



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Monoklonaalisten vasta-aineiden aggregaatio ja sen mittausmenetelmät

Jenni Närhi

Kemia (Detektioteknologian tutkimusryhmä)

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

15.4.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Jenni Närhi

Otsikko: Monoklonaalisten vasta-aineiden aggregaatio ja sen mittausmenetelmät

Ohjaaja: Harri Härmä

Sivumäärä: 26 sivua

Päivämäärä: 13.4.2025

Monoklonaaliset vasta-aineet (mAb:t) ovat yleistyneet huomattavasti nyky lääketieteessä, ja niitä kehitetään jatkuvasti lisää. Ne ovat laboratoriossa tuotettuja proteiineja, jotka koostuvat kahdesta raskaasta ja kahdesta kevyestä polypeptidiketjusta.¹ Vasta-aineiden erityispiirteenä on tarkka antigeenikohtien tunnistus, mikä mahdollistaa erittäin spesifiset hoitomuodot.

Monoklonaalisilla vasta-aineilla on taipumus aggregoitua, jolloin osittain vääränlaskostuneet osat voivat yhdistyä epätoivotulla tavalla muodostaen suurempia komplekseja. Tämä voi johtaa vasta-aineen toimimattomuuteen ja haitallisiin immuunireaktioihin potilailla. Aggregoitumiseen vaikuttavat sekä sisäiset tekijät, kuten valmistusprosessit, että ulkoiset tekijät, kuten käsittely- ja säilytysolosuhteet. Aggregoituminen heikentää lääkeaineiden laatua, turvallisuutta ja tehoa, minkä vuoksi sen hallinta on keskeinen haaste monoklonaalisten vasta-aineiden kehityksessä.

Aggregaation havaitsemiseen on kehitetty useita mittausmenetelmiä. Valonsirontamenetelmät (DLS, SLS) mittaavat aggregaattien kokoa ja jakautumista. Spektroskooppiset menetelmät (FTIR, UV-Vis, fluoresenssispektroskopia) paljastavat aggregaattien rakenteelliset muutokset ja molekyylien vuorovaikutukset. Kokoerottelukromatografia (SEC) erottelee aggregaatit molekyylimassan perusteella. Atomivoimamikroskopia (AFM) mahdollistaa aggregaattien visuaalisen havaitsemisen nanometritasolla. Nämä menetelmät tarjoavat monipuoliset työkalut aggregaation tutkimiseen ja hallintaan, mikä on keskeistä monoklonaalisten vasta-aineiden turvallisuuden ja tehon varmistamisessa.

Avainsanat: monoklonaalinen vasta-aine, aggregaatio

Sisällys

Lyhenneluettelo	4
1. Johdanto	5
2. Monoklonaaliset vasta-aineet	6
3. Monoklonaalisten vasta-aineiden luokittelu	8
4. Monoklonaalisten vasta-aineiden aggregaatio.....	11
5. Aggregaation vaikutus vasta-aineiden tehoon ja turvallisuuteen.....	12
6. Aggregaation mittaamenetelmät	13
6.1. Dynaaminen valonsironta	13
6.2. Staattinen valonsironta	14
6.3. Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia.....	15
6.4. Kokoerottelukromatografia	17
6.5. UV-Vis-spektroskopia	18
6.6. Fluoresenssispektroskopia	19
6.7. Atomivoimamikroskopia	21
7. Yhteenveto.....	23
8. Viitteet	24

Lyhenneluettelo

mAb	Engl. <i>Monoclonal antibody</i> , monoklonaalinen vasta-aine
DLS	Engl. <i>Dynamic light scattering</i> , dynaaminen valonsironta
SLS	Engl. <i>Static light scattering</i> , staattinen valonsironta
FTIR	Engl. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> , Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia
SEC	Engl. <i>Size-exclusion chromatography</i> , kokoerottelukromatografia
AFM	Engl. <i>Atomic force microscopy</i> , atomivoimamikroskopia

1. Johdanto

Monoklonaaliset vasta-aineet (mAb:t) ovat laboratoriossa valmistettuja proteiineja, jotka kykenevät sitoutumaan tarkasti tiettyyn antigeeniin. Niitä hyödynnetään biolääketieteessä, erityisesti erilaisten sairauksien diagnostiikassa ja hoidossa. mAb:ien käyttö on tuonut merkittäviä edistysaskelia esimerkiksi syövän, autoimmuunisairauksien ja infektioautien hoidossa, sillä ne mahdollistavat täsmällisen hoidon, vähentäen samalla haittavaikutuksia terveissä kudoksissa. Näitä vasta-aineita kehitetään jatkuvasti, ja niillä on merkittävä rooli tulevaisuuden lääketieteessä. mAb:eja voidaan muokata geneettisesti niiden ominaisuuksien parantamiseksi, mikä tekee niistä entistä monipuolisempia terapeuttisia työkaluja.

Yksi mAb:ien tuotannon ja käytön keskeisistä haasteista on niiden aggregoituminen. Aggregaatiolla tarkoitetaan vasta-aineiden spontaania yhteenliittymistä, mikä voi vaikuttaa niiden vakauteen, biologiseen aktiivisuuteen ja turvallisuuteen. Aggregoitumista voi tapahtua eri vaiheissa, kuten tuotannon, varastoinnin ja potilaalle annostelun aikana. Aggregoituneet vasta-aineet voivat laukaista elimistössä immuunivasteen, joka saattaa aiheuttaa haittavaikutuksia, kuten immuuniperäisiä komplikaatioita tai lääkkeen tehon heikkenemistä. Tämän takia aggregaatiota on tärkeää tutkia, jotta vasta-aineista saadaan kehitettyä entistäkin turvallisempia ja tehokkaampia.

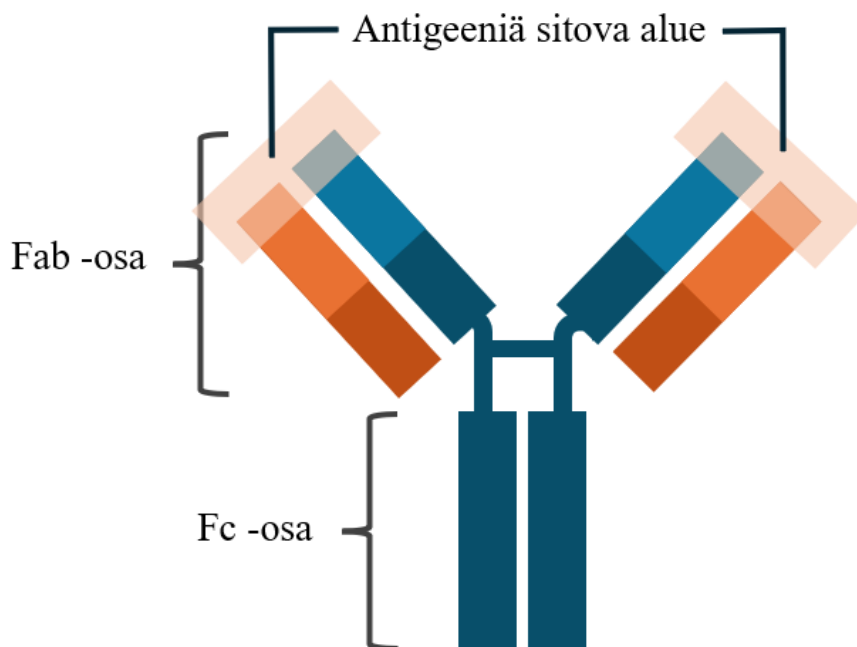
Aggregaation syitä on monia, ja siihen voivat vaikuttaa esimerkiksi lämpötila, pH, ionivahvuus sekä proteiinikonsentraatio. Lisäksi vasta-aineiden tuotantomenetelmät ja säilytysolosuhteet voivat joko ehkäistä tai edistää aggregaatiota. Aggregaation mittaaminen on olennainen osa mAb:ien laadunvalvontaa ja kehitysprosessia. Tarkat ja luotettavat analyysimenetelmät mahdollistavat aggregaation havaitsemisen ja sen vaikutuksen arvioinnin, mikä on tärkeää lääkkeen koko elinkaaren aikana. Erilaiset menetelmät, kuten valonsironta, spektroskopia ja kromatografia, tarjoavat keinoja aggregaation tutkimiseen ja sen hallintaan. Näiden menetelmien avulla voidaan arvioida aggregaation laajuutta ja selvittää sen vaikutuksia vasta-aineen rakenteeseen ja biologiseen aktiivisuuteen.

Tässä tutkielmassa käsitellään monoklonaalisia vasta-aineita, vasta-aineiden aggregaattien syntymekanismeja sekä mittausmenetelmiä, joilla aggregaatiota voidaan tutkia ja seurata. Tutkielmassa tarkastellaan aggregaation vaikutusta lääkkeiden tehoon ja turvallisuuteen sekä arvioidaan eri mittausmenetelmien soveltuvuutta aggregaation havaitsemiseen. Aggregaation ymmärtäminen voi auttaa kehittämään uusia strategioita vasta-aineiden stabiloimiseksi. Tämä tieto on olennaista sekä akateemisessa tutkimuksessa että teollisessa lääkekehityksessä, sillä mAb:t muodostavat yhä suuremman osan uusista biologisista lääkkeistä. Paremmat analyysimenetelmät ja syvällisempi käsitys aggregaatiomekanismeista voivat edesauttaa entistä tehokkaampien vasta-aineiden kehittämistä.

2. Monoklonaaliset vasta-aineet

mAb:t ovat laboratorio-olosuhteissa tuotettuja proteiineja, jotka on suunniteltu sitoutumaan tarkasti tiettyihin kohdeproteiineihin. Ne toimivat tehokkaina diagnostisina työkaluina ja lääkeaineina, sillä ne tunnistavat tarkasti tiettyjä antigeenejä ja sitoutuvat niihin. mAb:t voivat merkitä kohdesolut immuunijärjestelmälle, joka tunnistaa ja tuhoaa ne.¹ Näiden vasta-aineiden kehitys on mullistanut lääketieteen tarjoamalla uusia, tarkasti kohdennettuja hoitomuotoja, joiden avulla voidaan vaikuttaa suoraan sairauksien molekulaarisiin mekanismeihin.

mAb:t kuuluvat erityiseen immuuniglobuliiniluokkaan, ja ne valmistuvat yhdestä B-solulinjasta, joka tuottaa identtisiä vasta-aineita kohdistumaan tiettyyn antigeeniin. Näiden vasta-aineiden keskeinen piirre on, että ne syntyvät yhdestä kantasolukloonista, olipa kyseessä luonnollinen immuunisolu tai rekombinanttilinjalla kasvatettu solu.² mAb:t kykenevät tunnistamaan ja sitoutumaan spesifisiin molekyyliin, erityisesti proteiineihin, jotka voivat esiintyä joko solukalvossa tai liukoisessa muodossa. Tämä sitoutuminen perustuu vasta-aineiden muuttuvan alueen rakenteelliseen mukautuvuuteen, mikä mahdollistaa korkean affiniteetin ja spesifisyyden kohdeantigeenin tiettyyn domeeniin.³ Kun vasta-aineet ovat sitoutuneet kohdeantigeeniinsa, immuunijärjestelmän muut solut voivat hyökätä sitä vastaan⁴. Tämä mahdollistaa tarkasti kohdennetut hoitomuodot monien sairauksien hoidossa. Yleisimpiä mAb:eilla hoidettuja sairauksia ovat syövät, autoimmuunisairaudet sekä infektioaudit.⁵



Kuva 1. Monoklonaalisen vasta-aineen perusrakenne. Rakenne pitää sisällään Fab- ja Fc-osat sekä antigeeniä sitovat alueet.

mAb on proteiini, joka koostuu neljästä polypeptidiketjusta: kahdesta raskaasta ja kahdesta kevyestä ketjusta, jotka ovat yhdistyneet toisiinsa disulfididisidoksilla.¹ Näiden ketjujen yhdistelmät muodostavat antigeenin tunnistamis- ja sitoutumisalueet, jotka mahdollistavat vasta-aineen vuorovaikutukset ihmiskehon immuunijärjestelmän kanssa. Raskaat ketjut sisältävät kolme vakioaluetta C_{H1} , C_{H2} ja C_{H3} sekä muuttuvan alueen V_H .⁶ Kevyet ketjut koostuvat yhdestä vakioalueesta C_L ja yhdestä muuttuvasta alueesta V_L . Näiden alueiden avulla vasta-aineet voivat tunnistaa ja sitoutua spesifisesti kohteena olevaan antigeeniin.

Vasta-aineen perusrakenne voidaan jakaa Fab- ja Fc-osaan. (Kuva 1) Fab-osa, eli fragmentti-antigeenin sitoutumisalue koostuu muuttuvista alueista ja vakioalueista molemmista ketjuista. Tämä osa vastaa antigeenin tunnistamisesta ja siihen sitoutumisesta. Vasta-aineen toinen osa, Fc-osa, eli fragmentti-kiteytyvä alue, koostuu raskaan ketjun vakioalueista ja on vastuussa immuunijärjestelmän aktivoimisesta ja vasta-aineiden kierrättämisestä elimistössä.⁶ Fc-alueella on merkittävä rooli vasta-aineiden vaikutusmekanismien hallinnassa, sillä se voi sitoutua immuunijärjestelmän solujen reseptoreihin ja edistää solujen tappomekanismeja, kuten komplementtivälitteistä sytotoksisuutta ja vasta-ainevälitteistä soluvälitteistä sytotoksisuutta.

mAb:ien valmistuksessa hyödynnetään bioteknologisia menetelmiä, joissa saadaan elävät solut tuottamaan haluttua proteiinia. Perinteinen menetelmä on hybridoomatekniikka, jossa koe-eläimen, kuten hiiren immuunisolut yhdistetään myeloomasolujen kanssa, mikä johtaa hybridoomasolujen muodostumiseen.⁷ Hybridoomasolut kykenevät jakautumaan rajoittamattomasti ja tuottamaan yksittäisiä antigeeniä tunnistavia vasta-aineita. Tuotantoprosessissa valitut hybridoomasolut kasvatetaan soluviljelmissä tai bioreaktoreissa, joissa ne tuottavat suuria määriä vasta-ainetta. Prosessin seuraavassa vaiheessa vasta-aineet eristetään ja puhdistetaan käyttämällä erilaisia kromatografisia tekniikoita, kuten proteiini A -affiniteetikromatografiaa.⁷ Puhdistusvaiheen jälkeen vasta-aineet analysoidaan niiden spesifisyyden, affiniteetin ja biologisen aktiivisuuden varmistamiseksi.

Kehittyneemmät menetelmät, kuten rekombinantti-DNA-tekniikka, mahdollistavat täysin ihmisen perimään perustuvien mAb:ien tuottamisen ilman eläinperäisiä soluja. Tässä prosessissa vasta-aineen kevyt- ja raskasketjuiset geenit kloonataan ja liitetään sopiviin ekspressiovektoreihin. Tämän jälkeen DNA siirretään tuotantosoluihin, jotka soveltuvat hyvin vasta-aineiden erittämiseen niiden tehokkaan posttranslaationaalisin muokkauksen ansiosta.⁸ Tämä tekniikka parantaa valmistusprosessin skaalautuvuutta, mahdollistaa vasta-aineiden rakenteellisen muokkauksen ja vähentää immunogeenisyyteen liittyviä ongelmia.

mAb:ien käyttö lääketieteessä jatkaa kasvuaan, ja tulevaisuudessa niiden sovellusmahdollisuudet laajenevat entisestään. Uudet tekniikat tarjoavat entistä tarkempia ja tehokkaampia hoitomuotoja. Näiden edistysaskeleiden ansiosta mAb:eista on tullut keskeinen osa modernia lääketiedettä ja bioteknologiaa, ja ne tarjoavat entistä täsmällisempiä ja tehokkaampia ratkaisuja monien sairauksien hoitoon.

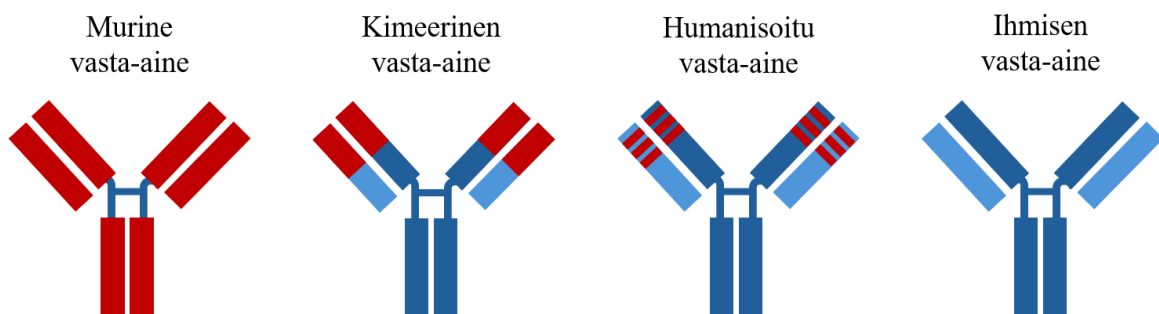
3. Monoklonaalisten vasta-aineiden luokittelu

mAb:ien varhaisvaiheen kehitys pohjautui hiiren proteiineihin, mutta ne eivät olleet täysin yhdensopivia ihmisen immuunijärjestelmän kanssa. Tämä rajoitti niiden pitkäaikaista käyttöä. Teknologisten innovaatioiden ansiosta kehitettiin kuitenkin uusia menetelmiä, jotka mahdollistivat humanisoitujen ja täysin ihmisen rakenteita vastaavien vasta-aineiden tuotannon.¹ Tämä kehitys on laajentanut mAb:ien käyttöä lääketieteessä.

mAb:t voidaan luokitella neljään päätyyppiin niiden tuotantolähteen mukaan: hiiriperäiset (murine), kimeeriset, humanisoidut ja ihmisen vasta-aineet (Kuva 2).⁶

Taulukko 1. Monoklonaalisten vasta-aineiden tyypit tuotantolähteen mukaan.^{1,6}

Tyypit	Perusominaisuudet	Hyödyt/haasteet	Esimerkkejä
Murine (pääte -omab)	Hiiri-peräisiä vasta-aineita, valmistetaan hiiren B-lymfosyyteistä ja myeloomasoluista.	Lyhyt puoliintumisaika, allergiset reaktiot yleisiä, rajoitettu hyöty ihmisillä.	Blinatumomab, Moxetumomab pasudotox-tdfk
Kimeeriset (pääte -ximab)	65% ihmisestä, 35% hiirestä peräisin olevia vasta-aineita. Hiiren muuttuja-alueet yhdistetty ihmisen raskaisiin ja kevyisiin ketjuihin.	Pidempi puoliintumisaika, vähemmän immuunivasteita, taipumus indusoida lääkkeiden vastaisia-vasta-aineita	Cetuximab, Rituximab
Humanisoidut (pääte -zumab)	95% ihmisperäisiä, mutta sisältävät hiiren hypermuuttuvia alueita.	lääkevastaisten vasta-aineiden vähentyminen, työläs ja vaikeampi valmistaa.	Alemtuzumab, Ado-trastuzumab emtansine
Ihmisen (pääte -umab)	Täysin ihmisperäisiä vasta-aineita.	Vähemmän antigeenisia, parempi sietokyky, pitkä puoliintumisaika.	Necitumumab, Denosumab



Kuva 2. Hahmotelma mAb:ien eri tyypeistä. Punaiset alueet viittaavat hiiren proteiineihin ja siniset alkuperäiseen vasta-aineeseen.^{6,9}

Hiiriperäiset mAb:t olivat ensimmäisiä kehitettyjä monoklonaalisia vasta-aineita. Ne valmistetaan yhdistämällä hiiren pernan B-lymfosyyttejä kuolemattomaan myeloomasolulinjaan, jolloin syntyy vasta-aineita tuottavia hybridoomasoluja.⁹ Näillä vasta-aineilla on kuitenkin haasteita kliinisessä käytössä, sillä ne voivat aiheuttaa immuunivasteen ihmisissä, mikä heikentää niiden tehoa ja voi johtaa haittavaikutuksiin. Lisäksi niiden puoliintumisaika elimistössä on lyhyt, koska ne eivät sitoudu tehokkaasti ihmisen vasta-aineita kierrättävään FcRn-reseptoriin. Näiden ominaisuuksien vuoksi niiden käyttö on vähentynyt ja niitä on alettu korvata paremmin siedetyillä vaihtoehdoilla.¹

Kimeeriset vasta-aineet kehitettiin parantamaan hiiriperäisten vasta-aineiden siedettävyyttä ihmiskehossa. Niissä hiiren vasta-aineen antigeeniä sitova osa yhdistetään ihmisen vasta-aineen rakenteellisiin osiin. Tämä muutos pidentää vasta-aineiden puoliintumisaikaa verenkierrossa, ja vähentää niiden immunogeenisyyttä verrattuna täysin hiiriperäisiin vasta-aineisiin. Myös kimeeriset vasta-aineet voivat kuitenkin laukaista elimistön immuunivasteen ja johtaa vasta-aineiden muodostumiseen.⁹ Tämä voi heikentää niiden tehoa pitkäaikaisessa käytössä. Tästä huolimatta ne ovat olleet merkittävä askel kohti paremmin siedettyjä ja tehokkaampia vasta-aineterapioita.¹

Humanisoidut vasta-aineet ovat edelleen kehitetty versio kimeerisistä vasta-aineista, joissa ainoastaan vasta-aineen antigeeniä sitovat osat ovat peräisin hiirestä, ja loput rakenteesta on ihmisen vasta-aineiden kaltaista. Tämän teknologian tavoitteena on vähentää immuunijärjestelmän reaktiota vasta-aineisiin ja siten parantaa hoidon tehokkuutta. Humanisoitujen vasta-aineiden kehittäminen on monimutkaista ja kallista, mutta niiden etuna on parempi siedettävyyys ja pienempi riski elimistön puolustusreaktiolle.^{1,9}

Ihmisen vasta-aineet on kehitetty uusien bioteknologisten menetelmien avulla, joissa hyödynnetään esimerkiksi geenimuokattuja eläimiä tai faginäyttökniikkaa. Nämä vasta-aineet ovat rakenteeltaan täysin ihmisen vasta-aineiden kaltaisia, mikä minimoi elimistön immuunivasteen ja pidentää niiden vaikutusaikaa.⁹ Ne tarjoavatkin tehokkaimman ja parhaiten siedetyn vaihtoehdon monoklonaalisissa vasta-aineterapioissa. Täysin ihmisen vasta-aineiden käyttö on yleistynyt erityisesti immunoterapiassa ja autoimmuunisairauksien hoidossa, joissa pitkäaikainen hoitotarve ja vähäinen immunogeenisyys ovat merkittäviä tekijöitä.¹

mAb:t voidaan myös luokitella neljään päätyyppiin niiden käyttötavan ja toimintamekanismin mukaan: konjugoidut, konjugoimattomat, bispesifiset ja trispesifiset vasta-aineet (Taulukko 2).^{1,9}

Konjugoimattomat vasta-aineet ovat yleisimmin käytettyjä vasta-aineita, jotka sitoutuvat spesifisesti kohdesolujen antigeeneihin ja aktivoivat immuunivasteen.⁹ Ne pystyvät toimimaan itsenäisesti ilman liitettyjä lisämolekyylejä¹. Yleisimmin niitä hyödynnetään syövän hoidossa, jossa ne voivat vaikuttaa eri tavoin taudin etenemiseen. Konjugoimattomat vasta-aineet voivat esimerkiksi tehostaa elimistön omaa immuunipuolustusta tunnistamalla ja tuhoamalla syöpäsoluja houkuttelemalla paikalle immuunisoluja, mikä johtaa syöpäsolujen apoptoosiin.¹

Konjugoidut vasta-aineet toimivat kuljettimina syöpälääkkeille tai radioaktiivisille isotoopeille. Nämä vasta-aineet kiertävät verenkierrassa, kunnes ne sitoutuvat kohdeantigeeniin, jolloin niihin liitetty terapeutinen aine vapautuu suoraan syöpäsoluun.⁹ Tämä kohdennettu lähestymistapa mahdollistaa syöpäsolujen selektiivisen tuhoamisen, mikä vähentää terveisiin soluihin kohdistuvia haittavaikutuksia verrattuna perinteisiin hoitomuotoihin. Konjugoidut vasta-aineet voivat sisältää joko solunsalpaajia tai radioaktiivisia partikkeleita, jolloin niiden vaikutusmekanismi perustuu joko solujen jakautumisen estämiseen tai säteilyn avulla tapahtuvaan solutuhoon.¹

Bispesifiset vasta-aineet omaavat rakenteen, jonka avulla ne voivat sitoutua kahteen eri antigeeniin samanaikaisesti.^{1,6,9} Yksi sitoutumiskohta voi tunnistaa syöpäsolun spesifisen antigeenin, kun taas toinen voi aktivoida immuunisoluja. Tämä mahdollistaa syöpäsolujen tehokkaan tuhoamisen immuunijärjestelmän avulla. Bispesifiset vasta-aineet ovat lupaava strategia erityisesti immunoterapian alalla, sillä ne voivat kohdennetusti vahvistaa immuunivasteita syöpäsoluja vastaan.⁹

Trispesifiset vasta-aineet muodostavat kehityksellisen jatkumon bispesifisille vasta-aineille. Nämä vasta-aineet voivat sitoutua kolmeen eri antigeeniin samanaikaisesti, mikä tarjoaa entistä tehokkaamman tavan aktivoida immuunijärjestelmä ja kohdistaa hoito taudinaiheuttajiin.⁹

Taulukko 2. Monoklonaalisten vasta-aineiden tyypit käyttötavan ja toimintamekanismin mukaan.

Vasta-ainetyyppi	Toimintaperiaate	Esimerkkejä ja sovelluksia
Konjugoidut vasta-aineet	Toimivat lääkkeiden tai radioaktiivisten aineiden kuljetusjärjestelminä, jotka kohdistuvat spesifisiin antigeeneihin.	Radioleimatut vasta-aineet (esim. Zevalin CD20-antigeenille), kemolabeloidut vasta-aineet (esim. trastutsumabiin kytketty DM1, kuten Kadcyli). Käytetään erityisesti syöpähoidoissa.
Konjugoimattomat vasta-aineet	Vaikuttavat suoraan ilman lisättyjä molekyyliä stimuloiden immuunijärjestelmää tuhoamaan kohdesoluja.	Käytetään esimerkiksi syövän hoidossa aktivoimaan immuunipuolustusmekanismeja tai sitoutumaan spesifisiin antigeeneihin.
Bispesifiset vasta-aineet	Yhdistävät kaksi eri antigeenia, yhden kohdesolussa ja toisen immuunisolussa. Tämä mahdollistaa immuunisolujen kohdistumisen tehokkaammin syöpäsoluihin.	Catumaxomab: sitoutuu T-soluihin (CD3) ja EpCAM-antigeeniin syöpäsoluissa. Käytetään erityisesti immunoterapiassa, syöpäsolujen tappamiseen.
Trispesifiset vasta-aineet	Sitoutuvat kolmeen eri antigeeniin, lisäten kohdistustarkkuutta ja parantaen immuunivastetta syöpäsoluja vastaan.	Etrumaxomab: sitoutuu HER2-antigeeniin (kasvaimen kohde), CD3-antigeeniin (T-solut) ja Fcγ-reseptoreihin. Käytetään syöpähoidoissa, erityisesti rintasyövän HER2-ekspressoivien solujen tuhoamisessa.

4. Monoklonaalisten vasta-aineiden aggregaatio

Aggregaatiolla viitataan tilanteeseen, jossa vasta-aineiden molekyylit yhdistyvät liiallisesti, mikä voi aiheuttaa ei-toivottuja rakenteellisia muutoksia ja heikentää niiden laatua, turvallisuutta ja tehoa. Aggregaatio on monivaiheinen prosessi, johon liittyy proteiinien konformaatiomuutoksia sekä kasautumista, jotka edistävät aggregaattien syntymistä.¹⁰ Aggregaatio muodostaa merkittävän haasteen uusien terapeuttisten vasta-aineiden kehittämiseksi.¹¹

Aggregaatio voi ilmetä valmistusprosessin eri vaiheissa, kuten fermentoinnissa, puhdistusvaiheessa, formuloinnissa ja varastoinnin aikana. Se tapahtuu erilaisten stressitekijöiden seurauksena, jotka voivat olla joko ulkoisia tai sisäisiä.¹²

Sisäisiä stressitekijöitä ovat esimerkiksi aminohapposekvenssit, mahdolliset mutaatiot sekä molekyylien rakenteellinen joustavuus, jotka ovat seurausta vasta-aineen kehitys- ja valmistusprosesseista.^{12,13} Lisäksi aggregaatioon vaikuttavat useat fysikaaliset ja kemialliset tekijät, kuten hydrofobiset ja van der Waals -vuorovaikutukset, vetysidosten muodostuminen sekä sähköstaattiset voimat. Ne voivat joko stabiloida tai epästabiloida proteiinia ympäristöolosuhteista riippuen. Liuottimen ja proteiinin väliset epäsuotuisat vuorovaikutukset voivat myös edistää aggregaatiota ajamalla proteiinimolekyylejä yhteen.¹⁴

Ulkoiset stressitekijät liittyvät lääkeaineen käsittelyyn ja säilytykseen eri vaiheissa, kuten valmistuksen, varastoinnin, kuljetuksen ja käytön aikana. Näitä ovat esimerkiksi vasta-aineen altistuminen valolle eri aallonpituuksilla, lämpötilavaihtelut, rajapinnat (ilma-, neste- ja kiinteä-neste-rajapinnat), leikkausvoimat, vaihtelevat pH-arvot, korkeat ionivahvuudet sekä kemialliset epäpuhtaudet.^{12,13,15} Altistuminen näille tekijöille voi destabiloida proteiinin kolmiulotteista rakennetta ja paljastaa aggregoitumiselle herkkiä alueita. Nämä alueet voivat yhdistyä muiden vasta-aineiden kanssa muodostaen pysyviä aggregaatioytimiä, joiden ympärille suuremmat kompleksit kasvavat.

Aggregaatiotasot sekä lääkeaineessa että lopullisessa tuotteessa ovat tärkeitä arvioitaessa valmisteen laatua, sillä ne voivat muuttaa biolääkkeen biologisia ominaisuuksia ja toimintakykyä.¹⁶ Proteiinipohjaisissa hoitomuodoissa yksi keskeisistä haasteista on juuri näiden ei-toivottujen aggregaattien muodostuminen solun sisäisen tuotannon, puhdistusvaiheiden, säilytyksen ja annostelun yhteydessä.¹⁷ Ne voivat laukaista ei-toivottuja immuunireaktioita, jotka voivat paitsi heikentää lääkkeen kliinistä hyötyä, myös lisätä riskiä potilaan terveyden vaarantumiselle.

Proteiinin biologinen aktiivisuus on vahvasti sidoksissa sen rakenteeseen, minkä vuoksi on olennaista, että mAb säilyttää alkuperäisen laskostumisensa koko elinkaaren ajan.¹⁸ Ymmärtämällä tarkemmin kuinka aggregaattit syntyvät ja mitkä tekijät vaikuttavat niiden muodostumiseen, voidaan kehittää parempia strategioita, joilla estetään näiden epätoivottujen rakenteiden syntymistä. Tämän avulla voidaan parantaa mAb:ien tuotantoprosesseja ja kehittää entistä turvallisempia lääkevalmisteita.

5. Aggregaation vaikutus vasta-aineiden tehoon ja turvallisuuteen

mAb:ien aggregoituminen voi vaikuttaa merkittävästi lääkevalmisteen tehoon, turvallisuuteen ja käyttökelpoisuuteen. Aggregaatio voi heikentää vasta-aineiden biologista aktiivisuutta, muuttaa niiden farmakokineettisiä ominaisuuksia sekä lisätä valmisteen immunogeenisyyttä, eli kykyä laukaista ei-toivottuja immuunivasteita.¹⁹

Tehon kannalta aggregaatio voi vaikuttaa haitallisesti erityisesti vasta-aineen sitoutumiskykyyn. Proteiinien konformaation muuttuessa vasta-aine ei enää välttämättä tunnista kohdeantigeeniään yhtä tehokkaasti. Lisäksi suurikokoiset aggregaatit voivat poistua verenkierrosta nopeammin esimerkiksi maksan tai pernan kautta, jolloin lääkkeen vaikutusaika lyhenee. Tämä voi johtaa siihen, että potilas ei saa riittävästi hoitovastetta tai tarvitsee useammin annostelua tehokkaan hoidon varmistamiseksi.

Aggregaatiolla voi olla vaikutuksia myös valmisteen fysikaalisiin ominaisuuksiin, kuten liukoisuuteen ja viskositeettiin. Esimerkiksi tiiviit aggregaatit, kuten mikrokiteet ja amorfiset nanopartikkelit, voivat laskea liuoksen viskositeettia, kun taas laajemmat ja toisiinsa sotkeutuvat rakenteet voivat lisätä sitä. Tämä voi vaikeuttaa lääkkeen käsittelyä ja annostelua sekä heikentää valmisteen imeytymistä elimistöön erityisesti ihonalaisen ja lihaksensisäisen annostelun yhteydessä. Jos aggregaatiota ei saada hallittua riittävästi, valmisteen pitoisuutta joudutaan laskemaan, mikä voi pakottaa käyttämään suonensisäistä annostelua.¹⁹

Aggregaatit voidaan luokitella liukeneviin ja liukenemattomiin muotoihin. Liukenevat aggregaatit ovat pieniä ja pysyvät homogeenisena osana liuosta. Ne voivat koostua dimereistä ja trimereistä ja saattavat hajota takaisin monomeereiksi tietyissä olosuhteissa. Liukenemattomat aggregaatit ovat pysyviä, fysikaalisesti erillisiä hiukkasia, jotka eivät liukene valmisteeseen. Ne voivat muodostua proteiinien voimakkaan denaturoimisen tai kemiallisen muuntumisen seurauksena ja johtavat usein valmisteen hajoamiseen.

Useat tutkimukset ovat pyrkineet määrittämään aggregaatiotason, jossa haittavaikutusten riski kasvaa. Valmisteita, joissa aggregoituneen proteiinin osuus jää alle 1–2 %, pidetään yleisesti turvallisena. Joissakin tapauksissa jopa 5–10 % aggregaattipitoisuuksia voi esiintyä ilman kliinisesti merkittäviä vaikutuksia, mutta tämä riippuu valmisteesta ja sen käytöstavasta.¹⁹ On todistettu, että immuunivasteen syntymiseen tarvitaan usein huomattavan korkea aggregaattipitoisuus, kuten yli 10^6 hiukkasta/ml, mutta myös pitkäaikainen altistuminen pienemmille määriille voi lisätä immunogeenisyyden riskiä.

Yhteenvedon voidaan todeta, että aggregaatiolla voi olla monisyisiä vaikutuksia vasta-ainevalmisteen toimintaan. Se voi heikentää tehoa, vaikeuttaa annostelua ja nostaa immunologisten haittavaikutusten riskiä. Tämän vuoksi aggregaatiota pyritään minimoimaan lääkkeen koko elinkaaren ajan.^{19,20}

6. Aggregaation mittaamenetelmät

Aggregaattien analyttinen karakterisointi on monimutkainen prosessi, joka ei voi perustua pelkästään yhteen menetelmään. Mikään tekniikka ei pysty kattamaan yksinään koko analysoitavan alueen monimuotoisuutta. Tästä syystä aggregaatteja tutkitaan yleensä yhdistämällä eri menetelmiä. Jokaisella analyysitekniikalla on omat vahvuutensa ja rajoituksensa, ja ne eroavat toisistaan sekä käytettävien toimintaperiaatteiden että niiden tarjoaman tiedon tyypin suhteen. Tämä tarkoittaa, että eri menetelmät voivat täydentää toisiaan ja tarjota laajemman kuvan aggregaattien ominaisuuksista.²¹

6.1. Dynaaminen valonsironta

Dynaaminen valonsironta (DLS) on tehokas työkalu makromolekyylien diffuusiokäyttäytymisen tutkimiseen liuoksessa.²² Menetelmän ideana on mitata sironneen valon intensiteettiä eri kulmista. DLS perustuu makromolekyylien Brownin liikkeen analysointiin, joka johtuu niiden jatkuvista törmäyksistä liuotinmolekyylien kanssa. Näiden liikkeiden seurauksena sironneen valon intensiteetti vaihtelee ajan suhteen, ja tätä aikavaihtelua analysoimalla voidaan määrittää partikkelien diffuusiokerroin. Tämän avulla voidaan arvioida hiukkasten koko, sillä suuremmat partikkelit liikkuvat hitaammin ja aiheuttavat erilaisen sirontakuvion kuin pienemmät hiukkaset.

DLS on yleisesti käytetty menetelmä mAb:ien aggregaation analysoinnissa, koska se mahdollistaa aggregaattien havaitsemisen ilman näytteen kemiallista muokkausta. DLS:n avulla voidaan havaita oligomeereja kokoluokassa 1 nm – 5 µm.^{21,22} DLS ei kuitenkaan pysty erottamaan yksittäisiä monomeereja muista aggregaateista, vaan laskee annetussa näytteessä olevien hiukkasten keskimääräisen koon.²¹ Menetelmän etuna on sen suuri herkkyys pienille aggregaattimäärille sekä korkea mittaustarkkuus.²¹

DLS perustuu partikkelien diffuusiokertoimen D mittaamiseen. Tätä arvoa käytetään mAb-liuoksen keskimääräisen hydrodynaamisen säteen R_H laskemiseen Stokes-Einsteinin yhtälön avulla (Kaava 1).^{21,23} Aggregaattien tapauksessa tämä tarkoittaa, että suuremmat aggregaatit liikkuvat hitaammin ja aiheuttavat erilaisen sirontakuvion kuin pienemmät partikkelit.

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_s D}$$

Kaava 1. Stokes-Einsteinin yhtälö. Yhtälössä k_B on Boltzmannin vakio, T on absoluuttinen lämpötila (25°C) ja η_s on liuotimen viskositeetti.²¹

Menetelmän suurin haittapuoli on, että saadut tulokset ovat moniselitteisiä ja vain puolikvantitatiivisia. DLS ei pysty erottelemaan yksittäisiä aggregoituneita lajeja eikä määrittämään niiden määriä erikseen. Sen sijaan se tarjoaa kokonaisvaltaisen kuvan partikkelikokojakaumasta, jonka tulkinta voi olla haastavaa erityisesti heterogeenisissä näytteissä. DLS:n herkkyys kasvaa molekyyli­massan kasvaessa, mikä tekee siitä hyödyllisen työkalun erittäin suurten aggregaattimolekyylien havaitsemisessa. Suuremmat hiukkaset aiheuttavat voimakkaampaa valonsirontaa, mikä parantaa menetelmän kykyä havaita jopa pieniä määriä suurikokoisia aggregaattimolekyyliä. Korkea herkkyys voi kuitenkin aiheuttaa virheellisiä tuloksia, jos näyte sisältää pölyä tai muita suuria hiukkasia. Kontaminaatiot voivat häiritä mittausta ja vääristää tuloksia.²¹ Tästä syystä näytteiden valmistelu ja käsittely on suoritettava erityisen huolellisesti, jotta vältetään ulkoisten tekijöiden aiheuttamat kontaminaatiot. Aggregaatiota voidaan mitata DLS:llä suoraan ilman laimentamista.²³ Tämä tekee siitä helpommin käytettävän menetelmän kuin staattinen valonsironta.

6.2. Staattinen valonsironta

Staattinen valonsironta (SLS) on menetelmä, jolla tutkitaan liuoksessa olevien molekyylien aiheuttamaa valonsirontaa. Kun valo kulkee liuoksen läpi, osa siitä sirotaan molekyyleistä, ja tämän sironnan määrää voidaan mitata valon intensiteetin perusteella (Kuva 4). Staattinen valonsironta eroaa dynaamisesta valonsironnasta siten, että SLS mittaa sironneen valon keskimääräistä intensiteettiä eri kulmissa, kun taas DLS perustuu sironneen valon intensiteetin aikavaihteluihin ja antaa tietoa hiukkasten koosta niiden liikkeen perusteella. SLS:n avulla voidaan määrittää molekyylien molaarimassa ja pyörimissäde. Koska valtaosa biomolekyyleistä on kooltaan alle 20 nm, pyörimissäteen määrittäminen SLS:llä on usein haastavaa siron­taintensiteetin heikkojen kulmariippuvuuksien vuoksi.^{23,24}

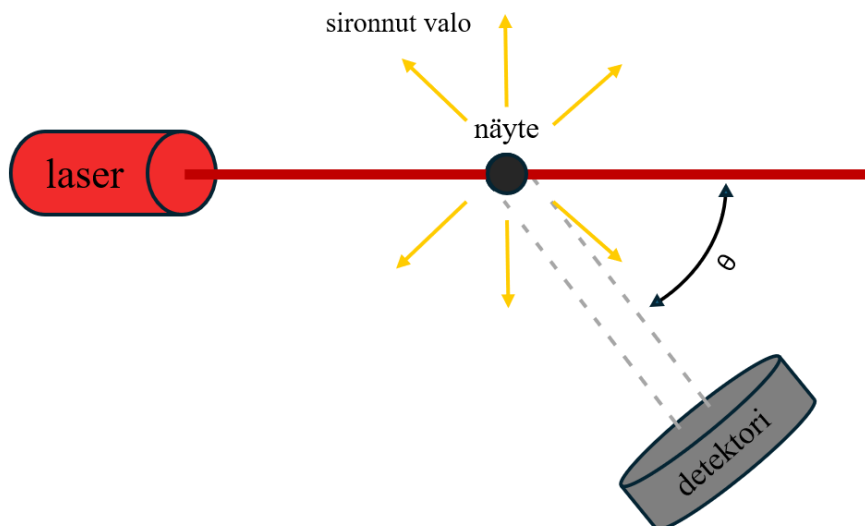
SLS-mittaukset voidaan tehdä yhden kulman avulla, mikäli liuoksen konsentraatio ja taitekerroin tunnetaan. Mittaukset perustuvat Rayleighin sirontateoriaan, jonka mukaan sironnan intensiteetti I korreloi näytteen molaarimassan ja konsentraation kanssa. Tätä ilmiötä kuvataan usein Debyen staattisen valonsironnan yhtälöllä (Kaava 2).

$$K \cdot \frac{c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c$$

Kaava 2. Debyen staattisen valonsironnan yhtälö. Yhtälössä $R(\theta)$ on sironnan suhteellinen intensiteetti kulmassa θ , M_w on näytteen painotettu keskimääräinen molaarimassa, A_2 on toisen kertaluvun virtausvakio ja K on optinen vakio, joka riippuu liuoksen taitekertoimesta, valon aallonpituudesta ja mitta­usgeometriasta.

Menetelmä soveltuu hyvin myös makromolekyylien liukoisuuden ja kiteytymiskyvyn tutkimiseen. Luotettavien tulosten saamiseksi tarvitaan kuitenkin eri konsentraatiolla valmistettuja, hyvin puhtaita ja pölyttömiä näytteitä.²⁴ SLS soveltuu erityisen hyvin suurten aggregaattien analysointiin, koska menetelmä ei ole altis Brownin liikkeen aiheuttamille häiriöille. Toisaalta suuret hiukkaset liikkuvat pienempiä hitaammin, mikä voi vaikuttaa mittausten tarkkuuteen.

SLS-mittauksissa voidaan käyttää monikulmamittauksia tekeviä valonsirontalaitteita, jotka mittaavat sirontaintensiteettiä useissa kulmissa samanaikaisesti. Tämä mahdollistaa entistä tarkemman analyysin erityisesti, kun halutaan selvittää hiukkasten muotoa tai kokoa epäideaalisissa näytteissä. Lisäksi SLS-mittauksia käytetään usein yhdessä erottelumenetelmien, kuten kokoerottelukromatografian kanssa, jolloin sirontaa voidaan mitata virtaavista ja yhtenäisistä näytteistä, mikä parantaa mittaustarkkuutta.²⁵



Kuva 4. Staattisen valonsironnan periaate. Laser lähettää valoa näytteeseen, josta osa valosta siroutuu eri suuntiin. Detektori mittaa sironneen valon intensiteettiä eri kulmissa suhteessa tulevaan säteilyyn, mikä mahdollistaa näytteen partikkelien koon ja molekyylipainon määrittämisen.

6.3. Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia

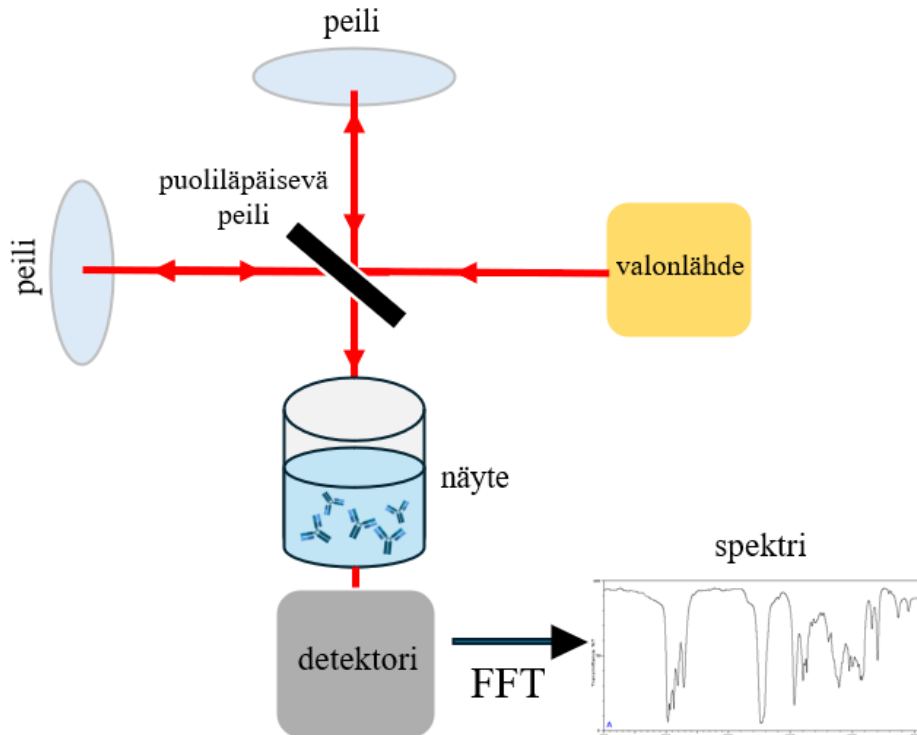
Fourier-muunnosinfrapunaspektroskopia (FTIR) on tehokas spektroskooppinen menetelmä, joka perustuu funktionaalisten ryhmien paikallistamiseen ja materiaalin karakterisointiin. Se mittaa näytteen absorptiota infrapunasäteilyä kohtaan, jonka aallonpituus on pidempi kuin näkyvän valon, tyypillisesti alueella $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$.²⁶

Menetelmä perustuu molekyylin värähtelyihin, kuten venytys- ja taivutusvärähtelyihin. Venytysvärähtelyt liittyvät sidosten pituuden muutokseen, ja taivutusvärähtelyt sidosten kulman muutoksiin.²⁶ FTIR-spektroskopiaa voidaan käyttää vasta-ainemolekyylien rakenteen ja koostumuksen tarkkaan analysointiin mittaamalla infrapunasäteilyn ja molekyylien värähtelyjen välistä vuorovaikutusta näytteessä. Menetelmä tarjoaa runsaasti tietoa proteiinien sekundaarirakenteesta, kuten α -kierteiden ja β -laskosten osuuksista.²⁷

FTIR-mittaus perustuu interferometriseen mittausasetelmaan, jossa infrapunavallo jaetaan puoliläpäisevällä peilillä kahteen eri suuntaan, ja tämän jälkeen ne yhdistetään jälleen. Tästä muodostuu interferenssikuvio. Tyypillinen FTIR-mittausjärjestely on esitetty kuvassa 5. Näytteestä mitattu signaali muunnetaan Fourier-muunnoksella (FFT) absorptiospektriiksi, jossa voidaan havaita molekyylien karakteristiset absorptiopiirteet. Spektrissä näkyvät absorptiopiirteet johtuvat siitä, että molekyylit absorboivat infrapunavalloa tietyillä aallonpituuksilla, jotka vastaavat niiden ominaisvärähtelyjä. Nämä absorptioaallonpituudet liittyvät erityisesti erilaisiin funktionaalisiin ryhmiin, kuten amidisidoksiin, karbonyyli- ja hydroksyyliiryhmiin. Tarkastelemalla, mitkä aallonpituudet vasta-aine absorboi, voidaan saada arvokasta tietoa sen rakenteellisista ja kemiallisista ominaisuuksista. FTIR voi myös tarjota tietoa siitä, miten materiaalin kemiallinen koostumus muuttuu, mikä voi olla hyödyllistä aggregaattien analysoinnissa.²⁶

FTIR-spektroskopia tarjoaa huomattavasti kattavampaa tietoa proteiinin rakenteellisista muutoksista kuin DLS, sillä se mahdollistaa suoran analyysin sekundäärirakenteen muutoksista.²⁶ Menetelmän herkkyys erityisesti pienten aggregaattien havaitsemisessa on kuitenkin heikompi verrattuna DLS:ään, eikä FTIR sovellu yhtä hyvin aggregaattimäärien tarkkaan kvantitatiiviseen analysointiin. DLS pystyy havaitsemaan aggregaatteja hyvin pieninä pitoisuuksina (<0,01%), kun taas FTIR edellyttää yleensä suurempia rakenteellisia muutoksia, jotta aggregaatio voidaan havaita.²⁸

Tästä huolimatta FTIR on erittäin tarkka menetelmä molekyyli-rakenteen muutosten havaitsemiseen ja pystyy paljastamaan myös pieniä rakenteellisia poikkeamia. Aggregaatio ilmenee FTIR-mittauksessa muutoksina proteiinin sekundaarirakenteessa, erityisesti amidi I -alueen absorptiokaistojen (1600–1700 cm^{-1}) siirtymänä ja profiilin muutoksina. Aggregaation seurauksena havaitaan usein β -laskosten osuuden lisääntymistä, mikä näkyy FTIR-spektrissä ominaisina absorptiokasvuina tai piikkisiirtymänä.²⁸ Tämä tekee FTIR:stä arvokkaan työkalun mAb:ien aggregaation rakenteellisen analyysin tutkimuksessa.^{26,28}



Kuva 5. FTIR-mittausasetelma. Valonlähteen infrapunavalo jaetaan puoliläpäisevällä peilillä kahteen polkuun, heijastetaan peileillä ja kuljetetaan näytteen läpi. Detektori mittaa interferenssisignaalin, joka muunnetaan Fourier-muunnoksella (FFT) spektriiksi.

6.4. Kokoerottelukromatografia

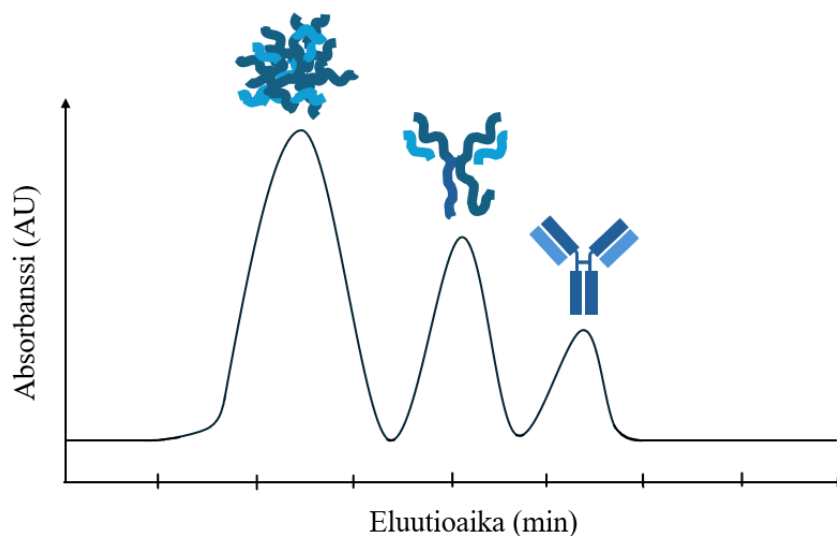
Kokoerottelukromatografia (SEC) on analyttinen menetelmä, jota käytetään molekyylien erottamiseen niiden koon ja hydrodynaamisen säteen perusteella.^{29,30} Menetelmässä näytteen komponentit kulkeutuvat kolonnin läpi, joka sisältää huokoisia helmiä.²³ Suuremmat molekyylit eluoituvat kolonnista aikaisemmin, koska ne eivät pääse tunkeutumaan huokosiin yhtä tehokkaasti kuin pienemmät molekyylit, jotka eluoituvat hitaammin.²⁹ Aggregaatit, jotka ovat huomattavasti suurempia kuin natiivit proteiinit, eluoituvat aikaisemmin, koska niiden suuri koko estää pääsyn huokosiin tehokkaasti.³¹

Toisin kuin useimmissa kromatografisissa tekniikoissa, SEC ei perustu näytteen ja kiinteän faasin välisiin kemiallisiin vuorovaikutuksiin, vaan ainoastaan molekyylien kokoon.³⁰ Tämä tekee SEC:stä erityisen soveltuvan mAb:ien aggregaattien analysointiin, sillä aggregaatit voidaan erottaa tehokkaasti natiiveista proteiineista niiden suuremman koon perusteella. Menetelmässä käytetään isokraatiota, eli yhtä ja samaa liuosta koko analyysin ajan, mikä parantaa mittausten toistettavuutta ja luotettavuutta.

Kolonnin valinta on keskeinen tekijä menetelmän erottelukyvyn kannalta, sillä huokoisuuden ja huokoskoon on vastattava tutkittavien molekyylien kokoluokkaa: jos huokokset ovat liian pieniä,

suuremmat analyytit eivät pääse etenemään tehokkaasti kolonnin läpi. Vastaavasti liian suuret huokokset voivat heikentää pienempien molekyylien erottumista. Tavallisesti käytettävät kolonnimateriaalit ovat inerttejä ja vesiliukoisia polymeerejä, kuten dekstraaneja tai polymetakrylaatteja.

SEC on herkkä ja toistettava menetelmä, mutta sen käyttöön liittyy myös haasteita. Näytteen laimentuminen kuljetusvaiheen aikana voi vaikuttaa aggregaattien havaitsemiseen, ja suuret aggregaatit voivat joskus hajota kolonissa aiheuttaen virheellisiä tuloksia. Lisäksi puskuriliuoksen olosuhteiden, kuten ionivahvuuden ja pH:n, on oltava optimaaliset, jotta näytteen rakenne säilyy analyysin aikana muuttumattomana.



Kuva 6. Monoklonaalisten vasta-aineiden aggregaation eteneminen ja määrittäminen SEC-kromatografialla. Yksittäiset vasta-aineet voivat käydä läpi rakenteellisia muutoksia, mikä johtaa lopulta suurempien aggregaattien muodostumiseen. SEC-kromatogrammi esittää erilaisten vasta-ainemuotojen erottelun eluutioajan perusteella. Suurempi huippu korkeammalla molekyylimassalla viittaa runsaampaan aggregoitumiseen.

6.5. UV-Vis-spektroskopia

UV-Vis-spektroskopia tarjoaa nopean ja ei-tuhoavan menetelmän proteiiniaggregaattien havaitsemiseen ja analysointiin liuoksessa. Menetelmä perustuu molekyylien kykyyn absorboida valoa ultraviolett- ja näkyvän valon aallonpituusalueella 200–800 nm. Valoa, jolla on tietty aallonpituus, ohjataan kyvetin läpi, joka sisältää tutkittavan näytteen. Kyvetistä läpäisevän valon intensiteetin mittauksella saadaan muodostettua näytteen absorptiospektri.³²

Spektrofotometrisessä mittauksessa analysoidaan valon absorptioon ja sirontaan liittyviä muutoksia spektrissä. Näin voidaan tunnistaa aggregaattien esiintyminen myös silloin, kun liuos näyttää

silmämääräisesti kirkkaalta. Erityisesti suurikokoiset proteiiniaggregaatit aiheuttavat valon sirontaa, mikä estää osan valosta pääsemästä detektorille. Sironnan seurauksena spektrissä havaitaan absorbanssin nousua, jonka perusteella aggregoituneiden proteiinien läsnäoloa voidaan arvioida.

UV-Vis-spektroskopian keskeisiä etuja ovat sen nopeus, yksinkertainen näytteenvalmistelu sekä näytettä rakenteellisesti säilyttävä analyysiprosessi. Aggregoituneet proteiinit voidaan havaita niiden aiheuttamien muutosten perusteella spektrissä. Erityisesti yli 200 nm:n kokoiset proteiiniaggregaatit voivat kasvattaa absorbanssia aallonpituusalueella, joka ylittää 320 nm, missä natiiviproteiinit eivät normaalisti absorboi. Tämä mahdollistaa suurikokoisten proteiiniaggregaattien tunnistamisen ilman kemiallista modifiointia. Pienempien aggregaattien havaitseminen voi olla haastavaa, koska niiden aiheuttama valonsironta on heikompaa. Siksi tarvitaan tarkempia ja herkempiä menetelmiä, kuten dynaamista valonsirontaa, jonka avulla pystytään havaitsemaan pienetkin partikkelit.

Spektroskopian tarkkuus ja herkkyys voivat kuitenkin olla rajoitettuja, jos näytteessä on muita komponentteja, jotka vaikuttavat absorptioon tai sirontaan.³² Tämä voi tehdä analyysistä vähemmän tarkan, vaikka menetelmä toimii muuten erinomaisesti seulontatyökaluna proteiinien tunnistamisessa.

UV-Vis-spektroskopian toimintaperiaate perustuu Beerin lakiin, jonka mukaan näytteen absorbanssi on suoraan verrannollinen aineen konsentraatioon, optiseen matkareittiin ja molaariseen absorptiivisuuteen (Kaava 3).³² Tämä tekee UV-Vis-spektroskopiasta tehokkaan menetelmän kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen analyysiin, mutta sen tarkkuus riippuu myös käytettävistä liuottimista ja mahdollisista liuoksen komponenttien vaikutuksista. Menetelmä tarjoaa arvokasta tietoa proteiiniaggregaattien ominaisuuksista ja läsnäolosta mAb-näytteissä.

$$A = \epsilon \times c \times l$$

Kaava 3. Beerin laki, jossa A on absorbanssi, ϵ molaarinen absorptiivisuus, c konsentraatio ja l optinen matkareitti.

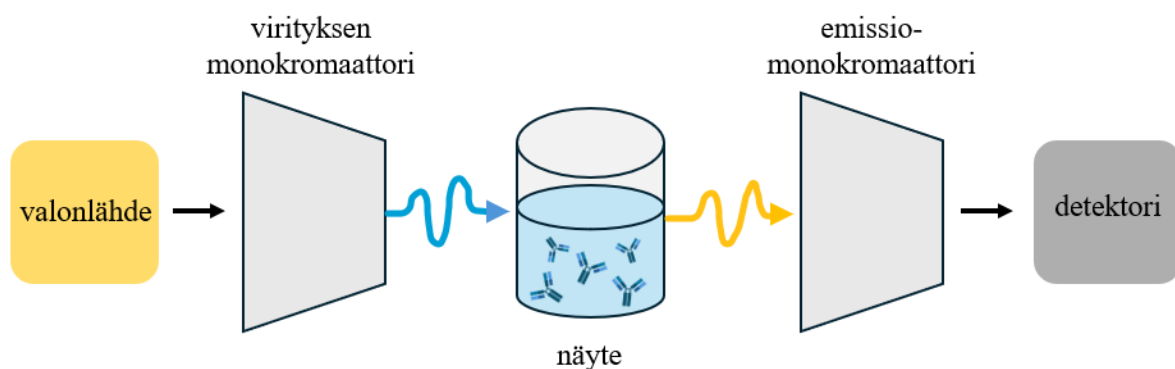
6.6. Fluoresenssispektroskopia

Fluoresenssispektroskopia on analyysimenetelmä, joka perustuu aineen kykyyn absorboida valoa tietyllä aallonpituudella ja emittoida sitä pidemmällä aallonpituudella. mAb:ien aggregaation tutkimuksessa fluoresenssispektroskopiaa voidaan hyödyntää havaitsemalla muutoksia näytteen fluoresenssisignaalin. Menetelmässä näytettä valaistetaan tyypillisesti 280 nm:n aallonpituudella, ja fluoresenssia mitataan noin 340 nm:n aallonpituudella. Näytteen valaistukseen käytetään virityksen monokromaattoria, joka valitsee sopivan aallonpituuden valonsäteestä ennen näytettä. Näytteestä

emitoitunut fluoresenssivalo kulkee emissiomonokromaattorin kautta detektorille, jossa fluoresenssi-intensiteetti mitataan. Fluoresenssimittauksen periaate on esitetty kuvassa 7. Fluoresenssi-intensiteettien suhde (esim. I_{340}/I_{280}), joka tunnetaan aggregaatioindeksinä (AI), on riippuvainen näytteen konsentraatiosta ja kuvaa suoraan aggregaation astetta.³³ Kun AI on noin 1, intensiteetit ovat yhtä suuret. AI-arvo, joka on selvästi suurempi kuin 1, viittaa merkittävään aggregaatioon, kun taas AI lähellä 1 tai sitä pienempi viittaa vähäiseen aggregaatioon. Näin fluoresenssispektroskopia tarjoaa nopean ja herkän keinon arvioida vasta-aineiden aggregoitumista ilman suurempaa näytteenkäsittelyä.

Fluoresenssispektroskopia on erittäin herkkä ja monipuolinen menetelmä, joka tarjoaa samanaikaisesti tietoa proteiinien rakenteellisista ja koon muutoksista sekä varhaisten oligomeerien että suurikokoisten aggregaattien muodostumisesta.³⁴ Tämä on erityisen hyödyllistä mAb:ien aggregaation tutkimisessa, koska menetelmä pystyy havaitsemaan varhaisia aggregaation vaiheita, kuten väärinlaskostumista ja oligomeerien muodostumista, joita ei välttämättä havaita muilla tekniikoilla.³⁴ Vaikka aggregaatioprosessi voi kokonaisuudessaan kestää tunteja tai päiviä, yksittäiset rakenteelliset muutokset proteiineissa tapahtuvat hyvin nopeasti ja voidaan havaita fluoresenssitekniikoilla jo nanosekunnin aikaskaalassa.³⁴ Tämä mahdollistaa aggregaation alkuvaiheiden tarkkailun ja tarjoaa arvokasta tietoa aggregaatioprosessin dynamiikasta.

Menetelmä mahdollistaa monien parametrien, kuten fluoresenssin intensiteetin, anisotropian ja spektrisiirtojen tarkkailun samanaikaisesti. Tämä moniparametrisuus auttaa erottamaan proteiinien monomeeriset, oligomeeriset ja aggregoituneet muodot sekä seuraamaan niiden rakenteellisia muutoksia aggregaatioprosessin aikana.³⁴



Kuva 7. Fluoresenssispektroskopian mittausperiaate. Valonlähteen valo suodatetaan virityksen monokromaattorilla valitsemaan haluttu viritysaallonpituus. Näyte emittoi pidempiaaltoista fluoresenssivaloa, joka suodatetaan emissio-kromaattorilla ennen detektointia.

6.7. Atomivoimamikroskopia

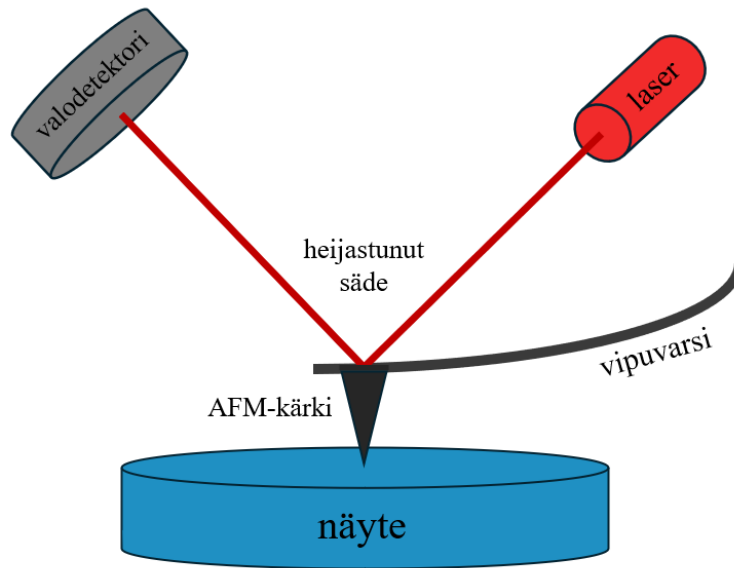
Atomivoimamikroskopia (AFM) on monikäyttöinen menetelmä, joka mahdollistaa näytepinnan korkearesoluutioisen kuvantamisen sekä molekyylien välisten voimien tarkan mittaamisen. AFM:ää hyödynnetään pintaan absorboituneiden vasta-aineiden kerrospaksuuden sekä pinnan suuntaisesti tapahtuvan aggregaation suhteellisten muutosten tarkasteluun.³⁵

AFM:n toiminta perustuu siihen, että mikroteknologisesti valmistettu, piistä (Si) tai pii-nitridistä (Si_3N_4) koostuva terävä kärki liikkuu näytteen pinnalla joko jatkuvassa kosketuksessa tai toistuvasti koskettaen pintaa skannauksen aikana. Kärki voi olla joko pyramidin tai kartion muotoinen, ja sen apikaalinen säde vaihtelee välillä 1–50 nm.³⁶ Kärki on kiinnitetty joustavaan vipuvarteeseen, jonka pituus voi olla 10–200 μm ja joka voi olla geometrialtaan kolmion- tai suorakaiteen muotoinen.³⁶ Vipuvarren taipuma syntyy kärjen ja näytteen välisistä vuorovaikutuksista, ja se mitataan laserin ja fotodiodin avulla. Tämän taipuman perusteella muodostetaan kuva näytteen pinnan rakenteesta.³⁵

Näytteen tutkimiseksi AFM käyttää pietsosähköisiä skannereita, jotka liikuttavat näytettä suhteessa kärkeen sekä pystysuunnassa että vaakasuunnassa. Pinnan kuvantaminen tapahtuu rasteriskannauksen avulla, jossa kärki liikkuu järjestelmällisesti samansuuntaisia linjoja pitkin. Jokainen pikseli tallentaa kärjen ja näytteen välisen voiman suuruuden, ja näistä tiedoista muodostetaan näytteen morfologian korkeuskartta. Ideaalitilanteessa AFM-kuvantaminen perustuu vain kärjen pystysuuntaisiin siirtymiin, jotka kuvastavat pinnan korkeuseroja. Vuorovaikutusvoimat, kuten van der Waalsin vetovoimat ja Pauli-hylkimisvoimat, voivat kuitenkin vaikuttaa mittaukseen ja aiheuttaa poikkeamia puhtaasta topografisesta kartasta.³⁶

AFM voi toimia eri tiloissa riippuen halutusta analyysistä. Kontaktitilassa kärki on jatkuvassa kosketuksessa näytteen kanssa, mikä mahdollistaa tarkat topografiset mittaukset, mutta voi aiheuttaa lateraalisia kitkavoimia ja näytteen vaurioitumista. Dynaamisessa tilassa, kuten koputustilassa, kärki värähtelee ja koskettaa näytettä ajoittain, mikä vähentää kitkavoimia ja soveltuu paremmin herkkien biologisten näytteiden analysointiin. Amplitudi- ja taajuusmodulaatiomenetelmät mahdollistavat tarkemman kontrollin värähtelystä ja ovat hyödyllisiä erityisesti vasta-aineiden aggregaation tutkimuksessa.³⁶

AFM:n etuna mAb:ien aggregaation tutkimuksessa on sen kyky tarjota korkearesoluutisia, kolmiulotteisia kuvia ilman värjäystä tai muita näytteen muokkaustoimenpiteitä. Se mahdollistaa aggregaattien koon, muodon ja pinnan rakenteen analyysin sekä molekyylien välisten vuorovaikutusten mittaamisen nanometrin tarkkuudella. Lisäksi menetelmä soveltuu näytteen dynaamisten muutosten, kuten aggregaation varhaisvaiheiden seurantaan lyhyillä aikaskaaloilla, vaikka varsinaista aggregoitumisen reaaliaikaista mittausta ei yleensä voida suorittaa.



Kuva 8. Atomivoimamikroskoopin toimintaperiaate. Laser osuu vipuvarteen, ja heijastunut säde ohjautuu valodetektoriin. AFM-kärki liikkuu näytteen pinnalla, ja detektori mittaa kärjen liikkeit, mikä mahdollistaa pinnan kolmiulotteisen rakenteen analysoinnin.

7. Yhteenveto

mAb:ien aggregaatio on merkittävä haaste biolääkkeiden kehityksessä, sillä se voi vaikuttaa niiden biologiseen aktiivisuuteen ja turvallisuuteen. Aggregoituminen voi johtaa lääkkeen tehon heikkenemiseen sekä lisätä haittavaikutusten, kuten immuunivasteiden riskiä. Tästä syystä aggregaation ymmärtäminen ja hallinta ovat keskeisiä tekijöitä mAb:ien valmistuksessa ja laadunvalvonnassa.

Aggregaation syntymiseen vaikuttavat monet fysikaaliset, kemialliset, ympäristölliset ja prosessointiin liittyvät tekijät, jotka voidaan jakaa sisäisiin ja ulkoisiin tekijöihin. Nämä tekijät voivat aiheuttaa vasta-aine-proteiinien yhteenliittymistä, mikä muuttaa niiden rakenteellisia ja toiminnallisia ominaisuuksia. Aggregaation vaikutukset eivät rajoitu ainoastaan lääkkeen tehoon, vaan ne voivat myös vaikuttaa sen säilyvyyteen ja tuotantoprosessien hallintaan.

Aggregaation tutkimukseen on kehitetty useita eri analyysimenetelmiä, joista jokainen tarjoaa erilaisen näkökulman aggregaattien rakenteen ja muodostumisen tutkimiseen. Kattavan ja luotettavan analyysin varmistamiseksi käytetään usein useampia mittausmenetelmiä yhdessä, sillä eri menetelmät täydentävät toisiaan ja ne tarjoavat yhdessä monipuolisempaa tietoa aggregaatiomekanismeista.

SEC on tarkin menetelmä aggregaattien koon ja määrän kvantitatiiviseen mittaamiseen, erityisesti pienille ja keskikokoisille aggregaateille. Sen heikkoutena on suurten aggregaattien huono havaitseminen, sillä ne voivat jäädä kolonniin kiinni. DLS on erittäin herkkä suurikokoisten aggregaattien havaitsemiseen ja antaa keskimääräisen partikkelikoon nopeasti, mutta ei pysty erottamaan eri kokoluokkien aggregaatteja tarkasti. SLS puolestaan soveltuu erityisen hyvin molekyylimassan ja aggregaattien konsentraation mittaamiseen silloin, kun aggregaatit ovat suurikokoisia ja homogeenisia. FTIR ei mittaa aggregaattien kokoa, vaan se on paras sekundäärirakenteen muutosten havaitsemiseen, mikä antaa tietoa siitä, liittyykö aggregaatioon proteiinin rakenteellisia muutoksia. UV-Vis-spektroskopia on helppo ja nopea menetelmä, joka voi havaita aggregaation aiheuttamia absorbanssipoikkeamia, mutta sen herkkyys pienten aggregaattien havaitsemiseen on rajallinen. Fluoresenssispektroskopia on erittäin herkkä pieniinkin proteiinin rakenteellisiin muutoksiin ja sopii hyvin aggregaation varhaisvaiheiden seurantaan, mutta se ei suoraan mittaa aggregaattien kokoa. AFM tarjoaa tarkimmat kolmiulotteiset kuvat aggregaattien muodosta ja koosta nanometrin tarkkuudella, mutta mittaus on työläämpi ja soveltuu parhaiten yksittäisten aggregaattien analyysiin, ei koko populaation arviointiin.

Näin ollen menetelmät täydentävät toisiaan: SEC tarjoaa luotettavan määrityksen pienistä aggregaateista, DLS ja SLS havaitsevat suuremmat aggregaatit, FTIR ja fluoresenssispektroskopia paljastavat rakenteellisia muutoksia, UV-Vis antaa yleiskuvan proteiinin stabiilisuudesta ja AFM mahdollistaa yksityiskohtaisen morfologisen analyysin. Näiden menetelmien yhdistäminen antaa kattavan kuvan mAb:ien aggregaatiosta ja parantaa analyysien luotettavuutta.

8. Viitteet

1. Bayer V. An Overview of Monoclonal Antibodies. *Semin Oncol Nurs.* 2019;35(5):150927. doi:10.1016/J.SONCN.2019.08.006
2. Sandeep, Shinde SH, Pande AH. Polyspecificity – An emerging trend in the development of clinical antibodies. *Mol Immunol.* 2023;155:175–183. doi:10.1016/J.MOLIMM.2023.02.005
3. Alejandra WP, Miriam Irene JP, Fabio Antonio GS, et al. Production of monoclonal antibodies for therapeutic purposes: A review. *Int Immunopharmacol.* 2023;120:110376. doi:10.1016/J.INTIMP.2023.110376
4. Quinteros DA, Bermúdez JM, Ravetti S, Cid A, Allemandi DA, Palma SD. Therapeutic use of monoclonal antibodies: General aspects and challenges for drug delivery. *Nanostructures for Drug Delivery.* 2017:807–833. doi:10.1016/B978-0-323-46143-6.00025-7
5. Kothari M, Wanjari A, Acharya S, et al. A Comprehensive Review of Monoclonal Antibodies in Modern Medicine: Tracing the Evolution of a Revolutionary Therapeutic Approach. *Cureus.* 2024;16(6):e61983. doi:10.7759/cureus.61983
6. Buss NAPS, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, De Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: History and future. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12(5):615–622. doi:10.1016/J.COPH.2012.08.001
7. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1. doi:10.1186/s12929-019-0592-z
8. Siegel DL. Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfus Clin Biol.* 2002;9(1):15–22. doi:10.1016/S1246-7820(01)00210-5
9. Behl A, Wani ZA, Das NN, et al. Monoclonal antibodies in breast cancer: A critical appraisal. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2023;183:103915. doi:10.1016/J.CRITREVONC.2023.103915
10. Ross CA, Poirier MA. What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(11):891–898. doi:10.1038/nrm1742
11. van der Kant R, Karow-Zwick AR, Van Durme J, et al. Prediction and Reduction of the Aggregation of Monoclonal Antibodies. *J Mol Biol.* 2017;429(8):1244–1261. doi:10.1016/J.JMB.2017.03.014
12. Sreenivasan S, Schöneich C, Rathore AS. Aggregation of therapeutic monoclonal antibodies due to thermal and air/liquid interfacial agitation stress: Occurrence, stability assessment strategies, aggregation mechanism, influencing factors, and ways to enhance stability. *Int J Pharm.* 2024;666:124735. doi:10.1016/J.IJPHARM.2024.124735
13. Vázquez-Rey M, Lang DA. Aggregates in Monoclonal Antibody Manufacturing Processes. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(7):1494–1508. doi:10.1002/bit.23155

14. Wu H, Kroe-Barrett R, Singh S, Robinson AS, Roberts CJ. Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 2014;588(6):936–941. doi:10.1016/J.FEBSLET.2014.01.051
15. van Haaren C, Byrne B, Kazarian SG. Study of Monoclonal Antibody Aggregation at the Air-Liquid Interface under Flow by ATR-FTIR Spectroscopic Imaging. *Langmuir.* 2024;40(11):5858–5868. doi:10.1021/acs.langmuir.3c03730
16. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):169–190. doi:10.1016/J.XPHS.2019.08.009
17. Roberts CJ. Protein aggregation and its impact on product quality. *Curr Opin Biotechnol.* 2014;30:211–217. doi:10.1016/J.COPBIO.2014.08.001
18. Das TK, Narhi LO, Sreedhara A, et al. Stress Factors in mAb Drug Substance Production Processes: Critical Assessment of Impact on Product Quality and Control Strategy. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):116–133. doi:10.1016/J.XPHS.2019.09.023
19. Pham NB, Meng WS. Protein aggregation and immunogenicity of biotherapeutics. *Int J Pharm.* 2020;585:119523. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119523
20. Cohen, J.R., Brych, S.R., Prabhu, S. *et al.* A High Threshold of Biotherapeutic Aggregate Numbers is Needed to Induce an Immunogenic Response *In Vitro*, *In Vivo*, and in the Clinic. *Pharm Res* 2024;41(4):651–672. doi:10.1007/s11095-024-03678-2
21. Bansal R, Gupta S, Rathore AS. Analytical Platform for Monitoring Aggregation of Monoclonal Antibody Therapeutics. *Pharm Res.* 2019;36(11):152. doi:10.1007/s11095-019-2690-8
22. den Engelsman J, Garidel P, Smulders R, et al. Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm Res.* 2011;28(4):920–933. doi:10.1007/s11095-010-0297-1
23. Ahrer K, Buchacher A, Iberer G, Josic D, Jungbauer A. Analysis of aggregates of human immunoglobulin G using size-exclusion chromatography, static and dynamic light scattering. *J Chromatogr A.* 2003;1009(1–2):89–96. doi:10.1016/S0021-9673(03)00433-3
24. Nobbmann U, Connah M, Fish B, et al. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2007;24:117–128. doi:10.1080/02648725.2007.10648095
25. Xu R. Light scattering: A review of particle characterization applications. *Particuology.* 2015;18:11–21. doi:10.1016/J.PARTIC.2014.05.002
26. Shukla U. Fourier transform infrared spectroscopy: A powerful method for creating fingerprint of molecules of nanomaterials. *J Mol Struct.* 2025;1322:140454. doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2024.140454

27. Baird G, Farrell C, Cheung J, Semple A, Blue J, Ahl PL. FTIR Spectroscopy Detects Intermolecular β -Sheet Formation Above the High Temperature T_m for Two Monoclonal Antibodies. *Protein J.* 2020;39(4):318–327. doi:10.1007/s10930-020-09907-y
28. Tiernan H, Byrne B, Kazarian SG. ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2020;241:118636. doi:10.1016/J.SAA.2020.118636
29. Chakrabarti A. Separation of Monoclonal Antibodies by Analytical Size Exclusion Chromatography. In: Böldicke T, ed. *Antibody Engineering*. IntechOpen; 2018. doi:10.5772/intechopen.73321
30. Fekete S, Beck A, Veuthey JL, Guillarme D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;101:161–173. doi:10.1016/J.JPBA.2014.04.011
31. Brusotti G, Calleri E, Colombo R, Massolini G, Rinaldi F, Temporini C. Advances on Size Exclusion Chromatography and Applications on the Analysis of Protein Biopharmaceuticals and Protein Aggregates: A Mini Review. *Chromatographia.* 2018;81(1):3–23. doi:10.1007/s10337-017-3380-5
32. A Review on UV-visible spectroscopy: Review Article. *J Pharma Insights Res.* 1(2):91–96. <https://jopir.in/index.php/journals/article/view/42>
33. Sreenivasan S, Jiskoot W, Rathore AS. Rapid aggregation of therapeutic monoclonal antibodies by bubbling induced air/liquid interfacial and agitation stress at different conditions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021;168:97–109. doi:10.1016/J.EJPB.2021.08.010
34. Bhattacharya M, Mukhopadhyay S. Studying Protein Misfolding and Aggregation by Fluorescence Spectroscopy. In: Geddes CD, ed. *Reviews in Fluorescence 2015*. Springer; 2016:1–27. doi:10.1007/978-3-319-24609-3_1
35. Wang X, Wang Y, Xu H, Shan H, Lu JR. Dynamic adsorption of monoclonal antibody layers on hydrophilic silica surface: A combined study by spectroscopic ellipsometry and AFM. *J Colloid Interface Sci.* 2008;323(1):18–25. doi:10.1016/J.JCIS.2008.04.024
36. Ruggeri FS, Šneideris T, Vendruscolo M, Knowles TPJ. Atomic force microscopy for single molecule characterisation of protein aggregation. *Arch Biochem Biophys.* 2019;664:134–148. doi:10.1016/J.ABB.2019.02.001