

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie

Obor: Jaderná chemie



Značení protilátky cetuximab pomocí Zr-89

Labelling of cetuximab antibody with Zr-89

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracoval: Lucie Dobiášová

Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Červenák, Ph.D.

Rok: 2021

Prohlášení

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

V Praze dne

.....
Lucie Dobiášová

Poděkování

Děkuji Ing. Jaroslavu Červenákovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Markétě Kleinové za pomoc při experimentech a za její nekonečnou trpělivost a Ing. Haně Vinšové, Ph.D. za cenné rady a laskavou podporu. Všem zmíněným bych ráda poděkovala za čas, který mi věnovali.

Lucie Dobiášová

Název práce:

Značení protilátky cetuximab pomocí Zr-89

Autor: Lucie Dobiášová

Studijní program: Aplikace přírodních věd

Obor: Jaderná chemie

Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Červenák, Ph.D.

Ústav jaderné fyziky Akademie věd ČR

Konzultant: RNDr. Martin Vlk, Ph.D.

Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
ČVUT

Abstrakt: Tato bakalářská práce se zabývá značením protilátky cetuximab pomocí ^{89}Zr . Literární rešerše je věnována problematice využití ^{89}Zr v immunoPET a shrnuje možnosti jeho chelatace. Dále se věnuje cetuximabu, což je uvedeno do kontextu s funkcí protilátek v imunitním systému. Byly popsány možnosti konjugace protilátky a chelátoru. V rámci experimentů se práce zabývala studiem poškození struktury cetuximabu po chelataci a po označení ^{89}Zr . Zirkonium-89 bylo připraveno reakcí $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ a následně separováno. Jako chelátor byl použit $\text{H}_3\text{DFOSqOEt}$. Byl zkoumán optimální molární poměr cetuximabu a $\text{H}_3\text{DFOSqOEt}$ pro konjugaci. Vzniklý konjugát byl značen ^{89}Zr o různé aktivity. Pro zjištění poškození struktury cetuximabu byla využita elektroforéza (SDS-PAGE) a HPLC. Pro značení byl vybrán konjugát s molárním poměrem 1:20. Bylo zjištěno, že protilátka nevykazuje větší poškození ani tři dny po značení.

Klíčová slova: cetuximab, ^{89}Zr , $\text{H}_3\text{DFOSqOEt}$, SDS-PAGE, HPLC

Title:

Labelling of cetuximab antibody with Zr-89

Author: Lucie Dobiášová

Abstract: This bachelor's thesis is focused on labelling of cetuximab antibody with ^{89}Zr . In the first part the usage of ^{89}Zr in immunoPET is discussed and the possibilities of chelation are mentioned. Cetuximab is introduced in the context of function of antibodies in the immune system. The methods of conjugation of antibodies and chelators are described. The aim of the experimental part was to study changes in the structure of cetuximab antibody after labelling. Zirconium-89 was prepared by $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ reaction and then separated. $\text{H}_3\text{DFOSqOEt}$ was used as a chelator. The optimal molar ratio of cetuximab and $\text{H}_3\text{DFOSqOEt}$ was studied. The prepared conjugate was labelled with ^{89}Zr . For analyses SDS-PAGE and HPLC were used. For labelling the conjugate with molar ratio 1:20 was chosen. Three days after labelling only minimal structural changes were recognized in the antibody.

Key words: cetuximab, ^{89}Zr , $\text{H}_3\text{DFOSqOEt}$, SDS-PAGE, HPLC

Obsah

Úvod	9
1 Teoretická část	13
1.1 PET	13
1.1.1 ImmunoPET	15
1.2 Zirkonium	17
1.2.1 Izotop 89	18
1.3 Protilátky	21
1.3.1 Cetuximab	25
1.4 Chelátor	26
1.4.1 Desferrioxamin B	27
1.5 Principy použitých metod	29
1.5.1 Stanovení koncentrace proteinů	29
1.5.2 Elektroforéza	30
1.5.3 Chromatografie	31
2 Experimentální část	33
2.1 Obecné informace	33
2.1.1 Použité materiály a přístroje	33
2.2 Postupy	34
2.2.1 Výroba a separace zirkonia-89	35
2.2.2 Konjugace cetuximabu s DFO	35
2.2.3 Značení konjugátu zirkoniem-89	35
2.2.4 HPLC	36
2.2.5 SDS-PAGE	36
2.3 Výsledky a diskuse	37
2.3.1 Výroba a separace zirkonia-89	37
2.3.2 Konjugace cetuximabu s DFO	38
2.3.3 Značení konjugátu zirkoniem-89	38
2.3.4 HPLC	39
2.3.5 SDS-PAGE	44
Závěr	47
Literatura	48

Úvod

Od objevu radioaktivity a popisu principu tohoto jevu našly radioaktivní zářiče uplatnění v celé škále odvětví přímo souvisejících s každodenním životem. Je řeč nejen o využití štěpitelných nuklidů v energetice, ^{14}C v archeologii, ale především o stále se rozvíjejících možnostech použití v medicíně. Díky potenciálu radioaktivních zářičů pro diagnostiku i terapii se vyvinul obor nukleární medicína. Léčivé přípravky v ní používané jsou označovány jako radiofarmaka. Ta využívají různých fyziologických procesů, díky kterým je radionuklid dopraven na místo působení. Široké uplatnění nachází nukleární medicína u onkologických pacientů, jelikož včasná diagnostika a volba vhodné terapie může zlepšit prognózu onemocnění.

Zobrazovací metody využívají možnosti detekce radionuklidů obsažených v radiofarmacích, a tím jejich lokalizaci. Konkrétně se jedná o metody PET a SPECT. Nádorové buňky mohou být specifické strukturami, které na svém povrchu exprimují, často se jedná o kvantitativní rozdíl oproti zdravým buňkám. Díky novým poznatkům o maligních buňkách a rozšiřujícím se znalostem o potenciálně vhodných radionuklidech, je možné docílit zobrazení např. receptorů, nebo jiných markerů, které mohou poskytnout informace o prognóze nemoci nebo pomoci s výběrem léčby.

Ke specifickým reakcím v organismu jsou nejčastěji využívány protilátky, které jsou označeny radionuklidy s vhodným poločasem rozpadu. Jejich lokalizace je možná pomocí PET nebo SPECT, jejichž kombinace s využitím protilátek je označována jako immunoPET, resp. immunoSPECT.

Důležitým faktorem, který rozhoduje o vhodnosti radionuklidu pro použití v immunoPET (příp. immunoSPECT) je jeho poločas rozpadu, který by měl korespondovat s farmakokinetikou značených protilátek. Jedním z nejvíce literaturou zmiňovaných zářičů v tomto kontextu je v poslední době ^{89}Zr s poločasem rozpadu 78,4 hodin. Dalšími skutečnostmi podporující myšlenku jeho použití je poměrně malá energie emitovaných beta plus částic, která dovoluje vysoké rozlišení pořízeného snímku, možná rutinní výroba a stabilita dceřiného nuklidu [1].

Cetuximab je monoklonální protilátka, kterou lze v kombinaci s radionuklidem využít pro zobrazení receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR), který je ve větší míře exprimován na povrchu některých typů nádorových buněk [2].

Pro značení cetuximabu pomocí ^{89}Zr je třeba najít vhodný chelátor, který by mezi nimi zprostředkoval vazbu. Dostatečně silná chelatace je nutná, aby došlo k omezení uvolnění zirkonia v organismu, jelikož se váže především do kostních tkání [3].

Tato bakalářská práce si klade za cíl prozkoumat možnosti značení cetuximabu ^{89}Zr a to pomocí DFO - chelátoru specifického pro zirkonium. Otázkou výzkumu bylo především zjistit stabilitu protilátky cetuximab *in vitro* po značení.

Seznam zkratk

ADCC Cytotoxická reakce závislá na protilátkách

BCR B-buněčný receptor

BsAb Bispecifické protilátky

CT Výpočetní tomografie

DFO Desferrioxamin

DTPA Diethylentriaminpentaoctová kyselina

EGF Epidermální růstový faktor

EGFR Receptor epidermálního růstového faktoru

EDTA Ethylendiamintetraoctová kyselina

Fab Fragment antigen-binding

Fc Fragment crystallizable region

HCab Heavy chain only antibody

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie

FDG [^{18}F]fluordeoxyglukosa

MR Magnetická rezonance

NK Natural killers

PET Pozitronová emisní tomografie

RTK Tyrosinkinázový receptor

scFv Single-chain variable fragment

SDS-PAGE sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

SPECT Jednofotonová emisní výpočetní tomografie

T/G Target-to-background

TFP 2,3,5,6-tetrafluorofenol

TGF Transformující růstový faktor

TCR T-buněčný receptor

TLC Chromatografie na tenké vrstvě

VEGF Vaskulární endotelový růstový faktor

VHH Variable domain of heavy-chain

1. Teoretická část

1.1 PET

Nukleární medicína je obor, který se zabývá využitím otevřených radionuklidových zářičů pro diagnostiku a terapii. Léčivé přípravky obsahující radionuklidy se označují jako radiofarmaka. Jsou založena na indikátorovém principu, který předpokládá stejné chemické chování stabilních a radioaktivních izotopů. Radiofarmakum se skládá z biologicky aktivní složky a radionuklidového zářiče. Biologicky aktivní složkou je myšlena anorganická či organická látka, která se v těle chová známým způsobem. Použitý radionuklid je definován poločasem, typem přeměny a energií emitovaných částic. Pro diagnostiku jsou využívány gama zářiče pro jednofotonovou emisní výpočetní tomografii (SPECT) a zářiče beta plus pro pozitronovou emisní tomografii (PET). Diagnostika pomocí radiofarmak je využívána v celé řadě lékařských oborů, např. v onkologii, kardiologii, pneumologii, pro zobrazování cévního a lymfatického systému nebo při vyšetření kostí. Pro terapii jsou využívány zářiče beta minus a alfa. Některé radionuklidy jsou vhodné jak k terapii, tak k diagnostice, čehož využívá teranostika, která oba tyto procesy kombinuje [4].

Příprava radionuklidů

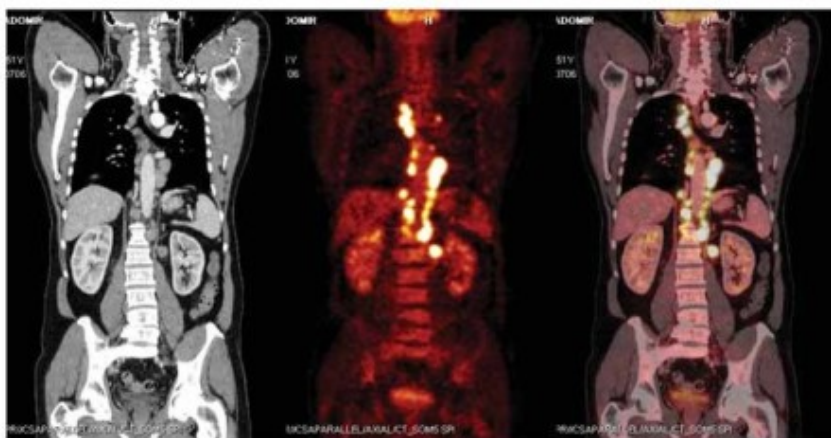
Radionuklidy používané v nukleární medicíně mohou být podle Českého lékopisu [5] připravovány bombardováním terče neutrony nebo nabitými částicemi v urychlovači, jaderným štěpením nuklidů s vysokým atomovým číslem nebo s využitím radionuklidového generátoru. Nejčastěji používanými urychlovači jsou cyklotrony, ve kterých jsou nabitě částice urychlovány elektrickým polem. Jejich trajektorie je ovlivňována polem magnetickým, jehož působením se urychlené částice pohybují ve tvaru spirály se stále se zvětšujícím poloměrem. Na konci této dráhy částice interagují s terčovými jádry a dochází k jaderným reakcím. Jedná se o nejčastější způsob, kterým jsou vyráběny radionuklidy pro PET. Tímto způsobem je připravován i nejpoužívanější PET radionuklid ^{18}F , který vzniká např. reakcí $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$. Další možnosti jsou radionuklidové generátory, které umožňují přípravu radionuklidu v blízkosti místa jeho dalšího použití. Jedná se, na rozdíl od např. cyklotronu, o prostorově a instrumentálně jednodušší zařízení. Mateřský radionuklid je vázán v matici (např. na koloně) a přeměňuje se na dceřiný radionuklid s kratším poločasem přeměny. Ten je z generátoru vhodným způsobem eluován. Tímto způsobem je získáváno např. ^{68}Ga a to pomocí germanium-galiového generátoru [4].

Zobrazování

Pozitronová emisní tomografie je zobrazovací metoda, která umožňuje neinvazivní vizualizaci fyziologických a biologických procesů v těle. Tato metoda využívá beta plus zářičů, při jejichž přeměně dochází k emisi pozitronu a neutrina. Pozitron se v prostředí zpomaluje a následně anihiluje s elektronem za vzniku dvou fotonů, které mají energii 511 keV a jsou emitovány v opačných směrech. Emitované fotony jsou zaznamenány pomocí detektorů, které fungují v koincidenčním režimu. Informace je tedy dále zpracovávána pouze pokud dojde k registraci obou dvou fotonů pocházejících z dané interakce. Tímto způsobem je omezen vliv pozadí [6].

V praxi se používají scintilační detektory, jejichž základními komponenty jsou scintilátor a fotonásobič. Scintilátor obsahuje materiál schopný scintilace, což znamená, že při interakci s fotonem excituje a následně deexcituje za vzniku fotonu viditelného nebo UV záření. Pro výběr scintilačního materiálu je důležité, aby měl vysokou efektivitu pro fotony o energii 511 keV. Dlouho byl používán krystal NaI(Tl), dnes jsou nejpoužívanějšími scintilačními materiály BGO (germanát bismutu) a LYSO (lutecium-yttrium oxyortosilikát). Záblesky scintilátoru jsou slabé a k jejich zesílení slouží fotonásobič, ve kterém fotony dopadají na fotokatodu, ze které vyráží elektrony. Ty jsou urychlovány elektrickým polem mezi dynodami, na kterých dochází k sekundární emisi elektronů, a tím k zesílení signálu. Tato kaskáda je zakončena sběrnou anodou [6, 7].

Typický PET sken zaznamená 10^6 - 10^9 rozpadů, ze kterých je pomocí matematických algoritmů vytvořen 2D nebo 3D obraz. V současné praxi se používají systémy s velkým množstvím detektorů, které jsou většinou uspořádány v kruhové, resp. válcové geometrii. Pozitronová emisní tomografie sama o sobě poskytuje informace pouze o procesech, které se v těle odehrávají, přičemž nepřesnost tohoto zobrazení se běžně pohybuje v rozmezí 5 až 6 mm. V praxi se obvykle kombinuje s dalšími zobrazovacími metodami, a to s výpočetní tomografií (CT) nebo magnetickou rezonancí (MR). Tímto spojením lze získat komplexní informace zahrnující i anatomickou strukturu těla (Obr. 1.1) [6, 8].



Obr. 1.1: Snímky CT (vlevo), PET (uprostřed) a kombinace PET/CT (vpravo) postižení lymfatických uzlin u nemocného s difúzním B-velkobuněčným lymfomem za použití FDG [9].

Používané radionuklidy

Pokrok ve výzkumu výroby a separace radionuklidů umožnil vývoj nových radiofarmak. Volba radionuklidu pro PET je podmíněna především charakterem jeho rozpadu a farmakokinetikou použité biologicky aktivní složky radiofarmaka. Obecně platí, že čím větší je biologicky aktivní část radiofarmaka, tím delší poločas rozpadu má radionuklid, kterým je označena. To je voleno z toho důvodu, že čím větší je daná látka, tím pomaleji probíhá její distribuce v těle. Existuje i řada radiofarmak, které se tohoto pravidla nedrží. Např. ^{223}Ra s relativně dlouhým poločasem rozpadu 11,4 dní se využívá v radioterapii v podobě [^{223}Ra]chloridu radnatého, tedy malé molekuly [10, 11].

Z pohledu rozlišení zobrazení je vhodné, aby při přeměně byly emitovány pozitrony s co nejnižší energií. Tím je omezen dolet pozitronu do místa anihilace, které je detekováno, a tím ke zlepšení rozlišení. S vyšší energií emitovaných částic také roste radiační zatížení pacienta i jeho okolí, a také se zvyšují požadavky na bezpečnost při manipulaci s radionuklidem. Schéma přeměny by mělo být co nejjednodušší, jelikož s narůstajícím počtem gama linek radiační zátěž také roste. Je také třeba přihlídnout ke vzdálenosti výroby radionuklidu od místa aplikace pacientovi. Radionuklidy s velmi krátkými poločasy je možné použít pouze v zařízeních s dostupnou výrobní technikou. U zvoleného radionuklidu by měla být možná rutinní výroba, vyvinuté metody separace a dostatečně známé chování *in vivo*. Chování *in vivo* a případná charakteristika rozpadu musí být známá i u dceřiného nuklidu. Další radionuklidy využívané v PET diagnostice jsou např. ^{64}Cu , ^{68}Ga a ^{89}Zr [10].

Nejčastěji používaným radiofarmakem pro PET je [^{18}F]fluordeoxyglukosa (FDG), která se v těle účastní stejných procesů jako glukosa, čímž je umožněno sledování metabolické aktivity tkání. Jedná se o širokospektrální radiofarmakum, při použití FDG jsou na PET snímku vidět místa, kde se přirozeně glukosa metabolizuje, jako např. mozek, a dále např. zánětlivá ložiska. Fluor-18 se přeměňuje s poločasem rozpadu 109 minut na stabilní ^{18}O , střední energie beta částic při této přeměně je 249,8 keV. Tento radionuklid je využíván pro značení širokého spektra dalších radiofarmak, jako např. [^{18}F]fluor-L-thyminu nebo [^{18}F]fluoridu sodného [10, 12].

1.1.1 ImmunoPET

V současnosti je diagnostika pomocí PET využívána především u onkologických onemocnění. Součástí vyšetření v průběhu léčby je i analýza markerů. Obecně se jedná o látky, jejichž výskyt vypovídá o stavu organismu či tkáně. V tomto případě je zjišťována přítomnost nebo nadměrná exprese určitých struktur na povrchu maligních buněk, případně jimi sekretovaných molekul. Prognostické markery poskytují informace o povaze nádoru, předpovídají rychlost jeho růstu a pravděpodobnost metastáz a recidivy. Na základě prediktivních markerů je možno předpovědět účinnost konkrétního léku. Dále lze stanovit hladinu sérových nádorových markerů, což jsou molekuly produkované maligními buňkami přítomné v krevním řečišti. Jsou využívány pro sledování aktuálního vývoje nádoru, a tedy i k vyhodnocování úspěšnosti léčby [13, 14, 15].

Pro zobrazování markerů je třeba využít specifitějších reakcí, ke kterým jsou využívány především monoklonální protilátky. Kombinací pozitronové emisní tomografie a protilátek se zabývá immunoPET. Vizualizace biomarkerů pomocí immunoPET je alternativou k biopsii, oproti které poskytuje celou řadu výhod. Především se jedná o neinvazivní metodu, která umožňuje sledovat průběh léčby bez opakovaných zásahů do těla. ImmunoPET podává celkový obraz, v případě biopsie je analyzována pouze malá část tkáně. Výsledek biopsie nemusí být vzhledem k heterogenitě nádoru vypovídající [8].

Radionuklidy pro immunoPET

Radiofarmaka používaná pro immunoPET obsahují radionuklid, protilátku nebo její fragment a sloučeninu, která tyto dvě části spojuje. Radionuklid je volen podle stejných kritérií jako u PET, přičemž jeho poločas rozpadu by měl korespondovat s farmakokinetikou protilátky, příp. jejího fragmentu. Farmakokinetikou je myšleno chování protilátky *in vivo*. V tomto případě je důležitý čas, kdy je dosaženo nejvyššího poměru T/B (target-to-background), tedy stavu, kdy je největší množství protilátky vázáno v místě působení v poměru k množství nenavázané protilátky. Dalším důležitým ukazatelem je čas eliminace z těla, který je charakterizován poločasem - časem, kdy je polovina protilátky vyloučena z těla. V případě monoklonálních protilátek typu IgG je dosaženo nejvyššího poměru T/B v řádu dní, tudíž je třeba hledat radionuklidy přeměňující se s podobnými poločasy. Potenciálně vhodnými radionuklidy jsou např. ^{89}Zr , ^{124}I , ^{64}Cu nebo ^{86}Y . Zirkoniu a jeho izotopu 89 se věnuje kapitola 1.2 [16].

Protilátky

Aby byl radionuklid dopraven na místo působení, je využíváno specifických reakcí protilátek, kterým se věnuje kapitola 1.3. Protilátky používané pro immunoPET jsou typu IgG, jejichž velikost je okolo 150 kDa, což se odráží na jejich pomalé farmakokinetice. Důsledkem je vystavení okolích tkání a orgánů vyšší radiační zátěži, přičemž některé z nich jsou k ionizujícímu záření obzvláště citlivé, např. kostní dřev. Pacient také v průběhu vyšetření obdrží poměrně vysokou dávku radiace. Vzhledem k velikosti protilátek je také omezen průnik dovnitř do nádoru. Z těchto důvodů byly vytvořeny fragmenty protilátek, které jsou menší než protilátky samotné, a zároveň si uchovávají vazebné vlastnosti. Jedná se např. o fragment obsahující jen těžké řetězce (HCab), pouze jednu variabilní doménu těžkého řetězce (VHH) nebo jeden těžký a jeden lehký řetězec, které jsou spojeny peptidovým řetězcem (scFv). Distribuce fragmentů je rychlejší, stejně tak eliminace z těla. Je také dosaženo většího průniku do nádorové tkáně a výhodnějšího poměru T/B. Nevýhodou je jejich nestabilita a nižší afinita k antigenu. Ke značení VHH se využívá např. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a ^{18}F s poločasy rozpadu 6 hodin, resp. 110 minut. Protilátky mohou být cíleny na struktury na povrchu či uvnitř buněk, jako např. tyrosinkinázové receptory, dále se jedná o molekuly produkované buňkami (např. VEGF) nebo enzymy (např. karbohydráza) [16].

Strategie značení

K navázání radionuklidu na protilátku byly vyvinuty různé metody. Nejčastěji jsou využívány chelátory, které slouží k vytvoření vazby mezi radionuklidem a protilátkou ještě před podáním farmaka, a kterým se věnuje kapitola 1.4. Byly vyvinuty i alternativní metody, které eliminují některé z problematických aspektů takto značených konjugátů.

Jednou z možností je nejprve podat protilátku s navázaným biotinem, která se naváže na příslušný antigen. Po eliminaci této protilátky z krevního oběhu je podán streptavidin - protein disponující čtyřmi vaznými místy pro biotin. Následně je aplikován biotin značený radionuklidem, který interaguje se streptavidinem, a tím je vytvořena vazba mezi protilátkou a radionuklidem [16, 17]. Další alternativou může být využití bispecifických protilátek (BsAb), které se vyznačují tím, že se mohou vázat na dva různé antigeny [16]. Nejprve je podána samotná protilátka, po jejím navázání a eliminaci z krevního oběhu je aplikována značená molekula, která se naváže na druhé vazebné místo protilátky. Kromě výhod v podobě minimalizace obdržené dávky a snížení pozadí, jsou tyto metody vhodné i pro použití krátkodobých zářičů. Obě tyto metody je možné použít i v terapii.

1.2 Zirkonium

Zirkonium je prvek s protonovým číslem 40 nacházející se ve 4. skupině a 5. periodě periodické tabulky. Patří mezi přechodné kovy. Vzhledem ke své reaktivitě se zirkonium přirozeně vyskytuje pouze ve formě minerálů, např. $ZrSiO_4$ nebo ZrO_2 . Jeho nejstabilnější oxidační čísla jsou +2, +3 a +4. Poslední zmíněné je nejčastější jak v pevných sloučeninách, tak i v roztocích [18].

Chemické vlastnosti

Ve vodném prostředí zirkonium hydrolyzuje a vytváří koordinační sloučeniny s celou řadou ligandů. Kationt Zr^{4+} je vysoce nabitý a poměrně velký, a tak vytváří komplexy s velmi vysokými koordinačními čísly. Hydratovaný iont se vyskytuje pouze ve velmi zředěných kyselých roztocích. Podle teorie tvrdých a měkkých kyselin a bází (HSAB) se jedná o tvrdý kationt, a tedy při komplexaci upřednostňuje kyslíkové donory. Zirkonium vytváří komplexy např. s hydroxidovými, fluoridovými, sírovými, dusičnanovými a chloridovými ionty. Tento výčet je seřazen podle klesající stability vzniklé koordinační sloučeniny. Komplexuje také s organickými kyselinami obsahujícími alespoň dvě karboxylové skupiny. Interakce s vinanovými a citrátovými ionty jsou poměrně silné, vzniklé koordinační sloučeniny jsou stabilní i při zásaditém pH. Šťavelany jsou méně stabilní, jejich existence je možná pouze v kyselém prostředí. Zirkonium dále vytváří stabilní komplexy se sloučeninami, které obsahují hydroxamátové skupiny, čehož je využíváno při jeho separaci a značení konjugátů [19]. Složení roztoků zirkonia záleží nejen na koncentraci obsažených sloučenin, ale také na pH, teplotě a stáří roztoku. V průběhu času dochází k vytvoření vazeb mezi

atomy zirkonia v důsledku hydrolyzy a vzniku polynukleráních a polymerických forem. Tento jev je nejčastější u nízkých pH [1, 18, 20].

Chování *in vivo*

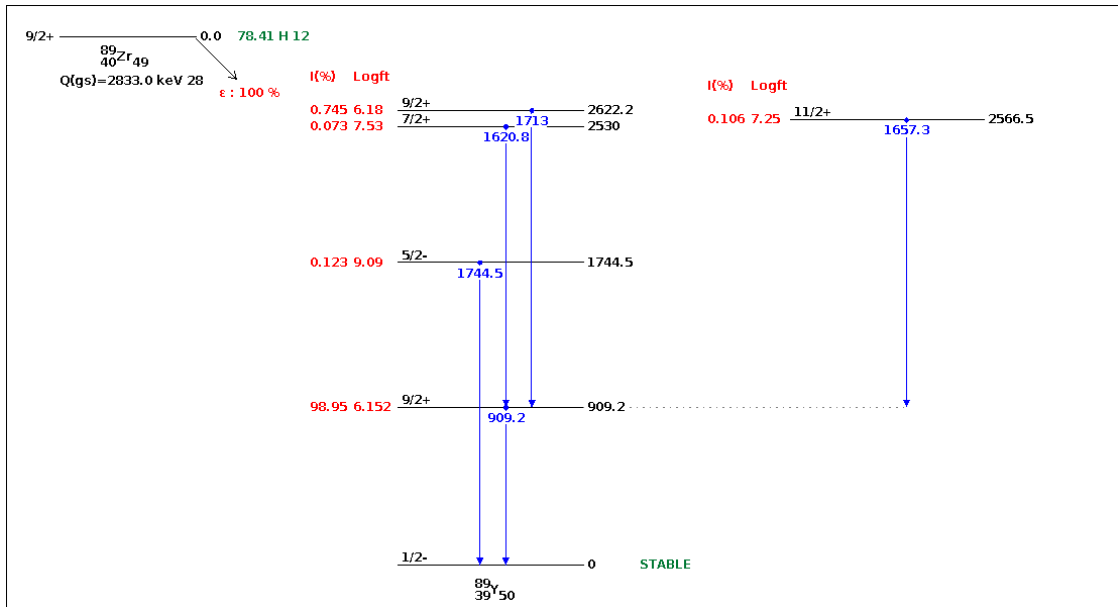
Pro získání informací o chování zirkonia v živých organismech byly uskutečněny experimenty na myších. S využitím ^{89}Zr je uskutečnila např. Abou, 2011 [3]. Celkový příjem těla a příjem jednotlivých tkání závisí na formě, ve které je ^{89}Zr podáno. Důležitou úlohu hraje nejen struktura sloučeniny, ale i její stabilita, jelikož volné zirkonium se váže na plazmatické bílkoviny a do kostní tkáně. Roztoky byly podány myším do ocasu, jednalo se o ^{89}Zr |Zr-šfavelan, ^{89}Zr |Zr-chlorid, ^{89}Zr |Zr-fosforečnan, ^{89}Zr |Zr-citrát a ^{89}Zr |Zr-DFO. V případě ^{89}Zr |Zr-oxalátu a ^{89}Zr |Zr-chloridu bylo z těla po šesti dnech vyloučeno 20% radioaktivity. Množství ^{89}Zr v jednotlivých orgánech si bylo také navzájem podobné, nejvíce bylo obsaženo v kostech. ^{89}Zr |Zr-fosfátu bylo exkretováno pouze 5%, což je dáno jeho nerozpustností ve vodě, a tím větší akumulací v játrech a slezině. ^{89}Zr |Zr-citrátu bylo z těla vyloučeno 35%. V případě ^{89}Zr |Zr-DFO byla aktivita ^{89}Zr kompletně vyloučena po jednom dni od aplikace, aniž by byla absorbována kostní tkání.

Izotopy

Existuje pět přirozeně se vyskytujících izotopů zirkonia a to ^{90}Zr , ^{91}Zr , ^{92}Zr , ^{94}Zr a ^{96}Zr , přičemž první čtyři jsou stabilní a ^{96}Zr se přeměňuje s poločasem rozpadu $2,35 \cdot 10^{19}$ let. Dále byly popsány radioizotopy s nukleonovými čísly 78 - 114, některé vyskytující se i v metastabilním stavu, a s poločasy rozpadu od milionů let po nanosekundy [12].

1.2.1 Izotop 89

Izotop 89 se v tabulce nuklidů nachází na levé straně od údolí stability, což vypovídá o jeho deficitu neutronů oproti stabilním nuklidům. Existuje jeden metastabilní stav ^{89}Zr , který se přeměňuje izomerním přechodem na základní stav s poločasem 4,2 min s pravděpodobností 93,77%, zbylá procenta představuje přeměna na $^{89\text{m}}\text{Y}$. Zirkonium-89 v základním stavu se přeměňuje s poločasem rozpadu 78,41 h na ^{89}Y . V 77,74% se jedná o elektronový záchyt, tedy reakci elektronu z vnitřní slupky obalu s protonem v jádře za vzniku neutronu a neutrina. Zbylých 22,26% představuje přeměna beta plus, střední energie emitovaných pozitronů je 396 keV. S pravděpodobností 98,95 % dochází ke vzniku $^{89\text{m}}\text{Y}$, které se s poločasem rozpadu 15,7 s přeměňuje na stabilní izotop ^{89}Y , což je doprovázeno emisí fotonu o energii 909 keV. Cesta ke stabilnímu nuklidu může vést přes jeho vyšší energetické hladiny, což je doprovázeno emisí dalších fotonů. Schéma přeměny ^{89}Zr je zobrazeno na Obr. 1.2 [12, 21].



Obr. 1.2: Schéma přeměny ^{89}Zr [12].

Příprava

Příprava ^{89}Zr probíhá v cyklotronu za použití ^{89}Y jako terčového materiálu. Yttrium-89 je buďto v čisté formě nebo ve vrstvě nanesené na plíšku jiného kovu, např. mědi nebo hliníku. Další možností je použití Y_2O_3 , což učinili např. Omara, 2009 [22] a Kandil, 2007 [23].

Terč je ozařován svazkem protonů nebo deutronů, v obou případech vznikají při ozařování kromě ^{89}Zr i další nuklidy v závislosti na zvolené energii svazku. V případě ozařování ^{89}Y protony vzniká ^{89}Zr reakcí $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$. Excitační funkce této reakce nabývá maxima v intervalu mezi 11 a 16 MeV, kde dosahuje nejvyšší hodnoty okolo 13 MeV. Nejdůležitějšími reakcemi, které při ozařování ^{89}Y protony také probíhají, jsou $^{89}\text{Y}(p,2n)^{88}\text{Zr}$ a $^{89}\text{Y}(p,pn)^{88}\text{Y}$, přičemž práh těchto reakcí je 13 MeV, resp. 12 MeV [24]. Zirkonium-88 a yttrium-88 jsou dlouhodobé radionuklidy s poločasy 83,4 dne a 106,65 dne. Vhodným rozpětím energií protonů pro výrobu ^{89}Zr se jeví 9-14 MeV, kdy je dosaženo maximálního výtěžku ^{89}Zr v porovnání s reakcemi vedoucími ke vzniku radionuklidových nečistot. Například Tang, 2019 [21] ozařoval protony o energii 13 MeV a proudu 10-30 μA po dobu jedné hodiny, výtěžek této reakce byl $44 \pm 4 \text{ MBq}/\mu\text{A h}$. Holland, 2009 [25] určil jako ideální protony o energii 15 MeV a proud svazku 15 μA . Ozařování probíhalo 2-3 hodiny a výtěžek byl $56 \pm 4 \text{ MBq}/\mu\text{A h}$.

Druhou možností přípravy je ozařování ^{89}Y deutrony, kde ^{89}Zr je produktem reakce $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$, jejíž práh je 6 MeV [24]. Nejvýznamnějšími z dalších probíhajících reakcí v tomto případě jsou $^{89}\text{Y}(d,3n)^{88}\text{Zr}$ a $^{89}\text{Y}(d,p)^{90\text{m}}\text{Y}$. Práh vzniku ^{88}Zr je 15,5 MeV, v případě $^{90\text{m}}\text{Y}$ se jedná o exotermní reakci a probíhá tedy bezprahově. Tang, 2019 [21] použil svazek deutronů o energii 15 MeV a proudu 10-15 μA . Ozařování probíhalo po dobu jedné hodiny a výtěžek této reakce byl $58 \pm 4 \text{ MBq}/\mu\text{A h}$.

Pro srovnání obou metod je třeba vzít v úvahu výtěžek reakcí, zhodnotit vliv dalších vznikajících produktů a v neposlední řadě možnost rutinní výroby. Co se týče dalších probíhajících reakcí, je rozhodující množství ^{88}Zr , jelikož vznikající izotopy yttria je možné odseparovat. Pokud je ^{89}Y nanášeno na kovový plíšek, je třeba kvůli následné separaci uvažovat i reakce, kterých se účastní jádra tohoto kovu. Lebeda, 2015 [26] došel k závěru, že výtěžek ^{89}Zr a množství ^{88}Zr jsou při obou reakcích srovnatelné. Rozhodujícím faktorem je cena provozu cyklotronů a jejich dostupnost pro produkci částic ostřelujícího svazku, který hraje ve prospěch reakce $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$. K produkci svazku protonů je možné použít také lineární urychlovač, na rozdíl od případu deutronů [21].

Separace

Pro separaci zirkonia od ostatních prvků byly popsány metody založené na kapalinové extrakci, iontově-výměnné chromatografii a na použití pryskyřice s hydroxamátovými skupinami. Podle použité metody je zvolena koncentrace HCl, v které je terč rozpuštěn [21, 23, 25, 27, 28].

Metoda kapalinové extrakce byla pro separaci zirkonia vyzkoušena nejdříve, rané studie popisují použití TTA (thenoyltrifluoroacetone) v xylenu. Kandil, 2007 [23] terč rozpustil v 9M HCl. Použil TPPO (trifenylfosfinoxid) rozpuštěný v chloroformu, kterým byla vyextrahována veškerá aktivita. Zpětnou extrakci do vodné fáze zajistil použitím 0,5% kyseliny šťavelové.

V případě iontově-výměnné chromatografie bylo publikováno mnoho studií, které se zabývají jak aniontovými, tak kationtovými měniči. Z aniontových pryskyřic je používána Dowex 1x8 (100-200 mesh) [21, 28]. Kolonka je promyta nejprve 12M, 2M a následně opět 12M HCl. Zweit, 1991 [28] použil k rozpuštění ostřelovaného terče 12M HCl. K roztoku přidal H_2O_2 , aby se ujistil, že veškeré zirkonium se nachází v oxidačním čísle +4. Roztok byl odpařen a následně opět rozpuštěn ve 12M HCl. Tang, 2016 [21] rozpustil terč v 1M HCl. V obou dvou studiích byl rozpuštěný terč nanášen na připravenou kolonu a následně promyt 12M HCl. Tento eluát obsahoval Y^{3+} . Dále byla kolona promývána 2M HCl, přičemž jímáný eluát obsahoval Zr^{4+} ve formě ZrCl_4 .

Zweit, 1991 [28] také vyzkoušel použití pryskyřice Dowex 2x8 (20-50 mesh). Bylo zjištěno, že v této koloně se yttrium chová stejně jako při použití Dowex 1x8. Aktivita v prvních jímáných 15 ml po promytí 2M HCl byla vyšší v porovnání s použitím Dowex 1x8.

Kandil, 2007 [23] popsal kationtovou i aniontovou výměnnou chromatografii. Jako katex použil Dowex 50W-x8 a terč rozpustil v 1M HCl. Zirkonium eluoval směsí 0,5% kyseliny šťavelové a 0,1M kyseliny citrónové v poměru 1:1. Jako anex využil Dowex 21K, do sorbentu byl vnesen terčík rozpuštěný ve 12M HCl. Pro eluci zirkonia využil několik roztoků: 1M kyselinu octovou, 0,1M kyselinu citronovou, 4M HCl a také stejnou směs, kterou využil u katexu. Ani jedna možnost se však neukázala jako efektivní. K separaci s použitím iontově výměnné chromatografie se tedy jeví vhodné použití Dowex 1x8 a eluce zirkonia pomocí 1M HCl.

Další literaturou zmiňovanou možností separace je použití hydroxamátových skupin (Holland, 2009 [25] a Verel, 2003 [27]). Oba autoři použili kationtově-výměnný sorbent Accell Plus CM. Obsažené karboxylové skupiny nejprve esterifikovali pomocí TFP a následně byl přidán hydroxylamin hydrochlorid. Tímto způsobem docílili navázání hydroxamátových skupin na povrch sorbentu. Verel, 2003 [27] použil k rozpuštění terče 1M HCl, do roztoku přidal H_2O_2 . Následně přidal 12M HCl tak, aby byl výsledný roztok 2M. Holland, 2009 [25] použil k rozpuštění terče 6M HCl. Zjistil, že přidáním H_2O_2 nedochází k rozdílnému chování při separaci. Roztok byl naředěn tak, aby výsledná koncentrace HCl byla menší než 2M. Po nanesení rozpuštěného terče oba autoři promyli kolonu 2M HCl. Tento eluát obsahoval Y^{3+} . Zirkonium bylo jímáno ve formě šťavelanu po promytí 1M kyselinou šťavelovou.

V současné době existují kolony, které již hydroxamátové skupiny obsahují. Příkladem je ZR Resin od společnosti Triskem. Slouží především k separaci zirkonia od yttriového terče pro radiofarmaceutické použití. Na kolonku je nanesen terč rozpuštěný v 2M nebo 6M HCl. Eluce yttria probíhá pomocí HCl o stejné koncentraci. Po promytí kolonky 0,05M kyselinou šťavelovou je jímáno zirkonium [29].

Ověření radionuklidové čistoty je možné pomocí gama spektrometrie. Spektrum by mělo obsahovat pouze linky 511 a 909 keV. Energie 511 keV odpovídá anihilačním fotonům, 909 keV izomernímu přechodu $^{89\text{m}}\text{Y}$ na základní stav. Ve spektru by neměly být patrné píky 393 keV a 898 keV, které odpovídají ^{88}Zr a ^{88}Y [21].

Využití v immunoPET

Vlastnosti ^{89}Zr předpokládají jeho úspěšné využití při zobrazování pomocí immunoPET. Jeho poločas rozpadu 78,4 h je vhodný pro značení protilátek, jelikož koresponduje s jejich farmakokinetikou. Jeho schéma rozpadu je poměrně jednoduché a jeho dceřiný nuklid je stabilní. Yttrium-89 je navíc jediným stabilním izotopem yttria, což je vítané při výrobě terčů. Největší výzvou je najít chelátor, se kterým bude zirkonium tvořit dostatečně silný komplex, jelikož se samotné váže do kostí a na plazmatické bílkoviny [1, 3, 21].

1.3 Protilátky

Imunitní systém je komplexní mechanismus, který zajišťuje obranu organismu před potenciálním nebezpečím. Je tvořen lymfatickými orgány, které jsou s dalšími anatomickými celky propojeny pomocí lymfatických cév. Lymfatické orgány lze rozdělit podle funkce na primární a sekundární. Součástí imunitního systému je také množství buněk a molekul [30].

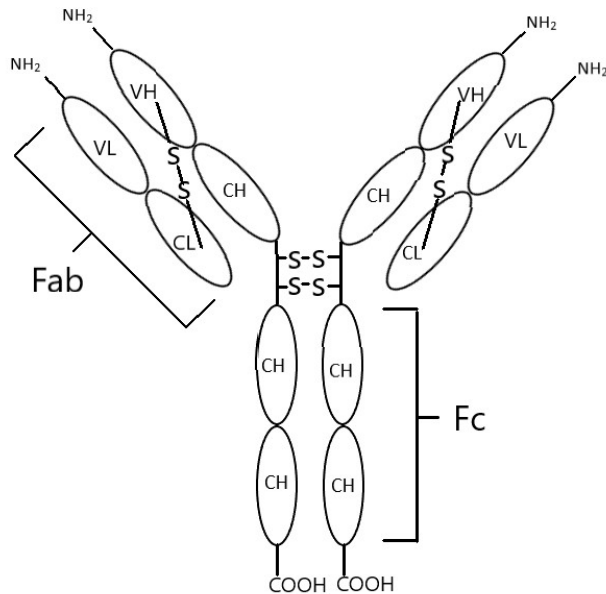
Stejně jako všechny specializované buňky, i imunocyty vznikají diferenciací kmenových buněk. K tomuto procesu dochází v kostní dřeni, která se, společně s brzlíkem, řadí k primárním lymfatickým orgánům. Z kmenových buněk vznikají dvě linie, myeloidní a lymfoidní. Z myeloidního prekurzoru vznikají buňky zodpovědné za vrozené

mechanismy, jedná se např. o makrofágy a dendritické buňky. V organismu jsou přítomné již ve své finální podobě a v případě potenciálního nebezpečí jsou schopny reagovat prakticky bezprostředně. Jejich role spočívá především ve schopnosti fagocytózy [30].

Druhým mechanismem je mechanismus adaptivní, za který jsou odpovědné buňky pocházející z lymfoidní linie. Jedná se o B a T lymfocyty a dále NK (natural killers) buňky. NK buňky jsou sice lymfocyty, ale jejich mechanismy se více podobají těm vrozeným. B a T lymfocyty mají na svém povrchu receptory (BCR resp. TCR), které se vyznačují vysokou specifitou pro konkrétní podněty - antigeny - tedy látky, které vyvolávají reakci imunitního systému. Samotné reakce s receptory se účastní pouze část antigenu, která se nazývá epitop. Antigen může být rozeznáván buď ve své nativní podobě, nebo zprostředkovaně pomocí antigen prezentujících buněk (APC). Nezralé B a T lymfocyty se krevním řečištěm dostávají do sekundárních lymfatických orgánů, kde dokončují svůj vývoj po kontaktu s antigenem [30].

U B lymfocytů může po vazbě BCR na antigen nastat několik situací. Může dojít k dělení a diferenciaci na plazmatické buňky, které produkují protilátky. V prvních dnech po imunizaci se jedná o imunoglobuliny s nízkou afinitou k antigenu typu IgM. Některé z B lymfocytů pokračují v dalším dělení a diferenciaci za doprovodu mutací genových segmentů, což způsobuje vznik nových buněk, jejichž vazebná místa se částečně liší od těch původních. Ze vzniklých variant jsou vybrány ty s nejsilnější afinitou k antigenu, která je o 4-6 řádů vyšší než u B lymfocytů primární reakce. Takto vzniklých klonů jsou stovky až tisíce, proto je protilátková odpověď označována jako polyklonální. Zároveň dochází k izotypovému přesmyku, a tedy se sekundární protilátkové reakce účastní i jiné typy imunoglobulinů než IgM [30].

Protilátky jsou imunoglobuliny sekretované plazmatickými buňkami, tedy zralými B lymfocyty po setkání s antigenem. Jedná se o polypeptidové struktury, které svým tvarem připomínají písmeno Y a jsou tvořeny dvěma lehkými (L) a dvěma těžkými (H) řetězci. Hmotnost lehkých řetězců je přibližně 25 kDa, těžkých 50kDa. Vzájemně jsou propojeny disulfidickými můstky. Lehké řetězce se skládají ze dvou domén, jejichž typ závisí na třídě imunoglobulinu, a označují se κ a λ . Těžký řetězec sestává z 4-5 domén. Podle typu těžkého řetězce rozeznáváme třídu imunoglobulinu, izotypy μ , δ , γ , α a ϵ odpovídají třídám IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Domény L i H na N koncích polypeptidových řetězců jsou variabilní a antigenně specifické, v těchto místech dochází k vazbě antigenu pomocí nekovalentních interakcí. Zbytek imunoglobulinu tvoří konstantní domény, které jsou stejné pro danou třídu. Strukturu protilátky lze dále rozdělit na Fc a Fab fragmenty (Obrázek 1.3). Fab fragment zodpovídá za vazbu antigenu a Fc fragment zprostředkovává další reakce imunitního systému. V těžkém řetězci tyto úseky rozděluje pantová oblast, která zajišťuje flexibilitu protilátky, a tím možnost navázat dva antigeny ve větší vzdálenosti od sebe. [30, 31].



Obr. 1.3: Struktura monomeru imunoglobulinu (VL = variabilní doména lehkého řetězce, VH = variabilní doména těžkého řetězce, CL = konstantní doména těžkého řetězce, CH = konstantní doména těžkého řetězce), převzato a upraveno [30].

IgG

Po imunizaci jsou převládajícím izotypem v organismu imunoglobuliny třídy IgG. Je možno je rozdělit do dalších čtyř podtříd na základě jejich velikosti a uspořádání disulfidických můstků mezi jednotlivými řetězci. Jedná se o imunoglobuliny sekundární protilátkové odpovědi s vysokou specifitou a jsou jediným typem protilátek schopným průchodu placentou. Pokud se imunoglobulin naváže na příslušný antigen, označí ho pro buňky vrozeného imunitního systému. Ty rozpoznají jeho Fc fragment a zahájí fagocytózu. Tento jev se nazývá opsonizace. Fc fragment také slouží jako iniciační znamení pro NK buňky, které jsou schopné působit cytotoxicky. Tento proces se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC). Vazbou na klíčové epitopy také dochází k neutralizaci toxického působení patogenu a iniciaci aktivace komplementu, což je proces s lytickými účinky. Výše zmíněné funkce plní nejen IgG, ale do jisté míry i protilátky jiných tříd [30, 31].

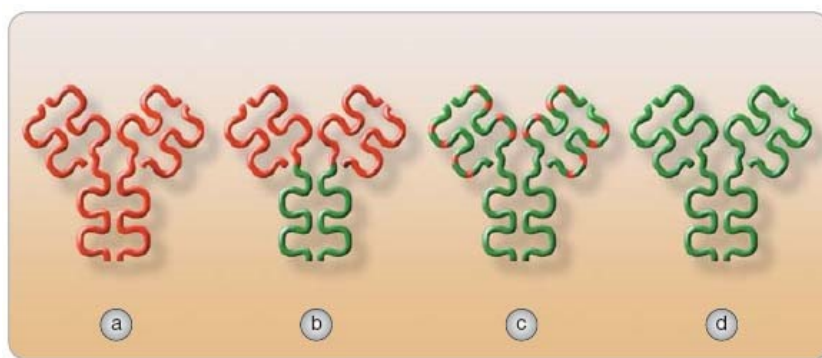
Monoklonální protilátky

Pokud jsou protilátky sekretovány pouze jedním klonem plazmocytů, jsou označovány jako monoklonální. Ty našly své uplatnění např. v léčbě autoimunitních onemocnění a transplantologii pro tlumení nežádoucích zánětlivých reakcí jako alternativa ke konvenčním imunosupresivům a především v onkologii [13, 32].

V počátcích byly použity myší protilátky, které byly produkovány buňkou vzniklou fúzí B lymfocytu a myelomové buňky. Tyto protilátky však nebyly v praxi použí-

telné, jelikož v lidském těle iniciovaly vznik tzv. HAMA protilátek. Jejich přítomnost znemožňovala vznik původně zamýšlené vazby na antigen a v některých případech vedla např. k anafylaxi. Aby lidský imunitní systém monoklonální protilátky lépe přijímal, byly vyvinuty metody umožňující nahrazení části myší genetické informace lidskou. Pokud vzniklá protilátka obsahuje myší Fab fragment a lidský Fc fragment, jedná se o chimérickou protilátku. V případě, že myší geny kódují pouze oblasti CDR, kde probíhají reakce s epitopy, je řeč o humanizované protilátce. Výroba monoklonálních protilátek obsahujících pouze lidskou genetickou informaci je možná, ale velmi složitá. Jednotlivé typy protilátek jsou zobrazeny na Obr. 1.4 [13, 32].

Názvosloví monoklonálních protilátek vypovídá o jejich typu a cílové struktuře. Předpona názvu je variabilní, následuje slabika, která vypovídá o tom, na co protilátka cílí. Dále název obsahuje informaci o původu protilátky, tedy jestli se jedná o protilátku chimérickou, humanizovanou či např. humánního či myšího původu. Všechna označení jsou zakončena příponou -mab [13].



Obr. 1.4: Typy monoklonálních protilátek: (a) myší, (b) chimérická, (c) humanizovaná, (d) lidská [13].

Monoklonální protilátky jsou pro svou vysokou specifitu využívány pro diagnostiku i cílenou léčbu onkologických onemocnění. Jsou využívány protilátky typu IgG které jsou cíleny tak, aby zabránily dalšímu růstu nádoru. Mohou se vázat na struktury exprimované na povrchu či uvnitř buňky, jako např. receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), který se podílí na regulaci proliferace buněk, nebo reagovat s molekulami produkovanými buňkami, např. s vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF), který je důležitý pro proces angiogeneze v rostoucím tumoru. Léčba je založena na blokaci přirozených mechanismů daných buněk či molekul a dále na mechanismech imunitního systému. Protilátky je také možné využít ve formě konjugátů s vhodnými sloučeninami, např. toxiny. Další možností je konjugace s cytostatiky, která umožňuje chemoterapii cílit a omezit tak její toxicitu. Použitím takového konjugátu je také možné obejít rezistenci nádorových buněk k cytostatikům, jelikož je využít jiný mechanismus transportu léčiva do buňky [17, 32].

Konjugáty sestávající z protilátky (případně jejího fragmentu) a radionuklidu jsou označovány jako radioimunokonjugáty. Ty nacházejí své využití v léčbě i diagnostice. Léčba spočívá ve vystavení nádorových buněk radioaktivnímu záření, které vede k jejich zničení. Oproti jiným konjugátům dosahuje tato léčba většího dosahu

účinku, jelikož působí i na buňky, které nemají dostatečnou expresi receptorů nebo nebylo možné, aby k nim protilátky pronikly. Radioimunokonjugáty lze také použít k zobrazování nádorů jako radiofarmak vhodných pro PET či SPECT diagnostiku [32].

1.3.1 Cetuximab

Cetuximab je chimérická protilátka, která je cílena na receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR). Polynukleotidový řetězec nesoucí genetickou informaci pro tvorbu této protilátky obsahuje úseky lidského a myšního původu [13, 33].

EGFR je jedním ze čtyř receptorů z rodiny transmembránových glykoproteinů ErbB. Obecně se receptory této rodiny skládají z extracelulární domény schopné vázat ligand, transmembránové lipofilní domény a intracelulární domény s tyrosinkinázovou aktivitou. Jedná se tedy o tyrosinkinázové receptory (RTK) [2, 33, 34].

EGFR může být aktivován několika ligandy, přičemž nejvýznamnějšími jsou EGF a TGF- α . Po navázání ligandu dochází k homo- či heterodimerizaci receptorů a následně k autofosforylaci tyrosinového rezidua na C konci řetězce a iniciaci jedné ze signálních drah, jejíž preference je podmíněna složením vzniklých dimerů a typem aktivujícího ligandu. EGFR hraje významnou roli při proliferaci a diferenciaci buněk a podílí se na regulaci buněčného cyklu. Další ze signálních drah mají cytoprotektivní antiapoptických účinek, nebo ovlivňují intracelulární metabolismus vápníku. EGFR se vyskytuje u epiteliálních buněk, kde je jeho exprese regulována. Jedná se o protoonkogen, tedy o gen, který se v genetické informaci běžně vyskytuje, ale jehož mutace může mít přímý dopad na maligní transformaci [2, 33].

Zvýšená exprese EGFR umožňuje snadnější dimerizaci, může dojít k nekontrolovanému dělení, a tím k iniciaci nádorového růstu. Byla pozorována na povrchu buněk velkého množství typů solidních nádorů, např. u nádorů hlavy a krku, prostaty, prsu či kolorektálního karcinomu. Zvýšená exprese tohoto receptoru koreluje s horší prognózou onemocnění, jeho větší agresivitou a pravděpodobností vzniku metastáz. EGFR také hraje roli ve zvýšené odolnosti proti působení ionizujícího záření a přispívá k rezistenci buněk proti radioterapii [2, 33, 34].

Cetuximab se účastní kompetitivní inhibice s přirozenými ligandy EGFR, oproti kterým má k receptoru 5-10x větší afinitu. Tím dochází ke snížení počtu receptorů, které mohou být aktivovány, a tedy k redukci proliferace buněk. Dále iniciuje apoptózu a vyvolává ADCC. Používá se při léčbě spinocelulárního karcinomu hlavy a krku a metastazujícího kolorektálního karcinomu v kombinaci s radioterapií a/nebo dalšími cytostatiky. Při léčbě se mohou objevit vedlejší účinky ve formě nežádoucích kožních reakcí, respiračních potíží nebo tvorby protilátek proti chimérickým imunoglobulinům (HACA). Pacientům je podáván prostřednictvím infuzí. Koncentrace cetuximabu v krevním séru dosahuje maxima přibližně po třech hodinách od jeho aplikace a následně pomalu klesá. Se zvyšující se dávkou se zvyšuje také biologický poločas protilátky, v případě dávky 50 mg/m² se jedná o 27,6 h, v případě 500 mg/m² je to 132,0 h [35, 36].

V současné době existují i další protilátky, které se vyznačují specifitou pro EGFR. Kromě nich je možné zacílit na EGFR použitím nízkomolekulárních inhibitorů cytoplasmatické tyrosinkinázy [2].

Využití v immunoPET

Cetuximab může být ve spojení s vhodným radionuklidem použit pro zobrazování pomocí immunoPET. Zobrazování EGFR jako biomarkeru může sloužit k predikci úspěšnosti léčby pomocí monoklonálních protilátek cílených proti EGFR [16].

1.4 Chelátor

Ke tvorbě radiofarmaka pro immunoPET je třeba najít vhodnou sloučeninu, která bude zprostředkovávat vazbu mezi monoklonální protilátkou a radionuklidem. Chelátor je molekula, která vytváří koordinační sloučeniny s kovy, mezi nejnámější patří např. kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA). Modifikací některých funkčních skupin chelátoru a/nebo protilátky lze docílit vzniku vazby mezi nimi, a tím označení protilátky.

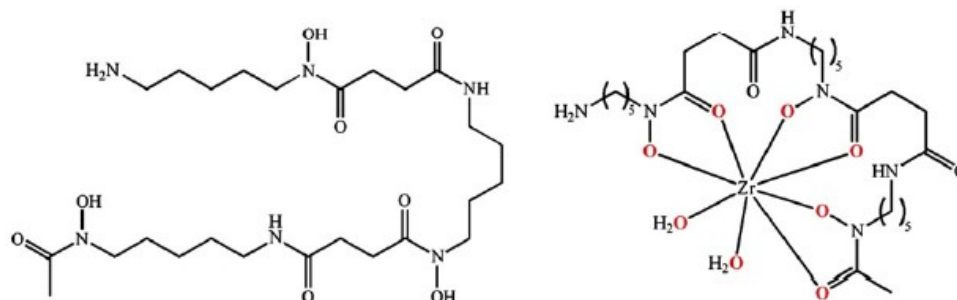
Pro konjugaci protilátky s chelátorem mohou být využívány volné thiolové a aminové skupiny ve struktuře protilátky. V případě aminových skupin se jedná o přibližně čtyřicet reziduí, které náleží aminokyselině lysin. Thiolová skupina je součástí aminokyseliny cystein, přičemž v polypeptidovém řetězci protilátky se vyskytuje přibližně osm těchto skupin. V případě vazby chelátoru na protilátku ve vazebném místě může docházet ke snížení její biologické funkce. Tyto nedostatky je možné vyřešit použitím alternativních metod spočívajících v navázání chelátoru na C konec protilátky, jako např. enzymem zprostředkované reakce. V každém případě je důležité, aby výsledné radiofarmakum bylo stabilní za fyziologických podmínek [16, 37, 38].

Chelatace zirkonia-89

Jelikož Zr^{4+} je podle teorie HSAB tvrdý kationt, preferuje kyslíkové donory. Vytváří komplexy s vysokými koordinačními čísly. Pro značení monoklonálních protilátek pomocí ^{89}Zr bylo zkoumáno použití běžných chelátorů jako EDTA nebo diethylenetriaminpentaoctová kyselina (DTPA), s kterými zirkonium vytváří stabilní komplexy s koordinačním číslem 8. V případě EDTA je vazba zprostředkována čtyřmi atomy kyslíku a dvěma molekulami dusíku náležícími chelátoru, dalšími dvěma ligandy jsou molekuly vody. V případě DTPA se jedná o pět molekul kyslíku a tři molekuly dusíku, konstanta stability tohoto komplexu je vyšší, jelikož všechny vazby jsou zprostředkovány chelátorem. Vzhledem k povaze iontu Zr^{4+} se jeví jako ideální najít co nejvíce vazný chelátor, který by zprostředkoval vazby prostřednictvím atomů kyslíku. Aktuálně se jeví jako nejvhodnější využití hydroxamátových skupin. Ty se nacházejí např. v desferrioxaminu, ale jsou na nich založeny i nově syntetizované chelátory [1, 39]

1.4.1 Desferrioxamin B

Desferrioxamin B (DFO) je šestivazný chelátor, který ve své struktuře obsahuje tři hydroxamátové skupiny. Jedná se o siderofor, tedy o chelátor železa produkovaný bakteriemi. Se zirkoniem vytváří komplex s koordinačním číslem 8. Šest z těchto vazeb je zprostředkováno atomy kyslíku hydroxamátových skupin, zbylé dvě vazby jsou na atomy kyslíku v molekulách vody (Obr. 1.5). Vazba na protilátku je zajištěna modifikací primární aminové skupiny chelátoru. První využití desferrioxaminu jako chelátoru je zmiňováno v souvislosti s izotopy galia. K vytvoření vazby mezi protilátkou a DFO bylo vyzkoušeno celé spektrum metod [1].



Obr. 1.5: Struktura desferrioxaminu B a schéma koordinační vazby na ⁸⁹Zr [1].

Lysinových reziduí protilátky pro konjugaci s DFO se rozhodl využít Verel, 2003 [27]. Z DFO nejprve syntetizoval N-succinyl-DFO, na který následně navázal Fe³⁺. K N-succinyl-DFO navázal esterovou vazbou TFP a nechal zreagovat s protilátkou tak, aby byl výsledný molární poměr 1:1. Pomocí EDTA chelatoval vázané železo a následně konjugát značil ⁸⁹Zr, které se nacházelo ve formě šfavelanu. Analýza vzniklého značeného konjugátu probíhala po rozdělení složek pomocí HPLC s využitím UV/VIS spektrometrie a radiometrického detektoru. Absorbance protilátky byla měřena při 280 nm, DFO při 215 nm a komplexu DFO-Fe³⁺ při 430 nm. Ke kontrole efektivity značení bylo použito i iTLC s 20mM kyselinou citronovou (pH=5) jako mobilní fází.

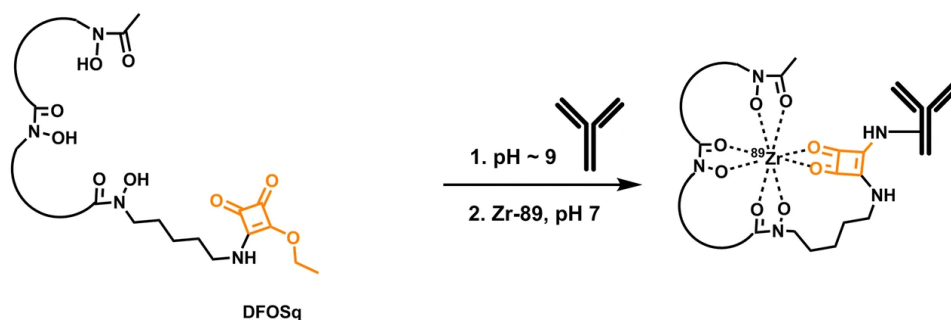
Vosjan a Perk, 2010 [40] zjednodušili proces konjugace protilátky a chelátoru do jednoho kroku tím, že použili p-isothiocyanatobenzyl-DFO. Protilátku a modifikovaný DFO smísili v molárním poměru 1:3. Vzniklý konjugát je třeba uchovávat při teplotě -20°C, kde vydrží minimálně 2 týdny. Bylo přidáno ⁸⁹Zr ve formě šfavelanu, značení probíhalo po dobu jedné hodiny. Úspěšnost značení byla větší než 85% a byla ověřena pomocí iTLC, kde byl jako mobilní fáze využit 20mM roztok kyseliny citrónové (pH=5).

Specifické reakce využívají thiolových skupin cysteinu, které jsou na protilátku uměle navázány tak, aby nebyla omezena její biologická funkce. Tedy na Fc fragment nebo tu část Fab fragmentu, kde nedochází k vazbě na antigen. Např. Junutula [38] si v protilátce trastuzumab vyhlédl jedno místo v těžkém a jedno v lehkém řetězci, kam cysteinové skupiny přidat, a takovéto protilátky nechal produkovat buňkami vaječnicků křečička čínského. Konjugací thiolové skupiny protilátek

s DFO se zabýval např. Tinianow, 2009 [37], který ve své práci použil N-[4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxyl]-desferrioxamin (DFO-Chx-Mal), N-bromoacetyldesferrioxamin (DFO-Bac) a N-iodoacetyldesferrioxamin (DFO-Iac). V případě DFO-Chx-Mal byl přidán chelátor k thio-trastuzumabu v poměru 8,5:1. Ve výsledném konjugátu byly na protilátce navázány v průměru 2 chelátory. U DFO-Bac a DFO-Iac byl použit nadbytek 12:1, resp. 11:1 a ve výsledném konjugátu bylo shodně v průměru 1,8 chelátoru na protilátku. Biologická aktivita konjugátů byla ověřována pomocí binding assay na buněčné linii BT474, kde bylo zjištěno, že modifikace protilátky trastuzumab nemá dopad na její vazebné schopnosti. Z těchto tří použitých chelátorů nejlepší výsledky poskytoval DFO-Chx-Mal, jelikož konjugace probíhala kratší dobu, bylo možné využít neutrálnější prostředí a poměr chelátor:protilátka byl nejvýhodnější. Poskytoval nejlepší výsledky i při značení.

H₃DFOSqOEt

Dalším derivátem desferrioxaminu B je jeho squaramid ester, který je možné připravit reakcí DFO-mesyátu s diethyl squaratem v zásaditém prostředí. Výsledkem reakce je ve vodě poměrně dobře rozpustný chelátor. Poskytuje stabilní vazbu na protilátku, přičemž na jednom polypeptidu je průměrně navázáno 4,5 molekuly chelátoru, aniž by docházelo ke tvorbě agregátů protilátky. Oproti samotnému DFO poskytuje silnější chelataci zirkonia díky atomům kyslíku dionu přítomným v linkeru (Obr. 1.6). Rudd, 2016 [41] provedl pokus, kde konjugoval tento typ DFO s trastuzumabem. Následně byl konjugát označen méně než za 30 minut, úspěšnost značení dosahovala 100 %, což bylo ověřeno pomocí iTLC (20mM kyselina citronová o pH=5 jako mobilní fáze) a reakcí s EDTA.



Obr. 1.6: Znázornění vazby mezi ⁸⁹Zr a protilátkou pomocí H₃DFOSqOEt [42]

Stejného linkeru pro konjugaci s protilátkou využívá i modifikace DFO se čtyřmi hydroxamátovými skupinami, která bylo pojmenována jako DFO* [42]. Poskytuje větší stabilitu radioimmunokonjugátu.

1.5 Principy použitých metod

1.5.1 Stanovení koncentrace proteinů

Metody využívané ke stanovení proteinů jsou založeny na různých principech a nedá se obecně říct, že by některá z nich byla nejvhodnější pro měření všech vzorků. Při výběru optimální metody je třeba vzít v úvahu řadu faktorů. Např. zda je v průběhu analýzy nutné zachovat biologické funkce daného proteinu, jakou má primární strukturu, vzít v úvahu jeho koncentraci ve vzorku a také přítomnost dalších látek, které by mohly analýzu ovlivnit. Vzhledem k tomu, že aminokyseliny (jakožto základní složky proteinu) ze svojí podstaty obsahují alespoň jednu aminoskupinu, lze místo koncentrace proteinu měřit množství přítomného dusíku ve vzorku. Další skupina metod pro stanovení bílkovin je založena na specifických reakcích činidel s funkčními skupinami peptidů. Aminokyseliny jsou vzájemně propojeny peptidovými vazbami, které je možno dokázat biuretovou reakcí. Stanovení proteinu je důležité v souvislosti s použitím navazujících metod.

Stanovení dle Bradforda

V roce 1976 publikoval M. Bradford článek, ve kterém popsal metodu, která se následně stala velmi používanou. Její přednosti spočívají v jednoduchosti, přesnosti a rychlosti provedení. Je založena na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein, při které dochází ke změně zbarvení z červené na modrou. Barvivo se naváže na aminokyseliny s bazickými postranními řetězci a také na ty, které obsahují aromatické jádro. Vzniklý komplex má vysoký absorpční koeficient, což zaručuje velkou přesnost metody. Navázání barviva na protein trvá 2 minuty, následně je provedeno měření absorbance při 595 nm. Komplex zůstává stabilní po dobu 1 hodiny [43, 44].

Je třeba připravit roztoky proteinů o známé koncentraci pro vytvoření kalibrační křivky, která je pro vyhodnocení vhodnější než použití Lambertova-Beerova zákona. Kalibrační křivkou je přímka, avšak při určité koncentraci dochází ke změně její směrnice. Tato nelinearita je dána překryvem ve spektru obou forem barviva. Blank je připraven záměnou roztoku proteinu za příslušné rozpouštědlo. Po jeho odečtení jsou naměřené hodnoty absorbance vyneseny v závislosti na koncentraci. Z vytvořené kalibrační přímky je možné určit koncentraci neznámého vzorku na základě znalosti absorbance. Pro nižší koncentrace je vhodné provést "microprotein assay", tato modifikace se liší poměrem proteinu a činidla. Bradford použil při analýze např. hovězí sérový albumin a hemoglobin. Je třeba, aby analyzované proteiny vázaly barvivo stejnou měrou jako ty, které byly použity k vytvoření kalibrační křivky, tj. měly podobný obsah aminokyselin, se kterými činidlo reaguje. Další výhodou tohoto stanovení proteinu je nízký počet interferujících látek. K získání falešně pozitivního výsledku dochází, pokud vzorek obsahuje např. dodecylsírán sodný a v menší míře analýzu ovlivňuje i přítomnost sodných a draselných iontů a některých sacharidů [43, 44].

Spektrofotometrie

Spektrofotometrické stanovení není destruktivní, a je tedy možné stanovit koncentraci proteinu i bez jeho poškození. Aromatické aminokyseliny (tryptofan, tyrosin a v menší míře i fenylalanin) absorbují světlo v ultrafialové oblasti. Nejvýhodnější je měřit absorbancí při 280 nm, což je v blízkosti absorpčního maxima tryptofanu (279 nm). Nevýhodou je blízkost této vlnové délky k absorpčnímu maximu nukleových kyselin (okolo 260 nm), které absorbují světlo násobně více. Pro korekci je vhodné provést měření pro obě vlnové délky a využít empirických vztahů. Metoda je vhodná pro koncentrace proteinu 20 - 3000 $\mu\text{g/ml}$ za použití standardu se stejným obsahem tryptofanu jako ve vzorku. Je možné také měřit absorbancí peptidové vazby a to při 200 - 220 nm. Toto měření je přesnější, jelikož není tak závislé na primární struktuře proteinů, avšak interferuje s některými složkami běžných pufrů [44, 45, 46].

1.5.2 Elektroforéza

Elektroforéza je jakožto jedna z elektromigračních metod založena na odlišné pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli. Rychlost pohybu (v) je přímo úměrná náboji částice (q) a intenzitě elektrického pole (E) a nepřímo úměrná její velikosti (poloměru r) a viskozitě prostředí (η)

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}. \quad (1.1)$$

K získání tohoto vztahu je třeba dát do rovnosti coulombickou sílu, která pohání náboje k opačně nabitě elektrodě, a sílu vnitřního tření, která působí proti tomuto pohybu. Tyto síly se po nějaké době vyrovnají. Podíl rychlosti částice a intenzity elektrického pole je označován jako mobilita a tedy veličina, která vypovídá o možnosti separace jednotlivých látek [47].

Metoda může být použita ve vodných roztocích pufrů (elektroforéza s pohyblivým rozhraním), s využitím gelu (gelová elektroforéza) nebo kapiláry (kapilární elektroforéza) [48].

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je založena na použití nevodivého gelu, který zabraňuje proudění a minimalizuje difuzi, což vede k větší ostrosti zón. Póry v gelu fungují jako síto, a je tedy možné od sebe rozdělit částice se stejnou pohyblivostí a to na základě jejich velikosti. Jedním z používaných gelů je agarosový. Jeho základem je agarobiosová jednotka, která se skládá z galaktosy a 3,6-anhydrogalaktosy. Póry v gelu mají velký průměr a většinu látek nedělá problém jimi bez omezení projít, výjimku tvoří proteiny s velmi velkou molekulovou hmotností nebo nukleové kyseliny [45, 44, 47].

Dalším používaným gelem v gelové elektroforéze je polyakrylamidový gel (PAGE). Ten vzniká polymerizací monomerů akrylamidu za přítomnosti N,N' -methylen-bis-amidu, který se skládá ze dvou molekul akrylamidu propojených methylenovou skupinou. Vznikají tak dlouhé lineární řetězce propojené N,N' -methylen-bis-amidovými molekulami. Vlastnosti gelu záleží na obsahu akrylamidu, který je udáván v procentech, přičemž používané gely mívají 3-30% [45, 44, 47].

Nízkomolekulární gely obsahují velké póry a jsou používány tam, kde je vyžadován volný pohyb analyzovaných látek. Při vyšším obsahu akrylamidu jsou póry menší, což je využíváno v případě, že je třeba separovat látky podle velikosti. Existují i tzv. gradientové gely, ve kterých se velikost póru zmenšuje s rostoucí vzdáleností a je tak možné dosáhnout lepšího rozdělení částic na základě velikosti. Gelovou elektroforézu je možné realizovat ve sloupcovém uspořádání, kdy je gel obsažen v trubičce, na jejíž koncích se nacházejí nádoby s puřem, do kterých jsou umístěny elektrody. Nevýhodou tohoto provedení je především nemožnost analyzovat více vzorků najednou. V současnosti je více používána aparatura, kdy je gelem naplněná destička umístěna do elektroforetické vany. Destička může být otočena vertikálně nebo horizontálně a obsahuje až 20 jamek. V obou případech jsou elektrody napojeny na zdroj, který poskytuje stejnosměrné napětí, obvykle v rozsahu 200-500 V. K minimalizaci nepříznivých dopadů tvorby tepla při tření (jako je vznik tepelných proudů) je vhodné, aby bylo součástí aparatury chlazení [45, 44, 47].

SDS-PAGE

Pro separaci proteinů na základě rozdílné velikosti je využívána elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za použití dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Ten se naváže na proteiny, přičemž na 1 g proteinu připadá 1,4 g SDS. Tím jim zajistí konstantní poměr náboje a velikosti, a tedy i stejnou pohyblivost. Vzorky se smíchají s činidlem, které obsahuje barvivo (obvykle bromfenolovou modř), SDS a glycerol. Barvivo umožňuje pozorování průběhu analýzy a glycerol zvyšuje hustotu vzorku, a tím zjednodušuje jeho aplikaci do jamky. V případě redukujícího činidla je přidán ještě 2-merkaptoethanol. Ten přerušuje disulfidické můstky zajišťující terciární strukturu proteinu, dojde tak k rozvolnění jeho prostorového uspořádání. Po přidání činidla (redukujícího či neredukujícího) je vzorek denaturován povařením a po vychladnutí nanesen do jamek [45, 48, 47].

Obvykle zjišťované molekulové hmotnosti se pohybují v rozsahu 15 až 200 kDa, jelikož je v tomto intervalu závislost logaritmu této veličiny na pohyblivosti lineární [47].

1.5.3 Chromatografie

Chromatografie zahrnuje separační metody, kde dochází k rozdělení složek vzorku mezi stacionární a mobilní fázi. Podle skupenství mobilní fáze lze rozdělit chromatografii na plynovou (GC) a kapalinovou (LC). Roli stacionární fáze může zastávat pevná látka nebo kapalina. Dále je možné metody dělit na základě uspořádání, to

může být plošné (např. chromatografie na tenké vrstvě - TLC), nebo sloupcové (HPLC) [48, 44].

HPLC

HPLC je zkratka pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Stacionární fází je pevná látka, která se nachází uvnitř kolony. Mobilní fází je kapalina, která protéká kolonou pod tlakem v definovaném směru. Analyty migrují kolonou odlišnými rychlostmi, které jsou dány afinitou k oběma fázím. Čím větší afinitu má látka ke stacionární fází, tím déle je v koloně pozdržena a následně z ní pomaleji uvolněna. Doba průtoku analytu kolonou se označuje jako retenční čas [48].

Při HPLC může být použita pouze jedna mobilní fáze (isokratická eluce) nebo jejich směs, přičemž poměr jednotlivých složek se může měnit v závislosti na čase (gradientová eluce). Jednotlivé mobilní fáze jsou vedeny do mixéru, který zajišťuje rovnoměrné mísení roztoků. Dále prochází odplyňovačem. K dávkování jednotlivých vzorků může být použit autosampler. Nanesený vzorek prochází společně s mobilní fází kolonou, následně je možné jednotlivé složky detekovat. Běžně používaný je například UV/VIS, radiometrický, hmotnostní nebo refraktometrický detektor [44].

Kolony pro HPLC jsou založeny na různých principech a jsou voleny na základě analyzovaného vzorku. Uspořádání, kdy je stacionární fáze polárního charakteru a mobilní fáze je nepolární, je označováno jako normální. V případě volby opačných polarit fází se jedná o reverzní uspořádání, které je často používáno při analýze peptidů a proteinů. Další možností je rozdělení na základě rozdílné hmotnosti částic, přesněji na základě rozdílného hydrodynamického objemu. Toto rozdělení je možné na základě pórovitosti stacionární fáze. Analyty je také možné dělit na základě elektrostatických interakcí a to iontově-výměnnou chromatografií [44].

2. Experimentální část

2.1 Obecné informace

2.1.1 Použité materiály a přístroje

K výrobě zirkonia-89 byl použit cyklotron U-120M Ústavu jaderné fyziky Akademie věd ČR, použitým terčem bylo yttrium o čistotě 99,999% a tloušťce 0,635 mm (American Elements). K separaci byla použita kolona ZR Resin od společnosti Triskem. Gama spektrum bylo změřeno pomocí HPGe spektrometru GMX45-Plus (Ortec), který byl energeticky a účinnostně zkalibrován. Použitým ovládacím softwarem byl Maestro. Aktivita značených konjugátů byla zjišťována pomocí přístroje Bqmetr4 (BQM).

Pro centrifugaci byla využita centrifuga Eppendorf Centrifuge 54177 R. Použitými vivaspiny byly Vivaspin 500 10 kDa (GE Healthcare).

Ke konjugaci byla použita protilátka cetuximab pod obchodním označením Erbitux o koncentraci 5 mg/ml od společnosti Merck. V následujícím textu bude pro ni používána zkratka CTX. H₃DFOSqOEt použitý ke konjugaci byl již připravený reakcí desferrioxaminu B mesylátu, N,N-diisopropylethylaminu a 3,4-diethoxy-3-cyklobuten-1,2-dionu v ethanolu - [49]. V textu bude označován jako DFO.

Pro HPLC analýzu byl použit chromatografický systém Agilent Technologies 1200 Series, který se skládá z degazéru (1260 Standard Degasser), pumpy (Quaternary Pump), autosampléru (Standard Autosampler). K ovládní 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. Jako barvicí činidlo byl použit Protein Assay Dye Reagent concentrate (Bio-Rad). Absorbance byla měřena na spektrofotometru Sunrise (Tecan).

Veškerá použitá voda byla deionizovaná (stanice TKA Smart2pure). V případě požadavku na roztoky v kvalitě *ultra pure* byla tato voda dočištěna pomocí chelatačního

čínidla CHELEX 100 sodium form od společnosti Sigma-Aldrich. V experimentech byly použity následující chemikálie:

- HCl (34-37%, for trace metal analyses, Normatom)
- kyselina šťavelová (99,999% trace metals basis, Sigma-Aldrich)
- uhličitan sodný (min. 99,8 %, Riedel-de Haën)
- NaCl (Sigma-Aldrich)
- glycerol (Sigma-Aldrich)
- SDS (10% v H₂O, Sigma-Aldrich)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich)
- tris(hydroxymethyl)amino-methan (Sigma-Aldrich)
- Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich)
- Destain Solution, Coomassie R-250 (Bio-Rad)
- dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)
- HEPES (Sigma-Aldrich)
- kyselina octová (Sigma-Aldrich)
- methanol (VWR Chemicals)
- PBS (Sigma-Aldrich)
- 2-merkaptoethanol (Sigma-Aldrich)
- borátový pufr (0,5M, pH=9, Alfa Aesar)
- MOPS SDS Running Buffer (20X, Novex)

Dále byly z výše uvedených chemikálií připraveny pufrы:

- Tris-HCl (0,5 M Tris, pH upraveno pomocí HCl na 6,8)
- 0,5M HEPES (pH 7)
- 20mM PBS (pH 7,4)

2.2 Postupy

Konjugace cetuximabu a DFO a značení připraveného konjugátu byly s modifikacemi provedeny podle [49].

2.2.1 Výroba a separace zirkonia-89

Yttriový terč byl na cyklotronu ostřelován protony o proudu $10 \mu\text{A}$ a energii $13,5 \pm 0,5$ MeV po dobu 1 h. Ozářený terč byl rozpuštěn v 6 ml 2M HCl (ředěno v chelexované vodě) a nanesen na kolonu ZR Resin. Kolona byla promyta 4 x 2,5 ml 2M HCl (ředěno v chelexované vodě) a následně 4 x 2,5 ml chelexované vody. Zirkonium-89 bylo eluováno 0,05M kyselinou šťavelovou (ředěno v chelexované vodě). Roztok byl odpařen do sucha při teplotě 120 °C. Bylo změřeno gama spektrum produktu.

2.2.2 Konjugace cetuximabu s DFO

Byly připraveny konjugáty cetuximabu s DFO v molárních poměrech 1:5, 1:10, 1:20 a 1:50. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v Tab. 2.1. Reakční objem byl 0,5 ml.

Tab. 2.1: Složení připravovaných konjugátů cetuximabu a DFO.

vzorek	$n_{CTX} : n_{DFO}$	m_{CTX} [mg]	m_{DFO} [mg]
A	1:5	1	0,02426
B	1:10	1	0,04852
C	1:20	1	0,09704
D	1:50	1	0,2426

800 μl cetuximabu bylo vneseno do vivaspinu, centrifugace probíhala 10 minut při 10°C rychlostí 5000 rpm. Vivaspin byl následně promyt 3x 400 μl borátového pufru. Byl připraven zásobní roztok DFO o koncentraci 0,6065 mg/ml (2,5 mg DFO, 120 μl DMSO, 880 μl chelexované vody, 3,12 ml borátového pufru). Byly připraveny konjugáty podle Tab. 2.1, roztoky byly doplněny na objem 0,5 ml borátovým pufrům. Konjugace probíhala přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byly konjugáty centrifugovány (10°C, 10 min, 5000 rpm) a promyty 3x 400 μl 0,9% (w/v) roztokem NaCl (v chelexované vodě).

Ke zjištění koncentrace protilátky v konjugátech bylo provedeno stanovení dle Bradforda. Byla vytvořena kalibrační křivka s použitím cetuximabu, jednotlivé kalibrační roztoky měly koncentrace 500 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 125 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 62,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ a 31,25 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Konjugáty byly naředěny 20x. Kalibrační roztoky i naředěný vzorek byly na mikrotitrační destičku nanášeny v tripletech, pipetovaný objem byl 10 μl . Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno 200 μl 5x zředěného barvicího činidla.

2.2.3 Značení konjugátu zirkoniem-89

Odparek obsahující ^{89}Zr byl rozpuštěn v 250 μl chelexované vody. Bylo přidáno 0,5 μl 2M Na_2CO_3 (ředěno v chel. vodě) tak, aby měl roztok slabě zásadité pH. Bylo přidáno 250 μl pufru HEPES (20mM pH=7). Výsledný roztok byl ponechán stát po dobu 5 minut, bylo potvrzeno neutrální pH.

Pro značení byl vybrán konjugát s molárním poměrem 1:20 (CTX:DFO). Bylo smícháno množství konjugátu obsahující 112,5 μg cetuximabu s roztokem ^{89}Zr o aktivitě uvedené v Tab. 2.2. Reakční objemy byly doplněny na objem nejaktivnějšího vzorku, tj. na 203 μl .

Tab. 2.2: Složení značených roztoků.

vzorek	m_{CTX} [μg]	$A_{^{89}\text{Zr}}$ [MBq]
1	112,5	6
2	112,5	13
3	112,5	26
4	112,5	54
5	112,5	110

Značení probíhalo 1 h. Následně byly roztoky přeneseny do vivaspinů, centrifugovány (4 min, 10000 rpm) a promyty 3x 400 μl 20mM PBS. Výsledné objemy byly přibližně 200 μl . Byla zjištěna koncentrace protilátky ve značeném konjugátu metodou dle Bradforda, postup byl stejný jako u neznačeného konjugátu. K dalším experimentům byly vybrány vzorky 2, 4 a 5.

2.2.4 HPLC

Pro stanovení výtěžku značení byl na HPLC jako mobilní fáze použit roztok obsahující 20mM HEPES a 150 mM NaCl (pH 7,39). Eluce probíhala isokraticky, průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min.

Pro analýzu byl připraven vzorek cetuximabu o koncentraci 0,5 mg/ml. Nástřik vzorku byl 10 μl . Konjugát CTX+DFO byl pro analýzu naředěn 10x, nástřik vzorku byl 10 μl . Značené vzorky byly analyzovány koncentrované, nástřik byl 5 μl .

Po separaci na koloně byl vzorek detekován na UV/VIS a radiometrickém detektoru. Na UV detektoru byla měřena absorbance při 220 nm. Na radiometrickém detektoru bylo nastaveno energetické okno 88-1000 keV.

2.2.5 SDS-PAGE

Byla provedena elektroforéza samotné protilátky, konjugátů v poměrech 1:5, 1:10, 1:20 a 1:50 a konjugátu 1:20 značeného ^{89}Zr o různé aktivitě (Tab. 2.4). V případě značeného konjugátu byla elektroforéza uskutečněna v den značení, po 24 hodinách a dále po 72 hodinách. Jako elektroforetický pufr byl použit MOPS.

Byl připraven neredukující vzorkový pufr (1,25 ml 0,5M Tris-HCl, 2 ml glycerol, 3,5 ml deionizovaná H_2O , 2 ml 10% SDS, 0,5 ml 0,1% bromfenolová modř). Následně byl připraven redukující vzorkový pufr tak, že bylo smíšeno 475 μl neredukujícího pufru a 25 μl 2-merkptoethanolu. Byly vytvořeny zásobní roztoky analyzovaných vzorků o koncentraci 267 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pro každý vzorek byly připraveny dva roztoky - neredukující (15 μl zásobního roztoku vzorku + 15 μl neredukujícího činidla) a redukující

(15 μl zásobního roztoku vzorku + 15 μl redukujícího činidla). Vialky obsahující vzorek a činidlo byly povařeny po dobu 5 minut.

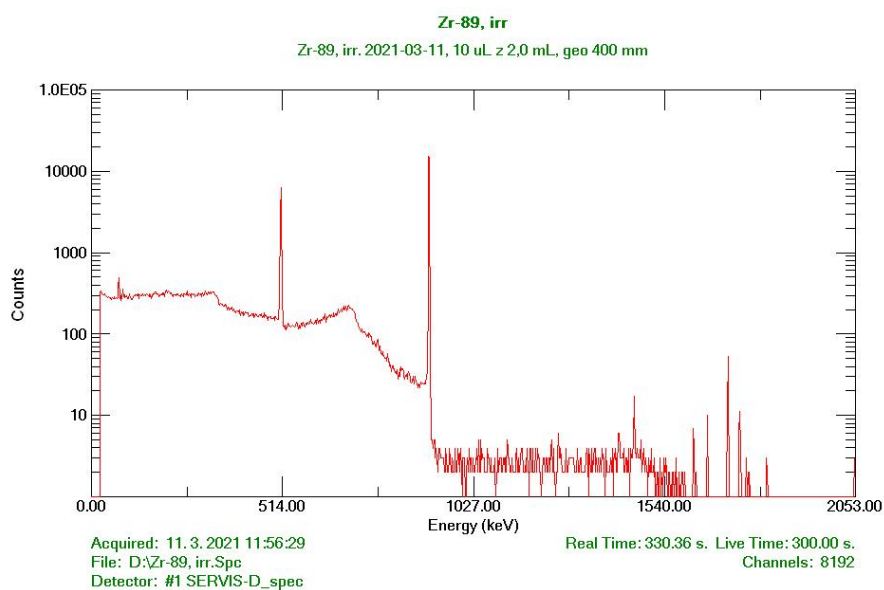
Destička s gelem byla umístěna do elektroforetické vany a naplněna pufrem MOPS. Do jamek bylo nanášeno 8 μl markeru a po 15 μl od všech vzorků tak, aby mezi redukujícími a neredukujícími byla jedna jamka volná. Elektroforéza probíhala při napětí 135 V. Po 80 minutách bylo napětí sníženo na 110 V pro zaostření zón. Tento proces trval 10 minut.

Po ukončení elektroforézy byl gel vložen do fixačního roztoku (5 minut). Následně byl gel zalit barvicím roztokem (45% methanol, 10% kyselina octová; 0,625 g Coomassie brilliant blue R-250 v 250 ml). Barvení probíhalo na kývačce po dobu 20 minut. Následně byl použit odbarvovací roztok (25% methanol, 10% kyselina octová). Odbarvování probíhalo na kývačce, první odbarvovací proces trval pět minut, druhý přes noc.

2.3 Výsledky a diskuse

2.3.1 Výroba a separace zirkonia-89

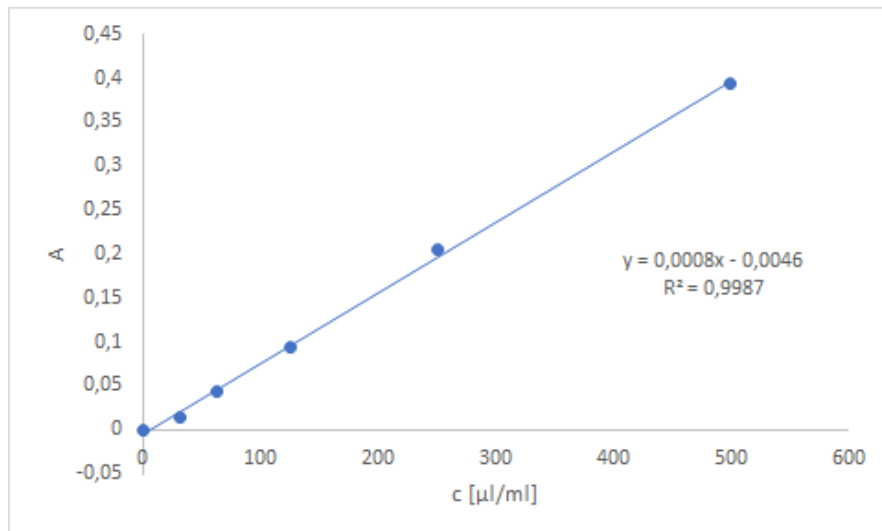
Bylo získáno ^{89}Zr o aktivitě 453 MBq. Na Obr. 2.1 se nachází gama spektrum vyrobeného a odseparovaného ^{89}Zr . Ve spektru se nacházejí dvě výrazné linky, 511 keV a 909 keV. Energie 511 keV odpovídá anihilačním fotonům, 909 keV je energie izomerního přechodu $^{89\text{m}}\text{Y}$ na základní stav. Jiné energetické linky nejsou odlišitelné od pozadí, lze tedy říct, že ^{89}Zr bylo prakticky radionuklidově čisté.



Obr. 2.1: Gama spektrum připraveného a odseparovaného ^{89}Zr .

2.3.2 Konjugace cetuximabu s DFO

Na Obr. 2.2 se nachází kalibrační křivka pro stanovení koncentrace cetuximabu v konjugátu CTX+DFO. Na základě fitu a znalosti absorbance byla zjištěna koncentrace konjugátů (Tab. 2.3).



Obr. 2.2: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace cetuximabu.

Tab. 2.3: Zjištěné koncentrace jednotlivých konjugátů.

vzorek	$n_{CTX} : n_{DFO}$	c_{CTX} [$\mu\text{l/ml}$]
A	1:5	2795
B	1:10	3495
C	1:20	2877
D	1:50	3159

2.3.3 Značení konjugátu zirkoniem-89

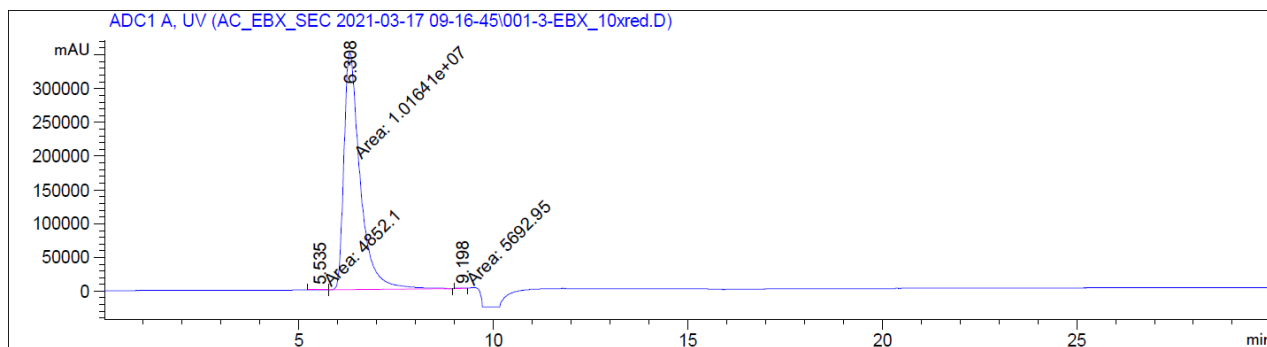
V Tab. 2.4 jsou zaznamenány aktivity ^{89}Zr , kterými byly konjugáty značeny (A_0), aktivity odseparovaných značených konjugátů (A) a koncentrace cetuximabu ve značených konjugátech (c_{CTX}). Koncentrace cetuximabu ve značeném konjugátu byla zjišťována pouze u vzorků 2, 4 a 5, jelikož s ostatními nebylo pracováno v další analýze.

Tab. 2.4: Složení značených roztoků.

vzorek	A_0 [MBq]	A [MBq]	c_{CTX} [$\mu\text{g/ml}$]
1	6	1,08	-
2	13	1,89	694
3	26	3,43	-
4	54	10,2	589
5	110	24,8	323

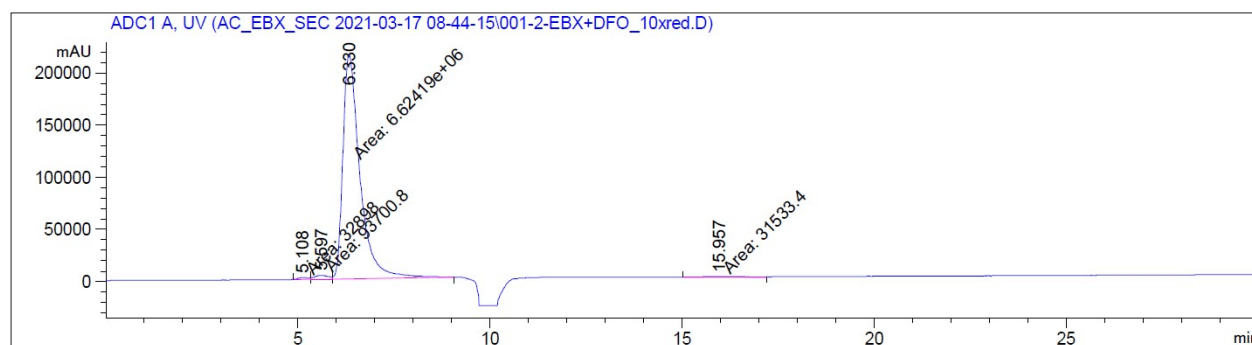
2.3.4 HPLC

Na Obr. 2.3 se nachází chromatogram cetuximabu o koncentraci 0,5 mg/ml, jehož retenční čas je 6,3 min.



Obr. 2.3: Chromatogram cetuximabu 0,5 mg/ml, detekce pomocí UV/VIS ($\lambda=220$ nm).

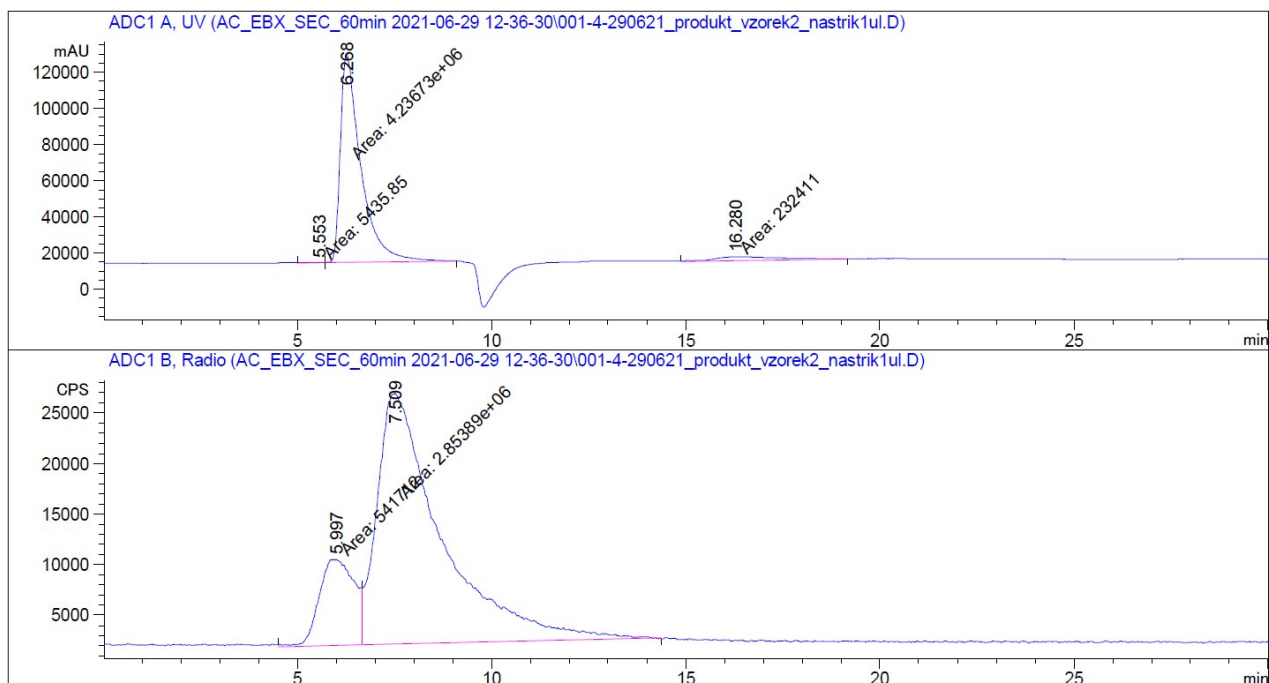
Na Obr. 2.4 se nachází chromatogram konjugátu CTX+DFO (1:20), který byl použit ke značení. Jeho retenční čas je 6,3 min. Dále se ve spektru nachází píky s retenčními časy 5,6 min a 16 min. Pík s retenčním časem 5,6 min pravděpodobně odpovídá agregátu protilátky, pík s retenčním časem 16 min pak jejím fragmentům. Na základě ploch píků lze usuzovat, že agregát je v celkovém množství protilátky zastoupen přibližně v 1,5 % a fragmenty v 0,5 %.



Obr. 2.4: Chromatogram CTX+DFO (1:20), detekce pomocí UV/VIS ($\lambda=220$ nm).

Po značení

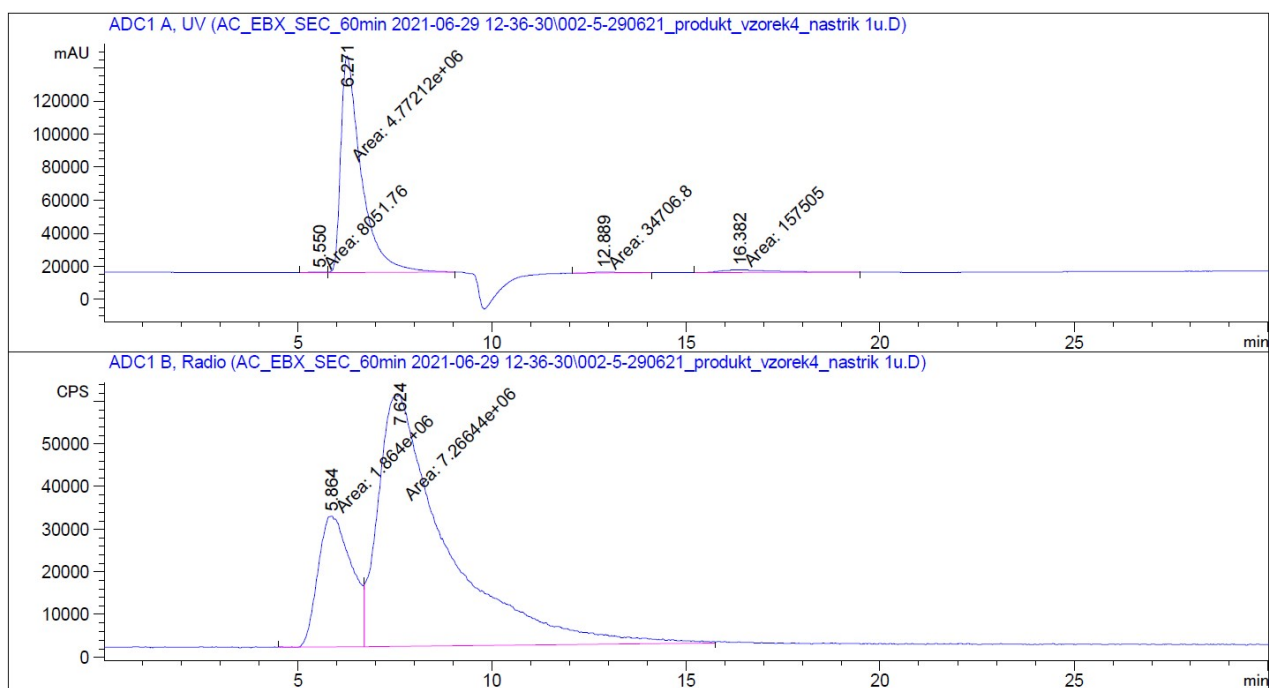
Na Obr. 2.5, 2.6 a 2.7 se nachází chromatogramy značených konjugátů (Tab. 2.4). Analýza probíhala ihned po označení.



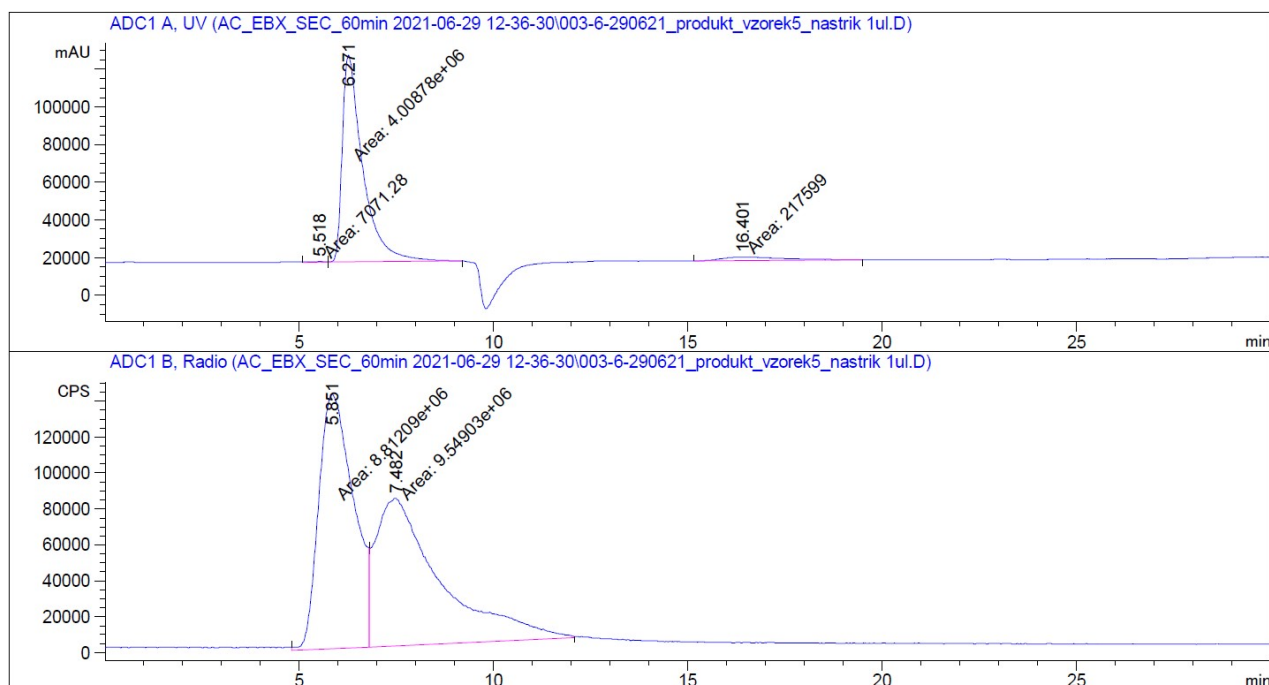
Obr. 2.5: Chromatogram vzorku 2 ($A=1,89$ MBq), detekce UV/VIS ($\lambda=220$ nm) a radiometrický detektor.

V případě vzorku 2 (Obr. 2.5) jsou na chromatogramu z UV/VIS detektoru patrné píky s retenčními časy 5,5 min, 6,27 min a 16,2 min. Na chromatogramu z radiometrického detektoru lze pozorovat píky s retenčními časy 6 min a 7,5 min. Retenční čas 6,3 min na UV/VIS a 7,5 min na radiometrickém detektoru odpovídá označenému konjugátu. Analyt s retenčním časem 5,6 min na UV/VIS detektoru a k němu odpovídající pík 6 min na radiometrickém detektoru pravděpodobně odpovídá agregátu konjugované protilátky, která vykazuje vysokou aktivitu ^{89}Zr . Analyt s retenčním časem 16,3 min na UV/VIS detektoru pravděpodobně odpovídá fragmentům protilátky, která nevykazuje žádnou aktivitu ^{89}Zr . Na základě ploch píků na UV/VIS chromatogramu je agregát zastoupen v přibližně 0,1 % a fragmenty v 5 % z celkového množství protilátky.

Podobné píky s obdobnými poměry ploch lze pozorovat i na Obr. 2.6 a 2.7. Je patrné, že poměr ploch prvního píku ku druhému u radiometrického detektoru se se zvyšujícím množstvím aktivity zvyšuje. Tj. aktivita agregátu je vyšší při značení větší aktivitou.



Obr. 2.6: Chromatogram vzorku 4 ($A=10,2$ MBq), detekce UV/VIS ($\lambda=220$ nm) a radiometrický detektor.



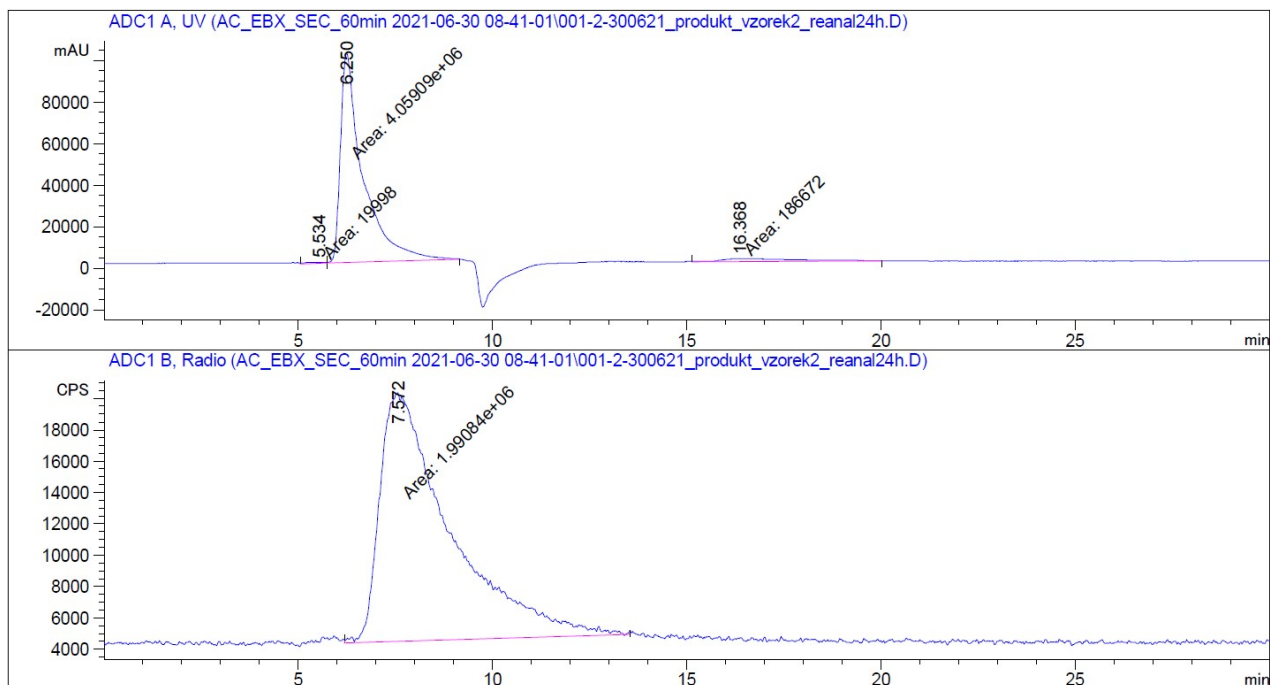
Obr. 2.7: Chromatogram vzorku 5 ($A=24,8$ MBq) detekce UV/VIS ($\lambda=220$ nm) a radiometrický detektor.

Po 24 hodinách od značení

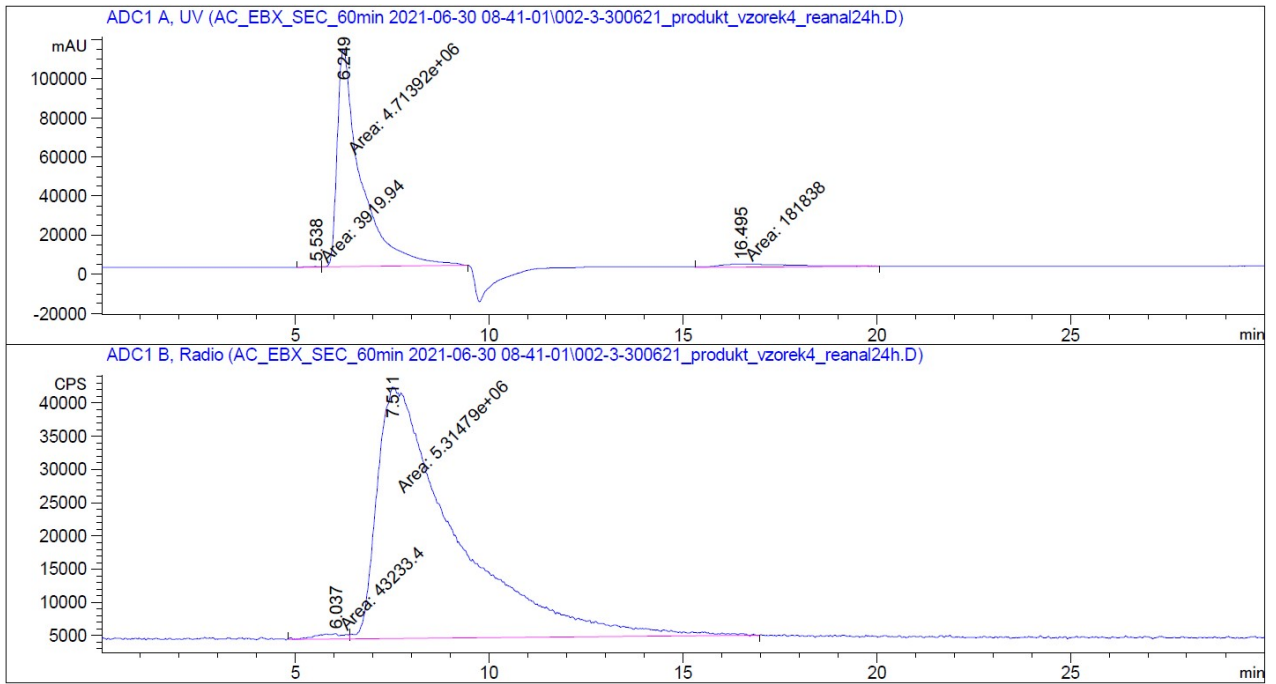
Na Obr. 2.8, 2.9 a 2.10 se nacházejí chromatogramy značených konjugátů (Tab. 2.4), analýza proběhla 24 od značení.

V případě vzorku 2 se na chromatogramu (Obr. 2.8) nachází pík s retenčním časem 6,3 min u UV/VIS detektoru, který odpovídá značenému konjugátu (pík s retenčním časem 7,6 min na radiometrickém detektoru). Na UV/VIS detektoru se nachází píky 5,6 min, který pravděpodobně odpovídá agregátu konjugované protilátky, a 16,4 min odpovídající jejím fragmentům. Z ploch jednotlivých píků lze usuzovat, že tvorba agregátů proběhla v 0,5 % a fragmentace v 4,4 %.

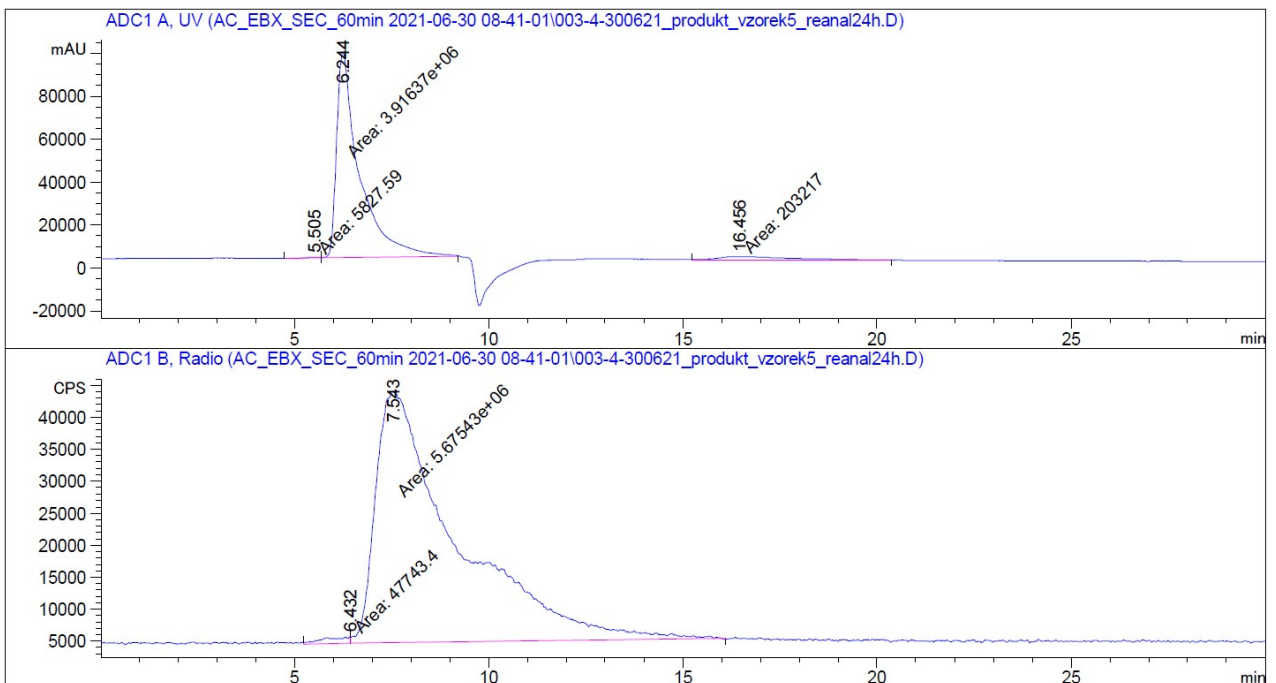
Obdobné píky lze pozorovat také u vzorků 4 a 5 (Obr. 2.9 a 2.10). Je patrné, že oproti analýze ihned po konjugaci se v radiometrickém chromatogramu nachází pouze jeden výrazný pík okolo 7,5 min. To může být vysvětleno tím, že během této doby mohlo dojít k uvolnění aktivity ^{89}Zr z agregátů protilátky, nebo disociaci agregátu na monomery.



Obr. 2.8: Chromatogram vzorku 2 ($A=1,89$ MBq) po 24 h od konjugace, detekce UV/VIS ($\lambda=220$ nm) a radiometrický detektor.



Obr. 2.9: Chromatogram vzorku 4 ($A=10,2$ MBq) po 24 h od konjugace, detekce UV/VIS detektorem ($\lambda=220$ nm) a radiometrický detektor.

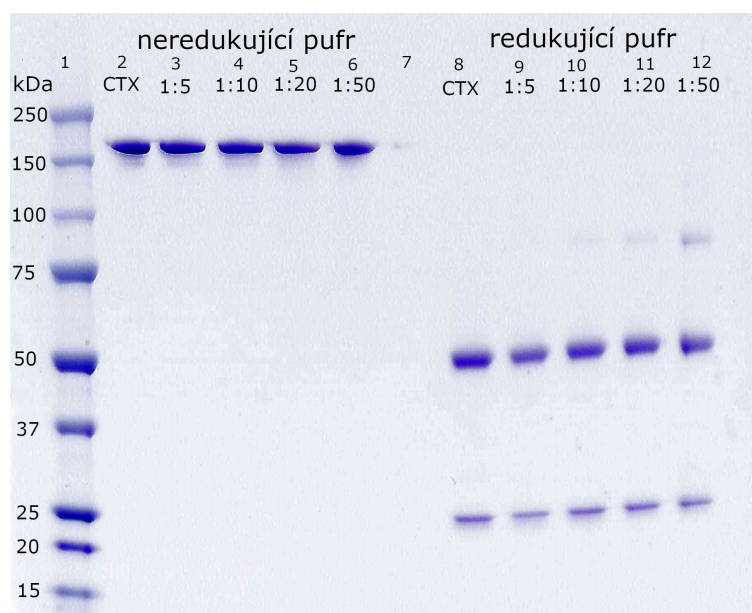


Obr. 2.10: Chromatogram vzorku 5 ($A = 24,8$ MBq) po 24 h od konjugace, detekce UV/VIS ($\lambda = 220$ nm) a radiometrický detektor.

2.3.5 SDS-PAGE

Na Obr. 2.11 se nachází gel po elektroforéze protilátky cetuximab a konjugátů CTX+DFO o poměrech 1:5, 1:10, 1:20 a 1:50. V jamce 1 se nachází bendy markeru. V jamkách 2-6 jsou vzorky za použití neredukujícího pufru, v jamkách 8-12 vzorky za použití redukujícího pufru. Neredukované protilátce odpovídá bend s molekulovou hmotností 150 kDa, těžkému řetězci 50 kDa a lehkému řetězci 25 kDa.

Ze skenu je patrné, že se zvyšujícím se molárním poměrem DFO dochází k většímu poškození struktury protilátky, jelikož se při použití redukující pufru vyskytují silnější bendy okolo molekulové hmotnosti 75 kDa. Tato molekulová hmotnost odpovídá spojení lehkého a těžkého řetězce, k jejich vazbě pravděpodobně přispívá DFO.

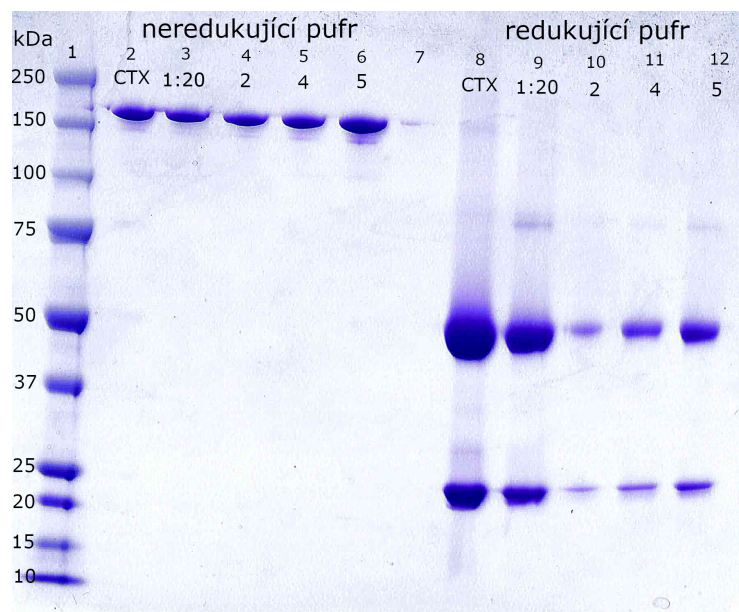


Obr. 2.11: SDS-PAGE cetuximabu a konjugátů CTX+DFO v molárních poměrech 1:5, 1:10, 1:20 a 1:50.

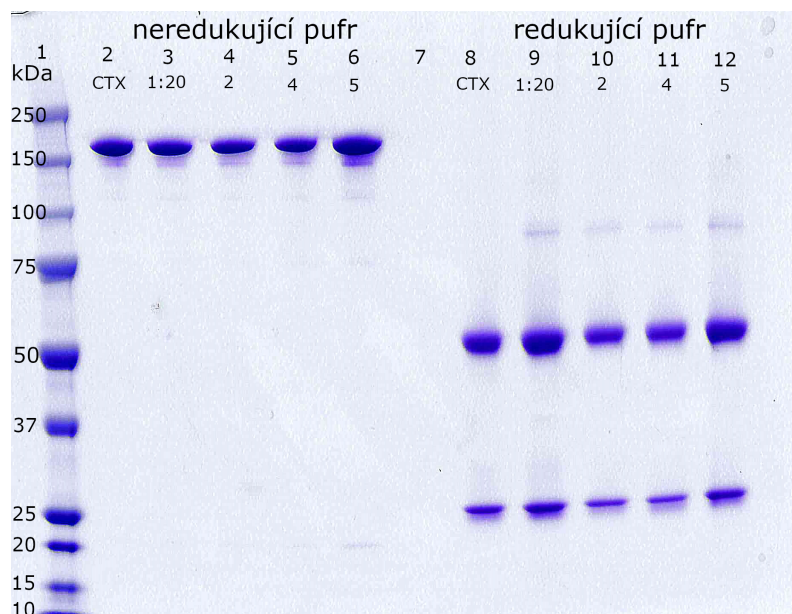
Ke značení byl zvolen molární poměr 1:20 (CTX:DFO), jelikož se jedná o dostatečný nadbytek DFO pro konjugaci k docílení poměru v konjugátu 1:4,5, a zároveň dochází k menšímu poškození protilátky.

Na Obr. 2.12, 2.13 a 2.14 se nacházejí skeny elektroforetických gelů vzorků 2, 4 a 5, k porovnání byl do jamky nanesen i cetuximab a neoznačený konjugát (1:20). Na Obr. 2.12 je SDS-PAGE provedená ihned po konjugaci, na Obr. 2.13 a 2.14 po 24 hod resp. po 72 hodinách.

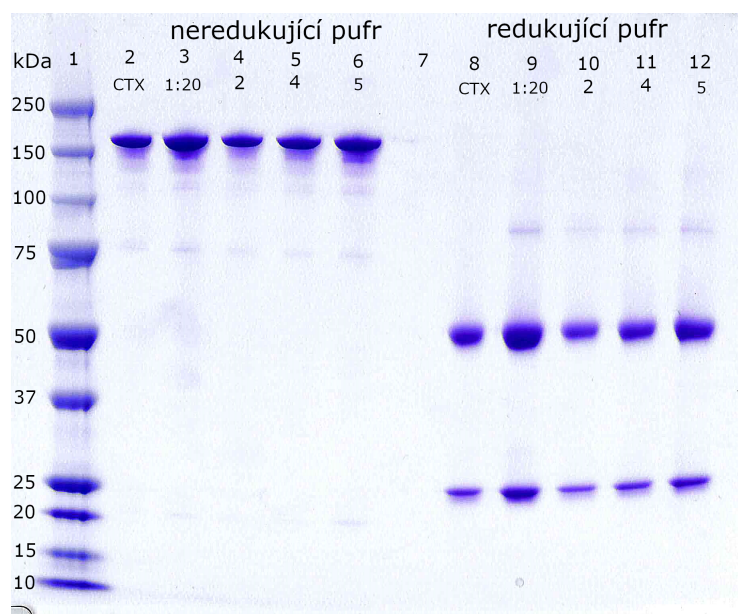
V jamce 1 se ve všech případech nachází marker, v jamkách 2-6 jsou vzorky za použití neredukujícího pufru, v jamkách 8-12 vzorky za použití redukujícího pufru.



Obr. 2.12: SDS-PAGE cetuximabu, konjugátů CTX+DFO (1:20) a vzorků 2,4 a 5.



Obr. 2.13: SDS-PAGE cetuximabu, konjugátů CTX+DFO (1:20) a vzorků 2,4 a 5 po 24 hodinách po konjugaci.



Obr. 2.14: SDS-PAGE cetuximabu a konjugátů CTX+DFO (1:20) a vzorků 2,4 a 5 po 72 hodinách po konjugaci.

Při porovnání Obr. 2.12, 2.13 a 2.14 je patrné, že při značení ^{89}Zr všemi zvolenými aktivitami (jamky 4-6 a 10-12) nedochází k výrazně většímu poškození protilátky ani po 72 hodinách od značení oproti konjugaci s DFO (jamky 3 a 9). Toto zjištění koresponduje s výsledky HPLC (kapitola 2.3.4), kde jsou plochy píků odpovídající fragmentaci zanedbatelné oproti značenému konjugátu.

Závěr

Byla provedena literární rešerše, která zahrnuje představení metody immunoPET a informace o jednotlivých komponentech radiofarmaka připraveného v experimentální části - ^{89}Zr , cetuximabu a $\text{H}_3\text{DFOSqOEt}$ - uvedených do širšího kontextu.

Byl připraven konjugát cetuximabu s $\text{H}_3\text{DFOSqOEt}$, kde reakční směs obsahovala jednotlivé složky v molárních poměrech 1:5, 1:10, 1:20 a 1:50. Na základě poznatků z SDS-PAGE byl ke značení vybrán konjugát s molárním poměrem 1:20, jelikož se jedná o dostatečný nadbytek $\text{H}_3\text{DFOSqOEt}$, aby ve výsledném konjugátu byly na jednu protilátku navázány v průměru 4,5 molekuly chelátoru, a zároveň nedochází k velkému poškození její struktury. Konjugát byl značen ^{89}Zr o různých aktivitách.

Pomocí SDS-PAGE a HPLC (detekce UV/VIS a radiometrickým detektorem) bylo zjištěno, že cetuximab nevykazuje výrazně větší poškození struktury při značení žádnou ze zvolených aktivit ^{89}Zr ve srovnání s neznačeným konjugátem. Pomocí obou metod byla zaznamenána fragmentace protilátky, ke které docházelo přibližně v 5 % (HPLC UV/VIS detektor). Na základě HPLC chromatogramů došlo po značení k označení agregátů protilátky, které vykazovaly vysokou aktivitu ^{89}Zr , přičemž po 24 h došlo pravděpodobně k uvolnění radionuklidu z agregátu nebo disociaci agregátu na monomery. Větší míra poškození nebyla pozorována ani 3 dny po značení na základě výsledků SDS-PAGE.

Jelikož nebylo pozorováno výrazné poškození struktury cetuximabu, bylo by v dalších pracích vhodné zjistit, zda byly zachovány jeho vazebné vlastnosti. To je možné např. s využitím metod ELISA, Western blot nebo buněčnými experimenty.

Literatura

- [1] DERI, Melissa A., Brian M. ZEGLIS, Lynn C. FRANCESCONI a Jason S. LEWIS. : ^{89}Zr : From radiochemistry to the clinic. *Nuclear Medicine and Biology*. 2013, **40**(1), 3-13. ISSN 09698051.
- [2] SIRÁK, I., J. HATLOVÁ, M. VOŠMIK, A. RYŠKA a H. VOŠMIKOVÁ. Receptor pro epidermální růstový faktor a jeho úloha v radioterapii. *Klinická onkologie*. 2008, **21**(6), 338-347.
- [3] 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.
- [4] KUPKA, Karel, Jozef KUBINYI a Martin ŠÁMAL, ed. *Nukleární medicína*. 6. Praha: Nakladatelství P3K, 2015. ISBN 978-80-87343-60-9.
- [5] Český lékopis 2017. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-802-7105-007.
- [6] PHELPS, Michael E., ed. *PET: Physics, instrumentation, and scanners*. New York, USA: Springer Science+Business Media, 2006. ISBN 978-0-387-34946-6.
- [7] JARÝ, Vítězslav a Jan PEJCHAL. *Scintilátory kolem nás*. Praha: Středisko společných činností AV ČR, 2007. Věda kolem nás. ISBN 978-80-270-2078-2.
- [8] WEBER, Wolfgang A. Positron Emission Tomography As an Imaging Biomarker. *Journal of Clinical Oncology*. 2006, **24**(20), 3282-3292. ISSN 0732-183X.
- [9] Postavení, přínos a možná úskalí integrovaného ^{18}F FDG PET/CT vyšetření u nemocných s ne-hodgkinskými lymfomy. *Linkos* [online]. [cit. 2021-4-18]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/postaveni-prinos-a-mozna-uskali-integrovaneho-18fdg-pet-ct-vysetreni-u-nemocnych/>
- [10] ADAM, Jan, Jan KADEŘÁVEK, Filip KUŽEL, Jiří VAŠINA a Zdeněk ŘEHÁK. Současné trendy ve využívání PET radiofarmak k onkologické diagnostice. *Klinická onkologie*. 2014, **27**(1), 129-136. ISSN 0862495X.
- [11] HARRISON, Michael R., Daniel J. GEORGE, Terence Z. WONG a Andrew J. ARMSTRONG. Radium-223 chloride: a potential new treatment for castration-resistant prostate cancer patients with metastatic bone disease. *Cancer Management and Research*. 2013, **5**(1), 1-14. ISSN 1179-1322.

- [12] *Nudat 2.8* [online]. National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory [cit. 2021-4-22]. Dostupné z: <https://www.nndc.bnl.gov/nudat2/>
- [13] SOBOTKOVÁ, Marta a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. *Remedia* . 2008, **18**(5), 356-364.
- [14] GOOSSENS, Nicolas, Shigeki NAKAGAWA, Xiaochen SUN a Yujin HOSHIDA. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*. 2015, **4**(3), 256–269.
- [15] NEKULOVÁ, Mirka. Současné možnosti laboratorního vyšetřování pro onkologicky nemocné: 1. část: kdy a jak vyšetřovat nádorové markery. *Onkologie* . 2008, **2**(4), 229-232.
- [16] 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.
- [17] SHARKEY, Robert M. a David M. GOLDENBERG. Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008, **60**(12), 1407-1420.
- [18] *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>.
- [19] LARENKOV, BUBENSCHIKOV, MAKICHYAN, ZHUKOVA, KRASNOPEROVA a KODINA. Preparation of Zirconium-89 Solutions for Radiopharmaceutical Purposes: Interrelation Between Formulation, Radiochemical Purity, Stability and Biodistribution. *Molecules*. 2019, **24**(8), 1534. ISSN 1420-3049.
- [20] WANG, Ling Yun a Man Seung LEE. A review on the aqueous chemistry of Zr(IV) and Hf(IV) and their separation by solvent extraction. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* . 2016, **39**, 1-9. ISSN 1226086X.
- [21] 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.
- [22] 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), 467-471. ISSN 0033-8230.
- [23] 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.

- [24] PRITYCHENKO B., A. SONZOGNI. *Q-value calculator* [online]. NNDC, Brookhaven National Laboratory [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <http://www.nndc.bnl.gov/qcalc>.
- [25] 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.
- [26] LEBEDA, Ondřej, Jan ŠTURSA a Jan RÁLIŠ. Experimental cross-sections of deuteron-induced reaction on ^{89}Y up to 20MeV; comparison of $\text{natTi}(d,x)^{48}\text{V}$ and $^{27}\text{Al}(d,x)^{24}\text{Na}$ monitor reactions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* ., 2015, (360), 118–128.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] *Product sheet - Zr Resin* [online]. Triskem [cit. 2021-6-16]. Dostupné z: https://www.triskem-international.com/scripts/files/5f46345d580ae1.30511386/PS_ZR-Resin_EN_171218.pdf
- [30] 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.
- [31] FLAHERTY, Dennis K. *Immunology for pharmacy*. St. Louis, Mo.: Elsevier, 2012. ISBN 9780323069472.
- [32] CWIERTKA, Karel, Radek TROJANEC, Kateřina ŠPAČKOVÁ a Marián HAJDÚCH. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2004, (18), 165-170.
- [33] ZHANG, Hongtao, Alan BEREZOV, Qiang WANG, Geng ZHANG, Jeffrey DREBIN, Ramachandran MURALI a Mark I. GREENE. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest*. 2007, 117(8), 2051–2058.
- [34] TOMAS, Alejandra, Clare E. FUTTER a Emily R. EDEN. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends in Cell Biology*. 2014, **24**(1), 26-34. ISSN 09628924.

- [35] 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.
- [36] *Erbitux*. SÚKL [online]. Praha [cit. 2021-04-02]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0028761>
- [37] TINIANOW, Jeff N., Herman S. GILL, Annie OGASAWARA, et al. Site-specifically ⁸⁹Zr-labeled monoclonal antibodies for ImmunoPET. *Nuclear Medicine and Biology*. 2010, **37**(3), 289-297. ISSN 09698051.
- [38] JUNUTULA, Jagath R, Helga RAAB, Suzanna CLARK, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nature Biotechnology*. 2008, **26**(8), 925-932. ISSN 1087-0156.
- [39] 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 ⁸⁹Zr-labeled antibodies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* . 2017, **27**(4), 708-712. ISSN 0960894X.
- [40] VOSJAN, Maria J W D, Lars R PERK, Gerard W M VISSER, Marianne BUDDE, Paul JUREK, Garry E KIEFER a Guus A M S VAN DONGEN. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nature Protocols*. 2010, **5**(4), 739-743. ISSN 1754-2189.
- [41] 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.
- [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 ⁸⁹Zr-immuno-PET. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2021, **48**(3), 694-707. ISSN 1619-7070.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] WILSON, Keith, WALKER, John M., HOFMANN, Andreas a CLOKIE, Samuel. *Wilson and Walker's principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Eighth edition. New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2018. ISBN 978-1-316-61476-1.

- [46] KODÍČEK, Milan, VALENTOVÁ, Olga a HYNEK, Radovan. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- [47] MANZ, A., Petra S. DITTRICH, Nicole PAMME a Dimitri IOSSIFIDIS. *Bioanalytical chemistry*. Second edition. London: Imperial College Press, 2015. ISBN 978-1-78326-671-5.
- [48] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody. 3., přeprac. vyd.* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 978-807080-449-0.
- [49] *Electronic Supplementary Material (ESI)* [online]. ChemComm, The Royal Society of Chemistry 2016 [cit. 2021-7-8]. Dostupné z: <http://www.rsc.org/suppdata/c6/cc/c6cc05961a/c6cc05961a1.pdf>