

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Zbyněk Nový

Školitel: Doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Název disertační práce: Studium interakcí radionuklidu značených monoklonálních protilátek s receptorem pro epidermální růstový faktor *in vitro*

Řada typů karcinomů se ve srovnání se zdravou tkání vyznačuje zvýšenou expresí receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Tohoto fenoménu využívají pro léčbu některých onkologických onemocnění anti-EGFR monoklonální protilátky. Intenzivně studovanou oblastí je ověřování možností zvýšit využitelnost těchto protilátek inkorporací vhodných radionuklidů, což může sloužit pro radiodiagnostiku či radioterapii zmíněných malignit. Ačkoliv je EGFR receptor a s ním spojené signální intracelulární kaskády předmětem intenzivního výzkumu, není dostatečně prostudována řada faktorů, které mohou zkoumání a míru vazby radioaktivně značených protilátek na EGFR *in vitro* významně ovlivnit.

Cílem této disertační práce bylo v první fázi zavést metodiku pro značení anti-EGFR monoklonálních protilátek (cetuximab, panitumumab) jódem-131 a s pomocí takto označených protilátek stanovit míru exprese EGFR u čtyř zvolených buněčných linií (A431, HaCaT, HCT116 a HepG2). V další fázi bylo úkolem provést s využitím těchto z hlediska exprese EGFR definovaných buněčných modelů vazebnostní studie s cetuximabem a panitumumabem značenými luteciem-177 a porovnat vazebnost těchto dvou protilátek na EGRF v relaci na buněčném modelu a typu použitého bifunkčního chelátoru vázajícího radiokov. Součástí práce byly i radiochemická charakterizace a ověření stability připravených radioaktivně značených protilátek.

Stanovení počtu receptorů bylo prováděno jak pomocí klasické manuální saturační techniky, tak pomocí nového poloautomatizovaného přístupu tzv. kinetické extrapolační metody (KEX). Míra exprese byla také porovnána s výsledky zjištěnými western blottingem. Stanovení

míry exprese EGFR bylo prováděno u čtyř vybraných buněčných linií. Pro značení luteciem-177 byla využita modifikace obou protilátek třemi bifunkčními chelátory (DOTA, NOTA a PCTA).

Optimalizace značení anti-EGFR protilátek jódem-131 vedla k vysoké výtěžnosti a radiochemické čistotě. Testování stability připravených protilátek ukázalo, že pokles radiochemické čistoty během 24 h je v řádu jednotek procent. Obě metody stanovení počtu receptorů vykazovaly výsledky ve vzájemné shodě. KEX metodu lze tedy pokládat za srovnatelně využitelnou jako klasickou saturační techniku. Počet EGFR receptorů na buňku se pohyboval od $1,98 \times 10^6$ u linie A431, přes $0,91 \times 10^6$ pro HaCaT až po $0,15 \times 10^6$ pro HCT116 a $0,07 \times 10^6$ u linie HepG2. Celkově lze tedy podle exprese EGFR studované linie seřadit takto: A431 > HaCaT > HCT116 \approx HepG2. Míra exprese korelovala s výsledky získanými western blottingem.

Postupy zavedené pro značení cetuximabu a panitumumabu luteciem-177 vedly k preparátům značených protilátek s vysokou radiochemickou čistotou a stabilitou až po dobu jednoho týdne. Ve vazebnostních studiích se ukázalo, že podíl navázané protilátky je výrazně rozdílný v závislosti na použité buněčné linii a je ve shodě s mírou exprese cílového EGFR. Vazba luteciem-177 značených protilátek na buněčné modely byla vysoce specifická, neboť preinkubace s nadbytkem neznačené protilátky radikálně vazbu snížila. Při vyhodnocování vlivu použitého chelátoru na vazbu protilátek *in vitro* nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v akumulaci protilátek modifikovaných DOTA, NOTA či PCTA v příslušných buněčných liniích. Získané výsledky dokládají, že připravené protilátky značené luteciem-177 mají vhodné radiochemické a biologické parametry a jsou tak vhodnými kandidáty pro další výzkum směrem k jejich potencionálnímu využití.