



36. ORSZÁGOS TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA 2023

36. OTDK KÉMIAI ÉS VEGYIPARI SZEKCIÓ

ANTITESTMÓDOSÍTÁS HETEROCIKLUSOKKAL

Készítette:

Pásztor Bettina

Gyógyszervegyészmérnök, I. évfolyam
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

ELKH Természettudományi Kutatóközpont
Gyógyszerkémiai Kutatócsoport

Témavezetők:

Dr. Keserű György Miklós

MTA levelező tagja, egyetemi tanár, kutatócsoport vezető

Dr. Ábrányi-Balogh Péter

tudományos munkatárs

Konzulens:

Szepesi Kovács Dénes

PhD hallgató



Budapest
2022

Lezárva: 2022.06.18.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, **Dr. Keserű György Miklósnak** és **Dr. Ábrányi-Balogh Péternek**, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a TTK Gyógyszerkémiai Kutatócsoportban végzett munkámhoz. Köszönöm a közös munka során nyújtott iránymutatásukat és tanácsaikat, valamint a belém vetett bizalmukat.

Köszönettel tartozom konzulensemnek, **Szepesi Kovács Dénesnek** a számos elméleti és gyakorlati téren nyújtott segítségéért és támogatásáért. Továbbá köszönöm a felém mutatott türelmét és azt, hogy bármikor fordulhattam hozzá tanácsért.

Köszönöm **Dr. Petri Lászlónak** a kinetikai mérések elvégzését, kiértékelésüket, szakmai tanácsait és segítségét.

Köszönöm **Müller Dalmának** a FACS vizsgálatokhoz szükséges sejtek jelölését és **Dr. Várady Györgynek** az áramlási citometria méréseket.

Köszönöm **Tóth Estilla Zsófiának** a konfokális mikroszkópiához szükséges sejtek tenyésztését, a sejtmetaszetek készítését és azok jelölését.

Köszönet illeti **Dr. Kupai Józsefet**, aki eddigi egyetemi éveim alatt mind a kutatás, mind pedig tanulmányaim területén számos hasznos tanáccsal látott el.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet szeretnék mondani a TTK Gyógyszerkémiai Kutatócsoport összes tagjának, akikhez témavezetőimen és konzulensemén kívül, bármikor fordulhattam segítségért.

Rövidítésjegyzék

ADC: antitest–gyógyszer konjugátum	HATU: 1-[<i>bisz</i> -(dimetilamino)-metilén]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridínium-3-oxid-hexafluorofoszfát
BBS: borát alapú sóoldat	Her2: humán epidermális növekedési faktor 2
Boc: <i>terc</i> -butoxikarbonil csoport	HOAT: 1-hidroxi-7-azabenzotriazol
BVP: <i>bisz</i> -(vinilszulfonil)-piperazin	HOBt·H ₂ O: 1-hidroxi-benzotriazol hidrát
CD22: cluster of differentiation-22 fehérje	IgG1: immunglobulin G1
Cys: cisztein	kDa: kilodalton
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	MeCN: acetonitril
DAR: gyógyszer-antitest arány (drug to antibody ratio), illetve a dolgozatban rekonjugálószer-antitest arány	MS: tömegspektrometria
DCC: <i>N,N'</i> -diciklohexil-karbodiimid	MVP: monovinilpirimidin
DIPEA: <i>N,N</i> -diizopropil-etil-amin	NaPi: nátrium-foszfát puffer
DKM: diklórmétán	NBS: <i>N</i> -bróm-szukcinimid
DM1: mertanzin	NGM: újgenerációs maleimid
DMF: <i>N,N</i> -dimetilformamid	NHS: <i>N</i> -hidroxi-szukcinimid
DMSO: dimetilszulfoxid	NMM: <i>N</i> -metil-morfolin
DOX: doxorubicin	PBS: foszfát alapú sóoldat
DTT: ditiotritol	Pd(dppf)Cl ₂ : diklór[1,1'- <i>bisz</i> -(difenilfoszfino)-ferrocén]palládium(II)
DVP: divinilpirimidin	PEG: polietilén-glikol
DVT: diviniltriazin	RT: szobahőmérséklet
EDC: <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid	SDS-PAGE: nátrim-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
EDC·HCl: <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidroklorid	SMCC: 4-[<i>N</i> -maleimidometil]ciklohexán-1-karboxilát
EEDQ: <i>N</i> -etoxikarbonil-2-etoxi-1,2-dihidrokinolin	TAMRA: 5-karboxitetrametilrodamin-azid
EGFR: epidermális növekedési faktor receptor	TCEP: <i>trisz</i> -(2-karboxietil)-foszfin
FAR: fluorofór-antitest arány (fluorophore to antibody ratio)	TEMED: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletán-1,2-diamin
FDA: Élelmiszer- és gyógyszerfelügyelet (U.S. Food and Drug Administration)	TFA: trifluorecetsav
FITC: fluoreszcein-izotiocianát	THF: tetrahidrofurán
Fmoc: 9-fluorenil-metoxi-karbonil csoport	THPTA: <i>trisz</i> -[(3-hidroxi-propil-triazolil)-metil]amin
GSH: glutation	Δ: forralás

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. Az antitestek	9
2.1.1. A trasztuzumab	10
2.2. Az antitest-gyógyszer konjugátumok (ADC-k).....	11
2.3. Az antitestmódosítás.....	13
2.3.1. Helyszelektív és nem helyszelektív módszerek.....	13
2.3.2. A redukálószeresek	16
2.3.3. A rekonjugálószeresek	17
2.3.3.1. Trisz-brómmetilén származékok	17
2.3.3.2. Divinilpirimidinek (DVP)	18
2.3.3.3. Diviniltriazinok (DVT)	20
2.3.3.4. Bisz-(vinilszulfonil)-piperazin (BVP) származékok.....	22
2.3.3.5. Újgenerációs maleimidek (NGM).....	24
2.3.3.6. Dibrómpiridazindionok (DBPD).....	29
2.4. Lehetőségek új rekonjugálószer fejlesztésére.....	32
3. Célkitűzés	33
4.1. Közvetlen előzmények	35
4.2. A rekonjugálószeresek előállítása.....	36
4.3. 3,5-Dibrom- <i>N</i> -but-3-in-1-il-pirazin-1-ium-triflát (82 , BuPi) tiol-reaktivitás és stabilitás vizsgálata	39
4.4. Trasztuzumab próbarekonjugációja 3,5-dibrom- <i>N</i> -but-3-in-1-il-pirazin-1-ium-trifláttal (82).....	41
4.5. Moláris abszorpciós koeficiensek meghatározása.....	42
4.6. Rekonjugáció optimalizálása	44
4.6.1. Hőmérséklet optimalizálása	44
4.6.2. Rekonjugálószer feleslegének optimalizálása.....	47
4.6.3. pH érték optimalizálása.....	49
4.7. Szelektivitásvizsgálat.....	50
4.8. A konjugátum GSH stabilitása	52
4.9. Terminális azid-alkin [3+2] cikloaddíció	53
4.10. Áramlási citometria (FACS) és mikroszkópos felvételek	56
5. Kísérleti rész.....	58

5.1. Alkalmazott anyagok, készülékek és vizsgálati módszerek	58
5.1.1. Alkalmazott anyagok	58
5.1.2. Alkalmazott készülékek	58
5.1.3. Alkalmazott vizsgálati módszerek	59
5.1.3.1. SDS-PAGE	59
5.1.3.2. SDS-PAGE denzitometriás kiértékelése	60
5.1.3.3. Moláris abszorpciós koefficiens, DAR és FAR meghatározása	61
5.1.3.4. Áramlási citometria (FACS)	64
5.1.3.5. Konfokális mikroszkópia	64
5.2. Elvégzett szintézisek leírása	65
5.3. Kémiai biológiai rész.....	68
5.3.1. Trasztuzumab oldat készítés	68
5.3.2. Trasztuzumab próbarekonjugációja BuPi-val (82)	69
5.3.3. BuPi (82) rekonjugációk optimalizálása	69
5.3.3.1. Hőmérséklet optimalizálása	69
5.3.3.2. Rekonjugálószer feleslegének optimalizálása	69
5.3.3.3. pH optimalizálása	70
5.3.4. BuPi (82) cisztein szelektivitás vizsgálata	70
5.3.5. T-BuPi GSH stabilitás vizsgálat	70
5.3.6. Azid-alkin cikloaddíciós reakció és rekonjugáció	71
6. Összefoglalás.....	72
7. Irodalomjegyzék.....	74

1. Bevezetés

A mai gyógyszeripar meghatározó elemévé váltak a biologikumok. Ezek a készítmények valamilyen biológiai forrásból (például élő sejtekből vagy mikroorganizmusokból) származó, leggyakrabban fehérje alapú hatóanyagokat tartalmaznak.

A biologikumok széles körben használt termékek, egyaránt alkalmazzák őket a prevenció, a diagnosztika és a gyógyászat területén is. Többek között olyan jelentős betegségek kezelésében nélkülözhetetlenek, mint a daganatos- vagy autoimmun betegségek, diabétesz, szklerózis multiplex.¹

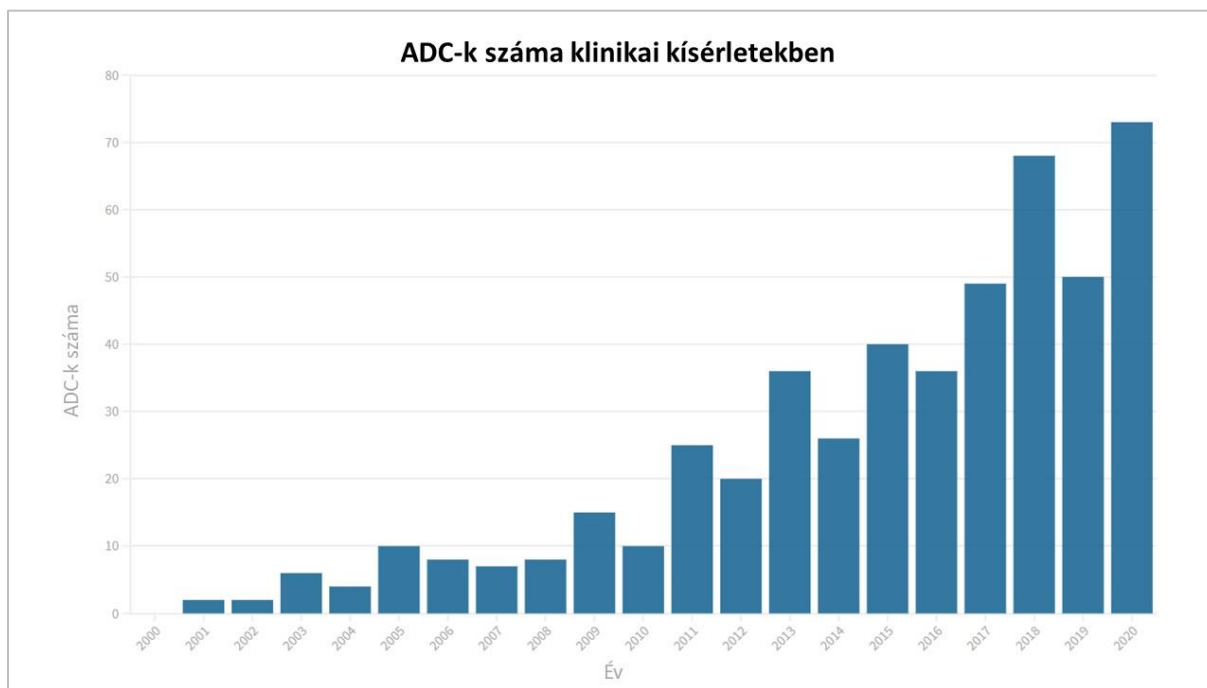
Egy 2021. évi felmérés szerint a 10 leggyakrabban alkalmazott biologikum közül 6 monoklonális antitestet tartalmaz, a többi pedig valamilyen fehérjét vagy enzimet.² Az antitesteket alkalmazhatják önmagukban terápiás célra (pl. Herceptin), de gyakran kismolekulás hatóanyagot is kapcsolnak hozzá (pl. Kadcyła), amelyet antitest–gyógyszer konjugátumnak, röviden ADC-nek neveznek (antibody-drug conjugate) (1. ábra).³



1. ábra: A Kadcyła és a Herceptin készítmények^{4,5}

Mind az alap kutatásban (pl. akadémiai, egyetemi szféra), mind a fejlesztésben és gyártásban szereplők (pl. az AstraZeneca és a Daiichi Sankyo gyógyszergyárak) szerint az onkológia területén a jövőben az ADC-knek kulcsfontosságú szerepe lesz.⁶ Mivel rendkívül ígéretes tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek például a jelenleg használt hagyományos kemoterápia mellékhatásait kiküszöbölhetik, emiatt jelentős bevételi forrásokká váltak a gyógyszeriparban. Felhasználásuk növekvő mértékét bizonyítja, hogy egyre több ADC-t vonnak be klinikai kísérletekbe. A 2000-es évek elejéhez képest közel 37-szeresére növekedett az ilyen célra felhasznált konjugátumok száma (2. ábra). Ennek következtében az amerikai

FDA (U. S. Food and Drug Administration) által engedélyezett ADC-k száma rohamosan növekszik. Ma már több mint 115 gyógyszergyár lépett be az ADC fejlesztők közé (például Pfizer, Boehringer Ingelheim, Merck, Genentech).



2. ábra: ADC-k száma klinikai kísérletekben⁶

Az ADC-k jelentősége az antitestek célpontja (antigén) felé mutatott specifikusságukban rejlik. Ezt felhasználva ugyanis szelektíven juttatnak olyan ható- és/vagy jelölőanyagokat a célzott sejtekhez, amelyeket hagyományos gyógyszerekkel kockázatos lenne kezelni, hiszen a szelektivitás hiánya miatt az egészséges sejtekre is ugyanolyan hatást fejtenének ki, mint a betegekre.⁷

Az ADC-k fontos eleme az antitestet és a hatóanyagot összekötő atomcsoport, a linker. Ennek fő feladata az antitest és a megfelelő gyógyszer stabil kapcsolatának biztosítása. Az antitestmódosítás megvalósítása és a megfelelő linker kiválasztása különösen nagy kihívást jelent, hiszen a konjugátumnak rendkívül stabilnak kell lennie a keringésben, viszont a célsejt képes kell legyen internalizáció után lebontani, hogy felszabadulhasson a hatóanyag.

Az elmúlt 10 évben nagy volumenű fejlődésen mentek keresztül a linkerek. Ennek eredményeként ismeretesek a hasítható linkerek, amik pl. valamilyen proteáz, GSH, enzim vagy pH-változás hatására leadják a hatóanyagot. Ezek általában bonyolult felépítésű molekulák. Emellett vannak nem hasítható linkerek is, amelyek egyszerűbb konstrukciók, továbbá nem hasadnak le a célhelyen sem. Ebben az esetben az endoszomális vagy lizoszomális lebontás során szabadul fel a hatóanyag a sejten belül.⁸

A nem hasítható linkerek többnyire alkil- vagy polietilén-glikol láncokat tartalmaznak, előnyük a hasíthatókkal szemben, hogy legtöbb esetben könnyebb őket előállítani, így a költséghatékonyságuk is jobb. Ugyanakkor figyelembe véve a krónikus és legtöbb esetben halálos betegségek elleni küzdelemben fektetett erőforrásokat, a biológiai hatékonyság felülírhatja ezt a szempontot.

Az ADC-hez nemcsak hatóanyag molekulát kapcsolhatnak, a diagnosztikai célra használt konjugátumokban gyakran alkalmaznak antitesthez kötött fluoreszcens festékeket, fluorofórokat. Ezekben az esetekben az antitestek szelektivitását úgy használják ki, hogy a célsejteket mikroszkópos vizsgálatok során is fel tudják ismerni a festéknek köszönhetően.

Az antitestmódosításra számos technika található a szakirodalomban, többek között helyspecifikus módszerek, amelyek akár natív, akár szintetikusán módosított antitesteken is alkalmazhatóak.⁹ A natív antitestek módosítása például a linkerek egy csoportjába tartozó rekonjugálószerrel megoldható a diszulfidhidak redukciójával és újrakötésével, azonban az eddig a szakirodalomban leírt rekonjugálószer többnyire bonyolult, soklépéses és költséges szintézisekben állíthatók elő.

Kutatócsoportunkban régóta foglalkoznak fehérjék kovalens módosítására alkalmas vegyületek fejlesztésével, így például heterociklusos fragmensekkel, amelyekben a heterociklus elektronszívó hatásának köszönhetően aktiválhatók elektrofil funkciós csoportok.^{10,11} A korábbi tapasztalatokat, továbbá Matos és kollégái 2019-ben publikált munkáját felhasználva költséghatékony és egyszerű szintézissel terveztünk előállítani egy új antitest rekonjugálószer.¹²

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az antitestek

Az antitestek vagy más néven immunglobulinok az immunrendszer által idegen anyagok felismerésére termelt fehérjék. Ezek az idegen anyagok, az antigének, sokfélék lehetnek, például vírusok, baktériumok, toxinok, de akár egyes endogén sejtfelszíni fehérjék vagy szénhidrátok. Az antitestek célja, hogy felismerjék ezeket az antigéneket, és magukat hozzájuk rögzítve olyan folyamatokat indítsanak el, amely eredményeképpen az antigének eliminálódnak.¹³

Az antitesteket speciális fehérvérsejtek termelik: a B-limfociták vagy B-sejtek. Az antigén először a B-sejthez kötődik, ennek hatására a B-sejt antitesteket választ ki a véráramba és a nyirokrendszerbe, ahol azok több hónap után is megtalálhatóak, így a később szervezetbe jutó antigént is képesek felismerni. A B-sejt antigénkötő helye szelektív az antigénre, azaz egy ilyen receptor egyféle antigént ismer fel és így specifikus antitestek termelődnek, amelyek jelzik a szervezet számára az adott antigén jelenlétét.

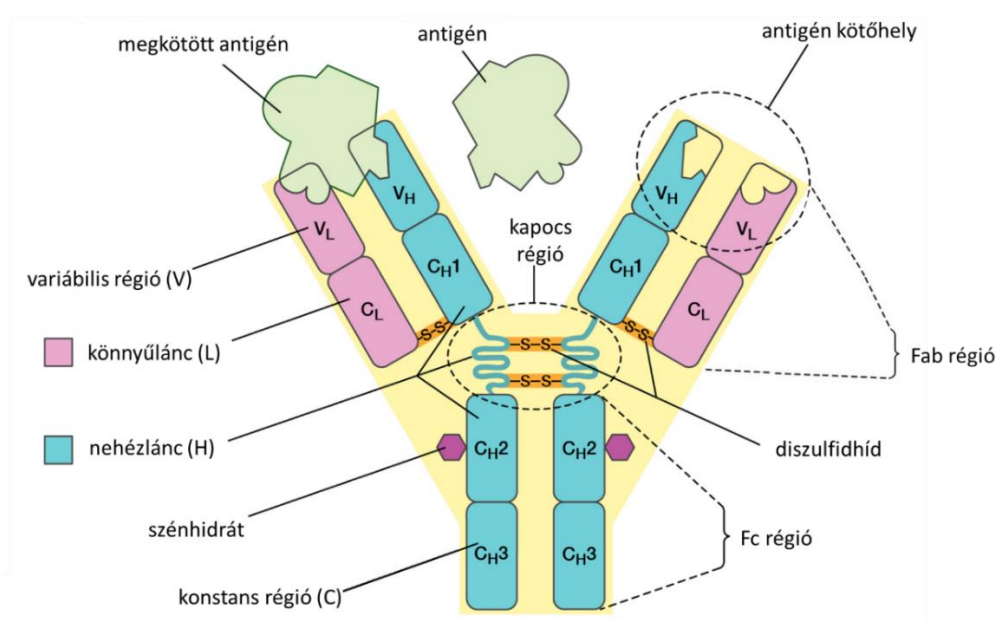
Az antigén semlegesítése vagy eltávolítása többféle mechanizmus szerint történhet. Egyrészt lehetséges, hogy az antigén megkötődése az antitesten olyan mértékben megváltoztatja annak szerkezetét, hogy káros biológiai funkciója megszűnik. Másrészt, ha az idegen elem egy mikroorganizmus, akkor az antitest mozgásképtelenné teheti vagy megakadályozhatja a sejtekbe való behatolását. További lehetőség, hogy az antitest oldhatatlan komplexet képez az antigénnel, amit a falósejtek eltávolítanak.

Az antitestek a daganatos sejtek halálát többféle módon okozhatják. Egyes esetekben elpusztítják a sejtmembránt, gátolják a sejtnövekedést, önpusztító mechanizmust váltanak ki vagy a tumort tápláló erek sokszorozódását akadályozzák meg. Ismertek olyan antitestek is, amelyek az immunrendszer inhibitorait blokkolják vagy a rákos sejtet és a megfelelő immunsejtet összekötik a gyors és hatékony immunválasz érdekében.¹⁴

Az antitest alapstruktúrája (3. ábra) két pár polipeptid láncból áll, amelyek Y alakot alkotnak. Az antitestek dimerekké, trimerekké és polimerekké is összekapcsolódhatnak diszulfid kötésekkel. Minden monomer formát két nehézlánc és két könnyűlánc alkot, a láncok diszulfid hidakkal kapcsolódnak össze. A nehézláncnak van egy konstans régiója, amely állandó minden azonos osztályba tartozó antitest esetén. Ennek alapján öt osztályt különböztetünk meg: IgG, IgA, IgM, IgD, és IgE. A nehézláncnak emellett variábilis régiója is van, ami az antitestek diverzitásáért felelős. Az említett láncokat tovább oszthatjuk az őket

felépítő doménekre. A nehézlánc konstans régióját három vagy négy domén alkotja, a variábilis régiót pedig egy. A könnyűlánc konstans- és variábilis régiója is egy-egy doménből áll. A domének hozzávetőlegesen 100-200 aminosavból állnak.

Az antitestek funkciója általában az antigén megkötése és információ-továbbítás az immunrendszer felé. Szerkezetüket két fő részre bonthatjuk, amelyek a Fab és Fc régiók vagy fragmensek. Ezeket a régiókat a kapocsrégió köti össze. A Fab (antigen-binding fragment) az antigén kötő fragmens, amely felismeri az antigént és megkötözi azt. A Fab helyileg az Y alakú antitest két azonos „ága”. Az Fc (crystallizable fragment) alakítja ki a kölcsönhatást az immunrendszer más elemeivel. Az Fc az Y „szárának” feleltethető meg.¹⁵



3. ábra: Az antitest alapszerkezete¹⁶

2.1.1. A trasztuzumab

A trasztuzumab egy monoklonális antitest, a Herceptin márkanevű készítmény hatóanyaga, amelyet jelenleg az emlő- és a gyomor Her2 pozitív (Her2+) rosszindulatú daganatának kezelésére használnak.^{17,18,19} A gyógyszert korai stádiumú emlődaganat esetén műtétet, kemoterápiát vagy sugárkezelést követően alkalmazzák. Az így kezelt betegek 8%-ánál újult ki a betegség egy év alatt szemben a gyógyszerrel nem kezelték 13%-ával. A hároméves túlélés pedig akár 12%-kal javult az alkalmazott kemoterápiától függően. Áttétes emlő-és gyomordaganat estében más gyógyszerekkel kombinációban használják. A hároméves túlélés a Herceptint kapó páciensek esetén 65%, míg a készítmény nélkül ez az arány csak 52%.

Ezekben az esetekben tehát bizonyítottan javítja az általános túlélést, illetve csökkenti a kiújulás és az elhalálozás arányát.

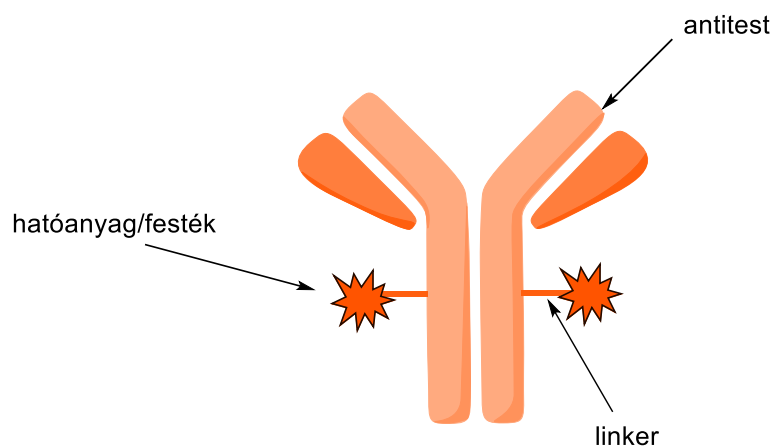
A Herceptin csak olyan esetekben alkalmazható, amikor a daganat fokozott Her2 expressziót mutat. Ez azt jelenti, hogy a tumorsejtek felszínén sok Her2-fehérje (antigén) termelődik, aminek hatására a tumorsejtek gyorsabban növekednek. Ez a jelenség az emlődaganatok körülbelül egynegyedénél és a gyomordaganatok egyötödénél figyelhető meg.

Hatásmechanizmusát tekintve miután a trastuzumab a Her2-fehérjéhez kötődött, aktivál bizonyos immunsejteket, amelyek ezt követően elpusztítják a tumorsejteket. A trastuzumab megakadályozza továbbá, hogy a Her2-fehérje a tumorsejtek növekedését kiváltó vegyületeket bocsásson ki.

A trastuzumab antitestet nemcsak önmagában, hanem ADC-ként is alkalmazzák. Ilyen ADC a Kadcyla® (trastuzumab emtansine) márkanévre hallgató készítmény, amelyben a kemoterápiás gyógyszer mertanzin a 4-(N-maleimidometil)-ciklohexán-1-karboxilát (SMCC) linkeren keresztül kapcsolódik az antitesthez.

2.2 Az antitest-gyógyszer konjugátumok (ADC-k)

Az ADC-k monoklonális antitestből, linkerből és hatóanyagból (vagy diagnosztikai célú alkalmazás esetén festékből: antitest-festék konjugátum, a továbbiakban az egyszerűség kedvéért az ADC rövidítés alá kerül) készülnek (4. ábra).²⁰



4. ábra: Egy ADC általános felépítése

Az ADC összetevői együtt szinergikus hatást eredményeznek. Az antitestnek szükségszerűen erős szelektivitással kell rendelkeznie a célhely felé, tehát nagyon korlátozottan vagy egyáltalán nem kötődhet az egészséges sejtekhez. A hatóanyagnak, amely általában egy citotoxikus gyógyszer, a tumorsejtet el kell pusztítania. A linkernek pedig a keringésben

stabilan kell kötnie a hatóanyagot, majd a célsejtben az emésztésnek a hatóanyag felszabadulását kell eredményeznie.

A cél a citotoxikus molekulák szelektív eljuttatása a tumorsejtekig az egészséges sejtek kitétségének minimálisra csökkentésével. Ezzel a módszerrel a hagyományos kemoterápia során észlelt mellékhatások drámaian csökkenthetők. Ez a szelektivitás azt eredményezi, hogy a tumorsejteket a citotoxikus molekulák kis mennyisége is elpusztíthatja ADC használata mellett.

Jelenleg 11 FDA által jóváhagyott ADC-t alkalmaznak (1. táblázat), amelyek döntő többségében nem helyszelektív stratégiával kötik össze a hatóanyagot az antitest ciszteineivel vagy lizineivel. Az igényt ezekre a különleges biologikumokra az is mutatja, hogy körülbelül 18 ADC az engedélyeztetés utolsó fázisaiban jár. Ebből is látszik, hogy a következő években a terápiás antitestek az egyik leggyorsabban növekvő ágazata lehet a gyógyszeriparnak.

Név	Kereskedelmi név	Kezelt betegség	Engedélyeztetés éve
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Akut myeloid leukémia	2000, 2007
Brentuximab vedotin	Adcetris	Hodgkin-limfóma, szisztémás anaplasztikus nagysejtes limfóma, Cutan T-sejtes limfóma	2011
Trasztuzumab emtanzin	Kadcyla	Her2+ emlődaganat	2013
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa	CD22+ B-sejt prekursor akut limfoblasztos leukémia	2017
Moxetumomab pazudotox	Lumoxiti	Hajas sejt leukémia	2018
Polatuzumab vedotin	Polivy	Diffúz nagy B-sejtes limfóma	2019
Enfortumab vedotin	Padcev	Előrehaladott vagy áttétes urotheliális daganat	2019
Trasztuzumab deruxtekán	Enhertu	Áttétes Her2+ emlődaganat	2019
Sacituzumab govitekán	Trodelvy	Áttétes tripla-negatív emlődaganat	2020
Belantamab mafodotin	Blenrep	Mielóma multiplex, diffúz nagy B-sejtes limfóma	2020
Cetuximab sarotalokán	Akalux	EGFR-t expresszáló fej- és nyaktáji daganatok	2020

1. táblázat: Jelenleg az FDA hatóság által engedélyezett ADC-k²¹

2.3. Az antitestmódosítás

2.3.1. Helyszelektív és nem helyszelektív módszerek

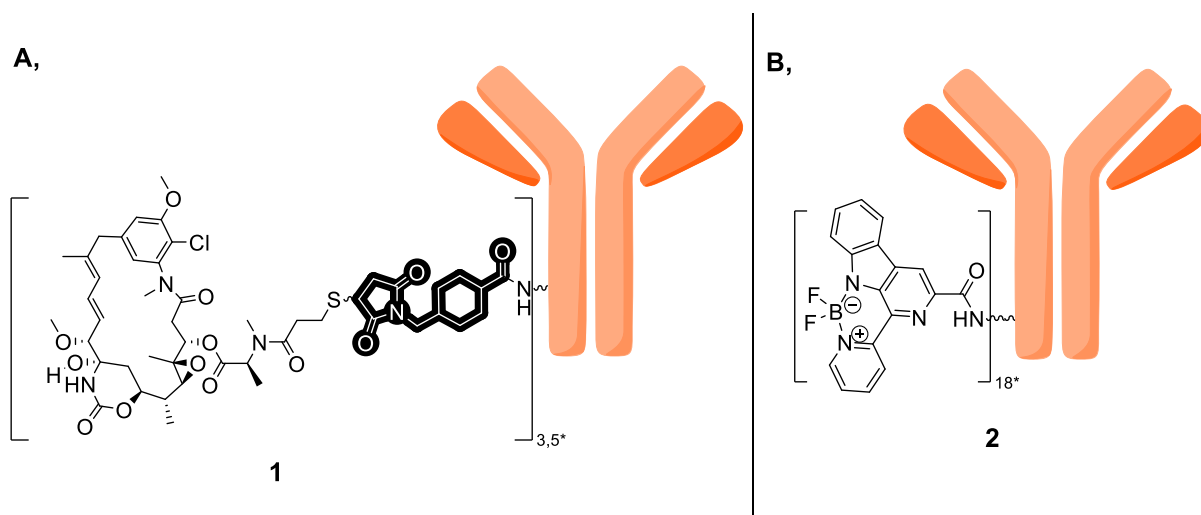
A nem helyszelektív antitestmódosítás során leggyakrabban lizin és esetenként cisztein aminosavak reaktivitását használják ki, ritkábban *N*-terminális szerint és treonint is céloznak elektrofil reagensekkel. Az eljárás úgy történik, hogy az antitesten természetesen megtalálható, vagy mesterségesen létrehozott nukleofil kötőhelyhez különböző módszerekkel hozzákapcsolják a linkert és a hatóanyagot, vagy egy lépésben a linker-hatóanyag konjugátumot.^{4,9}

A konjugálás minősítésére gyakran használt mennyiség a hatóanyag- és a fluorofór-antitest arány (drug to antibody ratio - DAR és fluorophore to antibody ratio - FAR), amely azt fejezi ki, hogy egy antitesthez hány hatóanyag vagy festék molekula kapcsolódik. (Továbbiakban az antitest-rekonjugálószer konjugátumok is DAR értékkel kerülnek jellemzésre, ugyanis ezt a szakirodalomban használják ilyen értelemben is.) Ezek a számok meghatározó jellemzői az ADC-nek és összefüggésben vannak a homogenitással. Ha egy készítményen belül az egyes antitestekhez különböző számú kismolekula kapcsolódik, akkor beszélünk heterogén termékről. Ha minden antitesthez azonos számú hatóanyag kapcsolódik, akkor pedig homogén a termék. A homogenitás változó mértéke miatt a készítményre jellemző DAR sokszor nem egész szám, és akár egy tartomány is megadható.

Kísérletek során igazolták, hogy a DAR optimális értéke a legtöbb ADC-ben négy. Ennél alacsonyabb DAR érték csökkenti az ADC hatásosságát, magasabb pedig aggregációt idézhet elő, növelheti a toxicitást és csökkentheti a stabilitást. Az optimális DAR alkalmazásával elérhető a citotoxicitás és a farmakokinetikus stabilitás közötti egyensúly.

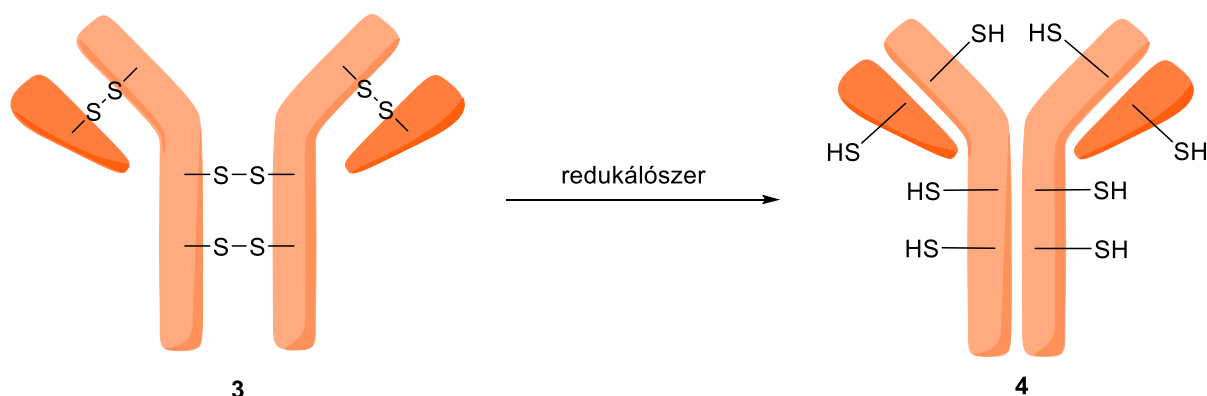
Számos helyszelektív konjugációs technikára találunk példát a szakirodalomban, amivel elkerülhetőek a heterogén termékek és DAR = 2-4 értéket biztosítanak. Ilyen például a Thiomab stratégia, amelynél reaktív ciszteineket építenek be az antitest Fab régiójának konstans doménjeire. További lehetőség, hogy nem természetes aminosavakat alakítanak ki az antitest felületén, ezzel létrehozva a helyszelektív reaktív csoportot (legtöbbször klikk-reakcióra alkalmassá téve az antitestet). Ezek azonban mind költséges és bonyolult eljárások egy vegyész szemszögéből. Az egyik leggyakoribb és jelentősen olcsóbb eljárás, ha az antitestek láncközi diszulfidhidjait redukálják, amellyel így 8 reaktív tiolcsoport keletkezik, amelyek közvetlenül is módosíthatók, vagy rekonjugálás esetén négy reaktív (általában klikkelhető) csoporttal szerelhetők fel.

Egy általános IgG1 (immunglobulin G1) antitest felületén körülbelül 80 lizin található. Jelölésükre például különböző *N*-hidroxi-szukcinimid (NHS)-észter származékokat használnak, ilyen a szukcinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciklohexán-1-karboxilát (SMCC), amit többek között a Kadcyła márkanevű készítményben alkalmaznak (5.a ábra) Festékmolekulákat is konjugálnak hasonló módszerrel antitest-fluorofór konjugátumok előállítására érdekében (5.b ábra).²² Becslések szerint egy ilyen hagyományos antitestmódosítási stratégiával a változatos lizinszmódosításoknak köszönhetően akár 10^6 féle speciesz is keletkezhet. Ez kerülendő, ugyanis így heterogén terméket kapunk, nem lesz egységes és megfelelő a DAR, ami kiszámíthatatlan farmakokinetikai- és a terápiás hatáshoz vezethet, egyszerűsége miatt azonban manapság is alkalmazzák.



5. ábra: (a) SMCC kötőelem a Kadcyła nevű készítményben (fekete színnel jelölve), (b) Kutatócsoportunkban korábban előállított antitest-fluorofór konjugátum. *Átlagérték

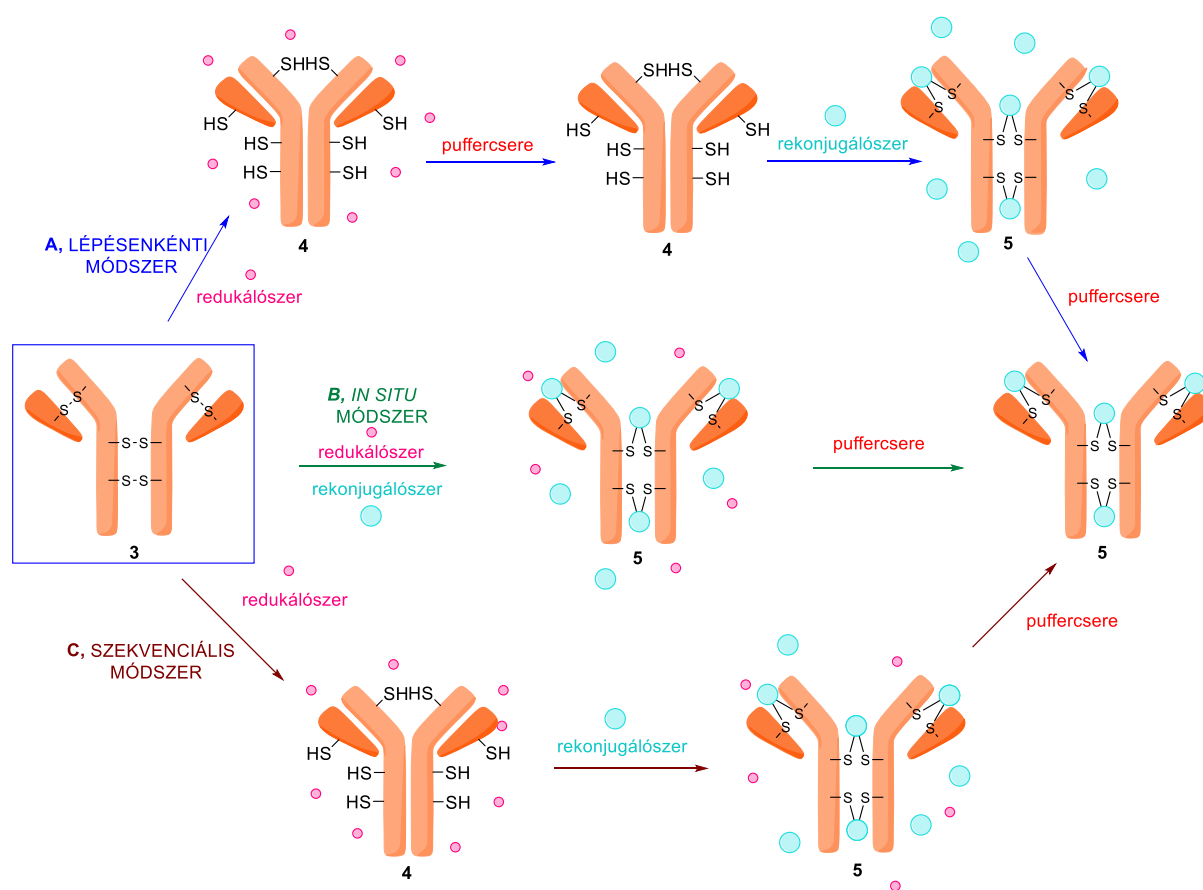
A fentiekben leírtak miatt előnyösebb kihasználni a ciszteinek reaktivitását, mert a natív antitestek nem tartalmaznak aktív ciszteineket a felületükön, ezeket a diszulfidhidak redukciójával lehet kialakítani. Egy általános IgG1 antitestben négy láncközi diszulfidhíd található, tehát a redukció után nyolc szabad tiolsoport válik hozzáférhetővé (6. ábra). Az így keletkezett antitestek hátránya, hogy a diszulfidhidak megszűnésével csökken a stabilitás és ez hozzájárulhat a heterogenitás növekedéséhez.



6. ábra: Diszulfidhidak redukciója

Egy rendkívül ígéretes helyszelektív stratégia a $\text{DAR} = 4$ eléréséhez, hogy olyan reagenseket alkalmaznak, amik újra összekapcsolják a diszulfidhidak két ciszteinjét. Ezeket a reagenseket rekonjugálószernek nevezzük.

A redukciós és a rekonjugációs lépések sorrendje szempontjából három különböző stratégiát használnak (7. ábra). A lépésenkénti (stepwise) módszer (7. ábra, A) esetében az első lépés a redukció, ezt követően puffercsere segítségével a redukálószer eltávolítják a rendszerből, majd hozzáadják a rekonjugálószer. Az újrakötés végén még egy puffercsere szükséges a termék tisztításához. A puffercsere során az antitest oldatokból membránszűrővel centrifugálva szűrik ki a redukáló- és/vagy a rekonjugálószer. Ilyenkor legtöbb esetben csökken az antitest mennyisége is, gyakori a kicsapódás, megkötődés a membrán/szűrő/gyanta felületén. A lépésenkénti módszer előnye mégis, hogy a redukálószer és a rekonjugálószer nem reagál egymással, de hátránya tehát a több lépés, több tisztítási folyamat során veszítünk az antitestből. A szekvenciális módszernél (7. ábra, C) ugyanez a lépések sorrendje, csak a redukálószer nem távolítják el. Hátránya, hogy az elreagálatlan redukálószer a rekonjugálószerrel reakcióba léphet, tehát olyan vegyületeket érdemes alkalmazni, ahol ez a mellékreakció kiküszöbölhető. A harmadik eljárás mód az *in situ* módszer (7. ábra, B), amelynél egyszerre kerül a rendszerbe a rekonjugálószer és a redukálószer. Ez a leggyorsabb módszer, viszont ennél a legvalószínűbbek a mellékreakciók.²³ Az utóbbi két esetben csak a folyamat legvégén szükséges a konjugátum elválasztása a kismolekuláktól, így az antitest mennyisége és így a várt hozam nem csökken olyan mértékben, mint két tisztítási lépés esetén.



7. ábra: Antitestmódosítás módszerei, (a) Lépésenkénti módszer, (b) In situ módszer, (c) Szekvenciális módszer

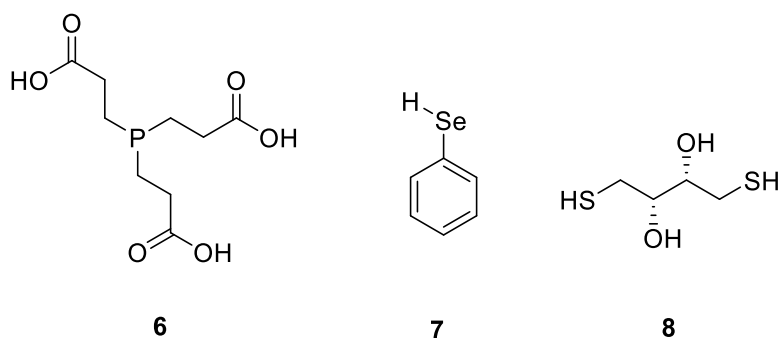
2.3.2. A redukálószer

Az antitestek diszulfid-hídjainak redukálására manapság leggyakrabban használt vegyület a trisz-(2-karboxietil)-foszfin (TCEP, **6**) (8. ábra), de használható még a benzoszelenol (PhSeH, **7**), és a ditiotreitól (DTT, **8**) is.^{24,25}

A benzoszelenol (**7**) előnytelen tulajdonsága, hogy könnyen oxidálódik, nem oldódik vízben, illetve gyakran lép reakcióba az alkalmazott linkerrel. A DTT (**8**) savas közegben nem használható, könnyen oxidálódik, nem stabil, ezért manapság alkalmazása szintén háttérbe szorult. UV/Vis spektroszkópiai méréseknél elnyelése gyakran egybeesik az antitest elnyelésével, amely lehetetlenné teszi a DAR meghatározását.²⁶

A TCEP (**6**) más redukálószerhez képest stabilabb, gyorsabb redukciót eredményez és az antitesten más funkciós csoporttal nem lép reakcióba, illetve alacsonyabb pH-tartományban is hatékony. További előnye, hogy a legtöbb rekonjugálószerrel szemben inert.

A TCEP (**6**) a Trasztuzumab antitestben csak a láncközi diszulfidhidakat redukálja, a többi diszulfidhíddal szemben inert.²⁷



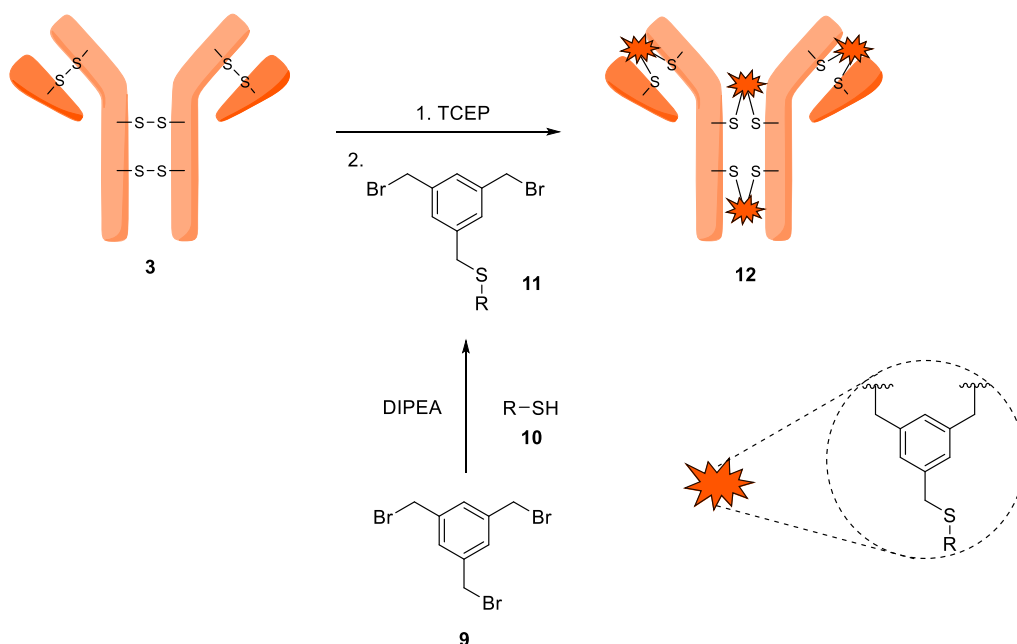
7. ábra: Gyakori redukálószer

2.3.3. A rekonjugálószer

2.3.3.1. Trisz-brómmetilén származékok

A trisz-brómmetilén származékokat korábban sikeresen alkalmazták fehérjék és karbonsav származékok linkereként. Mivel az eredmények biztatóak voltak, felmerült az antitestek rekonjugálásának lehetősége.²⁸

Ramos-Tomillero és munkatársai először **9** tiolszármazékait (**11**) alakították ki, majd a kétfogú **11** alkalmazásával kétféle antitestet módosítottak (9. ábra).²⁹ A **10** tiolban az R csoport lehet fenil-, benzil-, cisztein-, kumarin- és fluoreszcein-származék.



9. ábra: Rekonjugálás metilén származékokkal

A rekonjugációs lépést redukált oxitocinon és két terápiás antitesten vizsgálták. A redukált oxitocint nátrium-hidrogén-karbonát pufferben (pH = 8) szobahőmérsékleten 15 percig inkubálták a rekonjugálószerrel. Az antitesteket először TCEP alkalmazásával redukálták, majd hozzáadták a **11** bisz-brómmetilén származékot. A reakcióhoz BBS puffert használtak, a redukció 2 óra alatt ment végbe szobahőmérsékleten, a rekonjugáció pedig 30 perc alatt 4 °C-on.

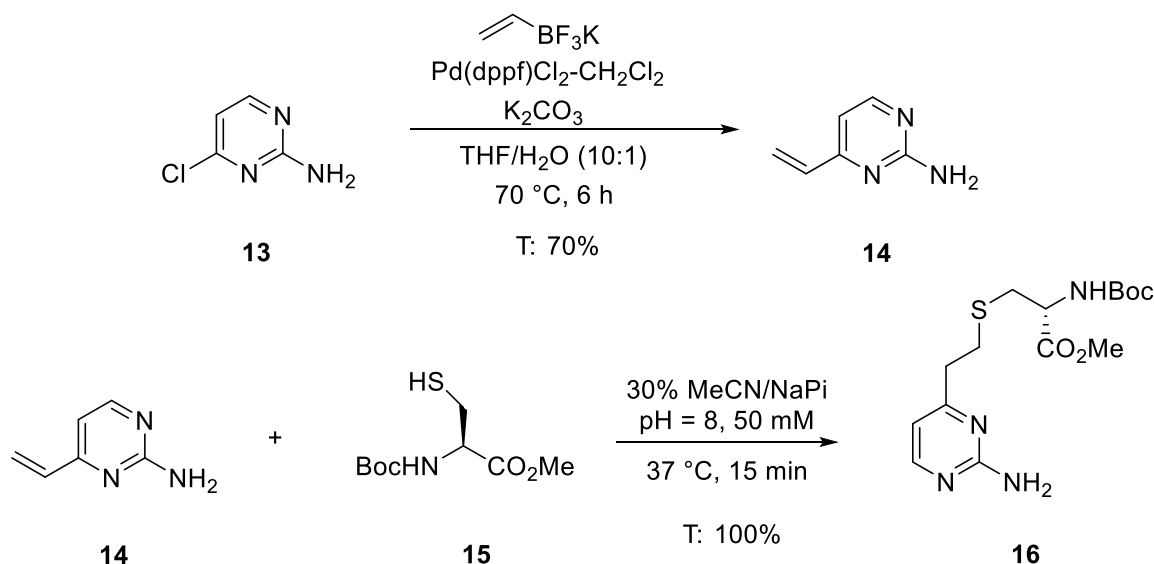
A keletkezett konjugátumok összetételét és homogenitását nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) alapján állapították meg, amely molekulatömeg szerint választja el a komponenseket. Mivel a rekonjugálószernek kicsi a tömege (néhány száz g/mol) az antitesthez (~150 kDa) képest, ezért ezzel az analitikai módszerrel nem lehetett megkülönböztetni a natív és a rekonjugált antitestet. Egy másik analitikai módszert alkalmazva, tömegspektrometriás vizsgálattal (MS) jellemezték a reakció sikerességét, ami az elvárásoknak megfelelő homogenitású és összetételű terméket eredményezett.

A konjugátumok analitikai jellemzése után meg kellett bizonyosodni arról, hogy az antitest eredeti biológiai funkciója és hatékonysága nem változott. A biológiai vizsgálatok során kiderült, hogy a konjugátumok affinitása a megfelelő epitópok felé kismértékben csökkent.

2.3.3.2. Divinilpirimidinek (DVP)

Antitestek kovalens rekonjugálására korábban monovinilpiridin származékokat használtak, de a reakciósebesség növelése érdekében ezeket továbbfejlesztve, Walsh és munkatársai a két nitrogénatomot tartalmazó monovinilpirimidinekhez (MVP) és divinilpirimidinekhez (DVP) jutottak.³⁰ A heteroatomok nagyobb száma elektronszívó hatásuknak köszönhetően ugyanis növeli a vinilcsoport elektrofilitását, így a rekonjugálószer reaktivitását.

Ennek igazolására előállították **14** MVP származékot 2-amino-4-klórpirimidin (**13**) és kálium-trifluoroborát palládium katalizált reakciójában, majd ezt **15** cisztein származék reakciójában teljes konverziót értek el (10. ábra). A szintézis hátránya, hogy a Pd tartalmú katalizátor drága, mérgező, illetve a reakcióelegyből gyakran nehéz maradéktalanul eltávolítani.

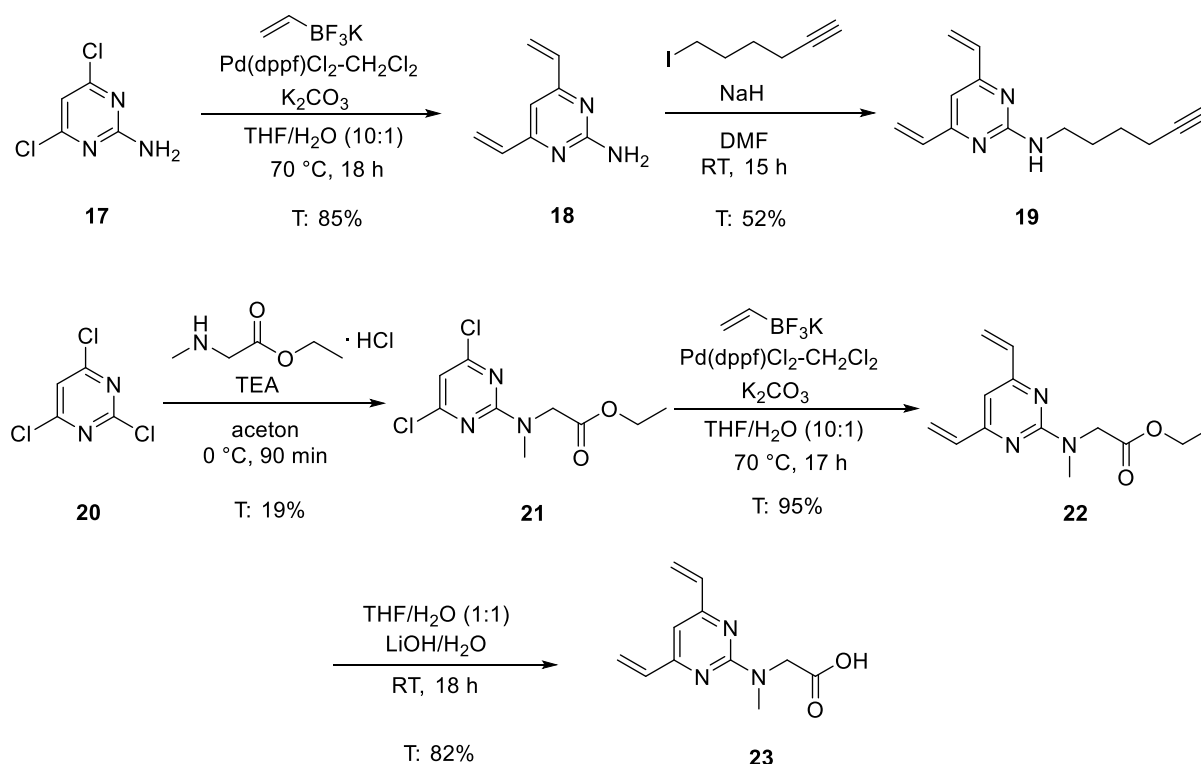


10. ábra: **14** MVP- és **16** Cys származék előállítása

A cisztein szelektivitás igazolására **14** MVP származékot lizinnel és ciszteinnel is reagáltatták egyszerre, amely reakció során csak a cisztein reagált, a lizin változatlanul maradt a reakcióelegyben. TCEP jelenlétében is vizsgálták a molekulát, ennek során az MVP nem mutatott aktivitást a TCEP felé, ebből arra következtettek, hogy vélhetően meg fogja őrizni stabilitását a rekonjugáció során. Ezt követően GSH jelenlétében végeztek stabilitás vizsgálatot. Az MVP addukt két héten keresztül stabil maradt. Mivel az eredmények ígéretesek voltak, ezért DVP származékokat is előállítottak többlépéses szintézisekkel antitestek rekonjugálása céljából (11. ábra).

Az előállított DVP származékokkal ugyanúgy, ahogy az MVP-k esetében kemoselektivitás és stabilitás vizsgálatokat végeztek, amelyeken igazolódott a ciszteinek felé mutatott szelektivitás és a konjugátumok stabilitása. A biológiai tesztelést először egy rekombináns bakteriális fehérjén (*PfRadA-dCys*) végezték el, amihez a diszulfidhíd redukálását követően hozzáadták a **19** rekonjugálószeret. A reakció >95% konverziót mutatott 1 óra elteltével.

Ezt követően trasztuzumab antitest redukált Fab fragmensét rekonjugálták 10 ekvivalens **19** DVP származékkal, aminek konverziója HPLC-MS mérés alapján 15 perc alatt >90% volt. Az eredményes rekonjugáció miatt a teljes trasztuzumabot is rekonjugálták **18**, **19** és **23** rekonjugálószerekkel. Optimalizálás után 90-95% konverziót értek el mindhárom esetben. További vizsgálatok alapján a konjugátumok aggregációra való hajlama megegyezett a natív antitestével.



11. ábra: DVP származékok előállítása

Mivel az eddigi eredmények biztatóak voltak, ezért a **19** rekonjugálószerhez doxorubicint (DOX) kapcsoltak rézkatalizált azid-alkin cikloaddícióval, majd ezzel rekonjugálták a trasztuzumabot. Az HPLC-MS igazolta, hogy a reakció megfelelően végbement. Az abszorbancia adatok alapján négyes DAR értéket értek el. A **19** BVP származékot egy fluoreszcens festékkel is kapcsolták azonos módszerrel, majd rekonjugálták az antitestet. A fluorofór-antitest arány (FAR) közel optimális volt (DAR = 3,9).

Végül a szérum stabilitást ellenőrizték GSH tripeptiddel, mely alapján a **19** DVP származék megfelelően stabilnak bizonyult. Továbbá monometil-aurisztatin E (MMAE) citotoxikus hatóanyaggal is kapcsolták a rekonjugálószeret, majd ezzel rekonjugálták az antitestet. A kapott ADC-t Her2 pozitív és negatív sejtvonalakon tesztelték, amely igazolta a Her2+ szelektivitást.

E rekonjugálószer hátránya a szintézisnél említett Pd tartalmú katalizátor használata, amely jelentős környezeti terhelést és magas költségeket jelent.

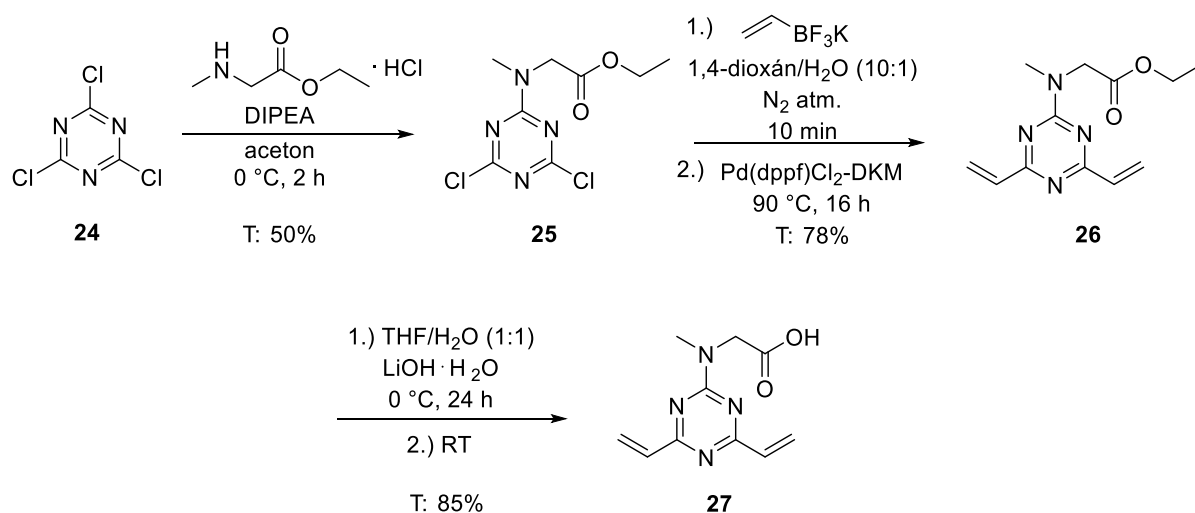
2.3.3.3. Diviniltriazinok (DVT)

A DVT-k fehérjékkel való konjugálása már ismert Robertson és munkatársai eredményeiből,³¹ Counsell és kollégái pedig antitesteket is módosítottak DVT

származékokkal.³² A DVP származékokhoz hasonlóan itt is az volt a cél, hogy a heteroatomok nagyobb száma növelje a vinilcsoport elektrofilitását, így a rekonjugálószer reaktivitását.

Counsell és munkatársai először a **27** rekonjugálószeret állították elő (12. ábra). A szintézis legnagyobb hátránya, hogy Pd(dppf)Cl₂ katalizátor szükséges hozzá, ami mérgező, rendkívül költséges, nehéz eltávolítani a reakcióelegyből. További negatívum, hogy hosszú a reakcióidő. Előnyként említendő, hogy jó termeléssel érhető el a végtermék.

A **27** DVT származékkal 37 °C-on 4 órán keresztül rekonjugáltak trasztuzumab antitestet, amelyet SDS-PAGE és HPLC-MS analitikával követve teljes rekonjugációt és kisebb mértékben félantitestek keletkezését mutatták ki. A félantitestek képződését a nehézlánc tiolecsoportjainak önmagukkal való kapcsolódása okozta.

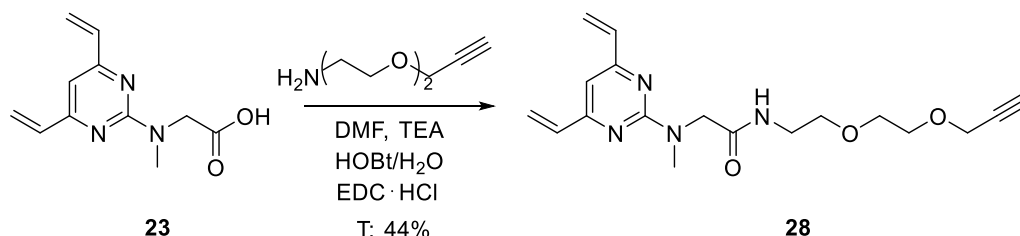


12. ábra: **27** DVT származék előállítása

Ennek elkerülése érdekében optimalizálni kezdték a reakciót. A vizsgált paraméterek a hőmérséklet, a rekonjugálószer feleslegének mennyisége, illetve a reakcióidő voltak. Megállapították, hogy magasabb hőmérsékleten hatékonyabb a rekonjugáció, illetve, hogy 10 mólekivivalens **27** DVT származék elegendő 37 °C-on 1 órás reakcióidővel a kiváló konverzióhoz. Továbbá az is kiderült, hogy ha 1 óránál tovább tart a rekonjugáció, akkor már nem érnek el javulást a termelésben. Ennek oka lehet, hogy a TCEP és származékai valószínűleg akadályozták a teljesen rekonjugált antitest képződését, mert lépésenkénti módszerrel kevesebb félantitest képződött. A továbbiakban megvizsgálták a rekonjugálószer mennyiségének hatását, és azt figyelték meg, hogy a könnyű- és a nehézláncok mennyisége enyhén növekedett, ha kevesebb DVT volt jelen.

Egy másik **28** DVT származékot is előállítottak azzal a céllal, hogy egy láncvégi alkinil funkciós csoport kerüljön a molekulába (13. ábra). Ennek segítségével a rézkatalizált azid-alkin

cikloaddícióval fluoreszcens festékeket tudtak a rekonjugálószerhez kapcsolni. A klikk reakciónak e fajtája azért olyan kedvelt, mert enyhe körülmények között megy végbe nagy hatásfokkal.



13. ábra: **28** DVT származék előállítása

A trasztuzumabot rekonjugálták a **28** vegyülettel, majd kapcsolták az AlexaFluor™ 488 festékkel, amely során a megfelelő konjugátum keletkezett és DAR = 4 értéket értek el. Majd ezzel a konjugátummal stabilitás vizsgálatot végeztek 1 héten keresztül, az eredmények stabil termékek meglétét igazolták.

A rekonjugálószer hátránya a fent leírtak alapján, hogy szintéziséhez Pd tartalmú katalizátor szükséges, illetve jelentős mennyiségben képződnek félantitestek az újrakapcsolás során.

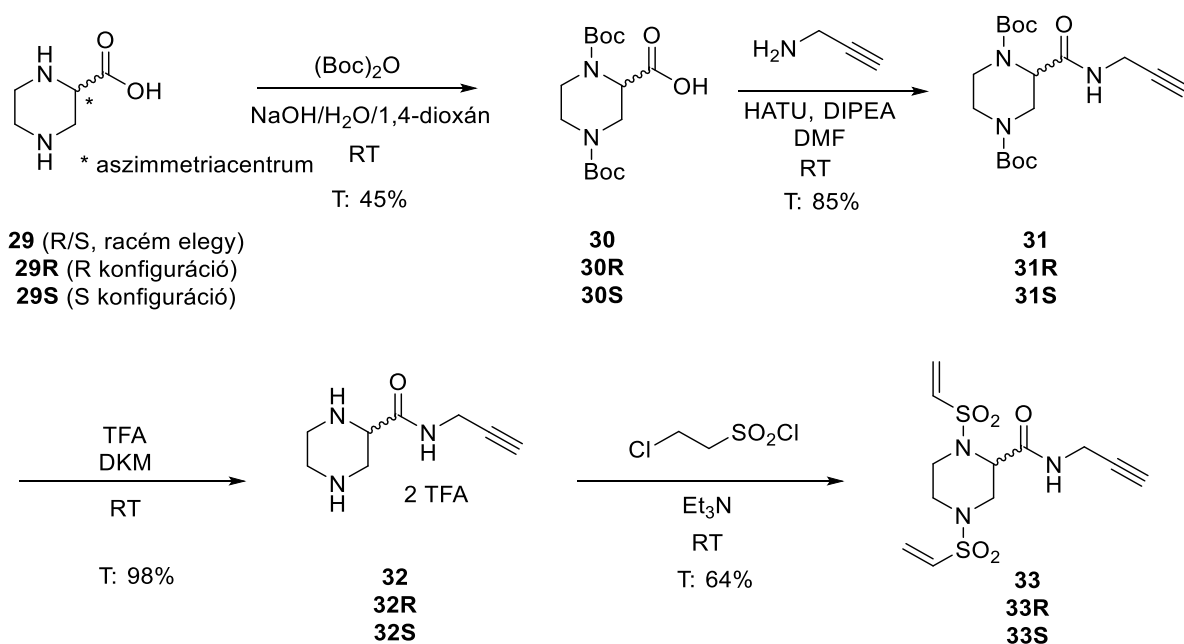
2.3.3.4. Bisz-(vinilszulfonil)-piperazin (BVP) származékok

A bisz-szulfonokat korábban már leírták ADC rekonjugálószerekként.^{33,34} Huang és munkatársai olyan BVP családról számoltak be³⁵, amelyek nem képeznek félantitesteket és DAR = 2-t tudnak biztosítani, így még elfogadható terápiás tulajdonságokkal bírnak. Ezeket a BVP származékokat sikeresen alkalmazták peptidek ciszteinjeinek rekonjugálására.

A félantitestek képződésének legvalószínűbb oka, hogy a Fab és Fc fragmenseket összekötő régióban a diszulfidhidak túl közel vannak egymáshoz. Ezért nagy az esélye, hogy a nehézláncok tioljai önmagukkal kapcsolódjanak össze. A destabilizálás oka lehet az is, hogy míg a natív antitestben a két láncot összekötő híd kétatomos, a BVP származékokkal való rekonjugálás után 8 atomból áll. Ennek elkerülésére olyan stratégiát próbáltak alkalmazni, ami csak a Fab régió rekonjugálását eredményezi.³⁶

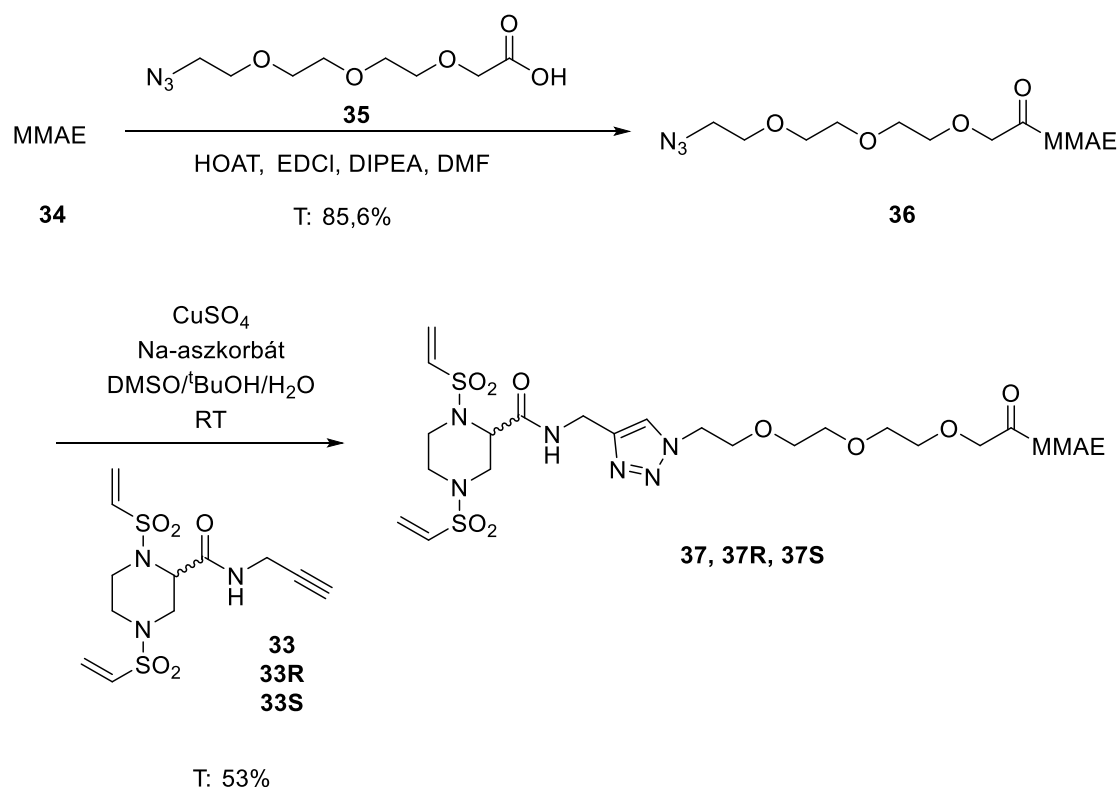
Huang és kollégái előállították **33** BVP származékot (14. ábra), majd cisztein szelektivitás vizsgálatot végeztek rajta oxitocinnal. A fehérjét TCEP-pel redukálták, majd Ellman-reagenssel vizsgálták a szabad tiolcsoportok jelenlétét és számát. Az Ellman-reagens egy diszulfidhidat tartalmazó vegyület, amely szabad tiolcsoport jelenlétében redukálódik tiol

fragmensekre, és megváltozik az abszorbancia spektruma. Így a keletkező fragmensek kvantitatív meghatározása abszorbancia méréssel megvalósítható.



14. ábra: **33**, **33R**, **33S** BVP származék előállítása

Ezután 2 ekvivalens rekonjugálószerzt adtak a redukált antitesthez. Az eredmények szerint **33** BVP származék szelektív és hatékony rekonjugálószernek bizonyult. Annak érdekében, hogy antitest-gyógyszer konjugátum keletkezzen, **33** BVP származékot felszerelték egy távtartó linkerrel és az MMAE hatóanyaggal, így **37** származékot kaptak (15. ábra). A távtartó linker szterikus okok miatt szükséges, mivel az MMAE nagy méretű molekula, ha közel van a rekonjugálószerhez, akkor az a szintén nagy méretű antitesthez nehezebben kapcsolódna, mint némileg távolabb a fehérjétől.



15. ábra: **37**, **37R**, **37S** BVP származékok szintézise

A trasztuzumabot TCEP-pel elvégzett teljes redukciója után **37** BVP származékkal rekonjugálták. HPLC-MS alkalmazásával kimutatták, hogy DAR = 2 értékű ADC-ket kaptak. A **37S** rekonjugálószer esetében teljes volt a konverzió, amíg a **37R** addukttal visszamaradt kis mennyiségű rekonjugálatlan antitest. SDS-PAGE alapján félantitest nem volt kimutatható. Méretkizárásos kromatográfia alapján aggregáció sem történt. A konjugátumokat és a natív trasztuzumabot papain enzimmal emésztették, amely után kétféle Fab fragmentum keletkezett. HPLC-MS mérések szerint a konjugátum és a trasztuzumab Fab közötti tömegkülönbség megfelelt a BVP MMAE tömegének. Fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölve stabilitás vizsgálat után azt is megállapították, hogy 1 hét után is stabil maradt a konjugátum. Her2 pozitív és negatív sejtvonalak közül csak a pozitívok felé mutatott affinitást, tehát a rekonjugálás során megmaradt a megfelelő antigénszelektivitás.

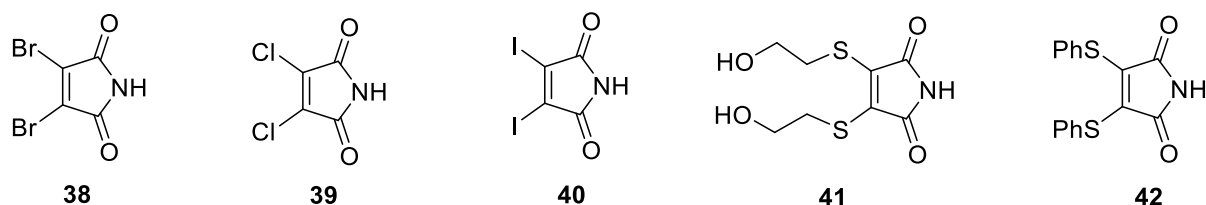
2.3.3.5. Újgenerációs maleimidek (NGM)

A maleimid származékok a leggyakrabban használt rekonjugálószer közé tartoznak. Az NGM-ek elődei, a hagyományos maleimidek valójában nem rekonjugálószer, hanem egyszerű cisztein-reaktív linkerek voltak, amelyek számos hátránnyal bírtak.³⁷ Vizes közegben retro-Michael-addícióval lassan lehasadtak a ciszteinről vagy felnyíltak a maleimid gyűrűk.

Utóbbi ugyan stabilizáló hatású, de sokszor véletlenszerű, nem tervezhető, és nem feltétlenül biztosítható reprodukálhatóan a teljes konverzió. Egyéb tiolcsoportot tartalmazó molekulák jelenlétében keresztreakció is felléphet, amely a hatóanyag idő előtti felszabadulásával jár, tehát csökken a hatékonyság és nő a toxicitás.²⁰

Az NGM-ek a maleimid kettős kötésen további atomokat tartalmaznak, így már nem Michael-addícióval, hanem nukleofil szubsztitúcióval reagálnak, a maleimid gyűrű csak a megfelelő alapváz (biztosítja a kellő távolságot a két szubsztituens között) és a szubsztituensek aktiválásához szükséges szerepét tölti be. A reakció során a fehérje ciszteinjeinek tiolcsoportjai a maleimid 3-as és 4-es pozíciójához kapcsolódnak a kettős kötés telítése nélkül. Ezek a vegyületek helyszelektív konjugációt tesznek lehetővé, ezáltal stabil, homogén termékek keletkeznek jó konverzióval, amelyek megtartják biológiai funkcióikat.

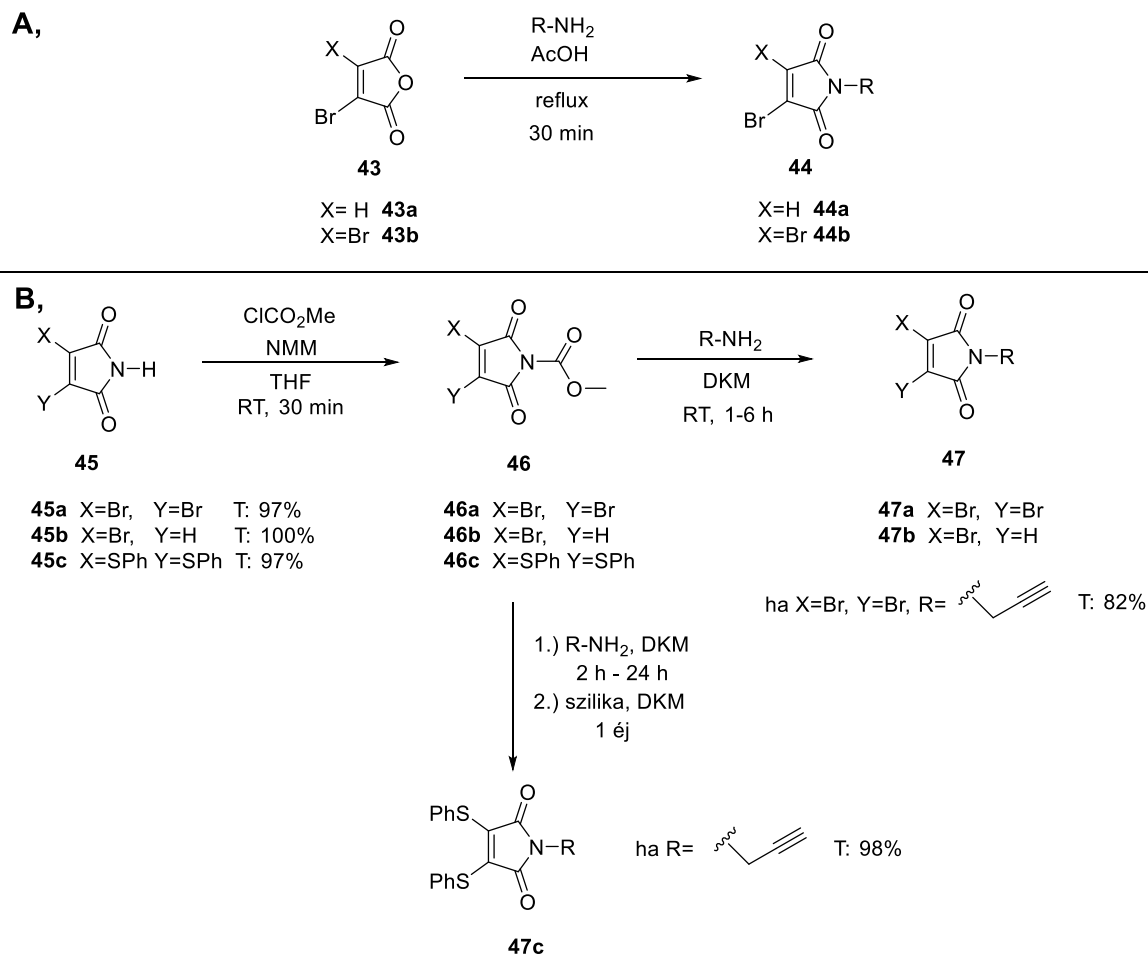
A jó távozó csoportokat Schumacher és munkatársai vizsgálták a 16. ábrán látható NGM-ekkel.³⁸ Szomatosztatint, amely egy diszulfidhidat tartalmaz, TCEP-pel redukálták, majd rekonjugálták ezekkel a vegyületekkel. A **38**, **39** és **40** maleimid származékok hatékony rekonjugációt eredményeztek, eltérő reaktivitási sorrendben (**40**>**38**>**39**). A **41** és **42** NGM származékok esetében a szubsztitúció rendkívül könnyen végbement. A **41** ditioéter megfelelő feleslegének alkalmazásával már 1 óra alatt 100%-os konverziót értek el, a **42** bisz-feniltiomaleimid esetén pedig 10 perc alatt kapták ugyanezt az eredményt. A halogéntartalmú maleimid származékok nagyobb reaktivitást mutattak TCEP-pel szemben, ami arra utalt, hogy *in situ* módszerre kevésbé alkalmasak. Az ennek igazolására tett kísérlet **38** és **42** maleimid származékokkal azt mutatta, hogy a dibrómmaleimid (**38**) esetén az áthidalás csak 60%-os volt. Az oldatban reagálatlan szomatosztatin is maradt, ezért arra következtettek, hogy a rekonjugálószer és a redukálószer mellékreakcióban reagálhat egymással. Ugyanakkor **42** bisz-feniltiomaleimiddal *in situ* 100%-os konverziót sikerült elérni 20 perc alatt, amely egy rendkívül hatékony rekonjugálószer fejlesztésének lehetőségét teremtette meg.



16. ábra: Újgenerációs maleimidek

Az előállítást illetően Castañeda és munkatársai által leírt maleimid származékok általános szintézisét a 17.a ábrán tüntettem fel. A forrásponton történő melegítés és az esetsav

alkalmazása erélyes reakciókörülmények, amit egyes aminok nem bírnak ki. Ezért olyan NGM-eknél, amik valamilyen érzékeny funkciós csoporttal felszereltek, a 17.b ábrán lévő szintézissor alkalmazható.³⁹

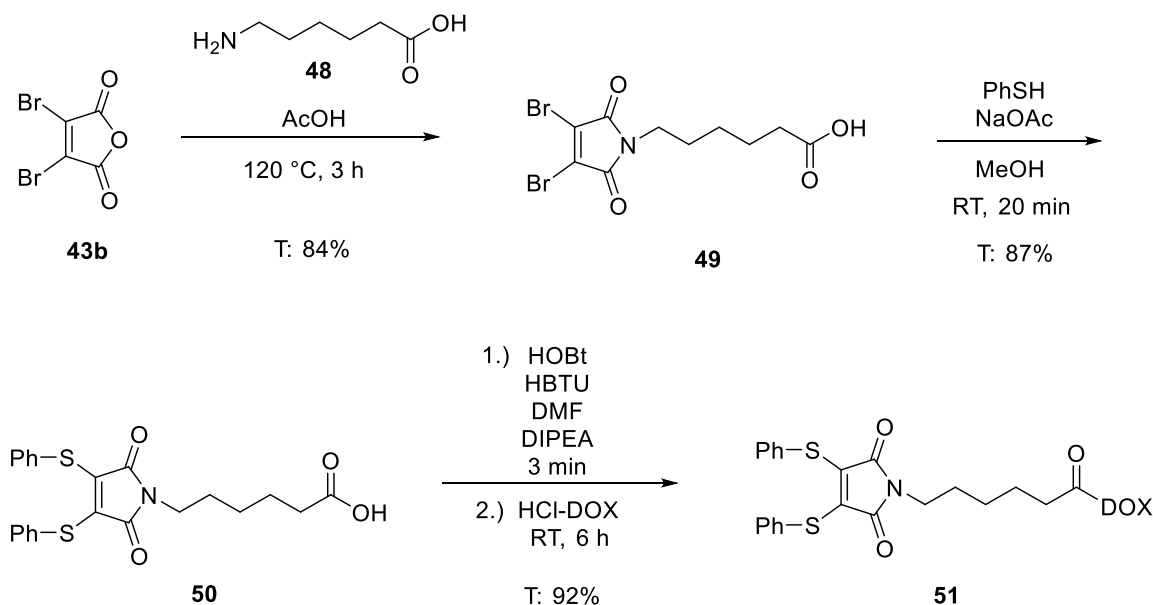


17. ábra: (a) Maleimid származékok általános szintézise (b) Maleimid származékok szintézise enyhébb körülmények között

Schumacher és munkatársai a trasztuzumabot TCEP-pel reduálták, majd **45a** rekonjugálószerrel szekvenciális módszerrel kapcsolták össze. SDS-PAGE alapján megfelelő rekonjugált antitest keletkezett. Szignifikáns volt a fragmentumok száma is, amennyiben hőkezelték a mintát az elektroforézis előtt. Ellman-reagenssel nem volt kimutatható szabad tiolcsoport, tehát az összes ciszteint sikerült reakcióba vinni. Ezt követően optimalizálták a reakciót, de továbbra is keletkezett teljes- és félantitest is. Ennek elkerülésére inkább *in situ* módszert alkalmaztak és a **47c** (R = H) ditiomaleimid származékot vizsgálták. Redukálószerként TCEP-et és benzoszelenolt alkalmaztak. A benzoszelenol esetében 4 °C, míg TCEP esetében 37 °C volt optimális, így csökkenthetőnek bizonyult a félantitestek mennyisége.

A vizsgálatok során kiderült, hogy a ditiomaleimidek (DTM, **47c**) esetében kevesebb volt a mellékreakciók száma, mint a dibrómmaleimideknél (DBM, **47a**).

A **50** rekonjugálószer szintézisét követően DOX-t kapcsoltak hozzá (**51**) (18. ábra), illetve más származékokat is szintetizáltak, amelyekben a maleimid nitrogén és a DOX között különböző molekularészlet (linker) található.

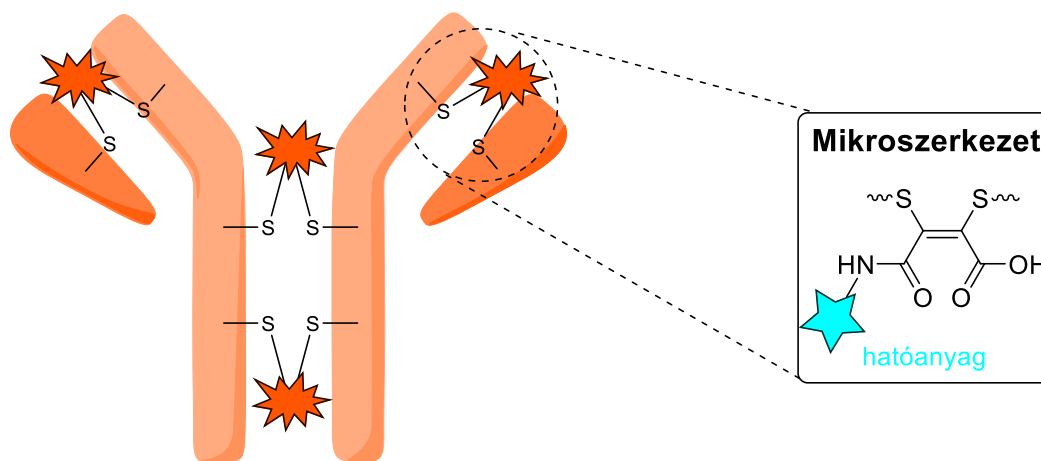


18. ábra: **51** vegyület szintézise

A DOX tartalmú rekonjugálószerrek közül többek között az **51** maleimid származék érte el a legjobb konverziót. Ezekkel rekonjugálták a trasztuzumabot szekvenciális módszerrel, amely ugyan hajlamos félantitest képzésre, de ezzel a módszerrel tudták elérni a legjobb DAR értékeket (3-3,8), illetve a legjobb konverziót (89-99%). Ezt követően cisztein szelektivitás vizsgálatot végeztek, majd a Her2 pozitív sejtvonalak felé mutatott affinitást is vizsgálták. A mérések igazolták a maleimid-konjugátumok megfelelő stabilitását és az antitest változatlan biológiai funkcióját.

A félantitestek keletkezésének kiküszöbölése érdekében kipróbálták az *in situ* módszert is. Ennek során csökkent a félantitestek száma. Majd úgy döntöttek, hogy egy olyan stratégiát is tesztelnek, ahol a rekonjugáció és a gyógyszermolekula rekonjugálószerhez való kapcsolása külön lépésben valósul meg. A **47c** vegyülettel (R = propargil) rekonjugálták az antitestet, majd egy DOX-azid származékot rézkatalizált azid-alkin cikloaddícióval kapcsoltak hozzá. A megfelelő termékek a reagensek mennyiségétől függően 52-69%-os konverzióval keletkeztek 3 és 4 közötti DAR értékekkel.

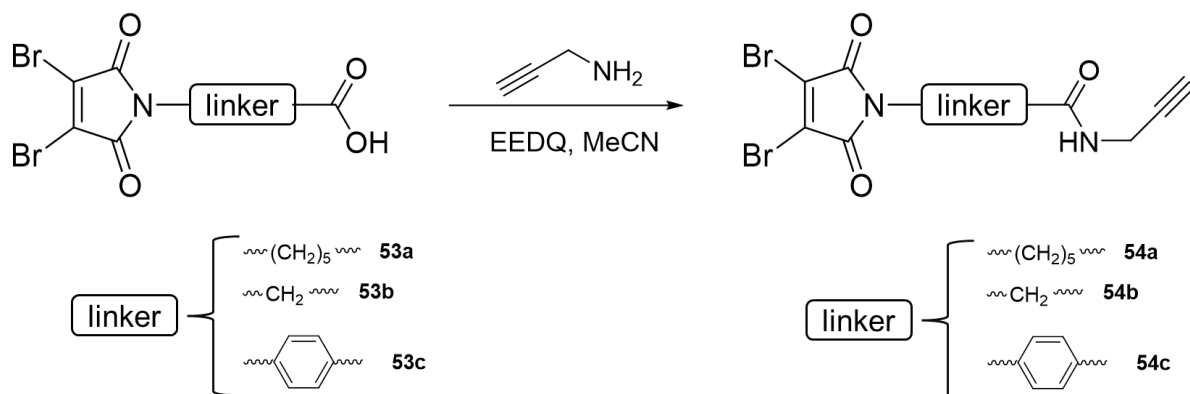
Morais és munkatársai a NGM-ek hidrolízisét tanulmányozták (19. ábra).⁴⁰ Korábbi irodalmi adatokból kiderült, hogy a konjugáció utáni hidrolízis teszi lehetővé a szérumbiztonságot és ezáltal azt, hogy a hatóanyag eljusson a célhelyre.³⁷ A hidrolízis azonban hosszú folyamat, pH = 8,4 értéken 72 óra is lehet. Morais és kollégái ezért a rekonjugálószer megtervezésével és a körülmények optimalizálásával igyekeztek gyorsítani a hidrolízist.



52

19. ábra: NGM a hidrolízis után

Morais és munkatársai a 20. ábrán látható rekonjugálószerkeket állították elő, és ezeken végezték a hidrolízis vizsgálatát.



20. ábra: DBM rekonjugálószerkekték szintézise

Az **54a** DBM származék lassan hidrolizált a trasztuzumab rekonjugációját követően. Az HPLC-MS vizsgálat kimutatta félantitestek, nehéz- és könnyűláncok jelenlétét is, tehát a diszulfidhidak újrakötése nem volt megfelelő. A **54b** és **54c** rekonjugálószerkekték gyorsabban hidrolizáltak, így kevesebb melléktermék keletkezett. További javulást értek el, ha a pH-t 8-ról 8,5-re állították, mert így még gyorsabb volt a hidrolízis. Mind az **54b**, mind az **54c** esetében

két termék keletkezett, a teljes- és a félantitest, viszont a DAR érték mindig optimális volt. Az eljárást ezt követően optimalizálták, így a félantitest : teljes antitest arány 1:1 lett.

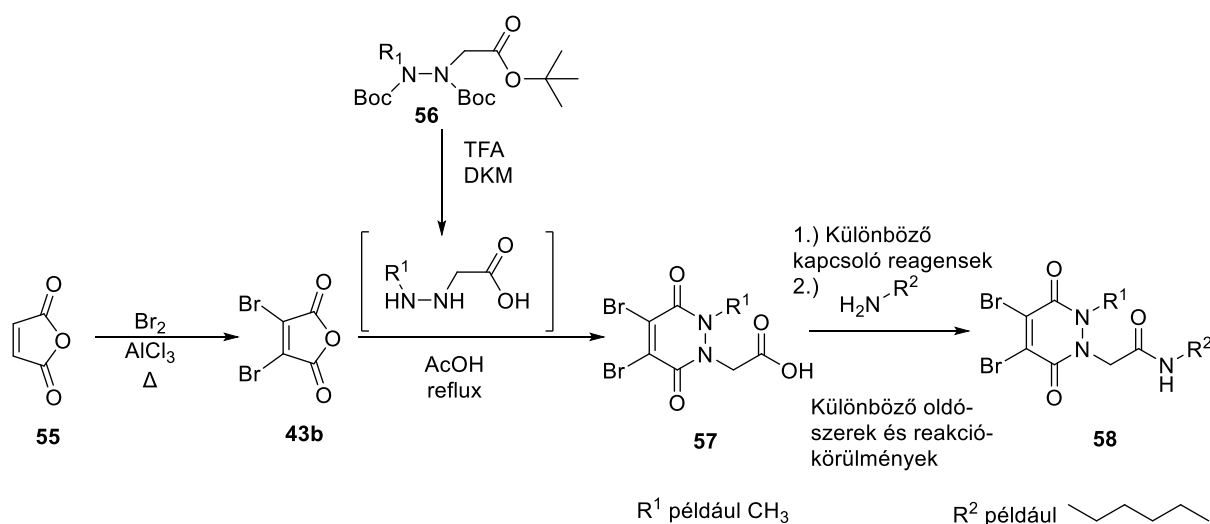
Abszorbancia vizsgálattal megállapították, hogy a DBM-ek sokkal gyorsabban hidrolizálnak, mint a *bisz*-(feniltio)-maleidek. Azok a maleimidek, amik nem vettek részt a rekonjugációban, elhidrolizáltak. Ez azért volt különösen előnyös, mert így nem kellett eltávolítani a reagensfelesleget, nem volt szükséges tisztítás. A kapott konjugátumok szérumbiztonság vizsgálatokon jól szerepeltek és bebizonyosodott, hogy a linker nagyban befolyásolta a hidrolízis sebességét, amely döntő hatással van az ADC-k tulajdonságaira.

Az egyik legnagyobb hátrányt, a félantitestek képződését azonban nem sikerült kiküszöbölniük, így a rekonjugálószer alkalmazása esetén számolni kell az alacsonyabb homogenitással.

2.3.3.6. Dibrómpiridazindionok (DBPD)

A hattagú DBPD származékok rendkívül előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek az öttagú maleimidekkel szemben, stabilitásukhoz nem szükséges hidrolízis, ellenállnak a redukáló ágenseknek és nem befolyásolják az antitestek antigénhez kötődését. Mindezek ellenére akadnak kihívások a származékok fejlesztése során.⁴¹

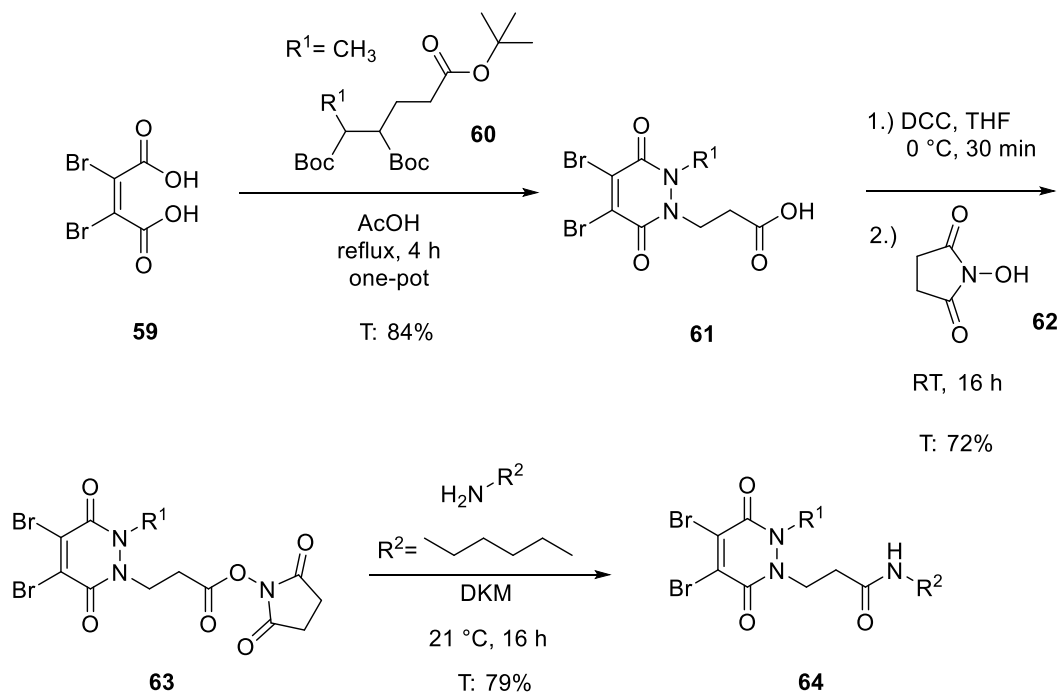
Az első kihívásnak az alapváz szintézise bizonyult, amely szintézissoron látható, hogy egyrészt költséges, másrészt több erélyes lépésből áll (21. ábra).



21. ábra: DBPD korábbi szintézise

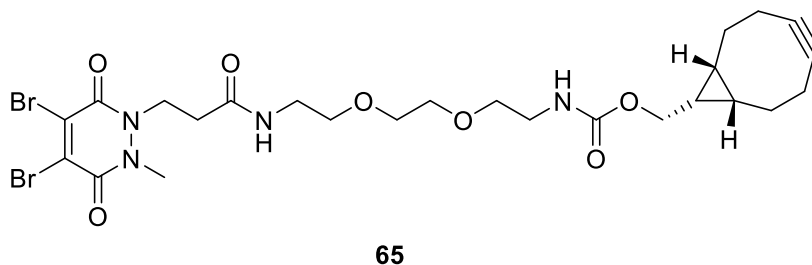
Korszerűbb szintézist dolgoztak ki Bahou és munkatársai (22. ábra), amely költséghatékonyabb, kevesebb lépésből áll, kiküszöböli a veszélyes és nehézkes brómozási

reakciót és sokkal jobb hozamot kínál, mint a korábbi szintézismód. Nagy előnye az is, hogy mivel a legtöbb antitesthez kapcsolható hatóanyag gyakran kapható aminként, így a sav funkcióval acilezhető.



22. ábra: DBPD származékok korszerű szintézise

A szintéziseket követően a kapott amidokkal trasztuzumab antitestet rekonjugálták. A fő koncepció az volt, hogy minél jobban visszaszorítsák a félantitestek képződését. Ennek érdekében lépésenkénti, szekvenciális és *in situ* módszerrel is próbálkoztak (ld. 16. oldal, 7. ábra). A három stratégia tesztelése során a **65** DBPD származékot használták rekonjugálószerként (23. ábra), amelyet 44%-os termeléssel kaptak a legkorszerűbb szintézissel.



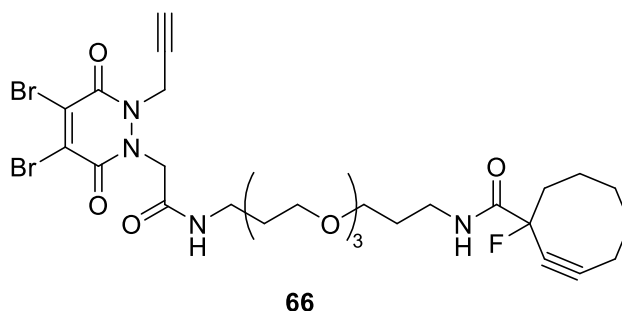
23. ábra: A 65 rekonjugálószer szerkezete

A leggyakrabban alkalmazott rekonjugálási módszer a lépésenkénti, mert a redukálószer és a rekonjugálószer nagyon gyakran reagálhatnak egymással. A DBPD származékoknál a

szekvenciális és az *in situ* protokoll is jól működik, mert TCEP-pel (**8**) nem reagálnak. A **65** piridazindion származék esetén mindhárom módszerrel DAR = 4-t értek el, de a lépésenkénti és a szekvenciális esetben több félantitest keletkezett. Ennek oka valószínűleg az, hogy a TCEP lassabban redukálja a diszulfid kötéseket, mint ami rekonjugáció sebessége. *In situ* módszerrel kevesebb félantitest képződött, tehát ez bizonyult a leginkább megfelelőnek.

Ezután a hőmérsékletet és a DBPD mennyiségét optimalizálták. Az optimális hőmérséklet 4 °C volt, magasabb hőmérsékleten nőtt a heterogenitás. A **65** DBPD származékánál 40 ekvivalens DBPD-re volt szükség, efelett a DAR csökkenni kezdett. Ezekkel a reakciókörülményekkel azt tapasztalták, hogy a teljes antitest mennyisége >95% és a DAR = 4,0.

A DBPD származékokat korábban Maruani és munkatársai is vizsgálták, a trasztuzumab Fab régióját rekonjugálták.⁴² A rekonjugálószer egy kivételesen stabil molekula (24. ábra), amelyen többféle funkciós csoport is elhelyezkedik a további kapcsolási reakciók érdekében. A kétféle alkinszármazék megteremtette annak a lehetőségét, hogy ortogonális klikk reakciók segítségével nem csak DOX-t, hanem egy fluoreszcens festéket (Sulfo-Cyanine5) is kapcsolhassanak az antitesthez.

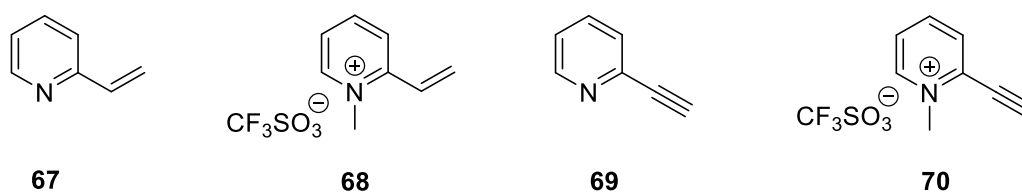


24. ábra: A **66** rekonjugálószer szerkezete

A Fab rekonjugálásakor **66** DBPD származékkal 95% konverziót értek el. Ezután a DOX-t a ciklooktinil gyűrűhöz, míg a festéket a terminális alkinhez kapcsolták. HPLC-MS vizsgálat alapján a rekonjugált antitest kiváló konverzióval keletkezett. Mivel a trasztuzumab Fab régióján végzett vizsgálatok sikeresek voltak, ezért a teljes redukált antitestet is rekonjugálták a **66** piridazindion származékkal. Optimalizálást követően megfelelő DAR értéket és stabilitást értek el. Ezután a DOX-t és a festéket is hozzákapcsolták a DBPD származékhoz, az így kapott módosított antitest a fent leírtakhoz hasonlóan jó tulajdonságokkal rendelkezett.

2.4. Lehetőségek új rekonjugálószer fejlesztésére

A nitrogéntartalmú heterociklusok közül a piridin, pirimidin és pirazin származékok egyszerű szubsztituálhatóságuk és nagy elektrofilitásuk miatt jó rekonjugálószer lehetnek.^{10,11} Matos és kollégái a vinil- és alkinilpiridin nitrogénjét kvaternizálták, és ennek a hatását vizsgálták a cisztein szelektív fehérje- és antitestmódosítás sebességére (25. ábra).¹² Számításos kémiai módszerekkel kiválasztották a különböző piridinszármazékok közül a leggyorsabb nukleofil addíciós reakciót adó molekulákat. A **67** és **69** piridin származékok a tiolok felé enyhe reaktivitással rendelkeztek, de kvaternerezett analógjaik 10⁹-szer reaktívabbak voltak (**68** és **70**).



25. ábra: Matos és munkatársai által vizsgált vegyületek

Ezt követően kísérleti úton is megvizsgálták a vegyületek tiolreaktivitását. A piridinszármazékokat sztöchiometrikus mennyiségű propán-tiollal és propil-aminnal reagáltatták. A **67** és **69** piridin származékok esetén rendre 62% és 6% volt a konverzió 24 óra alatt, a **68** és **70** molekulák pedig 1 óra alatt 99%-os konverziót produkáltak. Propil-aminnal lassan reagáltak a piridin származékok (24 óra alatt 6% termék keletkezett). A vizsgálatot *N*-acetyl-cisztein-amiddal is megismételték és hasonló eredményt kaptak. *N*-acetyl-lizinnel a **68** vegyület szintén nagyon lassan reagált (6% termék 24 óra alatt), tehát a cisztein-szelektivitás igazolódott. Ezután **68** heterociklust különböző fehérjékkel konjugálták, 1 óra alatt 37 °C-on 95%-ban a megfelelő tioéter addukt keletkezett, a lizinnel pedig nem volt keresztreakció, a konjugátum Ellman-reagenssel sem reagált és a plazma stabilitás is megfelelő volt.

Továbbiakban a nitrogénre egy alkin funkciós csoportot építettek be és rézkatalizált azid-alkin cikloaddícióval MMAE-t kapcsoltak a molekulához, amellyel Thiomab antitestet konjugáltak. A konjugátum homogén és stabil volt, illetve megtartotta affinitását a Her2 pozitív sejtek felé. A nitrogéntartalmú heterociklusok kvaternerezésével tehát jelentősen gyorsítható az antitestmódosítás és mindemelett a konjugátumok megtartják jó tulajdonságaikat.

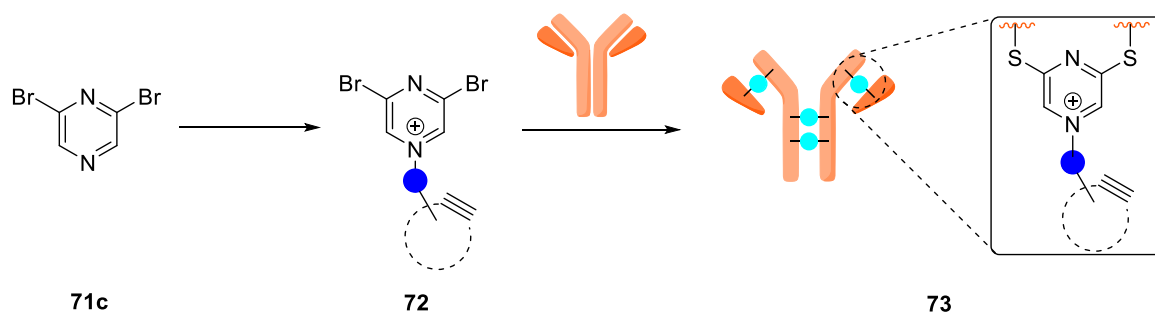
3. Célkitűzés

A gyógyszerek leggyakoribb építőkövei közé tartoznak a heterociklusok, amelyeknek közel 80%-a nitrogént tartalmaz. Ezek között számos irreverzibilisen, kovalens kötással fehérjékhez kapcsolódó vegyület található, ilyenek például az ADC-kben található rekonjugálószerkezetek. Alapvető követelmény egy új rekonjugálószerrel szemben, hogy megfelelő sztérikus tulajdonságokkal és reaktivitással rendelkezzen, erős és tartós kovalens kötést alakítson ki a célponttal, stabilitást kölcsönözzön a rekonjugált antitestnek. Az új rekonjugálószerkezetek fejlesztésének alapötletét gyakran fehérjék kovalens módosítására használt vegyületek képezik.

Kutatócsoportunkban korábban különböző heterociklusos vegyületeket vizsgáltak és meghatározták cisztein felé mutatott reaktivitásukat kovalens MurA inhibitorok fejlesztése céljából. A kutatás során 5 és 6 tagú, elektrofil szubsztituenseket tartalmazó nitrogéntartalmú heterociklusok stabilitását, cisztein reaktivitását és specifikusságát tanulmányozták. Az eredmények alapján a halogénezett piridin, pirimidin és a pirazin származékok alkalmasnak tűntek rekonjugálószerkezetek alapvázának.

Ezen nitrogéntartalmú heterociklusok közül a piridin és a pirimidin származékait már alkalmazták rekonjugálószerként. A pirazint eddig nem írták le a szakirodalomban ilyen célú felhasználásra. A pirazin előnye, hogy a két nitrogénatom elektronhiányosabbá teszi a gyűrűt, mint például a piridin egy nitrogénje, így a pirazinszármazék könnyebben reagál nukleofil reagensekkel. További pozitívum, hogy a pirazin szimmetrikus szubsztituálhatóságot tesz lehetővé, tehát a halogén szubsztituensek feltehetően azonos reaktivitással rendelkeznek.

Annak érdekében, hogy a pirazinszármazék két helyen tudjon kapcsolódni az antitesthez, egy dibrómpirazin származékból terveztünk kiindulni. Ezt kvaternereztük, hogy tovább gyorsíthassuk a rekonjugációt. Célul tűztük ki, hogy a 2,3-, 2,5- és a 2,6-dibrómpirazin közül a kvaternerezés után legjobb rekonjugálási képességgel rendelkező molekulát *N*-alkinilezve eljussunk új rekonjugálószer jelöltekhez (26. ábra). A pirazin származékok alkinilcsoportjához terveink szerint azid-alkin cikloaddícióval (klikk-reakció) festéket kapcsolunk és trasztuzumab antitestet rekonjugálunk velük. Sikeres módosítás esetén a rekonjugációs lépést optimalizálását is terveztük.



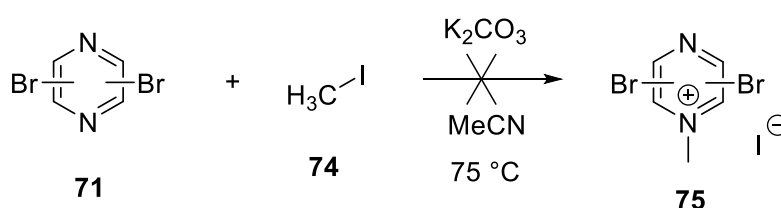
26. ábra: Új rekonjugálószerrek tervezett előállítása

Elképzeléseink szerint a rekonjugált antitesteket puffercserét követően SDS-PAGE és UV/Vis spektroszkópia segítségével vizsgáljuk meg. Ebből kiderül a rekonjugáció határfoka, a DAR érték és megállapíthatjuk, hogy a teljesen rekonjugált antitesten kívül keletkeznek-e antitest fragmentumok. Végül áramlási citometriás mérésekkel és mikroszkópos vizsgálatokkal az antitest specifikus antigénfelismerő képességét ellenőrizzük.

4. Eredmények és értékelésük

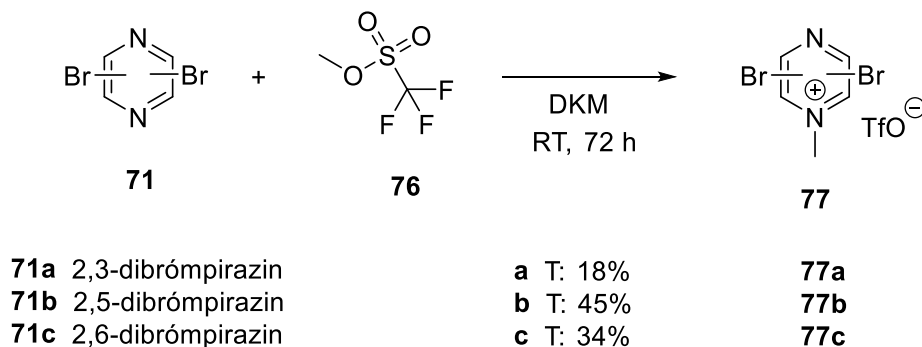
4.1. Közvetlen előzmények

A rekonjugálószerke alapvázának egy dibrómpirazin gyűrűt választottunk. Ahhoz, hogy mely helyzetekben szubsztituált dibrómpirazin a legalkalmasabb számunkra, különböző vegyületekkel *N*-metilezéses próbareakciókat végeztünk. A 2,3-, a 2,5- és a 2,6-dibrómpirazin (**71**) alkilezésénél metilezőszerként metil-jodidot (**74**) használtunk, azonban ez a reakció több ekvivalens alkilezőszer és melegítés hatására egyik vizsgált vegyületnél sem ment végbe (27. ábra).



27. ábra: Dibrómpirazinok metilezése metil-jodiddal

Ezért metilezőszerként a továbbiakban metil-triflátot (**76**) alkalmaztunk (28. ábra). A reakciók elfogadható termeléssel játszódtak le.



28. ábra: Dibrómpirazinok metilezése metil-trifláttal

Az így előállított dibrómpirazínium származékok reaktivitását GSH vizes oldatával (*L*-glutination) vizsgáltuk. A **77a** és **77b** pirazínium származékok esetében a bróm pillanatszerűen cserélt hidroxilcsoportra, míg a **77c** pirazínium származék pillanatszerűen elreagált glutationnal, emellett bomlástermék nem volt detektálható. Feltételezésünk szerint a meta helyzetű, a nitrogénen lokalizált pozitív töltéstől távolabb elhelyezkedő bróm melletti szénen lágyabb elektrofil centrum található, ami a szintén lágy nukleofil tiollal fog reagálni a kemény nukleofil hidroxid helyett. Azt valószínűsítjük, hogy a kvaternerezett nitrogén melletti brómatomok már túl reaktívak. Így arra következtettünk, hogy a **77c** pirazínium származék a

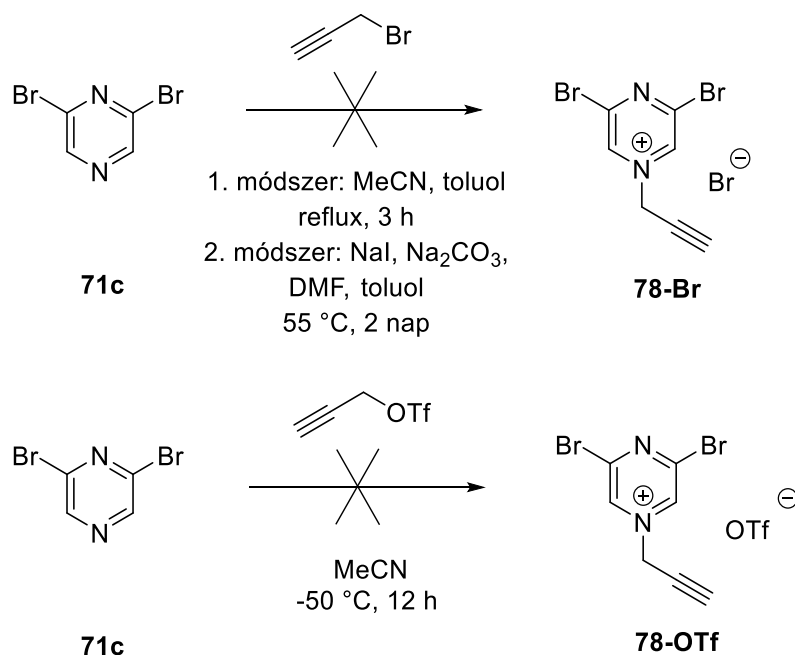
legmegfelelőbb a tiol-szubsztitúcióra. Ezért ezzel a molekulával *in situ* rekonjugáltuk a kutatócsoportban rendelkezésre álló trasztuzumab antitestet. A rekonjugáció során az antitesthez képest 40 ekvivalens pirazint (**77c**) és 20 ekvivalens TCEP-et (**6**) adtunk az oldathoz. A rekonjugálószer feleslegét Bahou és munkatársai alapján a DBPD (**65**) analógiájára, a TCEP (**6**) feleslegét pedig Schumacher és munkatársai publikációja alapján választottuk.^{41,43} Ezután 1 éjszakán keresztül inkubáltuk az oldat egy részét 4 °C-on, másik részét szobahőmérsékleten. Ezt követően puffercserét hajtottunk végre. Erre azért volt szükség, hogy a konjugátumot meg tudjuk tisztítani az el nem reagált rekonjugálószerrel és redukálószerrel. Ezzel biztosítottuk, hogy az UV/Vis spektrum felvételénél ezek jelenléte ne befolyásolja a mért abszorbancia értékeket, és így ne hamis DAR értéket számítsunk.

Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a rekonjugáció végbement-e és hogy esetlegesen milyen antitest fragmentumok (pl.: félantitest, nehézlánc, könnyűlánc...) keletkeztek, SDS-PAGE vizsgálatot végeztünk. Az SDS-PAGE segítségével az antitest konjugátumokat és fragmentumokat tömegük szerint tudjuk elválasztani állandó áramerősség hatására poliakrilamid gélben történő elektroforézissel. A nehezebb fehérjeláncok lassabban, a könnyebbek gyorsabban haladnak a gélben. Az elektroforézis végén, előhívás után a különböző tömegű fehérjék különböző hosszúságú utakat tesznek meg, így tömegük szerint elkülönült sávokban jelennek meg. A sávok helye az alkalmazott referencia fehérjeeleggyel összevetve felvilágosítást ad az egyes sávok tömegéről. A fent említett rekonjugálás során, SDS-PAGE és ennek denzitometriás értékelése alapján 1 éjszaka alatt szobahőmérsékleten 97% teljesen rekonjugált antitest keletkezett, míg ez a szám 4 °C-on csak 91% volt. A denzitometriás kiértékeléseket ImageJ programmal végeztem, a géllap szkennelése alapján kapott görbe csúcsalatti területeinek integrálásával.⁴¹

Az új rekonjugálószer fejlesztésének első lépéseit összefoglalva tehát a GSH aktivitás vizsgálat és a rekonjugáció bizonyították, hogy a három dibrómvegyület közül a 3,5-dibróm-1-metilpirazin-1-ium-triflát (**77c**) alkalmas rekonjugálószer.

4.2. A rekonjugálószer előállítása

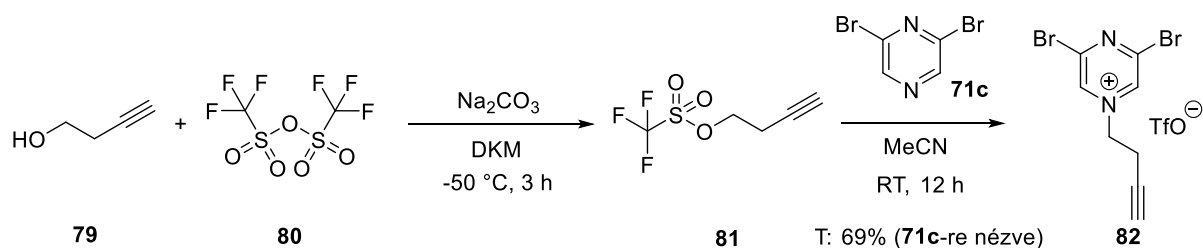
A rekonjugációt követően a 2,6-dibrómpirazint (**71c**) terveztük propargilezni, hogy később klikk-reakcióban alkalmazhassuk fluoreszcens festékmolekula kapcsolására. Ehhez szükséges volt egy alkinil funkciós csoport jelenléte a molekulában, azonban ennek a beépítése több propargilező reagens használatával sem sikerült (29. ábra).



29. ábra: A **78** pirazínium származék előállítására tett kísérletek

A felhasznált alkilezőszerek elérhetőek voltak a laboratóriumunkban. Elsőként propargil-bromiddal próbáltuk *N*-alkilezni a pirazin gyűrűt. A reakció azonban többféle bázis és NaI hozzáadása esetén sem eredményezett terméket. Ezután prop-2-inil-triflátot használtunk alkilezőszerként, de ez a reakcióút sem volt sikeres.

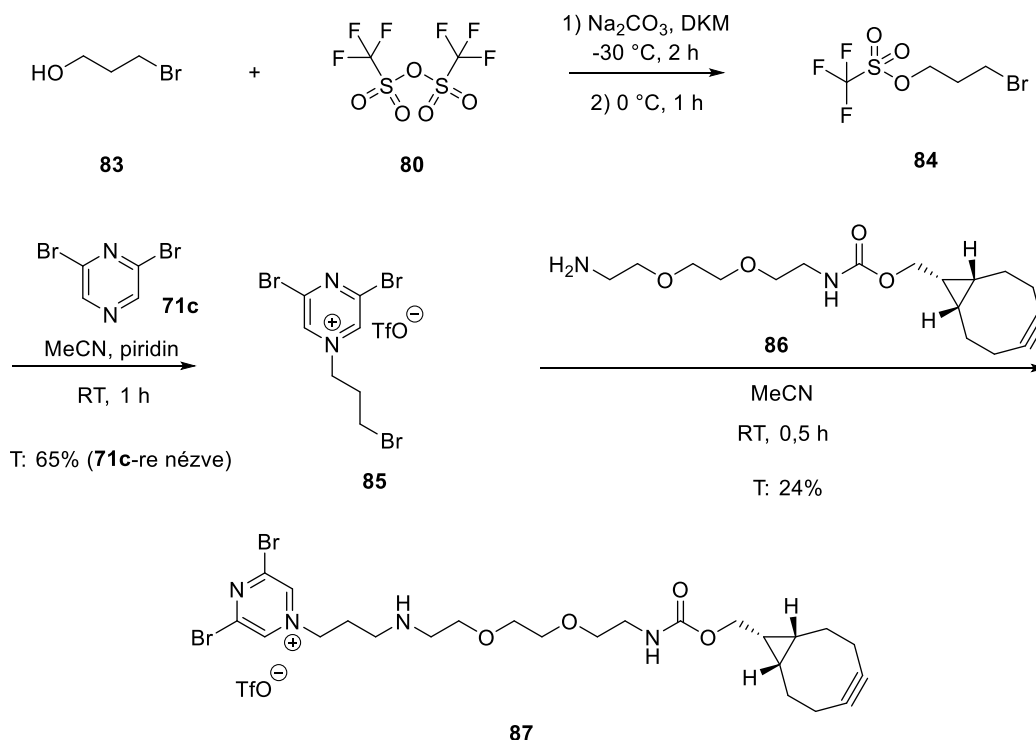
A propargil csoporttal való alkilezés sikertelensége miatt másik alkinszármazékot kerestünk. Arra gondoltunk, hogy egy hosszabb láncot választunk, ahol az alkilező csoport és az alkinilcsoport távolabb helyezkedik el egymástól. Így a 2,6-dibrómpirazinhoz butinil csoport kapcsolását végeztem el. A reakciót az alkilezőszer előállításával kezdtem, melynek során but-3-in-1-ol (**79**) és trifluormetánszulfonsav-anhidrid (**80**) reakciójában **81** szulfonátot szintetizáltam, majd ezt bepárlás után a 2,6-dibrómpirazin (**71c**) acetonitriles oldatához adtam (30. ábra). A nyersterméket fordított fázisú oszlopkromatográfiával tisztítottam, és dietil-éterrel kristályosítottam. Az első reakció teljes konverzióval játszódott le 3 óra alatt -50 °C-on nátrium-karbonát jelenlétében. A második lépés után pedig 1 éjszaka elteltével 69%-os termeléssel sikerült izolálnom **82** rekonjugálószer trifluormetánszulfonát sóként.



30. ábra: A 3,5-dibróm-*N*-but-3-in-1-il-pirazin-1-ium-triflát (továbbiakban BuPi, **82**) előállítása

Az *N*-butinilezéssel párhuzamosan megkíséreltem *N*-pentinilezni is a pirazingyűrűt. A reakció a 30. ábrán látható szintézissel analóg, a különbség csupán a szénlánc hossza. Az eljárás azonban a fent leírt módszerrel csak 36%-os termelést szolgáltatott. Ennek a vegyületnek az előállítására nem végeztem több reakciót, rekonjugálószerként való alkalmazás esetén az egy szénatomos lánchosszbeli különbség feltehetően nem okoz lényeges különbséget.

Egy olyan rekonjugálószer szintézisét is terveztem megvalósítani, amelynél a későbbiekben a fluorofórhoz való azid-alkin cikloaddíció során nem szükséges réz katalízis. Ennek alapvázául is a 2,6-dibrómpirazint (**71c**), alkinként pedig egy cikloooktinil-származékot (**86**) választottam. A szintézis első lépésében 3-brómpropan-1-olból (**83**) és trifluormetánszulfonsav-anhidridből (**80**) az alkilezőszert, a 3-brómpropil-trifluormetánszulfonátot (**84**) állítottam elő. Majd a reakcióelegy bepárlása után ezt hozzáadtam a 2,6-dibrómpirazin (**71c**) MeCN-es oldatához. Így a **85** pirazin származékhoz jutottam, amit bepárlással, etanolos és diizopropil-éteres átkristályosítással izoláltam. Ezt a cikloooktinil-aminnal (**86**) alkilezve alacsony termeléssel (24%) kaptam a terméket (**87**) (31. ábra).



31. ábra: A **87** pirazínium származék előállítása

A feldolgozás óvatos bepárlásból, illetve preparatív HPLC-vel való tisztításból állt, ezután liofilizáltuk a megfelelő frakciókat. Az óvatos bepárlásra és a liofilizálásra azért volt szükség, mert a termék könnyen bomlik. Az alacsony termelés oka lehet egyrészt a szabad ciklooktinil-amin kismértékű stabilitása, amit jelez, hogy a reagenst -20°C -on kell tárolni. Továbbá az HPLC-MS mérés azt mutatta, hogy a reakció végén a konverzió teljes volt, de a feldolgozás során jelentős veszteség lépett fel. Ez is azzal volt magyarázható, hogy a termék nem stabil. Ugyanakkor előnye lehet a hosszabb PEG lánc, mint távtartó jelenléte, illetve a ciklooktinil gyűrű, ami segédanyagmentes klikk-reakciót tenne lehetővé. Ezzel a rekonjugálószerrel a jövőben tervezünk biológiai vizsgálatokat végezni.

Az egyes reakciókat HPLC-MS segítségével követtem, a termékeket pedig ^1H és ^{13}C NMR alapján azonosítottam. Az új, irodalomban eddig nem ismert vegyületek esetében olvadáspont és HRMS méréseket végeztünk el.

4.3. 3,5-Dibróm-*N*-but-3-in-1-il-pirazin-1-ium-triflát (**82**, BuPi) tiol-reaktivitás és stabilitás vizsgálata

Kutatócsoportunkban korábban sikeresen kidolgoztunk egy eljárást kismolekulák stabilitásának és tiol-reaktivitásának vizsgálatára GSH jelenlétében.⁴⁴ Modellvegyületnek az *L*-glutationt választottuk, mert jól oldódik vízben és a tiolcsoportot tartalmazó oldallánc két

peptid-kötés között található. Így elektronikus tulajdonságai nagyon hasonlóak az antitestek ciszteinejéhez. Ez a GSH- és stabilitási teszt megmutatja a próbavegyület reakciósebességi együtthatóját és a felezési idejét, így lehetőséget ad arra, hogy meghatározzuk a BuPi (**82**) tiol-reaktivitását és stabilitását a vizes pufferes közegben. A méréseket és értékelésüket Dr. Petri László végezte.

A GSH vizsgálat során pszeudo-elsőrendű kinetikát biztosítottunk a GSH nagy (20-szoros) feleslegével. A bimolekuláris reakció amúgy másodrendű kinetikát követne, de a pszeudo-elsőrendű kinetika értékelése egyszerűbb, ezért kézenfekvő volt ezt választani. Az *L*-glutationt nemcsak a kinetika rendősége, hanem a belőle képződő GSH dimer és az oxidációs mellékreakciók zavaró hatásának kiküszöbölése miatt is érdemes feleslegben alkalmazni.

A mérés során a GSH és a BuPi (**82**) elegyítése után először percenként majd óránként HPLC-MS segítségével analizáltuk a mintákat (reaktivitási assay). A rekonjugálószer *L*-glutation nélkül, csak vizes pufferes (BBS) közegben is vizsgáltuk, óránként végzett mérésekkel (vizes stabilitási assay). A sebességi együttható (*k*) a pszeudo-elsőrendű reakciókinetikai egyenlet alapján számolható:

$$\ln \frac{[BuPi]}{[BuPi]_0} = -k \cdot t$$

vagyis az HPLC-MS kromatogram csúcs alatti területeinek integrálása alapján kapott maradékarány logaritmusának az időbeli változására illesztett egyenes meredekségének a negatívjaként. Az egyenletben $[BuPi]$ az adott időpillanatban vett rekonjugálószer koncentráció, a $[BuPi]_0$ a kezdeti rekonjugálószer koncentráció, *t* pedig az eltelt idő.

A GSH nélküli mérésre azért is volt szükség, mert a GSH-BuPi reakciót csak víz jelenlétében tudtuk megvalósítani és így egy bruttó (hidrolízis és GSH-BuPi reakció) reakciósebességi együtthatót kaptunk. Mivel a pszeudo-elsőrendű kinetika által lineáris egyenesekhez jutottunk és a két mérés eredményei által meghatározott egyenesekre jellemző az additivitás, ezért a bruttó egyenes és a hidrolízis egyenesének különbségéből megkaptuk a BuPi-GSH reakció által meghatározott kinetikai összefüggést a diagramon. Ennek meredekségének meghatározásával pedig a keresett rekonjugálószer-GSH reakció reakciósebességi együtthatójához jutottunk.

A stabilitást a felezési idővel ($t_{1/2}$) jellemeztük. Ezt a következő egyenlettel határoztuk meg:

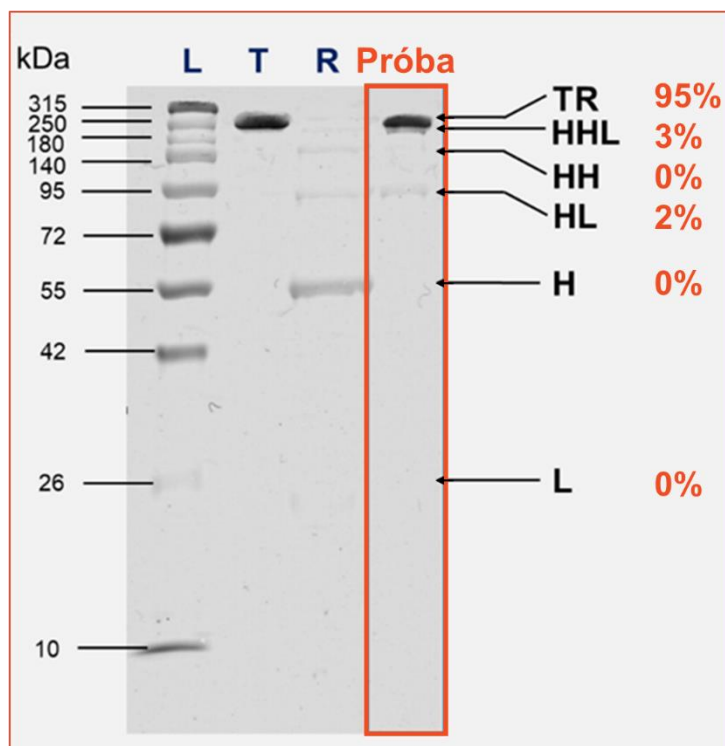
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

A reaktivitási assay során azt tapasztaltuk, hogy a BuPi (**82**) vizes közegben pillanatszerűen reagált a GSH-val, felezési ideje nem volt mérhető. A vizes stabilitási assay-ból pedig az derült ki, hogy 7,4-es pH-n a hidroxibrom szubsztitúció reakciósebességi együtthatója $0,092 \frac{1}{h}$, így BuPi (**82**) felezési ideje 7,55 h. 8,0 pH-n a reakciósebességi együttható $0,127 \frac{1}{h}$, a felezési idő pedig 5,5 h. Az eredmények szerint a rekonjugálószer gyors reakcióban reagál a GSH-val, vizes közegben pedig lassabban bomlik, minthogy ezzel számolni kelljen a rekonjugálási reakciók átlagos 1-2 órás ideje alatt. A vizes stabilitási assay alapján pH = 8 értéken romlott a stabilitás. Ennek oka, hogy magasabb pH-n több hidroxidion van jelen és a brom, jó távozó csoport lévén, hidroxidionra cserél. A felezési idő és a reakcióidő között azonban több nagyságrend különbség van. Ebből adódik, hogy a kívánt reakcióút sokkal gyorsabban játszódik le, mint a mellékreakciók.

4.4. Trasztuzumab próbarekonjugációja 3,5-dibrom-N-but-3-in-1-il-pirazin-1-ium-trifláttal (**82**)

Ahhoz, hogy a **82** rekonjugálószer (BuPi) megfelelően tudja-e áthidalni az antitestet, próbareakciót végeztem a kutatócsoportunkban rendelkezésre álló Genentech által gyártott trasztuzumabbal. Az antitestből borít alapú sóoldat (BBS) puffer oldatot (pH = 8) készítettem, majd 40 ekvivalens BuPi-t (**82**) adtam hozzá 4 °C-on, amit 0,5 órán keresztül inkubáltam. Az inkubálás azért volt szükséges, hogy a rekonjugálószer molekulák megfelelően el tudjanak helyezkedni az antitest körül és a redukálószer hozzáadása során gyorsan tudjanak reagálni a tiolcsoportokkal. Ezt követően 20 ekvivalens TCEP (**6**) hozzáadásával 4 °C-on további 16 órán keresztül inkubáltam az oldatot. Ez idő alatt a redukció és a rekonjugáció lejátszódott. Azért ezeket a körülményeket és arányokat választottam, mert a kutatócsoportunkban korábbi rekonjugálószerreknél ezek voltak az optimálisak, illetve a szakirodalomból is erre lehetett következtetni.⁴¹

Puffercsere után SDS-PAGE denzitometriás kiértékelése alapján 95%-ban teljesen rekonjugált antitest keletkezett, ezt a 32. ábrán a TR-rel jelölt sáv mutatja (250 kDa sor). Emellett kis mennyiségben (rendre 3% és 2%) HHL (180 kDa, két nehézlánc és egy könnyűlánc alkotta fragmentum) és HL (95 kDa, félantitest) fragmentumok maradtak az oldatban. Önálló nehéz- (55 kDa) és könnyűláncok (26 kDa) nem voltak kimutathatóak. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az általam szintetizált molekula igen hatékonyan tudja újrakapcsolni az antitest láncait, a nem kívánt fragmentumok minimális keletkezésével.



32. ábra: Próbarekonjugációról készített SDS-PAGE. A: protein referencia (létra); B: trasztuzumab; C: redukált trasztuzumab; D: rekonjugált trasztuzumab. TR: teljesen rekonjugált antitest; HHL: két nehézlánc és egy könnyűlánc; HH: két nehézlánc, HL: egy nehézlánc és egy könnyűlánc; H: nehézlánc; L: könnyűlánc

A 32. ábrán látható, hogy a 148 kDa tömegű trasztuzumab antitest (B oszlop) a protein referencia szerint a 250 kDa sávban jelent meg és a géllapon a félantitestig minden sáv nagyobb tömegnél helyezkedik el. Erre pontos magyarázatot nem találtunk. Eredményeinket azonban helyesnek tekintjük, mert a szakirodalomban közölt számos publikációban ugyanez a jelenség figyelhető meg.^{41,43} Emellett említést érdemel, hogy a könnyű lánc általában a szakirodalomban sem lázik, aminek oka esetleg az lehet, hogy kis mennyisége miatt nehezen detektálható.

4.5. Moláris abszorpciós koeficiensek meghatározása

Az antitest és a rekonjugálószer, valamint a fluorofór koncentrációját UV/Vis spektroszkópia segítségével határoztam meg. A mért jel, az abszorbancia és a koncentráció között a Lambert-Beer törvény teremti meg a kapcsolatot:

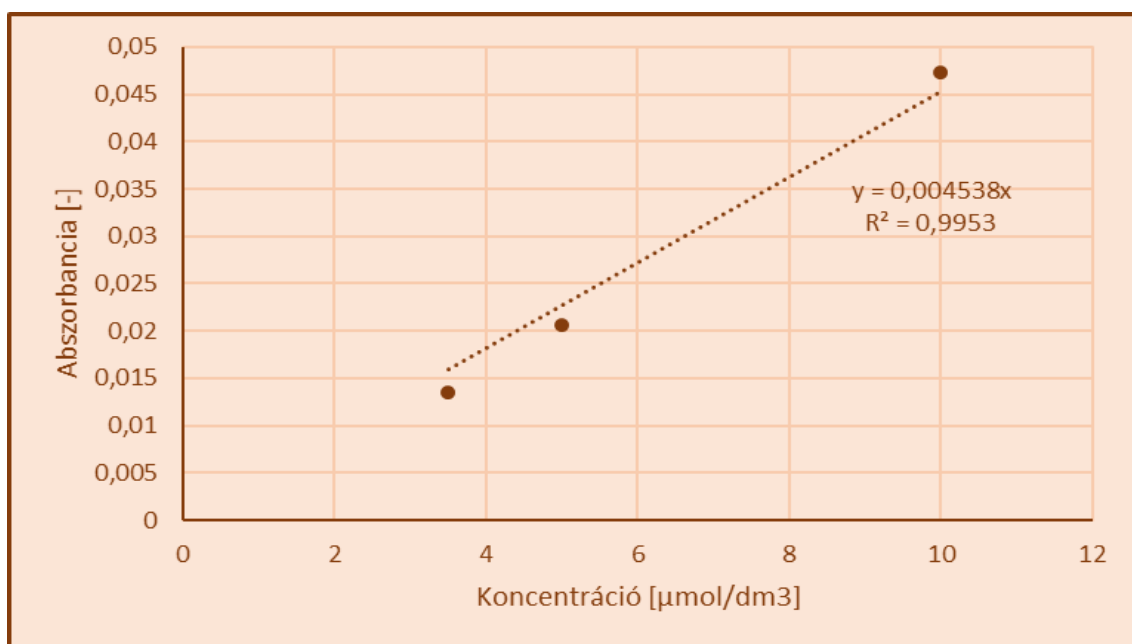
$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

ahol A a mért abszorbancia [-], ε a moláris abszorpciós koeficiens $\left[\frac{dm^3}{mol \cdot cm}\right]$, l az optikai úthossz [cm] és c a koncentráció $\left[\frac{mol}{dm^3}\right]$. Ez alapján, amennyiben ismerjük az optikai úthosszt, a

moláris abszorpciós koefficiens és megmértem az abszorbanciát, akkor az oldat koncentrációja kiszámítható.

A moláris abszorpciós koefficiens meghatározásához egy oldatsorozatot használtam fel, amit BuPi (82) törzsoldatból készítettem. Ezekről az oldatokról ezt követően UV/Vis spektrumot vettem fel, majd meghatároztam a BuPi (82) abszorpciós maximumának helyét (330 nm) és ennél a hullámhossznál leolvastam a kalibráló oldatok abszorbanciáját. A trasztuzumab abszorpciós maximumánál (280 nm) kapott értékek pontatlanok (egyenest illesztésre alkalmatlanok) voltak, ezért 252 nm-nél olvastam le az abszorbanciákat, ahol már az adatok lehetővé tették a pontosabb lineáris regressziót és ezáltal a moláris abszorpciós koefficiens precízebb meghatározását. Ezután a kapott abszorbancia értékeket az antitest koncentráció függvényében ábrázoltam, majd lineáris egyenest illesztettem a pontokra úgy, hogy az egyenes átmenjen az origón. Az egyenes meredekségének értékét 10^6 -nal szorozva megkaptam a moláris abszorpciós koefficiens.

Az 1. diagramon látható értékekre a fent leírt módon egyenest illesztve megkaptam a BuPi (82) moláris abszorpciós koefficiens értékét 330 nm-en, ami $4538 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$. Mivel az illesztett egyenes determinációs együtthatója (R^2) 1-hez közeli érték, ezért az illesztés megfelelő. Ehhez azonban szükséges volt, hogy a $2,0$ és $7,5 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}$ koncentrációjú oldatokhoz tartozó abszorbancia értéket kihagyjam az lineáris regresszióból, mert ezek egy kiugró adatok voltak.



1. diagram: BuPi (82) moláris abszorpciós koefficiensének meghatározása 330 nm-en

252 nm-en szintén ugyanígy határoztam meg a moláris abszorpciós koefficiensét, ami $3688 \frac{dm^3}{mol \cdot cm}$.

A trasztuzumab moláris abszorpciós koefficiensére 252 nm hullámhosszon irodalmi adatot használtam fel, amely a következő: $76565 \frac{dm^3}{mol \cdot cm}$.⁴⁵

A koncentrációkat az előbb meghatározott koefficiensek segítségével, illetve a mért abszorbancia értékekkel és a mérés során felhasznált küvetta fényútjával tudtam meghatározni az alábbi kétismeretlenes egyenletrendszer megoldásával:

$$\begin{aligned} A^{252 \text{ nm}} &= \epsilon_{BuPi}^{252 \text{ nm}} \cdot l \cdot c_{BuPi} + \epsilon_T^{252 \text{ nm}} \cdot l \cdot c_T \\ A^{330 \text{ nm}} &= \epsilon_{BuPi}^{330 \text{ nm}} \cdot l \cdot c_{BuPi} + \epsilon_T^{330 \text{ nm}} \cdot l \cdot c_T \end{aligned}$$

Az egyenletrendszerben a BuPi (**82**) és a trasztuzumab (T) koncentrációján kívül minden paraméter ismert, így a megoldás után megkaptam a keresett mennyiségeket.

Továbbiakban akkor is ezt a módszert használtam, amikor a fluorofór koncentrációját kellett meghatároznom az azid-alkin cikloaddíció és a rekonjugáció után, ekkor az abszorpciós maximum helye 552 nm-nél van. A felhasznált festék moláris abszorpciós koefficiensét 252 nm-en és 552 nm-en méréssel állapítottam meg, ami $39657 \frac{dm^3}{mol \cdot cm}$ és 552 nm hullámhosszon $37456 \frac{dm^3}{mol \cdot cm}$.

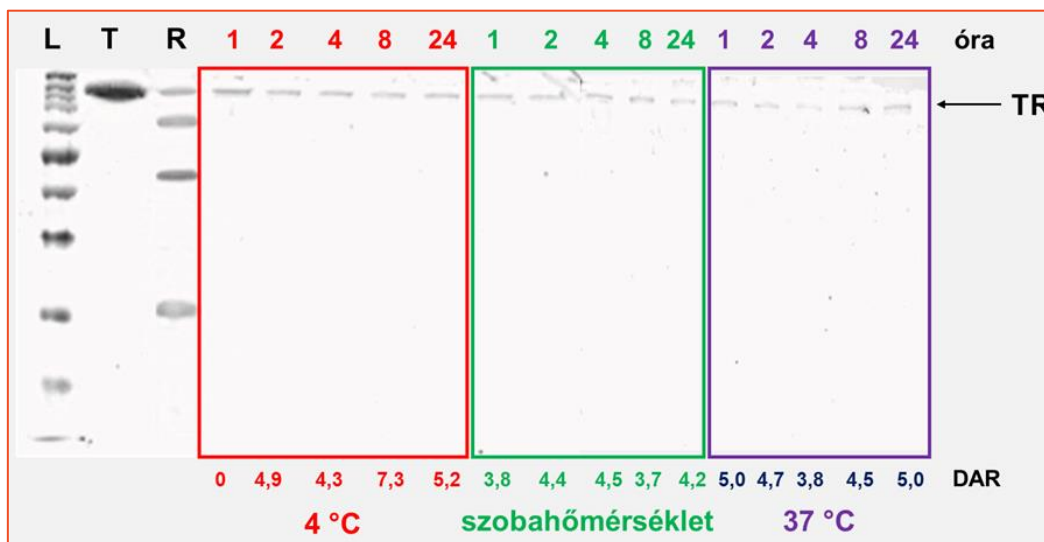
4.6. Rekonjugáció optimalizálása

4.6.1. Hőmérséklet optimalizálása

Annak érdekében, hogy a legjobb DAR értéket és megfelelő homogenitást érjek el, megvizsgáltam a hőmérséklet rekonjugációra gyakorolt hatását. A rekonjugálást 4 °C-on, szobahőmérsékleten és 37 °C-on végeztem el *in situ* módszerrel. Trasztuzumab oldathoz 40 ekvivalens BuPi-t (**82**) adtam és 0,5 órán át adott hőmérsékleten inkubáltam. A rekonjugálószer feleslegét a kutatócsoport más rekonjugálószerrel való tapasztalatai alapján és a szakirodalom alapján választottam⁴¹. Ezt követően 20 ekvivalens TCEP-et (**6**) adtam az oldathoz, majd a meghatározott hőmérsékleten követtem a reakciót 24 órán keresztül. Mintákat 1, 2, 4, 8 és 24 óra elteltével vettem, majd az SDS-PAGE vizsgálatig fagyasztóba helyeztem ezeket.

Az SDS-PAGE alapján az összes vizsgált hőmérsékleten teljesen végbement a rekonjugáció. A 33. ábrán látható, hogy minden oszlopban közel azonos magasságban vannak

a minták a trasztuzumabbal (T), tehát a tömegük azonosnak tekinthető. Ez azért lehetséges, mert a rekonjugálószer tömege elhanyagolható az antitestéhez képest, ugyanis a vizsgált mérettartományban nem jelenik meg ilyen kis különbség.



33. ábra: Hőmérséklet optimalizálásáról készített SDS PAGE gél. L: protein referencia (létra); T: trasztuzumab; R: redukált trasztuzumab; 1–24 óra minták különböző hőmérsékleteken

Az SDS-PAGE géllap denzitometriás értékelését a 2. táblázat szemlélteti. Látható, hogy csak teljesen rekonjugált antitestek képződtek mindhárom hőmérsékleten, fragmentumok keletkezése nem volt kimutatható.

4°C, RT, 37 °C					
	TR (%)	HHL (%)	HH (%)	HL (%)	H+L (%)
1 h	100	0	0	0	0
2 h	100	0	0	0	0
4 h	100	0	0	0	0
8 h	100	0	0	0	0
24 h	100	0	0	0	0

2. táblázat: A hőmérséklet hatása az antitest rekonjugációra

A minták DAR értékét is meghatároztam a 4.5. fejezetben leírt módon. Először megmértem az oldatok abszorbanciáját 252 és 330 nm-en, majd a már meghatározott moláris abszorpciós koefficiensekkel és az adott kivető vastagsággal megoldottam az alábbi kétismeretlenes egyenletrendszer:

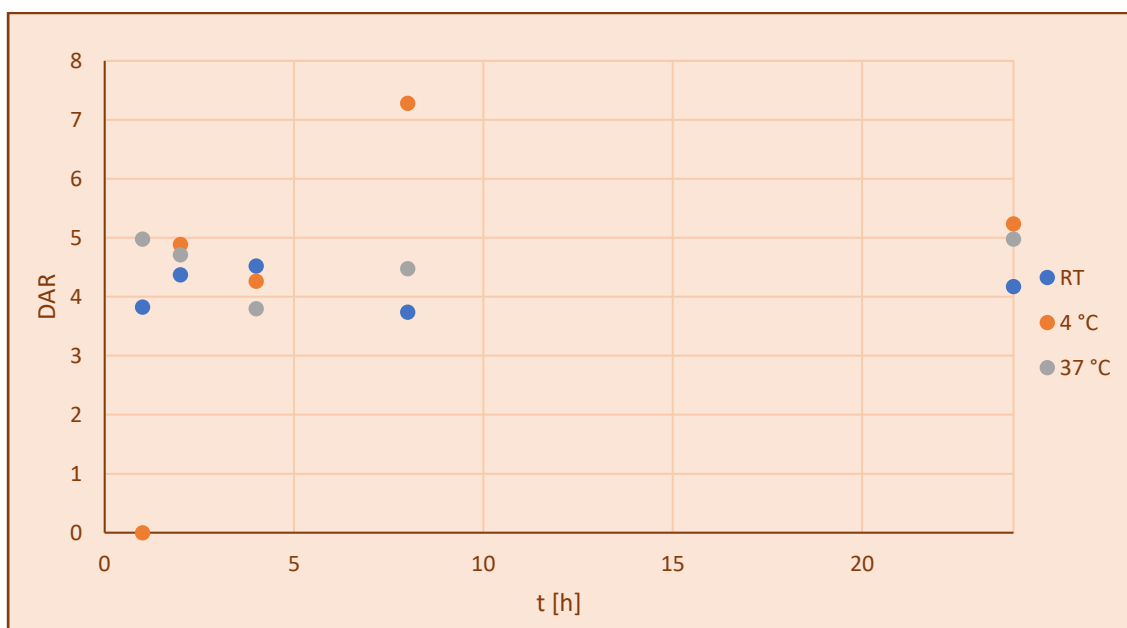
$$A_{252\text{ nm}} = \varepsilon_{252\text{ nm}, BuPi} \cdot l \cdot c_{BuPi} + \varepsilon_{252\text{ nm}, T} \cdot l \cdot c_T$$

$$A_{330\text{ nm}} = \varepsilon_{330\text{ nm}, \text{BuPi}} \cdot l \cdot c_{\text{BuPi}} + \varepsilon_{330\text{ nm}, T} \cdot l \cdot c_T$$

Így megkaptam a c_{BuPi} és a c_T értékét. Ebből a DAR számítása a következő egyenlettel történt:

$$\text{DAR} = \frac{c_{\text{BuPi}}}{c_T}$$

Az eredményeket a 2. *diagramon* szemléltetem. Az UV/Vis spektrumokat Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer készüléken vettem fel. Ezzel a készülékkel a DAR értékek pontatlannak bizonyultak. (A 2. *diagramon* például DAR = 4 helyett 6-ot kaptam.) A pontosabb meghatározás miatt tömegspektrométer (MS) segítségével is jellemeztük a mintákat. Ez alapján a mért DAR értékeket valójában 2/3-dal kell szorozni, hogy valós eredményt kapjunk. Ennek igazolására egy kalibrációs görbét készítettem, melynek egyenlete $y=0,6885x$ ($R^2=0,9972$). Tehát az összes *diagramon* úgy ábrázoltam az adatokat, hogy 2/3-dal szoroztam az pontatlan készülékkel kapott adatokat.



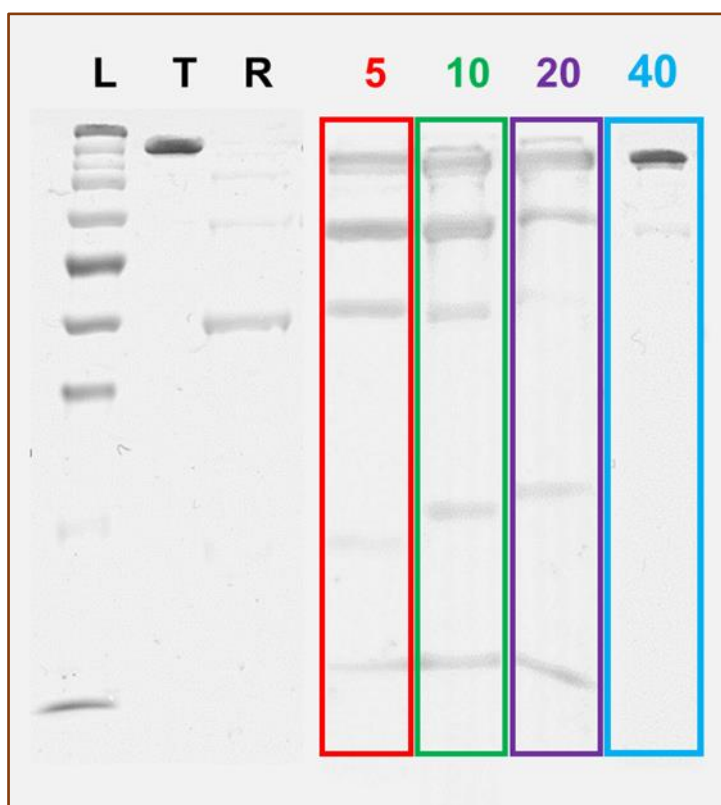
2. *diagram*: Hőmérséklet hatása a DAR értékre

A 2. *diagramról* leolvasható, hogy 4 °C-on nem kaptam optimális eredményt (a DAR általában valamivel 4 körül szór). Magasabb hőmérsékleten, 37 °C-on már a DAR = 4 és 5 közötti, de a szobahőmérsékleten kapott adatok jobban megközelítik a 4-es értéket.

Az eredmények alapján elmondható, hogy szobahőmérsékleten a legkisebb a szórás az optimális DAR körül, ezért ezt választottam optimális hőmérsékletnek, ráadásul a módszer előnye lehet így, hogy ennek eléréséhez nem szükséges külső beavatkozás, hőmérséklet szabályozás.

4.6.2. Rekonjugálószer feleslegének optimalizálása

A DAR értéket és a homogenitást meghatározó másik fontos paraméter a rekonjugálószer feleslege az antitesthez képest. A rekonjugációkat eddig 40 ekvivalens rekonjugálószer felesleggel végeztem. A szakirodalomban ennél kisebb felesleget is szokás alkalmazni, tehát megvizsgáltam 5, 10, 20 ekvivalens BuPi (**82**) hozzáadását és a reakciót fél órán át szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezt követően 20 ekvivalens TCEP-et (**6**) adtam az oldatokhoz, és negyed, fél, háromnegyed, 1, 2, 4 és 8 óra után vettem mintát. A rekonjugációt 8 óra után már nem követtem, mert az ez idő alatt összegyűlt adatokból is egyértelműen meghatározható volt az optimális rekonjugálószer felesleg. Puffercsere után SDS-PAGE-el határoztam meg a rekonjugáció mértékét, a 34. ábrán a 2 óránál vett mintákat tüntettem fel.



34. ábra: Rekonjugálószer felesleg optimalizálás SDS-PAGE. L: protein referencia (létra); T: trasztuzumab; R: redukált trasztuzumab; 5: 5 ekv. 2 h minta; 10: 10 ekv. 2 h minta; 20: 20 ekv. 2 h minta; 40: 40 ekv. 2 h minta

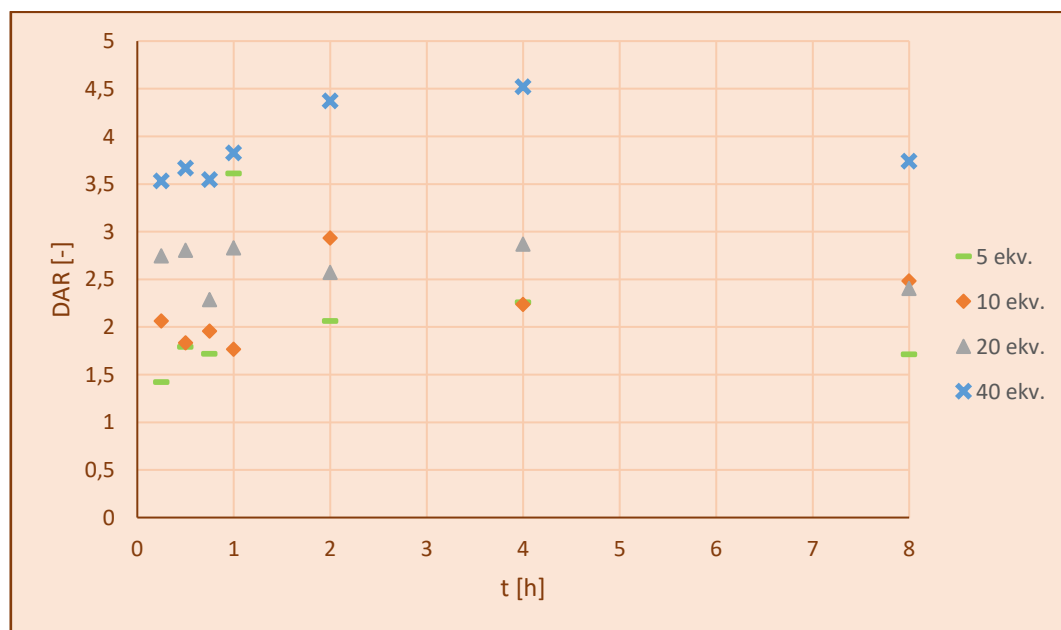
A 34. ábrán szereplő SDS-PAGE denzitometriás kiértékelésének részlete a 3. táblázatban látható. Ez alapján két óra rekonjugáció után ezeknél az arányoknál jelentős volt a nem teljesen rekonjugált antitest fragmentumok képződése. Tíz ekvivalens esetén mindössze 40%-ban képződött rekonjugált antitest és a minta majd harmada félantitestet (HL) tartalmazott. A felesleget 20 ekvivalensre növelve két óra elteltével továbbra is csak 65% teljesen rekonjugált

antitest keletkezett és sok HHL képződött. A 34. ábrán látható SDS-PAGE alapján 40 ekvivalens rekonjugálószerrel azonban maximálisan végbemegy az újrapcsolás. Emiatt nem változtattam a kezdetben is választott 40 ekvivalens feleslegén.

	5 ekv.	10 ekv.	20 ekv.
TR (%)	34%	40%	65%
HHL (%)	6%	9%	20%
HH (%)	7%	4%	4%
HL (%)	37%	28%	3%
H+L (%)	16%	19%	8%

3. táblázat: SDS-PAGE denzitometriás kiértékelése 2 óránál különböző ekvivalenseknél

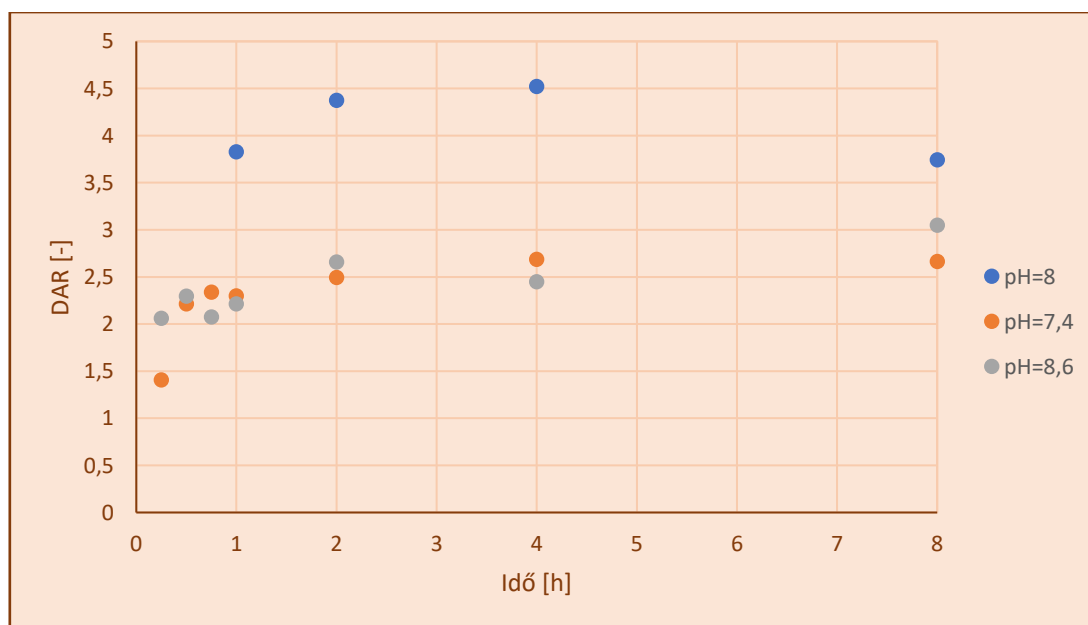
UV/Vis spektroszkópia segítségével a DAR értékeket is meghatároztam (a 4.6.1. fejezetben leírtak szerint) az idő függvényében (3. diagram). A DAR érték 40 ekvivalens rekonjugálószer feleslegénél (a 4.6.1. fejezetben lévő rekonjugáció alapján) érte el az optimális négyet. Húsz ekvivalens esetén is csak $\text{DAR} = 2,9$ volt a legmagasabb érték. A rekonjugáció időintervallumát tekintve 2 óra volt az optimális. Szintén leolvasható a diagramról, hogy ezalatt 40 ekvivalens esetén még 4 alatti a DAR, 2 óra után pedig már nem nő szignifikánsan az értéke. Az eredmények alapján elmondható, hogy a rekonjugálószer feleslegének növelésétől a DAR érték nagyobb lesz, ezért helytálló a 40 ekvivalens rekonjugálószer optimálisnak választása.



3. diagram: Rekonjugálószer felesleg hatása a DAR értékre

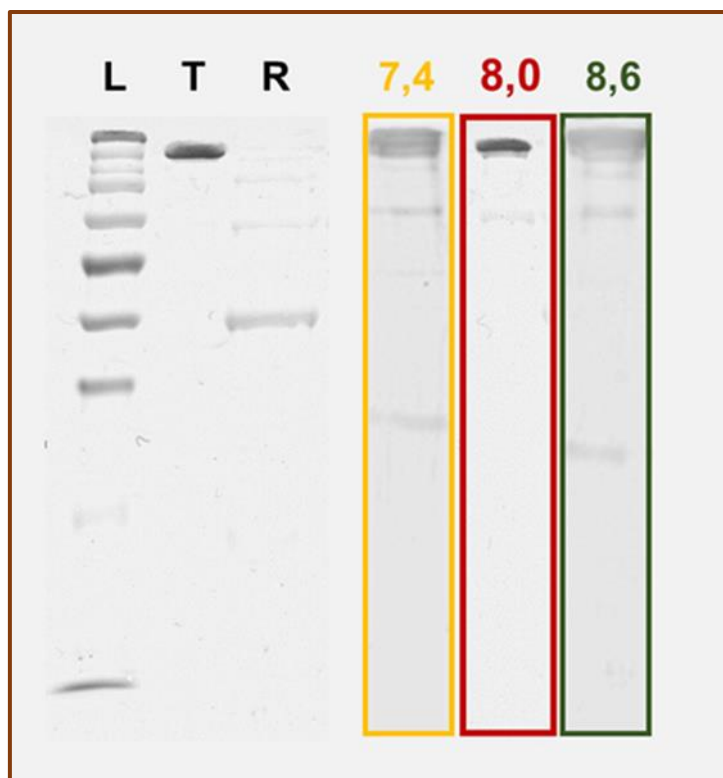
4.6.3. pH érték optimalizálása

Az optimalizálás során vizsgált pH értékek: 7,4; 8,0; és 8,6 voltak, ugyanis a pH = 8 érték mellett gyakran szoktak pH = 8,6-ot is használni, továbbá az ugyanilyen mértékben savasabb pH értéket is vizsgáltam. Szobahőmérsékleten 40 ekvivalens rekonjugálószerzt adtam az antitest oldathoz, majd fél órán keresztül inkubáltam. Ezt követően 20 ekvivalens TCEP-et (6) pipettáztam hozzá, majd további 8 órán át követtem a reakciót. Mintákat 1, 2, 4, és 8 óra elteltével vettem. Puffercsere után UV/Vis spektroszkópia segítségével meghatároztam a DAR értékeket (a 4.6.1. fejezetben leírtak szerint), amelyek eredményei a 4. diagramon láthatóak. A diagramról leolvasható, hogy a legjobb DAR = 3,8 értéket pH = 8 esetén értem el. Alacsonyabb, illetve magasabb pH-n 2-3 körül volt a DAR.



4. diagram: pH hatása a DAR értékre

Ezzel párhuzamosan SDS-PAGE-el is megvizsgáltam a konjugátumokat pH = 7,4 és 8,6 értékeken. (Mivel minden más rekonjugációt pH = 8 értéken végeztem, ezért ezt itt külön nem vizsgáltam.) Az eredményeket a 35. ábrán szemléltetem. Látható, hogy mindkét vizsgált pH értéken minden időpontban jelentős mennyiségben keletkeztek félantitest fragmentumok. Az eredmények és az eddigi 8-as pH értéken végzett rekonjugálások alapján optimálisnak a pH = 8 értéket választottam, mert ezen a pH értéken a legkisebb a nem teljesen rekonjugált antitest fragmentumok keletkezésének mértéke.

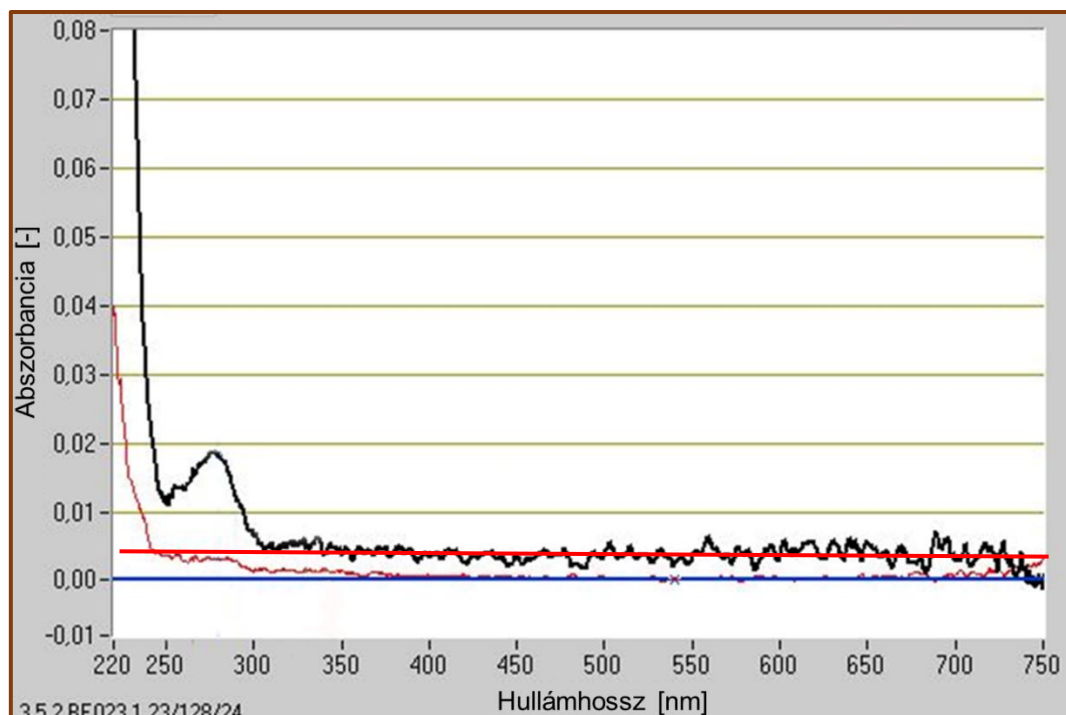


35. ábra: SDS-PAGE a pH optimalizálásról (pH 7,4 és 8,6). L: protein referencia (létra); T: trastuzumab; R: redukált trastuzumab; 7,4: 2 h minta pH = 7,4; 8,0: 2 h minta pH = 8,0; 8,6: 2 h minta pH = 8,6

4.7. Szelektivitásvizsgálat

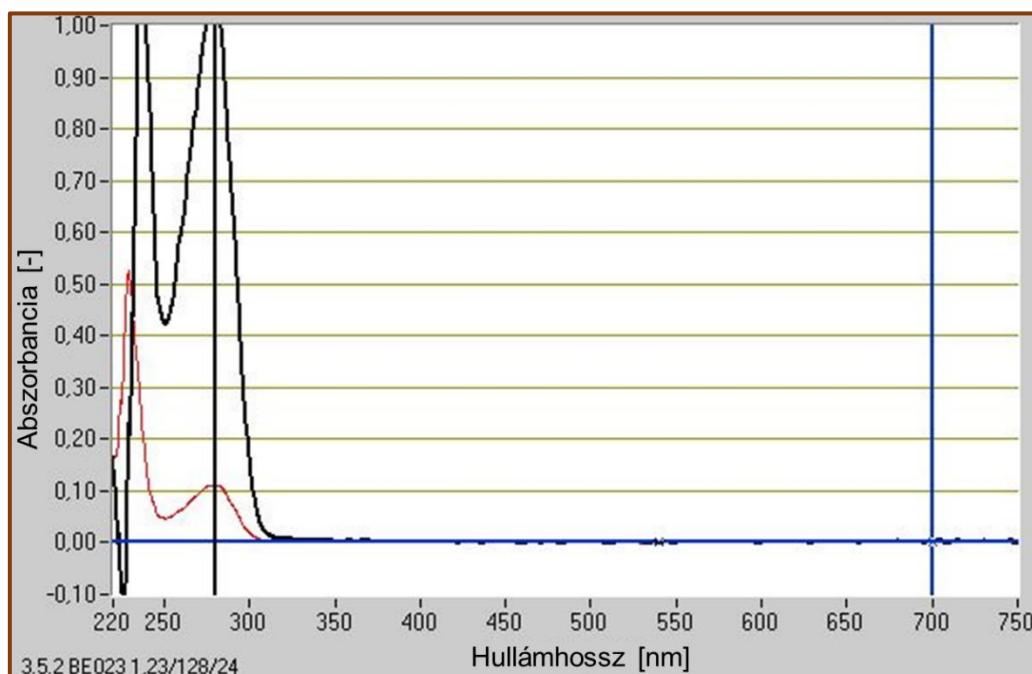
A rekonjugálószer igen fontos tulajdonsága a szelektivitás. A pirazinszármazéknak csak az antitest láncközi diszulfid hídjaiból felszabaduló tiolcsoportokhoz szabad kapcsolódnia. Egyéb aminosavakhoz, például lizinhez egyáltalán nem, vagy csak elhanyagolható mértékben kötődhet. Ennek igazolására szelektivitás vizsgálatot végeztem. Ez úgy történt, hogy a trastuzumab oldathoz szobahőmérsékleten hozzáadtam a rekonjugálószer vizes oldatát, majd 2 órán keresztül inkubáltam szintén szobahőmérsékleten. Mivel nem adtam redukálószer a rendszerhez, ezért szabad tiolok nem voltak az antitesten, csak egyéb nukleofil aminosavakkal reagálhatna a rekonjugálószer.

Puffercsere után UV/Vis spektrumot vettem fel, 252 és 330 nm-nél meghatároztam az abszorbancia értékeket. A 36. ábrán látható spektrumon a 330 nm-nél vett elnyelést elhanyagoltam, mert az itt abszorbanciát okozó zaj az egész spektrumra kiterjed. Olyan részekben is emelkedett kissé az abszorbancia, ahol már nem lehet semmilyen fényelnyelés, így a korrigált alapvonalat pirossal jelöltem.



36. ábra: Szelektivitás vizsgálat UV/Vis spektruma (NanoDrop készülék képernyőképe)

A 252 nm-nél jelentkező csúcs az antitest elnyelése. Egy tiszta antitest oldat spektrumát a 37. ábrán tüntettem fel, ahol látható, hogy az antitest nem nyel el 310 nm felett.



37. ábra: Tiszta antitest oldat UV/Vis spektruma (NanoDrop készülék képernyőképe)

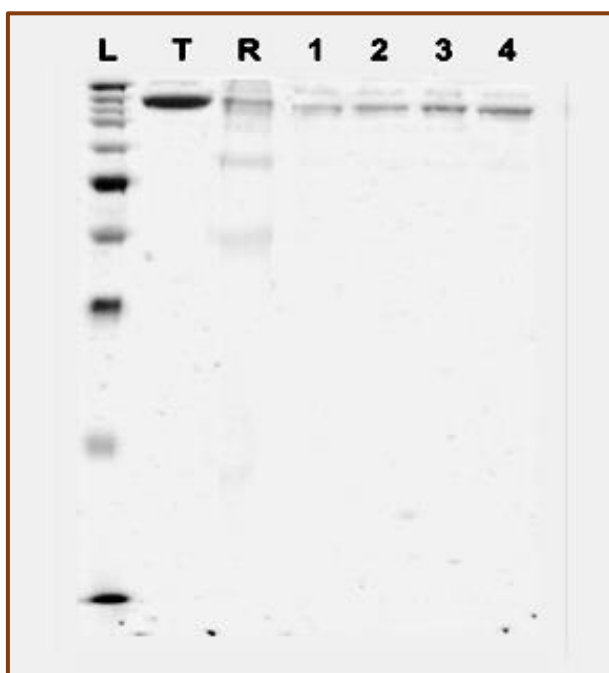
Ebből levonható a következtetés, hogy az antitesthez nem kapcsolódott rekonjugálószer, igazoltuk, hogy amennyiben a láncközi diszulfidok nem redukálódtak, a BuPi (**82**) nem talál

megfelelő reakciópartnert az antitesten. Amennyiben a BuPi (**82**) nem lenne cisztein szelektív, hanem például lizinhez is kötődne, ez esetben redukálószer nélkül is végbement volna a kapcsolódás.

4.8. A konjugátum GSH stabilitása

Az antitest-BuPi konjugátum intaktságát GSH modellvegyülettel vizsgáltuk. Ezt az indokolta, hogy a konjugátum az emberi szervezetbe kerülve GSH-val találkozhat, és fennáll annak a veszélye, hogy a szabad tiolcsoportok reakcióba lépnek a rekonjugált diszulfidhidakkal. A kísérlet során trasztuzumab oldathoz 40 ekvivalens rekonjugálószerrel adtam, majd fél órán keresztül inkubáltam az oldatot. Ezt követően 20 ekvivalens TCEP-et (**6**) pipettáztam hozzá, majd további 2 órán keresztül inkubáltam. Az oldatot puffercserével tisztítottam.

Az így előállított konjugátumokhoz irodalmi módszer alapján GSH-t adtam (40%) és 37 °C-on inkubáltam. 1, 2, 4 és 24 óra elteltével mintákat vettem, majd SDS-PAGE segítségével vizsgáltam őket.⁴⁶ A 38. ábrán látható, hogy 24 óra elteltével is stabil maradt a konjugátum, hiszen főként teljesen rekonjugált antitest látható az 4. számú oszlopban is.



38. ábra: GSH stabilitás vizsgálat eredménye SDS-PAGE-el. L: protein referencia (létra); T: trasztuzumab; R: redukált trasztuzumab; 1.: 1 h minta; 2.: 2 h minta; 3.: 4 h minta; 4.: 24 h minta

Az SDS-PAGE denzitometriás eredményeit értékelve (4. táblázat) azt a következtetést vontuk le, hogy 4 órán keresztül teljesen stabil maradt a konjugátum. Ezen felül 24 óra elteltével

is a teljesen rekonjugált antitestek négyötöde megmaradt. A négyórás stabilitás pedig elegendő, mivel jellemzően ennyi idő alatt már el tud jutni az antitest a célsejtekhez és ott az antigénhez kötődés után internalizálódik.

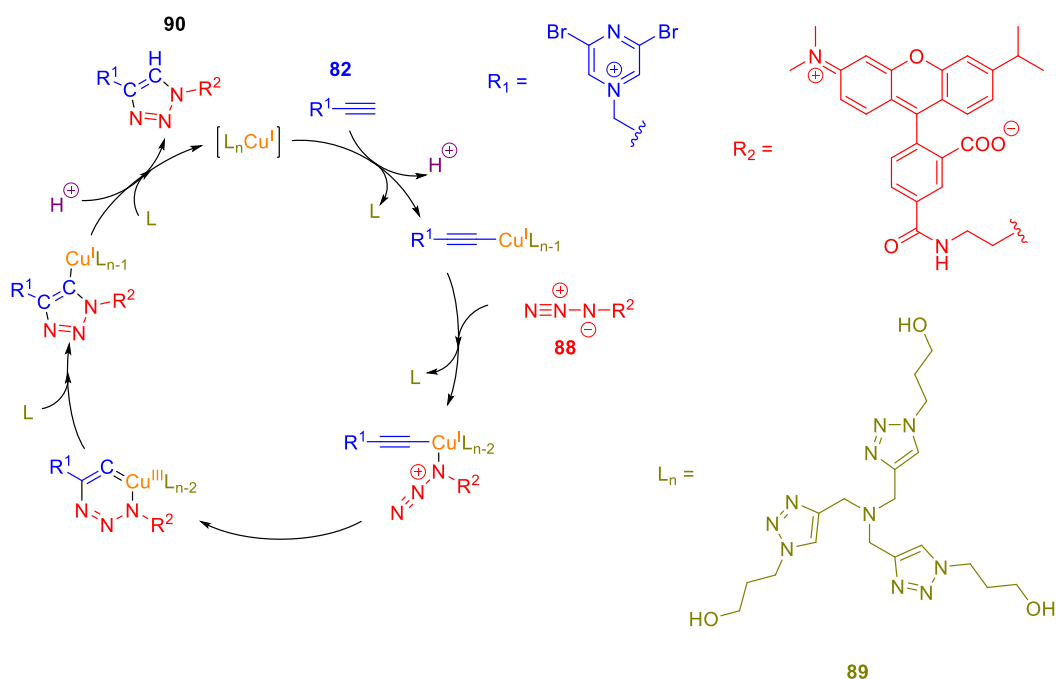
	0 h	1 h	2 h	4 h	24 h
TR (%)	93	91	92	92	82
HHL (%)	2	3	3	4	9
HH (%)	4	5	4	2	5
HL (%)	1	1	1	2	4
H+L (%)	0	0	0	0	0

4. táblázat: SDS-PAGE denzitometriás értékelése a GSH stabilitás vizsgálatról

4.9. Terminális azid-alkin [3+2] cikloaddíció

A réz-katalizált azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíció a klikk reakciók egyik legnépszerűbb fajtája. 1961-ben Huisgen figyelte meg, hogy termikus aktiválás hatására az azidok és az alkinek között reakció megy végbe, amelyben 1,2,3-triazolok regioizomerjei képződnek.⁴⁷ Sharpless és Meldal 2002-ben mutatták be, hogy Cu(I) ionok jelenlétében a reakció sokkal gyorsabb, nagyobb termelést eredményez és regioszelektív is, hiszen csak 1,4-szubsztituált triazol képződik.^{48,49}

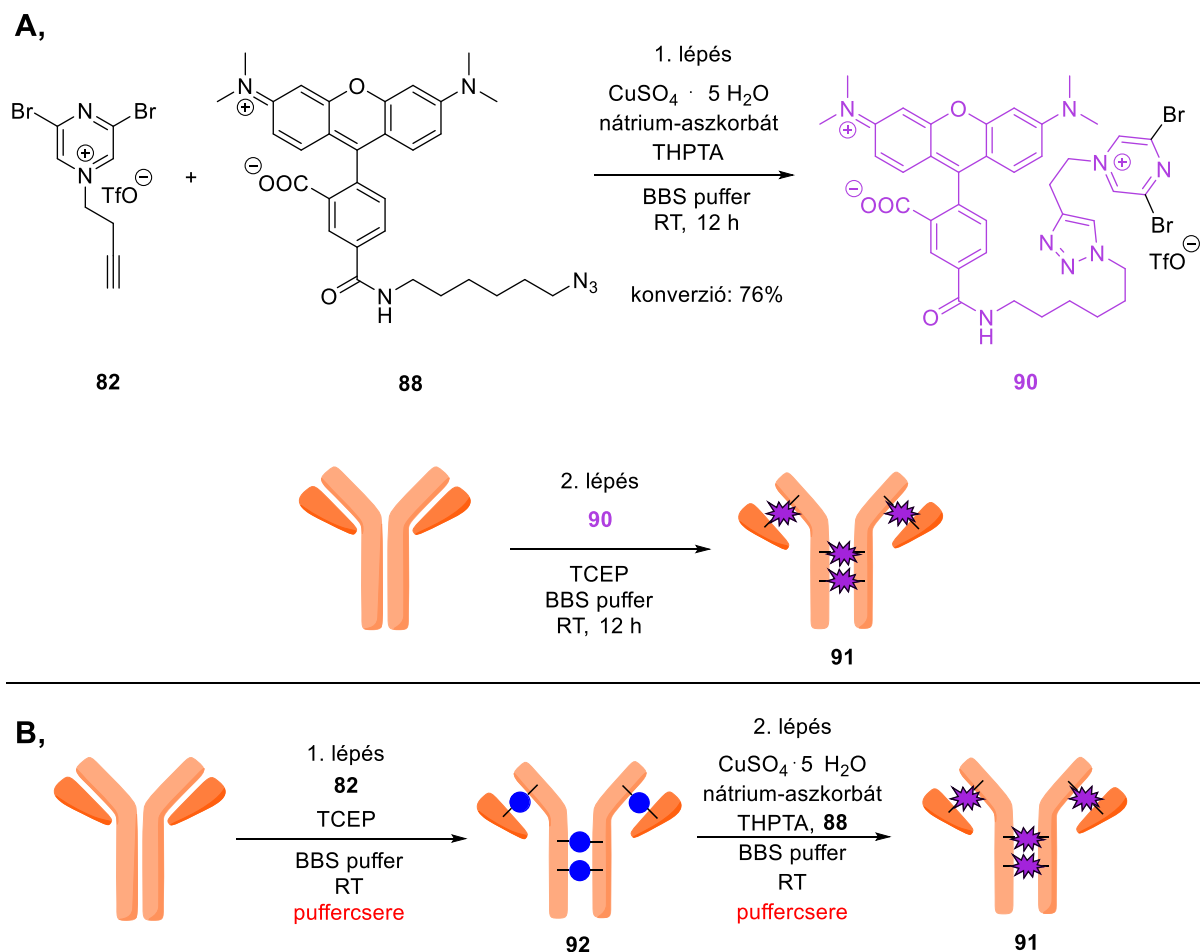
Ez a klikk reakció azért olyan kedvelt, mert enyhe reakciókörülmények mellett, kemo- és regioszelektíven, jó termeléssel, melléktermék képződése nélkül játszódik le. Nem érzékeny levegőre és vízre sem, széles pH tartományban alkalmazható és RT-en is lejátszódik.⁵⁰ A reakció általános sémája és az általam használt vegyületek képlete a 39. ábrán látható.



39. ábra: Rézkatalizált azid-alkin cikloaddíció mechanizmusa és az alkalmazott vegyületek képlete

Munkám során prokatalizátorként kristályvizes réz-szulfátot használtam. A kapcsolni kívánt azid az 5-karboxitetrametilrodamin-azid, röviden TAMRA (**88**) fluorofór volt. Ligandumként *tris*-((3-hidroxi-propil-triazolil)-metil)-amint (THPTA, **89**) és redukálószerként a réz-(I)-ionok előállításához nátrium-aszkorbátot használtam.

Kísérleteim során a BuPi (**82**) vizes-, az azid DMSO-s, a THPTA, a nátrium-aszkorbát és a réz-szulfát vizes oldatát mértem össze. A reakció 1 éjszaka alatt játszódott le 76%-os konverzióval. A terméket nem izoláltam, a konverziót HPLC-MS alapján számítottam. Ezután ezt az elegyet adtam az antitesthez, és a benne található összekapcsolt termékkel (**90**) végeztem el a rekonjugációt (40.A ábra).



40. ábra: (A) Klikk reakció, majd rekonjugáció, (B) Rekonjugáció, majd klikk reakció

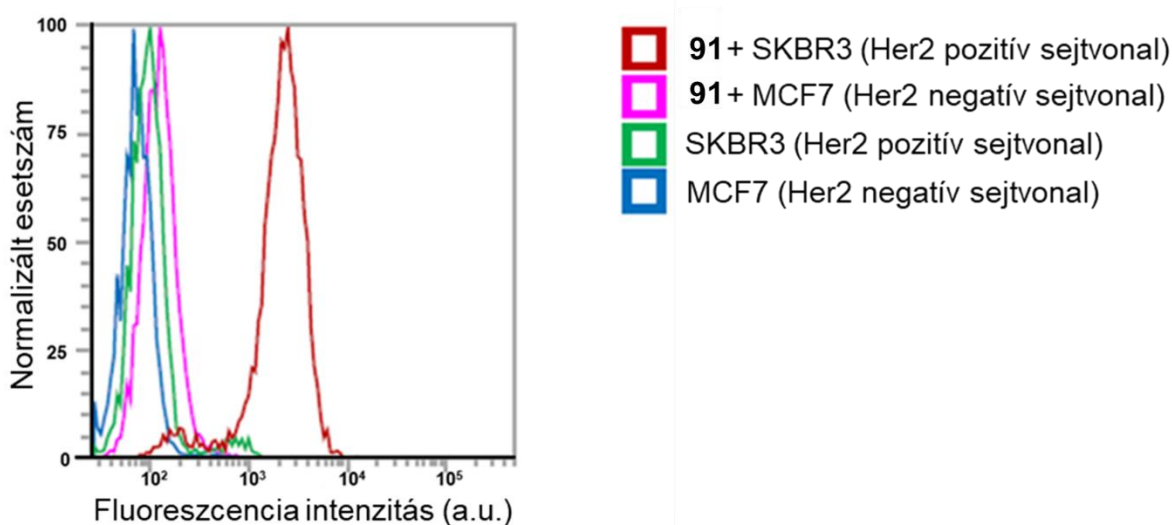
Az így kapott konjugátumnak felvettem az UV/Vis spektrumát, és meghatároztam a FAR értékét. Ezzel a módszerrel FAR = 2 értéket sikerült elérnem.

Olyan klikk reakciót is megvalósítottam, amelynél nem az első lépés volt a **82** alkin és a **88** azid cikloaddíciója, hanem először a rekonjugációs lépést hajtottam végre, majd a rekonjugálószer-antitest konjugátumhoz (**92**) adtam hozzá a klikk reakció reagenseit (40.b ábra). Ezzel a módszerrel is 2-es FAR értéket sikerült elérnem. Az alacsony FAR érték megoldására kutatócsoportunkban számos ötlet született, melyek között az egyik, hogy egy olyan festékkel tervezzük a klikk reakciókat, amely hosszabb linkerrel rendelkezik, mint a TAMRA azid. Az ötlet forrása, hogy mivel a reakciók nagy részénél a 2-es FAR-t sikerült elérnünk, ezért valószínűleg csak a két könnyű- és nehézlánc közötti láncközi diszulfid kötés közé illeszkedett be a festék, mivel ez nagy eséllyel szterikusan könnyebben hozzáférhető. A két nehézlánc közé valószínűleg a rövid oldallánccal rendelkező TAMRA nem fért oda, ami miatt nem addicionálódott a rekonjugálószerhez.

4.10. Áramlási citometria (FACS) és mikroszkópos felvételek

A FACS (fluorescence activated cell sorter) az áramlási citometria egyik típusa, amely a sejteket egyszerre több paraméterük, pl.: fluoreszcenciájuk mértéke alapján képes szétválogatni és kvantitatívan jellemezni őket.

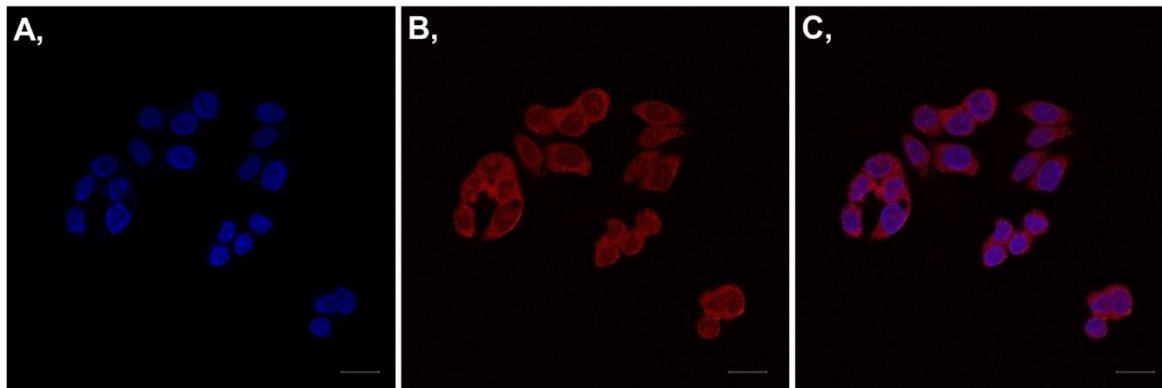
Az általunk rekonjugált antitestekkel Dr. Váradi György és Müller Dalma különféle sejteken végeztek FACS vizsgálatot, amiből arra következtethettünk, hogy mennyi sejtet tudott jelölni az antitest konjugátum. A mérés az SKBR3 (Her2+) és MCF7 (Her2-) sejtvonalakon történt. A 41. ábrán a mérés eredményét szemléltetem, amelyen az látható, hogy a TAMRA azid-antitest konjugátummal jelölt pozitív SKBR3 sejtpopuláció fluoreszcenciája szignifikánsan, több nagyságrenddel nagyobb, mint a sejtek alapjele, illetve a konjugátummal kezelt negatív MCF7 sejté. Ez azt jelenti, hogy csak ezekhez a sejtekhez kapcsolódott a fluorofór. A többi sejt nagyságrendekkel kisebb fluoreszcenciát mutatott, tehát ezekhez nem kapcsolódott az általam előállított konjugátum.



41. ábra: Fluorofórral rekonjugált antitestek FACS vizsgálatának eredménye

A fluorofór-antitest konjugátummal kezelt sejteket konfokális mikroszkóppal is megvizsgálták. Ennek során a SKOV3 Her2+ sejteket a rekonjugált trasztuzumabbal jelölték, sejt felszíni klikk reakciót végeztek el, majd mosási és fixálási lépések után készítettek róluk felvételeket a mikroszkóppal (42. ábra). Az **A** felvételen 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) jelölt sejtmagok láthatóak. Az **B** képen a TAMRA azid sejt körül dúsuló piros színe jelzi a sejt felszínhez való kötődését az antitest konjugátumnak, ahol az antigének is találhatóak. Az ábra **C** részén pedig az **A** és **B** kép egyesített felvétele látható. A felvételek bizonyítják, hogy a

Her2+ sejteket a konjugátum megfelelően jelölte. Tehát igazolható, hogy a trasztuzumab a rekonjugáció után is megtartotta szelektív antigén felismerő képességét.



42. ábra: Konfokális mikroszkópos felvételek. A: DAPI sejtmag festékkal jelölt sejtek (kék), B: fluorofór-antitest konjugátumok (piros), C: egyesített felvétel. A skála 10 mikron.

5. Kísérleti rész

5.1. Alkalmazott anyagok, készülékek és vizsgálati módszerek

5.1.1. Alkalmazott anyagok

A felhasznált trasztuzumab antitest a Genentech Inc., az alkalmazott vegyszerek a Sigma-Aldrich, Thermo Fisher és a VWR International vállalatoktól származnak.

5.1.2. Alkalmazott készülékek

A folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriai (HPLC-MS) méréseket Shimadzu LCMS-2020 típusú készülékkel készítettem 50-1000 m/z méréstartományban. A tiol-reaktivitás és stabilitás vizsgálatokat Dr. Petri László ugyanezen a készüléken mérte. A készülék Reprospher 100 C18 (5 μm ; 100x3mm) oszloppal, valamint pozitív és negatív kettős ionforrással (DUIS $\pm$) és kvadrupól MS analizátorral felszerelt. Az alkalmazott gradiens: 100% vízről indulva 2 perc alatt 100% acetonitril, 1 perc 45 másodpercig 100% acetonitrilt tartva, majd 45 másodperc alatt 100% víz, fél percig 100% vizet tartva (a mérés összesen 5 perc).

Az 1H és ^{13}C spektrumokat Varian Unity Inova 500 MHz típusú és Varian Unity Inova 300 MHz típusú NMR készüléken mértem TMS belső standarddal a megadott oldószerben. A csatolási állandókat (J) Hz-ben, a kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben rögzítettem.

Az olvadáspont értékeket Jasco SRS OptiMelt készülékkel mértem meg.

Az moláris abszorpciós koeficiensek meghatározásához az abszorbancia spektrumokat Jasco V-750 készüléken 10 mm-es négyszögletű kvarcküvetében, 1 nm-es sáv szélességben, 1nm-enként gyűjtött adatokkal, 400 nm/perc felvételi sebességgel 220 és 750 nm között vettem fel. Az antitestről és az antitest konjugátumokról készült UV/Vis spektrumokat Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer készüléken és SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices; San Jose, CA) készüléken abszorbancia módban a megfelelő hullámhosszokon (252, 280, 552 nm) BBS puffer háttérrel vettem fel.

Az antitest oldatokat Eppendorf Centrifuge 5810 R készüléken centrifugáltam.

A sejtek fluoreszcenciáját Attune NxT áramlási citométerrel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mérték a TTK-EI Onkológiai Biomarker Kutatócsoportban. Az eredményeket Attune NxT Software v3.1.2 szoftverrel értékelték ki. A fluoreszcens jeleket az egyesével álló sejteken kék lézeres gerjesztéssel (488 nm) a BL1 csatornában (530/30)

vizsgálták. A konfokális mikroszkópiát a TTK-KPI Összehasonlító Pszichofiziológiai Kutatócsoportban Zeiss LSM 710 Confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany) mikroszkóppal végezték.

5.1.3. Alkalmazott vizsgálati módszerek

5.1.3.1. SDS-PAGE

Az SDS-PAGE géllap elkészítéséhez kétféle gél, egy alsó- és egy felső gél, öntünk. Az alsó- vagy szeparáló gélhez laponként 2 ml 30 m/m%-os akrilamid-bisakrilamid (19:1) oldat, 2,25 ml 1 mol/dm³-es *tris*-(hidroximetil)-amino-metán (Tris) puffer (pH = 8,8), 60 µl 10 m/m% nátrium-dodecil-szulfát (SDS) oldat, 1,68 ml ultratiszta víz, 45 µl telített kálium-perszulfát-oldat és 5 µl *N,N,N',N'*-tetrametiletán-1,2-diamin (TEMED) szükséges, amelyeket egy főzőpohárban összekeverünk és üveglapok közé öntjük. Ezt követően a gél felszínére izopropil-alkoholt rétegzünk. Az alsó gél polimerizációja 1 óra alatt játszódik le.

A felső- vagy tömörítő gélhez laponként 334 µl 30 m/m%-os akrilamid-bisakrilamid (19:1) oldat, 250 µl 1 mol/dm³-es *tris*-(hidroximetil)-amino-metán (Tris) puffer (pH = 6,8), 20 µl 10 m/m% nátrium-dodecil-szulfát (SDS) oldat, 1,36 ml ultratiszta víz, 20 µl telített kálium-perszulfát-oldat és 4 µl *N,N,N',N'*-tetrametiletán-1,2-diamin (TEMED) szükséges, amelyeket egy főzőpohárban összekeverjük, majd ezt az izopropil-alkohol kiöntése és ultratiszta vizes mosás után az alsó gélre öntjük. A minták helyét egy 1 mm vastag fésű behelyezésével alakítjuk ki. A felső gél polimerizációja 15 percet vesz igénybe.

Ezt követően előkészítjük a mintákat. Az antitest oldatoknak abszorbancia méréssel meghatározzuk a koncentrációját, majd $4 \cdot 10^{-5}$ µmol-t pipetázunk Eppendorf csőbe. Ehhez 5 µl mintapuffert (1 g SDS, 3 ml glicerin, 6 ml 0,5 mol/dm³ Tris puffer pH = 6,8, 2 mg R-250 festék) adunk, majd az így előkészített mintákat 65 °C-on 5 percig melegítjük Eppendorf® ThermoMixer® C segítségével. Ezt követően a megkötött gél a futtató kádba helyezük, melyet feltöltünk futtató pufferrel (30 g Tris, 144,4 g glicin, 10 g SDS 1000 ml ioncserélt víz, majd ebből 100 ml-t mérőhengerben kimérünk és 1000 ml-re hígítjuk). A mintákat a fésű eltávolítása után betöltjük a zsebekbe, az első zsebbe 5 µl protein referenciát (létra, ProSieve® Quadcolor™ Protein Marker, 4,6-300 kDa), a másodikba 1 µl trasztuzumab referencia oldatot és 5 µl mintapuffert, a harmadikba pedig 25 µl redukált trasztuzumab oldatot és szintén 5 µl mintapuffert, a további zsebekbe pedig az aktuális minták kerültek. Ezután bekapcsoljuk a stabilizátort (powerPRO 3AMP), melyet konstans áramerősségre állítunk (200 mA). 30-40 perc

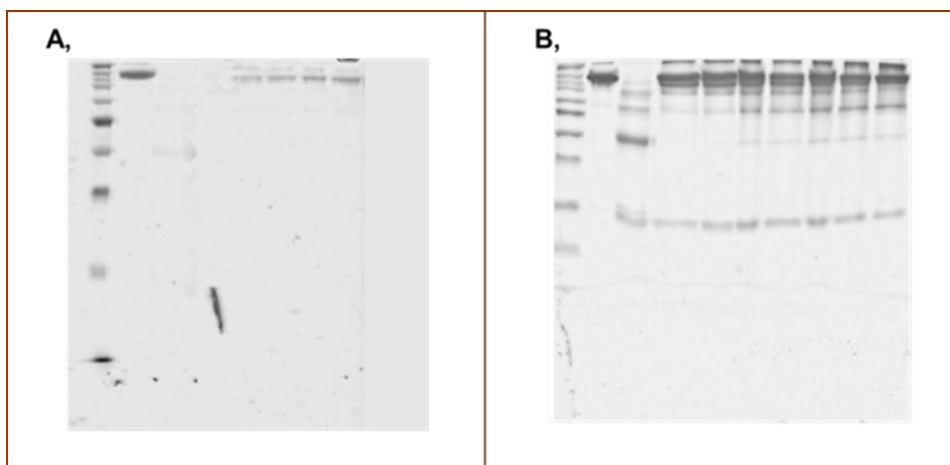
elteltével a kész gélt kétszer mossuk forró ioncserélt vízzel, majd Coomassie-festékkel (0,12 g Coomassie-blue G-250, 0,1 g Coomassie-blue R-250, 500 ml MeOH, 400 ml ioncserélt víz, 100 ml AcOH) festjük. Ioncserélt vizes mosást követően 1 éjszaka elteltével láthatóvá váltak a gélen a megfestett minták.

5.1.3.2. SDS-PAGE denzitometriás kiértékelése

A denzitometriás kiértékeléseket szakirodalomban meghatározott módszerrel végezzük el.⁴¹ A géllapokat nyomtató (esetemben HP Deskjet1350) segítségével szkenneljük 600 dpi felbontással tif formátumban. A képeket alapértelmezett fényerő, kontraszt- és gamma beállításokkal mentjük el. A géllapokat ImageJ alkalmazásával értékeljük ki. A háttérkorrekciót gördülő paraboloiddal és simítással érjük el. A kép típusánál a 32 bites beállítást választjuk ki, amellyel fekete-fehér képet kapunk.

A vizsgálni kívánt minta oszlopát kijelölés után *Select first lane*, majd *Plot lanes* parancsokkal analizálva egy görbét kapunk. A csúcsok integrálásával a program kiszámítja a görbe alatti területet. Ebből az egyes csúcsok százalékos arányát ki tudjuk számítani. A csúcsok azonosítását a protein referencia alapján tudjuk elvégezni. Így a teljesen rekonjugált, a HHL, HH, HL és H+L fragmentumok tömegét ismerve az egyes sávokhoz (és csúcsokhoz) hozzárendeljük a nem teljesen rekonjugált antitest fragmentum típusát. A H+L fragmentumok együttes meghatározásának oka, hogy ezek gyakran nem látszanak a géllapokon megfelelően és így az együttes meghatározásuk pontosabb eredményt szolgáltat.

A 43. ábrán egy tipikusan jó és rossz rekonjugáció eredményét mutatom be az SDS-PAGE géllapokon elektroforézis és előhívás után. Az A képen látható, hogy a protein referencia, a trasztuzumab és a redukált trasztuzumab után következő minták esetében teljesen rekonjugált antitestek keletkeztek. A B ábráról elmondható, hogy jelentős fragmentáció lépett fel, sok HHL, HH, HL és H vagy L fragmentum keletkezett.

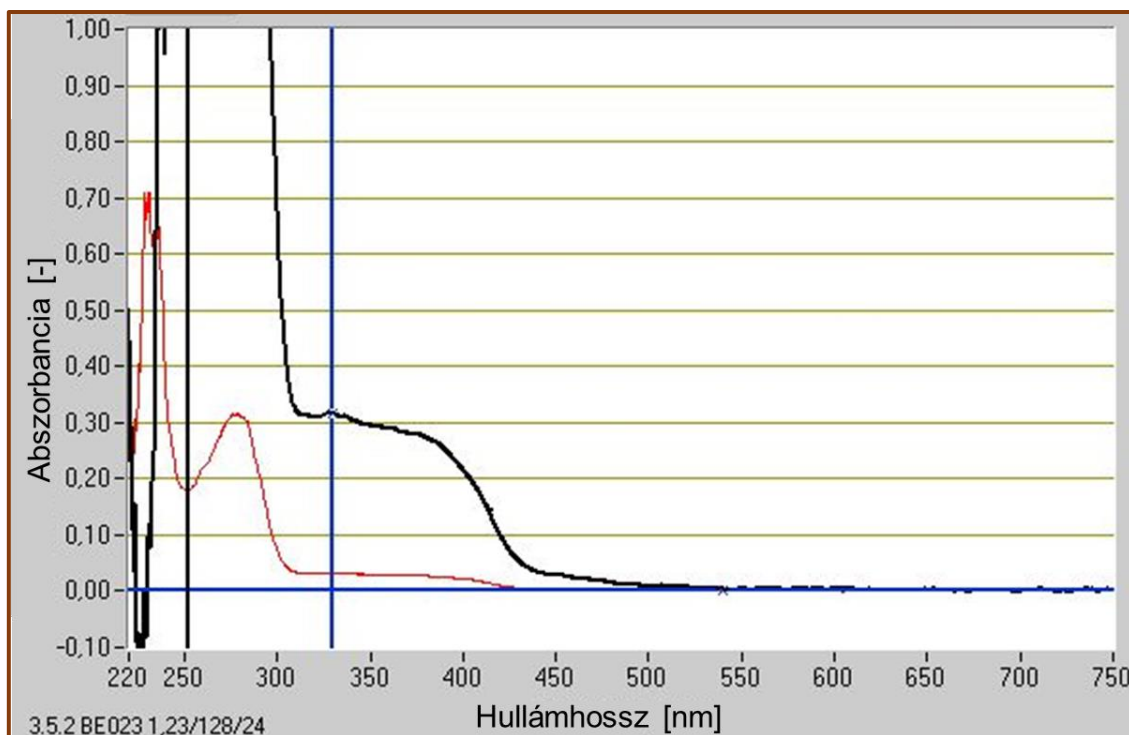


43. ábra: (a) jó rekonjugáció, (b) rossz rekonjugáció

5.1.3.3. Moláris abszorpciós koefficiens, DAR és FAR meghatározása

A moláris abszorpciós koefficiensek meghatározásához oldatsorozatokat készítünk. Az oldatok 2,0; 3,5; 5,0; 7,5; 10,0 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ koncentrációjúak, BBS puffer oldószerrel készítjük. A mérési eredményeket vakmintával korrigáljuk. A megadott koncentrációjú oldatoknak felvesszük az abszorbancia spektrumát, majd a 4.6. fejezetben leírtak szerint meghatározzuk a moláris abszorpciós koefficiensek értékét.

A DAR meghatározásához először a megfelelő antitest konjugátum oldat abszorbanciáját határozzuk meg 252 és 330 nm-en. A DAR számításához szükséges koncentrációkat az adott hullámhosszokon meghatározott moláris abszorpciós koefficiensek (BuPi (**82**) és trasztuzumab (T)) segítségével, illetve a mért abszorbancia értékekkel és a mérés során felhasznált küvetta fényútjával tudjuk meghatározni egy kétismeretlenes egyenletrendszer megoldásával. Az 44. ábrán egy T-BuPi konjugátum UV/Vis spektruma látható, amelyet egy példaszámításra használok fel.



44. ábra: T-BuPi konjugátum abszorbancia spektruma (NanoDrop képernyőkép)

Az abszorbancia adatokból a Lambert-Beer törvény segítségével meghatározhatóak a koncentrációk:

$$A^{252 \text{ nm}} = \varepsilon_{\text{BuPi}}^{252 \text{ nm}} \cdot l \cdot c_{\text{BuPi}} + \varepsilon_T^{252 \text{ nm}} \cdot l \cdot c_T$$

$$A^{330 \text{ nm}} = \varepsilon_{\text{BuPi}}^{330 \text{ nm}} \cdot l \cdot c_{\text{BuPi}} + \varepsilon_T^{330 \text{ nm}} \cdot l \cdot c_T$$

Behelyettesítve a mért abszorbancia értékeket és a megfelelő moláris abszorpciós koefficienseket, valamint $l = 0,1 \text{ cm}$:

$$1,542 = 336,8 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 0,1 \text{ cm} \cdot c_{\text{BuPi}} + 7656,5 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 0,1 \text{ cm} \cdot c_T$$

$$0,316 = 453,8 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 0,1 \text{ cm} \cdot c_{\text{BuPi}} + 0 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 0,1 \text{ cm} \cdot c_T$$

A kétismeretlenes egyenletrendszert megoldva és a koncentráció értékeket 10^6 -al szorozva:

$$c_{\text{BuPi}} = 696,3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}$$

$$c_T = 170,5 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}$$

$$DAR = \frac{c_{\text{BuPi}}}{c_T}$$

$$DAR = 4,08$$

A FAR számítása ezzel analóg módon történik. Az 45. ábrán egy fluorofór-antitest konjugátum UV/Vis spektruma látható. E konjugátum FAR értékének meghatározására a következő egyenletrendszert oldottam meg:

$$A_{252\text{ nm}} = \varepsilon_{252\text{ nm},TAMRA} \cdot l \cdot c_{TAMRA} + \varepsilon_{252\text{ nm},T} \cdot l \cdot c_T$$

$$A_{552\text{ nm}} = \varepsilon_{552\text{ nm},TAMRA} \cdot l \cdot c_{TAMRA} + \varepsilon_{552\text{ nm},T} \cdot l \cdot c_T$$

Behelyettesítve a mért abszorbanca értékeket és a megfelelő moláris abszorpciós koefficienseket, valamint $l = 0,1\text{ cm}$:

$$0,918 = 39657 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 0,1\text{ cm} \cdot c_{TAMRA} + 76565 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 0,1\text{ cm} \cdot c_T$$

$$0,443 = 37456 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 0,1\text{ cm} \cdot c_{TAMRA} + 0 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 0,1\text{ cm} \cdot c_T$$

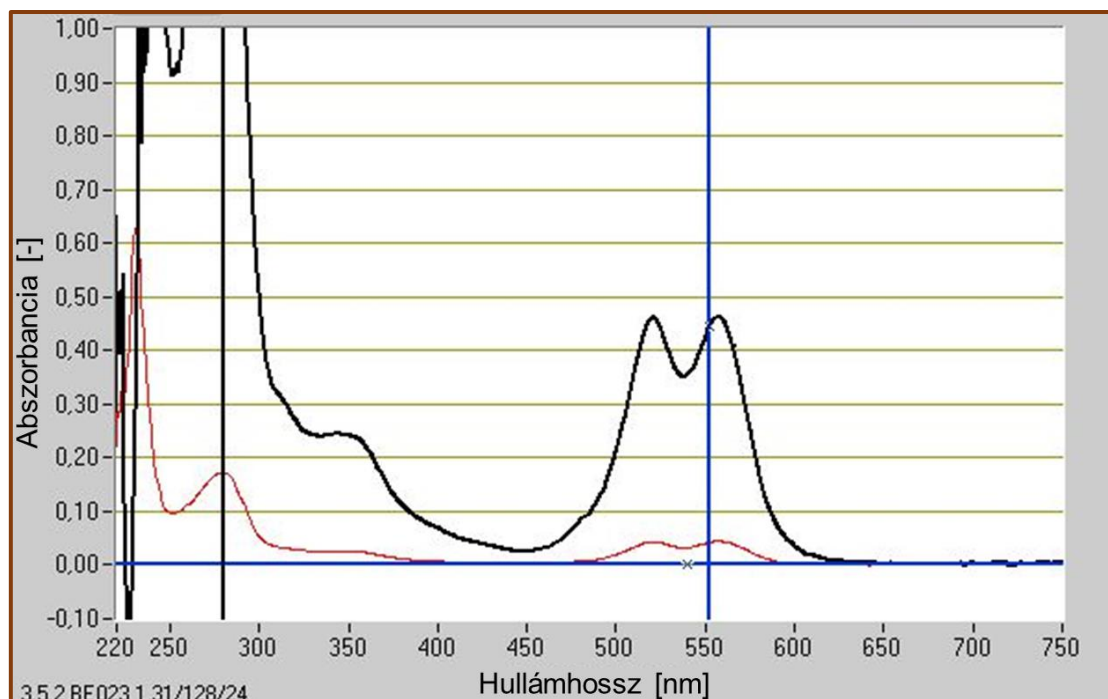
A kétismeretlenes egyenletrendszert megoldva és a koncentráció értékeket 10^6 -nal SZOROSVA:

$$c_{TAMRA} = 118,3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}$$

$$c_T = 58,6 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}$$

$$FAR = \frac{c_{TAMRA}}{c_T}$$

$$FAR = \frac{118,3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}}{58,6 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}} = 2,02$$



45. ábra: Egy fluorofór-antitest konjugátum abszorbancia spektruma (NanoDrop képernyőkép)

5.1.3.4. Áramlási citometria (FACS)

Az áramlási citometriai mérésekhez az MCF7 (Her2-) és az SKBR3 (Her2+) emlőtumor sejtvonalakat használtak fel, melyeket 10% FBS (EuroClone), 100 egység/ml penicillin, 100 mg/ml sztreptomicin és 0,25 µg/ml amfotericin B (Lonza) tartalmú DMEM (Gibco) médiumban, 37°C hőmérsékleten, 5% CO₂ tartalmú nedves levegőt tároló inkubátorban inkubáltak.

A sejteket 0,25% tripszint tartalmazó oldat (Corning) segítségével gyűjtötték össze, majd adagonként 10⁵ nagyságrendnyi sejtet porcióztak ki. A sejteket 30 percig, szobahőmérsékleten, sötétben, 200 µl 20 µg/ml koncentrációjú (3% BSA tartalmú PBS-ben hígított) antitesttel inkubálták. Az ezt követő mosásokat 500 µl puffer (1% FBS, 0,1% nátrium-azid és 0,5 mM EDTA tartalmú PBS) felhasználásával végezték. Az áramlási citometriai méréshez 500 µl PBS-t adtak a sejtekhez.

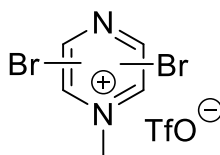
5.1.3.5. Konfokális mikroszkópia

A T-BuPi konjugátum élő, sejtés környezetben való vizsgálatához a TTK-KPI Összehasonlító Pszichofiziológiai Kutatócsoportban SKOV3 sejtvonalat használtak. Passzálás

után 1 ml szuszpenzált sejtes médiumot (megközelítőleg 200000db sejt/ml) 24 óra alatt fedőlemezre inkubálták, majd fixálták (10 perc 4% paraformaldehid). Az aspecifikus kötődés megakadályozására 4% borjú szérum albumin blokkoló oldattal (PBS-ben) kezelték, majd 1 órán át inkubálták a sejteket 20µg/ml T-BuPi oldattal (50µl, PBS-ben oldva). A klikk reakciót egy éjszakán át végezték szobahőmérsékleten, 1ml reakcióelegy került a sejtekre: 25µM TAMRA, 50µM CuSO₄, 1mM THPTA és 0,01 mM nátrium-aszkorbát összetételben. A sejteket DAPI-t tartalmazó Vectashielddel fedték, majd konfokális mikroszkóppal készítették el a képeket (Zeiss LSM 710 Confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany)).

5.2. Elvégzett szintézisek leírása

2,3-;2,5-;2,6-Dibróm-1-metilpirazin-1-ium-trifluormetánszulfonát (77)



Egy lombikba bemérünk 5 ml MeCN-t és 104,7 mg 2,3- vagy 2,5- vagy 2,6-dibrómpirazint (**71a**; **71b**; **71c**) (0,44 mmol) oldunk fel benne. Hozzáadunk 48 µl metil-trifluormetánszulfonátot (**76**) (72,2 g, 0,44 mmol, 1 ekv.) és sötétben 30 percig kevertetjük. Bepároljuk, majd hozzáadunk háromszor 50 ml MeCN-t és egyszer 50 ml DKM-t és minden alkalommal újra bepároljuk. A nyersterméket 5 ml diizopropil-éterrel eldörzsöljük, majd jéggel hűtjük, a kivált kristályokat szűrjük és dietil-éterrel mossuk.

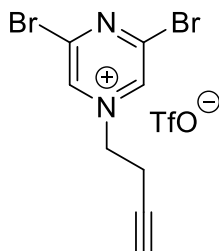
77a termelés: 35,0 mg (18%), barna kristály, op. 70-72 °C (Et₂O); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,79 (d, *J* = 4,03 Hz, 1H, ArH), 7,18 (d, *J* = 4,03 Hz, 1H, ArH), 3,51 (s, 3H, NCH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) 132,8 (=CH), 122,3 (=CH), 108,1 (C=), 92,1 (C=), 35,5 (NCH₃) ppm. HRMS: [M+H]⁺mért: 250,8811, számított: 250,8813.

77b termelés: 83,6 mg (45%), barna kristály, op. 119-121 °C (Et₂O); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,11 (s, 1H, ArH), 7,86 (s, 1H, ArH), 3,43 (s, 3H, NCH₃) ppm; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) 147,5 (=CH), 133,2 (=CH), 113,0 (C=), 90,5 (C=), 36,9 (NCH₃) ppm. HRMS: [M+H]⁺mért: 250,8811, számított: 250,8813.

77c termelés: 64,5 mg (34%), világosbarna kristály, op. 189-191 °C (Et₂O); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,07(s, 2H, ArH), 4,36 (s, 3H, NCH₃) ppm; ¹³C NMR (125 MHz,

MeCN- d_3) δ 142,4 (=CH), 140,1 (C=), 49,0 (NCH₃) ppm. HRMS: [M+H]⁺mért: 250,8817, számított: 250,8813.

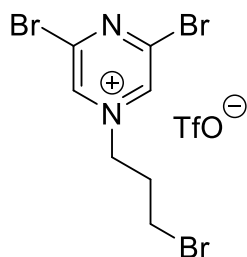
3,5-Dibróm-1-N-but-3-in-1-il-pirazin-1-ium-trifluormetánszulfonát (82)



Egy többnyakú lombikot ellátunk keverőmaggal, csepegtető tölcsérrel, hőmérővel, gázbevezető csomaggal, illetve buborékszámolóval. Nitrogén atmoszféra alatt bemérünk 0,15 ml but-3-in-1-olt (**79**) (0,14 g, 2,0 mmol, 4,0 ekv.), 0,13 g nátrium karbonátot (1,30 mmol, 2,6 ekv.) és 40 ml DKM-t, majd -50 °C-ra hűtjük kevertetés közben a lombik tartalmát. Miután lehűlt az oldat, belecsepegtetünk 0,42 ml trifluormetánszulfonsav-anhidridet (**80**) (0,70 g, 2,5 mmol, 5,0 ekv.), majd 3 órán keresztül kevertetjük sötétben és bepároljuk. Egy másik, egynyakú lombikba bemérünk 80 ml MeCN-t és 0,12 g 2,6-dibrómpirazint (**71c**) (0,5 mmol) és kevertetjük az oldódás végéig. Ehhez hozzáadjuk a bepárolt alkilezőszert (**81**) és 1 éjszakán át kevertetjük. A reakcióelegyet szilikagélre pároljuk, majd 5% vizet tartalmazó MeCN-nel átnedvesített normál fázisú szilikagél oszlopon kromatografáljuk. A megfelelő frakciók összepárlása után éterrel eldörzsöljük az anyagot és leszűrjük.

Termelés: 0,152 g (69%), sárga kristály, op. 195-196 °C (Et₂O); ¹H NMR (500 MHz, MeCN- d_3) δ 9,15 (s, 2H, ArH), 4,72 (t, J = 6,71 Hz, 2H, NCH₂), 3,03-2,98 (m, 2H, CH₂), 2,59 (t, J = 3,05 Hz, 1H, HC≡) ppm; ¹³C NMR (MeCN- d_3 , 125 MHz) δ 142,8 (=CH), 139,1 (C=), 77,3 (C=), 74,5 (≡CH), 60,8 (NCH₂), 20,2 (CH₂) ppm. HRMS: [M+H]⁺mért: 288,8966, számított: 288,8970.

3,5-Dibróm-1-(3-brómpropil)-pirazin-1-ium-trifluormetánszulfonát (**85**)

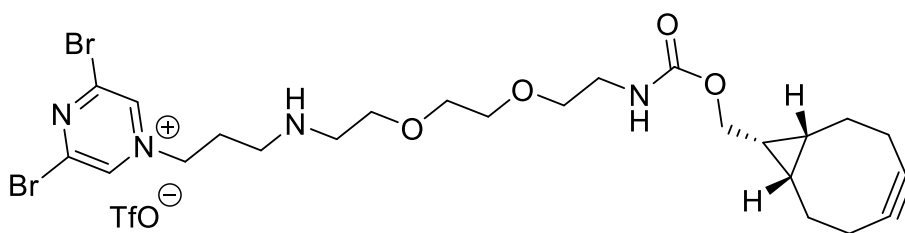


Egy többnyakú lombikot ellátunk keverőmaggal, csepegtetőtölcsérrel, hőmérővel és gázbevezető csomaggal, illetve buborékszámológóval. A lombikba bemérünk 30 ml DKM-t és -78°C -ra hűtjük. Feloldunk 5 ml DKM-ban 0,46 ml 3-brómpropán-1-olt (**83**) (0,84 g, 6 mmol, 4,8 ekv.) hozzáadunk 485 μl piridint (6 mmol), majd hozzáadjuk a reakcióelegyhez. A lombikba 0,855 ml trifluormetánszulfonsav-anhidridet (**80**) (1,43g, 5,1 mmol, 4,0 ekv.) csepegtetünk. A reakcióelegyet még 5 percen keresztül -78°C -on, majd további 1 órán keresztül 0°C -on kevertetjük.

A reakcióelegyet bepároljuk. Egy lombikba bemérünk 100 ml MeCN-t és hozzáadunk kevertetés közben 300 mg 2,6-dibrómpirazint (**71c**) (1,26 mmol) és az előzőleg bepárolt alkilezőszert (**84**). A lombik tartalmát 1 órán keresztül kevertetjük, majd bepároljuk. 5 ml etanolból átkristályosítjuk. 10 ml diizopropil-étert adunk hozzá, majd szűrjük.

Termelés: 0,417 g (65%), fehér kristály, op. $208\text{--}210^{\circ}\text{C}$ ($i\text{-Pr}_2\text{O}$); ^1H NMR (500 MHz, $\text{MeCN-}d_3$) δ 9,16 (s, 2H, ArH), 4,74 (t, $J = 6,71$ Hz, 2H, NCH_2), 3,58 (t, $J = 6,10$ Hz, 2H, CH_2), 2,66 - 2,58 (m, 2H, CH_2) ppm; ^{13}C NMR ($\text{MeCN-}d_3$, 125 MHz) δ 143,1 ($=\text{CH}$), 139,4 ($\text{C}=\text{N}$), 61,6 (NCH_2), 32,7 (CH_2), 59,9 (CH_2), 28,2 (CH_2) ppm. HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ mért: 356,8228, számított: 356,8232.

1-(1-((1R,8S,9S)-biciklo[6.1.0]non-4-in-9-yl)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4,13-diazaheptadecán-16-yl)-3,5-dibrómpirazin-1-ium-trifluormetánszulfonát (**87**)



Egy lombikba bemérünk 40 ml MeCN-t, majd kevertetés közben hozzáadunk 66 mg 3,5-dibróm-1-(3-brómpropil)-pirazin-1-ium-trifluormetánszulfonátot (**85**) (0,13 mmol, 1 ekv.) és 42 mg ((1R,8S,9s)-biciklo[6.1.0]non-4-in-9-il)metil-(2-(2-(2-aminoetoxi)-etoxi)-etil)-karbamátot (**86**) (0,13 mmol). Fél órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetjük. Bepárlást követően preparatív HPLC segítségével (MeCN:H₂O) tisztítjuk a terméket, majd a megfelelő frakciókat liofilizáljuk.

Termelés: 19 mg (24%), barna kristály, op. 85-87 °C (MeCN:H₂O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9,98 (s, 1H, NH), 8,02 (s, 1H, NH), 7,22 (d, *J* = 3,05 Hz, 2H, ArH), 4,24-4,11 (m, 1H, CH₂), 3,85-3,79 (m, 1H, CH₂), 3,76-3,47 (m, 8H, CH₂), 3,41-3,30 (m, 2H, CH₂), 3,29-3,21 (m, 1H, CH₂), 3,13-2,89 (m, 2H, CH₂), 2,83-2,72 (m, 1H, HC), 2,55-2,34 (m, 1H, HC), 2,29-2,14 (m, 2H, CH₂), 2,05-1,45 (m, 9H, CH₂), 1,44-1,28 (m, 2H, CH₂), 1,27 (s, 1H, HC) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 143,1 (C=O), 137,3 (2xC=), 128,9 (2x=CH), 93,1 (-C≡), 70,2 (2xOCH₂), 66,6 (OCH₂), 62,9 (OCH₂), 62,7 (OCH₂), 61,3 (N⁺CH₂), 48,0 (CH), 40,8 (NHCH₂), 40,2 (2xCH₂), 33,5 (2xCH₂), 30,7 (2xCH) ppm. HRMS: [M+H]⁺mért: 601,1017, számított: 601,1019.

5.3. Kémiai biológiai rész

A BBS puffer (25 mM bórax, 25 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 2% DMSO) pH értéke mindig 8,0. Amennyiben ettől eltérő a pH érték, azt a BBS puffer neve mögött tüntetem fel.

5.3.1. Trasztuzumab oldat készítés

A trasztuzumab oldatot Herceptin[®] készítményből állítjuk elő. A kívánt koncentráció eléréséhez 18 mg trasztuzumabot kimérünk analitikai mérleg segítségével, majd 1 ml ultratiszta vízben feloldjuk. Az oldatot Eppendorf Centrifuge 5810 R készüléken Amicon[®] Ultra – 0,5 Centrifugal Filter Unit membránszűrővel centrifugáljuk 14000 g-vel 15 percen keresztül. Másik gyűjtőcsőbe helyezve a szűrőt további 1000 g-n 2 percig centrifugáljuk, majd a kapott oldatot 500 µl BBS pufferrel hígítjuk. A trasztuzumab oldat koncentrációjának meghatározásához abszorbancia spektrumot veszünk fel. Ebből a 280 nm-en mért abszorbancia értéket (mivel itt nem számolunk DAR értéket, ezért 280 nm hullámhosszon mértünk, a szükséges moláris abszorpciós koefficiens szakirodalomból kerestük ki) és a Lambert-Beer törvényt felhasználva meghatároztuk a koncentrációt és az így kapott oldatot használjuk fel rekonjugációk megvalósítására.

5.3.2. Trasztuzumab próbarekonjugációja BuPi-val (82)

A BBS pufferben lévő T-oldathoz (10,87 µl, 46 µM, $5 \cdot 10^{-4}$ µmol) 4 °C-on hozzáadunk MeCN oldószerben lévő BuPi-oldatot (1,85 µl, 10 mM, 37 ekv.) és 84,78 µl BBS puffert, majd 0,5 órán át 4 °C-on inkubáljuk. Ezután hozzáadjuk a szintén előhűtött TCEP oldatot (2,5 µl, 4 mM, 20 ekv.), majd további 16 órán át 4 °C-on inkubáljuk.

Az így rekonjugált antitestet ezután hatszor puffercserével tisztítjuk A puffercserét Vivaspin 500 membránszűrővel hatszor 10 percen keresztül végezzük 15000 g-n.

5.3.3. BuPi (82) rekonjugációk optimalizálása

5.3.3.1. Hőmérséklet optimalizálása

A BBS pufferben lévő T-oldathoz (49,83 µM, $1,25 \cdot 10^{-3}$ µmol, 25,1 µl) 4 °C-on/szobahőmérsékleten/37 °C-on hozzáadunk a szintén BBS pufferben lévő BuPi-oldatot (4,63 µl, 10 mM, 37 ekv.) és 214 µl BBS puffert, majd 0,5 órán át 4 °C-on/szobahőmérsékleten/37 °C-on inkubáljuk. Ezután hozzáadjuk az előhűtött vizes TCEP oldatot (6,25 µl, 4 mM, 20 ekv). Továbbra is 4 °C-on/szobahőmérsékleten/37°C-on tartva 24 órán át vezetjük a reakciót és 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h időknél 50 µl mintát veszünk.

A mintákat ezt követően hatszor puffercserével tisztítjuk 4 °C-on/szobahőmérsékleten/37 °C-on. A puffercserét Vivaspin 500 membránszűrővel hatszor 10 percen keresztül végezzük.

5.3.3.2. Rekonjugálószer feleslegének optimalizálása

A BBS pufferben lévő T-oldathoz (35,12 µl, 49,83 µM, $1,75 \cdot 10^{-3}$ µmol) szobahőmérsékleten hozzáadunk a szintén BBS pufferben lévő BuPi-oldatot (0,88 µl, 10 mM, 5 ekv.)/(1,75 µl, 10 mM, 10 ekv.)/(3,5 µl, 10 mM, 20 ekv.)/(7 µl, 10 mM, 40 ekv.) és 341,3 µl-re egészítettem ki az oldatot BBS pufferrel, majd 0,5 órán át RT-on inkubáljuk. Ezután hozzáadjuk az előhűtött, vizes TCEP oldatot (8,75 µl, 4 mM, 20 ekv). Továbbra is szobahőmérsékleten tartva 8 órán át vezetjük a reakciót és 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h időknél 50 µl mintát veszünk.

A mintákat ezt követően hatszor puffercserével tisztítjuk szobahőmérsékleten. A puffercserét Vivaspin 500 membránszűrővel hatszor 10 percen keresztül végezzük.

5.3.3.3. pH optimalizálása

A BBS pufferben (pH = 7,4; 8,0; 8,6) lévő T-oldathoz (25,1 μ l, 49,83 μ M, $1,25 \cdot 10^{-3}$ μ mol) szobahőmérsékleten hozzáadunk szintén BBS pufferben lévő BuPi-oldatot (4,63 μ l, 10 mM, 37 ekv.) és 214 μ l BBS puffert (pH = 7,4; 8,0; 8,6), majd 0,5 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezután hozzáadjuk az előhűtött vizes TCEP oldatot (6,25 μ l, 4 mM, 20 ekv.). Továbbra is szobahőmérsékleten tartva 24 órán át vezetjük a reakciót és 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h időknél 50 μ l mintát veszünk.

A mintákat ezt követően hatszor 10 percre puffercserével tisztítjuk szobahőmérsékleten. A puffercserét Vivaspin 500 membránszűrővel végezzük.

5.3.4. BuPi (82) cisztein szelektivitás vizsgálata

A T-oldathoz (130 μ l, 46 μ M, $6,5 \cdot 10^{-4}$ μ mol) szobahőmérsékleten hozzáadunk BuPi-oldatot DMSO oldószerben (2,4 μ l, 10 mM, 37 ekv.) és 130 μ l-re egészítjük ki BBS pufferrel, majd 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezt követően Zeba™ Spin 7K MWCO, 0,5 ml géliszűrő használatával puffercserét végzünk. Ennek során a géliszűrő alját eltávolítjuk és a tetején lévő kupakot meglazítjuk, de nem csavarjuk le teljesen. A szűrőt egy gyűjtőcsőbe helyezük, majd 1 percre 1500 g-n centrifugáljuk. 300 μ l BBS puffert töltünk a géliszűrőre, majd háromszor 1 percre újra 1500 g-n centrifugáljuk. A szűrőt egy új gyűjtőcsőbe helyezük és rátöltjük a 130 μ l mintánkat. 1500 g-n 2 percre centrifugáljuk.

5.3.5. T-BuPi GSH stabilitás vizsgálat

A T-oldathoz (46 μ M, 27,17 μ l, $1,25 \cdot 10^{-3}$ μ mol) RT hozzáadunk MeCN oldószerben lévő BuPi-oldatot (5 μ l, 10 mM, 40 ekv.) és 250 μ l-re egészítjük ki BBS pufferrel, majd 0,5 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután hozzáadtuk az előhűtött TCEP vizes oldatát (6,75 μ l, 4 mM, 20 ekv.), majd további 2 órán át RT-on inkubáljuk.

Az így rekonjugált antitestet ezután hatszor 10 percre keresztül puffercserével tisztítjuk Vivaspin500 használatával.

Az így előállított és tisztított antitesthez ezután 5,5 μ l 10 mM GSH (BBS pufferben) oldatot adunk (0,13 ekvivalens, $5 \cdot 10^{-3}$ μ mol). A reakcióelegyet ezután 37 °C-on inkubáljuk. Mintát veszünk 1, 2, 4 és 24 óra elteltével.

5.3.6. Azid-alkin cikloaddíciós reakció és rekonjugáció

Klikk reakció, majd rekonjugáció

Egy 10 ml-es lombikb bemérünk 6,25 μ l TAMRA oldatot (20 mM, DMSO-ban oldva), 5 μ l THPTA oldatot (100mM, PBS-ben oldva), 5 μ l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ oldatot (20 mM, vízben oldva), 5 μ l BuPi oldatot (25 mM, vízben oldva), 1,1 μ l Na-aszorbát oldatot (120 mM, vízben oldva) és 2,65 μ l PBS oldatot, majd 1 éjszakán keresztül rázatjuk.

T-oldathoz (13,5 μ l, 48,14 μ M, $6,5 \cdot 10^{-4}$ μ mol) szobahőmérsékleten hozzáadjuk az előző pontban elkészített reakcióelegyből 5,2 μ l-t és 108 μ l BBS (pH = 8) oldatot. Majd 0,5 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezután hozzáadjuk az előhűtött vizes TCEP oldatot (3,25 μ l, 4 mM), majd további 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk.

Az így rekonjugált antitestet ezután hatszor 10 percig puffercserével tisztítjuk Vivaspin500 használatával.

Rekonjugáció, majd klikk reakció

A T-oldathoz (55,55 μ l, 44,74 μ M, 0,0025 μ mol) szobahőmérsékleten hozzáadjuk a BuPi-oldatot vízben oldva (4 μ l, 25 mM, 40 ekv.) és 427,6 μ l BBS oldatot, majd 0,5 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezután hozzáadtuk az előhűtött vizes TCEP oldatot (12,5 μ l, 4 mM, 20 ekv.), majd további 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk.

Az így rekonjugált antitestet ezután hatszor 10 percen keresztül puffercseréltük. Az így kapott oldatnak felvesszük az abszorbancia spektrumát és meghatározzuk ebből a koncentrációt és a DAR-t.

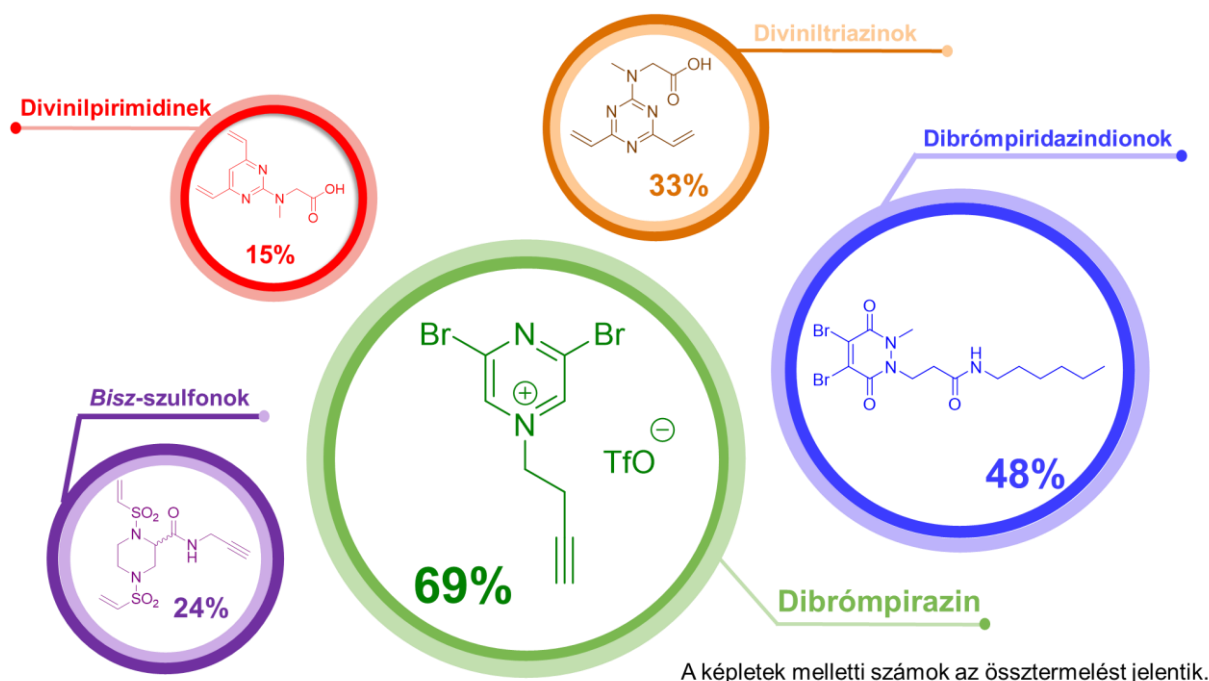
Az előzőekben elkészített T-BuPi oldathoz (59,77 μ M, 13 μ l, 0,00078 μ mol), hozzáadtunk 0,3 μ l (0,003 μ mol, 40 ekv.) THPTA oldatot, 0,3 μ l (0,0062 μ mol, 8 ekv.) CuSO_4 oldatot, 0,39 μ l (0,0078 μ mol, 10 ekv.) TAMRA oldatot és 0,61 μ l Na-aszorbát oldatot, majd 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk.

Az így rekonjugált antitestet ezután hatszor 10 percen keresztül puffercserével tisztítjuk Vivaspin 500 használatával.

6. Összefoglalás

Az ADC-k növekvő felhasználása hívta életre az antitestmódosítás során használt linkerek és rekonjugálók fejlesztését. A jelenleg használt és a szakirodalomban leírt, az antitestek diszulfidhídjait redukció után újrakötő rekonjugálók többnyire költséges, és soklépéses szintézisekben állíthatók elő, gyenge termeléssel. Így érdemesnek találtuk egy új, kismolekulás rekonjugálószer fejlesztését, amely a lehető legkevesebb lépésben, olcsón előállítható.

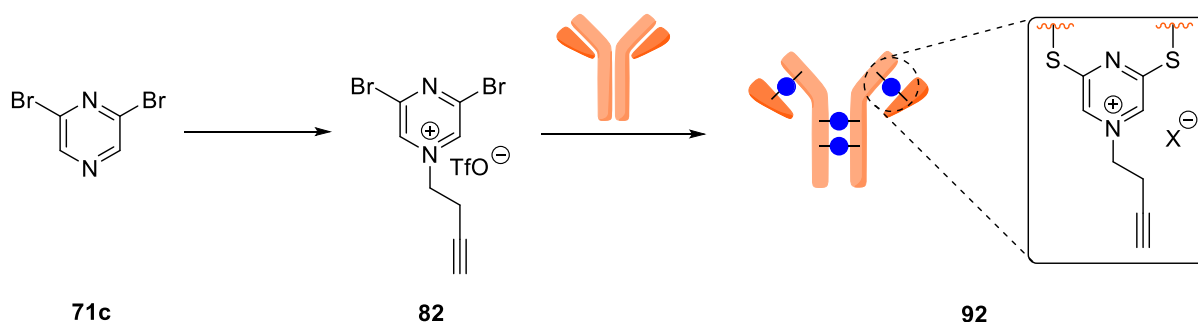
Munkám során kétlépéses szintézisben, jó termeléssel sikerült előállítanom egy eddig nem ismert rekonjugálószer (46. ábra). Az ehhez felhasznált anyagok egyszerű és költséghatékony molekulák voltak. Az előállított pirazinszármazék egy vizes oldatban stabil és tiol-reaktív vegyület.



46. ábra: Különböző rekonjugálók össztermeléseinek összehasonlítása

A szintetizált pirazinszármazékkal trasztuzumab antitest rekonjugálását valósítottam meg helyszelektív módszerrel (47. ábra). A rekonjugáció hőmérséklet, rekonjugálószer felesleg és pH optimalizálását is végrehajtottam. A továbbiakban SDS-PAGE vizsgálattal igazoltam, hogy a keletkezett antitest konjugátumok teljesen rekonjugálódtak és nem teljesen rekonjugált antitest fragmentumok (például félantitestek) csak minimális arányban keletkeztek. UV/Vis spektroszkópia segítségével pedig azt bizonyítottam be, hogy a konjugátumok rekonjugálószer-

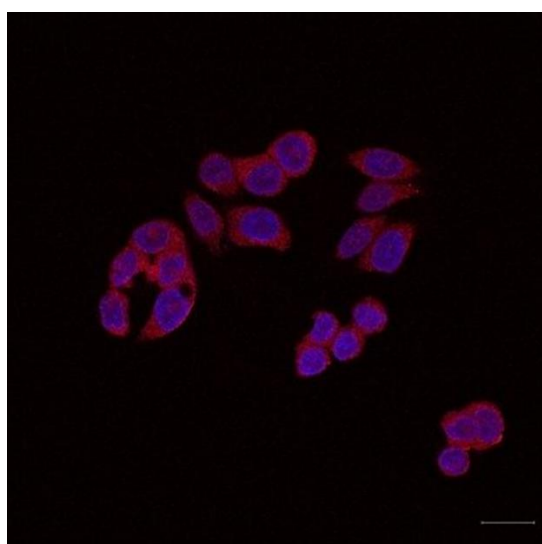
antitest aránya (DAR) négy, ami optimális. A rekonjugáció során 95%-os homogenitást sikerült elérnem.



47. ábra: Rekonjugálószer szintézise és antitestmódosítás

GSH stabilitás vizsgálat alapján a rekonjugált antitestekről elmondható, hogy a vizsgált 24 óra alatt a termék háromnegyede maradt változatlan formában jelen az oldatban és 4 órán át szinte teljesen stabil maradt a konjugátum. A négyórás stabilitás elegendő, mivel többnyire ennyi idő alatt már el tud jutni az antitest a célsejtekhez és ott az antigénhez kötődés után internalizálódni tud.

A rekonjugálószerhez egy fluorofórt is kapcsoltam, amellyel lehetővé vált mikroszkópos vizsgálatok elvégzése sejtmetszeteken, illetve áramlási citometriás mérések is. Erre azért volt szükség, hogy megbizonyosodjak arról, hogy a rekonjugált antitest megtartotta-e a szelektivitását Her2⁺ sejtek felé. A 48. ábrán látható, hogy a trasztuzumab a rekonjugáció után is megtartotta szelektív antigén felismerő képességét.



48. ábra: Konfokál mikroszkópos felvétel a konjugátummal jelölt Her2⁺ sejtekről

Az eredmények összegezve kijelenthető, hogy egy új, szelektív rekonjugálószer sikerült fejleszteni, ami a jövőben alkalmazható lehet az onkológiai diagnosztikában.

7. Irodalomjegyzék

- (1) Liu, J.; Ting, J. P.; Al-azzam, S.; Ding, Y.; Afshar, S. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–71.
- (2) Lu, R. M.; Hwang, Y. C.; Liu, I. J.; Lee, C. C.; Tsai, H. Z.; Li, H. J.; Wu, H. C. *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 1–30.
- (3) Sochaj, A. M.; Świdarska, K. W.; Otlewski, J. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 775–784.
- (4) Blankenship, K. “12. Herceptin.” *FiercePharma*, **2020**. július 27. www.fiercepharma.com/special-report/top-20-drugs-by-global-sales-2019-herceptin. Megnyitva: 2021.08.10.
- (5) “Kadcyla.” *ED Store*, 2021, egyptiandrugstore.com/index.php?route=product/product&product_id=2791. Megnyitva: 2021.08.13.
- (6) Megget, K. “Antibody–Drug Conjugates Drive Growth in Oncology.” *Chemistry World*, **2021**. május 26., www.chemistryworld.com/news/antibody-drug-conjugates-drive-growth-in-oncology/4013371.article. Megnyitva: 2021.08.16.
- (7) Ravichandran, S.; Verma, G. *Biotechnology Business - Concept to Delivery*; © Springer Nature Switzerland AG, **2020**.
- (8) Su, Z.; Xiao, D.; Xie, F.; Liu, L.; Wang, Y.; Fan, S.; Zhou, X.; Li, S. *Acta Pharm. Sin. B* **2021**.
- (9) Forte, N.; Chudasama, V.; Baker, J. R. *Drug Discovery Today: Technol.* **2018**, *30*, 11–20.
- (10) Keeley, A.; Ábrányi-Balogh, P.; Hrast, M.; Imre, T.; Ilaš, J.; Gobec, S.; Keserű, G. M. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2018**, *351*, 1–7.
- (11) Keeley, A.; Ábrányi-Balogh, P.; Keserű, G. M. *MedChemComm* **2019**, *10*, 263–267.
- (12) Matos, M. J.; Navo, C. D.; Hakala, T.; Ferhati, X.; Guerreiro, A.; Hartmann, D.; Bernardim, B.; Saar, K. L.; Compañón, I.; Corzana, F.; Knowles, T. P. J.; Jiménez-Osés, G.; Bernardes, G. J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 6640–6644.
- (13) Britannica, The Editors of Encyclopaedia. “antibody”. *Encyclopedia Britannica*, **2020**. május 27., <https://www.britannica.com/science/antibody>. Megnyitva: 2021.08.06.
- (14) Ludwig, D. L.; Pereira, D. S.; Zhu, Z.; Hicklin, D. J.; Bohlen, P. *Oncogene* **2003**, *22*, 9097–9106.
- (15) Absolute Antibody. “Antibody Structure.” *Absolute Antibody*, **2019**. szeptember 17., absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-structure. Megnyitva: 2021.08.06.
- (16) Antibody | Definition, Structure, Function, & Types.” *Encyclopedia Britannica*, **2020**, www.britannica.com/science/antibody#/media/1/27783/17658. Megnyitva: 2021.08.07.
- (17) Dean, L.; Kane, M. *Med. Genet. Summ.* **2021**, 1–12.
- (18) Bartsch, R.; Wenzel, C.; Steger, G. G. *Biol. Targets Ther.* **2007**, *1*, 19–31.

- (19) EPAR-összefoglaló a nyilvánosság számára, Herceptin. *European Medicines Agency*, **2018**, https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/herceptin-epar-summary-public_hu.pdf. Megnyitva: 2021.08.13.
- (20) Saber, H.; Leighton, J. K. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2015**, *71*, 444–452.
- (21) do Pazo, C.; Nawaz, K.; Webster, R. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 583–584.
- (22) Szepesi Kovács, D.; Hajdu, I.; Mészáros, G.; Wittner, L.; Meszéna, D.; Tóth, E. Z.; Hegedűs, Z.; Randelović, I.; Tóvári, J.; Szabó, T.; Szilágyi, B.; Milen, M.; Keserű, G. M.; Ábrányi-Balogh, P. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 12802–12807.
- (23) Toseland, C. P. *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 85–95.
- (24) Singh, R.; Maloney, E. K. *Anal. Biochem.* **2002**, *304*, 147–156.
- (25) Santarino, I. B.; Oliveira, S. C. B.; Oliveira-Brett, A. M. *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 114–117.
- (26) Seo, A.; Jackson, J. L.; Schuster, J. V.; Vardar-Ulu, D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *23*, 1–7.
- (27) Nunes, J. P. M.; Morais, M.; Vassileva, V.; Robinson E.; Rajkumar V. S.; Smith, M.; Barbara Pedley, R.; Caddick, S.; Baker, J. R.; Chudasama, V. *Chem. Commun.* , **2015**, *51*, 10624–10627.
- (28) Dewkar, G. K.; Carneiro, P. B.; Hartman, M. C. T. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4708–4711.
- (29) Ramos-Tomillero, I.; Perez-Chacon, G.; Somovilla-Crespo, B.; Sanchez-Madrid, F.; Domínguez, J. M.; Cuevas, C.; Zapata, J. M.; Rodríguez, H.; Albericio, F. *Bioconj. Chem.* **2018**, *29*, 1199–1208.
- (30) Walsh, S. J.; Omarjee, S.; Galloway, W. R.; Kwan, T.; Sore, H. F.; Parker, J. S.; Hyvönen, M.; Carroll, J. S.; Spring, D. R. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 694–700.
- (31) Robertson, N. S.; Walsh, S. J.; Fowler, E.; Yoshida, M.; Rowe, S. M.; Wu, Y.; Sore, H. F.; Parker, J. S.; Spring, D. R. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 9499–9502.
- (32) Counsell, A. J.; Walsh, S. J.; Robertson, N. S.; Sore, H. F.; Spring, D. R. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 4739–4743.
- (33) Bryant, P.; Pabst, M.; Badescu, G.; Bird, M.; McDowell, W.; Jamieson, E.; Swierkosz, J.; Jurlewicz, K.; Tommasi, R.; Henseleit, K.; Sheng, X.; Camper, N.; Manin, A.; Kozakowska, K.; Peciak, K.; Laurine, E.; Grygorash, R.; Kyle, A.; Morris, D.; Parekh, V.; Abhilash, A.; Choi, J. W.; Edwards, J.; Frigerio, M.; Baker, M. P.; Godwin, A. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 1872–1879.
- (34) Badescu, G.; Bryant, P.; Bird, M.; Henseleit, K.; Swierkosz, J.; Parekh, V.; Tommasi, R.; Pawlisz, E.; Jurlewicz, K.; Farys, M.; Camper, N.; Sheng, X.; Fisher, M.; Grygorash, R.; Kyle, A.; Abhilash, A.; Frigerio, M.; Edwards, J.; Godwin, A. *Bioconj. Chem.* **2014**, *25*, 1124–1136.
- (35) Huang, R.; Sheng, Y.; Wei, D.; Yu, J.; Chen, H.; Jiang, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *190*, 112080.

-
- (36) Lee, M. T. W.; Maruani, A.; Richards, D. A.; Baker, J. R.; Caddick, S.; Chudasama, V. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2056–2060.
- (37) Schumacher, F. F.; Nunes, J. P. M.; Maruani, A.; Chudasama, V.; Smith, M.; Chester, K. A.; Baker, J. R.; Caddick, S. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7261–7269.
- (38) Schumacher, F. F.; Nobles, M.; Ryan, C. P.; Smith, M. E. B.; Tinker, A.; Caddick, S.; Baker, J. R. *Bioconj. Chem.* **2011**, *22*, 132–136.
- (39) Castañeda, L.; Wright, Z. V. F.; Marculescu, C.; Tran, T. M.; Chudasama, V.; Maruani, A.; Hull, E. A.; Nunes, J. P. M.; Fitzmaurice, R. J.; Smith, M.; Jones, L. H.; Caddick, S.; Baker, J. R. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3493–3495.
- (40) Morais, M.; Nunes, J. P. M.; Karu, K.; Forte, N.; Benni, I.; Smith, M.; Caddick, S.; Chudasama, V.; Baker, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2947–2952.
- (41) Bahou, C.; Richards, D. A.; Maruani, A.; Love, E. A.; Javaid, F.; Caddick, S.; Baker, J. R.; Chudasama, V. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 1359–1366.
- (42) Maruani, A.; Smith, M.; Miranda, E.; Chester, K. A.; Chudasama, V.; Caddick, S. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 2–10.
- (43) Schumacher, F. F.; Nunes, J. P. M.; Maruani, A.; Chudasama, V.; Smith, M.; Chester, K. A.; Baker, J. R.; Caddick, S. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 7261–7269.
- (44) Ábrányi-Balogh, P.; Petri, L.; Imre, T.; Szijj, P.; Scarpino, A.; Hrast, M.; Mitrović, A.; Fonovič, U. P.; Németh, K.; Barreteau, H.; Roper, D. I.; Horváti, K.; Ferenczy, G. G.; Kos, J.; Ilaš, J.; Gobec, S.; Keserű, G. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *160*, 94–107.
- (45) Wakankar, A. A.; Feeney, M. B.; Rivera, J.; Chen, Y.; Kim, M.; Sharma, V. K.; Wang, Y. J. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1588–1595.
- (46) Bahou, C.; Spears, R. J.; Aliev, A. E.; Maruani, A.; Fernandez, M.; Javaid, F.; Szijj, P. A.; Baker, J. R.; Chudasama, V. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 14829–14832.
- (47) Huisgen, R. *Proceedings of the Chemical Society* **1961**, 357.
- (48) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- (49) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- (50) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *1*, 51.