

## OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

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

**Autor:** Mgr. Zbyněk Nový

Předložená disertační práce se zabývá aktuální problematikou receptorově afinitních radiofarmak určených pro diagnostické a terapeutické účely. Jedná se o studium řady faktorů, jejichž objasnění vede k optimalizaci přípravy radiofarmak pro jejich zavedení mezi diagnostické a terapeutické postupy v nukleární medicíně.

Cílem práce bylo zavést metodiku značení monoklonálních protilátek proti receptoru pro epidermální růstový faktor jodem-131 a stanovit míru jeho exprese u čtyř buněčných linií. Získaných poznatků dále využít ke značení protilátek cetuximabu a panitumumabu luteciem-177 a k jejich porovnání na buněčném modelu a použitých chelátorech vázajících tento radionuklid. Dále popsat radiochemické vlastnosti a stabilitu těchto značených protilátek.

Disertační práce je rozdělena do 10 částí. V úvodu autor seznamuje s předmětem zkoumání, kterým je oblast monoklonálních protilátek cílených na receptor pro epidermální růstový faktor; ten se vyskytuje ve zvýšené míře u mnoha typů nádorů. Autor posuzoval okolnosti, které mohou ovlivnit vazbu radioaktivně značených protilátek na výše uvedený receptor.

Teoretická část, je rozdělena do třech oblastí, přehledu radiofarmak s cílenou biodistribucí využitelných pro diagnostiku a terapii, dále popisuje monoklonální protilátky, způsoby jejich produkce a značení radionuklidu se zřetelem na metodu využívající bifunkční cheláty, kterou v dále popsaných experimentech uplatňuje. Popisuje i současný vývoj a situaci v předklinickém a klinickém hodnocení radioaktivně značených protilátek, vlastnosti a funkci receptoru pro epidermální růstový faktor a protilátky cílené na tento receptor.

V experimentální části jsou popsány použité monoklonální protilátky, chemikálie, cheláty a buněčné linie, dále použité přístroje a metody značení monoklonálních protilátek a kontrola radiochemické čistoty přípravků, stanovení počtu receptorů, jejich koncentrace, exprese a vazebnost protilátek.

Výsledky experimentů jsou přehledně rozděleny a ukazují, že označené protilátky cetuximab a panitumomab po přečištění vykazují při značení jodem-131 vysokou radiochemickou čistotu a po dobu 24 hodin i stabilitu vhodnou pro vazbu na modelové buněčné linie. Rovněž značení dobře přečištěných monoklonálních protilátek radionuklidem lutecia-177 komplexovaného s chelátorem bylo úspěšné a vykazovalo potřebnou stabilitu. Výsledky studia vazebnosti modifikovaných monoklonálních protilátek na vybraných buněčných liniích exprimujících receptor pro epidermální růstový faktor jsou přehledně prezentovány graficky i tabelárně.

Diskuse je v této disertační práci velmi cenným nástrojem pro orientaci v dané problematice a osvětluje nejasnosti a podmínky pro řešení problematiky výzkumu, vývoje a přípravy

radiofarmak s cílenou biodistribucí pro oblast imunodiagnostiky a imunoterapie. Diskuse srovnávající získané výsledky publikované v disertační práci se opírá o nejnovější citace zahraniční literatury z renomovaných pracovišť. Tato výborně vedená diskuse svědčí o velmi dobré znalosti problematiky řešené v disertační práci.

Závěr disertační práce je formulován přehledně a poskytuje informace o záměru, provedení a rozsahu experimentální činnosti v oblasti radioaktivně značených monoklonálních protilátek.

V použité literatuře je uvedeno 156 položek týkajících se řešené problematiky, které mohou sloužit i dalším vědeckým pracovníkům v této oblasti.

Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací v 7 zahraničních časopisech s IF, v nichž je disertant prvním autorem nebo spoluautorem ukazuje na jeho schopnost vědecké práce, což potvrzuje i 30 prezentací na zahraničních i domácích vědeckých konferencích.

V příloze jsou i 2 nejnovější odborné publikace disertanta s tématikou disertační práce zveřejněné v zahraničních časopisech s IF.

Součástí posudku disertace je několik připomínek a dotazů pro autora:

V textu jsem našel několik opakovaných nepřesností, které však nesnižují celkovou hodnotu disertační práce. Jedná se o správné názvosloví některých sloučenin, např. methanol (str. 59, 64, 79), příp. prvku jod (opakovaně), překlepů (str. 30,43, 61, 101, 68, 66, 86, 90). Namísto termínu laboratorní teplota (str. 69) a pokojová teplota (str. str. 65,69,85) doporučuji používat lékopisný termín teplota místnosti. Namísto termínu inkubace „přes noc“ doporučuji lépe vyjádřit časovým údajem, např. hod. (str. 63, 64). V textu ve větách doporučuji psát zkratku obr. malým počátečním písmenem. V části 2.2.4 Radionuklidy pro značení protilátek v tabulce 4 str. 33,34 jsou v první a druhé části chybně všechny zářiče uvedeny jako pozitronové ( $\beta^+$ ), namísto  $\beta^-$ .

Závěrečné dotazy k disertantovi:

K termínu specifická aktivita: nebylo by vhodnější použít termín hmotnostní aktivita vyjadřovaný v Bq/g, nebo molární aktivita vyjadřovaná v Bq/mol ?

Jakou nečistotu představuje červený pík na obr. 20? Jedná se o „volný“ jod-131? Proč není patrný v křivce analýzy HPLC na obr. 21?

U obou značených protilátek se hodnotila radiochemická čistota po 24 hod., u cetuximabu i po 7 dnech. Proč ne u panitumomabu?

Proč není v obr. 38 a obr. 39 a v tab. 10 a tab. 11 uvedena vazebnost na buněčnou linii exprimující HepG2. Je to proto, že rozdíly mezi HCT116 a HepG2 v počtu zkoumaných receptorů nejsou podle míry exprese EGFR signifikantní, jak je uvedeno v diskuzi na str. 91?

Disertační práce obsahuje 124 stran textu s 10 tabulkami a 39 obrázky a přílohou s odbornými publikacemi autora. Práci doplňuje užitečný seznam použitých zkratek

Předložený spis disertační práce hodnotím jako velmi zdařilý, je napsán přehledně, srozumitelně a s velmi dobrou grafickou úpravou. Teoretická i experimentální část obsahuje mnoho cenných vědeckých informací z oblasti řešené problematiky a jistě bude zdrojem informací při dalším výzkumu těchto radioaktivních léčiv pro diagnostiku a terapii závažných onemocnění. Provedení mnoha náročných experimentů a zpracování velkého množství výsledků ukazuje na autorovu velmi dobrou orientaci v řešené problematice a získanou zkušenost ve vědecké práci. Výsledky této práce mohou posunout další předklinická a klinická hodnocení této skupiny radioaktivních přípravků mezi nová léčiva pro diagnostiku a terapii metodami nukleární medicíny.

Závěr:

Předloženou disertační práci hodnotím jako přínosnou pro oblast nových radioaktivních léčiv. Mgr. Zbyněk Nový prokázal schopnost samostatně řešit vědecké problémy, pracovat s odbornou literaturou, poznatky aplikovat do experimentální práce a z dosažených výsledků formulovat závěry pro další výzkumnou činnost v této oblasti ve vědním oboru Farmakologie a toxikologie. Předložený spis jednoznačně splňuje z hlediska všech kritérií požadavky kladené na práce tohoto typu. Doporučuji proto disertační práci k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení pak udělení titulu Ph.D.

V Praze, 14.8.2014