených výsledků experimentální práce. Přehled je

psán fundovaně a jeho rozsah je přiměřený charakteru práce. Ocenit je třeba připojený seznam zkratk, bez něhož by jinak orientace v textu byla obtížnější.

V praktické části jsou uvedeny komentáře k jednotlivým publikacím, které byly zahrnuty do disertační práce. Výsledky první části práce zaměřené na vývoj generátoru s modifikovaným adsorpčním systémem uvádí velmi pečlivou analýzu ověřující strukturní parametry studovaného oxidu ceričitého. Počet analytických metod použitých v rámci tohoto ověřování je více než 10. Tento přístup umožnil velmi důkladnou charakterizaci připravených nanokrystalů a potvrdil jejich kvalitu nutnou pro aplikaci v generátorovém systému. Výsledky dalších experimentů charakterizujících sorpci mateřského a dceřiného radionuklidu na nosič umožnily vybrat optimální způsob separace a eluce galia-68 z generátoru. Z výsledků analyzujících zkonstruovaný generátorový systém je třeba vyzdvihnout dva v této části uvedené údaje. Prvním kladem zavedené metody je skutečnost, že eluční profil galia-68 se v dlouhém časovém intervalu významně nemění, což zaručuje dlouhodobou reprodukovatelnost získaného preparátu. Druhou pozitivní vlastností modifikované metody je nízká a konstantní kontaminace eluátu cerem.

V části, která uvádí nepublikované výsledky (kapitola 5), se jeví jako přínosné porovnání vhodnosti dvou chelátorů DOTA a NOTA pro značení protilátky aktiniem-225, což může mít i obecnější význam pro radioaktivní značení jiných podobných biomolekul. Provedené radiofarmaceutická testy ukazují na vysokou stabilitu a kvalitu připravených radioimunokonjugátů, což je zásadním předpokladem pro biologické testování. Při rychlé degradaci by mohlo docházet ke zkracování eliminačního poločasu radioterapeutika a případně i zvýšené nežádoucí kumulaci radionuklidu v necílových orgánech. Afinitní studie *in vitro* potvrdily specifickou vazbu připravených protilátek na buňky exprimující příslušné receptory, což dokládá zachování biologických vlastností důležitých pro cílení protilátek. Stanovení biodistribuce zvolené protilátky ukázalo poměrně očekávaný obraz, z kterým se setkáváme i u jiných radioimunokonjugátů. Kladem je vysoká akumulace v modelovém HER2 pozitivním nádoru. Avšak projevila se i obvyklá distribuční charakteristika protilátek spočívající v relativně vysoké akumulaci ve slezině. Poměrně nízký nárůst kumulace radioaktivity v kostech během sledovaného intervalu 7 dní svědčí o dobré stabilitě *in vivo* a potvrzuje výsledky získané *in vitro*. Z hlediska standardního designu testování vývojových radiofarmak by bylo žádoucí ještě uvedenou studii doplnit některými dalšími testy (viz připomínky) a vyhnout se tak případným námitkám recenzentů.

Připomínky a dotazy oponenta:

O odpovídající úrovni vědecko-výzkumné práce uchazečky svědčí skutečnost, že autorka publikovala výsledky své práce ve formě několika odborných sdělení v recenzovaných časopisech, ve třech případech s impaktním faktorem. Všechny publikace, které jsou součástí této disertační práce, tedy prošly recenzním řízením v kvalitních odborných časopisech. Zásadní připomínky, které by zpochybňovaly cíle, metody, výsledky či závěry práce oponent nemá. Následující připomínky a dotazy oponenta jsou proto zaměřeny hlavně na upřesnění některých údajů uvedených v teoretickém úvodu, v jednotlivých publikacích, a především v části uvádějící zatím nepublikované výsledky:

1. K formální stránce práce má oponent jen jednu připomínku týkající se uvádění značených sloučenin. Pokud se jedná o konkrétní sloučeninu (např. radioimunokonjugát), pak dle platné mezinárodní nomenklatury by označení radionuklidu mělo být uvedeno v hranaté závorce a za ní označení daného prvku a název protilátky – např. [²²⁵Ac]Ac-DOTA-pertuzumab.
2. Vzhledem k tomu, že k výsledkům práce doktorandky patří užitečný vzor modifikovaného generátorového systému pro galium-68, nabízí se otázka, zda se uvažuje o dalším kroku ve vývoji případného nového typu tohoto generátoru.

3. Z difraktogramu připraveného oxidu ceričitého (obr. 14) dovozujete, že velikost krystalitů je s malou odchylkou cca 11 nm (str. 67). Avšak zobrazení získané elektronovou mikroskopií (obr. 16b) naznačuje nehomogenní velikost částic.

4. Biodistribuční *in vivo* studie se značenými protilátkami by měly zahrnovat i porovnání s farmakokinetikou shodně značené nescifické protilátky. Provedli jste, případně připravujete takovou studii umožňující diferencovat mezi specifickou a nescifickou tkáňovou vazbou testovaného radioimunokonjugátu? Podobně by bylo žádoucí provést ještě studii stability radioimunokonjugátů v myší plazmě.

5. Po konjugaci a značení radionuklidem zpravidla dochází v důsledku modifikace struktury ke snížení afinity monoklonálních protilátek na cílový antigen/receptor. Můžete porovnat vámi stanovené afinitní parametry (str. 92) s údaji pro nativní formy testovaných protilátek?

6. V rámci biodistribučních studií uvádíte množství radioaktivity v orgánech zvířat v přepočtu na gram tkáně. V tomto pohledu je kumulovaná aktivita ve slezině poměrně vysoká. Jaké by byly aktivity ve slezině ve vztahu k aplikované dávce při vztažení na celý orgán?

Závěr:

Na základě výše uvedených skutečností konstatuji, že předložená práce Ing. Kateřiny Ondrák Fialové „Příprava preparátu ^{68}Ga a značení HER2 cílicích protilátek“ splňuje požadavky kladené na doktorskou disertační práci v daném oboru a dokumentuje schopnost autorky samostatně vědecky pracovat na odpovídající úrovni. Doporučuji proto uvedenou disertační práci k obhajobě, na jejímž základě by byl udělen uchazečce titul Ph.D.

V Hradci Králové dne 15.8. 2024

prof. PharmDr. František Trejtnar, CSc.