

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Název: Synthesis and Evaluation of radioconjugates formed with selected trivalent radiometals

Autor: Denis Rolando Beckford Vera, M.Sc.

Předložená disertační práce se zabývá aktuální problematikou radioaktivně značených monoklonálních protilátek radionuklidů vhodnými pro diagnostiku a terapii nádorových onemocnění.

Cílem práce bylo vytvořit metodiku pro značení monoklonálních protilátek Nimotuzumab a Trastuzumab radionuklidů ^{86}Y a ^{90}Y a ^{166}Ho , ^{111}In a ^{177}Lu a pro značení DOTA-Puromycinu radionuklidů ^{68}Ga a ^{44}Sc . Vyhodnotit vlastnosti syntetizovaných radiokonjugátů pro targeting do lidských nádorů i kultivovaných buněčných linií *in vitro* a posoudit biodistribuci značených látek u zdravých zvířat s implantovaným nádorem. U vybraných radionuklidů odhadnout radiační zátěž a posoudit možnost využití pro zobrazování syntézy proteinu *in vivo*.

V teoretické části práce autor popisuje v souvislosti s řešenou problematikou základní principy terapie a zobrazování radionuklidů sloučenin kovů pro studium imunotargetingu pomocí bifunkčních chelátů a jejich vazby na monoklonální protilátky. Předpokladem validních výsledků je však i ověření biologické aktivity radioimunokonjugátů, kterému se autor věnuje v teoretické i praktické části disertace. Stručná informace o dozimetrii radiofarmak uzavírá teoretickou část. V jejím závěru oceňuji stručný souhrn radionuklidů a bifunkčních chelátů, které autor s ohledem na budoucí trendy pro radioimunoterapii zkoumal.

V experimentální části nemám k popisu přípravy použitých látek a modifikace protilátek s bifunkčními cheláty, včetně charakterizace imunokonjugátů a analytických metod jejich analýzy, žádné připomínky. Jejich náročné značení sedmi různými radionuklidů je popsáno přehledně a srozumitelně. Rovněž tak studie *in vitro* na buněčných kulturách metodami vazebné saturační a vazebné kompetitivní analýzy a cytotoxicity nádorových buněk. Studie *in vivo* biodistribuce zkoumaných radiokonjugátů jsou popsány jasně a přehledně.

Část týkající se výsledků a jejich diskuse navazuje na předchozí metodickou část disertace. Výborně vedená diskuse prezentovaných výsledků konfrontovaná s literárními údaji potvrzuje jejich správnost a v mnoha případech autor disertace dosáhl i lepších výsledků, což posunuje zkoumané problémy do situace reálného využití v lékařské praxi.

V této souvislosti uvádím několik poznámek či dotazů: V části výsledků konjugace a radioaktivního značení (str. 74-75) se ukázalo, že poměr DOTA/h-R3 zvyšuje výtěžnost značení ^{177}Lu a ovlivňuje chování sloučeniny *in vivo*. Poměr aktivity játra/krev se ve všech časových intervalech měření zvyšuje. V jakých jednotkách je tento poměr v tabulce 2 vyjádřen?

V části studie vlivu druhu chelátoru na výtěžek značení u Nimotuzumabu konjugovaného s p-SCN-Bn-DOTA a s p-SCN-Bn-DTPA ukazuje obr. 8 a obr. 9 jejich ITLC profily. Z obr. 9 není patrné u jednotlivých profilů křivek, která z křivek přísluší kterému konjugátu. Pozitivním výsledkem je zjištění, že další čištění u konjugátu ^{177}Lu -DOTA-Bn-h-R3 není po jeho přípravě potřebné.

U studie značení monoklonálních protilátek yttriem-90 ukazuje obr. 10 jejich ITLC profily, tab. 3 všechny další výsledky. Zde mám otázku vyplývající z poslední věty na str. 82. Ve kterých případech nebylo třeba při značení ^{90}Y čištění konjugátů?

Z výsledků hodnocení stability velmi oceňuji excelentní stabilitu konjugátů $^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Nimotuzumabu.

Pozitivně hodnotím, že v *in vitro* studiích byla zjištěna imunoreaktivita použitých protilátek i jejich 4 konjugátů podobná a dokonce vyšší než udává literatura.

K názvosloví protilátek použitému v disertaci: doporučil bych jednotně používat pouze generický (INN–mezinárodní nechráněný název) Trastuzumab namísto firemního názvu Herceptin a Nimotuzumab (INN) namísto firemního názvu Theraloc.

Studium biodistribuce *in vivo*: Biodistribuční studie ^{177}Lu -DOTA-Bn-h-R3 v myších s SNU-C2B implantátem (kolorektální Ca) ukázaly rychlé vychytávání *in vivo* na receptory lidského epidermálního růstového faktoru v buňkách kolorektálního karcinomu *in vivo*, které je v těsném souladu s *in vitro* studiemi. To je důkaz, že biologická aktivita a schopnost targetingu studovaných protilátek zůstává zachována i po konjugaci a značení.

Ke studii biodistribuce v myších s implantátem spinocelulárního karcinomu (dlaždicové buňky) prezentované na str. 115-119 mám dotaz, proč se vychytávání při i.v. aplikaci sledovalo 264 hod a při logoregionální aplikaci jen 96 hod?

Na kterém pracovišti se připravoval bifunkční chelát ^{44}Sc -DOTA-Pur a prováděla se jeho mikroPET studie?

V úplném závěru disertační práce autor shrnul výsledky své práce a ukázal výhledy do 8 oblastí, ve kterých by se v souvislosti s výsledky této disertace mělo pokračovat. Jak autor naznačil již v úvodu disertace, cílem práce byla předně formulace radiofarmak pro radioimunoterapii s tím, že je nezbytné jejich biodistribuci a imunotargeting ověřovat i jejich *in vivo* zobrazováním, nejlépe pomocí PET. Radioterapie je důležitou součástí metod nukleární medicíny a onkologická radiofarmaka jsou vzhledem k závažnosti nádorových onemocnění preferována.

V tomto ohledu mám ještě k autorovi dizertace závěrečný, všeobecný dotaz: Pro účinnou a bezpečnou RIT je třeba volba vhodného radionuklidu. Jakými principy se tato volba řídí a které faktory hrají pro výběr radionuklidu rozhodující úlohu?

Disertační práce obsahuje 144 stran textu s 8 tabulkami a 39 obrázky. Práci doplňují seznamy použitých zkratk, obrázků a tabulek, 170 literárních citací a seznam 25 publikací a prezentací autora, vztahujících se k tématu předložené disertační práce v nichž je v 10 případech prvním autorem.

Předložený spis disertační práce hodnotím jako zdařilý, je napsán v anglickém jazyce, 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 potenciálních radioaktivních léčiv s cílenou biodistribucí. Provedení všech náročných experimentů a zpracování velkého množství výsledků ukazuje na autorovu dobrou orientaci v řešené problematice a získanou zkušenost ve vědecké práci.

Závěr:

Předloženou disertační práci hodnotím jako přínosnou pro oblast nových, moderních radioaktivních léčiv s cílenou biodistribucí. Denis Rolando Beckford Vera, MSc. 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. Předložený spis jednoznačně splňuje z hlediska všech kritérií požadavky kladené na práce tohoto typu. Doporučuji proto disertační práci k obhajobě. Po jejím úspěšném obhájení pak udělení titulu Ph.D.