

**Vasta-ainelääkekonjugaattien toiminta,  
ongelmakohtat ja mekanismit syöpäkudoksen  
ulkopuolisen toksisuuden vähentämiseen**

LuK-tutkielma  
Turun yliopisto  
Bioteknologian laitos  
Biokemia

Laatija:  
Johanna Vill

19.4.2026  
Turku

Kandidaatintutkielma

**Tutkinto-ohjelma, oppiaine:** Biokemia

**Tekijä:** Johanna Vill

**Otsikko:** Vasta-ainelääkekonjugaattien toiminta, ongelmakohdat ja mekanismit syöpäkudoksen ulkopuolisen toksisuuden vähentämiseen

**Ohjaaja:** Hanna Sanmark

**Sivumäärä:** 36 sivua

**Päivämäärä:** 19.04.2026

Vasta-ainelääkekonjugaatit (engl. antibody-drug conjugate, ADC) ovat syövän hoitoon kehitettyjä täsmälääkkeitä, jotka koostuvat pääsääntöisesti kolmesta osasta: vasta-aineesta, linkkeristä ja sytotoksisesta yhdisteestä. ADC:t hyödyntävät vasta-aineita syöpäsolun tunnistuksessa, ja vapauttavat sytotoksisen yhdisteen siirryttyään soluun reseptorivälitteisellä endosytoosilla. ADC:t ovat osoittaneet hyvää hoitotehoa useisiin syöpiin, mutta niiden aiheuttamat sivuvaikutukset ovat mittavia. Suuret sivuvaikutukset suhteessa lääkkeen tehoon tarkoittaa matalaa terapeutista indeksia. Matala terapeutinen indeksi johtuu mm. ADC-lääkkeiden aiheuttamasta kohdekudoksen ulkopuolisesta toksisuudesta, ennenaikaisesta lääkkeen vapautumisesta sekä puutteellisuudesta kohdekudokseen tunkeutumisessa.

Useita ratkaisuja vasta-ainelääkekonjugaattien terapeutisen indeksin nostamiseksi on tutkittu ja kehitetty. ADC-lääkkeiden stabiilisuutta voidaan esimerkiksi lisätä tiosukkinimidikonjugaation hydrolyysillä tai PEGylaatiolla. Lääke-vasta-ainesuhteen optimointi esimerkiksi THIOMAB-XTEN-menetelmällä lisää ADC-lääkkeiden tehokkuutta, ja bispesifiset vasta-aineet sekä vapaisiin sytotoksiin yhdisteisiin sitoutuvat vasta-aineet vähentävät kohdekudoksen ulkopuolista toksisuutta. Myös innovatiivisimpia menetelmiä, kuten UV-kontrolloituja vasta-ainelääkekonjugaatteja, on tutkittu ADC-lääkkeiden terapeutisen indeksin parantamiseen.

ADC-lääkkeiden potentiaali on merkittävä, ja niiden uskotaan vaikuttavan merkittävästi syöpähoitojen mahdollisuuksiin. Tällä hetkellä FDA-hyväksytyjä vasta-ainelääkekonjugaatteja on 14, ja kymmeniä uusia ADC-lääkkeitä on jo faasin III kliinisissä tutkimuksissa.

**Avainsanat:** Vasta-ainelääkekonjugaatti, ADC, biologinen syöpälääke, täsmälääke, kohdekudoksen ulkopuolinen toksisuus, terapeutinen indeksi

# Sisällysluettelo

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Vasta-ainelääkekonjugaatit eli ADC</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Rakenne</b>	<b>8</b>
2.1.1	Monoklonaalinen vasta-aine	8
2.1.2	Linkkeri	9
2.1.3	Sytotoksinen yhdiste	10
2.1.4	Konjugaatio	11
<b>2.2</b>	<b>Toiminta</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Vasta-ainelääkekonjugaattien ongelmakohdat</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Kohdekudoksen ulkopuolinen toksisuus</b>	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Ennenaikainen lääkkeen vapautuminen</b>	<b>15</b>
<b>3.3</b>	<b>Puutteellisuus kasvainkudokseen tunkeutumisessa</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>Ratkaisut vasta-ainelääkekonjugaattien ongelmakohtiin</b>	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>Tiosukkinimidikonjugaation hydrolyysi</b>	<b>18</b>
<b>4.2</b>	<b>PEGylaatio</b>	<b>20</b>
<b>4.3</b>	<b>Lääke-vasta-ainesuhteen optimointi ja kohdespesifinen konjugaatio</b>	<b>21</b>
4.3.1	THIOMAB-menetelmä	21
4.3.2	XTEN-polypeptidit	22
<b>4.4</b>	<b>Bispesifiset vasta-aineet</b>	<b>23</b>
<b>4.5</b>	<b>UV-kontrolloidut vasta-ainelääkekonjugaatit</b>	<b>24</b>
<b>4.6</b>	<b>Vapaat sytotoksiseen yhdisteeseen sitoutuvat vasta-aineet</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>Yhteenveto</b>	<b>26</b>
	<b>Lähteet</b>	<b>27</b>

# 1 Johdanto

Syövän lääkehoito alkoi 1900-luvun alussa kemoterapialla, jonka perustajana pidetään saksalaista tutkijaa Paul Ehrlichia (DeVita ja Chu 2008; Valent ja muut 2016). Kemoterapia tarkoittaa syövän lääkehoitoa sytotoksisilla yhdisteillä systeemisen verenkierron välityksellä (Qazi 2023). Ennen lääkehoidon kehittymistä syövän ainoana hoitomekanismina oli leikkaushoito sekä sädehoito. Nykyään syövän hoitoon on useampia hoitomuotoja, joista valitaan potilaalle yksilöllisesti sopivin hoito tai hoitomuotojen yhdistelmä. Näitä hoitomuotoja ovat kemoterapian, leikkaushoidon sekä sädehoidon lisäksi muun muassa immuunihoito, hormonihoito sekä täsmähoito. Myös muita, uudenlaisia syövän hoitomuotoja on käytössä (Kaur ja muut 2023). Näitä ovat esimerkiksi geeniterapia, kantasoluhoito sekä nanopartikkeleihin perustuva hoito.

Useissa potilastapauksissa kemoterapia on pääasiallinen hoitomuoto syövän hoidossa (Alfarouk ja muut 2015; McPhail ja muut 2024). Kemoterapiassa sytotoksiset yhdisteet vaikuttavat negatiivisesti syöpäkudoksen lisäksi normaaleihin, terveisiin soluihin, minkä vuoksi kemoterapia aiheuttaa elimistölle ja potilaalle laajoja sivuvaikutuksia (Corrie 2008). Koska kemoterapian laajat sivuvaikutukset aiheutuvat puuttuvasta kohdespesifisyydestä syöpäkudokseen, on etenkin viime vuosikymmeninä tutkittu ja kehitetty syövän täsmälääkkeitä (Chari 2008). Täsmälääkkeet eli biologiset syöpälääkkeet perustuvat pieniin molekyyliin tai monoklonaalisiin vasta-aineisiin, jotka tunnistavat syöpäsoluille spesifisiä rakenteita (Qazi 2023). Näin syöpälääkkeiden vaikutus normaaleihin, terveisiin soluihin olisi mahdollisimman vähäistä ja syöpälääkkeiden terapeuttista indeksia saataisiin nostettua (Trail ja muut 2003). Lääkeaineiden terapeuttinen indeksi tarkoittaa lääkeaineen toksisen pitoisuuden suhdetta siihen lääkeaineen pitoisuuteen, joka aiheuttaa tarpeeksi tehokkaan halutun vasteen (Y.-S. Chen ja muut 2024). Terapeuttinen indeksi toimii siis lääkeaineen turvallisuutta määrittävänä arvona.

Vasta-ainelääkekonjugaatit (engl. antibody-drug conjugate, ADC) ovat innovatiivinen esimerkki täsmälääkkeistä, jotka hyödyntävät monoklonaalisia vasta-aineita (Chari 2008). ADC-lääkkeissä sytotoksinen yhdiste on kiinnitetty monoklonaaliseen vasta-aineeseen linkkerin välityksellä (Chau ja muut 2019). Lääkkeen tavoitteena on, että sytotoksinen yhdiste pysyy inaktiivisena, kunnes vasta-aine kiinnittyy syöpäsolun pinnalla olevaan antigeeniin ja lääke vapautuu aktiivisena kohdesoluun. Vasta-ainelääkekonjugaatit yhdistävät siis täsmälääkkeiden suuren kohdespesifisyyden sekä kemoterapian tehokkaan sytotoksisuuden

(Evans ja Thurber 2022). ADC-lääkkeiden toiminta ei kuitenkaan ole vielä täydellistä, ja ratkaisuja niiden ongelmakohtiin kehitetään jatkuvasti. Tässä tutkielmassa käydään läpi ADC-lääkkeiden toimintaa ja tarkastellaan mahdollisia ratkaisuja ADC-lääkkeiden ongelmakohtiin.

## 2 Vasta-ainelääkekonjugaatit eli ADC

Vasta-ainelääkekonjugaattien perustana on, että vasta-aine tunnistaa spesifisti syöpäsolulle tyypillisen antigeenin (Fu ja muut 2022). Tunnistettavan kasvaintigeenin tulee sijaita kasvainsolun ekstrasellulaarisessa osassa (Phillips 2013). Lisäksi olisi toivottua, että kasvaintigeeniä esiintyisi tasaisesti kaikkialla kohdekudoksessa. Tällöin kyseessä on homogeeninen kasvaintigeenin ilmentyminen. Ideaalitulanteessa samaa antigeeniä ei ilmene terveissä soluissa, jolloin syöpäkudoksen ulkopuolista toksisuutta on mahdollisimman vähän (Chau ja muut 2019).

Ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori 2 (engl. Human Epidermal Growth Factor 2, HER2) on reseptori, jota esiintyy pienissä määrin ihmisen kudossoluissa, mutta yliilmenee 25-30 %:lla rintasyövistä (Axup ja muut 2012; Gutierrez ja Schiff 2011). Lisäksi yliilmentymistä esiintyy joissain kohtu- ja mahasyövässä (Gutierrez ja Schiff 2011). HER2 kuuluu tyrosiinikinaasireseptoreihin, ja se säätelee erityisesti syöpäsolujen lisääntymistä ja elinkykyä. HER2 on täten hyvä kohdeantigeeni vasta-ainelääkekonjugaateille. Muita vasta-ainelääkekonjugaattien kohdeantigeneja ovat esimerkiksi eräät CD-antigeenit, trofoplastisolujen pinta-antigeeni 2 (engl. trophoblast cell surface antigen-2, TROP-2) sekä kudostekijä (engl. tissue factor, TF) (Fu ja muut 2022).

2000-luvun aikana kliinistä tutkimusta vasta-ainelääkekonjugaateista on tehty yli sadasta erilaisesta lääkeaineesta (Chau ja muut 2019), ja huhtikuuhun 2025 mennessä Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston (Food and Drug Administration, FDA) toimesta hyväksytyjä vasta-ainelääkekonjugaatteja oli 14 (L. Shen ja muut 2024; R. Wang ja muut 2025). FDA-hyväksytyt vasta-ainelääkekonjugaatit ja muun muassa niiden kohdeantigeenit, linkkeriluokka sekä sytotoksinen yhdiste näkyvät taulukossa 1.

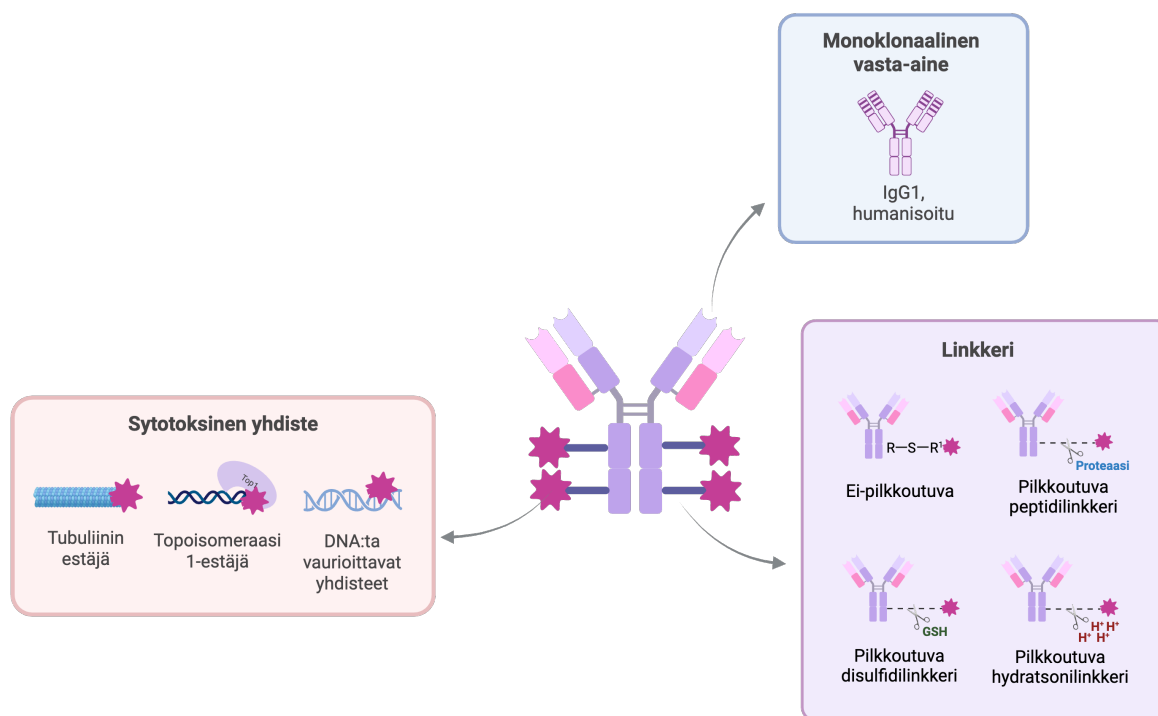
Syövän hoito vasta-ainelääkekonjugaateilla alkoi gemtuzumab ozogamicinilla (Mylotarg), joka hyväksyttiin FDA:n toimesta vuonna 2000 (Bross ja muut 2001). Gemtuzumab ozogamicinia käytetään CD33-positiivisen akuutin myeloidisen leukemian hoitoon (Liu ja muut 2025). Ensimmäinen kiinteisiin kasvaimiin kohdistuva vasta-ainelääkekonjugaatti, Trastuzumab emtansine (Kadcyla), hyväksyttiin FDA:n toimesta vuonna 2013 (Geyer ja muut 2025; Verma ja muut 2012). Trastuzumab emtansinea käytetään HER2-positiivisen rintasyövän hoitoon.

Taulukko 1. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston hyväksymät vasta-ainelääkekonjugaatti-lääkkeet huhtikuuhun 2025 mennessä. Listasta puuttuu moxetumomab pasudotox-tdfk (Lumoxiti, hyväksytty 2018), koska lääkkeen valmistaja AstraZeneca lakkautti tuotteen myynnin Yhdysvaltain markkinoilla 2022. AML, akuutti myeloinen leukemia; HL, Hodgkinin lymfooma; sALCL systeeminen anaplastinen suurisolulymfooma; MF, myelofibroosi; DLBCL, diffuusi suurisolulainen B-solulymfooma; BC, rintasyöpä; ALL, akuutti lymfoblastileukemia; UC, uroteliaalinen karsinooma; MBC, metastaattinen rintasyöpä; GC, mahasyöpä; NSCLC, ei-pienisolulainen keuhkasyöpä; TNBC, kolmoisnegatiivinen rintasyöpä; MM, multipple myelooma.

Lääkeaine	Tuotenimi	Kohde-antigeeni	Linkkeri	Sytotoksinen yhdiste	Indikaatio	Hyväksytty	Yhtiö
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	CD33	pilkkoutuva	kalikeamiinit	AML	2000, uudelleenhyväksytty 2017	Pfizer
Brentuximab vedotin	Adcetris	CD30	pilkkoutuva	MMAE	HL, sALCL, MF, DLBCL	2011	Seagen / Takeda
Trastuzumab emtansine	Kadcyla	HER2	ei-pilkkoutuva	DM1	HER2+ BC	2013	Roche
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa	CD22	pilkkoutuva	kalikeamiinit	ALL	2017	Pfizer
Polatuzumab vedotin-piiq	Polivy	CD79	pilkkoutuva	MMAE	DLBCL	2019	Roche
Enfortumab vedotin	Padcev	Nectin-4	pilkkoutuva	MMAE	UC	2019	Astellas / Seagen
Trastuzumab deruxtecan	Enhertu	HER2	pilkkoutuva	Dxd	HER2+ BC, HER2-matala/ultramatala MBC, HER2+ GC, NSCLC	2019	AstraZeneca / Daiichi Sankyo
Sacituzumab govitecan	Trodelyv	Trop-2	pilkkoutuva	SN-38	HR+/HER2-MBC, TNBC	2020	Gilead
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep	BCMA	ei-pilkkoutuva	MMAF	MM	uudelleenhyväksytty 2025	GSK
Loncastuximab tesirine-lpyl	Zynlonta	CD19	pilkkoutuva	PBD SG3199	DLBCL	2021	ADC Therapeutics
Tisotumab vedotin-tftv	Tivdak	Tissue factor	pilkkoutuva	MMAE	Kohdunkaulan syöpä	2021	Seagen
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE	FR $\alpha$	pilkkoutuva	DM4	Munasarjasyöpä	2022	ImmunoGen
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	TROP-2	pilkkoutuva	Dxd	HR+/HER2- BC	2025	AstraZeneca / Daiichi Sankyo
Telisotuzumab vedotin	EMRELIS	c-Met	pilkkoutuva	MMAE	NSCLC	2025	AbbVie

## 2.1 Rakenne

Vasta-ainelääkekonjugaattien optimaaliseen toimintaan vaikuttavat kaikki sen osat: monoklonaalinen vasta-aine, linkkeri sekä sytotoksinen yhdiste (Hurvitz ja Olivier 2017). Kuvaan 1 on koottu yleisimmät monoklonaalisen vasta-aineen, sytotoksisen yhdisteen ja linkkerin tyypit.



Kuva 1. Vasta-ainelääkekonjugaattien yleinen rakenne sekä niiden yleisimmät vasta-aine-, linkkeri- ja sytotoksisen osan tyypit. Kuva luotu BioRender -sovelluksella.

### 2.1.1 Monoklonaalinen vasta-aine

Vasta-aineena käytetään tyypillisesti humanisoitua immunoglobuliini G-luokan (IgG) vasta-ainetta (Booth ja muut 2018). IgG:llä on pitkä seerumin puoliintumisaika, mikä on edellytyksenä hyvin toimivassa ADC-lääkkeessä (Booth ja muut 2018; Hurvitz ja Olivier 2017). Vasta-aineen tulisi olla kimeerinen tai humanisoitu, jotta sen immunogeenisyys ihmiselle olisi mahdollisimman alhainen. IgG-luokan vasta-aineet jaetaan edelleen neljään alaluokkaan: IgG1, IgG2, IgG3 ja IgG4 (Fu ja muut 2022). Näistä vasta-ainelääkekonjugaattien vasta-aineena IgG1 on eniten käytetty. IgG1 alaluokka saa aikaan korkeatasoisia Fc-välitteisiä vaikutusmekanismeja, kuten vasta-aineriippuvaista soluvälitteistä sytotoksisuutta (engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) sekä

komplementtivälitteistä sytotoksisuutta (engl. complement-dependent cytotoxicity, CDC), jotka edelleen lisäävät vasta-ainelääkekonjugaattien tehokkuutta. (Nevoltris ja Chames 2018).

### 2.1.2 Linkkeri

Linkkeri yhdistää sytotoksisen yhdisteen kemiallisesti tai entsyymaattisesti monoklonaaliseen vasta-aineeseen (Yamazoe ja muut 2025). Linkkerin tehtävänä on varmistaa vasta-ainelääkekonjugaatin stabiilisuus verenkierrossa sekä säädellä sytotoksisen yhdisteen vapautumista kohteessa (Lee ja muut 2025). Linkkereiden valinnalla ja kehittämisellä voidaan merkittävästi vaikuttaa vasta-ainelääkekonjugaatin tehokkuuteen ja farmakokineettisiin ominaisuuksiin (Zhang ja muut 2024). Linkkerit voidaan luokitella kahteen luokkaan: pilkkoutuvat ja ei-pilkkoutuvat linkkerit. Pilkkoutuvat ja ei-pilkkoutuvat linkkerit eroavat toisistaan tavoilla, joilla ne vapauttavat sytotoksisen yhdisteen (Lee ja muut 2025).

Suurin osa FDA-hyväksytyistä vasta-ainelääkekonjugaateista omaavat pilkkoutuvan linkkerin (taulukko 1). Pilkkoutuva linkkeri vapauttaa sytotoksisen yhdisteen nimensä mukaisesti pilkkoutumalla. Pilkkoutuva linkkeri hyödyntää syöpäsolujen ja systeemisen verenkierron mikroympäristöjen eroavaisuuksia kohdentaakseen sytotoksisen yhdisteen vapauttamisen juuri syöpäsoluihin (Fu ja muut 2022). Pilkkoutuminen voi aiheutua linkkerityypistä riippuen matalan pH:n, proteaasien tai suuren glutationipitoisuuden vaikutuksesta. Pilkkoutuvat linkkerit voidaan täten vastaavasti jakaa hydratsonilinkkereihin, peptidilinkkereihin ja disulfidilinkkereihin (Phillips 2013).

Ei-pilkkoutuva linkkeri tarvitsee monoklonaalisen vasta-aineen lysosomaalista hajoamista sytotoksisen yhdisteen vapauttamiseksi (Fu ja muut 2022). Tämä tekee ei-pilkkoutuvasta linkkeristä stabiilimman verrattuna pilkkoutuvaan linkkeriin. Suuremmasta stabiilisuudesta huolimatta, ei-pilkkoutuvan linkkerin omaavia FDA-hyväksytyjä vasta-ainelääkekonjugaatteja on vain kaksi: Trastuzumab emtansine (Kadcyla) ja Belantamab mafodotin-blmf (Blenrep) (Taulukko 1). Tämä johtunee siitä, että pilkkoutuvalla linkkerillä voidaan saada aikaan tehokkaampi sivullisvaikutus (engl. bystander effect) kuin ei-pilkkoutuvalla linkkerillä. (Lee ja muut 2025).

Sivullisvaikutus tarkoittaa, että kohdesolussa vapautunut sytotoksinen yhdiste, joka pystyy läpäisemään solukalvon, pääsee leviämään ja vaikuttamaan ympäröiviin soluihin (Fu ja muut 2022; Lee ja muut 2025). Tämä on hyödyksi etenkin sellaisissa kasvaimissa, joissa antigeenin ilmentyminen on heterogeenistä. Sivullisvaikutuksen on todettu olevan hyödyksi

etenkin HER2:ta vähän tai heterogeenisesti ilmentävien syöpien hoidossa (Ogitani ja muut 2016; Tsao ja muut 2024).

### 2.1.3 Sytotoksinen yhdiste

Vasta-ainelääkekonjugaatin sytotoksinen yhdiste on se osa konjugaattia, joka aiheuttaa varsinaisen syöpäsolun tuhoutumisen (Hurvitz ja Olivier 2017). Yhdisteen tulisi olla erittäin tehokas jo pikomolaarisina pitoisuuksina, mutta aktivoitua vasta päästyään sisälle kohdesoluun (Fu ja muut 2022). FDA-hyväksytyissä vasta-ainelääkekonjugaateissa esiintyy pääsääntöisesti kolmenlaista eri sytotoksista yhdisteryhmää, jotka vaikuttavat kohdesoluun keskenään eri tavoin (Fu ja muut 2022; Han ja muut 2022). Näitä ovat tubuliinin estäjät, DNA:ta vaurioittavat yhdisteet ja topoisomeraasi I-estäjät.

Tubuliinin estäjät, kuten auristatiinit (MMAE) ja maytansiini (DM1 ja DM4), häiritsevät solun toiminnalle ja ylläpidolle tärkeitä mikrotubuluksia (Hurvitz ja Olivier 2017). Mikrotubulukset ovat solun tukirangan tärkeitä proteiineja, jotka osallistuvat solun mitoottiseen jakautumiseen (Phillips 2013). Tubuliinin estäjät sitoutuvat tubuliiniin häiriten mikrotubulusten oikeanlaista toimintaa. Tämä johtaa solunjakautumisen estymiseen ja lopuksi solun kuolemaan. Koska tubuliinin estäjät häiritsevät erityisesti mitoosia, kohdistuu niiden teho nopeasti jakautuviin soluihin, kuten syöpäsoluihin (Hurvitz ja Olivier 2017).

DNA:ta vaurioittavat yhdisteet, kuten kalikeamiinit, voivat häiritä DNA:n toimintaa usealla eri tavalla (Phillips 2013). Ne voivat aiheuttaa halkeamia kaksijuosteiseen DNA:han, alkyloida emäksiä tai sijoittaa itsensä DNA:n pienempään uriin (engl. minor groove) johtaen lopuksi solukuolemaan. DNA:ta vaurioittavat yhdisteet vaikuttavat syöpäsolujen lisäksi myös terveisiin soluihin, mikä voi sytotoksisen osan vapautuessa ennenaikaisesti aiheuttaa sivuvaikutuksia ja alentaa lääkkeen terapeutista indeksia (Damelin 2018). Toisaalta kaikki syöpäsolut eivät ole nopeasti jakautuvia, minkä vuoksi DNA:ta vaurioittavat solut voivat olla etulyöntiasemassa tehokkuudessaan verrattuna tubuliinin estäjiin.

Topoisomeraasi I-estäjät (Dxd, SN-38) vaikuttavat DNA-topoisomeraasiin, joka katalysoi muutoksia DNA:n topologiassa (Han ja muut 2022). DNA-topoisomeraasit ovat välttämättömiä solun DNA:n oikeanlaiselle replikaatiolle ja transkriptiolle. Kun topoisomeraasi I:n toiminta estyy, replikaatio ja transkriptio epäonnistuvat ja kaksijuosteinen DNA voi haljeta. Vaikutukset johtavat lopulta solukuolemaan. Samoin kuin DNA:ta

vaurioittavat yhdisteet, myös topoisomeraasi 1-estäjät voivat kohdistaa toksisia vaikutuksia terveisiin soluihin.

#### 2.1.4 Konjugaatio

Sytotoksinen yhdiste liitetään linkkerin välityksellä perinteisesti vasta-aineen Fc-osan lysiini- tai kysteiniitähteisiin (Fu ja muut 2022). Tätä tapahtumaa kutsutaan konjugaatioksi. Yhteen vasta-aineeseen liitetään pääsääntöisesti 2–5 molekyyliä sytotoksista yhdistettä (Phillips 2013). Sytotoksisen yhdisteen määrää yhtä vasta-ainemolekyyliä kohti kuvataan lääke-vasta-ainesuhteella (engl. drug-to-antibody ratio, DAR) (R. Wang ja muut 2025).

Kysteiniinikonjugaatiossa vasta-aineen liuottimille paljastuneet (engl. solvent accessible) disulfididokset pelkistetään, jolloin syntyy vapaita tioliryhmiä (Adem ja muut 2014).

Linkkerin päädyssä oleva maleimidi liitetään sitten vapaaseen tioliryhmään Michael-additiolla, jolloin muodostuu tiosukkinimidirengas (R. Wang ja muut 2025).

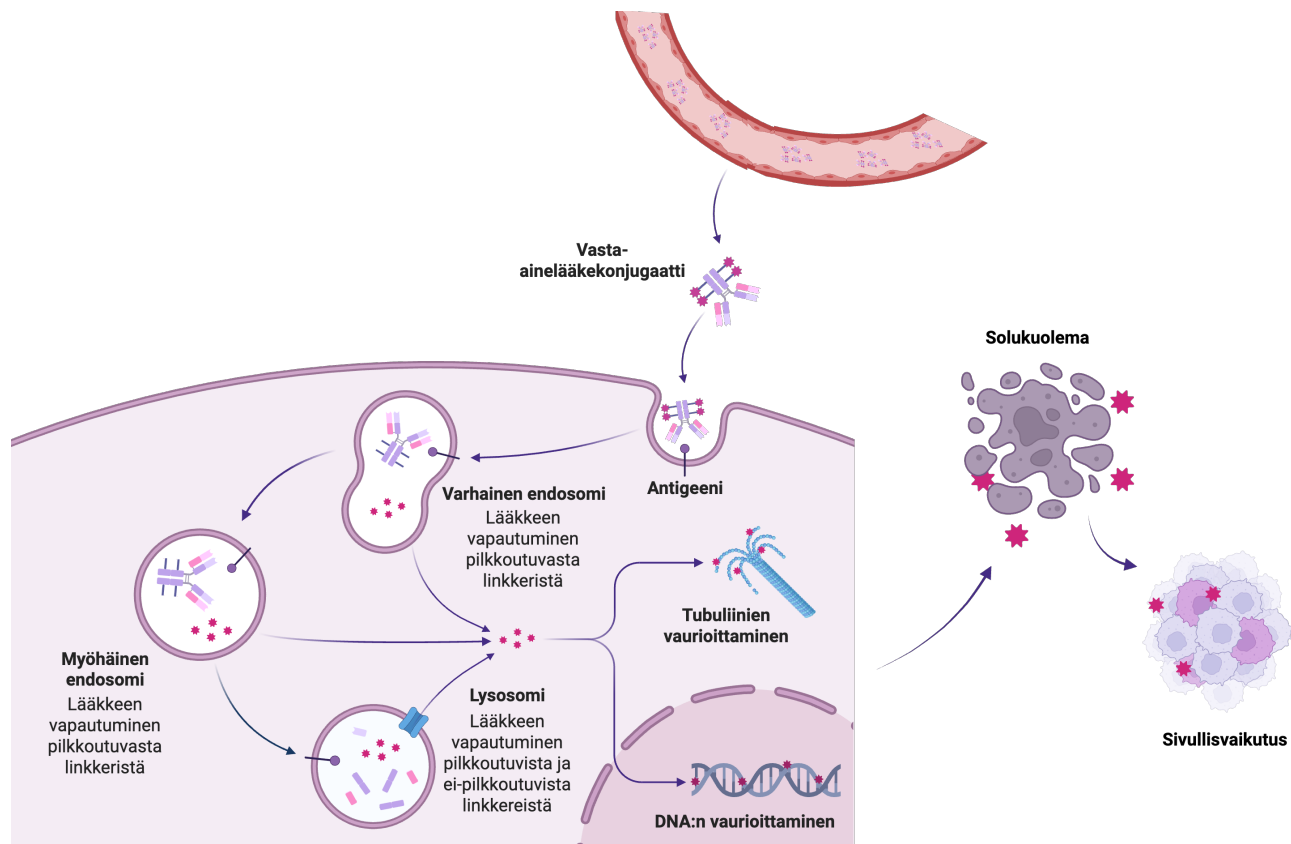
Lysiinikonjugaatiossa linkkerin karboksyylihappoesteri liitetään lysiiniin amididoksella (Fu ja muut 2022).

## 2.2 Toiminta

Vasta-ainelääkekonjugaatit annostellaan suonensisäisesti systeemiseen verenkiertoon (Mecklenburg 2018). Kun vasta-aine tunnistaa ja sitoutuu syöpäsolun kohdeantigeeniin, solu endosytoi vasta-ainelääkekonjugaatin reseptorivälitteisellä endosytoosilla (Shivatara ja muut 2023). Vasta-ainelääkekonjugaatin soluun pääsy riippuu vahvasti vasta-aineen ja kohdeantigeenin välisestä affiniteetista (Fu ja muut 2022). Mitä suurempi affiniteetti vasta-aineen ja kohdeantigeenin välillä on, sitä nopeammin soluun sisään siirtyminen tapahtuu. Vasta-ainelääkekonjugaatti siirtyy soluun endosomissa. Varhainen endosomi kypsyy myöhäiseksi endosomiksi, ja fuusioituu lysosomin kanssa.

Lysosomissa hydratsonilinkkeri pilkkoutuu lysosomin matalan pH:n seurauksena ja peptidilinkkeri pilkkoutuu lysosomissa esiintyvien proteaasien seurauksena (Fu ja muut 2022). Disulfidilinkkeri pilkkoutuu solun sytosolissa glutationien pelkistävän vaikutuksen takia. Ei-pilkkoutuva linkkeri irtoaa yhdessä sytotoksisen yhdisteen kanssa vasta-aineesta, kun lysosomin proteaasit hajottavat vasta-aineen. Vasta-ainelääkekonjugaatin lääkeaine kohdistaa vaikutuksensa soluun sytotoksisen yhdisteen toimintamekanismin mukaan. Lääkeaine aiheuttaa lopulta syöpäsolun hajoamisen. Kun solu hajoaa, sytotoksinen yhdiste

vapautuu. Riippuen yhdisteestä, se voi kohdistaa vaikutuksensa myös ympäröiviin soluihin (sivullisvaikutus). Vasta-ainelääkekonjugaattien toiminta on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Vasta-ainelääkekonjugaattien toiminnan yleinen mekanismi. Vasta-ainelääkekonjugaatit injektoidaan verenkiertoon, josta ne kulkeutuvat solun sytosoliin reseptorivälitteisellä endosytoosilla. Sytosolissa vasta-ainelääkekonjugaatin sytotoksinen osa vapautuu vasta-aineesta, ja pääsee vaurioittamaan solua johtaen solukuolemaan. Solun hajotessa sytotoksinen yhdiste pääsee vaikuttamaan ympäröiviin soluihin sivullisvaikutuksella. Kuva luotu BioRender -sovelluksella.

### 3 Vasta-ainelääkekonjugaattien ongelmakohdat

Vasta-ainelääkekonjugaattien tutkimuksessa ja kehityksessä tarkkaillaan useita eri tekijöitä, joilla arvioidaan lääkkeen tehokkuutta ja turvallisuutta (Long ja muut 2025). Vasta-ainelääkekonjugaattien kehityksessä etenkin hyvän lääke-vasta-ainesuhteen, terapeuttisen indeksin sekä stabiilisuuden saavuttaminen ovat olleet oleellisia menestyksekkäälle vasta-ainelääkekonjugaatille (Bordeau ja muut 2023).

Lääke-vasta-ainesuhde tarkoittaa liitettyjen sytotoksisten molekyylien määrää yhtä vasta-ainemolekyyliä kohden (Pettinato 2021). Terapeuttinen indeksi tarkoittaa lääkeaineen toksisen pitoisuuden suhdetta siihen lääkeaineen pitoisuuteen, joka aiheuttaa tarpeeksi tehokkaan halutun vasteen (Syndercombe Court ja muut 2025). Viimeisimpänä, stabiilisuus viittaa vasta-ainelääkekonjugaatin kykyyn säilyä kemiallisesti ja fysikaalisesti eheänä esimerkiksi systeemisessä verenkierrossa ja säilytyksessä. (Adem ja muut 2014) Etenkin vasta-ainelääkekonjugaattien linkkerin stabiilisuudella on paljon painoarvoa lääkkeen optimaaliselle toiminnalle (Mohamed Amar ja muut 2022).

Lääke-vasta-ainesuhde, stabiilisuus sekä monet muut tekijät vaikuttavat suorasti tai epäsuorasti terapeuttiseen indeksiin (Sun ja muut 2017; Zhang ja muut 2024). Matala terapeuttinen indeksi tarkoittaa, että lääke aiheuttaa suuremmissa määrin sivuvaikutuksia potilaalle (J. Li ja muut 2021). Vaikkakin vasta-ainelääkekonjugaattien terapeuttista indeksia on saatu nostettua verrattuna esimerkiksi perinteisiin kemoterapialääkkeisiin, esiintyy vasta-ainelääkekonjugaattien käytön yhteydessä edelleen sivuvaikutuksia (Huppert ja muut 2025; Modi ja muut 2020, 2022). Yleisimpiä sivuvaikutuksia ovat väsymys, pahoinvointi ja oksentelu, hematologiset toksisuudet, oftalmologiset toksisuudet sekä perifeerinen neuropatia (Tan ja muut 2025). Lisäksi sivuvaikutuksena voi esiintyä trombosytopeniaa sekä maksavaurioita (Taylor ja Lindorfer 2024).

Tänä päivänä matala terapeuttinen indeksi on pääsääntöisin ongelma vasta-ainelääkekonjugaateissa (J. Li ja muut 2021). Matala terapeuttinen indeksi johtuneen etenkin syöpäkudoksen ulkopuolisesta toksisuudesta (engl. off-target toxicity), joka edelleen aiheutuu useasta eri tekijästä (J. Li ja muut 2021; Tan ja muut 2025). Syitä voivat olla esimerkiksi ennenaikainen lääkkeen vapautuminen sekä kohdeantigeenin esiintyminen terveissä soluissa (Datta-Mannan ja muut 2024). Matala terapeuttinen indeksi johtaa siihen, että vasta-ainelääkekonjugaattien lääkeannos tulee pitää liian matalana halutun vasteen saamiseen

tarvittuun lääkeannokseen verrattuna (Bordeau ja muut 2023). Matalan terapeuttisen indeksin lisäksi ongelmia on aiheuttanut resistenssi, joka voi kehittyä vasta-ainelääkekonjugaateille hoidon aikana (Zeng ja muut 2024). Lisäksi heterogeeninen antigeenin ilmentyminen syöpäsoluissa on ollut haastavaa, mutta parannuksena tähän on tehokkaamman sivullisvaikutuksen aikaansaaminen (Ogitani ja muut 2016).

### 3.1 Kohdekudoksen ulkopuolinen toksisuus

Kohdekudoksen ulkopuolinen toksisuus voidaan jakaa kahteen ryhmään (Nguyen ja muut 2023). Toksisuus voi aiheutua vasta-ainelääkekonjugaatin sitoutuessa terveessä solussa ilmenevään kasvaintigeeniin (engl. tumor associated antigen, TAA) tai se voi aiheutua ilman kasvaintigeeniin sitoutumista. Kun toksisuus aiheutuu jälkimmäisellä tavalla, voi sytotoksinen yhdiste päätyä soluun eri mekanismeilla. Vasta-ainelääkekonjugaatti saattaa vapauttaa sytotoksisen yhdisteen ennaikaisesti (ks. 3.2 Ennenaikainen lääkkeen vapautuminen), sytotoksinen yhdiste saattaa päätyä soluun ei-spesifisen endosytoosin välityksellä tai vasta-ainelääkekonjugaatti saattaa sitoutua immuunisolujen Fc $\gamma$ -reseptoreihin (Aoyama ja muut 2022; Bordeaux ja muut 2023). Haitalliset sivuvaikutukset voivat aiheutua immuunipuolustuksen käynnistymisestä tai sytotoksisesta yhdisteestä.

Pohjimmaisena ongelmana kohdekudoksen ulkopuoliselle toksisuudelle on, että vasta-ainelääkekonjugaattien sytotoksinen yhdiste ei pääse läpäisemään kohdesolun solukalvoa tarpeeksi tehokkaasti (Nessler ja muut 2024; Shivatara ja muut 2023). Tämänhetkisillä lääkeannoksilla on oletettua, että korkeintaan 1 % annetusta lääkeannoksesta saavuttaa kasvainkudoksen (Cini ja muut 2018). Pienillä lääkeannoksilla tarpeeksi lääkettä ei pääse kohdesoluihin, ja hoitovaste ei ole tarpeeksi tehokas (Rubahamya ja muut 2024). Lääkeannoksia nostamalla enemmän lääkettä pääsee soluihin, mutta samalla vapaan vasta-ainelääkekonjugaatin määrä systeemisessä verenkiertossa kasvaa, ja kohdekudoksen ulkopuolisten toksisuuksien määrä lisääntyy (Ponte ja muut 2021).

Kohdekudoksen ulkopuolisen toksisuuden yhtenä aiheuttajana voi olla vasta-ainelääkekonjugaattien aggregoituminen (Aoyama ja muut 2022). Aggregoituminen aiheutuu etenkin vasta-ainelääkekonjugaattien sytotoksisista yhdisteistä (Buecheler ja muut 2018). Vasta-ainelääkekonjugaateissa käytetyt sytotoksiset yhdisteet ovat tyypillisesti hydrofobisia, koska tällöin yhdisteen kulkeutuminen solukalvon läpi ja kohteen tavoittaminen ovat tehokkaampia kuin hydrofiilistä yhdistettä käytettäessä. Hydrofobisten sytotoksisten yhdisteiden konjugoiminen vasta-ainelääkekonjugaatteihin lisää konjugaattien

hydrofobisuutta, joka edistää aggregoitumista. Tutkitusti vasta-ainelääkekonjugaattien aggregoituminen aiheuttaa kohdekudoksen ulkopuolista toksisuutta aktivoimalla immuunisolujen Fcγ-reseptoreita (Aoyama ja muut 2022).

Vuonna 2020 Modi ja muut toimesta julkaistussa kliinisessä tutkimuksessa sekä vuonna 2022 Modi ja muut julkaistussa mekanistisessa tutkimuksessa havaittiin merkittäviä kohdekudoksen ulkopuolisia sivuvaikutuksia. Tutkimuksissa vasta-ainelääkekonjugaattina käytettiin trastuzumab deruxtecania. Vuonna 2020 julkaistussa tutkimuksessa noin 57 %:lla havaittiin vähintään tason 3 sivuvaikutuksia. Kokonaisvasteosuus (engl. overall response rate, ORR) oli 60,9 %. Vuoden 2022 tutkimuksessa trastuzumab deruxtecania vertailtiin lääkärin valitsemaan kemoterapiahoitoon. Tutkimuksessa trastuzumab deruxtecan osoitti parempaa tehokkuutta kemoterapiaan verrattuna (vahvistettu objektiivinen vaste 52,6 % trastuzumab deruxtecan vs 16,3 % kemoterapia) sekä vähemmän tason 3 tai korkeampia sivuvaikutuksia kuin kemoterapia (52,6 % trastuzumab deruxtecan vs 67,4 % kemoterapia). Vakavia sivuvaikutuksia oli trastuzumab deruxtecanilla 27,8 % ja kemoterapialla 25,0 %. Tutkimukset vahvistavat väitettä siitä, että trastuzumab deruxtecan osoittaa hyvää hoitovastetta syövän hoidossa, mutta lääkkeen haittavaikutukset ovat hyvin mittavia. Vuoden 2022 tutkimuksessa trastuzumab deruxtecan potilaista 3,8 %:lla ilmeni kuolemaan johtavia sivuvaikutuksia, ja 16,2 %:lla potilaista sivuvaikutukset johtivat lääkkeen keskeyttämiseen.

### **3.2 Ennenaikainen lääkkeen vapautuminen**

Ennenaikainen lääkkeen vapautuminen tarkoittaa vasta-ainelääkekonjugaatin sytotoksisen yhdisteen vapautumista ennen kohteeseen eli syöpäsoluun pääsyä (Nguyen ja muut 2023). Ennenaikainen lääkkeen vapautuminen johtuu vasta-ainelääkekonjugaatin epävakaudesta, erityisesti linkkerin epävakaudesta (Adem ja muut 2014; Su ja muut 2018). Linkkerin epävakaas voi aiheutua kahdesta tekijästä: epävakaas voi johtua konjugaatiosta eli tavasta, jolla linkkeri on yhdistetty vasta-aineeseen tai epävakaas voi johtua mekanismista, jolla linkkeri vapauttaa sytotoksisen yhdisteen (Su ja muut 2018). Kun sytotoksinen yhdiste vapautuu ennenaikaisesti, se vähentää terapeuttista indeksiä kahdella tavalla (Lyon ja muut 2014). Sytotoksisen yhdisteen vapautuessa ennenaikaisesti kohteen ulkopuolinen toksisuus lisääntyy ja lääkkeen kasvaimien kasvua heikentävä vaikutus pienenee.

Ennenaikainen lääkkeen vapautuminen johtuu yleisimmin konjugaation epävakaudesta (Tumey ja muut 2017). Useat FDA-hyväksytyt vasta-ainelääkekonjugaatit sisältävät tiosukkinimidikonjugaation eli maleimidi-kysteiniinikonjugaation (Y. Wang ja muut 2022).

Tiosukkinimidi muodostuu vasta-aineen kysteiniitiolin ja linkkerin maleimidin välisellä Michael-additiolla. Tiosukkinimidikonjugaatio ei kuitenkaan ole täysin stabiili biologisissa olosuhteissa, kuten veren seerumissa (Sussman ja muut 2018). Tiosukkinimidin muodostuminen on nimittäin reversiibeli reaktio, mikä tarkoittaa, että vasta-ainelääkekonjugaatti voi dekonjugoitua retro-Michael-reaktiolla (Lyon ja muut 2014). Tällöin vasta-ainelääkekonjugaatin sytotoksinen yhdiste vapautuu ennenaikaisesti vasta-aineesta, ja voi päästä vaikuttamaan terveisiin soluihin.

Vasta-ainelääkekonjugaatin stabiilisuuteen vaikuttaa lisäksi linkkerin konjugaatiokohta (B.-Q. Shen ja muut 2012). Konjugaatiokohta viittaa siihen vasta-aineen kohtaan, johon linkkeri kiinnitetään. Perinteiset konjugaatiomenetelmät johtavat usein heterogeenisen vasta-ainelääkekonjugaattierän muodostumiseen (Tumey ja muut 2017). Heterogeeninen vasta-ainelääkekonjugaatti tarkoittaa vasta-ainelääkekonjugaattierää, joka sisältää vasta-aineeseen eri määrän ja eri kohtiin sitoutuneita sytotoksisia yhdisteitä (H. Chen ja muut 2024). Saman erän vasta-ainelääkekonjugaateissa sytotoksinen yhdiste sijaitsee siis eri kohdissa eri vasta-ainelääkekonjugaattimolekyyleillä. Lisäksi sytotoksisia yhdisteitä voi liittyä eri määrä yhtä vasta-ainelääkemolekyyliä kohden, mikä aiheuttaa vaihtelevan suuruisia lääke-vasta-ainesuhteita (Nunes ja muut 2017). Heterogeenisyys vasta-ainelääkekonjugaateissa aiheuttaa eroja vasta-ainelääkekonjugaattimolekyylien farmakokineettisissä ominaisuuksissa, kuten niiden vakaudessa (Strop ja muut 2013; Sun ja muut 2017). Tavoitteena on valmistaa homogeenisen lääke-vasta-ainesuhteen omaavia vasta-ainelääkekonjugaatteja (Zacharias ja muut 2022). Tällöin lääke-vasta-ainesuhde saadaan parhaiten optimoitua, eli sytotoksista yhdistettä on yhtä vasta-ainelääkekonjugaattia kohden tarpeeksi hyvän vasteen aikaansaamiseksi (Nunes ja muut 2017).

### **3.3 Puutteellisuus kasvainkudokseen tunkeutumisessa**

Vasta-ainelääkekonjugaatteja on käytössä sekä hematologisten että kiinteiden kasvainten hoidossa (Jen ja muut 2018; Modi ja muut 2020). Kuitenkin kiinteiden kasvainten hoito vasta-ainelääkekonjugaateilla on osoittautunut haastavaksi useasta syystä (Long ja muut 2025). Ongelmia ovat heterogeeninen kohdeantigeenin ilmentyminen, liian matala sivullisvaikutus sekä puutteellisuus kasvainkudokseen tunkeutumisessa (Evans ja Thurber 2022; Xue ja muut 2025)

Puutteellisuus kasvainkudokseen tunkeutumisessa tarkoittaa, että tarpeeksi vasta-ainelääkekonjugaattia ei pääse kasvaimen sisempiin osiin, vaan suurin osa vasta-

ainelääkekonjugaateista jäävät kasvaimen perivaskulaarisiin alueisiin (Bordeau ja muut 2021). Tämä johtuu suurelta osin sitoutumispaikkaesteestä (engl. binding site barrier, BSB) (Wei ja muut 2024). BSB on ilmiö, jossa korkean affiniteetin omaavat vasta-ainelääkekonjugaatit sitoutuvat nopeasti perivaskulaarisella alueella sijaitsevien syöpäsolujen kohdeantigeeneihin (Bordeau ja muut 2021). Tällöin tarpeeksi lääkettä ei pääse kasvaimen syvempiin osiin. Helppona ratkaisuna tähän olisi lääkeannoksen nostaminen. Tämä ei kuitenkaan ole mahdollista suurien kohdekudoksen ulkopuolisten toksisuusmäärien vuoksi.

Koska lääkeannosta ei voida nykyisillä vasta-ainelääkekonjugaattien ominaisuuksilla nostaa, tulee niiden tehokkuutta parantaa (Zacharias ja muut 2022). Tehokkuutta kiinteiden syöpäkasvainten hoidossa voidaan lisätä parantamalla sivullisvaikutusta ja optimoimalla lääke-vasta-ainesuhteita (Wei ja muut 2024; Zacharias ja muut 2022). Sivullisvaikutusta varten tulee sytotoksisten yhdisteiden olla hydrofobinen (Long ja muut 2025). Samalla, kun tehokkuutta halutaan parantaa, tulisi lääke-vasta-ainesuhdetta nostaa. Lääke-vasta-ainesuhde ei kuitenkaan saa olla liian suuri sytotoksisten yhdisteiden hydrofobisuuden vuoksi. Kuten aiemmin mainittu, aiheuttaa lisääntynyt hydrofobisuus vasta-ainelääkekonjugaatin aggregoitumista ja täten kohdekudoksen ulkopuolista toksisuutta (Aoyama ja muut 2022).

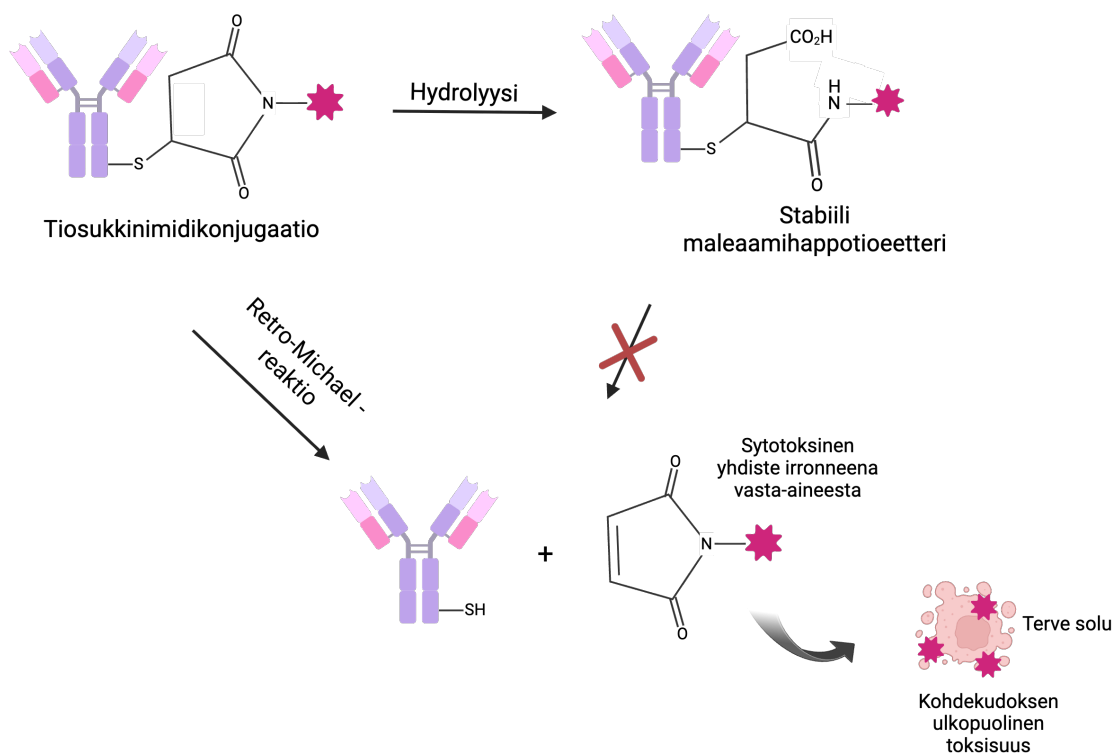
Lääke-vasta-ainesuhteiden optimoinnissa haasteita aiheuttaa heterogeeninen vasta-ainelääkekonjugaattien muodostuminen (Nunes ja muut 2017). Yhdessä vasta-aineessa on tyypillisesti yli 70 lysiniä ja 8 kysteiiniä, joihin linkkeri voidaan mahdollisesti liittää (Chumsae ja muut 2009; Gautier ja muut 2015). Koska mahdollisia konjugaatiokohtia on täten hyvin monta, on stoikiometrinen kontrolli rajattua (Axup ja muut 2012). Tämä tekee homogeenisten vasta-ainelääkekonjugaattien valmistuksesta haastavaa, ja aiheuttaa suurta vaihtelua vasta-ainelääkekonjugaattien lääke-vasta-ainesuhteissa.

## 4 Ratkaisut vasta-ainelääkekonjugaattien ongelmakohtiin

### 4.1 Tiosukkinimidikonjugaation hydrolyysi

Vasta-ainelääkekonjugaateissa yleisesti käytetty tiosukkinimidikonjugaatio on epästabiili olosuhteissa, joissa on läsnä tioleja (Y. Wang ja muut 2022). Tiolit eli merkaptaanit eli sulfhydryylit ovat orgaanisia yhdisteitä, joissa on funktionaalisenä ryhmänä tioliryhmä (Patrick 2004). Tioliryhmä (-SH) muodostuu yhdestä rikki- ja vetyatomista. Tioleja esiintyy etenkin veren seerumin albumiinissa sekä glutationissa (Bonanata ja muut 2017; Richie ja muut 2015). Retro-Michael-reaktiossa konjugaatiossa syntynyt tioetterisidos purkautuu ja tiosukkinimidirengas poistuu (Fontaine ja muut 2015). Tällöin alkuperäinen linkkerin maleimidiryhmä palautuu ja kysteiinin tioli vapautuu takaisin vapaaksi tioliksi. Jos muita vapaita tioleja ei olisi läsnä, niin maleimidi voisi jälleen reagoida vasta-aineen kysteiinin tiolin kanssa. Koska veren seerumissa kuitenkin esiintyy vapaita tioleja, niin linkkerin kanssa irronnut sytotoksinen yhdiste reagoi näiden vapaiden tiolien kanssa. Lääke vapautuu ennenaikaisesti vasta-aineesta ja pääsee vaikuttamaan sytotoksisesti terveisiin soluihin.

Tiosukkinimidirengas voidaan metaboloida vakaampaan, avautuneeseen muotoon, johon retro-Michael-reaktio ei voi tapahtua (Tumey ja muut 2014; Y. Wang ja muut 2022). Tiosukkinimidirengaan avautunut muoto saadaan aikaan hydrolyysillä (kuva 3), joka tyypillisesti suoritetaan vasta-ainelääkekonjugaatin valmistuksen jälkeen (Lyon ja muut 2014; B.-Q. Shen ja muut 2012; Tumey ja muut 2014). Hydrolyysi suoritetaan heikosti emäksisissä olosuhteissa, mikä katalysoi veden nukleofiilistä additiota (J. Kalia ja Raines 2007). Hydrolyysin seurauksena tiosukkinimidirengas aukeaa, ja muodostuu avorenkainen maleaamihappotioetteri.



Kuva 3. Tiosukkinimidikonjugaatio, siihen kohdistuva Retro-Michael-reaktio sekä tiosukkinimidirenkään hydrolyysi. Tähdet kuvaavat sytotoksista yhdistettä. Kuva luotu BioRender -sovelluksella.

Tiosukkinimidirenkään hydrolyysillä on tutkitusti saatu lisättyä vasta-ainelääkekonjugaattien vakautta huomattavasti (Tumey ja muut 2014). Tumeyn ja muiden (2014) tutkimuksessa myös vasta-ainelääkekonjugaatin teho lisääntyi avautuneella tiosukkinimidirenkäällä verrattuna sulkeutuneeseen tiosukkinimidirenkäaseen. Hydrolyysin aiheuttaminen ulkoisilla olosuhteilla on kuitenkin epäkäytännöllistä, koska hydrolyysiin vaadittu aika on huomattavasti pidempi, kuin vasta-ainelääkekonjugaattien puoliintumisaika (Fontaine ja muut 2015). Tämän vuoksi useita mekanismeja itse-hydralysoituville vasta-ainelääkekonjugaateille on tutkittu (Fontaine ja muut 2015; D. Kalia ja muut 2017; Lyon ja muut 2014). Itse-hydralysoituvien vasta-ainelääkekonjugaattien etuna on, että hydrolyysin reaktio-olosuhteiksi riittää normaalit olosuhteet (pH 7,4 ja lämpötila 22 °C) (Lyon ja muut 2014).

Lyon ja muut (2014) tutkivat vasta-ainelääkekonjugaattien vakauden parantamista lisäämällä linkkerin maleimidin läheisyyteen diaminopropionihapon (DPR). DPR on ei-proteogeeninen, ei-luonnollinen aminohappo, jota käytetään tyypillisesti peptideissä, lääkekehityksessä sekä bioteknologiassa (Lan ja muut 2010; Temperini ja muut 2020). Kun DPR liitetään maleimidiin, DPR:n vapaa amiiniryhmä asetetaan lähelle maleimidirengasta (Lyon ja muut 2014). DPR:n vapaa amiiniryhmä toimii molekyyllinsisäisenä emäksenä, joka

katalysoi tiosukkinimidirenkään hydrolyysiä. Tutkimuksessa havaittiin, että menetelmä nopeutti tiosukkinimidirenkään hydrolyysiä merkittävästi sekä paransi vasta-ainelääkekonjugaatin vakautta huomattavasti. Tutkimuksessa yhden viikon aikana sekä *in vivo*- että *in vitro* -olosuhteissa DPR-modifioitua vasta-ainelääkekonjugattia ei dekonjugoitunut lähes lainkaan, kun taas kontrollivasta-ainelääkekonjugaatilla lähes puolet linkkeristä dekonjugoitui.

Toinen menetelmä itse-hydralysoituvien vasta-ainelääkekonjugaattien valmistamiselle on vaihtoehtoisen maleimidijohdannaisen käyttö (Christie ja muut 2015). Tyypillisesti tiosukkinimidikonjugaation sisältävissä vasta-ainelääkekonjugaateissa käytetään N-alkyyylimaleimidia. Christie ja muut (2015) tutkivat N-aryylimaleimidin käyttöä vasta-ainelääkekonjugaattien vakauden lisäämiseksi. N-alkyyylimaleimidin huono itse-hydrolysaatiokyky johtuu sen delokalisoituneesta rakenteesta. N-aryylimaleimidissa on N-alkyyylimaleimidin rakenteesta poiketen substituenttina fenyylirengas, jonka ansiosta N-aryylimaleimidi on N-alkyyylimaleimidia alttiimpi hydrolyysille. Tutkimus osoitti, että N-aryylimaleimidin omaavissa vasta-ainelääkekonjugaateissa tiosukkinimidin hydrolyysi lisääntyi 15–20 kertaista N-alkyyylimaleimidin omaaviin vasta-ainelääkekonjugaatteihin verrattuna. Myös stabiilisuus lisääntyi; N-aryylimaleimidin omaavilla vasta-ainelääkekonjugaateilla esiintyi vain minimaalista linkkerin dekonjugaatiota.

## 4.2 PEGylaatio

Vasta-ainelääkekonjugaattien hydrofobisuus on ollut merkittävä ongelmakohta niiden tehokkuuden ja lääke-vasta-ainesuhteen parantamisessa (Long ja muut 2025). Lisäksi vasta-ainelääkekonjugaattien tehokkuuteen vaikuttaa se, kuinka nopeasti ne eliminoidaan verenkierrosta (F. Li ja muut 2019). Eliminaation nopeus kasvaa tyypillisesti lääke-vasta-ainesuhteen kasvaessa (Zacharias ja muut 2022). Lyon ja muut (2015) havaitsivat tutkimuksessaan, että vasta-ainelääkekonjugaattien eliminaation nopeuden kasvu lääke-vasta-ainesuhteen kasvaessa johtuu hydrofobisuuden kasvusta. Hydrofobisuuden aiheuttaman aggregoitumisen ja nopeamman eliminaation vuoksi on kehitetty menetelmiä, kuten PEGylaatio, joilla vasta-ainelääkekonjugaattien hydrofiilisyttä saataisiin lisättyä (Long ja muut 2025; Simmons ja muut 2020).

PEGylaatio tarkoittaa polyetyleeniglykolin (PEG) liittämistä vasta-ainelääkekonjugaattiin (Lyon ja muut 2015). PEG on vesiliukoinen polymeeri, joka koostuu toistuvista etyleeniglykoliyksiköistä (Dabaja ja muut 2025). Sitä käytetään muun muassa

lääkeaineiden farmakokineettisten ominaisuuksien muokkaamiseen (Mattheolabakis ja muut 2014). Vasta-ainelääkekonjugaateissa PEGylaatio lisää niiden hydrofiilisyyttä ja parantaa näin niiden farmakokineettisiä ominaisuuksia (Lyon ja muut 2015). Useita eri mekanismeja vasta-ainelääkekonjugaattien PEGylaatiolle on tutkittu (Long ja muut 2025; Lyon ja muut 2015; Shao ja muut 2020; Simmons ja muut 2020). PEG voidaan esimerkiksi sijoittaa vasta-ainelääkekonjugaatin linkkeriin välikappaleeksi tai liittää se kilveksi suojaamaan vasta-ainelääkekonjugaattien hydrofobisia osia.

Long ja muut (2025) tutkivat linkkerin hydrofiilisyyden ja turvallisuuden optimoimista PEGylaatiolla. He valmistivat yhteensä 16 eri vasta-ainelääkekonjugaattia, joissa eri pituisia PEG-molekyylejä oli liitetty eri kohtiin erilaisia linkkereitä. He havaitsivat, että PEG:in liittäminen välikappaleeksi linkkeriin lisäsi vasta-ainelääkekonjugaatin hydrofobisuutta, kun taas PEG:in liittäminen linkkeriin sivuketjuna lisäsi vasta-ainelääkekonjugaatin hydrofiilisyyttä ja stabiilisuutta. Parhain tulos saatiin liittämällä pitkä (24 etyleeniglykolyyksikköä sisältävä) PEG<sub>24</sub>-molekyylillä linkkeriin sivuketjuna. Linkkerit, joissa sivuketjuina oli lyhyempiä PEG-molekyylejä, osoittivat epäoptimaalisia ominaisuuksia. Lisäksi PEGyloidut vasta-ainelääkekonjugaatit, joiden lääke-vasta-aine suhde oli 8, osoittivat parempaa tehokkuutta kuin vasta-ainelääkekonjugaatit, joiden lääke-vasta-ainesuhde oli 4. Tulos vahvistaa, että vasta-ainelääkekonjugaattien tehokkuutta ja toksisuusprofiilia voidaan parantaa kasvattamalla vasta-ainelääkekonjugaatin hydrofiilisyyttä ja alentamalla eliminaationopeutta verenkierrosta.

### **4.3 Lääke-vasta-ainesuhteen optimointi ja kohdespesifinen konjugaatio**

#### **4.3.1 THIOMAB-menetelmä**

Lääke-vasta-ainesuhteen optimoinnin sanotaan olevan keskeisin lähestymistapa vasta-ainelääkekonjugaattien tehokkuuden parantamisessa, ja suurimalla osalla tehokkaista vasta-ainelääkekonjugaateista lääke-vasta-ainesuhde on alle 4 (Zacharias ja muut 2022). Lääke-vasta-ainesuhdetta on saatu optimoitua kohdespesifisillä konjugaatiomenetelmillä (Junutula ja muut 2008). Ensimmäinen merkittävä kohdespesifinen konjugaatiomenetelmä, nimeltään THIOMAB, keksittiin vuonna 2008. Junutula ja muut ovat osoittaneet tutkimuksissaan (2008 ja 2010) THIOMAB-menetelmän parantaneen vasta-ainelääkekonjugaattien siedettävyyttä sekä vähentäneen toksisuutta. Lääke-vasta-aine suhde pysyy THIOMAB-vasta-ainelääkekonjugaateissa (TDC) alle 2 pitäen samalla tehokkuuden vähintään yhtä hyvänä kuin

perinteisesti konjugoiduissa vasta-ainelääkekonjugaateissa (Junutula ja muut 2008, 2010; Nunes ja muut 2017). Toisin sanoen THIOMAB-menetelmä parantaa tutkitusti vasta-ainelääkekonjugaattien terapeuttista indeksia.

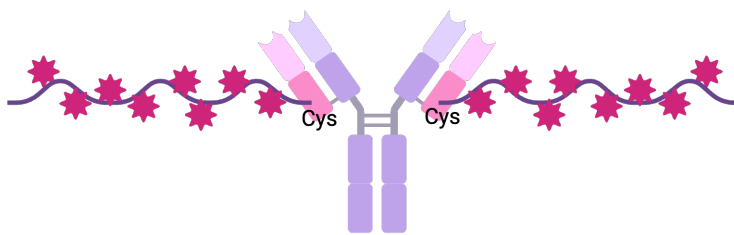
THIOMAB-vasta-ainelääkekonjugaatit perustuvat geneettisesti muokattuihin kysteiinitähteisiin (Junutula ja muut 2008). Vasta-aineet muokataan PCR-pohjaisella kohdennetulla mutageenesilla, jolloin muokatut kysteiinitähteet saadaan ilmennettyä vasta-aineiden kevyt- tai raskasketjuissa. IgG1-vasta-aineessa luonnostaan esiintyvät kysteiinitähteet ovat tyypillisesti sitoutuneena toisiinsa ketjujen välisillä tai ketjujen sisäisillä disulfididisidoksilla eikä vapaita tioliryhmiä ole (H. Chen ja muut 2024). Täten, kun halutaan muodostaa kysteiinikonjugoituneita vasta-ainelääkekonjugaatteja, tulee disulfididisidokset osittain pelkistää (Junutula ja muut 2010). Tämä johtaa heterogeenisiin vasta-ainelääkekonjugaatteihin. Kun vasta-aineeseen lisätään kysteiinitähteitä kohdennetulla mutageenesilla, saadaan vasta-aineeseen vapaita tioliryhmiä. Tällöin konjugaatio tapahtuu kohdespesifisesti ja tuloksena on homogeenisia vasta-ainelääkekonjugaatteja.

#### 4.3.2 XTEN-polypeptidit

Zacharias ja muut (2022) hyödynsivät THIOMAB-menetelmää yhdessä XTEN-polypeptidien kanssa homogeenisten vasta-ainelääkekonjugaattien valmistamisessa. XTEN on synteettinen, hydrofiilinen polypeptidi, joka on suunniteltu lisäämään terapeuttisten peptidien ja proteiinien puoliintumisaikaa (Podust ja muut 2016). XTEN-polypeptidi on pituudeltaan tyypillisesti 144–864 aminohappoa, ja koostuu aminohapoista, jotka ovat luonteeltaan hydrofiilisiä sekä varaukseltaan neutraaleja tai negatiivisia (Zacharias ja muut 2022). Näitä ovat alaniini, glysiini, proliini, seriini, treoniini ja glutamaatti.

Zachariaksen ja kollegoiden (2022) tutkimuksen ideana oli parantaa vasta-ainelääkekonjugaattien tehokkuutta. XTEN-polypeptidi liitetään THIOMAB-vasta-ainelääkekonjugaatin konjugaatiokohdan ja linkkerin väliin (kuva 4). Tutkimuksessa käytettiin 432 aminohapon pituisia XTEN-polypeptidiä. Tämän pituisen hydrofiilisen molekyylin lisääminen vasta-ainelääkekonjugaattiin lisää sen hydrofiilisyyttä huomattavasti. Kun vasta-ainelääkekonjugaatin hydrofiilisyyttä parannetaan, voidaan siihen lisätä suurempi määrä sytotoksista yhdistettä. Tällöin siis vasta-ainelääkekonjugaatin lääke-vasta-ainesuhdetta saadaan nostettua samalla säilyttäen niiden mahdollisimman hydrofiilisen luonteen. Lisäksi THIOMAB-XTEN-yhdistelmällä vasta-ainelääkekonjugaattien konjugaatiokohdat ja täten homogeenisyys olisi hyvin kontrolloitua.

Tutkimuksessa Zacharias ja muut (2022) lääke-vasta-ainesuhdetta saatiin nostettua jopa 18:ta vasta-ainelääkekonjugaattien ollessa homogeenisia. Lisäksi THIOMAB-XTEN-vasta-ainelääkekonjugaattien (TXC) havaittiin olevan rakenteellisesti vakaita. TXC:t osoittivat parempaa antitumoraalista tehokkuutta kuin THIOMAB-vasta-aineet, kun käytettiin annosta, joka sisälsi saman määrän sytotoksista yhdistettä. Parempi tehokkuus johtunee pienemmästä vasta-ainemäärästä, jolloin sitoutumispaikkaesteen muodostuminen on vähäisempää. Tutkimus osoitti merkittävää parannusta vasta-ainelääkekonjugaattien homogeenisuuden ja lääke-vasta-ainesuhteen optimoinnissa.



**THIOMAB-XTEN ADC**

*Kuva 4. THIOMAB-vasta-ainelääkekonjugaatti, johon on kiinnitetty XTEN-polypeptidi. Kuvan "Cys" viittaa vasta-aineen kysteiniähteisiin, joihin XTEN-polypeptidi on liitetty. XTEN-polypeptidi näkyy kuvassa liilana aaltoilevana viivana. Tähdet esittävät sytotoksista yhdistettä, jotka on liitetty linkkerin välityksellä XTEN-polypeptidiin. Kuva luotu BioRender -sovelluksella.*

#### 4.4 Bispesifiset vasta-aineet

Osa syöpäkudoksen ulkopuolisesta toksisuudesta voi aiheutua kasvaintigeenin ilmentymisestä terveissä soluissa (Tan ja muut 2025). Tästä johtuvien sivuvaikutusten vähentämiseksi sekä vasta-ainelääkekonjugaattien kohdespesifisyyden lisäämiseksi on kehitetty bispesifisiä vasta-ainelääkekonjugaatteja (Zeng ja muut 2024). Lisäksi bispesifisten vasta-ainelääkekonjugaattien oletetaan nopeuttavan syöpäsoluun siirtymistä sekä auttavan lääkeresistenssin ohittamisessa. Bispesifisellä vasta-ainelääkekonjugaatilla on perinteisestä vasta-ainelääkekonjugaatista eroten kaksi kohdeantigeenia (Ma ja muut 2024). Bispesifinen vasta-aine on rakenteeltaan epäsymmetrinen siten, että vasta-aineen raskas- ja kevytketjut eroavat toisistaan vastakkaisilla puolilla, jolloin vasta-aineella on kaksi eri paratooppia (Zong ja muut 2024).

Ma ja muut (2024) kehittivät bispesifisen vasta-ainelääkekonjugaatin (BL-B01D1), jonka kohdeantigeeneina ovat epidermaalinen kasvutekijäreseptori (EGFR) ja ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori 3 (HER3). Faasin 1 tutkimuksessa analysoitiin BL-

B01D1:n turvallisuutta, antitumoraalista aktiivisuutta sekä farmakokinetiikkaa. Tutkimus koostui 195 potilaasta, jotka sairastivat paikallisesti edennyttä tai metastaattista kiinteän kasvaimen syöpää, johon muut terapiamuodot eivät olleet riittävän tehokkaita. BL-B01D1 osoitti tutkimuksessa hyvää antitumoraalista tehokkuutta; osittainen vaste havaittiin 34 %:lla (174 potilaasta) ja stabiili tauti 43 %:lla. 195 potilaasta 71 %:lla havaittiin vähintään tason 3 sivuvaikutuksia. Tutkimuksen mukaan BL-B01D1 osoittaa kuitenkin lupaavaa turvallisuusprofiilia.

#### **4.5 UV-kontrolloidut vasta-ainelääkekonjugaatit**

Kohdekudoksen ulkopuolisen toksisuuden vähentämiseksi on kehitetty menetelmiä, joilla voitaisiin entisestään parantaa sytotoksisen yhdisteen aktivoitumista kohteessa (J. Li ja muut 2021). Aktivoitumista kohteessa voitaisiin säädellä esimerkiksi valolla. Tämänlaiset valokontrolloidut vasta-ainelääkekonjugaatit perustuvat valolla vapautettaviin häkkimolekyyleihin (engl. photocage). Li ja muut (2021) kehittivät UV-kontrolloidun vasta-ainelääkekonjugaatin, jonka linkkeriin lisättiin UV-kontrolloitu orto-nitrobentsyyliiryhmä. UV-kontrolloitu vasta-ainelääkekonjugaatti täten vapauttaisi sytotoksisen yhdisteensä UV-säteilyn vaikutuksesta. UV-säteilyn vaikutuksesta orto-nitrobentsyyliiryhmä muodostaa reaktiivisen diradikaalin, jota seuraa hiiliatomin dehydrogenaatio, jonka vaikutuksesta sytotoksinen yhdiste vapautuu vasta-aineesta. UV-kontrolloitujen vasta-ainelääkekonjugaattien avulla voitaisiin täten saavuttaa tarkka ajallinen ja tilallinen sytotoksisen yhdisteen vapauttaminen.

Li ja muiden (2021) tutkimus osoitti kehitetyn UV-kontrolloidun vasta-ainelääkekonjugaatin omaavan hyvän stabiilisuuden, kohdespesifisyyden sekä valokontrolloitavuuden. Kun UV-säteilyä kohdennettiin molekyyliin, oli sytotoksisen yhdisteen vapautuminen tehokasta. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että vasta-ainelääkekonjugaatit, joihin ei kohdennettu UV-säteilyä, olivat huomattavasti vähemmän toksisia. Tämä viittaa siihen, että mahdollisesti myös kohdekudoksen ulkopuolinen toksisuus olisi vähentynyt UV-kontrolloiduilla vasta-ainelääkekonjugaateilla.

#### **4.6 Vapaat sytotoksiseen yhdisteeseen sitoutuvat vasta-aineet**

Sen sijaan, että vasta-ainelääkekonjugaattien sytotoksisuutta vähennetään parantamalla niiden vakautta tai muokkaamalla niiden linkkeriä, Bordeaux ja muut (2023) ehdottivat vapaita, sytotoksiseen yhdisteeseen sitoutuvia vasta-aineita. MMAE:n, joka toimii sytotoksisena

yhdisteenä useissa FDA-hyväksytyissä vasta-ainelääkekonjugaateissa, on osoitettu aiheuttavan sytotoksisuutensa ollessaan vapaana veren plasmassa eikä ollessaan konjugoituneena vasta-aineeseen (Zhao ja muut 2017). Vapaat MMAE-molekyylit pääsevät lipofiilisyytensä ansiosta kulkeutumaan terveisiin soluihin solukalvon läpi (Bordeau ja muut 2023). Täten MMAE:n aiheuttamaa sytotoksisuutta voitaisiin vähentää estämällä sen pääsy terveisiin soluihin.

Bordeau ja muut (2023) kehittivät humanisoidun fab-fragmentin, ABC3315, joka sitoutuu vapaaseen MMAE-molekyyliin mutta ei vasta-aineeseen konjugoituneeseen MMAE:hen. Kun ABC3315 sitoutuu vapaaseen MMAE-molekyyliin, ei molekyyli pääse siirtymään soluun solukalvon läpi, ja lääkkeen toksiset vaikutukset pienenisivät. Tutkimuksen tulokset osoittivat, että ABC3315 nosti vapaan MMAE:n  $IC_{50}$ -arvoa 0,12 nmol/L:sta 95,96 nmol/L:aan eli kasvatti vapaan MMAE:n  $IC_{50}$ -arvoa 800-kertaiseksi.  $IC_{50}$ -arvo on se pitoisuus, jolla yhdisteen tai molekyylin biologinen vaikutus on estynyt 50 %. Tuloksien perusteella siis ABC3315 vähensi MMAE:n sytotoksisuutta merkittävästi. Vasta-aineeseen konjugoituneella MMAE-muodolla ABC3315 nosti  $IC_{50}$ -arvoa 0,12 nmol/L:sta 0,13 nmol/L:aan eli ei lähes ollenkaan. Lisäksi ABC3315 ei vaikuttanut vasta-ainelääkekonjugaatin tehokkuuteen. Tutkimuksen perusteella vapaat, sytotoksiseen yhdisteeseen sitoutuvat vasta-aineet voisivat siis vähentää sytotoksisten yhdisteiden aiheuttamaa vasta-ainelääkekonjugaattien kohdekudoksen ulkopuolista toksisuutta samalla säilyttäen lääkkeen tehokkuuden. Tämä nostaisi lääkkeen terapeutista indeksia.

## 5 Yhteenveto

Teoriassa täydellisen vasta-ainelääkekonjugaatin ominaisuuksiin kuuluvat korkea lääke-vasta-ainesuhde, matala terapeutinen indeksi sekä hydrofiilinen luonne (Zacharias ja muut 2022). Käytännössä tämänlaisen vasta-ainelääkekonjugaatin valmistus on kuitenkin tuottanut haasteita. Tästä riippumatta useita ratkaisuja vasta-ainelääkekonjugaattien lääke-vasta-ainesuhteen, terapeutisen indeksin, kohdespesifisyyden ja tehokkuuden parantamiseksi on tutkittu.

Suurin osa näistä ratkaisuista parantavat vasta-ainelääkekonjugaattien toimintaa vaikuttamalla useisiin eri ongelmakohtiin. Karkeana yhteenvetona voidaan sanoa, että PEGylylaatio, THIOMAB-menetelmä sekä XTEN-THIOMAB-yhdistelmä parantavat vasta-ainelääkekonjugaattien tehokkuutta, ja tiosukkinimidirenkään hydrolyysi, bispesifiset vasta-aineet, UV-kontrolloidut ADC:t ja vapaat sytotoksiseen yhdisteeseen sitoutuvat vasta-aineet niiden turvallisuutta. Kaiken kaikkiaan ratkaisut parantavat vasta-ainelääkekonjugaattien terapeutista indeksia, joka toimii lähtökohtana tehokkaalle ja turvalliselle lääkkeelle.

Vaikkakin monia ADC-lääkkeitä on jo hyväksytty FDA:n toimesta, eivät ne sisällä vielä näitä uuden sukupolven ADC (engl. next-generation ADC) -menetelmiä (Tong ja muut 2021). Nykyisten vasta-ainelääkekonjugaattien teho syövän hoidossa on jo hyvä, mutta uuden sukupolven vasta-ainelääkekonjugaattien odotetaan parantavan hoitotehoa entisestään, etenkin yhdistettynä muihin syövän hoitomekanismeihin (Tong ja muut 2021; Tsuchikama ja muut 2024).

Lääketutkimus ja -kehitys ovat pitkiä prosesseja, ja uuden lääkkeen hyväksyminen ja käyttöönotto voi viedä vuosikymmeniä (Hughes ja muut 2011). Vasta-ainelääkekonjugaattien tutkimus on laajaa, ja tällä hetkellä jo yli 20 uutta ADC-lääkettä on faasin III kliinisessä tutkimuksessa (R. Wang ja muut 2025). Lisäksi ADC-lääkkeiden potentiaalia myös muiden sairauksien, kuten autoimmuunisairauksien, hoidossa on alettu tutkia (Tong ja muut 2021). Vasta-ainelääkekonjugaatit voivat tulevaisuudessa tarjota siis uuden, omanlaisensa hoitomuodon useille eri sairauksille. Suuressa mittakaavassa ADC-lääkkeiden kehitys on vasta aluillaan, mutta jo nyt voidaan sanoa niiden potentiaalın olevan merkittävä.

## Lähteet

- Adem, Y. T., Schwarz, K. A., Duenas, E., Patapoff, T. W., Galush, W. J. & Esue, O. (2014) Auristatin Antibody Drug Conjugate Physical Instability and the Role of Drug Payload. *Bioconjug Chem* **25**:656–664.
- Alfarouk, K. O., Stock, C.-M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., ... Rauch, C. (2015) Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int* **15**:71.
- Aoyama, M., Tada, M., Yokoo, H., Demizu, Y. & Ishii-Watabe, A. (2022) Fcγ Receptor-Dependent Internalization and Off-Target Cytotoxicity of Antibody-Drug Conjugate Aggregates. *Pharm Res* **39**:89–103.
- Axup, J. Y., Bajjuri, K. M., Ritland, M., Hutchins, B. M., Kim, C. H., Kazane, S. A., ... Schultz, P. G. (2012) Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:16101–16106.
- Bonanata, J., Turell, L., Antmann, L., Ferrer-Sueta, G., Botasini, S., Méndez, E., ... Coitiño, E. L. (2017) The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid. *Free Radic Biol Med* **108**:952–962.
- Booth, B. J., Ramakrishnan, B., Narayan, K., Wollacott, A. M., Babcock, G. J., Shriver, Z. & Viswanathan, K. (2018) Extending human IgG half-life using structure-guided design. *mAbs* **10**:1098–1110.
- Bordeau, B. M., Nguyen, T. D., Polli, J. R., Chen, P. & Balthasar, J. P. (2023) Payload-Binding Fab Fragments Increase the Therapeutic Index of MMAE Antibody–Drug Conjugates. *Mol Cancer Ther* **22**:459–470.
- Bordeau, B. M., Yang, Y. & Balthasar, J. P. (2021) Transient Competitive Inhibition Bypasses the Binding Site Barrier to Improve Tumor Penetration of Trastuzumab and Enhance T-DM1 Efficacy. *Cancer Res* **81**:4145–4154.

- Bross, P. F., Beitz, J., Chen, G., Chen, X. H., Duffy, E., Kieffer, L., ... Pazdur, R. (2001) Approval summary: Gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* **7**:1490–1496.
- Buecheler, J. W., Winzer, M., Tonillo, J., Weber, C. & Gieseler, H. (2018) Impact of Payload Hydrophobicity on the Stability of Antibody–Drug Conjugates. *Mol Pharm* **15**:2656–2664.
- Chari, R. V. J. (2008) Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs. *Acc Chem Res* **41**:98–107.
- Chau, C. H., Steeg, P. S. & Figg, W. D. (2019) Antibody–drug conjugates for cancer. *The Lancet* **394**:793–804.
- Chen, H., Qiu, D., Shi, J., Wang, N., Li, M., Wu, Y., ... Sun, S. (2024) In-Depth Structure and Function Characterization of Heterogeneous Interchain Cysteine-Conjugated Antibody–Drug Conjugates. *ACS Pharmacol Transl Sci* **7**:212–221.
- Chen, Y.-S., Jin, E. & Day, P. J. (2024) Use of Drug Sensitisers to Improve Therapeutic Index in Cancer. *Pharmaceutics* **16**:928.
- Christie, R. J., Fleming, R., Bezabeh, B., Woods, R., Mao, S., Harper, J., ... Dimasi, N. (2015) Stabilization of cysteine-linked antibody drug conjugates with N-aryl maleimides. *J Controlled Release* **220**:660–670.
- Chumsae, C., Gaza-Bulseco, G. & Liu, H. (2009) Identification and Localization of Unpaired Cysteine Residues in Monoclonal Antibodies by Fluorescence Labeling and Mass Spectrometry. *Anal Chem* **81**:6449–6457.
- Cini, E., Faltoni, V., Petricci, E., Taddei, M., Salvini, L., Giannini, G., ... De Santis, R. (2018) Antibody drug conjugates (ADCs) charged with HDAC inhibitor for targeted epigenetic modulation. *Chem Sci* **9**:6490–6496.
- Corrie, P. G. (2008) Cytotoxic chemotherapy: Clinical aspects. *Medicine (Baltimore)* **36**:24–28.
- Dabaja, A., Dabaja, A. & Abbas, M. (2025) Polyethylene Glycol. Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557652/>

- Damelin, M. (Toim.) (2018) *Innovations for Next-Generation Antibody-Drug Conjugates*. Cham: Springer International Publishing.
- Datta-Mannan, A., Choi, H., Jin, Z., Liu, L., Lu, J., Stokell, D. J., ... Feng, Y. (2024) Reducing target binding affinity improves the therapeutic index of anti-MET antibody-drug conjugate in tumor bearing animals. *PLOS ONE* **19**:e0293703.
- DeVita, V. T. & Chu, E. (2008) A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res* **68**:8643–8653.
- Evans, R. & Thurber, G. M. (2022) Design of high avidity and low affinity antibodies for in situ control of antibody drug conjugate targeting. *Sci Rep* **12**:7677.
- Fontaine, S. D., Reid, R., Robinson, L., Ashley, G. W. & Santi, D. V. (2015) Long-Term Stabilization of Maleimide–Thiol Conjugates. *Bioconjug Chem* **26**:145–152.
- Fu, Z., Li, S., Han, S., Shi, C. & Zhang, Y. (2022) Antibody drug conjugate: The “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* **7**:93.
- Gautier, V., Boumeester, A. J., Lössl, P. & Heck, A. J. R. (2015) Lysine conjugation properties in human IgGs studied by integrating high-resolution native mass spectrometry and bottom-up proteomics. *PROTEOMICS* **15**:2756–2765.
- Geyer, C. E., Untch, M., Huang, C.-S., Mano, M. S., Mamounas, E. P., Wolmark, N., ... Loibl, S. (2025) Survival with Trastuzumab Emtansine in Residual HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **392**:249–257.
- Gutierrez, C. & Schiff, R. (2011) HER2: Biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* **135**:55–62.
- Han, S., Lim, K. S., Blackburn, B. J., Yun, J., Putnam, C. W., Bull, D. A. & Won, Y.-W. (2022) The Potential of Topoisomerase Inhibitor-Based Antibody-Drug Conjugates. *Pharmaceutics* **14**:1707.
- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B. & Philpott, K. L. (2011) Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* **162**:1239–1249.
- Huppert, L. A., Mahtani, R., Fisch, S., Dempsey, N., Premji, S., Raimonde, A., ... Rugo, H. S. (2025) Multicenter retrospective cohort study of the sequential use of the antibody-drug conjugates

- (ADCs) trastuzumab deruxtecan (T-DXd) and sacituzumab govitecan (SG) in patients with HER2-low metastatic breast cancer (MBC). *Npj Breast Cancer* **11**:34.
- Hurvitz, S. A. & Olivier, K. J. (Toim.) (2017) *Antibody-drug conjugates: Fundamentals, drug development, and clinical outcomes to target cancer*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Jen, E. Y., Ko, C.-W., Lee, J. E., Del Valle, P. L., Aydanian, A., Jewell, C., ... Pazdur, R. (2018) FDA Approval: Gemtuzumab Ozogamicin for the Treatment of Adults with Newly Diagnosed CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* **24**:3242–3246.
- Junutula, J. R., Flagella, K. M., Graham, R. A., Parsons, K. L., Ha, E., Raab, H., ... Sliwkowski, M. X. (2010) Engineered Thio-Trastuzumab-DM1 Conjugate with an Improved Therapeutic Index to Target Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **16**:4769–4778.
- Junutula, J. R., Raab, H., Clark, S., Bhakta, S., Leipold, D. D., Weir, S., ... Mallet, W. (2008) Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol* **26**:925–932.
- Kalia, D., Pawar, S. P. & Thopate, J. S. (2017) Stable and Rapid Thiol Bioconjugation by Light-Triggered Thiomaleimide Ring Hydrolysis. *Angew Chem Int Ed* **56**:1885–1889.
- Kalia, J. & Raines, R. T. (2007) Catalysis of imido group hydrolysis in a maleimide conjugate. *Bioorg Med Chem Lett* **17**:6286–6289.
- Kaur, R., Bhardwaj, A. & Gupta, S. (2023) Cancer treatment therapies: Traditional to modern approaches to combat cancers. *Mol Biol Rep* **50**:9663–9676.
- Lan, Y., Langlet-Bertin, B., Abbate, V., Vermeer, L. S., Kong, X., Sullivan, K. E., ... Mason, A. J. (2010) Incorporation of 2,3-diaminopropionic acid into linear cationic amphipathic peptides produces pH-sensitive vectors. *Chembiochem Eur J Chem Biol* **11**:1266–1272.
- Lee, H. K., Kim, B., Ko, Y. G., Chung, S. W., Shim, W. S., Choi, S.-Y., ... Byun, Y. (2025) Enhancing the bystander effect of antibody-drug conjugate by using a novel caspase-3 cleavable peptide linker to overcome tumor heterogeneity. *J Controlled Release* **382**:113738.

- Li, F., Ulrich, M. L., Shih, V. F.-S., Cochran, J. H., Hunter, J. H., Westendorf, L., ... Benjamin, D. R. (2019) Mouse Strains Influence Clearance and Efficacy of Antibody and Antibody–Drug Conjugate Via Fc–FcγR Interaction. *Mol Cancer Ther* **18**:780–787.
- Li, J., Xiao, D., Xie, F., Li, W., Zhao, L., Sun, W., ... Zhou, X. (2021) Novel antibody-drug conjugate with UV-controlled cleavage mechanism for cytotoxin release. *Bioorganic Chem* **111**:104475.
- Liu, X., Wu, F., Li, Z., Li, C., Li, X., Yuan, Y., ... Xu, P. (2025) Safety assessment of gemtuzumab ozogamicin: Real-world adverse event analysis based on the FDA Adverse Event Reporting System. *Front Med* **12**:1643780.
- Long, J., Shao, T., Wang, Y., Chen, T., Chen, Y., Chen, Y.-L., ... Wang, C. (2025) PEGylation of Dipeptide Linker Improves Therapeutic Index and Pharmacokinetics of Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjug Chem* **36**:179–189.
- Lyon, R. P., Bovee, T. D., Doronina, S. O., Burke, P. J., Hunter, J. H., Neff-LaFord, H. D., ... Senter, P. D. (2015) Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. *Nat Biotechnol* **33**:733–735.
- Lyon, R. P., Setter, J. R., Bovee, T. D., Doronina, S. O., Hunter, J. H., Anderson, M. E., ... Senter, P. D. (2014) Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol* **32**:1059–1062.
- Ma, Y., Huang, Y., Zhao, Y., Zhao, S., Xue, J., Yang, Y., ... Zhao, H. (2024) BL-B01D1, a first-in-class EGFR–HER3 bispecific antibody–drug conjugate, in patients with locally advanced or metastatic solid tumours: A first-in-human, open-label, multicentre, phase 1 study. *Lancet Oncol* **25**:901–911.
- Mattheolabakis, G., Wong, C. C., Sun, Y., Amella, C. A., Richards, R., Constantinides, P. P. & Rigas, B. (2014) Pegylation Improves the Pharmacokinetics and Bioavailability of Small-Molecule Drugs Hydrolyzable by Esterases: A Study of Phospho-Ibuprofen. *J Pharmacol Exp Ther* **351**:61–66.
- McPhail, S., Barclay, M. E., Johnson, S. A., Swann, R., Alvi, R., Barisic, A., ... Zalcborg, J. R. (2024) Use of chemotherapy in patients with oesophageal, stomach, colon, rectal, liver, pancreatic,

- lung, and ovarian cancer: An International Cancer Benchmarking Partnership (ICBP) population-based study. *Lancet Oncol* **25**:338–351.
- Mecklenburg, L. (2018) A Brief Introduction to Antibody–Drug Conjugates for Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol* **46**:746–752.
- Modi, S., Jacot, W., Yamashita, T., Sohn, J., Vidal, M., Tokunaga, E., ... Cameron, D. A. (2022) Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* **387**:9–20.
- Modi, S., Saura, C., Yamashita, T., Park, Y. H., Kim, S.-B., Tamura, K., ... DESTINY-Breast01 Investigators (2020) Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **382**:610–621.
- Mohamed Amar, I. A., Huvelle, S., Douez, E., Letast, S., Henrion, S., Viaud-Massuard, M.-C., ... Denevault-Sabourin, C. (2022) Dual intra- and extracellular release of monomethyl auristatin E from a neutrophil elastase-sensitive antibody-drug conjugate. *Eur J Med Chem* **229**:114063.
- Nessler, I., Rubahamya, B., Kopp, A., Hofsess, S., Cardillo, T. M., Sathyanarayan, N., ... Thurber, G. M. (2024) Improving Intracellular Delivery of an Antibody-Drug Conjugate Targeting Carcinoembryonic Antigen Increases Efficacy at Clinically Relevant Doses In Vivo. *Mol Cancer Ther* **23**:343–353.
- Nevoltris, D. & Chames, P. (Toim.) (2018) *Antibody Engineering: Methods and Protocols*. (3rd ed. 2018). New York, NY: Humana Press.
- Nguyen, T. D., Bordeau, B. M. & Balthasar, J. P. (2023) Mechanisms of ADC Toxicity and Strategies to Increase ADC Tolerability. *Cancers* **15**:713.
- Nunes, J. P. M., Vassileva, V., Robinson, E., Morais, M., Smith, M. E. B., Pedley, R. B., ... Chudasama, V. (2017) Use of a next generation maleimide in combination with THIOMAB™ antibody technology delivers a highly stable, potent and near homogeneous THIOMAB™ antibody-drug conjugate (TDC). *RSC Adv* **7**:24828–24832.
- Ogitani, Y., Hagihara, K., Oitate, M., Naito, H. & Agatsuma, T. (2016) Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody–drug conjugate, in

- tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. *Cancer Sci* **107**:1039–1046.
- Patrick, G. L. (2004) *Organic chemistry*. (2nd ed). London New York: Bios Scientific.
- Pettinato, M. C. (2021) Introduction to Antibody-Drug Conjugates. *Antibodies* **10**:42.
- Phillips, G. L. (2013) *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins: From Pre-Clinical Development to Therapeutic Applications*. New York, NY: Springer.
- Podust, V. N., Balan, S., Sim, B.-C., Coyle, M. P., Ernst, U., Peters, R. T. & Schellenberger, V. (2016) Extension of in vivo half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers. *J Controlled Release* **240**:52–66.
- Ponte, J. F., Lanieri, L., Khera, E., Laleau, R., Ab, O., Espelin, C., ... Thurber, G. M. (2021) Antibody Co-Administration Can Improve Systemic and Local Distribution of Antibody–Drug Conjugates to Increase *In Vivo* Efficacy. *Mol Cancer Ther* **20**:203–212.
- Qazi, A. S. (2023) *Therapeutic Approaches in Cancer Treatment*. (1st ed). Cham: Springer International Publishing AG.
- Richie, J. P., Nichenametla, S., Neidig, W., Calcagnotto, A., Haley, J. S., Schell, T. D. & Muscat, J. E. (2015) Randomized controlled trial of oral glutathione supplementation on body stores of glutathione. *Eur J Nutr* **54**:251–263.
- Rubahmya, B., Dong, S. & Thurber, G. M. (2024) Clinical translation of antibody drug conjugate dosing in solid tumors from preclinical mouse data. *Sci Adv* **10**:eadk1894.
- Shao, T., Chen, T., Chen, Y., Liu, X., Chen, Y.-L., Wang, Q., ... Wang, C. (2020) Construction of paclitaxel-based antibody–drug conjugates with a PEGylated linker to achieve superior therapeutic index. *Signal Transduct Target Ther* **5**:132.
- Shen, B.-Q., Xu, K., Liu, L., Raab, H., Bhakta, S., Kenrick, M., ... Junutula, J. R. (2012) Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol* **30**:184–189.
- Shen, L., Sun, X., Chen, Z., Guo, Y., Shen, Z., Song, Y., ... Zhu, F. (2024) ADCdb: The database of antibody–drug conjugates. *Nucleic Acids Res* **52**:D1097–D1109.

- Shivatare, V. S., Huang, H., Tseng, T., Chuang, P., Zeng, Y. & Wong, C. (2023) Probing the Internalization and Efficacy of Antibody-Drug Conjugate via Site-Specific Fc-Glycan Labelling of a Homogeneous Antibody Targeting SSEA-4 Bearing Tumors. *Isr J Chem* **63**:e202300042.
- Simmons, J. K., Burke, P. J., Cochran, J. H., Pittman, P. G. & Lyon, R. P. (2020) Reducing the antigen-independent toxicity of antibody-drug conjugates by minimizing their non-specific clearance through PEGylation. *Toxicol Appl Pharmacol* **392**:114932.
- Strop, P., Liu, S.-H., Dorywalska, M., Delaria, K., Dushin, R. G., Tran, T.-T., ... Rajpal, A. (2013) Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates. *Chem Biol* **20**:161–167.
- Su, D., Kozak, K. R., Sadowsky, J., Yu, S.-F., Fourie-O'Donohue, A., Nelson, C., ... Pillow, T. H. (2018) Modulating Antibody–Drug Conjugate Payload Metabolism by Conjugation Site and Linker Modification. *Bioconjug Chem* **29**:1155–1167.
- Sun, X., Ponte, J. F., Yoder, N. C., Laleau, R., Coccia, J., Lanieri, L., ... Lambert, J. M. (2017) Effects of Drug–Antibody Ratio on Pharmacokinetics, Biodistribution, Efficacy, and Tolerability of Antibody–Maytansinoid Conjugates. *Bioconjug Chem* **28**:1371–1381.
- Sussman, D., Westendorf, L., Meyer, D. W., Leiske, C. I., Anderson, M., Okeley, N. M., ... Benjamin, D. R. (2018) Engineered cysteine antibodies: An improved antibody-drug conjugate platform with a novel mechanism of drug-linker stability. *Protein Eng Des Sel* **31**:47–54.
- Syndercombe Court, D., Kadri, A. & Xiu, P. (Toim.) (2025) *Medical sciences*. (Fourth edition). Edinburgh: Elsevier.
- Tan, H. N., Morcillo, M. A., Lopez, J., Minchom, A., Sharp, A., Paschalis, A., ... Banerji, U. (2025) Treatment-related adverse events of antibody drug-conjugates in clinical trials. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* **18**:71.
- Taylor, R. P. & Lindorfer, M. A. (2024) Antibody-drug conjugate adverse effects can be understood and addressed based on immune complex clearance mechanisms. *Blood* **144**:137–144.

- Temperini, A., Aiello, D., Mazzotti, F., Athanassopoulos, C. M., De Luca, P. & Siciliano, C. (2020) 2,3-Diaminopropanols Obtained from d-Serine as Intermediates in the Synthesis of Protected 2,3-l-Diaminopropanoic Acid (l-Dap) Methyl Esters. *Molecules* **25**:1313.
- Tong, J. T. W., Harris, P. W. R., Brimble, M. A. & Kavianinia, I. (2021) An Insight into FDA Approved Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules* **26**:5847.
- Trail, P. A., King, D. H. & Dubowchik, G. M. (2003) Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* **52**:328–337.
- Tsao, L.-C., Ma, X., Wang, J. S., Trotter, T. N., Wang, T., Wei, J.-P., ... Hartman, Z. C. (2024) Abstract 2377: HER2-ADC efficacy is rooted in its induction of immunogenic cell death with FcGR activation and a systemic bystander effect. *Cancer Res* **84**:2377–2377.
- Tsuchikama, K., Anami, Y., Ha, S. Y. Y. & Yamazaki, C. M. (2024) Exploring the next generation of antibody–drug conjugates. *Nat Rev Clin Oncol* **21**:203–223.
- Tumey, L. N., Charati, M., He, T., Sousa, E., Ma, D., Han, X., ... Graziani, E. I. (2014) Mild Method for Succinimide Hydrolysis on ADCs: Impact on ADC Potency, Stability, Exposure, and Efficacy. *Bioconjug Chem* **25**:1871–1880.
- Tumey, L. N., Li, F., Rago, B., Han, X., Loganzo, F., Musto, S., ... Tchistiakova, L. (2017) Site Selection: A Case Study in the Identification of Optimal Cysteine Engineered Antibody Drug Conjugates. *AAPS J* **19**:1123–1135.
- Valent, P., Groner, B., Schumacher, U., Superti-Furga, G., Busslinger, M., Kralovics, R., ... Sörgel, F. (2016) Paul Ehrlich (1854-1915) and His Contributions to the Foundation and Birth of Translational Medicine. *J Innate Immun* **8**:111–120.
- Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., Baselga, J., ... Blackwell, K. (2012) Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* **367**:1783–1791.
- Wang, R., Hu, B., Pan, Z., Mo, C., Zhao, X., Liu, G., ... Yu, L. (2025) Antibody–Drug Conjugates (ADCs): Current and future biopharmaceuticals. *J Hematol Oncol* **18**:51.

- Wang, Y., Xie, F., Liu, L., Xu, X., Fan, S., Zhong, W. & Zhou, X. (2022) Development of applicable thiol-linked antibody-drug conjugates with improved stability and therapeutic index. *Drug Deliv* **29**:754–766.
- Wei, Q., Yang, T., Zhu, J., Zhang, Z., Yang, L., Zhang, Y., ... Cheng, X. (2024) Spatiotemporal Quantification of HER2-targeting Antibody–Drug Conjugate Bystander Activity and Enhancement of Solid Tumor Penetration. *Clin Cancer Res* **30**:984–997.
- Xue, Q., Peng, J., Dai, W., Wu, Q., Jiao, J., Hu, Y., ... Li, J. P. (2025) A biparatopic HER2-targeting ADC constructed *via* site-specific glycan conjugation exhibits superior stability, safety, and efficacy. *RSC Chem Biol* **6**:1284–1296.
- Yamazoe, S., Cheng, Q., Kotapati, S., Rangan, V. S., Sung, M., Deshpande, M., ... Rao, C. (2025) The Impact of Conjugation Mode and Site on Tubulysin Antibody-Drug-Conjugate Efficacy and Stability. *ChemistryOpen* **14**:e202400522.
- Zacharias, N., Podust, V. N., Kajihara, K. K., Leipold, D., Del Rosario, G., Thayer, D., ... Sadowsky, J. (2022) A homogeneous high-DAR antibody–drug conjugate platform combining THIOMAB antibodies and XTEN polypeptides. *Chem Sci* **13**:3147–3160.
- Zeng, H., Ning, W., Liu, X., Luo, W. & Xia, N. (2024) Unlocking the potential of bispecific ADCs for targeted cancer therapy. *Front Med* **18**:597–621.
- Zhang, Y., Wang, L., Cao, X., Song, R., Yin, S., Cheng, Z., ... Zhu, S. (2024) Evaluation of Double Self-Immolative Linker-Based Antibody–Drug Conjugate FDA022-BB05 with Enhanced Therapeutic Potential. *J Med Chem* **67**:19852–19873.
- Zhao, H., Gulesserian, S., Malinao, M. C., Ganesan, S. K., Song, J., Chang, M. S., ... Doñate, F. (2017) A Potential Mechanism for ADC-Induced Neutropenia: Role of Neutrophils in Their Own Demise. *Mol Cancer Ther* **16**:1866–1876.
- Zong, H., Li, X., Han, L., Wang, L., Liu, J., Yue, Y., ... Zhu, J. (2024) A novel bispecific antibody drug conjugate targeting HER2 and HER3 with potent therapeutic efficacy against breast cancer. *Acta Pharmacol Sin* **45**:1727–1739.