

Selektiivinen proteiiniadsorptio pinnoitettuihin mikropartikkeleihin - Denaturoidun proteiinin havainnointi

Pro gradu -tutkielma

Kemian laitos, Turun Yliopisto

Detektioteknologian tutkimusryhmä

Olivia Kuivala

Toukokuu 2026

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

Pro Gradu -tutkielma

Pääaine: Lääkekehityksen kemia

Tekijä: Olivia Kuivala

Otsikko: Selektiivinen proteiiniadsorptio pinnoitettuihin mikropartikkeleihin - Denaturoidun proteiinin havainnointi

Ohjaajat: Harri Härmä, Kari Kopra

Toukokuu 2026

Proteiinien denaturaatio ja aggregaatio tuottavat haasteita lääketeollisuudessa, sillä konformaation muutos proteiini- tai peptidilääkkeessä saattaa heikentää lääkkeen tehoa tai aiheuttaa sivuvaikutuksia potilaalle. Siksi onkin tärkeää löytää uusia menetelmiä denaturoituneiden ja aggregoituneiden proteiinien havainnoimiseksi. Proteiinin rakenteen avautuessa on sillä suurempi kontaktipinta, ja sen oletetaan muodostavan enemmän erilaisia vuorovaikutuksia verrattuna natiiviin proteiiniin. Denaturoitu proteiini adsorboituu tehokkaammin pintaan kuin natiivi muoto, mikä on hyvä lähtökohta uuden havainnointimenetelmän kehittämiseksi.

Tässä projektissa tutkittiin peptidiketjuilla pinnoitettuja ja kemiallisesti muokattuja mikropartikkeleita, joihin denaturoitu proteiini selektiivisesti adsorboituu. Karboksyloidun mikropartikkelin pintaa modifioitiin sekä hydrofobisella sykloheksyyliamiinilla että positiivisella N,N-dimetyyli-1,3-propaanidiamiinilla. Natiivin ja denaturoidun proteiinin adsorptiota tutkittiin trastutsumabi-proteiinin sitoutumisella mikropartikkeleihin mittaamalla sentrifugoidun näytteen supernatanttiin jäävän proteiinin konsentraatiota adsorption jälkeen käyttäen aikaerotteista luminesenssia.

Natiivin ja denaturoidun proteiinin adsorptiotehokkuudessa saatiin positiivisella N,N-dimetyyli-1,3-propaanidiamiinilla modifioidulla mikropartikkelilla 6-kertainen ero. Trastutsumabi on hyvin positiivisesti varautunut pH 4:ssä, joten mikropartikkelin pinnalla positiivisesti varautuneet ryhmät hylkivät proteiinia.

Sisällysluettelo

Sisällysluettelo	3
1. Johdanto	6
1.1 Vasta-aineiden rakenne ja stabiilisuus	6
1.2 Proteiinin adsorptioon vaikuttavat tekijät	8
1.3 Pinnan vaikutus proteiinin adsorptioon	10
1.4 Menetelmiä proteiiniadsorption havainnoimiseksi	13
1.5 Projektin tarkoitus ja tavoitteet	19
2. Materiaalit ja menetelmät	19
2.1 Peptidimikropartikkelien modifiointi.....	19
2.2 Karboksyloidun mikropartikkelin modifiointi.....	20
2.3 Proteiinkonsentraation määrittäminen	21
2.4 Proteiinin sitoutuminen mikropartikkeliin.....	21
2.5 Proteiinin sitoutuminen tasopintoihin	22
3. Tulokset ja niiden tarkastelu	22
3.1 Proteiinkonsentraation määrittäminen.....	22
3.2 Proteiinin sitoutuminen peptidipartikkeleihin.....	24
3.3 Proteiinin sitoutuminen karboksyloituihin ja modifioituihin partikkeleihin	26
3.4 Proteiinin sitoutuminen tasopintoihin.....	32
4. Yhteenveto ja johtopäätökset.....	34
5. Viitteet.....	38

Lyhenneluettelo

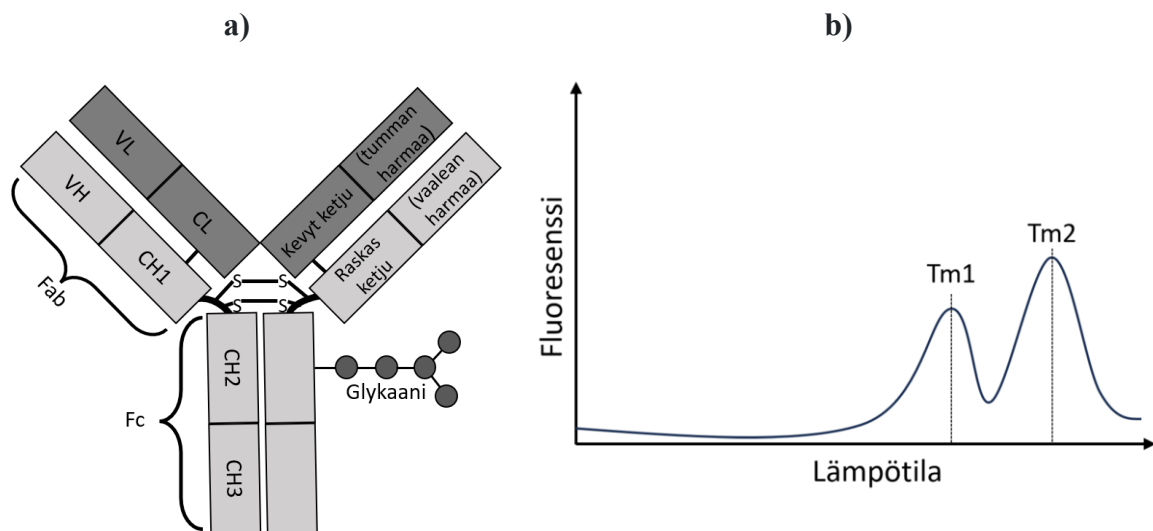
ABS	Akryylnitriilibutadieenistyreeni
BCA	Bisinkoniinihappo
BSA	Naudan seerumin albumiini, engl. bovine serum albumin
CH	Raskaan ketjun vakiodomeeni, engl. heavy chain constant domain
CHA	Sykloheksyyliamiini
CL	Kevyen ketjun vakiodomeeni, engl. light chain constant domain
DLS	Dynaaminen valonsironta
DMF	Dimetyyliformamidi
DMPA	N,N-dimetyyli-1,3-propaanidiamiini
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
EDC	N-(3-dimetyyliaminopropyyli)-N'-etyylikarbodiimidi
Fab	Antigeenin sitoutumisfragmentti, engl. Fragment: antigen binding
FBS	Naudan sikiön seerumi, engl. fetal bovine serum
Fc	Kiteytyvä fragmentti, engl. Fragment: crystallizable
FITC	Fluoreseiini-isotiosyanaatti
HEPES	N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappo
HSA	Ihmisen seerumin albumiini, engl. human serum albumin
HTS	Korkean kapasiteetin seulonta, engl. high-throughput screening
IgG	Immunoglobuliini G
mAb	Monoklonaalinen vasta-aine
MES	2-morfolinoetaanisulfonihappo
PEG	Polyetyleeniglykoli
pI	Isoelektrinen piste

PMMA	Polymetyylimetakrylaatti
POM	Polyoksimetyyli, polyasetaali
PVC	Polyvinylikloridi
QCM	Kvartsikidemikrovaaka
SPR	Pintaplasmoniresonanssi
T _m	Sulamislämpötila, engl. melting temperature
Tris	Tris(hydroksimetyyli)aminometaani
VH	Raskaan ketjun vaihteleva domeeni, engl. heavy chain variable domain
VL	Kevyen ketjun vaihteleva domeeni, engl. light chain variable domain

1. Johdanto

1.1 Vasta-aineiden rakenne ja stabiilisuus

Monoklonaalisia vasta-aineita (mAb) käytetään useiden sairauksien, kuten syöpien, hoidossa. Ne sitoutuvat spesifisesti antigeeneihin ja tarjoavat näin tehokkaan terapeutin vasteen. Vasta-aineita kuvataan yleensä y-kirjaimen muotoisina proteiineina, ja niiden terapeuttinen aktiivisuus perustuu niiden rakenteeseen. Tyypillisesti immunoglobuliini G -vasta-aineen (IgG) rakenne (**kuva 1a**) koostuu kahdesta raskaasta ketjusta (engl. heavy chain) ja kahdesta kevyestä ketjusta (engl. light chain). Raskaat ja kevyet ketjut ovat toisissaan kiinni disulfididoksin. Yhdessä raskaassa on yksi vaihteleva domeeni (engl. variable domain; VH) ja kolme vakiodomeenia (engl. constant domain; CH). Kevyessä on puolestaan yksi vaihteleva domeeni (engl. variable, light; VL) ja yksi vakiodomeeni (engl. constant, light; CL). Raskaan ja kevyen ketjun vaihtelevat domeenit ja raskaan ketjun ensimmäinen vakiodomeeni sekä kevyen ketjun vakiodomeeni muodostavat yhdessä antigeenin sitoutumisfragmentin (engl. fragment antigen binding; Fab). Fab-osan päässä on tietylle antigeenille spesifi sitoutumispaikka. Kaksi raskaan ketjun vakiodomeenia muodostavat ns. kiteytyvän fragmentin (engl. fragment crystallizable; fc).¹



Kuva 1. a) Tyypillisen IgG-vasta-aineen rakenne. b) Trastutsumabin kaksivaiheinen sulamiskäyrä, fragmentit denaturoituvat eri lämpötiloissa ja sisäisen fluoresenssin määrä kasvaa denaturoituessa. Mukailtu lähteestä².

Vasta-aineiden stabiilisuutta säätelevät disulfidisidokset, ei-kovalenttiset sidokset CH₂ ja CH₃-domeenien välillä sekä vuorovaikutukset vasta-aineen CH₂-domeenin ja glykaaniryhmän välillä.³ IgG denaturoituu usein kahdessa osassa lämpötilan noustessa: ensin denaturoituu Fab-fragmentti ja sitten Fc-fragmentti (**kuva 1b**). Rakenteeltaan erilaiset fragmentit ovat herkkiä erilaisille olosuhteiden muutoksille. Korkeampaa lämpötilaa kestävä Fc-fragmentti kestää huomommin matalaa pH:ta verrattuna Fab-fragmenttiin.⁴

Neutraalissa pH:ssa lämpötilan noustessa IgG1-luokan trastutsumabi-vasta-aineen rakenteessa paralleelien beta-laskosten määrä nousee, ja antiparalleelien beta-laskosten määrä vähenee. Lisäksi alfa-heliksien sekä satunnaisesti muodostuvien ja joustavien ”random coil”-rakenteiden määrä lisääntyy. Tällaiset muutokset vasta-aineiden rakenteiden suhteellisessa määrässä edesauttavat proteiinin aggregoitumista.³ Monet proteiinit destabiloituvat eli niiden sulamislämpötila (T_m) madaltuu matalassa pH:ssa.^{3,5} Trastutsumabin sulamislämpötila ei juurikaan muutu pH:n muuttuessa, mutta rakenteessa ilmenee muutoksia alemmassa lämpötilassa pH:n laskiessa. Aggregaatteja ei kuitenkaan pääse muodostumaan, sillä matalassa pH:ssa proteiinit ovat usein positiivisesti varautuneita ja hylkivät toisiaan.³

Kehitettäessä ja formuloitaessa lääkinnällisiä proteiineja on otettava huomioon esimerkiksi useat raaka-aineiden jäädytys- ja sulatuskerrat sekä nesteiden sekoitus.⁶ Erityisesti proteiinin vuorovaikutus ilman ja nesteen sekä nesteen ja jään välillä olevien rajapintojen kanssa altistavat proteiinin aggregoitumiselle.⁶ Vasta-ainelääkkeisiin lisätään usein erilaisia lisäaineita stabiilisuuden parantamiseksi ja erityisesti aggregoitumisen vähentämiseksi ja estämiseksi. Varsinkin ionittomat pinta-aktiiviset aineet, kuten erilaiset polysorbaatit, ovat tehokkaita stabiloimaan proteiineja jäädytyksen, sulatuksen, sekoituksen ja kuivauksen aikana. Lisäksi ne estävät proteiinin saostumista ja adsorptiota pintoihin. Ionittomien pinta-aktiivisten lisäaineiden toiminta perustuu kilpailevaan adsorptioon esimerkiksi nesteen ja ilman rajapinnoissa: lisäaineen adsorptio on termodynaamisesti kannattavampaa kuin proteiinin adsorptio. Proteiini siis pysyy nesteessä eikä altistu ilmalle. Lisäaine myös tarttuu proteiinin hydrofobisiin alueisiin, parantaen proteiinin kolloidista stabiilisuutta ja estäen hydrofobisten alueiden tarttumista esimerkiksi astioiden pintoihin.⁶

Trehaloosin ja histidiinin on raportoitu hidastavan aggregaation nopeutta, mikä tekee niistä stabiloivia lisäaineita. Proliinilla myös pieni aggregaatiota hidastava vaikutus.⁷ Histidiinin lisäys puskuriliukokseen on raportoitu nostavan T_m -arvoja. Positiivisesti varautuneet aminohapot, kuten histidiini, stabiloivat vasta-aineita muita aminohappoja tehokkaammin.

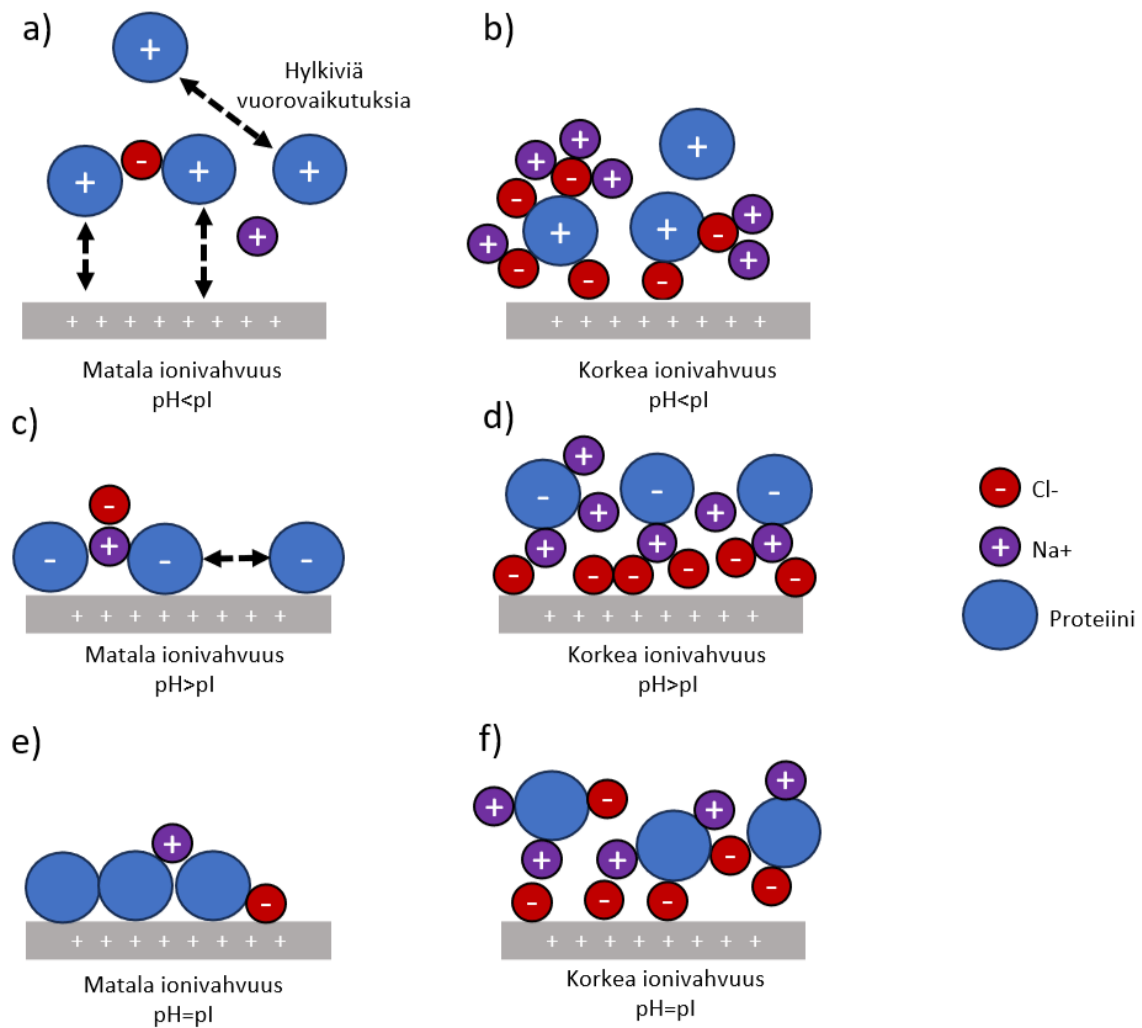
Aminohapon lisäys muuttaa liuokseen liunneen vasta-aineen ympärille muodostuvan ”solvataatiokuoren” rakennetta ja tekee aggregaatiosta energiankäytön näkökulmasta epäsuotuisaa.⁸ Ionittomien lisäaineiden tapaan histidiini tarttuu proteiinin hydrofobisiin alueisiin, ja vähentää niiden altistumista vedelle. Histidiinin pK_a-arvo on 6,0, joten se puskuroi monelle vasta-aineelle optimaalisella pH-alueella.⁹

1.2 Proteiinin adsorptioon vaikuttavat tekijät

Proteiinit ovat jatkuvasti kontaktissa erilaisiin pintoihin, ja niillä on taipumus kiinnittyä olosuhteiden ollessa suotuisia. Proteiinien adsorptioon vaikuttavia ulkoisia tekijöitä ovat lämpötila, pH, liuoksen ionivahvuus ja puskuriliuoksen koostumus.¹⁰ Lisäksi pinnan polaarisuus, varaus ja morfologia vaikuttavat proteiinien sitoutumiseen, ja proteiinit sitoutuvatkin yleensä voimakkaammin poolittomiin kuin polaarisiin substraatteihin. Usein proteiineilla on korkea affiniteetti hydrofobisiin substraatteihin.¹⁰

Lämpötila vaikuttaa sekä proteiiniadsorptioon kinetiikkaan sekä tasapainotilaan.¹⁰ Korkeampi lämpötila nostaa yksittäisten pintaan sitoutuvien proteiinien määrää. Ympäristön pH puolestaan vaikuttaa proteiinien elektrostaattiseen tilaan: proteiinin pinnan nettovaraus on neutraali silloin, kun ympäristön pH on saman arvoinen proteiinin isoelektrisen pisteen (pI) kanssa. Kun ympäristön pH-arvo on pienempi kuin proteiinin pI, proteiinin nettovaraus on positiivinen, ja kun pH on suurempi kuin pI, on nettovaraus negatiivinen. Proteiinien väliset repulsiivoimat ovat pienimmillään isoelektrisessä pisteessä, mikä mahdollistaa proteiinien pakkautumisen tiiviisti pintaan, ja adsorptio on suurimmillaan tuossa olosuhteessa (**kuva 2e**). Adsorptioon reaktionopeus on puolestaan korkeimmillaan, kun proteiinilla ja substraatilla on vastakkaiset varaukset.¹⁰

Ionivahvuudella tarkoitetaan liunneiden ionien konsentraatiota.¹⁰ Mitä korkeampi ionivahvuus on, sitä lyhyempi on yksittäisten varautuneiden partikkelien välinen etäisyys. Korkeassa ionivahvuudessa varautuneiden proteiinien adsorptio vastakkaisesti varautuneisiin substraatteihin heikkenee.¹⁰ Tämä johtuu varautuneiden ionien proteiinin ympärille muodostamasta kuoresta, joka estää elektrostaattisia vuorovaikutuksia (**kuva 2d**).¹¹ Puolestaan samalla tavalla varautuneiden partikkelien vuorovaikutus paranee, mikä parantaa adsorptiota¹⁰, ja saattaa johtaa myös proteiinien aggregoitumiseen (**kuva 2**).¹²



Kuva 2. Proteiinien ja pinnan väliset vuorovaikutukset vaihtelevissa ionivahvuuksissa ja pH-arvoissa. **a)** Kun proteiinilla ja pinnalla on samanlaiset varaukset matalassa ionivahvuudessa, elektrostaattiset vuorovaikutukset aiheuttavat hylkimistä. **b)** Korkeassa ionivahvuudessa samanlaisten varausten hylkivät vuorovaikutukset vähenevät ionien muodostaman kuoren ansiosta. **c)** Matalassa ionivahvuudessa vastakkain varautuneilla pinnalla ja proteiinilla on korkea affiniteetti toisiinsa. Proteiinit hylkivät toisiaan. **d)** Korkea ionivahvuus heikentää pinnan ja proteiinin välisiä vuorovaikutuksia silloin, kun proteiinilla ja pinnalla on vastakkaiset varaukset. **e)** Kun $\text{pH} = \text{pI}$ on proteiinin nettovaraus neutraali, eikä havaittavissa ole hylkiviä elektrostaattisia vuorovaikutuksia. Proteiinit pakkautuvat tiiviisti pintaan, kun ionivahvuus on matala. **f)** Korkea ionivahvuus heikentää pinnan ja proteiinien välisiä vuorovaikutuksia. Varautuneet ionit hakeutuvat proteiinien vastakkain varautuneille alueille.

Proteiinin konformaatio usein muuttuu sen kiinnittyessä pintaan.^{10,13} Konformaation muutos johtuu energiaeroista liuoksessa olevan ja pintaan kiinnittyneen proteiinin välillä. Liuoksessa

olevan proteiinin konformaation vapaan energian minimiarvo eroaa pintaan kiinnittyneen proteiinin konformaation vapaan energian minimiarvosta. Adsorptio nostaa proteiinin konformaation vapaata energiaa, jolloin konformaation on muututtava paremman stabiilisuuden saavuttamiseksi proteiinin ja pinnan välisessä kompleksissa. Proteiinin konformaation muutos aiheuttaa usein muutoksia myös proteiinin toiminnassa. Esimerkiksi entsyymien aktiivisuuden on havaittu muuttuvan tai heikkenevän adsorption myötä.¹⁰

Terapeuttisten proteiinien valmistusprosessit ovat monimutkaisia, ja prosessin aikana proteiini saattaa adsorboitua erilaisiin pintoihin ja denaturoitua osittain.¹¹ Kaikki prosessin vaiheet tulee suunnitella huolellisesti, jotta proteiinin rakenne pysyy stabiilina sen altistuessa erilaisille stressitekijöille. Proteiiniliuos on vuorovaikutuksessa prosessin aikana vaihtelevien pintojen, kuten letkujen, filttareiden, sekoitusastioiden ja pakkausmateriaalien, kanssa. Lisäksi se voi altistua muun muassa ilmalle, lämpötilan ja paineen vaihtelulle, valolle ja mekaaniselle stressille. Käytetyillä puskuriliuksilla on suuri vaikutus erilaisten apuaineiden lisäksi. Puskuriliuksella voidaan vaikuttaa proteiinin pinnan varaukseen ja hydrofobisiin alueisiin sekä ylläpitää sopivaa pH:ta.¹¹

1.3 Pinnan vaikutus proteiinin adsorptioon

Proteiinin ja pinnan välisiin vuorovaikutuksiin vaikuttavat esimerkiksi pinnan fysiokemialliset ominaisuudet kuten hydrofobisuus ja hydrofiilisyys, varaus ja funktionaaliset ryhmät.¹⁴ Proteiinit voivat adsorboitua sekä hydrofiilisiin että hydrofobisiin pintoihin,¹⁵ ja yleensä sitoutuminen tapahtuu ei-kovalenttisin sidoksin¹⁶. Vesiliuksessa proteiinin aminohappojen hydrofobiset sivuketjut ovat proteiinin sisäosissa ja hydrofiiliset ovat puolestaan ulkopinnalla. Hydrofiilisiin pintoihin sitoutuessaan proteiinin hydrofiiliset sivuketjut vuorovaikuttavat hydrofiilisen pinnan kanssa vetysidoksin ja elektrostaattisin vuorovaikutuksin. Hydrofobisiin pintoihin sitoutuminen tapahtuu puolestaan hydrofobisten ja van der Waals vuorovaikutusten kautta hydrofobisissa sivuketjuissa. Proteiinin konformaatio usein muuttuu sen sitoutuessa hydrofobiseen pintaan, koska pinta vetää puoleensa hydrofobisia aminohappojen sivuketjuja proteiinin sisältä.¹⁵ Proteiinien adsorptio hydrofiilisiin pintoihin on puolestaan palautuva eli proteiini irtoaa helposti hydrofiilisestä pinnasta, sillä hydrofiilinen pinta ei aiheuta samanlaisia konformaation muutoksia proteiiniin kuin hydrofobiseen pintaan sitoutuminen.¹⁶ Hydrofobisten vuorovaikutusten tiheys vaikuttaa sitoutumisen tehokkuuteen. Proteiinin denaturointi ennen sitoutumista parantaa adsorptiota hydrofobisiin pintoihin, sillä

hydrofobisten vuorovaikutusten tiheys kasvaa.¹⁵ Denaturoitu proteiini sitoutuu pintoihin paremmin kuin natiivi proteiini, sillä van der Waals vuorovaikutusten määrä on suurempi johtuen denaturaation aiheuttamasta hydrofobisten aminohapposivuketjujen paljastumisesta proteiinin sisältä. Suurin ero natiivin ja denaturoidun proteiinin sitoutumisessa saadaan hydrofobisella pinnalla, proteiinin isoelektristä pistettä vastaavassa pH:ssa. Sitoutumisen ero on mahdollista nähdä myös hydrofiilisellä pinnalla.¹⁷

Plasmaproteiinien adsorptio nanopartikkelin pintaan on havaittu kasvavan siirryttäessä vähiten hydrofobisesta pinnasta hydrofobisimpaan pintaan.¹⁸ Vertailtaessa (hydrofobisuuden kasvaessa) akroeliinia, metyylimetakrylaattia, tert-butyylistyreeniä, metyylistyreeniä ja styreeniä, havaitaan metyylistyreenin ja tert-butyylistyreenin hydrofobisuuden olevan samankaltaista. Proteiinin sitoutuminen on kuitenkin heikompaa tert-butyylipinnoitettuihin partikkeleihin johtuen steerisistä esteistä. Hydrofobisten vuorovaikutusten ohella funktionaalisten ryhmien rakenne vaikuttaa proteiinin adsorptioon.¹⁸ Myös nanopartikkelin pinnalla olevan polymeerin rakenne vaikuttaa proteiiniadsorption tehokkuuteen.¹⁹ Vertailtaessa negatiivisesti varautuneita poly(metyylimetakrylaatti-ko-styreeni)-nanopartikkeleita vaihtelevalla styreenin ja metyylimetakrylaatin konsentraatiolla, havaitaan korkeamman styreenipitoisuuden nostavan adsorboituneiden proteiinien määrää partikkelin pinnalla. Tämä selittyy styreenin hydrofobisuudella. Styreenin ja proteiinien aminohappojen sivuketjujen välille muodostuu π - π -pinoutumista, mikä ei puolestaan ole mahdollista metyylimetakrylaatilla. Naudan seerumin albumiinin (BSA), IgG:n ja fibronektiinin sitoutumisen on raportoitu paranevan partikkelien styreenipitoisuuden kasvaessa. Fibronektiinin adsorptio on kuitenkin korkeampaa kuin BSA:lla ja IgG:llä, mikä selittyy sen kyvyllä sitoutua erilaisiin pintoihin epäspesifisesti.¹⁹

BSA:sta ja ovalbumiinista koostuvat nanopartikkelit sisältävät sekä hydrofobisia että hydrofiilisiä alueita, sillä proteiinit ovat luonteeltaan kahtaisionisia.²⁰ Hydrofobisuus ja varaukset ovat riippuvaisia proteiinin aminohappoketjun sekvenssistä, joten proteiinista koostuvan nanopartikkelin ominaisuudet ovat niin ikään riippuvaisia käytetystä proteiinista. BSA:sta ja ovalbumiinista rakennetut nanopartikkelit ovat anionisia, eli niillä on pinnassaan negatiivista varausta. BSA:n pintaa voidaan muuttaa liittämällä siihen primääriamiineja, jolloin pinnasta saadaan kationinen. Seerumissa inkuboinnin jälkeen anioniseen BSA-partikkeliin sitoutuu vastoin yleistä käsitystä vähiten proteiineja. Kationiseen BSA:han puolestaan sitoutuu eniten erilaisia seerumin proteiineja. Yleensä proteiinien adsorptio on parempaa hydrofobisiin

kuin hydrofiilisiin nanomateriaaleihin, mutta proteiineista rakennettujen nanopartikkelien ominaisuudet ovat riippuvaisia proteiinin laadusta.²⁰

Paklitakseli-syöpälääkkeellä lastattuja polyprolaktonipartikkeleita hyödyntämällä on osoitettu, että pinnan varaus vaikuttaa ihmisen seerumin albumiinin (HSA) adsorptioon.²¹ Partikkelien pinnan varausta voidaan muokata lisäämällä joko kationista setyyli(trimetyyli)ammoniumbromidia tai anionista natriumdodekyylisulfaattia. Matalassa proteiinkonsentraatioissa nanopartikkelin pinnan varauksella ei ole vaikutusta proteiinin adsorptioon. Ero pintojen välille saadaan näkyville korkeammassa proteiinkonsentraatioissa, jolloin vähiten proteiinia sitoo neutraalisti varautunut partikkeli ja eniten puolestaan positiivisesti varautunut partikkeli. Tämä selittyy sillä, että HSA:n isoelektrinen piste on 4,8, ja proteiini on pH 7:ssä negatiivisesti varautunut, jolloin affiniteetti vastakkaisesti varautuneeseen partikkeliin on korkea. HSA:n on kuitenkin raportoitu adsorboituvan negatiivisesti varautuneeseen partikkeliin paremmin kuin neutraaliin partikkeliin. Tämä johtuu siitä, että muutkin heikot vuorovaikutukset elektrostaattisten vuorovaikutuksien lisäksi vaikuttavat sitoutumiseen.²¹

Proteiinien adsorptiota pintoihin halutaan joissain tilanteissa myös estää. Esimerkiksi erilaisia lääkinnällisiä implantteja käytettäessä veren ja kudosten proteiinien sitoutuminen implantin pintaan voi aiheuttaa esimerkiksi tulehduksia tai verisuonitukoksia. Toisaalta, tietynlaisten proteiinien adsorptio implantin pintaan saattaa ehkäistä hylkimisreaktiota.²² Proteiinien adsorptiota pyritään estämään välttämällä elektrostaattisia tai hydrofobisia vuorovaikutuksia, ja sitoutumista estävät (engl. antifouling) pinnat ovat yleensä hydrofiilisiä ja varauksettomia. Esimerkiksi hydrofiilinen polyetyleeniglykolipinnoite (PEG) muodostaa hylkivän pinnan yhdessä muiden hydrofiilisten molekyylien, kuten veden, kanssa estäen proteiinien sitoutumisen.²³

PEG-modifioinnin on osoitettu vähentävän plasmaproteiinien adsorptiota polylaktidipartikkeleihin sitä mukaa kun PEG-ketjun pituus kasvaa.²⁴ Vertailtaessa erikokoisia PEG-molekyylejä (2000-20000 g mol⁻¹), parhaiten sitoutumista estää 5000 g mol⁻¹ PEG, eikä suuremmista molekyyleistä saada lisähyötyä. Nanopartikkelin pinnan PEG:n tiheyden kasvaessa proteiiniadsorptio partikkelin pintaan pienenee. Proteiiniadsorptiota ei voida täysin estää PEG-modifioinnilla²⁴, mutta sen sijaan proteiiniadsorption estämiseen voidaan käyttää myös kahtaisionisia polymeerejä, joilla on parempi hylkimisteho kuin PEG:lla.²³ Lisäksi kultananopartikkeleita on modifioitu lyhyillä oligoetyleeniglykoliketjuilla, joissa on

kahtaisioninen sulfobetainipääty. Nanopartikkelin hydrofobisuutta voidaan säätää muuttamalla sulfobetainin rakennetta lisäämällä tyypen erilaisia sivuketjuja. Tällaisella pinnoitteella voidaan täysin estää proteiinien sitoutuminen riippumatta pinnan hydrofobisuudesta.²⁵

Silikananopartikkelin pinnoittaminen kysteinillä, lysiinillä tai arginiinilla estää BSA:ta sitoutumasta partikkelin pintaan.²⁶ Sen sijaan fenyylialaniilla pinnoitettuun partikkeliin muodostuu suuri proteiinikorona verrattuna pinnoittamattomaan partikkeliin, johtuen fenyylialaniinin hydrofobisesta luonteesta. Glysiinillä pinnoitettuun nanopartikkeliin sitoutuu saman verran BSA:ta kuin pinnoittamattomaan nanopartikkeliin.²⁶ Silikananopartikkeleita on pinnoitettu myös biotiinin ja kysteiinin yhdistelmällä, ja vertailtu pelkällä biotiinilla tai kysteinillä pinnoittamiseen.²⁷ Biotiinilla pinnoitettuihin partikkeleihin sitoutuu paljon proteiineja plasmasta. Sen sijaan kysteinillä sekä kysteiinin ja biotiinin yhdistelmällä pinnoitettuihin partikkeleihin proteiineja ei adsorboidu lainkaan, johtuen kysteiinin kahtaisionisesta luonteesta.²⁷ Niin ikään kahtaisionisilla organosiloksaaneilla pinnoittaminen estää proteiiniadsorptiota silikananopartikkeleihin. Pinnoitettu partikkeli hylkii sekä negatiivisesti että positiivisesti varautuneita proteiineja naudan sikiön seerumissa (FBS). Lisäksi organosiloksaanipartikkelin on raportoitu hylkivän lysotsyymiä ja BSA:ta.²⁸

BSA:ta on laajalti käytetty molekyylien epäspesifisen sitoutumisen estämiseen.¹³ Kuitenkin natiivin BSA:n pysyvyys pinnalla on heikkoa. On havaittu, että denaturoimalla BSA lämmittämällä, saadaan tiheämpi ja pysyvämpi pinnoite. Denaturoitu ja pintaan adsorboitunut BSA estää muiden molekyylien adsorptiota 10-kertaisesti verrattuna natiivilla BSA:lla pinnoitettuun piioksidipintaan.¹³

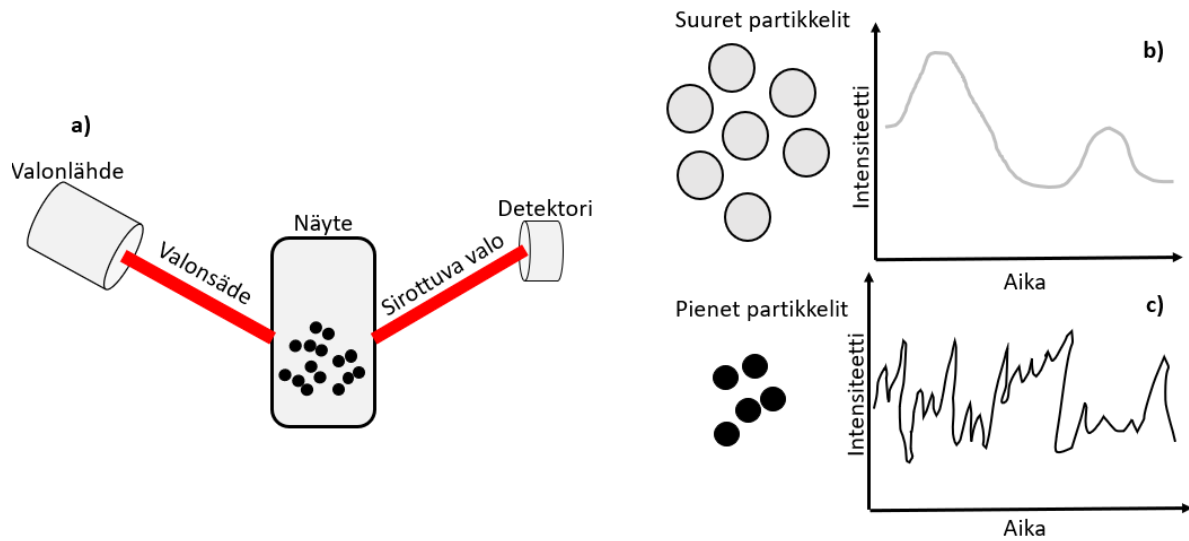
Peptidiketjuilla pinnoitetuilla kultananopartikkeleilla on myös proteiiniadsorptiota estäviä ominaisuuksia.²⁹ Pinnan varausprofiili, ja erityisesti varausten järjestys ketjussa, vaikuttavat seerumin proteiinien adsorptioon. Erilaiset peptidiketjut adsorboivat erilaisia proteiineja. Peptidiketjun aminohappoja voidaan vaihtaa toisiin samoin varautuneisiin aminohappoihin ilman, että pinnan proteiinikorona muuttuisi merkittävästi seerumi-inkubaation jälkeen.²⁹

1.4 Menetelmiä proteiiniadsorption havainnoimiseksi

Proteiinin adsorptiota voidaan havainnoida ja kvantifioida erilaisilla menetelmillä, kuten dynaamisella valonsironnalla, pintaplasmoniresonanssilla ja kvartsikidemikrova'alla. Lisäksi adsorption jälkeen näyteliuokseen jäävää proteiinikonsentraatiota voidaan määrittää

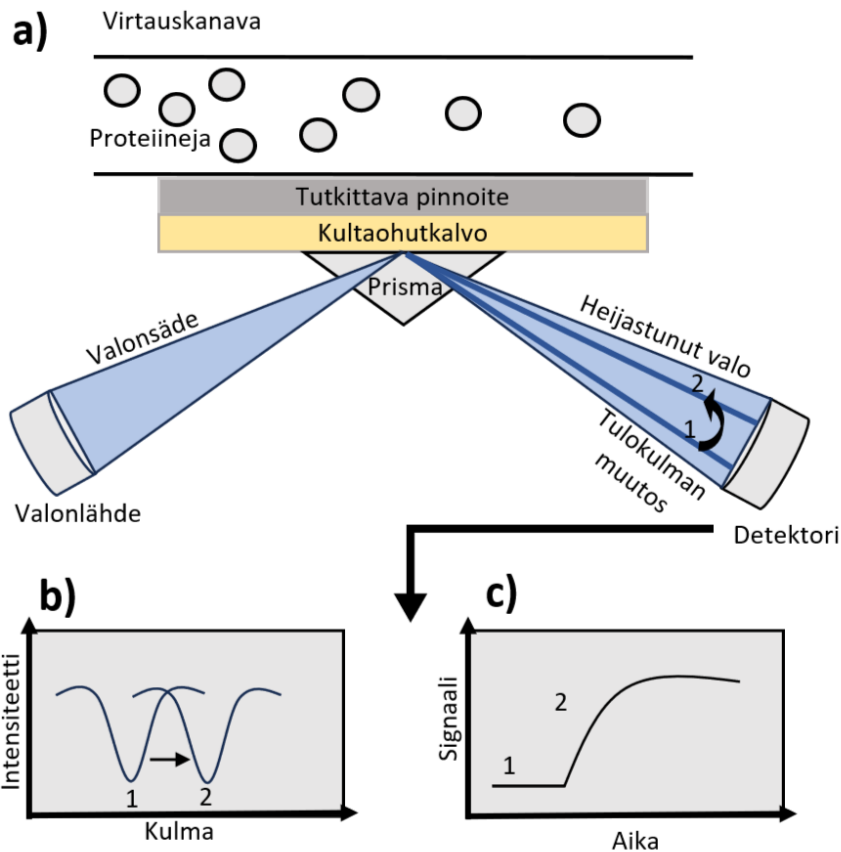
absorbanssiin ja luminesenssiin perustuvilla menetelmillä. Menetelmiä vertaillaan **taulukossa 1**.

Dynaamista valonsirontaa (DLS, dynamic light scattering) käytetään nanopartikkelin hydrodynaamisen halkaisijan määrittämiseen. Sitä voidaan käyttää proteiiniadsorptiomittauksissa vertaamalla proteiiniliuoksessa inkuboidun nanopartikkelin halkaisijaa puhtaan nanopartikkelin halkaisijaan. Halkaisijan kasvaessa voidaan päätellä proteiinien sitoutuvan partikkelin pintaan. Huomioon tulee kuitenkin ottaa myös mahdollinen nanopartikkelien aggregoituminen, joka myös kasvattaa halkaisijaa.²⁶ DLS-mittaus perustuu monokromaattisen valonsäteen sirottumiseen sen kulkiessa partikkeleita sisältävän liuoksen läpi. Dynaaminen valonsironta mittaa sirottuneen valon intensiteetin vaihtelua ajassa (**kuva 3**). Intensiteetin vaihtelu johtuu partikkelien liikkeestä, ja siitä voidaan määrittää diffuusiokerroin, joka on verrannollinen partikkelien hydrodynaamiseen halkaisijaan. Partikkelien liike on riippuvainen niiden koosta, ympäristön lämpötilasta ja liuoksen viskositeetista. Staattisella valonsironnalla puolestaan mitataan sirottuvan valon intensiteetin keskiarvoa. Suuremmat partikkelit sirottavat enemmän valoa kuin pienet, ja staattisella valonsironnalla mitataankin partikkelin painoa eikä halkaisijaa kuten dynaamisella valonsironnalla.³⁰ Kuten dynaamisessa valonsironnassa, myös elektroforeettisessa valonsironnassa mitataan intensiteetin vaihtelua ajassa. Värähtelevä sähkökenttä aiheuttaa partikkelien liikkeen, ja sillä voidaan määrittää partikkelien zeta-potentiaalia.³¹



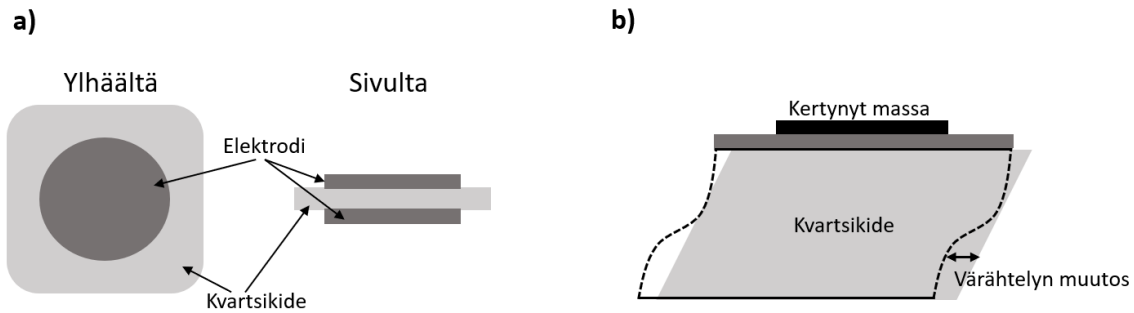
Kuva 3. a) DLS-tekniikan periaate: monokromaattinen valonsäde sirottuu sen kulkiessa partikkeleita sisältävän liuoksen läpi. b,c) Partikkelin koon vaikutus valonsironnan intensiteetin vaihteluihin ajan funktiona. b) Suuret partikkelit liikkuvat hitaammin kuin c) pienet partikkelit. Mukailtu³²

Pintaplasmoniresonanssia (SPR, surface plasmon resonance) voidaan käyttää proteiiniadsorption mittaamiseen sensorin pinnasta. Menetelmällä mitataan käytännössä taitekertoimen tai heijastuvan valon intensiteetin muutosta, jotka johtuvat pinnassa tapahtuvista muutoksista. SPR on ilmiö, jossa valonsäde osuu pinnassa oleviin elektroneihin, jotka fotoniin kytkeytyessään muodostavat näyteliuoksen ja kiinteän pinnan rajapinnassa liikkuvan sähkökentän eli pintaplasmonin. Kun valo osuu sopivassa kulmassa elektroniin, tapahtuu resonanssia, joka pienentää takaisin heijastuvan valon intensiteettinä (**kuva 4**). Proteiiniadsorptiota tutkittaessa sensori pinnoitetaan halutulla materiaalilla, jonka tulee kuitenkin olla läpinäkyvä. Proteiinien sitoutuessa pintaan taitekerroin muuttuu, koska pinnoitteen paksuus sensorin päällä kasvaa.^{13,33}



Kuva 4. SPR-tekniikan periaate: **a)** Valon osuu pinnan elektroneihin ja heijastuu prisman kautta detektorille. **b)** Resonanssi näkyy intensiteetin minimiarvona. Heijastuneen valon tulokulma muuttuu taitekertoimen muuttuessa, kun proteiinit adsorboituvat sensorin pintaan. **c)** Signaali kasvaa ajan funktiona tulokulman muuttuessa. Mukailtu lähteestä³³.

Kvartsikidemikrovaakaa (QCM, engl. quartz crystal microbalance) käytetään proteiiniadsorption kvantifioitiin, ja reaaliaikaiseen seurantaan kiinteän ja nesteen rajapinnassa. QCM-menetelmää käytettäessä tutkittavan pintamateriaalin ei tarvitse olla läpinäkyvää. Muitakaan pinnoitteen optisia ominaisuuksia tarvitse ottaa huomioon toisin kuin SPR-menetelmällä. QCM-D (quartz crystal microbalance with dissipation) -tekniikalla mitataan muutoksia värähtelijän taajuudessa, kun värähtelijän pintaan adsorboituu materiaalia ja pinnalla oleva massa kasvaa (**kuva 5**).^{34,35}



Kuva 5. a) QCM-sensorin rakenne **b)** Sensorin värähtelyn taajuus muuttuu, kun massaa kertyy sensorin pinnalle. Mukailtu lähteestä³⁴.

Proteiinin adsorptiota voidaan määrittää myös mittaamalla näytteeseen jäävää proteiinkonsentraatiota pinnalla inkuboinnin jälkeen. Tämä on käytännöllinen menetelmä mikro- ja nanopartikkelien proteiiniadsorption tutkimiseksi. Proteiinia inkuboidaan partikkelien kanssa liuoksessa, jonka jälkeen näyte sentrifugoidaan. Partikkelit painuvat mikrosentrifuugiputkeen pohjaan, ja voidaan määrittää supernatanttiin jäävän proteiinin konsentraatio. Proteiinkonsentraation määrittämiseen on erilaisia absorbanssiin ja luminesenssiin perustuvia menetelmiä. Esimerkiksi bisinkoniinihappomenetelmää (bicinchoninic acid, BCA) käytetään havainnoimaan biureettireaktiota, jossa Cu(II) pelkistyy Cu(I)-muotoon proteiinin läsnä ollessa emäksisissä olosuhteissa. BCA kelatoi Cu(I):n muodostaen violetin värin, jonka intensiteetti on verrannollinen proteiinkonsentraatioon. Käytössä on myös fluoresoivia leima-aineita, esimerkiksi fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) ja rodamiini.^{29,36} Lisäksi voidaan mitata proteiinin sisäistä fluoresenssia käyttämällä viritysaallonpituutena 280 nm, joka virittää proteiinin tryptofaaniaminohappoja. Tällöin emissioaallonpituutena mitataan 360 nm.¹⁰

Taulukko 1. Proteiiniadsorptioon käytettyjen havainnointimenetelmien vertailua

Menetelmä	Herkkyys	Ajankäyttö	Laitteisto	Soveltuvuus	Haasteet	Lähteet
Dynaaminen valonsironta	Havaittava partikkelikoko 1-1000 nm. Näytteen konsentraatio tyypillisesti 1-10 mgml ⁻¹	Yhden näytteen mittauksen kesto n. minuutti	Pöytämallinen. Mahdollistaa korkean kapasiteetin seulonnan (engl. high-throughput screening, HTS). Korkea automaatiotaso, mikäli käytössä on levylukijan sisältävä laite.	Proteiinin adsorptio nanopartikkelin pinnalle.	Ei voida mitata todella laimeita tai väkeviä liuoksia. Näytteen tulee olla läpinäkyvä.	³⁰⁻³²
Pintaplasmoni -resonanssi	10 pgml ⁻¹	Minuutteja	Pöytämallinen. Korkea automaatiotaso.	Proteiinin adsorptio tasopinnalle.	Herkkä lämpötilan vaihtelulle: puskuriliuoksen taitekerroin muuttuu lämpötilan muuttuessa. Kallis laitteisto. Matala näytekapasiteetti (engl. low throughput)	³³
Kvartsikide-mikrovaaka	1 ngcm ⁻²	Minuutteja.	Pöytämallinen. Matala automaatiotaso.	Proteiinin adsorptio tasopinnalle.	Herkkä puskuriliuoksen ionivahvuudelle, viskositeetille ja tiheydelle. Matala näytekapasiteetti.	^{34,35,37}
Proteiini-konsentraatio: luminesenssi	Riippuu leima-aineesta. Esim. rodamiini 10 ngml ⁻¹ , FITC 100 ngml ⁻¹ . Proteiinin sisäisen fluoresenssin mittaus tryptofaanista n. 1000 ngml ⁻¹ proteiinista riippuen.	Yhden näytteen mittauksen kesto sekunteja.	Monileima-levylukija. Pöytämallinen. Mahdollistaa korkean kapasiteetin seulonnan. Korkea automaatiotaso, mikäli käytössä on esim. pipetointirobotti.	Proteiinin adsorptio sekä taso- että partikkelipinnalle.	Useat menetelmät vaativat leima-aineiden käyttöä, pois lukien proteiinin sisäisen fluoresenssin mittaus tryptofaanista.	^{10,36}
Proteiini-konsentraatio: BCA	20 µgml ⁻¹	Yhden näytteen mittauksen kesto sekunteja. Vaatii 30 min reagenssien inkuboinnin.	Monileima-levylukija. Pöytämallinen. Mahdollistaa korkean kapasiteetin seulonnan. Korkea automaatiotaso.	Proteiinin adsorptio sekä taso- että partikkelipinnalle.	Pitkä reagenssien inkubointiaika.	²⁹

1.5 Projektin tarkoitus ja tavoitteet

Proteiinien toiminta perustuu pääosin niiden kolmiulotteiseen rakenteeseen. Lääketeollisuudessa terapeuttisten proteiini- ja peptidilääkkeiden denaturaatio ja aggregaatio aiheuttavat haasteita. Lääkkeessä olevan proteiinin tai peptidin konformaation muutos saattaa aiheuttaa potilaalle epätoivottuja sivuvaikutuksia tai heikentää lääkkeen tehoa.¹ Siksi onkin tärkeää, että denaturoitu tai aggregoitunut proteiini voidaan erottaa natiivista proteiinista.

Tässä projektissa tarkasteltiin denaturoidun trastutsumabi -vasta-aineen selektiivistä adsorptiota mikropartikkeleihin. Denaturoidun proteiinin adsorption erottelukykyä suhteessa natiiviin tutkittiin peptidipinnoitetuilla tai kemiallisesti muokatuilla mikropartikkeleilla sekä erilaisilla tasopinnoilla. Projektin lähtökohtana pidettiin sitä, että denaturoitu proteiini sitoutuu natiivia proteiinia tehokkaammin erilaisiin pintoihin.

Projektissa tutkittiin ensin kuudella erilaisella peptidisekvenssillä pinnoitettuja mikropartikkeleita. Peptidisekvensseihin pyrittiin saamaan sopivasti eroavaisuuksia hydrofobisuuteen ja kokonaisvaraukseen aminohappoja vaihtelemalla, ja sekvenssin pituutta muuttamalla. Lisäksi mitattiin kaupallista karboksyyli-pinnoitettua mikropartikkeliä, johon konjugoitiin hydrofobisia tai pH 4:ssä protonoituvia, positiivisesti varautuneita aminoligandeja. Lopuksi proteiinien adsorptiota tarkasteltiin erilaisilla polymeeri-, lasi- ja metallitasopinnoilla, jotta saatiin mahdollisimman kattava käsitys proteiinin sitoutumiskyvystä erilaisiin materiaaleihin. Lisäksi tutkittiin ja optimoitiin proteiiniadsorption olosuhteita esimerkiksi vaihtamalla puskuriliuoskomponentteja, säätämällä pH:ta tai lisäämällä erilaisia lisäaineita.

2. Materiaalit ja menetelmät

2.1 Peptidimikropartikkelien modifiointi

Peptidisekvenssit syntetisoitiin 4-sulfamyylimikropartikkelien (\varnothing 50 μm , sitomiskapasiteetti 0,72 mmol g^{-1} ; Sigma Aldrich) pinnalle Liberty blue -peptidisyntetisaattorilla (CEM) käyttäen 0,005 millimoolin synteessiskaalaa. Kuhunkin synteisiin punnittiin 7 mg mikropartikkeliä ja aminohappoja käytettiin 5 ekvivalenttia (0,025 millimoolia) suhteessa mikropartikkeliin, jolloin synteessissä käytettyjen aminohappojen pitoisuus liuotettuna dimetyyliformamidiin (DMF; Acros organics) oli 0,04 M. Fmoc-aminohapot (Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser-OH, Fmoc-L-Val-OH) hankittiin Sigma Aldrichilta. Synteeseissä käytettiin aktivaattorina 0,025 M 2-(1H-bentsotriatsoli-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumheksafluorifosfaattia (Acros

organics), ja aktivaattoriemäksenä 0,05 M di-isopropylietyyliamiinia (Acros organics). Fmoc-suojaryhmien poistamiseen käytettiin 20% piperidiiniä (Sigma Aldrich) DMF:ssä. Syntetisoidut peptidisekvenssit on esitetty **taulukossa 2**. Peptidisekvenssi kiinnitettiin mikropartikkeliin aminopäästään. Synteesin jälkeen peptidimikropartikkelit säilöttiin DMF:ään ja ennen määrittäviä pestiin kolme kertaa vedellä. Peptidisekvensseistä poistettiin sivuketjujen tert-butyylisuojarahmät käsittelemällä ne trifluoretikkahapolla (95/5 CF₃COOH/H₂O, v/v; Thermo Fisher Scientific) 30 min koko ajan sekoittaen. Käsitelyn jälkeen peptideillä pinnoitetut mikropartikkelit pestiin vedellä kolme kertaa ja säilöttiin veteen: pitoisuus vedessä oli noin 0,1 mg ml⁻¹. Kaikki työssä käytetty vesi oli ultrapuhdasta (Merck Millipore Synergy UV -vedenpuhdistusjärjestelmä).

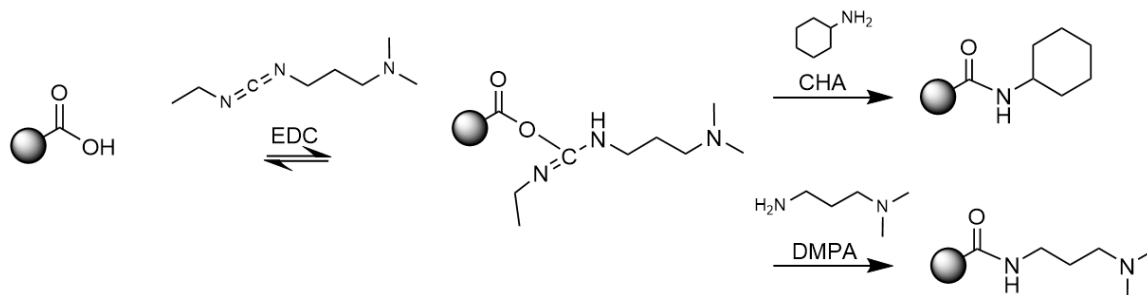
Taulukko 2. Syntetisoidut peptidisekvenssit

	Sekvenssi
1	H ₂ N-EYEEEEVEEEVEEE-COOH
2	H ₂ N-EYEEVVVVVEEEVEEE-COOH
3	H ₂ N-EYEEEEVEEEVEEEERRR-COOH
4	H ₂ N-EYEEEEVEEEVEEEERRRRRRR-COOH
5	H ₂ N-EYEEEEVEEEVEEEERRRRRRRRR-COOH
6	H ₂ N-EYEESSSSSEEEVEEE-COOH

Aminohapot: E: Glutamiinihappo, R: Arginiini, S: Seriini, V: Valiini, Y: Tyrosiini,

2.2 Karboksyloidun mikropartikkelin modifiointi

Karboksyloidun mikropartikkelin (∅ 2 µm; Thermo Fisher Scientific) pintaa modifioitiin sekä sykloheksyyliamiinilla (CHA; Sigma Aldrich) että N,N-dimetyyli-1,3-propanidiamiinilla (DMPA; Tokyo chemical industries), ja niiden pitoisuudet suhteessa mikropartikkelin karboksyyliryhmien määrään olivat 0,1-10 -kertaisia. Konjugointireaktio tehtiin 50 mM pH 6 2-morfolinoetaanisulfonihappopuskurissa (MES; Acros organics). CHA-ligandin konjugointireaktiossa MES-puskurissa oli 40 % dimetyylisulfoksidia (DMSO). Reaktioissa aktivaattorina käytettiin 2,5 mM N-(3-dimetyyliaminopropyli)-N'-etylikarbodiimidiä (EDC; Acros organics). Konjugointireaktion annettiin edetä 2 h koko ajan sekoittaen. Reaktion jälkeen mikropartikkelit pestiin vedellä kolme kertaa. Reaktio on esitetty **kaaviossa 1**.



Kaavio 1. EDC:n aktivoima aminoligandin konjugointireaktio karboksyyli-modifioituun mikropartikkeliin. EDC aktivoi karboksyyli-ryhmän muodostaen reaktiivisen O-asyyli-isourea-väliaineen, joka edelleen reagoi amiiniryhmän kanssa. Lopputuloksena syntyy stabiili amidisidos ja sivutuotteena ureaa.

2.3 Proteiinkonsentraation määrittäminen

Veteen vaihdetun trastutsumabi -vasta-aineen (Roche) konsentraatiota määritettiin Eu-leimatulla nanopartikkelilla (QRET Technologies). Tarvittaessa vasta-aine (3 μM) denaturoitiin pH 3 fosfaattisitraattipuskurissa (7,95 mM sitruunahappoa (Fisher Scientific) ja 4,11 mM Na_2HPO_4 :a (Fisher Scientific); *puskuri 1*) 4 min ajan 85 °C:ssa. Näytteen puskuriliuoksena käytettiin pH 4 fosfaatti-sitraattipuskuria (6,15 mM sitruunahappoa ja 7,71 mM Na_2HPO_4 :a; *puskuri 2*), joka sisälsi 0,01 % Triton X-100:aa (Thermo Fisher). Kaikissa määrittämissä näytteen tilavuus kuoppalevyllä oli 10 μl . Näyteliuoksen päälle levyllä pipetoitiin 10 μl detektioliuosta, joka sisälsi 2 μM Q14-sammuttajaa (QRET Technologies), 1:7000 Eu-leimattua nanopartikkeliä ja 0,01 % Triton X-100:aa. Detektioliuos valmistettiin pH 4 fosfaatti-sitraattipuskuriin (61,5 mM sitruunahappoa ja 77,1 mM Na_2HPO_4 :a; *puskuri 3*). Ennen mittausta levyä lämmitettiin 2 min 85 °C PTC-200 PCR-laitteella (MJ Scientific).

Kuoppalevymäärittämissä käytettiin Spark -monileimalukijaa (Tecan Life Sciences). Määrittämissä mitattiin aikaerotteista luminesenssia europiumille aallonpituudella 620 nm. Viritysaallonpituutena käytettiin 340 nm, viiveaikana 800 μs ja integraatioaikana 400 μs . Kaikissa määrittämissä käytettiin valkoista 384-PCR-kuoppalevyä (Biorad).

2.4 Proteiinin sitoutuminen mikropartikkeliin

Natiivin ja denaturoidun trastutsumabin sitoutumista mikropartikkeleihin määritettiin mittaamalla sentrifugoidun näytteen supernatanttiin jäävän vasta-aineen konsentraatiota. Ennen sentrifugointia mikropartikkelien annettiin inkuboitua vasta-aineen kanssa 5 min ajan.

Kaikki näytteet sentrifugoitiin Centrifuge 5424 -sentrifuugilla (Eppendorf) 3 min 1000 g:ssä. Vasta-aineen pitoisuus näyteliuksessa oli 3 nM. Peptidimikropartikkelin pitoisuus näyteliuksessa oli 2 μgml^{-1} . Karboksyylihapolla pinnoitetun mikropartikkelin konsentraatio oli pääasiassa 0,17 tai 0,33 μgml^{-1} . Mikäli proteiini denaturoitiin mikropartikkelin läsnä ollessa, oli proteiinin konsentraatio denaturoitaessa 3 nM ja puskuriliuksena käytettiin puskuri 2:ta. Tällöin denaturoitava näyte lämmitettiin 4 min ajan 85 °C ThermoStat Plus -laitteella (Eppendorf)

2.5 Proteiinin sitoutuminen tasopintoihin

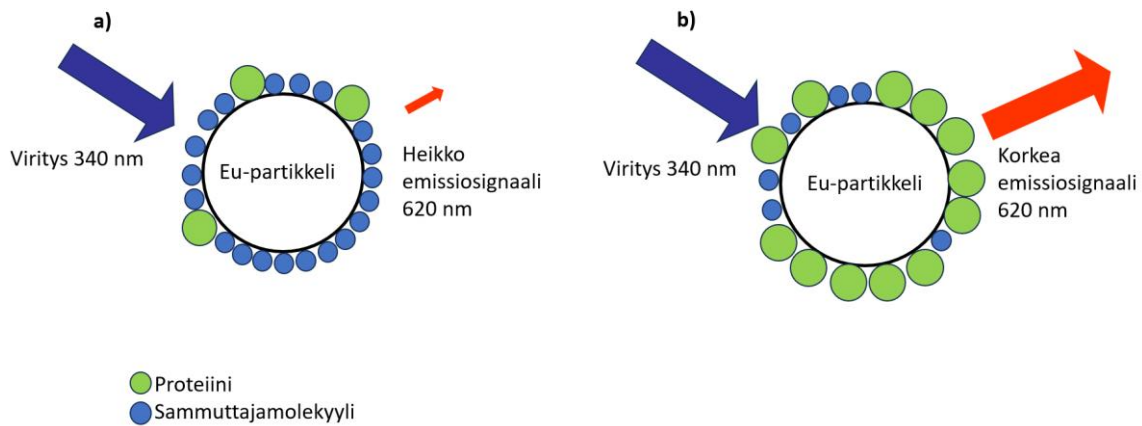
Tutkittavat tasopintojen materiaalit olivat akryylnitriilibutadieenistyreeni (ABS), polymetyylimetakrylaatti (akryyli, PMMA), polyvinyylidikloridi (PVC), polyoksimetyyli (POM, polyasetali), polykarbonaatti, teflon, lasi, pii, alumiini, ruostumaton teräs ja messinki. Näytteen puskuriliuksena käytettiin puskuri 2:ta. Denaturoitava näyte lämmitettiin 4 min ajan 85 °C ThermoStat Plus -laitteella. Trastutumabi-proteiinin konsentraatio oli näyteliuksessa 3 nM. Näytettä pipetoitiin 15 μl tasopinnalle, ja annettiin inkuboitua 5 min ajan. Inkuboinnin jälkeen pinnalta pipetoitiin 10 μl näytettä kuoppalevyllä.

Kaikki tulokset on normalisoitu 3 nM proteiinikontrolliin. Useissa mittauksissa haasteena oli denaturoidun proteiinikontrollin signaalitason lasku verrattuna natiiviin proteiiniin. Tulosten selkeyttämiseksi sekä natiivien että denaturoitujen kontrolliproteiinien signaalien normalisoitu lähtötaso on 1.

3. Tulokset ja niiden tarkastelu

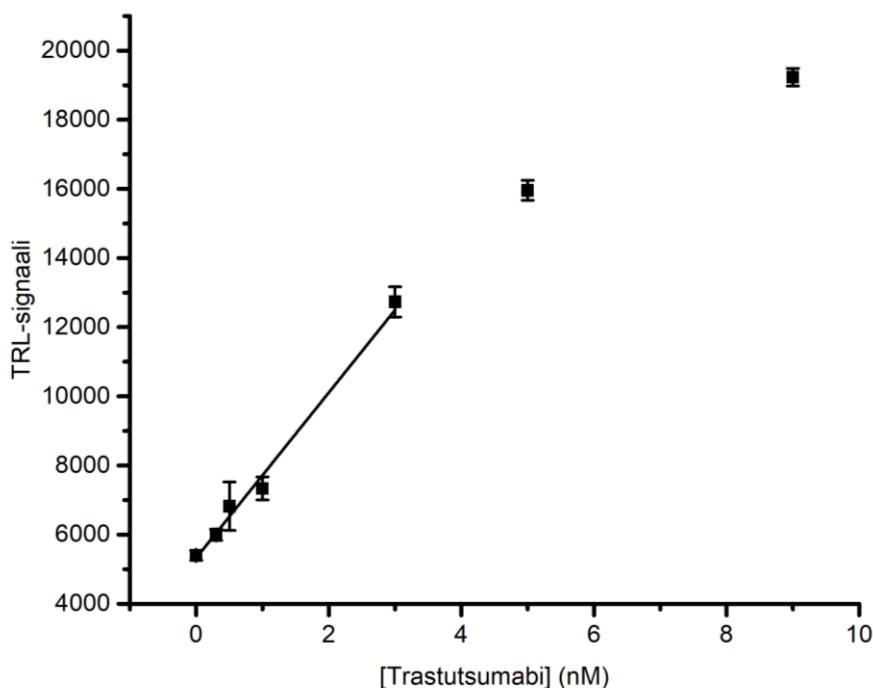
3.1 Proteiinkonsentraation määrittäminen

Eu-nanopartikkelin toiminta proteiinkonsentraatiomäärittämisessä perustuu sammuttajamolekyylin ja mitattavan proteiinin väliseen kilpailuun. Toimintamekanismia on esitelty **kuvassa 6**. Matalassa proteiinkonsentraatiossa proteiini peittää partikkelin pintaa vain vähän, jolloin sammuttajamolekyylit sitoutuu paremmin partikkelin pintaan ja sammuttaa europiumin luminesenssia tehokkaammin. Proteiinin suuri määrä puolestaan estää sammuttajaa sitoutumasta, mikä johtaa heikompaan sammutukseen ja korkeampaan signaalitasoon.



Kuva 6. Eu-nanopartikkelin toimintamekanismi proteiinkonsentraatiomäärityksessä. Toiminta perustuu kilpailevaan sitoutumiseen sammuttajamolekyylin ja proteiinin välillä. **a)** Matalassa proteiinkonsentraatiossa sammuttajamolekyylit sitoutuu enemmän ja **b)** korkeassa proteiinkonsentraatiossa proteiinia sitoutuu enemmän. Signaalin taso on suoraan verrannollinen proteiinin konsentraatioon.

Natiivin ja denaturoidun proteiinin adsorptiota tutkittiin 3 nM trastutsumabi -vasta-aineen sitoutumisella mikropartikkeleihin mittaamalla sentrifugoidun näytteen supernatanttiin jäävän proteiinin konsentraatiota adsorption jälkeen käyttäen aikaerotteista luminesenssia. Määrityksissä käytetyn Eu-nanopartikkelin lineaarinen määrittelyalue on noin 0,1-3 nM (**kuva 7**). Mikropartikkeleita haluttiin käyttää silmin havaittava määrä, koska se helpotti sentrifugoinnin seuraamista, ja käytettyyn partikkelimäärään nähden 3 nM vasta-ainekonsentraatio oli optimaalinen.



Kuva 7. Standardisuora trastutsumabin konsentraation määrittämiseksi Eu-nanopartikkelilla. Määrittämisen lineaarinen alue on 0,1-3 nM. Virherajat on ilmoitettu keskihajontana. N=3

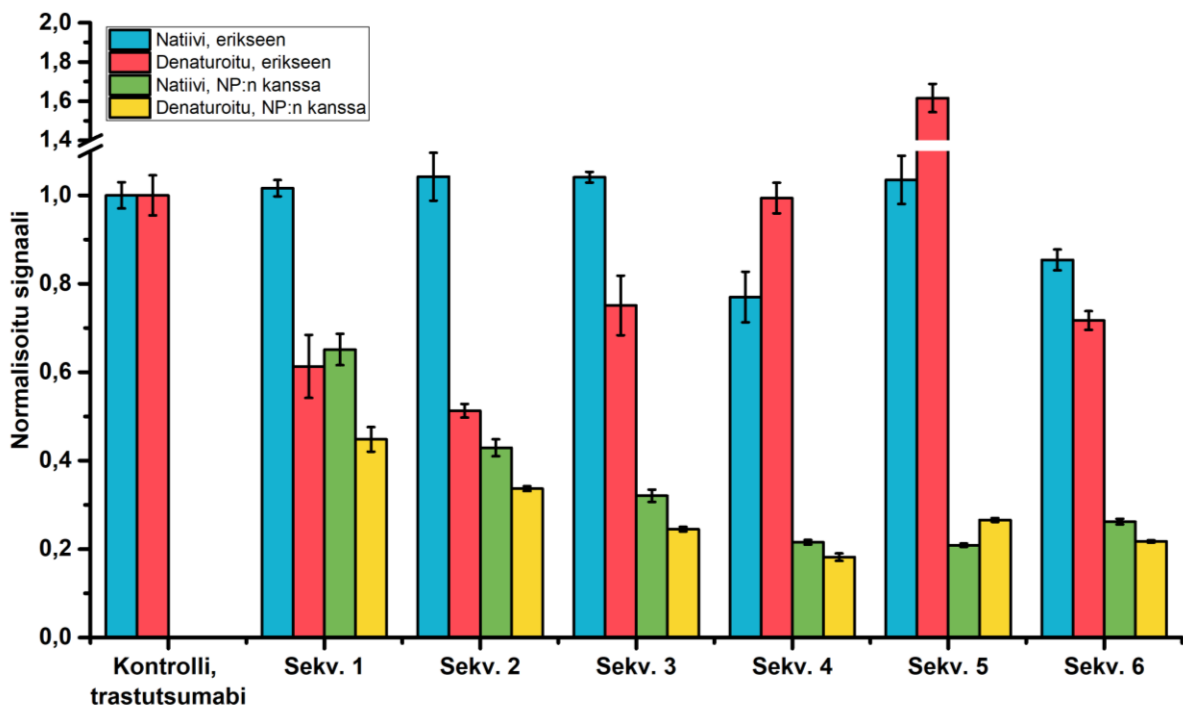
3.2 Proteiinin sitoutuminen peptidipartikkeleihin

Trastutsumabin sitoutumista peptideillä pinnoitettuihin mikropartikkeleilla tutkittiin denaturoimalla vasta-ainetta partikkelin kanssa tai erikseen (**kuva 8**). Käytetyt peptidisekvenssit on esitetty **taulukossa 1**. Kun vasta-aine denaturoitiin erikseen, natiivi ei sitoudu laisinkaan peptidipartikkelin pintaan. Sekvensseillä 1 ja 2 denaturoidusta proteiinista sitoutuu partikkeliin noin puolet. Sekvenssissä 1 on pääosin pH 4:ssä negatiivisesti varautunutta glutamiinihappoa, yksi tyrosiini ja hieman hydrofobista valiinia. Sekvenssissä 2 on myös pääosin glutamiinihappoa, mutta enemmän valiinia kuin sekvenssissä 1. Denaturoidun proteiinin affiniteetti sekvenssiin 2 on hieman parempaa kuin sekvenssiin 1, mikä johtuu suuremmasta hydrofobisten ryhmien määrästä. Proteiinien affiniteetti on yleensä korkeampaa hydrofobisiin pintoihin.¹⁵

Sekvenssillä 3 denaturoitu proteiini sitoutuu hieman. Sekvenssillä 4 puolestaan natiivi proteiini sitoutuu hieman, mutta denaturoitu ei sitoudu lainkaan. Sekvenssillä 5 kumpikaan proteiinin muoto ei sitoudu, ja denaturoidun proteiinin määrittämiseen liittyy epäspesifistä sitoutumista sen signaalitason yllättäessä vapaan trastutsumabin normalisoidun signaalitason. Sekvenssillä 6 natiivi proteiini sitoutuu hieman ja denaturoitu proteiini vähän paremmin. Merkittävää eroa ei kuitenkaan ole havaittavissa. Sekvenssit 3, 4 ja 5 ovat muutoin samanlaisia, mutta ne erottuvat

toisistaan pidentyvällä positiivisesti varautuneella arginiinihännällä. Sekvensseillä 3, 4 ja 5 sitoutuminen heikkenee positiivisuuden lisääntyessä, mikä osoittaa hylkimisreaktiota pH 4:ssä positiivisesti varautuneeseen trastutsumabiin. Sekvenssissä 6 on hydrofiilistä seriiniä, johon trastutsumabi ei juurikaan sitoudu.

Aiemmin sekvenssi 1:tä on käytetty proteiinien stabiilisuuden ja aggregaation määrittämiseen konjugoimalla siihen Eu-kelaatti. Eu-peptidikoetin ei sitoudu natiiviin proteiiniin, mutta proteiinia denaturoitaessa pääsee sitoutumaan aiheuttaen korkeaa aikaerotteista luminesenssia.³⁸ Tätä pidettiin sopivana lähtökohtana peptidisekvenssin valinnassa. Kyseistä sekvenssiä muokattiin esimerkiksi lisäämällä hydrofobisuutta (sekvenssi 2), positiivista varausta (sekvenssit 3-5) ja hydrofiilisyyttä (sekvenssi 6).



Kuva 8. 3 nM trastutsumabin sitoutuminen peptideillä pinnoitettuihin mikropartikkeleihin natiivina ja denaturoituneena mikropartikkelin pitoisuudessa $2 \mu\text{gml}^{-1}$. Vertailussa on tilanteet, joissa proteiini on denaturoitu erikseen tai proteiini on denaturoitu mikropartikkelin läsnä ollessa. Mikropartikkeleihin sitoutumattoman proteiinin mittaussignaalit normalisoitiin natiivin ja denaturoidun proteiinin tuloksiin, joiden testeissä ei käytetty mikropartikkeleita. Virherajat on ilmoitettu keskihajontana, $N=3$.

Kun proteiini denaturoitiin partikkelin kanssa, kaikilla sekvenssipinnoilla proteiini sitoutui suunnilleen puoliksi riippumatta proteiinin muodosta. Siispä lämmitettäessä yhdessä partikkelin kanssa partikkelin pinta ei erottele natiivi proteiinia denaturoidusta. On epäselvää, miksi natiivi proteiini käyttäytyy täysin eri tavoin verrattuna määritykseen, jossa proteiini denaturoitiin erikseen. Natiivia proteiinia käsiteltiin samalla tavalla molemmissa määrityksissä. Ero saattaa johtua uudelleen valmistetusta puskurin kantaliuoksesta. Denaturoidun proteiinin affiniteetti mikropartikkeleihin on kaikilla sekvensseillä korkeampaa verrattuna määritykseen, jossa proteiini denaturoitiin erikseen. Peptideillä pinnoitetut mikropartikkelit todennäköisesti aggregoituvat tai muuttavat muotoaan lämmitettäessä, mikä vaikuttaa myös trastutsumabin sitoutumiseen.

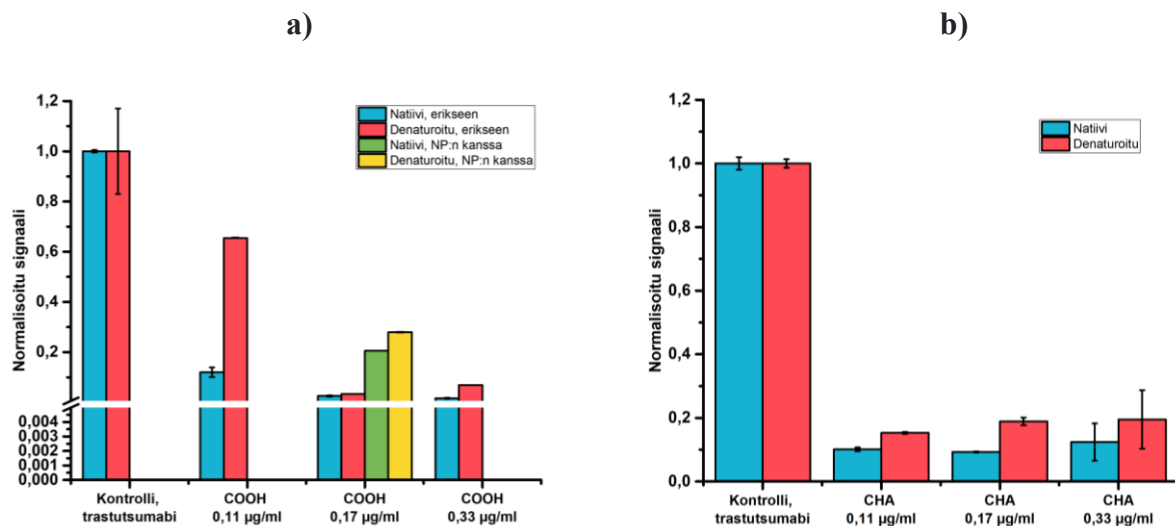
3.3 Proteiinin sitoutuminen karboksyyloituihin ja modifioituihin partikkeleihin

Trastutsumabin sitoutumista karboksyyloituihin ja sykloheksyyliamiinilla modifioituihin partikkeleihin tutkittiin kolmessa eri mikropartikkelin pitoisuudessa (**kuva 9**). Natiivin vasta-aineen sitoutuminen karboksyylihapoilla pinnoitettuihin partikkeleihin heikkenee partikkelikonsentraation laskiessa, mutta affiniteetti on kuitenkin korkea kaikissa tilanteissa. Matalassa ($0,11 \mu\text{gml}^{-1}$) konsentraatiossa, noin 90 % proteiinista sitoutuu mikropartikkelin pintaan. Denaturoidun proteiinin affiniteetti pintaan on korkea $0,17$ ja $0,33 \mu\text{gml}^{-1}$ pitoisuuksissa, mutta heikkenee $0,11 \mu\text{gml}^{-1}$ pitoisuudessa, jolloin vain noin 35 % proteiinista on sitoutunut partikkelin pinnalle.

Kuvan 9b määrityksessä oli käytössä partikkeli, jonka konjugointireaktiossa sykloheksyyliamiinia käytettiin 10-kertainen ylimäärä suhteessa karboksyyliiryhmien määrään. Oletus oli, että kaikkiin karboksyyliiryhmiin oli konjugoitunut amiini. Mikropartikkelin konsentraatioilla ei ole eroa proteiinin sitoutumisen suhteen. Kaikissa konsentraatioissa sekä natiivi että denaturoitu proteiini sitoutuvat korkealla affiniteetilla mikropartikkelin pintaan. Denaturoitu proteiini sitoutuu hieman heikommin kuin natiivi, mutta niitä ei voi selkeästi erottaa toisistaan. Kahdessa korkeimmassa ($0,17$ ja $0,33 \mu\text{gml}^{-1}$) konsentraatioissa proteiinit eivät sitoudu yhtä tehokkaasti kuin karboksyylipintaiseen partikkeliin. Kuitenkin matalimmassa ($0,11 \mu\text{gml}^{-1}$) konsentraatiossa, denaturoitu proteiini sitoutuu paremmin kuin karboksyylipintaisen partikkelin vastaavassa konsentraatiossa. Tästä voidaan päätellä, että affiniteetti hydrofobiseen pintaan on korkeampaa kuin osittain negatiivisesti varautuneeseen pintaan.

Denaturoidun vasta-aineen sitoutumista karboksyloituun partikkeliin tutkittiin myös lämmittämällä vasta-aine mikropartikkelin kanssa. Määrittäessä sekä natiivi että denaturoitu proteiini sitoutuvat suunnilleen yhtä tehokkaasti partikkelin pintaan, kuitenkin heikommin kuin erikseen denaturoitu proteiini. Karboksyyli-pintaisella mikropartikkelilla ei voida selektiivisesti erotella denaturoitua proteiinia natiivista. Karboksyyli-ryhmien pKa-arvo on noin 4 eli ne ovat puoliksi protonoituneita pH 4:ssä. Karboksyyli-pintaisella mikropartikkelilla on siis osittain negatiivinen varaus, mikä selittää positiivisesti varautuneen proteiinin korkeaa affiniteettia pintaan.

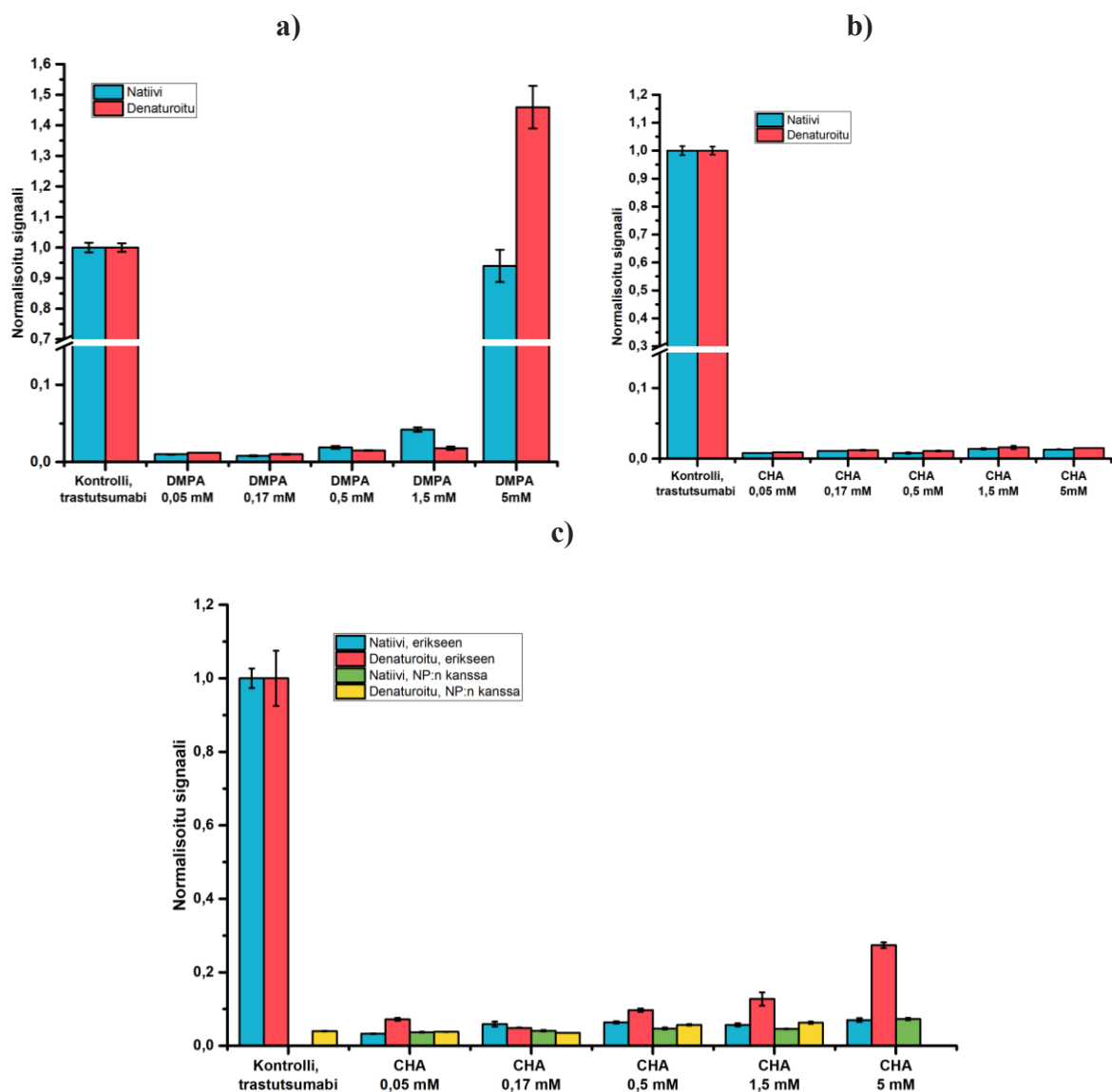
Näiden tulosten perusteella paras mikropartikkelikonsentraatio on $0,17 \mu\text{gml}^{-1}$. Vaikka matalimmalla partikkelikonsentraatiolla nähdään ero natiivin ja denaturoidun proteiinin välillä, tulos ei ole tälle projektille hyödyllinen, koska tarkoituksena on saada selektiivinen tulos nimenomaan denaturoidulle proteiinille. Kirjallisuuden perusteella denaturoitu proteiini tarttuu paremmin pintaan kuin natiivi¹⁷, joten tämä tulos on vääräsuuntainen ja määrittämisestä ei tiedetä tarkkaa toimintamekanismia. Denaturoituja proteiineja ei tutkittu tarkemmin, eikä tiedetä, onko osa niistä esimerkiksi aggregoitunut.



Kuva 9. 3 nM trastutsumabin sitoutuminen mikropartikkeliin natiivina ja denaturoituna kolmessa mikropartikkelin konsentraatiossa. Mikropartikkeleihin sitoutumattoman proteiinin mittaussignaalit normalisoitiin natiivin ja denaturoidun proteiinin tuloksiin, joiden testeissä ei käytetty mikropartikkeleita. Virherajat on ilmoitettu keskihajontana, N=3. **a)** Partikkeli on pinnoitettu karboksyylihapoilla. $0,17 \mu\text{gml}^{-1}$ konsentraatiossa on vertailussa tilanne, jossa proteiini on denaturoitu mikropartikkelin läsnä ollessa. Muissa tilanteissa proteiini on denaturoitu erikseen. **b)** Karboksyylihapoilla pinnoitettu partikkeli on modifioitu 5 mM CHA:lla.

Natiivin ja denaturoidun vasta-aineen sitoutumista DMPA:lla ja CHA:lla konjugoituun mikropartikkeliin tutkittiin vaihtelevilla konjugoitireaktion konsentraatioilla (**kuva 10**). Mikropartikkelin konsentraatio määrittäksessä oli $0,33 \mu\text{gml}^{-1}$. CHA-pinnoitettua partikkelia tutkittiin myös $0,17 \mu\text{gml}^{-1}$ konsentraatiossa. DMPA:n tertiääriamiini on positiivisesti varautunut pH4:ssä. Proteiinin kumpikaan muoto ei sitoudu partikkeliin, jonka karboksyyliyhmiä on käytetty 5 mM DMPA:ta. Sen sijaan matalammassa pitoisuudessa, joissa karboksyyliyhmiä on jäänyt enemmän ilman ligandia, on affiniteetti suurta molemmilla proteiinin muodoilla. $0,33 \mu\text{gml}^{-1}$ partikkelikonsentraatiossa ei voida erottaa denaturoitua proteiinia natiivista. Mikropartikkelin pinnassa on lähes pelkästään positiivista varausta, joka hylkii voimakkaasti positiivisesti varautunutta proteiinia. Mikropartikkelin konsentraatio on proteiinkonsentraatioon nähden myös korkea, jolloin positiivista varausta on määrittäksessä paljon.

Vasta-aineella on korkea affiniteetti pintaan kaikissa CHA:n konjugoitikonstraatioissa ja partikkelikonsentraatioissa (**kuvat 10b ja 10c**). Proteiinit sitoutuvat hyvin hydrofobisiin pintoihin ja negatiivisesti varautuneeseen deprotonoituun karboksyyliyhmiin. Ei ole siis väliä, onko mikropartikkelin pinnalla enemmän hydrofobisia vai negatiivisesti varautuneita ryhmiä, sillä proteiinilla on korkea affiniteetti molempiin. Hydrofobisen ryhmän käyttö mikropartikkelin pinnalla ei lainkaan erottele natiivia proteiinia denaturoidusta.



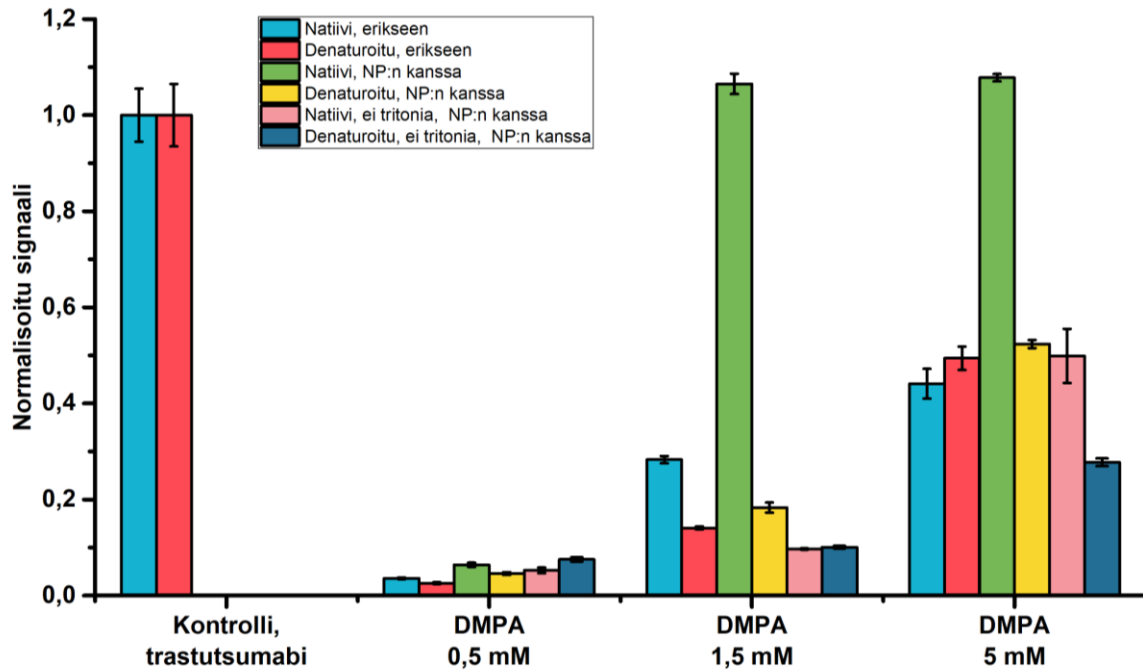
Kuva 10. 3 nM trastutsumabin sitoutuminen modifioituihin mikropartikkeliin natiivina ja denaturoituneena. Mikropartikkeleihin sitoutumattoman proteiinin mittaussignaalit normalisoitiin natiivin ja denaturoidun proteiinin tuloksiin, joiden testeissä ei käytetty mikropartikkeleita. Virherajat on ilmoitettu keskihajontana, N=3. **a)** modifiointi 0,05-5 mM DMPA:lla, partikkelin konsentraatio $0,33 \mu\text{gml}^{-1}$ **b)** modifiointi 0,05-5 mM CHA:lla, partikkelin konsentraatio $0,33 \mu\text{gml}^{-1}$ **c)** modifiointi 0,05-5 mM CHA:lla, partikkelin konsentraatio $0,17 \mu\text{gml}^{-1}$

Trastutsumabin sitoutumista DMPA:lla modifioituihin pintoihin määritettiin myös $0,17 \mu\text{gml}^{-1}$ partikkelikonsentraatioissa (**kuva 11**). Kun proteiini on denaturoitu erikseen, sitoutuminen paranee DMPA-konjugointikonsentraation laskiessa. Denaturoitu proteiini sitoutuu hieman tehokkaammin pintaan kuin natiivi proteiini. 1,5 mM konjugointikonsentraatioissa on kaksinkertainen ero natiivin ja denaturoidun proteiinin sitoutumisessa. Puolestaan

määrityksessä, jossa proteiini denaturoitiin yhdessä mikropartikkelin kanssa, natiivi proteiini ei sitoudu ollenkaan 1,5 ja 5 mM konjugointikonsentraation mikropartikkeliin. Partikkelin kanssa denaturoitu proteiini sen sijaan sitoutuu 5 mM konsentraatiossa noin puoliksi ja 1,5 mM konsentraatiossa noin 80 % proteiinista sitoutuu. Proteiinin molemmat muodot sitoutuvat hyvin 0,5 mM konjugointikonsentraation mikropartikkeliin.

1,5 mM DMPA:lla pinnoitettu mikropartikkeli erottelee selektiivisesti natiivin proteiinin denaturoidusta, ja proteiini- ja denaturoidun proteiinin välillä on noin 6-kertainen ero sitoutumisessa. Ilman tritonia tehdyssä määrityksessä, jossa niin ikään denaturoitiin proteiini mikropartikkelin läsnä ollessa, proteiinin molemmat muodot sitoutuvat korkeammalla affiniteetilla pintaan. 5 mM DMPA-konjugointikonsentraatiossa natiivin ja denaturoidun proteiinin sitoutumisessa on hieman alle kaksinkertainen ero, mutta 1,5 ja 0,5 mM konsentraatiossa ero katoaa. Ilman tritonia pinta ei erottele natiivia proteiinia denaturoidusta. Triton vähentää natiivin proteiinin sitoutumista partikkelin pinnalle, mikä johtunee sen kyvystä tarttua proteiinin pinnan hydrofobisiin alueisiin.

Trastutsumabi sitoutuu heikoiden mikropartikkeliin, jonka pinnalla on eniten positiivista varausta. Matalassa pH:ssa positiivisesti varautunutta DMPA-ligandia käytettiin synteesissä 10-kertainen moolimäärä suhteessa mikropartikkelin COOH-ryhmien määrään. Vertailtaessa 1,5 mM DMPA:lla käsitellyn mikropartikkelin kahta konsentraatiota ($0,17$ ja $0,33 \mu\text{gml}^{-1}$) saadaan parempi ero natiivin ja denaturoidun proteiinin sitoutumiselle matalammassa mikropartikkelin pitoisuudessa. Käytettäessä hieman pienempää ylimäärää pinnoituksessa, on osa COOH-ryhmistä jäänyt ilman ligandia. Suuremmissa partikkelikonsentraatioissa on määrityksessä enemmän COOH-ryhmiä vapaana määrällisesti verrattuna pienempään mikropartikkelin konsentraatioon, jolloin proteiinin affiniteetti pintaan on korkeampaa. Pienemmässä partikkelikonsentraatiossa on määrällisesti vähemmän COOH-ryhmiä vapaana, jolloin sitoutuminen heikkenee ja natiivin sekä denaturoidun proteiinin adsorptioero tulee sopivasti näkyviin.

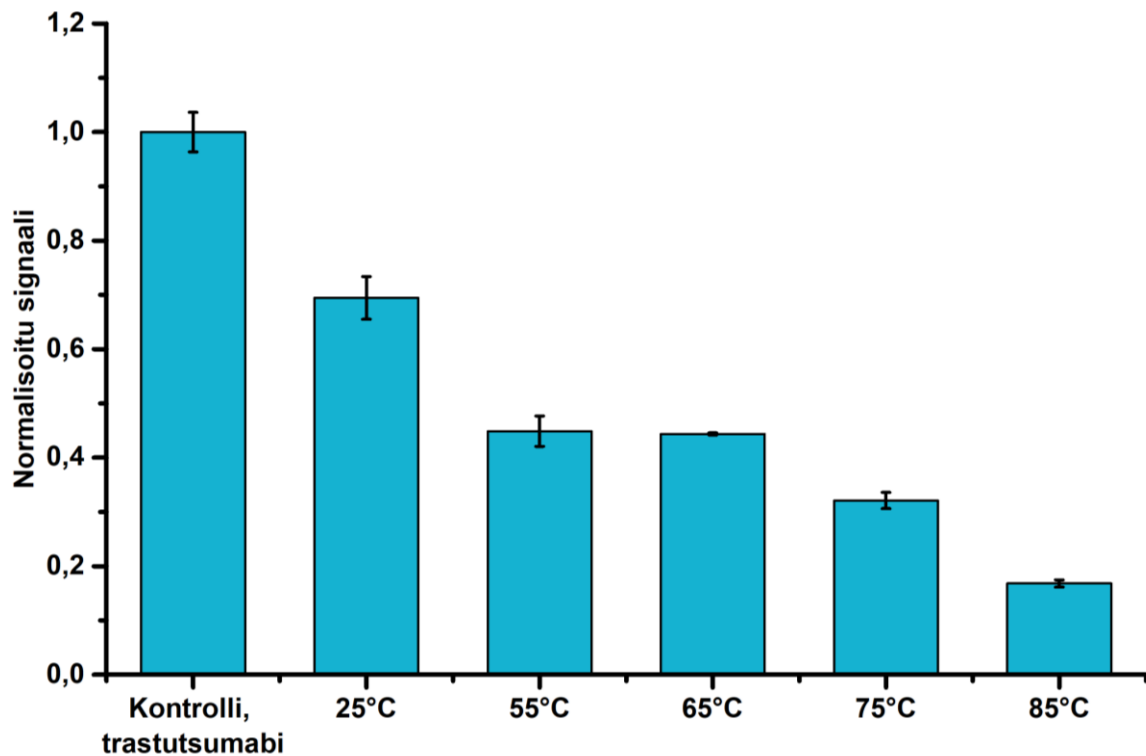


Kuva 11. 3 nM trastutsumabin sitoutuminen 0,5-5 mM DMPA:lla modifioituihin mikropartikkeleihin natiivina ja denaturoituneena mikropartikkelin pitoisuudessa 0,17 µgml⁻¹. Vertailussa on tilanteet, joissa proteiini on denaturoitu erikseen tai proteiini on denaturoitu mikropartikkelin läsnä ollessa. Vertailussa on myös tilanne, jossa proteiini on denaturoitu mikropartikkelin läsnä ollessa 0,01 % Triton X-100 sisältävässä puskuriliuoksessa. Mikropartikkeleihin sitoutumattoman proteiinin mittaussignaalit normalisoitiin natiivin ja denaturoidun proteiinin tuloksiin, joiden testeissä ei käytetty mikropartikkeleita. Virherajat on ilmoitettu keskihajontana, N=3.

Trastutsumabin sitoutumista tutkittiin 1,5 mM DMPA:lla modifioituihin mikropartikkeleihin natiivina ja denaturoituna neljässä lämpötilassa 0,17 µgml⁻¹ mikropartikkelin ja tritonin läsnä ollessa (**kuva 12**). Adsorptio paranee hieman jo 55 °C:ssa. 55 ja 65 °C lämmitettyjen proteiinien sitoutumisessa ei ole keskenään eroa. Adsorptio paranee edelleen lämpötilan noustessa, ja on tässä määrittäksessä tehokkainta 85 °C:ssa. Lisäksi korkeampi lämpötila itsessään lisää proteiinien adsorptiota pintaan¹⁰, mikä osaltaan myös selittää adsorption paranemisen jo 55 °C:ssa. Trastutsumabin on raportoitu denaturoituvan kahdessa osassa: ensin denaturoituu CH2-domeeni (70 °C) ja toisena Fab- ja CH3-domeeni (85 °C.)².

Määrittäksessä natiivi sitoutuu hieman, eli se toimii eri tavalla kuin edellisessä määrittäksessä, jossa natiivi ei vastaavissa olosuhteissa sitoutunut laisinkaan. Ero saattaa selittyä uudelleen valmistetulla puskurin kantaliuoksella tai vaihtuvilla mikrosentrifuugiputkilla. Kyse on myös normalisoidusta eikä absoluuttisesta signaalista: signaalitaso vaihtelee määrittäysten välillä ja

riippuu pitkälti siitä, miten detektioliuos on valmistettu. Määrityksen koosta riippuen saatettiin esimerkiksi valmistaa erilaisia tilavuuksia detektioliuosta.



Kuva 12. 3 nM Trastutsumabin sitoutuminen 1,5 mM DMPA:lla modifioituihin mikropartikkeleihin natiivina ja denaturoituna neljässä lämpötilassa 0,17 μgml^{-1} mikropartikkelin läsnä ollessa. Mikropartikkeleihin sitoutumattoman proteiinin mittaussignaalit normalisoitiin natiivin ja denaturoidun proteiinin tuloksiin, joiden testeissä ei käytetty mikropartikkeleita. Virherajat on ilmoitettu keskihajontana. N=6.

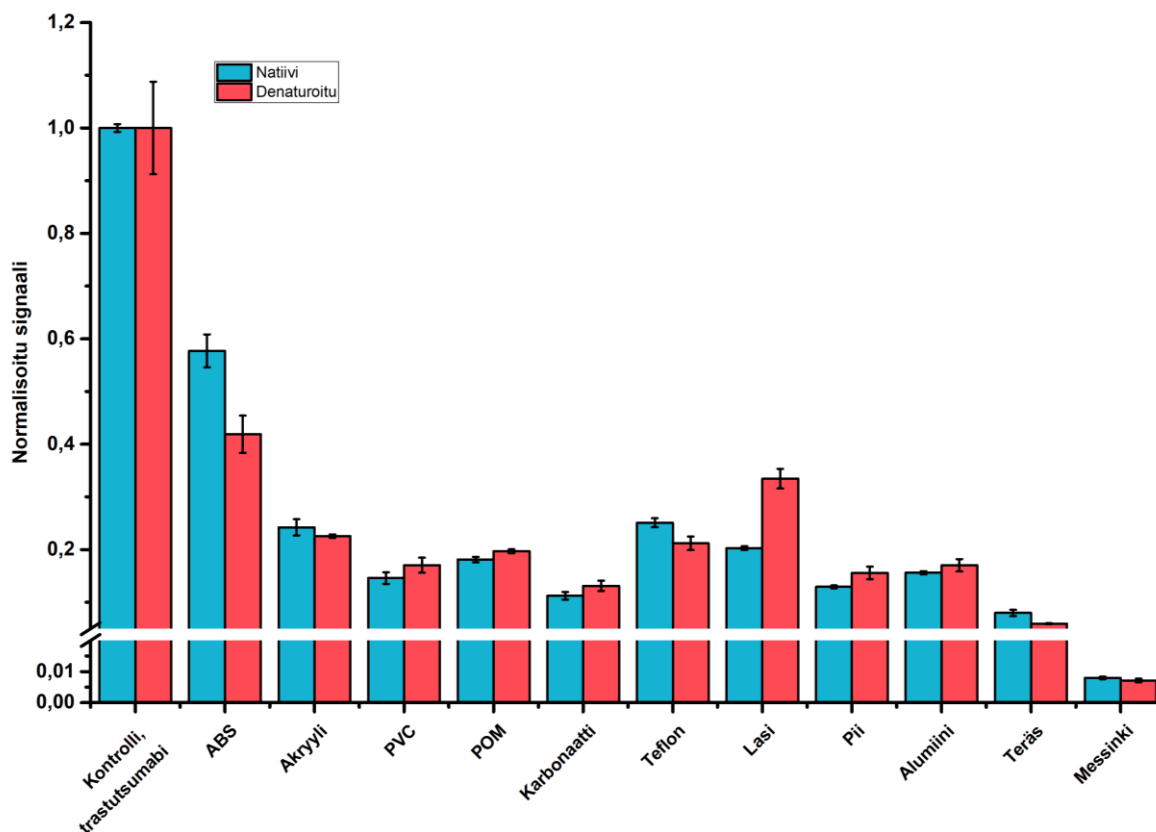
3.4 Proteiinin sitoutuminen tasopintoihin

Lopuksi tutkittiin vielä natiivin ja denaturoidun trastutsumabin sitoutumista erilaisiin tasopintoihin (**kuva 13**). Mikään materiaali ei erottele natiivin ja denaturoidun proteiinin sitoutumista. Proteiinilla on suurin affiniteetti messinkiin ja heikoin ABS-muoviin. ABS-muovin on aiemmin raportoitu hylkivän proteiinien adsorptiota.³⁹ ABS-muovi koostuu akrylinitriili-, styreeni- ja butadieenimonomeereista, joiden suhde seoksessa vaihtelee. Akrylinitriili on luonteeltaan hydrofiilinen, mutta styreeni ja butadieeni ovat hydrofobisia.⁴⁰

Polymetyylimetakrylaatti, polykarbonaatti, polyvinylikloridi, polyasetaali (POM) ja teflon ovat kaikki hydrofobisia, jolloin proteiineilla on korkea affiniteetti pintaan. Määrityksessä proteiini sitoutui suunnilleen yhtä tehokkaasti kaikkiin näihin pintoihin. Eroa ei nähdä myöskään natiivin ja denaturoidun sitoutumisen tehokkuudessa. Myös tämä määrittäminen osoittaa, että hydrofobisella pinnalla ei voida erotella natiivisiä proteiineja denaturoidusta, ja proteiinit tarttuvat korkealla affiniteetilla hydrofobisiin pintoihin.

Samankaltaisia tuloksia saadaan myös lasilla, piillä, alumiinilla ja ruostumattomalla teräksellä. Lasi on luonteeltaan hydrofiilistä: tässä määrityksessä lasille pipetoitu näytepisara levisi pinnalle, eikä muodostanut lainkaan pisaraa, toisin kuin kaikilla muilla pinnoilla. Denaturoitu proteiini sitoutui hieman heikommin lasiin kuin natiivinen proteiini. Lasin silanoliryhmät muodostavat ionisidoksia proteiinin amiiniryhmien kanssa. Pii on puhtaana hydrofobista: määrityksessä kiekolle pipetoitu pisara jäi pallomaiseen muotoon. Pii ei siis ollut hapettunut, sillä piioksidi olisi ollut luonteeltaan hydrofiilistä, jolloin pisara olisi lasipinnan tapaan levinnyt. Vesi siis muodostaisi happiatomien kanssa vetysidoksia. Ruostumaton teräs on hydrofiilistä, ja siihen pipetoitaessa pisara levisi jonkin verran. Materiaali sisältää raudan lisäksi ainakin kromia, joka hapettuu. Kromioksidi muodostaa veden kanssa vetysidoksia. Myös alumiinipinnalle pipetoitu pisara levisi hieman, eli pinta oli hydrofiilinen. Alumiinilevyn pintaan muodostuu alumiinioksidikerros sen ollessa kontaktissa ilman kanssa.

Messinki on kuparin ja sinkin seos. Proteiinien on raportoitu sitoutuvan tehokkaasti sinkkioksidipintoihin⁴¹, mikä voidaan havaita tässäkin määrityksessä. Messingissä sekä kupari että sinkki muodostavat metallioksideja reagoidessaan ilman hapen kanssa. Lisäksi proteiineilla on taipumusta muodostaa kelaatteja siirtymämetallien, kuten sinkin ja kuparin, kanssa. Esimerkiksi histidiinin sivuketjun imidatsolirengas, kysteiinin tioliryhmä ja metioniinin tioetteriryhmä muodostavat koordinaatiokomplekseja metalli-ionien kanssa.⁴² Tioli- ja tioetteriryhmät kelatoivat metalli-ioneja muodostamalla rikkisiltoja. Imidatsolirengaassa puolestaan typpiatomit koordinoituvat metalli-ioniin. Kelaatinmuodostus proteiinin ja metalli-ionien välille omalta osaltaan parantaa proteiinin adsorptiota messinkipintaan.



Kuva 13. 3 nM trastutsumabin sitoutuminen erilaisiin tasopintoihin natiivina ja denaturoituneena. Sitoutumattoman proteiinin mittaussignaalit normalisoitiin natiivin ja denaturoidun proteiinin tuloksiin. Virherajat on ilmoitettu keskihajontana, N=3.

4. Yhteenveto ja johtopäätökset

Tässä projektissa tutkittiin denaturoidun vasta-aineen selektiivistä adsorptiota erilaisiin pintoihin. Tavoitteena oli löytää sellainen pinta ja olosuhde, jossa denaturoitu trastutsumabi voidaan erotella natiivista. Havainnointiin käytettiin Eu-leimattua nanopartikkelia, jolla määritettiin liukseen jääneen proteiinin konsentraatiota mittaamalla aikaerotteista luminesenssia.

Jotta voidaan luotettavasti havainnoida proteiinin sitoutumista mikropartikkelinpintaan, ovat käytetyt proteiini- ja mikropartikkelikonsentraatiot tärkeitä. Molempia pitää olla määrittäessä oikeassa suhteessa toisiinsa nähden. Jos mikropartikkelia on liikaa suhteessa proteiiniin, on mahdollista kiinnittymispintaa myös liikaa, jolloin kaikki proteiini todennäköisesti adsorboituu pintaan muodostaan riippumatta.

Peptidisekvensseillä pinnoitettuihin partikkeleihin proteiini sitoutui heikosti. Kuitenkin erikseen denaturoidun proteiinin määrittämiseen käyttökelpoinen menetelmä olisi EEEEEEEVEEEEE- tai EEEEEVVVVVEEEEE- peptidisekvenssillä pinnoitettu partikkeli. Näillä sekvensseillä saatiin kaksinkertainen ero denaturoidun proteiinin sitoutumisessa. Käyttökelpoisen menetelmästä tekee myös se, että natiivi proteiini ei sitoutunut laisinkaan peptidipintaisiin partikkeleihin. Aiemmin EEEEEEEVEEEEE-sekvenssiä on käytetty osana Eu-koetinta, jolla on raportoitu kasvavaa TRL-signaalia sen ollessa vuorovaikutuksessa denaturoidun proteiinin kanssa.³⁸ Samankaltaisia tuloksia saatiin tässäkin projektissa kyseisellä sekvenssillä pinnoitetuilla partikkeleilla. Hyödyllistä voisi olla kokeilla, miten lyhyemmällä peptidisekvensseillä tai vain yksittäisillä aminohapoilla pinnoitetut partikkelit toimisivat tässä tarkoituksessa.

Karboksyyliryhmällä pinnoitettuun partikkeliin proteiinin molemmat muodot sitoutuivat kaikissa olosuhteissa korkealla affiniteetilla. Pinnan hydrofiiliset ja negatiivisesti varautuneet ryhmät sitoivat hyvin positiivisesti varautunutta proteiinia. Karboksyylipintaisella partikkelilla ei voida erotella natiivia proteiinia denaturoidusta. Niin ikään hydrofobisella ligandilla modifioituun partikkeliin proteiini sitoutui hyvin. Vaikka hydrofobisen ligandin määrää partikkelin pinnalla vaihdeltiin, ei sillä ollut vaikutusta, koska proteiinilla oli korkea affiniteetti myös partikkelin pinnalla vapaaksi jääneisiin karboksyyliryhmiin.

Positiivisella DMPA:lla modifioidulla partikkelilla korkein 5 mM ligandin pitoisuus hylki positiivisesti varautunutta proteiinia. Kaikkiin partikkelin karboksyyliryhmiin oli tällöin todennäköisesti konjugoitunut DMPA. Kuitenkin 1,5 mM DMPA:lla konjugoitu partikkeli pystyi erottelamaan natiivin ja denaturoidun proteiinin toisistaan noin kaksinkertaisella erolla, kun proteiini oli denaturoitu erillään mikropartikkelista ja ilman Triton X-100:aa. Ero kuitenkin parani, kun proteiini denaturoitiin mikropartikkelin ja Triton X-100:n läsnä ollessa. Natiivi proteiini käyttäytyy eri tavoin eri määrityskerroilla. On mahdollista, että se on päässyt esimerkiksi aggregoitumaan ennen määrittystä tai aggregoituu eri tavoilla määrittysten aikana. Proteiinien muotoa ei tutkittu ennen määrittystä, eikä tiedetä, olivatko proteiinit denaturoituneet tai aggregoituneet. Trastutsumabi on kuitenkin melko stabiili proteiini, eikä sen pitäisi denaturoitua helposti. Lisäksi proteiinikonsentraatiot olivat matalia, mikä tekee aggregoitumisesta epätodennäköistä. Jos kuitenkin alkuperäinen proteiinin kantaliuos olisi aggregoitunut voisi näytteeseen tulla laimennettaessa eri määriä aggregaattia.

Vaikka 1,5 mM DMPA:lla konjugoidulla partikkelilla saatiin noin 6-kertainen ero natiivin ja denaturoidun proteiinin sitoutumisessa (kun proteiini denaturoitiin partikkelin ja tritonin läsnä ollessa) ja menetelmä oli toistettavissa, ei se ole kovin käyttökelpoinen erottelemaan denaturoitua proteiinia natiivista. Jos proteiini täytyy denaturoida partikkelin kanssa, ei voida määrittää valmiiksi denaturoitua proteiinia. Käytännössä tällä menetelmällä on mahdollista määrittää kahdessa vaiheessa, että proteiini oli alun perin natiivissa muodossa.

Projektin aikana haasteeksi joissain määrittämissä muodostui se, että natiivin ja denaturoidun kontrolliproteiinin signaalitasot eivät olleet samalla tasolla. Eu-nanopartikkelilla määritettäessä lämmitetyn proteiinin signaalitaso saattoi olla matalampaa kuin natiivilla proteiinilla. Ilmiö korostui erityisesti silloin, kun proteiinia lämmitettiin kauemmin kuin 4 minuuttia, esimerkiksi 8 tai 12 minuuttia (tuloksia ei ole esitetty). Proteiinin muoto on siis muuttunut enemmän pidempään lämmitettäessä, ja se on voinut muodostaa esimerkiksi aggregaatteja. Ilmiötä havaittiin myös silloin, kun 4 minuutin ajan lämmitetty proteiini seiso pöydällä ennen määrittystä kauemmin kuin tavallisesti, jolloin se on myös saattanut muodostaa aggregaatteja.

Signaalitason madaltuminen osoittaisi, että Eu-nanopartikkeli itsessään pystyy erottamaan proteiinin erilaiset muodot toisistaan, erityisesti jos kyseessä on aggregaatin vertailu natiiviin proteiiniin. Proteiinien muotoa ei tarkastettu missään vaiheessa projektia, joten tietoa lämmitettyjen proteiinien mahdollisesta aggregaatiosta ei ole. Oletus on, että proteiinit ovat ainakin denaturoituneet, mutta jos ne ovat lämmitysaikaa pidennettäessä aggregoituneet, aggregaattien kokoa ei tiedetä. Matalassa proteiinkonsentraatiossa aggregaattien kokoa on mahdotonta mitata. Myöskään kaupallisen Eu-nanopartikkelin kokoa ei tiedetä. Eu-nanopartikkelin toimintamekanismin perusteella todennäköisin vaihtoehto on, että aggregoitunut proteiini on niin suuri, ettei se ole vuorovaikutuksessa Eu-nanopartikkelin kanssa. Eu-nanopartikkelimäärittämisessä signaalitason madaltuminen tarkoittaisi, että sammuttajamolekyylillä pääsee pintaan sammuttamaan luminesenssia, eli proteiini ei ole ollut nanopartikkelin pinnalla estämässä sammuttajan sitoutumista. Tämän perusteella Eu-nanopartikkelilla voidaan jossain määrin erotella proteiiniaggregaatti natiivista proteiinista. Toisaalta, sammuttajamolekyylillä on paljon pienempi verrattuna vasta-aineeseen, joten sammuttaja voisi silti mahtua sitoutumaan Eu-partikkelin pintaan.

Projektissa tutkittiin trastutsumabi -vasta-aineen adsorptiota useisiin erilaisiin pintoihin: tarkasteltiin sekä mikropartikkelipintoja että tasopintoja. Tutkitut pinnat olivat luonteeltaan hyvinkin erilaisia. Projektissa oli mukana hydrofobisia, hydrofiilisiä ja eri tavoin varautuneita

pintoja. Tutkimuksen lähtökohtana pidettiin sitä, että denaturoitu proteiini adsorboituu pintaan tehokkaammin kuin natiivi proteiini. Usein molemmat proteiinin muodot sitoutuivat samankaltaisesti pintaan. Haasteena oli erityisesti se, että usealla pinnalla oli todella korkea affiniteetti proteiinin kanssa, ja se, että malliproteiinina käytettiin vain trastutsumabia. Haasteita lisäsi myös elektrostaattisten vuorovaikutusten suuri määrä käytettäessä puskuriliuoksessa pH 4:ää. Suurimmat erot sitoutumisessa saatiin kuitenkin juuri hyödyntämällä positiivisia ja negatiivisia varauksia: käytetyn proteiinin tiedettiin olevan positiivisesti varautunut pH 4:ssä, jolloin se veti puoleensa negatiivisesti varautuneita pintoja ja hylki positiivisesti varautuneita pintoja.

Kirjallisuuden mukaan adsorptio hydrofobisen pintaan on tehokkainta proteiinin isoelektristä pistettä vastaavassa pH:ssa (trastutsumabilla noin 8,5), jolloin myös saadaan suurin ero natiivin ja denaturoidun proteiinin sitoutumisessa.¹⁷ Tässä projektissa tätä ei voitu todentaa toimivaksi, sillä trastutsumabin sitoutuminen pintoihin oli heikkoa neutraalissa tai sitä korkeammassa pH:ssa. Sitoutuminen oli tehokkainta pH 4:ssä. Tasopintoja tutkittaessa havaittiin, että sitoutuminen oli samankaltaista lähes kaikkiin materiaaleihin, eikä hydrofobisuudella tai hydrofiilisyydellä juurikaan ollut merkitystä. Korkein affiniteetti kuitenkin oli messinkiin, mikä selittynee proteiinin taipumuksella muodostaa kelaatteja siirtymämetallien kanssa. Heikoiten proteiini puolestaan sitoutui ABS-muoviin, jossa on vaihtelevia määriä erilaisia monomeerejä, joilla on sekä hydrofiilisiä että hydrofobisia ominaisuuksia.

Tutkittuja pintoja ei projektissa karakterisoitu, joten niiden luonnetta ei tiedetä varmaksi. Ainoastaan kaupallisen karboksyylilihapolla pinnoitetun mikropartikkelin ominaisuudet olivat tiedossa. Peptidiketjuilla pinnoitetuista partikkeleista ei tiedetä, olivatko peptidit synteessivaiheessa kaikkiin yksittäisiin ketjuihin muodostuneet kokonaisuudessaan, vai oliko pinnalla mukana myös osittain syntetisoituneita, lyhyempiä ketjuja. Sykloheksyyliamiinilla ja N,N-dimetyyli-1,3-diamiinilla konjugoiduista partikkeleista ei myöskään tiedetä, kuinka suuri osa karboksyyliryhmistä jäi vapaaksi konjugointireaktiossa. Partikkeleilla saatiin kuitenkin toisistaan eriäviä tuloksia, joten voidaan päätellä, että erilaiset konjugointikonsentraatiot ovat tuottaneet erilaisia pinnoitteita partikkeleille.

Tämän projektin tulokset ovat linjassa kirjallisuuden kanssa ainakin siltä osin, että proteiineilla on taipumusta sitoutua korkealla affiniteetilla hydrofobisiin pintoihin.¹⁸ Erityisesti elektrostaattisilla vuorovaikutuksilla havaittiin olevan suuri merkitys sitoutumisen kannalta. Tämän projektin tuloksista saadaan kattava käsitys siitä, miten trastutsumabi -vasta-aine

sitoutuu pH 4:ssä erilaisiin pintoihin ollessaan positiivisesti varautunut. Jatkossa olisi hyvä vielä karakterisoida määritettävät pinnat ja tutkia muitakin proteiineja trastutsumabin lisäksi.

5. Viitteet

1. Kaur H. Stability testing in monoclonal antibodies. *Crit Rev Biotechnol. Taylor and Francis Ltd.* 2021;41(5):692-714. doi:10.1080/07388551.2021.1874281
2. Joshi S, Maharana C, Rathore AS. An application of Nano Differential Scanning Fluorimetry for Higher Order Structure assessment between mAb originator and biosimilars: Trastuzumab and Rituximab as case studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;186:113270. doi:https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113270
3. Sert F, Hız D, Gülmez M, et al. Temperature and pH-Dependent Behaviors of mAb Drugs: A Case Study for Trastuzumab. *Sci Pharm.* 2022;90(1):21. doi:10.3390/scipharm90010021
4. Vermeer AWP, Norde W. The thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J.* 2000;78(1):394-404. doi:10.1016/S0006-3495(00)76602-1
5. Bickel F, Herold EM, Signes A, Romeijn S, Jiskoot W, Kiefer H. Reversible NaCl-induced aggregation of a monoclonal antibody at low pH: Characterization of aggregates and factors affecting aggregation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2016;107:310-320. doi:10.1016/j.ejpb.2016.07.020
6. Khan TA, Mahler HC, Kishore RSK. Key interactions of surfactants in therapeutic protein formulations: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2015;97:60-67. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.09.016
7. Oyetayo OO, Kiefer H. Experimental Model System to Study pH Shift-Induced Aggregation of Monoclonal Antibodies Under Controlled Conditions. *Pharm Res.* 2016;33(6):1359-1369. doi:10.1007/s11095-016-1878-4
8. Falconer RJ, Chan C, Hughes K, Munro TP. Stabilization of a monoclonal antibody during purification and formulation by addition of basic amino acid excipients. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2011;86(7):942-948. doi:10.1002/jctb.2657

9. Saurabh S, Kalonia C, Li Z, et al. Understanding the Stabilizing Effect of Histidine on mAb Aggregation: A Molecular Dynamics Study. *Mol Pharm.* 2022;19(9):3288-3303. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.2c00453
10. Rabe M, Verdes D, Seeger S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv Colloid Interface Sci. Elsevier B.V.* 2011;162(1-2):87-106. doi:10.1016/j.cis.2010.12.007
11. Downey JD, Crean AM, Ryan KB. Impact of protein adsorption during biopharmaceutical manufacture & storage. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2025;209:107071. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107071
12. Li X, Cheng Y, Yi C, Hua Y, Yang C, Cui S. Effect of ionic strength on the heat-induced soy protein aggregation and the phase separation of soy protein aggregate/dextran mixtures. *Food Hydrocoll.* 2009;23(3):1015-1023. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.024
13. Park JH, Jackman JA, Ferhan AR, Ma GJ, Yoon BK, Cho NJ. Temperature-Induced Denaturation of BSA Protein Molecules for Improved Surface Passivation Coatings. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(38):32047-32057. doi:10.1021/acsami.8b13749
14. Gerasimovich E, Karaulov A, Nabiev I, Sukhanova A. Protein Adsorption on Nano- and Microparticles: Dependence on Morphological and Physicochemical Properties of Particles and Effect on Particle–Cell Interactions. *Nanomaterials. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).* 2025;15(13):1013. doi:10.3390/nano15131013
15. Goli KK, Rojas OJ, Özçam AE, Genzer J. Generation of functional coatings on hydrophobic surfaces through deposition of denatured proteins followed by grafting from polymerization. *Biomacromolecules.* 2012;13(5):1371-1382. doi:10.1021/bm300075u
16. Kim J. Systematic approach to characterize the dynamics of protein adsorption on the surface of biomaterials using proteomics. *Colloids Surf B Biointerfaces. Elsevier B.V.* 2020;188:110756. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110756
17. Shirahama H, Suzawa T. Adsorption of heat-denatured albumin onto polymer latices. *J Colloid Interface Sci.* 1988;126(1):269-277. doi:https://doi.org/10.1016/0021-9797(88)90121-X

18. Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke B, Mäder K, Müller RH. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int J Pharm.* 2000;196(2):245-249. doi:10.1016/s0378-5173(99)00432-9
19. Seifert B, Baudis S, Wischke C. Composition-Dependent Protein–Material Interaction of Poly(Methyl Methacrylate-co-styrene) Nanoparticle Series. *Int J Mol Sci.* 2023;24(22):16390. doi:10.3390/ijms242216390
20. Champion JA, Pustulka SM, Ling K, Pish SL. Protein nanoparticle charge and hydrophobicity govern protein corona and macrophage uptake. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12(43):48284-48295. doi:10.1021/acsami.0c12341
21. Nandhakumar S, Dhanaraju MD, Sundar VD, Heera B. Influence of surface charge on the in vitro protein adsorption and cell cytotoxicity of paclitaxel loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University.* 2017;55(2):249-258. doi:10.1016/j.bfopcu.2017.06.003
22. Firkowska-Boden I, Zhang X, Jandt KD. Controlling Protein Adsorption through Nanostructured Polymeric Surfaces. *Adv Healthc Mater. Wiley-VCH Verlag.* 2018;7(1):1700995. doi:10.1002/adhm.201700995
23. Yu Y, Luan Y, Dai W. Dynamic process, mechanisms, influencing factors and study methods of protein corona formation. *Int J Biol Macromol. Elsevier B.V.* 2022;205:731-739. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.105
24. Gref R, Lück M, Quellec P, et al. ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2000;18(3):301-313. doi:https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00156-3
25. Moyano DF, Saha K, Prakash G, et al. Fabrication of corona-free nanoparticles with tunable hydrophobicity. *ACS Nano.* 2014;8(7):6748-6755. doi:10.1021/nn5006478
26. Wang H, Cheng F, Shen W, et al. Amino acid-based anti-fouling functionalization of silica nanoparticles using divinyl sulfone. *Acta Biomater.* 2016;40:273-281. doi:10.1016/j.actbio.2016.03.035

27. Safavi-Sohi R, Maghari S, Raoufi M, et al. Bypassing protein corona issue on active targeting: Zwitterionic coatings dictate specific interactions of targeting moieties and cell receptors. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(35):22808-22818. doi:10.1021/acsami.6b05099
28. Hu F, Chen K, Xu H, Gu H. Functional short-chain zwitterion coated silica nanoparticles with antifouling property in protein solutions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;126:251-256. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.12.036
29. Overby C, Park S, Summers A, Benoit DSW. Zwitterionic peptides: Tunable next-generation stealth nanoparticle modifications. *Bioact Mater*. 2023;27:113-124. doi:10.1016/j.bioactmat.2023.03.020
30. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev. Springer Verlag*. 2016;8(4):409-427. doi:10.1007/s12551-016-0218-6
31. Xu R. Light scattering: A review of particle characterization applications. *Particuology*. 2015;18:11-21. doi:https://doi.org/10.1016/j.partic.2014.05.002
32. Jia Z, Li J, Gao L, Yang D, Kanaev A. Dynamic Light Scattering: A Powerful Tool for In Situ Nanoparticle Sizing. *Colloids and Interfaces. MDPI*. 2023;7(1):15. doi:10.3390/colloids7010015
33. Nguyen HH, Park J, Kang S, Kim M. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Switzerland). MDPI AG*. 2015;15(5):10481-10510. doi:10.3390/s150510481
34. Songkhla SN, Nakamoto T. Overview of quartz crystal microbalance behavior analysis and measurement. *Chemosensors. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. 2021;9(12):350. doi:10.3390/chemosensors9120350
35. Furikado I, Forsman J, Nylander T. Particle Adsorption Using a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation by Applying a Kelvin–Voigt-Based Viscoelastic Model and the Gauss–Newton Method. *Anal Chem*. 2023;95(41):15286-15292. doi:10.1021/acs.analchem.3c02642

36. Wang H, Wang Y, Yuan L, et al. Thermally responsive silicon nanowire arrays for native/denatured-protein separation. *Nanotechnology*. 2013;24(10):105101. doi:10.1088/0957-4484/24/10/105101
37. Höök F, Kasemo B, Nylander T, Fant C, Sott K, Elwing H. Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study. *Anal Chem*. 2001;73(24):5796-5804. doi:10.1021/ac0106501
38. Valtonen S, Vuorinen E, Eskonen V, Malakoutikhah M, Kopra K, Härmä H. Sensitive, homogeneous, and label-free protein-probe assay for antibody aggregation and thermal stability studies. *MAbs*. 2021;13(1):1955810. doi:10.1080/19420862.2021.1955810
39. Anciaux SK, Bowser MT. Reduced surface adsorption in 3D printed acrylonitrile butadiene styrene micro free-flow electrophoresis devices. *Electrophoresis*. 2020;41(3-4):225-234. doi:10.1002/elps.201900179
40. Kamelian FS, Saljoughi E, Shojaee Nasirabadi P, Mousavi SM. Modifications and research potentials of acrylonitrile/butadiene/styrene (ABS) membranes: A review. *Polym Compos. John Wiley and Sons Inc*. 2018;39(8):2835-2846. doi:10.1002/pc.24276
41. Horie M, Nishio K, Fujita K, et al. Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(3):543-553. doi:10.1021/tx800289z
42. Guan H, Yan C, Zhu X, et al. Protein-Derived Chelating Peptides: Preparation, Conformational Relationships, and Biological Activities. *J Agric Food Chem. American Chemical Society*. 2025;73(38):23809-23823. doi:10.1021/acs.jafc.5c09028