



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



**Марија С. Арев**

**ФОРМУЛАЦИЈА И ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКА  
КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЛИОФИЛИЗОВАНИХ  
И РАДИООБЕЛЕЖЕНИХ ИМУНОКОЊУГАТА  
ТРАСТУЗУМАБА  
ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

Ниш, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Marija S. Arev**

**FORMULATION AND PHYSICOCHEMICAL  
CHARACTERIZATION OF FREEZE-DRIED  
AND RADIOLABELED TRASTUZUMAB  
IMMUNOCONJUGATES**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Доц. др Предраг Џодић Одсек за Фармацију Медицински Факултет, Универзитет у Нишу
Наслов:	Формулација и физичко-хемијска карактеризација лиофилизованих и радиообележених имунокоњугата трастузумаба
Резиме:	<p>Терапија заснована на моноклонским антителима је један од нај-успешнијих терапијских приступа код солидних тумора и већине малигних болести. Радиообележавањем антитела радиоизотопима добијају се селективни и специфични радиофармаци чиме се повећава ефекат радиотерапијских метода. Трастузумаб је моноклонско антитело које се примењује за лечење ХЕР2-позитивног карцинома дојке, па је одабран у циљу развоја формулације радиоимунокоњугата за терапију.</p> <p>Трастузумаб је коњугован коришћењем три хелатора, p-SCN-Bn-DTPA, p-SCN-Bn-1B4M-DTPA, p-SCN-Bn-DOТА у различитим моларним односима антитело:хелатор (1:10, 1:20, 1:50). Леофилизовани коњугати обележени су претходно нерадиоактивним металним јонима итријумом <math>Y^{3+}</math> и лутецијумом <math>Lu^{3+}</math> ради одређивања могућих физичко-хемијских промена у структури након увођења радиоактивних метала. Имунокоњугати (при моларном односу антитело:хелатор 1:20) су били окарактерисани применом HPLC-UV методе, која је показала висок ниво интегритета и одсуство деградационих продуката антитела. Очувана секундарна структура антитела доказана је спектроскопском анализом са FT-IR и Рамановом спектроскопијом. У Рамановим спектрима откривени су карактеристичне амидне I траке на <math>\sim 1670\text{ cm}^{-1}</math> и амидне III траке (<math>1230\text{--}1300\text{ cm}^{-1}</math>) специфичне за антитела која се углавном састоје од <math>\beta</math>-равни. FT-IR спектри такође садрже амидне I (<math>1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}</math>), амидне II (<math>1480\text{--}1575\text{ cm}^{-1}</math>) и амидне III траке (<math>1255\text{--}1244\text{ cm}^{-1}</math>) специфичне за секундарну структуру IgG1 протеина. Одређивање неопходног броја молекула хелатора везаних по једном молекулу антитела, важан је корак у циљу добијања стабилног радиоимунокоњугата у високом приносу. За</p>

ово испитивање користишћена је метода MALDI-TOF MS, којом смо доказали успешну коњугацију и утврђивање задовољавајућег броја хелатора по молекулу антитела за даље радиообележавање. Интегритет антитела, чистоћа и хомогеност након лиофилизације и обележавања са нерадиоактивним изотопима, утврђени су помоћу SDS-PAGE. Резултати показују да нема деструкције имунокоњугата у свим узорцима, без обзира на њихову концентрацију и моларни однос антитело:хелатор. Радиообележавање лиофилизоване формулације  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$  (специфичне активности  $200\mu\text{Ci/mL}$ ) је било успешно са високим приносом радиообележавања:  $>96\%$  за  $^{90}\text{Y}$ -имунокоњугате и  $>99\%$  за  $^{177}\text{Lu}$ -имунокоњугате. Испитивања стабилности након 72 сата ITLC-SG методом, показала су високу стабилност радиоимунокоњугата уз минимално ослобађање радиоизотопа ( $< 25\%$   $^{90}\text{Y}$  и  $<5\%$   $^{177}\text{Lu}$ ).

Резултати овог рада потврђују могућност даљих испитивања радиоимунокоњугата на бази трастузумаба у правцу *in vivo* фармакокинетичких студија на животињским моделима, са циљем утврђивања најприкладније формулације погодне за клиничка испитивања.

Научна област:

Медицинске науке, Фармација

Научна  
дисциплина:

Фармацеутске науке

Кључне речи:

трастузумаб, p-SCN-Bn-DTPA, p-SCN-Bn-1B4M-DTPA,  
p-SCN-Bn-DOTA,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$

УДК:

616-097-073:544.2(043.3)

CERIF  
класификација:

B 740 Фармаколошке науке, фармакогнозија, фармација,  
токсикологија

Тип лиценце  
Креативне  
заједнице:

CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Ass. Prof. Predrag Džodić, PhD Department of Pharmacy Faculty of Medicine, University of Niš
Title:	Formulation and physicochemical characterization of liophilized and radiolabeled trastuzumab immunoconjugates
Abstract:	<p>Monoclonal antibody-based therapy is one of the most successful therapeutic approaches for solid tumors and other malignancies. Radiolabeling of antibodies with radioisotopes provides development of selective and specific radiopharmaceuticals with better radiotherapeutical effect. Trastuzumab is a monoclonal antibody used for the treatment of HER2-positive breast cancer. The radioimmunoconjugate formulation of trastuzumab offers a strategy that is promising for selective and specific cancer therapies therefore it was chosen for development of new formulation of radioimmunoconjugate for the therapy.</p> <p>Trastuzumab has been conjugated with three chelators, p-SCN-Bn-DTPA, p-SCN-Bn-1B4M-DTPA, p-SCN-Bn-DOTA using different molar ratios (1:10, 1:20, 1:50). The conjugates were labeled with non-radioactive metal ions <math>Y^{3+}</math> and <math>Lu^{3+}</math> and used to determine the possible physicochemical changes in the structure after radioactive metal introduction. Immunoconjugates (1:20 ratio) were characterized by HPLC-UV. They show the high levels of integrity, without degradation products present in comparison with the native antibody. The retained secondary structure of the antibody was proven by spectroscopic analysis with FT-IR and Raman spectroscopy. Characteristic amide I band at <math>\sim 1670\text{ cm}^{-1}</math> and amide III band (<math>1230\text{-}1300\text{ cm}^{-1}</math>), specific for antibody principally composed of <math>\beta</math>-sheets, were detected in Raman spectra. FT-IR spectra also contain the amide I (<math>1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}</math>), amide II (<math>1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}</math>) and amide III bands (<math>1255\text{-}1244\text{ cm}^{-1}</math>) specific for secondary structure of the IgG1 proteins. The sufficient number of chelator molecules bound to a single antibody was an important step to ensure stable binding to radioactive isotopes with a high radiolabeling</p>

yield. For this characterization, we used MALDI-TOF MS, which method proved successful conjugation and identification of a sufficient number of chelators per antibody molecule. Antibody integrity, purity and possible aggregate formation after lyophilization and non-radioactive isotope labeling we determined using SDS-PAGE. The obtained gels shows that there is no destruction of immunoconjugates in all samples, regardless of their concentration and relationship with ligands. Radiolabeling of freeze-dried formulation with  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  (with a specific activity of  $200 \mu\text{Ci} / \text{mL}$ ) has been shown successful binding with high radiolabeling yield ( $>96\%$  for  $^{90}\text{Y}$  and  $>99\%$  for  $^{177}\text{Lu}$ ). Stability studies using ITLC-SG method high stability of radioimmunoconjugate 72 h after labelling with non-significant radioisotope release ( $<25\%$  for  $^{90}\text{Y}$  and  $<5\%$  for  $^{177}\text{Lu}$ ). The results of this work confirm the possibility of further testing of radioimmunoconjugates based on trastuzumab in the direction of *in vivo* pharmacokinetic studies in animal models, with the aim of determining the most appropriate formulation suitable for clinical trials.

Scientific Field:	Medical sciences, Pharmacy
Scientific Discipline:	Pharmaceutical chemistry
Key Words:	Trastuzumab, p-SCN-Bn-DTPA, p-SCN-Bn-1B4M-DTPA, p-SCN-Bn-DOTA, $^{177}\text{Lu}$ , $^{90}\text{Y}$
UDC:	616-097-073:544.2(043.3)
CERIF Classification:	B 740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology
Creative Commons License Type:	<b>CC BY-NC-ND</b>

*За израду ове докторске дисертације дугујем захвалност мом ментору, **доц. др Предрагу Цодићу** на стручној подршци, помоћи и разумевању, његовим корисним саветима и сугестијама у току читаве израде докторске дисертације, особито у отежаним условима током пандемије КОВИД-а 19.*

*Посебну захвалност дугујем **проф. др Емилији Јеневић-Ивановској** из Републике Северне Македоније на великој подршци током свих етапа израде овог истраживања, уз потребу да изразим дивљење њеној енергији и оптимизму којим зрачи, а који су увек неопходни.*

*Посебну захвалност дугујем **проф. др Петрету Макреском** из Републике Северне Македоније на несебичној помоћи током спровођења инструменталних истраживања (FT-IR и Раманове спектроскопије).*

*Захвалност дугујем и **проф. др Бојану Марковићу, др Сањи Врањеш Ђурић, проф. др Марини Влајковић и доц. др Јелени Живковић***

*Захваљујем и мом супругу, мојој мами и тати, на разумевању.*



***Овај рад је посвећен  
мојој ћерки Мији***

# САДРЖАЈ

---

<b>1. УВОД</b> .....	<b>15</b>
1.1. Структура хуманих антитела .....	15
1.1.1. Развој, структура и класификација моноклонских антитела.....	16
1.1.2. Механизам деловања моноклонских антитела .....	17
1.1.3. Моноклонска антитела у терапији канцера.....	18
1.1.3.1.Трастузумаб – анти HER2/neu антитело.....	20
1.2. HER2/neu рецептор .....	23
1.2.1. Улога HER2/neu рецептора у развоју рака дојке .....	24
1.2.2. Тирозин-киназни инхибитори .....	25
1.3. Протеин тирозин-киназе.....	25
1.3.1. Класификација протеин тирозин-киназа .....	26
1.3.2. Трансмембрански рецептор тирозин-киназе.....	26
1.4. Антитуморски радиоимунокоњугати.....	27
1.4.1. Најчешће доступни радиоизотопи .....	28
1.4.1.1. Итријум-90 ( <sup>90</sup> Y).....	30
1.4.1.2. Лутецијум-177 ( <sup>177</sup> Lu).....	30
1.4.2. BFCA за обележавање моноклонских антитела са <sup>90</sup> Y и <sup>177</sup> Lu.....	30
1.5. Лиофилизација антитела .....	32
1.6. Методе за карактеризацију имунокоњугата .....	34
1.6.1. Натријум додецил сулфат – полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE).....	34
1.6.2. Вибрациона спектроскопија .....	36
1.6.2.1. Инфрацрвена спектроскопија .....	37
1.6.2.2. Раманова спектроскопија .....	39
1.6.3. Матрицом потпомогнута ласерска десорпција/јонизација-време прелета масена спектрометрија (MALDI-TOF MS) .....	40
1.6.4. Течна хроматографија са детекцијом у ултраљубичастој области спектра (HPLC-UV) .....	42
1.7. Инстант танкослојна хроматографија (ITLC) .....	43
<b>2. ЦИЉ</b> .....	<b>45</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>46</b>
3.1. Пречишћавање антитела.....	46
3.2. Коњугација антитела коришћењем три различита BFCA-а у различитим моларним односима .....	46



3.3. Лиофилизација трастузимаб-имунокоњугата .....	46
3.4. Обележавање трастузимаб-коњугата нерадиоактивним итријумом и лутецијумом .....	47
3.5. Испитивање интегритета имунокоњугата применом SDS-PAGE.....	47
3.6. Инфрацрвена спектроскопија имунокоњугата.....	48
3.7. Раманова спектроскопија имунокоњугата.....	49
3.8. Одређивање просечног броја BFCA са MALDI-TOF MS .....	49
3.9. Одређивање интегритета трастузимаб-имунокоњугата након лиофилизације применом HPLC-UV-а .....	50
3.10. Радиоактивно обележавање трастузимаб-коњугата .....	50
3.11. Одређивање радиохемијске чистоће радиоимунокоњугата коришћењем ITLC-SG методе .....	50
3.12. Статистичка обрада података .....	51
<b>4. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>52</b>
4.1. Коњугација антитела са хелаторима BFCA.....	52
4.2. Лиофилизација имунокоњугата.....	53
4.3. Обележавање трастузимаб-коњугата нерадиоактивним итријумом и лутецијумом .....	53
4.4. Испитивање интегритета имунокоњугата након лиофилизације и обележавања са нерадиоактивним изотопима помоћу SDS-PAGE .....	54
4.5. Хемијска карактеризација имунокоњугата након коњугације, лиофилизације и обележавања нерадиоактивним металним јонима .....	56
4.6. Одређивање просечног броја BFCA везаног за један молекул трастузимаба применом методе MALDI-TOF MS.....	102
4.7. Одређивање интегритета имунокоњугата коришћењем HPLC-UV .....	107
4.8. Радиоактивно обележавање имунокоњугата и карактеризација радиоимунокоњугата .....	109
<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>125</b>
<b>6. ЗАКЉУЧАК .....</b>	<b>137</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>139</b>
Биографија аутора .....	156

## ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

<sup>225</sup> Ac	– Actinium-225, Актинијум-225
<sup>211</sup> At	– Astatine-211, Астат-211
<sup>213</sup> Bi	– Bismuth-213, Бизмут-213
<sup>67</sup> Cu	– Cooper-67, Бакар-67
<sup>131</sup> I	– Iodine-131, Јод-131
<sup>176</sup> Lu	– Lutetium-176, Лутецијум-176
<sup>177</sup> Lu	– Lutetium-177, Лутецијум-177
<sup>186</sup> Re	– Rhenium-186, Ренијум-186
<sup>188</sup> Re	– Rhenium-188, Ренијум-188
<sup>90</sup> Sr	– Strontium-90, Стронцијум-90
<sup>90</sup> Y	– Yttrium-90, Итријум-90
<sup>90</sup> Zr	– Zirconium-90, Цирконијум-90
ACN	– Acetonitrile, Ацетонитрил
ACR/BIS	– Acrylamide / bisacrylamide, Акриламид / бисакриламид
ADCC	– Antibody-dependent cellular cytotoxicity, Ћелијска цитотоксичност зависна од антитела
ALK	– Anaplastic lymphoma kinase, Киназа анапластичног лимфома
AML	– Acute myeloid leukemia, Акутна мијелоидна леукемија
APS	– Ammonium persulphate, Амонијум-персулфат
ATR	– Attenuated total reflectance, Пригушена тотална рефлексација
ATP	– Adenosine triphosphate, Аденозин-трифосфат
B-NHL	– B-cell non-Hodgkin's lymphoma, Б-ћелијски нон-Ходжкинов лимфом
BFCA	– Bifunctional chelating agent, Бифункционални хелатни агенс
C1q	– Component of complement 1q, Компонента комплемента 1q
CAIX	– Carbonic anhydrase IX, Карбонска анхидраза IX
CD	– Cluster of differentiation, Кластер диференцијација
CDC	– Complement-dependent cellular cytotoxicity, Цитотоксичност зависна од комплемента за циљне ћелије

CDR	– Complementary determining regions, Регије које одређују комплементарност
CSF	– Colony-stimulating factor, Фактор стимулације колоније
CTLA-4	– Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, Цитотоксични протеин 4 повезан са Т-лимфоцитима
ДНК	– Дезоксирибонуклеинска киселина
DOTA	– 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, 1,4,7,10-Тетраазациклододекан-1,4,7,10- тетрасирћетна киселина
DTPA	– Diethylene-triamine pentaacetic acid, Диетилен-триаминопентасирћетна киселина
ED-B	– Extra domain B, Додатни домен Б
EGFR	– Epidermal growth factor receptor, Рецептори за епидермални фактор раста
EGFR1	– Epidermal growth factor receptor 1, Рецептор за епидермални фактор раста 1
EMA	– European medicines agency, Европска агенција за лекове
Fab	– Fragment antigen-binding, Антиген-везујући фрагмент
FAP $\alpha$	– Fibroblast activation protein- $\alpha$ , Протеин активације фибробласта алфа
Fc	– Fragment crystallisable, Кристализирајући фрагмент
FGF	– Fibroblast growth factor, Фактор раста фибробласта
FDA	– Food and drug administration, Управа за храну и лекове
FT-IR	– Fourier-transform infrared spectroscopy, Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом
FLT3	– Tyrosine kinase 3, Тирозин киназа 3
GD2	– Disialoganglioside, Дисижалоганглиозид
НАМА	– Human anti-mouse antibody, Хумана анти-мишја антитела
HER2	– Human epidermal growth factor receptor 2, Рецептор за хумани епидермални фактор раста 2
HER3	– Human epidermal growth factor receptor 3, Рецептор за хумани епидермални фактор раста 3

HER4	– Human epidermal growth factor receptor 4, Рецептор за хумани епидермални фактор раста 4
HGFR	– Hepatocyte growth factor receptor, Рецептор хепатоцитног фактора раста
HLA-DR	– Human leukocyte antigen-DR, Хумани леукоцитни антиген-ДР
HPLC-UV	– High performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection, Течна хроматографија под високим притиском са детекцијом у ултраљубичастој области
IgG	– Immunoglobulin G, Имуноглобулин G
IGF-1	– Insulin-like growth factor 1, Инсулину сличан фактор раста тип 1
ITLC	– Instant Thin Layer Chromatography, Инстант танкослојна хроматографија
K <sub>D</sub>	– Dissociation constant of antigen-antibody complex Константа дисоцијације антиген-антитело комплекса
kDa	– Kilodalton, Килодалтон
LuCl <sub>3</sub>	– Lutetium(III) chloride, Лутецијум(III)-хлорид
mAb	– Monoclonal antibody, Моноклонско антитело
MALDI-TOF MS	– Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry, Матрицом потпомогнута ласерска десорпција/јонизација-време прелета масена спектрометрија
MBq	– Megabecquerel, Мегабекерел
MeV	– Megaelectronvolt, Мегаелектроволт
mm	– Milimeter, Милиметар
μm	– Micrometer, Микрометар
MTD	– Maximum Tolerated Dose, Максимална толерантна доза
mCi	– Millicurie, Миликири
NaCl	– Sodium chloride, Натријум-хлорид
NCR	– Nuclear Regulatory Commission, Нуклеарна регулаторна комисија
nM	– Nanomole, Наномол

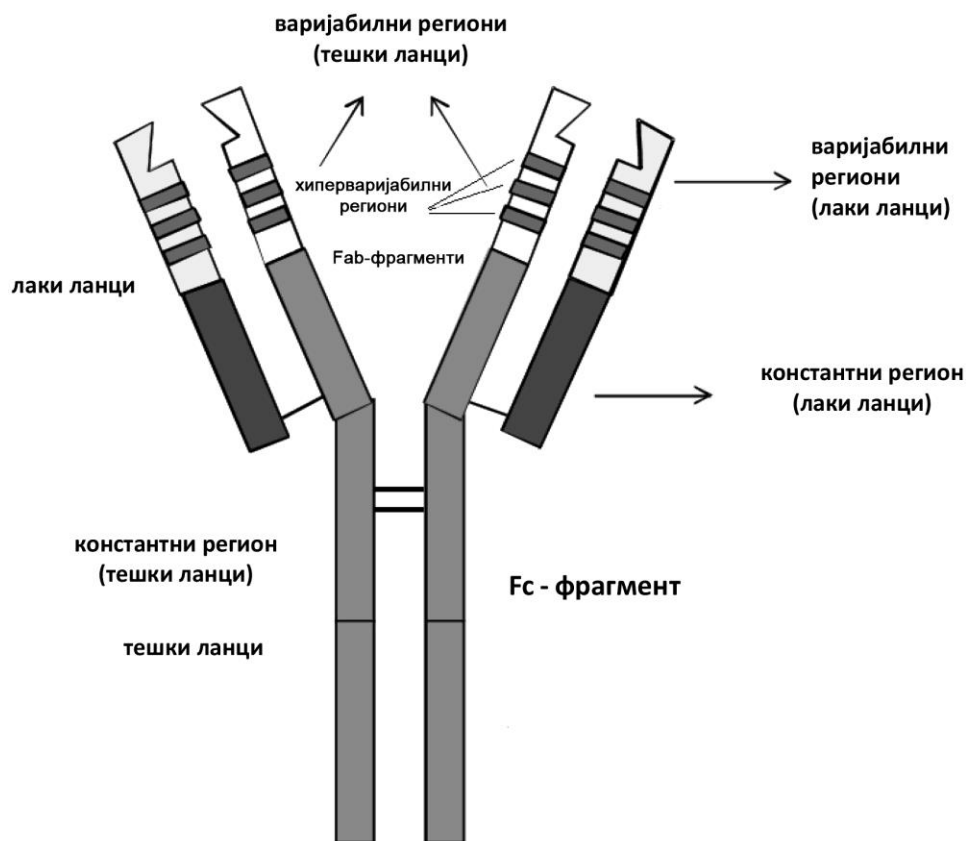
NOTA	– 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid 1,4,7-Триазациклононан-1,4,7-трисирћетна киселина
NRTK	– Non-receptor tyrosine kinase, Нерецепторска тирозин киназа
PBS	– Phosphate buffer saline, Фосфатни пуфер
p-SCN-Bn-1B4M-DTPA	– 2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-6-methyl-diethylene-triamine pentaacetic acid, (2-(4-Изотиоцианатобензил)-6-метил-диетилен-триамино пентасирћетна киселина)
p-SCN-Bn-DOTA	– (2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), (2-(4-Изотиоцианатобензил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрасирћетна киселина)
p-SCN-Bn-DTPA	– (2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-diethylene-triaminepentaacetic acid), (2-(4-Изотиоцианатобензил)-диетилен-триаминопентасирћетна киселина)
PDGF	– Platelet-derived growth factor, Фактор раста тромбоцита
PD-1	– Programmed cell death protein 1, Протеин програмиране ћелијске смрти 1
PD-L1	– Programmed death-ligand 1, Лиганд програмиране ћелијске смрти 1
Phe	– Phenylalanine, Фенилаланин
PSMA	– Prostate-specific membrane antigen, Простата специфичан мембрански антиген
PTK	– Protein tyrosine kinases, Протеин тирозин киназе
QC	– Quality control, Контрола квалитета
RIT	– Radioimmunotherapy, Радиоимунотерапија
RTK	– Receptor tyrosine kinase, Рецептор тирозин киназе
SCFR	– Mast/stem cell growth factor receptor, Рецептор фактор раста матичних/стем ћелија
scFv	– Single-chain variable-fragment, Једноланчани варијабилни фрагмент
SDS-PAGE	– Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Натријум додецил сулфат-полиакриламид гел електрофореза
TEMED	– Tetramethylethylenediamine, Тетраметилетилендиамин

TFA	– Trifluoroacetic acid, Трифлуоросирћетна киселина
Tris HCl	– Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrogen chloride buffer, Трис(хидроксиметил)-аминометан хидрохлорид пуфер
Tr	– Trastuzumab, Трастузумаб
Trp	– Tryptophan, Триптофан
Tyr	– Tyrosine, Тирозин
USP	– United States Pharmacopeia, Фармакопеја Сједињених Америчких Држава
UV/VIS	– Ultraviolet/Visible Spectroscopy, Ултраљубичаста/Видљива спектроскопија
VEGF	– Vascular endothelial growth factor, Васкуларни ендотелни фактор раста
YCl <sub>3</sub>	– Yttrium(III) chloride, Итријум(III)-хлорид

# 1. УВОД

## 1.1. Структура хуманих антитела

Б-ћелије стварају антитела (имуноглобулине), молекуле чија је молекулска маса око 150 kDa. Имуноглобулин је састављен од 4 полипептидна ланца (2 тешка и 2 лака ланца), који се спајају како би формирали свој карактеристични облик Y (слика 1). Антитела могу циркулисати у растворљивом облику, или могу бити везани за мембрану Б-ћелије као део Б-ћелијских рецептора. Тешки и лаки ланци имају константни део, означен са (с), који је идентичан код имуноглобулина истог изотипа. Поред тога на лаким ланцима молекул има уникатне варијабилне делове (v) који садрже антиген-везујућа места, лоцирана на оба лака ланца молекула. Ензимско цепање антитела помоћу папаина, даје два Fab-фрагмената и један Fc-фрагмент. Fab-фрагмент садржи један варијабилан домен, који има три хиперваријабилне аминокиселинске секвенце одговорне за специфичност антитела, и један константан домен CDRs (CDR1, CDR2, CDR3). Fc-фрагмент садржи два константна региона. Овај фрагмент одређује изотипове антитела (IgA, IgD, IgG, IgM, IgE) и служи за везивање за комплементе и леукоците (1,2).



Слика 1. Структура хуманих IgG антитела (преузето и адаптирано (3))

Циркулишућа антитела штите организам домаћина на два начина:

- Директним везивањем и неутрализацијом токсина;
- Активирањем имуног одговора домаћина углавном на два начина:
  - Везивањем и активацијом комплемента C1q на Fc-фрагменат, што доводи до формирања мембранског комплекса који напада и лизира циљне ћелије (CDC) (2).
  - Иницирање ћелијског одговора (ADCC) који настаје кроз везивање Fc-рецептора (CD16, CD32, CD64) са природним ћелијама убицама, моноцитима и макрофагима (1).

Различити изотипови и субкласе антитела разликују се у својој способности да активирају ћелијски одговор: хумана IgM антитела искључиво активирају комплемент, док IgG (посебно IgG1 и IgG3) доводи до јаког ADCC (1,4–6).

### 1.1.1. Развој, структура и класификација моноклонских антитела

Моноклонска антитела су молекули произведени у лабораторији, са циљем да служе као антитела који могу да обнове, појачају или имитирају имуни систем. Представљају идентичне имуноглобулине, који потичу из једног Б-ћелијског клона. Ова антитела препознају јединствене епитопе или везујућа места на једном антигену. Антитуморска моноклонска антитела дизајнирана су да се везују за антигене који су бројнији на површини туморских ћелија (7).

Напредак генетичког инжињеринга током година пружио је бројне могућности за дизајнирање и производњу четири главне категорије моноклонских антитела (мишјих, химерних, хуманизованих и хуманих) (8).

Мишја антитела која су првобитно била коришћена, показала су два главна недостатка. С обзиром да потичу од глодара препознаје их имуни систем човека и долази до развоја НАМА. Ова реакција не само што инактивира и елиминише мишја антитела, него ствара антитело-НАМА комплекс, који може довести до алергијске реакције и анафилактичног шока. Због разлике између мишјег и хуманог имуног система, мишји Fc-фрагмент такође смањује могућност изазивања комплемент-посредоване и антитело зависне ћелијске токсичности (9,10).

Да би се превазишли ови проблеми, оригинално мишје антитело је редизајнирано са циљем да се минимизира имуногеност и да се добију антитела која су слична хуманим антителима са добрим фармаколошким одговором (1,11,12).

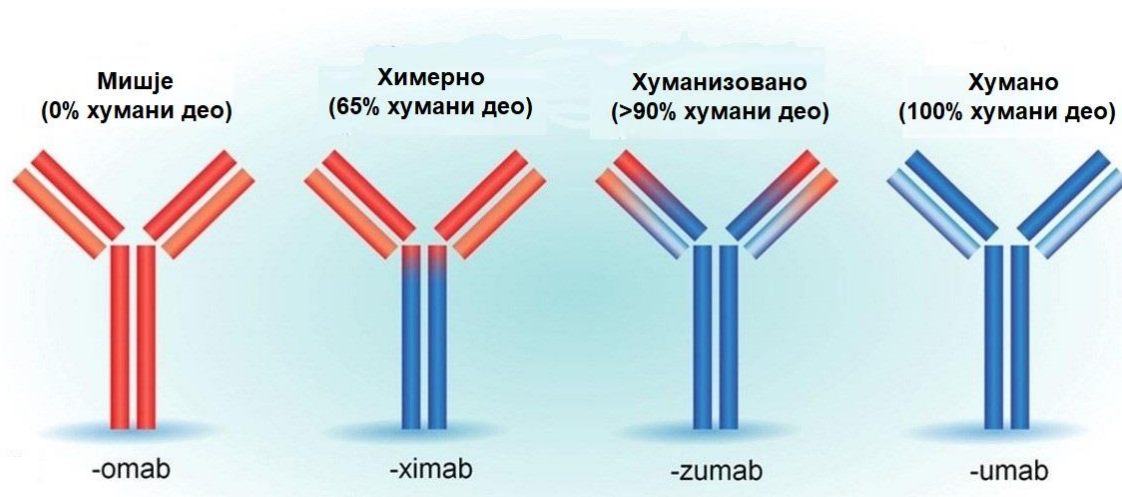


Химерна антитела производе се клонирањем рекомбинантне ДНК која садржи секвенце гена мишјих антитела и гена константних региона хуманих антитела. Ова химерна антитела су мање имуногена у поређењу са мишјим антителима (11).

Хуманизована антитела имају више од 90% хуманих делова, добијају се пресађивањем мишјег CDR у хумана антитела због чега показују најмању имуногеност (13).

Други тип модификације, у циљу побољшања фармакокинетике антитела и смањења НАМА одговора, је коришћење фрагмената антитела. Утврђено је да уклањање Fc-фрагмента смањује НАМА одговор и везивање антитела за Fc-рецепторе у јетри и метаболизовање од стране макрофага (14,15).

Тип антитела може се препознати по суфиксу имена лека: -omab (мишје), -ximab (химерно), -zumab (хуманизовано) или -umab (хумано) (16) (слика 2).



Слика 2. Класификација моноклонских антитела (преузето и адаптирано (17))

### 1.1.2. Механизам деловања моноклонских антитела

Вишеструки механизам деловања моноклонских антитела је значајан за објашњење антитуморске активности антитела специфичних за туморски антиген. Последњих година, највише пажње усмерено је на способност антитела да манипулишу критичним сигналним путевима који одржавају малигни фенотип и да покрену анти-туморски антиген-специфични имуни одговор (18,19).

Механизам деловања моноклонских антитела може да буде преко:

- Директне акције антитела (преко блокаде рецептора, изазивањем апоптозе или испоруком лека или цитотоксичног лека),
- Индиректног начина – механизам имунолошког посредованог убијања ћелија (укључујући CDC, ADCC и регулацију функције Т-ћелије),
- Специфичног ефекта антитела на васкуларну структуру тумора и строме (20).

Клинички доступна антитела обично делују тако што користе комбинацију механизма и усмеравају цитотоксичне ефекте на ћелије тумора. Већина њих користе ADCC или CDC и пренос измењених сигнала унутар ћелије тумора и елиминишу критичне површинске антигене (21).

Директни ефекти антитела настају везивањем за површинске рецепторе на ћелијама, мембрански везане протеине, факторе раста, или протеине у циркулацији. Самим процесом везивања антитела за ћелијске антигене настаје моделирање ћелије. Већина терапијских моноклонских антитела производи биолошки одговор кроз директни контакт између варијабилних региона ћелијских антигена. Поред биолошке активности нека антитела имају и механизам деловања који је индиректно посредован преко Fc-фрагмента. Индиректни ефекат антитела настаје кад се антитела везују за циљне ћелије и стимулишу регрутацију ефекторне ћелије преко ADCC или фагоцитозе. Најчешће ефекторне ћелије су природне ћелије убице, моноцити или макрофаги. Други индиректан метод којим антитела изазивају ћелијску смрт је CDC, где се везивање антитела за циљне ћелије врши активацијом комплементарне каскаде. Који ће се од ова два процеса, ADCC или CDC, активирати, зависи од тога које је IgG антитело присутно (17,22,23).

### 1.1.3. Моноклонска антитела у терапији канцера

Некоњугована моноклонска антитела регистровале су и Европска ЕМА и америчка FDA у циљу лечења различитих солидних тумора и хематолошких малигнитета (табела 1). Постоји велики број терапијских антитела која се рутински испитују за ране или касне клиничке студије. Показало се да је употреба терапијских моноклонских антитела код пацијента са солидним тумором успешнија од антитела усмерених на EGFR и VEGF рецепторе. Моноклонска анитела се могу користити као слободна (некоњугована) или коњугована са различитим лековима, токсинима и лигандима у циљу побољшања специфичности и фармаколошког одговора и уклањања нежељених ефеката (24–27).

Табела 1. Моноклонска антитела која су одобрили ЕМА и FDA

Назив активног принципа	Циљно место	Тип	Година одобрења EU/ЕМА	Година одобрења FDA	Терапијске индикације
Avelumab	PD-L1	Хумани IgG1/κ	2017	2017	Метастатски карцином Меркелових ћелија
Durvalumab	PD-L1	Хумани IgG1/κ	2018	2017	Метастатски уротелијални карцином
Olaratumab	PDGFR-α	Хумани IgG1	2016	2016	Сарком
Daratumumab	CD38	Хумани IgG1/κ	2016	2015	Мултипли мијелом
Elotuzumab	SLAMF7	Хумани IgG1	2016	2015	Мултипли мијелом
Necitumumab	EGFR	Хумани IgG1	2016	2015	Ситно-ћелијски карцином плућа
Atezolizumab	PD-L1	Хумани IgG1	2017	2016	Метастатски ситно-ћелијски карцином плућа
Nivolumab	PD-1	Хумани IgG4	2015	2015	Ситно-ћелијски карцином плућа; Карцином бубрежних ћелија Hodgkin-ова болест меланом
Dinutuximab	GD2	Хумани IgG1/κ	2015	2015	Неуробластом
Bevacizumab	CD19	BiTEs	2015	2014	Прекурсор лимфобласних ћелија леукемија-лимфом
Pembrolizumab	PD-1	Хумани IgG4	2015	2014	Меланом
Ramucirumab	VEGF	Хумани IgG1	2014	2014	Неоплазме у стомаку
Pertuzumab	HER2	Хуманизиран IgG1	2013	2014	Breast cancer
Obinutuzumab	CD20	Хуманизиран IgG1	2014	2013	Хронична лимфоцитна леукемија
Ipilimumab	CTLA-4	Хумани IgG1	2011	2011	Меланом
Denosumab	RANKL	Хумани IgG2	2011	2011	Превенција од SREs код пацијената са метастазама у костима пореклом од солидних тумора
Ofatumumab	CD20	Хумани IgG1	2010	2009	Хронична лимфоцитна леукемија

Назив активног принципа	Циљно место	Тип	Година одобрења EU/EMA	Година одобрења FDA	Терапијске индикације
Satumaxomab	ЕрСАМ и CD3	Трифункционална MAb IgG2a/IgG2b	2009	Није одобрено	Малигни асцит код пацијената са ЕрСАМ - позитивним карциномима
Ranitumumab	EGFR	Хумани IgG2	2007	2006	Метастатски колоректални карцином
Satumaxomab	ЕрСАМ	Хуманизирана MAb	2005	2005	Рак главе и врата
Bevacizumab	VEGF	Хуманизиран IgG1	2005	2004	Метастатски колоректални карцином; Ситно-ћелијски карцином плућа; метастатски рак дојке; мултиформни глиобластом; метастатски карцином бубрежних ћелија
Cetuximab	EGFR	Химерни IgG1	2004	2004	Рак главе и врата; колоректални карцином
Alemtuzumab	CD52	Хуманизирани IgG1	2001	2001	Хронична лимфоцитна леукемија Б-ћелија
Trastuzumab	HER-2	Хуманизирани IgG1	2000	1998	Карцином дојке; метастатски аденокарцином гастричног или гастроезофагеалног споја
Rituximab	CD20	Химерни IgG1	1998	1997	Non-Hodgkin-ов лимфом; хронична лимфоцитна леукемија; реуматоидни артритис

### 1.1.3.1. Трастузумаб – анти HER2/neu антители

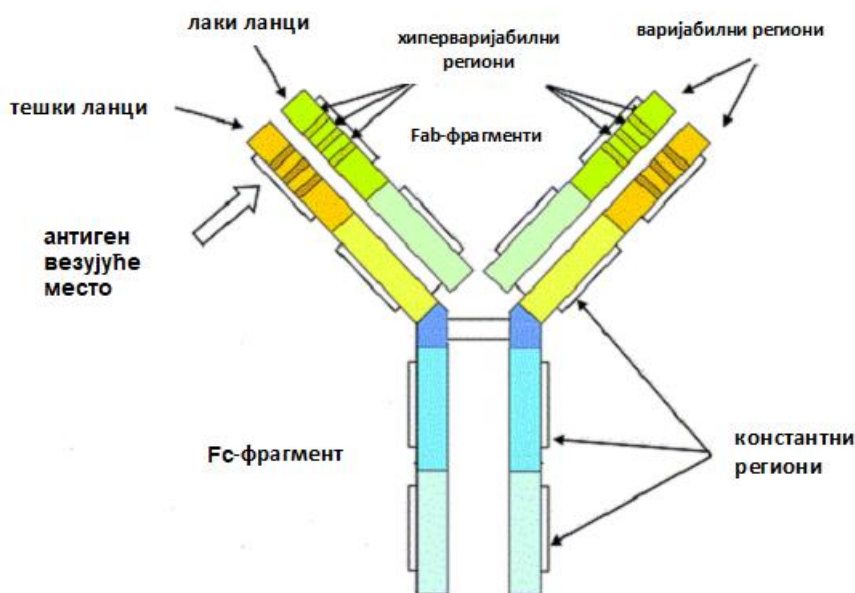
Откривање прекомерне експресије HER2/neu рецептора код агресивног карцинома дојке и негативни прогностички развој, подстакла је истраживаче да формулишу агенсе који се везују за ове рецепторе и у исто време врше њихову инхибицију (28).

Откривено је да се мишја моноклонска антители везују за ванћелијске домene HER2 рецептора и да су нека од њих у стању да инхибирају раст ћелија на местима где је присутна прекомерна експресија овог рецептора. Мишје антители 4D5 инхибира

пролиферацију ћелијских линија које имају прекомерну експресију HER2, али има мањи или нема ефект на ћелије које немају експресију рецептора. Као потентан инхибитор раста хуманих ћелија рака дојке, мишје антитело 4D5 је изабрано за даљи клинички развој, а да би се избегло генерисање НАМА, оно је хуманизовано (29).

Carter и сарадници (30), су субклонирали хиперваријабилне регионе из 4D5 у плазмиде који кодирају стварање константних ланаца хуманог IgG1 и генеришу вектор који кодира стварање химерног антитела које је додатно хуманизовано. Добијено је хуманизовано моноклонско антитело, трастузумаб, које има већи афинитет према HER2 него 4D5 ( $K_D = 0,1 \text{ nM}$ ). Садржи 95% хуманих и 5% мишјих делова и састављено је од 1328 аминокиселина са молекулском тежином од око 145 kDa.

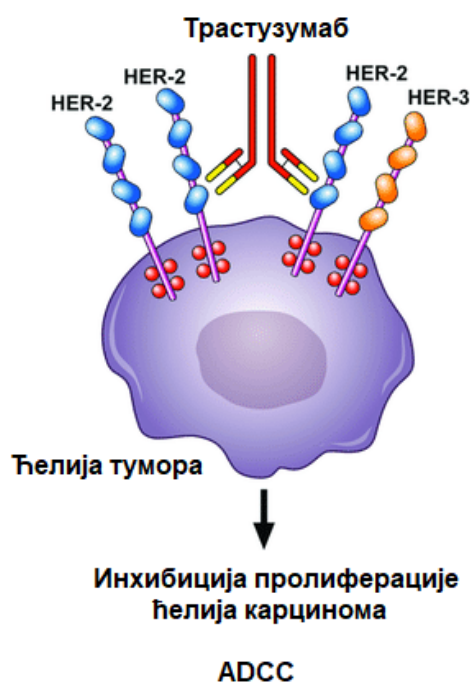
Постоје два лака ланца и два тешка ланца који су међусобно повезани дисулфидним везама. Лаки ланци су састављени из једног варијабилног региона и једног константног региона. Тешки ланци имају један варијабилан и три константна региона. Такође ланци садрже један Fc-фрагмент и два Fab-фрагмента. Специфичност антитела је одређена варијабилним регионом Fab-фрагмента, који садржи три хиперваријабилна региона CDR (слика 3). У периоду од 1998. до 2000. године, трастузумаб је одобрен за терапију HER2 позитивног рака дојке (31,32).



Слика 3. Структура трастузумаба

Константни регион Fc садржи угљено хидратне остатке који интерреагују са осталим деловима имунолошког система као ефекторне ћелије. Трастузумаб испољава своје деловање преко ADCC у присуству хумано-имуних ефекторних ћелија, које повећавају анти-туморску активност антитела. Делује на начин да омета стабилност димера (HER2-HER2, HER2-HER3 и HER2-HER4) и спречава активацију рецептора. Самим тим процесом, спречава се стварање сигнала, раст и пролиферација ћелија (33,34).

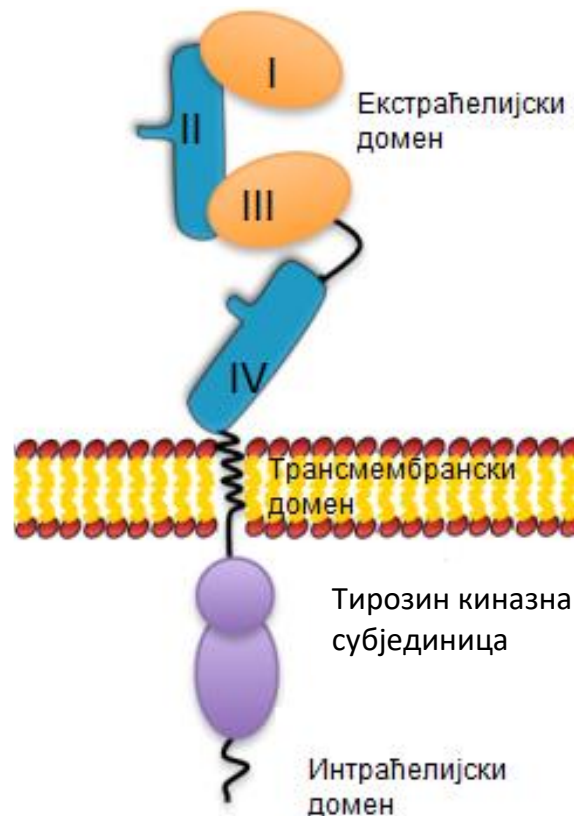
Садржи две антиген-специфичне локације које се везују за екстраћелијске домене HER2 рецептора (IV суб-домена) и спречавају активност унутарћелијске тирозин киназе. Инхибира везивање епидермалног хормона раста за рецепторе и спречава њихову активацију и димеризацију. Као резултат смањења броја рецептора, долази до антагонизма раста и деобе ћелија. Постоји неколико могућих механизма којима трастузумаб смањује сигнализацију, и то: превенција димеризације рецептора, повећање ендоцитне деструкције рецептора и имуна активација. Предклинички модели показују да трастузумаб привлачи имуно ефекторне ћелије које су одговорне за ADCC. Ова хипотеза је подржана резултатима испитивања на анималним моделима код животиња које имају дефицит имуно ефекторних ћелија и код којих трастузумаб не даје одговор. Студије код животињских модела са HER2 позитивним раком дојке и прекомерном експресијом рецептора, указују да трастузумаб може да инхибира ангиогенезу, која иницира нормализацију васкуларизације преко модулације проангиогенетских и анти-ангиогенетских фактора (35,36) (слика 4).



Слика 4. Механизам деловања трастузумаба (преузето и адаптирано (37))

## 1.2. HER2/neu рецептор

HER2/neu, такође познат као c-ErbB2, кодира 185 kDa трансмембрански тирозин киназни рецептор означен као p185HER2 (38,39). HER2/neu рецептор је члан EGFR (ErbB) фамилије, која садржи четири субфамилије које су сличне и уско повезане: EGFR1 (ErbB1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4). HER2/neu рецептор садржи екстраћелијски, трансмембрански и интраћелијски домен (40,41) (слика 5).



Слика 5. Структура HER2/neu рецептора (преузето и адаптирано (42))

**Екстраћелијски домен** је изграђен од четири субдомена: I, II, III и IV и два домена богата цистеином.

**Екстраћелијски субдомен I и III** – за разлику од других рецептора у HER фамилији, субдомен I код HER2/neu је у константном контакту са субдоменом III. Стална интеракција између ова два субдомена одржава рецепторе у отвореној конформацији, откривајући субдомен II и обезбеђујући да је рецептор увек спреман за димеризацију.

**Екстраћелијски субдомен II** – домен одговоран за димеризацију. Субдомен II омогућава да се HER2/neu рецептор веже са другим рецепторима из исте фамилије и да се покрене низводна сигнализација.

**Екстраћелијски субдомен IV** – тачна улога овог субдомена још увек није у целости позната, али се сматра да стабилише и држи рецептор у отвореној конформацији. Овај субдомен помаже процес димеризације, али није директно укључен у њу (38,42).

**Трансмембрански домен** – овај домен држи рецептор уграђен у мембрану и имплициран је у контролу активирања рецептора. Још није у потпуности доказана његова улога у иницирању сигнала (38,43).

**Интраћелијски домен** – овај домен има цитоплазматски линкер, тирозин киназу компоненту и реп који фосфорилише и регрутује адаптерски протеине након димеризације. Ови адаптерски протеини могу покренути пролиферацију ћелије, ћелијски раст и диференцијацију (42,43).

### 1.2.1. Улога HER2/neu рецептора у развоју рака дојке

Након везивања лиганда (фактор раста) за екстраћелијски домен, HER2/neu рецептор гради хомо- или хетеродимере (HER2-HER1, HER2-HER2, HER2-HER3, HER2-HER4) и цитоплазматични домени постају активни. Овим процесом настаје С-терминална фосфорилација, чиме се додатно иницирају доњи сигнални путеви. HER2/neu рецептор функционише као најповољнији партнер димеризације и доприноси преживљавању ћелије, ћелијској пролиферацији и туморогенези (44–46). Екстраћелијски трансмембрански и интраћелијски домени протеина су укључени у процес димеризације и сваки од њих има потенцијални допринос у њему (38).

Код 20–30% пацијената са примарним раком дојке постоји повећан број HER2/neu гена и прекомерна експресија HER2/neu рецептора. Ово стање је везано са агресивношћу болести и лошом прогнозом (47–49). HER2/neu онкоген је дуго времена био предмет дебате у вези са прогностичким значајем за развој рака дојке. Урађена је студија у којој је испитивана амплификација HER2/neu гена код 362 пацијената са примарним раком дојке. Аксиларни лимфни чворови су били присутни код 185 пацијената, а код 177 није било никаквих чворова. Утврђена је амплификација гена код 33% пацијената (30% код пацијената без аксиларних лимфних чворова, 31% код пацијената са 1–3 аксиларних лимфних чворова и 40% код пацијената са >3 аксиларних лимфних чворова). Закључено је да амплификација HER2/neu гена није повезана са статусом лимфних чворова, старошћу пацијената или коришћењем хемотерапије (50).

Друга студија је показала повезаност амплификације HER2/neu гена и примарног рака дојке. Студија је обухватила 282 пацијената и утврђено је да је амплификација



овог гена присутна код 20–23% пацијената. Амплификација је имала већу фреквенцију код већих тумора и код присуства аксиларних лимфних чворова, али није била повезана са годинама, статусом менопаузе и статусом стероидних рецептора (51).

Касније је испитано да ли постоји веза између амплификације HER2/neu онкогена и хистолошког типа као и степена развоја тумора. Прегледан је 401 случај са инвазивним раком дојке, различитим хистолошким карактеристикама и различитим степеном развоја рака. Лобуларни карцином имао је мањи проценат амплификације гена, него дуктални карцином. Амплификација је мања код дукталног канцера првог степена развоја у поређењу са другим и трећим степеном развоја. Метастатски карцином често показује већу амплификацију него у случају када нема метастаза (52).

### 1.2.2. Тирозин-киназни инхибитори

Једно од главних достигнућа у терапији канцера задњих година је циљно уништавање туморских ћелија. Повезивање активности РТК са развојем канцера је велики напредак у терапији канцера и других пролиферативних болести (53).

Онкогена активација тирозин киназе услед мутације, аутокринно-паракрина стимулација ћелије рака може се блокирати селективним анти-тирозин киназама, што се сматра да представља обећавајући приступ у третману канцера (54).

Постоји неколико група супстанци које се користе као антитуморски лекови и које инхибирају тирозин киназе. Најзначајније међу њима су: инхибитори тирозин киназе мале молекулске масе и моноклонска антитела (55–57).

### 1.3. Протеин тирозин-киназе

Еукариотске РТК чине велику супер породицу хомогених протеина. Повезане су на основу својих киназних домена (познатих и као каталитички домени), који се састоје од 250–300 аминокиселинских остатака. Киназни домени који дефинишу ову групу ензима, садрже 12 поддомена који се савијају у заједничку каталитичку структуру језгра, чиме се откривају тродимензионалне структуре неколико протеинских серин киназа. Постоје две главне поделе супер породица: протеин серин/треонин-киназе и протеин тирозин киназе. Активност рецептора ћелијске површине регулише велики број лиганда, укључујући мале органске молекуле, липиде, угљено хидрате, пептиде и протеине. Везивање фактора раста као што су IGF-1, EGFR и PDGF за ванћелијски домен овог трансмембранског рецептора, покреће киназну активност каталитичког домена (58,59).

Фосфорилација тирозина је једна од кључних ковалентних модификација која се јавља код вишећелијских организама, као резултат међућелијске комуникације током ембриогенезе и одржавања ткива код одраслих. Ензими који обављају ову модификацију су RTK, и који катализују пренос  $\gamma$  фосфата од АТФ на хидроксилну групу тирозина на протеинске супstrate. Фосфорилација тирозинских остатака модулира ензимску активност и изазива регрутовање доњих сигналних протеина. Ови ензими су битни медијатори у каскадној сигнализацији и играју кључну улогу у различитим биолошким процесима као што су: раст, диференцијација, метаболизам и апоптоза као одговор на спољашње и унутрашње стимулансе (60,61).

### 1.3.1. Класификација протеин тирозин-киназа

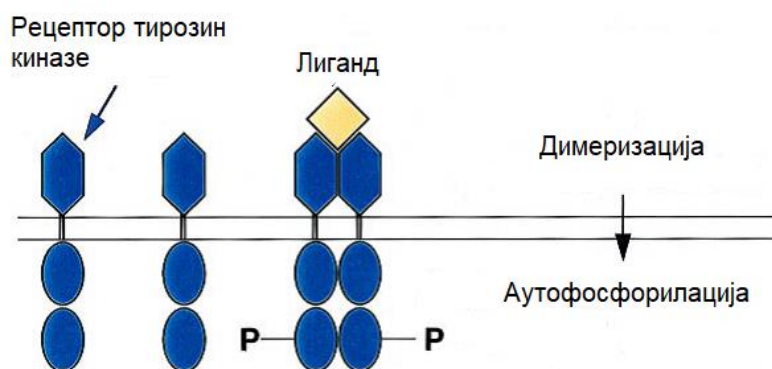
РТК могу се поделити у две основне категорије: трансмембранске RTK и NRTK (54).

### 1.3.2. Трансмембрански рецептор тирозин-киназе

Скоро две трећине гена који кодирају синтезу тирозин киназе припадају RTK-а. Ове тирозин-киназе садрже четири главна домена (62).

Организовање ових рецептора у доменима, показује да су различите функције додељене одређеним регионима. Ванћелијски домен, углавном гликолизован, је одговоран за везивање лиганда и примање екстерног сигнала. Тирозин-киназе посредују у биолошком одговору и шаљу сигнал интрацелуларно. Трансмембрански део је хидрофобан хеликс који учвршћује рецептор за мембрану. RTK нису само ћелијски површински трансмембрански рецептори, него су и ензими који имају киназне активности. Тирозин-киназни домен је део цитоплазматског региона рецептора, познат као каталитички домен (63).

РТК се активирају везивањем лиганда за екстрацелуларне домене, које је праћено димеризацијом рецептора, олакшавајући притом транс-фосфорилацију у цитоплазматском домену. Везивање лиганда индукује активирање интрацелуларног тирозин-киназног домена и доводи до покретања сигнализације специфичне за сваки рецептор (54). Процес активације рецептора приказан је на слици 6.



Слика 6. RTK и његова активација (преузето и адаптирано (55))

RTK могу се поделити у две групе, зависно од структурне организације рецептора. Прва категорија укључује рецепторе који садрже регионе богате цистеином у екстрацелуларном домену у континуираном киназном домену. EGFR група из прве категорије садржи рецепторе са два или три региона богата цистеином (EGFR1, HER2/neu, HER3/erb3, HER4/erb-4) (59,64,65).

Друга група из прве категорије су хетеротетрамери међусобно повезани дисулфидним везама. У ову групу спадају IGF-1 (66) и ALK (67). Недавно идентификовани HGFR је трећи члан и представља хетеродимер повезан дисулфидном везом (68).

Друга велика категорија разликује се од прве категорије у структури како ванћелиског, тако и у киназном домену. Ови рецептори садрже више правилно распоређених цистеина и садрже киназне делове у киназном домену. Рецептори у оквиру ове категорије варирају у односу на број имуноглобулина: VEGF садржи седам (69), PDGF, CSF, SCFR и FLT3 садрже по пет (70), док FGF садржи по два или три имуноглобулина (71)

#### 1.4. Антитуморски радиоимунокоњугати

RIT представља селективну терапију зрачењем употребом радионуклида везаних за туморско усмерена моноклонска антитела (укључујући и фрагменте) или за пептиде. Поред тога, антитела имају цитотоксични ефекат на малигне ћелије, али као нативни молекули без везаних антитуморских лекова у одређеним ситуацијама нису довољни за значајни терапијски ефекат и побољшање степена преживљавања пацијента. Као један од приступа за побољшање терапијског одговора антитела је њихово везивање са радиоизотопима (радиообележавање) који поседују  $\alpha$ - или  $\beta$ - емисију. Овај терапијски приступ и присуство специфичних антитела везаних за радиоизotope, омогућава селективно циљање антигена на туморској ћелији. RIT обезбеђује испоруку

велике дозе терапијског зрачења туморским ћелијама и истовремено смањује изложеност здравих ћелија (72–74).

Стерилне и апирогене формулације које садрже радиоактивно обележана специфична моноклонска антитела администрирају се углавном директно у тумор, у телесну шупљину као што је перитонеум, плеура или итратакални простор или интравенски за системски приступ малигним ћелијама (72,75). Ова терапија се највише примењује код малигнома типа леукемије и лимфома. Солидни тумори су радиорезистентнији и захтевају веће дозе зрачења да би се омогућио одговарајући терапијски ефекат (76).

Детерминација одговарајућег антигена на површини ћелија и оптималног и специфичног антитела је пресудно за успешну терапију. Идеалан антиген за RIT има прекомерну хомогену експресију на површини свих туморских ћелија, нема експресију на здравим ћелијама и не улази у крвоток (71).

Циљни антигени су углавном макромолекули експримирани на површини туморске ћелије, лако доступни из крви и ванћелијских течности. Овде спадају и хематопоетски CD антигени који се експримирају током хематопоетског сазревања различитих ћелија. Ови антигени, укључују и гликопротеине на површини ћелија, ензиме као што су PSMA и CAIX, гликолипиде GD2, угљене хидрате, стромалне компоненте (FAP $\alpha$ ), компоненте крвних судова (VEGFR) и молекуле за пренос сигнала (EGFR) и HER2 (77,78).

И поред тога што не постоји савршени пар антиген-антитело у RIT, идентификовано је неколико изврских циљева за лимфоме, укључујући: CD20, CD22 и HLA-DR за B-NHL; CD33 CD45 за AML; PSMA и ED-B за солидне туморе. CD20 је успешна мета код малигнух тумора Б-ћелија и претставља негликозиловани фосфопротеин који је експримиран на површини зрелих Б-лимфоидних ћелија и 95% Б-ћелијских лимфома (76,79).

#### 1.4.1. Најчешће доступни радиоизотопи

Избор оптималног радиоизотопа за терапију канцера, зависи од захтева RIT, као и од радиофизичких карактеристика изотопа (енергије и времена полураспада). За терапију се користе  $\alpha$ - и  $\beta$ -емитери (табела 2).  $^{131}\text{I}$  и  $^{90}\text{Y}$  су  $\beta$ -емитери, који се често примењују у клиничким испитивањима RIT (80). Такође  $\beta$ -емитер који се све чешће користи је  $^{177}\text{Lu}$  (73).

$^{90}\text{Y}$  има већу  $E_{\max}$  бета честица и краће време полураспада у поређењу са  $^{131}\text{I}$ .  $^{90}\text{Y}$  емитује  $\beta$ -честице које емитују пет пута више енергије од  $^{131}\text{I}$ . Разликују се и по начину везивања за моноклонска антитела. Везивање  $^{90}\text{Y}$  за антитело мора да буде употребом хелатних агенаса, док се  $^{131}\text{I}$  најчешће везује директно. С друге стране  $^{177}\text{Lu}$ , као и  $^{131}\text{I}$ , има нижу енергију  $\beta$ -честица, али сличан начин обележавања као  $^{90}\text{Y}$ . Због недовољног домета у тумору и ниске енергије  $\beta$ -честица,  $^{177}\text{Lu}$  није погодан за примену у терапији солидних тумора великог дијаметра, док се на супрот томе  $^{90}\text{Y}$ , због веће енергије, не користи код микроскопских тумора (81).

Табела 2. Радиоизотопи коришћени у RIT-у

Радиоизотоп	$E_{\max}$ (MeV)	Опсег	Полувреме распада
<b><math>\beta</math>-емитери</b>			
$^{67}\text{Cu}$	0,58	2,1 mm	2,6 дана
$^{90}\text{Y}$	2,28	12,0 mm	2,7 дана
$^{131}\text{I}$	0,61	2,0 mm	8,0 дана
$^{177}\text{Lu}$	0,50	1,5 mm	6,7 дана
$^{186}\text{Re}$	1,07	4,5 mm	3,7 дана
$^{188}\text{Re}$	2,12	10,4 mm	16,9 дана
<b><math>\alpha</math>-емитери</b>			
$^{211}\text{At}$	6,8	80 $\mu\text{m}$	7,2 часа
$^{213}\text{Bi}$	8,3	84 $\mu\text{m}$	46 мин
$^{225}\text{Ac}$	6,0~8,0	60~90 $\mu\text{m}$	10,0 дана

У задње време све је већи број истраживања RIT коришћењем  $\alpha$ -емитера.  $\alpha$ -честице дају енергију суседним молекулама у опсегу ( $<100 \mu\text{m}$ ) еквивалентном неколико пречника ћелија, што доводи до значајног трансфера енергије унутар ћелије, и до мањег ефекта на здрава ткива, у поређењу са антителима обележеним  $\beta$ -емитерима. Ефикасност  $\alpha$ -емитера, због високог линеарног преноса, не показује зависност од јачине дозе и ефикасни су и у хипоксичним условима. Појединачна ћелија карцинома може бити убијена интеракцијом са само неколико, а могуће и са једном  $\alpha$ -честицом. Алфа честице су прилично велике, имају високу енергију од неколико MeV, и постоји велика вероватноћа непоправљивог цепања дволанчане ДНК. Најчешће коришћене  $\alpha$ -честице у терапији канцера су  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$  и  $^{225}\text{Ac}$  (73,81,82).

#### 1.4.1.1. Итријум-90 ( $^{90}\text{Y}$ )

$^{90}\text{Y}$  може бити генераторски или реакторски произведен радиоизотоп и настаје распадом радиоактивног прекурсора  $^{90}\text{Sr}$ . Распада се емисијом  $\beta$  зрачења високе енергије ( $E_{\text{max}}=2,28 \text{ MeV}$ , 99,98%) до стабилног  $^{90}\text{Zr}$ .  $^{90}\text{Y}$  има време полураспада од 2,7 дана (64,1 сат), што је довољно да би се постигла критична терапијска доза, али истовремено довољно да се радиофармак произведе и испоручи за клиничку употребу. Специфична активност  $^{90}\text{Y}$  је веома висока и због тога је овај радиоизотоп погодан за развој терапеутских радиофармака који садрже моноклонска антитела која се вежу за специфичне рецепторе (83,84).

#### 1.4.1.2. Лутецијум-177 ( $^{177}\text{Lu}$ )

$^{177}\text{Lu}$  је реакторски или циклотронски произведен радиоизотоп. Карактеристичне енергије  $\beta$ -честица су: 12% 0,176 MeV, 9% 0,384 MeV и 79% 0,497 MeV), али он емитује и  $\gamma$  зрачење (6,4% 113 keV и 11% 208 keV) па је на тај начин једноставно омогућено праћење терапије. Време полураспада је 6,75 дана (83, 85).

### 1.4.2. BFCA за обележавање моноклонских антитела са $^{90}\text{Y}$ и $^{177}\text{Lu}$

Бифункционални хелатни агенси су једињења која садрже снажну хелатну групу за везивање метала на једном крају и реактивну функционалну групу за везивање протеина на другом крају. Када су коњуговани са моноклонским антителима, ови агенси делују као носачи радиометала за терапију тумора (86).

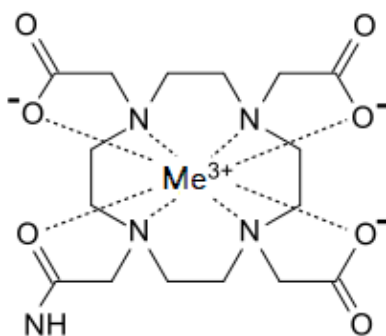
Хелатори који у физиолошким условима могу задржати током дужег временског периода радиометале и дати стабилан радиоимунокоњугат су од великог значаја за спречавање оштећења здравих ћелија. Ациклични хелатори засновани на ДТРА структури и макроциклични хелатори засновани на ДОТА структури су најчешће коришћени хелатори у РИТ. Иако се ДТРА једињења карактеришу брзом кинетиком комплексирања  $\text{Y(III)}$  и других лантанида, у *in vivo* условима су показали мању кинетичку стабилност него макроциклични хелатори. Ово је особито штетно када се користи  $^{90}\text{Y}$ , који се временом *in vivo* ослобађа из комплекса са ДТРА хелатором и акумулира у коштаном ткиву у непосредној близини високоосетљиве коштане сржи. Супротно томе, хелатори базирани на ДОТА структури снажно везују радиометале и дају високу *in vivo* стабилност радиоимунокоњугату, али захтевају повишену темпера-

туру и дуже време током реакције комплексирања. ДТРА аналог, 1В4М-ДТРА, показује повољну кинетику радиообележавања са  $^{90}\text{Y}$  (81,87-89).

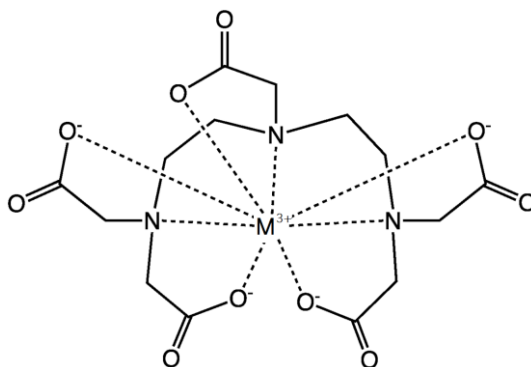
Идеалан терапијски радиофармак мора имати следеће карактеристике: високу акумулацију у тумору, висок однос тумор/околно ткиво, дуже време задржавања у тумору као и брзо уклањање из циркулације. Велика акумулација у тумору и брзи бубрежни клиренс су важни за однос тумор/околно ткиво и смањење озрачавања здравих ткива (83,90).

Итријум и остали лантаниди имају +3 оксидационо стање, па је интеракција са донорским атомима, као што су азот из амина и кисеоник из карбоксилне групе, претежно јонска. Слободни јони  $\text{Y}^{3+}$  и  $\text{Lu}^{3+}$  везују велики број молекула воде у воденом раствору. Процес коњугације представља замену молекула воде полидентатним хелатором. Због њихове величине, углавном имају координационе бројеве између 7 и 10 (91).

Показало се да  $\text{Y}(\text{III})$  и  $\text{Lu}(\text{III})$  имају велики јонски радијус и због тога се могу координирати са хелаторима високе дентности, као што су октадентатни DOTA и ДТРА. На сликама 7 и 8 представљен је начин везивања DOTA и ДТРА са јонима метала (III)-валентним лантанидима. Прилагођавање величине између јонског радијуса метала и макроцикличне шупљине важно је за оптимално комплексирање хелатора са металом. Хексадентатни NOTA је неефикасан у везивању лантанида због неадекватне величине макроцикличне шупљине (90).



Слика 7. Комплексирање DOTA са тривалентним јонима метала



Слика 8. Комплексирање ДТРА са тривалентним јонима метала

Развијене су бројне технике за модификацију биомолекула. Одређене функционалне групе олакшавају везивање хелатора за биомолекуле и најчешће коришћене су: анхидридне, бромо- или јодоацетамидне, изотиоцијанатне, N-хидрокси сукцинамид естарске и малеимидне групе, које су електрофили и захтевају присуство нуклеофилне функције у структури биомолекула. Ове групе, било да су природни део биомолекула, или су додатно уведене, представљају „мост” за коњугацију ВFСА са биомолекулом (83).

## 1.5. Лиофилизација антитела

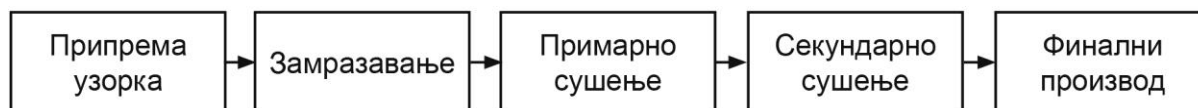
Нестабилност молекула протеина један је од главних изазова у области биофармацеутских препарата. Због веће молекулске тежине и разноврсности састава, терапијски протеини имају сложенију структуру од конвенционалних лекова добијених хемијском синтезом. Изложеност неким стресним условима, као што су екстремна рН вредност средине, високе температуре, смрзавање и светлост проузрокују често нестабилност протеина. Будући да се протеини могу лако разградити током производње и чувања, користе се различите стратегије за побољшање стабилности протеина и очување њихове структуре (92,93).

Процес лиофилизације, којима се обрађују и дехидрирају протеини како би се произвеле стабилније протеинске формулације у чврстом стању, често се користи за биофармацеутске препарате који су недовољно стабилни у воденом раствору. Чврсти дозирани облици протеина мање су склони денатурацији и таложењу током процеса производње и чувања. Будући да су водене формулације протеина подложније физичко-хемијској деградацији, уклањање воде је добар начин за продужавање рока трајања протеинске формулације (94).

Међутим, сам процес лиофилизације праћен је значајним губицима у фракцији биоматеријала. Додавање такозваних криопротектаната (нпр. дисахарида) доводи до знатног смањења оштећења током процеса лиофилизације. Заштитни механизам криопротектаната је сложен и није у потпуности објашњен, али прихваћена је такозвана хипотеза о витрификацији. Према овој хипотези, биомолекули уграђени у стаклену матрицу шећера, показују значајно побољшане стабилности због мале покретљивости која доводи до успоравања штетних хемијских и физичких реакција. Ово се може потврдити применом криопротектаната у бројним производима из области прехранбене индустрије, фармације и биотехнологије (95).

Процес лиофилизације углавном се састоји од три фазе, и то: замрзавања, примарног сушења и секундарног сушења (слика 9).





Слика 9. Процес лиофилизације

**Замрзавање** – У лабораторијским условима се често материјал убацује у боце за замрзавање, боца ротира у замрзивачу са полицама, а затим хлади, сувим ледом и течним азотом. Углавном, замрзавање се обавља помоћу машине за замрзавање. У овом кораку је важно да се материјал охлади испод његове тројне тачке, на најнижој температури на којој могу да коегзистирају чврста, течна и гасовита фаза (96). На тај начин се осигурава да ће се у следећим корацима десити сублимација, а не топљење материјала. Већи кристали се лакше лиофилизују. Да би се произвели већи кристали, производ треба полако смрзавати или увести додатни термички третман, такозвани “annealing” – корак, који се изводи на температури изнад температуре стакленог преласка. Ово повећање температуре обезбеђује рекристализацију узорка што доводи до његове потпуне кристализације, а касније омогућује ефикасније примарно сушење (95). Најчешћа температура мржњења је између  $-50^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ . Фаза замрзавања је најкритичнија током целог процеса лиофилизације, јер уколико се не добију кристали одговарајуће величине, неће бити успешан ни процес сушења (примаран и секундаран) (97).

**Примарно сушење** – Током примарне фазе сушења, притисак се спушта (у опсегу од неколико милибара), и испоручује се довољно топлоте материјалу како би замрзнута вода сублимирала. Количина топлоте потребна за успешну сублимацију молекула може се израчунати помоћу латентне топлоте сублимације (98). У овој примарној фази сушења, сублимира око 95% воде узорка. Ова фаза може бити спора (у индустрији може трајати и неколико дана), јер уколико се одједном дода превише топлоте, може се нарушити структура биомолекула. Притисак се контролише применом вакуума, који убрзава процес сублимације (96). Хладна комора кондензатора омогућава поновно замрзавање водене паре, како би се спречило да водена пара дође до вакуумске пумпе, што би могло довести до погоршања перформанси пумпе. Температура кондензатора су углавном испод  $-50^{\circ}\text{C}$ , а кондензатор нема значај у одржавању материјала у смрзнутом стању (99).

**Секундарно сушење** – Секундарна фаза сушења има за циљ уклањање одмрзнутих молекула воде, пошто је лед формиран у примарној фази. У овој фази процеса лиофилизације температура се подиже више него у примарној фази, а може износити и преко  $0^{\circ}\text{C}$ , како би се прекинуле физичко-хемијске интеракције између моле-

кула воде и смрзнутог материјала (100). Обично се притисак смањује (у опсегу микробара), да би се стимулисао процес десорпције (96). Након завршетка процеса лиофилизације, вакуум се најчешће прекида увођењем инертног гаса, као што је азот, пре него што се материјал затвори. На крају поступка, финални садржај заостале воде у производу је изузетно низак, и креће се од 1% до 4% (101).

## 1.6. Методе за карактеризацију имунокоњугата

Када се ради на увођењу новог потенцијалног терапијског производа, треба обратити пажњу на све факторе који повећавају ефикасност и жељени ефекат и смањују могуће нежељене ефекте. До одговора на сва ова питања се обично долази у фази дизајнирања или оптимизације биопрепарата, посебно током фазе преклиничког развоја. Због тога су аналитичке методе које се користе за карактеризацију имунокоњугата од велике важности и требале би да омогуће мерење различитих врста. Оне треба да допринесу ефикасности, безбедности и чистоћи производа, конзистентности процеса, аналитичкој методологији, као и комплетној и свеобухватној карактеризацији коњугата (102).

### 1.6.1. Натријум додецил сулфат – полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE)

Електрофореза протеина је стандардна лабораторијска техника којом се наелектрисани молекули протеина крећу кроз растварач помоћу електричног поља. И протеини и нуклеинске киселине могу се раздвојити електрофорезом, која представља брзу, једноставну и осетљиву аналитичку технику. Већина биолошких молекула имају одређено наелектрисање на било којој рН вредности, осим на њиховој изоелектричној тачки, када је наелектрисање једнако нули (103). Покретљивост молекула кроз електрично поље зависи од више фактора и то: јачине поља, наелектрисања молекула, величине и облика молекула, јонске снаге и особина стационарне фазе кроз коју молекул мигрира. Полиакриламид и агароза су два носећа матрикса који се обично користе у електрофорези. Оба матрикса служе као порозни медији и понашају се попут молекулског сита. Агароза има велики пречник пора и погодна је за одвајање нуклеинских киселина и великих протеинских молекула. Полиакриламид има мању величину пора и идеалан је за раздвајање већине протеина и мањих нуклеинских киселина (104).

Постоје неколико типова електрофорезе у полиакриламидном гелу и сваки тип може пружити различите врсте података о протеинима од интереса. Денатурациона и редуциона SDS-PAGE електрофореза са дисконтинуираним пуферским системом,

представљају најчешће коришћене технике за раздвајање протеина у зависности од њихове молекулске масе. Са друге стране, PAGE електрофореза без денатурације раздваја протеине према њиховом односу маса/наелектрисање (105).

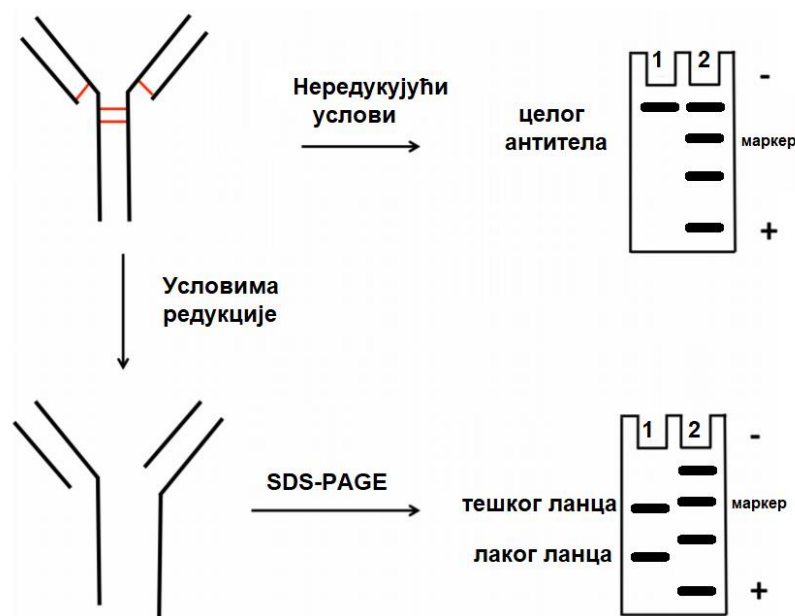
SDS-PAGE протеине раздваја примарно по молекулској маси, јер јонски де-терцент SDS денатурише протеине и везује се за њих чинећи их негативно наелектрисаним. Због тога, када се примени електрична струја, сви протеини везани са SDS у узорку мигрираће кроз гел према позитивно наелектрисаној електроди. Протеини са мањим молекулским масама путују брже кроз гел од оних са већом масом због ефекта про-сејавања кроз матрикс. Једном одвојени електрофорезом, протеини се могу детектовати на гелу применом различитих боја или пренети на мембрану ради одређивања моле-кулске масе применом MS-а (106).

Полиакриламид је најчешће коришћен материјал за припрему гелова за електро-форезу. Гелови се припремају мешањем акриламида са бисакриламидом да би се фор-мирала полимерна мрежа након додавања полимеризујућег средства. APS и TEMED катализују реакцију полимеризације и настајање полиакриламида, омогућавајући про-изводњу слободних радикала (105,107).

Величина пора које су настале у гелу је обрнуто пропорционалан концентрацији полиакриламида. На пример, 7% полиакриламидни гел има веће поре од 12% гела. Гелови са малим процентом полиакриламида се користе за раздвајање великих протеина, а гелови са високим процентом за раздвајање малих протеина. „Градиентни гелови” припремају се тако да гел са ниским процентом полиакриламида буде на врху, а гел са високим процентом на дну, што омогућава одвајање протеина ширег опсега димензија. Да би се добило оптимално раздвајање протеина, користи се гел за слагање, који се излива преко гела за сепарацију, при чему гел за слагање има нижу концентрацију акриламида (7%) и веће поре, као и нижу рН вредност (око 6,8). Гел за сепарацију пуферисан је са Tris-пуфером и рН је подешен на 8,8. Гел за слагање омогућава да се протеини концентришу у једну чврсту траку током првих неколико минута електрофорезе, пре него што доспеју у гел за сепарацију. Гел за слагање није потребан када се користи градијентни гел, јер сам градијент овог гела обавља функцију гела за слагање (105,108,109).

SDS-PAGE се може извести у редукујућим и нередукујућим условима. Када се изводи у редукујућим условима, користе се редуциона средства (дитиотретиол (ДТТ) или β-меркаптоетанол (2-меркаптоетанол), која потпуно денатуришу протеине, преки-дајући дисулфидне везе у између цистеина у ланцима. Дисулфидне везе су од кључног значаја за терцијарну и кватернарну структуру протеина. Редуција ових веза, при-

меном наведених редукционих средстава који делују и као биолошки антиоксиданси, резултира денатурацијом. Ово је посебно важно када се испитују моноклонска антитела применом SDS-PAGE-а. У нередукујућим условима добија се само једна трака од 150 kDa (која одговара молекулској маси целог антитела), док се у редукујућим условима прекидају дисулфидне везе и добијају се две траке од 25 kDa (лаки ланци антитела) и 50 kDa (тешки ланци антитела) (слика 10) (107,110–112).



Слика 10. Техника SDS-PAGE у редукујућим и нередукујућим условима

### 1.6.2. Вибрациона спектроскопија

Вибрациона спектроскопија је једна од основних метода за хемијску анализу која се користи у разним научним областима као што су органска/неорганска хемија, фармација, биомедицина, прехранбена индустрија и форензичке науке. У току вибрационе спектроскопске анализе молекули се излажу одређеним енергијама електромагнетног зрачења и посматра се и мери зрачење које се преноси кроз, или се одбија од анализираних узорка (113). Применом апсорционе спектроскопије у видљивој области, зрачење из видљивог дела електромагнетног спектра делује на тај начин што омогућава да електрони из основног стања пређу у много више енергетско стање (ексцитационо стање). Електромагнетно зрачење које одговара електронском прелазу се апсорбује, формира се апсорпциони максимум (пик) на одговарајућој таласној дужини, и ствара се апсорпциони спектар (114). У вибрациону спектроскопију спадају инфрацрвена (IR) и Раманова спектроскопија. Вибрационе спектроскопске методе користе инфрацрвену област спектра за стварање валенционих и деформационих вибрација хемијских веза у молекула. Као и код видљиве

спектроскопије, зрачење које изазива вибрације се апсорбује и ствара се одговарајући апсорциони максимум у IR и пикове у Рамановом спектру. У овом случају електрони из основног стања прелазе у вибрационо екзитационо стање, које се налази између основног и екзитационог стања и карактерише се нижом енергијом него екзитационо стање код видљиве спектроскопије. Вибрациона спектроскопија представља неинвазивну молекуларну спектроскопију која омогућава добијање информација о специфичним хемијским везама у узорку. Инфрацрвена и Раманова спектроскопија се међусобно допуњују. IR детектују асиметричне вибрације, а Рамановом спектроскопијом се одређују симетричне вибрације у молекулима, па су због тога ове две методе комплементарне (115).

### ***1.6.2.1. Инфрацрвена спектроскопија***

Инфрацрвена спектроскопија се често назива и вибрациона спектроскопија јер основу ове методе представља мерење апсорпције зрачења које доводи до побуђивања вибрационих кретања код молекула у испитиваном узорку. IR светлост се може апсорбовати молекулском вибрацијом када се фреквенција светлости и вибрација поклапају. Фреквенција вибрације и вероватноћа апсорпције зависе од јачине и поларности вибрационих веза. Код ове спектроскопије, инфрацрвена лампа IR спектрометра емитује електромагнетно зрачење, карактеристично по својој таласној дужини која се налази у интервалу од 700 nm до 1 mm (116). Основни услов који мора бити испуњен да би молекул могао да апсорбује инфрацрвено зрачење јесте да се диполни момент хемијске везе мења услед сопственог вибрационог или ротационог кретања молекула. Промене енергије вибрације молекула настају при интеракцији молекула са зрачењем истих фреквенција, и региструје се као апсорпциони спектар у IR области. Средња IR област се највише користи, најчешће за квалитативну анализу, док се за квантитативна одређивања углавном користи блиска IR област (117).

За праћење вибрационих побуђивања у молекулима, користе се инфрацрвена спектроскопија са Fourier-овом трансформацијом, FT-IR спектрометри су једнозрачни уређаји, а најбитнији део ових уређаја је Мајклсонов интерферометар. Уређај се састоји од извора зрачења, колиматора, разделника снопа, покретног и стационарног огледала, места где се поставља узорак и детектора (118). Извор зрачења је инфрацрвена лампа која емитује зрачење различитих таласних дужина. Зрачење прво пролази кроз колиматор снопа, како би се осигурало да се фотони крећу у једном смеру, без расејања. Затим зрачење улази у разделник снопа и раздваја се у два снопа. Један снап се преусмерава на стационарно огледало под углом од  $90^\circ$ , а други на покретно огледало. Долази до временског кашњења

између ова два зрачна снопа које резултира њиховом интерференцијом на одређеној таласној дужини. Као резултат овог процеса, у датом тренутку само фотони једне таласне дужину доспевају до узорка. Да би се променила таласна дужина фотона, покретно огледало се подешава тако да се снимање одвија на жељеној таласној дужини. Континуираним подешавањем покретног огледала, омогућава се да инструмент скенира читав опсег таласних дужина, како би се оформио спектар (113,119,120).

Инфрацрвена апсорпциона спектроскопија је активна за поларне функционалне групе као што су (O–H) и (N–H) група. Анализа IR спектра се обично користи у циљу утврђивања присуства (или одсуства) појединих функционалних група у органским молекулима. Сваки молекул има карактеристичне вибрације, које зависе од чврстоће веза и маса делова молекула који вибрирају. Та чињеница даје IR спектроскопији велике аналитички значај, јер је могуће одредити од којих се функционалних група молекул састоји. Табела 3 садржи неке уобичајене таласне бројеве вибрација за различите типове функционалних група. Када се веза у молекулу вибрационо побуди, на спектру се појављује апсорпциона трака на тој фреквенцији (односно таласном броју). Јачина хемијске везе је директно повезана са фреквенцијом, другим речима за вибрирање чвршће везе потребно је више енергије (већа фреквенција) (120,121).

**Табела 3. Положаји карактеристичних трака у IR спектрима**

Функционална група	Таласни број (cm <sup>-1</sup> )	Интензитет
O–H	3200–3700	јака
C–O	1050–1150	јака
C=O	1670–1820	јака
C–H	2850–3100	средња
C=C	1620–1680	варијабилан
C≡C	2100–2260	варијабилан
C–N	1250–1335	средња
C=N	2100–2270	средња
C≡N	2210–2260	средња
S–C	570–710	слаба
S=C	1030–1200	јака

### 1.6.2.2. Раманова спектроскопија

Раманова спектроскопија је још једна вибрациона техника која има све већу примену због значајног технолошког напретка задњих година. Користи се за идентификацију скелетних структура молекула, и активна је за везе као што су C=C, S-S (113).

Рамански спектар је представљен као однос померања интензитета траке према таласном броју. Протеини дају око тридесет Раманових трака у региону између 400-2000  $\text{cm}^{-1}$  и у региону 2500-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Ове траке јављају се због вибрација карактеристичних функционалних група као што су N-H, O-H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> и S-H (табела 4), који су значајне код анализа секундарне структуре протеина (122).

**Табела 4.** Раманове траке уобичајених функционалних група

Функционална група	Раманове траке ( $\text{cm}^{-1}$ )
N-H	3200
O-H	3250
CH <sub>3</sub>	2950
CH <sub>2</sub>	2845
S-H	2500–2700

Раманов ефект представља нееластично расејање монохроматског упадног зрачења (ласерског зрачења) из UV, VIS области (у неким случајевима блиске IR области), настало услед интеракције упадног зрачења (фотона) са електричним диполом молекула или атома материјала који се проучава. Разлика у енергији упадног и расејаног зрачења директно је зависна од молекулске врсте присутне у испитиваном узорку. Ова спектроскопска техника користи ласер са једном таласном дужином за побуђивање електрона узорка. Извор ласера је усмерен на огледало које усмерава сноп на поларизатор и полуталасну плочу. Ове две компоненте заједно делују као колиматор код инфрацрвене спектроскопије и осигуравају да се сви фотони крећу у истом смеру у циљу побуђивања молекула узорка. Ласерски зрак се затим шаље кроз експандер зрака како би се осигурало да је величина тачке довољна да произведе јак ефекат током анализе. Затим се проширени ласерски зрак фокусира и преноси зрачење директно до узорка. Када сноп ступи у интеракцију са узорком, његово електрично поље побуђује молекуле узорка и иницира промену у њиховој поларизабилности. Зрачење које је прошло кроз узорак се затим пропушта кроз филтер. Филтер селективно блокира само зрачење на фреквенцији ексцитације, а све остале фреквенције пропушта до детектора (123,124).

Механизам ексцитације код Раманове спектроскопије може бити Rayleigh, Stokes и анти-Stokes расејање. Rayleigh расејање је еластично јер ексцитација почиње и завршава се у истом вибрационом стању, а расуто зрачење је исте фреквенције као и упадно зрачење. Већи део упадног зрачења се расипа током еластичних интеракција и еластично расејање фотона дешава се чешће него нееластично расејање. Мањи део упадног зрачења се расипа у виду слабог нееластичног расејања чија се фреквенца разликује од фреквенце упадног снопа и представља Раманово расејање. Оно носи значајне информације о хемијским и структурним карактеристикама материјала. Stokes и анти-Stokes расејање спадају у нееластично расејање, јер су почетни и крајњи ниво енергије побуђених електрона на различитим вибрационим стањима. Stokes расејање (код ког је расуто зрачење ниже фреквенцији од упадног зрачења) је много чешће од анти-Stokes расејања (расуто зрачење више фреквенцији од упадног зрачења) (125,126).

### **1.6.3. Матрицом потпомогнута ласерска десорпција/јонизација-време прелета масена спектрометрија (MALDI-TOF MS)**

Масена спектроскопија је аналитичка техника у којој се узорци јонизују у наелектрисане молекуле и мери се однос њихове масе према наелектрисању ( $m/z$ ). MALDI-TOF MS омогућава генерисање јона коришћењем матрицом потпомогнутом ласерске десорпционе јонизације. Представља брзу, високо осетљиву и слабо инвазивну методу за јонизацију молекула. Методом масене спектрометрије заснованој на времену прелета (TOF MS), однос масе према наелектрисању се одређује из мерења времена прелета одговарајућих јона. Јони се убрзавају у електричном пољу одређене јачине, а затим анализатор времена прелета (енгл. TOF – time of flight) мери време долета појединих јона. Анализирана супстанца се раствара у матрици, која представља одређена хемијска једињења растворена у смеси воде и органских растварача. Матрица штити узорак од дејства ласера, а испаравањем и јонизацијом преноси део наелектрисања на анализирану супстанцу и јонизује је.

Ласер током MALDI одређивања претвара узорак растворен у матрици из течне у гасовиту фазу, без разграђивања или фрагментације (127). MALDI је прикладан за анализу биомолекула попут пептида, антитела, липида, угљених хидрата, који се користе у фармацији, ветерини и у микробиологији (128–132).

Има значајну примену као техника за анализу пептида и протеина у релативно сложеним узорцима. Користити се и за директну анализу узорка ткива. Узорци који садрже пептиде и протеине растворене у одговарајућој матрици се суше на плочи која апсорбује светлост ласера. Испаравањем смеше протеина и матрице, ослобађају се јонизовани моле-



кули протеина, који се могу анализирати са TOF масеним спектрометром (133). Представља једноставну и брзу аналитичку технику одређивања молекулске тежине и хетерогености малих количина протеина. Генерално, непромењени молекуларни јони настају од појединачних пептидних ланаца, што омогућава тачно одређивање масе полипептида (134,135).

Ласери који се користе могу бити у области ултраљубичастих (UV) и инфрацрвених (IR) таласних дужина, при чему UV ласери представљају значајније изворе светлости у овој аналитичкој методи (133,136).

Избор праве матрице је такође од значаја за успех у MALDI-у и генерално високо поларни узорци се анализирају растворени у високо поларним матрицама, а неполарни узорци пожељно је да се комбинују са поларним матрицама (137). У табели 5 приказане су матрице које се најчешће користе и њихова специфична примена.

**Табела 5.** MALDI-TOF MS матрице (преузето и адаптирано (137))

Хемијско једињење	Скраћеница	Примена
Никотинска киселина	NA	Протеини, пептиди
Пиколинска киселина	PA	Олигонуклеотиди, ДНК
3-Хидроксипиколинска киселина	HPA, 3-HPA	Олигонуклеотиди, ДНК
3-Аминопиколинска киселина	3-APA	Олигонуклеотиди, ДНК
6-Аза-2-тиотимин	ATT	Олигонуклеотиди, ДНК
2,5-Дихидроксибензоева киселина, гентисинска киселина	DHB	Протеини, олигосахариди
$\alpha$ -Цијано-4-хидроксициметна киселина	$\alpha$ -CHC, CHCA, $\alpha$ -CHCA, 4-HCCA	Протеини, мали протеини
4-Хлоро- $\alpha$ -цијаноциметна киселина	ClCCA	Пептиди
3,5-Диметокси-4-хидроксициметна киселина, синапинска киселина	SA	Протеини
2-(4-Хидроксифенилазо)бензоева киселина	HABA	Пептиди, протеини, гликопротеини
2-Меркаптобензотиазол	MBT	Пептиди, протеини, синтетски полимери
5-Хлоро-2-меркаптобензотиазол	ClMBT	Гликопептиди, фосфопептиди, протеини
2,6-Дихидроксиацетофенон фосфат	DHAP	Гликопептиди, Фосфопептиди, протеини
2,4,6-Трихидроксиацетофенон	THAP	Чврсти олигонуклеотиди

#### 1.6.4. Течна хроматографија са детекцијом у ултраљубичастој области спектра (HPLC-UV)

HPLC-UV представља популарну аналитичку технику која се користи за раздвајање, идентификацију и квантификацију појединих компоненти у датим смешама. Карактеристика је висока осетљивост, омогућава одређивање јако ниских концентрација испитиваних једињења, па је позната и као течна хроматографија високих перформанси. У овој техници мобилна фаза се креће кроз колону под одређеним високим притиском у зависности од природе испитиваног узорка и због тога је овај метод много бржи у поређењу са другим хроматографским методама на колони (138,139).

Под дејством високог притиска омогућава се континуирани проток мобилне фазе, успостављање динамичке равнотеже са стационарном фазом, и обезбеђује добра и селективна расподела компоненти у испитиваној смеси (узорку). Због тога је пумпа високог притиска важна, јер омогућава стабилан, висок проток мобилне фазе у којој је растворен узорак кроз хроматографску колону која је напуњена чврстим материјалом (стационарну фазу). Интеракција сваке компоненте узорка биће различита са мобилном или стационарном фазом, што омогућава разлику у брзини протока појединачних компоненти доводи до њиховог раздвајања (140).

Ексклузивна хроматографија (енгл. size exclusion chromatography) или гел филтрација (хроматографија на молекулским ситима) је један од начина сепарације молекула код ког се раздвајања врши по величини. Када растворени молекули различитих величина улазе у колону, порозни материјал стационарне фазе задржава мање молекуле и они спорије пролазе кроз колону јер улазе у поре, док већи молекули пролазе. Због тога се већи молекули елуирају са колоне пре, а мањи молекули касније, чиме се молекули ефикасно раздвајају по величини. Доступне су разне врсте колони, са стационарним фазама (матриксама) различитих структура и величина честица, што пружа могућност избора колони које раздвајају молекуле у тачно одређеном опсегу величина (139). Најчешће су коришћени хидрофилни материјали за паковање и водени растварачи као мобилна фаза за раздвајање и мерење дистрибуције молекула растворљивих у води, као што су полисахариди, пептиди и протеини (139,140). Такође, у ексклузивној хроматографији постоји могућност примене хидрофобних материјала за паковање колони и органских растварача као мобилне фазе за раздвајање синтетичких полимера. Избор стационарне и мобилне фазе играју важну улогу у поступку раздвајања молекула (138,141).

Најчешће коришћене мобилне фазе укључују смеше водених и органских растварача. Органски растварачи који се углавном користе су метанол, ацетонитрил и

комбинација ова два растварача, међутим неки HPLC системи користе само водене растворе на бази киселина или соли које омогућају раздвајање компонената узорка (142). У хроматографији се користе различити типови детектора: детектори на бази мерења флуоресценције, индекса рефракције, пламено-јонизациони детектори (FID), масени (MS), колориметријски, међутим најчешће се користи UV апсорциони детектор. Овај детектор је селективан, може да детектује само супстанце које апсорбују или флуоресцирају у UV области спектра. Пропуштањем светлости, мери се интензитет UV зрачења коју апсорбује свака компонента и одређује концентрација појединих компонената анализираних узорка. Детектор може да користи једну или више таласних дужина, а највише се примењује таласна дужина од 254 nm, коју емитује UV живина лампа (143). Ови детектори могу радити при различитим таласним дужинама.

У оквиру испитивања нових лекова, у области фармације, биологије и медицине, HPLC се често користи као аналитичко средство за испитивање разних узорака на присуство или одсуство познатих супстанци (лекова, метаболита лекова, токсина, аминокиселина, пептида, протеина, моноклонских антитела), а може се користити и у идентификацији непознатих једињења. У фармацеутској хемији, HPLC метода користи се за праћење тока хемијских реакција и одређивање чистоте лекова. Може се модификовати и у препаративну HPLC, која се користи за изоловање одређене супстанце у узорку у великом проценту. Стога је главна сврха препаративне хроматографије прецишћавање одређене супстанце од интереса за даљу употребу (142–148).

### **1.7. Инстант танкослојна хроматографија (ITLC)**

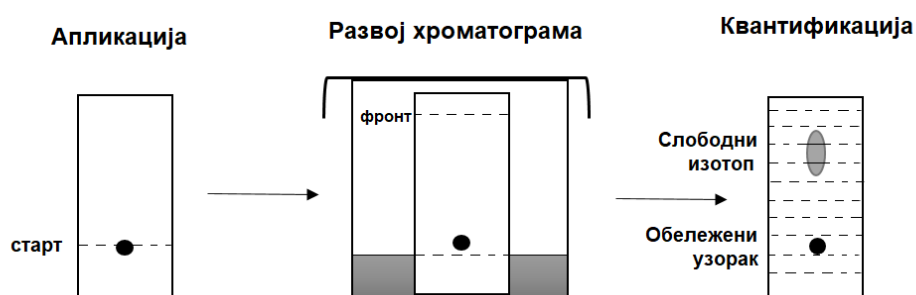
Танкослојна хроматографија (TLC), односно инстант танкослојна хроматографија (ITLC) су хроматографске технике код којих се раздвајање компонената врши између стационарне фазе коју чини танак слој прашкастог адсорбента (силика-гел (SG)), који је нанет у танком слоју на инертну подлогу (стаклену или пластичну плочу) и мобилне фазе. ITLC-SG се углавном примењује за квалитативно одређивање различитих анализата, лекова, и једна је од обавезних метода за одређивање квалитета радиофармака по препорукама ЕМА и других фармакопеја. Квалитет радиофармака зависи од сваког корака припреме током процеса производње. Захтеви за квалитет, између осталог, укључују и тестове одређивања радиохемијске, радионуклидне и хемијске чистоте (149–152). Званични захтеви за стандардну контролу квалитета налазе се у прописима официналних фармакопеја.

Поступке за контролу квалитета треба увек изводити након припреме радиофармацеутског препарата и пре него што га пацијент администрира, како би се гарантовало да је радиофармацеутик сигуран и безбедан (149,153).

Контрола квалитета је обавезна за све радиофармаке, без обзира на то да ли се користе за дијагностичке или терапијске сврхе. Радиохемијска чистоћа радиофармацеутика дефинисана је као проценат укупне радиоактивности присутне у одређеном хемијском облику у радиоактивном леку. Без прихватљиве радиохемијске чистоће дијагностичког препарата, може доћи до неадекватне интерпретације снимка, што доводи до погрешне дијагнозе и непотребног зрачења пацијента. Апликација терапијских радиофармацеутика неприхватљиве радиохемијске чистоће може довести до локализације препарата у здравом ткиву и његовог оштећења (149).

У радиофармацији најчешће коришћена метода за испитивање радиохемијске чистоће је ITLC, која је у основи TLC, али стационарни и мобилни фазни системи омогућавају брзо одвајање и идентификацију радиохемијских нечистоћа, па се назива тренутном хроматографијом. Принцип ITLC-SG-a је приказан на слици 11. Уобичајена стационарна фаза у ITLC-у су траке од стаклених влакана инпрегниране SG-ом или полисилицијумовом киселином (PA), док избор мобилне фазе зависи од природе супстанци које се одвајају. Најчешће коришћене мобилне фазе за одвајање су МЕК (метил етил кетон), ацетон, 0,9% NaCl, вода, метанол, и њима сличне. Начин рада применом ове технике заснован је на принципима TLC-a, идентификација појединих компонената врши се према добијеним вредностима ретенционог фактора ( $R_f$ ) (154,155).

Мерење радиоактивности на TLC тракама врши се стандардним инструментима за мерење радиоактивности: TLC скенером, гама бројачем или калибратором доза. Резултати мерења се користе за израчунавање радиохемијске чистоће радиофармацеутика у процентима, као однос радиоактивности испитиване компоненте и укупне радиоактивности узорка нанетог на старт хроматограма, односно збиру свих импулса после мерења хроматограма (149,155).



Слика 11. Одређивање радиохемијске чистоће радиофармацеутика помоћу ITLC-SG-a

## 2. ЦИЉ

Главни циљ докторске дисертације је добијање стабилних имунокоњугата трастузумаба у облику коначне формулације потенцијалног радиофармака за дијагностику, терапију и праћење терапије HER2/neu позитивних туморских лезија.

За остварење постављеног циља и због обећавајућих резултата у тренутним предклиничким и клиничким студијама, везаним за терапеутска и дијагностичка својства трастузумаба, формиран су следећи специфични подциљеви:

- Развој формулације лиофилизованог и коњугованог препарата трастузумаба погодног за обележавање нерадиоактивним металним јонима лутецијумом и итријумом ( $\text{Lu}^{3+}$  и  $\text{Y}^{3+}$ ) и утврђивање методе за идентификацију и контролу квалитета препарата.
- Одређивање најпогодније методе за коњугацију антитела трастузумаба применом три различита BFCА-а у различитим моларним односима антитело:хелатор: (p-SCN-Bn-DTPA – 1:10; 1:20; 1:50); (p-SCN-Bn-1B4M-DTPA – 1:10; 1:20; 1:50) и (p-SCN-Bn-DOТА – 1:20).
- Леофилизација добијених имунокоњугата применом дефинисаног протокола леофилизације.
- Утврђивање секундарне структуре антитела, хемијска карактеризација имунокоњугата и испитивање могуће промене нативне структуре протеина после поступка коњугације и леофилизације.
- Одређивање услова обележавања коњугата нерадиоактивним металним јонима. Обележавање леофилизованих коњугата радиоактивним  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{90}\text{Y}$ , одређивање приноса реакције обележавања радиоактивних имунокоњугата, као и њихове стабилности након обележавања.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

#### **3.1. Пречишћавање антитела**

Трастузумаб (Tr) је изолован пречишћавањем комерцијалног производа Herceptin<sup>®</sup> (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) ултрафилтрацијом током 1 сата на 5000 rpm, уз примену филтера Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 (Sigma Aldrich, Missouri, USA), величине пора 30 kDa. Антитело Tr је пречишћено узастопним испирањем током шест циклуса са 0,1 М PBS-ом, pH=8, применом центрифуге HuMax 4k (Human, Wiesbaden, Germany).

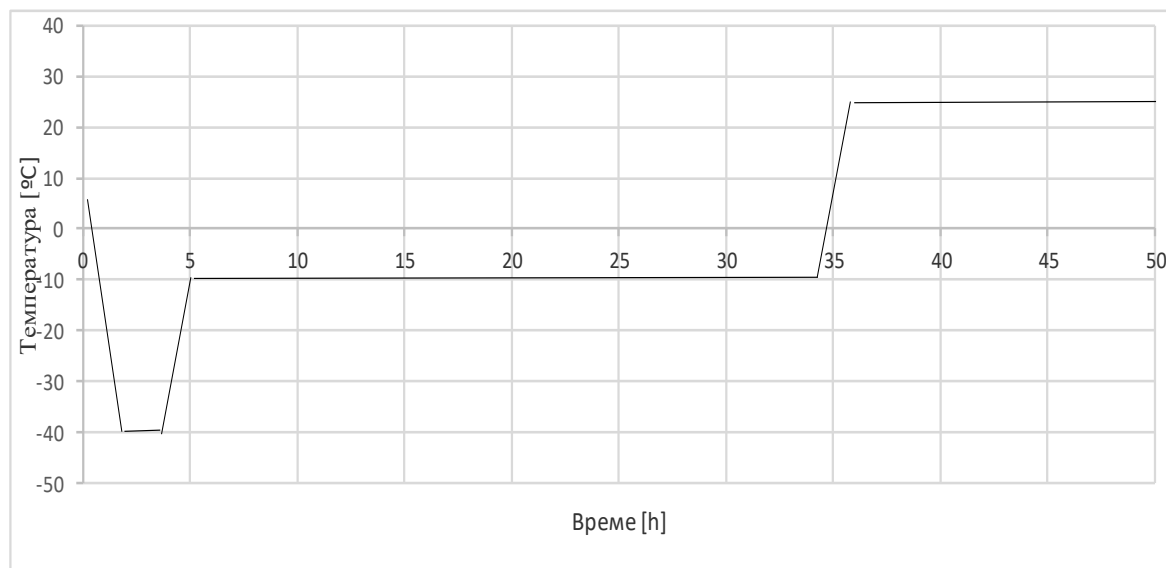
#### **3.2. Коњугација антитела коришћењем три различита BFCA-а у различитим моларним односима**

Везивање хелатора за Tr је изведено сједињавањем антитела концентрације 10 mg/mL и BFCA-а у различитим моларним односима (антитело:BFCA) и то: (p-SCN-Bn-DTPA – 1:10; 1:20; 1:50; p-SCN-Bn-1B4M-DTPA – 1:10; 1:20; 1:50 и p-SCN-Bn-DOTA – 1:20, на 4°C током 18 сати инкубације уз благо мућкање. Имунокоњугати су пречишћени током шест циклуса ултрафилтрације (Amicon<sup>®</sup> Ultra-4, 30 kDa), уз испирање са 0,05 М амонијум-ацетатом (pH=7). Концентрација имунокоњугата је подешена на 1 mg/mL, а за мерење концентрације коришћен је UV/VIS спектрофотометар Jenway<sup>®</sup> 6715 (Staffordshire, UK).

#### **3.3. Лиофилизација трастузумаб-имунокоњугата**

Након коњугације, у циљу побољшања стабилности и спречавања деградације имунокоњугата, извршена је његова лиофилизација. Раствор имунокоњугата (1 mL) уз присуство криопротектанта и агенса за пуњење (1% манитол, 50 µL у свакој бочици) је пребачен у стаклене бочице типа I и лиофилизован до чврстог стања. Лиофилизација је изведена у лиофилизатору Labconco Free Zone Stoppering Tray Dryer (Kansas City, Missouri, USA), применом протокола Gjorgieva Askova и сар. (156), уз мање модификације. Узорци су смештени у полице лиофилизатора након постизања температуре од 4°C. Прва фаза лиофилизације је замрзавање узорка. Температура је подешена на -40°C, брзина хлађења 1°C/min, температурни опсег од 4°C до -40°C, а време трајања ове фазе износило је 5 сати. Друга фаза је примарно сушење на температури од -25°C (брзина загревања 0,15°C/min, температурни опсег од -40°C до -25°C), током 28 сати уз притисак од 0,133

mbar-a. Трећа фаза је секундарно сушење на 25°C (0,2°C/min, од -25°C до 25°C) током 14 сати. Протокол лиофилизације приказан је на слици 12. Након завршетка лиофилизације, бочице су затворене и чуване на температури од 4°C до даљих анализа.



Слика 12. Протокол лиофилизације

### 3.4. Обележавање трастузумаб-коњугата нерадиоактивним итријумом и лутецијумом

Обележавање испитиваног лиофилизованог имунокоњугата Tr нерадиоактивним  $\text{Lu}^{3+}$  и  $\text{Y}^{3+}$  извршено је након растварања имунокоњугата у стерилном 0,9% раствору NaCl. Раствореном лиофилизату додато је 1,0  $\mu\text{L}$  раствора  $\text{LuCl}_3$  концентрације 1,0709  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  [еквивалентно радиоактивности  $^{177}\text{Lu}$  од 4377,1 MBq, која одговара MTD-у код пацијента]. На сличан начин, раствор  $\text{YCl}_3$  концентрације 1,155  $\text{mg}/\mu\text{L}$  [еквивалентно радиоактивности  $^{90}\text{Y}$  од 1049,69 MBq, која одговара MTD-у] додат је у следећу бочицу која садржи растворени лиофилизованог имунокоњугат. Раствори Tr-DTPA и Tr-1B4M-DTPA са  $\text{LuCl}_3$ , односно  $\text{YCl}_3$  су инкубирани на собној температури 30 минута, док је инкубација са Tr-DOTA изведена на температури од 40°C у току једног сата.

### 3.5. Испитивање интегритета имунокоњугата применом SDS-PAGE

Гел електрофореза је извршена у редукујућим условима уз примену меркаптоетанола на уређају Enduro<sup>®</sup> Modular Vertical Gel Electrophoresis System (Labnet, Edison, NJ, USA). Током електрофорезе, 12% гел за сепарацију (акриламид / бисакриламид) и

4% гел за слагање је припремљен у складу са протоколом за употребу препорученом од стране произвођача (табела 6). Гел електрофореза је поновљена три пута. Концентрација сваког појединачног узорка била је 1 mg/mL. На првом гелу су аплицирани некоњуговани Тг и лиофилизовани имунокоњугати након реконституције са 0,9% NaCl. На другом и трећем гелу су аплицирани обележени имунокоњугати са нерадиоактивним Lu<sup>3+</sup> и Y<sup>3+</sup>. 30 µg узорка додато је у 10 µL Tris HCl пуфера, након чега је смеша загревана 5 минута на 98,5°C и центрифугирана 5 минута на 5000 rpm. 25 µL сваког узорка и 10 µL протеинског маркера SigmaMarker™, Wide Range, Molecular Weight (Saint Louis, MO, USA) су аплицирани на гелу за слагање. На основу резултата претходних истраживања, примењени су услови који су процењени као оптимални, (константан напон од 150 V и јачину електричне струје од 23 mA). Након завршетка целокупног процеса, извршено је бојење гела је са Coomassie staining плавом бојом током 20 сати. У смеси воде, метанола и сирћетне киселине урађена је дисколорација током гела током 7-8 сати. Сви реагенси, који су били употребљени, су набављени од Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Припремљени гелови су затим скенирани уређајем Glite 900 BW Gel Scanner (PacificImage, Torrance, CA).

**Табела 6.** Састав гелова за SDS-PAGE

Компоненте	Гел за слагање (4%)	Гел за сепарацију (12%)
Дестилована вода	3,18 mL	3,49 mL
ACR/BIS (40%)	0,5 mL	2,4 mL
1 M Tris HCl	1,25 mL	/
1,5 M Tris HCl	/	2 mL
10% SDS	50 µL	80 µL
10% APS	18,3 µL	29,3 µL
TEMED	2,9 µL	4,7 µL
pH	6,8	8,8
Укупна запремина	5 mL	8 mL

### 3.6. Инфрацрвена спектроскопија имунокоњугата

FT-IR спектроскопска анализа имунокоњугата урађена је на собној температури на спектрометру Varian 660 (PerkinElmer FTIR 2000 интерферометар, USA) у спектралном опсегу 2000-400 cm<sup>-1</sup> и резолуцијом од 4 cm<sup>-1</sup> уз помоћ MIRacle ZnSe ATR module



(PIKE technologies). Корекције ATR спектра су извршене коришћењем ATR correct Algorithm 2 у оквиру софтвера Varian Resolutions Pro.

### 3.7. Раманова спектроскопија имунокоњугата

Рамански спектри ( $2000\text{--}100\text{ cm}^{-1}$ ) су снимљени на микро-Рамановом вишеканалном спектрометру (Horiba Jobin Yvon LabRam 300 Infinity), на собној температури. Раманов ефекат је добијен коришћењем зрака таласне дужине  $632,8\text{ nm}$ , емитовано из He:Ne ласера, без употребе атенуацијског филтра. Примењен је Olympus MPlanN конфокални микроскоп са увећање  $\times 50$  објективом, а спектрална резолуција подешена на  $4\text{ cm}^{-1}$ . Коришћена је конфокална рупа од око  $2\text{ }\mu\text{m}$  и положај на површини узорка је подешен аутоматски контролисана платформа (планарно, у две димензије) x-y фазом. Раманово померање је калибрисано Рамановим пиком силицијум-диоксида који се налази на  $520,7\text{ cm}^{-1}$ . Време прикупљања и број акумулације подешен је на  $20\text{ s}$  и  $20$  скенова, редом.

Лиофилизоване узорци су директно постављени испод снопа ласерских зрака инструмента. После обележавања нерадиоактивним металним јонима, узорци су најпре сушени на  $26^\circ\text{C}$ , а затим постављени испод снопа ласерских зрака инструмента.

### 3.8. Одређивање просечног броја BFCA са MALDI-TOF MS

Одређивање просечног броја група BFCA везаних за сваки молекул антитела је изведен помоћу масене спектроскопије MALDI-TOF (Axima Performance<sup>®</sup>, Shimadzu, Biotech).

Лиофилизоване имунокоњугате са три различита хелатна агенса су растворени у  $1\text{ mL}$  ултрапречишћене воде и 3 пута испрани коришћењем Amicon<sup>®</sup> kDa (Millipore) филтра ради уклањања соли. Пречишћени узорци су упарени до запремине од  $20\text{ }\mu\text{L}$  и растворени у  $80\text{ }\mu\text{L}$  раствора  $70\%$  ACN /  $30\%$   $0,1\%$  TFA. Аликвот од  $1\text{ }\mu\text{L}$  финалног узорка је нанесен на MALDI плочу и плоча брзо покривена са  $1\text{ }\mu\text{L}$  матрикса ( $20\text{ mg/mL}$  синапинске киселине у смеси  $50\%$  ACN /  $50\%$   $0,1\%$  TFA).

Радни услови инструмента били су постављени на следећи начин: Начин рада-линеаран; Поларитет-позитиван; Max Laser Rep Rate 1; Снага ласера 85; Пулсна екстракција: 150000; Ранг испитивања молекулске масе 100-300 kDa. Параметри за обраду апсорпционих максимума су следећи: Ширина пика  $80$  ланаца; Метод поравнања-просечан; Метод детекције пика-градијентан.

### **3.9. Одређивање интегритета трастузумаб-имунокоњугата након лиофилизације применом HPLC-UV-а**

Интегритет лиофилизованог Тг-имунокоњугата 1В4М-ДТРА у коме је однос антитело-лиганд 1:20, као и евентуално присуство распадних продукта одређено је HPLC-UV методом на инструменту Agilent 1200 Series, са бинарном пумпом и DAD (diode-array detector) детектором (California, USA) уз примену Zorbax Bio Series GF-250 хроматографске колоне. Одређени волумен (20  $\mu$ L) антитела у комерцијалном облику, пречишћеног антитела и коњугат антитела са 1В4М-ДТРА лигандом је аплициран на хроматографску колону, уз примену мобилне фазе (0,9% NaCl) и брзине протока од 1 mL/min. Процес елуирања је праћен на таласној дужини од 280 nm.

### **3.10. Радиоактивно обележавање трастузумаб-коњугата**

Радиоактивно обележавање имунокоњугата (добитених са испитиваним врстама ВFСА у односу 1:20) је рађено са  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$ . Разблажење раствора радиоизотопа постигнуто је са 150  $\mu$ L 0,04 М HCl, и на тај начин добијена активност  $^{90}\text{Y}$  је износила 1,425 mCi, а  $^{177}\text{Lu}$  8,15 mCi. Радиоактивно обележавање урађено је након растварања имунокоњугата у 0,5 mL 0,9% NaCl, и подешавањем pH=4,5-5 за  $^{90}\text{Y}$ , као и подешавањем pH=6 за  $^{177}\text{Lu}$ . У раствору имунокоњугата додато је 8,5  $\mu$ L раствора  $^{90}\text{Y}$  односно 5  $\mu$ L раствора  $^{177}\text{Lu}$ . Раствори са Тг-ДТРА и Тг-1В4М-ДТРА су инкубирани на собној температури током 30 минута, док су Тг-ДОТА инкубирани на 40°C током 1 час.

### **3.11. Одређивање радиохемијске чистоће радиоимунокоњугата коришћењем ITLC-SG методе**

Након обележавања, радиохемијска чистоћа и стабилност радиоимунокоњугата су испитани радиохроматографском анализом Инстант танкослојном хроматографијом на силика гел - SG тракама (ITLC-SG метода), са три различите мобилне фазе: метанол 0,4 М / натријум-ацетат (1:1), затим физиолошки раствор (0,9% NaCl), као и 0,1 М ацетатни пуфер. Одређена је најефикаснија мобилна фаза за раздвајање радиоимунокоњугата од радиоизотопа. Метода је изведена тако што се на 2 cm од доње ивице траке, наноси по 0,01 mL испитиване пробе. Затим се траке ставе у мобилну фазу и хроматограми се развијају на собној температури. Након развијања, SG траке се суше на ваздуху и секу на мање подеке дужине 1 cm. Расподела радиоактивности дуж траке се одређује мерењем

радиоактивности сваког центиметра траке. С обзиром да је  $^{90}\text{Y}$  чист бета емитер, његова детекција је једино могућа путем Bremsstrahlung ефекта (закочног зрачења) на  $\beta$ -дозе калибратору и NaI(Tl) гама бројачу (WIZARD 2480, Perkin Elmer USA). Садржај сваке фракције рачуна се у односу на укупну радиоактивност траке и изражава се у процентима.

Испитана је стабилност радиоимунокоњугата након 24h, 48h и 72h од радио-обележавања ITLC-SG методом.

### 3.12. Статистичка обрада података

Расподела континуираних података тестирана је применом Shapiro-Wilks  $W$  теста, с обзиром на то да број података по групама није био већи од педесет. Све нумеричке варијабле су анализирани применом дескриптивне статистике, односно представљене мерама централне тенденције (аритметичка средња вредност, медијана), и мерама дисперзије (стандардна девијација, распон вредности, интерквartilни распон).

Тестирање разлика између две независне варијабле, за податке са правилном дистрибуцијом је обављено Student  $t$ -тестом, а за податке са неправилном дистрибуцијом примењен је Mann-Whitney  $U$  тест, као непараметарски еквивалент за тестирање разлика између две независне популације података. Тестирање значајних разлика између три и више група података код независних варијабли изведено је применом Kruskal-Wallis теста (непараметарске ANOVA), а затим помоћу Mann-Whitney  $U$  теста, као његовог post-hoc теста. У случају зависних варијабли, поређење је изведено применом непараметарске ANOVA са понављањем (Friedman-ова ANOVA), а затим применом Wilcoxon-овог непараметарског теста парова као post-hoc теста.

Pearsonова линеарна корелациона анализа коришћена је за тестирање постојања корелације између основне структуре трастузумаба и новосинтетисаних коњугата. Јачина корелације је представљена коефицијентима детерминације ( $R^2$ ) корелације ( $r$ ).

Постојање статистички значајне разлике је прихватано за све израчунате  $p$  вредности мање од 0,05. За статистичку обраду добијених резултата коришћени су статистички програми Statistica 12.0 (TIBCO Software, California, USA) и SPSS вер. 18.0. (SPSS Inc. Chicago, USA).

## 4. РЕЗУЛТАТИ

Због високе ефикасности трастузумаба у терапији агресивног карцинома дојке, за многе истраживаче представља подстицај да га и примењују у великом броју претклиничких и клиничких студија за терапију и визуализацију карцинома дојке.

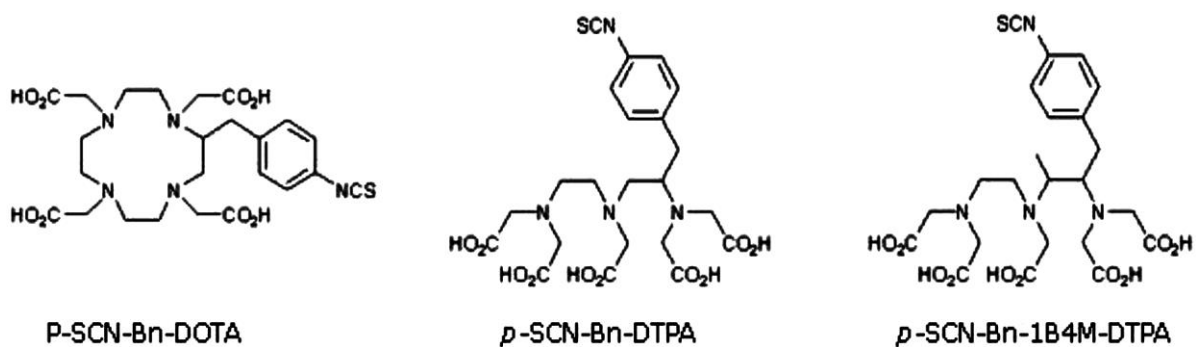
Користећи најдоступније  $\gamma$ -емитере ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), урађена су бројна истраживања за добијања радиоимунокоњугата за визуелизацију и идентификацију HER2 позитивних лезија (157-159). Успешно обележавање са  $^{90}\text{Y}$  ( $\beta$ -емитер) даје наду за формулисање терапијског агенса за HER2 позитиван карцином (160). Међутим, овај радиоизотоп, због високе  $\beta$  енергије, изазива карактеристичну системску токсичност, па се због тога у последње време чешће користи  $^{177}\text{Lu}$  –  $\beta$ -емитер мањих енергија који се често примењује у терапији метастаза (161).

У овој докторској дисертацији испитана је стабилност и структура лиофилизованог коњугата трастузумаба, извршено је обележавање имунокоњугата нерадиоактивним и радиоактивним итријумом и лутецијумом, а затим су добијени радиоимунокоњугати окарактерисани применом свеобухватних аналитичких техника.

### 4.1. Коњугација антитела са хелаторима BFCA

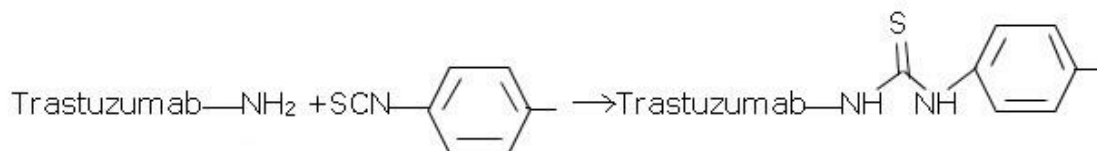
Коњугацијом Tr-а са BFCA хелаторима, који су примењени у различитим моларним односима антитело:хелатор, добијено је седам имунокоњугата: (p-SCN-Bn-DTPA – 1:10; 1:20; 1:50), (p-SCN-Bn-1B4M-DTPA – 1:10; 1:20; 1:50) и (p-SCN-Bn-DOTA – 1:20). Различите функционалне групе (анхидридна, бромоацетамидна, изотиоцијанатна) у молекулима BFCA се везују за антитела и обезбеђују ефикасну коњугацију.

Хемијске структуре BFCA који су коришћени за коњугацију Tr-а, приказане су на слици 13.



Слика 13. Хемијске структуре BFCA коришћене за коњугацију трастузумаба

Хелатори имају 4-изотиоцијанатобензилну структуру која учествује у процесу везивања са антителима (слика 14). Координативна хемијска веза се формира између амино групе лизина у секвенци трастузумаба и изотиоцијанатних група хелатора (162).



Слика 14. Коњугација трастузумаба и ВФСА-а

#### 4.2. Лиофилизација имунокоњугата

У циљу повећања стабилности имунокоњугата током дужег временског периода, извршена је лиофилизација, применом претходно описаног протокола (слика 12). Целокупан процес укључује замрзавање узорка, а затим уклањања воде сублимацијом под вакуумом. Након извођења процеса лиофилизације, добијају се формулације у чврстом стању хомогене структуре и оформљени лиофилизати (слика 15). Добијених седам узорака лиофилизованих препарата су се користила за даља испитивања.



Слика 15. Лиофилизовани Тг-имунокоњугати

Лиофилизовани имунокоњугати чувани су на температури од +4°C у стакленим бочицама затвореним гуменим запушачем и са алуминијумским поклопцем, да би се избегао контакт са влагом и ваздухом, и спречило потенцијално разлагање имунокоњугата.

#### 4.3. Обележавање трастузумаб-коњугата нерадиоактивним итријумом и лутецијумом

Обележавање нерадиоактивним итријумом и лутецијумом у идентичним експерименталним условима који су коришћени при обележавању са радиоактивним изотопима,

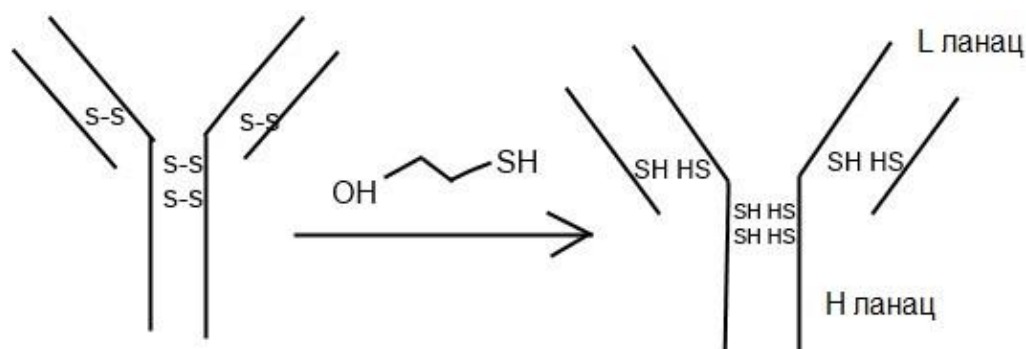
имало је за циљ да се добију нерадиоактивни производи, изврше све потребне хемијске анализе, и покаже стабилност обележеног коњугованог антитета.

С обзиром да су хемијске карактеристике нерадиоактивних и радиоактивних метала итријума и лутецијума идентичне, примена метала без радиоактивности био је једини начин да се изведе безбедна физичко-хемијска анализа коњугованих антитета.

Резултати испитивања нерадиоактивно обележених Тг-имунокоњугата, прелиминарно су показали да је коњуговано антитело стабилно и да се може користити и за обележавање радиоактивним изотопима итријумом и лутецијумом.

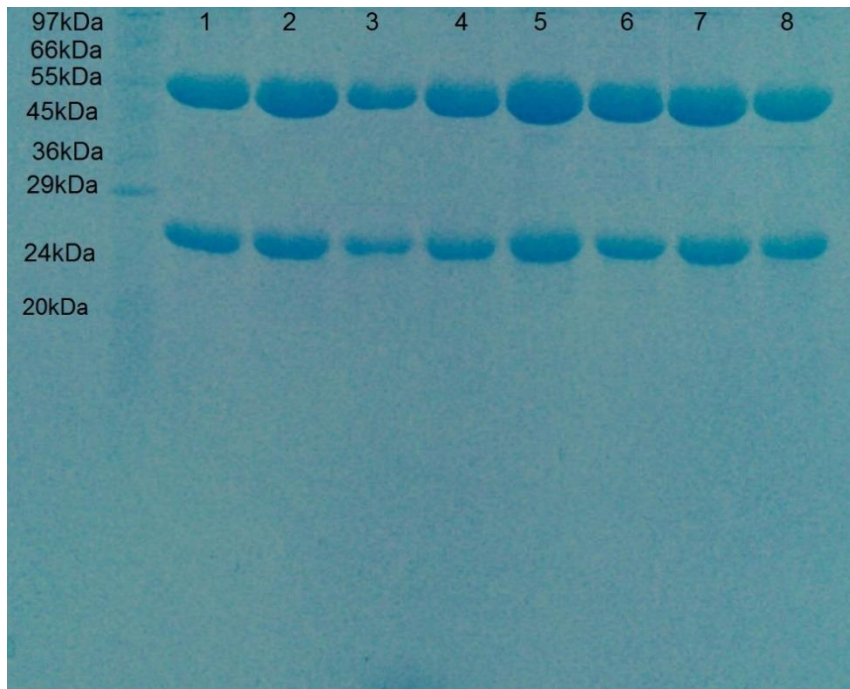
#### 4.4. Испитивање интегритета имунокоњугата након лиофилизације и обележавања са нерадиоактивним изотопима помоћу SDS-PAGE

Интегритет протеина, чистоћа и могуће стварање агрегата, након лиофилизације и обележавања са нерадиоактивним металним јонима, утврђени су помоћу SDS-PAGE. Као стандард је коришћен оригинални, немодификован и пречишћен трастузумаб у концентрацији 1 mg/mL. Дисулфидне везе у протеину су раскинуте у редукујућим условима у присуству 2-меркаптоетанола чиме је постигнуто раздвајање протеина на два тешка ланца (молекулске масе ~50 kDa) и два лака ланца ~25 kDa (слика 16) (163).

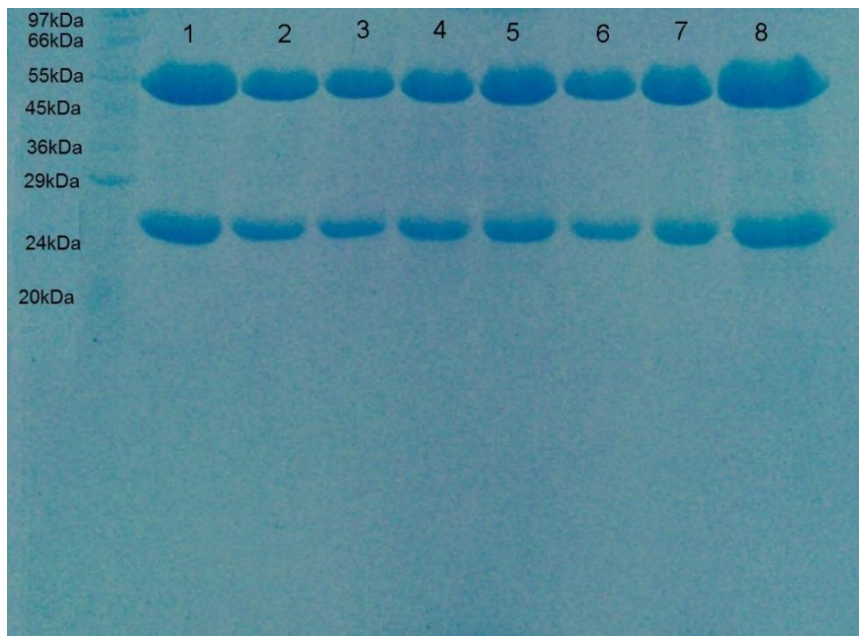


Слика 16. Редукација дисулфидних веза Тг-имунокоњугата

Изглед гела добијеног SDS-PAGE електрофорезом, са немодификованим и пречишћеним Тг и лиофилизованим имунокоњугатима припремљени у различитим моларним односима са хелаторима је приказан на слици 17. Гелови са имунокоњугатима обележеним са нерадиоактивним металним јонима итријумом и лутецијумом су приказани на слици 18 и слици 19.

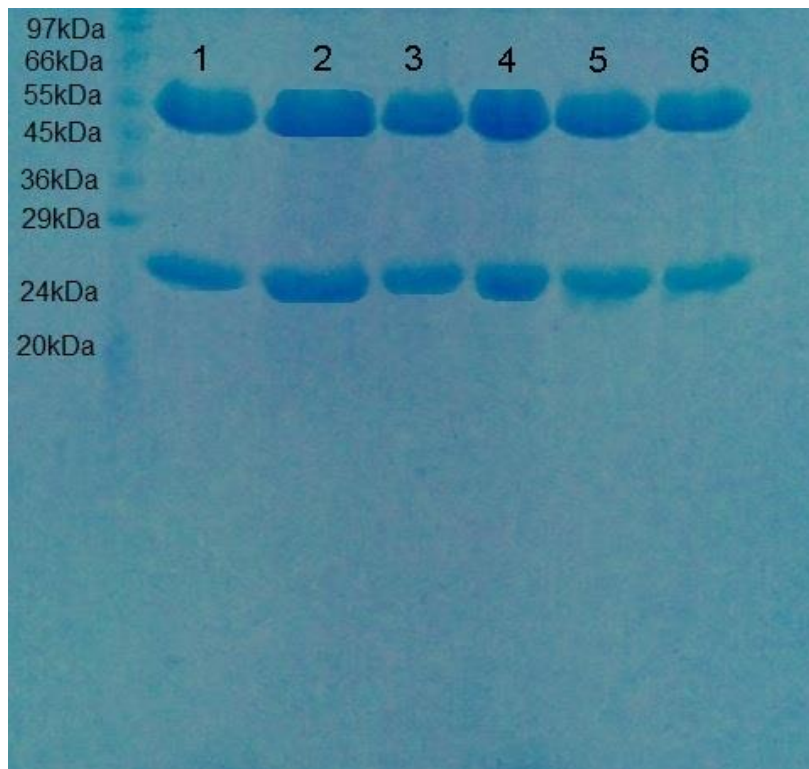


**Слика 17.** SDS-PAGE електрофореза трастузумаба концентрације 1 mg/mL у редукујућим условима (1); Tr-DTPA (1:10) (2); Tr-DTPA (1:20) (3); Tr-DTPA (1:50) (4); Tr-DOTA (1:20) (5); Tr-1B4M-DTPA (1:10) (6); Tr-1B4M-DTPA (1:20) (7); Tr-1B4M-DTPA (1:50) (8).



**Слика 18.** SDS-PAGE електрофореза Tr-DTPA-Y (1:10) у редукујућим условима (1); Tr-DTPA-Lu (1:10) (2); Tr-DTPA-Y (1:20) (3); Tr-DTPA-Lu (1:20) (4); Tr-DTPA-Y (1:50) (5); Tr-DTPA-Lu (1:50) (6); Tr-DOTA-Y (1:20) (7); Tr-DOTA-Lu (1:20) (8).





**Слика 19.** SDS-PAGE електрофореза Tr-1B4M-DTPA-Y (1:10) у редукујућим условима (1); Tr-1B4M-DTPA-Lu (1:10) (2); Tr-1B4M-DTPA-Y (1:20) (3); Tr-1B4M-DTPA-Lu (1:20) (4); Tr-1B4M-DTPA-Y (1:50) (5); Tr-1B4M-DTPA-Lu (1:50) (6).

Резултати електрофорезе показују да се траке фрагмената немодификованог анти-тела добијених у редукујућим условима поклапају са тракама имунокоњугата, чиме се доказује очување интегритета и структуре антитела након везивања за хелаторе без обзира на њихову структуру и концентрацију.

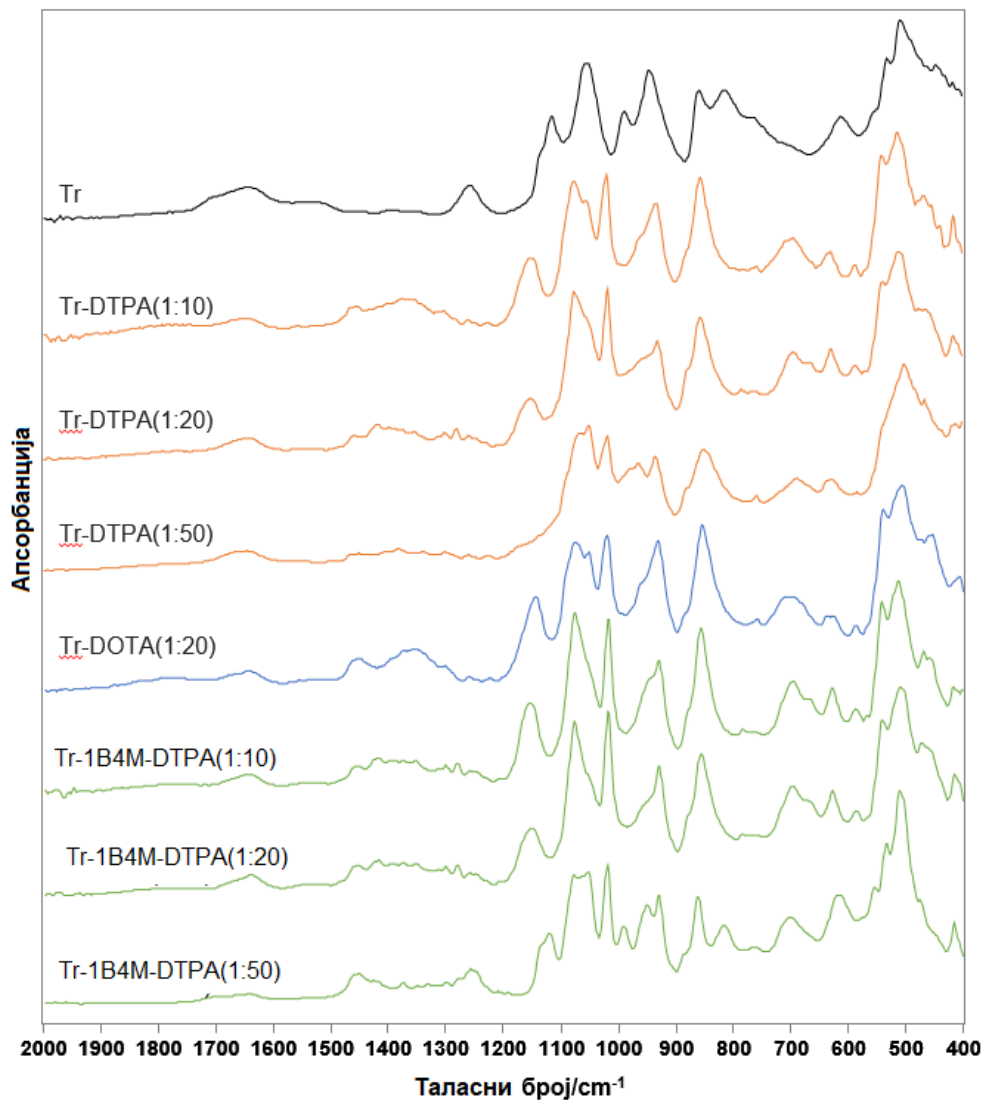
#### **4.5. Хемијска карактеризација имунокоњугата након коњугације, лиофилизације и обележавања нерадиокативним металним јонима**

Вибрациона спектроскопија је моћна и лако доступна техника за испитивање промена нативне структуре протеина која може настати услед хемијских модификација, лиофилизације или везивања металних јона. Припремљено је седам имунокоњугата након везивања трастузумаба са BFCA у различитим односима: Tr-DTPA (1:10); Tr-DTPA (1:20); Tr-DTPA (1:50); Tr-DOТА (1:20); Tr-1B4M-DTPA (1:10); Tr-1B4M-DTPA (1:20); Tr-1B4M-DTPA (1:50). Немодификовани трастузумаб је коришћен као репрезентативни узорак за процену ефикасности вибрационе спектроскопије (инфра-

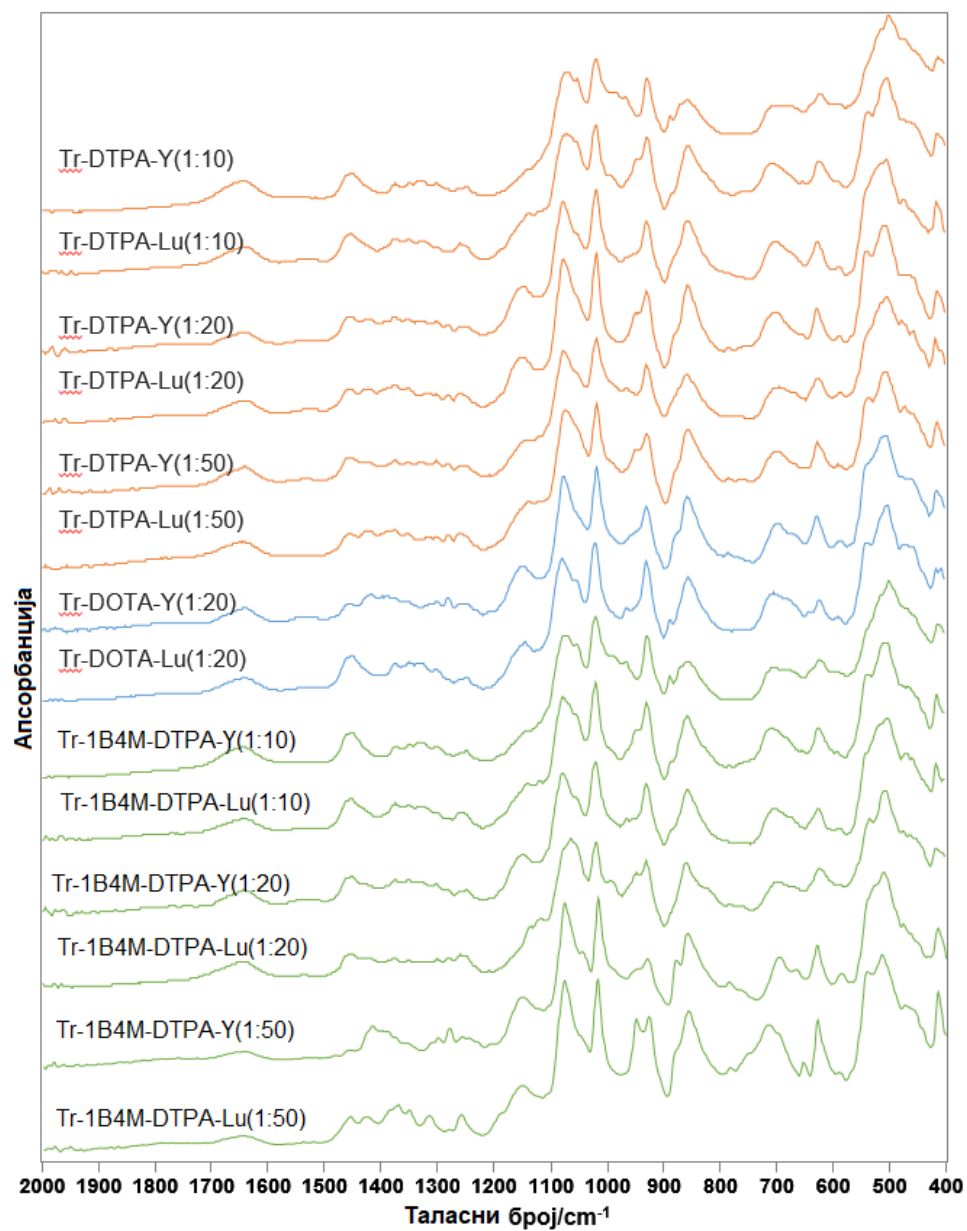


црвене и Раманове технике), у идентификацији промена структуре антитела након коњу-гације са изабраним ВФСА, и након везивања са нерадиоактивним тровалентним јонима метала  $\text{Lu}^{3+}$  и  $\text{Y}^{3+}$ .

Инфрацрвени спектри са Fourier-овом трансформацијом лиофилизованих имуно-коњугата и имунокоњугата обележених са нерадиоактивним металним јонима прика-зани су на слици 20 и 21, док су асигнације карактеристичних апсорпционих FT-IR тра-ка функционалних група приказане у табели 7.



Слика 20. FT-IR спектри лиофилизованих имунокоњугата



Слика 21. FT-IR спектри имунокоњугата обележених са нерадиоактивним металним јонима

**Табела 7.** Асигнације карактеристичних апсорпционих FT-IR трака имунокоњугата (необележених и обележених са нерадиоактивним металним јонима)

Узорак	АСИГНАЦИЈЕ				
	Амидне траке VI (cm <sup>-1</sup> )	Амидне траке IV и V (cm <sup>-1</sup> )	Амидне траке III (cm <sup>-1</sup> )	Амидне траке II (cm <sup>-1</sup> )	Амидне траке I (cm <sup>-1</sup> )
Tr	525 сл.*, 571 в.сл.	802 сл.	1233 сл.	1443 сл., 1531 j.	1633 в.j.
Tr-DTPA 1:10	517 j., 538 в.сл., 582 в.сл.	621 сл., 689 ср., 780 в.сл.	1241 в.сл., 1263 сл.	1470 сл., 1561 сл.	1645 сл.
Tr-DTPA 1:20	512 j., 587 сл.	629 ср., 694 ср., 763 в.сл., 784 в.сл.	1260 в.сл., 1281 ср.	1457 в.сл.	1644 ср.
Tr-DTPA 1:50	506 j., 574 в.сл.	620 сл., 691 сл.	1214 сл., 1260 сл., 1306 сл.	1450 в.сл.	1651 ср.
Tr-DOTA 1:20	506 в.j., 540 в.сл., 588 сл.	625 сл., 638 в.сл., 710 ср., 760 сл.	1224 в.сл., 1260 в.сл.	1453 ср., 1555 в.сл.	1645 ср.
Tr-1B4M-DTPA 1:10	509 j., 543 ср., 588 сл.	628 ср., 696 ср., 789 в.сл.	1253 в.сл., 1282 в.сл., 1304 сл.	1454 в.сл.	1640 ср.
Tr-1B4M-DTPA 1:20	510 в.j., 541 в.сл., 587 сл.	628 ср., 697 ср., 784 в.сл.	1260 в.сл., 1281 сл., 1301 сл.	1453 сл., 1538 в.сл.	1641 ср.
Tr-1B4M-DTPA 1:50	509 в.j., 531 в.сл., 578 сл.	624 ср., 692 ср., 763 сл.	1257 ср., 1304 в.сл.	1454 ср.	1643 ср.
Tr-DTPA-Y 1:10	517 в.сл., 584 в.сл.	630 ср., 723 в.сл., 770 в.сл.	1250 ср., 1272 сл., 1318 в.сл.	1454 ср.	1640 ср.
Tr-DTPA-Lu 1:10	502 j., 524 в.сл.	634 в.сл., 657 в.сл., 703 ср.	1261 ср., 1307 в.сл.	1457 ср.	1643 ср.

АСИГНАЦИЈЕ					
Узорак	Амидне траке		Амидне траке	Амидне траке	
	VI (cm <sup>-1</sup> )	IV и V (cm <sup>-1</sup> )	III (cm <sup>-1</sup> )	II (cm <sup>-1</sup> )	I (cm <sup>-1</sup> )
Tr-DTPA-Y 1:20	504 в.ј.,	626 ср.,	1248 сл.,	1453 ср.	1640 ср.
	588 в.сл.	701 ср.	1281 в.сл., 1301 в.сл.		
Tr-DTPA-Lu 1:20	508 в.ј.,	627 ср.,	1260 сл.,	1456 сл.,	1642 ср.
	540 в.сл.,	701 ср.,	1281 сл.,	1518 в.сл.	
	588 в.сл.	783 в.сл.	1302 в.сл.		
Tr-DTPA-Y 1:50	509 в.ј.,	623 ср.,	1246 сл.,	1450 сл.	1647 ср.
	577 в.сл.	716 в.сл.,	1293 в.сл.		
		783 в.сл.			
Tr-DTPA-Lu 1:50	506 ј.,	617 ср.,	1261 сл., 1307 в.сл.	1461 сл.	1647 ср.
	528 сл.,	700 ср.,			
	571 в.сл.	746 в.сл.,			
		768 в.сл.			
Tr-DOTA-Y 1:20	505 в.ј.,	627 ср.,	1248 сл.,	1454 сл., 1538 в.сл.	1640 ср.
	586 сл.	696 ср.,	1259 в.сл., 1281 сл., 1300 сл.		
		784 в.сл.			
Tr-DOTA-Lu 1:20	503 в.ј.,	623 ср.,	1248 сл.,	1451 ср.,	1644 ср.
	539 в.сл.	704 ср.	1302 в.сл.	1517 в.сл.	
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	500 ј.,	620 сл.,	1247 сл.,	1458 ј.	1644 ср.
	546 в.сл.	667 в.сл., 713 в.сл.	1300 сл.		
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:10	509 в.ј.	624 ср.,	1257 ср.,	1454 ј.	1643 ср.
		716 ср.	1279 в.сл.		
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:20	503 в.ј.,	624 ср.,	1248 сл.,	1452 ср.,	1644 ср.
	587 в.сл.	701 ср.	1301 в.сл.	1524 в.сл.	
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:20	506 ср.,	622 ср.,	1259 сл.,	1451 сл.	1639 ср.
	534 в.сл.	698 ср.,	1280 в.сл., 1300 в.сл.		
		782 в.сл.			
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	509 в.ј.,	623 ј.,	1257 ср.,	1454 ср.	1643 сл.
	531 ср.	670 в.сл.,	1304 в.сл.		
		696 ср.			
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:50	509 в.ј.,	624 ср.,	1257 ср.,	1450 ср.	1647 в.сл.
	556 в.сл.	716 ср.,	1304 в.сл.		
		760 сл.			

\*Интензитет траке: в.сл: врло слаба, сл: слаба, ср: средња, ј: јака, в.ј: врло јака

## Поређење апсорпционих максимума функционалних група испитиваних једињења добијених применом FT-IR спектроскопије

Извршено је поређење апсорпционих максимума добијених применом FT-IR спектроскопије испитиваних једињења и то: а. Свих новосинтетисаних коњугата са основном структуром трастузумаба; б. Различитих врста коњугата са истим разблажењем; в. Различитих разблажења у оквиру исте врсте коњугата.

Резултати добијени применом t-теста парова нису показали статистички значајне разлике између испитиваних параметара. Основни параметри дескриптивне статистике (средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (SD) су приказани у табели 8.

**Табела 8.** Апсорпциони максимуми амидних трака I-VI добијени FT-IR спектроскопијом за основну структуру трастузумаба и новосинтетисане комплексе

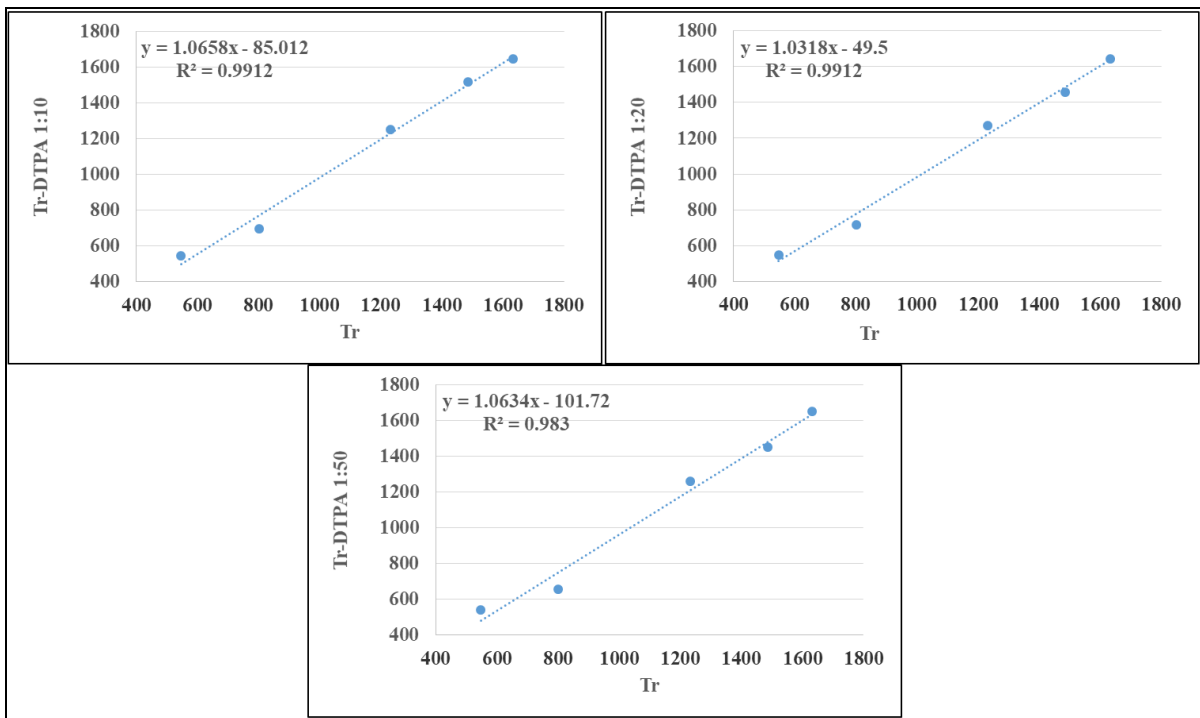
Једињење	Амидне траке VI (cm <sup>-1</sup> )	Амидне траке IV и V (cm <sup>-1</sup> )	Амидне траке III (cm <sup>-1</sup> )	Амидне траке II (cm <sup>-1</sup> )	Амидне траке I (cm <sup>-1</sup> )	p
Tr	548,0 $\pm$ 23,0	757,0 $\pm$ 45,0	1241,5 $\pm$ 8,5	1487,0 $\pm$ 44,0	1629,5 $\pm$ 3,5	ns
Tr-DTPA 1:10	549,5 $\pm$ 32,5	700,5 $\pm$ 79,5	1252,0 $\pm$ 11,0	1515,5 $\pm$ 45,5	1635,5 $\pm$ 9,5	ns
Tr-DTPA 1:20	549,5 $\pm$ 37,5	706,5 $\pm$ 77,5	1270,5 $\pm$ 10,5	1492,0 $\pm$ 35,0	1635,0 $\pm$ 9,0	ns
Tr-DTPA 1:50	540,0 $\pm$ 34,0	655,5 $\pm$ 35,5	1260,0 $\pm$ 46,0	1488,5 $\pm$ 38,5	1638,5 $\pm$ 12,5	ns
Tr-DOTA 1:20	547,0 $\pm$ 41,0	692,5 $\pm$ 67,5	1242,0 $\pm$ 18,0	1504,0 $\pm$ 51,0	1635,5 $\pm$ 9,5	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:10	548,5 $\pm$ 39,5	708,5 $\pm$ 80,5	1278,5 $\pm$ 25,5	1490,5 $\pm$ 36,5	1633,0 $\pm$ 7,0	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	548,5 $\pm$ 38,5	706,0 $\pm$ 78,0	1280,5 $\pm$ 20,5	1495,5 $\pm$ 42,5	1633,5 $\pm$ 7,5	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:50	543,5 $\pm$ 34,5	693,5 $\pm$ 69,5	1280,5 $\pm$ 23,5	1490,5 $\pm$ 36,5	1634,5 $\pm$ 8,5	ns
Tr-DTPA-Y 1:10	550,5 $\pm$ 33,5	700,0 $\pm$ 70,0	1284,0 $\pm$ 34,0	1490,5 $\pm$ 36,5	1633,0 $\pm$ 7,0	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	513,0 $\pm$ 11,0	668,5 $\pm$ 34,5	1284,0 $\pm$ 23,0	1492,0 $\pm$ 35,0	1634,5 $\pm$ 8,5	ns
Tr-DTPA-Y 1:20	546,0 $\pm$ 42,0	663,5 $\pm$ 37,5	1274,5 $\pm$ 26,5	1490,0 $\pm$ 37,0	1633,0 $\pm$ 7,0	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	548,0 $\pm$ 40,0	705,0 $\pm$ 78,0	1281,0 $\pm$ 21,0	1487,0 $\pm$ 31,0	1634,0 $\pm$ 8,0	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	543,0 $\pm$ 34,0	703,0 $\pm$ 80,0	1269,5 $\pm$ 23,5	1488,5 $\pm$ 38,5	1636,5 $\pm$ 10,5	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	538,5 $\pm$ 32,5	692,5 $\pm$ 75,5	1284,0 $\pm$ 23,0	1494,0 $\pm$ 33,0	1636,5 $\pm$ 10,5	ns
Tr-DOTA-Y 1:20	545,5 $\pm$ 40,5	705,5 $\pm$ 78,5	1274,0 $\pm$ 26,0	1496,0 $\pm$ 42,0	1633,0 $\pm$ 7,0	ns
Tr-DOTA-Lu 1:20	521,0 $\pm$ 18,0	663,5 $\pm$ 40,5	1275,0 $\pm$ 27,0	1484,0 $\pm$ 33,0	1635,0 $\pm$ 9,0	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	523,0 $\pm$ 23,0	666,5 $\pm$ 46,5	1273,5 $\pm$ 26,5	1492,5 $\pm$ 34,5	1635,0 $\pm$ 9,0	ns
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:10	540,0 $\pm$ 31,0	670,0 $\pm$ 46,0	1268,0 $\pm$ 11,0	1490,5 $\pm$ 36,5	1634,5 $\pm$ 8,5	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:20	545,0 $\pm$ 42,0	662,5 $\pm$ 38,5	1274,5 $\pm$ 26,5	1488,0 $\pm$ 36,0	1635,0 $\pm$ 9,0	ns
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:20	520,0 $\pm$ 14,0	702,0 $\pm$ 80,0	1279,5 $\pm$ 20,5	1489,0 $\pm$ 38,0	1632,5 $\pm$ 6,5	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	520,0 $\pm$ 11,0	659,5 $\pm$ 36,5	1280,5 $\pm$ 23,5	1490,5 $\pm$ 36,5	1634,5 $\pm$ 8,5	ns
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:50	532,5 $\pm$ 23,5	692,0 $\pm$ 68,0	1280,5 $\pm$ 23,5	1488,5 $\pm$ 38,5	1636,5 $\pm$ 10,5	ns

ns - "енгл. *non significant*", незначајно, без статистички значајне разлике

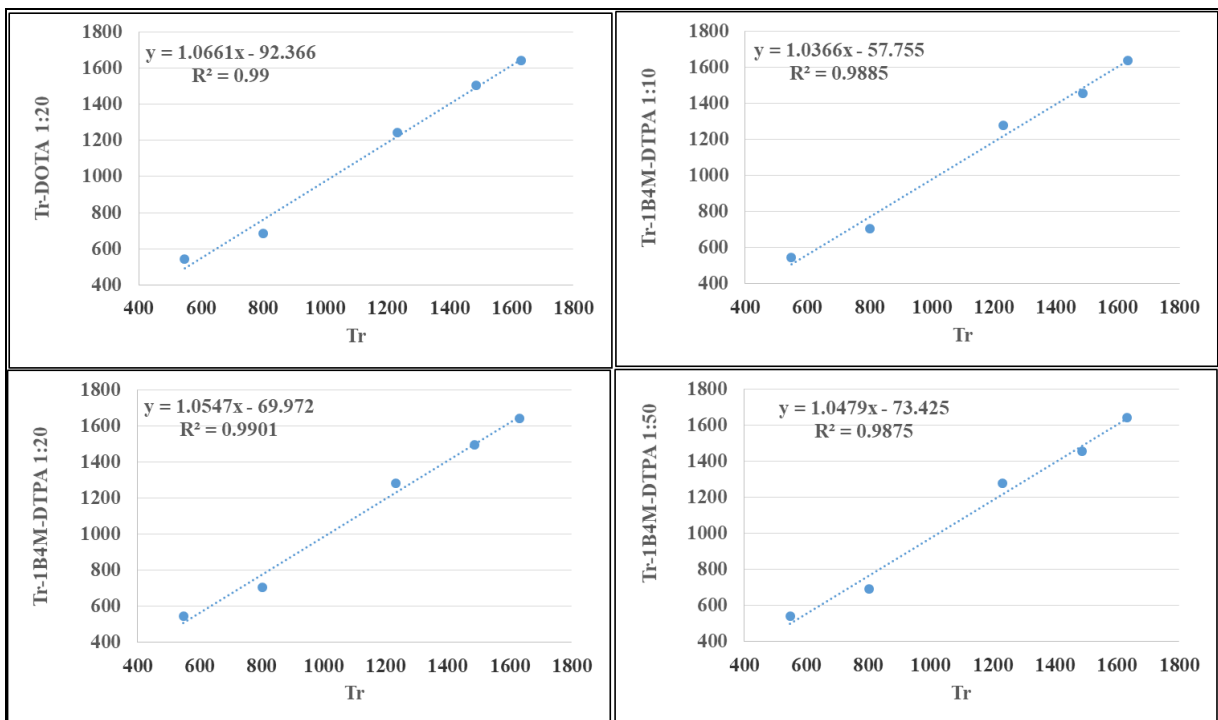
У табели 9 и на сликама 22-26 приказани су резултати корелационе анализе (*Pearsonova* параметарска корелација) апсорпционих максимума функционалних група добијених FT-IR спектроскопијом трастузумаба и испитиваних једињења. Корелациона анализа је изведена са циљем испитивања сличности структура у смислу апсорпционих карактеристика функционалних група.

**Табела 9.** *Pearsonova* параметарска корелација између апсорпционих максимума функционалних група добијених FT-IR спектроскопијом трастузумаба и испитиваних једињења ( $R^2$  – коефицијент детерминације,  $r$  – коефицијент корелације)

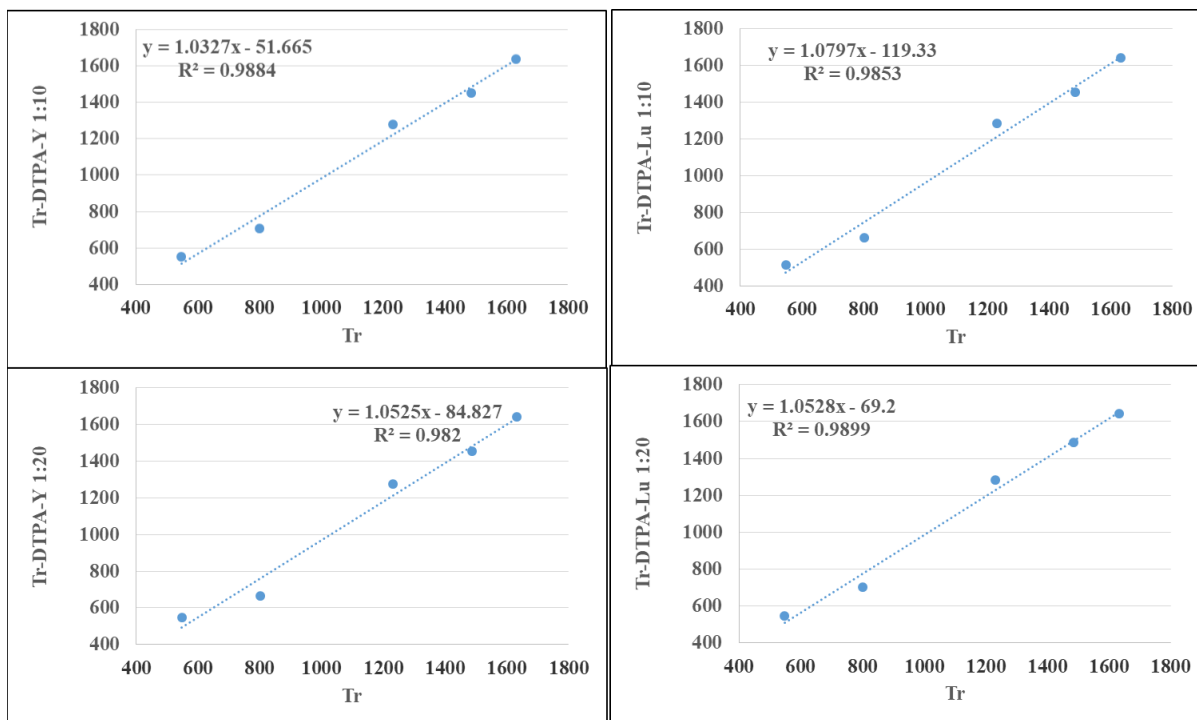
<b>Корелација Tr са једињењима:</b>	<b><math>R^2/r</math></b>
Tr-DTPA 1:10	0,991/0,995
Tr-DTPA 1:20	0,991/0,995
Tr-DTPA 1:50	0,983/0,991
Tr-DOTA 1:20	0,990/0,995
Tr-1B4M-DTPA 1:10	0,988/0,994
Tr-1B4M-DTPA 1:20	0,990/0,995
Tr-1B4M-DTPA 1:50	0,988/0,994
Tr-DTPA-Y 1:10	0,988/0,994
Tr-DTPA-Lu 1:10	0,985/0,992
Tr-DTPA-Y 1:20	0,982/0,991
Tr-DTPA Lu 1:20	0,990/0,995
Tr-DTPA-Y 1:50	0,990/0,995
Tr-DTPA Lu 1:50	0,990/0,995
Tr-DOTA-Y 1:20	0,991/0,995
Tr-DOTA Lu 1:20	0,987/0,993
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	0,987/0,993
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:10	0,988/0,994
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:20	0,984/0,992
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:20	0,990/0,995
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	0,985/0,992
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:50	0,989/0,994



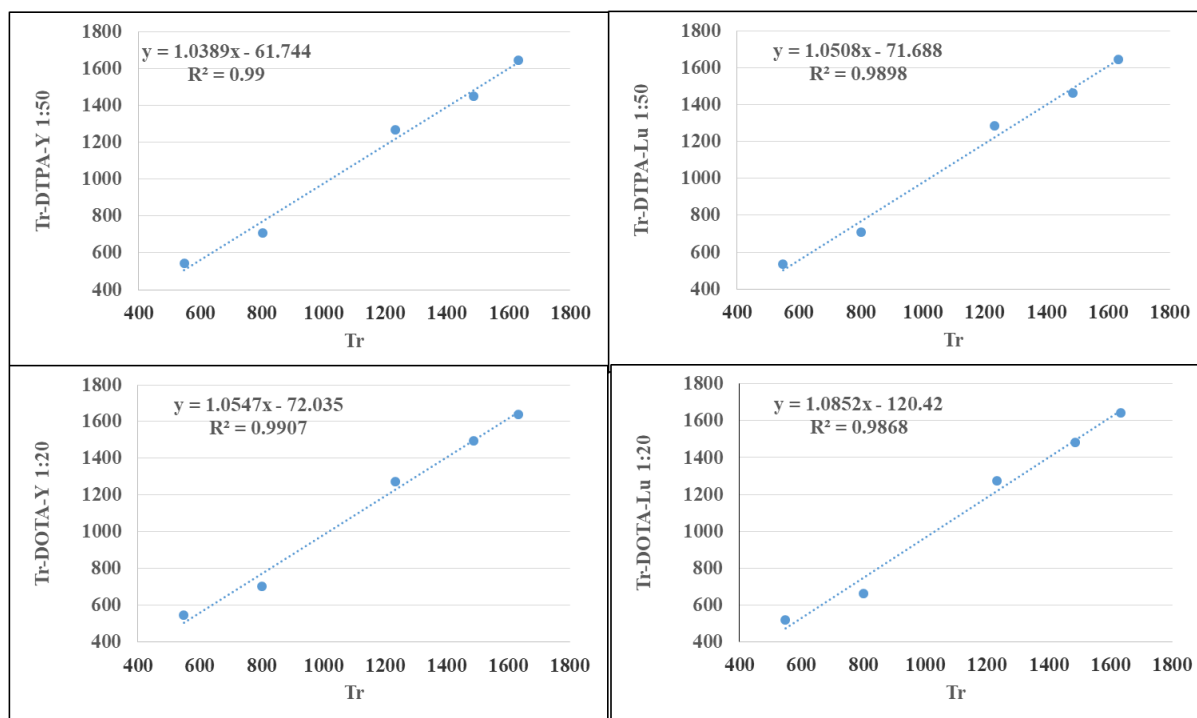
Слика 22. Корелација апсорпционих максимума функционалних група добијених FT-IR спектроскопијом трастузумаба и Tr-DTPA једињења (1:10; 1:20; 1:50)



Слика 23. Корелација апсорпционих максимума функционалних група добијених FT-IR спектроскопијом трастузумаба и Tr-DOTA (1:20), као и корелација трастузумаба и Tr-1B4M-DTPA (1:10; 1:20; 1:50)

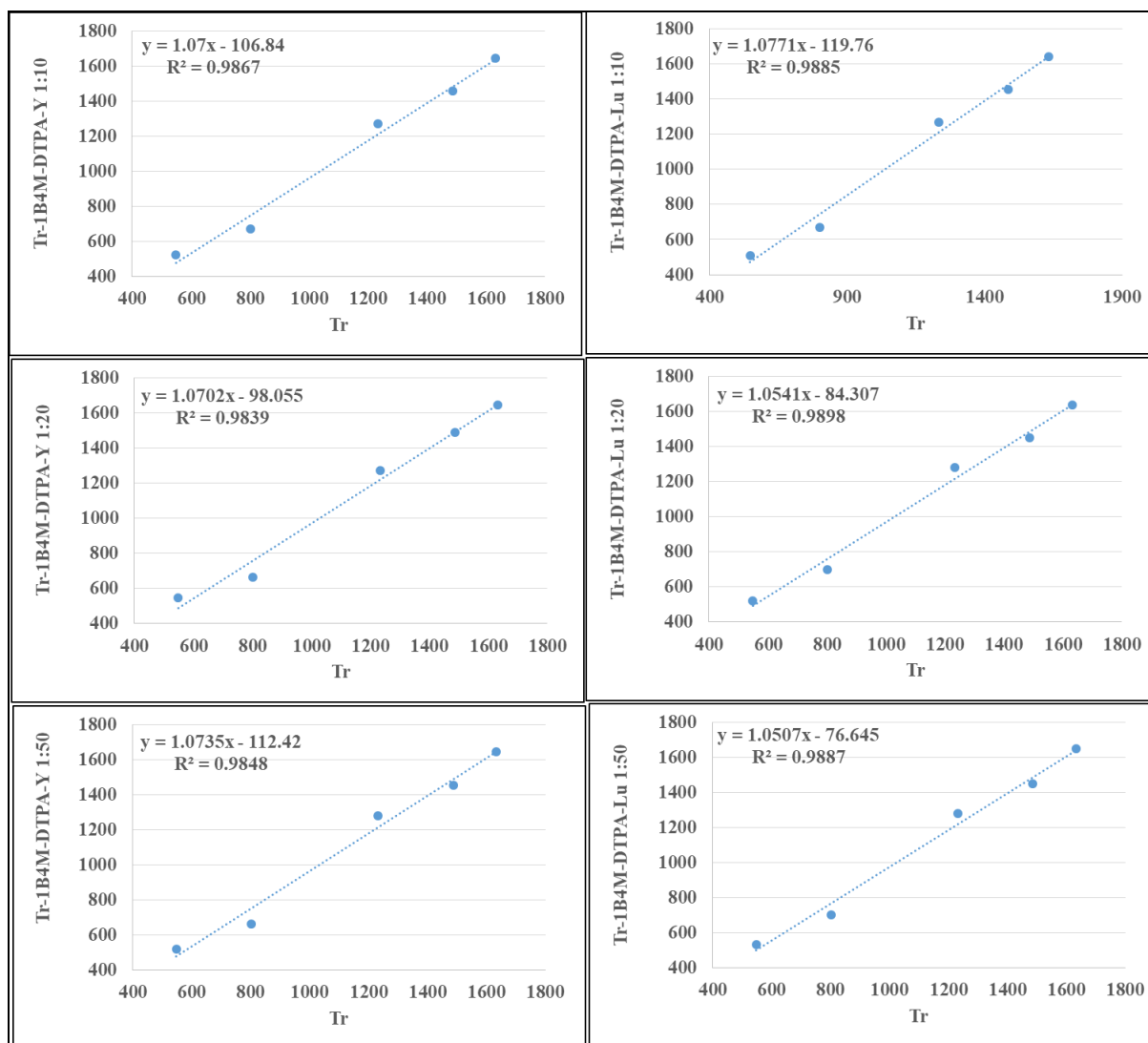


Слика 24. Корелација апсорпционих максимума функционалних група добијених FT-IR спектроскопијом трастузумаба са Tr-DTPA-Y (1:10; 1:20) и Tr-DTPA-Lu (1:10; 1:20)



Слика 25. Корелација апсорпционих максимума функционалних група добијених FT-IR спектроскопијом трастузумаба са Tr-DTPA (1:50) и Tr-DOТА (1:20) обележаних са  $Y^{3+}$  и  $Lu^{3+}$

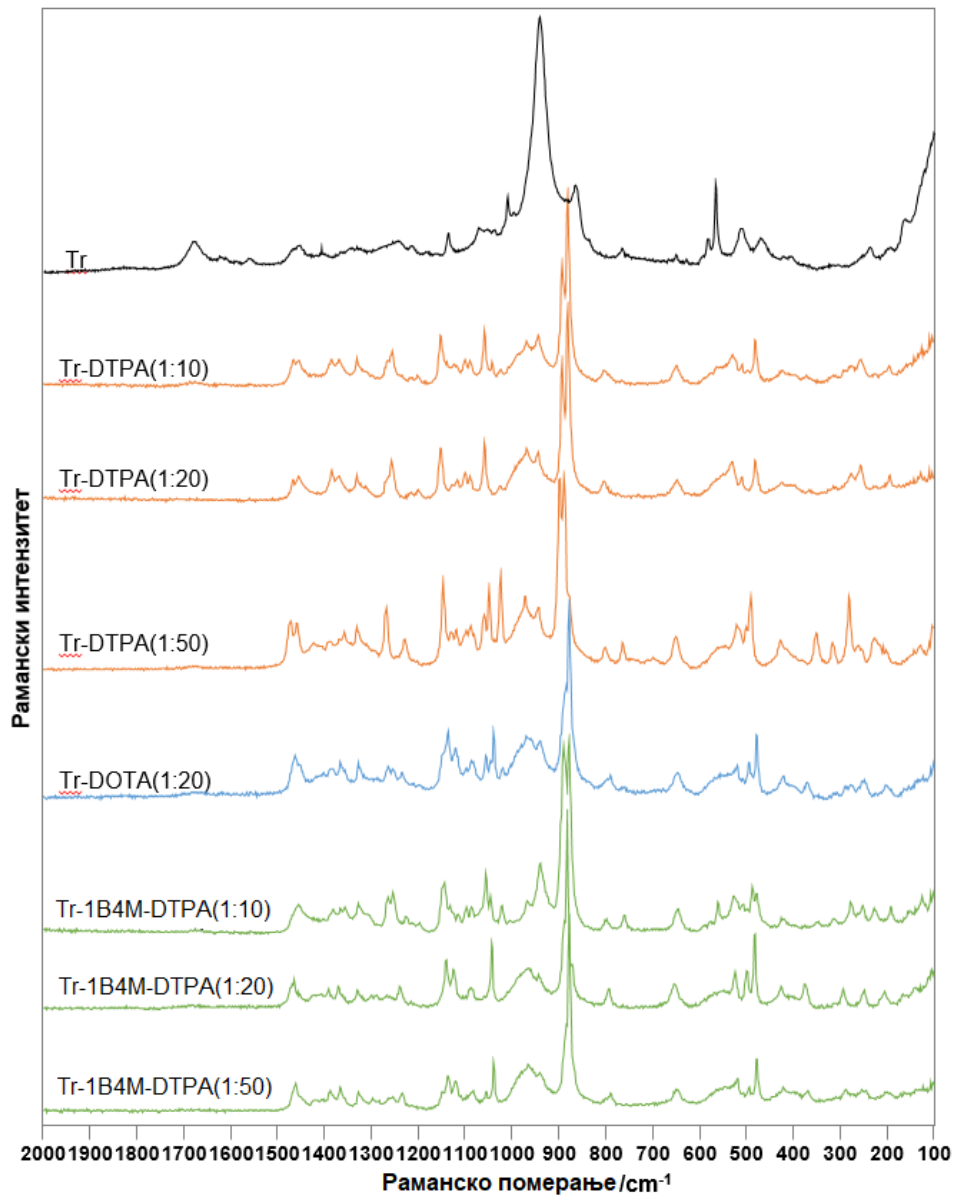




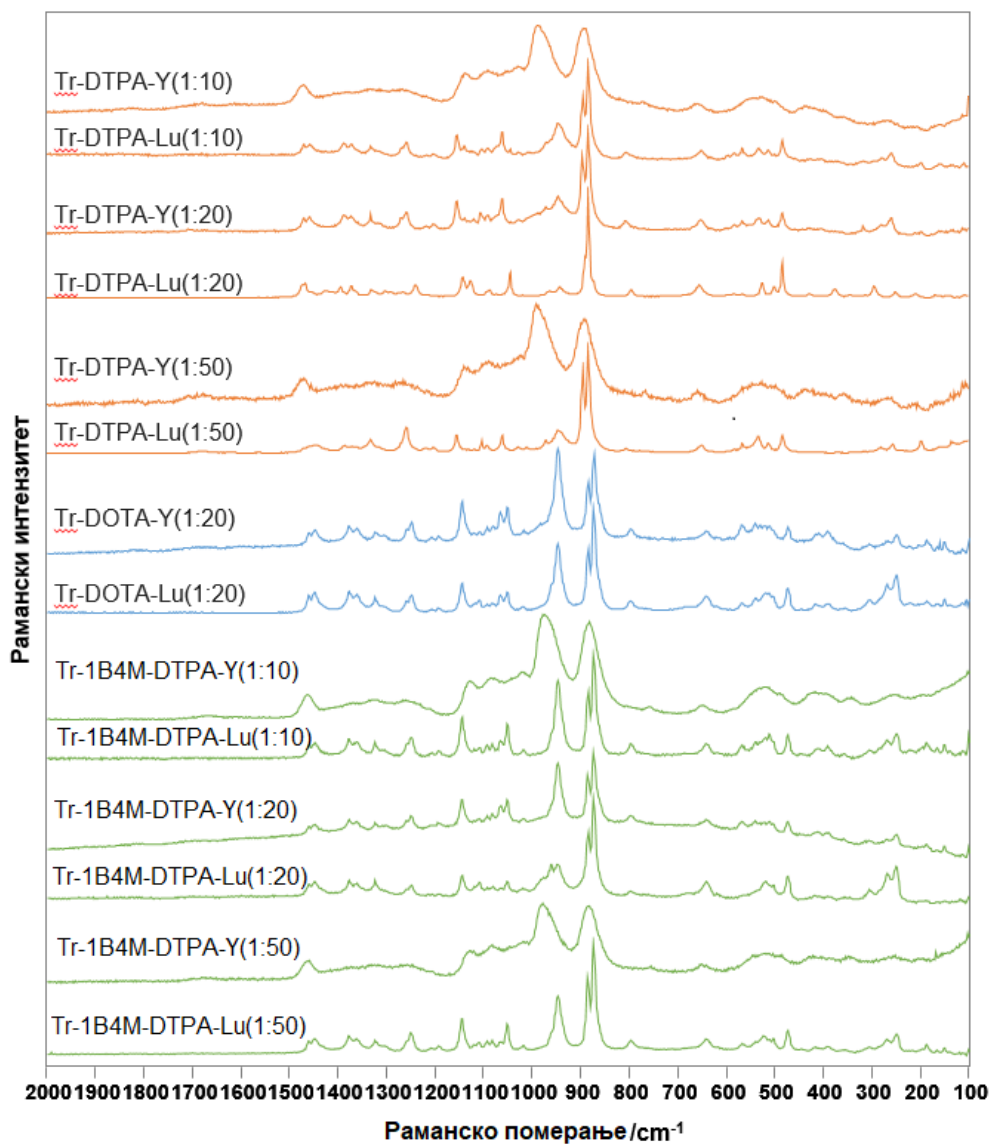
**Слика 26.** Корелација апсорпционих максимума функционалних група добијених FT-IR спектроскопијом Tr и Tr-1B4M-DTPA (1:10, 1:20, 1:50) обележаних са  $Y^{3+}$  и  $Lu^{3+}$

Корелациона анализа испитиваних једињења са основном структуром трастузу-маба је показала одлично слагање структура за већину од укупно двадесет једног једињења (табела 9). Мање одступање у слагању структура уочено је код једињења Tr-DTPA (1:50) ( $R^2=0,983$ ,  $r=0,991$ ) и Tr-DTPA-Y (1:20) ( $R^2=0,982$ ,  $r=0,991$ ), а за још десет једињења је утврђена корелација са коефицијентима детерминације ( $R^2$ ) нижим од 0,990, односно коефицијентима корелације ( $r$ ) нижим од 0,995, док су преосталих девет једињења имали коефицијенте детерминације/коефицијенте корелације више од помених вредности.

У овим испитивањима су добијени и Раманови спектри имунокоњугата који у својој структури имају различите хелаторе, као и обележених препарата тих истих имунокоњугата са нерадиоактивним металним јонима након лиофилизације. Раманови спектри су приказани на слици 27 и 28, док су асигнације добијених таласних бројева карактеристичних трака ( $\text{cm}^{-1}$ ) одговарајућих функционалних група наведене у табели 10.



Слика 27. Раманови спектри лиофилизованих имунокоњугата



Слика 28. Раманови спектри обележених имунокоњугата са нерадиоактивним изотопима

**Табела 10.** Асигнације добијених таласних бројева карактеристичне за Раманске траке ( $\text{cm}^{-1}$ ) имунокоњугага (необележени и обележени са нерадиоактивним изотопима)

Узорак	АСИГНАЦИЈЕ											
	s-s	Тур	Тур (760-790)	Тур (875-900)	CH <sub>3</sub> (def)	Phe	vC-C	Амидне траке III	Тур (def)	CH <sub>2</sub> (def)	Индол прстен (Тур)	Амидне траке I
Tr	471 ср.*,					1010 ср.,			1332		1562	1613
	510 ср.,	629 сл.,	757	865 ср.	942 в.ј.	1038 сл.,	1136 ср.	1245 в.сл.	в.сл.	1453 ср.	сл.	1676 ср.
	566 ј.,	650 сл.	в.сл.			1053 сл.						
	583 ср.											
Tr-DTPA	479 ср.,	640 ср.	/	790 сл.	878 в.ј.	1056 ср.	1126 сл.,	1255 ср.	1328 ср.	1456 ср.	/	1674 в.сл.
	528 ср.						1150 ср.				/	
Tr-DTPA	479 ср.,	646 ср	/	/	879 в.ј.,	1024 сл.,	1115 сл.,	1255 ср.	1328 ср.,	1453 ср.	/	1670 в.сл.
	508 сл.,				943 ср.	1056 ср.	1150 ср.		1369 сл.,	1453 ср.	/	
	528 ср.				891 ј.				1382 ср.		/	
Tr-DTPA	425 ср.,	648 ср.	/	762 сл.	886 в.ј.	1022 ср.,	1118 сл.,	1227 сл.	1328 ср.	1425 сл.	/	1676 в.сл.
	489 ср.,				946 ср.	1049 ср.,	1142 ср.				/	
	519 ср.					1058 сл.					/	
Tr-DOTA	422 ср.,					1021 сл.,						
	479 ј.,	648 ср.	/	761 сл.,	879 в.ј.	1040 ср.,	1121 ср.,	1235 сл.	1328 ср.	1463 ср.	/	1678 в.сл.
	496 ср.,			792 ср.	943 ј.	1056 ср.	1137 ср.				/	
	521 ср.										/	
Tr-1B4M-DTPA	479 ср.,	645 ср.	/	762 сл.	879 в.ј.	1022 ср.,	1120 сл.,	1226 сл.	1328 ср.	1454 ср.	/	1676 в.сл.
	488 ср.,				941 ј.	1060 ср.,	1132 сл.,				/	
	527 ср.					1071 сл.	1143 ср.				/	

АСИГНАЦИЈЕ												
Узорак	s-s	Тур	Тур (760-790)	Тур (875-900)	CH <sub>3</sub> (def)	Phe	νC-C	Амидне траке III	Тур (def)	CH <sub>2</sub> (def)	Индол прстен (Тур)	Амидне траке I
<b>Tr-1B4M-DTPA</b> <b>1:20</b>	428 ср.,	/	795 ср.	883 в.ј.	943 ср.	1044 ср.	1125 ср., 1141 ср.	1238 ср.	1331 ср.	1466 ср.	/	1679 в.сл.
	483 ј.,	654 ср.										
	500 ср.,											
	525 ср.											
<b>Tr-1B4M-DTPA</b> <b>1:50</b>	479 ср.,	/	790 сл.	878 в.ј.	938 ср.	1040 ср., 1053 сл., 1078 сл.	1113 сл., 1124 ср., 1149 сл.	1235 сл.	1328 сл.	1464 ср.	/	1678 в.сл.
	496 сл.,	648 ср.										
	521 сл.											
<b>Tr-DTPA-Y</b> <b>1:10</b>	424 сл.,	/	770 сл.	892 в.ј.	938 сл.	1028 сл., 1053 сл., 1077 сл.	1125 сл., 1137 ср., 1149 сл.	1258 в.сл.	1328	1469 ср.	/	1689 в.сл.
	497 ср.,	657 ср.										
	522 ср.											
<b>Tr-DTPA-Lu</b> <b>1:10</b>	485 ср.,	/	781 сл.	885 в.ј.	947 сл.	1027 сл., 1047 сл., 1062 ср.	1122 сл., 1133 сл., 1158 ср.	1256 ср.	1329 ср.	1456 ср.	/	1685 в.сл.
	509 сл.,	655 ср.										
	533 ср.,											
	558 сл.											
<b>Tr-DTPA-Y</b> <b>1:20</b>	483 ср.,	/	/	882 в.ј., 894 ј.	945 ј.	1105 сл., 1028 сл., 1060 ср.	1118 сл., 1153 ср.	1257 ср.	1331 ср.	1458 ср.	/	1672 в.сл.
	512 сл.,	651 ср.										
	532 ср.,											
	566 сл.											
<b>Tr-DTPA-Lu</b> <b>1:20</b>	483 ј.,	/	794 ср.	882 в.ј.	941 сл.	1043 ј., 1085 ср.	1125 ср., 1140 ср.	1238 ср.	1371 ср., 1393 ср.	1466 ср.	/	1688 в.сл.
	500 сл.,	654 ср.										
	524 ср.											

АСИГНАЦИЈЕ

Узорак	s-s	Тур	Тур	Тур	Тур	CH <sub>3</sub>	Phe	vC-C	Амидне траке III	Тур (def)	CH <sub>2</sub> (def)	Индол прстен (Тур)	Амидне траке I
		Тур	Тур	(760-790)	(875-900)	(def)							
<b>Tr-DTPA-Y</b> <b>1:50</b>	431 ср.,	/	765 ср.	886 в.ј.	947 сл.	1030 сл.,	1114 сл.,	1264 ср.	1323 сл.,	1469 ср.	/	/	1677 сл.
	443 ср.,	657 ср.				1054 сл.,	1139 ср.		1361 сл.				
	504 ср.,					1079 сл.							
	529 ср.												
<b>Tr-DTPA-Lu</b> <b>1:50</b>	483 ср.,	/	779 в.сл.	885 в.ј.	942 ср.	1026 сл.,	1152 ср.	1258 ср.	1332 ср.,	1452 ср.	/	/	1677 сл.
	507 сл.,	653 ср.				1063 ср.			1367 сл.				
	531 ср.,												
	567 сл.												
<b>Tr-DOTA-Y</b> <b>1:20</b>	412 ср.,	/	798 ср.	874 в.ј.,	948 в.ј.	1019 сл.,	1145 ј.	1250 ср.	1323 сл.,	1450 ср.,	/	/	1671 в.сл.
	473 ср.,	642 ср.		886 ј.		1052 ср.,	1066 ср.		1363 ср.,	1461 ср.			
	541 ср.,								1378 ср.				
	568 ср.												
<b>Tr-DOTA-Lu</b> <b>1:20</b>	418 сл.,	/	798 ср.	874 в.ј.,	948 ј.	1019 сл.,	1110 сл.,	1250 ср.	1324 ср.,	1449 ср.,	/	/	1681 в.сл.
	474 ср.,	641 ср.		886 ј.		1052 ср.,	1146 ср.		1362 ср.,	1461 ср.			
	513 ср.,					1066 ср.			1378 ср.				
	521 ср.,												
<b>Tr-1B4M-DTPA-Y</b> <b>1:10</b>	475 ср.,	/	799 ср.	875 в.ј.,	947 ј.	1020 сл.,	1143 ср.	1252 ср.	1326 ср.,	1453 ср.	/	/	1672 в.сл.
	513 сл.,	645 ср.		889 ј.		1057 ср.,	1067 ср.		1361 сл.,	1453 ср.			
	537 сл.,								1379 ср.				
	561 сл.												

АСИГНАЦИЈЕ

Узорак	s-s	T <sub>уг</sub>	T <sub>гр</sub>	T <sub>уг</sub> (760-790)	T <sub>гр</sub> (875-900)	CН <sub>3</sub> (def)	Phe	νC-C	Амидне траке		CН <sub>2</sub> (def)	Индол прстен (T <sub>гр</sub> )	Phe	Амидне траке
									III	I				
	475 ср.,													
<b>Tr-1B4M-DTPA-Lu</b>	511 ср.,						1020 сл.,	1119 сл.,						
<b>1:10</b>	522 ср.,	643 ср.	/	798 ср.	873 в.ј.,	949 в.ј.	1054 ср.,	1143 ј.	1252 ср.	1324 ср.	1449 ср.,	/	/	1678 в.сл.
	546 сл.,				885 ј.		1066 сл.				1462 ср.			
	571 ср.													
<b>Tr-1B4M-DTPA-Y</b>	474 ср.,						1019 сл.,	1111 сл.,						
<b>1:20</b>	512 сл.,	640 ср.	/	798 ср.	874 в.ј.,	948 в.ј.	1052 ср.,	1145 ј.	1250 ср.	1324 сл.,	1450 сл.,	/	/	1673 в.сл.
	542 сл.				886 ј.		1066 ср.			1362 сл.,	1462 сл.			
										1377 ср.				
<b>Tr-1B4M-DTPA-Lu</b>	474 ср.,						1020 сл.,	1110 сл.,						
<b>1:20</b>	521 ср.	642 ср.	/	798 сл.	874 в.ј.,	948 ср.	1052 ср.	1145 ср.	1249 ср.	1324 ср.,	1449 ср.,	/	/	1673 в.сл.
					886 ј.					1362 ср.,	1461 сл.			
										1378 ср.				
<b>Tr-1B4M-DTPA-Y</b>	465 сл.,						1019 сл.,	1129 сл.,						
<b>1:50</b>	490 сл.,	655 ср.	/	760 сл.	885 в.ј.	942 сл.	1043 сл.,	1154 сл.	1252 сл.	1355 сл.	1462 ср.	/	/	1677 в.сл.
	514 сл.						1081 сл.							
<b>Tr-1B4M-DTPA-Lu</b>	473 ср.,						1020 сл.,							
<b>1:50</b>	520 сл.	643 ср.	/	799 ср.	873 в.ј.,	947 ј.	1054 ср.,	1145 ј.	1250 ср.	1326 ср.	1447 ср.	/	/	1677 в.сл.
					886 ј.		1090 сл.							

\*Интензитет траке: в.сл: врло слаба, сл: слаба, ср: средња, ј: јака, в.ј: врло јака, def – деформационе вибрације

### Поређење Раманових апсорпционих пикова испитиваних једињења

Извршено је поређење апсорпционих пикова ( $\text{cm}^{-1}$ ) добијених применом Раманове спектроскопије испитиваних једињења (посматрањем целокупне структуре једињења) и то:

- а. Свих новосинтетисаних коњугата са основном структуром трастузумаба;
- б. Различитих врста коњугата са истим разблажењем и
- в. Различитих разблажења у оквиру исте врсте коњугата.

Добијене разлике применом t-теста парова анализираних параметара су приказане у табели 11. Утврђено је постојање статистички значајне разлике између основне структуре трастузумаба и следећих једињења: Tr-DTPA-Lu (1:10), Tr-DTPA-Lu (1:50) и Tr-1B4M-DTPA-Y (1:10).

Поређењем различитих испитиваних комплекса, са истим разблажењима (1:50) добијене су следеће статистички значајне разлике у апсорпционим пиковима: једињење Tr-DTPA (1:50) се значајно разликовало од Tr-DTPA-Y (1:50), Tr-DTPA-Lu (1:50) и Tr-1B4M-DTPA-Y (1:50).

Поређењем различитих комплекса са 1:20 разблажењем добијене су статистички значајне разлике између једињења Tr-DOTA, Tr-1B4M-DTPA и Tr-DTPA-Lu.

Статистички значајне разлике између једињења са 1:10 разблажењем утврђене су између Tr-1B4M-DTPA и Tr-DTPA-Lu и Tr-1B4M-DTPA-Y.

Поређењем различитих разблажења у оквиру истих једињења *нису добијене* статистички значајне разлике.

У табели 12 и на сликама 29-33 приказани су резултати корелационе анализе (*Pearsonova* параметарска корелација) апсорпционих пикова функционалних група добијених Рамановом спектроскопијом трастузумаба и испитиваних једињења. Корелациона анализа је изведена са циљем испитивања идентичности структура у смислу апсорпционих карактеристика функционалних група.

Корелациона анализа испитиваних једињења са основном структуром трастузумаба је показала одлично слагање структура за већину једињења. Мање одступање у слагању структура уочено је са једињењем Tr-1B4M-DTPA (1:50) ( $R^2=0,983$ ,  $r=0,991$ ) и Tr-DTPA-Lu (1:10) ( $R^2=0,966$ ,  $r=0,983$ ), док су за сва остала испитивана једињења добијени коефицијенти детерминације  $\geq 0,996$  односно коефицијенти корелације  $\geq 0,998$  (табела 12).



**Табела 11.** Поређење Раманових апсорционих пикова ( $\text{cm}^{-1}$ ) у целокупним структурама једињења (посматрајући једињење као целину)

Функционална група/једињење	S-S	Tyr (760-780)	Tyr (875-900)	CH <sub>3</sub> (def)	Phe	νC-C	Амидне траке		CH <sub>2</sub> (def)	Амидне траке I	p	
							III	II				
<b>Tr</b>	527,0 ±	639,5 ±	770,0 ±	876,0 ±	943,5 ±	1031,5 ±	1135,5 ±	1255,0 ±	1334,5 ±	1456,5 ±	1673,0 ±	0,011 vs. 0,009 vs. Tr-DTPA-Lu Tr-DTPA-Lu Tr-DTPA-Y 1:10 Tr-DTPA-Lu 1:50 DTPA-Y 1:10 0,011 vs. 0,009 vs. Tr-DTPA-Lu Tr-DTPA-Lu Tr-DTPA-Y 1:50 DTPA-Y 1:10
<b>Tr-DTPA 1:10</b>	503,5 ±	643,5 ±	782,5 ±	882,5 ±	945,5 ±	1044,0 ±	1138,0 ±	1260,0 ±	1332,5 ±	1458,0 ±	1672,0 ±	/
<b>Tr-DTPA 1:20</b>	503,5 ±	646,5 ±	885,0 ±	885,0 ±	944,0 ±	1040,0 ±	1132,5 ±	1260,0 ±	1355,0 ±	1456,5 ±	1670,5 ±	/
<b>Tr-DTPA 1:50</b>	473,0 ±	647,5 ±	768,5 ±	886,5 ±	945,5 ±	1040,0 ±	1130,0 ±	1246,0 ±	1332,5 ±	1442,5 ±	1673,0 ±	0,036 vs. 0,011 vs. Tr-DTPA-Y Tr-DTPA-Lu Tr-DTPA-Lu 1:50 DTPA-Y 1:50 0,005 vs. 0,005 vs. Tr-IB4M-DTPA 1:20 0,011 vs. 0,041 vs. Tr-DTPA-Lu Tr-IB4M-DTPA-Y 1:10 DTPA-Y 1:10
<b>Tr-DOGA 1:20</b>	471,5 ±	647,5 ±	776,5 ±	883,0 ±	944,0 ±	1038,5 ±	1129,0 ±	1250,0 ±	1332,5 ±	1461,5 ±	1674,0 ±	0,005 vs. Tr-IB4M-DTPA-Lu 0,004 vs. DTPA 1:20 1:20
<b>Tr-IB4M-DTPA 1:10</b>	503,0 ±	646,0 ±	768,5 ±	883,0 ±	943,0 ±	1046,5 ±	1131, ±	1245,5 ±	1332,5 ±	1457,0 ±	1673,0 ±	0,011 vs. Tr-DTPA-Lu Tr-IB4M-DTPA-Y 1:10 DTPA-Y 1:10 0,005 vs. Tr-DOGA Tr-DOGA 1:20 0,005 vs. Tr-DOGA 1:20
<b>Tr-IB4M-DTPA 1:20</b>	476,5 ±	650,5 ±	785,0 ±	885,0 ±	944,0 ±	1038,0 ±	1133,0 ±	1251,5 ±	1334,0 ±	1463,0 ±	1674,5 ±	0,005 vs. Tr-DOGA Tr-DOGA 1:20 0,005 vs. Tr-DOGA 1:20

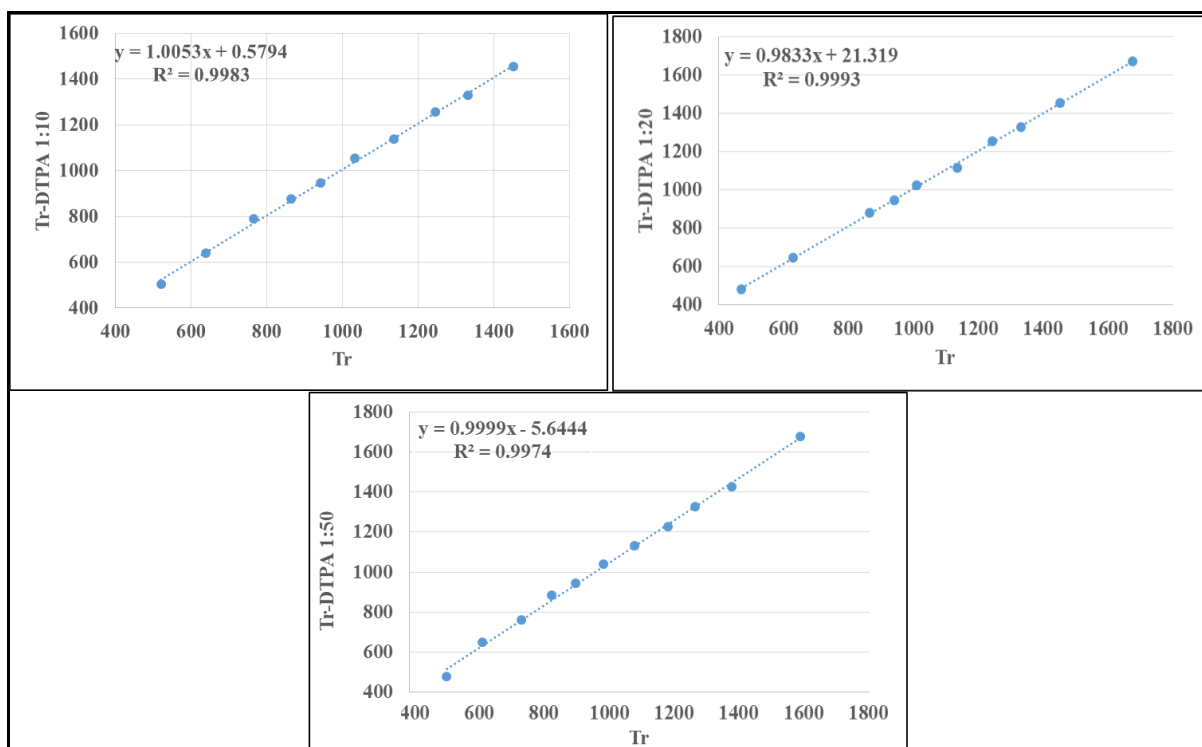
Функционална група/једињење	S-S		Tyr (760-780)		Tyr (875-900)		CH <sub>3</sub> (def)	Phe	vC-C	Амидне траке III		Tyr (def)	CH <sub>2</sub> (def)	Амидне траке I	p
	±	±	±	±	±	±				±	±				
<b>Tr-1B4M-DTPA</b>	500,0	647,5	782,5	882,5	941,5	1059,0	1131,0	1250,0	1332,5	1462,0	1674,0	/	/	/	/
<b>1:50</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	/
	29,7	0,7	10,6	6,4	4,9	26,9	25,5	21,2	6,4	2,8	5,7				
<b>Tr-DTPA-Y</b>	473,0	652,0	772,5	889,5	941,5	1052,5	1137,0	1261,5	1332,5	1464,5	1679,5	/	/	/	/
<b>1:10</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	/
	69,3	7,1	3,5	3,5	4,9	34,6	17,0	4,9	6,4	6,4	13,4				
<b>Tr-DTPA-Lu</b>	521,5	651,0	778,0	886,0	946,0	1043,0	1140,0	1260,5	1333,0	1458,0	1677,5	0,011	0,011 vs.	0,011 vs.	/
<b>1:10</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	vs.Tr	Tr-1B4M-DTPA	Tr-1B4M-DTPA	/
	51,6	5,7	4,2	1,4	1,4	26,9	25,5	6,4	5,7	2,8	10,6				
<b>Tr-DTPA-Y</b>	524,5	649,0	888,0	888,0	945,5	1044,0	1129,0	1261,0	1334,0	1459,0	1671,0	/	/	/	/
<b>1:20</b>	±	±	/	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	/
	58,7	2,8		8,5	0,7	22,6	33,9	5,7	4,2	1,4	1,4				
<b>Tr-DTPA-Lu</b>	603,5	650,5	784,5	884,5	943,0	1064,0	1132,5	1251,5	1361,0	1463,0	1679,0	0,004 vs.	0,004 vs.	0,004 vs.	/
<b>1:20</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	Tr-DOTA	Tr-DOTA	Tr-DOTA	/
	112,4	4,9	13,4	3,5	2,8	29,7	10,6	19,1	45,3	4,2	12,7	1:20	1:20	1:20	/
<b>Tr-DTPA-Y</b>	480,0	652,0	770,0	886,5	946,0	1054,5	1126,5	1264,5	1342,0	1464,5	1673,5	0,036 vs.	0,036 vs.	0,036 vs.	/
<b>1:50</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	Tr-DTPA	Tr-DTPA	Tr-DTPA	/
	69,3	7,1	7,1	0,7	1,4	34,6	17,7	0,7	6,9	6,4	4,9	1:50	1:50	1:50	/
<b>Tr-DTPA-Lu</b>	525,0	650,0	777,0	886,0	943,5	1044,5	1143,5	1261,5	1349,5	1456,0	1673,5	0,009	0,009	0,009	0,011 vs.
<b>1:50</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	vs.Tr	vs.Tr	vs.Tr	Tr-DTPA
	59,4	4,2	2,8	1,4	2,1	26,2	12,0	4,9	24,7	5,7	4,9	1:50	1:50	1:50	/
<b>Tr-DOTA-Y</b>	490,0	644,5	786,5	880,0	946,5	1042,5	1140,0	1257,5	1350,5	1455,5	1670,5	/	/	/	/
<b>1:20</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	/
	110,3	3,5	16,3	8,5	2,1	33,2	7,1	10,6	38,9	7,8	0,7				

Функционална група/једињење	S-S	T <sub>gr</sub>	T <sub>gr</sub> (760-780)	T <sub>gr</sub> (875-900)	CH <sub>3</sub> (def)	Phe	νC-C	Амидне траке		P				
								III	I					
<b>Tr-DOTA-Lu</b>	493,5	644,0	786,5	880,0	946,5	1042,5	1128,0	1257,5	1351,0	1455,0	1675,5	/	/	/
<b>1:20</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	106,8	4,2	16,3	8,5	2,1	33,2	25,5	10,6	38,2	8,5	7,8			
<b>Tr-1B4M-DTPA-Y</b>	518,0	646,0	787,0	882,0	946,0	1043,5	1139,0	1258,5	1352,5	1456,5	1671,0	0,011 vs. Tr	0,041 vs. Tr-1B4M-DTPA 1:10	/
<b>1:10</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	60,8	1,4	17,0	9,9	1,4	33,2	5,7	9,2	37,5	4,9	1,4			
<b>Tr-1B4M-DTPA-Lu</b>	523,0	645,0	786,5	879,0	947,0	1043,0	1131,0	1258,5	1330,5	1455,5	1674,0	/	/	/
<b>1:10</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	67,9	2,8	16,3	8,5	2,8	32,5	17,0	9,2	9,2	9,2	5,7			
<b>Tr-1B4M-DTPA-Y</b>	508,0	643,5	786,5	880,0	946,5	1042,5	1128,0	1257,5	1350,5	1456,0	1671,5	/	/	/
<b>1:20</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	48,1	4,9	16,3	8,5	2,1	33,2	24,0	10,6	37,5	8,5	2,1			
<b>Tr-1B4M-DTPA-Lu</b>	497,5	644,5	786,5	880,0	946,5	1036,0	1127,5	1257,0	1351,0	1455,0	1671,5	/	/	/
<b>1:20</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	33,2	3,5	16,3	8,5	2,1	22,6	24,7	11,3	38,2	8,5	2,1			
<b>Tr-1B4M-DTPA-Y</b>	489,5	651,0	767,5	886,0	943,5	1050,0	1141,5	1258,5	1346,0	1461,0	1673,5	0,029 vs. Tr-DTPA 1:50	/	/
<b>1:50</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	34,6	5,7	10,6	1,4	2,1	43,8	17,7	9,2	12,7	1,4	4,9			
<b>Tr-1B4M-DTPA-Lu</b>	496,5	645,0	787,0	879,5	946,0	1055,0	1149,5	1257,5	1331,5	1453,5	1673,5	/	/	/
<b>1:50</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	332	2,8	17,0	9,2	1,4	49,5	6,4	10,6	7,8	9,2	4,9			

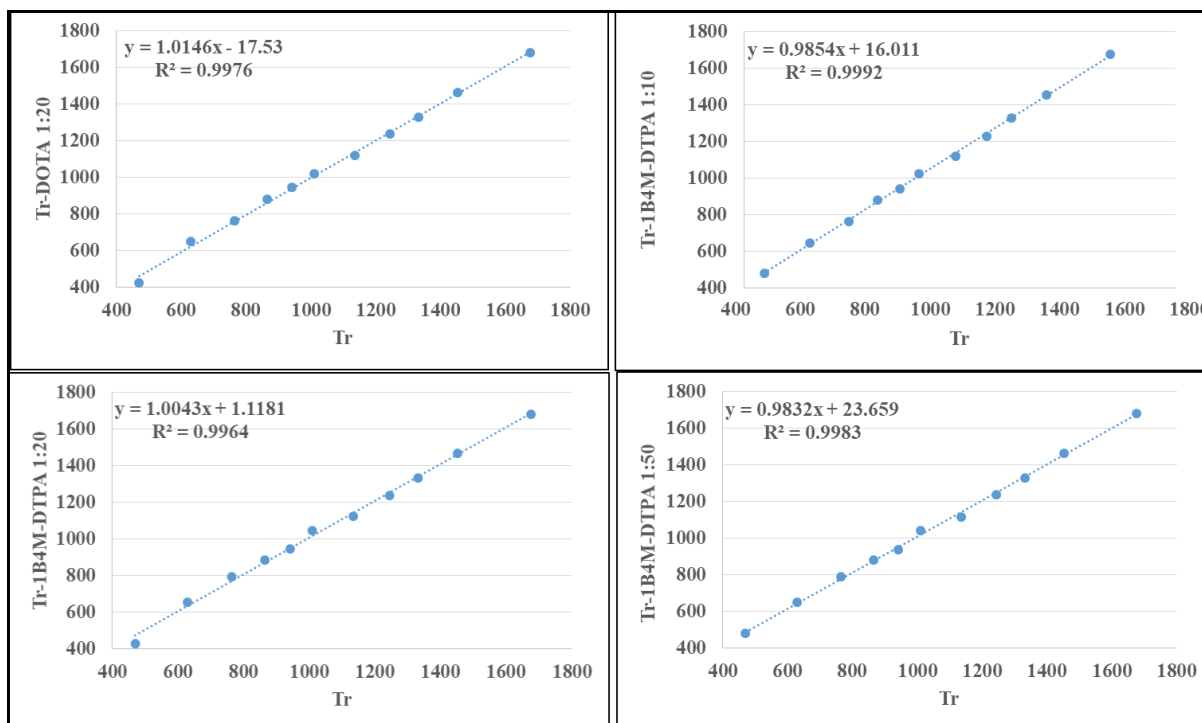
P- t-тест парова

**Табела 12.** *Pearsonova* параметарска корелација између апсорпционих пикова функционалних група добијених Рамановом спектроскопијом трастузумаба и испитиваних једињења ( $R^2$  – коефицијент детерминације,  $r$  – коефицијент корелације)

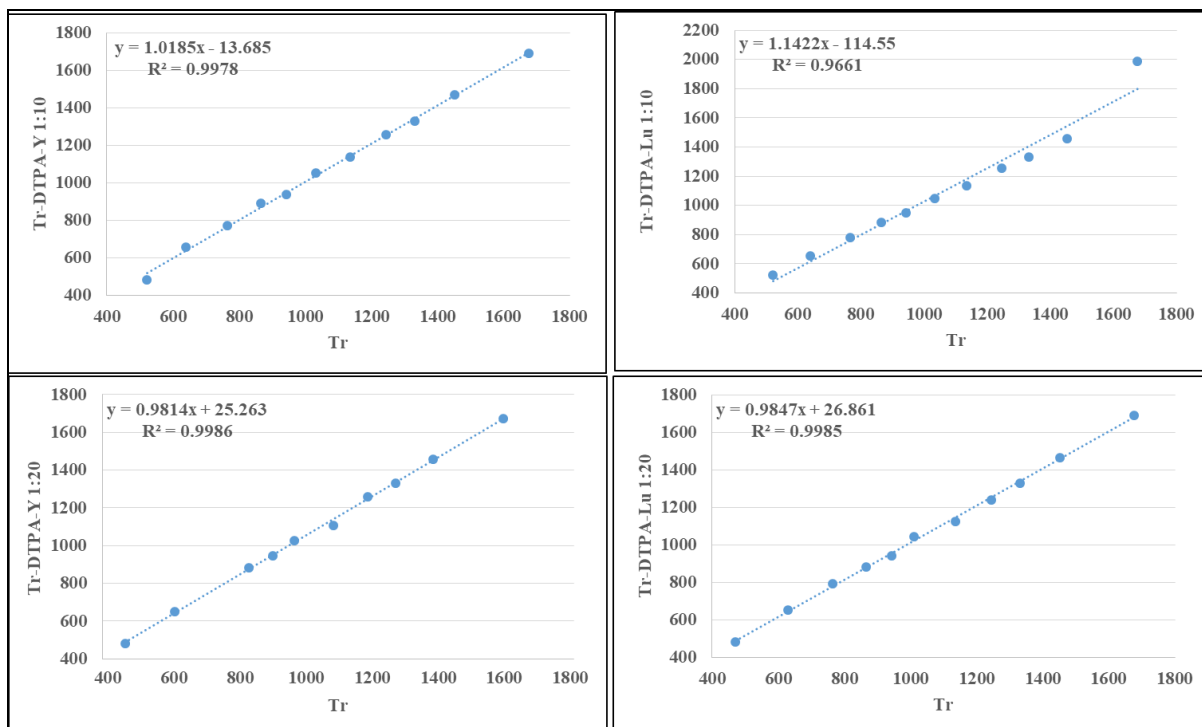
Корелација Tr са једињењима:	$R^2/r$
Tr-DTPA 1:10	0,999/0,999
Tr-DTPA 1:20	0,993/0,996
Tr-DTPA 1:50	0,999/0,999
Tr-DOTA 1:20	0,998/0,999
Tr-1B4M-DTPA 1:10	0,999/0,999
Tr-1B4M-DTPA 1:20	0,996/0,998
Tr-1B4M-DTPA 1:50	0,983/0,991
Tr-DTPA-Y 1:10	0,998/0,999
Tr-DTPA-Lu 1:10	0,966/0,983
Tr-DTPA-Y 1:20	0,999/0,999
Tr-DTPA Lu 1:20	0,998/0,999
Tr-DTPA-Y 1:50	0,998/0,999
Tr-DTPA Lu 1:50	0,999/0,999
Tr-DOTA-Y 1:20	0,996/0,998
Tr-DOTA Lu 1:20	0,996/0,998
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	0,999/0,999
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:10	0,999/0,999
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:20	0,999/0,999
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:20	0,999/0,999
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	0,999/0,999
Tr-1B4M-DTPA-Lu 1:50	0,999/0,999



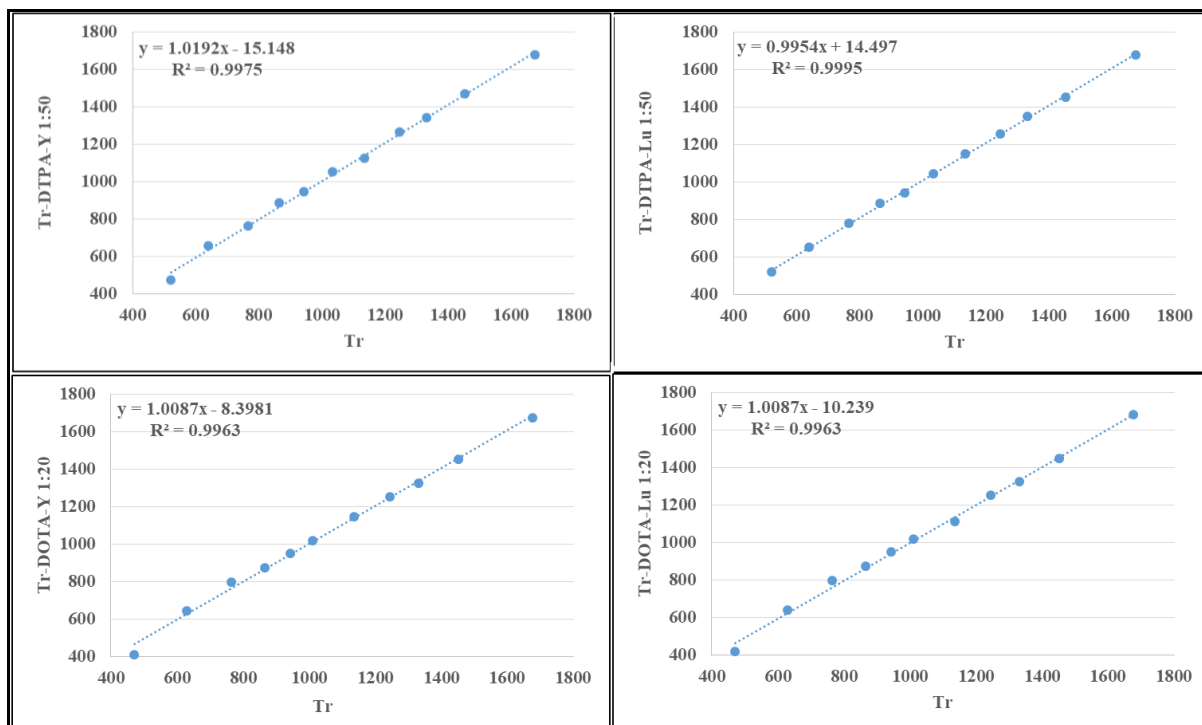
Слика 29. Корелација апсорпционих пикова функционалних група добијених Рамановом спектроскопијом трастузумаба и Tr-DTPA једињења (1:10; 1:20; 1:50)



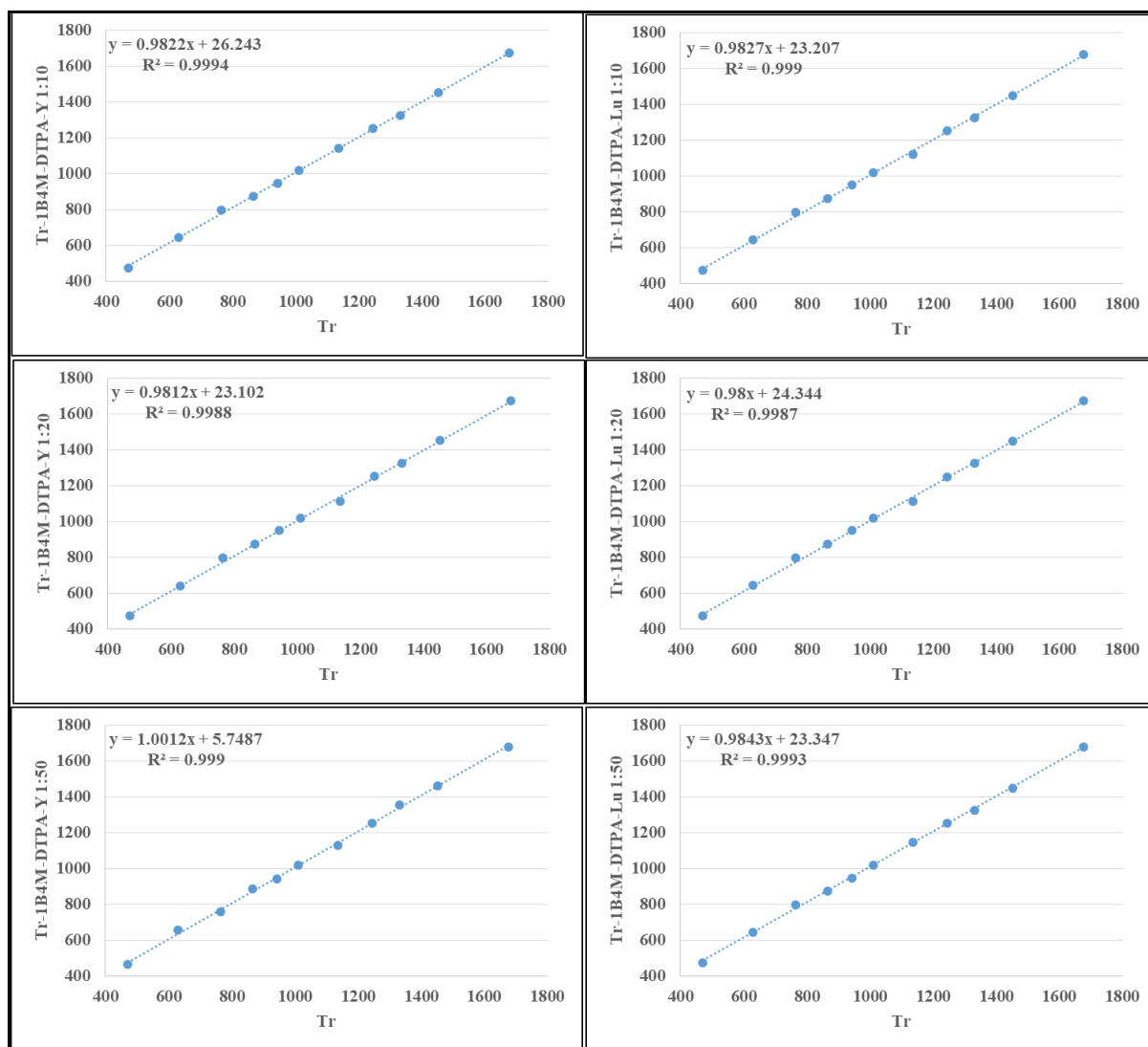
Слика 30. Корелација апсорпционих пикова функционалних група добијених Рамановом спектроскопијом трастузумаба и Tr-DOTA (1:20), као и корелација трастузумаба и Tr-1B4M-DTPA (1:10; 1:20; 1:50)



**Слика 31.** Корелација апсорпционих пикова функционалних група добијених Рамановом спектроскопијом трастузумаба са Tr-DTPA-Y (1:10; 1:20) и Tr-DTPA-Lu (1:10; 1:20)



**Слика 32.** Корелација апсорпционих пикова функционалних група добијених Рамановом спектроскопијом трастузумаба и Tr-DTPA (1:50) обележаних са  $Y^{3+}$  и  $Lu^{3+}$  као и корелација трастузумаба и Tr-DOTA (1:20) обележених са  $Y^{3+}$  и  $Lu^{3+}$



**Слика 33.** Корелација апсорпционих пикова функционалних група добијених Рамановом спектроскопијом трастузумаба и Tr-1B4M-DTPA (1:10, 1:20, 1:50) обележених са  $Y^{3+}$  и  $Lu^{3+}$

### Поређење Раманових апсорпционих пикова појединих делова структуре молекула испитиваних једињења

Прецизнија анализа разлике у апсорпционим пиковима појединих делова структуре молекула, за које је у прелиминарној анализи комплетних структура утврђено да се значајно разликују од других испитиваних једињења, изведена је применом t-теста парова. Добијене разлике су биле малобројне и на граници статистичке значајности ( $p > 0,05$  и  $p < 0,100$ ). Овај део анализе испитиваних једињења је приказан у табелама 13–23 и графички на сликама 34–44.

У табели 13 и на слици 34 су приказани апсорпциони пикови за S-S групе у структурама испитиваних једињења и резултати поређења вредности ових пикова између испитиваних једињења.

**Табела 13.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за S-S групе у испитиваним једињењима

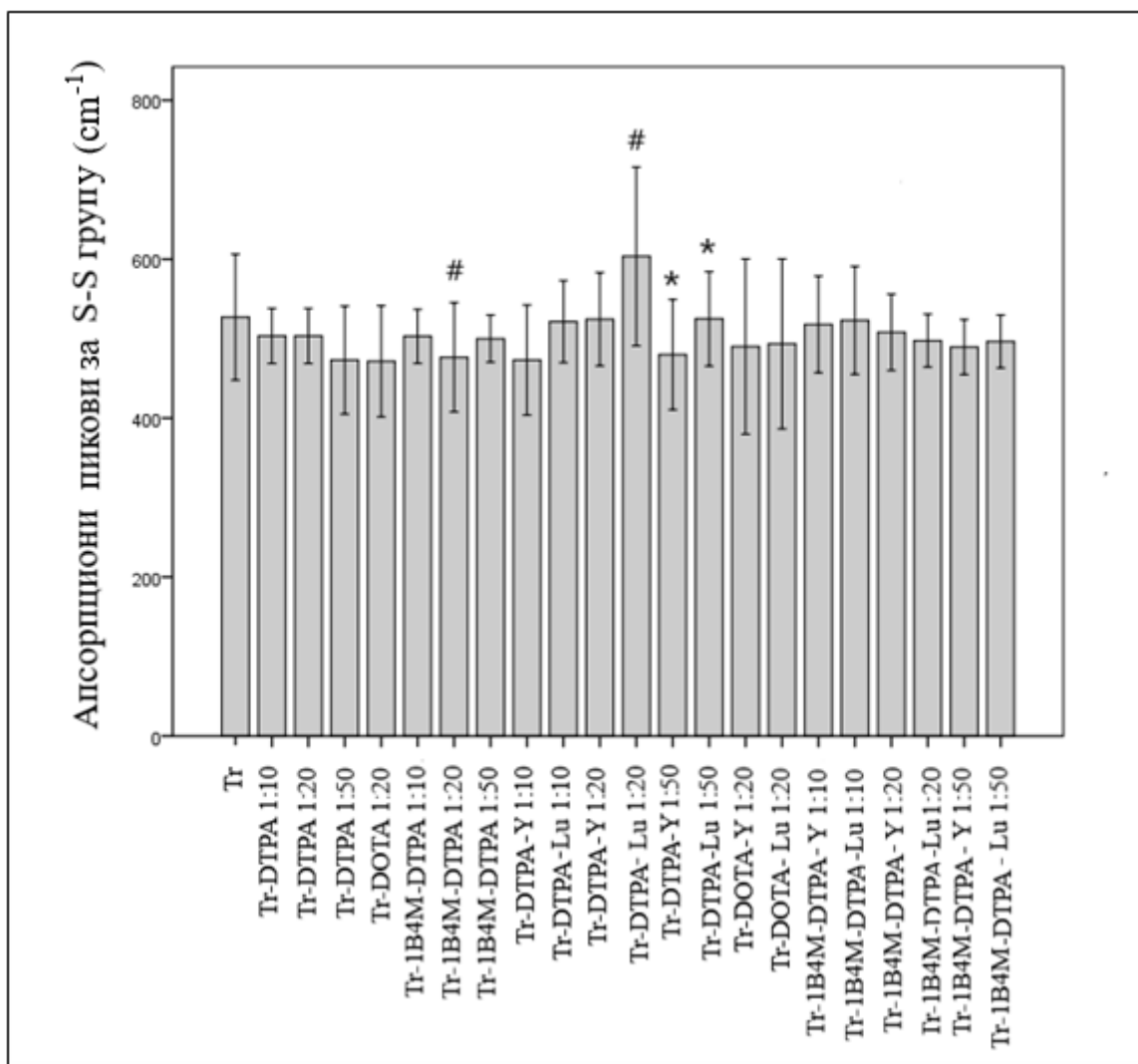
Једињење	Вредности апсорпционих пикова за S-S групу (cm <sup>-1</sup> )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	Xsr	SD	Минимум	Максимум	
Tr	527,0	79,2	471	583	ns
Tr-DTPA 1:50	473,0	67,9	425	521	Tr-DTPA-Y 1:50; Tr-DTPA-Lu 1:50
Tr-DOTA 1:20	471,5	70,0	422	521	Tr-1B4M-DTPA 1:20; Tr-DTPA-Lu 1:20
Tr-1B4M-DTPA 1:10	503,0	33,9	479	527	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	476,5	68,6	428	525	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	521,5	51,6	485	558	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	603,5	112,4	524	683	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	480,0	69,3	431	529	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	525,0	59,4	483	567	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	518,0	60,8	475	561	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	489,5	34,6	465	514	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике);

vs – versus.

Разлике у апсорпционим пиковима за S-S групе (на граници статистичке значајности) добијене су између Tr-DTPA (1:50) и следећих једињења: Tr-DTPA-Y (1:50) и Tr-DTPA-Lu (1:50).





Слика 34. Апсорпциони пикови S-S група добијени Рамановом спектроскопијом

#–гранична статистички значајна разлика vs. Tr-DOTA 1:20; \* vs. Tr-DTPA 1:50

У табели 14 и на слици 35 су приказани апсорпциони пикови за тирозинске бочне ланце у структурама испитиваних једињења и резултати поређења вредности ових пикова између испитиваних једињења.

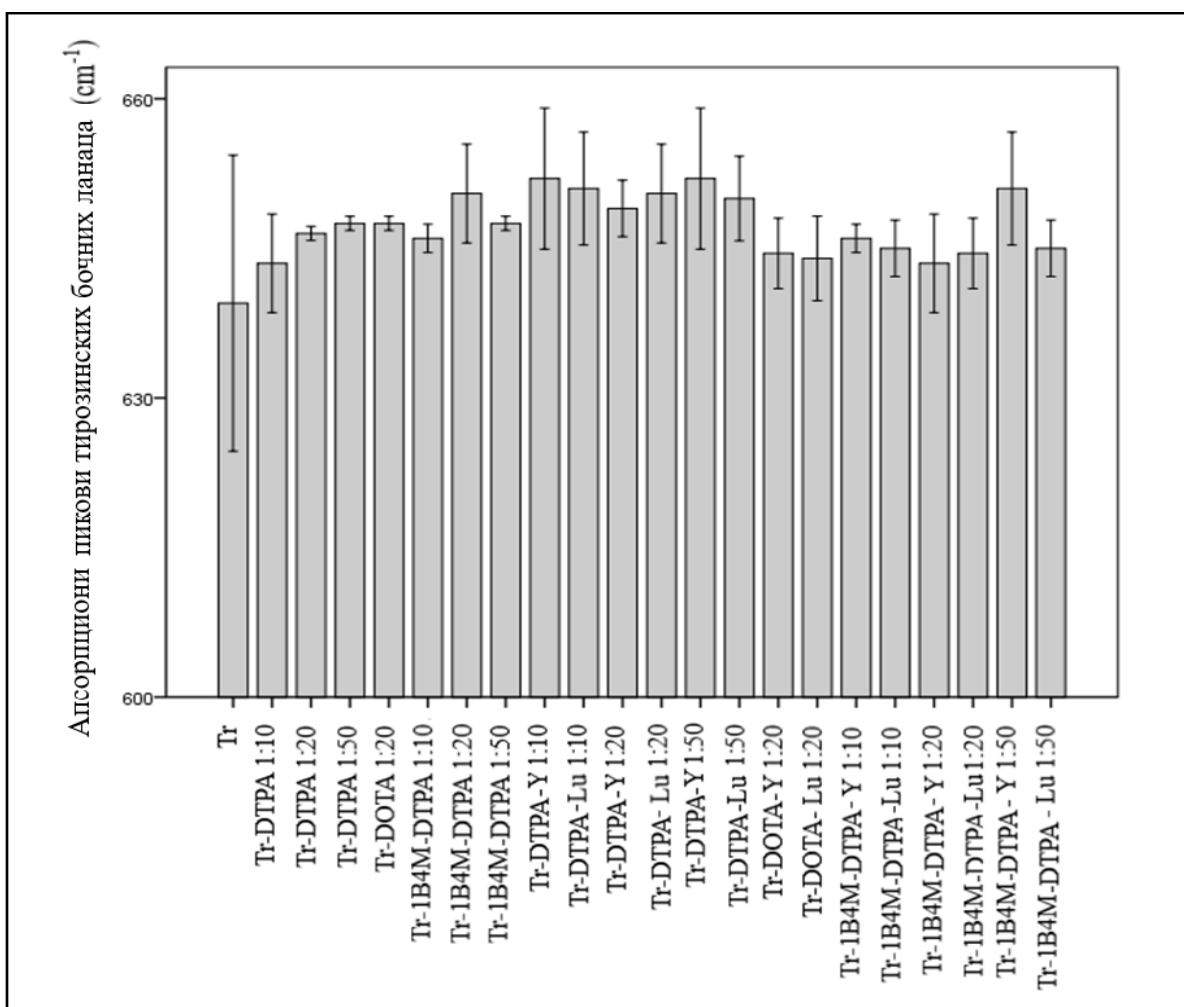
**Табела 14.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за тирозинске бочне ланце у испитиваним једињењима

Једињење	Вредности апсорпционих пикова за Tyr (cm <sup>-1</sup> )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	X <sub>sr</sub>	SD	Минимум	Максимум	
Tr	639,5	14,8	629	650	ns
Tr-DTPA 1:50	647,5	0,7	647	648	ns
Tr-DOTA 1:20	647,5	0,7	647	648	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:10	646,0	1,4	645	647	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	650,5	4,9	647	654	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	651,0	5,7	647	655	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	650,5	4,9	647	654	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	652,0	7,1	647	657	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	650,0	4,2	647	653	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	646,0	1,4	645	647	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	651,0	5,7	647	655	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике);

vs – versus.

Није било статистички значајне разлике у апсорпционим пиковима за тирозинске бочне ланце у испитиваним једињењима (табела 14).



Слика 35. Апсорпциони пикови тирозинских бочних ланаца добијени Рамановом спектроскопијом

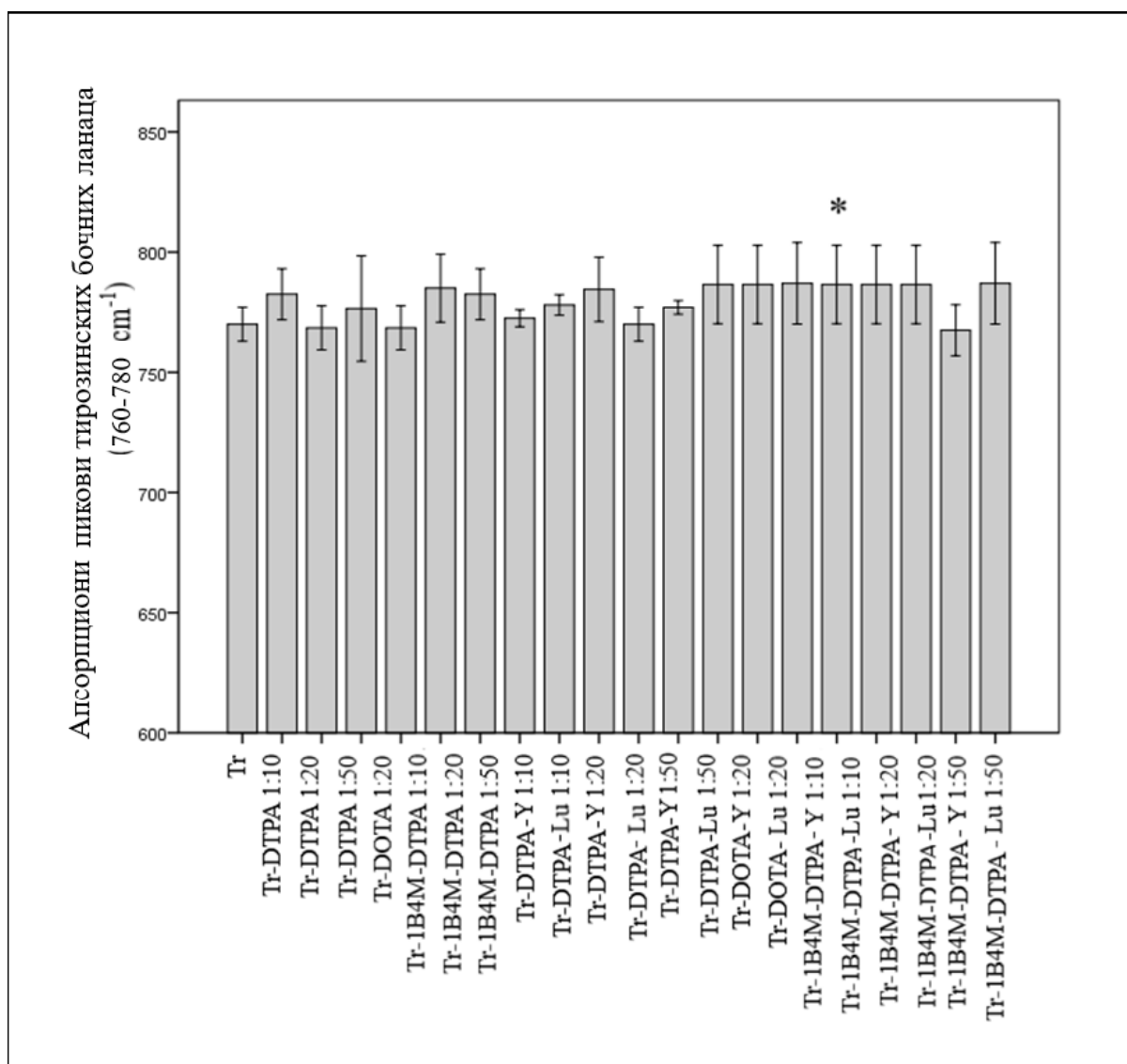
У табели 15 и на слици 36 су приказани апсорпциони пикови тирозинских бочних ланаца у области ( $760\text{--}780\text{ cm}^{-1}$ ) и поређење добијених максимума између испитиваних једињења.

**Табела 15.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за тирозинске бочне ланце ( $760\text{--}780\text{ cm}^{-1}$ ) у испитиваним једињењима

Једињење	Вредности апсорпционих пикова за Тур ( $760\text{--}780\text{ cm}^{-1}$ )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	Xsr	SD	Минимум	Максимум	
Tr	770,0	7,1	765	775	Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10
Tr-DTPA 1:50	768,5	9,2	762	775	ns
Tr-DOTA 1:20	776,5	21,9	761	792	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:10	768,5	9,2	762	775	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	785,0	14,1	775	795	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	778,0	4,2	775	781	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	784,5	13,4	775	794	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	770,0	7,1	765	775	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	777,0	2,8	775	779	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	787,0	17,0	775	799	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	767,5	10,6	760	775	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns - “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике); vs - versus.

Једино је основна структура трастузумаба показала гранично значајну разлику у поређењу са једињењем Tr-1B4M-DTPA-Y (1:10) за апсорпционе пикове тирозинских бочних ланаца ( $760\text{--}780\text{ cm}^{-1}$ ).



Слика 36. Апсорпциони пикови тирозинских бочних ланаца (760–780 cm<sup>-1</sup>)

добјени Рамановом спектроскопијом

\* – гранична статистички значајна разлика vs. Tr.

У табели 16 и на слици 37 су приказани апсорпциони пикови триптофанског бочног ланца у области (875–900  $\text{cm}^{-1}$ ) и поређење добијених максимума између испитиваних једињења.

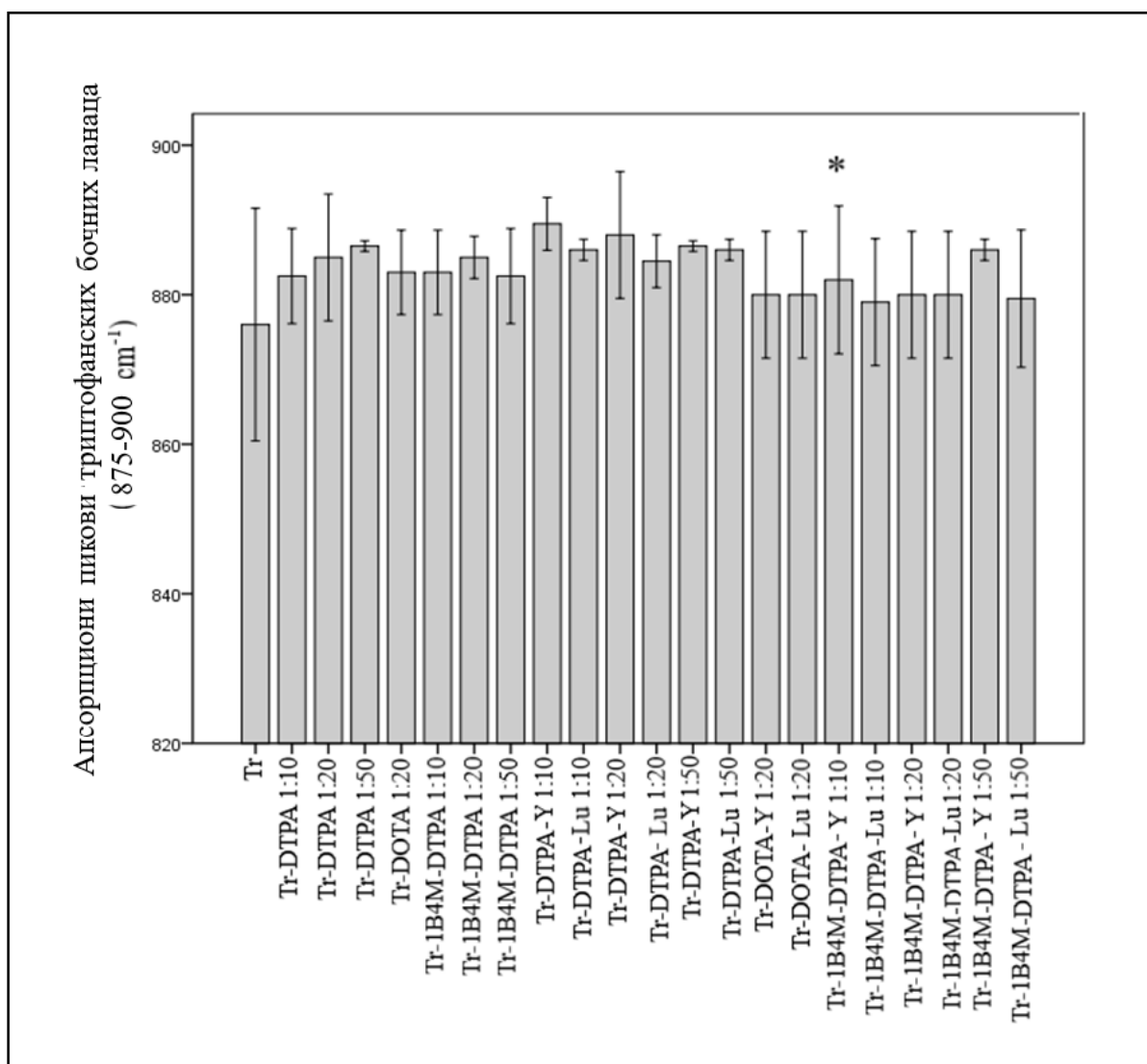
**Табела 16.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за триптофански бочни ланац (875–900  $\text{cm}^{-1}$ ) у испитиваним једињењима

Једињење	Вредности апсорпционих пикова за Trp (875-900 $\text{cm}^{-1}$ )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	Xsr	SD	Минимум	Максимум	
Tr	876,0	15,6	865	887	Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10
Tr-DTPA 1:50	886,5	0,7	886	887	ns
Tr-DOTA 1:20	883,0	5,7	879	887	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:10	883,0	5,7	879	887	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	885,0	2,8	883	887	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	886,0	1,4	885	887	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	884,5	3,5	882	887	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	886,5	0,7	886	887	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	886,0	1,4	885	887	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	882,0	9,9	875	889	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	886,0	1,4	885	887	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике);

vs – versus.

Једино је основна структура трастузумаба показала гранично значајну разлику у поређењу са једињењем Tr-1B4M-DTPA-Y (1:10) за апсорпционе пикове триптофанских бочних ланаца (875–900  $\text{cm}^{-1}$ ).



Слика 37. Апсорпциони пикови триптофанских бочних ланаца (875–900 cm<sup>-1</sup>)

добијени Рамановом спектроскопијом

\* – гранична статистички значајна разлика vs. Tr.

У табели 17 и на слици 38 су приказани апсорпциони пикови  $\text{CH}_3$  деформационе вибрације (def) и поређење добијених максимума између испитиваних једињења.

**Табела 17.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за  $\text{CH}_3$  (def) групе у испитиваним једињењима

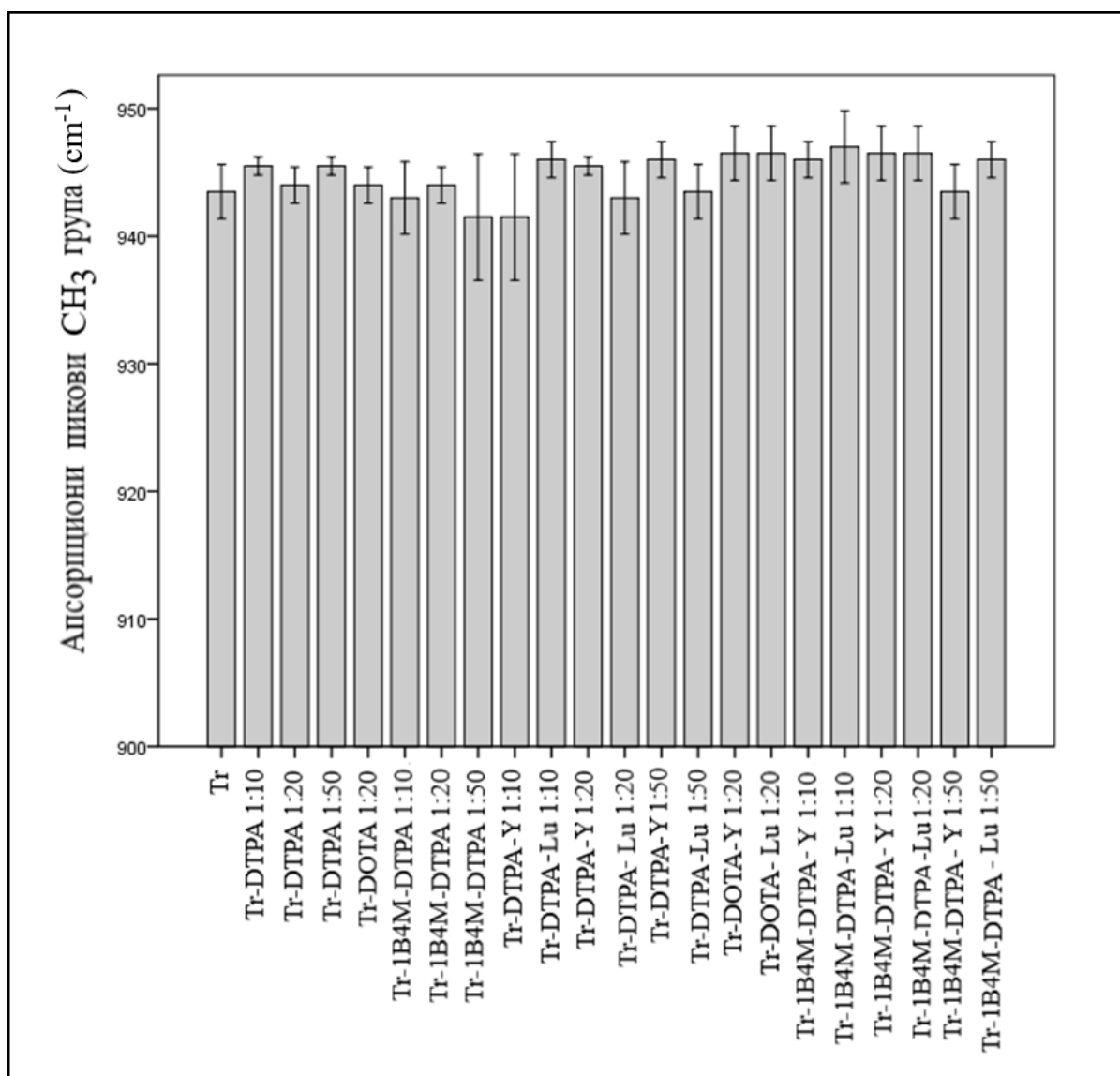
Једињење	Вредности апсорпционих пикова за $\text{CH}_3$ (def) групу ( $\text{cm}^{-1}$ )				$p < 0,100$ (гранична статистичка значајност) vs.
	Xsr	SD	Минимум	Максимум	
Tr	943,5	2,1	942	945	ns
Tr-DTPA 1:50	945,5	0,7	945	946	ns
Tr-DOTA 1:20	944,0	1,4	943	945	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:10	943,0	2,8	941	945	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	944,0	1,4	943	945	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	946,0	1,4	945	947	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	943,0	2,8	941	945	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	946,0	1,4	945	947	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	943,5	2,1	942	945	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	946,0	1,4	945	947	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	943,5	2,1	942	945	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике);

vs – versus.

Није било статистички значајне разлике у апсорпционим пиковима за  $\text{CH}_3$  (def) групе поређењем испитиваних једињења.





Слика 38. Апсорпциони пикови СН<sub>3</sub> (def) групу добијени Рамановом спектроскопијом

У табели 18 и на слици 39 су приказани апсорпциони пикови за фенилаланинске бочне остатке у структурама испитиваних једињења и резултати поређења вредности ових пикова између испитиваних једињења.

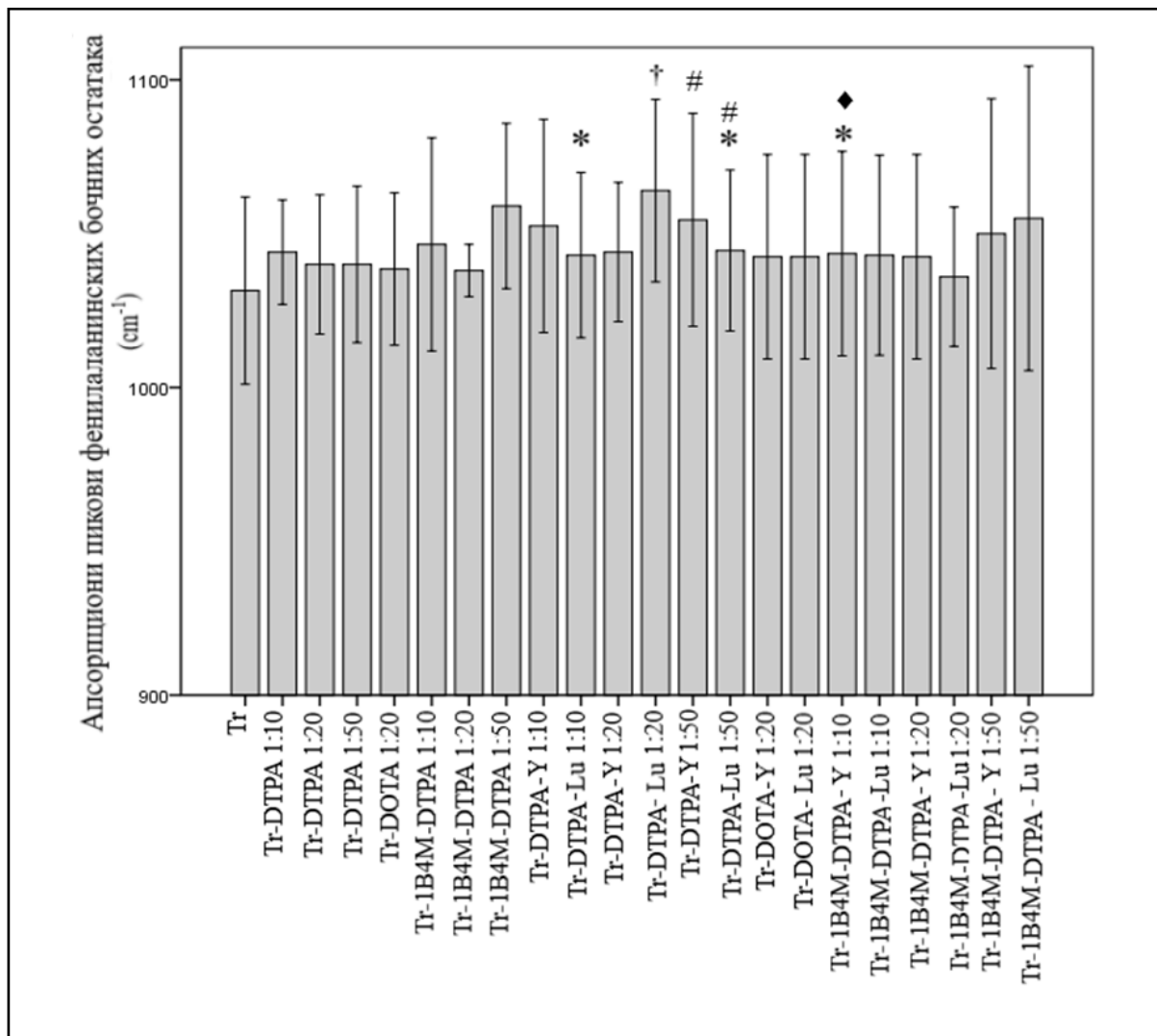
**Табела 18.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за фенилаланинске бочне остатке у испитиваним једињењима

Једињење	Вредности апсорпционих пикова за Phe (cm <sup>-1</sup> )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	Xsr	SD	Минимум	Максимум	
Tr	1031,5	30,4	1010	1053	Tr-DTPA-Lu 1:10; Tr-DTPA-Lu 1:50; Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10
Tr-DTPA 1:50	1040,0	25,5	1022	1058	Tr-DTPA-Y 1:50; Tr-DTPA-Lu 1:50
Tr-DOTA 1:20	1038,5	24,7	1021	1056	Tr-DTPA-Lu 1:20
Tr-1B4M-DTPA 1:10	1046,5	34,6	1022	1071	Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10
Tr-1B4M-DTPA 1:20	1038,0	8,5	1032	1044	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	1043,0	26,9	1024	1062	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	1064,0	29,7	1043	1085	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	1054,5	34,6	1030	1079	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	1044,5	26,2	1026	1063	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	1043,5	33,2	1020	1067	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	1050,0	43,8	1019	1081	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике);

vs – versus.

Основна структура трастузумаба је показала гранично значајну разлику у поређењу са једињењима Tr-DTPA-Lu (1:10), Tr-DTPA-Lu (1:50) и Tr-1B4M-DTPA-Y (1:10) за апсорпционе пикове фенилаланинских бочних остатака. Утврђено је постојање разлике између једињења Tr-DTPA (1:50) и једињења Tr-DTPA-Y (1:50) и Tr-DTPA-Lu (1:50). Гранично значајна разлика је постојала и између једињења Tr-DOTA (1:20) и Tr-DTPA-Lu (1:20), као и између једињења Tr-1B4M-DTPA (1:10) и Tr-1B4M-DTPA-Y (1:10).



Слика 39. Апсорпциони пикови фенилаланинских бочних остатака добијени Рамановом спектроскопијом

\* гранична статистички значајна разлика vs. Tr; # vs. Tr-DTPA 1:50; † vs. Tr-DOTA 1:20;

♦ vs. Tr-1B4M-DTPA 1:10.

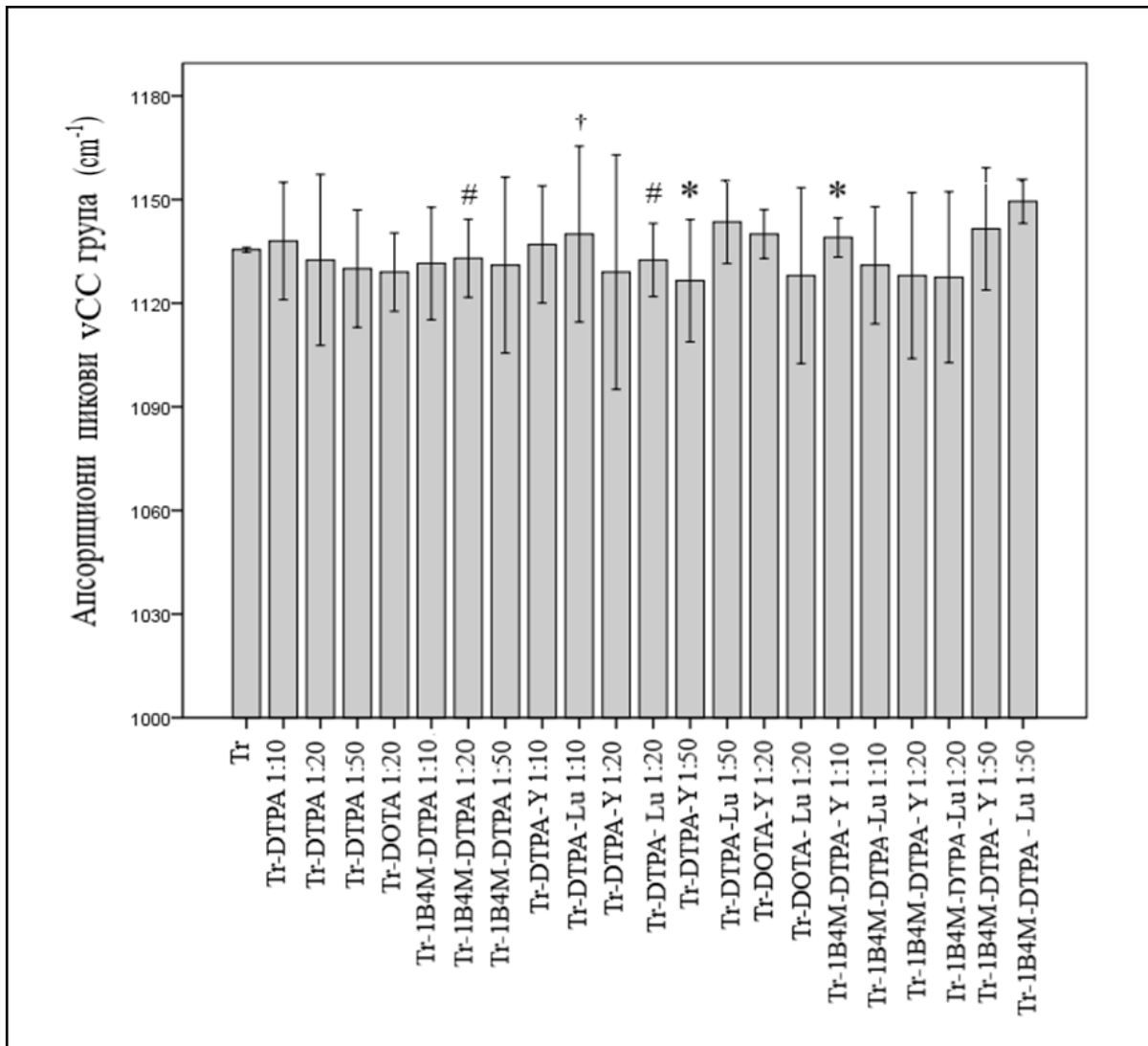
У табели 19 и на слици 40 су приказани апсорпциони пикови за валенциону вибрацију  $\nu$ C-C групе у структурама испитиваних једињења и резултати поређења вредности ових пикова између испитиваних једињења.

**Табела 19.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за  $\nu$ C-C групе у испитиваним једињењима

Једињење	Вредности апсорпционих пикова за $\nu$ C-C групу ( $\text{cm}^{-1}$ )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	Xsr	SD	Минимум	Максимум	
Tr	1135,5	0,7	1135	1136	ns
Tr-DTPA 1:50	1130,0	17,0	1118	1142	Tr-DTPA-Y 1:50; Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50
Tr-DOTA 1:20	1129,0	11,3	1121	1137	Tr-1B4M-DTPA 1:20; Tr-DTPA-Lu 1:20
Tr-1B4M-DTPA 1:10	1131,5	16,3	1120	1143	Tr-DTPA-Lu 1:10
Tr-1B4M-DTPA 1:20	1133,0	11,3	1125	1141	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	1140,0	25,5	1122	1158	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	1132,5	10,6	1125	1140	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	1126,5	17,7	1114	1139	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	1143,5	12,0	1135	1152	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	1139,0	5,7	1135	1143	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	1141,5	17,7	1129	1154	ns

\*У колони р приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике); vs – versus.

Једињење Tr-DTPA (1:50) је показало гранично значајну разлику у поређењу са једињењима Tr-DTPA-Y (1:50) и Tr-1B4M-DTPA-Y (1:50) за апсорпционе пикове  $\nu$ C-C група. Уочена је и разлика у апсорпционим пиковима  $\nu$ C-C група између Tr-DOTA (1:20) једињења и Tr-1B4M-DTPA (1:20) и Tr-DTPA-Lu (1:20), као и између Tr-1B4M-DTPA (1:10) и Tr-DTPA-Lu (1:10).



Слика 40. Апсорпциони пикови νC-C група добијени Рамановом спектроскопијом

\* гранична статистички значајна разлика vs. Tr-DTPA 1:50; # vs. Tr-DOTA 1:20; † vs. Tr-1B4M-DTPA 1:10

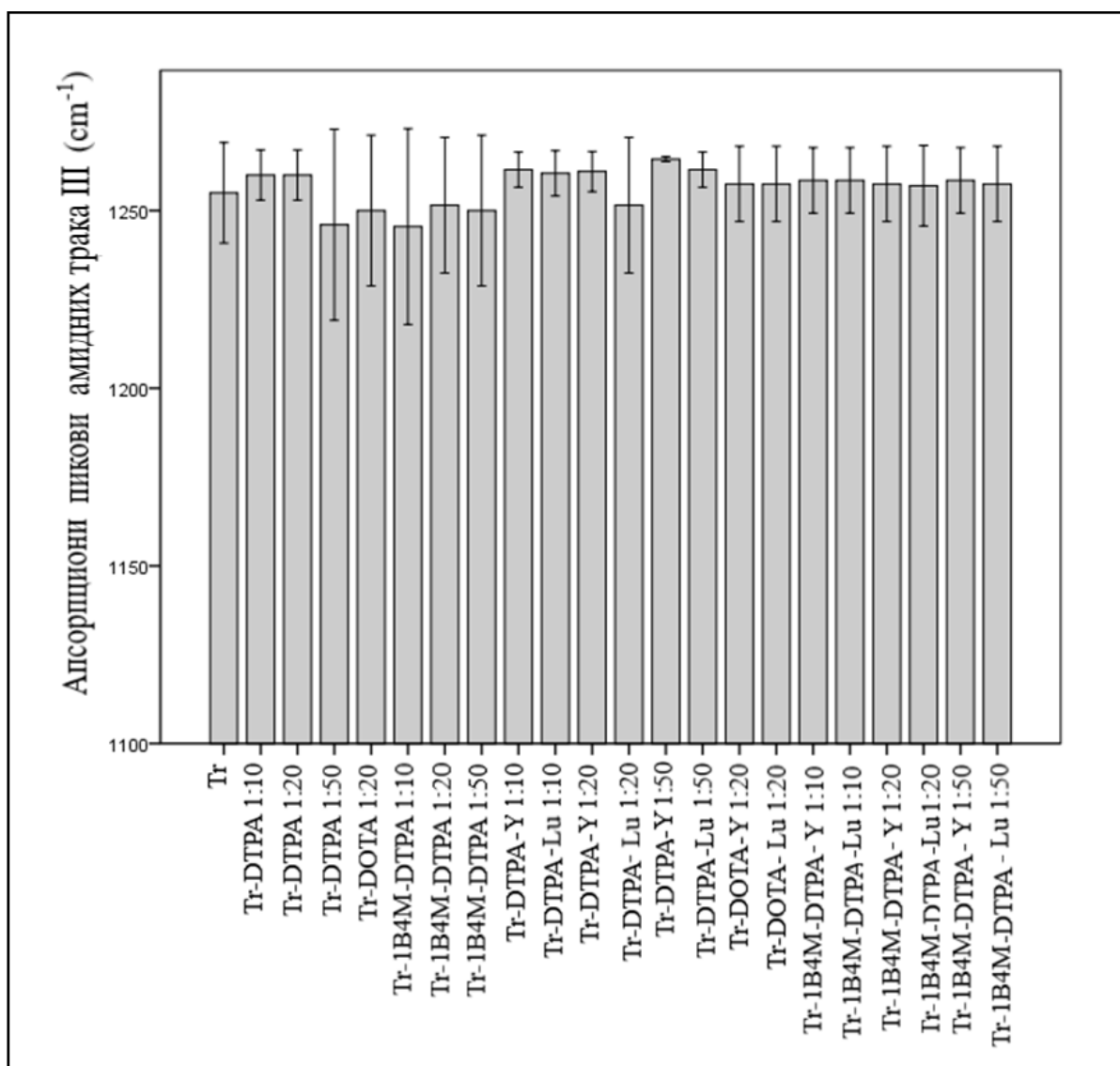
У табели 20 и на слици 41 су приказани апсорпциони пикови за амидне траке III у структурама испитиваних једињења и резултати поређења вредности ових пикова између испитиваних једињења.

**Табела 20.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за амидне траке III у испитиваним једињењима

Једињење	Вредности апсорпционих пикова за амидне траке III (cm <sup>-1</sup> )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	X <sub>sr</sub>	SD	Минимум	Максимум	
Tr	1255,0	14,1	1245	1265	ns
Tr-DTPA 1:50	1246,0	26,9	1227	1265	ns
Tr-DOTA 1:20	1250,0	21,2	1235	1265	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:10	1245,5	27,6	1226	1265	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	1251,5	19,1	1238	1265	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	1260,5	6,4	1256	1265	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	1251,5	19,1	1238	1265	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	1264,5	0,7	1264	1265	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	1261,5	4,9	1258	1265	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	1258,5	9,2	1252	1265	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	1258,5	9,2	1252	1265	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике); vs – versus.

Није било статистички значајне разлике у апсорпционим пиковима за амидне траке III у испитиваним једињењима.



Слика 41 Апсорпциони пикови амидних трака III добијени Рамановом спектроскопијом

У табели 21 и на слици 42 су приказани апсорпциони пикови деформационих вибрација за триптофанске бочне ланце (def) у структурама испитиваних једињења и резултати поређења вредности ових пикова између испитиваних једињења.

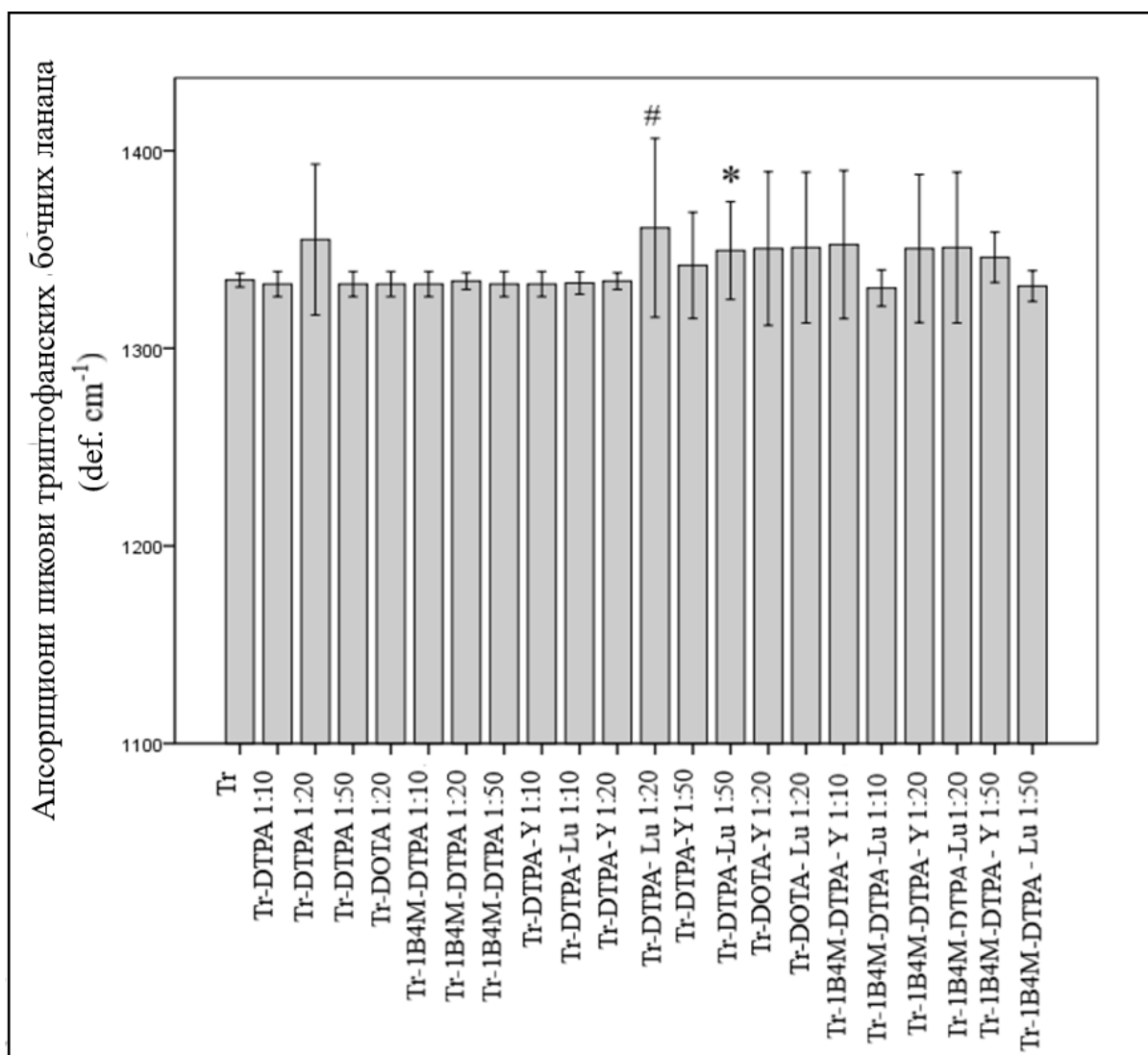
**Табела 21.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за триптофанске бочне ланце (def) у испитиваним једињењима

Једињење	Вредности апсорпционих пикова за Trp (def) (cm <sup>-1</sup> )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	Xsr	SD	Минимум	Максимум	
Tr	1334,5	3,5	1332	1337	ns
Tr-DTPA 1:50	1332,5	6,4	1328	1337	Tr-DTPA-Lu 1:50
Tr-DOTA 1:20	1332,5	6,4	1328	1337	Tr-DTPA-Lu 1:20
Tr-1B4M-DTPA 1:10	1332,5	6,4	1328	1337	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	1334,0	4,2	1331	1337	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	1333,0	5,7	1329	1337	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	1361,0	45,3	1329	1393	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	1342,0	26,9	1323	1361	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	1349,5	24,7	1332	1367	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	1352,5	37,5	1326	1379	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	1346,0	12,7	1337	1355	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике); vs – versus.

Једињење Tr-DTPA (1:50) је показало гранично значајну разлику у поређењу са једињењем Tr-DTPA-Lu (1:50), као и једињење Tr-DOTA (1:20) у поређењу са Tr-DTPA-Lu (1:20) за апсорпционе пикове триптофанских бочних ланаца (def).





Слика 42. Апсорпциони пикови триптофанских бочних ланаца (def)

добијени Рамановом спектроскопијом

\* гранична статистички значајна разлика vs. Tr-DTPA 1:50; # vs. Tr-DOТА 1:20.

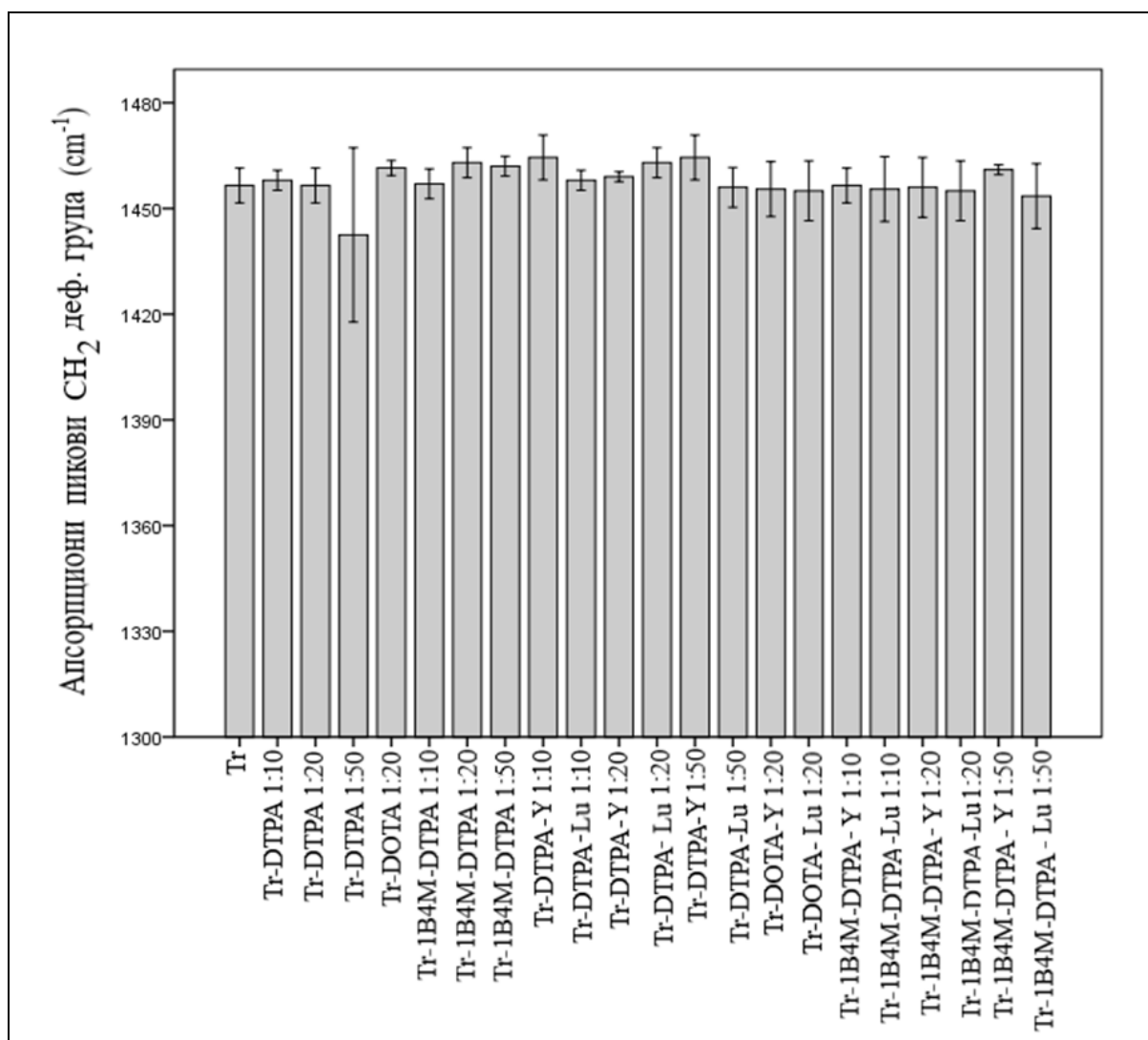
У табели 22 и на слици 43 су приказани апсорпциони пикови за  $\text{CH}_2$  (def) групе у структурама испитиваних једињења и резултати поређења вредности ових пикова између испитиваних једињења.

**Табела 22.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за  $\text{CH}_2$  (def) групе у испитиваним једињењима

Једињење	Вредности апсорпционих пикова за $\text{CH}_2$ (def) ( $\text{cm}^{-1}$ )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	Xsr	SD	Минимум	Максимум	
Tr	1456,5	4,9	1453	1460	ns
Tr-DTPA 1:50	1442,5	24,7	1425	1460	ns
Tr-DOTA 1:20	1461,5	2,1	1460	1463	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:10	1457,0	4,2	1454	1460	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	1463,0	4,2	1460	1466	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	1458,0	2,8	1456	1460	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	1463,0	4,2	1460	1466	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	1464,5	6,4	1460	1469	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	1456,0	5,7	1452	1460	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	1456,5	4,9	1453	1460	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	1461,0	1,4	1460	1462	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике); vs – versus.

Није било статистички значајне разлике у апсорпционим пиковима за  $\text{CH}_2$  (def) групе у испитиваним једињењима.



Слика 43. Апсорпциони пикови CH<sub>2</sub> (def) група добијени Рамановом спектроскопијом

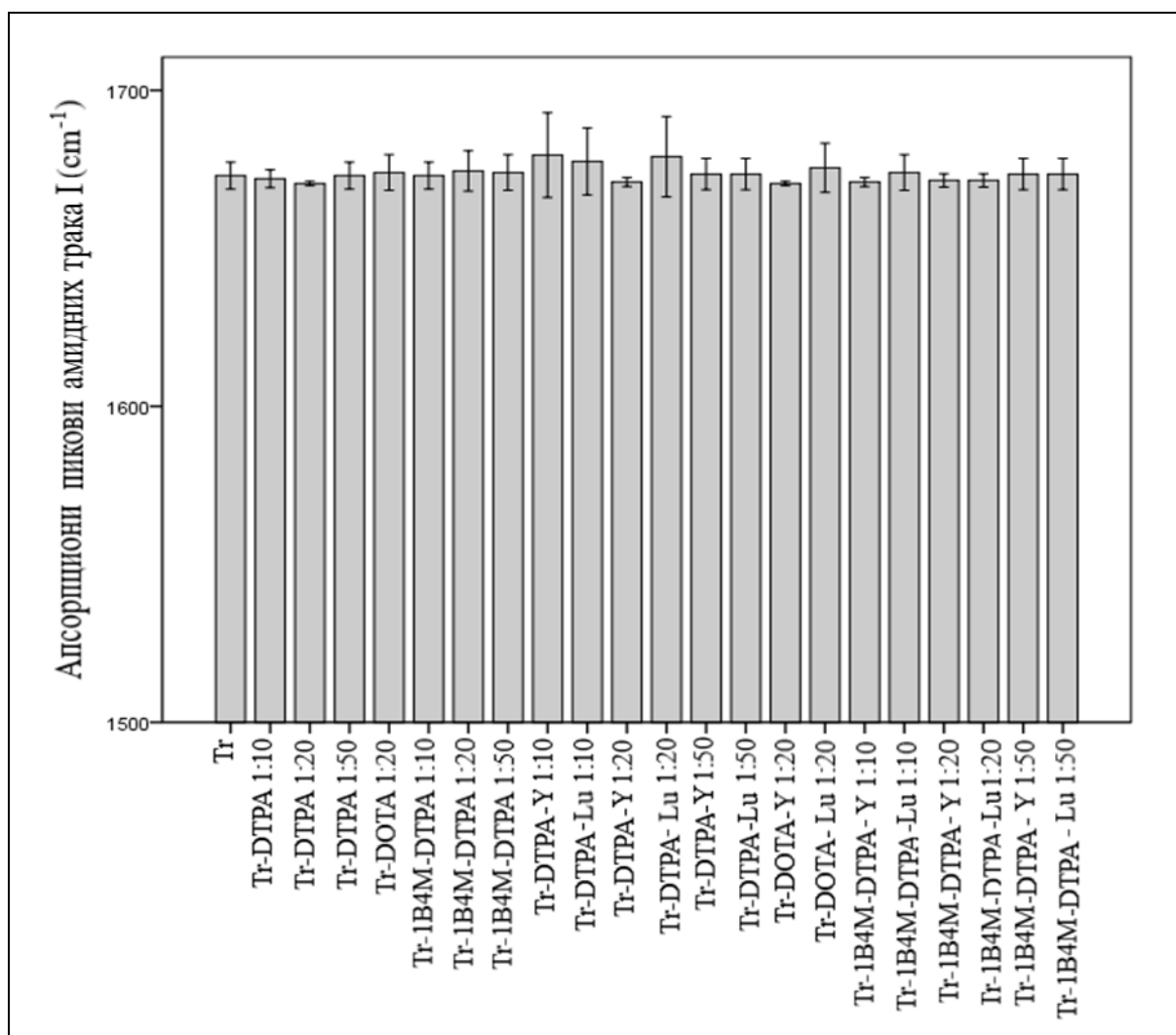
У табели 23 и на слици 44 су приказани апсорпциони пикови за амидне траке I у структурама испитиваних једињења и резултати поређења вредности ових пикова између испитиваних једињења.

**Табела 23.** Апсорпциони пикови добијени Рамановом спектроскопијом за амидне траке I у испитиваним једињењима

Једињење	Вредности апсорпционих пикова за амидне траке I ( $\text{cm}^{-1}$ )				p<0,100 (гранична статистичка значајност) vs.
	Xsr	SD	Минимум	Максимум	
Tr	1673,0	4,2	1670	1676	ns
Tr-DTPA 1:50	1673,0	4,2	1670	1676	ns
Tr-DOTA 1:20	1674,0	5,7	1670	1678	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:10	1673,0	4,2	1670	1676	ns
Tr-1B4M-DTPA 1:20	1674,5	6,4	1670	1679	ns
Tr-DTPA-Lu 1:10	1677,5	10,6	1670	1685	ns
Tr-DTPA-Lu 1:20	1679,0	12,7	1670	1688	ns
Tr-DTPA-Y 1:50	1673,5	4,9	1670	1677	ns
Tr-DTPA-Lu 1:50	1673,5	4,9	1670	1677	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:10	1671,0	1,4	1670	1672	ns
Tr-1B4M-DTPA-Y 1:50	1673,5	4,9	1670	1677	ns

\*У колони p приказане су гранично значајне разлике у вредностима измерених апсорпционих пикова између наведених једињења; ns – “енгл. *non significant*”, несигнификатно (без значајне разлике); vs – versus.

Није било статистички значајне разлике у апсорпционим пиковима за амидне траке I у испитиваним једињењима.



Слика 44. Апсорпциони пикови амидних трака I добијени Рамановом спектроскопијом

#### 4.6. Одређивање просечног броја ВФСА везаног за један молекул трастузумаба применом методе MALDI-TOF MS

Одређивање просечног броја ВФСА везаних за молекуле антитела важан је корак за утврђивање довољног броја молекула хелатора везаних за антитело – трастузумаб, у циљу обезбеђивања стабилног везивања са радиоактивним изотопима са добрим приносом (164). За ову карактеризацију коришћена је MALDI-TOF MS. Ова јонизациона техника је погодна за испитивање једињења са великом молекулском масом, као што су пептиди, протеини и угљени хидрати (165).

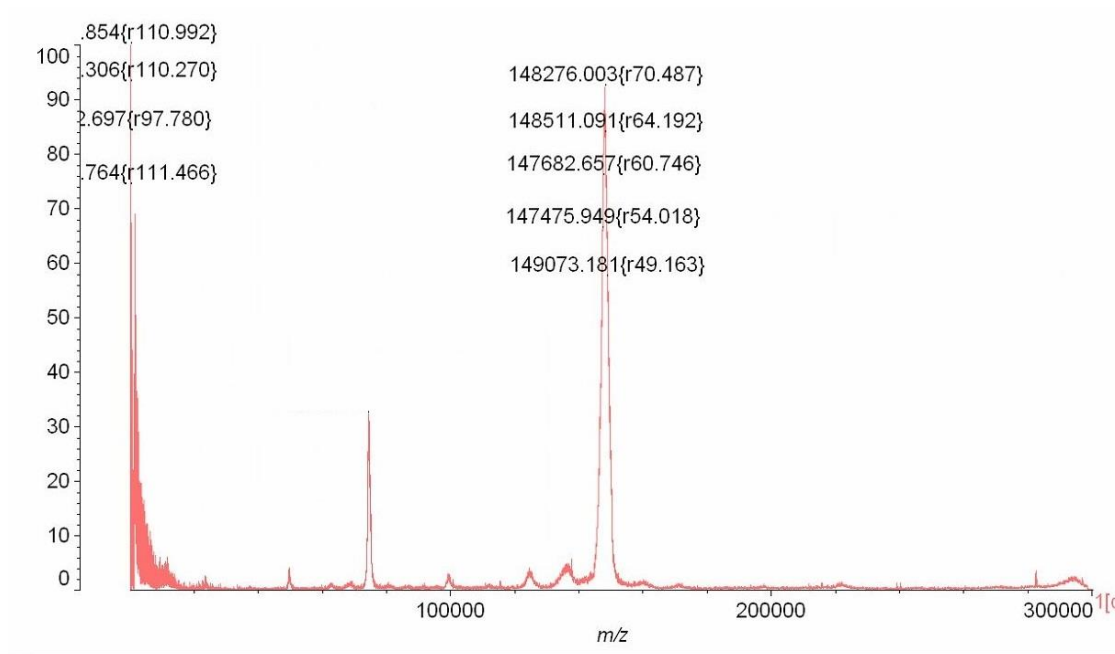
Овом методом испитано је седам припремљених имунокоњугата, са хелаторима: [*p*-SCN-Bn-DTPA (MW = 540,54 g/mol) (1:10, 1:20, 1:50)]; [*p*-SCN-Bn-DOTA (MW = 551,61 g/mol) (1:20)] и [*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA (MW = 555,58 g/mol) (1:10, 1:20, 1:50)].

Моларна маса имунокоњугата одређена MS-ом упоређена је са моларном масом чистог трастузумаба (MW = 145531,5 Da). Разлика у маси имунокоњугата и антитела и моларне масе хелатора омогућила је тачно одређивање броја хелатора везаних по једном молекулу антитела (166). Израчунавање просечног броја хелатора приказано је у табели 24. Коњугована маса представља експериментално одређену масу.

**Табела 24.** Просечан број хелатора везаних за трастузумаб

Узорци	Н+ коњугована маса	Разлика масе Н+ (коњугована-теоријска)	MW хелатора	Број хелатора
1 Теоријска Mw Тростузумаба	145531,50 Da			
2 Tr-DTPA 1:10	148276,00 Da	2744,5	540,54 g/mol	5
3 Tr-DTPA 1:20	148159,63 Da	2628,13	540,54 g/mol	4,8
4 Tr-DTPA 1:50	148417,33 Da	2885,83	540,54 g/mol	5,3
5 Tr-DOTA 1:20	148259,54 Da	2728,04	551,61 g/mol	4,9
6 Tr-1B4M-DTPA 1:10	148076,39 Da	2544,89	555,58 g/mol	4,5
7 Tr-1B4M-DTPA 1:20	147912,37 Da	2380,87	555,58 g/mol	4,3
8 Tr-1B4M-DTPA 1:50	148495,49 Da	2963,99	555,58 g/mol	5,3

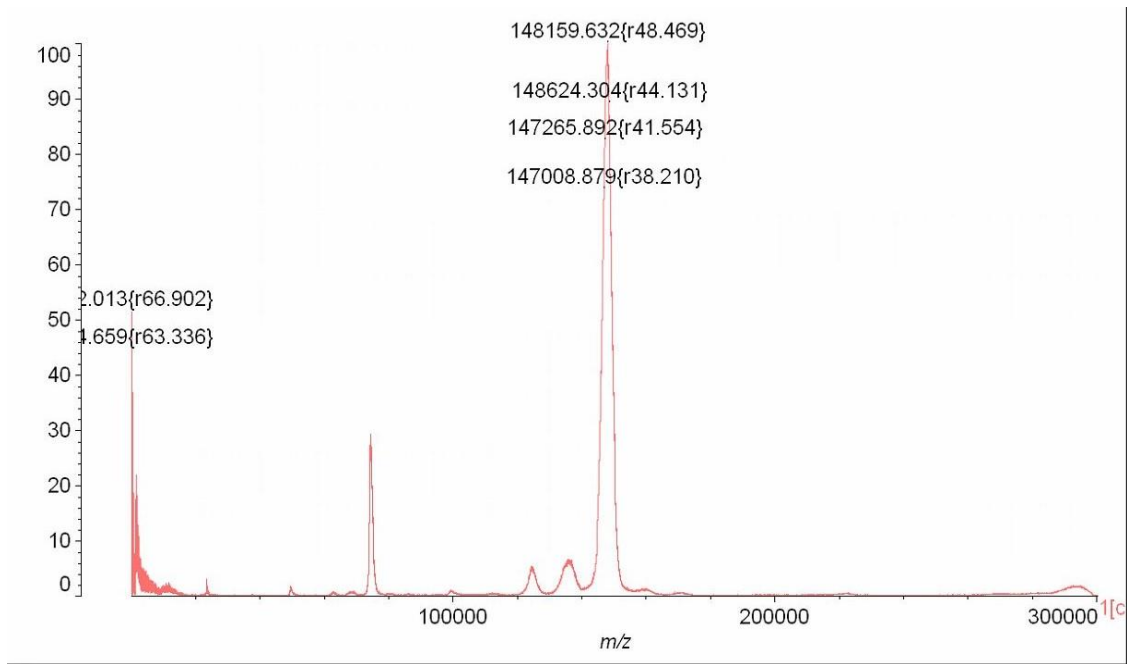
Спектар имунокоњугата Tr-DTPA (1:10) показао је присуство пика MW 148276,00 Da (слика 45) и у поређењу са MW чистог антитела (145531,50 Da), израчунато је да се просечно 5 молекула BFCA везује по једном молекулу трастузумаба. У спектрима нису примећени додатни пикови који би наговестили структурне промене молекула.



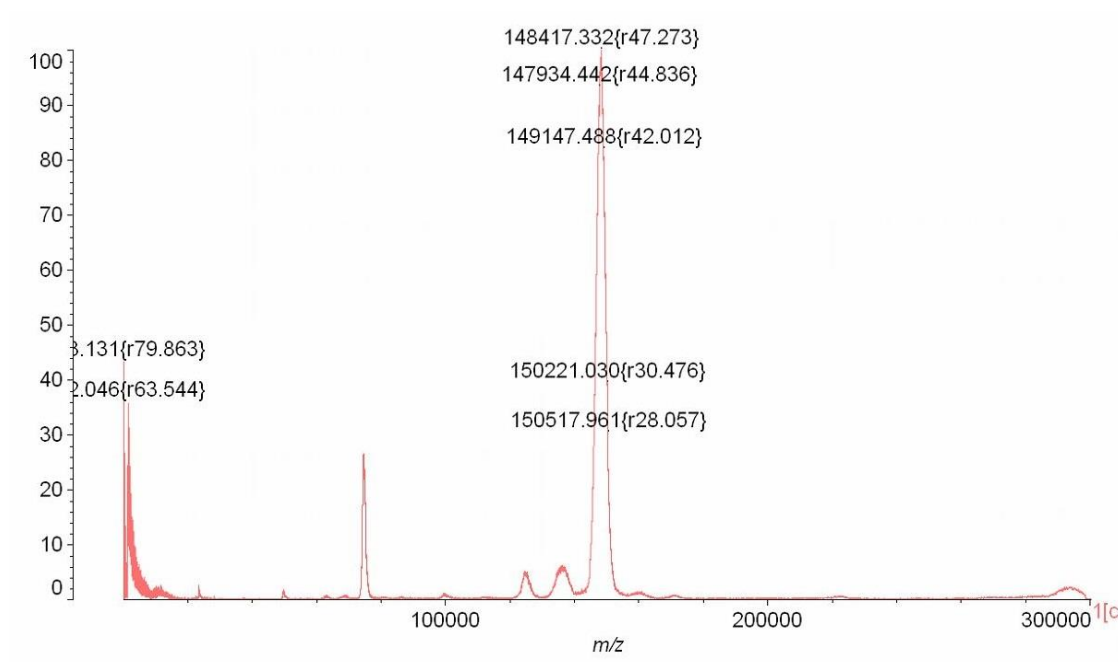
Слика 45. MALDI-TOF MS спектар Tr-DTPA (1:10)

Спектар имунокоњугата Tr-DTPA (1:20) показао је присуство пика MW 148159,63 Da (слика 46) и у поређењу са MW чистог антитела (145531,50 Da), израчунато је да се просечно 4,8 молекула BFCA везује по једном молекулу трастузумаба. У спектрима нису примећени додатни пикови који би наговестили структурне промене молекула.

Спектар имунокоњугата Tr-DTPA (1:50) показао је присуство пика MW 148417,33 Da (слика 47) и у поређењу са MW чистог антитела (145531,50 Da), израчунато је да се просечно 5,3 молекула BFCA везује по једном молекулу трастузумаба. У спектрима нису примећени додатни пикови који би наговестили структурне промене молекула.



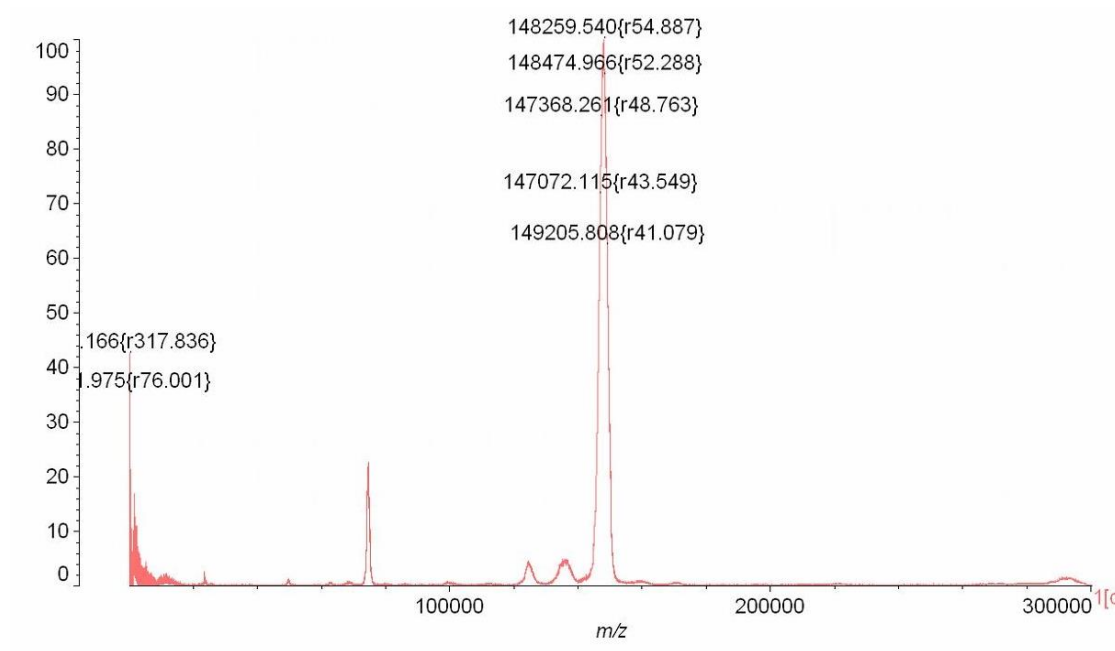
Слика 46. MALDI-TOF MS спектар Tr-DTPA (1:20)



Слика 47. MALDI-TOF MS спектар Tr-DTPA (1:50)

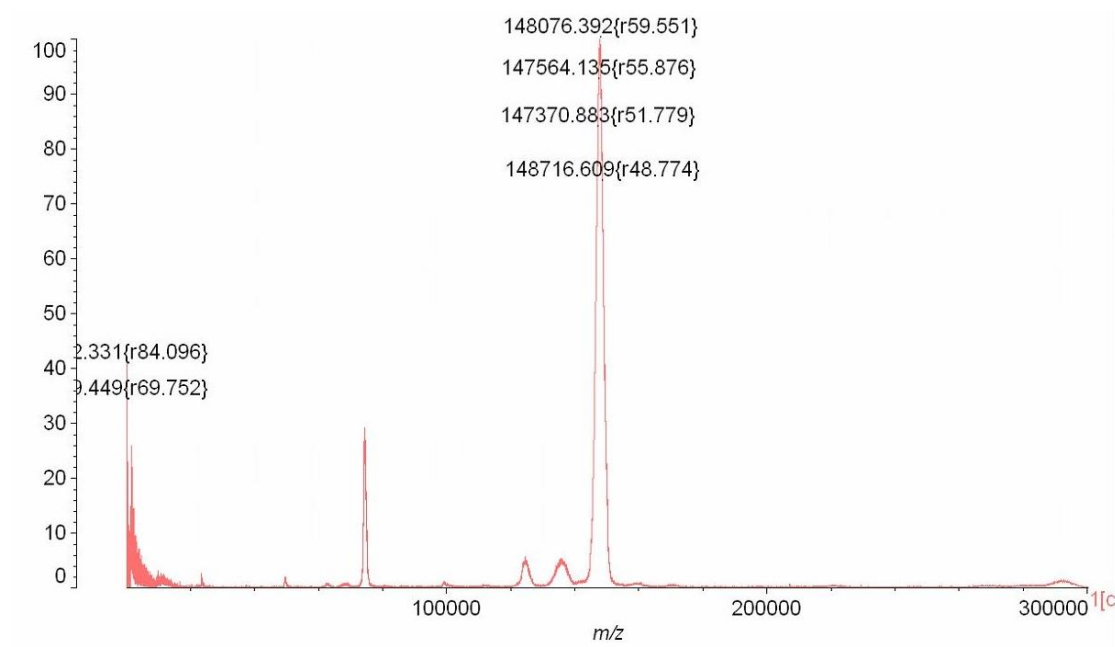
Спектар имунокоњугата Tr-DOTA (1:20) показао је присуство пика MW 148259,54 Da (слика 48) и у поређењу са MW чистог антитела (145531,50 Da), израчунато је да се просечно 4,9 молекула BFCA везује по једном молекулу трастузумаба. У спектрима нису примећени додатни пикови који би наговестили структурне промене молекула.





Слика 48. MALDI-TOF MS спектар Tr-DOTA (1:20)

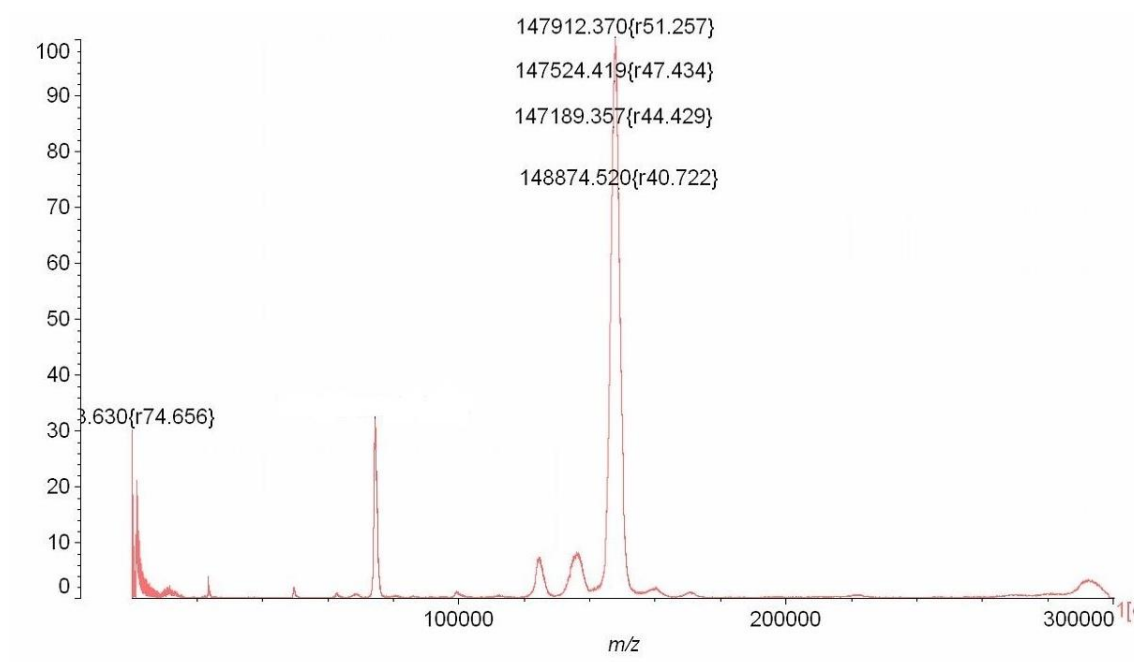
Спектар имунокоњугата Tr-1B4M-DTPA (1:10) показао је присуство пика MW 148076,39 Da (слика 49) и у поређењу са MW чистог антитела (145531,50 Da), израчунато је да се просечно 4,5 молекула BFCA везује по једном молекулу трастузумаба. У спектрима нису примећени додатни пикови који би наговестили структурне промене молекула.



Слика 49. MALDI-TOF MS спектар Tr-1B4M-DTPA (1:10)

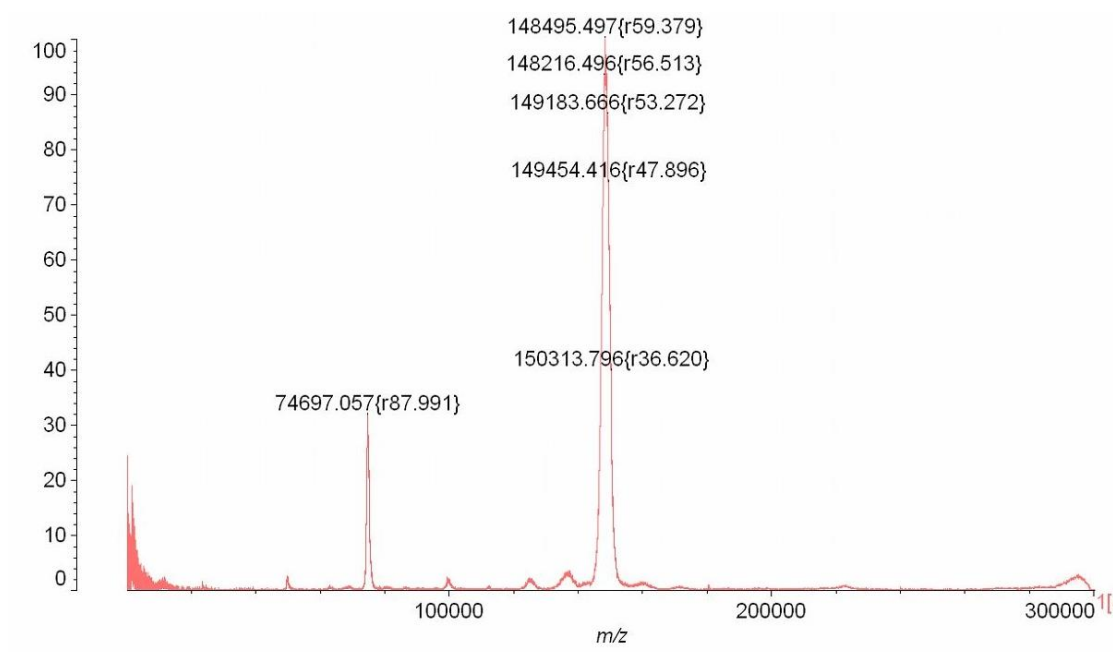
Спектар имунокоњугата Tr-1B4M-DTPA (1:20) показао је присуство пика MW 147912,37 Da (слика 50) и у поређењу са MW чистог антитела (145531,50 Da), израчунато

је да се просечно 4,3 молекула ВФСА везује по једном молекулу трастузумаба. У спектрима нису примећени додатни пикови који би наговестили структурне промене молекула.



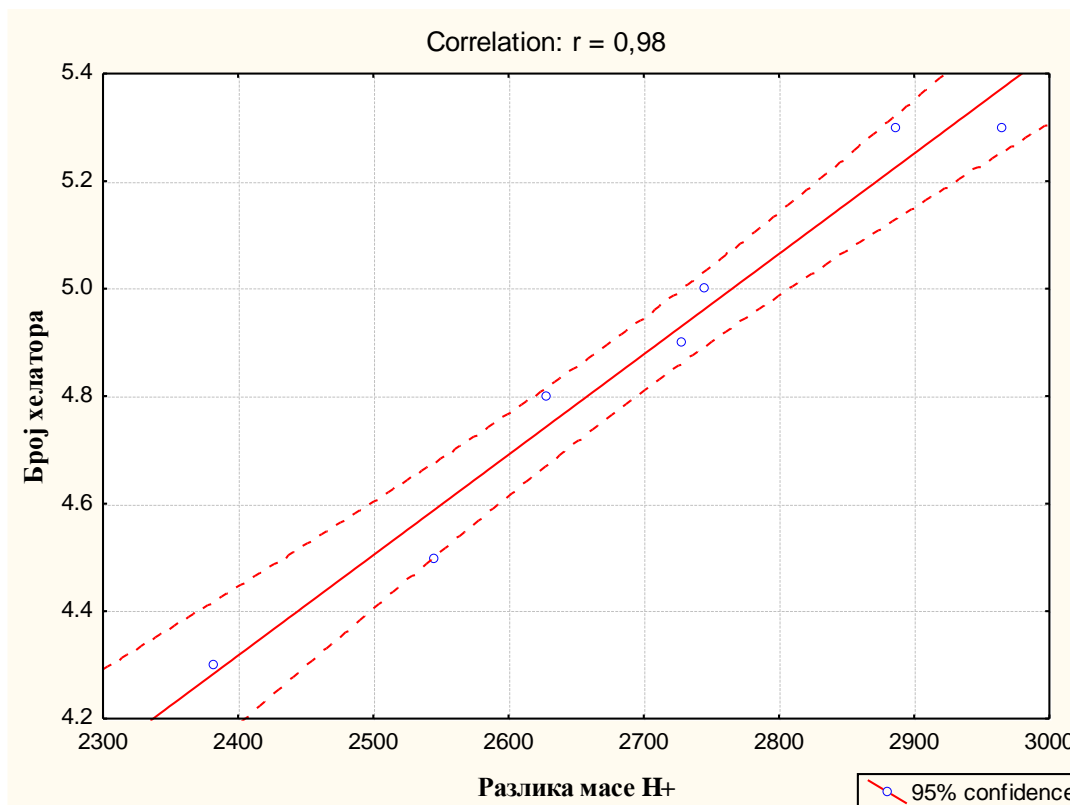
Слика 50. MALDI-TOF MS спектар Tr-1B4M-DTPA (1:20)

Спектар имунокоњугата Tr-1B4M-DTPA (1:50) показао је присуство пика MW 148495,49 Da (слика 51) и у поређењу са MW чистог антитела (145531,50 Da), израчунато је да се просечно 4,3 молекула ВФСА везује по једном молекулу трастузумаба. У спектрима нису примећени додатни пикови који би наговестили структурне промене молекула.



Слика 51. MALDI-TOF MS спектар Tr-1B4M-DTPA (1:50)

Вредности из добијених спектра после статистичке анализе показале су да постоји врло јака позитивна корелација између броја хелатора и разлике у маси Н+ (коњугована – теоријска) ( $r = 0,98$ ), што је приказано на слици 52.



Слика 52. Графикон корелације између броја хелатора и разлике у маси

#### 4.7. Одређивање интегритета имунокоњугата коришћењем HPLC-UV

За испитивање стабилности лиофилизованог имунокоњугата Tr-1B4M-DTPA у коме је однос антитело-хелатор (1:20) коришћена је HPLC-UV техника. На сликама 53–55 приказани су HPLC-UV хроматограми комерцијално набављеног антитела, пре-чишћеног антитела, и извршено је њихово поређење са хроматограмом Tr-1B4M-DTPA (1:20).

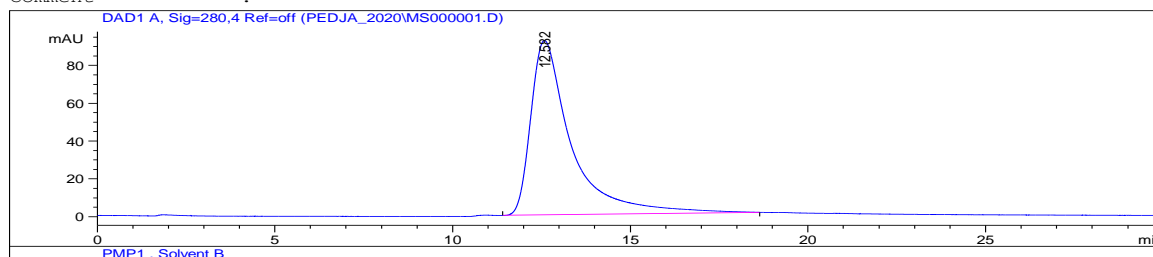
Data File C:\CHEM32\1\DATA\PEDJA\_2020\MS000001.D  
 Sample Name: pTrastuzumab

```

=====
Acq. Operator   : KRISTINA
Acq. Instrument : Instrument 1                Location : Vial 1
Injection Date  : 2/18/2020 12:58:08 PM
                                           Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\KONJUGATI.M
Last changed    : 2/18/2020 12:57:45 PM by KRISTINA
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\KONJUGATI.M
Last changed    : 2/18/2020 1:29:06 PM by KRISTINA
                  (modified after loading)
=====
    
```

```

=====
Column Description : TSK G2000SW
Product#           : 993967-902          Batch# :
Serial#            :
Diameter           : 7.5 mm              Length : 600.0 mm
Particle size      : 5.0 µm              Void volume : 60.0 %
Maximum Pressure   : 400 bar              Maximum pH : 9
Maximum Temperature: 60 °C
Comment            :
=====
    
```



Слика 53. HPLC-UV хроматограм комерцијално набављеног антитела Tr

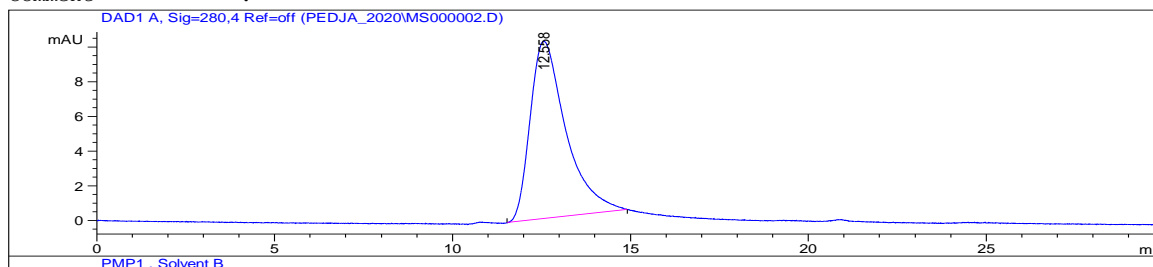
Data File C:\CHEM32\1\DATA\PEDJA\_2020\MS000002.D  
 Sample Name: Trastuzumab

```

=====
Acq. Operator   : KRISTINA
Acq. Instrument : Instrument 1                Location : Vial 1
Injection Date  : 2/18/2020 1:30:10 PM
                                           Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\KONJUGATI.M
Last changed    : 2/18/2020 1:29:22 PM by KRISTINA
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\KONJUGATI.M
Last changed    : 2/18/2020 2:01:21 PM by KRISTINA
                  (modified after loading)
=====
    
```

```

=====
Column Description : TSK G2000SW
Product#           : 993967-902          Batch# :
Serial#            :
Diameter           : 7.5 mm              Length : 600.0 mm
Particle size      : 5.0 µm              Void volume : 60.0 %
Maximum Pressure   : 400 bar              Maximum pH : 9
Maximum Temperature: 60 °C
Comment            :
=====
    
```



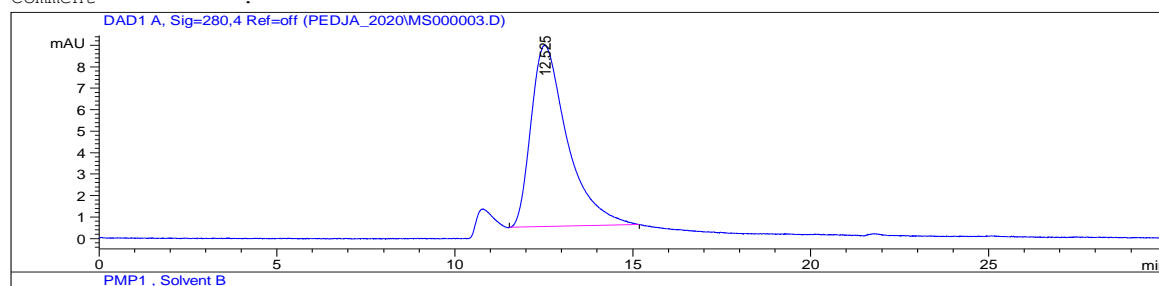
Слика 54. HPLC-UV хроматограм пречишћеног антитела Tr

Data File C:\CHEM32\1\DATA\PEDJA\_2020\MS000003.D  
Sample Name: Konjugat

```
=====
Acq. Operator   : KRISTINA
Acq. Instrument : Instrument 1                Location : Vial 1
Injection Date  : 2/18/2020 2:02:43 PM      Inj Volume : 20 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\KONJUGATI.M
Last changed    : 2/18/2020 2:01:33 PM by KRISTINA
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\KONJUGATI.M
Last changed    : 2/18/2020 2:33:53 PM by KRISTINA
                  (modified after loading)
=====
```

```
Column Description : TSK G2000SW
Product#           : 993967-902           Batch# :
Serial#            :
Diameter           : 7.5 mm               Length : 600.0 mm
Particle size      : 5.0 µm              Void volume : 60.0 %
Maximum Pressure   : 400 bar              Maximum pH : 9
Maximum Temperature : 60 °C
Comment            :
```



Слика 55. HPLC-UV хроматограм Tr-1B4M-DTPA (1:20)

Хроматограми јасно приказују да није дошло до промене места основног пика нативног антитела (слика 53) у хроматограму имунокоњугата (слика 55), као и да пречишћавање антитела (слика 54) нема значајнију улогу у повећању чистоће антитела за његову даљу обраду, односно хелатирање.

#### 4.8. Радиоактивно обележавање имунокоњугата и карактеризација радиоимунокоњугата

За радиоактивно обележавање Tr са  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$  коришћени су имунокоњугати који садрже сва три хелатора, са моларним односом протеин:хелатор 1:20. Да би се одредила најефикаснија радиохроматографска метода за испитивање радиохемијске чистоће радиоимунокоњугата, неопходно је било прво одредити ефикасну методу којом се испитује радиохемијска чистоћа самих радиоизотопа. Одређивање радиохемијске чистоће радиоизотопа ITLC-SG методом извршено је коришћењем три мобилне фазе и добијени резултати су приказани у табелама 25 и 26. Најбољи резултати за испитивање радиохемијске чистоће  $^{90}\text{Y}$  (од 99,87%) постигнути су применом ITLC-SG технике у којој се као мобилна фаза користио систем растварача 0,4 М метанол / натријум-ацетат

(1:1). Док, најбоља метода за испитивање радиохемијске чистоте  $^{177}\text{Lu}$  одређена је са 0,9% физиолошким раствором као мобилном фазом, чијом применом је добијена радиохемијска чистота од 100%.

**Табела 25.** Радиохемијска чистота  $^{90}\text{Y}$  у различитим мобилним фазама

Узорак	Мобилна фаза	Радиохемијска чистота (%)
$^{90}\text{Y}$	0,9% NaCl	92,89
$^{90}\text{Y}$	<b>0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1)</b>	<b>99,87</b>
$^{90}\text{Y}$	0,1 М ацетатни пуфер	99,82

**Табела 26.** Радиохемијска чистота  $^{177}\text{Lu}$  у различитим мобилним фазама

Узорак	Мобилна фаза	Радиохемијска чистота (%)
$^{177}\text{Lu}$	<b>0,9% NaCl</b>	<b>100</b>
$^{177}\text{Lu}$	0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1)	98,58
$^{177}\text{Lu}$	0,1 М ацетатни пуфер	99,66

Исте мобилне фазе показале су се као најпогодније и за испитивање радиохемијске чистоте имунокоњугата обележених  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$  који садрже сва три хелатора (1:20). Испитивањем радиохемијске чистоте радиоимунокоњугата одређени су приноси обележавања имунокоњугата и стабилност обележених имунокоњугата током одређеног времена (до 72 сата). Резултати ИТЛС-SG испитивања радиообележених имунокоњугата Tr са  $^{90}\text{Y}$  приказани су у табелама 27-29, а са  $^{177}\text{Lu}$  у табелама 30-32. Примењеном методом радиообележавања на рН 5, односно рН 6, постигнуто је ефикасно радиообележавање са приносом обележавања имунокоњугата трастузимаба са  $^{90}\text{Y}$  >96% и  $^{177}\text{Lu}$  >99%.

**Табела 27.** Принос обележавања  $^{90}\text{Y}$  обележених Tr-DTPA одређен ИТЛС-SG методом са различитим мобилним фазама

Узорак	Мобилна фаза	Принос обележавања (%)
$^{90}\text{Y}$ -DTPA-Tr	0,9% NaCl	90,80
$^{90}\text{Y}$ -DTPA-Tr	<b>0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1)</b>	<b>96,08</b>
$^{90}\text{Y}$ -DTPA-Tr	0,1 М ацетатни пуфер	95,29

**Табела 28.** Принос обележавања  $^{90}\text{Y}$  обележених Tr-1B4M-DTPA одређен ITLC-SG методом са различитим мобилним фазама

Узорак	Мобилна фаза	Принос обележавања (%)
$^{90}\text{Y}$ -1B4M-DTPA-Tr	0,9% NaCl	85,95
$^{90}\text{Y}$ -1B4M-DTPA-Tr	<b>0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1)</b>	<b>96,28</b>
$^{90}\text{Y}$ -1B4M-DTPA-Tr	0,1 М ацетатни пуфер	95,05

**Табела 29.** Принос обележавања  $^{90}\text{Y}$  обележених Tr-DOTA одређен ITLC-SG методом са различитим мобилним фазама

Узорак	Мобилна фаза	Принос обележавања (%)
$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tr	0,9% NaCl	92,95
$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tr	<b>0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1)</b>	<b>96,32</b>
$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tr	0,1 М ацетатни пуфер	95,26

**Табела 30.** Принос обележавања  $^{177}\text{Lu}$  обележених Tr-DTPA одређен ITLC-SG методом са различитим мобилним фазама

Узорак	Мобилна фаза	Принос обележавања (%)
$^{177}\text{Lu}$ -DTPA-Tr	<b>0,9% NaCl</b>	<b>99,29</b>
$^{177}\text{Lu}$ -DTPA-Tr	0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1)	78,52
$^{177}\text{Lu}$ -DTPA-Tr	0,1 М ацетатни пуфер	89,75

**Табела 31.** Принос обележавања  $^{177}\text{Lu}$  обележених Tr-1B4M-DTPA одређен ITLC-SG методом са различитим мобилним фазама

Узорак	Мобилна фаза	Принос обележавања (%)
$^{177}\text{Lu}$ -1B4M-DTPA-Tr	<b>0,9% NaCl</b>	<b>99,15</b>
$^{177}\text{Lu}$ -1B4M-DTPA-Tr	0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1)	98,26
$^{177}\text{Lu}$ -1B4M-DTPA-Tr	0,1 М ацетатни пуфер	97,95

**Табела 32.** Принос обележавања  $^{177}\text{Lu}$  обележених Tr-DOTA одређен ITLC-SG методом са различитим мобилним фазама

Узорак	Мобилна фаза	Принос обележавања (%)
$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tr	0,9% NaCl	100
$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tr	0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1)	99,27
$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tr	0,1 М ацетатни пуфер	98,03

Резултати добијени мерењем приноса обележавања  $^{90}\text{Y}$  обележених имунокоњугата са мобилном фазом 0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1) нису имали нормалну Гаусову расподелу, па су разлике у овом параметру испитиване применом непараметарских тестова: Kruskal-Wallis-овог теста (непараметарске ANOVE) и његовог post-hoc-a, Mann-Whitney U теста. Основни параметри дескриптивне статистике (средња вредност, стандардна девијација, медијана, 25. и 75. перцентил, минимална и максимална вредност) за три испитивана радиоимунокоњугата, као и резултати њиховог поређења су приказани у табели 33 и 34 и на слици 56.

**Табела 33.** Дистрибуција принос обележавања  $^{90}\text{Y}$  обележених имунокоњугата у растварачу 0,4 М метанол / натријум-ацетата (1:1)

$^{90}\text{Y}$ -DTPA-Tr	$^{90}\text{Y}$ -1B4M-DTPA-Tr	$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tr
71,35	61,97	18,66
7,63	1,59	8,55
3,66	4,07	13,24
4,46	4,59	12,73
2,86	3,34	10,71
3,00	3,03	12,50
2,30	4,38	9,65
1,46	3,55	7,17
0,63	1,72	3,08
0,56	0,68	1,06
0,70	0,47	0,83
0,63	0,83	0,87
0,77	0,78	0,97



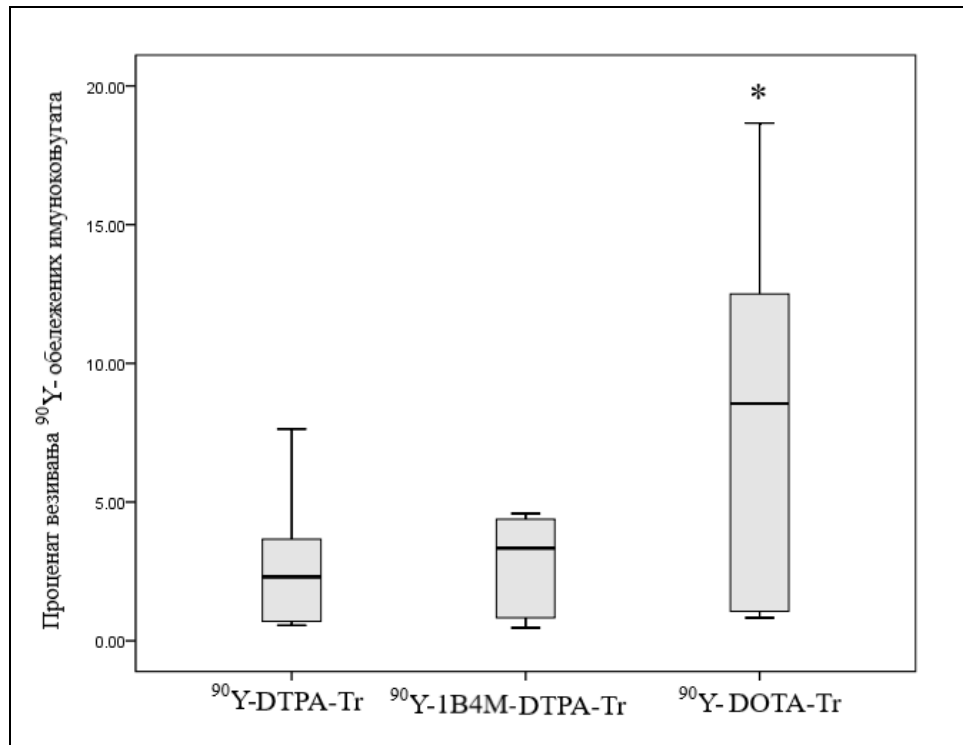
**Табела 34.** Принос обележавања  $^{90}\text{Y}$  обележених имунокоњугата одређена са мобилном фазом 0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1)

Коњугати	$\bar{X}$	SD	Ме (25 – 75. перцентил)	Минимум	Максимум
$^{90}\text{Y}$ -ДТРА-Тр	7,69	19,23	2,30 (0,70 – 3,66)	0,56	71,35
$^{90}\text{Y}$ -1В4М-ДТРА-Тр	7,69	16,53	3,34 (0,83 – 4,38)	0,47	61,97
$^{90}\text{Y}$ -ДОТА-Тр	7,69	5,90	8,55 (1,06 – 12,50)*	0,83	18,66
р	0,090				

$\bar{X}$  - средња вредност, SD – стандардна девијација, Ме – медијана; р – Kruskal-Wallis-ов тест;

\* $p < 0,05$  vs.  $^{90}\text{Y}$ -ДТРА-Тр Mann-Whitney U тест.

Применом Kruskal-Wallis-овог теста (непараметарска ANOVA) утврђено је да постоји гранично значајна разлика у приносу обележавања три испитиване врсте обележених имунокоњугата. Mann-Whitney U тест је показао статистички значајну разлику у приносу обележавања једињења  $^{90}\text{Y}$ -ДОТА-Тр и једињења  $^{90}\text{Y}$ -ДТРА-Тр ( $P=0,044$ ), док се принос обележавања једињења  $^{90}\text{Y}$ -1В4М-ДТРА-Тр није значајно разликовао од преостала два испитивана једињења ( $p=0,418$  vs.  $^{90}\text{Y}$ -ДТРА-Тр и  $p=0,125$  vs.  $^{90}\text{Y}$ -ДОТА-Тр).



**Слика 56.** Принос обележавања одређен испитивањем радиохемијске чистоће  $^{90}\text{Y}$  обележених имунокоњугата у мобилној фази 0,4 М метанол / натријум-ацетата (1:1)

Подаци добијени одређивањем приноса обележавања  $^{177}\text{Lu}$  обележених имунокоњугата испитивањем њихове радиохемијске чистоће у 0,9% NaCl као мобилној фази нису имали нормалну Гаусову расподелу, због чега су разлике у овом параметру испитиване применом непараметарских тестова: Kruskal-Wallis-овог теста (непараметарске ANOVE) и његовог post-hoc, Mann-Whitney U теста. Основни параметри дескриптивне статистике (средња вредност, стандардна девијација, медијана, 25. и 75. перцентил, минимална и максимална вредност) за свако од три испитивана једињења, као и резултати поређења су приказани у табели 35 и 36 и на слици 57.

**Табела 35.** Дистрибуција принос обележавања  $^{177}\text{Lu}$  обележених имунокоњугата одређена са 0,9% NaCl као мобилном фазом

$^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$	$^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$	$^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$
46,81	5,88	36,40
4,03	5,46	5,33
4,44	5,88	5,69
3,89	6,38	5,51
3,89	6,13	4,43
4,17	7,56	5,51
3,33	30,48	5,42
7,36	5,88	5,78
3,89	6,30	4,43
4,44	5,46	4,88
4,86	4,79	4,16
4,17	4,28	6,50
4,72	5,54	5,96

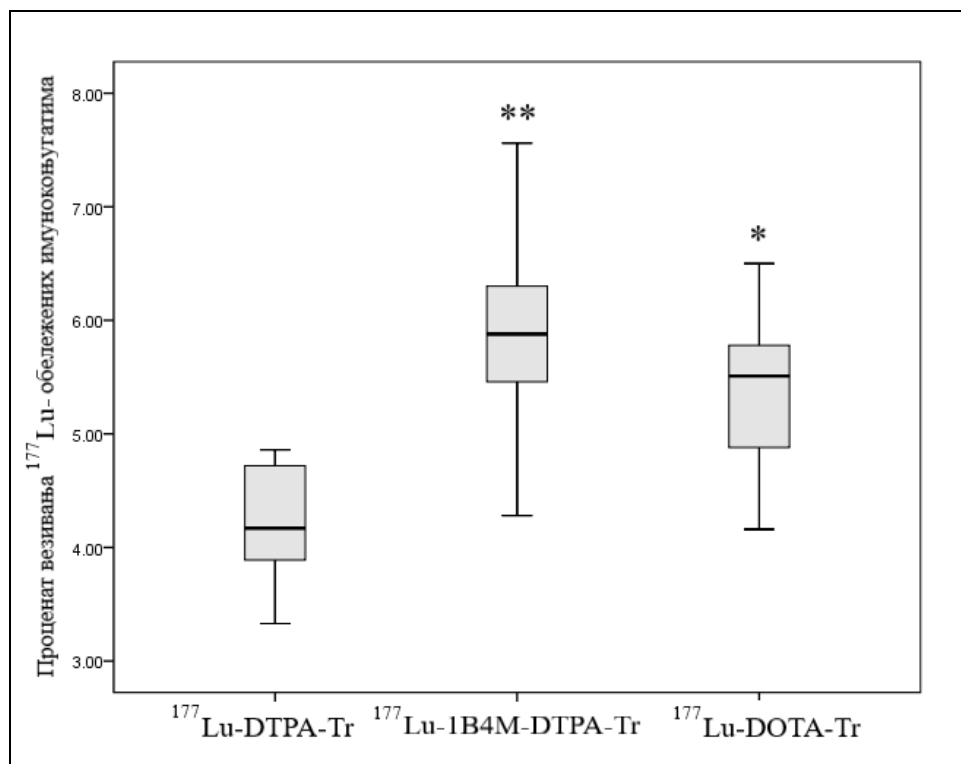
**Табела 36.** Принос обележавања  $^{177}\text{Lu}$  обележених имунокоњугата одређена са мобилном фазом 0,9% NaCl

Коњугати	$\bar{X}$	SD	Me (25 – 75. перцентил)	Минимум	Максимум
$^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$	7,69	11,79	4,17 (3,89-4,72)	3,33	46,81
$^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$	7,69	6,89	5,88 (5,46-6,30)**	4,28	30,48
$^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$	7,69	8,65	5,51 (4,88-5,78)*	4,16	36,40
p	0,006				

$\bar{X}$  - средња вредност, SD – стандардна девијација, Me – медијана; p – Kruskal-Wallis-ov тест;

\*\*\*P<0,05; 0,01 vs.  $^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$  (Mann-Whitney U тест).

Применом Kruskal-Wallis-овог теста утврђено је да постоји статистички значајна разлика у приносу обележавања три испитиване врсте обележених имунокоњугата ( $p=0,006$ ). Mann-Whitney U тест је показао статистички значајну разлику у приносу обележавања једињења  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-Tr и  $^{177}\text{Lu}$ -1B4M-DTPA-Tr ( $p=0,004$ ), као и између  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-Tr и  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tr ( $p=0,019$ ). Разлика у у приносу обележавања између  $^{177}\text{Lu}$ -1B4M-DTPA-Tr и  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tr није била статистички значајна ( $p=0,186$ ).



Слика 57. Принос обележавања одређен испитивањем радиохемијске чистоће  $^{177}\text{Lu}$  обележених имунокоњугата у мобилној фази 0,9% NaCl

Стабилност  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$  обележених имунокоњугата трастузумаба је утврђена након инкубације у 0,9% физиолошком раствору, на собној температури, током 1, 24, 48 и 72 сата, испитивањем њихове радиохемијске чистоће применом мобилне фазе 0,4 М метанол/натријум-ацетат (1:1). Радиохемијска нечистоћа изражена је у виду процента ослобођених радиоизотопа. Добијени резултати су приказани у табелама 37-42. После 72 сата инкубације  $^{177}\text{Lu}$  обележени имунокоњугати су показали већу стабилност ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tr (<1,48%),  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-Tr (<2,9%),  $^{177}\text{Lu}$ -1B4M-DTPA-Tr (<3,13%)) у односу на  $^{90}\text{Y}$  обележене имунокоњугате ( $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tr (<17,17%),  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Tr (<25,01%),  $^{90}\text{Y}$ -1B4M-DTPA-Tr (<15,1%)).

Табела 37. Стабилност  $^{90}\text{Y}$  из  $^{90}\text{Y}$ -ДТРА-Тг у току времена

$^{90}\text{Y}$ -ДТРА-Тг		
Време инкубације (сати)	Радиохемијска чистота (%)	Радиохемијска нечистота- $^{90}\text{Y}$ (%)
1	96,08	3,92
24	88,96	11,04
48	83,24	16,76
72	74,99	25,01

Табела 38. Стабилност  $^{90}\text{Y}$  из  $^{90}\text{Y}$ -1В4М-ДТРА-Тг у току времена

$^{90}\text{Y}$ -1В4М-ДТРА-Тг		
Време инкубације (сати)	Радиохемијска чистота (%)	Радиохемијска нечистота- $^{90}\text{Y}$ (%)
1	96,28	3,72
24	90,93	9,07
48	87,66	12,34
72	84,90	15,10

Табела 39. Стабилност  $^{90}\text{Y}$  из  $^{90}\text{Y}$ -ДОТА-Тг у току времена

$^{90}\text{Y}$ -ДОТА-Тг		
Време инкубације (сати)	Радиохемијска чистота (%)	Радиохемијска нечистота- $^{90}\text{Y}$ (%)
1	96,32	3,68
24	92,40	7,60
48	88,15	11,85
72	82,83	17,17

Табела 40. Стабилност  $^{177}\text{Lu}$  из  $^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$  у току времена

$^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$		
Време инкубације (сати)	Радиохемијска чистота (%)	Радиохемијска нечистота- $^{177}\text{Lu}$ (%)
1	99,29	0,71
24	98,07	1,93
48	97,88	2,12
72	97,10	2,90

Табела 41. Стабилност  $^{177}\text{Lu}$  из  $^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$  у току времена

$^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$		
Време инкубације (сати)	Радиохемијска чистота (%)	Радиохемијска нечистота- $^{177}\text{Lu}$ (%)
1	99,15	0,85
24	98,55	1,45
48	97,15	2,85
72	96,87	3,13

Табела 42. Стабилност  $^{177}\text{Lu}$  из  $^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$  у току времена

$^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$		
Време инкубације (сати)	Радиохемијска чистота (%)	Радиохемијска нечистота- $^{177}\text{Lu}$ (%)
1	100	0
24	99,14	0,86
48	98,97	1,03
72	98,52	1,48

Примена Kruskal-Wallis ANOVA теста је показала да постоји статистички значајна разлика у средњим вредностима процента ослобођеног  $^{90}\text{Y}$  из коњугата након 24 сата ( $p=0,020$ ), (табела 43 и 44 и слика 58).

**Табела 43.** Дистрибуција процента ослобођеног  $^{90}\text{Y}$  из коњугата након 24 сата

$^{90}\text{Y-DTPA-Tr}$	$^{90}\text{Y-1B4M-DTPA-Tr}$	$^{90}\text{Y-DOТА-Tr}$
0,78	59,38	90,58
54,88	33,33	3,24
20,28	0,78	0,47
12,98	0,59	0,71
1,96	0,68	0,67
1,27	0,88	0,44
1,08	0,54	0,47
0,49	0,83	0,79
1,08	0,83	0,79
1,03	0,59	0,63
0,54	1,12	0,63
1,22	0,44	0,55
0,73		
1,67		

**Табела 44.** Основни статистички параметри процента ослобођеног  $^{90}\text{Y}$  из коњугата након 24 сата као показатељи стабилности испитиваних једињења

Коњугати	$\bar{X}$	SD	Me (25 – 75. перцентил)	Минимум	Максимум
$^{90}\text{Y-DTPA-Tr}$	7,14	14,92	1,15 (0,84-1,89)	0,49	54,88
$^{90}\text{Y-1B4M-DTPA-Tr}$	8,33	18,61	0,81 (0,59-0,94)	0,44	59,38
$^{90}\text{Y-DOТА-Tr}$	8,33	25,91	0,65 (0,53-0,79) *	0,44	90,58
p	0,020				

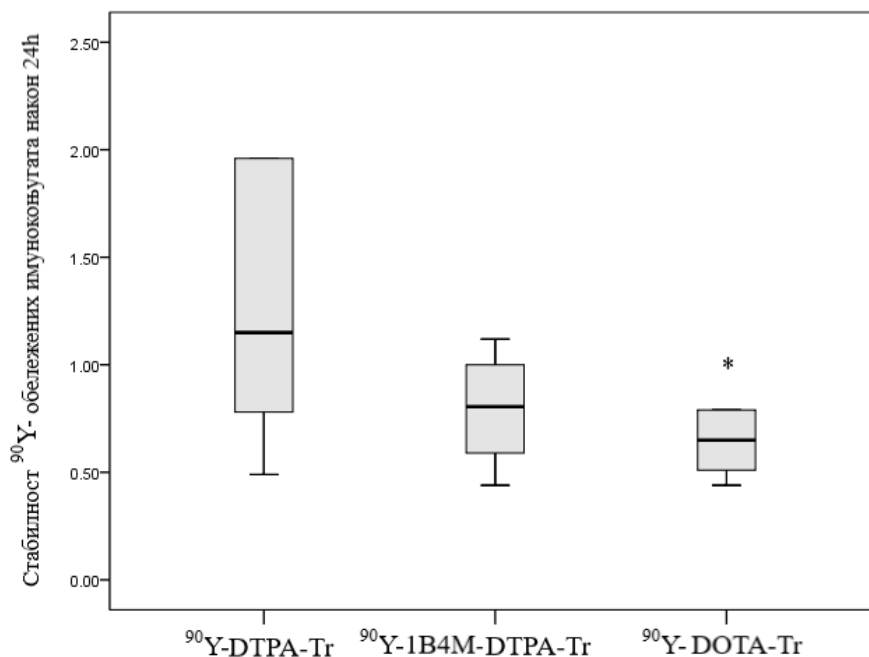
$\bar{X}$  - средња вредност, SD – стандардна девијација, Me – медијана; p – Kruskal-Wallis-ov тест;

\* $p < 0,05$  vs.  $^{90}\text{Y-DTPA-Tr}$  (Mann-Whitney U тест).

Између средњих вредности процената ослобођеног  $^{90}\text{Y}$  из  $^{90}\text{Y-DOТА-Tr}$  и  $^{90}\text{Y-DTPA-Tr}$  добијених применом методе ITLC-SG са мобилном фазом 0,4 М метанол / натријум-ацетат (1:1) постоји значајна разлика ( $p=0,035$ ).

Између средњих вредности процената ослобођеног  $^{90}\text{Y}$  из  $^{90}\text{Y-DOТА-Tr}$  и  $^{90}\text{Y-1B4M-DTPA-Tr}$  добијених применом методе ITLC-SG са мобилном фазом 0,4 М метанол/натријум-ацетат (1:1) није било статистички значајне разлике ( $p=0,340$ ).

Између средњих вредности процената ослобођеног  $^{90}\text{Y}$  из  $^{90}\text{Y-DTPA-Tr}$  и  $^{90}\text{Y-1B4M-DTPA-Tr}$  добијених применом методе ITLC-SG са мобилном фазом 0,4 М метанол/натријум-ацетат (1:1) није било статистички значајне разлике ( $p=0,165$ ).



**Слика 58.** Стабилност <sup>90</sup>Y-обележених имунокоњугата након 24 сата изражена као проценат ослобођеног <sup>90</sup>Y (\*p<0,05 vs. <sup>90</sup>Y-DTPA-Tr, Mann-Whitney U тест).

Примена Kruskal-Wallis ANOVA теста је показала да постоји статистички значајна разлика у средњим вредностима процента ослобођеног <sup>90</sup>Y из коњугата након 72 сата (p=0,031), (табела 45 и 46 и слика 59).

**Табела 45.** Дистрибуција процента ослобођеног <sup>90</sup>Y из коњугата након 72 сата

<sup>90</sup> Y-DTPA-Tr	<sup>90</sup> Y-1B4M-DTPA-Tr	<sup>90</sup> Y-DOTA-Tr
56,17	63,78	85,01
9,57	15,15	1,50
7,72	4,53	0,49
0,74	0,80	0,59
0,96	0,62	0,44
0,67	0,80	0,72
0,85	0,69	6,58
2,73	0,97	1,14
14,41	4,67	0,49
0,92	3,46	0,57
1,15	0,59	0,83
1,29	1,49	0,83
2,81	1,25	0,83
	1,21	

**Табела 46.** Основни статистички параметри % ослобођеног <sup>90</sup>Y из коњугата након 72 сата као показатељи стабилности испитиваних једињења

Коњугати	$\bar{X}$	SD	Me (25 – 75. перцентил)	Минимум	Максимум
<sup>90</sup> Y-DTPA-Tr	7,69	15,18	1,29 (0,92-7,72)	0,67	56,17
<sup>90</sup> Y-1B4M-DTPA-Tr	7,14	16,75	1,23 (0,80-4,26)	0,59	63,78
<sup>90</sup> Y-DOTA-Tr	7,69	23,29	0,83 (0,57-1,14)*	0,44	85,01
p	0,031				

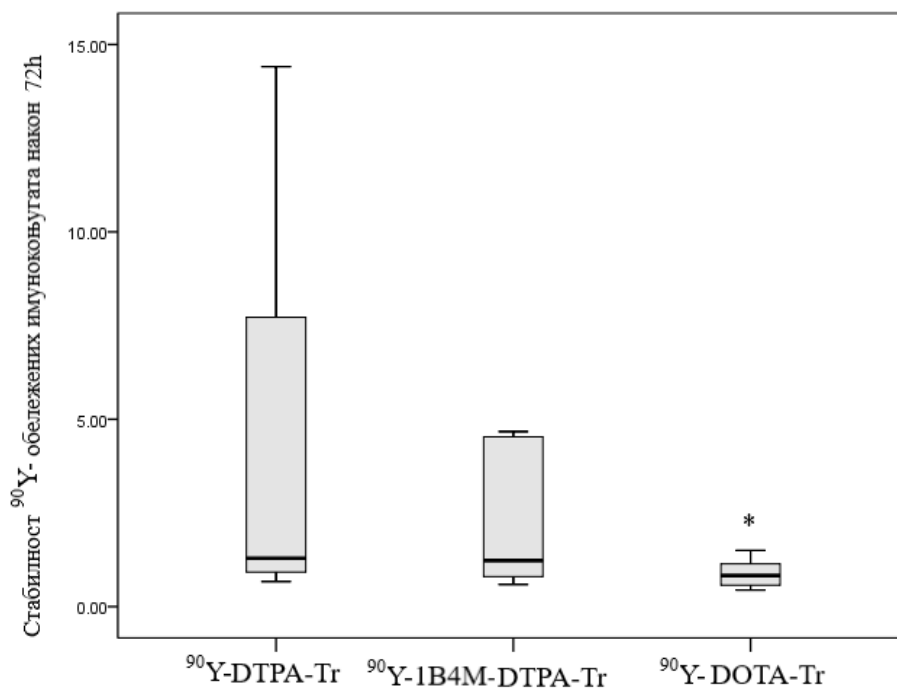
$\bar{X}$  - средња вредност, SD – стандардна девијација, Me – медијана; p – Kruskal-Wallis-ov тест;

\*p<0,05 vs. <sup>90</sup>Y-DTPA-Tr (Mann-Whitney U тест).

Између средњих вредности процената ослобођеног <sup>90</sup>Y из <sup>90</sup>Y-DOTA-Tr и <sup>90</sup>Y-DTPA-Tr постоји значајна разлика (p=0,026).

Између средњих вредности процената ослобођеног <sup>90</sup>Y из <sup>90</sup>Y-DOTA-Tr и <sup>90</sup>Y-1B4M-DTPA-Tr нема значајне разлике (p=0,126).

Између средњих вредности процената ослобођеног <sup>90</sup>Y из <sup>90</sup>Y-DTPA-Tr и <sup>90</sup>Y-1B4M-DTPA-Tr нема значајне разлике (p=0,627).



**Слика 59.** Стабилност <sup>90</sup>Y-обележених имунокоњугата након 72 сата изражена као проценат ослобођеног <sup>90</sup>Y (\*p<0,05 vs. <sup>90</sup>Y-DTPA-Tr, Mann-Whitney U тест).



Примена Kruskal-Wallis ANOVA теста је показала да постоји статистички значајна разлика у средњим вредностима процента ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из коњугата након 24 сата ( $p=0,0012$ ), (табела 47 и 48 и слика 60).

**Табела 47.** Дистрибуција процента ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из коњугата након 24 сата

$^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$	$^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$	$^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$
5,14	20,68	46,29
24,57	7,57	5,06
4,86	5,73	4,57
4,86	6,24	4,65
7,14	5,63	5,39
5,81	6,14	4,33
5,33	5,73	4,98
6,00	5,22	5,14
5,24	6,35	4,90
5,90	6,35	5,14
6,29	5,83	4,41
6,67	5,42	5,14
5,71	6,55	
6,48	6,55	

**Табела 48.** Основни статистички параметри процента ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из коњугата након 24 сата као показатељи стабилности испитиваних једињења

Коњугати	$\bar{X}$	SD	Ме (25. – 75. перцентил)	Минимум	Максимум
$^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$	7,14	5,06	5,86 (5,26-6,43)	4,86	24,57
$^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$	7,14	3,94	6,19 (5,73-6,50)	5,22	20,68
$^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$	8,33	11,96	5,02 (4,63-5,14)**, ###	4,33	46,29
p	0,0012				

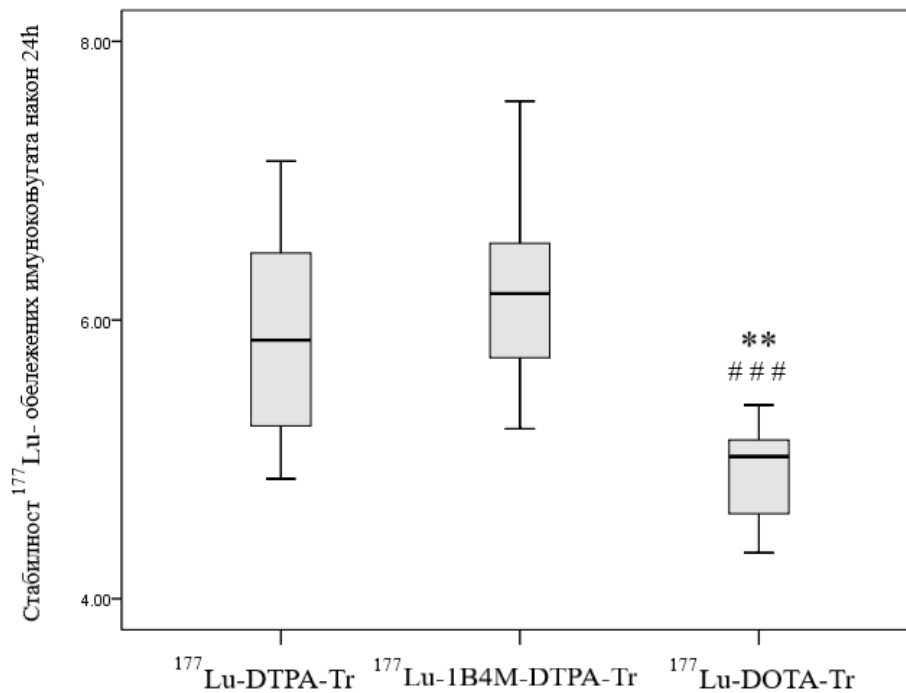
$\bar{X}$  - средња вредност, SD – стандардна девијација, Ме – медијана; p – Kruskal-Wallis-ov тест;

\*\* $p < 0,05$  vs.  $^{90}\text{Y-DTPA-Tr}$ ; ### $p < 0,001$  vs.  $^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$  (Mann-Whitney U тест).

Између средњих вредности процената ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tr и  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-Tr постоји статистички значајна разлика ( $p=0,008$ ).

Између средњих вредности процената ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tr и  $^{177}\text{Lu}$ -1B4M-DTPA-Tr постоји статистички значајна разлика ( $p=0,0004$ ).

Између средњих вредности процената ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-Tr и  $^{177}\text{Lu}$ -1B4M-DTPA-Tr нема значајне разлике ( $p=0,358$ ).



**Слика 60.** Стабилност  $^{177}\text{Lu}$ -обележених имунокоњугата након 24 сата изражена као проценат ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  (\*\* $p<0,05$  vs.  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-Tr; ### $p<0,001$  vs.  $^{177}\text{Lu}$ -1B4M-DTPA-Tr, Mann-Whitney U тест).

Примена Kruskal-Wallis ANOVA теста је показала да не постоји статистички значајна разлика у средњим вредностима процента ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из коњугата након 72 сата ( $p=0,964$ ), (табела 49 и 50 и слика 61).

**Табела 49.** Дистрибуција процента ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из коњугата након 72 сата

$^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$	$^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$	$^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$
25,13	13,75	37,20
4,45	3,82	3,39
3,80	3,49	4,07
3,27	3,22	4,34
3,86	3,75	4,00
3,93	3,22	4,54
4,25	3,75	3,59
3,66	4,80	18,97
9,62	27,96	4,20
26,57	13,62	4,13
4,19	5,53	3,86
3,47	3,82	3,79
3,80	4,93	3,93
	4,34	

**Табела 50.** Основни статистички параметри процента ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из коњугата након 72 сата као показатељи стабилности испитиваних једињења

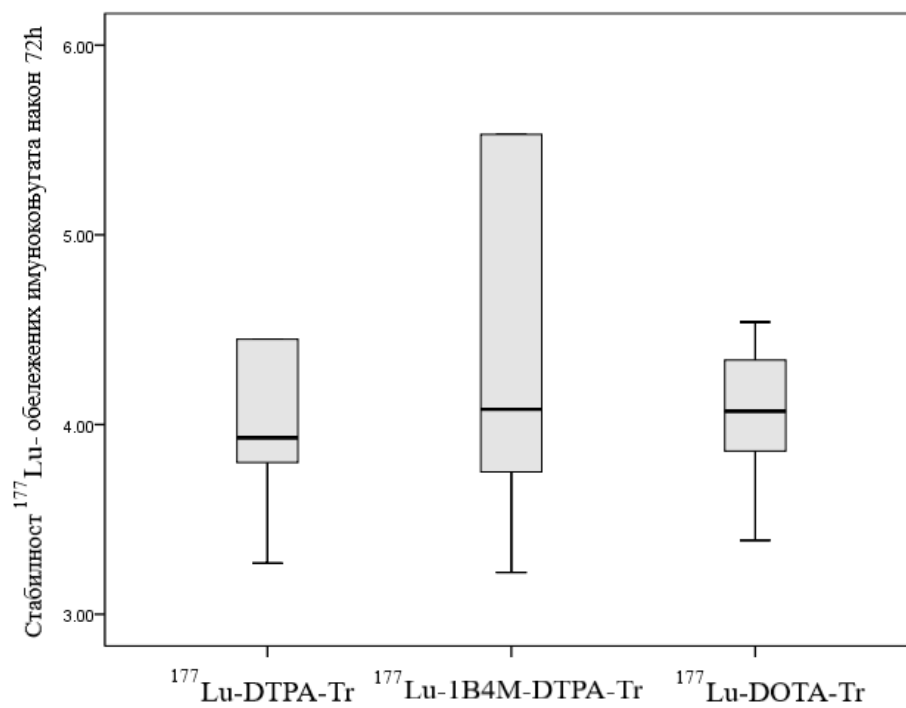
Коњугати	$\bar{X}$	SD	Ме (25 – 75. перцентил)	Минимум	Максимум
$^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$	7,69	8,22	3,93 (3,80-4,45)	3,27	26,57
$^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$	7,14	6,96	4,08 (3,75-5,38)	3,22	27,96
$^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$	7,69	9,79	4,07 (3,86-4,34)	3,39	37,20
p	0,964				

$\bar{X}$  - средња вредност, SD – стандардна девијација, Ме – медијана; p – Kruskal-Wallis-ov тест.

Између средњих вредности проценат ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из  $^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$  и  $^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$  нема статистички значајне разлике (p=0,778).

Између средњих вредности проценат ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из  $^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$  и  $^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$  нема статистички значајне разлике (p=0,865).

Између средњих вредности проценат ослобођеног  $^{177}\text{Lu}$  из  $^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$  и  $^{177}\text{Lu-1B4M-DTPA-Tr}$  нема значајне разлике p=0,961).



**Слика 61.** Стабилност <sup>177</sup>Lu-обележених имунокоњугата након 72 сата изражена као проценат ослобођеног <sup>177</sup>Lu

## 5. ДИСКУСИЈА

Примена радиофармацеутика представља сигуран и ефикасан приступ лечењу многих врста карцинома. Ова врста терапије је дефинисана испоруком радиоактивних изотопа циљаном тумору и испољава значајну предност у односу на постојеће терапијске приступе (22,26).

Такође, многа антитела која се користе у лечењу малигних болести су идеалан носач за терапијски агенс-радионуклид. Циљаним допремањем радионуклида везаним за антитело, путем високог специфичног везивања за антиген на тумору, повећава се ефекат радиотерапије јер је доза радионуклида у самом тумору највећа, док се нежељени системски ефекат значајно смањује. Везана радиоактивност на туморској ћелије физички уништава малигну ћелију и индукује ћелијски одговор (24).

Да би се све ово постигло, потребно је пронаћи одговарајући начин да се избрани радиоизотоп стабилно веже за антитело и испоручи до циљне ћелије. У ту сврху је неопходно:

- добијање стабилног имунокоњугата који ће омогућити високо специфично везивање радиоактивног изотопа;
- стабилно везивање радиоактивног изотопа за антитело, а то је могуће само ако постоји лиганд који ће у високом приносу везати радиоизотоп, што зависи од структуре самог лиганда и физичко-хемијских карактеристика радиоизотопа.

Најприкладнија антитела за ову сврху су антитела која су већ показала успех у терапији, као што је трастузумаб. Због доказане ефикасности према HER2 позитивном карциному дојке, био је велики изазов користити трастузумаб у формулацији лиофилизованих имунокоњугата за даљу потенцијалну примену у радиоимунотерапији.

Имунокоњугати нам дају највећу наду за развој канцер-специфичних цитотоксичних препарата и имају потенцијалну предност због селективности према одређеним антигенима на површини туморске ћелије (25).

Главни циљ истраживања је био добијање и карактеризација имунокоњугата погодних за обележавање са радиоизотопима. Због погодности да постоји готова формулација спремна за обележавање, примењен је поступак лиофилизације. На овај начин коњугати постају стабилна чврста форма увек спремна за даљу обраду, па и радио-обележавање.

Лиофилизација има велики значај у процесу формулисања стабилних фармацевтских производа (моноклонска антитела и формулације протеина). Правилно одабрани услови неопходни су за потпуно уклањање воде и задржавање структурног интегритета протеина. Кључно је одредити методу лиофилизације при којој се добијају стабилни, хомогени колачи равних површина који задржавају своје карактеристике након реконструкције. Први корак у процесу лиофилизације је замрзавање, које је важно за процес превођења протеина у далеко стабилније кристално стање. Контрола кристализације и величина кристала током замрзавања су критични параметри и веома је важан одговарајући избор и дефинисање брзине хлађења: споро хлађење даје веће кристале, док брже замрзавање даје мање кристале. Са друге стране, брже хлађење може довести до агрегације и денатурације антитела. Током припреме водених формулација потребно је да бочице буду постављене у лиофилизаторе на охлађене полице на 4–5°C (167). Да би се урадила боља кристализација, често се примењује још један корак у фази замрзавања, такозвани „annealing” – корак (168). Наш истраживачки тим већ има искуство са лиофилизацијом моноклонског антитела-ритуксимаб. Gjorgieva Askova и сарадници (156) користили су тродневни протокол са укљученим „annealing” – кораком. Добијени резултати били су обећавајући, јер су произведени стабилни колачићи без стварања агрегата и денатурације антитела.

Циљ овог истраживања је био и скратити дужину процедуре на два дана, искључујући „annealing” – корак. У исто време, постојала је жеља да се утврди да ли се применом брзине хлађења од 1°C/мин могу добити колачићи истог квалитета. Промена брзине хлађења извршена је на основу резултата студије Tang-а и сарадника (169). Са истом брзином смрзавања постигнуто је побољшање већ постојеће процедуре и добијање уједначене структуре леда без „annealing” – корака.

Примарно сушење је други корак лиофилизације када се замрзнута вода под вакуумом уклања сублимацијом током 28 сати. Време секундарног сушења продужено је на 14 сати. У овој фази уклања се везана незаамрзнута вода на температури већој од 25°C (168). Многи шећери (глукоза, манитол и трехалоза), могу се користити као криопротектанти, како би се протеини заштитили од денатурације и инактивације током процеса замрзавања (170). Nounou и сарадници (171) су у својој студији показали да су добијени лиофилизоване колачићи, без икаквог криопротектанта, имали компактну структуру, али су показивали потешкоће у процесу реконституције. Због тога, употреба шећера као агенса за пуњење, омогућава добијање пухастих колача који омогућавају лаку реконституцију. У овој студији у циљу заштите антитела од веће температуре и

добијања елегантних колача за лаку реконституцију, коришћен је 1% манитол. После растварања колача са 0,9% NaCl за време мање од једног минута, добијени су бистри до опалесцентни раствори без видљивих чврстих честица и колоида.

Процеси коњугације и лиофилизације антитела могу довести до промене интегритета протеина (агрегације и фрагментације) и зато је било од велике важности увођење аналитичких метода за доказивање стабилности имунокоњугата након коњугације и лиофилизације.

Значајно је било показати да обележавање итријумом и лутецијумом, тровалентним металним јонима, нема утицаја на структуру антитела. Једна од најважнијих метода за испитивање интегритета и чистоће протеина је SDS-PAGE електрофореза у редукујућим условима (раздвајање молекула се заснива на њиховој величини) (172). Многе студије стабилности трастузумаба направљене су применом SDS-PAGE технике у редукујућим и нередукујућим условима. Под редукујућим условима, трастузумаб се раздваја на два фрагмента ~50 kDa и ~25 kDa (масе одговарају моларним масама тешког и лаког ланца), док је у нередукујућим условима идентификован само један фрагмент на ~150 kDa (маса одговара моларној маси интактног антитела) (173-175).

Имплементиран је метод коришћен за испитивање моноклонског антитела ритуксимаба у приближно истим условима са малим модификацијама (156). Да би се постигли редукујући услови, уместо дитиотретиола, употребљен је 2-меркаптоетанол. Испитивања SDS-PAGE електрофорезом су коришћена за анализу не само добијених коњугата након коњугације и лиофилизације, већ и након шестомесечног чувања лиофилизованих имунокоњугата на температури од 4°C. На овај начин утврђена је стабилност формулације, али и показана предност примењене методе лиофилизације. Обележавање са нерадиоактивним металним јонима примењено је за формирање одговарајућег комплекса чија ће хемијска структура бити подударна са оном након радиоактивног обележавања. Нерадиоактивно обележени имунокоњугати су испитивани методом SDS-PAGE. Добијени резултати миграције узорака током електрофорезе одговарају већ објављеним резултатима за друга IgG1 моноклонска антитела (173,174). У редукујућим условима, трастузумаб се раздваја у две траке фрагмената молекулске масе од 25 kDa (карактеристична маса за лаке ланце) и 50 kDa (карактеристична маса за тешке ланце), што је доказано са Wide Range, Molecular Weight маркером. Исти интензитет фрагмената лиофилизованих и нерадиоактивно обележених коњугата са фрагментима интактног комерцијалног (немодификованог) трастузумаба указује да није дошло до разградње антитела. Резултати су показали да су коњугација, лиофилизација и обележа-

вање успешни, односно да наведени процеси нису довели до оштећења, фрагментације, денатурације и агрегације трастузумаба.

Веома је тешко испитати физико-хемијска оштећења лекова са протеинском структуром у поређењу са лековима изграђеним од малих молекула, што је случај и са комплексним структурама антитела. Дугорочна стабилност је чест проблем моноклонских антитела, и представља озбиљан изазов при развоју стабилних лиофилизованих формулација, које имају велике практичне предности, поготово када се користе у клиничким условима. Једна од главних препрека произилази из чињенице да су IgG антитела протеински мулти-доменски парови, састављени од четири полипептидна ланца повезана дисулфидним везама и нековалентним интеракцијама. Спољњи утицаји или минимална промена само једног домена значајно утиче на понашање и стабилност читавог протеина. Такође, могу да се денатуришу независно и доведу до расплета структуре протеина, што је увек праћено неповратним процесом агрегације (176,177).

IgG антитела са приближно 150 kDa молекулском масом, укључујући трастузумаб, углавном су састављена од  $\beta$ -равни, неколико  $\beta$ -завоја, малог дела  $\alpha$ -хеликса, а остатак је неуређена структура (178). Спектри и карактеристичне апсорпционе траке протеина зависе и од формирања водоничних веза у полипептидном ланцу, које се разликују код  $\alpha$ -хеликса и  $\beta$ -равни.

Раманови спектри препознају доминантну структуру  $\beta$ -равни у IgG антителима идентификујући карактеристичну апсорпциону траку повезану са такозваним амидним I регионом и другу интензивнију карактеристичну траку повезану са амидним III регионом. Амидна I трака потиче од валентне вибрације карбонилних група (C=O). Важно је напоменути да, уколико је полипептидни ланац претежно састављен од  $\alpha$ -хеликса, очекује се да се апсорпциони пик амидне I траке појави на  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ , док код антитела и других макромолекула састављених углавном од  $\beta$ -равни, карактеристична амидна I трака се уобичајено налази на  $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ . Амидна III трака потиче од валентне C-N вибрације и N-H деформационе вибрације веза у структури пептида. Такође, амидна III трака је значајна за одређивање протеинске секундарне структуре  $\beta$ -равни и углавном се детектује у опсегу између  $1230\text{ cm}^{-1}$  и  $1300\text{ cm}^{-1}$ . Код протеина са доминантним  $\alpha$ -хеликсом, овај опсег се јавља између  $1300\text{ cm}^{-1}$  и  $1340\text{ cm}^{-1}$ . Антитела углавном састављена од  $\beta$ -равни показују амидну III траку на приближно  $1245\text{ cm}^{-1}$  (179–182).



FT-IR спектри протеина и моноклонских антитела увек показују девет карактеристичних трака познатих као: амидне траке А и В и амидне траке I-VII. Најважније траке које су карактеристичне за протеинску структуру су амидне траке I, II и III. Амидна I трака ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) је најосетљивији спектрални регион и углавном потиче од C=O валентне вибрације амидне групе (80%), са малим уделом валентних вибрација CN ван равни и савијања NH везе у равни. Амидна II трака ( $1480-1575\text{ cm}^{-1}$ ) настаје због CN валентне вибрације (18-40%) у комбинацији са NH савијањем (40-60%). Амидна I трака је осетљивија у погледу конформације протеина од амидне траке II, и вибрације веза у бочном ланцу ( $183-185$ ) доста утичу на њу. Амидна III трака код протеина је сложенија, па таласни бројеви ове траке зависе од конформација протеинске структуре ( $\alpha$ -хеликс на  $1328-1289\text{ cm}^{-1}$  и  $\beta$ -раван на  $1255-1244\text{ cm}^{-1}$ ). Ова трака потиче од NH деформационе вибрације савијања у структури протеина и CN валентне вибрације са малим уделом C=O савијања у равни (183,184,186). Остале траке су мање значајне за карактеризацију секундарне структуре протеина, јер оне зависе од променљиве природе бочних ланаца и јачине и положаја водоничних веза. Амидне траке А и В се налазе на око  $3300\text{ cm}^{-1}$  и  $3100\text{ cm}^{-1}$  и потичу од NH истежуће валентне вибрације. Амидне траке IV и V ( $625-800\text{ cm}^{-1}$ ), VI ( $537-606\text{ cm}^{-1}$ ), и VII ( $\sim 200\text{ cm}^{-1}$ ) укључују деформационе вибрације ван равних релевантних функционалних група (OCN, NH и C=O савијање) и такође су настале комбинациојом померања координативних веза (183,187). Међутим, због посебне важности скрининга секундарне структуре антитела, углавном је акценат дат карактеризацији најзначајнијих трака, амидне I, II и III траке.

Анализа Раманових спектра чистих антитела, необележених имунокоњугата и обележених имунокоњугата са нерадиоактивним изотопима након лиофилизације, омогућила је да се докаже задржавање нативне структуре протеина преко утврђивања присуства карактеристичних амидних трака. Код свих испитаних узорака протеина, амидна I трака је идентификована у региону карактеристичном за веће присуство структурне  $\beta$ -равни ( $1668-1688\text{ cm}^{-1}$ ), што је поткрепљено чињеницом да Раманови спектри показују присуство амидне III траке средњег интензитета у региону  $1235-1260\text{ cm}^{-1}$ . Траке у региону  $1453-1467\text{ cm}^{-1}$  повезане су са  $\text{CH}_2$  деформационим вибрацијама ( $\rho\text{CH}_2$ ), а оне у региону  $940-950\text{ cm}^{-1}$  са  $\text{CH}_3$  деформационе вибрацијама ( $\rho\text{CH}_3$ ). Траке које се јављају у региону  $1100-1170\text{ cm}^{-1}$  потичу од  $\nu(\text{C}-\text{C})$  вибрације угљениковог скелета антитела.

Аминокиселински бочни ланци су критична тачка у стабилизацији структуре антитела. Неколико Раманових трака бочних аминокиселинских група значајно утичу на укупан изглед спектра и положај апсорпционих пикова карактеристичних група. Бочни ланци ароматичних аминокиселина Phe, Tug и Ttr углавном су укључени у интеракције образовања хидрофобних и водоничних веза и самим тим, имају важну улогу у стабилизацији секундарне структуре протеина. Траке које настају због присуства ароматичних структура у овим аминокиселинама су изразите и лако препознатљиве. Због тога се могу користити као поуздани маркери конформационих промена, мада увек треба бити опрезан, јер се могу преклапати са амидним тракама повезаним са другим групама бочног ланца. У овој студији, Tug је показао апсорпциони пик око  $647\text{ cm}^{-1}$  и у интервалу од  $760\text{--}790\text{ cm}^{-1}$ . Траке Ttr детектоване су око  $757\text{ cm}^{-1}$ ,  $878\text{ cm}^{-1}$  и  $1337\text{ cm}^{-1}$ . Сигнали повезани са остацима индола идентификовани су око  $1560\text{ cm}^{-1}$ . Вибрације у опсегу  $1004\text{--}1060\text{ cm}^{-1}$  и  $1610\text{ cm}^{-1}$  повезане су са присуством фениланинских аминокиселинских остатака (178,188,189). Раманови спектри чистог трастузумаба показали су присуство добро дефинисаних трака повезаних са присуством ароматичних аминокиселина у структури. Треба напоменути, да је у неким спектрима имунокоњугата нотиран губитак, или промена интензитета апсорпционих трака, што је повезано са присуством карактеристичних ароматичних аминокиселина. Такве мале спектралне варијације могу се објаснити претпоставком да ова једињења подстичу сам процес коњугације антитела са ВФСА. Са друге стране ова појава може проузроковати извесно преклапање трака које дају ароматичне аминокиселине са тракама које настају повезивањем различитих хелатора са протеинским делом.

То се доказује и резултатима статистичке обрадом података, која упоређује асигнације између антитела Tr и свих имунокоњугата, између хелатора три различите концентрације, као и исте концентрације различитих хелатора. У већини поређења нема статистички значајне разлике ( $p > 0,05$ ), односно нема одступања у вредностима таласних бројева. Код следећих поређења: (Tr / Tr-DTPA-Lu (1:10); Tr / Tr-DTPA-Lu (1:50); Tr / Tr-1B4M-DTPA-Y (1:10); Tr-1B4M-DTPA (1:20) / Tr-DOTA (1:20); Tr-1B4M-DTPA (1:10) / Tr-DTPA-Lu (1:10); Tr-1B4M-DTPA (1:10) / Tr-1B4M-DTPA-Y (1:10); Tr-DOTA (1:20) / Tr-DTPA-Lu (1:20); Tr-DTPA (1:50) / Tr-DTPA-Y (1:50); Tr-DTPA (1:50) / Tr-DTPA-Lu (1:50) и Tr-DTPA (1:50) / Tr-1B4M-DTPA-Y (1:50)), постоји статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ), која потиче из већ поменутих интеракција, односно самог процеса коњугације и везивања металних јона за антитело.

Корелациона анализа испитиваних једињења са основном структуром траст-узимаба је показала одлично слагање структура скоро за сва једињења (коэффициенти детерминације ( $R^2$ )  $\geq 0,996$  односно коэффициенти корелације ( $r$ )  $\geq 0,998$ ), осим за [Tr-1В4М-DTPA (1:50) ( $R^2=0,983$ ,  $r=0,991$ )] и [Tr-DTPA-Lu (1:10) ( $R^2=0,966$ ,  $r=0,983$ )], где има малог одступања у односу на нативно антитело. Добијени резултати такође потврђује одржавање структуре антитела након коњугације и обележавања.

Због појаве статистички значајне разлике код наведених узорака, урађено је детаљно поређење свих карактеристичних трака, како би се утврдило због чега долази до одступања. Добијена је гранична статистичка значајност  $p < 0,100$ . Већина одступања јавља се код ароматичних аминокиселина (Phe, Tyr ( $760-780\text{ cm}^{-1}$ ), Trp ( $875-900\text{ cm}^{-1}$ )), што потврђује литературне податке да су промене интензитета и положаја трака повезане са присуством ароматичних аминокиселина, које подстичу коњугацију антитела (178,188).

Цистеински остаци су углавном укључени у формирање дисулфидних мостова унутар или између ланаца IgG1 антитела (CS-SC). Међутим, присуство занемарљиве концентрације слободних сулфхидрилних (SH) група уграђених у структуру антитела, убедљиво је потврђено присуством Раманове траке врло ниског интензитета на  $2500-2700\text{ cm}^{-1}$ . Појава добро дефинисаних пикова повезаних са слободним сулфхидрилним групама увек је знак денатурације антитела која доводи до образовања слободних тешких и лаквих ланаца. Супротно томе, детекција слабих, али различитих трака повезаних са вибрацијом дисулфидних веза, у региону са ниским таласним бројевима  $400-700\text{ cm}^{-1}$  (180,190), представља снажан маркер који указује на очување дисулфидних мостова током процеса коњугације, лиофилизације и обележавања нерадиоактивним изотопима, без значајних доказа (карактеристичних трака) о денатурацији антитела. Овај закључак такође је поткрепљен присуством амидне I и III траке у IR спектрима. Добијене и приказане асигнације у табели 3 (у којој су дати положаји карактеристичних трака у IR спектрима), такође се слажу и допуњују са претходно наведеним резултатима (177,179,180,188).

Сви ови резултати добијени након статистичке анализе потврдили су закључке добијене директном анализом спектра.

Агрегација протеина је главни проблем који може утицати на стабилност антитела, а самим тим и угрозити његову имуногеност, биолошку активност и трајност. Овај процес настаје када се хидрофобни делови изложени ка површини суседних про-

теина, неповратно закаче један за други, стварајући велике нерастворљиве честице. Неприкладно руковање материјалом током процеса коњугације и неадекватни протоколи извођења лиофилизације углавном су најрелевантнији, а и најчешћи разлози за подстицање разградње и агрегације протеина. Вибрациона спектроскопија је техника коришћена за испитивање присуства агрегата у испитиваним узорцима. Раманови спектри који показују добро дефинисан пик на  $\sim 1634 \text{ cm}^{-1}$  углавном се тумаче као показатељ повећане интрамолекуларне водоничне везе у структури  $\beta$ -равни, што је такође знак појаве одређеног степена агрегације (191). Одсуство ове карактеристичне траке у Рамановим спектрима узорака сматра се убедљивим експерименталним доказом задржавања нативног стања антитела у комбинацији са одсуством агрегације протеина.

Раманове траке за коришћени криопротектант - манитол су мање интензивне и показале су пик на  $1554 \text{ cm}^{-1}$ . Ово померање је повезано са вибрацијом прстена из ароматичних аминокиселина и преклапањем са неким тракама које потичу из хелатора (188).

Анализа FT-IR спектра такође је имала велики значај у детектовању промена интегритета антитела. Заправо, амидна I трака у инфрацрвеним спектрима је најзначајнији маркер за испитивање варијација у секундарним структурама протеина, мада амидне II и амидне III траке такође могу играти значајну улогу у идентификовању било каквих промена у његовом нативном стању. Због високе осетљивости амидне I траке на главни распоред скелета протеина, интервал апсорпције варира између две главне конформације  $\alpha$ -хеликса и  $\beta$ -равни. Структуре  $\alpha$ -хеликса показују апсорпцију око  $1655 \text{ cm}^{-1}$ , док у секундарним структурама  $\beta$ -равни положај ове траке се јавља у опсегу  $1640\text{--}1612 \text{ cm}^{-1}$  (184,192,193). У анализираним спектрима, детектована је јака амидна I трака у региону од  $1633\text{--}1645 \text{ cm}^{-1}$ , што сугерише на веће присуство конформације  $\beta$ -равни у структури и задржавање секундарне структуре антитела. Амидна II трака, иако је осетљива на секундарну структуру протеина, не узима се као поуздан маркер структурних деформација (192). У складу са претходно објављеним резултатима (184), у нашим спектрима су идентификовани карактеристични пикови у опсегу  $1480\text{--}1575 \text{ cm}^{-1}$ . Присуство добро дефинисаних амидних III трака може бити корисно за анализу структуре антитела и за утврђивање појаве  $\alpha$ -хеликса и  $\beta$ -равни. Ипак, у многим случајевима ове траке показују слаб интензитет због преклапања са другим вибрацијама (188). У анализираним узорцима, изглед и положај амидне III траке подржава присуство високог процента конформације  $\beta$ -равни у структури трастузумаба. Остале амидне траке (IV–VII) нису од значаја и препоручљиво је занемарити их у процесу анализе секун-

дарне структуре. Међутим, њихов положај и интензитет у спектрима је у складу са претходно наведеним подацима (184,193).

Висока осетљивост амидне I траке у IR спектрима такође се може искористити за идентификацију савијања, расклапања и потенцијалне агрегације протеина, јер присуство апсорпционе траке близу или испод  $1620\text{ cm}^{-1}$  (184,188) указује на агрегацију протеина. Одсуство ових максимума апсорпције у приказаним FT-IR спектрима је у складу са претходним закључцима изведеним из анализе Раманових спектра, који подржавају тезу да поступак лиофилизације није изазвао уочљиву агрегацију трастузумаба и да је његова секундарна структура у потпуности очувана.

Овај закључак је такође статистички потврђен, односно не постоји статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) између амидних трака у чистим антителима и свих анализираних имунокоњугата. Такође, не постоји статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) између амидне траке истог хелатора са три различите концентрације (моларна односа антитело:хелатор) и између амидне траке у спектрима имунокоњугата са истом концентрацијом различитих хелатора. Корелациона анализа такође је показала одлично слагање структура испитиваних једињења са основном структуром трастузумаба, осим код Tr-DTPA (1:50) ( $R^2=0,983$ ,  $r=0,991$ ) и Tr-DTPA-Y (1:20) ( $R^2=0,982$ ,  $r=0,991$ ), где је коефицијент детерминације нижи од 0,985, односно коефицијентима корелације нижим од 0,995. Ова корелација показује мало одступање у структури ова два једињења, због благог померања пикова током процеса коњугације и обележавања, али ипак доказује да је задржана секундарна структура антитела.

Очувана секундарна структура и одсуство фрагментације антитела, такође је потврђена резултатима MALDI-TOF MS анализе који показују да не постоји додатни пик у MALDI-TOF спектру, осим пика који показује моларну масу коњугата. Масена спектрометрија је такође најприкладнија метода за одређивање просечног броја хелатора везаних за антитела, а самим тим и одређивање стабилности коњугата. Добијени статистички резултати иду у прилог претходно изнетим констатацијама.

Резултати су показали да повећање концентрације хелатора при коњугацији, (1:10; 1:20; 1:50), утиче на повећање броја BFCA-а везаних за трастузумаб (врло јака позитивна корелација ( $r=0,98$ )). С обзиром да се број хелатора везаних за једно антитело кретао од 4-5, констатовано је да је најпрактичније и најекономичније радити са моларним односом Tr:BFCA (1:10). Добијени резултати су подржани већ објављеним студијама.

Наша истраживачка група је већ радила коњугацију ритуксимаба са истим хелаторима у односу 1:20. Под истим условима коњугације, просечан број хелатора по антители је већи (6,1 *p*-SCN-Bn-DTPA, 8,8 *p*-SCN-Bn-DOТА и 8,3 *p*-SCN-Bn-1В4М-DTPA) у поређењу са трастузумабом (156,194).

Bhusari и сарадници (195) извели су коњугацију трастузумаба са *p*-SCN-Bn-DOТА при моларним односима антители:BFCA у распону 1:5–1:40. Број коњугованих BFCA молекула је варирао у просеку 0,8 код 5-моларног вишка хелатора до 11,6 код 40-моларног вишка. Моларни однос 1:20 изабран је као најбољи за коњугацију Tr са просечним бројем везаних BFCA молекула 7,2.

У следећој студији (196) радили су са другим антителима (цетуксимабом) и истим хелатором (*p*-SCN-Bn-DTPA) са два моларна односа (1:10 и 1:20). Резултати потврђују презентован резултат добијен у овој студији, да при повећању концентрације хелатора није било промена у броју хелатора везаних за антители. Већина објављених радова показује да се просечно 6–7 молекула хелатора везује за антители.

Wojdowska и сарадници (164) показали су да су у оптималним условима са десетоструким моларним вишком *p*-SCN-Bn-DOТА присутна  $4,2 \pm 0,8$  молекула хелатора по једном молекулу ритуксимаба, а добијен је и добар принос радиоактивног обележавања са  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{90}\text{Y}$ , изнад 99%. Ово је био охрабрујући податак, јер су услови коњугације антители подударни са раније добијеним резултатима нашег тима.

У истраживању Thakral и сарадници (197), постигнути су слични резултати при коњугацији:  $5,25 \pm 1,04$  молекула *p*-SCN-Bz-DOТА били су везани за један молекул ритуксимаба. У овом случају је рађено са великим вишком хелатора, при моларном односу протеин:хелатор 1:50, након чега је такође је постигнуто успешно радиообележавање са  $^{177}\text{Lu}$  (принос обележавања >95%).

За даље испитивање, односно радиообележавање, изабрани су коњугати добијени при моларном односу антители:хелатор (1:20), али пре тога је извршено испитивање чистоће и присуство деградационих продуката код лиофилизованог имунокоњугата Tr-1В4М-DTPA (1:20), комерцијалног антители и пречишћеног антители коришћењем HPLC-UV хроматографије.

Добијени хроматограм за Tr-1В4М-DTPA (1:20) показује присуство само једног пика који одговара имунокоњугату, и одсуство нечистоћа у виду слободног хелатора или фракције антители мале молекулске тежине. Наши резултати одговарају подацима који су већ објављени (156,166,196,198). Чињеница да су добијени профили хромато-

грама комерцијалног и пречишћеног антитета исти, потврђује чистоћу самог комерцијалног препарата и доказује одсуство деградационих продуката након процеса пречишћавања.

Након физичко-хемијске карактеризације имунокоњугата који су показали повољне карактеристике, извршено је радиоактивно обележавање са  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$ .

Радиохемијска чистоћа  $^{90}\text{Y}$  у све три испитане мобилне фазе била је у распону од 92,89% до 99,87%, док је радиохемијска чистоћа  $^{177}\text{Lu}$  у све три мобилне фазе била у опсегу од 98,58% до 100%. Испитивање радиохемијске чистоће радиоимунокоњугата у све три мобилне фазе, показало је присуство радиоактивности само на старту траке јер због велике молекулске масе Тг мобилна фаза не може да транспортује антителио које зато остаје на месту наношења узорка. Овај податак одговара претходно објављеним резултатима (197). Како је радиоактивност детектована искључиво на старту траке, може се закључити да нема присуства радиообележених фрагмената антитета са ниском молекулском тежином, као ни слободних хелатора и/или слободне форме радиоизотопа које смо користили за радиообележавање у виду  $^{90}\text{YCl}_3$  и  $^{177}\text{LuCl}_3$ .

Већ објављени радови показују да је ДТРА најкоришћенији хелатор за обележавање са итријумом-90, док за обележавање са лутецијумом-177 најчешће су коришћени хелатори са DOTA структуром (195,197,199,200). Из наших приказаних резултата највећи принос обележавања постигнут код  $^{177}\text{Lu}$  обележених имунокоњугата је забележен код  $^{177}\text{Lu-DOTA-Tg}$  (100%). Највећи принос обележавања код  $^{90}\text{Y}$  обележених имунокоњугата је забележен код  $^{90}\text{Y-DOTA-Tg}$  (96,32%), а најнижи код  $^{90}\text{Y-DTRA-Tg}$  (96,08%), где и постоји статистички значајна разлика ( $p=0,044$ ).

Тест стабилности извршен након 24 сата показао је највећу стабилност  $^{90}\text{Y-DOTA-Tg}$  (>92,40%) и  $^{177}\text{Lu-DOTA-Tg}$  (>99,14%), чиме је потврђено минимално ослобађање  $^{90}\text{Y}^{3+}$  (<7,6%) и  $^{177}\text{Lu}^{3+}$  (<0,86%) из радиоимунокоњугата. Након 72 сата највећа стабилност забележена је код  $^{90}\text{Y-1B4M-DTRA-Tg}$  (>84,90%) и  $^{177}\text{Lu-DOTA-Tg}$  (>98,52%), са најнижим процентом ослобођеног  $^{90}\text{Y}^{3+}$  (<15,1%) и  $^{177}\text{Lu}^{3+}$  (<1,48%).

За разлику од података из литературе, у овом испитивању је најнижа стабилност добијена за  $^{90}\text{Y-DTRA-Tg}$ , 88,56% након 24 сата и 74,99% након 72 сата. То је такође потврђено резултатима статистичких испитивања, где постоји значајна статистичка разлика између стабилности  $^{90}\text{Y-DOTA-Tg}$  и  $^{90}\text{Y-DTRA-Tg}$ , након 24 сата ( $p=0,0349$ ) и 72 сата ( $p=0,0255$ ). Већа стабилност  $^{177}\text{Lu-DOTA-Tg}$ , након 24 сата, у поређењу са друга два радиоимунокоњугата, такође је статистички потврђена, јер постоји статистички значајна разлика ( $p<0,05$ ). Разлике између  $^{177}\text{Lu-DOTA-Tg}$  и  $^{177}\text{Lu-1B4M-DTRA-Tg}$

( $p=0,0004$ ), је већа него разлика између  $^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$  и  $^{177}\text{Lu-DTPA-Tr}$  ( $p=0,008$ ). Тест стабилности након 72 сата показао је врло малу разлику у стабилности коњугата са различитим хелаторима обележених са  $^{177}\text{Lu}$ . Иако је  $^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$  показало нешто већу стабилност у односу на друге радиоимунокоњугате, та разлика није статистички значајна ( $p>0,05$ ), па можемо закључити да постоји скоро иста стабилност између радиоимунокоњугата након 72 сата.

Принос обележавања  $^{177}\text{Lu}$  био је већи ( $>99\%$ ) у односу на принос обележавања  $^{90}\text{Y}$  ( $>96\%$ ). Насупрот нашим резултатима, Bhusari и сарадници (195) добили су мањи принос радиообележавања ( $>91\%$ ) за  $^{177}\text{Lu-Tr}$  преко DOТА хелатора при моларним односима 1:5–1:40. Такође принос обележавања ритуксимаба са  $^{177}\text{Lu}$  преко DOТА био је нижи  $\sim 95\%$  односно  $\sim 96\%$  (197,200) у поређењу са нашим резултатима. Blend и сарадници (199) постигли су већи принос обележавања  $>99\%$  трастузумаба са  $^{90}\text{Y}$  користећи DTPA као хелатни агенс.

Резултати ове студије показују већу стабилност  $^{177}\text{Lu-DOТА-Tr}$ , након инкубације од 72 сата у 0,9% физиолошком раствору, у поређењу са сличним студијама. Bhusari и сарадници (195) и Rasaneh и сарадници (200) испитали су стабилност  $^{177}\text{Lu}$  обележених Tr-DOТА у PBS-у на собној температури. 24 сата након инкубације радиохемијска чистоћа комплекса је била  $>87\%$  док је након 96 сати била 93% (195,200), што значи да је стабилност мања у поређењу са нашим радиоимунокоњугатима (радиохемијска чистоћа  $>98,5\%$ ). Највећа стабилност  $^{90}\text{Y}$  обележених имунокоњугата (радиохемијска чистоћа  $>84,90\%$ ), након 72 сата, односно  $>83,24\%$  након 48 сати постигнута је код  $^{90}\text{Y-1B4M-DTPA-Tr}$ . Ово је нижи резултат у поређењу са резултатима испитивањима Blend-а и сарадника (199) код којих је радиохемијска чистоћа  $^{90}\text{Y}$  обележених трастузумаба преко DTPA након 48 сата инкубације у PBS-у  $>97\%$ .



## 6. ЗАКЉУЧАК

На основу свих добијених резултата претходно обрађених и дискутованих изведен је следећи закључак:

Коњугована моноклонска антитела обележена одговарајућим радиоизотопима намењена за дијагностику, а посебно за терапију малигних болести, представљају потенцијални изазов у формулацији нових радиофармака. Избор антитела, радиозотопа и хелатора који ће осигурати њихово стабилно везивање пресудан је за започињање предклиничких, а затим и клиничких испитивања.

У овој докторској тези, коњугати антитела трастузумаба су коришћени за радиоактивно обележавање лутецијумом-177 и итријумом-90.

Испитивања свих имунокоњугата припремљених са три различита хелатора, везаних у различитим односима, показала су сличне резултате, наизглед без значајних разлика. Међутим, након радиоактивног обележавања можемо с правом закључити да после обележавања лутецијумом-177 добијамо препарат који има већи принос обележавања и већу стабилност након 72 сата, у поређењу са итријумом-90.

Овај закључак заснован је на следећим под закључцима донетим након реализације појединачних фаза ове дисертације и то:

1. Комерцијално коришћена антитела након поступка пречишћавања могу се користити за радиоактивно обележавање.
2. Успостављени процес коњугације омогућава добијење имунокоњугата способних да се везују за радиоизотопе у облику одговарајућих формулација.
3. Процес лиофилизације не утиче на структуру и стабилност коњугата, што сугерише да предложени метод лиофилизације може бити погодан за развој чврстих формулација радиофармацеутика заснованих на протеинима.
4. MALDI-TOF MS-ом доказана је успешну коњугација, и то идентификацијом довољног броја молекула хелатора по једном молекулу антитела, што је од велике важности за даљи ток обележавања, а и саме студије.
5. Позитивни електрофоретски резултати и мања разлика у FT-IR и Рамановим спектрима (промене интензитета, недостатак неких пикова ниског интензитета) у поређењу са нативним трастузумабом, показују безначајне промене структуре протеина након коњугације, лиофилизације и обележавања са нерадиоактивним металним јонима. Насупрот томе, присуство карактеристичних амидних трака потврдило је запажање да су лиофилизоване формулације у стању да у потпу-

ности задрже примарну анти-HER2 активност трастузумаба, па су стога погодне за ефикасно обележавање радиоизотопима  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{90}\text{Y}$ , који су инспиративни кандидати за радионуклоидну терапију HER2 позитивног карцинома дојке.

- б. Метода радиоактивног обележавања лиофилизованих имунокоњугата са  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{90}\text{Y}$  показала се успешном са високим приносом радиообележавања. Резултати испитивања стабилности радиоимунокоњугата након 72 сата инкубације такође су задовољавајући јер показују минимално отпуштање радиоизотопа.

Утврђене методе и добијени потенцијални радиофармацеутици у току ових испитивања представљају добру основу за наставак рада у правцу *in vivo* фармакокинетичких студија и испитивања биодистрибуције на анималним моделима, у циљу потврде најадекватније формулације погодне за клиничка испитивања.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Stern M, Herrmann R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Critical Reviews in Oncology/Hemathology* 2005; 54: 11-29.
2. Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human disease at the dawn of the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003; 2(1): 52-61.
3. Bendandi M. Hybridoma-derived idiotype vaccine for lymphoma: Approval must wait. *Pharmaceuticals* 2010; 3(3): 667-78.
4. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12(14): 278-88.
5. Adams GA, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Monoclonal antibody therapy of cancer. Nature Biotechnology* 2005; 23(9):1147-57.
6. Natsume A, Niwa R, Satoh M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Design, Development and Therapy* 2009; 3: 7-16.
7. Mehren M, Adams GA, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annual Review of Medicine* 2003; 54: 343-69.
8. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibody: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Immunology* 2010; 10(5): 317-27.
9. Legouffe E, Liautard J, Gaillard JP, Rossi JF, Wijdendes J, Bataille R, Klein B, Brochier J. Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clinical and Experimental Immunology* 1994; 98(2): 323-9.
10. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical Chemistry* 1999; 45(7): 942-56.
11. Hosono M, et al. Human/mouse chimeric antibodies show low reactivity with human anti-murine antibodies (HAMA). *British Journal of Cancer* 1992; 65(2): 197-200.
12. Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewirz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotechnology* 2005; 23(9): 1073-8.
13. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *mAbs* 2010; 2(3): 256-65.

14. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2(10): 750-63.
15. Beckman RA, Weiner LM, Davis HM. Antibody constructs in cancer therapy. *Cancer* 2007; 109(2): 170-9.
16. Gerber DE. Targeted Therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician* 2008; 77(3): 311-9.
17. Foltz IN, Karow M, Wasserman SM. Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies. *Circulation* 2013; 127(22): 2222-30.
18. Louis MW, Madhav VD, Soldano F. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet* 2009; 373(9668): 1033-40.
19. Malero I, Harvas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll DM, Chen L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nature Review Cancer* 2007; 7(2): 95-106.
20. Ludwig DL, Pereira D, Zhu Z, Hicklin DJ, Bohlen P. Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 9097-106.
21. Zafir-Lavie I, Michaeli Y, Reiter Y. Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene* 2007; 26: 3714-33.
22. Adler MJ, Dimitrov DS. Therapeutic antibodies against cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2012; 26(3): 447-81.
23. Ross JS, Gray K, Gray GS, Worland PJ, Rolfe M. Anticancer antibodies. *American Journal of Clinical Pathology* 2003; 119(4): 472-85.
24. Sharkey RM, Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2006; 56(4): 226-43.
25. Oldham RK, Dillman RO. Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26(11): 1774-7.
26. Payne G. Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2003; 3(3): 207-12.
27. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, Wu HC. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science* 2020; 27: 1-30.

28. Slamon DJ, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine* 2001; 344(11): 783-92.
29. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard M, Ullrich A. p185<sup>HER2</sup> monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular and Cellular Biology* 1989; 9(3): 1165-72.
30. Carter P, et al. Humanization of an anti-p185<sup>HER2</sup> antibody for human cancer therapy. *PNAS* 1992; 89(10): 4285-9.
31. Baselga J. Clinical trials of herceptin (trastuzumab). *European Journal of Cancer* 2001; 37(1): S18-S24.
32. Harries M, Smith I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine-Related Cancer* 2002; 9(2): 75-85.
33. Gennari R, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clinical Cancer Research* 2004; 10(17): 3650-5.
34. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of Oncology* 2007; 18(6): 977-84.
35. Hudis GA. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *New England Journal of Medicine* 2007; 357(1): 39-51.
36. Baselga J, Albanell J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Annals of Oncology* 2001; 12(1): S35-S41.
37. Varricchi G, et al. Antineoplastic drug-induced cardiotoxicity: A redox perspective. *Frontiers in Physiology* 2018; 9(167): 1-18.
38. Brennan PJ, Kumagai T, Berezov A, Murali R, Greene MI. HER2/neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene* 2000; 19(53): 6093-101.
39. Scott GK, et al. A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology* 1993; 13(4): 2247-57.
40. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The erbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO Journal* 2000; 19(13): 3159-67.

41. Garrett TPJ, et al. The crystal structure of a truncated erbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other erbB receptors. *Molecular Cell* 2003; 11(2): 495-505.
42. Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008; 65(10): 1566-84.
43. Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *PNAS* 1993; 90(5): 1746-50.
44. DeFazio-Eli L, Strommen K, Dao-Pick T, Parry G, Goodman L, Winslow J. Quantitative assays for the measurement of HER1-HER2 heterodimerization and phosphorylation in cell lines and breast tumors: applications for diagnostics and targeted drug mechanism of action. *Breast Cancer Research* 2011; 13(2): 1-18.
45. Spears M, et al. In situ detection of HER2:HER2 and HER2:HER3 protein-protein interactions demonstrates prognostic significance in early breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012; 132(2): 463-70.
46. Steffensen KD, Waldstrom M, Andersen RF, Olsen DA, Jeppesen U, Knudsen HJ, Brandslund I, Jakobsen A. Protein levels and gene expressions of the epidermal growth factor receptors, HER1, HER2, HER3 and HER4 in benign and malignant ovarian tumors. *International Journal of Oncology* 2008; 33(1): 195-204.
47. Allen SD, et al. Peptide vaccines of the HER-2/neu dimerization loop are effective in inhibiting mammary tumor growth in vivo. *Journal of Immunology* 2007; 179(1): 472-82.
48. Carter WB, Hoying JB, Boswell C, Williams SK. HER2/neu over-expression induces endothelial cell retraction. *International Journal of Cancer* 2001; 91(3): 295-9.
49. Lowery AL, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2009; 11(3): 1-18.
50. Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer research* 1991; 51: 944-8.
51. Berns EMJJ, Klijn JGM, Putten WLJV, Staveren ILV, Portengen H, Foekens JA. c-myc amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Research* 1992; 52(5): 1107-13.

52. Hoff ER, Tubbs RR, Myles JL, Procop GW. HER2/neu amplification in breast cancer – stratification by tumor type and grade. *American Journal of Clinical Pathology* 2002; 117(6): 916-21.
53. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Cancer* 2006; 6(9): 714-27.
54. Bari SB, Adhikari S, Surana SJ. Tyrosine kinase receptor inhibitors: a new target for anticancer drug development. *Journal of PharmSciTech* 2012; 1(2): 36-45.
55. Kolibaba KS, Druker BJ. Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1333: F217-48.
56. Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. Smart drugs: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 2002; 1(2): 117-23.
57. Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase-Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences* 2004; 1(2): 101-15.
58. Hanks SK, Hunter T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB Journal* 1995; 9(8): 576-96.
59. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103(2):211-25.
60. Hunter T. Signaling-2000 and beyond. *Cell* 2000; 100(1): 113-27.
61. Maruyama I.N. Mechanism of action of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cells* 2014; 3(2): 304-30.
62. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000; 19(49): 5548-57.
63. Cadena DL, Gill NG. Receptor tyrosine kinases. *FASEB Journal* 1992; 6(6): 2332-7.
64. Ogiso H, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002; 110(6): 775-87.
65. Stamos J, Sliwkowski MX, Eligenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(48): 46265-72.
66. Pautsch A, Zoephel A, Ahom H, Spevak W, Hauptmann R, Nar H. Crystal structure of bisphosphorylated IGF-1 receptor kinase: insight into domain movements upon kinase activation. *Structure* 2001; 9(10): 955-65.
67. Kwak EL, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non–small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2010; 363(18): 1693-703.

68. Patrick CM, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, Johnson BE, Salgia R. c-met mutation analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Research* 2003; 63(19): 6272-81.
69. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 2009; 61(9): 915-22.
70. Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular Cell* 2004; 13(2): 169-78.
71. Johnson DE, Lee PL, Lu J, Williams T. Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factor. *Molecular and Cellular Biology* 1990; 10(9):4728-36.
72. Larson SM, Carrasquillo JA, Cheung NV, Press O. Radioimmunotherapy of human tumors. *Nature Reviews Cancer* 2015; 15(6): 347-60.
73. Kawashima H. Radioimmunotherapy: a specific treatment protocol for cancer by cytotoxic radioisotopes conjugated to antibodies. *Scientific World Journal* 2014; 2014: 1-10.
74. Sharkey RM, Goldenberg DM. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy* 2011; 3(3):349-70.
75. Smaglo BG, Aldeghaither D, Weiner LM. The development of immunoconjugates for targeted cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2014; 11(11): 637-48.
76. Kairemo KJA. Radioimmunoconjugates of solid cancers: A review. *Acta Oncologica* 1996; 35(3): 343-55.
77. Tagawa ST, et al. Anti-prostate specific membrane antigen-based radioimmunotherapy for prostate cancer. *Cancer* 2010; 116(4): 1075-83.
78. Gule MK, et al. Targeted therapy of VEGFR2 and EGFR significantly inhibits growth of anaplastic thyroid cancer in an orthotopic murine model. *Clinical Cancer Research* 2011; 17(8): 2281-91.
79. Rao AV, Akabani G, Rizzieri DA. Radioimmunotherapy for Non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Medicine and Research* 2005; 3(3): 157-65.
80. Kassis AI. Therapeutic radionuclides: biophysical and radiobiologic principles. *Seminars in Nuclear Medicine* 2008; 38(5): 358-66.
81. Boswell CA, Brechbiel MW. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nuclear Medicine and Biology* 2007; 34(7): 757-78.



82. Macklis RM, et al. Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. *Science* 1988; 240(4855): 1024-6.
83. Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60(12): 1347-70.
84. Pandey U, Gamre N, Chakravarty R, Pillai MRA, Dash A. Investigation on the influence of metal ion impurities on the complexation behavior of generator produced  $^{90}\text{Y}$  with different bifunctional chelators. *Radiochimica Acta* 2014; 102(10): 947-54.
85. Dash A, Pillai MRA, Knapp FF. Production of  $^{177}\text{Lu}$  for targeted radionuclide therapy: available options. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2015; 49(2): 85-107.
86. Meares CF, et al. Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy. *British Journal of Cancer* 1990; 62(10): 21-6.
87. Sarko D, Eisenhut M, Haberkorn U, Miler W. Bifunctional chelators in the design and application of radiopharmaceuticals for oncological diseases. *Current Medicinal Chemistry* 2012; 19(17): 2667-88.
88. Kukis DL, DeNardo SJ, DeNardo GL, O'Donnell RT, Meares CF. Optimized conditions for chelation of Yttrium-90-DOTA immunoconjugates. *Journal of Nuclear Medicine* 1998; 39(12): 2105-10.
89. Deshpande SV, DeNardo SJ, Kukis DL, Moi MK, McMall MJ, DeNardo GL, Meares CF. Yttrium-90-labeled monoclonal antibody for therapy: labeling by a new macrocyclic bifunctional chelating agent. *Journal of Nuclear Medicine* 1990; 31(4): 473-9.
90. Chong HS, et al. Synthesis and comparative biological evaluation of bifunctional ligands for radiotherapy applications of  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$ . *Bioorganic and Medical Chemistry* 2015; 23(5): 1169-78.
91. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics and applications. *Chemical Reviews* 1999; 99(9): 2293-352.
92. Emami F, Vatanara A, Park EJ, Na DH. Drying technologies for the stability and bioavailability of biopharmaceuticals. *Pharmaceutics* 2018; 10(3): 1-22.
93. Chang L, Pikal MJ. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 98(9): 2886-908.

94. Kett V, McMahon D, Ward K. Freeze-drying of protein pharmaceuticals-the application of the thermal analysis. *Cryo Letters* 2004; 25(6): 389-404.
95. Joshi AJ. A review and application of cryoprotectant: the science of cryonics. *PharmaTutor* 2016; 4(1): 12-8.
96. Das UK, Bordoloi R, Ganguly S. Freeze-drying technique and its wide application in biomedical and pharmaceutical sciences. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences* 2014; 2(3): 01-04.
97. Shukla S. Freeze drying process: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2011; 2(12): 3061-8.
98. Kawasaki H, Shimanouchi T, Kimura Y. Recent development of optimization of lyophilization process. *Journal of Chemistry* 2019; 2019: 1-14.
99. Ramezani V, Vatanara A, Najafabadi AR, Shokrgozar MA, Khabiri A, Seyedabadi M. A comparative study on the physicochemical and biological stability of IgG1 and monoclonal antibodies during spray drying process. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 22(1): 1-7.
100. Abdul-Fattah AM, Truong-Le V, Yee L, Nguyen L, Kalonia DS, Cicerone MT, Pikal MJ. Drying-induced variation in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability (I): stability of a monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 96(8): 1983-2008.
101. Haeuser C, Goldbach P, Huwyler J, Friess W, Allmendinger A. Be aggressive! Amorphous excipients enabling single-step freeze-drying of monoclonal antibody formulations. *Pharmaceutics* 2019; 11(616): 1-16.
102. ICH Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, Q6B. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
103. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics* 2014; 6(5): 1068-78.
104. Stellwagen NC. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* 2009; 30(Suppl1): S188-95.
105. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.

106. Lu C, Liu D, Liu H, Motchnik P. Characterization of monoclonal antibody size variants containing extra light chains. *mAbs* 2013; 5(1): 102-13.
107. Kirley TL, Norman AB. Unfolding of IgG domains detected by non-reducing SDS-PAGE. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018; 503(2): 944-9.
108. Kirley TL, Greis KD, Norman AB. Domain unfolding of monoclonal antibody fragments revealed by non-reducing SDS-PAGE. *Biochemistry and Biophysics Reports* 2018; 16(2018): 138-44.
109. Li L, Kalaga R, Paul S. Proteolytic components of serum IgG preparations. *Clinical and Experimental Immunology* 2000; 120(2): 261-6.
110. Rizner TL. Teaching the structure of immunoglobulins by molecular visualization and SDS-PAGE analysis. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2014; 42(2): 152-9.
111. Ravindran R, et al. Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to indian kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infection and Immunity* 2004; 72(2): 863-70.
112. Penha TR, Kruger ER, Thomaz-Soccol V, Agottani JVB, Itano FH, Troiano LDC, Brodzinski J. Production and characterization of monoclonal antibodies and fragment Fc of bovine IgG. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2010; 53(1): 105-14.
113. Hashimoto K, Badarla VR, Kawai A, Ideguchi T. Complementary vibrational spectroscopy. *Nature Communications* 2019; 10(4411): 1-6.
114. Roberts J, Power A, Chapman J, Chandra S, Cozzolino D. The use of UV-Vis spectroscopy on bioprocess and fermentation monitoring. *Fermentation* 2018; 4(18):1-8.
115. Barth A, Zscherp C. What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 2002; 35(4): 369-430.
116. Cote Y, Nomine Y, Ramirez J, Hellwig P, Stote RH. Peptide-protein binding investigated by Far-IR spectroscopy and molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal* 2017; 112(12): 2575-88.
117. Fournier F, et al. Protein identification and quantification by two-dimensional infrared spectroscopy: implications for an all-optical proteomic platform. *PNAS* 2008; 105(40): 15352-7.

118. Usoltev D, Sitnikova V, Kajava A, Uspenskaya M. Systematic FTIR spectroscopy study of the secondary structure changes in human serum albumin under various denaturation conditions. *Biomolecules* 2019; 8(359): 1-17.
119. Baird G, Farrell C, Cheung J, Semple A, Blue J, Ahl PL. FTIR spectroscopy detects intermolecular  $\beta$ -sheet formation above the high temperature  $T_m$  for two monoclonal antibodies. *Protein Journal* 2020; 39(4): 318-27.
120. Kristoffrsen KA, Amerongen A, Bocker U, Lindbrg D, Wubshet SG, Bosch HV, Horn SJ, Afseth NK. Four-transform infrared spectroscopy for monitoring proteolytic reactions using dry-film treated with trifluoroacetic acid. *Scientific Reports* 2020; 10: 1-10.
121. Boulet-Audet M, Kazarian SG, Byrne B. In-column ATR-FTIR spectroscopy to monitor affinity chromatography purification of monoclonal antibodies. *Scientific Reports* 2016; 6: 1-13.
122. Bumbrah GS, Sharma RM. Raman spectroscopy – basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 2016; 6(3): 209-15.
123. Kumamoto Y, Harada Y, Takamatsu T, Tanaka H. Label-free molecular imaging and analysis by raman spectroscopy. *Acta Histochemica et Cytochemica* 2018; 51(3): 101-10.
124. Jones RR, Hooper DC, Zhang L, Wolverson D, Valev VK. Raman techniques: fundamentals and frontiers. *Nanoscale Research Letters* 2019; 14(231): 1-34.
125. Ember KJI, et al. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *NJP Regenerative Medicine* 2017; 2(12): 1-10.
126. Mogilevsky G, Borland L, Bricckhouse M, Fountain AW. Raman spectroscopy for homeland security applications. *International Journal of Spectroscopy* 2012; 2012:1-12.
127. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6(791): 1-16.
128. Tscheuschner G, Schwaar T, Weller MG. Fast confirmation of antibody identity by MALDI-TOF-MS fingerprints. *Antibodies* 2020; 9(2): 1-17.
129. Bonk T, Humeny A. MALDI-TOF MS analysis of protein and DNA. *Neuroscientist* 2001; 7(1): 6-12.

130. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis* 2019; 27(2): 404-14.
131. Feucherolles M, Poppert S, Utzinger J, Becker SL. MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review. *Parasites and Vectors* 2019; 12(245): 1-13.
132. Rakotonirina A, et al. MALDI-TOF-MS: optimization for future uses in entomological surveillance and identification of mosquitoes from New Caledonia. *Parasites and Vectors* 2020; 13(359): 1-12.
133. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26(3): 547-603.
134. Hortin GL, Remaley AT. Mass determination of major plasma proteins by Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Proteomics* 2006; 2(1): 103-15.
135. Van der Burgt YEM, Kilgour DPA, Tsybin YO, Srzentic K, Forneli L, Beck A, Wuhrer M, Nicolardi S. Structural analysis of monoclonal antibodies by ultrahigh resolution MALDI in-source decay FT-ICR mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2019; 91(3): 2079-85.
136. Clark CM, Costa MS, Sanchez LM, Murphy BT. Coupling MALDI-TOF mass spectrometry protein and specialized metabolite analyses to rapidly discriminate bacterial function. *PNAS* 2018; 115(19): 4981-6.
137. Leopold J, Popkova Y, Engel KM, Schiller J. Recent development of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of lipids. *Biomolecules* 2018; 8(173): 1-25.
138. Thammana M. A review of high performance liquid chromatography (HPLC). *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis* 2016; 5(2): 22-8.
139. Neupane R, Bergquist J. Analytical techniques for the characterization of Antibody Drug Conjugates: Challenges and prospects. *European Journal of Mass Spectroscopy* 2017; 23 (6): 417-26
140. Tompkins J, Spurgeon T, Tobias R, Andres J, Butler-Roberts E, Adomaitis M. Validation of a dual wavelength size exclusion HPLC method with improved sensitivity to detect aggregates of a monoclonal antibody biotherapeutic. *Eurofins BioPharma Product Testing* 2017; 9425: 1-5.

141. Regl C, Wohlschlager T, Esser-Skala W, Wagner I, Samonig M, Holzmann J, Huber CG. Dilute-and-shoot analysis of therapeutic monoclonal antibody variants in fermentation broth: a method capability study. *mAbs* 2019; 11(3): 569-82.
142. Preston GW, Phillips DH. Quantification of a peptide standard using the intrinsic fluorescence of tyrosine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016; 408: 2187-93.
143. Ferreira IMPLVO, Mendes E, Ferreira MA. HPLC/UV analysis of proteins in a dairy products using a hydrophobic interaction chromatographic column. *Analytical Sciences* 2001; 17: 499-501.
144. Hesse A, Weller MG. Protein quantification by derivatization-free high-performance liquid chromatography of aromatic amino acids. *Journal of Amino Acids* 2016; 2016: 1-8.
145. Chhetri HP, Thapa P, Schepdael AV. Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2014; 22(5): 483-7.
146. Bond MD, et al. Evaluation of a dual-wavelength size exclusion HPLC method with improved sensitivity to detect protein aggregates and its use to better characterize degradation pathways of an IgG1 monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99(6): 2582-97.
147. Yang Y, Strahan A, Li C, Shen A, Liu H, Ouyang J, Katta V, Francissen K. Detecting low level sequence variants in recombinant monoclonal antibodies. *mAbs* 2010; 2(3): 285-98.
148. Regl C, Wohlschlager T, Holzmann J, Huber CG. A generic HPLC method for absolute quantification of oxidation in monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins using UV and MS detection. *Analytical Chemistry* 2017; 89(16): 8391-8.
149. Ullah H, Ahmad I, Khattak MR, Shah S, Ahmad S, Khan K, Ahmad SZ. Evaluation of radiochemical purity of routinely used radiopharmaceuticals: Three years' experience of a single institute. *Iranian Journal of Nuclear Medicine* 2018; 27(1): 19-25.
150. Yousefnia H, Jalilian AR, Zolghadri S, Bahrami-Samani A, Shirvani-Arani S, Ghannadi-Maragheh M. Preparation and quality control of Lutetium-177 bleomycin as a possible therapeutic agent. *Nukleonika* 2010; 55(3): 285-91.

151. Jeon YH, Cho YH, Jung JH, Choi JH. Quality control of radiochemical purity and safety of  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP and  $^{99m}\text{Tc}$ -phytate adiohamaceuticals labelig. International Journal of Radiation Research 2020; 18(1): 179-83.
152. Ekoume FP, Boersma HH, Zok FD, Rubow SM. Validation of a cost-effective alternative for a radiochromatography method to be used in a developing country. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry 2020; 5(9): 1-14.
153. Bornholdt MG, Woelfel KM, Fang P, Jacobson MS, Hung JC. Rapid instant Thin-Layer chromatography system for determining the radiochemical purity of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE. Journal of Nuclear Medicine Technology 2018; 46(3): 285-7.
154. Aslani A, Snowdon GM, Bailey DL, Schembri GP, Bailey EA, Pavlakis N, Roach PJ. Lutetium-177 DOTATATE production with an automated radiopharmaceutical synthesis system. Asia Oceania Journal of Nuclear Medicine and Biology 2015; 3(2): 107-15.
155. Kowalsky RJ, Creekmore JR. Technical artifacts in chromatographic analysis of Tc-99m radiopharmaceuticals. Journal of Nuclear Medicine Technology 1982; 10(1): 15-9.
156. Gjorgieva-Ackova D, Smilkov K, Janevik-Ivanovska E. Formulation and characterization of “ready to use”  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-rituximab for Lu-177 labeling. World Journal of Medical Sciences 2014; 11(4): 535-40.
157. Hooge MNL, et al. Preclinical characterization of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab. British Journal of Pharmacology 2004; 143(1): 99-106.
158. Chen WJ, Yen CL, Lo ST, Chen KT, Lo JM. Direct  $^{99m}\text{Tc}$  labeling of Herceptin (trastuzumab) by  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  tricarbonyl ion. Applied Radiation and Isotopes 2008; 66(3): 340-5.
159. Alirezapour B, Jalilian AR, Bolourinovin F, Moradkhani S. Production and quality control of  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-trastuzumab for radioimmunoscintigraphy. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2013; 12(2): 355-66.
160. Palm S, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of  $^{86}\text{Y}$ -trastuzumab for  $^{90}\text{Y}$  dosimetry in an ovarian carcinoma model: correlative MicroPET and MRI. Journal of Nuclear Medicine 2003; 44(7): 1148-55.
161. Rasaneh S, Rajabi H, Akhlaghpour S, Sheybani S. Radioimmunotherapy of mice bearing breast tumor with  $^{177}\text{Lu}$ -labeled trastuzumab. Turkish Journal of Medical Sciences 2012; 42(1): 1292-8.

162. Cooper MS, Ma MT, Sunassee K, Shaw KP, Williams JD, Paul RL, Donnelly PS, Blower PJ. Comparison of  $(64)\text{Cu}$ -complexing bifunctional chelators for radioimmunoconjugation: labeling efficiency, specific activity and in vitro/in vivo stability. *Bioconjugate Chemistry* 2012; 23(5): 1029-39.
163. Beardsley DS, Spiegel JE, Jacobs MM, Handin RI, Lux SE. Platelet membrane glycoprotein IIIa contains target antigens that bind anti-platelet antibodies in immune thrombocytopenias. *Journal of Clinical Investigation* 1984; 74(5): 1701-7.
164. Wojdowska W, Karczmarczyk U, Maurin M, Garnuszek P, Mikołajczak R. Standardization of procedures for the preparation of  $^{177}\text{Lu}$ - and  $^{90}\text{Y}$ -labeled DOTA-rituximab based on the freeze-dried kit formulation. *Current Radiopharmaceuticals* 2015; 8(1): 62-8.
165. Wakankar A, Chen Y, Gokarn Y, Jacobson FS. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *mAbs* 2011; 3(2): 161-72.
166. Schjoeth-Eskesen C, Nielsen CH, Heissel S, Hojrup P, Hansen PR, Gillings N, Kjaer A. [ $^{64}\text{Cu}$ ]-labelled trastuzumab: optimization of labelling by DOTA and NODAGA conjugation and initial evaluation in mice. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2015; 58(6): 227-33.
167. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability and formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 96(1): 1-26.
168. Chang BS, Patro SY, 2004. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals. In: *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. American Association of Pharmaceutical Scientists, pp. 113-38.
169. Tang XT, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice. *Pharmaceutical Research* 2004; 21(2): 191-200.
170. Izutsu K, Yoshioka S, Terao T. Effect of mannitol crystallinity of the stabilization of enzymes during freeze-drying. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1994; 42(1): 5-8.
171. Nounou MM, El-khordagui L, Khallafallah N, Khalil S. Influence of different sugar cryoprotectants on the stability and physico-chemical characteristics of freeze-dried 5-fluorouracil plurilamellar vesicles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 13(4): 133-42.
172. Vlasak J, Ionescu R. Fragmentation of monoclonal antibodies. *mAbs* 2011; 3(3): 253-63.



173. Nebija D, Noe CR, Urban E, Lachmann B. Quality control and stability studies with the monoclonal antibody, trastuzumab: Application of 1D-vs. 2D-gel electrophoresis. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; 15(4): 6399-411.
174. Milenic DE, Baidoo KE, Brechbiel MW. Bench to bedside: Stability studies of GMP produced trastuzumab-TCMC in support of a clinical trial. *Pharmaceuticals* 2015; 8(3): 435-54.
175. Pabari RM, Ryan B, Ahmad W, Ramtoola Z. Physical and structural stability of the monoclonal antibody, trastuzumab (herceptin<sup>®</sup>), intravenous solutions. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2013; 14(2): 220-5.
176. Vermeer AWP, Norde W. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophysical Journal* 2000; 78(1): 394-404.
177. Degardin K, Desponds A, Roggo Y. Protein-based medicines analysis by Raman spectroscopy for the detection of counterfeits. *Forensic Science International* 2017; 278: 313-25.
178. Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *Journal of Molecular Biology* 1998; 275(5): 861-72.
179. Kengne-Momo RP, Daniel P, Lagarde F, Jeyachandran YL, Pilard JF, Durand-Thouand MJ, Thouand G. Protein interactions investigated by the Raman spectroscopy for biosensor applications. *International Journal of Spectroscopy* 2012; 2012: 1-7.
180. Wen ZQ. Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 96(11): 2861-78.
181. Baker AE, Mantz AR, Chiu ML. Raman spectroscopy characterization of antibody phases in serum. *mAbs* 2014; 6(6): 1509-17.
182. Paudel R, Raijada D, Rantanen J. Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2015; 89: 3-20.
183. Tuma R. Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. *Journal of Raman Spectroscopy* 2005; 36(4): 307-19.
184. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 2007; 1767(9): 1073-101.
185. Krimm S. Vibrational analysis of conformation in peptides, polypeptides and proteins. *Biopolymers* 1983; 22(1): 217-25.

186. Fu F, DeOliveira DB, Trumble WR, Sarkar HK, Singh BR. Secondary structure estimation of protein using the amide III region of fourier transform infrared spectroscopy: application to analyze calcium-binding-induced structural changes in calsequestrin. *Applied Spectroscopy* 1994; 48(11): 1432-41.
187. Wang Y, Boysen RI, Wood BR, Kansiz M, McNaughton D, Hearn MTW. Determination of the secondary structure of proteins in different environments by FTIR-ATR spectroscopy and PLS regression. *Biopolymers* 2008; 89(11): 895-905.
188. Gjorgieva Ackova D, Smilkov K, Janevik-Ivanovska E, Stafilov T, Arsova-Sarafinovska Z, Makreski P. Evaluation of non-radioactive Lutetium- and Yttrium-labeled immunoconjugates of rituximab – a vibrational spectroscopy study. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 2015; 34(2): 351-62.
189. Takeuchi H. UV Raman markers for structural analysis of aromatic side chain in proteins. *Analytical Sciences* 2011; 27(11): 1077-86.
190. Liu H, May K. Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *mAbs* 2012; 4(1): 17-23.
191. Cuesta RG, Goodacre R, Ashton L. Monitoring antibody aggregation in early drug development using raman spectroscopy and perturbation-correlation moving windows. *Analytical Chemistry* 2014; 86(22): 11133-40.
192. Schule S, Frieb W, Bechtold-Peters K, Garidel P. Conformational analysis of protein secondary structure during spray-drying of antibody/mannitol formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 65(1): 1-9.
193. Fabian H, Mantele W, 2002. Infrared spectroscopy of proteins. In: Chalmers JM, Griffiths PR (Eds.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 3399-426.
194. Gjorgieva Ackova D, Smilkov K, Janevik-Ivanovska E. Physicochemical evaluation of lyophilized formulation of *p*-SCN-Bn-DTPA- and *p*-SCN-Bn-DOTA-rituximab for NHL radio immunotherapy. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2016; 15(3): 295-302.
195. Bhusari P, Vatsa R, Singh G, Parmar M, Bal A, Dhawan DK, Mittal BR, Shukla J. Development of Lu-177-trastuzumab for radioimmunotherapy of HER2 expressing breast cancer and its feasibility assessment in breast cancer patients. *International Journal of Cancer* 2017; 140(4): 938-47.

196. Benedetto R, Massicano AVF, Silvia JJ, Boas CAWV, Mengatti J, Araujo EB. Development of radioimmunoconjugate for diagnosis and management of head-and-neck subclinical cancer and colorectal carcinoma. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017; 53(4): 1-10.
197. Thakral P, Singla S, Yadav MP, Vashist A, Sharma A, Gupta SK, Snehlata B, Malhotra A. An approach for conjugation of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-SCN-Rituximab (BioSim) & its evaluation for radioimmunotherapy of relapsed & refractory B-cell non Hodgkins lymphoma patients. *Indian Journal of Medical Research* 2014; 139(4): 544-54.
198. Engin E, Karasulu E, Ertas H. Assessment of HPLC-FLD method for determination of trastuzumab. *Journal of Science and Technology* 2019; 12(1): 517-26.
199. Blend MJ, Stastny JJ, Swanson SM, Breshbiel MW. Labeling anti-HER2/neu monoclonal antibodies with  $^{111}\text{In}$  and  $^{90}\text{Y}$  using a bifunctional DTPA chelating agent. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2003; 18(3): 355-63.
200. Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Daha FJ, Salouti M. Radiolabeling of trastuzumab with  $^{177}\text{Lu}$  via DOTA, a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nuclear Medicine and Biology* 2009; 36(4): 363-9.

## **Биографија аутора**

Марија С. Арев је рођена 27.11.1984.

Средњу школу је завршила у 2003, у Штипу (Македонија) са максималним успехом.

Фармацеутски факултет, Универзитета Св. Кирила и Методија, у Скопљу (Македонија), завршила је јула 2008. године са просечном оценом 8,35.

Докторске академске студије уписала је 2019/2020. године на Медицинском факултету Универзитета у Нишу.

У периоду 2009–2010. била је радно ангажована у ПЗУ – Апотека „Јака 80“, у периоду 2010–2011. у ПЗУ – Апотека „Еурофарм“ и у периоду 2011–2012. у Апотеци „Видафи“.

Од 13.12.2012. до данас ради као асистент на Факултету медицинских наука, на Универзитету „Гоце Делчев“ у Штипу, на предметима Фармацеутска хемија 1, 2, 3 и Биоорганска хемија.

Успешно је учествовала на бројним стручним семинарима, радионицама и конгресима.

Члан је Фармацеутске Коморе Македоније.

Поред матерњег македонског језика, активно користи енглески и српски језик.

Поседује потребне рачунарске вештине.

Удата је и мајка је једног детета.

## Изјава 1.

### ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**ФОРМУЛАЦИЈА И ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА  
ЛИОФИЛИЗОВАНИХ И РАДИООБЕЛЕЖЕНИХ ИМУНОКОЊУГАТА  
ТРАСТУЗУМАБА**


која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу,

Потпис аутора дисертације:



Марија С. Арев

## Изјава 2.

### ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

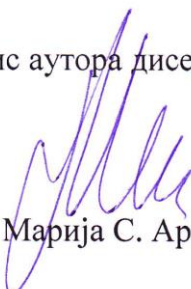
Наслов дисертације:

#### ФОРМУЛАЦИЈА И ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЛИОФИЛИЗОВАНИХ И РАДИООБЕЛЕЖЕНИХ ИМУНОКОЊУГАТА ТРАСТУЗУМАБА

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу,

Потпис аутора дисертације:



Марија С. Арев

### Изјава 3.

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

#### **ФОРМУЛАЦИЈА И ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЛИОФИЛИЗОВАНИХ И РАДИООБЕЛЕЖЕНИХ ИМУНОКОЊУГАТА ТРАСТУЗУМАБА**

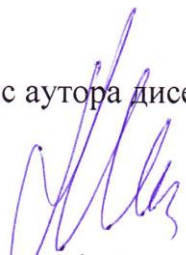
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)<sup>1</sup>

У Нишу,

Потпис аутора дисертације:



Марија С. Арев

---

<sup>1</sup> Аутор дисертације обавезан је да изабере и означи (заокружи) само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста.