České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie
Obor: Jaderná chemie

Značení konstruktů chelátor-polymer-protilátka/peptid izotopy mědi

Labelling of chelator-polymer-antibody/peptide constructs with isotopes of copper

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracoval: Marie Balková
Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Červenák, Ph.D.
Rok: 2022

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie Akademický rok **2021/2022**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student: **Marie Balková**

Studijní program: Aplikace přírodních věd

Obor: Jaderná chemie

Název práce: **Značení konstruktů chelátor-polymer-protilátka/peptid izotopy**
(česky) **mědi**

Název práce: Labelling of chelator-polymer-antibody/peptide constructs with isotopes of copper
(anglicky)

Pokyny pro vypracování:

Listopad-Prosinec: Příprava rešeršní části práce a příprava experimentů, příprava ^{64}Cu a ^{61}Cu

Leden-Únor: Dokončení rešeršní části práce, vývoj analytické metody na zjištění čistoty konstruktů chelátor-polymer-protilátka

Březen-Duben: Příprava experimentální části práce, značení konstruktů pomocí ^{64}Cu a ^{61}Cu

Květen-Červen: Vyhodnocování výsledků experimentů, závěrečné úpravy práce

Doporučená literatura:

[1] Duncan, R., Polymeric Drug Delivery Systems, Kwon, G. S., editor; Taylor&Francis: 2005; pp. 1-92.

[2] Venditto V.J., et al., Advanced Drug delivery Reviews 2013, 65, 80-88

[3] Heinrich A.-K., et al., Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15, 998 – 1007
[4] Townsend E.-C. et al, Cancer Cell 2016, Chapuy B et al, Blood 2016
[5] Sirova M., et al., Cancer Immunol Immunother 2007, 56, 35-47

Jméno a pracoviště vedoucího práce:
Ing. Jaroslav Červenák, Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Jméno a pracoviště konzultanta:
doc. RNDr. Ján Kozempel, Ph.D., Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Datum zadání bakalářské práce: 20. 10. 2021

Termín odevzdání bakalářské práce: 7. 7. 2022
Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.

……
Garant oboru

prof. Ing. Jan John, CSc.

……..
Vedoucí katedry

prof. Ing. Igor Jex, DrSc.

……..
Děkan

V Praze dne: 20. 10. 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Ing. Jaroslava Červenáka, Ph.D. a použila jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v přiloženém seznamu.

V Praze 5. ledna 2022 .....

Marie Balková

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Jaroslavu Červenákovi,Ph.D., vedoucímu této práce, a Markétě Kleinové za jejich nekonečnou trpělivost, ochotu, mnoho cenných rad a připomínek. Poděkování rovněž patří dlouholeté kamarádce Terce za jazykovou korekturu a stylistické úpravy. Na závěr děkuji rodině a příteli, kteří mě po celou dobu studia usilovně podporovali.

Název práce:
Značení konstruktů chelátor-polymer-protilátka/peptid izotopy mědi

Autor: Marie Balková

Studijní program: Aplikace přírodních věd
Obor: Jaderná chemie
Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Červenák, Ph.D.
Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze
Konzultant: doc. RNDr. Ján Kozempel, Ph.D.
Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze

Abstrakt: Tato práce se zabývá značením nově navržených konstruktů mědi-61 a mědí-64. Hlavním cílem této práce je vypracovat literární rešerši, která popisuje použití mědi v pozitronové emisní tomografii a výběr vhodných bifunkčních chelátorů pro izotopy mědi. Dále navrhnout analytickou metodu na zjištění čistoty konstruktů chelátor - polymer - protilátka a jejich následné značení ^{61}Cu a ^{64}Cu. V experimentální části byla popsána kontrola kvality mědi a shrnuty postupy značení jednotlivých konstruktů. Výsledkem experimentální části jsou označené konstrukty.

Klíčová slova: PET, izotopy mědi, chelátory mědi, značení konstruktů

Title:
Labelling of chelator-polymer-antibody/peptide constructs with isotopes of copper

Author: Marie Balková

Abstrakt: This thesis is focused on labelling of newly designed constructs of copper-61 and copper-64. The main goal of this thesis is to elaborate literary research, which is describing copper application in positron emission tomography and selecting suitable bifunctional chelator for isotopes of copper. Another goal was to propose analytical method for purity inspecting of chelator - polymer - antibody and their labelling ^{61}Cu and ^{64}Cu. In experimental part of this thesis was described copper quality check and made summary of labelling of each construct. The result of experimental part are constructs which was successfully labelled.

Key words: PET, copper isotopes, copper-specific chelators, labelling of constructs

Obsah

Úvod **17**

1 Teoretická část **19**
1.1 Pozitronová emisní tomografie 19
1.2 Radionuklidy používané v pozitronové emisní tomografii 20
1.2.1 Izotopy mědi používané pro PET 21
1.3 Konjugace a nosiče 26
1.3.1 Konstrukty 26
1.3.2 Optimální bifunkční chelátory pro sloučeniny s radionuklidy mědi 27
1.3.3 Kinetika v lidských tkáních 29
1.4 Kontrola kvality 30
1.4.1 Radionuklidová a radiochemická čistota 30
1.4.2 Chemická čistota 30
1.4.3 Hmotnostní aktivita 31
1.4.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 31

2 Experimentální část **33**
2.1 Kontrola kvality 33
2.1.1 Radionuklidová a radiochemická čistota 33
2.2 Značení konstruktů 35
2.2.1 Podmínky značení 36
2.3 Analýza 36

3 Diskuze a výsledky **39**
3.1 Kontrola kvality 39
3.2 Značení konstruktů 40

Závěr **43**

Literatura **44**

Přílohy **50**

A Struktury značených konstruktů **51**

B Naměřené chromatogramy **55**

Seznam zkratek

ACBP	Acyl-CoA binding protein-1
ATSM	Diacetyl-bis- (N4-methyltiosemikarbazónový) komplex
BGO	Bismut germánium oxid
CB-TE2A	Kyselina 1,4,8,11-tetraazabicyklo [6.6.2] hexadekan-4,11-dioctová
CT	Počítačová tomografie (computed tomography)
DO2P	Kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,7-di (methylfosforečná)
DOTA	Kyselina tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
DTPA	Diethylentriaminpentaacetát
EBX	Erbitux
EDTA	Kyselina ethylenndiamintetraoctová
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru (Epidermal growth factor receptor)
FDG	2-[^{18}F]-fluoro-2-deoxy-D-glukóza
GSO	Gadolinium oxyorthosilikát
LSO	Lutecium oxyorthosilikát
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPMA	N-(2-Hydroxypropyl)methakrylamid
MES	Kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová
NaOH	Hydroxid sodný
NOTA	Kyselina triazacyklononan-1,4,7-tetraoctová
PET	Pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography)
PTSM	Pyruvaldehyd bis - (N4-metyltiosemikarbazónový) komplex
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (Single-Photon Emission Computed Tomography)
TETA	Kyselina tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetraoctová
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)

Seznam obrázků

1.1 Diagnostická fáze [12] 21
1.2 Terapeutická fáze [12] 21
1.3 PET snímek po aplikaci Ga-68 DOTATOC [12] 21
1.4 Rozpadové schéma ^{61}Cu [18] 24
1.5 Rozpadové schéma ^{64}Cu [21] 25
1.6 Rozpadové schéma ^{67}Cu [26] 26
1.7 Struktura sarcophaginu 28

A.1 Charakteristika ligandu RAM 14 51
A.2 Charakteristika ligandu RAM 15 52
A.3 Charakteristika ligandu RAM 16 53

B.1 Chromatogram MES 55
B.2 Chromatogram MES + ^{61}Cu 56
B.3 Chromatogram MES + ^{61}Cu 56
B.4 Chromatogram MES + ^{64}Cu 57
B.5 Chromatogram RAM 14 57
B.6 Chromatogram RAM 14 značený ^{61}Cu 58
B.7 Chromatogram RAM 14 značený ^{64}Cu 58
B.8 Chromatogram RAM 15 59
B.9 Chromatogram RAM 15 značený ^{61}Cu 59
B.10 Chromatogram RAM 15 značený ^{64}Cu 60
B.11 Chromatogram RAM 16 60
B.12 Chromatogram RAM 16 značený ^{61}Cu 61
B.13 Chromatogram RAM 16 značený ^{64}Cu 61

Seznam tabulek

1.1 Radioizotopy mědi s využitím v nukleární medicíně [14] 23
1.2 Radioizotopy mědi s využitím v nukleární medicíně [14] 23

2.1 Značení vzorků 35
2.2 Vzorky analyzované při značení ^{61}Cu 37
2.3 Vzorky analyzované při značení ^{64}Cu 37

3.1 Výsledky radiochemické čistoty jednotlivých vzorků 39
3.2 Výtěžky značení jednotlivých konstruktů ^{61}Cu 40
3.3 Výtěžky značení jednotlivých konstruktů ^{64}Cu 40

Úvod

V současnosti narůstají případy, kdy je pacientům diagnostikován určitý druh nádorového onemocnění. V roce 2018 byla na celém světě sdělena tato diagnóza přibližně 18 milionům lidí, z toho 9,5 milionů bylo mužů a zbývajících 8,5 milionů byly ženy [1].

Dle výzkumu, který proběhl v České republice v roce 2015, každý třetí Čech trpí onkologickým onemocněním a každý čtvrtý Čech na to umírá. Každý rok v České republice zemře na rakovinu téměř 27 000 lidí, což odpovídá tomu, že v průměru každých 20 minut v naší zemi zemře jeden člověk na nádorové onemocnění. V počtu onkologických onemocnění zaujímáme přední příčky v Evropě [2].

Dnes tato onemocnění představují druhý nejčastější důvod úmrtí. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace v příštích 20 letech stoupne počet nemocných ročně o 70 procent. Příčinou tohoto nárůstu je především vývoj diagnostických metod, ale také nezdravý životní styl. Prevence rakoviny je jednou z nejvýznamnějších výzev v oblasti veřejného zdraví 21. století.

Karcinomy plic a prsu byly nejčastějšími rakovinami na světě, z nichž každá přispěla 12,3 % z celkového počtu nových případů s onkologickými diagnózami v roce 2018. Nejčastějším karcinomem byl v roce 2018 kolorektální karcinom.

Moderní medicína využívá k léčbě rakoviny tři základní metody: chirurgickou léčbu, chemoterapii a radioterapii. Chirurgická léčba představuje základní léčebný postup, ten však není u některých pacientů možný. Zde závisí především na druhu, velikosti a lokalizaci nálezu. Dalším léčebným směrem v onkologii je chemoterapie. Ta funguje na principu podávání cytostatik, která zastavují dělení buněk. Cytostatika bohužel nejsou specifická, tudíž ničí i zdravou tkáň.

Krátce po objevení rádia Marii Curii-Skłodowskou v roce 1898 se jeho léčebných účinků začalo využívat v onkologii. Od té doby prošla metoda řadou změn. Radioterapie se v současné době používá při 50 % léčby zhoubných nádorů. Můžeme ji rozdělit na teleterapii a brachyterapii. Teleterapie využívá vnější ozařování pomocí lineárních urychlovačů a kobaltových ozařovačů, zatímco brachyterapie je ozařování na krátkou vzdálenost. Zdroj záření se umisťuje do blízkosti nádoru nebo do nádoru samotného. Brachyterapie je vždy kombinovaná s teleterapií. Tyto tři výše zmíněné metody se nejčastěji kombinují a vzájemně doplňují. Nynější výzkum klade důraz především na genovou terapii a imunoterapii, které díky své selektivitě mají mnohem menší zátěž na organismus pacienta.

Léčba otevřenými zářiči je nedílnou součástí nukleární medicíny. Nejčastěji se zde volí radionuklidy podléhající β^- nebo α (trend posledních let) přeměně, díky krátkému doletu alfa částic (řádově několik milimetrů). Hlavní výhoda použití α zářičů je v jejich menšímu doletu, než je tomu u přeměny β, tudíž dochází k minimálnímu poškození okolních tkání. Zásluhou selektivního vychytávání radiofarmaka

v cílové tkání a již zmíněnému doletu záření může být dosaženo mnohem většího stupně ozáření cílové tkáně, než je tomu u zevního ozáření. Radioimunoterapie je založena na aplikaci monoklonálních protilátek s navázanými radionuklidy emitujícími záření β^-, což vede k cílené fixaci těchto radionuklidů na povrchy maligních buněk.

Účinku ionizujícího záření se nevyužívá pouze při léčbě nádorového onemocnění, ale také k zobrazování. Pro diagnostiku se v dnešní době využívá 90 % radiofarmak. Zobrazování v medicíně je momentálně založeno na dvou zobrazovacích technikách SPECT a PET. Klinicky zavedená diagnostická radiofarmaka se spoléhají na několik lékařských radionuklidů, které emitují γ paprsky vhodné energie (SPECT) nebo pozitrony (PET). Zobrazování pomocí radiofarmak spočívá zejména ve vychytávání nebo přímém zacílení značené sloučeniny v zobrazovaném orgánu či tkáni. V posledních letech došlo k růstu počtu nových radionuklidů navržených pro zobrazování, ale také léčbu různých onemocnění [3, 4].

Kovy obvykle nemohou být podávány samostatně, jelikož by docházelo k nežádoucí distribuci radioaktivity v těle pacienta, proto je snaha o jejich připojení ke specifickým nosičům, jako jsou peptidy či monoklonální protilátky, které mají vhodné biologické vlastnosti. Pro stabilitu *in vivo* kovu musí být radionuklid zakomplexován s vhodným ligandem. Obecnou strukturou radiofarmaka je nosič - bifunkčný chelátor - radionuklid. Bifunkční chelátor je na jedné straně připojený k nosiči a na straně druhé komplexuje daný radionuklid [3, 4].

Cílem této práce bylo označení tří konstruktů radionuklidy ^{61}Cu a ^{64}Cu, které jsou vhodnými adepty pro teranostické použití. Tyto radionuklidy byly použity pro jejich dobré zobrazovací vlastnosti. Navrhovaný systém polymer - radionuklid - nosič má významně prodlužovat cirkulaci terapeutického/teranostického radionuklidu v organismu, a zároveň významně zvyšovat jeho akumulaci v solidních nádorech nebo metastázách (což je zapříčiněno tím, že velké molekuly jsou obecně pomaleji vylučovány z organismu) a aktivně cílit proti receptorům epidermálního růstového faktoru.

Kapitola 1

Teoretická část

1.1 Pozitronová emisní tomografie

První zmínky o zobrazovacích metodách jsou datovány na konec 19. století, kdy bylo objeveno rentgenové záření. V následujících letech došlo k rozvoji těchto metod. Největší rozvoj byl zaznamenán v období druhé světové války, kdy byla potřeba vyšetření zraněných vojáků. Rentgenové záření se využívá i v dnešní době, avšak přístroje, které ho využívají jako zdroj záření a detekční systémy detekující toto záření, prošly již mnohými modernizacemi.

Koncem 60. let 20. století se v lékařské diagnostice začínají využívat počítače. První klinický prototyp výpočetní tomografie byl představen 1. října 1971 ve výzkumných laboratořích EMI. Rozdíl mezi zobrazením pomocí rentgenu a výpočetní tomografie spočívá v tom, že rentgenový snímek je pouze sumační. Všechny orgány, které jsou ve skutečnosti 3-D jsou zobrazeny do 2-D roviny. Výsledný CT obraz ve srovnání se skiagrafickým vyšetřením poskytuje podstatně více detailů, ale za cenu vyšší dávky.

Pozitronová emisní tomografie byla uvedena do praxe až v 90. letech 20. století. PET je momentálně jedna z nejmodernějších molekulárních zobrazovacích metod, která prostřednictvím radioaktivně značených látek, anebo molekul - radiofarmak, umožňuje trojrozměrně zobrazit procesy v lidském těle. Molekulární zobrazovací metoda je neinvazivní zobrazení, které napomáhá k identifikaci a kvantifikaci biologických procesů na buněčné a podbuněčné úrovni v živých organismech [5]. V kombinaci s počítačovou tomografií patří k hlavním zobrazovacím metodám nejen v onkologii, ale také v neurologii, kardiologii a dalších medicínských odvětvích [6].

Metoda PET funguje na principu detekce pozitronů. Zdrojem pozitronů je malá dávka radiofarmaka, které je pacientovi aplikováno před vyšetřením a následně je distribuováno v organismu podle jeho biologických vlastností. Pozitron má velmi krátkou dobu života, tudíž po zabrzdění anihiluje s elektronem za vzniku dvou fotonů o energii $E = 511$ keV, které jsou emitovány pod úhlem 180°. Takto vyzářené fotony jsou identifikovány detektory v koincidenčním módu. Jednotlivé krystaly jsou uspořádány do bloků, které poté tvoří snímací prstence. Po zaznamenání fotonů v detektorech je zrekonstruován tomografický řez tělem pacienta. Moderní detektory pozitronové emisní tomografie se obvykle skládají z 2-D modulárních detektorových polí scintilačních krystalů. Současný multiprstencový PET přístroj obsahuje 10 000 - 20 000 krystalů, které jsou uspořádány přibližně do 200 až 400 bloků a při-

bližně 500 až 1000 fotonásobičů [7]. Do nedávna se používaly zejména BGO krystaly, dnes jsou však jejich vlastnosti překonány krystaly GSO a především LSO, které mají podobné absorpční schopnosti jako BGO, avšak délka scintilace je výrazně kratší, proto umožňují detekovat vyšší fotonové toky [8].

1.2 Radionuklidy používané v pozitronové emisní tomografii

Důležitým aspektem při výběru radionuklidů pro diagnostiku jsou jejich jaderné vlastnosti, náklady na výrobu a dostupnost. Radionuklidy používané v nukleární medicíně jsou připravovány pouze uměle. Vyrábějí se v cyklotronech, jaderných reaktorech nebo jako dceřiné radionuklidy v radionuklidových generátorech. Výroba na cyklotronech a jaderných reaktorech závisí na těchto zařízeních, proto nejpohodlnější způsob získání radionuklidu je radionuklidový generátor, kterým disponuje každé oddělení nukleární medicíny [6].

Radionuklidové generátory jsou založeny na genetické závislosti mezi mateřským a dceřiným radionuklidem. Dceřiný radionuklid je od mateřského radionuklidu oddělen elucí. Mateřský radionuklid zůstává uvnitř radionuklidového generátoru chemicky nezměněn. Výhodou produkce radionuklidů v generátorech jsou přiměřené náklady na výrobu, výroba radionuklidů s kratším poločasem rozpadu než v cyklotronech či jaderných reaktorech, protože radionuklid nemusí být převážen do nemocnice a také vysoká specifická aktivita dceřiného nuklidu [9, 10].

Existuje přes 600 radionuklidů, které se rozpadají β^+ přeměnou, a tudíž jsou potenciálními adepty k využití v zobrazovací metodě PET. Nejvíce používaným pozitronovým radionuklidem v PET jsou biogenní radionuklidy ^{13}N ($T_{\frac{1}{2}}$ = 9,97 min), ^{15}O ($T_{\frac{1}{2}}$ = 2,04 min), ^{18}F ($T_{\frac{1}{2}}$ = 109 min) nebo ^{68}Ga ($T_{\frac{1}{2}}$ = 68 min). Tyto radionuklidy mají relativně krátké poločasy rozpadu, což je činní výhodnými pro nízkou radiační zátěž a vysokou kvalitu získaného obrazu, avšak pro své specifické podmínky při značení (např. vysoká teplota) nejsou příliš vhodné pro používání biomolekulárních nosičů [11].

Již v roce 1977 byla stanovena spotřeba glukózy v mozku krysy pomocí [^{14}C] deoxiglukózy. Později byl uhlík nahrazen ^{18}F. V roce 1978 byla poprvé popsána 2-[^{18}F]-fluoro-2-deoxy-*D*-glukóza (FDG) jako je známá dnes. Díky této sloučenině se PET zobrazení začalo dostávat z ryze výzkumné půdy také do klinické praxe. V současnosti se FDG podílí na více než 90 % všech PET a PET/CT vyšetřeních. Další sloučeninou ^{18}F je fluorid sodný, který své uplatnění nalézá v zobrazování kostí. NaF se váže na kostní matrix, zvláště v místech ložiskových kostních procesů [8].

Pokrok na poli syntézní a separační instrumentace otevírá čím dál více dveře značení pomocí kovových a dalších, dříve nepoužívaných, iontů, např. ^{64}Cu ($T_{\frac{1}{2}}$ = 12 h), ^{124}I ($T_{\frac{1}{2}}$ = 100,32 h), ^{68}Ga ($T_{\frac{1}{2}}$ = 68 min) či ^{89}Zr($T_{\frac{1}{2}}$ = 78 h) [11].

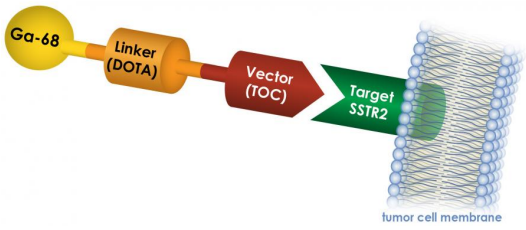
Při vývoji nových radiofarmak, které využívají radionuklidy kovů, hraje nejdůležitější roli poločas rozpadu, typ radioaktivní přeměny, dostupnost a cena daného radionuklidu. Optimální poločas rozpadu musí být dostatečně dlouhý, aby došlo k distribuci radiofarmaka v tkáni, ale vše s ohledem na radiační zátěž pacienta.

Poločasy radionuklidů používaných v pozitronové emisní tomografii se pohybují

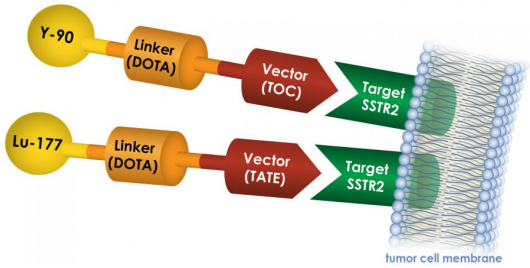
od několika minut (např. ^{13}N $T_{\frac{1}{2}}$ = 9,96 min) po dobu několika dní (např. ^{89}Zr $T_{\frac{1}{2}}$ = 78 h). Obecně lze říci, že radionuklidy s kratším poločasem rozpadu se hodí převážně pro značení nízkomolekulárních látek, kdežto s radionuklidy disponujícími delším poločasem rozpadu mohou být značeny i větší molekuly jako jsou např. fragmenty protilátek nebo protilátky samy, jelikož jejich kinetika je v lidském těle pomalejší než u menších látek [6].

1.2.1 Izotopy mědi používané pro PET

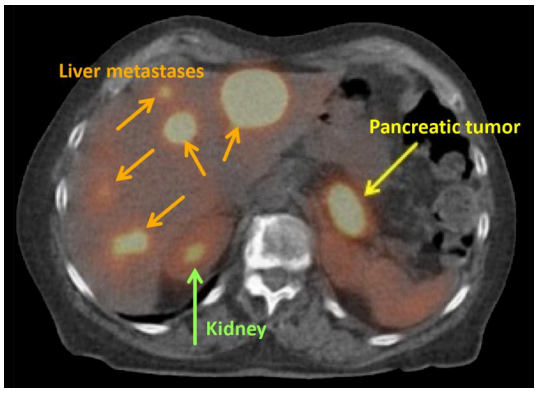
Teranostika je medicínská strategie, která v nukleární medicíně spojuje diagnostické zobrazování a terapii. Pro představu je zde teranostický postup uveden na nádorových buňkách. Na jejich membráně se nachází somatostatinový receptor (SSTR2), který slouží jako cíl pro radiofarmaka. Jako diagnostické radiofarmakum je uvedeno Ga-68 DOTATOC, které je injektováno do žíly pacienta a putuje skrz krevní oběh do všech orgánů a tkání těla. Pokud se u pacienta nachází neuroendokrinní nádor s SSTR2 na membránách nádorových buněk, bude se Ga-68 DOTATOC vázat na SSTR2 (Obrázek 1.1) a nádor při PET zobrazení bude zobrazen (Obrázek 1.3). Jakmile je diagnostikován neuroendokrinní nádor pomocí PET a Ga-68 DOTATOC, může být ^{68}Ga nahrazeno jiným radionuklidem, jako jsou lutecium-177 (^{177}Lu) nebo yttrium-90 (^{90}Y), které mohou cílit a ničit nádorové buňky mající SSTR2 na svých membránách (Obrázek 1.2) [12].



Obrázek 1.1: Diagnostická fáze [12]



Obrázek 1.2: Terapeutická fáze [12]



Obrázek 1.3: PET snímek po aplikaci Ga-68 DOTATOC [12]

Tato metoda může být užitečná pro odhad potenciální odezvy a případné toxicity léčby. Teranostika klade vysoké specifické požadavky na radioizotopy i na jejich nosiče.

Základními požadavky jsou:

- vhodný poločas rozpadu;
- radionuklid s různými možnostmi rozpadu nebo dvojice izotopů, které jsou vhodné jak pro diagnostiku i terapii;
- radionuklid s nízkou produkcí vysokoenergetického záření γ;
- sloučeniny, které mají mírné podmínky značení a vysokou *in vivo* stabilitu;
- dostupnost radionuklidu.

Všechny tyto požadavky zvyšují popularitu kovových radioizotopů pro terapeutické aplikace mezi dostupnými radionuklidy [13].

Izotopy mědi představují vynikající volbu pro terapeutika vzhledem k velké rozmanitosti poločasů, které poskytují (od 9,76 min do 62,01 h), a jejich rozpadovým vlastnostem (β^+, β^- nebo EZ), jenž jsou vhodné pro diagnostické zobrazování, radionuklidovou terapii nebo obojí pro zobrazování a terapii. Další výhodou radioizotopů mědi je existence velkých znalostí koordinační a bioinorganické chemii[1] měděných iontů, které umožnily vývoj vysoce selektivních měděných komplexů pro víceúčelové lékařské aplikace [13].

Základní výzvou pro nukleární medicínu je výroba radiofarmak, která mohou být selektivně zacílená na konkrétní místo v lidském těle (orgány nebo buňky). Existuje několik strategií pro navrhování a vývoj selektivních radiofarmak. Mezi nejoblíbenější strategie cílení patří použití nosiče s vysokou afinitou pro dané cílové orgány, např. jód - pro štítnou žlázu, stroncium - pro kosti; nebo bifunkční přístup, který vede k propojení cílového specifického molekulárního fragmentu s konstruktem nesoucím radionuklid. Poslední uvedený přístup, i když je synteticky náročnější, zajišťuje lepší specificitu a v současné době se v radioimunoterapii používá k propojení terapeutického radionuklidu se specifickou protilátkou. Dozimetrie je dalším z hlavních úkolů v radioimunoterapii, který vyžaduje měření množství radionuklidu vázané na nádorové buňky *in vivo*, což silně závisí na typu nádoru, cílové skupině a mnoha dalších faktorech. Použitím pozitronových zářičů mědi lze získat PET snímek, který umožňuje kvantifikaci distribuce radiofarmaka. Jednoduchou záměnou izotopu mědi za radioterapeutický radionuklid a použitím stejného biomolekulárního nosiče lze najednou definovat množství aktivity (terapeutická dávka) a využít terapeutické vlastnosti radionuklidu. Možnost pohodlně kombinovat nebo vyměňovat terapeutické a diagnostické aplikace lokálního záření, které jsou k dispozici pomocí různých izotopů mědi, je hlavní hnací silou v současné době ve výzkumu v oblasti nukleární medicíny na bázi mědi [13].

Radionuklidy mědi mající využití diagnostické jsou ^{60}Cu, ^{61}Cu, ^{62}Cu a ^{64}Cu a radionuklidy s potenciálním využitím v teranostice jsou ^{64}Cu a ^{67}Cu. Základní charakteristiky a způsoby výroby těchto radioizotopů mědi jsou uvedeny v Tabulce 1.1 a Tabulce 1.2.

Tato práce je zaměřená především na izotopy ^{61}Cu a ^{64}Cu.

[1] Bioinorganická chemie je část chemie, která zkoumá roli kovů v biologii. Bioinorganická chemie zahrnuje studium jak přírodních jevů, jako je chování metaloproteinů, tak i uměle zavedených kovů, včetně těch, které nejsou běžnou součástí organismu, v medicíně a toxikologii.

Tabulka 1.1: Radioizotopy mědi s využitím v nukleární medicíně [14]

Izotop	**Poločas rozpadu**	**Metoda výroby**
^{60}Cu	23,74 min	cyklotron, ^{60}Ni(p,n)^{60}Cu
^{61}Cu	3,32 hod	cyklotron, ^{61}Ni(p,n)^{61}Cu
^{62}Cu	9,76 min	^{62}Zn / ^{62}Cu generátor
^{64}Cu	12,70 hod	cyklotron, ^{64}Ni(p,n)^{64}Cu
^{67}Cu	62,01 hod	urychlovač, ^{67}Zn(n,p)^{67}Cu

Tabulka 1.2: Radioizotopy mědi s využitím v nukleární medicíně [14]

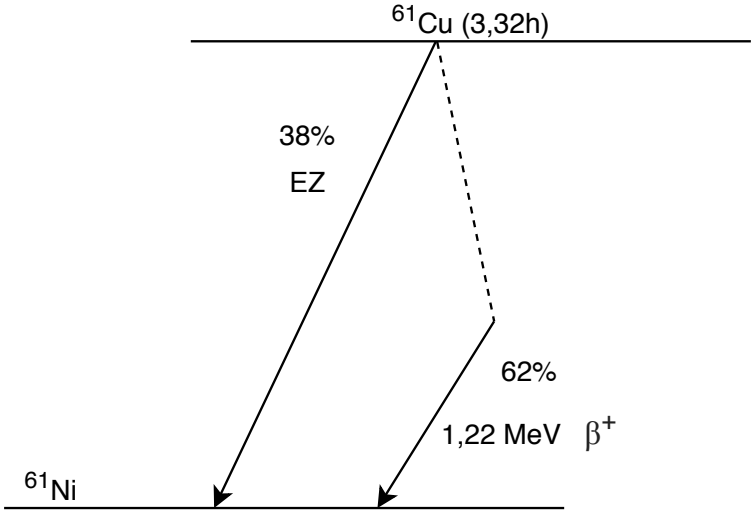
Izotop	**$E_{\beta^-,max}$ [MeV]**	**$E_{\beta^+,max}$ [MeV]**	**EZ [%]**	**E_γ [keV]**	**I [%]**
^{60}Cu	-	3,920	7,4	850 1330 1760 2130	15 80 52 6
^{61}Cu	-	1,220	40	284 380 511	12 3 120
^{62}Cu	-	2,910	2	511	194
^{64}Cu	0,578	0,653	41	1350 511	0,6 34,8
^{67}Cu	0,577	-	-	184 92	40 23

^{61}Cu

^{61}Cu je jedním z nejzajímavějších radioizotopů pro výzkum v oblasti nukleární medicíny díky svým vlastnostem zahrnující vhodný poločas rozpadu a jednoduchost výroby. Rozpadové schéma tohoto radionuklidu se nachází na Obrázku 1.4. Měď-61 je jedna z nejlepších možností pro značení relativně malých molekul, které mají rychlou biokinetiku jako je např. [^{61}Cu] TETA – oktreotid pro zobrazování neuroendokrinních nádorů. Ve srovnání s [^{64}Cu] TETA – oktreotid je dávkou pro všechny orgány nižší s výjimkou močového měchýře, kde je dávka srovnatelná. Tento izotop mědi se používá pro zkoumání distribuce mědi u pacientů trpících Wilsonovou cho-

robou[2]. Citlivost detekce ^{61}Cu je trojnásobně vyšší než ^{64}Cu, proto roste snaha nahradit měď-64 mědí-61 [15].

Výroba byla studována na nízkoenergetických urychlovačích. Většina metod však využívá obohacené terče, což je finančně nákladné. Efektivní cesta pro výrobu ^{61}Cu je pomocí obohaceného ^{61}Ni(p,n)^{61}Cu. K této jaderné reakci se používá 88,84% obohacený ^{61}Ni. Efektivita této cesty je způsobena nízkým prahem reakce. Tato reakce v cyklotronu běží při energiích 9-12 MeV. Další příprava tkví v reakci ^{64}Zn(p,α)^{61}Cu, která probíhá v cyklotronu při energii 3,5-8 MeV. Na výrobu tohoto terče je použit přírodní zinek [15, 16, 17].



Obrázek 1.4: Rozpadové schéma ^{61}Cu [18]

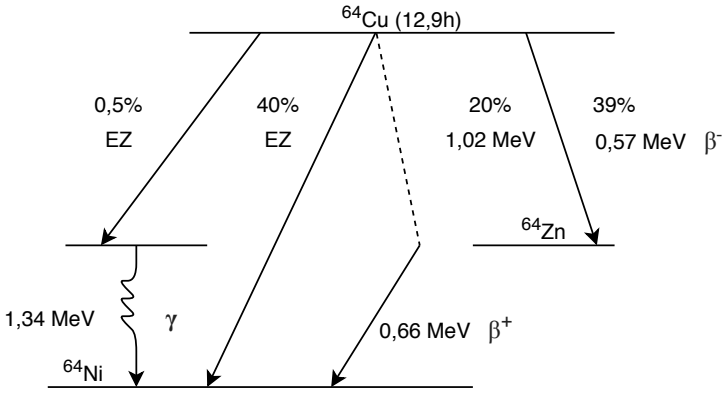
^{64}Cu

Měď-64 je radionuklid emitující pozitron se středně dlouhým poločasem rozpadu, který se používá v pozitronové emisní tomografii, kde mapuje především pomalejší biochemické dráhy, které nemohou být zobrazovány běžně dostupnými radionuklidy jako jsou ^{18}F a ^{11}C. Rozpadové schéma mědi-64 je zobrazeno na Obrázku 1.5. Výše zmíněný radionuklid je, díky svým vlastnostem (např. poločas rozpadu, typ přeměny), radioterapeutickým nuklidem. Radiofarmaka obsahující ^{64}Cu jsou slibné pro zobrazení např. mozku či perfúze myokardu. Protilátky značené mědí-64, mohou poskytovat cenné informace o účinnosti radioimunoterapie pomocí mědi-67. Komplexy značené ^{64}Cu, jako jsou např. Cu-ASSM, Cu-ATSE a Cu-ATSM, byly nedávno studovány jako látky zobrazující hypoxii. Studium hypoxie je důležité v plánování radioterapie. Okysličenost tkáně ovlivňuje efektivitu radioterapie. Možnou nevýhodou použití ^{64}Cu v klinických aplikacích je její sekundární emise, která významně přispívá k radiační dávce pacienta [15].

V současnosti se ^{64}Cu vyrábí ozařováním zinkového terče ^{64}Zn(n,p)^{64}Cu rychlými neutrony nebo záchytnou reakcí ^{63}Cu(n,γ)^{64}Cu v jaderných reaktorech. Takto

[2]Wilsonova choroba neboli hepatolentikulární degenerace je vzácnou dědičnou autozomálně recesivní poruchou metabolismu mědi. Měď se nadměrně ukládá v játrech a mozku [19].

vyrobená měď-64 má však velmi nízkou specifickou aktivitu (např. pro značení antigenu), a proto se využívá dalšího způsobu přípravy a to pomocí jaderné reakce ^{64}Ni(p,n)^{64}Cu na cyklotronu. V této reakci se používá obohacený ^{64}Ni (95 % nebo 98 %). Obohacený nikl je galvanicky nanášen na zlaté plíšky v tloušťkách 20 - 300 μm a ostřelován protony. ^{64}Cu je možné rychle oddělit od ^{64}Ni a dalších vedlejších produktů pomocí iontoměničové chromatografie. Tato technika umožňuje regeneraci niklu eluovaného z kolony znovu použitím při galvanizaci nových terčů s celkovou účinností vyšší než 90 % [20].



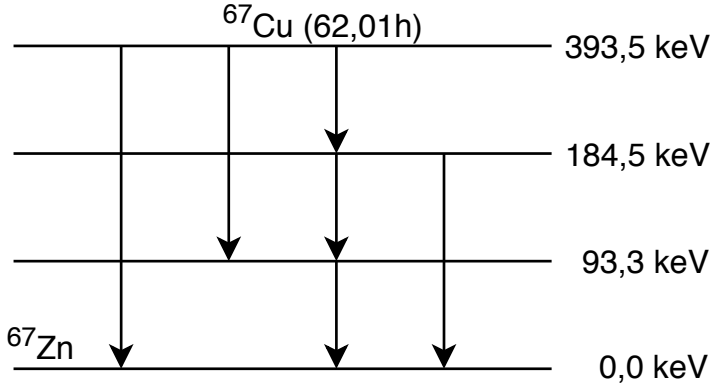
Obrázek 1.5: Rozpadové schéma ^{64}Cu [21]

^{67}Cu

Měď-67 je nejdéle žijící měděný radionuklid s praktickými aplikacemi v diagnostice i terapii. Při poločasu 2,6 d emituje ^{67}Cu β částice s maximální energií v rozsahu 0,4–0,6 MeV, což je vhodná energie pro pronikání do malých nádorů. Spolu se 100% emisí beta emituje ^{67}Cu γ fotony o energiích 92 a 184 keV, které jsou vhodné pro gamma scintigrafii. Kombinace poločasů, β a γ emisí činí ^{67}Cu vysoce atraktivním radionuklidem pro léčbu rakoviny. Rozpadové schéma tohoto radionuklidu se nachází na obrázku 1.6. Díky poměrně dlouhému poločasu rozpadu dochází k dobrému zobrazení značených látek v postižené tkáni. Většina výzkumů radiofarmak značených tímto radionuklidem selhala na nedostatku ^{67}Cu. Výroba tohoto radionuklidu je příliš nákladná. V současné době se ^{67}Cu v USA vyrábí na vysokoenergetickém urychlovači v Brookhaven National Laboratory v Brookhaven Linac Isotope Producer (BLIP) pomocí reakce ^{68}Zn (p,2p) ^{67}Cu s energií protonů 200 MeV, která je také nejrozšířenější reakcí pro výrobu ^{67}Cu. Důvodem je výrazně vyšší výtěžek než jiné jaderné reakce [22, 23].

K produkci ^{67}Cu pomocí reakce ^{68}Zn(p,2p)^{67}Cu je potřeba velké množství obohaceného zinku (několik gramů až desítek gramů), kvůli nízké brzdné schopnosti zinku pro vysokoenergické protony. Pro separaci radioizotopu mědi může být využita elektrolýza, extrakce a ionexová chromatografie. Nejúspěšněji se jeví iontoměničová chromatografie za použití chelatační iontoměničové pryskyřice, která má vyšší selektivitu pro ionty mědi než pro zinek ve slabé kyselině [24, 25].

Aby se snížily náklady na výrobu a zvýšila se dostupnost radionuklidu, přechází se od vysokoenergetických reakcí k reakcím na nízkoenergetických cyklotronech a urychlovačích. Takovou reakcí může být např. ^{70}Zn(p,α)^{67}Cu, kde vstupní energie protonů je 20,4 MeV a proud do 17 μA. K výrobě terče může být použit stlačený oxid zinku nebo zinkové folie [22].



Obrázek 1.6: Rozpadové schéma ^{67}Cu [26]

1.3 Konjugace a nosiče

Radiofarmaka obsahující ^{64}Cu můžeme rozdělit do dvou kategorií. První kategorie jsou specificky navržené přímo značené malé molekuly např. Cu-PTSM, která byla vyvinuta jako látka používaná při měření průtoku krve[3]. V průběhu let se výzkum v této oblasti posunul na zobrazení také jiných biologických procesů pomocí Cu-ATSM nebo k diagnostice Dubin-Johnsonova syndromu[4] pomocí Cu-DO2P. Druhou skupinou jsou biologické nosiče s cílenou biodistribucí (peptidy, protilátky) značené přes bifunkční chelátory. Tato skupina zahrnuje hlavně látky peptidového charakteru, které se selektivně vážou na daný receptor [27].

Tato práce je zaměřena na druhou ze zmíněných skupin.

1.3.1 Konstrukty

Kovy obvykle nemohou být podávány jako radiofarmaka samostatně, jelikož by docházelo k nežádoucí distribuci radioaktivity v těle pacienta, proto je snaha o připojení ke specifickým nosičům jako jsou peptidy či monoklonální protilátky, které mají vhodné biologické vlastnosti.

[3]Nejdříve se k měření průtoku krve používala voda značená ^{15}O. Problém byl v tom, že k výrobě ^{15}O je potřeba cyklotronu, a proto odhady průtoku byly omezeny na použití ^{82}Rb, které lze získat z generátoru. Ačkoliv se ukázalo, že ^{82}Rb je užitečné při určování relativního průtoku krve myokardem, extrakce a retence rubidia závisí na nelineárním poměru toku a je nezávisle ovlivněna metabolickým stavem srdce, což zapříčiňuje, že kvantifikace průtoku krve myokardu v absolutních podmínkách je obtížná. Vzhledem k poločasu rozpadu ^{82}Rb ($T_{\frac{1}{2}} = 75$ s) je kvalita obrazu nízká, proto se tento radionuklid začal nahrazovat radioizotopy mědi [28].

[4]Dubinův-Johnsonův syndrom je autozomálně recesivní onemocnění charakterizované hyperbilirubinémií.

Jedinečné vlastnosti polymerů, jako je jejich vysoký stupeň větvení, multivalence, globulární struktura a dobře definovaná molekulová hmotnost, z nich činí slibné řešení pro distribuci léčiv. V posledním desetiletí se zvýšil výzkum designu a syntézy biokompatibilních polymerů a jejich aplikace v mnoha oblastech biologie včetně distribuce léčiv, imunologie a vývoje vakcín, antimikrobiálních látek a antivirotik. Nedávný pokrok byl učiněn také v aplikaci biokompatibilních polymerů na léčbu rakoviny.

Struktury konstruktů použitých v této práci se nacházejí v Příloze A.

1.3.2 Optimální bifunkční chelátory pro sloučeniny s radionuklidy mědi

Chelatační činidla pro sloučeniny značené radionuklidy mědi, jsou v poslední době velmi důležitou oblastí výzkumu. Rychlý vývoj má za následek vysoce specifické chelátory, které mohou být snadno konjugovány s biomolekulami a účinně radioaktivně značeny mědí (v oxidačním stavě II) za vzniku stabilních komplexů *in vivo*. Tyto chelátory nejsou určeny pouze pro konjugaci s monovalentními biomolekulami, ale také pro konjugaci s multivalentními cílícími ligandy, jako jsou např. teranostické nanočástice. Díky těmto vlastnostem mají sloučeniny značené radioaktivní mědí uplatnění v diagnostice i terapii. Na základě chemické struktury se dají chelátory používané v nukleární medicíně při přípravě radiofarmak obsahující radionuklidy mědi rozdělit do dvou kategorií na acyklické a makrocyklické chelátory. O obou podskupinách bude pojednáváno níže [29].

Acyklické chelátory

Acyklické chelátory tvoří komplexy rychleji než makrocyklické chelátory, avšak jejich vazba s radionuklidem je slabší, a proto se téměř nepoužívají. Mezi klasické acyklické chelátory, které komplexují měď, patří např. EDTA a DTPA [29].

Makrocyklické chelátory

Makrocyklické chelátory a jejich kovové komplexy mají v biomedicínské oblasti široké uplatnění. Za průkopníka tohoto odvětví může být považován Charles J. Pederson, který jako první popsal komplexační vlastnosti a syntézy mnoha makrocyklických látek. Od této chvíle bylo prozkoumáno a připraveno velké množství makrocyklických chelátorů. Stabilita komplexu makrocyklických chelátorů je vysoká, výtěžek jejich značení, však může být relativně malý. Největší úspěch měly tetraazamakrocyklické ligandy s přívěskovými rameny, které využívají makrocyklických i chelatačních účinků pro zvýšení stability. Doposud byly jako chelátory pro značení radionuklidy mědi používané analogy TETA. Nevýhodou efektivního značení těchto analogů je vysoká teplota 90 °C. Nedávné studie prokázaly relativně nízkou *in vivo* stabilitu komplexů Cu (II) - TETA (měď se snadno z komplexu uvolní), proto se od těchto chelátorů upustilo [30].

Bass a kol. prokázali [31], že když byl Sprague-Dawley krysám injektován ^{64}Cu-TETA-oktreotid (OC), téměř 70 % ^{64}Cu z ^{64}Cu-TETA-OC se navázalo na sloučeninu o velikosti 35 kDa, o které se předpokládá, že je superoxiddismutáza (SOD)

nacházející se v játrech 20 hodin po injekci. Toto pozorování také potvrdil Boswell a kolektiv [32].

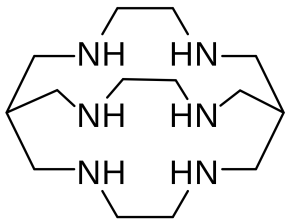
Studie metabolismu v játrech potkanů odhalily, že komplex ^{64}Cu-CB-TE2A měl za následek výrazně nižší hodnoty ^{64}Cu navázané na protein než ^{64}Cu-TETA (13±6 % vs 75±9 % za 4 h) [32].

Historie sloučeniny DOTA a jejich komerčně dostupných derivátů sahá do 90. let minulého století. Její využití je široké zejména pro komplexaci různých kovových radionuklidů. Pořád zde je pomalé značení i při vysoké teplotě (90 °C). Komplexy jsou inertní, avšak možnost redukce mědi do stupně I zde přetrvává stejně jako u předchozího chelátoru. Stabilita komplexu *in vivo* je totožná se stabilitou komplexů TETA. Nízká stabilita vede k vysoké akumulaci komplexů v játrech [30, 33].

Podobný trend jako u sloučenin, kde ligandem byla TETA a CB-TE2A, byl pozorován u cyklámových derivátů, s komplexem ^{64}Cu CB-DO2A podléhající menší transchelaci než komplex ^{64}CuDOTA (61±14 % vs 90,3±0,5 % po 4 h) [32].

Postupem času se začaly více zkoumat „cross-bridged“ cyklámové deriváty (c-b chelátory). C-b cyklámové deriváty tvoří vysoce stabilní komplexy s Cu(II) (nedochází zde k redukci na Cu (I)) z důvodu většího geometrického omezení při začlenění do makrocyklického ligandu, které zvyšuje kinetickou inertnost a termodynamickou stabilitu. Takto vytvořené komplexy vykazují dobrou *in vivo* stabilitu [33, 34].

Mezi komerčně dostupnými chelátory se téměř před deseti lety objevil sarcophagin (3,6,10,13,16,19-Hexazabicyclo [6.6.6] n-ikosan) (Obrázek 1.7) a jeho deriváty. Sarcophagin je bicyklická sloučenina odvozená od cyklámu. Tyto ligandy jsou selektivní pro Cu (II), u které nedochází k redukci na Cu (I), taktéž se vyznačují účinným značením a umožňují dosáhnout vysokou hmotnostní aktivitu vzniklého komplexu. Nevýhodou je nízká chemická variace a složitá syntéza [33].



Obrázek 1.7: Struktura sarcophaginu

Mezi nejpoužívanější chelátory v radionuklidové terapii patří NOTA. Velkou výhodou je rychlé značení při laboratorní teplotě. I přes malou selektivitu a nízkou kinetickou inertnost jsou takto vytvořené komplexy *in vivo* stabilní [30].

Poschenrieder a kolektiv zkoumali *in vivo* stabilitu ^{64}Cu-NOTA-pentixater. Tento komplex v lidském séru zůstal stabilní po dobu 24 hodin (> 99 % intaktní ^{64}Cu-chelát) [35].

Největší shodu s požadovanými vlastnostmi (podmínky značení, stabilita vytvořeného komplexu) vykazují chelátory NOTA a cb-cyklámy, proto se v současnosti výzkum koordinační chemie mědi zaměřuje především na rozvoj těchto chelátů [33].

1.3.3 Kinetika v lidských tkáních

Měď je třetím nejvíce se vyskytujícím přírodním stopovým kovem v lidském organismu (po železe a zinku). V současnosti jsou její biochemické a metabolické pochody již dobře popsány [23].

Výzkum metabolismu mědi v lidském těle se začal rozvíjet v 30. a 40. letech 20. století, kdy proběhlo mnoho studií na lidech týkajících se příjmu mědi v potravě a jejího následného vylučování. První použití radioaktivních izotopů mědi se datuje na začátek 40. let 20. století u potkanů a psů. Tyto studie poskytly informace o absorpci a retenci mědi po perorálním podání a o odbourání mědi z krve po intravenózní aplikaci. První hlášená studie na lidech proběhla v roce 1947. Vědci sledovali výskyt radioaktivní mědi v krvi po intravenózních a subkutánních aplikacích. Ve výzkumu metabolismu se používají dva radioizotopy mědi (^{64}Cu a ^{67}Cu). Tyto radioizotopy mají relativně krátké poločasy rozpadu, což omezuje jejich použití pouze na krátkodobé studie. Radioizotopy se i dnes používají pro metabolické studie u laboratorních zvířat a lidí s poruchami metabolismu mědi. Velká část výzkumu u lidí se zaměřila na Wilsonovu chorobu, Menkesův syndrom[5] a biliární cirhózu. Výše zmíněné metabolické defekty vedou k vyčerpání nebo nahromadění mědi v tkáních [37].

Měď je v lidském těle nesena krevním proteinem ceruloplasminem do dvanáctníku a horní části tenkého střeva, kde je absorbována a následně transportována do jater. Poslední výzkumy poukazují i na vstřebávání v žaludku. Volná měď ani její volné ionty se v lidském organismu téměř nevyskytují, veškeré ionty jsou spojeny s proteiny: 95 % s ceruloplasminem, zbytek s albuminem a aminokyselinami. Malé množství mědi se vylučuje močí, avšak hlavní část přijaté mědi v organismu je vylučována žlučovou šťávou. Měď je v lidské výživě nezbytná pro normální metabolismus železa a tvorbu červených krvinek. Anémie je klinickým příznakem nedostatku železa i mědi. Měď je nevyhnutelnou součástí lidského organismu [38, 39, 40].

Důležitým aspektem radiofarmak je jejich kinetická stabilita. Tento pojem charakterizuje rychlost disociace radionuklidu z radiofarmaka a úzce souvisí se stabilitou kovového komplexu *in vivo*. U kovových komplexů acyklických chelátorů je kinetická disociace rychlá, kdežto cyklické chelátory jsou více kineticky inertní [29].

Nízká kinetická stabilita komplexu vede k dekomplexaci a následné akumulaci radionuklidů v necílových tkáních. V posledních letech výzkum pracuje především na zlepšení kinetiky tetraazamakrocyklických ligandů zvýšením pevnosti kostry ligandu. Aby se zvýšila pevnost kostry ligandu, došlo k chemickému přemostění cyklámových kruhů. Připravené byly různé deriváty s postranními řetězci, které mají za úkol vytvářet stabilní vazbu s kovem. Mezi takové ligandy patří např. kyselina CB-TE2A, která je vybavena dvěma přivěšenými rameny karboxylové kyseliny. Kyselina CB-TE2A tvoří s mědí (II) vysoce *in vivo* stabilní komplexy s příznivou farmakokinetikou. Zvýšená pevnost ligandu způsobila prodloužení doby značení a také zvýšení teploty pro účinné značení radionuklidy mědi. Zmíněné podmínky jsou zcela nevyhovující pro značení konstruktů obsahující peptidy nebo jiné biomolekuly, jelikož se jedná o molekuly citlivé na zvýšenou teplotu [29].

[5] Menkesův syndrom neboli trichopoliodystrophia je onemocnění vázané na chromosom X, které je způsobeno mutací genu kódujícího Cu^{2+} transportující ATPázu a neumožňuje přenos Cu přes Golgiho membránu do krevního řečiště [36].

1.4 Kontrola kvality

Důležitým krokem v řetězci operací pro výrobu nového radionuklidu je zajištění kvality získaného produktu. Obecně je třeba vzít v úvahu čtyři aspekty. Jedná se o radionuklidovou čistotu, radiochemickou čistotu, chemickou čistotu a specifickou aktivitu. O jednotlivých aspektech je pojednáváno v následujících podkapitolách. Zmíněné čtyři testy zjištění kvality jsou zásadní z hlediska dalšího zpracování radionuklidu. Pokud je radionuklid použit na přípravu radiofarmaka pro humánní podání, přichází na řadu několik dalších přísných testů, jako jsou testy sterility, apyrogenicity a toxicity. V této práci byla zkoumána pouze radiochemická čistota u preparátu ^{64}Cu [41].

1.4.1 Radionuklidová a radiochemická čistota

Podle Majera [42] lze za radiochemicky čistý považovat takový preparát radioaktivního prvku, ve kterém nelze chemickými nebo fyzikálními analytickými metodami dokázat jiné rušivé elementy, které tento preparát může obsahovat. Tato množství jiných radioaktivních prvků projevujících se svou vlastní charakteristickou a třeba i silnou aktivitou, jsou nevážitelná a uvedenými analytickými metodami nepostřehnutelná. Nepřítomnosti jakéhokoli jiného radionuklidu je dosaženo volbou vhodné reakce pro přípravu a energetické ztráty svazku při ozařování na cyklotronu v kombinaci s chemickou separací.

Jak uvádí Majer [42], za radionuklidově čistý označujeme takový produkt, který jeví radioaktivní vlastnosti jen jediného, zcela určitého jaderného individua, jenž může však obsahovat i značné množství libovolných stabilních chemických prvků. Přítomnost těchto chemických nečistot nemusí být pro daný účel rušivá. To znamená, že radiochemicky oddělený produkt je ve formě jednoho hlavního chemického druhu. V případě pevného produktu je oddělený radionuklid obecně převeden do požadované radiochemické formy prostřednictvím oxidačních/redukčních reakcí. Výroba radionuklidů v cyklotronech, při vhodně zvoleném jaderném procesu a chemické separaci, vede k velmi nízkých radiochemickým a radionuklidovým nečistotám. Radiochemická čistota se obecně testuje radiochromatografickými metodami, jako jsou chromatografie na tenké vrstvě (TLC), vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) a ionexovou chromatografii [41].

1.4.2 Chemická čistota

Pod pojmem chemická čistota se rozumí nepřítomnost neaktivních nečistot, které se obvykle zavádějí chemickými činidly používanými při výrobě radionuklidu. Kromě jejich možné toxicity mohou tyto nečistoty tvořit komplexy s radionuklidem, čímž snižují jeho reaktivitu. Pro kontrolu chemické čistoty se používá jedna nebo více standardních technik, jako je např. kapalinová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, detekce ultrafialovým (UV) nebo infračerveným (IR) paprskem, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a polarografie [41].

1.4.3 Hmotnostní aktivita

Hmotnostní aktivita je definována jako radioaktivita vztažená na jednotku hmotnosti daného prvku nebo jeho chemické formy. Pro odhad hmotnostní aktivity se obecně radioaktivita měří v ionizační komoře a hmotnost se stanoví pomocí citlivé detekční metody, jako je UV, IR, index lomu nebo měření vodivosti [41].

1.4.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je analytická metoda, jejíž začátky sahají až k vynálezu chromatografie na počátku 20. století. Vývoj pokračoval přes rozdělovací a papírové chromatografie ve 40. letech 20. století, k zavedení kapalinové chromatografie na počátku 60. let. Krátce nato potřeba lepšího rozlišení a vysokorychlostních analýz netěkavých vzorků vedla k vývoji HPLC [43].

Za průkopníka chromatografie je považován ruský botanik Michail Cvět, který v roce 1903 jako první na sloupci sorbentu rozdělil listová barviva. Ve 40. letech 20. století vědci Martin a Synge vyvinuli rozdělovací chromatografii a tyto děje matematicky popsali, za což jim byla v roce 1952 udělena Nobelova cena. V roce 1944 byla poprvé použita papírová chromatografie, která byla vyvinuta pro separaci aminokyselin. Další vývoj dospěl k tomu, že v roce 1969 bylo představeno první komerční HPLC (HPLC ALC100). V 80. letech 20. století byla HPLC běžně používaná technika pro separaci chemických sloučenin. Nové přístroje a postupy zajistily lepší separaci, identifikaci, čištění a kvantifikaci, zatímco počítače a automatizace poskytovaly pohodlí. Zlepšení reprodukovatelnosti bylo zapříčiněno vynálezem mikro-kolon, afinitních kolon a rychlým vývojem HPLC. V roce 2004 byla představena nová ultra výkonná kapalinová chromatografie (UPLC), která až 10x snížila dobu analýzy a 3x zlepšila citlivost přístroje [43].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z nejrozšířenějších chromatografických technik, jejíž použití se pravděpodobně v následujících letech ještě zvýší [43].

Kapitola 2

Experimentální část

2.1 Kontrola kvality

2.1.1 Radionuklidová a radiochemická čistota

Radionuklidová čistota byla provedena pouze u radioizotopu ^{64}Cu a to pomocí metody TLC. Cílem experimentu bylo ověření kvality a čistoty připravovaného radionuklidu ^{64}Cu pomocí různě selektivních chelátorů pro měď.

Použité chemikálie

- Pufr MES hydrát; $\geq$ 99,5 % (Sigma Aldrich, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina; 99,995 % trace metals basic (Sigma Aldrich, USA)
- Chelex 100 sodium form; 50-100 mesh (Sigma Aldrich, USA)
- Voda; TraceSELECT (Sigma Aldrich, Švýcarsko)
- Hydroxid sodný; $\geq$ 98,0 % (MERCK, Německo)
- ^{64}Cu; š. 180110Cu64 (Ústav jaderné fyziky AV ČR, v.v.i.)

Použitý materiál

- DC-Fertigfolien Alugram SIL G, layer 0,2 mm silica gel 60 (Macherey-Nagel, Německo)
- Safe-Lock Tubes 0,5 ml; PCR clean (Eppendorf, Německo)

Použité přístroje

- Termo-třepačka Biosan TS-500 (MERCI, ČR)
- Cyclone Plus Storage Phosphor System (Packard-Cyclon, USA)

Nejprve byly připraveny reakční směsi DOTA, NOTA, ACBP v příslušných objemech a množstvích jako je uvedeno v Tabulce 2.1.

Příprava reagencí

- 1M NaOH:
  Roztok byl připraven rozpuštěním 2,0 g NaOH v 50 ml vody.

- 0,1M EDTA pH 5,0:
  Roztok byl připraven rozpuštěním 2,9922 g EDTA ve 100 ml vody při teplotě 80 °C, titrováno 1M NaOH na pH 5,0.

- 0,5M MES pufr pH 6,2:
  Roztok byl připraven rozpuštěním 5,857 g MES ve 300 ml vody, titrováno 1M NaOH na pH 6,2. Přidáno 0,5 g chelexu, uloženo přes noc v lednici.

- Složka A: DOTA:
  Do 3 ml kryovilaky připraven roztok DOTA ve vodě o koncentraci 0,5 mg/ml.

- Složka B: NOTA:
  Do 3 ml kryovilaky připraven roztok NOTA ve vodě o koncentraci 0,5 mg/ml.

- Složka C: ACBP:
  Do 3 ml kryovilaky připraven roztok ACBP ve vodě o koncentraci 0,5 mg/ml.

- Složka D: ^{64}Cu
  Radionuklid ^{64}Cu (š. 180110Cu64) byl připraven pracovníky Ústavu jaderné fyziky AV ČR.

K příslušným reagencím bylo přidáno 40 MBq radionuklidu ^{64}Cu; š 180110Cu64. Takto vzniklý roztok byl doplněn na 100 μl pufrem MES a mikroelektrodou ověřeno příslušné pH 6,2. Směsi byly inkubovány po dobu 10 min, při teplotě 25°C. Po inkubaci bylo na TLC destičku naneseno 3 μl takto připraveného vzorku. Jako stacionární fáze byla použita DC-Fertigfolien Alugram SIL G, layer 0,2 mm silica gel 60 na dráze 8,0 cm. Vzorky byly vyvíjeny pomocí mobilní fáze 0,1M EDTA po dobu 1 hodiny. Následně byly desky vysušeny pod infralampou a měřeny na přístroji Cyclon. Vzorky byly měřeny v tripletech a výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru OptiQuant.

Tabulka 2.1: Značení vzorků

Číslo vzorku	Složka A [mol. ekv.]	Složka B [mol. ekv.]	Složka C [mol. ekv.]	Složka D [mol. ekv.]	Teplota [°C]
1	90			40	25
2	90			40	25
3	90			40	25
4		90		40	25
5		90		40	25
6		90		40	25
7			90	40	25
8			90	40	25
9			90	40	25
10				40	25

2.2 Značení konstruktů

V rámci spolupráce s ústavem makromolekulární chemie AV ČR a Přírodovědeckou fakultou Univerzity Karlovy byly připraveny ligandy, které byly značeny radionuklidy ^{61}Cu a ^{64}Cu.

Použité chemikálie

- Pufr MES hydrát; $\geq$ 99,5 % (Sigma Aldrich, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina; 99,995 % trace metals basic (Sigma Aldrich, USA)
- Chelex 100 sodium form; 50-100 mesh (Sigma Aldrich, USA)
- Voda; TraceSELECT (Sigma Aldrich, Švýcarsko)
- Hydroxid sodný; $\geq$ 98,0 % (MERCK, Německo)
- ^{64}Cu; š. 180110Cu64 (Ústav jaderné fyziky AV ČR, v.v.i.)
- RAM-14; PK-250419GE-11 (Ústav Makromolekulární Chemie AV ČR, v.v.i.), struktura uvedena v Příloze A
- RAM-15a; PC519A (Ústav Makromolekulární Chemie AV ČR, v.v.i.), struktura uvedena v Příloze A
- RAM-16; PC518zn (Ústav Makromolekulární Chemie AV ČR, v.v.i.), struktura uvedena v Příloze A

Použitý materiál

- Safe-Lock Tubes 0,5 ml; PCR clean (Eppendorf, Německo)

Použité přístroje

- Termo-třepačka Biosan TS-500 (MERCI, ČR)

2.2.1 Podmínky značení

Z každého ligandu byl odvážen přibližně přesně 1 mg, který byl rozpuštěn v 1 ml 0,5M MES pH = 6,2. Z takto připravených vzorků bylo odebráno 100 μl na neaktivní HPLC analýzu.

Ze vzorku ligandu bylo odebráno 200 μl, ke kterému bylo přidáno 164 μl ^{64}Cu (což odpovídá aktivitě přibližně 400 MBq) a 636 μl 0,5M MES. Takto připravené vzorky byly při laboratorní teplotě ponechány na třepačce 30 min.

Po 30 min bylo z každého takto připraveného vzorku odebráno 100 μl na analýzu výtěžku značení.

2.3 Analýza

Použité chemikálie

- Pufr MES hydrát; $\geq$ 99,5 % (Sigma Aldrich, USA)
- Chelex 100 sodium form; 50-100 mesh (Sigma Aldrich, USA)
- Voda; TraceSELECT (Sigma Aldrich, Švýcarsko)
- Chlorid sodný; (Sigma Aldrich, USA)
- Isopropanol; HPLC grade
- Methanol; HPLC grade

Použitý materiál

- Vialka šroubovací, širokohrdlá, 2 ml (Verkon, ČR)
- Uzávěr šroubovací se septem (pro širokohrdlé 2ml vialky), ND10 (Verkon, ČR)
- Inserty pro širokohrdlé vialky (Verkon, ČR)
- BioSep-SEC-s2000 (Phenomenex, USA)
- BioSep-SEC-s4000 (Phenomenex, USA)

Použité přístroje

- Agilent technologies 1200 series (Agilent Technologies, USA)
- Gabi * (Elysia-raytest GmbH, Německo)
- Waters 2489 UV/Visible Detector (Waters Corporation, USA)
- Agilent 35900 dual channel interface (Agilent Technologies, USA)

Analýza probíhala na radioaktivních i neaktivních vzorcích, které jsou uvedeny v Tabulkách 2.2, 2.3, kde * značí označený vzorek radionuklidem.

Systém se skládal z HPLC (Agilent technologies 1200 series), radiodetektoru (Raytest Gabi), UV VIS detektoru (UV/Visible detector Waters 2489), Agilent 35900 dual channel interface. Celý systém byl uložen ve 100% isopropanolu. K analýze byly použity gelové kolony (BioSep-SEC-s2000 a BioSep-SEC-s4000), které byly před experimentem uloženy ve 60% methanolu.

Jako mobilní fáze byl použit 100% pufr (20 mM MES, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH = 6,2). Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min 0,4 ml/min, nástřik byl 15 μl. UV/VIS detektor byl nastaven na vlnovou délku 254 nm, energetické rozhraní radiodetektoru bylo v rozsahu 350-650 keV. Analýza jednoho vzorku probíhala 25 min. Naměřené chromatogramy jsou uvedeny v příloze B.

Tabulka 2.2: Vzorky analyzované při značení ^{61}Cu

	Vzorek
1.	MES
2.	RAM 14
3.	RAM 15
4.	RAM 16
5.	RAM 14 *
6.	RAM 15 *
7.	RAM 16 *
8.	^{61}Cu + MES

Tabulka 2.3: Vzorky analyzované při značení ^{64}Cu

	Vzorek
1.	MES
2.	RAM 14
3.	RAM 15
4.	RAM 16
5.	RAM 14 *
6.	RAM 15 *
7.	RAM 16 *
8.	^{64}Cu + MES

Kapitola 3

Diskuze a výsledky

3.1 Kontrola kvality

Analýza kvality a čistoty připravovaného radionuklidu Cu-64 byla provedena pomocí postupu uvedeného v literatuře [44]. Podle Davida [44] dochází k výtěžkům značení pro chelátor NOTA 17±12 % a 5±4 % pro chelátor DOTA. ACBP bylo syntetizováno na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy skupinou profesora Hermanna tak, aby docházelo ke komplexaci mědi s výtěžky >95 %.

Tabulka 3.1: Výsledky radiochemické čistoty jednotlivých vzorků

	Výtěžky značení [%]		**Délka inkubace [min]**	**Molární ekvivalent chelátoru**
^{64}Cu	98,0	98,0	10	0
DOTA	6,2		10	90
DOTA	8,3	6,3±1,9	10	90
DOTA	4,5		10	90
NOTA	32,6		10	90
NOTA	29,8	30,0±2,5	10	90
NOTA	27,7		10	90
ACBP	93,9		10	90
ACBP	97,2	95,2±1,7	10	90
ACBP	94,6		10	90

V Tabulce 3.1 si můžeme všimnout výsledků, ze kterých vyplývá, že připravená měď-64 byla v dobré čistotě [44]. Metoda použita pro analýzu radiochemické čistoty připravovaného radionuklidu byla časově náročná, proto by bylo vhodné do budoucna tuto analýzu vyvinout např. na HPLC systém.

3.2 Značení konstruktů

Z výsledků uvedených v Tabulce 3.2 a Tabulce 3.3 je patrné, že ne všechny konstrukty jsou kvantitativně označeny. Analyzované konstrukty se podařilo označit ^{64}Cu, ^{61}Cu však nikoliv.

Tabulka 3.2: Výtěžky značení jednotlivých konstruktů ^{61}Cu

	Výtěžek značení [%]
RAM 14	-
RAM 15	-
RAM 16	-

Tabulka 3.3: Výtěžky značení jednotlivých konstruktů ^{64}Cu

	Výtěžek značení [%]
RAM 14	93,2
RAM 15	95,4
RAM 16	95,1

Důvod, proč jsou výtěžky značení nízké a v některých případech značení vůbec neproběhlo, může být ten, že se jedná o nově připravené konstrukty a jejich stálost v čase ještě nebyla otestována – konstrukty by měly být značeny co nejdříve po syntéze. Z důvodu koronavirové pandemie musely být některé experimenty po dobu tří měsíců posunuty a požadavek značení těsně po syntéze byl splněn pouze u značení ^{64}Cu, kdy toto značení probíhalo ještě před zmíněnou pandemií. Značení ^{61}Cu probíhalo až po tříměsíční pauze, a to může být jeden z důvodů, proč při experimentech nedošlo k označení polymeru mědí-61. Na značení by neměl mít v tomto případě vliv druh radioizotopu, jelikož oba izotopy byly před značením připravené do stejné matrice (0,01M ultra trace HCl), tudíž výsledky značení by měly být srovnatelné.

Pro budoucí měření bych navrhovala zkoumat výtěžek značení v závislosti na teplotě. Všechna měření, která jsou uvedená v této práci probíhala za teploty 25 °C. V literatuře je uváděno srovnání značení konstruktů při dvou teplotách (25 °C a 70 °C). Značení samotných ligandů je podobné, avšak vyšší teplota (70 °C) vedla k lepší účinnosti značení, to znamená k vyšší hmotnostní aktivitě, protože pro prakticky kvantitativní označení postačoval nižší přebytek ligandu. Teplota však v našem případě nemůže být příliš vysoká, aby nedošlo k denaturaci protilátky - EBX, která je součástí konstruktů [44].

Vzorky byly měřeny na dvou kolonách (BioSep-SEC-s2000, BioSep-SEC-s4000), přičemž jsem zjistila, že měření na druhé zmíněné koloně je lepší pro její vhodnější vlastnosti pro dělení analyzovaných látek.

Konstrukty obsahují fosfátové skupiny mimo makrocyklický řetězec. Tyto skupiny by měly napomáhat k přenosu kovového iontu z roztoku do středu makrocyklického řetězce, tudíž by měly komplexaci a proces značení mírně urychlit. Fosfátové skupiny jsou kyselé povahy, což umožňuje značení i v kyselém prostředí. Postranní chelatační ramena, která jsou připojena na makrocyklickou kostru, by měla umožňovat komplexaci kovového iontu i při velmi nízkých koncentracích rozpuštěných iontů radionuklidu v roztoku.

Rychlá a účinná komplexace za mírných podmínek je obecně velmi žádaná vlastnost u nosičů pro radionuklidy, které se plánují požívat jako radiofarmaka v nukleární medicíně, zvláště pokud se jedná o radionuklidy s krátkým poločasem rozpadu jako

je měď. V literatuře je uvedeno, že dosavadní radiochemické experimenty na podobných konstruktech potvrdily předpoklady účinné vazby radioizotopů mědi a vysokou stabilitu těchto komplexů [44].

Závěr

V této práci byla napsána literární rešerše o využití radioizotopů mědi v nukleární medicíně, o vhodných konstruktech a nosičích, ale také o kontrole kvality připravovaných radiofarmak.

V první pasáži experimentální části byla provedena analýza kvality a čistoty připravovaného radionuklidu ^{64}Cu pomocí tenkovrstvé chromatografie. Z výsledků je patrné, že pro značení 3 různě selektivních chelátorů pro měď (DOTA, NOTA, ACBP) při 90 molárním ekvivalentním přebytku ligandu za teploty 25 °C po dobu 10 min je výsledná radiochemická čistota 6,3; 30,0 a 95,2 % (DOTA, NOTA, ACBP), což poukazuje na dobrou radiochemickou čistotu $^{64}Cu^{2+}$. Metoda, kterou byla zkoumána kvalita připravovaného radionuklidu je časově náročná, proto by bylo do budoucna vhodné tuto metodu převést na HPLC, které by analýzu urychlilo.

Dále byly označeny a zanalyzovány konstrukty chelátor-polymer-protilátka, které byly vyvinuty na Ústav makromolekulární chemie AV ČR v. v. i. Analýza aktivních i neaktivních vzorků proběhla pomocí systému HPLC na BioSep-SEC-s2000 a BioSep-SEC-s4000 kolonách. Z výsledků vyplývá, že značení konstruktů při teplotě 25 °C po dobu 30 min mědí-61 neproběhlo. Značení konstruktů mědí-64 při totožných podmínkách proběhlo s výtěžky značení 93,2, 95,4, 95,1 (RAM 14, RAM 15, RAM 16). Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben rozkladem vzorků zkoumaných konstruktů. Dosažené výsledky poslouží jako základ další práce, která by měla být zaměřená na případnou optimalizaci podmínek značení, stabilitu *in vitro* a *in vivo*.

Literatura

[1] World Cancer Research Fund International. Global cancer statistics for the most common cancers. [cit. 2020-06-18]. Dostupné z: https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data

[2] Národní onkologický program. Česká republika a rakovina v číslech. [cit. 2020-06-18]. Dostupné z: https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/

[3] Cherry, R.S., Phelps, M. E. a Sorenson, A. J. *Physics in Nuclear Medicine*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. ISBN 978-1-4160-5198-5.

[4] Saha, G. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 7th ed. New York: Springer, 2018. ISBN 978-3-319-57580-3.

[5] KUPKA, K., KUBINYI, J. a ŠÁMAL, M. *Nukleární medicína*. Praha: P3K, 2007. ISBN 978-809-0358-492.

[6] ADAM, J. et al. Nová radiofarmaka a aplikace pozitronové emisní tomografie na Masarykově onkologickém ústavu v Brně. *Klinická onkologie* [online]. 2009, roč. 22, č. 3, s. 94-97 [cit. 2020-05-12]. ISSN 0862-495X. Dostupné z: https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/150/3487.pdf

[7] METTLER, F.A. a GUIBERTEAU, M.J. Instrumentation and Quality Control. In: METTLER, F.A *Essentials of nuclear medicine imaging*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012, s. 23-71. ISBN 9781455701049.

[8] VOTRUBOVÁ, J. *Klinické PET a PET/CT*. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-619-9.

[9] RÖSCH, F. a KNAPP, F. F. Radionuclide Generators. In: VÉRTES, A. et al. *Handbook of Nuclear Chemistry* [online]. Boston, MA: Springer US, 2011, s. 1935-1976 [cit. 2020-07-07]. ISBN 978-1-4419-0719-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0720-2_40

[10] VLK, M., SUCHÁNKOVÁ, P. a KOZEMPEL, J. Medicinální radionuklidové generátory – mateřské radionuklidy, principy funkce a kontrola kvality eluátu. *Nuclear Medicine*. 2019, roč. 8, č. 3, s. 42-51. Dostupné z: https://www.prolekare.cz/en/journals/nuclear-medicine/2019-3-9/medicinalni-radionuklidove-generatory-materske-radionuklidy-principy-funkce-a-kontrola-kvality-eluatu-113640

[11] ADAM, J. et al. Current Trends in Using PET Radiopharmaceuticals for Dia gnostics in Oncology. *Klinicka onkologie* [online]. 2014, roč. 27, Suppl 1, s. S129-S136 [cit. 2020-05-12]. ISSN 0862495X. Dostupné z: http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4506/

[12] University of Iowa Hospitals & Clinics. *What is theranostics?*[online]. O'Dorisio, M.S. USA, 2018. [cit. 2020-08-06]. Dostupné z: https://uihc.org/health-topics/what-theranostics.

[13] AHMEDOVA, A. et al. Copper radiopharmaceuticals for theranostic applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2018, roč. 157, s. 1406-1425 [cit. 2020-07-07]. ISSN 02235234. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523418307219

[14] SUN, X. a ANDERSON, C. J. Production and Applications of Copper-64 Radiopharmaceuticals. *Imaging in Biological Research, Part B* [online]. Elsevier, 2004, s. 237-261 [cit. 2020-05-14]. ISBN 9780121827915. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687904860117

[15] ROWSHANFARZAD, P. et al. An overview of copper radionuclides and production of ^{61}Cu by proton irradiation of natZn at a medical cyclotron. *Applied Radiation and Isotopes* [online]. 2006, roč. 64, č. 12, s. 1563-1573 [cit. 2020-05-12]. ISSN 09698043. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969804305003684

[16] GYÜRKY, Gy. et al. Direct study of the α -nucleus optical potential at astrophysical energies using the ^{64}Zn (p ,α) ^{61}Cu reaction. *Physical Review* C [online]. 2014, roč. 90, č. 5, s. 052801-1-052801-4 [cit. 2020-07-07]. ISSN 0556-2813. Dostupné z: https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevC.90.052801

[17] MCCARTHY, D. W. et al. High purity production and potential applications of copper-60 and copper-61. *Nuclear Medicine and Biology* [online]. 1997, roč. 26, č. 4, s. 351-358 [cit. 2020-05-12]. ISSN 09698051. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969805198001139

[18] ZUBER, K., SINGH, B. Nuclear Data Sheets for A = 61. *Nuclear Data Sheets* [online]. 2015, roč. 125, s. 1-200 [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090375215000022

[19] BURKHEAD, Jason L., Lawrence W. GRAY a Svetlana LUTSENKO. Systems biology approach to Wilson's disease. *BioMetals* [online]. 2011, roč. 24, č. 3, s. 455-466 [cit. 2020-06-23]. ISSN 0966-0844. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s10534-011-9430-9

[20] MCCARTHY, D. W. et al. Efficient production of high specific activity ^{64}Cu using a biomedical cyclotron. *Nuclear Medicine and Biology* [online]. 1999, roč. 24, č. 1, s. 35-43 [cit. 2020-05-12]. ISSN 09698051. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969805196001576

[21] VOSE, P. B. Nuclear Reactions. *Introduction to Nuclear Techniques in Agronomy and Plant Biology* [online]. Elsevier, 1980, s. 16-26 [cit. 2020-05-12]. ISBN 9780080249247. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/piiB9780080249247500090

[22] CONN, M.P. Preparation of Materials. *Imaging in Biological Research, Part B. 1.* Elsevier, 2004, s. 217-301. ISBN 9780121827915.

[23] SUN, X. a ANDERSON, C. J. Production and Applications of Copper-64 Radiopharmaceuticals. *Imaging in Biological Research, Part B* [online]. Elsevier, 2004, s. 237-261 [cit. 2020-08-08]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121827915. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687904860117

[24] O'BRIEN, H.A. The preparation of ^{67}Cu from ^{67}Zn in a nuclear reactor. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* [online]. 1969, roč. 20, č. 2, s. 121-124 [cit. 2020-07-07]. ISSN 0020708X. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0020708X69901495

[25] KATABUCHI, T. et al. Production of ^{67}Cu via the ^{68}Zn(p,2p)^{67}Cu reaction and recovery of ^{68}Zn target. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* [online]. 2008, roč. 277, č. 2, s. 467-470 [cit. 2020-05-12]. ISSN 0236-5731. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s10967-007-7144-9

[26] CHEN, J. et al. Precise absolute gamma-ray and beta- branching intensities in the decay of ^{67}Cu. *Physical Review C* [online]. 2015, roč. 92, č. 4 [cit. 2020-05-12]. ISSN 0556-2813. Dostupné z: https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevC.92.044330

[27] STANÍK, R. a SVĚTLÍK J. Polydentátne ligandy pre moderné rádiofarmaka obsahujúce ^{64}Cu - review. *Nukleární medicína.* Olympia, a.s. Praha, 2013, č. 1, s. 2-6 [cit. 2020-07-07]. ISSN 1805-1146. Dostupné z: https://www.prolekare.cz/casopisy/nuklearni-medicina/2013-1/polydentatne-ligandy-pre-moderne-radiofarmaka-obsahujuce-64cu-review-40852

[28] SHELTON, M. E. et al. Kinetics of copper-PTSM in isolated hearts: A novel tracer for measuring blood flow with positron emission tomography. *Journal of Nuclear Medicine.* 1989, roč. 30, č. 11, s. 1843-1847. ISSN 0161-5505. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2809749/

[29] CAI, Z. a ANDERSON, C. J. Chelators for copper radionuclides in positron emission tomography radiopharmaceuticals. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals [online]. 2014, roč. 57, č. 4, s. 224-230 [cit. 2020-06-22]. ISSN 03624803. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jlcr.3165

[30] T MA, M. a DONNELLY, P. S. Peptide Targeted Copper-64 Radiopharmaceuticals. *Current Topics in Medicinal Chemistry* [online]. 2011, roč. 11, č. 5, s. 500-520 [cit. 2020-06-22]. ISSN 15680266. Dostupné z: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=11&issue=5&spage=500

[31] BASS, L. A. et al. In vivo transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxide dismutase in rat liver. *Bioconjugate chemistry* [online]. 2000, roč. 11, č. 4, s. 527-532 [cit. 2020-07-21]. ISSN 1043-1802. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bc990167l

[32] BOSWELL, C. A. et al. Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes. *Journal of medicinal chemistry* [online]. 2004, roč. 47, č. 6, s. 1465-1474 [cit. 2020-07-21]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm030383m

[33] ZEGLIS, B. M. a LEWIS, J.S. A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography. *Dalton Transactions* [online]. 2011, roč. 40, č. 23 [cit. 2020-06-22]. ISSN 1477-9226. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=c0dt01595d

[34] RAMOGIDA, C. F. a ORVIG C. Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy. *Chemical Communications* [online]. 2013, roč. 49, č. 42, s. 4720-4739 [cit. 2020-06-22]. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cc41554f

[35] POSCHENRIEDER, A. et al. [^{64}Cu]NOTA-pentixather enables high resolution PET imaging of CXCR4 expression in a preclinical lymphoma model. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* [online]. 2017, roč. 2, č. 1 [cit. 2020-07-21]. ISSN 2365-421X. Dostupné z: http://ejnmmipharmchem.springeropen.com/articles/10.1186/s41181-016-0020-6

[36] KODAMA, H., FUJISAWA, C. a BHADHPRASIT, W. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Current Drug Metabolism* [online]. 2012, roč. 13, č. 3, s. 237-250 [cit. 2020-06-23]. Dostupné z: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=articl&issn=1389-2002&volume=13&issue=3&spage=237

[37] TURNLUND, J R. Human whole-body copper metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 1998, roč. 67, č. 5, s. 960S-964S [cit. 2020-06-23]. Dostupné z: https://academic.oup.com/ajcn/article/67/5/960S/4666198

[38] ANGELOVA, M. COPPER IN THE HUMAN ORGANISM. *Trakia Journal of Sciences* [online]. 2011, roč. 8, č. 1, s. 88-98 [cit. 2020-06-23]. ISSN 313-3551. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/284772858_Copper_in_the_human_organism

[39] COLLINS, J.F., PROHASKA, J.R. a KNUTSON, M.D. Metabolic Crossroads of Iron and Copper. *Nutrition Reviews* [online]. 2010, roč. 68, č. 3, s. 133-147 [cit. 2020-06-23]. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20384844/

[40] HARRIS, E. D. Copper in human and animal health. In: ROSE, J. *Trace Elements in Health: A Review of Current Issues* [online]. Elsevier

Science, 2016, s. 44-74 [cit. 2020-06-23]. ISBN 9781483191959. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=YnX-BAAAQBAJ

[41] QAIM, Syed M. Development of novel positron emitters for medical applications: nuclear and radiochemical aspects. *Radiochimica Acta* [online]. 2011, roč. 99, č. 10, s. 611-625 [cit. 2020-07-12]. ISSN 0033-8230. Dostupné z: http://www.degruyter.com/doi/10.1524/ract.2011.1870

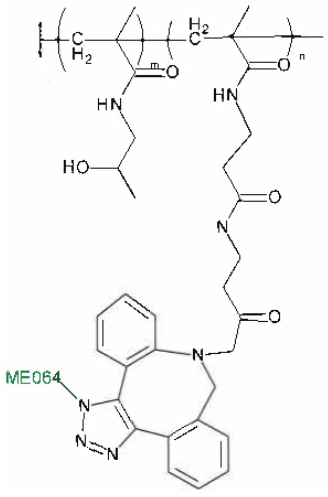
[42] MAJER, Vladimír. *Základy jaderné chemie: vysokoškolská učebnice*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1961.

[43] DEPALMA, A. SPECIAL GUIDE TO HPLC SYSTEMS. *Lab Manager* [online]. Elsevier, 2010, roč. 5, č. 5, s. 66-78 [cit. 2020-07-14]. ISBN 9780121827915. Dostupné z: https://www.labmanager.com/laboratory-technology/evolution-of-hplc-systems-19579

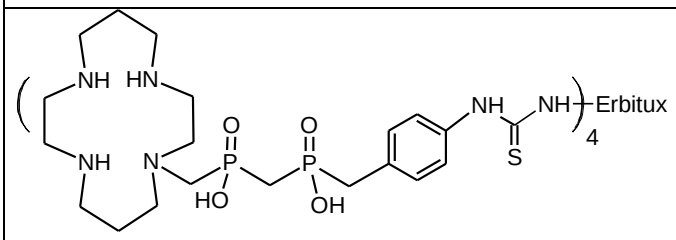
[44] DAVID, T. et al. Cyclam Derivatives with a Bis(phosphinate) or a Phosphinato–Phosphonate Pendant Arm: Ligands for Fast and Efficient Copper(II) Complexation for Nuclear Medical Applications. *Inorganic Chemistry* [online]. 2015, roč. 54, č. 24, s. 11751-11766 [cit. 2020-08-06]. ISSN 0020-1669. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.5b01791

Příloha A

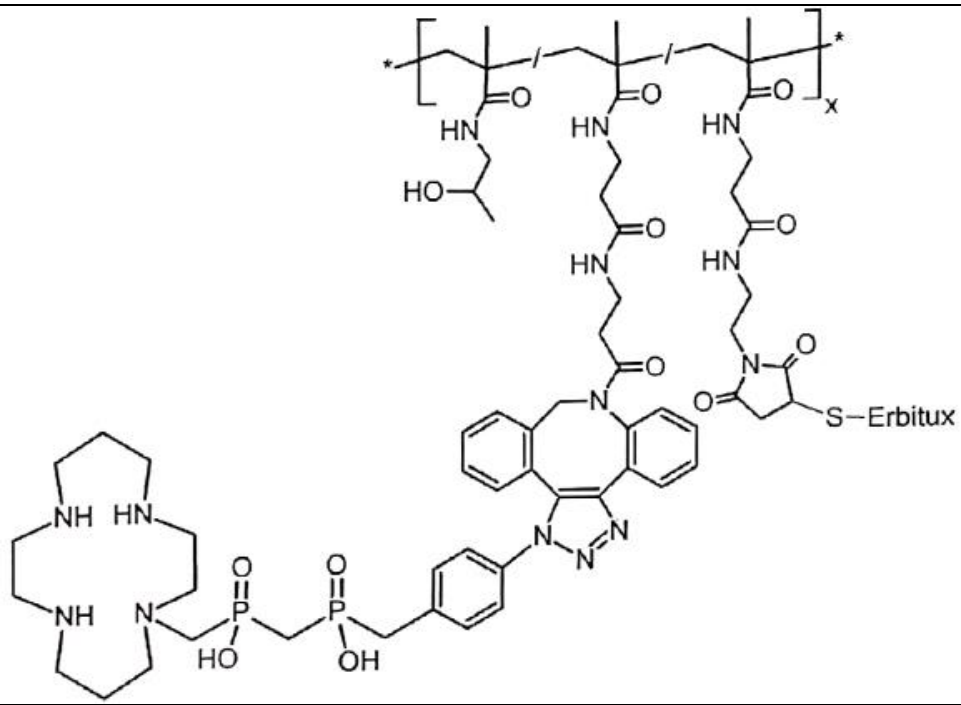
Struktury značených konstruktů

Název vzorku	RAM-14			
Popis vzorku	Polymerní konjugát s chelátorem ME064-2 směrovaný GE-11 k EGFR			
Interní název vzorku	PK-250419GE-11			
Uchovávání	~~v mrazáku~~	v lednici	~~citlivý na vlhkost~~	citlivý na světlo
	Jiné:			
Příprava vzorku	Rozpustit v:	PBS pufru	destilovaná voda	Jiné:
	Koncentrace roztoku:			
	Sonifikace roztoku	min	Zahřátí roztoku	°C
	Pozn.			
Schématická struktura				
				
Charakterizace	Mw	47 000 g/mol	*Đ*	1,05	Rh	n.a.
	Jiné					
Aktivní složka	Vzorek ME064-2, peptid GE-11					
Obsah aktivní složky	15% peptidu 15% chelátoru	wt%	1,9 peptidu 3,3 chelátoru	mol%		

Obrázek A.1: Charakteristika ligandu RAM 14

Název vzorku	RAM-15			
Popis vzorku	Erbitux s chelátorem 14-N_4-PPi~NCS (ME058)			
Interní název vzorku	PC519A			
Uchovávání	~~v mrazáku~~	v lednici	~~citlivý na vlhkost~~	citlivý na světlo
	Jiné:			
Příprava vzorku	Rozpustit v:	PBS pufru	destilovaná voda	Jiné:
	Koncentrace roztoku:			
	Sonifikace roztoku	min	Zahřátí roztoku	°C
	Pozn.			
Schématická struktura				
				
Charakterizace	Mw	154 000 g/mol	*Đ*	n.a.
	Rh	n.a.		
	Jiné			
Aktivní složka	Erbitux, 14-N_4-PPi~NCS (ME058)			
Obsah aktivní složky	cca 1,3	wt%		mol%

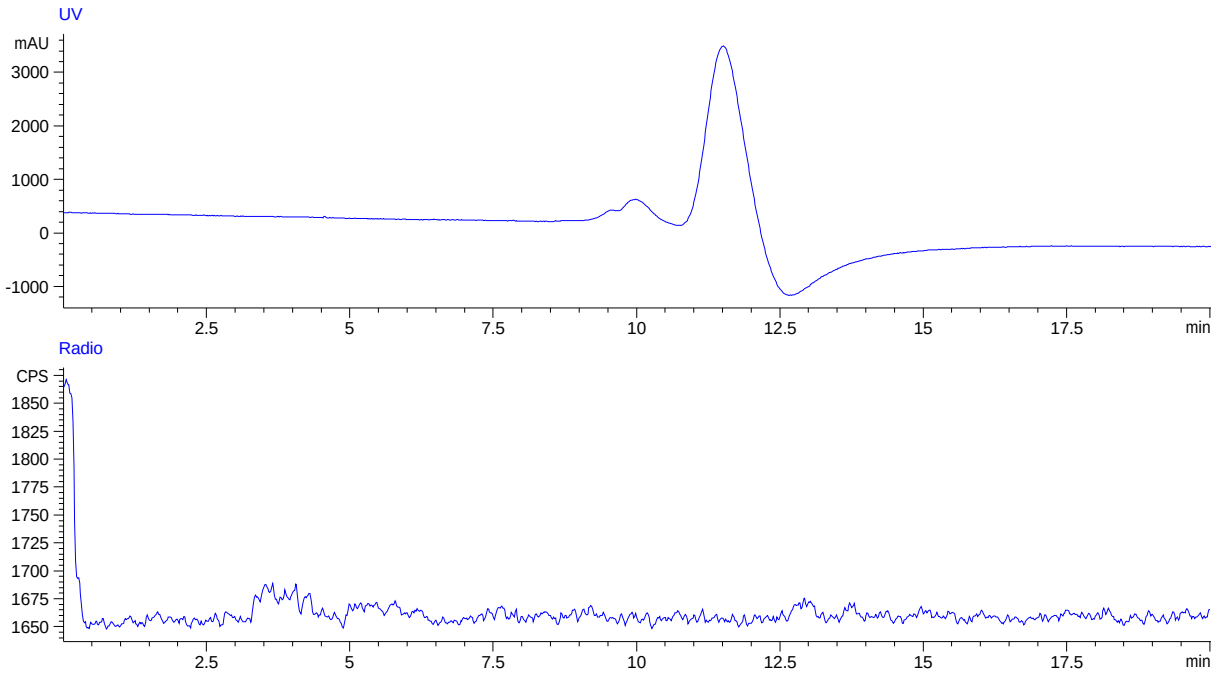
Obrázek A.2: Charakteristika ligandu RAM 15

Název vzorku	RAM-16			
Popis vzorku	Konjugát s HPMA kopolymeru s chelátorem ME064 a s Erbituxem			
Interní název vzorku	PC518zn			
Uchovávání	~~v mrazáku~~	v lednici	~~citlivý na vlhkost~~	citlivý na světlo
	Jiné:			
Příprava vzorku	Rozpustit v:	PBS pufru	destilovaná voda	Jiné:
	Koncentrace roztoku:			
	Sonifikace roztoku	min	Zahřátí roztoku	°C
	Pozn.			
Schématická struktura				
				
Charakterizace	Mw	490 000 g/mol	*Đ*	n.a.	Rh	n.a.
	Jiné					
Aktivní složka	Erbitux, chelátor ME064					
Obsah aktivní složky		wt%		mol%		

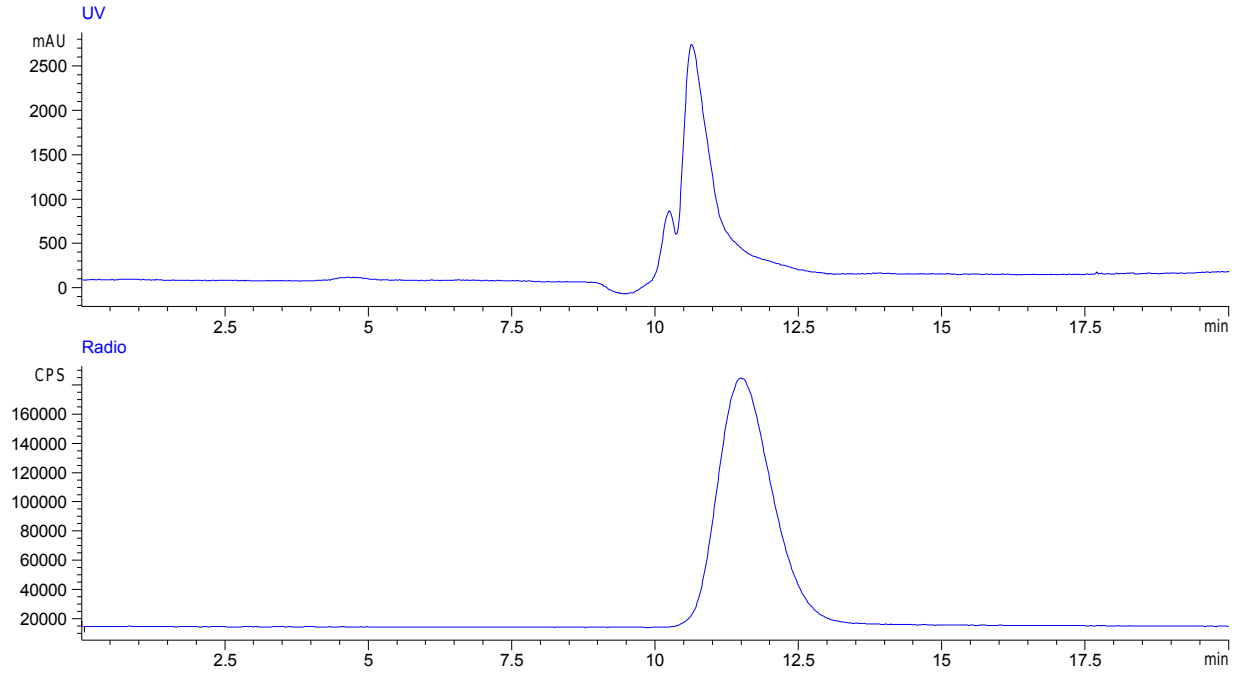
Obrázek A.3: Charakteristika ligandu RAM 16

Příloha B

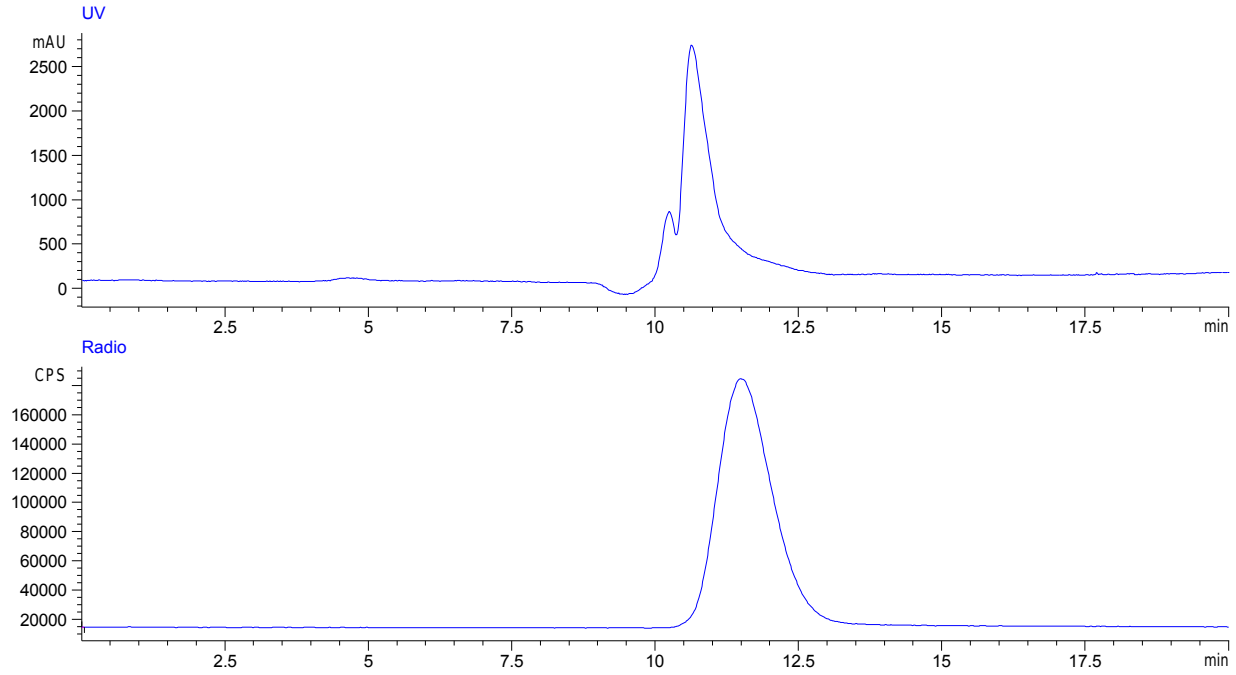
Naměřené chromatogramy



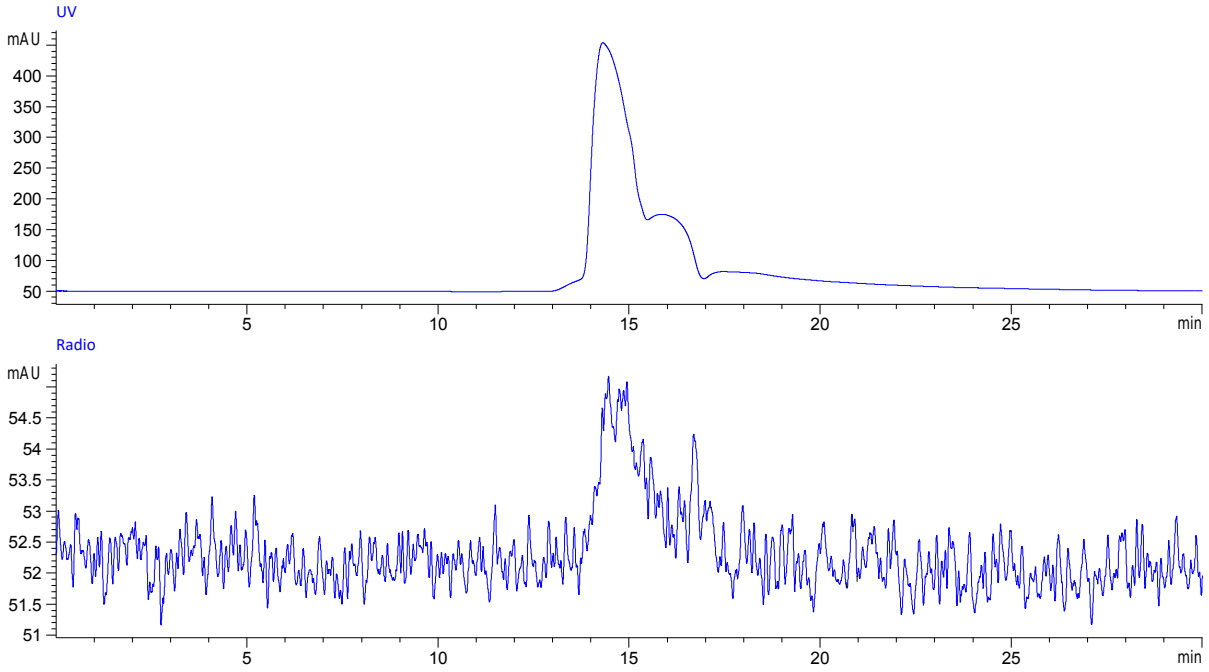
Obrázek B.1: Chromatogram MES



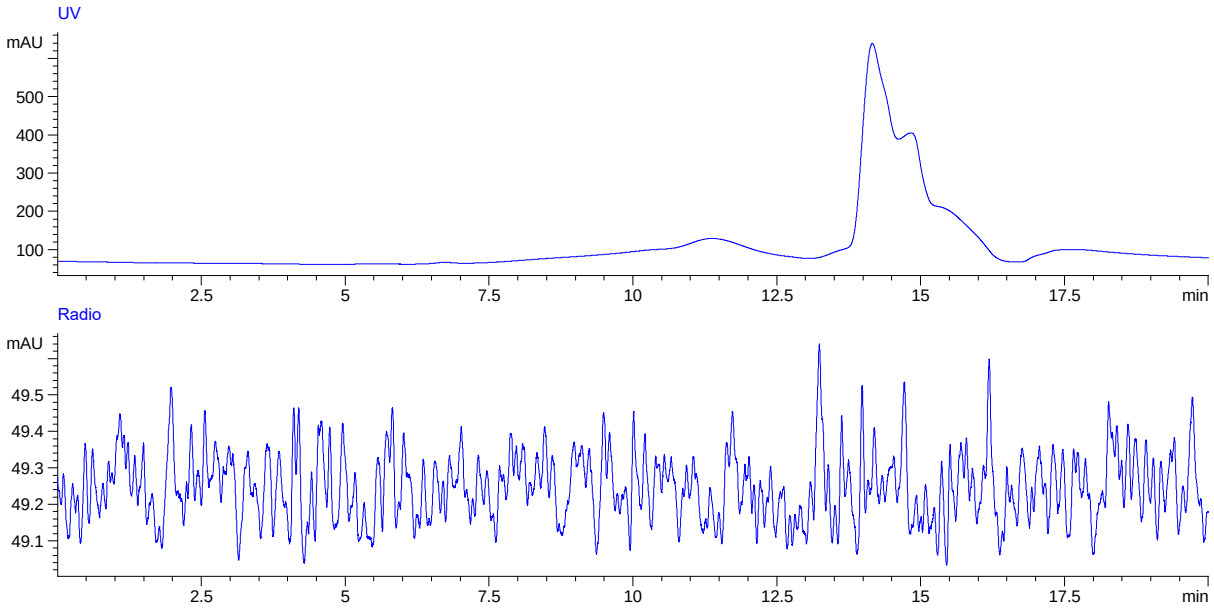
Obrázek B.2: Chromatogram MES + ^{61}Cu



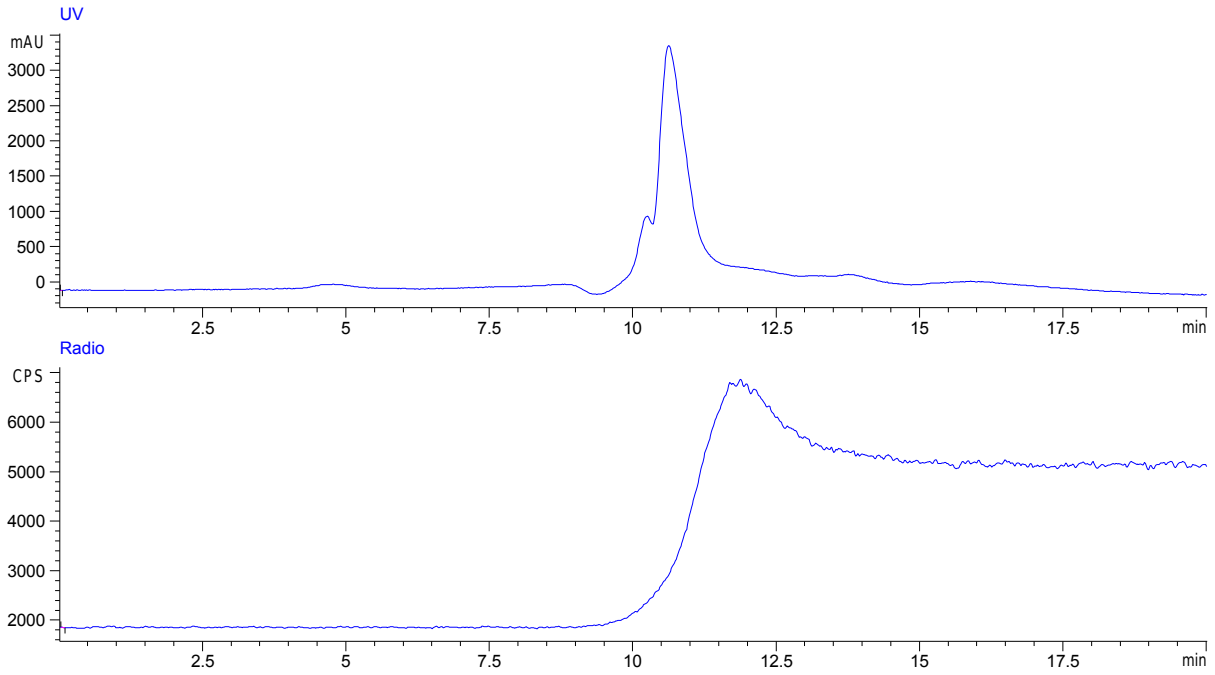
Obrázek B.3: Chromatogram MES + ^{61}Cu



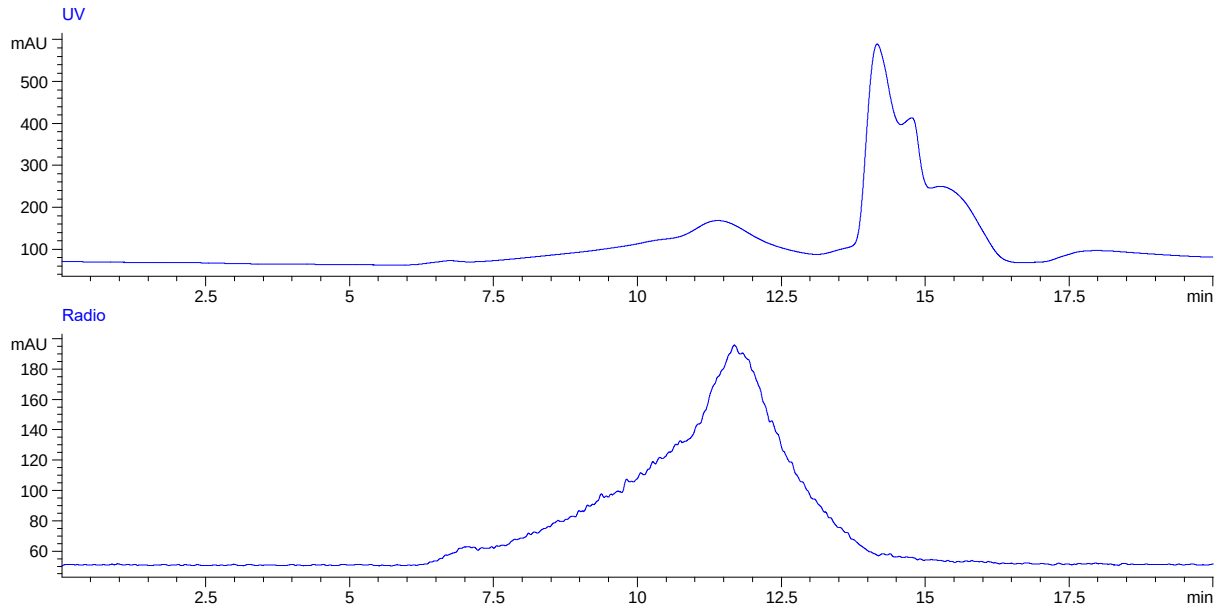
Obrázek B.4: Chromatogram MES + ^{64}Cu



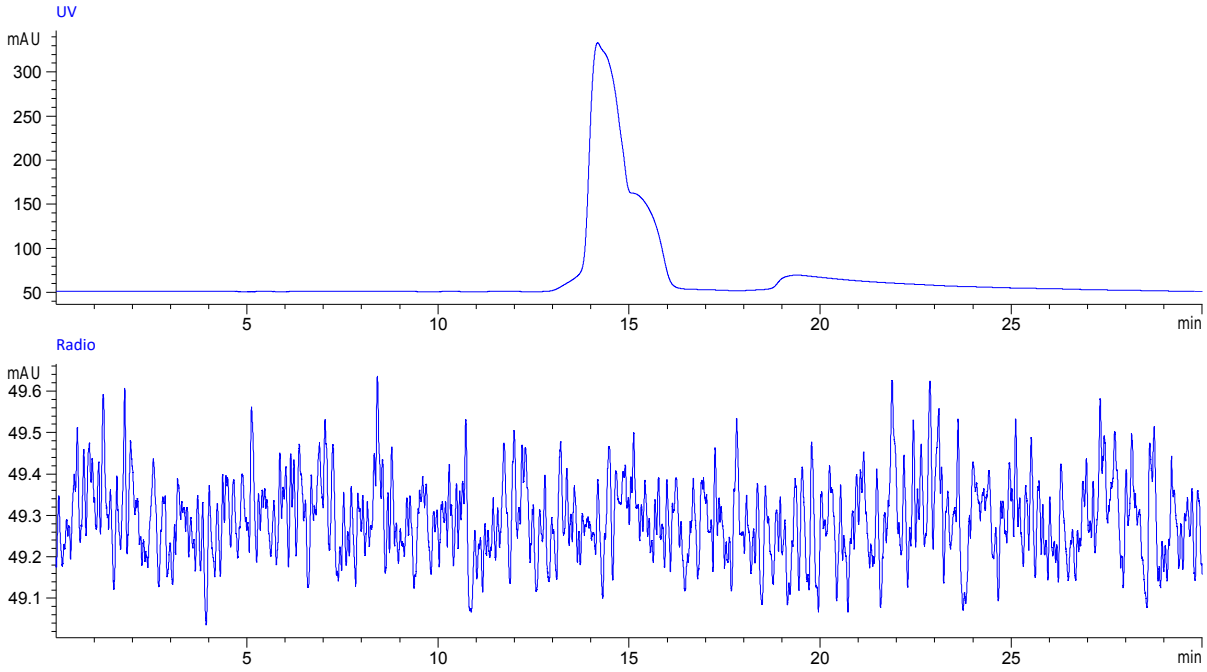
Obrázek B.5: Chromatogram RAM 14



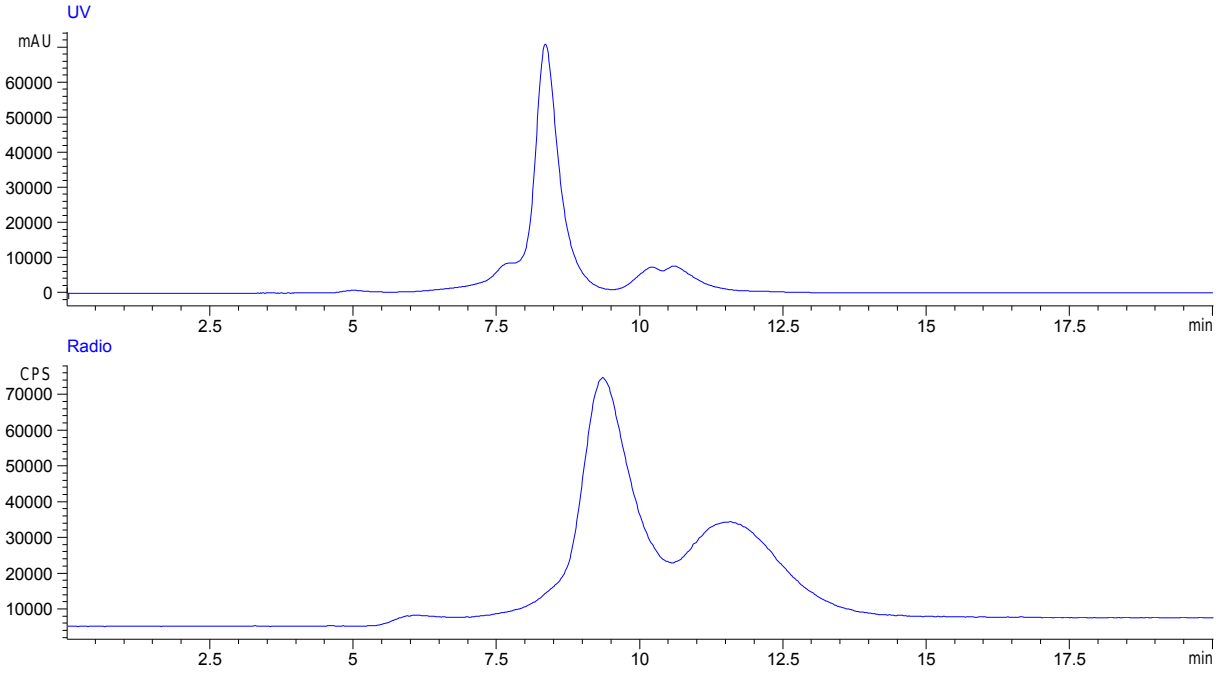
Obrázek B.6: Chromatogram RAM 14 značený ^{61}Cu



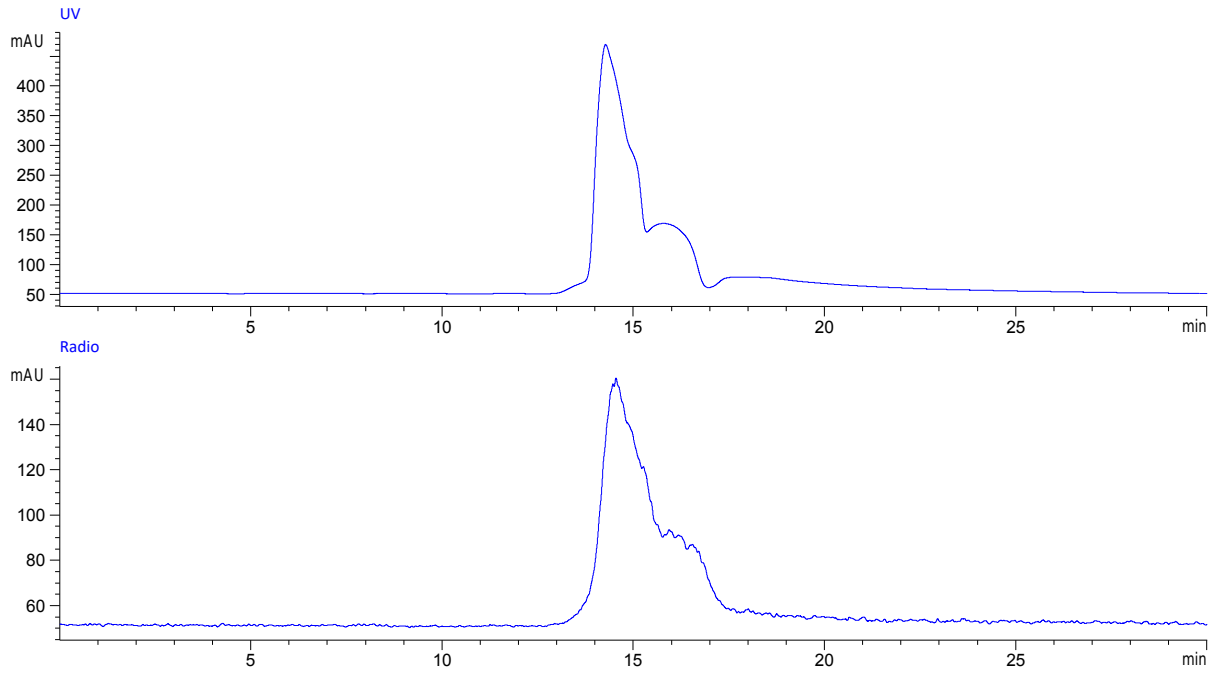
Obrázek B.7: Chromatogram RAM 14 značený ^{64}Cu



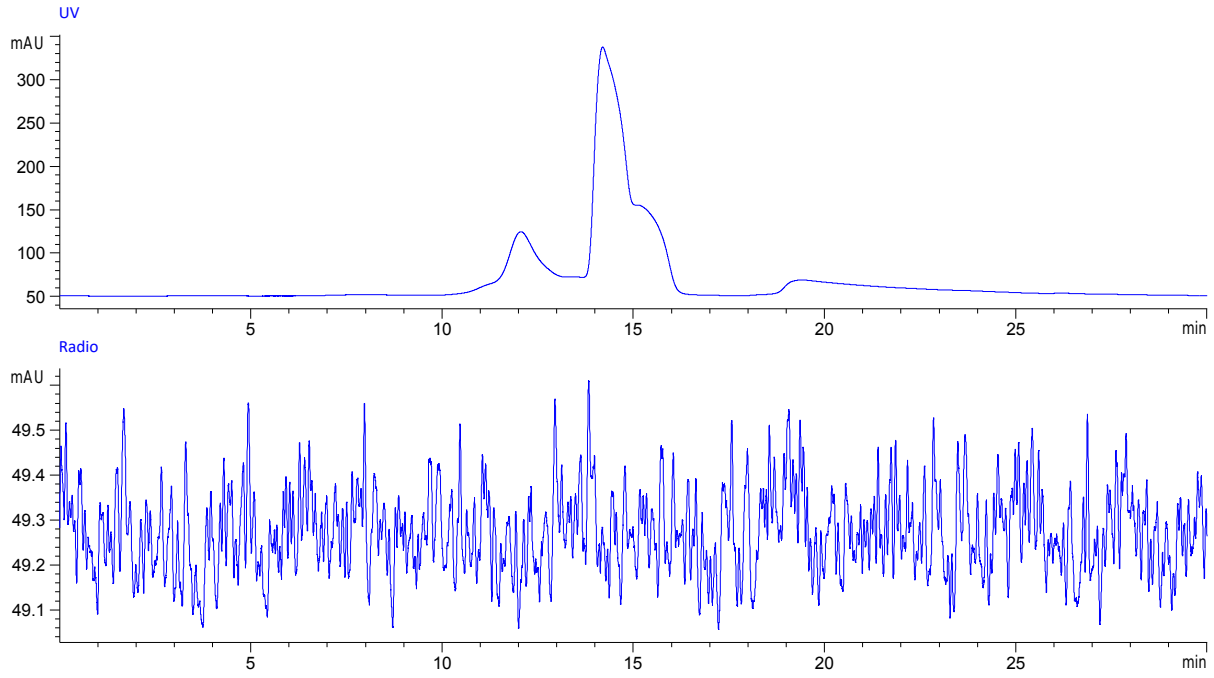
Obrázek B.8: Chromatogram RAM 15



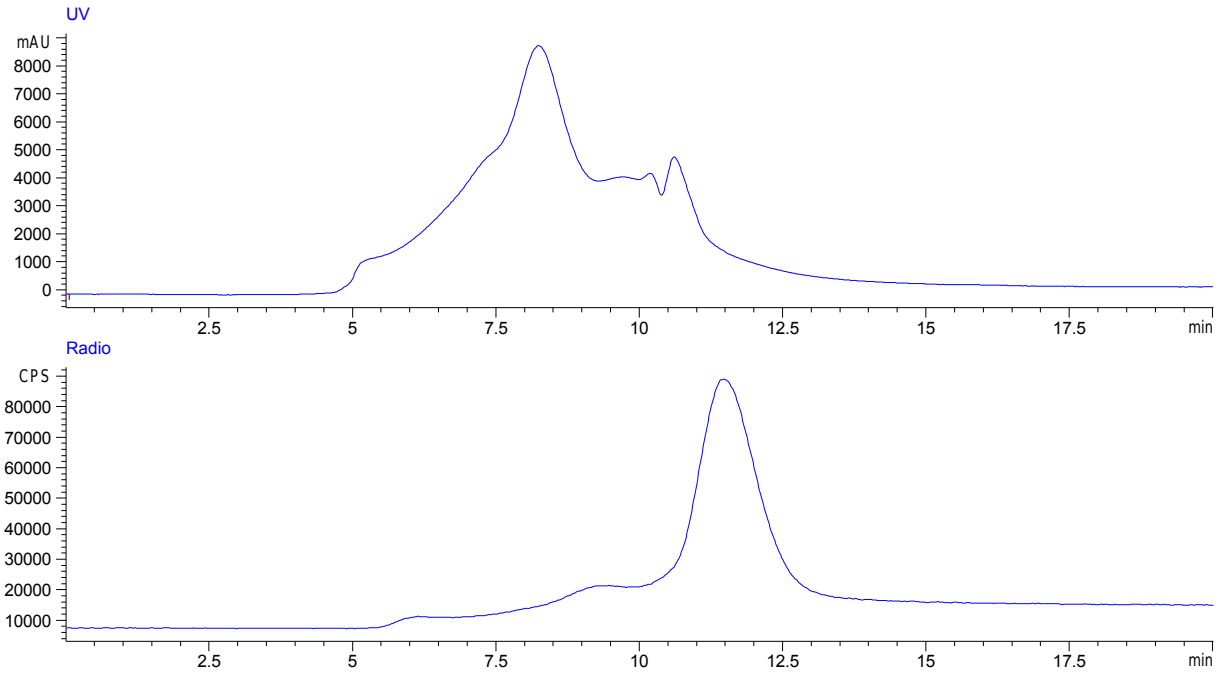
Obrázek B.9: Chromatogram RAM 15 značený ^{61}Cu



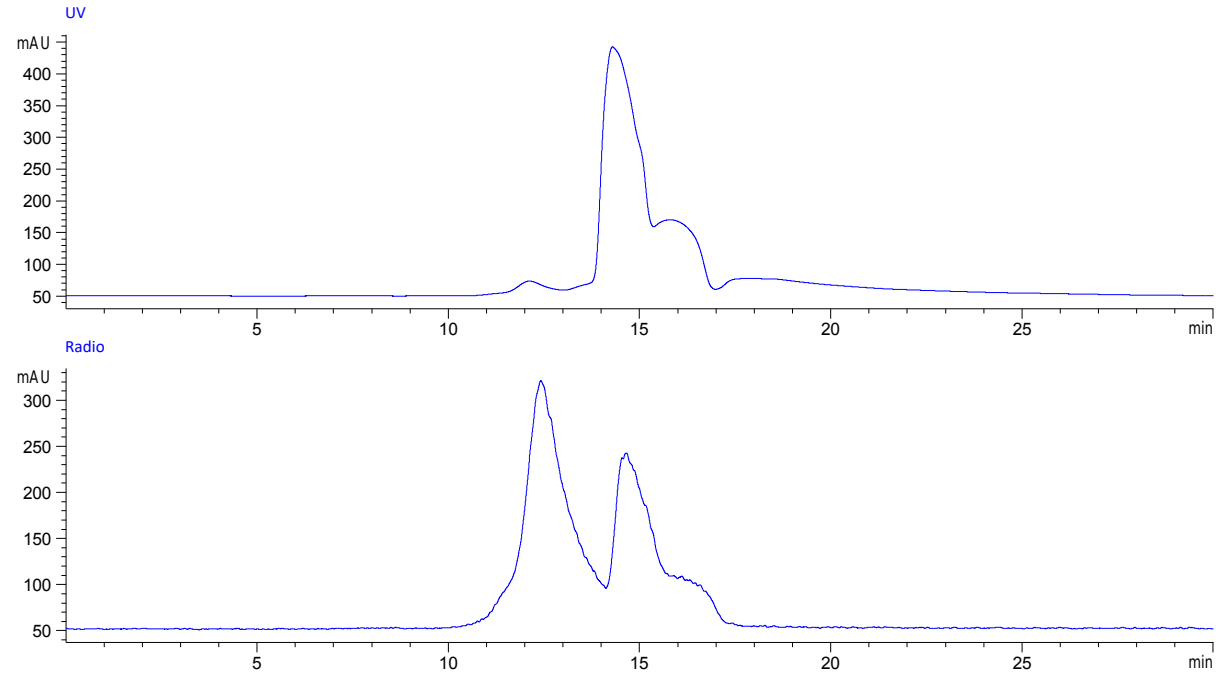
Obrázek B.10: Chromatogram RAM 15 značený ^{64}Cu



Obrázek B.11: Chromatogram RAM 16



Obrázek B.12: Chromatogram RAM 16 značený ^{61}Cu



Obrázek B.13: Chromatogram RAM 16 značený ^{64}Cu