



ELTE EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

36. OTDK, Biológia Szekció

**FELTÉTELESEN FOTOAKTIVÁLHATÓ,
CÉLZOTT HATÓANYAGLEADÁS
IN VITRO MODELLEZÉSÉRE ALKALMAS
SEJTES TESZTRENDSZEREK FEJLESZTÉSE**

Készítette:

Csorba Zsóka

MSc. IV. féléves hallgató

Témavezető:

Dr. Németh Krisztina

tudományos főmunkatárs

Természettudományi Kutatóközpont

Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet, Kémiai Biológia Kutatócsoport

Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológia Intézet

2022



Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítés jegyzék	3
Köszönetnyilvánítás	4
Bevezetés	5
Célkitűzések	10
Anyagok és módszerek.....	11
FA-peptid konjugátumok előállítása	11
Sejtvonalak fenntartása	11
Sejtek transzfektálása	12
Sejtek jelölése	13
Konfokális mikroszkópiás felvételek készítése	14
Eredmények	15
Extracelluláris receptor modell: IR-TAG	15
IR-TAG jelölése tetrazin-kapcsolt „üres” védőcsoporttal	15
IR-TAG jelölése feltételesen fotolabilis modell-vegyülettel	17
Ligandum-Receptor alapú célzott hatóanyagleadó modellrendszer	19
Összefoglalás	27
Szerzői hozzájárulás	28
Irodalomjegyzék.....	29

Rövidítés jegyzék

COS7 *Cerophtecus aethiops* (zöld majom) vese sejt

DMSO dimetil-szulfoxid

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA etilén-diamin-tetraecetsav

FBS *Fetal Bovine Serum*

HEK *Human Embryonic Kidney* (sejtkultúra)

HeLa *Human cervix* sejtvonal

HEPES 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav

IR inzulin-receptor

PBS *Phosphate Buffered Saline*

RPMI *Roswell Park Memorial Institute Medium*

BCN *biszciklononin*

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni végtelen hálámat témavezetőm, Dr. Németh Krisztina felé, akire nem csak TDK munkám során, de az elmúlt 3 évben mindenben számíhattam és rengeteget tanulhattam tőle.

Köszönettel tartozom Dr. Bojtár Mártonnak, illetve Albitz Evelinnek, akik a Tet-COU-PEG védőcsoport, a Tet-COU-PEG-MitoSir modellvegyület, és a MitoSir festék előállítását végezték. Továbbá köszönettel tartozom Póti Ádám Leventének, akinek a folsav-peptid-BCN hordozómolekulát köszönhetem.

Szeretném megköszönni a kutatócsoportunk vezetőjének, Dr. Kele Péternek, hogy a csoport tagja lehetek és dolgozatomat a Kémiai Biológia Kutatócsoportban készíthettem el.

Bevezetés

Szervezetünkbe jutatott biológiailag aktív vegyületeknek (pl. kemoterápiás szerek) csupán **töredéke** hasznosul, ráadásul nem feltétlenül **ott** és **akkor** realizálódik hatásuk, ahol szükség lenne rá. Az elmúlt évtizedekben nagyívű fejlődésen mentek keresztül az olyan komplex hatóanyagleadó rendszerek, melyek biológiailag aktív vegyületek **térben** és **időben kontrollált felszabadítását** teszik lehetővé. Ezek az ún. **célzott hatóanyagleadó rendszerek** a hagyományos kismolekulás gyógyszeres kezelésekhez (pl. **kemoterápiához**) képest nagyobb hatékonysággal, valamint szelektivitásuknak köszönhetően kevesebb mellékhatással rendelkeznek.¹

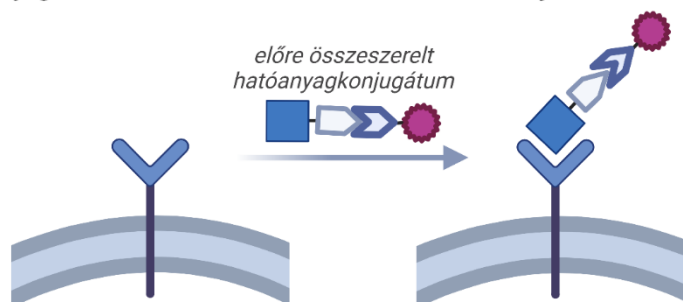
A tumor terápiákban alkalmazott célzott hatóanyagleadó rendszerek ezt két stratégia ötvöztetésével érik el: implementálnak egy hatóanyagot szelektíven a tumorkörnyezetbe juttató módszert (**tumor célzó rendszer**), illetve **hatóanyagleadó rendszert**, mely a terápiás szer lokális aktiválását végzi a tumorkörnyezetre korlátozva annak hatását.

A **tumort célzó rendszerek** olyan megkülönböztető jeleket aknáznak ki, melyek kifejezetten a rákos sejtekre vagy azok környezetére jellemzőek, ugyanakkor az egészséges szövetekre nem, vagy csökkent mértékben. Egyik ilyen tulajdonság a tumorsejtek megváltozott **sejtfelszíni receptormintázata**. Az ezt kihasználó rendszereket megkülönböztethetjük aszerint, hogy a hatóanyagot (drug) **célsejt specifikus** receptor **ligandumjához**, avagy a receptor ellen termeltetett **antitesthez** kapcsolt módon juttatják célba.² Megemlítendő ugyanakkor, hogy „**off-target**” toxicitás kialakulásához vezethet, ha a rákos sejtek ugyan nagyarányban fejezik ki felszínükön ezen receptorokat, de az egészséges szövetekben található receptorok számának abszolút értéke meghaladhatja a tumorszövetekéit.³

A) Pretargeting stratégia működési elve



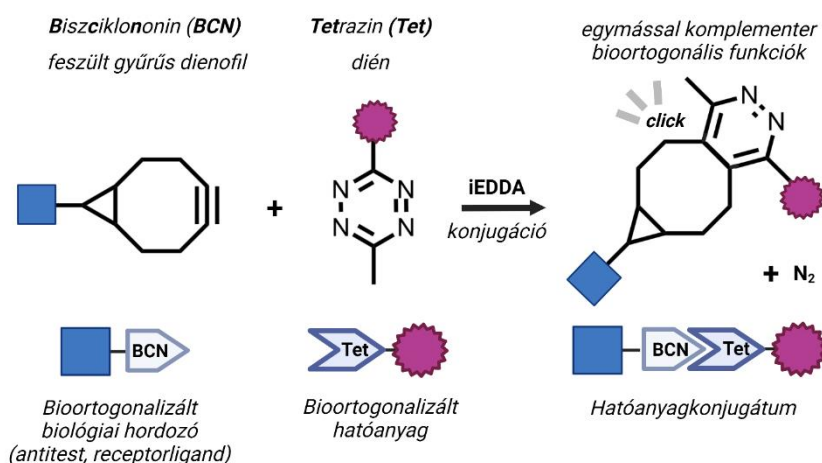
B) Hatóanyagok előre összeszerelt formában történő célbajuttatása



1. Ábra Pretargeting (A) és preclick (B) hatóanyag célbajuttatási stratégiák összehasonlítása

A célbajuttatás szelektivitása jelentősen növelhető, ha a terápiás szer **nem** hordozóhoz kapcsolva („preclick”) jut el a célsejtekhez, hanem csak lokálisan, **in situ** jön létre a **konjugáció**.⁴ Ezt „pretargeting” stratégiának nevezzük.⁵ (A két módszer összehasonlítását az **1. Ábra** jegyzi.)

In situ konjugáció megvalósítására alkalmas bioortogonális reakció (inverz elektronigényű Diels Alder reakció)

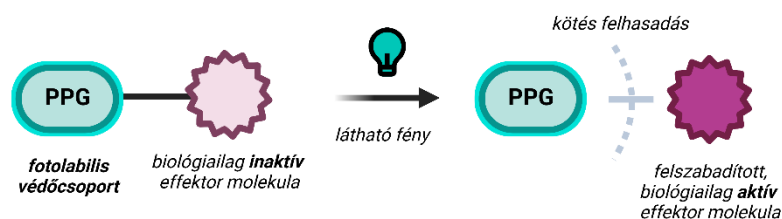


2. Ábra In situ konjugáció megvalósítására alkalmas bioortogonális reakció (inverz elektron igényű Diels-Alder reakció – iEDDA)

Ehhez a konjugációnak gyorsan és szelektíven kell lezajlania a szervezeten belül, toxikus melléktermékek keletkezése nélkül. Ilyen különleges reakciócsoportot alkotnak a **bioortogonális**

reakciók, melyek szervezetidegen funkciós csoportok között játszódnak le nagy szelektivitással és hatékonysággal fiziológiás körülmények közt.⁶ (A bioortogonális kémia jelentőségét mutatja, hogy 2022-ben kémiai Nobel-díjjal ismerték el.⁷) A konjugációhoz szükségeltetik a hordozó, illetve a kapcsolni kívánt hatóanyag funkcionálizálása egymással komplementer bioortogonális motívummal, melyek általában úgy kerülnek kiválasztásra, hogy inverz elektronigényű Diels Alder (iEDDA) reakció játszódjon le köztük (**2. Ábra**). Ez számít ugyanis az élő szervezetekben legszéleskörűbben alkalmazható reakciótípusnak teljes bioortogonalitásának, illetve különösen nagy reakciósebességének köszönhetően ($k_2=10^4\text{-}10^6\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^{4,8}

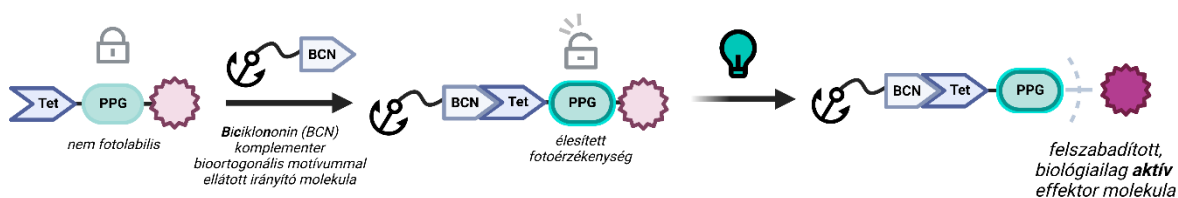
Fotolabilis védőcsoportok működési elve



3. Ábra Fotolabilis védőcsoportok működési elve

A **hatóanyag-leadó rendszereket** megkülönböztethetjük a stimulus **eredete** szerint, melynek nyomán a hatóanyagok lokális felszabadítását, aktivitásának visszaállítását végzik. Ezek lehetnek **belső** (pl. enzim általi kötésfelhasítás, pH, hipoxia) vagy **külső** (pl. **fény**, hőbesugárzás, ultrahang) **ingerek**, ugyanakkor utóbbi rendszerek előnyösebbek, hisz nagyobb kontrollt biztosít számunkra a hatóanyagfelszabadítás felett.^{1,9} Ezek közül is kiemelendők a **fény-stimulust** kihasználó hatóanyag-leadó módszerek, mivel a fény kiválóan szabályozható térben és időben, továbbá a **látható tartományban** nem toxikus.¹⁰ Ilyen módszer a fotolabilis védőcsoportok (**PPG**) alkalmazása is, melyek fénybesugárzást követően, **egyetlen kötés felhasításával** képesek felszabadítani az addig hatásában blokkolt hatóanyagot (**3. Ábra**)¹¹

Feltételes fotoaktiválhatóság működési elve

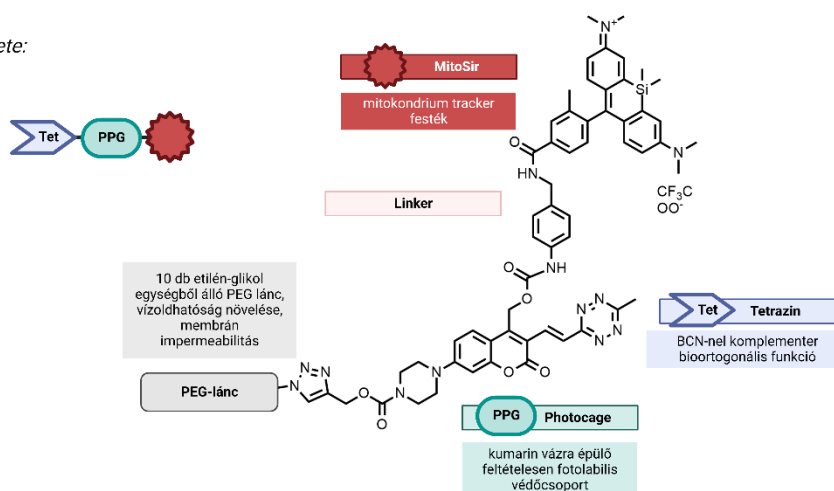


4. Ábra Feltételes fotoaktiválhatóság működési elve

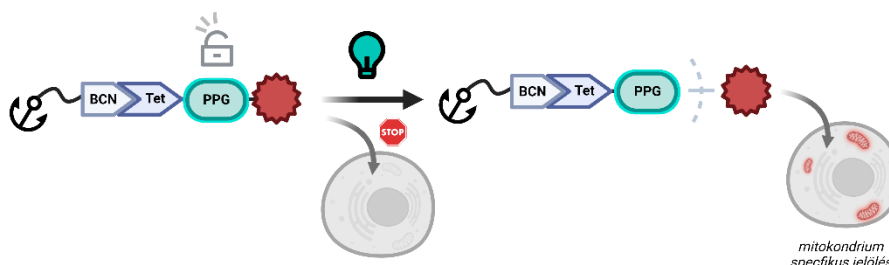
Kutatócsoportunkban olyan **bioortogonális funkciót** viselő, **kumarin** alapvázra épülő fotolabilis védőcsoportokat állítottak elő, melyek csak akkor válnak fényérzékennyé, ha bioortogonális partnerükkel elreagáltak (**feltételes fotoaktiválhatóság**). A komplementer **bioortogonális partnert** megfelelő **hordozóhoz** kötve, a **kék** fénnel történő hatóanyag-felszabadítás helye a szervezeten belül irányíthatóvá válik, alkalmassá téve a rendszert **célzott hatóanyag leadás** megvalósítására (**4. Ábra**). Korábbi munkánkban hordozóként egy mitokondriumot célzó, bisz-ciklononin (**BCN**) bioortogonális motívumot viselő trifenil-foszfónium konjugátumot alkalmazva, a mitokondriumban egy fluorogén festéket (tetrazin-PPG-rodol) szabadítottunk fel két lépésben, bioortogonális konjugációt követően fény segítségével.¹² Ezután a védőcsoportot terápiás szempontból relevánsabb hordozókhoz (tumormarker receptor ellenes antitest) kívántuk kapcsolni, azonban korlátozott vízoldhatósága miatt nem sikerült előállítanunk hordozó molekulához kapcsolt verzióját, illetve nagyfokú membrán-permeabilitása miatt képes volt bejutni és felhalmozódni a sejtekben, megnehezítette a sejt-felszíni célba juttatást és a felszabadítás (szabad hatóanyag sejtbe áramlásának) nyomon követését.

Tet-PL-COU-MitoSiR feltételesan fotolabilis modellvegyület szerkezeti képlete és felépítése

Szerkezete:



Működése:



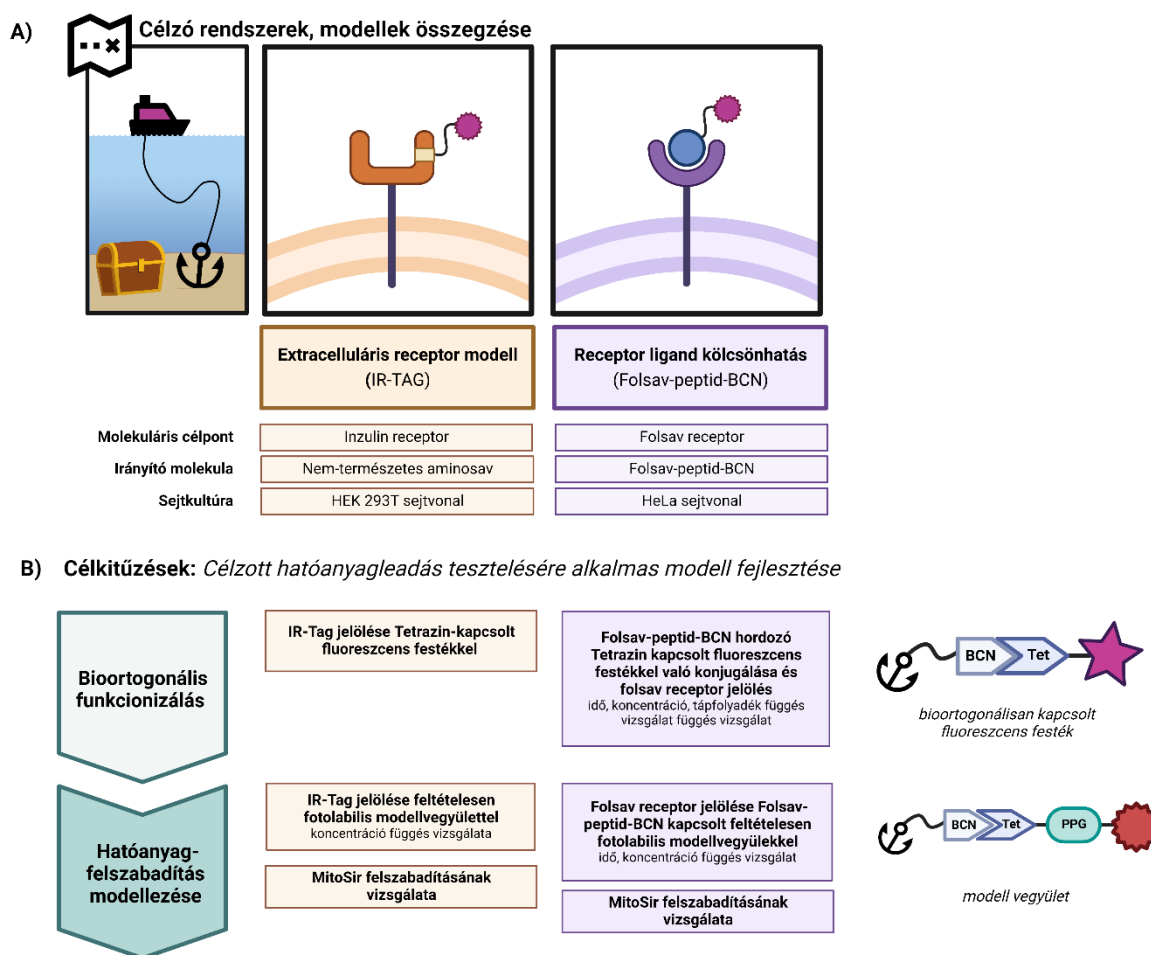
5. Ábra Tet-COU-PEG-MitoSiR feltételesan fotolabilis modellvegyület szerkezeti képlete, felépítése és működése

Ezen limitációk feloldásához a védőcsoport alapváza egy **PEG-oldallánccal** került kibővítésre, melyet széleskörűen alkalmaznak vegyületek vízoldhatóságának növelésére és impermeábilissá tételére.¹³ Továbbá a hatóanyagleadás modellezéséhez ehhez a kék fénnel feltételesan aktiválható, **Tet-COU-PEG** (tetrazin, kumarin, PEG molekula részletekre utaló) névre keresztelt photocage-hez egy

MitoSiR, vörös fénnel gerjeszthető **szilikorodamin** származék került kapcsolásra. A MitoSiR **riportervegyület**ként szolgál: a konjugátumból való felszabadítását követően pozitív töltése révén képes a **mitokondriumban** feldúsulni, így a felszabadítás hatékonyságára a festék lokalizációjának változásából lehet következtetni (5. Ábra).

Célkitűzések

Munkám célja a feltételes fotoaktiválhatóság elvét kihasználó célzott hatóanyagleadás tesztelésére alkalmas sejtes **modellrendszer(ek)** (6. A Ábra) fejlesztése a **Tet-COU-PEG** védőcsoport alapváz és a **Tet-COU-PEG-MitoSiR** riportervegyület alkalmazásával, mely lehetővé teszi a vegyület célzott sejtbejuttatását, illetve a felszabadítás folyamatának megfigyelését is fluoreszcens mikroszkóppal.



6. Ábra A) Sejtes modellrendszereink; B) Célkitűzéseim

Előkísérletként inzulin-receptor fehérjeláncába épített bioortogonalizált nem-természetes aminosav (nt-AS) (IR-TAG) segítségével kívánjuk tesztelni a próba molekulánkat. További munkám során ezen **Tet-COU-PEG-MitoSiR** vegyületet egy **folsav-peptid-BCN** alapú biológiai hordozóhoz tervezem kapcsolni, mely terápiás szempontból releváns, tumorsejtek által nagy mennyiségben kifejezett sejtfelszíni folsavreceptort (FR- α) céloz meg receptor-ligand kölcsönhatás kihasználásával. A modellfejlesztés tervezett lépéseit a 6. B Ábra taglalja.

Anyagok és módszerek

FA-peptid konjugátumok előállítása

A kísérletekhez használt konjugátumokat mindig frissen, a kísérletet megelőző napon állítottam össze.

Az **FA-peptid-Cy5** konjugátumok előállításához 500 μ M koncentrációjú FA-peptid-BCN és Cy5-HTet (Jena Bioscience) oldatot elegyítettem 1:1 arányban, 250 μ M névleges koncentrációjú oldathoz jutva, melyet szobahőmérsékleten, sötétben tároltam felhasználásig (16 óra). Az **FA-peptid-Tet-COU-PEG-MitoSir** típusú vegyülethez 20 mM hordozómolekulát és 20 mM modellvegyületet elegyítettem szintén 1:1 arányban, 10 mM koncentrációjú konjugátumot nyerve, melyet a Cy5 festékekkel készült konjugátummal azonos körülmények közt tároltam.

Sejtvonalak fenntartása

Sejtes kísérleteimet COS7 (Sigma #87021302), HEK293T (ATCC #CRL-3216) valamint HeLa (ATCC CCL-2) sejtvonalakon végeztem. Minden sejtkultúrát 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszférában növesztettem. A COS7, HEK293T esetében Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies #4165-039) tápoldatban neveltük a sejteket, mely 10 % FBS-t (Fetal Bovine Serum, Sigma #F7524), 1 % penicillin-sztreptomocint (Sigma #P0781), 1 % L-Glutamint (Sigma #G7513) és 1 % nátrium-piruvátot (Life Technologies #11360) tartalmazott. A HeLa sejteket növesztettem a DMEM-ben, RPMI 1640-ben (Gibco, #A10491-01) vagy folsav-mentes RPMI tápoldatokban (Gibco, #270016-021) is. A sejteket 3-4 naponta passzáltuk körülbelül 80%-os konfluenciánál, 25 cm² alapterületű Nunc sejtenyésző flaskában (Thermo Fischer). Ezt addig folytattuk, míg a kultúra el nem érte a 20. passzálást.

A passzálás során először leszívtuk a tápoldatot, majd mostuk egyszer a sejteket 5 ml PBS-sel (pH=7,4; 37 °C, Thermo Fischer). Ezután a sejteket 1 ml szobahőmérsékletű tripszin-EDTA oldattal (0,05% Gibco #25300-054) az adott sejtkultúrának szükséges ideig (HeLa és COS7: 6 perc, HEK293T: 4 perc) inkubáltuk, majd a sejtekhez 5 ml tápfolyadékot adtunk. Ezt követően egy friss sejtenyésző flaskába (előzetesen 5 ml tápfolyadékkal feltöltve) 1 ml sejtes szuszpenziót (HEK293 sejteknél: 0,3 ml) adtunk hozzá, és 5 és 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszférában növesztettük tovább a sejteket a következő passzálásig.

A mikroszkópos képek készítéséhez minden kísérletnél a sejteket 8-lyukú, üvegaljű μ -Slide Ibidi high precision #1.5H (170 μ m/ $\pm$ 5 μ m) lemezre (Ibidi #80827) növesztettem. A sejtsuszpenziót a megfelelő koncentrációra hígítottam (HEK293T 40 ezer; A431 30 ezer; COS7 15 ezer; HeLa 12,5 ezer db/kamra), és a kamrákba 250-250 μ l szuszpenziót pipettáztam, a kísérlet megkezdéséig (40 óra) a sejteket 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában tartva. A HEK293T sejtek lemezre helyezése előtt a

tárgylemez felületét 10 µg/ml koncentrációjú poli-L-lizin oldattal (Sigma #P5899) kezeltem négy órán át, majd lemostam.

Sejtek transzfektálása

A HEK293T sejtek IR-TAG modellrendszerekkel történő transzfektálását JetPRIME® (Polyplus, #114-07) transzfekciós reagenssel (Polyplus) végeztük, a sejtek kiültetését követő 2. napon, követve a protokoll utasításait. A nem-természetes aminosav beépítéséhez a transzfekciós mixbe a célfehérjét kódoló plazmid mellé PyIRS^{AF-NES} (ajándék Edward Lemke laborjától²²) plazmidot is tettünk, kamránként 0,25-0,25 µg mennyiségben, illetve JetPrime reagenst és puffert adva az elegyhez, melyet 15 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Eközben a 100 mM BCN^{endo}-lizin törzsoldatot (Sichem #SC-8014, 0,2 M NaOH és 15% DMSO) négyszeresére hígítottam 1M HEPES pufferrel, melyet végül 250 µM koncentrációban adtam a kamrákhoz. A sejteket 4 órán át inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszférában, majd médiumot cseréltem rajtuk. A másnapi jelölésig 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában pihentettük őket.

Sejtek jelölése

Kísérleteim során alkalmazott jelölések körülményeit az alábbi táblázatban összegeztem, jelölve a használt sejtvonalat (és fenntartásnak körülményeit), a fluoreszcens jelölő, a konjugátum nevét, az alkalmazott koncentrációkat és jelölési időtartamot.

1. Táblázat: Sejtek jelölésének körülményei konfokális mikroszkópiához

IR-TAG									
	Sejtvonal		Sejtfenntartáshoz alkalmazott médium		Jelölő	Koncentráció	Jelölési idő	Ábra	
MitoSiR intracelluláris lokalizációjának vizsgálata	HEK293T		DMEM		MitoSiR	10 nM, 100 nM, 1 μM	60 perc	8. A	
A védőcsoport vizsgálata	HEK293T		DMEM		Tet-COU-PEG	10 μM	60 perc	7.	
A modellvegyület vizsgálata	HEK293T		DMEM		Tet-COU-PEG-MitoSiR	300 nM	60 perc	8. B-C	
FA-peptid-BCN									
	Sejtvonal		Sejtfenntartáshoz alkalmazott médium		Jelölési stratégia (preclick, pretargeting)	Jelölő, konjugátum	Koncentráció	Jelölési idő	Ábra
Hordozómolekulával végezhető jelölési stratégiák vizsgálata	HeLa	COS7	DMEM (COS7), folsavmentes RPMI (HeLa)		preclick, pretargeting	Cy5-Tet és FA-BCN-peptid, FA-peptid-Cy5	1 μM Cy5-Tet és 1 μM FA-BCN-peptid (pretargeting), 1 μM FA-peptid-Cy5 (preclick)	In situ, vagy preclick összekapcsolt konjugátummal történő inkubáció: 90 perc (Pretargeting: 20 percig vagy előkezelt hordozóval, vagy rögtön a festékkel adtam hozzá a sejtekhez.)	10.
FA-peptid-Cy5 jelölési koncentráció optimalizálás	HeLa	COS7	DMEM (COS7), folsavmentes RPMI (HeLa)		preclick	FA-peptid-Cy5	100nM, 300 nM, 1 μM	90 perc	11. A)
FA-peptid-Cy5 jelölési idő optimalizálás	HeLa	COS7	DMEM (COS7), folsavmentes RPMI (HeLa)		preclick	FA-peptid-Cy5	1 μM	10, 30, 60, 90 perc	11. B
MitoSiR intracelluláris lokalizációjának vizsgálata HeLa sejteken	HeLa	COS7	DMEM		preclick	MitoSiR	10 nM, 100 nM, 1 μM	60 perc	13. A
FA-peptid-COU-PEG vizsgálata	HeLa	COS7	DMEM (COS7), folsavmentes RPMI (HeLa)		preclick	FA-peptid-COU-PEG	1 μM	90 perc	12.
FA-peptid-COU-PEG-MitoSiR vizsgálata	HeLa	COS7	DMEM (COS7), folsavmentes RPMI (HeLa)		preclick	FA-peptid-COU-PEG-MitoSiR	100nM, 300 nM, 1 μM	30 perc	13. B
FA-peptid-BCN jelölés tápoldék függésének vizsgálata	Sejtvonal	Sejtfenntartáshoz alkalmazott médium	Sejtkültetéshez alkalmazott médium	Jelöléshez alkalmazott médium	Jelölési stratégia (preclick, pretargeting)	Jelölő, konjugátum	Koncentráció	Jelölési idő	Ábra
	HeLa	DMEM	DMEM	DMEM	preclick	FA-peptid-Cy5	1 μM	90 perc	9. B
	HeLa	RPMI	RPMI	RPMI	preclick	FA-peptid-Cy5	1 μM	90 perc	9. B
	HeLa	RPMI	RPMI	folsavmentes RPMI	preclick	FA-peptid-Cy5	1 μM	90 perc	9. B
	HeLa	RPMI	folsavmentes RPMI	folsavmentes RPMI	preclick	FA-peptid-Cy5	1 μM	90 perc	9. B
	HeLa	folsavmentes RPMI	folsavmentes RPMI	folsavmentes RPMI	preclick	FA-peptid-Cy5	1 μM	90 perc	9. B
	COS7	DMEM	DMEM	DMEM	preclick	FA-peptid-Cy5	1 μM	90 perc	9. B

A sejteket a kísérlet megkezdéséig, valamint a jelölési idő alatt 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában inkubáltam. Az inkubálási idő elteltével az IR-TAG modellrendszerrel készült mintákat tápfolyadékkal mostam kétszer gyors egymásutánban, majd ismét kétszer, de 10 perces időközökkel, minden más esetben csupán tápfolyadékot cseréltem a sejteken. A védőcsoport, illetve a modellvegyület fényhatására bomlik, ezért ügyeltem rá, hogy ne érje fény a mintákat.

Konfokális mikroszkópiás felvételek készítése

A feltételesen aktiválható fotolabilis konjugátumok sejten belüli elhelyezkedését konfokális mikroszkópiával követtük nyomon. A Tet-COU-PEG védőcsoporttal készült kísérletekről a Zeiss LSM710 mikroszkóppal készítettünk felvételeket, PLAN-APOCHROMAT 40x/1,4 Oil objektív alkalmazásával. A kumarin alapváz lokalizációját emissziójának megfelelő (420-600) nm tartományon vizsgáltuk 405 nm gerjesztő lézert alkalmazva, míg a MitoSiR-t és mRFP-t 633 nm-es lézerrel gerjesztettünk (643-800) nm tartományban detektálva emittált jelet.

Minden más felvételt Leica TCS SP8 típusú mikroszkóppal készítettük Leica HC PL APO CS2 100x/1,40 olajimmerziós objektívvel detektorként pedig Leica HyD detektort alkalmaztunk. Az mOrange mikroszkopizálásához az 552 nm-es gerjesztőlézert használtuk, 565-615 nm tartományon vizsgálva a jelölést. A mRFP, MitoSiR, és Cy5 jelölőket 638 nm-es lézerrel gerjesztettük és 650-800 nm tartományon detektálva őket.

A MitoSiR felszabadítását az IR-TAG modell esetében 450 nm körüli fényt emittáló, 4 W-os névleges bemeneti teljesítményű LED-panel segítségével végeztem, 1 perces bevilágítást kivitelezve. A folsav-alapú konjugátum esetében a Leica TCS SP8 mikroszkópba épített metalhalid lámpát és 385±25 nm szűrőt használtuk, 10 s időtartamig besugározva a mintát.

A képeket ImageJ software (verziószám: 1.51) segítségével értékeltem ki.

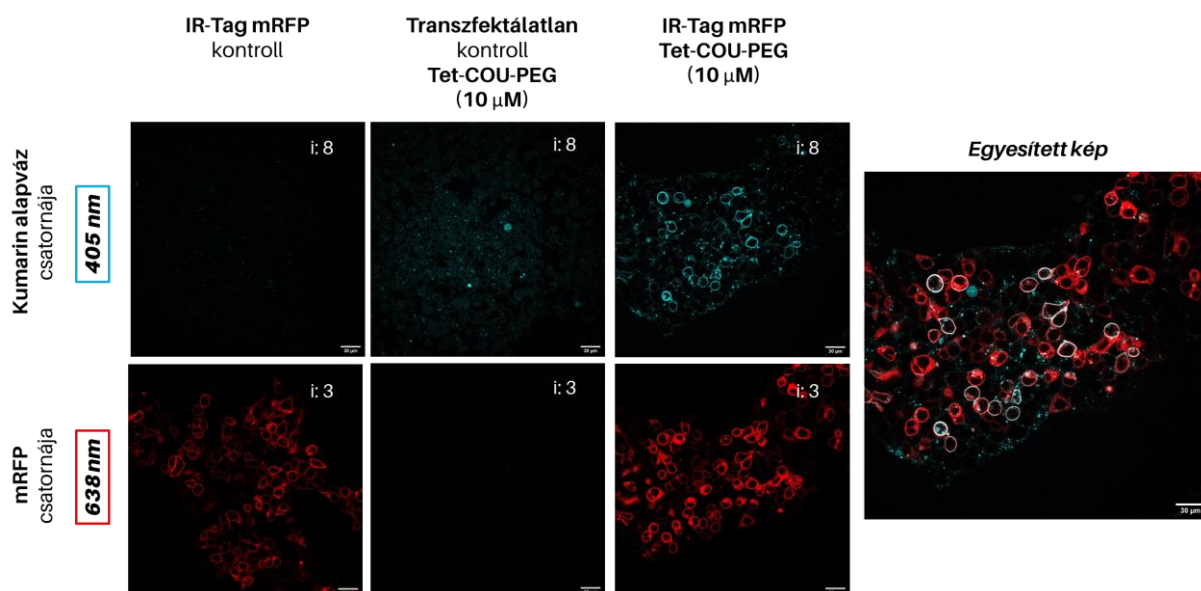
Eredmények

Extracelluláris receptor modell: IR-TAG

Első lépésként azt vizsgáltam, hogy a **Tet-COU-PEG** védőcsoport valóban alkalmas-e sejtfelszíni képletek, receptorfehérjék szelektív jelölésére, illetve a **MitoSiR** riportervegyület célba juttatására, valamint, hogy tényleg sikerült-e úgy módosítanunk a molekulát, hogy ne legyen membrán-permeábilis.

Ehhez egy olyan **HEK293-T** sejtekbe transzfekcióval bevitt, -Amber stop kodon- mutációt hordozó inzulin-receptorra (**IR**) épülő modellrendszert alkalmaztam, mely korábban hatékonyan bizonyult nem-membránpermeábilis festékek tesztelésére (**IR-TAG** modell).¹⁴ Az IR sejtmembránban ülő receptorfehérje 676-os pozíciójába bioortogonális motívumot viselő, **nem-természetes aminosav (BCN-Lizin)** került beépítésre a **genetikai kód kiterjesztésével** (stop kodon szupresszió). Ez a pozíció az extracelluláris régióban helyezkedik el, így a nem-membránpermeábilis célvegyület stabil, kovalens kötésen keresztül hozzákapszolódhat. Fluoreszcens riporter címkeként - a spektrális átlapolást megelőzendő - mOrange vagy mRFP fehérjét fúzionáltattunk az IR-hez.

IR-TAG jelölése tetrazin-kapcsolt „üres” védőcsoporttal



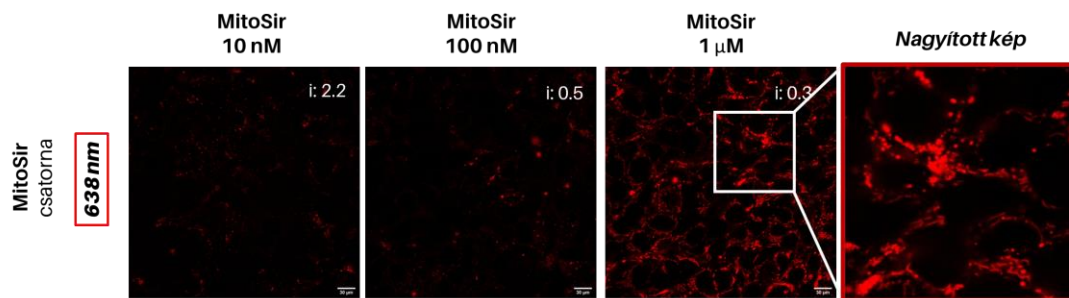
7. Ábra: A **Tet-COU-PEG** (10 μM) lokalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkóppal, transzfektált **IR-TAG^{BCN-lizin}** HEK293-T sejtekben. A gerjesztés a **kumarin** alapváz (405 nm, felső sor) vagy **mRFP** fluoreszcens fehérje (638 nm, alsó sor) abszorpciójának megfelelő lézerrel (intenzitása: képek jobb felső sarka) történt. Mércse: 30 μm.

Elsőként **Tet-COU-PEG** védőcsoportot teszteltem membrán-permeabilitás és jelölőképesség szempontjából. HEK293-T sejteket transzfektáltam **IR-TAG-mRFP** konstrukcióval, kontrollként transzfektálatlan sejteket használtam (7. Ábra). A riporter mRFP csatornáján láthatjuk, ahogy

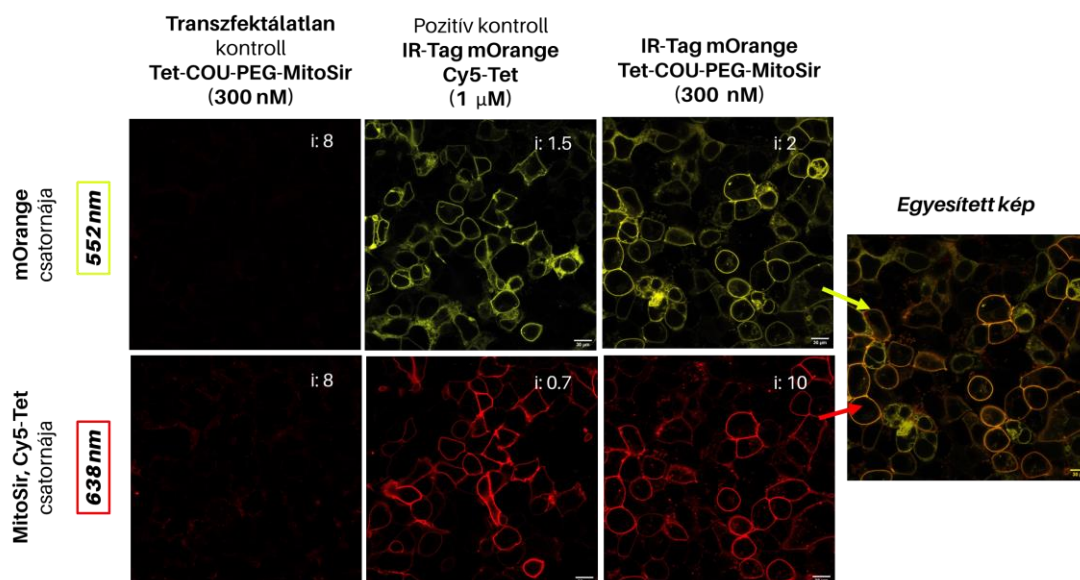
kirajzolódik a membrán struktúrája, ám egyes sejteken a citoplazmában is megfigyelhetünk fluoreszcens jelet, melyet még éretlen, naszcens IR-ok szolgáltatják. A transzfektálatlan, de célvegyülettel kezelt kontroll sejteken a vártak megfelelően nem tapasztaltunk számottevő jelölődést sem intra- sem extracellulárisan, míg a bioortogonális funkciót hordozó IR-TAG^{BCN-Lizin} pozitív sejtek fluoreszcens jele a kék csatornában (kumarin) nagymértékben kolokalizált a mRFP-csatornáéval, de csak a plazmamembránok területén (**7. Ábra: Egyesített kép**). Ebből arra következtethetünk, hogy a Tet-COU-PEG impermeabilitása miatt alkalmas extracelluláris célpontok szelektív jelölésére.

IR-TAG jelölése feltételeken fotolabilis modell-vegyülettel

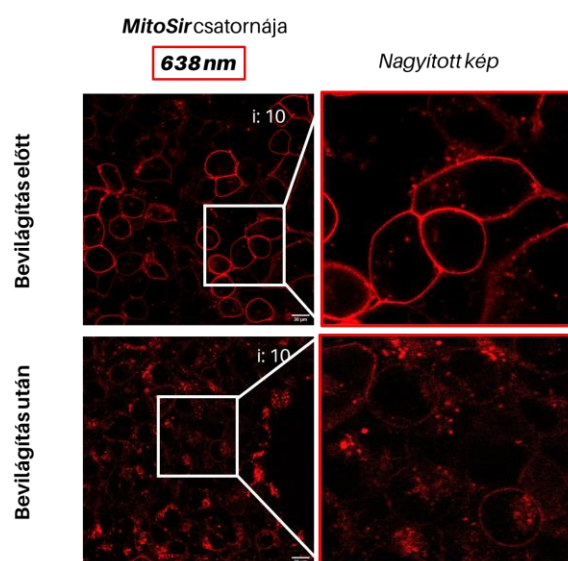
A) MitoSir intracelluláris lokalizációja



B) IR-TAG jelölése Tet-COU-PEG-MitoSir-rel



C) MitoSirl felszabadítása a modellvegyületből (IR-Tag mOrange Tet-COU-PEG-MitoSir (300 nM))



8. Ábra: A) A MitoSiR (10 nM-1 μM) mitokondriumot célzó fluoreszcens festék lokalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkóppal HEK293-T sejtekben. B) A Tet-COU-PEG-MitoSiR modell vegyület lokalizációjának (300 nM) vizsgálata konfokális mikroszkóppal IR-TAG-mOrange

modellrendszert hordozó HEK293-T sejtekben. (Pozitív kontroll: Cy5-Tet (1 μ M) jelölt IR-TAG-mOrange.) **C)** A **Tet-COU-PEG-MitoSiR** (300 nM) felszabasításának vizsgálata konfokális mikroszkóppal IR-TAG-mOrange modellrendszert hordozó HEK293-T sejtekben. A minta 1 percen át lett bevilágítva 450 nm körüli kék fényt emittáló fényforrással. Felső sorban a minta bevilágítás előtti, míg az alsóban bevilágítás utáni felvételei láthatóak. A minták gerjesztése **MitoSiR** és **Cy5-Tet** (638 nm lézer), illetve az **mOrange** (552 nm lézer) abszorpciójának megfelelő lézerrel (intenzitása: képek jobb felső sarka) történt. Mércse: 30 μ m.

Ezt követően ellenőriztem, hogy a riportervegyületként alkalmazott **MitoSiR** festék valóban a mitokondriumban dúsul-e fel (10 nM-1 μ M koncentráció tartományban vizsgálva). A felvételeink szerint a festék pozitív töltöttsége révén elsősorban a mitokondriumban, és csak kisebb részben lizoszómában dúsul fel a jelölés során (**8. A Ábra**).

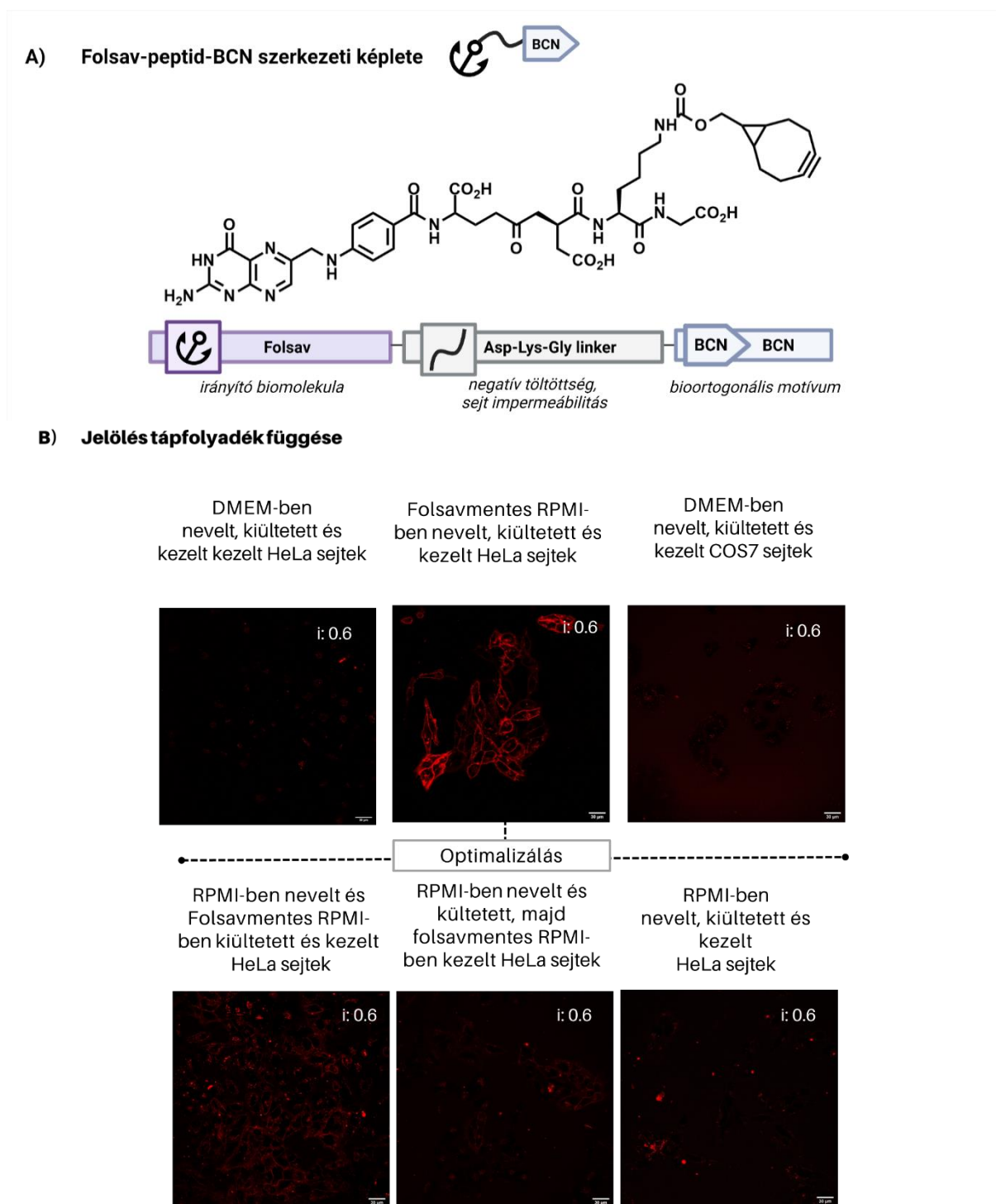
Ezután tértünk rá a **Tet-COU-PEG-MitoSiR** modellvegyület vizsgálatára (**8. B Ábra**). A **MitoSiR** (λ_{exc} : 638 nm) és a fluoreszcens riporter címke spektrális átlapolása elkerülése érdekében az IR-TAG^{BCN-lizin}-hez **mOrange-t** (λ_{exc} : 552 nm) fuzionáltattunk. A modellvegyületet 300 nM koncentrációban adtam a sejtekhez, és elhelyezkedését a **MitoSiR** csatornáján követtük nyomon. A bioortogonális módosíthatóság ellenőrzésére egyes kontroll mintákban a IR-TAG^{BCN-lizin}-t **Cy5-Tet** (**Tet**: Tetrazin csoportot hordozó) fluoreszcens festékekkel jelöltem meg. A **Tet-COU-PEG-MitoSiR** a **Cy5-Tet** kontrollhoz hasonlóan a sejtmembrán területén határozottan kirajzolódik, intracelluláris képletek háttérjelölődése nélkül. Sőt, a **MitoSiR** mitokondrium jelölésére utaló jelet sem látunk (ebben a koncentrációban), így arra következtethetünk, hogy a kiindulási vegyület nem membrán-permeabilis, valamint, hogy a mindeddig sötétben tartott mintából nem szabadult fel a riportervegyület. A **MitoSiR** fénykontrollált **felszabadításának** vizsgálatához (**8. C Ábra**) a mintákat 1 percen keresztül világítottuk be. A mikroszkópos felvételek ugyan nem azonos mintarészletekről készültek, de így is megfigyelhető, hogy membrán struktúra elhalványult és nagyon gyenge intracelluláris jelölés látszódik. Ez alapján azt az óvatos következtetést tehetjük, hogy a sejtfelszínről sikeresen szabadítottuk fel a festéket, mely ezt követően mitokondriumba vándorolt és dúsult fel.

Összegezve, a **Tet-COU-PEG-MitoSiR** vegyület alkalmasnak tűnt célzott hatóanyag-leadás modellezésére, és a reményteli eredmények tükrében áttértünk a terápiás szempontból releváns, **Ligandum-Receptor** alapú kölcsönhatásra épülő hatóanyagleadó rendszerek kialakítására.

Ligandum-Receptor alapú célzott hatóanyagleadó modellrendszer

A ligandum-receptor kölcsönhatásra épülő célzott hatóanyagleadás tanulmányozására egy folsav-folsav receptor interakción alapuló modellt választottunk.

A folsav élettani szempontból elengedetlen aminosavak, illetve a DNS szintéziséhez, javításához. Egyes, főként epithélium eredetű rákos megbetegedések emelkedett folsav felvételt mutatnak az egészséges szövetekhez képest. A hatékony folsavfelvételt felszínükön nagyszámban kifejezett folsav receptor alfa izotípusa (FR- α) biztosítja. Folsavat irányító molekulaként alkalmazó célzott terápiák, diagnosztikus eljárások fejlesztése napjaink igen intenzíven kutatott területe.^{15,16} Az általunk alkalmazott folsav-alapú komplex hordozó - **FA-peptid-BCN** - K. Numasawa és munkatársai nyomán került szintetizálásra.¹⁷ Irányító molekulaként folsavat (folic acid - **FA**) tartalmaz, melyet egy negatív töltésű Asp-Lys-Gly **peptid**-linker követ. Utóbbi biztosítja a konjugátum sejtbe áramlásának mérséklését, illetve a lizin oldalláncán át valósul meg bioortogonális funkcionálizálás (**BCN**) (9. A Ábra). **FA-peptid-BCN**-t a modell vegyületekkel összekapcsolva, a folsav receptort nagyszámban kifejező sejtvonalon, petefészekrák eredetű HeLa kultúrán teszteltem.¹⁸



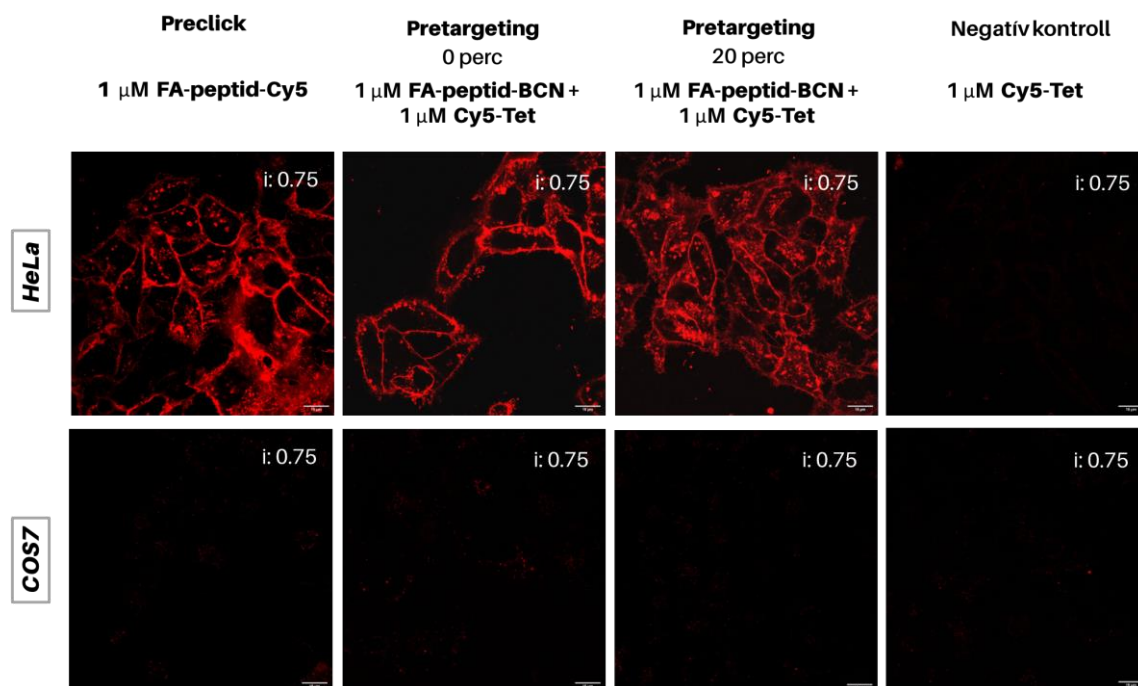
9. Ábra: A) FA-peptid-BCN hordozóvegyület szerkezeti képlete és funkcionális egységei. **B)** A jelölés médiumának, illetve a sejtfenntartás körülményeinek optimalizálása; FR- α pozitív HeLa, illetve negatív COS7 sejteken vizsgálva; 1 μ M FA-peptid-Cy5 konjugátumot alkalmazva; Alkalmazott lézer 638 nm-es lézer; intenzitás (i): képek jobb felső sarkában; Mércse: 30 μ m.

Mielőtt azonban ezt elkezdhettem volna, ellenőrizni kívántam, hogy a HeLa sejtvonal valóban alkalmas platform-e folsav-alapú hatóanyagleadás vizsgálatára, illetve tanulmányozni akartam a FR- α jelölésének ideális körülményeit.

A sejtvonalak fenntartásához használt tápfolyadékok többnyire tartalmaznak folsavat, a sejtek megfelelő biológiai működésének fenntartásához. Az irodalom megosztott abban a kérdésben, hogy a folsav-alapú rendszerek tesztelését folsav-mentes médiumban ajánlatos-e végezni.^{19,20} Több érv szól a folsav mentes médium mellett: (1) feltételezhető, hogy a tápfolyadék folsav molekulái ($\sim 9 \mu\text{M}$) kompetitíve gátolják a hatóanyag-konjugátum FR- α receptorhoz kötődését, (2) valamint az ebből adódó receptor-mediált endocitózis következtében várható a receptorok sejtfelszíni számának csökkenése.

Ennek tisztázására és a modellrendszer optimalizálása érdekében, HeLa sejteket három különböző médiumban növesztettem, folsavat tartalmazó **DMEM** és **RPMI**, valamint **folsavmentes RPMI** tápfolyadékban. Mikroszkópos vizsgálatokhoz kiültettem ezekből a sejtekből, illetve két további mintát képeztem a RPMI-ben nevelt sejtekből, egyiktől már a kiültetéskor azonnal, a másiktól pedig csak közvetlenül a vizsgálatok előtt vontam meg a folsavat. A sejtek mindegyik tápfolyadékban azonos sebességgel osztódtak, tehát nem okozott problémát a folsav hiánya. A sejteket **Cy5-Tet** módosított **FA-peptid-BCN-nel** kezeltem. Azt tapasztaltam, hogy kizárólag a végig folsavmentes tápfolyadékban tartott sejtek jelölődtek hatékonyan a membránban (**9. B Ábra**). Ezek alapján, a mi rendszerünkben egyértelműen a végig folsavmentes tápban tartott HeLa sejteken tudunk jelölést és célzott hatóanyagfelszabadulást vizsgálni.

Preclick és pretargeting jelölési stratégiák

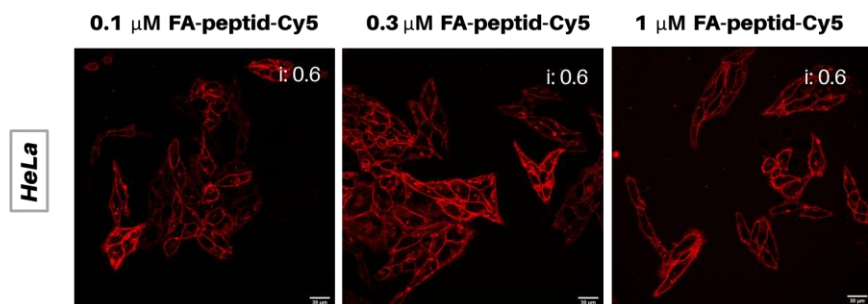


10. Ábra: FA-peptid-BCN (1 μ M) hordozóvegyület tesztelése pretargeting és preclick stratégiákra Cy5-Tet (1 μ M) festékkel; FR- α pozitív HeLa, illetve negatív COS7 sejteken; a gerjesztés Cy5 abszorpciójának megfelelő fényforrással történt; Alkalmazott lézer: 638 nm lézer; intenzitás (i): képek jobb felső sarkában; Mérete: 30 μ m.

Vizsgáltam, hogy alkalmas-e az **FA-peptid-BCN** hordozó mindkét stratégia (**preclick, pretargeting**) kivitelezésére. A pretargeting módszer optimalizálása érdekében kétféleképpen kezeltem a sejteket: vagy pre-inkubáltam őket 20 percig **FA-peptid-BCN**-el, vagy egyidőben adtam a hordozót és a **Cy5-Tet** festéket (**10. Ábra**).

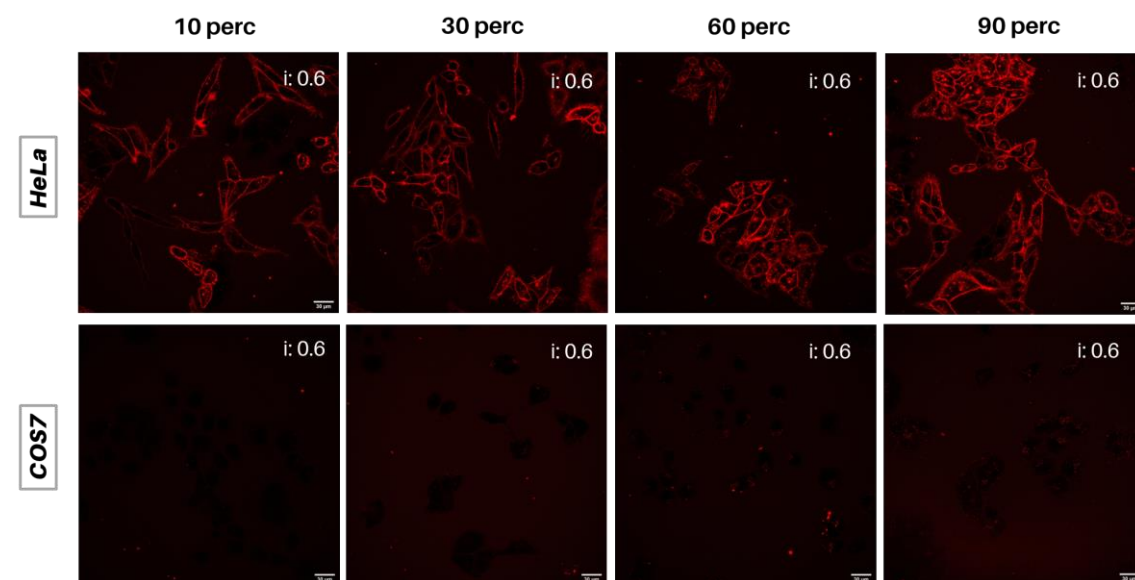
A HeLa sejteknél nem volt számottevő különbség a jelölési módok között és mindhárom esetben hasonló, szép kontrasztos képeket készíthettünk azonos lézerintenzitás mellett. Erőteljes membránjelölés, illetve kevés, „pötyyszerű” intracelluláris képlet volt látható, mely utóbbi valószínűleg receptor internalizálódásra utaló jel. Ezzel szemben a negatív kontrolloknál egyáltalán nem mutatható ki jelölődés.

A) Preclick jelölés koncentráció függése



Preclick, 90 perc inkubáció 37°C-on, 5% CO₂ mellett

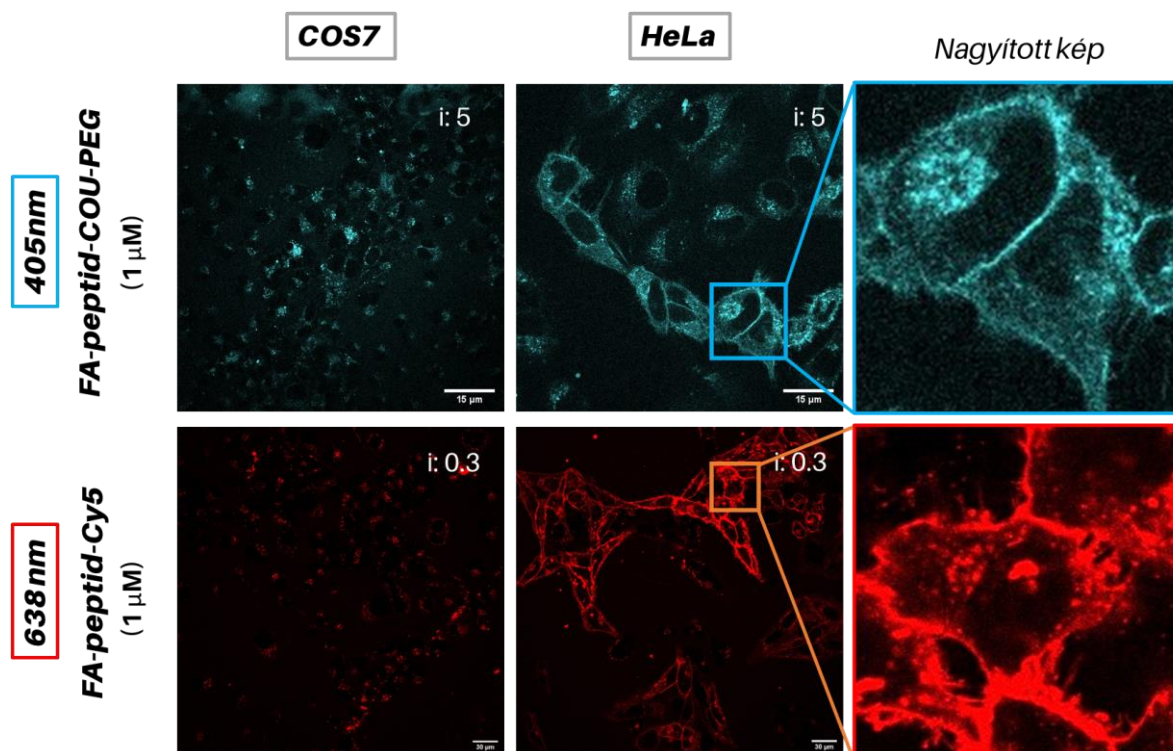
B) Preclick jelölés idő függése



11. Ábra: Folsav receptor jelölés koncentráció (A) és idő (B) optimum keresése FA-peptid-Cy5 konjugátummal (1 μM); (638 nm lézer; intenzitás (i): képek jobb felső sarkában) Mércé: 30 μm .

A jelölés optimalizálását, koncentráció- (0,1-1 μM ; **11. A Ábra**) és időfüggésének vizsgálatát (10-90 perc; **11. B Ábra**) preclick-kelt FA-peptid-BCN+Cy5-Tet-el (FA-peptid-Cy5) végeztem.

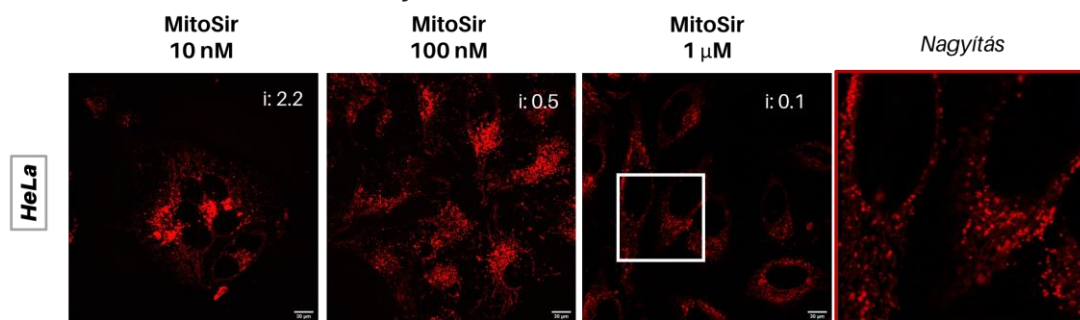
A mikroszkópos felvételeken -azonos lézerintenzitás mellett- az **FA-peptid-Cy5** még a legalacsonyabb koncentrációban (0,1 μM) is hatékonyan jelölte a HeLa sejteket, ami jól egybeesik a folsav receptorkötődésének erősségének nagyságrendjével ($K_D \sim 1 \text{ nM}$).²¹ A jelölés időfüggése tekintetében elmondhatjuk, hogy az **FA-peptid-Cy5** ligand gyorsan, már 10 perc inkubációt követően hatékonyan kötődött a HeLa sejtekhez, míg FR- α negatív COS7 sejtekhez egyáltalán nem. (**11. B Ábra**) Ebből arra következtettünk, a **FA-peptid-BCN** hordozó kiválóan alkalmas FR- α célzására.



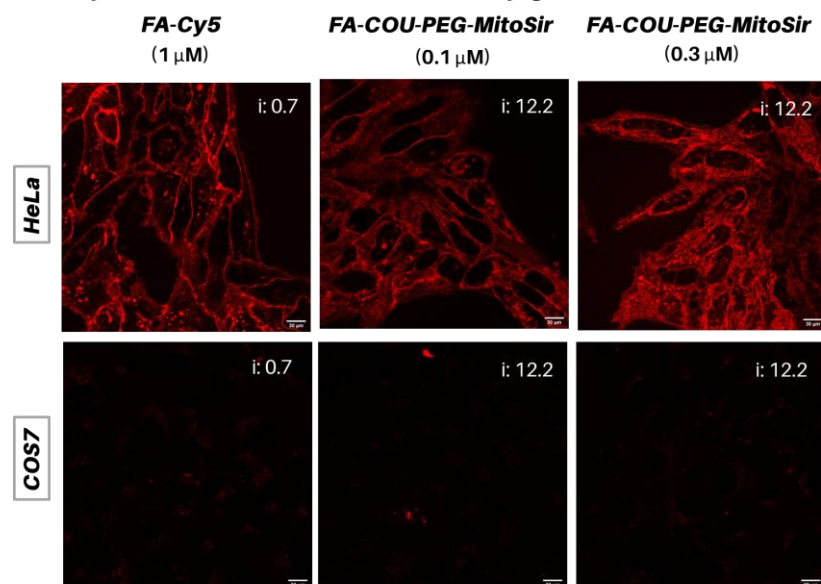
12. Ábra: FA-peptid-COU-PEG és FA-peptid-Cy5-tel (1-1 μM) konjugátummal jelölődés összehasonlítása FR-α pozitív HeLa és negatív COS7 sejteken. A gerjesztés a **kumarin alapváz** (405 nm) vagy **Cy5** (638 nm lézer) abszorpciójának megfelelő fényforrással történt. Alkalmazott lézer intenzitás: az ábra jobb felső sarkában. Mércé: 30 μm.

Következő lépésként az **FA-peptid-BCN** és az „üres” védőcsoport a **Tet-COU-PEG** konjugátumával (preclick; **FA-peptid-COU-PEG-el**) végeztünk jelöléseket HeLa és COS7 sejteken, kontroll vegyületként a **FA-peptid-Cy5**-öt használtam (12. Ábra). Az **FA-peptid-COU-PEG** ugyan szelektív FR-α jelölést mutatott, ám a membrán struktúra sokkal kevésbé intenzíven rajzolódott ki, mint az **FA-peptid-Cy5**-nél, és a citoplazma is kissé fényesen sejtett fel, de e jelenség valószínűleg csak részben tudható be intenzív receptor-internalizációnak.

A) MitoSiR intracelluláris lokalizációja



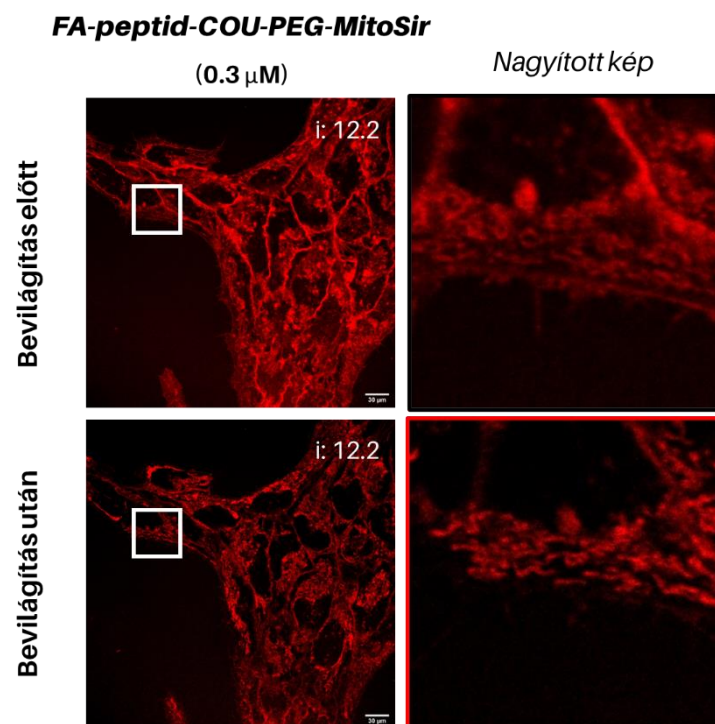
B) FR-ok jelölése Tet-PL-MitoSiR-rel készült konjugátummal



13. Ábra: A) A MitoSiR (10 nM-1 μ M) mitokondriumot célzó fluoreszcens festék lokalizációjának vizsgálata HeLa sejtekben. B) A Tet-COU-PEG-MitoSiR-rel készült konjugátumok (0,1-0,3 μ M) összehasonlítása FA-Cy5-tel (1 μ M) (FR pozitív HeLa, illetve negatív COS7 sejtek); Alkalmazott lézer: 638 nm-es lézer, intenzitása (i): az ábra jobb felső sarkában. Mércse: 30 μ m.

A teljes modellvegyület **Tet-COU-PEG-MitoSiR** és **FA-peptid-BCN** konjugátumával (**FA-peptid-COU-PEG-MitoSiR**) (preclick) végzett kísérletek az előző fejezetben bemutatott sémát követték. Előkísérletben megvizsgáltam, hogy a **MitoSiR** festék hol halmozódik fel HeLa sejtekben (13. A Ábra), majd hordozóhoz kapcsolva (**FA-peptid-COU-PEG-MitoSiR**) milyen képleteket jelöl (13. B Ábra), végül próbálkoztam a festék felszabadítására a konjugátumból (14. Ábra).

A **FA-peptid-COU-PEG-MitoSiR** konjugátumok is szelektív FR- α jelölést mutattak, ám a koncentráció növelésével nem-kívánatos intracelluláris háttér jelölődés jelenik meg. (13. B Ábra)



14. Ábra: A MitoSiR felszabadításának vizsgálata az FA-peptid-COU-PEG-MitoSiR konjugátumból (0,3 μ M); FR pozitív HeLa sejteken vizsgálva; Felszabadítás: 10 s bevilágítás (metalhalid lámpa); Alkalmazott lézer: 638 nm-es, intenzitás (i): jobb felső sarok A bevilágítás a mikroszkóp metalhalid lámpájával történt 10 s időtartamban. Mércse: 30 μ m.

A 14. ábra mutatja be a **MitoSiR** felszabadítására tett próbálkozásunkat. A nagyított felvételen látszik, hogy a membránstruktúra kék fény hatására elhalványodik, az intracelluláris, mitokondrium struktúrák jobban definiáltakká válnak, ami feltételezi a membrán-asszociált konjugátumból a **MitoSiR** felszabadulását. Noha ezen eredmények erőteljesebb bizonyításának feladata még előttünk áll, úgy tűnik, hogy jó úton járunk, mert IR-TAG-hez hasonlóan a folsav-alapú sejtes modell is alkalmas a feltételelesen fotoaktiválható célzott hatóanyagleadás tanulmányozására.

Összefoglalás

Mindkét sejtes modell (IR-TAG, folsav-receptor) esetében sikeresen kapcsoltam bioortogonális partneréhez a Tet-COU-PEG védőcsoportot, majd hajtottam végre vele szelektív jelölést. Ezen túlmenően célba juttattam a Tet-COU-PEG-MitoSiR modellvegyületet és szabadítottam fel belőle riportervegyületet, melynek mitokondrium specifikus jelölését is nyomon követtem.

Megemlítendő ugyanakkor, hogy a vegyület felszabadításának megfigyelését erőteljesen limitálja, hogy az általa célzott sejtalkotó nehezen megkülönböztethető más, citoplazmában nagyszámban jelenlévő organelumtól – mint pl. lizoszóma vagy endoszómák - melyek maguk is részt vehetnek a konjugátum sejten belüli szállításában, hasznosításában. Így mielőtt áttérhetnénk a hatóanyagot tartalmazó konjugátumok tesztelésére, érdemes lenne más, ezen limitációktól nem szenvedő riportervegyületek kipróbálása is. Ilyen alkalmas riporterek lehetnek pl. az interkalálódó DNS festékek, melyek amellet, hogy a citoplazmától jól elkülöníthető sejtmagot festik meg, ún. strukturális fluorogenicitással bírnak, azaz csak akkor válnak fluoreszcenssé, ha bázispárok közé ékelődnek.

Szerzői hozzájárulás

Ezúton nyilatkozom, hogy a

- A feltételesen fotoaktiválható vegyületek IR-TAG modellrendszeren történő vizsgálatát (HEK293T sejtek transzfekciója és jelölése) **Én** végeztem.
- A feltételesen fotoaktiválható vegyületek Receptor-Ligand modellrendszeren (FR - folsav-peptid-BCN) történő vizsgálatát (konjugátumok előállítása, sejtek jelölése és annak optimalizálása) **Én** végeztem.

Ezúton nyilatkozom, hogy OTDK konferencián korábban **nem értem el helyezést.**

Irodalomjegyzék

- (1) Bae, Y. H.; Park, K. Targeted Drug Delivery to Tumors: Myths, Reality and Possibility. *J Control Release* **2011**, *153* (3), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.001>.
- (2) *Ligand-Targeted Drug Delivery | Chemical Reviews*. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.chemrev.7b00013> (accessed 2021-05-12).
- (3) Joubert, N.; Beck, A.; Dumontet, C.; Denevault-Sabourin, C. Antibody-Drug Conjugates: The Last Decade. *Pharmaceuticals (Basel)* **2020**, *13* (9). <https://doi.org/10.3390/ph13090245>.
- (4) Patra, M.; Zarschler, K.; Pietzsch, H.-J.; Stephan, H.; Gasser, G. New Insights into the Pretargeting Approach to Image and Treat Tumours. *Chemical Society Reviews* **2016**, *45* (23), 6415–6431. <https://doi.org/10.1039/C5CS00784D>.
- (5) Reardan, D. T.; Meares, C. F.; Goodwin, D. A.; McTigue, M.; David, G. S.; Stone, M. R.; Leung, J. P.; Bartholomew, R. M.; Frincke, J. M. Antibodies against Metal Chelates. *Nature* **1985**, *316* (6025), 265–268. <https://doi.org/10.1038/316265a0>.
- (6) Scinto, S. L.; Bilodeau, D. A.; Hincapie, R.; Lee, W.; Nguyen, S. S.; Xu, M.; am Ende, C. W.; Finn, M. G.; Lang, K.; Lin, Q.; Pezacki, J. P.; Prescher, J. A.; Robillard, M. S.; Fox, J. M. Bioorthogonal Chemistry. *Nature Reviews Methods Primers* **2021**, *1* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00028-z>.
- (7) Wu, P. The Nobel Prize in Chemistry 2022: Fulfilling Demanding Applications with Simple Reactions. *ACS Chem. Biol.* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00788>.
- (8) Stéen, E. J. L.; Jørgensen, J. T.; Denk, C.; Battisti, U. M.; Nørregaard, K.; Edem, P. E.; Bratteby, K.; Shalgunov, V.; Wilkovitsch, M.; Svatunek, D.; Poulie, C. B. M.; Hvass, L.; Simón, M.; Wanek, T.; Rossin, R.; Robillard, M.; Kristensen, J. L.; Mikula, H.; Kjaer, A.; Herth, M. M. Lipophilicity and Click Reactivity Determine the Performance of Bioorthogonal Tetrazine Tools in Pretargeted In Vivo Chemistry. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acspsci.1c00007>.
- (9) Bargh, J. D.; Isidro-Llobet, A.; Parker, J. S.; Spring, D. R. Cleavable Linkers in Antibody–Drug Conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (16), 4361–4374. <https://doi.org/10.1039/C8CS00676H>.
- (10) Kim, M. M.; Darafsheh, A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* **2020**, *96* (2), 280–294. <https://doi.org/10.1111/php.13219>.
- (11) Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (1), 119–191. <https://doi.org/10.1021/cr300177k>.
- (12) Bojtár, M.; Németh, K.; Domahidy, F.; Knorr, G.; Verkman, A.; Kállay, M.; Kele, P. Conditionally Activatable Visible-Light Photocages. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (35), 15164–15171. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c07508>.
- (13) Tedeschini, T.; Campara, B.; Grigoletto, A.; Bellini, M.; Salvalaio, M.; Matsuno, Y.; Suzuki, A.; Yoshioka, H.; Pasut, G. Polyethylene Glycol-Based Linkers as Hydrophilicity Reservoir for Antibody-Drug Conjugates. *Journal of Controlled Release* **2021**, *337*, 431–447. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.07.041>.
- (14) Török, G.; Cserép, G. B.; Telek, A.; Arany, D.; Váradi, M.; Homolya, L.; Kellermayer, M.; Kele, P.; Németh, K. Large Stokes-Shift Bioorthogonal Probes for STED, 2P-STED and Multi-Color STED Nanoscopy. *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *9* (1), 015006. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/abb363>.

- (15) Sudimack, J.; Lee, R. J. Targeted Drug Delivery via the Folate Receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *41* (2), 147–162. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00062-9).
- (16) Scaranti, M.; Cojocaru, E.; Banerjee, S.; Banerji, U. Exploiting the Folate Receptor α in Oncology. *Nat Rev Clin Oncol* **2020**, *17* (6), 349–359. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0339-5>.
- (17) Numasawa, K.; Hanaoka, K.; Saito, N.; Yamaguchi, Y.; Ikeno, T.; Echizen, H.; Yasunaga, M.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Miura, M.; Nagano, T.; Urano, Y. A Fluorescent Probe for Rapid, High-Contrast Visualization of Folate-Receptor-Expressing Tumors In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition* **2020**, *59* (15), 6015–6020. <https://doi.org/10.1002/anie.201914826>.
- (18) Siwowska, K.; Schmid, R. M.; Cohrs, S.; Schibli, R.; Müller, C. Folate Receptor-Positive Gynecological Cancer Cells: In Vitro and In Vivo Characterization. *Pharmaceuticals* **2017**, *10* (3), 72. <https://doi.org/10.3390/ph10030072>.
- (19) Bandara, N. A.; Hansen, M. J.; Low, P. S. Effect of Receptor Occupancy on Folate Receptor Internalization. *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11* (3), 1007–1013. <https://doi.org/10.1021/mp400659t>.
- (20) Wibowo, A. S.; Singh, M.; Reeder, K. M.; Carter, J. J.; Kovach, A. R.; Meng, W.; Ratnam, M.; Zhang, F.; Dann, C. E. Structures of Human Folate Receptors Reveal Biological Trafficking States and Diversity in Folate and Antifolate Recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110* (38), 15180–15188. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308827110>.
- (21) Low, P. S.; Kularatne, S. A. Folate-Targeted Therapeutic and Imaging Agents for Cancer. *Curr Opin Chem Biol* **2009**, *13* (3), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.022>.
- (22) Kozma, E.; Paci, G.; Estrada Girona, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. Fluorogenic Tetrazine-Siliconrhodamine Probe for the Labeling of Noncanonical Amino Acid Tagged Proteins. *Methods Mol Biol* **2018**, *1728*, 337–363. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7574-7_22.