TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Immunoglobuliin G omaduste parandamine keelemudelite abil GLUT1 vastase antikeha näitel

Magistritöö

30 EAP

Raimond Tilk

Juhendajad

PhD Ave van der Hoek

PhD Mihkel Saluri

PhD Reet Kurg

TARTU 2025

INFOLEHT

Immunoglobuliin G omaduste parandamine keelemudelite abil GLUT1 vastase antikeha näitel

Glükoosi transporter tüüp 1 (GLUT1) valku ekspresseerivate vähirakkude vastu on loodud antikeha, mis indutseerib nende apoptoosi. Immunoglobuliinil avastati ravimikandidaadiks saamist takistav omadus, nimelt ei suudetud kontsentratsiooni tõsta piisavalt kõrgeks, et säiliks selle ravitoime. Probleemi lahendamisel võeti abiks keelemudelid, mis pakkusid algmolekulile üheaminohappelisi mutatsioone.

Antud magistritöös uuritakse keelemudelite võimekust pakkuda välja üheaminohappelisi mutatsioone antikeha järjestuses. Mudeli poolt pakutud molekulidel sooviti välja selgitada nende arendatavusega seotud omadused ja sobivus prekliinilisteks katseteks.

Märksõnad: keelemudelid, antikehade arendatavus, ravimiarendus, GLUT1, vähk

CERCS kood: T490 Biotehnoloogia

Improving the properties of Immunoglobulin G using language models: the case of a GLUT1-targeting antibody

An antibody has been developed against cancer cells expressing Glucose transporter type 1 (GLUT1) that induces apoptosis of these cells. A property was discovered that prevented the immunoglobulin from becoming a drug candidate, specifically, its concentration could not be increased high enough to maintain its therapeutic effect. Language models were used to help with this problem, offering single amino acid changes to the initial molecule.

The effectiveness of language models to provide single amino acid mutations in the antibody was studied in this master's thesis. Molecules suggested by these models were assessed for their developability parameters as well as their suitability for preclinical studies.

Keywords: language models, antibody developability, drug development, GLUT1, cancer

CERCS code: T490 Biotechnology

SISUKORD

INFOLEHT *2*

SISUKORD *3*

KASUTATUD LÜHENDID *5*

SISSEJUHATUS *6*

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE *8*

1.1. Antikehad **8**

1.2. Glükoosi transport ja tarbimine vähirakkudes **12**

1.3. GLUT1 vastane antikeha **14**

1.4. Ravimiarendus **15**

1.4.1. Uuringute faas 16

1.4.2. Antikeha põhise ravimi arendamine ja prekliinilised katsed 16

1.4.3. Kliinilised katsed ehk ravimi mõju inimestele 19

1.5. Antikehade arendatavus **19**

1.5.1. Ekspressioon ja tootlikkus 20

1.5.2. Homogeensus ja puhtus 20

1.5.3. Antikeha stabiilsus 21

1.5.4. Antigeenispetsiifilisus 21

1.5.5. Lahustuvus kõrgetel kontsentratsioonidel 22

1.6. Keelemudelid antikehade omaduste parandamiseks **23**

2. EKSPERIMENTAALOSA *24*

2.1. Töö eesmärk **24**

2.2. Materjal ja metoodika **25**

2.2.1. GLUT1 vastaste antikehade tootmine ja puhastamine ning keelemudeli põhimõte 25

2.2.2. *Protein A* afiinsuskromatograafia antikeha tiitri määramiseks 26

2.2.3. Puhastatud antikehade kontsentreerimine 26

2.2.4. Analüütiline suuruseralduskromatograafia 26

2.2.5. Kapillaarelektroforees 27

2.2.6. Analüütiline ioonvahetuskromatograafia 27

2.2.7. Analüütiline hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia 28

2.2.8. Seondumise ja polüreaktiivsuse ELISA 28

2.2.9. AC-SINS 30

2.2.10. NanoDSF ja DLS 32

2.3. Tulemused ja arutelu **33**

2.3.1. Tootlikkuse määramine afiinsuskromatograafia abil 33

2.3.2. Puhastatud antikehade kontsentreerimine 34

2.3.3. Homogeensuse ja puhtuse määramine 36

2.3.3.1. Suuruseralduskromatograafia 36

2.3.3.2. Hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia 38

2.3.3.3. Ioonvahetuskromatograafia 41

2.3.3.4. Kapillaarelektroforees 43

2.3.3.5. DLS 46
2.3.4. Stabiilsuse hindamine 48
2.3.5. Enesega interakteerumine 51
2.3.6. Antigeenispetsiifilisus 52
2.3.7. Polüreaktiivsus 53
2.4. Hinnang uuritud antikehadele 54
KOKKUVÕTE 55
KIRJANDUSE LOETELU 57
VEEBIAADRESSID 69
LISAD 70
Lisa 1 70
Lisa 2 71
Lisa 3 72
Lisa 4 73
Lisa 5 73
Lisa 6 74
Lisa 7 80
LIHTLITSENTS 86

KASUTATUD LÜHENDID

AC-SINS – *affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy*

BCM – barütsentriline keskmine (*Barycentric mean*)

BLI – biointerferomeetria

CDR – komplementaarsust määrav piirkond (*complementarity-determining region*)

CH1, CH2, CH3 – konstantsed raske ahela piirkonnad

CL – konstantne kerge ahela piirkond

DLS – *differential light scattering*

DSC – diferentsiaalne skaneeriv kalorimeetria

DSF – diferentsiaalne skaneeriv fluorimeetria

Fab – *fragment antigen-binding* regioon

FACS – fluorestsentsiga aktiveeritud rakkude sorteerimine

Fc – *fragment crystallizable* regioon

Fv – *variable fragment* regioon

GLUT – passiivsed glükoosi transporterid (*Glucose transporters*)

GLUT1 – glükoosi transporter tüüp 1 (*Glucose transporter type 1*)

HPLC – *High-performance liquid chomatography*

Ig – immunoglobuliin, antikeha

NanoDSF – *nano differential scanning fluorimetry*

SGLT – naatriumist sõltuvad glükoosi transporterid (*Sodium-glucose cotransporter*)

SLC2 – *solute carrier family 2*

SPR – pindmine plasmonresonants (*surface plasmon resonance*)

VH – varieeruv raske ahela piirkond

VLP – viiruse-sarnane osake (*virus-like particle*)

VL – varieeruv kerge ahela piirkond

SISSEJUHATUS

Ravimiarendus on läbi aegade olnud pikk ja keeruline protsess, mis nõuab palju aega ja ressursse. Inimravimi turule toomine muutub ajaga aina keerukamaks ja kulukamaks, nõudes järjest spetsiifilisemate haiguste ravimist, kulukamate analüüside teostamist ning aeganõudvamate kliiniliste katsete läbiviimist. Ravimi avastamisest kuni selle turule jõudmiseni peavad ettevõtted investeerima sadu miljoneid või isegi miljardeid dollareid. Vaatamata suurtele kulutustele võivad need kliinilistesse katsetesse jõudes jääda ilma ravimiloast, mille põhjused võivad tingitud olla näiteks molekuli liigsest toksilisusest, kiirest degradeerumisest või agregeerumisest ning ebaspetsiifilistest interaktsioonidest. Loetletud probleemide ennetamiseks tuleks ravimikandidaadile teha eelnevalt põhjalik biofüüsikaliste, biokeemiliste ja farmakokineetiliste omaduste analüüs.

Ravimite väljatöötamisel on aina rohkem hakatud keskenduma kõrgele sihtmärgi spetsiifilisusele, vältides nii terve organismi mõjutamist medikamentide poolt. Antikehad ehk immunoglobuliinid on selle omaduse pärast kõige eelistatumad ravimikandidaadid, omades afiinsust ainult endale vastava antigeeni vastu. Niisiis otsitakse molekule haigust põhjustava raku pinnal oleva valgu vastu, mis ei mõjuks hävitavalt inimese teistele kudedele. Terapeutiliste antikehadega enim ravitud haiguseks on vähkkasvaja, mille suurimaks probleemiks on haigete rakkude pinnavalkude erinevused nii inimeste vahel kui ka sama kasvaja siseselt.

Antud magistritöös uuritakse Icosagenis välja töötatud antigeeni glükoosi transporter tüüp 1 (GLUT1) vastast antikeha. GLUT1 valku ekspresseerivad vähirakud on uuritava antikeha terapeutiliseks sihtmärgiks, indutseerides kasvajarakkude apoptoosi. Immunoglobuliinil avastati ravimikandidaadiks saamist takistav omadus, nimelt ei suudetud selle kontsentratsiooni tõsta piisavalt kõrgeks, et säiliks valgu ravitoime. Probleemi lahendamisel võeti abiks keelemudelid, mis pakkusid algmolekulile üheaminohappelisi mutatsioone. Keelemudelid suudavad andmebaasidest õppida üldiseid reegleid ning rakendada neid järgnevate tundmatute probleemide lahendamiseks. Saadud antikehadel hinnati nende arendatavusega seotud omadusi ja selgitati välja sobivus prekliinilisteks katseteks.

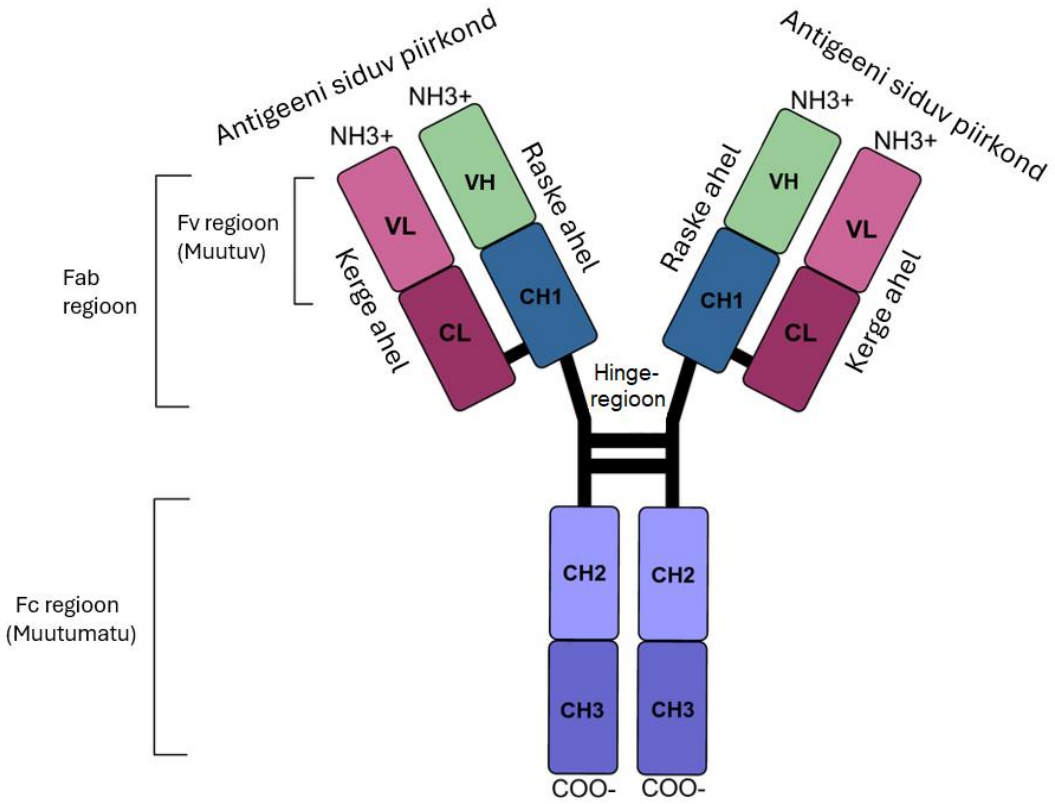
Töö eksperimentaalne osa teostati Icosagen Cell Factory OÜ analüütika laboris. Minu poolt teostatud katsed on afiinsuskromatograafia antikehade kontsentratsioon mõõmiseks, antikehade kontsentreerimine, analüütiline suuruseralduskromatograafia, ioonvahetus-

kromatograafia, hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia, kapillaarelektroforees, nanoDSF ja DLS analüüsid, AC-SINS, seondumise ning polüreaktiivsuse ELISA. Kõikide loetletud analüüsimeetodite andmeanalüüs teostati samuti töö autori poolt.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

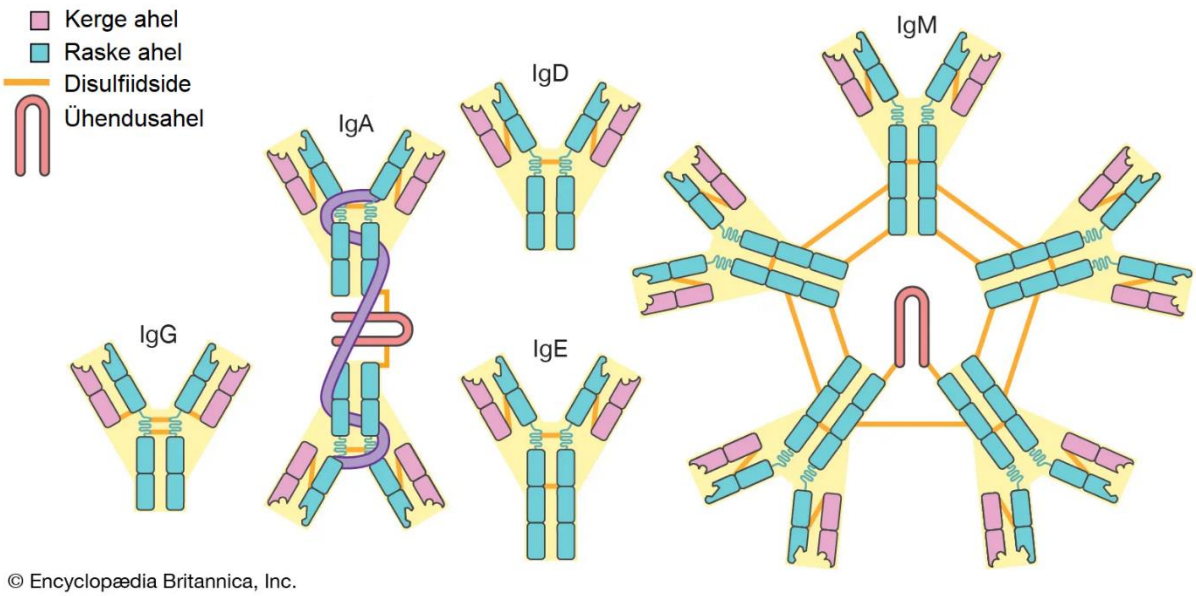
1.1. Antikehad

Loomorganismid alustavad antikehade tootmist võõrvalkudega kokkupuutel, mis looduses pärinevad sageli bakteritelt, viirustelt või teistelt patogeenidelt. Antikeha ehk immunoglobuliin (Ig) on B-lümfotsüüdi poolt toodetud valk, mis tunneb ära temale vastava valgu ehk antigeeni ja seondub sellele. Antikeha seondumisel antigeenile aktiveerub immuunsüsteemi kaskaad, mille tulemusena hävitatakse antigeeni ekspresseeriv rakk. Immunoglobuliinid koosnevad neljast polüpeptiidahelast: kahest identsest raskest ahelast ja kahest identsest kergest ahelast (Joonis 1) (Uibo *et al.*, 2015). Vastavalt isotüübile koosneb antikeha raske ahel umbes 450 kuni 575 ja kerge ahel umbes 220 aminohappejäägist (Narciso *et al.*, 2011). Kerge ahel koosneb kahest domeenist: VL ja CL ning raske ahel neljast domeenist: VH, CH1, CH2 ja CH3. Molekuli disulfiidsillad ühendavad omavahel CH1 ja CL domeenid, mis seovad kovalentselt kerge ja raske ahela, samuti on tsüsteiinidevaheliste sidemetega ühendatud omavahel kaks rasket ahelat. Raske ahela CH1 ja CH2 piirkondi ühendavat aminohappelist järjestust nimetatakse hinge-regiooniks (ing keeles *hinge region*) ning see tagab molekuli konformatsioonilise paindlikkuse (Mark *et al.*, 2022). Nii raske kui ka kerge ahel sisaldavad konstantseid ja varieeruvaid regioone. Varieeruvad piirkonnad sisaldavad järjestusi, mis seonduvad vastavale antigeenile, ning erinevad vastavalt antigeeni järjestusele. Konstantsed piirkonnad on sama isotüübiga antikehade puhul sama järjestusega (Uibo *et al.*, 2015).



Joonis 1. Antikeha ehk immunoglobuliini lihtsustatud skemaatiline ehitus IgG näitel. Värviliste kastide sees on välja toodud piirkondade nimetused (VL – varieeruv kerge ahela piirkond; VH – varieeruv raske ahela piirkond; CL – konstantne kerge ahela piirkond; CH1, CH2, CH3 – konstantsed raske ahela piirkonnad). Paksu musta joonega on tähistatud tsüsteiinidevahelised disulfiidsillad. Raske ahela CH1 ja CH2 piirkondi ühendavat aminohappelist järjestust nimetatakse hinge-regiooniks (Mark *et al.*, 2022).

Immunoglobuliinid jagunevad vastavalt nende raske ahela konstantse regiooni ehituse järgi järgmisteks isotüüpideks ehk klassideks: IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE (Joonis 2). IgG ja IgA jagunevad omakorda vastavalt - IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ning IgA1 ja IgA2 alamklassideks (Uibo *et al.*, 2015). Alamklassid on nummerdatud nende kontsentratsiooni järgi vereseerumis: IgG1 esineb kõige rohkem (5–12 g/L), teisena IgG2 (2–6 g/L), kolmandana IgG3 (0,5–1 g/L) ja kõige vähem esineb IgG4 (0,2–1 g/L) isotüüpi. Sama kehtib ka IgA1 (0,5–2 g/L) ja IgA2 (0–0,2 g/L) puhul (Hamilton, 1987). IgG alamklasside aminohappelised järjestused jagavad 90% homoloogiat, erinevused paiknevad põhiliselt CH2 ja hinge-regioonis (Vidarsson *et al.*, 2014).



Joonis 2. Immunoglobuliinide isotüübid ehk klassid. Põhilised erinevused klasside vahel on raske ahela domeenide arv, disulfiidsildade paiknemine ning arv ja multimeeride moodustamine IgA ning IgM puhul (Perdue ja Humphrey, 2025).

Terapeutiliste antikehade loomisel on kõige enam kasutusel immunoglobuliin G, kuna selle isotüübiga antikehadel on kõige tugevamad efektorfunktsioonid, nt antikehast sõltuva rakulise tsütotoksilisuse aktivatsioon (Vukovic *et al.*, 2021). IgG on umbes 150 kDa suurune molekul, millest 100 kDa moodustavad kaks rasket ahelat ja ülejäänud 50 kDa kerged ahelad (Thomson, 2016). Antikeha piirkonnad jagunevad Fc (*Fragment crystallizable*), Fab (*Fragment antigen-binding*) ja Fv (*variable fragment*) regioonideks (Joonis 1). Fc ei seo antigeeni, kuid on võimeline interakteeruma mitmete teiste molekulidega (Larsson, 2000). Fc piirkonnaga seonduvad näiteks makrofaagide pinnal olevad Fc retseptorid (Mak ja Saunders, 2006). Fc-le seondumine aktiveerib ka paljusid teisi immuunrakke, mis omakorda tekitavad kehas immuunvastuse. Nt makrofaagid hakkavad sekreteerima molekule, mis lõikavad Fc piirkonda, mille tulemusel suureneb B-lümfotsüütide elulemus (Weigle *et al.*, 1985). Fab piirkond osaleb antigeeni sidumisel ja sisaldab omakorda Fv regiooni, mis asub molekuli distaalses otsas ja omab antigeenile komplementaarseid järjestusi (Larsson, 2000).

Need komplementaarsed järjestused moodustavad Fv regiooni otsast väljaulatuvaid linge ehk aasasid. Selliseid antikeha spetsiifilisust antigeeni suhtes määravaid linge nimetatakse komplementaarsust määravateks piirkondadeks (ing keeles *complementarity-determining region*) ehk CDR-deks (Uibo *et al.*, 2015). Nii raske kui ka kerge ahela varieeruvas osas on kolm antigeenile seonduvat CDR-i, mida nimetatakse ka hüpervarieeruvateks regioonideks.

Antikehal on kokku 12 CDR piirkonda, igal kergel ja raskel ahelal kolm CDR piirkonda: CDR1, CDR2 ja CDR3 (Bona ja Bonilla, 2019). CDR-de aminohappelised järjestused on kõige mitmekesisemad osad antikeha Fv regioonis ning nende pikkus võib erineda vastavalt antikeha spetsiifilisusele (Thomson, 2016). Kõikide ahelate komplementaarsust määravad piirkonnad asuvad tavaliselt esimese 140 aminohappe seas: CDR1 tavaliselt umbes 20–40, CDR2 umbes 60–75 ning CDR3 umbes 110–135 (Dondelinger *et al.*, 2018).

Valkude aminohapete loendamist alustatakse N-terminusest ehk vaba α-aminorühmaga aminohape on esimene ja vaba α-karboksüülrühmaga aminohape on viimane (Joonis 1). Antikeha lingudes leiduvaid aminohappeid on võimalik nummerdada Kabati, Chothia või teiste süsteemide järgi (Joonis 3) (Dondelinger *et al.*, 2018). Kuna erinevate süsteemide olemasolu tõttu võivad aminohapete identifitseerimisel tekkida vead, siis on antikehade aminohapete järjestuste joondamiseks välja töötatud algoritmid, mis võimaldavad automatiseerida aeganõudvaid ja vigade tegemise ohuga manuaalseid joondamisi (Jarasch ja Skerra, 2017).

Kabat	L24	L25	L26	L27	a	b	c	d	e	f	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34
1igm	Q	A	S	Q	-	-	-	-	-	-	D	I	S	N	Y	L	A
2imm	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	F	L	A
Chothia	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	a	b	c	d	e	f	L31	L32	L33	L34

Joonis 3. Kabat ja Chothia nummerdamise süsteemide erinevused inimese IgM Fv piirkonna (PDB ID: 1igm) ja hiire immunoglobuliini Fv piirkonna (PDB ID: 2imm) järjestuste näidetel (Dondelinger *et al.*, 2018).

CDR-piirkonnas olevate aminohapete muutmisel võib antikeha afiinsus ehk antigeeni ja antikeha mittekovalentne seondumine kaduda, selle tugevus oluliselt väheneda või hoopis suureneda. Samuti võib ka lingudest väljaspool asuvate aminohapete muutmine mõjutada CDR-piirkonna afiinsust antigeeni vastu, sest antikeha painduvus või CDR konformatsioon võib selle tulemusel muutuda. Suuremat mõju avaldavad tavaliselt aminohapped, mis asuvad ruumiliselt CDR-i läheduses (Dondelinger *et al.*, 2018; González-Muñoz *et al.*, 2012). Sellist komplementaarsust määravate piirkondade väliste aminohapete mõju antigeenile seondumisel on leitud umbes 20% antigeen-antikeha komplekside puhul (Kunik *et al.*, 2012). Aminohapete muutmine võib osutuda vajalikuks, kui on vaja muuta molekuli afiinsust, stabiilsust või vähendada immuunvastust võõra antikeha vastu (Queen *et al.*, 1989).

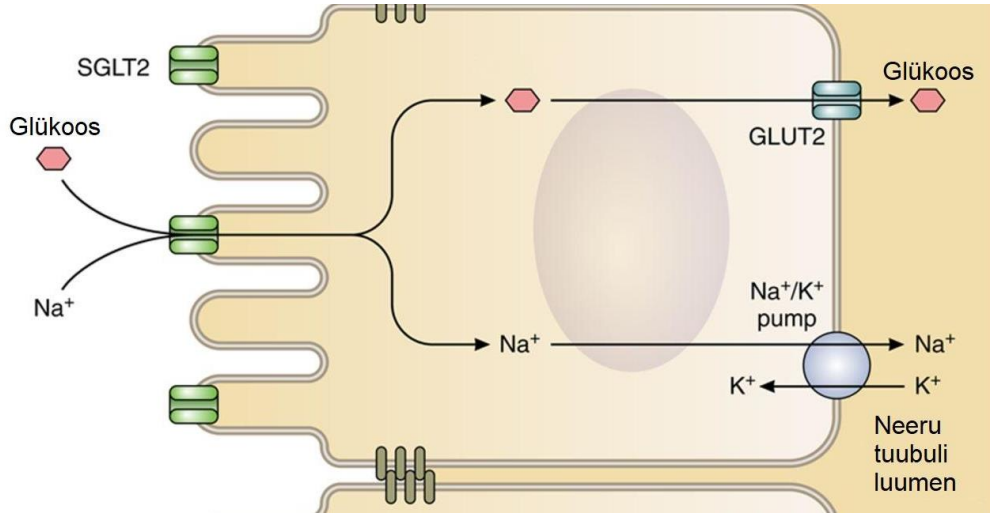
Kõikidele immunoglobuliinidele on iseloomulik glükosüleerimine ning spetsiifiline suhkrujääkidest moodustuv glükomuster, mis võib erineda suhkrujääkide arvu ja tüübi ning oligosahhariidi asukoha poolest (Zheng *et al.*, 2011). Antikehadel esineb *N*-seoseline, väga harva ka *O*-seoseline glükosüleerimine. *N*-seoseline glükosüleerimine toimub asparagiini jäägi kõrvalahela ja *N*-atsetüülglükoosamiidi ühendamisel (Reily *et al.*, 2019). Enamasti kinnituvad oligosahhariidid IgG molekulides mõlema raske ahela asparagiin-297 jäägi külge (Jefferis, 2009). *N*-seoseline glükosüleerimine mängib olulist rolli antikeha normaalses funktsioonis. Antikehast sõltuv tsütotoksilisus ja komplemendist sõltuv tsütotoksilisus on suuresti seotud antikeha glükomustriga. Näiteks võimendab IgG1-lt fukoosi eemaldamine antikehast sõltuvat tsütotoksilisust, mida on oluline jälgida ravimiarenduses kasutatavate antikehade puhul (Niwa *et al.*, 2005).

1.2. Glükoosi transport ja tarbimine vähirakkudes

Hapniku olemasolul ehk aeroobsetes tingimustes toodavad normaalsed rakud energiat oksüdatiivse fosforüleerimise kaudu. Anaeroobsetes tingimustes toodetakse energiat glükolüüsi kaudu. Erandiks on erütrotsüüdid, mis ei sisalda mitokondreid (R. A. Harris ja Johnson, 2019). Glükolüüsi tulemusel tekib 2 molekuli ATP-d, oksüdatiivsel fosforüleerimisel 32 molekuli (Pfeiffer *et al.*, 2001). Vähirakkudes seevastu on aga täheldatud ebanormaalne glükoosi kasutamine ATP tootmiseks, kus glükoosi metabolismiks kasutatakse isegi hapniku olemasolul lisaks oksüdatiivsele fosforüleerimisele ka glükolüüsi (Hay, 2016). Seda, kasvajates esinevat aeroobset glükolüüsi, nimetatakse Warburgi efektiks (Warburg, 1924). Warburgi efekt ei ole vähi kaasnähtus, vaid oluline mehhanism, mille takistamine vähendab vähirakkude elulemust (Fantin *et al.*, 2006). Vähirakkudes on glükolüüsi kasutamise vajalikkusele antud erinevaid põhjendusi: glükoosist saab toota teisi raku paljunemiseks vajalikke biomolekule, glükolüüs toodab rohkem redoksreaktsioonideks vajalikke kofaktoreid ning ebaefektiivsema glükoosi kasutamise arvelt kiireneb ATP tootmine. Kõik need tegurid annavad vähirakkudele kasvueelise (Hosios *et al.*, 2016; Pfeiffer *et al.*, 2001).

Suurenenud tarbimise tõttu tuleb rakku transportida rohkem glükoosi. Glükoos on polaarne molekul, mille transpordiks rakku on vaja selleks spetsialiseerunud transportereid. Glükoosi transporterid jagatakse kahte klassi – naatriumist sõltuvad glükoosi transporterid (SGLT) ja passiivsed glükoosi transporterid (GLUT) (Mora ja Pessin, 2004; Navale ja Paranjape, 2016).

SGLT töötab naatriumioonide kontsentratsioonide erinevuste poolt tekitatud gradiendi põhimõttel ning see esineb peensoole luumenis ja neerude tuubulites selleks, et eraldada glükoos ja ülejäänud kehast väljuv mass (Joonis 4). Diabeedi puhul on glükoosi kontsentratsioon veres suurenenud ja transporterid küllastuvad, mis põhjustab liigse glükoosi eritumist uriiniga. Transport GLUT valkude abil toimub passiivselt, vastavalt glükoosi kontsentratsioonile, rakumembraani mõlemal pool. Kuna rakkudes kasutatakse glükoosi pidevalt energia tootmiseks, siis säilib raku sees madalam glükoosi kontsentratsioon, mis omakorda soodustab glükoosi pidevat liikumist rakku (Mora ja Pessin, 2004).



Joonis 4. SGLT töömehhanism neeru näitel. Aktiivne transport toimub glükoosi ja naatriumi samaaegsel rakku sisenemisel. Ioonide tasakaalu säilitamiseks tuleb 3 naatrumi iooni välja ja 2 kaaliumi iooni sisse pumbata. Edasine transport tuubuli luumenisse toimub GLUT abil (Heerspink *et al.*, 2016).

SLC2 (inglise keeles *solute carrier family 2*) geenide poolt kodeeritud GLUT-tüüpi valke ekspresseeritakse perifeersetes kudedes ja need osalevad glükoosi normaalsel transpordil rakku (Alpern ja Hebert, 2007). Siiani on iseloomustatud 14 erinevat GLUT valku ning neid kodeerivat geeni (Mueckler ja Thorens, 2013). GLUT valgud on umbes 500 aminohappest koosnevad transmembraansed valgud, mille alfa-heeliksid läbivad rakumembraani 12 korda (Mueckler *et al.*, 1985).

GLUT1 transpordib lisaks glükoosile ka galaktoosi ja askorbiinhapet (Carruthers *et al.*, 2009). GLUT1 ekspresseeritakse ajus, endoteeli rakkudes, platsentas, erütrotsüütides ja rinnanäärmetes (Mora ja Pessin, 2004; Younes *et al.*, 1996). Soole epiteelis valku ei leidu, kuid seda esineb hilises staadiumis kasvajates, millega kaasnevad tihti metastaasid lümfisõlmedes

(Younes, Lechago, and Lechago 1996). Ka üleekspressioon kindlates kudedes, nt kõhunäärmes ja rinnanäärmetes, on seotud agressiivsema ja suurema kasvaja ning metastaasidega (Jang *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2010). See võimaldab GLUT1 ekspressiooni järgi eristada vähirakke normaalsetest rakkudest ning tekitab võimaluse luua vähi vastu terapeutilised antikehad.

1.3. GLUT1 vastane antikeha

Kuna GLUT1 ekspressiooni järgi saab eristada terveid rakke vähirakkudest, siis transporteri vastu on loodud antikehad, mis hävitavad kasvaja. GLUT1 vastane IgG1 on välja töötatud Icosagen Cell Factory OÜ poolt ning saadud antigeeni süstimisel looma organismi. Kuna tegemist on looma jaoks võõra molekuliga, siis hakkab organism tootma selle vastu antikehasid. Pärast antikeha eraldamist ja järjestuse määramist identifitseeriti CDR-piirkonna aminohappeline järjestus. Seejärel antikeha humaniseeriti ehk muudeti inimesele sobivamaks, et vähendada või eemaldada inimkehas immuunvastust. Immuunreaktsioon tekib inimorganismi jaoks võõraste järjestuste tõttu, kuna looma IgG sisaldab teatud piirkondades järjestusi, mis pole inimesele omased (Safdari *et al.*, 2013). Humaniseerimist saab teostada läbi erinevate meetodite.

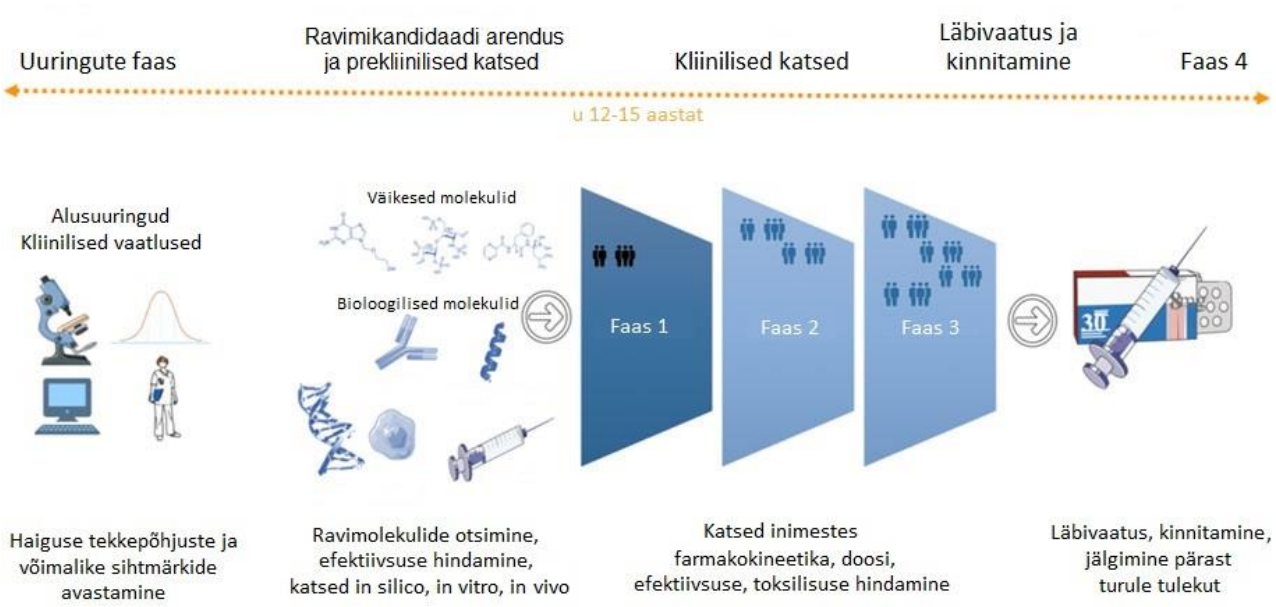
Kõige levinum humaniseerimise meetod on inimese Ig CDR järjestuse asendamine loomas toodetud antikeha CDR-ga (Safdari *et al.*, 2013). Näiteks saab inimese IgG1 ja IgG4 CDR järjestused asendada hiire IgG3 CDR järjestustega, mille tulemusel tekkinud antikehad tekitavad märkimisväärselt suurema antikehast sõltuva rakulise tsütotoksilisuse (Cheung *et al.*, 2012). CDR-i asendamine sellise meetodiga võib vähendada oluliselt antikeha afiinsust antigeeni vastu. Nagu eelnevas peatükis mainitud, siis seondumist ei mõjuta ainult CDR vaid ka seda konformatsiooniliselt ümbritsevad aminohapped. Antikeha humaniseerimisel on täheldatud selle afiinsuse vähenemist 40 korda. Afiinsust saab taastada, kui asendada CDR-i läheduses olevad aminohapped antikeha tootnud organismi omadega (Makabe *et al.*, 2008).

Teine humaniseerimise meetod põhineb inimese ja hiire CDR-piirkondade struktuursel sarnasusel. Antikeha CDR-i välise järjestuse valikul lähtutakse inimese idurakkude geenijärjestustest. Sarnasust hinnatakse inimese ja hiire CDR järjestuste homoloogia ning CDR-piirkondade ruumiliste struktuuride põhjal (Khee Hwang *et al.*, 2005).

Kolmandaks humaniseerimise meetodiks on loomas toodetud antikeha pinnal olevate aminohapete asendamine inimese omadega. Humaniseeritud antikeha aminohapped valitakse sellest lähtuvalt, millised aminohapped esinevad inimese antikehades antud positsioonides kõige sagedamini (Padlan, 1991). Läbi erinevate modelleerimismudelite saab hinnata aminohapete asendamise vajadust ning selle mõju CDR konformatsioonile. Kui mudeli järgi mõjutab muudatus potentsiaalselt CDR konformatsiooni, siis seda muutust välditakse (Staelens *et al.*, 2006).

1.4. Ravimiarendus

Uute ravimite arendamine ja turule toomine on pikk protsess (Joonis 5), mis kestab keskmiselt 12 kuni 15 aastat (Singh *et al.*, 2023). Uue ravimi turule toomise maksumus oleneb suuresti arendatava ravimi eesmärgist, kuid jääb üldjuhul vahemikku 400 miljonit kuni 1,7 miljardit USA dollarit ning keskmine maksumus koos kõikvõimalike kuludega on hinnanguliselt 900 miljonit USA dollarit (Sertkaya *et al.*, 2024). Ravimiarendus koosneb järgnevatest etappidest: alusuuringud, ravimikandidaadi arendus ja prekliinilised katsed, kliinilised katsed inimestes, ravimistaatusesse kinnitamine ja pikaajaline kõrvaltoimete jälgimine.



Joonis 5. Ravimiarenduse etapid. Esimesena on uuringute faas. Seejärel hakatakse otsima ravimikandidaate ning katsetatakse neid erinevates *in silico*, *in vitro* ja *in vivo* katsetes. Kolmandana hinnatakse ravimikandidaadi sobivust kliinilistes katsetes. Katsete tulemuste läbivaatuse ja ravimiloa saamise järel jälgitakse ravimi pikaajalisi kõrvaltoimeid pärast ravimi turule tulekut (Singh *et al.*, 2023).

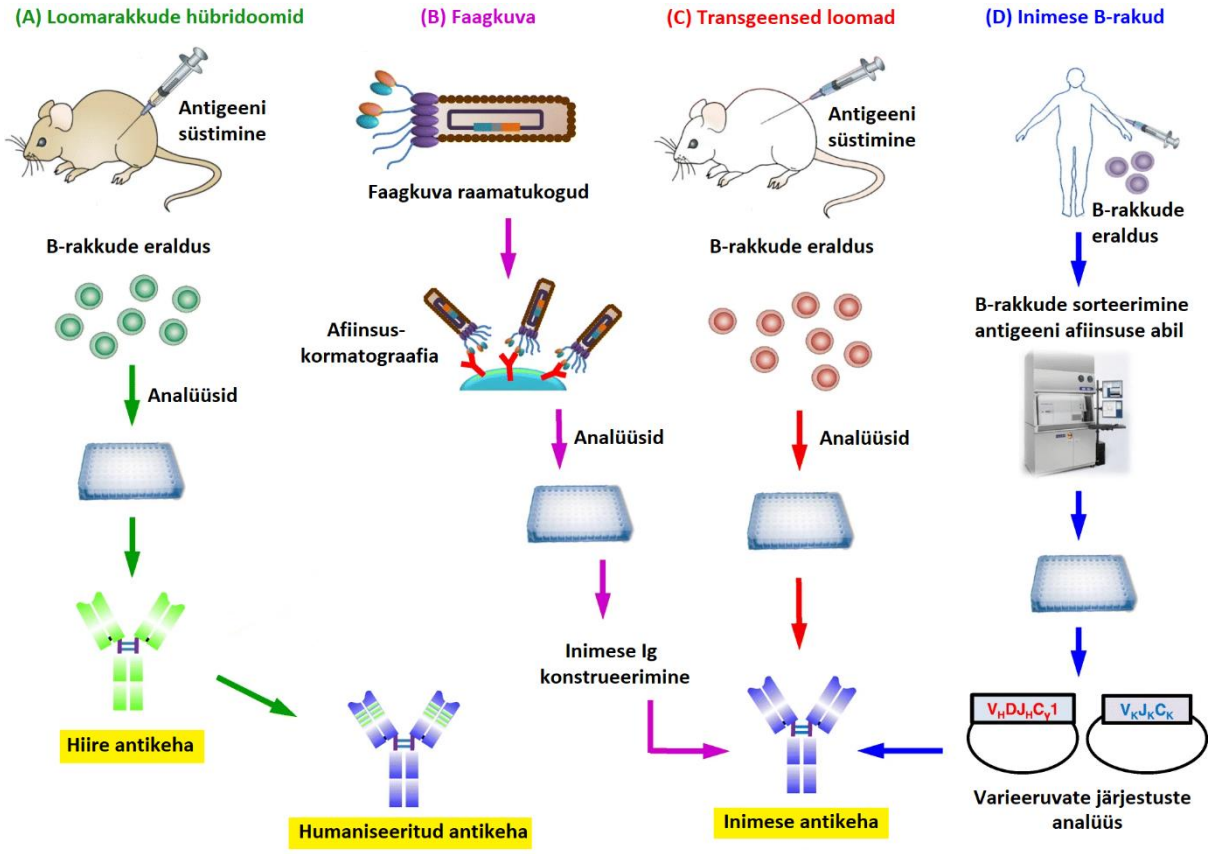
1.4.1. Uuringute faas

Enne uue ravimi arendust tuleb välja selgitada, mille vastu ravim luuakse. Selleks tuleb leida haiguse tekkepõhjus ning ravimi võimalikud sihtmärgid. Näiteks on rinnakasvaja rakkudel olevate türosiin-kinaas retseptorite vastu välja arendatud terapeutiline antikeha nimega Trastusumaabemtansiin, mis pärsib vähirakkude kasvu (Emens ja Davidson, 2004). Enamjaolt teostatakse see etapp akadeemilistes asutustes, kus uuritakse haigusega seotud molekule, signaalradasid või haiguse tekkemehhanisme (Singh *et al.*, 2023).

1.4.2. Antikeha põhise ravimi arendamine ja prekliinilised katsed

Pärast uuringute faasi saab hakata arendama ravimit haiguse vastu. Ravimiks saavad olla madalmolekulaarsed ühendid, näiteks antibiootikumid, või kõrgmolekulaarsed bioloogilised molekulid, näiteks antikehad (Singh *et al.*, 2023). Kahe ravimigrupi vahele ei saa molekuli suuruse põhjal selget piiri tõmmata, kuid üldiselt loetakse madalmolekulaarseteks ühenditeks alla 1000 Da suuruseid molekule (Dougherty ja Pucci, 2012). Ravimite arendamisel võidakse testida erinevate analüüsimeetoditega tuhandeid molekule, mille tulemusel valitakse välja piiratud arv molekule, mida kasutatakse loomkatsetes (Singh *et al.*, 2023). Ravimikandidaatide otsimisel kasutatakse järjest enam juba olemasolevaid andmebaase. Tehisaru treenimisel erinevate molekulide ja nende kombinatsioonidega saab olemasolevate ravimolekulide põhjal välja töötada uusi ravimeid (Rani *et al.*, 2024).

Bioloogiliste molekulide hulka kuuluvatest ravimitest moodustavad antikehadel põhinevad ravimid kõige suurema osa ning iga aastaga tuleb turule järjest enam selliseid ravimeid (R.-M. Lu *et al.*, 2020). 2024. aasta seisuga on 148 erinevat antikehal põhinevat ravimit saanud kasutusloa Euroopa Liidus ja Ameerika Ühendriikides, neist 66 on välja töötatud vähiraviks (antibodysociety.org). Terapeutiliste antikehade väljatöötamiseks on neli erinevat meetodit (Joonis 6) – loomast eraldatud rakkude hübridoomid, faagkuva, transgeensed loomad või vaktsineeritud/nakatunud inimese B rakkude eraldamine (R.-M. Lu *et al.*, 2020).



Joonis 6. Erinevad meetodid terapeutiliste antikehade väljatöötamisks. (A) Loomarakkude hübridoomid, (B) Faagkuva, (C) Transgeensed loomad, (D) Inimese B-rakkude eraldamine (R.-M. Lu *et al.*, 2020).

Loomarakkude hübridoomi loomiseks tuleb esmalt loom immuniseerida huvipakkuva antigeeniga, mille vastu hakkavad looma B–rakud tootma antikehi. Loomast eraldatud B–rakkude ja müeloomi rakkude ühendamisel tekivad hübridoomid, mis sekreteerivad huvipakkuvat antikeha ning suudavad paljuneda (R.-M. Lu *et al.*, 2020). Saadud rakkude poolt toodetud antikehad on võõrad inimese immuunsüsteemile. Juba peale esimest manustamist tekib inimeses loomorganismis toodetud antikeha vastu immuunreaktsioon ning antikeha lagundatakse järgnevate manustamiste käigus. Ravimivastased antikehad tekivad 7 kuni 15 päeva pärast ravi alustamist, mis pärsib aga ravimi pikaajalise manustamise efektiivsust. Siiski, osadel patsientidel on ravimi efektiivsus säilinud (Legouffe *et al.*, 2008). Looma antikeha immunogeensust saab vähendada läbi antikeha humaniseerimise.

Faagkuva meetod põhineb inimese immunoglobuliini geenidelt toodetud antikehade presenteerimisel bakteriofaagide pinnal. Bakteriofaagi ehk faagi pinnavalgu geeni sisestatakse inimese antikeha varieeruva piirkonna (Fv piirkond) järjestus. Pärast bakteri nakatamist hakkavad need sekreteerima bakteriofaage, mille pinnal on huvipakkuvad peptiidid

(McCafferty *et al.*, 1990). Bakteriofaagid, mille pinnal on osa inimese antikeha järjestusest, saab afiinsuse järgi eraldada ülejäänud faagidest (Parmley ja Smith, 1988). Afiinsuskromatograafia abil saab eraldada antigeeni spetsiifilised bakteriofaagid ja teha nendest raamatukogud. Raamatukogu koosneb erinevatest inimese antikeha varieeruva piirkonna järjestustest, mis omavad afiinsust antigeeni suhtes (McCafferty *et al.*, 1990). Selle meetodiga saadud molekulide puhul on vaja analüüsida nende biofüüsikalisi omadusi. Tihti võivad faagkuva meetodiga saadud antikehad kõrgematel kontsentratsioonidel agregeeruda ning on polüreaktiivsed, mis tähendab, et need seonduvad mittespetsiifiliselt erinevate molekulidega (Kaleli *et al.*, 2019).

Antikehi saab toota ka transgeensetes loomades. Selleks tuleb looma immunoglobuliini geen eemaldada ja asendada see inimese omaga (Lonberg *et al.*, 1994). Näiteks saab hiire idurakkudesse viia pärmi tehisliku kromosoomi sees inimese kerge ja raske ahela järjestused (Green *et al.*, 1994). Looma süstimisel antigeeniga hakkavad B-rakud tootma antigeeni vastaseid inimese antikehi. Huvipakkuvad B-rakud saab loomast eraldada ning tekitada nendest antikehi tootvad hübridoomid (Lonberg *et al.*, 1994).

Inimese verest on võimalik eraldada B-rakke, millest saab erinevate meetodite abil tekitada antikehi tootvaid kultuure. B-rakkude eluiga on üsna lühike, mistõttu on vajalik nende eluea pikendamine (Pedrioli ja Oxenius, 2021). Rakke saab pikaajaliselt kasvatada, kui nendest tekitada hübridoomid või nakatades neid Epstein-Barri viirusega (Epstein *et al.*, 1964; Strike *et al.*, 1984). Kuna B-rakud on inimesest pärit, siis on sellisel meetodil toodetud antikehadel üldiselt hea afiinsus ja madal polüreaktiivsus.

Erinevate meetodite abil saadud antikehade hulgast on vaja leida kõige sobilikumad ravimikandidaadid kasutades *in silico*, *in vitro* ja *in vivo* analüüsimeetodeid. Seejärel analüüsitakse potentsiaalseid ravimikandidaate loomkatsetes näriliste peal. Kui ravimikandidaat on efektiivne ja oluliste kõrvalnähtudeta, manustatakse ravimikandidaate ka suurematele loomadele nagu küülikud ja sead (Acharya *et al.*, 2017; Bajpayee *et al.*, 2015). Loomkatsete õnnestumisel saab taotleda luba kliiniliste katsete läbiviimiseks (Singh *et al.*, 2023). Ravimi mittetoksiline mõju katseloomale ei välista selle toksilisust inimeste puhul (Pognan *et al.*, 2023).

1.4.3. Kliinilised katsed ehk ravimi mõju inimestele

Kliinilised katsed, mille eesmärk on välja selgitada ravimikandidaadi mõju inimestele, jagunevad viieks põhiliseks faasiks. Faasis 0 hinnatakse ravimi väga madalate dooside mõju, mille raames analüüsitakse farmakokineetikat. Faasi 1 kaasatakse alla 50 inimese ning selgitatakse välja ravimi ohutu ja maksimaalne doos. Faas 2 katsetesse kutsutakse 5–100 ravi vajavat patsienti, selle käigus hinnatakse terapeutilist mõju ja doosi ning tulemusi võrreldakse platseeboga. Faasi 3 raames kaasatakse 300–3000 patsienti, kellel hinnatakse ravimi efektiivsust, ohutust ja kõrvalmõjusid ning võrreldakse platseeboga. Faas 4 hõlmab uuringuid peale loa saamist ja ravimi turule toomist – jälgitakse võimalikke pikaajalisi kõrvaltoimeid ja erinevaid koosmõjusid (Kandi ja Vadakedath, 2023).

1.5. Antikehade arendatavus

Antikeha arendatavus (ing keeles *developability*) viitab uuritava antikeha sobivusele saada hästi toodetavaks, ohutuks ja efektiivseks ravimiks. Arendatavust tuleks hinnata enne kliinilisi katseid, et vähendada ravimikandidaadi ebaõnnestumise võimalust kliinilistes katsetes. Hindamine toimub mitmes etapis, alustades terapeutilise antikeha otsimise faasist, kus potentsiaalsete kandidaatide arv võib ulatuda tuhandetesse. Arvu piiramiseks on kasutusel mitmeid erinevaid analüüsimeetodid, mille abil tuvastatakse molekulid, mis ei vasta soovitud omadustele ning need kõrvaldatakse edasistest etappidest (W. Zhang *et al.*, 2023). Katsete tulemusel valitakse välja molekul, mis vastab kliinilisteks uuringuteks vajalikele nõuetele (Mieczkowski *et al.*, 2023).

Ideaalsel ravimikandidaadil on järgnevad omadused: kõrge tootlikkus, lihtne suures koguses puhastada (nt afiinsuskromatograafiaga), homogeenne, kerge taastoota, vesilahuses pikaajaliselt stabiilne (ei toimu agregeerumist, fragmenteerumist, keemilist degradeerumist, bioloogilise aktiivsuse langust), spetsiifilisus ainult soovitud antigeeni vastu, lahustub kõrgel kontsentratsioonil, madala immunogeensusega (Jarasch *et al.*, 2015). Hilisemate komplikatsioonide vältimiseks kliinilistes katsetes ning aja ja raha säästmiseks tuleks analüüsida kõiki loetletud parameetreid. Näiteks avastati bispetsiifilise ehk kahele antigeenile seonduva antikeha väljatöötamisel pärast humaniseerimist madal stabiilsus, polüreaktiivsus, kõrge tõenäosus iseendaga assostsieerumiseks ning deamidatsiooni oht molekuli CDR-is (Root *et al.*, 2021). Antud töös kasutati faagkuva meetodit, et tekitada paremate parameetritega

kandidaate, mille seast valiti erinevate analüüsimeetodite abil välja kõige paremate omadustega molekulid. Samas on ka oluline märkida, et ravimikandidaadi ühe omaduse parendamine võib tuua kaasa teiste halvenemise, näiteks stabiilsuse parandamisel võib väheneda afiinsus.

1.5.1. Ekspressioon ja tootlikkus

Üks esimesi parameetreid, mida pärast ravimikandidaatide tootmist hinnatakse, on ekspressioonitase ja tootlikkus. Üldiselt kasutatakse esmase arendatavuse hindamise analüüsides molekule, mis on toodetud transientse geenieksprессiooni abil. Selle meetodi puhul transfekteeritakse ehk viiakse rakutuuma huvipakkuva molekuli geen, misjärel hakkab toimuma antikeha ekspressioon (da Silva Junior, 2022). Ekspressiooni saab hinnata rakkude poolt toodetud valgu koguse järgi (Durocher, 2002). Spetsiifilise valgu kontsentratsiooni lahuses saab hinnata afiinsuskromatograafia abil (Satzer ja Jungbauer, 2018). Seda metoodikat kasutatakse tihti ka esimese sammuna antikehade puhastamisel, kuna see tagab kõrge seondumisspetsiifilisuse, puhtuse ja saagise (Rathore ja Narnaware, 2022). Selliselt on võimalik 2–4 nädala jooksul toota milligrammides kuni grammides antikehi, mida saab kasutada järgnevates arendatavuse parameetrite hindamise katsetes (da Silva Junior, 2022; Durocher, 2002). Madala ekspressioonitasemega molekulide tootmise hind kujuneb väga kõrgeks ning need eemaldatakse arendusest.

1.5.2. Homogeensus ja puhtus

Toodetud antikehaga võivad aja jooksul toimuda muutused, mis muudavad lahuse heterogeenseks. Heterogeensust võivad põhjustada protsessid, mis mõjutavad molekuli suurust, laengut ja/või hüdrofoobsust, näiteks N-terminuses asuva glutamiini tsükliseerumine ehk püroglutamaadi moodustumine, asparagiini deamidatsioon ja aspartaadi isomerisatsioon (Dick *et al.*, 2007; R. J. Harris *et al.*, 2001; Sydow *et al.*, 2014). Kõik need muutused mõjuvad tihtipeale negatiivselt terapeutilise antikeha efektiivsusele. Tavaliselt põhjustab molekulmassi suurenemist molekulide agregeerumine ning vähenemist nende degradeerumine. Molekulmassis toimuvaid muutuseid saab analüüsida suuruseralduskromatograafia, geelelektroforeesi, kapillaarelektroforeesi või massispektromeetri abil. Massispektromeeter võimaldab kõige täpsemat molekulmassi analüüsi ning suudab antikeha järjestuses toimunud

modifikatsioone eristada ka juhul, kui need erinevad vaid ühe aminohappe või translatsioonijärgse modifikatsiooni võrra (C. Lu *et al.*, 2013). Antikeha pinnalaengu muutumine võib põhjustada soovimatuid elektrostaatilisi interaktsioone lahuses olevate antikehade või inimkehas leiduvate molekulidega. Molekuli pinnalaengute muutust saab analüüsida kasutades isoelektrilise fokusseerimise või ioonvahetuskromatograafia meetodit (King *et al.*, 2018; Y. T. Zhang *et al.*, 2014). Antikehade hüdrofoobsuse liigsel suurenemisel hakkavad immunoglobuliinid agregeeruma ja selle tulemusel lahusest välja sadenema (Zhang *et al.*, 2023). Hüdrofoobsuse muutuste tuvastamiseks kasutatakse hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafiat (Wakankar *et al.*, 2007).

1.5.3. Antikeha stabiilsus

Valkude termostabiilsust saab määrata diferentsiaalse skaneeriva kalorimeetria (DSC) või diferentsiaalse skaneeriva fluorimeetria (DSF) meetoditega. DSC abil saab tuvastada molekuli muutuseid läbi referentsmaterjali ja huvipakkuva molekuli kuumutamise – mõõtes nende soojendamiseks vajaliku energia vahet (Haines *et al.*, 1998). Kasutades molekuli fluorestsentsispektri muutust, võimaldab DSF samuti läbi proovi kuumutamise määrata valgu termostabiilsust. Kuigi mõlemad meetodid mõõdavad molekulide termostabiilsust, siis DSF sobib ravimi otsimise faasi paremini, kulutades vähem proovi ning võimaldades sama aja jooksul rohkem proove analüüsida (He *et al.*, 2010). Mõlema meetodi abil saab antikeha lahti pakkumise ehk sulamistemperatuuri (T_m) ja agregeerumise temperatuuri (T_{agg}) järgi hinnata selle pikaajalist stabiilsust. Halva termostabiilsusega ehk termolabiilsete molekulide puhul toimub 50% ulatuses lahti pakkumine vähem kui 55 °C juures ning agregeerumine veel madalamal temperatuuril (Zhang *et al.*, 2023).

1.5.4. Antigeenispetsiifilisus

Antikeha spetsiifilist ning mittespetsiifilist seondumist saab määrata biointerferomeetria ehk BLI, pindmise plasmonresonantsi ehk SPR-i, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ja fluorestsentsiga aktiveeritud rakkude sorteerimise ehk FACS-i abil. BLI ja SPR meetodid mõõdavad molekulidevahelisi interaktsioone, jälgides, kuidas valguse omadused – SPR-i puhul peegelduse nurk või intensiivsus ning BLI puhul valguse interferentsimuster – muutuvad molekuli seondumise ajal (Kim *et al.*, 2019; Olaru *et al.*, 2015). ELISA analüüsis tuvastatakse

antikeha seondumine erinevatele molekulidele, mõõtes seondumise tulemusena tekkinud värvusreaktsiooni optilist tihedust (OD), mille intensiivsus näitab seondumise ulatust (Gorshkova *et al.*, 2022). FACS võimaldab mõõta molekulide seondumist nii antikehaga kaetud rakkudele kui ka vastavalt töödeldud kerakestele (Makowski *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2013). Ebaspetsiifiline seondumine võib tekitada kõrvalnähte ravimi kasutamisel, näiteks ninaneeluvähi raviks kasutatav Camrelizumab nimeline antikeha põhjustab hemangioomi ehk healoomulist veresoontekasvajat (Xuelian *et al.*, 2019). Kasvaja tekkepõhjuseks on antikeha mittespetsiifiline seondumine VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*) molekuliga (Finlay *et al.*, 2019).

1.5.5. Lahustuvus kõrgetel kontsentratsioonidel

Valgu lahustuvus näitab maksimaalset kontsentratsiooni, mille juures valk jääb lahusesse ega hakka välja sadenema või agregeeruma (Shire *et al.*, 2004). Valgul põhinev ravim loetakse kõrge kontsentratsiooniga ravimiks, kui selle kontsentratsioon ületab 50 mg/ml. Osade antikehade terapeutiline toime avaldub alles suure koguse juures, nõudes väikese ruumala süstimisel kõrget kontsentratsiooni. Suurem osa nendest on mõeldud subkutaanseks ehk nahaaluseks, osa ka intravenoosseks ehk veenisiseseks manustamiseks (Wang *et al.*, 2021). Valgulahuse kõrge kontsentratsioon on oluline, sest suure koguse (rohkem kui 3 ml) ravimi subkutaansel süstimisel võib tekkida süstekohas valuaisting ja vastureaktsioon (Mathaes *et al.*, 2016). Ravimi jaoks piisavalt kõrge valgu kontsentratsiooni saavutamine võib aga osutuda problemaatiliseks.

Lahustuvus sõltub enamjaolt valgu primaar-, sekundaar-, tertsiaar- ja kvaternaarstruktuurist. Sõltuvalt molekulist on lahustuvus suuremal või vähemal määral mõjutatud ka temperatuurist, rõhust, pH-st, puhvri komponentidest (nt soolad, aminohapped, suhkrud) ja komponentide kontsentratsioonidest (Manning *et al.*, 1995; Pindrus *et al.*, 2015; Terry Jenkins, 1998). Agregeerumine toimub molekulide omavaheliste interaktsioonide tulemusel ning seda mõjutavad hüdrofoobsed, van der Waalsi ja elektrostaatilised jõud ning vee molekulide polaarsus (Weiss *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2011). Agregeerumise saab jagada viieks erinevaks etapiks. Esmalt toimub valgu osaline lahtipakkumine, seejärel pöörduv interaktsioon teiste osaliselt lahti pakkunud molekulidega. Kolmandas etapis moodustuvad pöördumatud agregatsiooni tuumad, millele järgneb tuumade suurenemine ja suuremate agregaatide teke.

Lõppfaasis võib moodustunud agregaat olla kas lahustuv või lahustumatu; kui see on lahustumatu, siis sadeneb valk lahusest välja (Sahin *et al.*, 2010). Lahustuvust saab parandada, näiteks muutes või eemaldades komplementaarsust määravas piirkonnas hüdrofoobne aminohape. Kuna CDR-s olevad aminohapped on ümbritsevale keskkonnale avatud, siis saavad nad teise molekulidega interakteeruda, mis võib aga mõjutada valgu lahustuvust (Pindrus *et al.*, 2015). Antikehade puhul on üheks stabiliseerimise võimaluseks ka alamklassi muutmine, näiteks IgG4 asemel kasutada IgG1 järjestust (Ito ja Tsumoto, 2013).

1.6. Keelemudelid antikehade omaduste parandamiseks

Erinevad kasutusel olevad arvutuslikud mudelid võimaldavad ennustada valgu konformatsiooni ning selle muutust, sekundaarstruktuuride (alfa-heeliksid ja beeta-lehed) olemasolu, ligandile seondumist ja valgukomplekside moodustumist (Jumper *et al.*, 2021; Marks *et al.*, 2012; Trigg *et al.*, 2011). Ennustamiseks vajavad mudelid andmeid varasemalt uuritud sarnase aminohappelise järjestusega valkude kohta. Samas puudub nendel mudelitel võime õppida andmetes leiduvaid mustreid ning kasutada neid uue valgu parameetrite ennustamiseks (Bepler ja Berger, 2021).

Erinevalt arvutuslikest mudelitest suudavad keelemudelid leida valkude aminohappelistes järjestustes mustreid ja luua seoseid individuaalsete aminohapete vahel (Alley *et al.*, 2019). Mudeleid saab treenida valkude andmebaaside (nt UniRef), antikehade andmebaaside (nt BioPhi) või seondumise afiinsuse põhjal (Mason *et al.*, 2021; Prihoda *et al.*, 2022; Suzek *et al.*, 2007). Keelemudelid suudavad õppimiseks kasutatud andmebaaside põhjal välja pakkuda valkude järjestusi, mis oleks evolutsiooniliselt võimalikud. Soovitusi suudavad need pakkuda ainuüksi antikeha järjestuse põhjal, mis tähendab, et ei vajata eraldi informatsiooni afiinsuse, antigeeni, homoloogide või struktuuri kohta (Hie *et al.*, 2024).

Lisaks suudavad keelemudelid välja pakkuda mutatsioone antikeha omaduste parandamiseks, võimaldades vältida aja- ja ressursikulukaid meetodeid nagu faagkuva. Ennustuste valiidsuse tõstmiseks saab kasutada paljusid erinevaid keelemudeleid, valides välja aminohappe muutused, mida soovitavad enamus või kõik mudelid. Näiteks on kirjeldatud kuue keelemudeli kasutamine, millega parandati seitsme antikeha afiinsust nendele vastavate antigeenide vastu. Lisaks afiinsusele paranesid ka teised antikeha omadused nagu termostabiilsus ja viiruse neutraliseerimise võime (Hie *et al.*, 2024).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Icosagenis on varasemalt välja töötatud antikeha, mis seondub väga hea afiinsusega GLUT1 valgule ning sellel puuduvad interaktsioonid teiste inimkehas leiduvate molekulidega. Edasise arenduse käigus avastati immunoglobuliinil ebasoovitav omadus, nimelt hakkab see terapeutilisel kontsentratsioonil ehk >10 mg/ml lahusest välja sadenema. Selle omaduse parendamiseks katsetati antikeha aminohapete muutmist, kasutades keelemudeleid, mille tulemusel saadi 16 uut terapeutilise antikeha kandidaati. Igas kandidaadis oli üks kindel aminohape asendatud teise, originaalmolekulist erineva aminohappega. Saadud antikehi analüüsiti erinevate biofüüsikaliste ja -keemiliste meetoditega, et hinnata nende arendatavusega seotud omadusi ning selgitada välja nende sobivus prekliinilisteks katseteks.

Hüpotees: Keelemudelite poolt välja pakutud üheaminohappelised muudatused parendavad GLUT1 vastase antikeha lahustuvusega seotud omadusi ning ei too endaga kaasa ebasoovitavaid omadusi, nt madal termostabiilsus, madalam tootlikkus ja polüreaktiivsus.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. GLUT1 vastaste antikehade tootmine ja puhastamine ning keelemudeli põhimõte

Esmane antikeha väljatöötamine, humaniseerimine, tootmine ja keelemudelite rakendamine teostati Icosageni arenduse, rakukultuuri ja valgupuhastuse labori poolt. GLUT1 vastane antikeha saadi hiire immuniseerimisel GLUT1 antigeeniga. Hiirest eraldatud antikeha järjestus humaniseeriti. Humaniseeritud IgG järjestust analüüsiti erinevate keelemudelitega, mis pakkusid välja 16 üheaminohappelist muutust algse antikeha järjestuses (Tabel 1). Osadesse katsetesse kaasati võrdluseks ka turul olev terapeutiline antikeha nimega Trastusumaabemtansiin.

Mutatsioonide tegemiseks kasutati kuut keelemudelit – ESM-1b ja ESM-1v, mis koosneb viiest erinevast mudelist (Hie *et al.*, 2024). Keelemudelite poolt pakutud järjestused valiti töösse, kui vähemalt kaks nendest pakkusid samas positsioonis ühesugust aminohappe muutust.

Tabel 1. Keelemudelitest saadud järjestuste muudatused ja molekulidele antud nimed

Molekuli nr	Tehtud mutatsioon	Nimi tulemuste analüüsis
305	Originaal	305 Originaal
402	Raske ahela 42. positsioonis asuv aspartaat on muudetud glütsiiniks	402 D42G HC
403	Raske ahela 58. positsioonis asuv trüptofaan on muudetud seriiniks	403 W58S HC
404	Raske ahela 63. positsioonis asuv treoniin on muudetud aspartaadiks	404 T63D HC
405	Raske ahela 64. positsioonis asuv valiin on muudetud seriiniks	405 V64S HC
406	Raske ahela 64. positsioonis asuv valiin on muudetud alaniiniks	406 V64A HC
407	Raske ahela 90. positsioonis asuv alaniin on muudetud glutamaadiks	407 A90E HC
408	Raske ahela 116. positsioonis asuv histidiin on muudetud glutamiiniks	408 H116Q HC
409	Raske ahela 119. positsioonis asuv glutamaat on muudetud leutsiiniks	409 E119L HC
410	Kerge ahela 1. positsioonis asuv alaniin on muudetud glutamiiniks	410 A1Q LC
411	Kerge ahela 54. positsioonis asuv aspartaat on muudetud glütsiiniks	411 D54G LC
412	Kerge ahela 77. positsioonis asuv valiin on muudetud alaniiniks	412 V77A LC
413	Raske ahela 5. positsioonis asuv aspartaat on muudetud valiiniks	413 D5V HC
414	Raske ahela 12. positsioonis asuv glutamiin on muudetud valiiniks	414 Q12V HC
415	Raske ahela 17. positsioonis asuv alaniin on muudetud seriiniks	415 A17S HC
416	Raske ahela 21. positsioonis asuv valiin on muudetud seriiniks	416 V21S HC
417	Raske ahela 34. positsioonis asuv isoleutsiin on muudetud metioniiniks	417 I34M HC

2.2.2. *Protein A* afiinsuskromatograafia antikeha tiitri määramiseks

Afiinsuskromatograafiat kasutatakse uuritavate antikehade eraldamiseks ülejäänud proovis leiduvast materjalist. Kolonni maatriksi sisse fikseeritud ligandile seondub mittekovalentselt huvipakkuv molekul. Omavahelist spetsiifilist afiinsust omavad näiteks ensüüm ja substraat või antikeha ja antigeen. Ülejäänud molekulid, mis ei oma afiinsust kolonni maatriksi vastu, lähevad kolonnist läbi.

Afiinsuskromatograafiaks kasutati HPLC süsteemi Agilent Infinity 1260 II, millega oli ühendatud Bio-Monolith Recombinant Protein A, 4,95 x 5,2 mm (Agilent) kolonn. Mõõtmine toimus rakkudest eraldatud supernatandist, eraldamine toimus rakukultuuri töötajate poolt. Kolonnile sidumiseks kasutati 50 mM Na-fosfaat pH 7,4 ja elueerimiseks 100 mM glütsiin pH 2,7 lahust, voolukiirusel 3 ml/min. Kolonniahi oli sätitud 25 °C peale. Elueerunud piigid detekteeriti lainepikkusel 280 nm ja võrreldi inimese anti-HEL IgG1 (Icosagen) lahjendusrea vastu. 280 nm lainepikkust kasutati antikehade eristamiseks glütsiiniga puhvrist. Proovid mõõdeti ühes korduses.

2.2.3. Puhastatud antikehade kontsentreerimine

Proovid soojendati toatemperatuurile. Puhastatud antikehad kontsentreeriti Amicon Ultra 0,5 ml Ultracel-30 regenereeritud tselluloosist membraanfiltritega 18 000 *x*g juures. Proovid kontsentreeriti või lahjendati 1 mg/ml ning 6–10 mg/ml peale. Proovide kontsentreerimisel 6–10 mg/ml-ni ületati kõikide antikehade puhul nende lahustuvuspiir. Kontsentreeritud proovid jäeti üleöö 4 °C juurde. Enne lahjendamist 10 mg/ml-ni lasti proovidel soojeneda toatemperatuurile ning neid tsentrifuugiti 18 000 *x*g juures 5 min. Eemaldati supernatant, mis lahjendati vajadusel 10 mg/ml peale 1x PBS lahusega. Lõplikud kontsentratsioonid mõõdeti kolmes korduses Nanodrop UV/Vis spektrofotomeetriga 280 nm juures, mikroruumala režiimis.

2.2.4. Analüütiline suuruseralduskromatograafia

Analüütiline suuruseralduskromatograafia võimaldab uurida valke, valgu agregaate või lagunemist natiivsetes tingimustes. Molekulid säilitavad oma hüdrodünaamilise diameetri ning liiguvad sellele vastavalt läbi kolonni pooride. Kolonnist väljuvad esmalt kõige suurema diameetriga molekulid ning järgnevad aina väiksemad molekulid, kuna viimased liiguvad sügavamale kolonni pooridesse, aeglustades nende liikumist läbi kolonni.

Analüütiliseks suuruseralduskromatograafiaks kasutati HPLC süsteemi Agilent Infinity 1260 II, millega oli ühendatud BioSuite 250, 4 µm UHR SEC, 4,6 mm x 300 mm (Waters) kolonn ja sellele vastav eelkolonn BioSuite UHR SEC, 4,6 mm x 35 mm (Waters). Mõõtmine toimus puhastatud proovidest kontsentratsioonidel 1 mg/ml ja 6–10 mg/ml, mõlemal juhul tsentrifuugiti proove 18 000 *x*g juures 5 min ja süstiti kolonnile 1 µg antikeha. Analüüsidele eelnevat tsentrifuugimist teostati suuremate osakeste eemaldamiseks supernatandist. Kolonnist läbi voolutamiseks kasutati 0,2 M kaaliumfosfaat, 0,25 M kaaliumkloriid, pH 6,2 lahust, voolukiirusel 0,35 ml/min. Kolonniahi oli sätitud 25 °C peale. Elueerunud signaalid detekteeriti 220 nm juures, kuna sellel lainepikkusel neelavad valgust peptiidsidemed. 280 nm lainepikkusel neelavad valgust ainult aromaatsete kõrvalahelatega aminohapped ning lagunenud antikeha osad, mis ei sisalda aromaatseid aminohappeid, jäävad detekteerimata. Kõik proovid mõõdeti triplikaatides.

2.2.5. Kapillaarelektroforees

Kapillaarelektroforeesi teostati süsteemiga LabChip GXII Touch (PerkinElmer). Antikehade algne kontsentratsioon oli 1 mg/ml ning analüüsiti vastavalt tootja protokollile nimega „ProteinEXactTM HR Assay Quick Guide LabChip ® GXII Touch“ (Revvity.com). Antikehi analüüsiti nii redutseerimata kui ka redutseeritud tingimustel, redutseerimiseks kasutati 1 M DTT lahust, lõppkontsentratsiooniga 30 mM. Kõik proovid mõõdeti triplikaatides.

2.2.6. Analüütiline ioonvahetuskromatograafia

Analüütilises ioonvahetuskromatograafias toimub molekulide lahutamine vastavalt nende pinnalaengutele. Vastavalt molekuli omadustele saab kasutada katioon- või anioonvahetuskolonne. Töös kasutatud katioonvahetuskolonni osakesed omandavad pH 7 juures negatiivse laengu ning seob endaga positiivselt laetud osakesi. Soolagradiendiga elueerides hakkavad esmalt elueeruma kõige negatiivsema pinnalaenguga ning järgnevad järjest positiivsema laenguga molekulid.

Analüütiliseks ioonvahetuskromatograafiaks kasutati HPLC süsteemi Agilent Infinity 1260 II, millesse oli ühendatud Agilent Bio SCX, NP1.7, 4,6 x 50 mm kolonn ja Agilent Bio SCX, NP1.7, 4 x 10 mm, guard eelkolonn. Mõõtmine toimus proovi kontsentratsioonil 1 mg/ml. Enne mõõtmist tsentrifuugiti proove 18 000 *x*g juures 5 min ning kolonnile süstiti 20 µg proovi. Kolonnile sidumiseks kasutatud puhver A: 20 mM MES, pH 6,0. Kolonnilt elueerimiseks kasutatud puhver B: 20 mM MES, 1 M NaCl, pH 6,0. Süstile järgnev eluatsiooniprogramm algas

2-minutilise isokraatilise hoidmisega 0% B juures, millele järgnes 0–35% B gradient 22 minuti jooksul ja 35–100% B tõus 1 minuti jooksul. Kolonni pesti 3 minutit 100% B juures, misjärel tasakaalustati statsionaarset faasi 5 minutit 0% B juures. Terve programmi vältel oli voolukiirus 0,6 ml/min ning kolonniahi sätitud 30 °C peale. Elueerunud signaalid detekteeriti 220 nm juures ning kõik proovid mõõdeti triplikaatides.

2.2.7. Analüütiline hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia

Hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafias toimub molekulide lahutamine sõltuvalt nende pinna hüdrofoobsusest. Kolonni tasakaalustamisel kasutatav kosmotroopne sool vähendab lahuse polaarsust, takistades valgu hüdrofiilsete osade interaktsiooni vee molekulidega ning molekuli hüdrofoobsed piirkonnad saavad seonduda kolonni maatriksile. Soola kontsentratsiooni vähendamisel hakkavad esmalt elueeruma hüdrofiilsemad molekulid, vajades vähem interaktsioone lahuses olevate vee molekulidega.

Analüütiliseks hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafiaks kasutati HPLC süsteemi Agilent Infinity 1260 II, millesse oli ühendatud MAbPac™ HIC-10, 5 µm, 1000 Å, 4,6 x 100 mm (Thermo Scientific) kolonn. Enne mõõtmist tsentrifuugiti proove 18 000 *x*g juures 5 min. Proovid mõõdeti kontsentratsioonil 1 mg/ml ning kolonnile süstiti 10 µg antikeha. Kolonnile seondumiseks kasutatud puhver A: 100 mM Na-fosfaat, 2 M ammooniumsulfaat, pH 7,0. Kolonnilt elueerimiseks kasutatud puhver B: 100 mM Na-fosfaat, pH 7,0. Süstile järgnev eluatsiooniprogramm algas 1-minutilise isokraatilise hoidmisega 0% B juures, millele järgnes 0–100% B gradient 14 minuti jooksul. Kolonni pesti 5 minutit 100% B juures, misjärel tasakaalustati statsionaarset faasi 5 minutit 0% B juures. Terve programmi vältel oli voolukiirus 1 ml/min. Elueerunud signaalid detekteeriti 220 nm juures ning kõik proovid mõõdeti triplikaatides.

2.2.8. Seondumise ja polüreaktiivsuse ELISA

ELISA analüüsimeetodi abil saab tuvastada uuritavate antikehade seondumist nii sihtmärk antigeenile kui ka mittesihtmärk molekulidele. Molekul, mille vastu tahetakse immunoglobuliine testida, seotakse plaadi kaevu põhjas olevale membraanile. Ebaspetsiifiliste interaktsioonide takistamiseks lisatakse valgulahust (nt BSA), polüreaktiivsuse ELISA puhul seda ei lisata. Kaevudesse lisatakse primaarne ehk uuritav antikeha ning seejärel sellega seonduv sekundaarne antikeha. Lõpuks lisatakse substraat, mis tekitab

värvusreaktsiooni sekundaarse antikehaga. Seondumist mõõdetakse proovi optilise tiheduse (OD) mõõtmise abil.

ELISA teostati Clear flat bottom Maxisorp 384-kaevuga plaatidel. Esmalt pipeteeriti katmiseks igasse plaadi kaevu 30 µl katmispuhvris (1 x PBS, pH 7,4) 5 µg/ml-ni lahjendatud antigeeni. Antigeenideks olid kaks erinevat viiruse-sarnast molekuli ehk VLP-d, mille pinnal on ekspresseeritud GLUT1 ja CD19 valgud (Icosagen). Katse positiivse kontrollina kasutati GLUT1 ja negatiivse kontrollina CD19 molekule. Pärast katmist inkubeeriti plaate üleöö 4 °C juures. Järgmisel päeval pesti kõik kaevud plaadipesuriga (BioTek) 4 korda 90 µl pesulahusega (1x PBS, 0,05% Tween 20, 0,1% Proclin300) ning lisati igasse kaevu 90 µl blokeerimislahust (1x PBS, 2% BSA , 0,05% Tween 20, 0,2% Proclin300). Plaate inkubeeriti 1 h toatemperatuuril. Peale inkubeerimist pesti kõik kaevud plaadipesuriga eelnevalt kirjeldatud meetodil. Primaarsed ehk uuritavad antikehad lahjendati analüüsipuhvris (1x PBS, 1% BSA, 0,1% Tween 20, 0,1% Proclin300) kontsentratsioonini 40 µg/ml ning nendest tehti 384-kaevusel plaadil 22 lahjendust 2x sammuga nii, et igasse plaadi kaevu jäi lõpuks 30 µl proovi. Originaalantikeha (305 Originaal) oli igal plaadil positiivse kontrollina, ülejäänud antikehad mõõdeti duplikaatidena. Kõige viimasesse kaevu lisati negatiivse kontrollina analüüsipuhver. Plaate inkubeeriti toatemperatuuril loksutil 1 h. Peale inkubeerimist pesti kõik kaevud plaadipesuriga eelnevalt kirjeldatud meetodil, et eemaldada seondumata antikehad. Sekundaarne antikeha Goat anti-Human IgG Fc Cross-Adsorbed HRP (Thermo Fisher) lahjendati kontsentratsioonini 0,08 µg/ml (1x PBS, 1% BSA, 0,1% Tween 20, 0,1% Proclin300 lahuses) ning igasse kaevu pipeteeriti 30 µl saadud lahust. Plaate inkubeeriti toatemperatuuril loksutil 1 h. Peale inkubeerimist pesti kõik kaevud plaadipesuriga eelnevalt kirjeldatud meetodil, et eemaldada seondumata sekundaarsed antikehad. Seejärel pipeteeriti kaevudesse 30 µl TMB VII (Biopanda) lahust ning inkubeeriti toatemperatuuril loksutil 3 min. Reaktsiooni peatamiseks lisati kaevudesse 15 µl 0,5 M H_2SO_4 lahust. Plaadi kaevudest mõõdeti kohe Multiskan FC Microplate spektrofotomeetriga (Thermo Fisher) optiline tihedus (OD) 450 nm juures.

Polüreaktiivsuse ELISA teostati samuti Clear flat bottom Maxisorp 384-kaevuga plaatidel. Polüreaktiivsuse hindamiseks kaeti plaadi kaevud järgneva kuue molekuliga: vasika tüümusest eraldatud kaheahelalaline DNA (ThermoFisher), vasika tüümusest eraldatud üheahelalaline DNA (Sigma-Aldrich), molluskist eraldatud hemotsüaniin (Sigma-Aldrich), inimese rekombinantne insuliin (Sigma-Aldrich), HIV-le iseloomulikku antigeeni sisaldav VLP ehk HIV gag mock VLP (Icosagen) ning kardiolipiin (Sigma-Aldrich). Kaheahelalaline DNA, üheahelalaline DNA,

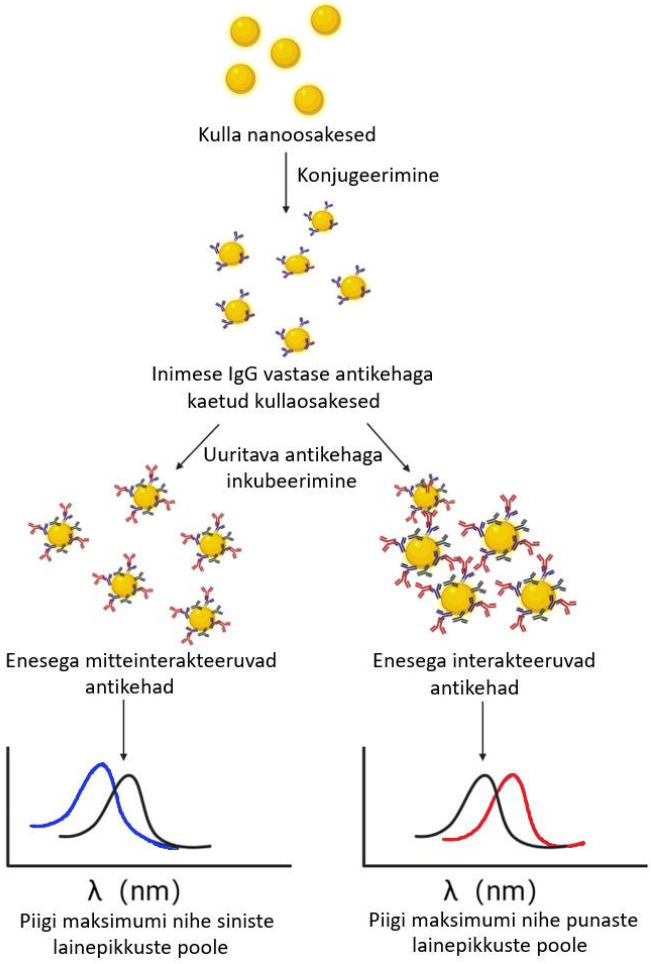
hemotsüaniin ja HIV gag mock VLP lahjendati 1x PBS-s kontsentratsioonini 10 µg/ml. Insuliin lahjendati 1x PBS-s kontsentratsioonini 5 µg/ml. Kardiolipiin lahustati 96% etanoolis kontsentratsioonini 10 µg/ml. Plaadi kannudesse pipeteeriti 30 µl vastavaid lahjendusi ja inkubeeriti üleöö 4 °C juures. Järgmisel päeval pesti kõik kaevud plaadipesuriga eelnevalt kirjeldatud meetodil. Seejärel pipeteeriti igasse kaevu 90 µl blokeerimislahust (1x PBS, 0,05% Tween 20, 1 mM EDTA). Plaate inkubeeriti 1 h toatemperatuuril. Primaarsed ehk uuritavad antikehad lahjendati analüüsipuhvris (1x PBS, 1% BSA, 0,1% Tween 20, 0,1% Proclin300) kontsentratsioonini 1 µg/ml ning nendest tehti 384-kaevusel plaadil 4 lahjendust 3x sammuga, igasse plaadi kaevu jäi lõpuks 30 µl lahjendust. Kõik antikehad mõõdeti duplikaatidena. Igale plaadile pipeteeriti positiivne kontroll (polüreaktiivne molekul) ja negatiivne kontroll (ei seondu mitte ühelegi kuuest molekulist) ning lahjendused tehti samamoodi nagu uuritavate antikehade puhul. Plaate inkubeeriti toatemperatuuril loksutil 1 h. Pärast inkubeerimist pesti kõik kaevud plaadipesuriga eelnevalt kirjeldatud meetodil. Sekundaarne antikeha Goat anti-Human IgG Fc Cross-Adsorbed HRP (ThermoFisher) lahjendati kontsentratsioonini 0,04 µg/ml puhvris 1x PBS, 0,05% Tween 20, 1 mM EDTA ning igasse kaevu pipeteeriti 30 µl saadud lahjendust. Plaate inkubeeriti toatemperatuuril loksutil 1 h. Pärast inkubeerimist pesti kõik kaevud plaadipesuriga eelnevalt kirjeldatud meetodil. Seejärel pipeteeriti plaadi kaevudesse 30 µl TMB VII (Biopanda) lahust ning inkubeeriti toatemperatuuril loksutil 3 min. Lõpuks lisati reaktsiooni peatamiseks kaevudesse 15 µl 0,5 M H_2SO_4. Plaadi kaevudest mõõdeti kohe Multiskan FC Microplate spektrofotomeetriga (Thermo Fisher) optiline tihedus (OD) 450 nm juures.

2.2.9. AC-SINS

AC-SINS (*affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy*) on suure läbilaskevõimega analüüsimeetod, mis aitab ennustada antikehade kalduvust enesega interakteeruda ja agregeeruda (Joonis 7). Esmalt tuleb kulla nanoosakestele konjugeerida inimese IgG-vastane antikeha ning seejärel saab lisada uuritavad antikehad. Kuna konjugaadil on afiinsus inimese IgG vastu, siis tekib osakeste ümber kõrge uuritava antikeha kontsentratsioon. Kui uuritava antikeha molekulide vahel esineb interaktsioone, siis nihkub neeldumismaksimum pikemate lainepikkuste ehk punase spektri suunas (Liu *et al.*, 2014).

Uuritavad antikehad lahjendati 1x PBS pH 7,4 puhvris kontsentratsioonini 0,25 mg/ml. Kulla nanoosakestega konjugeeritud inimese IgG-Fc regiooni vastane kitse antikeha (AuNP-GAH Fc konjugaat) valmistati valgupuhastuse labori poolt vahetult enne analüüsi ning kontsentreeriti

10x. 96 sügava kaevuga plaadil pipeteeriti igasse kaevu 70 µl antikeha lahjendust ja 70 µl konjugaati. Seejärel inkubeeriti plaati 50 min toatemperatuuril. Pärast seda lisati kaevudesse 210 µl 1x PBS-i ja inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Järgmisena pipeteeriti igast kaevust 100 µl lahust kolmes korduses 384-kaevulise plaadi kaevudesse. Adsorptsiooni mõõdeti 1 nm sammuga lainepikkuste vahemikus 475 kuni 625 nm, kasutades mõõtmiseks CLARIOstar Plus (BMG Labtech) plaadilugejat.



Joonis 7. AC-SINS meetodi põhimõte. Kulla nanoosakesed konjugeeritakse inimese IgG vastase antikehaga. Seejärel konjugaadid kontsentreeritakse 10x ja segatakse kokku uuritavate inimese antikehadega. Enesega interakteeruvad antikehad moodustavad suuremaid agregaate ning mitteinterakteeruvad antikehad püsivad lahuses eraldatuna. Võrreldes referentsiga (must joon) toimub piigi maksimumi nihe siniste lainepikkuste poole, kui molekulid on enesega vähem interakteeruvad, ning punaste lainepikkuste poole, kui molekulid on enesega rohkem interakteeruvad (Zhou *et al.*, 2021).

2.2.10. NanoDSF ja DLS

NanoDSF (*nano differential scanning fluorimetry*) ja DLS (*differential light scattering*) mõõtmiseks kasutati Uncle (Unchained Labs) masinat. Masin kasutab nanoDSF-i puhul 266 nm lainepikkusega laserit, et tuvastada valgumolekulis olevate aromaatsete aminohapete fluorestsentsi abil selle sulamistemperatuur ja valguse hajumise järgi molekulide agregeerumine. Sulamistemperatuur ehk T_m tähistab temperatuuri, mille saavutamisel on denatureerunud 50% lahuses olevatest valgu molekulidest. Agregeerumistemperatuuri ehk T_{agg}-i määratakse valguse hajumise järgi 266 või 473 nm lainepikkusel, vastavalt madalal (tavaliselt alla 50 mg/ml) ja kõrgel (tavaliselt üle 50 mg/ml) antikehade kontsentratsioonil. Agregaatide teket saab tuvastada suurenenud valguse hajumise abil. Mida kõrgemad on sulamis- ja agregeerumistemperatuur, seda stabiilsemaks loetakse molekuli struktuuri. DLS abil saab hinnata proovi homogeensust ning selles olevate molekulide hüdrodünaamilist diameetrit (unchainedlabs.com).

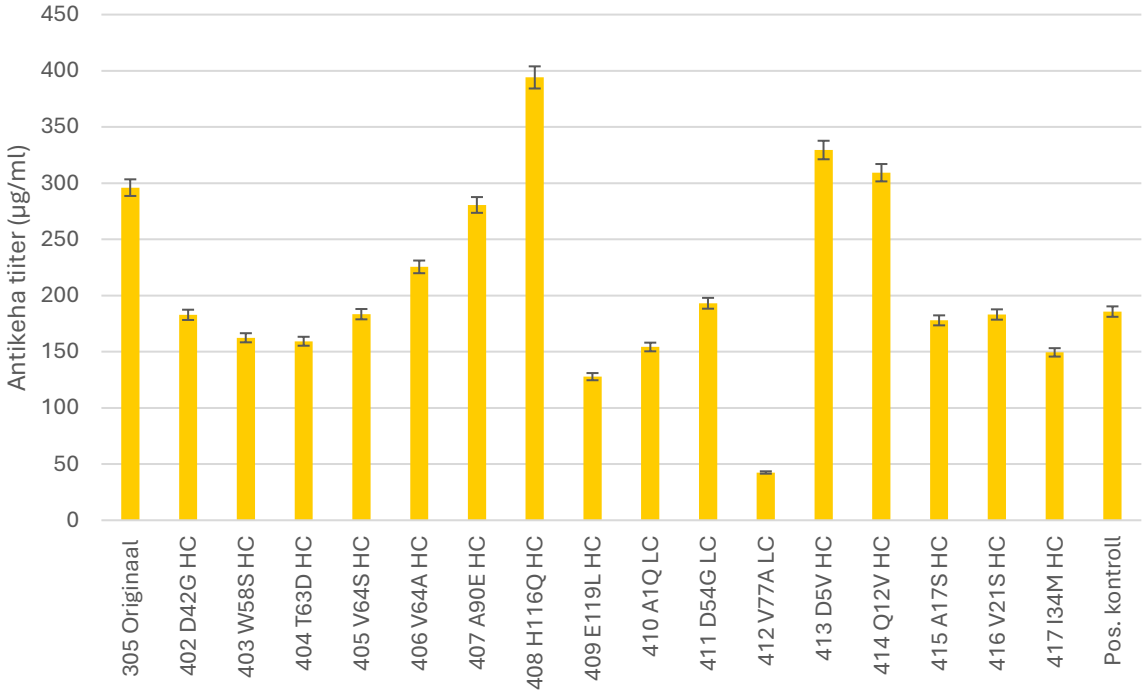
Proove tsentrifuugiti 18 000 *x*g juures 5 min ja igat proovi pipeteeriti küvettidesse 9 µl kolmes korduses. DLS mõõtmine teostati temperatuuril 15 °C. NanoDSF mõõdeti alates 15 °C-st kuni 95 °C-ni, temperatuuri tõus toimus ühtlaselt 0,3 °C/min. Masina UV ja Blue filter olid asendis 3. Tm-i määramine toimus Unchained Labs poolt välja töötatud barütsentrilise keskmise ehk BCM valemi järgi. BCM arvestab 300–430 nm lainepikkuste vahele jääva piigi pindala keskkoha nihkumist temperatuuri tõusmise mõjul. Tagg määrati temperatuuril, mille juures oli 266 nm lainepikkusel valguse hajumise intensiivsus tõusnud baasjoonest 10%.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Tootlikkuse määramine afiinsuskromatograafia abil

Rakukultuuri supernatantidest antikehade ekpressioonitaseme ja tootlikkuse mõõtmiseks kasutati *protein A* afiinsuskromatograafiat. Varasemalt on kindlaks tehtud, et meetodi variatsioonikoefitsent (proovide standardhälve jagatud nende keskmisega ja korrutatud 100%-ga) jääb alla 5%, mis tähendab, et kuigi proovid mõõdeti ühes korduses, on nende põhjal võimalik anda usaldusväärne hinnang tootlikkusele. Võrreldes originaalantikehaga oli kaheteistkümnel muteeritud antikehal madalam ning kolmel sarnane tootlikkus (Joonis 8). Raske ahela 116. positsioonis asuva histidiini muutmine glutamiiniks (408 H116Q HC) tõi võrreldes originaalantikehaga kaasa tootlikkuse suurenemise umbes 33% võrra. Seevastu kerge ahela 77. positsioonis asuva valiini muutmine alaniiniks (412 V77A LC) põhjustas umbes kuuekordse tiitri vähenemise (-86%). Tulemused korreleeruvad puhastusosakonnas afiinsuskromatograafia kolonniga eraldatud proovide kogustega, näidates mõlema kolonni sarnast sidumise võimekust kõikide antikehade puhul (Lisa 1).

Tootlikkuse suurenemise või vähenemise põhjuseks võib vastavalt olla antikeha lahustuvuse parenemine või halvenemine. Enne sekreteerimist tekib rakus immunoglobuliinide kõrge lokaalne kontsentratsioon, mistõttu on madala lahustuvuse puhul nende tootmine takistatud (Wu ja Yu, 2021). Tootlikkust võib vähendada ka antikehade vale kokkupakkimine, tekitades rakkudes stressivastuse, mis vähendab nende sekreteerimist (Gregersen ja Bross, 2010).



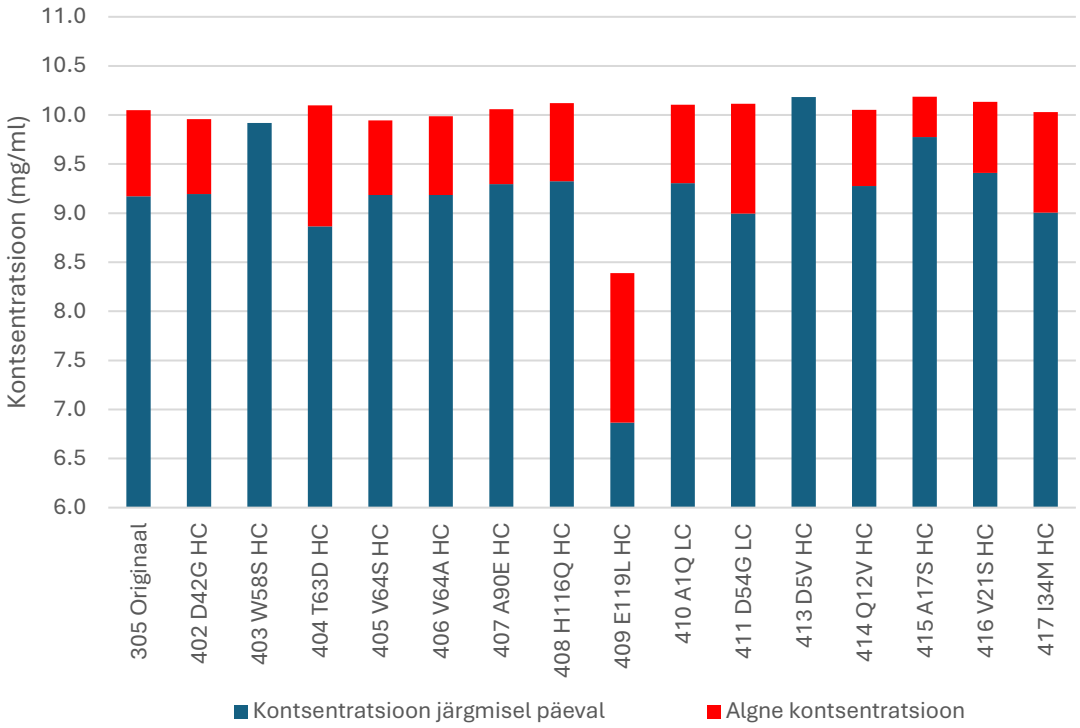
Joonis 8. Afiinsuskromatograafia abil rakukultuuri supernatandist mõõdetud antikehade tiitrid. Tulpadel on näidatud standardhälve, mis on arvutatud meetodi varasemalt kindlaks tehtud maksimaalse variatsioonikoefitsendi (5%) põhjal, kuna mõõtmine toimus ühes korduses. Positiivse kontrollina kasutati Trastusumaabemtansiini.

2.3.2. Puhastatud antikehade kontsentreerimine

Valgupuhastuse osakonna töötajad puhastasid antikehad afiinsuskromatograafia abil. Peaaegu kõik puhastatud antikehad kontsentreeriti või lahjendati nii, et nende kontsentratsioonid olid kas 1 mg/ml või vahemikus 6–10 mg/ml. Kontsentratsioonil 1 mg/ml ei toimunud märgatavat antikehade välja sadenemist. Kontsentratsioonid mõõdeti kohe pärast lahjendamist ning järgneval päeval. Antikehade resuspendeerimiseks kontsentratsioonil 10 mg/ml soojendati need toatemperatuurile, suspendeeriti vorteks segajal ning tsentrifuugiti 18 000 *x*g juures. Peale tsentrifuugimist mõõdeti kontsentratsioonid, mille järgi arvestati antikehade koguseid analüüside teostamisel. Antikeha 412 V77A LC tootlikkus jäi väga madalaks, mistõttu sai seda kontsentreerida vaid 1 mg/ml-ni, aga materjali ei olnud piisavalt 10 mg/ml-ni kontsentreerimiseks. Teine antikeha (409 E119L HC) ei kontsentreerunud üle 6 mg/ml, sest hakkas lahusest välja sadenema.

Neljateistkümnes 10 mg/ml-ni kontsentreeritud proovis olid üleöö 4 °C juures seismisega immunoglobuliinid osaliselt lahusest välja sadenenud, kaks proovi (403 W58S HC ja 413 D5V HC) säilitasid oma kontsentratsiooni (Joonis 9). 403 W58S HC puhul võib molekuli

stabiliseerida molekuli pinnal asuva hüdrofoobse aminohappe muutmine hüdrofiilseks, võimaldades puhvri molekulide poolset stabiliseerimist. 413 D5V HC molekulis on toimunud tõenäoliselt lokaalne konformatsiooni muutus, mille põhjustas negatiivselt laetud aminohappe (aspartaat) asendamine hüdrofoobsega (valiin), ehk ruumiliselt lähedal asuvate aminohapete asetus võis muutuda ning tekitada molekuli stabiliseeriva piirkonna. Molekuli 409 E119L HC kergemale agregeerumisele ja sadenemisele viitab ka hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia tulemus, kus antikeha moodustab teistest molekulidest suurema agregaatide piigi (peatükk 2.3.3.2).



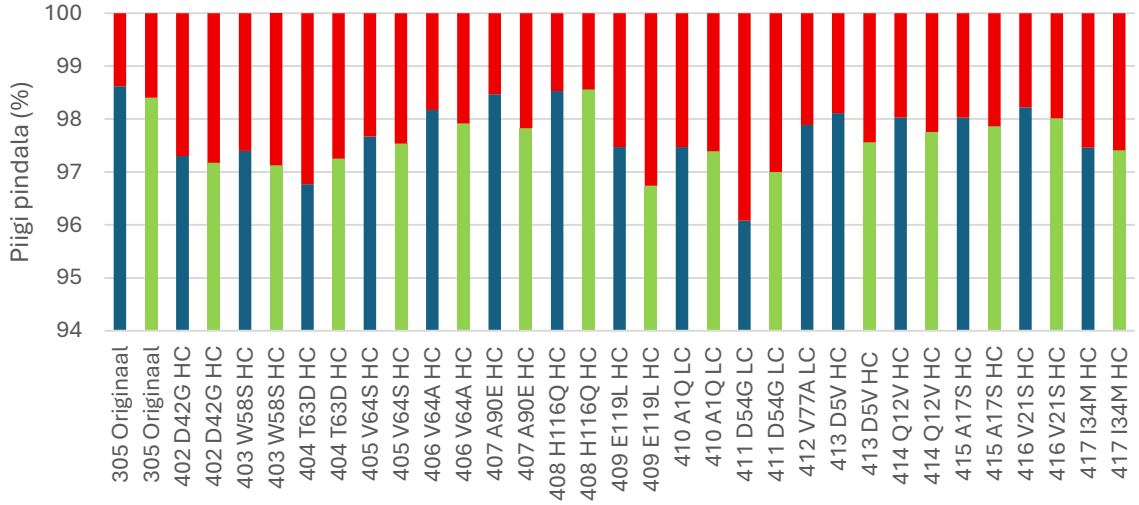
Joonis 9. Antikehade kontsentratsioon lahuses enne ja pärast üleöö inkubeerimist 4 °C juures. Punase ja sinise tulba liitmisel saab antikehade kontsentratsiooni peale kontsentreerimist. Sinised tulbad näitavad antikehade kontsentratsioone pärast üleöö seismist. Graafikul on kajastatud triplikaatide keskmised väärtused. Mõõtmiste standardhälve oli niivõrd madal (max 0,05), et see ei kajastu joonisel. NB! Molekuli 412 V77A LC tootlikkus oli niivõrd madal, et materjali ei olnud piisavalt katse teostamiseks.

2.3.3. Homogeensuse ja puhtuse määramine

Eraldatud immunoglobuliinide puhtuse ja homogeensuse hindamiseks kasutati järgmiseid meetodeid: analüütiline suuruseralduskromatograafia, ioonvahetuskromatograafia ja hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia, kapillaarelektroforees ning DLS (*differential light scattering*).

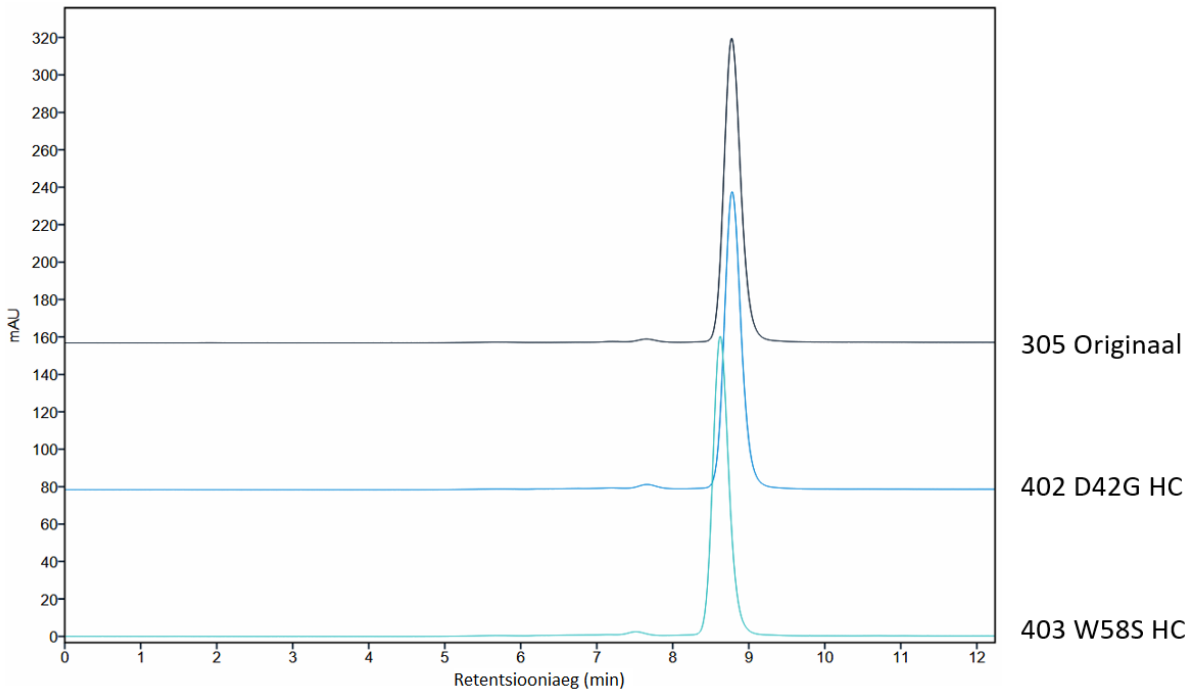
2.3.3.1. Suuruseralduskromatograafia

Antikehade puhul kasutatakse puhtuse määramiseks monomeeride protsentuaalset sisaldust proovis, afiinsuskromatograafia järel on väga hea, kui puhtusaste ületab 95%. Suuruseralduskromatograafia näitas suurepärast puhtusastet nii madalal kontsentratsioonil (1 mg/ml) kui ka kõrgemal kontsentratsioonil (6–10 mg/ml), monomeeri sisaldus oli üle 96,5% kõikide uuritavate antikehade puhul (Joonis 10). See tähendab, et sõltumata mutatsioonist oli afiinsuskromatograafia abil puhastatud molekulidel sarnane monomeersete vormide sisaldus ning antikehade kontsentratsiooni tõstmine ei viinud lahustuvate agregaatide moodustumiseni.



Joonis 10. Suuruseralduskromatograafia käigus eraldunud piikide protsentuaalne jaotus proovide kontsentratsioonidel 1 ja 6–10 mg/ml. Sinised tulbad näitavad antikeha monomeeri protsentuaalset sisaldust proovide kontsentratsioonil 1 mg/ml, rohelised kontsentratsioonil 6-10 mg/ml. Punased tulbad tähistavad kõrgema molekulmassiga molekulide sisaldust. Protsendid on arvutatud 220 nm juures detekteeritud piikide pindalade järgi. Graafikul on kajastatud triplikaatide keskmised väärtused. Mõõtmiste standardhälve oli niivõrd madal (max 0,16), et see ei kajastu joonisel. NB! Molekuli 412 V77A LC tootlikkus oli niivõrd madal, et materjali piisas ainult 1 mg/ml-ni kontsentreerimiseks.

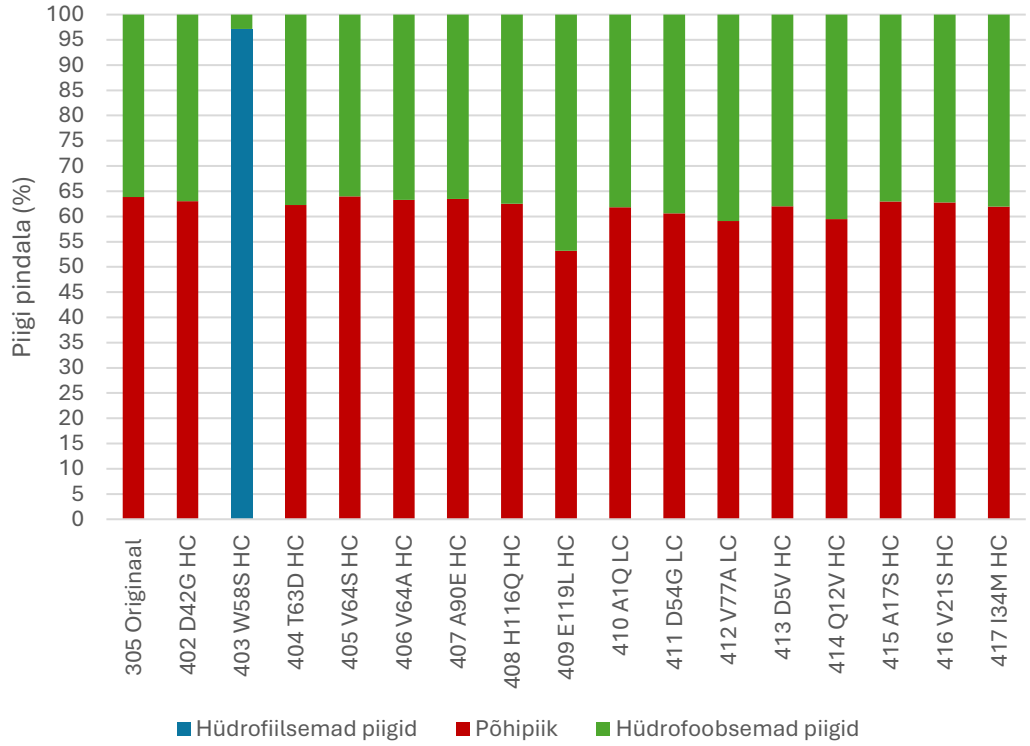
Kromatogrammidelt analüüsiti ka piikide kuju ning retentsiooniaega. Kontsentratsioonidel 1 mg/ml ning 6-10 mg/ml olid kõikide antikehade piikide kujud sarnased nii kõrguselt kui ka laiuselt, kromatogrammid on toodud lisas 2. Erandiks oli molekul 403 W58S HC, mille puhul raske ahela 58. positsioonis asuva trüptofaani muutmine seriiniks põhjustas selle varasema elueerumise võrreldes teiste uuritud antikehadega kontsentratsioonidel nii 1 mg/ml kui ka 10 mg/ml (Joonis 11). Retentsiooniaja vähenemine annab märku molekuli hüdrodünaamilise raadiuse suurenemisest. Antud juhul võis retentsiooniaja muutus olla tingitud hüdrofoobse aminohappe asendamisest polaarsega, mis võis muuta molekuli konformatsiooni.



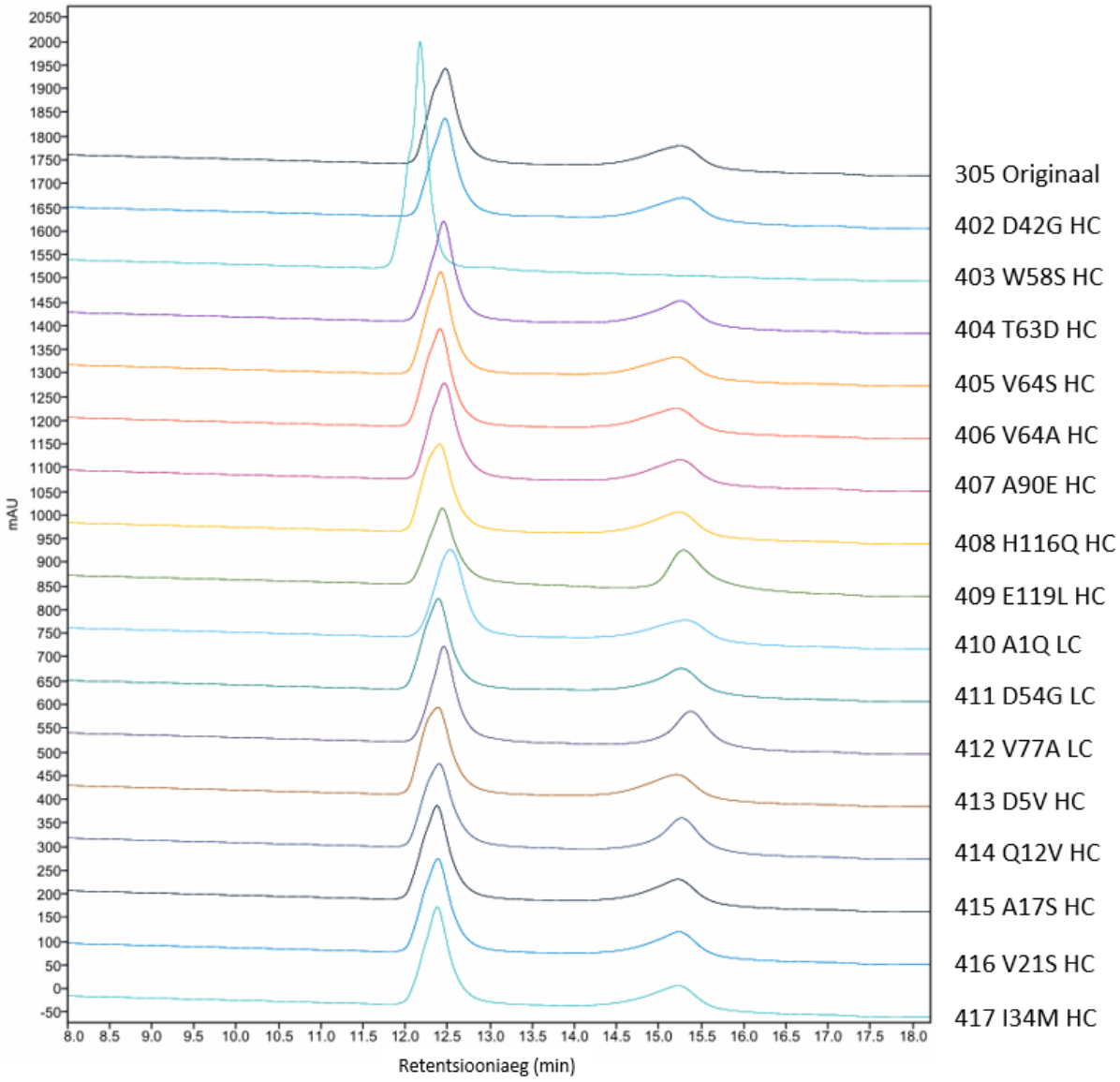
Joonis 11. Suuruseralduskromatograafia abil saadud kromatogrammid kolmele molekulile kontsentratsioonil 1 mg/ml. Piikide retentsiooniajad on antud minutites ning kõrgused neelduvusühikutes (mAU). Kromatogrammid on detekteeritud 220 nm lainepikkuse juures. Triplikaatidest on välja valitud iga molekuli puhul üks esinduslik korduskatse tulemus.

2.3.3.2. Hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia

Originaalantikeha kromatogrammil on näha kahte piiki, esimene elueerub soolakontsentratsiooni languse ajal ning teine alles siis, kui ammooniumsulfaadi kontsentratsioon on 0. Kromatogrammi põhipiigiks määrati kõige suurema pindalaga piik, moodustades elueerunud materjalist 64%. Muteeritud antikehadele võeti võrdluseks originaalantikeha kromatogrammi piikide retentsiooniajad, kujud ja protsentuaalsed osakaalud (Joonis 12). Muteeritud antikehade piikide retentsiooniajad loeti põhipiigiga samaväärseks, kui nende erinevus oli maksimaalselt 0,03 minutit. Aeg sai valitud analüüsitud molekulide triplikaatide maksimaalse kõikumise järgi. Kolme molekuli (402 D42G HC, 404 T63D HC ning 407 A90E HC) retentsiooniajad kattusid originaalmolekuliga, üks oli hüdrofoobsem (410 A1Q LC) ning kaksteist hüdrofiilsemad (Joonis 13). Kõik peale ühe molekuli elueerusid kahe piigina. Kuna analüüsimeetodis kasutati väga kõrget ammooniumsulfaadi kontsentratsiooni (1,5 M), võisid uuritavad antikehad selle mõjul moodustada agregaate, mis elueerusid teise piigina alles soola puudumisel. Enamusel molekulidest ei erinenud kahe piigi osakaalud märkimisväärselt (põhipiik 60–64%), kuid ühe molekuli (409 E119L HC) põhipiik jäi 53% juurde, vihjates suuremal määral agregeerumisele kõrge soolaga tingimustes. Varasemalt selgus kontsentreerimise ajal, et 409 E119L HC agregeerus ja sadenes madalamatel kontsentratsioonidel võrreldes teiste molekulidega. Molekul 403 W58S HC oli ainsana originaalmolekulist tunduvalt hüdrofiilsem ning elueerus ühe piigina 0,3 min varem. Selle põhjustas hüdrofoobse trüptofaani asendamine polaarse seriiniga, mis võis põhjustada lahusega interakteeruva piirkonna hüdrofiilsuse suurenemise.



Joonis 12. Hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia tulemused, kõik proovid olid kontsentratsioonidel 1 mg/ml. Algse antikeha kõige suurema pindalaga piik on määratud põhipiigiks, mis on tähistatud punasega. Põhipiigi järgi on määratud muudetud antikehade piigid – kui nende retentsiooniajad kattuvad (+/- 0,03 minutit), siis loetakse need võrdseteks põhipiigiga. Põhipiigist hüdrofiilsemate piikide protsentuaalne osakaal lahuses on tähistatud sinisega ning hüdrofoobsemate osakaal rohelisega. Kromatogrammid detekteeriti 220 nm lainepikkuse juures. Graafikul on kajastatud triplikaatide keskmised väärtused. Mõõtmiste standardhälve oli niivõrd madal (max 0,57), et see ei kajastu joonisel.



Joonis 13. Hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia abil saadud kromatogrammid, proovide kontsentratsioonil 1 mg/ml. Piikide retentsiooniajad on antud minutites ning kõrgused neelduvusühikutes (mAU). Kromatogrammid on detekteeritud 220 nm lainepikkuse juures. Triplikaatidest on välja valitud iga molekuli puhul üks esinduslik korduskatse tulemus.

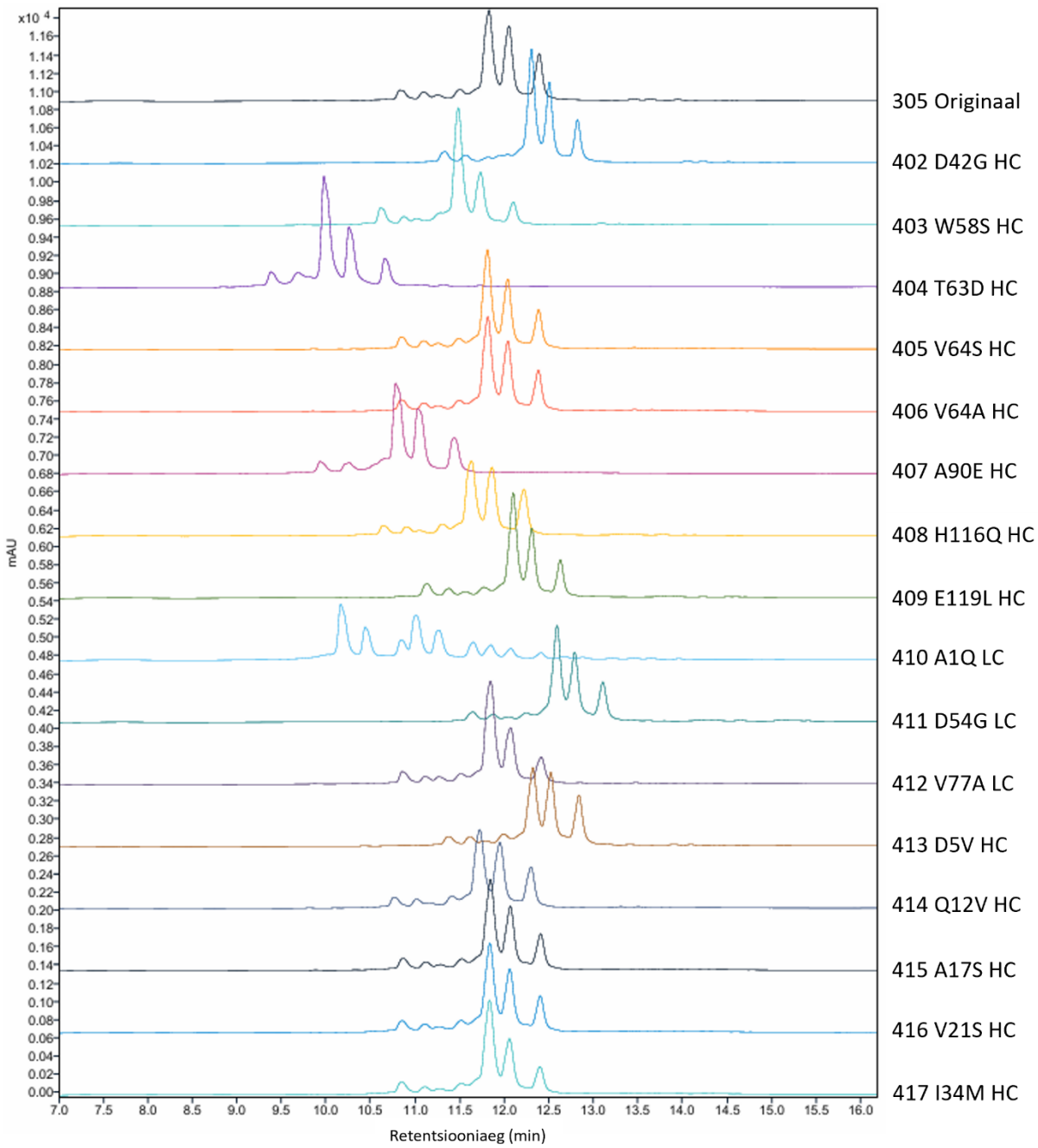
2.3.3.3. Ioonvahetuskromatograafia

Originaalantikeha kromatogrammil on näha kolme suuremat piiki ja nendest varem elueeruvaid negatiivsema laenguga osakesi (Joonis 14). Kolm suuremat piiki on põhjustatud raske ahela posttranslatsioonilisest C-terminaalsete lüsiinide eemaldamisest (Beck *et al.*, 2005). Lüsiini kõrvalahel muudab molekuli pinnalaengu positiivsemaks ehk antikeha lüsiinideta vorm on nähtav kõige kõrgema piigina, millele järgnevad eraldi piikidena antikeha vormid, mille ühe või mõlema raske ahela küljes on lüsiin. Kolmele suuremale piigile võivad eelneda molekuli ühe aminohappe erinevad laenguvormid, mida näitab suuremate piikidega sarnane osakeste jaotus.

Originaalmolekuli kromatogrammi retentsiooniaja ja profiili alusel määrati muteeritud antikehade kromatogrammides põhipiikide asukohad. Enamik antikehadest elueerusid originaalmolekuliga sarnase lüsiinimustriga. Erandiks on molekul 410 A1Q LC, millel on võrreldes originaal- ja teiste antikehadega erinev piikide jaotus. Esimesena on 410 A1Q LC puhul elueerunud pindalalt kõige suurem piik, järgnevad piigid näitavad sama mustri kordumist põhjustatuna ühe aminohappe laenguvormi muutumisest. Profiili muutumist võib põhjustada hüdrofoobset aminohapet (alaniin) sisaldava piirkonna pöördumine molekuli hüdrofoobsest sisemusest immunoglobuliini pinnale, kui see asendada polaarse aminohappega (glutamiin). Teistsuguse profiili võivad põhjustada ka osaliselt *O*-glükosüleeritud kerged ahelad (tavaliselt need ei ole glükosüleeritud) ja signaalpeptiidi ebanormaalne lõikus. Kergel ahelal ei saa olla *N*-glükosüleerimine, sest puudub selleks vajalik järjestus.

Suuremad muutused toimusid piikide retentsiooniaegades. 7 molekuli (405 V64S HC, 406 V64A HC, 412 V77A LC, 414 Q12V HC, 415 A17S HC, 416 V21S HC, 417 I34M HC) profiilid on väga sarnaste retsentsiooniaegadega (+/- 0,1 min) võrreldes originaalantikehaga. 4 mutatsiooni (402 D42G HC, 409 E119L HC, 411 D54G LC, 413 D5V HC) puhul omandasid kõik laenguvariandid positiivsema ehk elueerusid hiljem ning 5 mutatsiooni (403 W58S HC, 404 T63D HC, 407 A90E HC, 408 H116Q HC, 410 A1Q LC) puhul omandasid kõik laenguvariandid negatiivsema pinnalaengu ehk elueerusid varem. Mutatsioonide tagajärjel tekkinud pinnalaengu muutused võisid põhjustada asendatud aminohapped ise või nende poolt indutseeritud molekulide ümberkorraldused. Näiteks on molekulidel 402 D42G HC ja 411 D54G LC tehtud sama asendus, aspartaat (negatiivse laenguga) on muudetud glütsiiniks (laenguta). Kuigi mõlema molekuli pinnalaengud muutuvad positiivsemaks, võrreldes

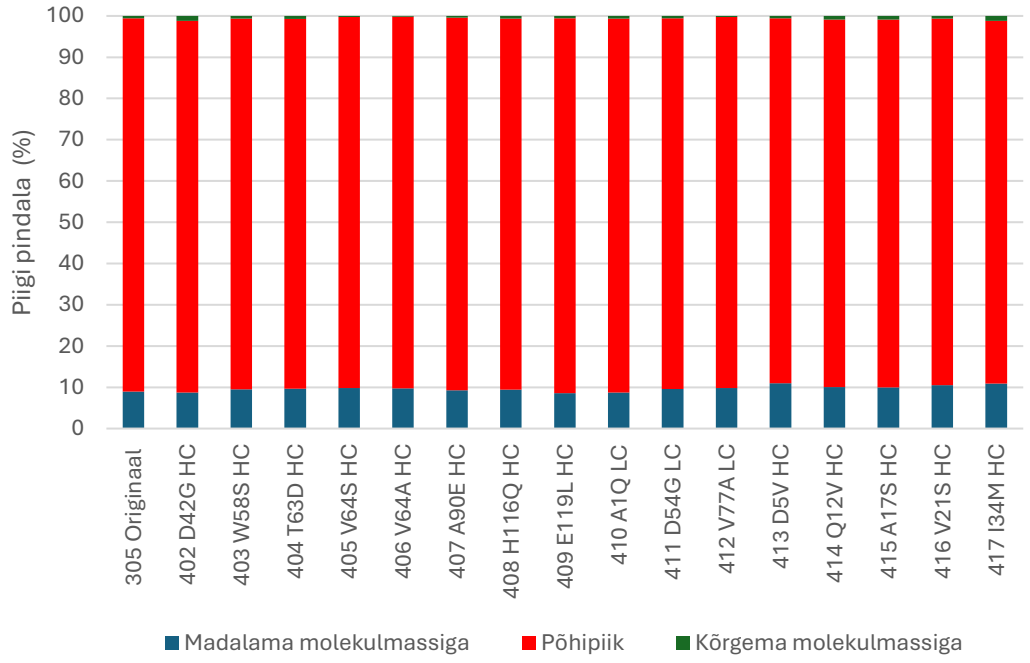
originaalantikehaga, siis 411 D54G LC omandab suurema positiivsema laengu, näidates laialdasemat laengute muutust molekuli pinnal. Laengu muutus võib avaldada mõju antikehade lahustuvusele (Yang *et al.*, 2019).



Joonis 14. Ioonvahetuskromatograafia abil saadud kromatogrammid kõikidele uuritud molekulidele kontsentratsioonil 1 mg/ml. Piikide retentsiooniajad on antud minutites ning kõrgused neelduvusühikutes (mAU). Kromatogrammid on detekteeritud 220 nm lainepikkuse juures. Triplikaatidest on välja valitud iga molekuli puhul üks esinduslik korduskatse tulemus.

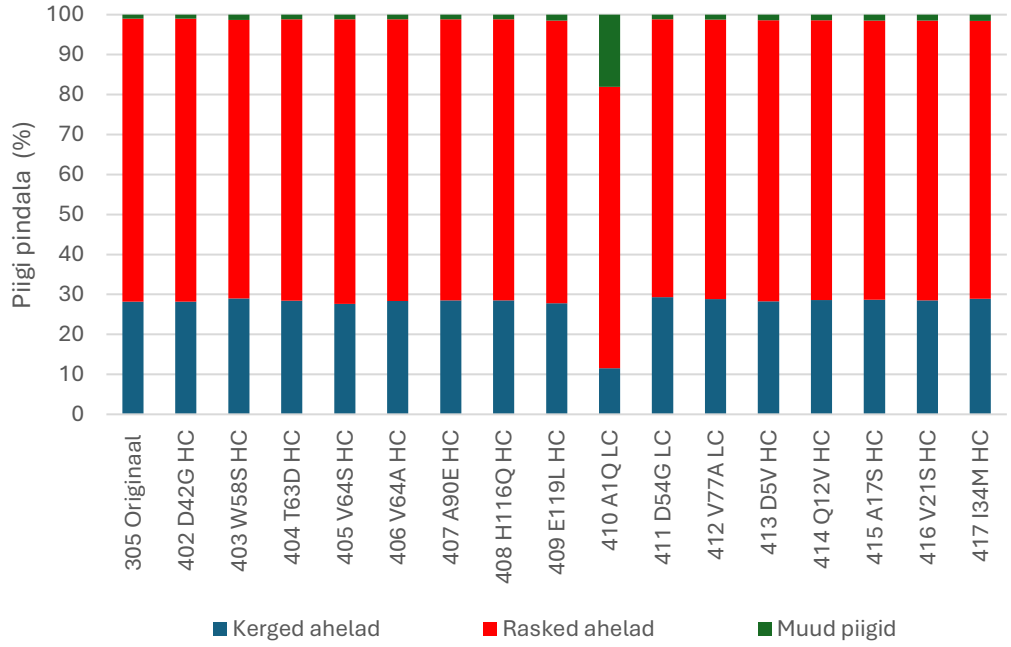
2.3.3.4. Kapillaarelektroforees

Kapillaarelektroforees-SDS teostati denatureeritud antikehadele nii mitteredutseeritud kui ka redutseeritud tingimustes. Mitteredutseeritud tingimustes saab hinnata denatureeritud molekulide molekulmassi ning homogeensust (Joonis 15). Nii originaalmolekuli kui ka muteeritud antikehade proovides oli protsentuaalselt umbes samal määral intaktset antikeha (90%), sellest madalama molekulmassiga 10% ning kõrgemaga alla 1% molekulidest. Molekulmassid olid intaktsete molekulide puhul umbes 177 kDa, mis on arvutuslikust molekulmassist umbes 25 võrra suurem. Meetodi eripärast tulenevalt on näiline molekulmassi suurenemine normaalne.



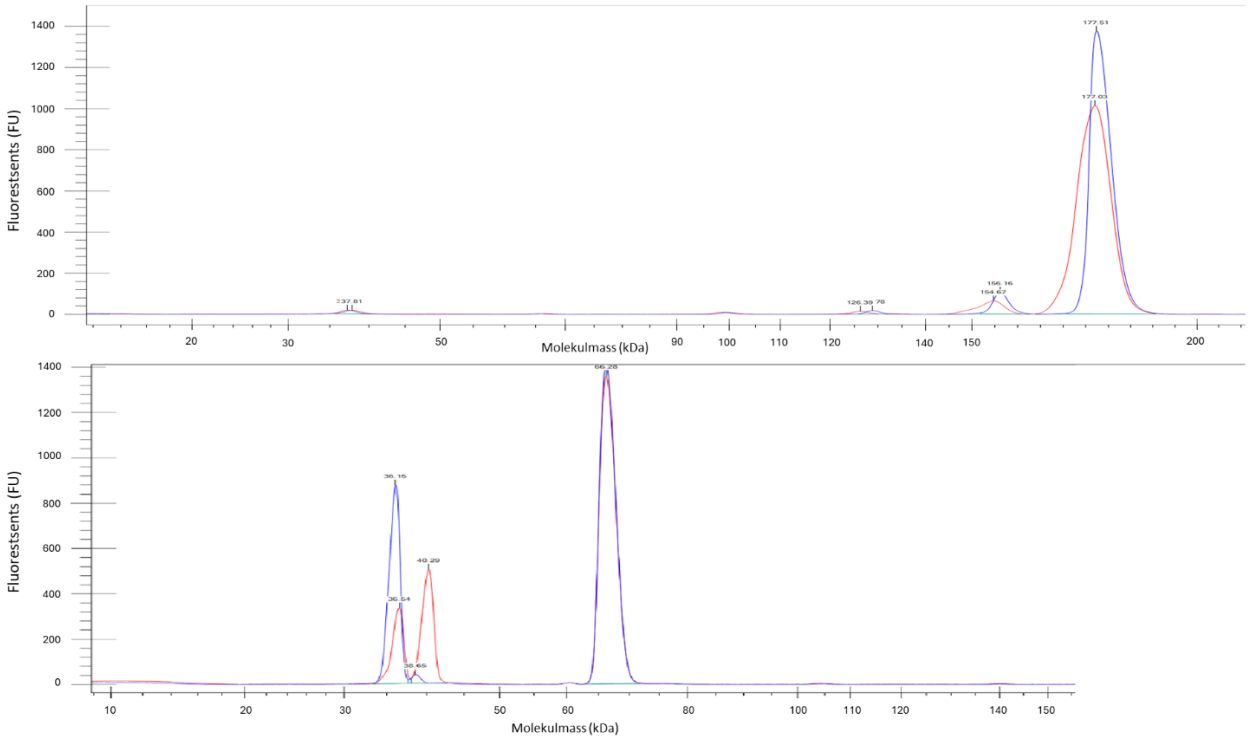
Joonis 15. Mitteredutseerivates tingimustes teostatud kapillaarelektroforeesi tulemused. Punasega on näidatud ferogrammi põhipiigi ehk kõige kõrgema signaaliga piigi protsentuaalne osakaal lahuses. Sinisega on näidatud põhipiigist madalamate molekulmassidega ning rohelisega põhipiigist kõrgemate molekulmassidega piikide osakaalud lahuses. Graafikul on kajastatud triplikaatide keskmised väärtused. Mõõtmiste standardhälve oli niivõrd madal (max 0,38), et see ei kajastu joonisel.

Redutseerivatel tingimustel taandati antikehas olevad disulfiidsillad, mille tulemusena eraldusid kerged ja rasked ahelad teineteisest, võimaldades neid kapillaarelektroforeesis eraldi visualiseerida (Joonis 16). Nii originaalmolekuli kui ka muteeritud antikehade puhul moodustasid kerged ahelad 28–30%, rasked ahelad 69–71% ning muud piigid 1–2% proovi koostisest, ühe erandiga (Joonis 17). Molekulmassid jäid kergetel ahelatel umbes 36 kDa ja rasketel ahelatel umbes 66 kDa juurde.



Joonis 16. Redutseerivates tingimustes teostatud kapillaarelektroforeesi tulemused. Sinisega on näidatud kergete ahelate, punasega raskete ahelate ja rohelisega muude piikide protsentuaalne osakaal lahuses. Graafikul on kajastatud triplikaatide keskmised väärtused. Mõõtmiste standardhälve oli niivõrd madal (max 0,17), et see ei kajastu joonisel.

Molekuli 410 A1Q LC ferogrammilt on mitteredutseerivates tingimustes näha 177 kDa juures teistest proovidest olulisemalt laiemat piiki. Sama antikeha redutseeritud proovi ferogrammil täheldati kerge ahela kahte erinevat vormi (Joonis 17). Muutused võivad olla põhjustatud osade kergete ahelate *O*-glükosüleerimisest (tavaliselt need ei ole glükosüleeritud), mis annab molekulile negatiivsema laengu ja põhjustab elektroforeesil teistest molekulidest erinevat mobiilsust. Kõikide proovide elektroferogrammid on toodud lisades 3 ja 4.

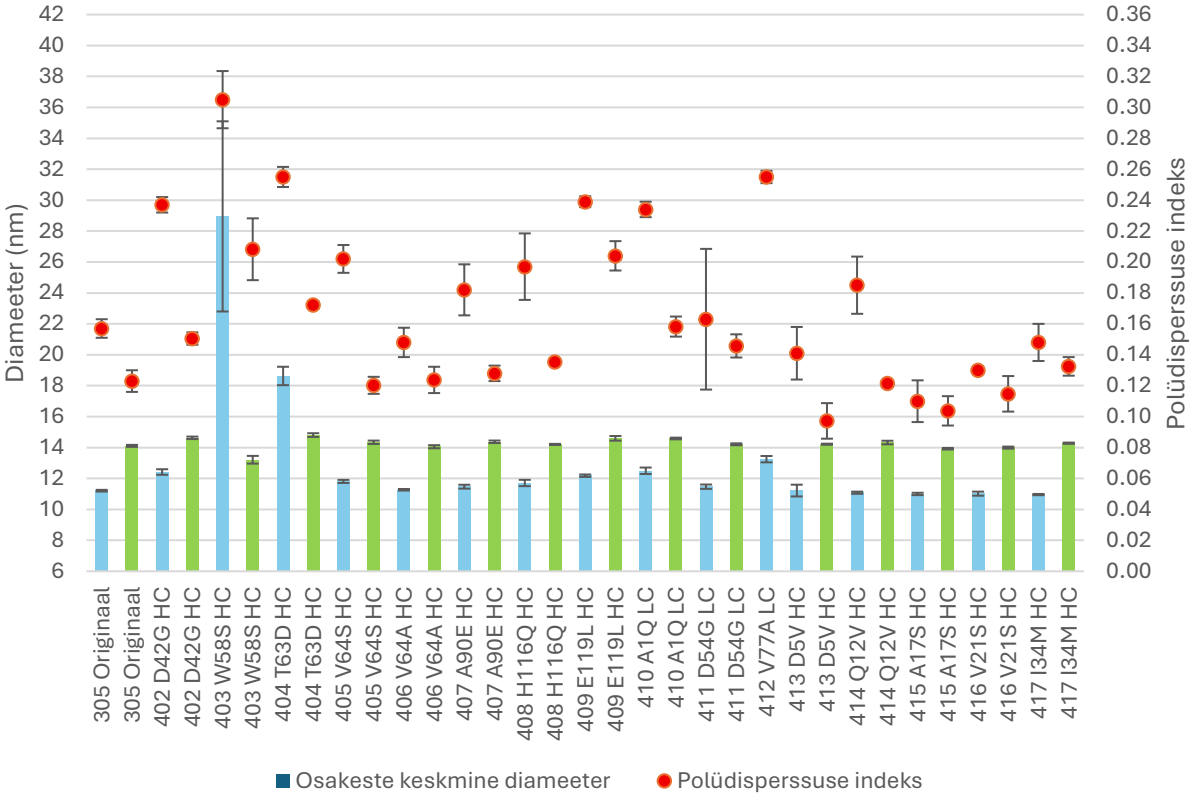


Joonis 17. Kapillaarelektroforeesi meetodiga saadud elektroferogrammid kahest molekulist – 305 Originaal (sinisega) ning 410 A1Q LC (punasega). Molekulide molekulmassid (kDa) on arvutatud suurusstandardi retsentsiooniaegade põhjal. Piikide kõrgused on fluorestsentsiühikutes. Mõlemal graafikul on kahe molekuli tulemustest tehtud ülekate, ülemisel on mitteredutseeritud ning alumisel redutseeritud proovid. Triplikaatidest on välja valitud mõlema molekuli puhul üks esinduslik katsekordus.

2.3.3.5. DLS

DLS (*differential light scattering*) abil saab mõõta lahuses olevate molekulide keskmist diameetrit ning polüdisperssust ehk heterogeensust. Varasemalt sama masinaga mõõdetud antikehade diameetrid on jäänud vahemikku 10–15 nm. Kontsentratsioonil 1 mg/ml jäid peaaegu kõikides uuritud proovidest mõõdetud osakeste keskmised diameetrid vahemikku 11–13 nm (Joonis 18). Kahes proovis, 403 W58S HC ja 404 T63D HC, leiduvate molekulide diameetrid olid vastavalt 29 ja 18,5 nm, mis on oluliselt kõrgemad antikehade tavalistest väärtustest. Molekuli 403 W58S HC suurenenud hüdrodünaamiline raadius oli nähtav ka suuruseralduskromatograafia abil. Mõlema proovi puhul võib näiline diameetri suurenemine olla põhjustatud kas lahuse viskoossuse tõusust, proovi halvast kvaliteedist või pipeteerimise veast. Viimase kahe põhjuse tõenäosus on kõrgem, sest kontsentratsioonil 6–10 mg/ml jäid kõikide antikehade diameetrid normaalsesse vahemikku ehk 13–15 nm. Kui kaks eelnevalt välja toodud molekuli välja arvata, siis kõikidel ülejäänud antikehadel tõusis 6–10 mg/ml kontsentratsioonil mõõdetud diameeter 2–3 nm võrreldes prooviga, mille kontsentratsioon oli 1 mg/ml . Näiline diameetri suurenemine on ootuspärane, kuna analüüsimeetod arvestab diameetri arvutustes osakeste liikumise kiirust, mis sõltub proovi viskoossusest. Antikehade kontsentratsiooni suurenemisel muutub proov viskoossemaks, aeglustub molekulide liikumine ning molekulid tunduvad seeläbi suuremad.

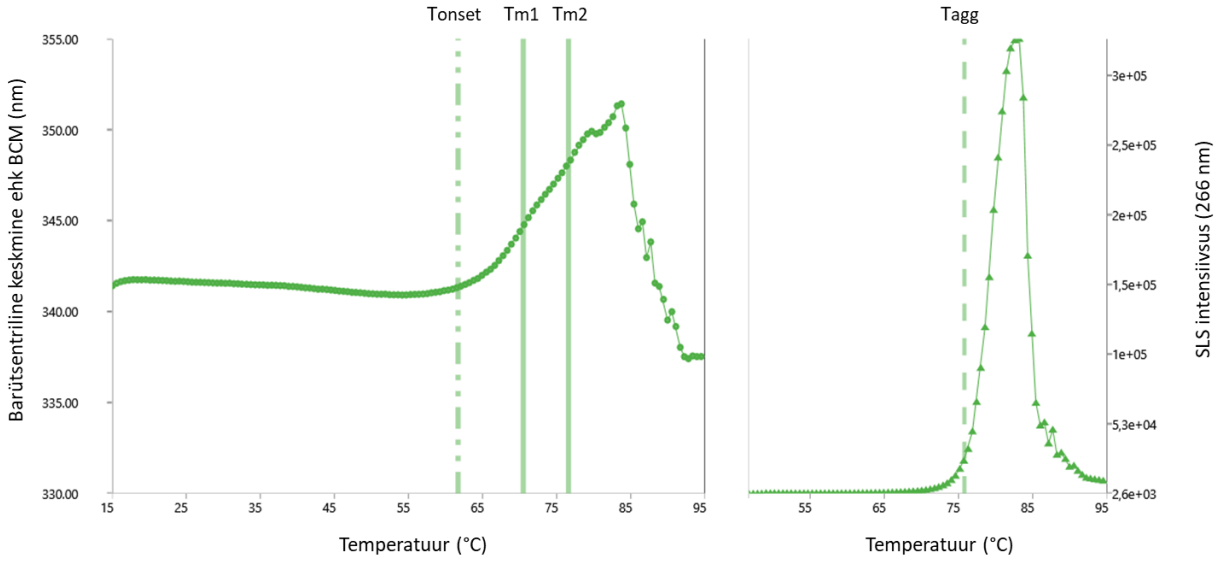
Polüdisperssus liigitatakse madalaks, kui polüdisperssuse indeks jääb alla 0,1, keskmiseks, kui indeks jääb vahemikku 0,1–0,3 ning kõrgeks, kui indeks ületab väärtuse 0,3. Uuritud proovide polüdisperssuse indeksid jäid vahemikku 0,1 kuni 0,3, mis tähendab, et kõikide lahuste koostised olid keskmiselt polüdisperssed (Joonis 18). Tulemused kattuvad suuruseralduskromatograafia tulemustega, millelt oli näha proovide üle 96,5–98,5%-st puhtusastet. Eelneva meetodiarenduse käigus on välja selgitatud, et indeksi väärtus alla 0,1 korreleerub 99–100% monomeeri sisaldusega.



Joonis 18. DLS (*differential light scattering*) abil mõõdetud osakeste keskmine diameeter ja polüdisperssuse indeks. Sinised tulbad näitavad proovis esinevate osakeste keskmist diameetrit proovide kontsentratsioonil 1 mg/ml, rohelised kontsentratsioonil 6-10 mg/ml. Punased täpid näitavad proovide polüdisperssuse indeksit. Polüdisperssus liigitatakse madalaks, kui polüdisperssuse indeks jääb alla 0,1, keskmiseks, kui indeks jääb vahemikku 0,1–0,3 ning kõrgeks, kui see ületab väärtuse 0,3. Graafikul on kajastatud nelja mõõtmise keskmised väärtused ning nende standardhälve. NB! Molekuli 412 V77A LC tootlikkus oli niivõrd madal, et materjali piisas ainult 1 mg/ml-ni kontsentreerimiseks.

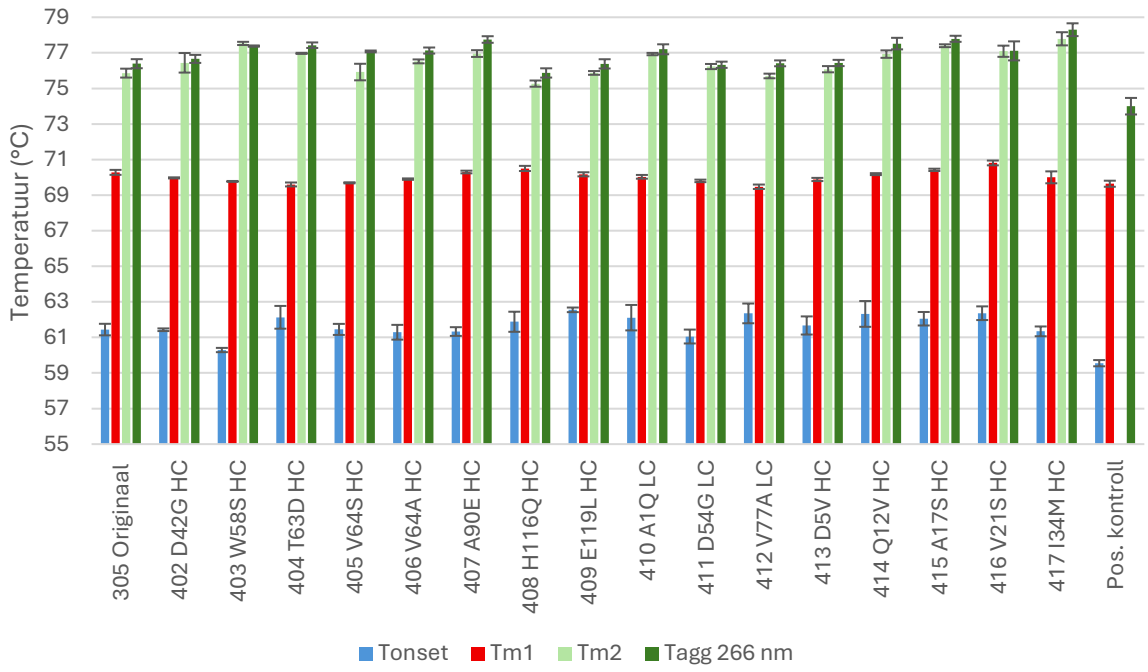
2.3.4. Stabiilsuse hindamine

Termostabiilsuse mõõtmiseks kasutati nanoDSF (*nano differential scanning fluorimetry*) meetodit. Analüüsimeetodi abil määratud lahtipakkumise algustemperatuur (T_{onset}), esimene sulamistemperatuur (T_{m1}), teine sulamistemperatuur (T_{m2}) ja agregeerumistemperatuur (T_{agg}) on originaalmolekuli näitel esitatud joonisel 19. Kõikide molekulide individuaalsed graafikud on toodud lisades 6 ja 7. T_{m1} ja T_{m2} tähistavad antikeha erinevate piirkondade lahtipakkumise sündmusi, regioonidest esimesena denatureerub tavaliselt CH2, millele järgnevad Fab ja CH3. Meetod ei võimalda täpset lahti pakkunud regiooni määramist, sest kaks sündmust võivad toimuda samaaegselt.



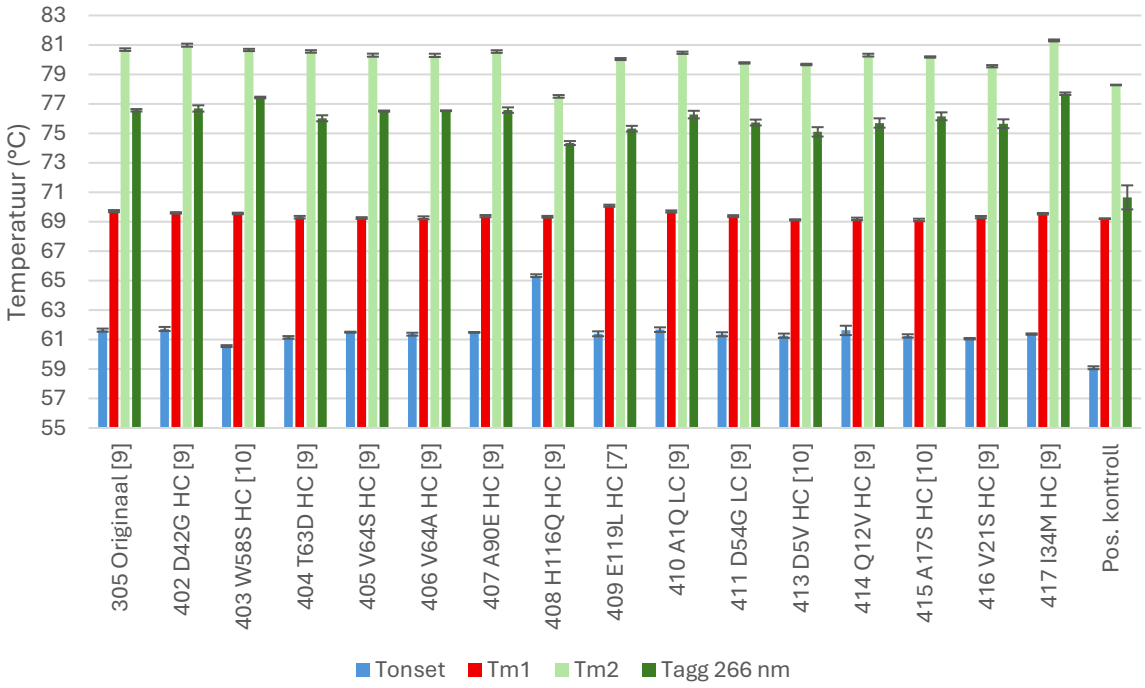
Joonis 19. Originaalmolekuli näitel NanoDSF tulemused kontsentratsioonil 1 mg/ml temperatuurigradiendiga 15–95 °C. Vasakul graafikul on antikeha fluorestsentsispektri põhjal arvutatud BCM graafik, mille abil saab määrata molekuli lahtipakkumise algustemperatuuri (T_{onset}), esimese sulamistemperatuuri (T_{m1}) ning teise sulamistemperatuuri (T_{m2}). Paremal graafikul on proovi valguse hajumise intensiivsus 266 nm lainepikkusel, millega määratakse molekuli agregeerumistemperatuur (T_{agg}).

Väärtused loetletud parameetritele (T_{onset}, T_{m1}, T_{m2} ja T_{agg}) antikehade kontsentratsioonil 1 mg/ml on toodud joonisel 20. Uuritud molekulide vahel puuduvad märkimisväärsed erinevused (rohkem kui 2 °C) termostabiilsuse puhul ning selle omaduse põhjal pole võimalik ühtegi nendest nimetada teistest paremaks või halvemaks ravimikandidaadiks. Kõik molekulid on piisavalt kõrge esimese sulamistemperatuuri ja agregeerumistemperatuuriga (mõlemad üle 55 °C), et kvalifitseeruda hea termostabiilsusega molekulideks. Uuritud molekulide T_{m1}-d olid sarnasel tasemel turul oleva terapeutilise antikehaga (Trastusumaabemtansiin) ning ületasid seda T_{onset} ja T_{agg} temperatuuride poolest.



Joonis 20. NanoDSF abil saadud termostabiilsuse näitajad kontsentratsioonil 1 mg/ml. Sinine näitab molekulide lahtipakkumise alguse temperatuuri, punane esimest sulamistemperatuuri, heleroheline teist sulamistemperatuuri ning tumeroheline agregeerumise temperatuuri (mõõdetud 266 nm lainepikkusel). Graafikul on kajastatud triplikaatide keskmised väärtused ning nende standardhälbed. NB! Positiivse kontrollina kasutati Trastusumaabemtansiini, millel puudus eristatav T_{m2}.

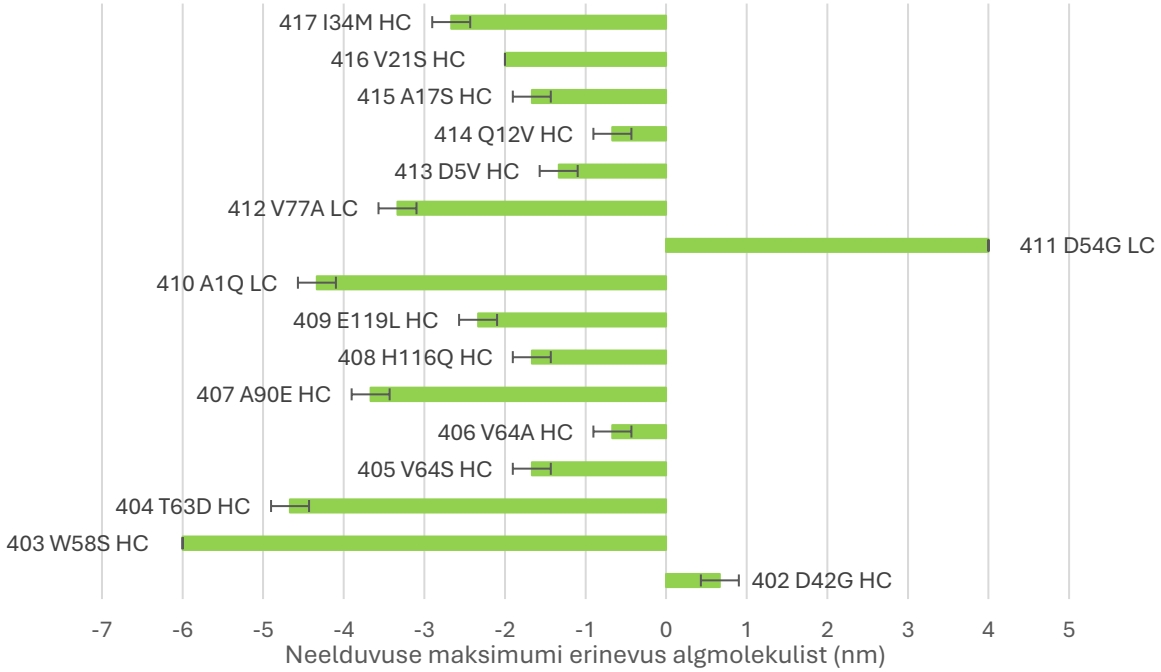
Väärtused loetletud parameetritele (T_{onset}, T_{m1}, T_{m2} ja T_{agg}) antikehade kontsentratsioonil 6–10 mg/ml on toodud joonisel 21. Termostabiilsus on jäänud võrreldavaks madalamal kontsentratsioonil tehtud analüüsiga, ainult T_{m2} on 2–5 °C kõrgem. Agregeerumise temperatuur on madalam kui T_{m2}, vihjates molekuli Fab ja CH3 regioonide lahtipakkumisele alles agregaatide moodustumise järel. Kõrgem kontsentratsioon võib molekuli hiljem denatureeruvaid piirkondi stabiliseerida. Uuritud molekulide T_{m1}-d olid sarnasel tasemel turul oleva terapeutilise antikehaga (Trastusumaabemtansiin) ning ületasid seda T_{onset}, T_{m2} ja T_{agg} temperatuuride poolest. Molekul 408 H116Q HC eristus teistest uuritud molekulidest kõrgema T_{onset} ning madalamate T_{agg} ja T_{m2} temperatuuride poolest.



Joonis 21. NanoDSF abil saadud termostabiilsuse näitajad kontsentratsioonil 10 mg/ml. Molekulide nimede taga olevates kandilistes sulgudes on toodud nende kontsentratsioonid analüüsi teostamise hetkel. Sinine näitab molekulide lahtipakkumise alguse temperatuuri, punane esimest sulamistemperatuuri, heleroheline teist sulamistemperatuuri ning tumeroheline agregeerumise temperatuuri (mõõdetud 266 nm lainepikkusel). Graafikul on kajastatud nelja mõõtmise keskmised väärtused ning nende standardhälbed.

2.3.5. Enesega interakteerumine

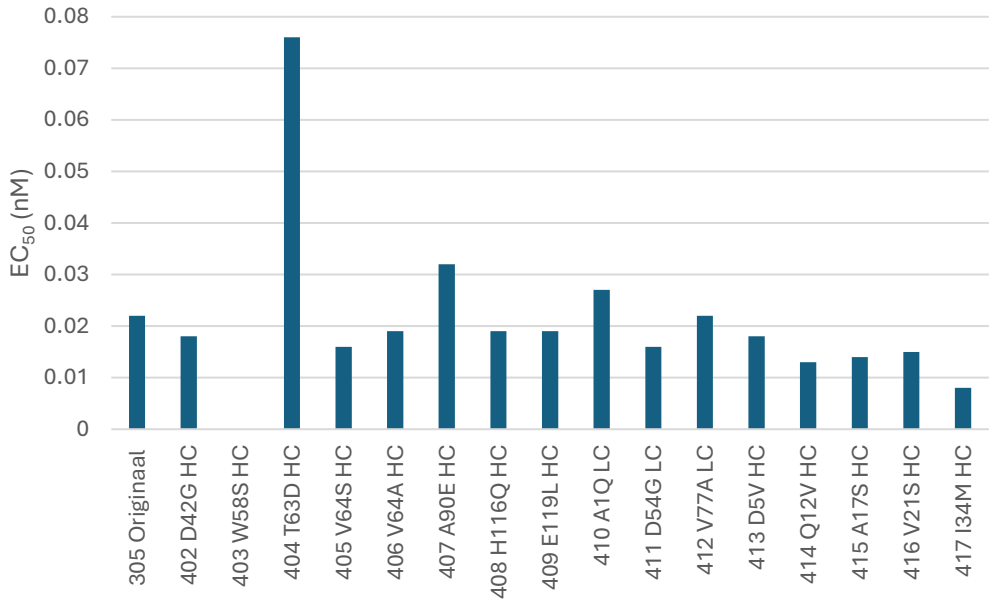
Antikehade enesega interakteerumise ja agregaatide moodustamise hindamiseks teostati AC-SINS (*affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy*) analüüs. Originaalantikeha võeti andmete analüüsimisel referentsiks ehk sellega võrreldi teiste antikehade neelduvuse maksimume (Joonis 22). Neelduvuse maksimumi rohkem kui 5 nm muutusel loetakse proov märkimisväärselt erinevaks referentsist. Ainult molekul 403 W58S HC erines piisavat (-6 nm), et määrata see enesega vähem interakteeruvaks kui originaalmolekul. Kõikide ülejäänud antikehade neelduvusmaksimumid erinesid originaalmolekulist vähem kui 5 nm võrra ehk nende enesega interakteerumise määr on sarnasel tasemel. Antud analüüsi tulemuste järgi ei saa ühtegi molekuli eemaldada potsentsiaalsete kandidaatide hulgast.



Joonis 22. AC-SINS (affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy) analüüsimeetodiga saadud tulemused. Proovid on mõõdetud 1x PBS puhvris, lõppkontsentratsioonil 0,25 mg/ml. Uuritavate antikehade neelduvuste maksimume on võrreldud originaalmolekuli vastu. Vasakule jäävad madalama ja paremale kõrgema neelduvuse maksimumiga molekulid. Graafikul on näidatud triplikaatide keskmised väärtused ja nende standardhälbed.

2.3.6. Antigeenispetsiifilisus

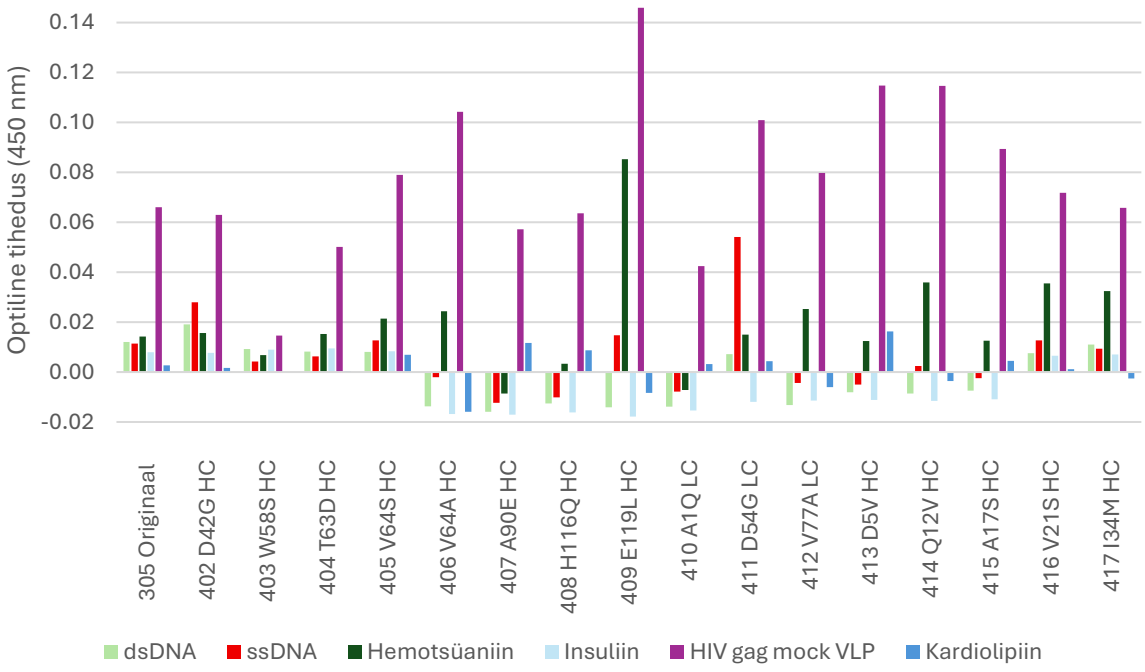
ELISA analüüsiga tuvastati uuritavate antikehade seondumist sihtmärkantigeenile GLUT1 (Joonis 23). Poolmaksimaalne efektiivne kontsentratsioon (EC_{50}) tähistab antikeha kontsentratsiooni, mis annab 50% maksimaalsest võimalikust bioloogilisest toimest ehk ELISA puhul pool maksimaalsest seondumise kontsentratsioonist. Enamiku molekulide EC_{50} väärtused olid väga sarnased originaalantikeha väärtusega, kuid kahe molekuli puhul erines see märkimisväärselt. Molekuli 404 T63D HC rohkem kui kolm korda kõrgemast EC_{50} väärtusest saab järeldada antikeha nõrgenenud seondumisvõimet, mistõttu nõuab efektiivseks seondumiseks suuremat kontsentratsiooni. Molekuli 403 W58S HC puhul seondumist antigeeniga ei tuvastatud, mis tähendab, et peale aminohappe vahetust ei sobi see terapeutiliseks antikehaks. Tulemus näitab aminohappe olulisust antikeha CDR-i funktsioonile.



Joonis 23. Uuritavate antikehade poolmaksimaalne efektiivne kontsentratsioon (EC_{50}) GLUT1 antigeeni vastu. Molekulil 403 W58S HC puudus võime antigeenile seonduda, mistõttu puudub sellel EC_{50} väärtus. Väärtused on arvutatud 450 nm lainepikkusel mõõdetud lahjendusrea põhjal. Graafikul on kajastatud duplikaatide keskmiste väärtused.

2.3.7. Polüreaktiivsus

Polüreaktiivsuse hindamiseks ELISA abil kaeti plaadi kaevud järgneva kuue molekuliga: kaheahelaline DNA, üheahelaline DNA, hemotsüaniin, insuliin, HIV-le iseloomulikku antigeeni sisaldav VLP ehk HIV gag mock VLP ning kardiolipiin. Need kuus molekuli on katsesse valitud, kuna nad on omadustelt väga erinevad. Molekul liigitatakse polüreaktiivseks, kui proovi mõõdetud optiline tihedus 450 nm lainepikkuse juures on vähemalt kahe antigeeni puhul üle 0,21. Kõikidel uuritavatel antikehadel, kontsentratsioonil 1 µg/ml ning alla selle, oli madal seondumise määr polüreaktiivsuse katses kasutatud molekulidega (Joonis 24). Polüreaktiivsuse ELISA tulemuste põhjal on kõik uuritud antikehad sobilikud ravimikandidaadid.



Joonis 24. Polüreaktiivsuse ELISA tulemused uuritavate antikehade kontsentratsioonil 1 µg/ml. Heleroheline näitab seondumist kaheahelalise DNA-ga, punane üheahelalise DNA-ga, tumeroheline hemotsüaniiniga, helesinine insuliiniga, lilla HIV-le iseloomulikku antigeeni sisaldava VLP-ga ning sinine kardiolipiiniga. Optiline tihedus on mõõdetud 450 nm lainepikkusel. Kõik katsed on tehtud duplikaatidena.

2.4. Hinnang uuritud antikehadele

Arendatavuse parameetreid arvestades olid originaalantikehaga võrreldes halvemate omadustega järgnevad 5 antikeha: 403 W58S HC, 408 H116Q HC, 409 E119L HC, 410 A1Q LC ning 412 V77A LC. 403 W58S HC puhul ei toimunud seondumist sihtmärk antikehale, 408 H116Q HC Tagg ja Tm2 olid märgatavalt väiksemad võrreldes originaalmolekuliga, 409 E119L HC oli kergesti agregeeruv juba madalamal kontsentratsioonil ning tootlikkus kehv, 410 A1Q LC kapillaarelektroforeesi redutseeritud proovist selgus kerge ahela posttranslatsioonilise modifikatsiooni kõrvalekalle ja 412 V77A LC ekspressioonitase oli oluliselt vähenenud. Molekulide omaduste halvenemise tõttu ei ole mõttekas neid edasi uurida.

Originaalantikehaga sarnaste omadustega olid 10 järgnevat antikeha: 402 D42G HC, 404 T63D HC, 405 V64S HC, 406 V64A HC, 407 A90E HC, 411 D54G LC, 414 Q12V HC, 415 A17S HC, 416 V21S HC, 417 I34M HC. Omadusteks olid: lahusest välja sadenemine kõrgematel kontsentratsioonidel sarnasel määral, monomeeride kõrge osakaal, hea termostabiilsus, ioonvahetuse profiil (kuid mitte retentsiooniaeg), seondumine antigeenile, madal polüreaktiivsus. Osade molekulide tootlikkus oli vähenenud (kuni 50%), kuid ravimi tootmiseks piisav. Antikehi pole mõistlik edasi uurida, sest olid enamjaolt võrdväärsete omadustega nagu originaalmolekul ning võib seda kasutada, sest on juba teada omadustega.

Molekuli 413 D5V HC omadused ei halvenenud ja see ületas originaalmolekuli kahe omaduse poolest. Antikehal oli 10% kõrgem tootlikkus ning see suutis püsida lahuses ilma agregeerumise ja sadenemiseta kontsentratsioonil 10 mg/ml. 413 D5V HC oli ainus uuritav antikeha, mida on mõistlik edasi arendada ning prekliinilistesse katsetesse viia. Arendustööd võiks vajadusel jätkata keelemudelite poolt pakutud kahe- ja kolmeaminohappeliste mutatsioonidega.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli välja selgitada keelemudelite poolt pakutud üheaminohappeliste mutatsioonide sobivust GLUT1-vastasele antikehale erinevate analüüsimeetoditega, eesmärgiga vähendada kõrgel kontsentratsioonil selle molekuli välja sadenemist. Mudelid pakkusid originaalmolekuli põhjal kokku 16 erinevate üheaminohappeliste mutatsioonidega antikeha. Kuna aminohapete muutmisega võivad molekuli omadused drastiliselt muutuda, siis tuli analüüsida saadud immunoglobuliinide arendatavuse parameetreid.

Kuueteistkümnest uuritud antikehast viis olid selgemalt kehvemate omadustega, kuna neil puudus seondumine antigeenile, olid halvemad termostabiilsuse näitajad, madal tootlikkus ja maksimaalne kontsentratsioon ning soovimatud posttranslatsioonilised modifikatsioonid. kümme antikeha määrati originaalmolekuliga võrdväärseteks peaaegu kõikide uuritud parameetrite põhjal. Kuigi paljudel molekulidel oli tootlikkus vähenenud, jäid need siiski ravimikandidaadi tootmiseks piisavale tasemele. Üks keelemudelite poolt pakutud antikeha, 413 D5V HC, oli selgelt originaalmolekulist paremate omadustega. Enamus molekuli parameetritest, näiteks homogeensus, seondumine antigeenile ja polüreaktiivsus olid sarnaste väärtustega, kuid tootlikkus suurenes 10% ning see ei sadenenud lahusest välja ka kontsentreerimisel 10 mg/ml juurde.

Tulemus näitab, et enamus keelemudelite poolt välja pakutud mutatsioonidest ei avalda mõju või on negatiivse efektiga GLUT1 vastase antikeha lahustuvusega seotud omadustele. Samuti tõid osad muudatused endaga kaasa ebasoovitavaid omadusi, nt madal termostabiilsus ja madalam tootlikkus. Erandiks oli üks uuritud antikeha, mille lahustuvus ja ekspressioonitase paranesid ning ülejäänud uuritud parameetrid ei muutunud.

Keelemudelitel on sobiv vahend antikeha omadusi parandavate mutatsioonide pakkumiseks. Molekuli 413 D5V HC saab veel keelemudelite abil edasi arendada ning viia prekliinilistesse katsetesse. Mutatsioonide pakkumise võimekust tuleks edasi uurida ka teiste antikehadega.

Improving the properties of Immunoglobulin G using language models: the case of a GLUT1-targeting antibody

Raimond Tilk

Summary

Drug development is a long and complicated process requiring an extensive amount of time and resources and costs hundreds of millions to billions of dollars. Extensive analyses of the candidates' biophysical, -chemical properties and pharmacokinetics must be performed to mitigate these costs. Researchers have started to shift focus towards antibody based drugs due to their target specificity. These drugs mitigate the systemic effect of the pharmaceutical and ease side effects. It may be difficult to find a fitting candidate for clinical trials, therefore language models have become a tool to shorten the time and money spent on antibody engineering.

This study examines an antibody that binds to glucose transporter type 1 (GLUT1) and induces apoptosis of cells expressing this protein. The immunoglobulin had an undesirable property – it was unstable at high concentrations. Language models were used to solve this problem by providing singe amino acid changes in the original molecule. 16 of these antibodies were selected for this study, each having different mutations.

5 out of 16 antibodies had worse developability characteristics, having atleast one of the following undesirable attributes – no binding to the target antigen, lower thermostability characteristics, limited yield and maximum concentration, unwanted posttranslational modifications. 10 antibodies out of 16 were deemed equal to the original antibody by all parameters. Even though many had reduced yield, it was enough for production at a reasonable level. One of the antibodies generated was clearly superior to the original, having 10% increased yield and not precipitating at a concentration of 10 mg/ml.

These results show that most of the mutations generated by language models had no effect or were detrimental to the solubility characteristics of GLUT1 and created undesirable properties, such as low thermostability and yield. Only one of the studied antibodies had higher solubility and yield, while impacting none of the other characteristics, indicating that language models can be used to enhance an antibody's properties but require extensive characterisation.

KIRJANDUSE LOETELU

Acharya, N. K., Qi, X., Goldwaser, E. L., Godsey, G. A., Wu, H., Kosciuk, M. C., Freeman, T. A., Macphee, C. H., Wilensky, R. L., Venkataraman, V., ja Nagele, R. G. (2017). Retinal pathology is associated with increased blood–retina barrier permeability in a diabetic and hypercholesterolaemic pig model: Beneficial effects of the LpPLA $_2$ inhibitor Darapladib. *Diabetes and Vascular Disease Research*, *14*(3), 200–213.

Alley, E. C., Khimulya, G., Biswas, S., AlQuraishi, M., ja Church, G. M. (2019). Unified rational protein engineering with sequence-based deep representation learning. *Nature Methods*, *16*(12), 1315–1322.

Alpern, R. J., ja Hebert, S. C. (2007). *Seldin and Giebisch's The Kidney Physiology ja Pathophysiology 1–2* (4th ed.).

Bajpayee, A. G., Scheu, M., Grodzinsky, A. J., ja Porter, R. M. (2015). A rabbit model demonstrates the influence of cartilage thickness on intra-articular drug delivery and retention within cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, *33*(5), 660–667.

Beck, A., Bussat, M.-C., Zorn, N., Robillard, V., Klinguer-Hamour, C., Chenu, S., Goetsch, L., Corvaïa, N., van Dorsselaer, A., ja Haeuw, J.-F. (2005). Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NS0 cells. *Journal of Chromatography B*, *819*(2), 203–218.

Bepler, T., ja Berger, B. (2021). Learning the protein language: Evolution, structure, and function. *Cell Systems*, *12*(6), 654–669.e3.

Bona, C. A., ja Bonilla, F. A. (2019). *Textbook of Immunology*. CRC Press.

Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., ja Devaskar, S. U. (2009). Will the original glucose transporter isoform please stand up! *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *297*(4), E836–E848.

Cheung, N.-K. v., Guo, H., Hu, J., Tassev, D. v., ja Cheung, I. Y. (2012). Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo. *OncoImmunology*, *1*(4), 477–486.

da Silva Junior, H. C. (2022). *Transient Gene Expression in Human Expi293 Cells* (pp. 319–325).

Dick, L. W., Kim, C., Qiu, D., ja Cheng, K. (2007). Determination of the origin of the N-terminal pyro-glutamate variation in monoclonal antibodies using model peptides. *Biotechnology and Bioengineering*, *97*(3), 544–553.

Dondelinger, M., Filée, P., Sauvage, E., Quinting, B., Muyldermans, S., Galleni, M., ja Vandevenne, M. S. (2018). Understanding the Significance and Implications of Antibody Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition. *Frontiers in Immunology*, *9*.

Dougherty, T. J., ja Pucci, M. J. (Eds.). (2012). *Antibiotic Discovery and Development*. Springer US.

Durocher, Y. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research*, *30*(2), 9e–99.

Emens, L. A., ja Davidson, N. E. (2004). Trastuzumab in breast cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, *18*(9), 1117–1128; discussion 1131-2, 1137–1138.

Epstein, M. A., Achong, B. G., ja Barr, Y. M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *The Lancet*, *283*(7335), 702–703.

Fantin, V. R., St-Pierre, J., ja Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, *9*(6), 425–434.

Finlay, W. J. J., Coleman, J. E., Edwards, J. S., ja Johnson, K. S. (2019). Anti-PD1 'SHR-1210' aberrantly targets pro-angiogenic receptors and this polyspecificity can be ablated by paratope refinement. *MAbs*, *11*(1), 26–44.

González-Muñoz, A., Bokma, E., O'Shea, D., Minton, K., Strain, M., Vousden, K., Rossant, C., Jermutus, L., ja Minter, R. (2012). Tailored amino acid diversity for the evolution of antibody affinity. *MAbs*, *4*(6), 664–672.

Gorshkova, E. N., Lecerf, M., Astrakhantseva, I. v., Vasilenko, E. A., Starkina, O. v., Ilyukina, N. A., Dimitrova, P. A., Dimitrov, J. D., ja Vassilev, T. L. (2022). Induced antigen-binding polyreactivity in human serum IgA. *Immunobiology*, *227*(3), 152213.

Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D. H., Zeng, Y., David, N. E., Sasai, H., Garza, D., Brenner,

D. G., Hales, J. F., McGuinness, R. P., Capon, D. J., Klapholz, S., ja Jakobovits, A. (1994). Antigen–specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nature Genetics*, *7*(1), 13–21.

Gregersen, N., ja Bross, P. (2010). *Protein Misfolding and Cellular Stress: An Overview* (pp. 3–23).

Haines, P. J., Reading, M., ja Wilburn, F. W. (1998). *Differential Thermal Analysis and Differential Scanning Calorimetry* (pp. 279–361).

Hamilton, R. G. (1987). Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, *33*(10), 1707–1725.

Harris, R. A., ja Johnson, J. S. (2019). Energy Metabolism | Glycolysis Overview. In *Encyclopedia of Biological Chemistry III* (pp. 141–148). Elsevier.

Harris, R. J., Kabakoff, B., Macchi, F. D., Shen, F. J., Kwong, M., Andya, J. D., Shire, S. J., Bjork, N., Totpal, K., ja Chen, A. B. (2001). Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *752*(2), 233–245.

Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*, *16*(10), 635–649.

He, F., Hogan, S., Latypov, R. F., Narhi, L. O., ja Razinkov, V. I. (2010). High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *99*(4), 1707–1720.

Heerspink, H. J. L., Perkins, B. A., Fitchett, D. H., Husain, M., ja Cherney, D. Z. I. (2016). Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Circulation*, *134*(10), 752–772.

Hie, B. L., Shanker, V. R., Xu, D., Bruun, T. U. J., Weidenbacher, P. A., Tang, S., Wu, W., Pak, J. E., ja Kim, P. S. (2024). Efficient evolution of human antibodies from general protein language models. *Nature Biotechnology*, *42*(2), 275–283.

Holm, E., Hagmüller, E., Staedt, U., Schlickeiser, G., Günther, H. J., Leweling, H., Tokus, M., ja Kollmar, H. B. (1995). Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Research*, *55*(6), 1373–1378.

Hosios, A. M., Hecht, V. C., Danai, L. V., Johnson, M. O., Rathmell, J. C., Steinhauser, M. L., Manalis, S. R., ja Vander Heiden, M. G. (2016). Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Developmental Cell*, *36*(5), 540–549.

Ito, T., ja Tsumoto, K. (2013). Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *22*(11), 1542–1551.

Jang, S. M., Han, H., Jang, K.-S., Jun, Y. J., Jang, S.-H., Min, K.-W., Chung, M. S., ja Paik, S. S. (2012). The Glycolytic Phenotype is Correlated with Aggressiveness and Poor Prognosis in Invasive Ductal Carcinomas. *Journal of Breast Cancer*, *15*(2), 172.

Jarasch, A., Koll, H., Regula, J. T., Bader, M., Papadimitriou, A., ja Kettenberger, H. (2015). Developability Assessment During the Selection of Novel Therapeutic Antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *104*(6), 1885–1898.

Jarasch, A., ja Skerra, A. (2017). Aligning, analyzing, and visualizing sequences for antibody engineering: Automated recognition of immunoglobulin variable region features. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *85*(1), 65–71.

Jefferis, R. (2009). Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(3), 226–234.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., … Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589.

Kaleli, N. E., Karadag, M., ja Kalyoncu, S. (2019). Phage display derived therapeutic antibodies have enriched aliphatic content: Insights for developability issues. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *87*(7), 607–618.

Kandi, V., ja Vadakedath, S. (2023). Clinical Trials and Clinical Research: A Comprehensive Review. *Cureus*.

Khee Hwang, W. Y., Almagro, J. C., Buss, T. N., Tan, P., ja Foote, J. (2005). Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods*, *36*(1), 35–42.

Kim, D. M., Yao, X., Vanam, R. P., ja Marlow, M. S. (2019). Measuring the effects of macromolecular crowding on antibody function with biolayer interferometry. *MAbs*, *11*(7), 1319–1330.

King, C., Patel, R., Ponniah, G., Nowak, C., Neill, A., Gu, Z., ja Liu, H. (2018). Characterization of recombinant monoclonal antibody variants detected by hydrophobic interaction chromatography and imaged capillary isoelectric focusing electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, *1085*, 96–103.

Kunik, V., Peters, B., ja Ofran, Y. (2012). Structural Consensus among Antibodies Defines the Antigen Binding Site. *PLoS Computational Biology*, *8*(2), e1002388.

Larsson, L.-I. (2000). *Immunocytochemistry: Theory and Practice*.

Legouffe, E., Liautard, J., Gaillard, J. P., Rossi, J.-F., Wijdenes, J., Bataille, R., Klein, B., ja Brochier, J. (2008). Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clinical and Experimental Immunology*, *98*(2), 323–329.

Liu, Y., Caffry, I., Wu, J., Geng, S. B., Jain, T., Sun, T., Reid, F., Cao, Y., Estep, P., Yu, Y., Vásquez, M., Tessier, P. M., ja Xu, Y. (2014). High-throughput screening for developability during early-stage antibody discovery using self-interaction nanoparticle spectroscopy. *MAbs*, *6*(2), 483–492.

Lonberg, N., Taylor, L. D., Harding, F. A., Trounstine, M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Kuo, C.-C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J. G., Munoz-O'Regan, D., O'Donnell, S. L., Lapachet, E. S. G., Bengoechea, T., Fishwild, D. M., Carmack, C. E., Kay, R. M., ja Huszar, D. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*, *368*(6474), 856–859.

Lu, C., Liu, D., Liu, H., ja Motchnik, P. (2013). Characterization of monoclonal antibody size variants containing extra light chains. *MAbs*, *5*(1), 102–113.

Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.-J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., ja Wu, H.-C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, *27*(1), 1.

Mak, T. W., ja Saunders, M. E. (2006). B Cell Receptor Structure and Effector Function. In *The Immune Response* (pp. 93–120). Elsevier.

Makabe, K., Nakanishi, T., Tsumoto, K., Tanaka, Y., Kondo, H., Umetsu, M., Sone, Y., Asano, R., ja Kumagai, I. (2008). Thermodynamic Consequences of Mutations in Vernier Zone Residues of a Humanized Anti-human Epidermal Growth Factor Receptor Murine Antibody, 528. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(2), 1156–1166.

Makowski, E. K., Wu, L., Desai, A. A., ja Tessier, P. M. (2021). Highly sensitive detection of antibody nonspecific interactions using flow cytometry. *MAbs*, *13*(1).

Manning, M. C., Matsuura, J. E., Kendrick, B. S., Meyer, J. D., Dormish, J. J., Vrkljan, M., Ruth, J. R., Carpenter, J. F., ja Sheftert, E. (1995). Approaches for increasing the solution stability of proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, *48*(5), 506–512.

Mark, J. K. K., Lim, C. S. Y., Nordin, F., ja Tye, G. J. (2022). Expression of mammalian proteins for diagnostics and therapeutics: a review. *Molecular Biology Reports*, *49*(11), 10593–10608.

Marks, D. S., Hopf, T. A., ja Sander, C. (2012). Protein structure prediction from sequence variation. *Nature Biotechnology*, *30*(11), 1072–1080.

Mason, D. M., Friedensohn, S., Weber, C. R., Jordi, C., Wagner, B., Meng, S. M., Ehling, R. A., Bonati, L., Dahinden, J., Gainza, P., Correia, B. E., ja Reddy, S. T. (2021). Optimization of therapeutic antibodies by predicting antigen specificity from antibody sequence via deep learning. *Nature Biomedical Engineering*, *5*(6), 600–612.

Mathaes, R., Koulov, A., Joerg, S., ja Mahler, H.-C. (2016). Subcutaneous Injection Volume of Biopharmaceuticals—Pushing the Boundaries. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *105*(8), 2255–2259.

McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., ja Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, *348*(6301), 552–554.

Mieczkowski, C., Zhang, X., Lee, D., Nguyen, K., Lv, W., Wang, Y., Zhang, Y., Way, J., ja Gries, J.-M. (2023). Blueprint for antibody biologics developability. *MAbs*, *15*(1).

Mora, S., ja Pessin, J. (2004). Glucose/Sugar Transport in Mammals. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (pp. 208–212). Elsevier.

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., ja Lodish, H. F. (1985). Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter. *Science*, *229*(4717), 941–945.

Mueckler, M., ja Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2–3), 121–138.

Narciso, J. E. T., Uy, I. D. C., Cabang, A. B., Chavez, J. F. C., Pablo, J. L. B., Padilla-Concepcion, G. P., ja Padlan, E. A. (2011). Analysis of the antibody structure based on high-resolution crystallographic studies. *New Biotechnology*, *28*(5), 435–447.

Navale, A. M., ja Paranjape, A. N. (2016). Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews*, *8*(1), 5–9.

Niwa, R., Natsume, A., Uehara, A., Wakitani, M., Iida, S., Uchida, K., Satoh, M., ja Shitara, K. (2005). IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *Journal of Immunological Methods*, *306*(1–2), 151–160.

Olaru, A., Bala, C., Jaffrezic-Renault, N., ja Aboul-Enein, H. Y. (2015). Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *45*(2), 97–105.

Padlan, E. A. (1991). A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Molecular Immunology*, *28*(4–5), 489–498.

Parmley, S. F., ja Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, *73*(2), 305–318.

Pedrioli, A., ja Oxenius, A. (2021). Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends in Immunology*, *42*(12), 1143–1158.

Perdue, S. S., ja Humphrey, J. H. (2025). immune system. In *Encyclopedia Britannica*. Encyclopedia Britannica.

Pfeiffer, T., Schuster, S., ja Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. *Science*, *292*(5516), 504–507.

Pindrus, M., Shire, S. J., Kelley, R. F., Demeule, B., Wong, R., Xu, Y., ja Yadav, S. (2015). Solubility Challenges in High Concentration Monoclonal Antibody Formulations: Relationship with Amino Acid Sequence and Intermolecular Interactions. *Molecular Pharmaceutics*, *12*(11), 3896–3907.

Pognan, F., Beilmann, M., Boonen, H. C. M., Czich, A., Dear, G., Hewitt, P., Mow, T., Oinonen, T., Roth, A., Steger-Hartmann, T., Valentin, J.-P., van Goethem, F., Weaver, R. J., ja Newham, P. (2023). The evolving role of investigative toxicology in the pharmaceutical industry. *Nature Reviews Drug Discovery*, *22*(4), 317–335.

Prihoda, D., Maamary, J., Waight, A., Juan, V., Fayadat-Dilman, L., Svozil, D., ja Bitton, D. A. (2022). BioPhi: A platform for antibody design, humanization, and humanness evaluation based on natural antibody repertoires and deep learning. *MAbs*, *14*(1).

Queen, C., Schneider, W. P., Selick, H. E., Payne, P. W., Landolfi, N. F., Duncan, J. F., Avdalovic, N. M., Levitt, M., Junghans, R. P., ja Waldmann, T. A. (1989). A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(24), 10029–10033.

Rani, P., Dutta, K., ja Kumar, V. (2024). Performance evaluation of drug synergy datasets using computational intelligence approaches. *Multimedia Tools and Applications*, *83*(3), 8971–8997.

Rathore, A. S., ja Narnaware, S. (2022). *Purification of Therapeutic Antibodies by Protein A Affinity Chromatography* (pp. 169–177).

Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., ja Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, *15*(6), 346–366.

Root, A. R., Guntas, G., Katragadda, M., Apgar, J. R., Narula, J., Chang, C. S., Hanscom, S., McKenna, M., Wade, J., Meade, C., Ma, W., Guo, Y., Liu, Y., Duan, W., Hendershot, C., King, A. C., Zhang, Y., Sousa, E., Tam, A., … Bloom, L. (2021). Discovery and optimization of a novel anti-GUCY2c x CD3 bispecific antibody for the treatment of solid tumors. *MAbs*, *13*(1).

Safdari, Y., Farajnia, S., Asgharzadeh, M., ja Khalili, M. (2013). Antibody humanization methods – a review and update. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *29*(2), 175–186.

Sahin, E., Grillo, A. O., Perkins, M. D., ja Roberts, C. J. (2010). Comparative Effects of pH and Ionic Strength on Protein–Protein Interactions, Unfolding, and Aggregation for IgG1 Antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *99*(12), 4830–4848.

Satzer, P., ja Jungbauer, A. (2018). High-capacity protein A affinity chromatography for the fast quantification of antibodies: Two-wavelength detection expands linear range. *Journal of Separation Science*, *41*(8), 1791–1797.

Sertkaya, A., Beleche, T., Jessup, A., ja Sommers, B. D. (2024). Costs of Drug Development and Research and Development Intensity in the US, 2000-2018. *JAMA Network Open*, *7*(6), e2415445.

Shire, S. J., Shahrokh, Z., ja Liu, J. (2004). Challenges in the development of high protein concentration formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *93*(6), 1390–1402.

Singh, N., Vayer, P., Tanwar, S., Poyet, J.-L., Tsaioun, K., ja Villoutreix, B. O. (2023). Drug discovery and development: introduction to the general public and patient groups. *Frontiers in Drug Discovery*, *3*.

Staelens, S., Desmet, J., Ngo, T. H., Vauterin, S., Pareyn, I., Barbeaux, P., van Rompaey, I., Stassen, J.-M., Deckmyn, H., ja Vanhoorelbeke, K. (2006). Humanization by variable domain resurfacing and grafting on a human IgG4, using a new approach for determination of non-human like surface accessible framework residues based on homology modelling of variable domains. *Molecular Immunology*, *43*(8), 1243–1257.

Strike, L. E., Devens, B. H., ja Lundak, R. L. (1984). Production of human-human hybridomas secreting antibody to sheep erythrocytes after in vitro immunization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *132*(4), 1798–1803.

Sung, J.-Y., Kim, G. Y., Lim, S.-J., Park, Y.-K., ja Kim, Y. W. (2010). Expression of the GLUT1 glucose transporter and p53 in carcinomas of the pancreatobiliary tract. *Pathology - Research and Practice*, *206*(1), 24–29.

Suzek, B. E., Huang, H., McGarvey, P., Mazumder, R., ja Wu, C. H. (2007). UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics*, *23*(10), 1282–1288.

Sydow, J. F., Lipsmeier, F., Larraillet, V., Hilger, M., Mautz, B., Mølhøj, M., Kuentzer, J., Klostermann, S., Schoch, J., Voelger, H. R., Regula, J. T., Cramer, P., Papadimitriou, A., ja Kettenberger, H. (2014). Structure-Based Prediction of Asparagine and Aspartate Degradation Sites in Antibody Variable Regions. *PLoS ONE*, *9*(6), e100736.

Terry Jenkins, W. (1998). Three solutions of the protein solubility problem. *Protein Science*, *7*(2), 376–382.

The Antibody Society. (2025, March 21). *Antibody therapeutics product data*. Therapeutic Monoclonal Antibodies Approved or in Regulatory Review.

Thomson, C. A. (2016). IgG Structure and Function. In *Encyclopedia of Immunobiology* (pp. 15–22). Elsevier.

Trigg, J., Gutwin, K., Keating, A. E., ja Berger, B. (2011). Multicoil2: Predicting Coiled Coils and Their Oligomerization States from Sequence in the Twilight Zone. *PLoS ONE*, *6*(8), e23519.

Uibo, R., Kisand, K., Peterson, P., ja Reimand, K. (2015). *Immunoloogia* (pp. 137–145). Pakett.

Vera, J. C., Rivas, C. I., Fischbarg, J., ja Golde, D. W. (1993). Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature*, *364*(6432), 79–82.

Vidarsson, G., Dekkers, G., ja Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, *5*.

Vukovic, N., van Elsas, A., Verbeek, J. S., ja Zaiss, D. M. W. (2021). Isotype selection for antibody-based cancer therapy. *Clinical and Experimental Immunology*, *203*(3), 351–365.

Wakankar, A. A., Borchardt, R. T., Eigenbrot, C., Shia, S., Wang, Y. J., Shire, S. J., ja Liu, J. L. (2007). Aspartate Isomerization in the Complementarity-Determining Regions of Two Closely Related Monoclonal Antibodies. *Biochemistry*, *46*(6), 1534–1544.

Wang, S. S., Yan, Y. (Susie), ja Ho, K. (2021). US FDA-approved therapeutic antibodies with high-concentration formulation: summaries and perspectives. *Antibody Therapeutics*, *4*(4), 262–272.

Warburg, O. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Die Naturwissenschaften*, *12*(50), 1131–1137.

Weigle, W. O., Hobbs, M. V., ja Morgan, E. L. (1985). Fc receptors and immunoglobulin Fc region interaction as immunoregulatory events. *Annales de l'Institut Pasteur / Immunologie*, *136*(3), 421–423.

Weiss, W. F., Young, T. M., ja Roberts, C. J. (2009). Principles, approaches, and challenges for predicting protein aggregation rates and shelf life. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *98*(4), 1246–1277.

Wu, X., ja Yu, L. (2021). EPSOL: sequence-based protein solubility prediction using multidimensional embedding. *Bioinformatics*, *37*(23), 4314–4320.

Xu, Y., Roach, W., Sun, T., Jain, T., Prinz, B., Yu, T.-Y., Torrey, J., Thomas, J., Bobrowicz, P., Vasquez, M., Wittrup, K. D., ja Krauland, E. (2013). Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. *Protein Engineering Design and Selection*, *26*(10), 663–670.

Xuelian, C., Lanying, M., Xi, W., Hongnan, M., Dawei, W., Bo, L., Dong, Q., Hongtu, Z., Jing, H., ja Binghe, X. (2019). Reactive capillary hemangiomas: a novel dermatologic toxicity following anti-PD-1 treatment with SHR-1210. *Cancer Biology ja Medicine*, *16*(1), 173.

Yadav, S., Sreedhara, A., Kanai, S., Liu, J., Lien, S., Lowman, H., Kalonia, D. S., ja Shire, S. J. (2011). Establishing a Link Between Amino Acid Sequences and Self-Associating and Viscoelastic Behavior of Two Closely Related Monoclonal Antibodies. *Pharmaceutical Research*, *28*(7), 1750–1764.

Yang, D., Kroe-Barrett, R., Singh, S., ja Laue, T. (2019). IgG Charge: Practical and Biological Implications. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, *8*(1).

Younes, M., Lechago, L. v, ja Lechago, J. (1996). Overexpression of the human erythrocyte glucose transporter occurs as a late event in human colorectal carcinogenesis and is associated with an increased incidence of lymph node metastases. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *2*(7), 1151–1154.

Zhang, W., Wang, H., Feng, N., Li, Y., Gu, J., ja Wang, Z. (2023). Developability assessment at early-stage discovery to enable development of antibody-derived therapeutics. *Antibody Therapeutics*, *6*(1), 13–29.

Zhang, Y. T., Hu, J., Pace, A. L., Wong, R., Wang, Y. J., ja Kao, Y.-H. (2014). Characterization of asparagine 330 deamidation in an Fc-fragment of IgG1 using cation exchange chromatography and peptide mapping. *Journal of Chromatography B*, *965*, 65–71.

Zheng, K., Bantog, C., ja Bayer, R. (2011). The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *MAbs*, *3*(6), 568–576.

Zhou, M., Yan, Z., Li, H., Liu, X., ja Sun, P. (2021). Application of Affinity-Capture Self-Interaction Nanoparticle Spectroscopy in Predicting Protein Stability, Especially for Co-Formulated Antibodies. *Pharmaceutical Research*, *38*(4), 721–732.

VEEBIAADRESSID

Revvity – https://resources.revvity.com/pdfs/GDE_ProteinEXact_HR_Quick_Guide.pdf (Külastatud 20.05.2025)

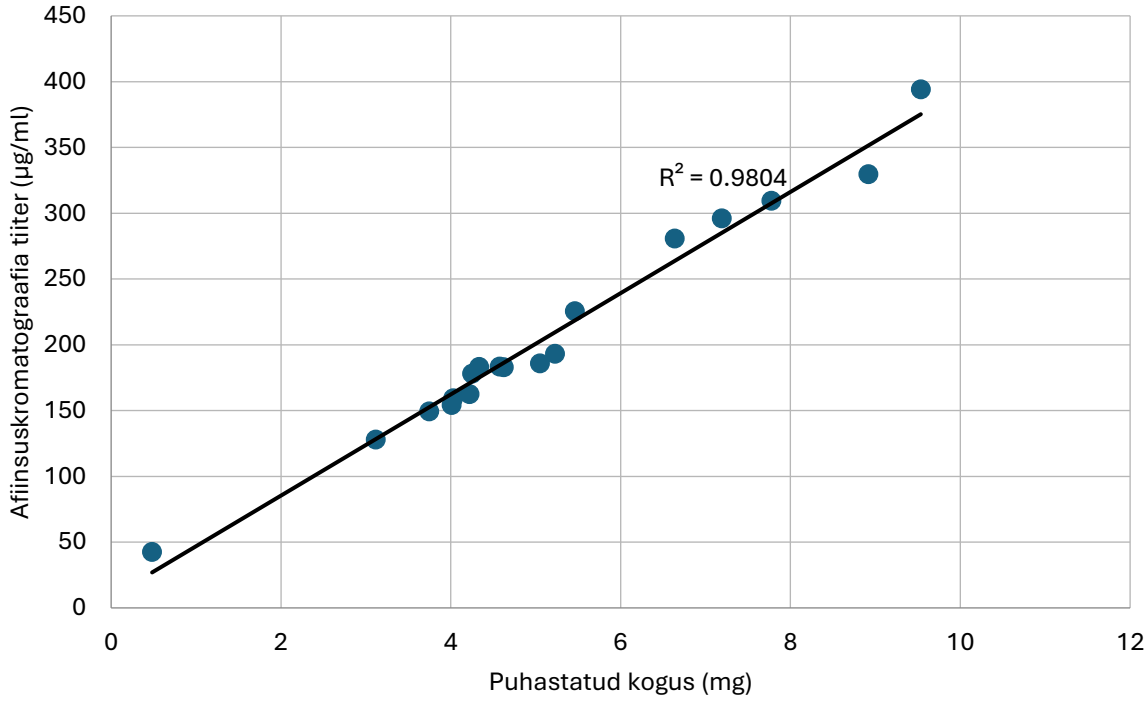
The Antibody Society – https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/ (Külastatud 21.03.2025)

Unchained labs – https://www.unchainedlabs.com/wp-content/uploads/2022/06/App_Note_Uncle_Uncle-stays-hot-for-proteins_RevA_r2.pdf (külastatud 04.05.2025)

LISAD

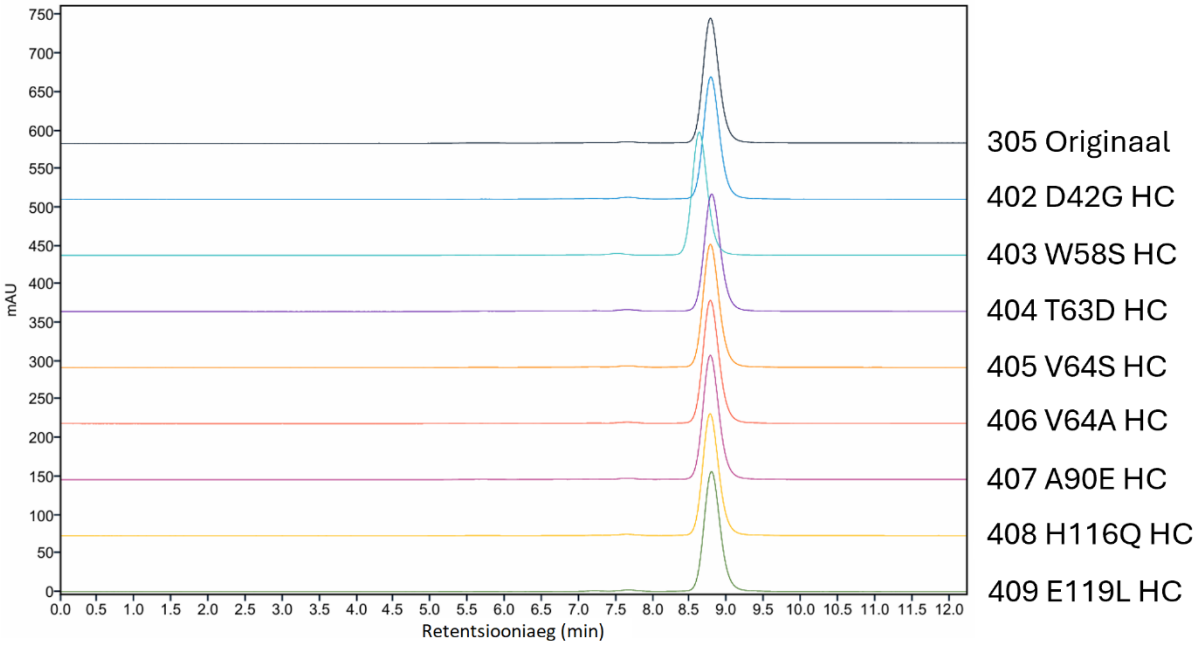
Lisa 1

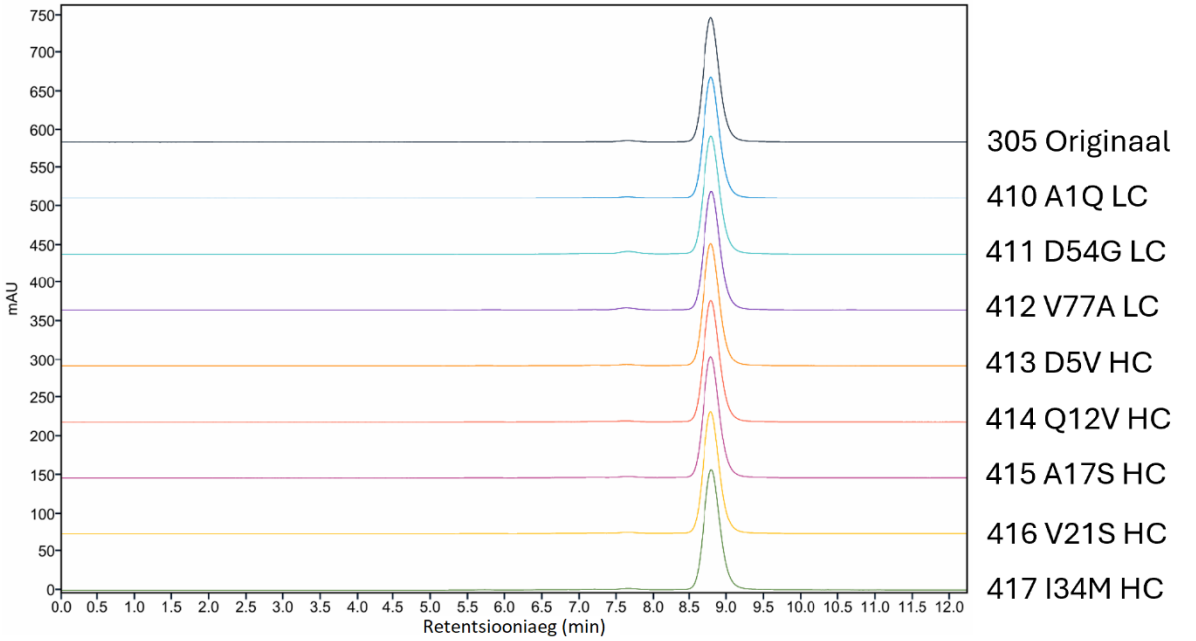
Rakukultuuri supernatandist afiinsuskromatograafia abil mõõdetud kontsentratsiooni ja afiinsuskromatograafia meetodil puhastatud antikeha koguse korrelatsioon kõikide uuritud antikehade puhul.



Lisa 2

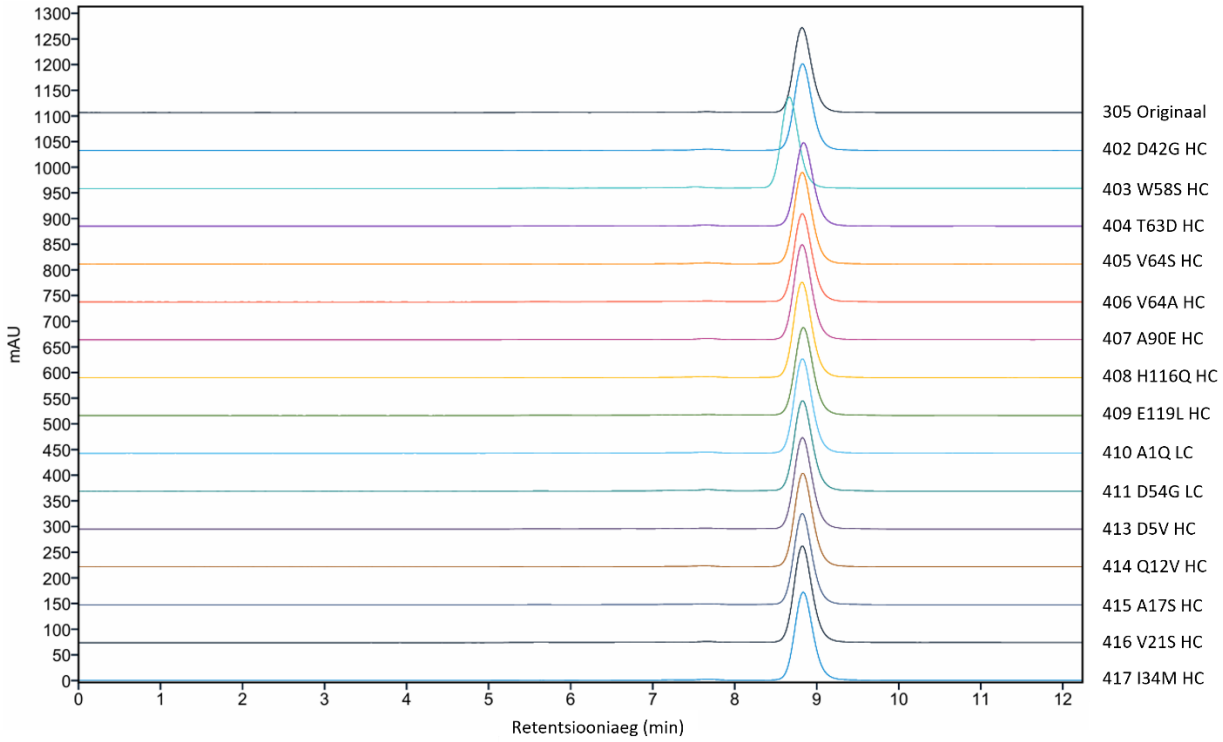
Suuruseralduskromatograafia kromatogrammid kõikidele proovidele kontsentratsioonil 1 mg/ml.





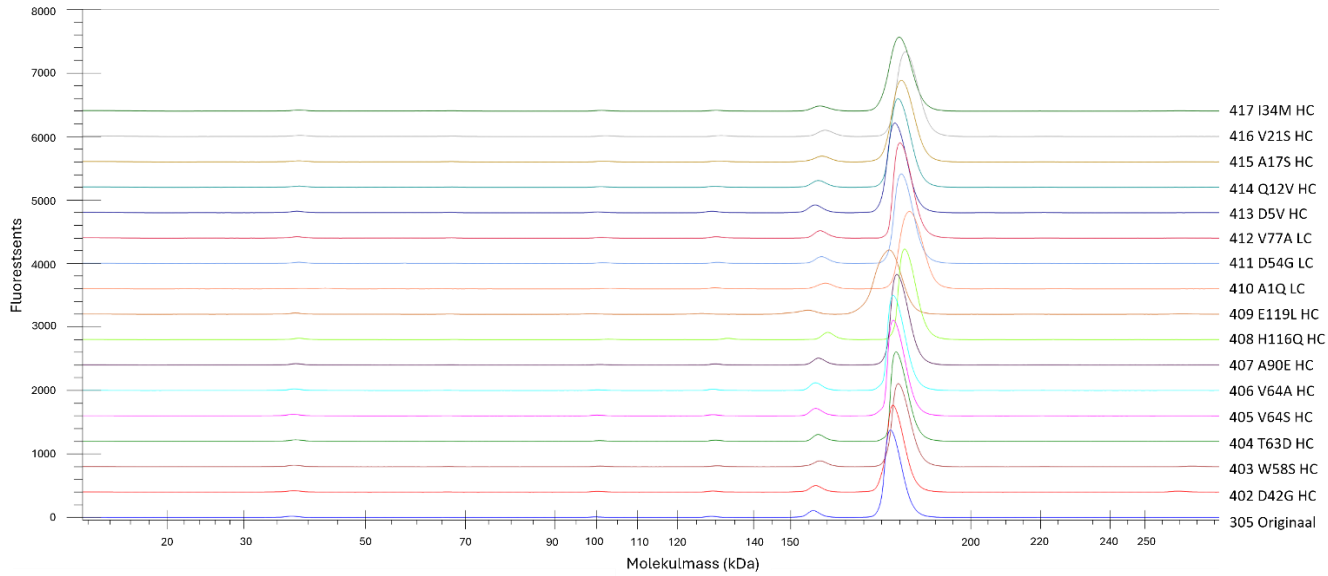
Lisa 3

Suuruseralduskromatograafia kromatogrammid kõikidele proovidele kontsentratsioonil 6–10 mg/ml.



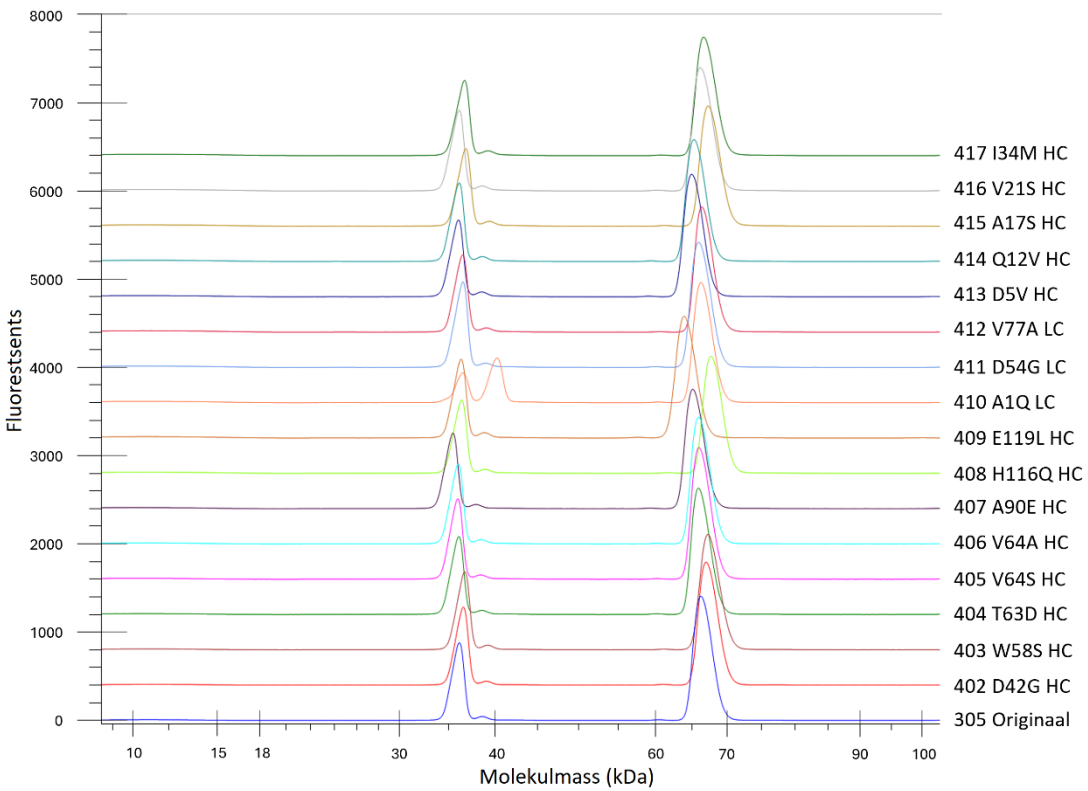
Lisa 4

Mitteredutseeritud proovide kapillaarelektroforeesi tulemused.



Lisa 5

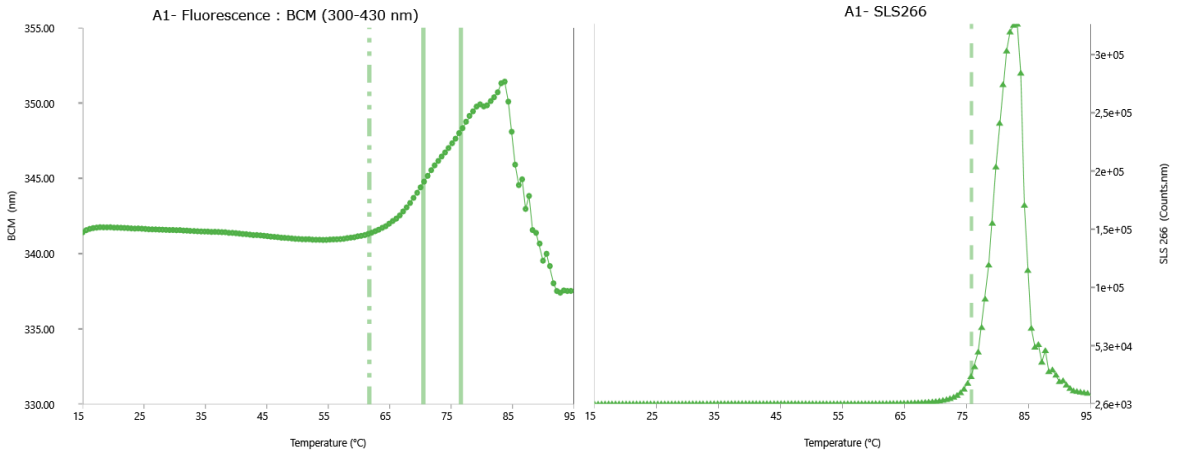
Redutseeritud proovide kapillaarelektroforeesi tulemused.



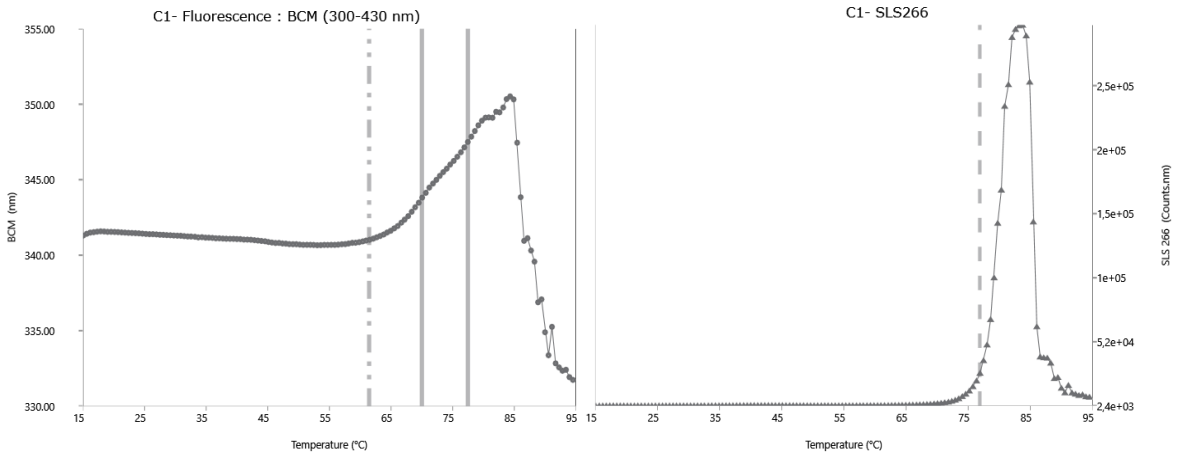
Lisa 6

NanoDSF analüüsimeetodil saadud BCM ja SLS graafikud proovi kontsentratsioonil 1 mg/ml.

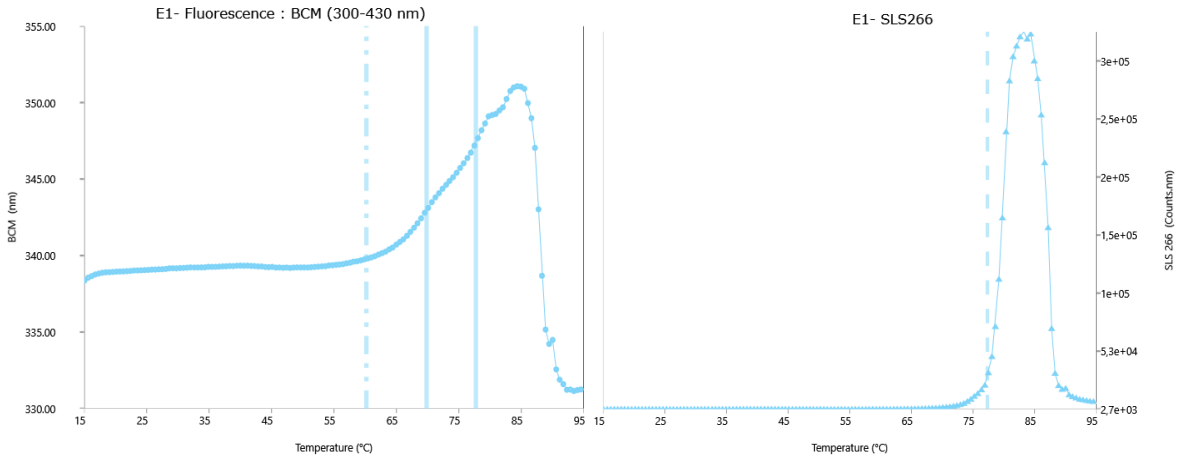
305 Originaal



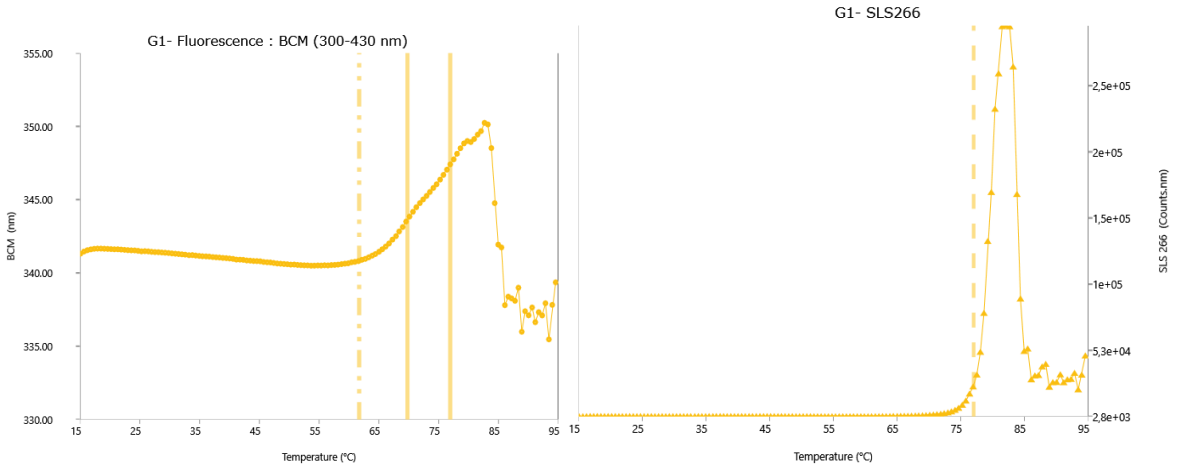
402 D42G HC



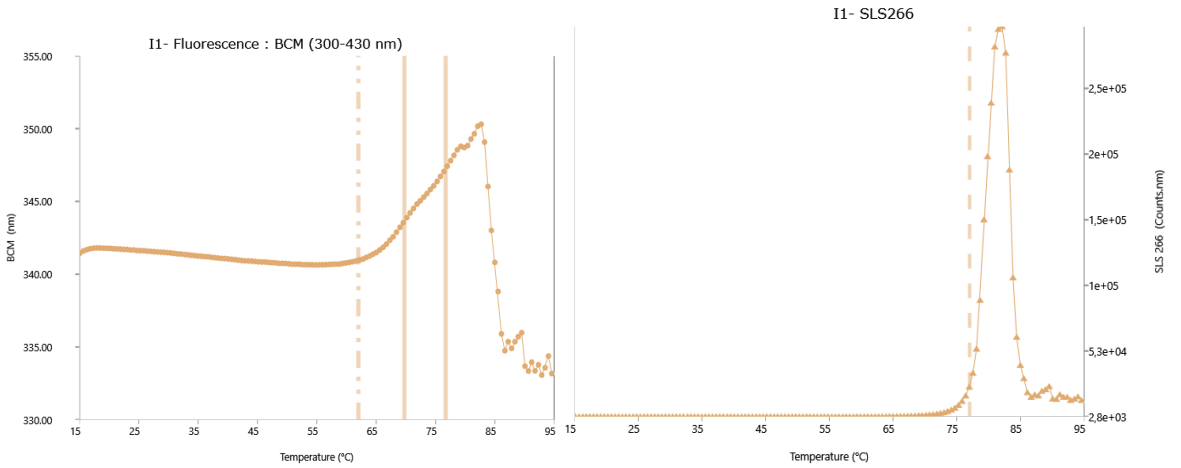
403 W58S HC



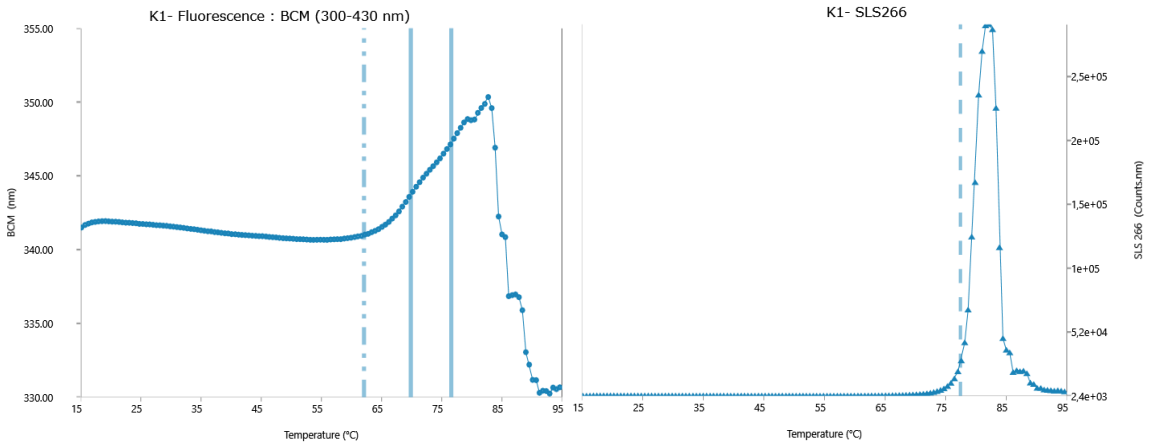
404 T63D HC



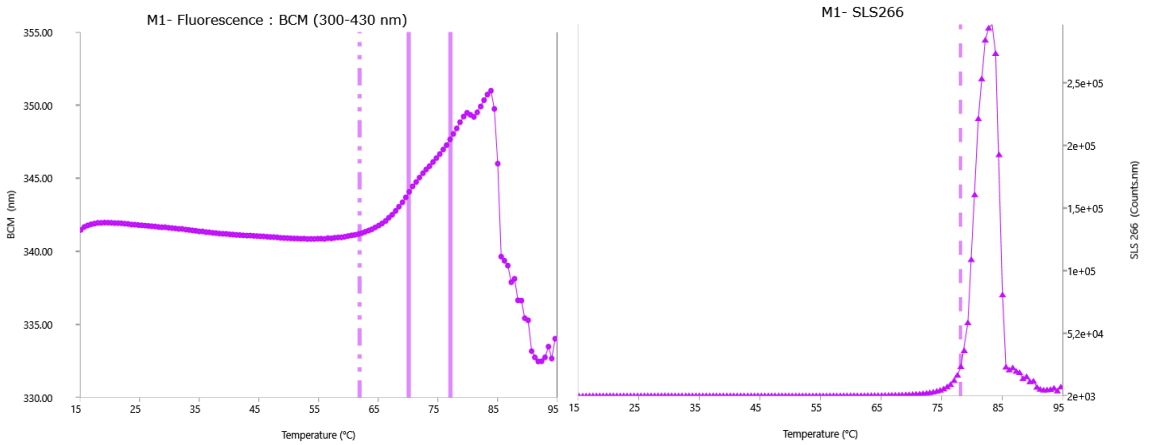
405 V64S HC



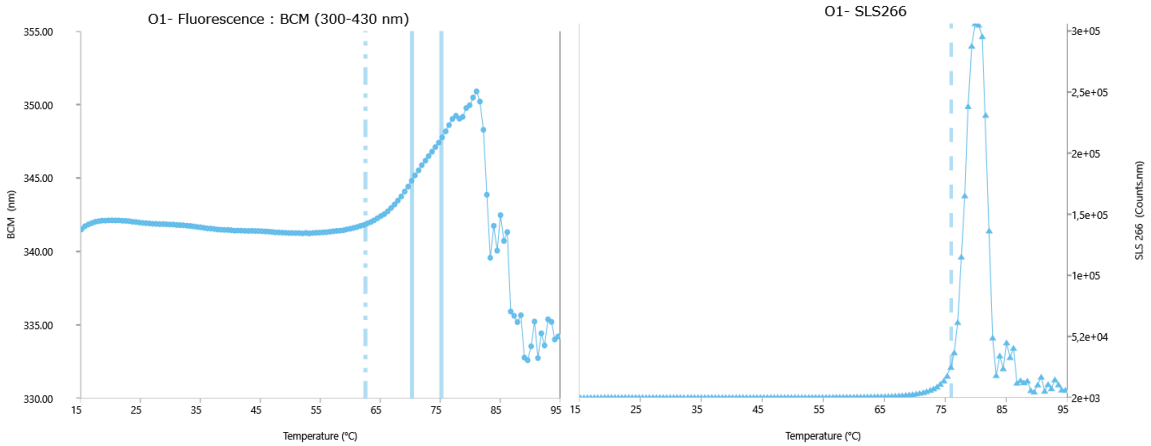
406 V64A HC



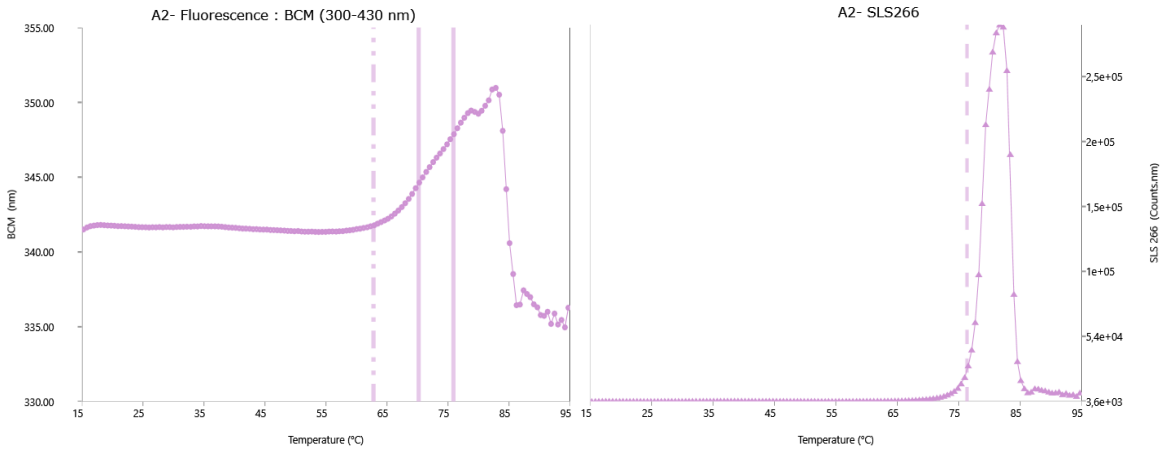
407 A90E HC



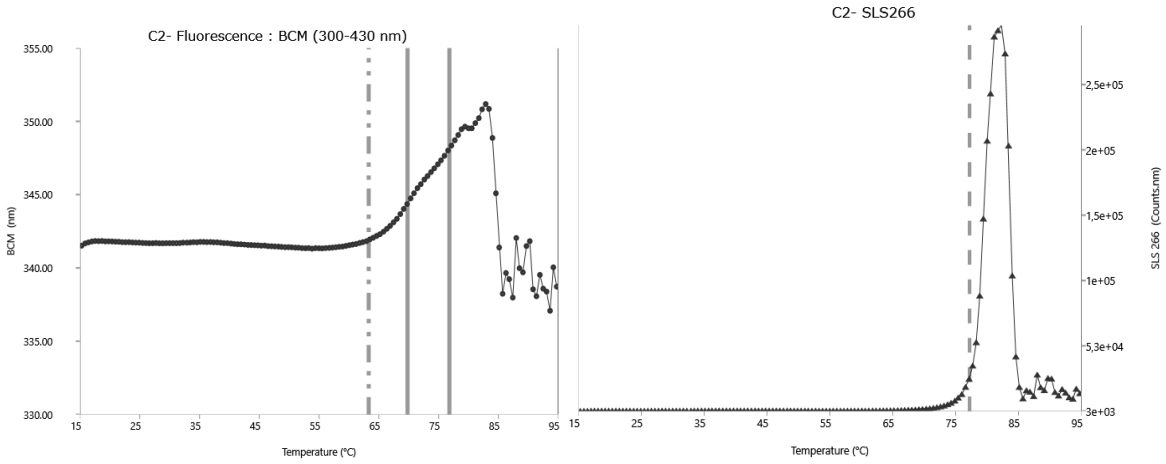
408 H116Q HC



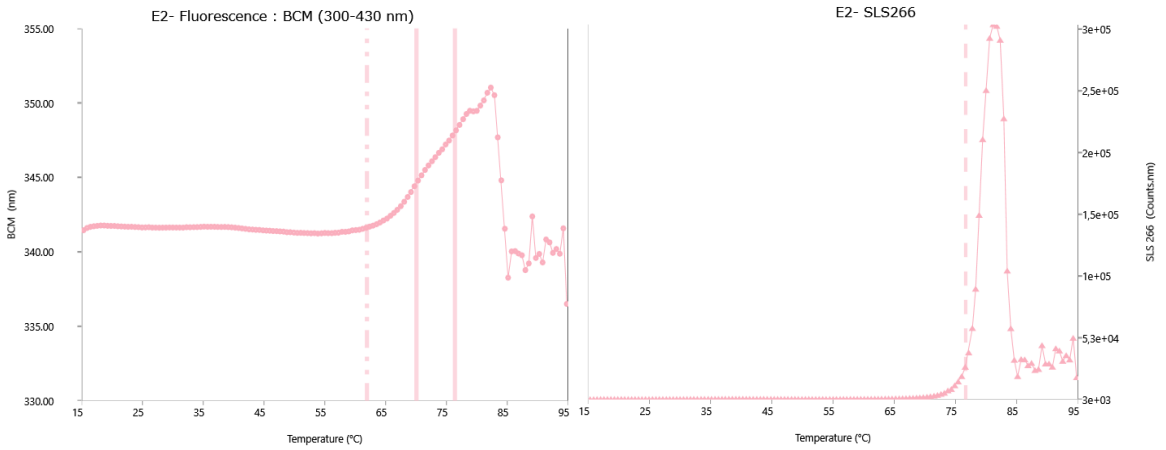
409 E119L HC



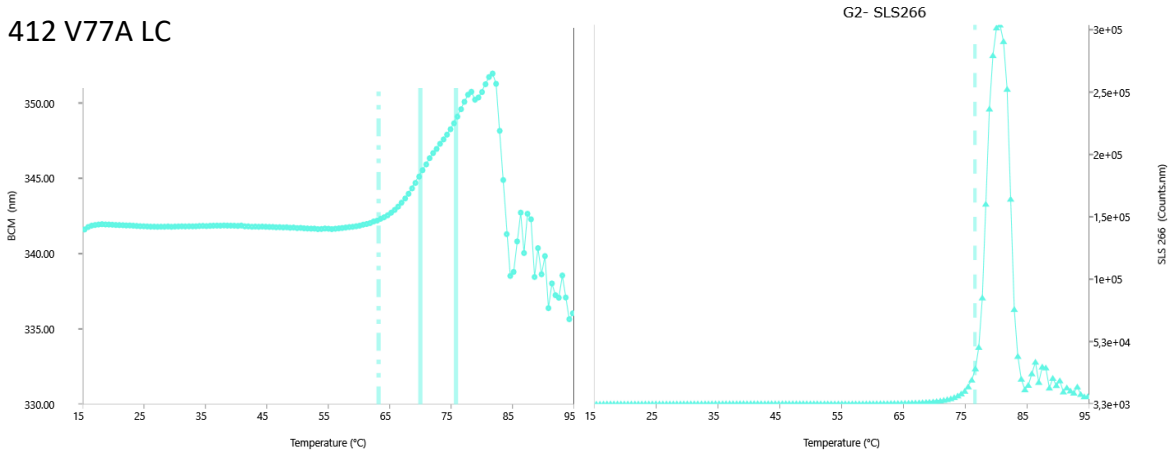
410 A1Q LC



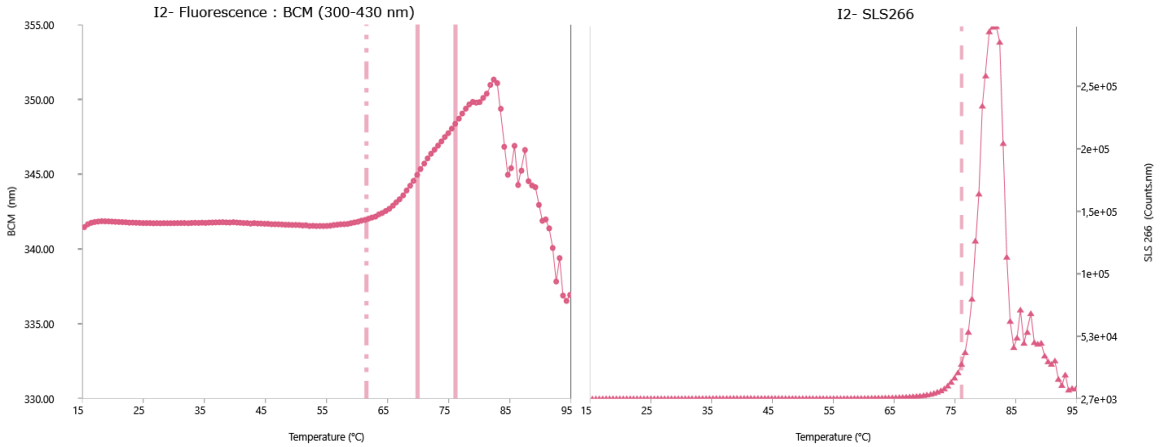
411 D54G LC



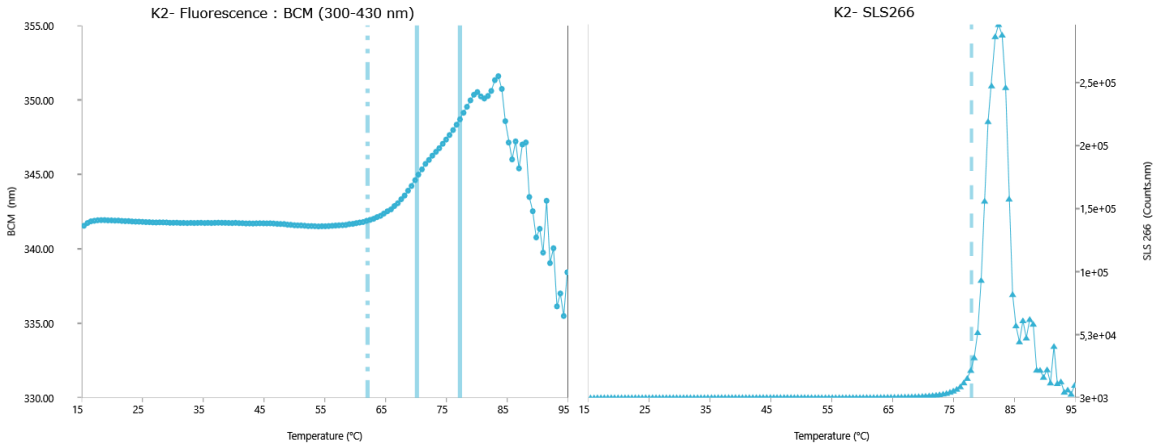
412 V77A LC



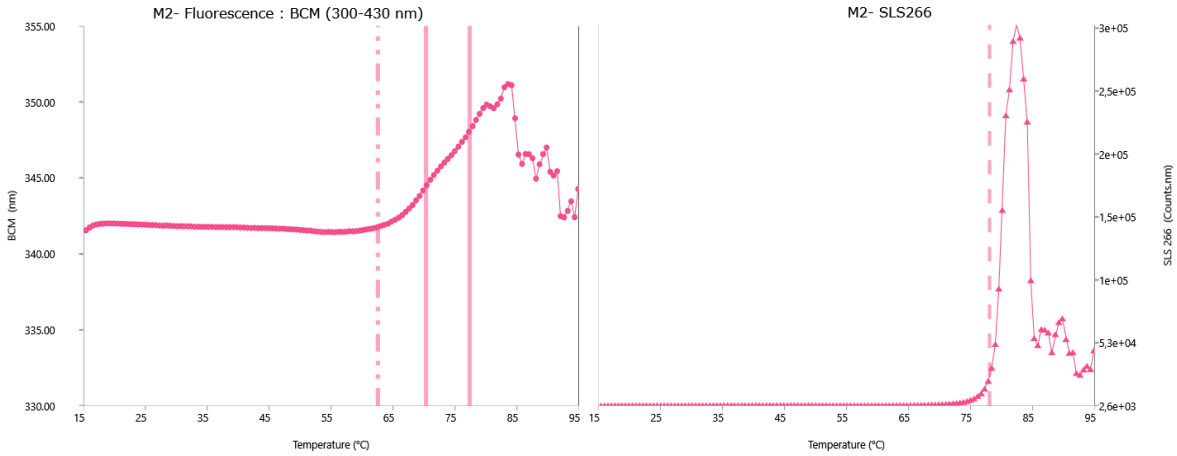
413 D5V HC



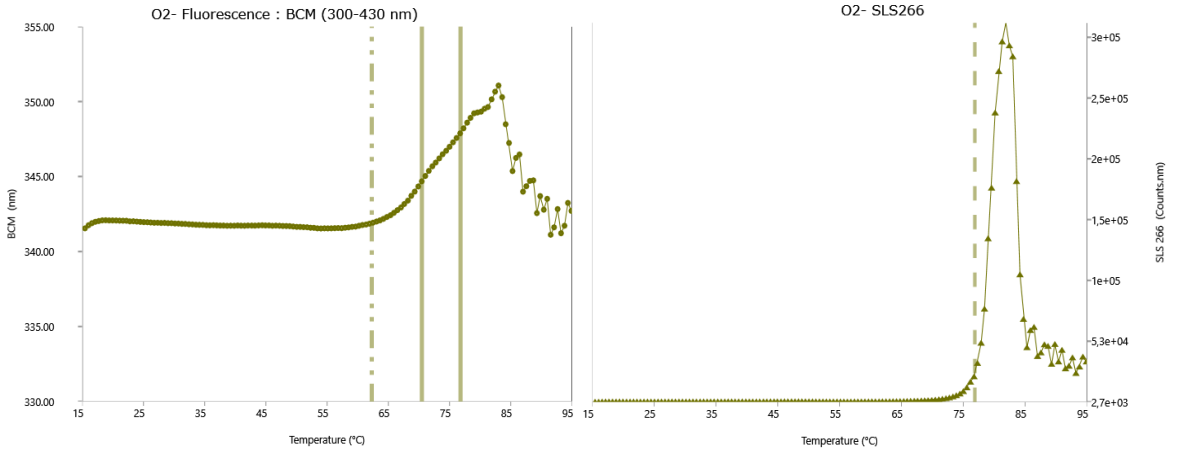
414 Q12V HC



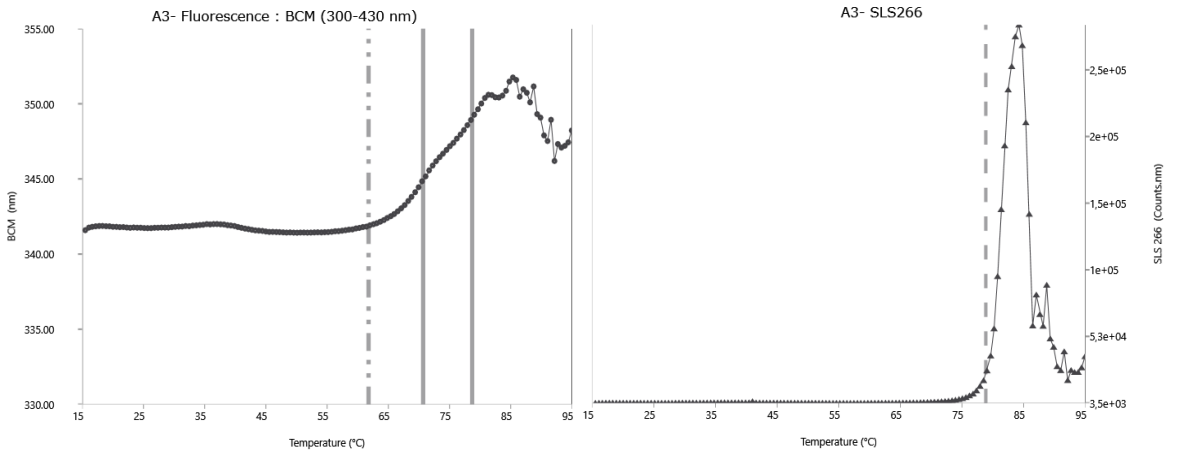
415 A17S HC



416 V21S HC



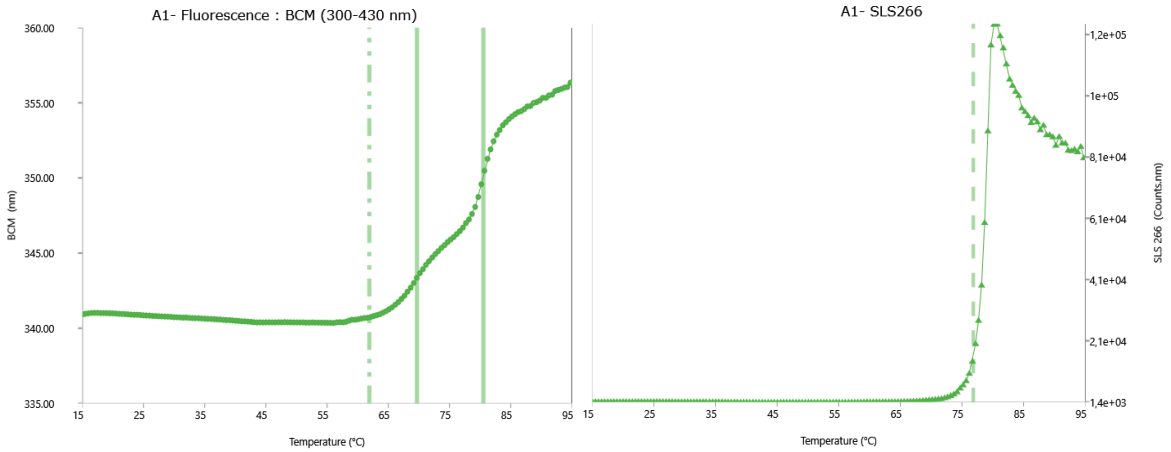
417 I34M HC



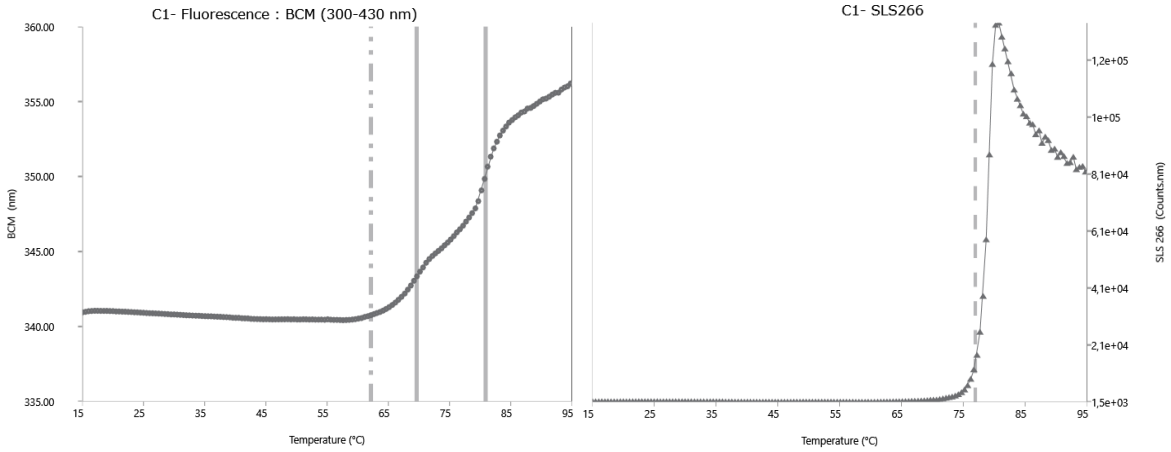
Lisa 7

NanoDSF analüüsimeetodil saadud BCM ja SLS graafikud proovi kontsentratsioonil 6-10 mg/ml.

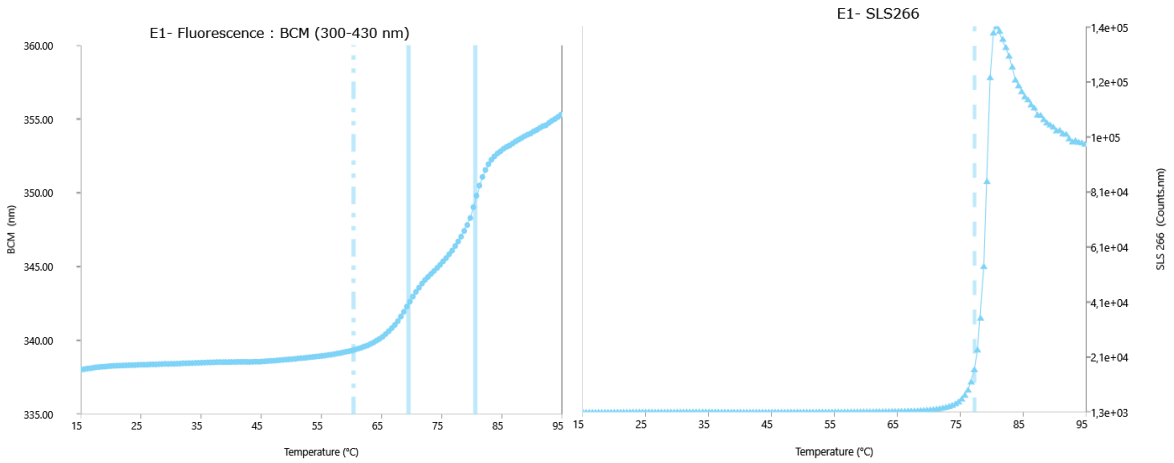
305 Originaal



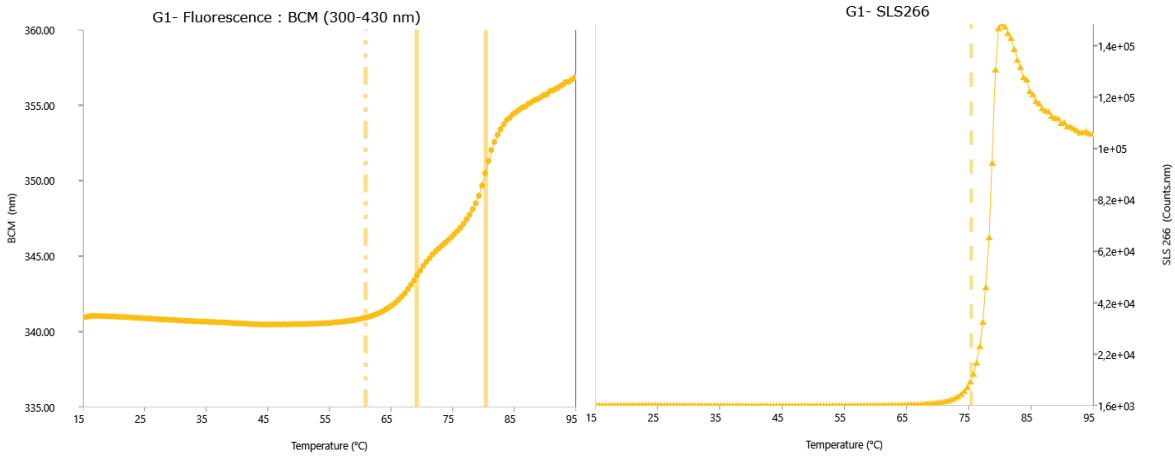
402 D42G HC



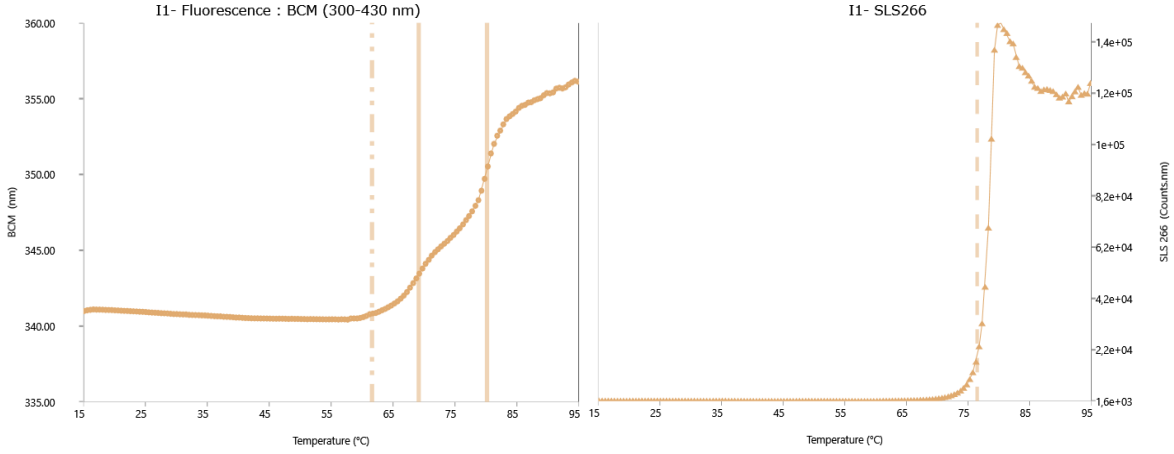
403 W58S HC



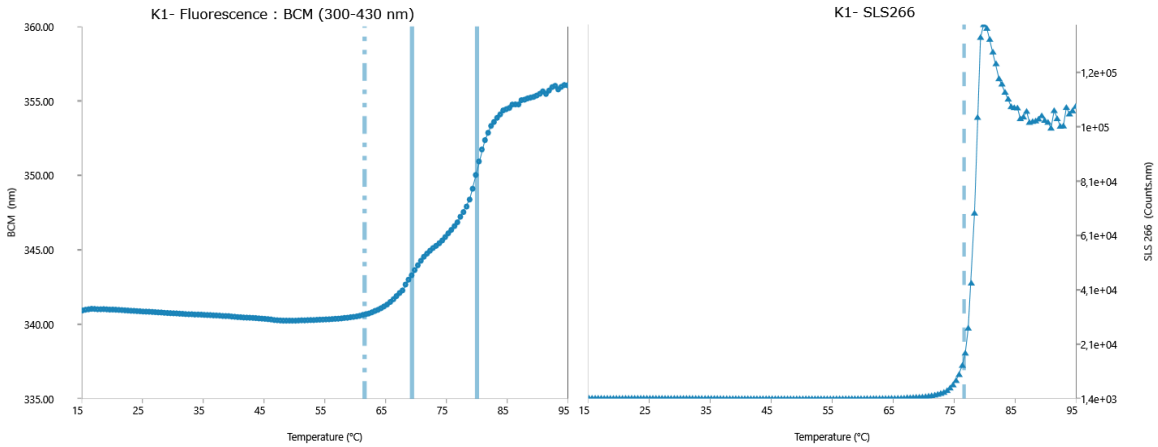
404 T63D HC



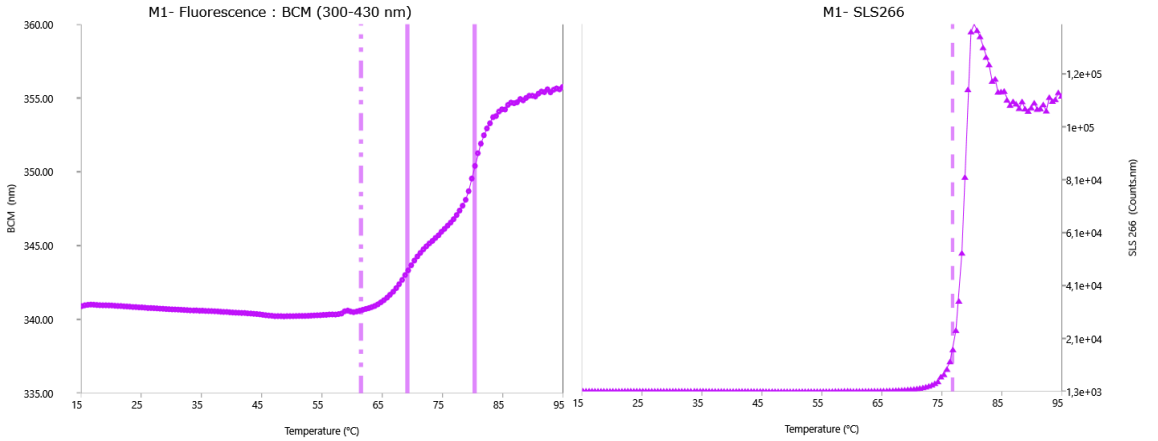
405 V64S HC



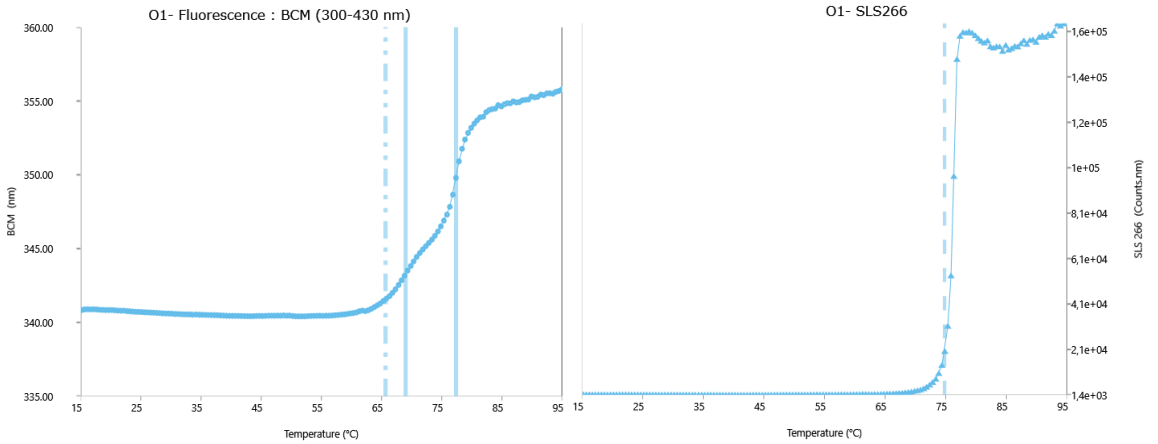
406 V64A HC



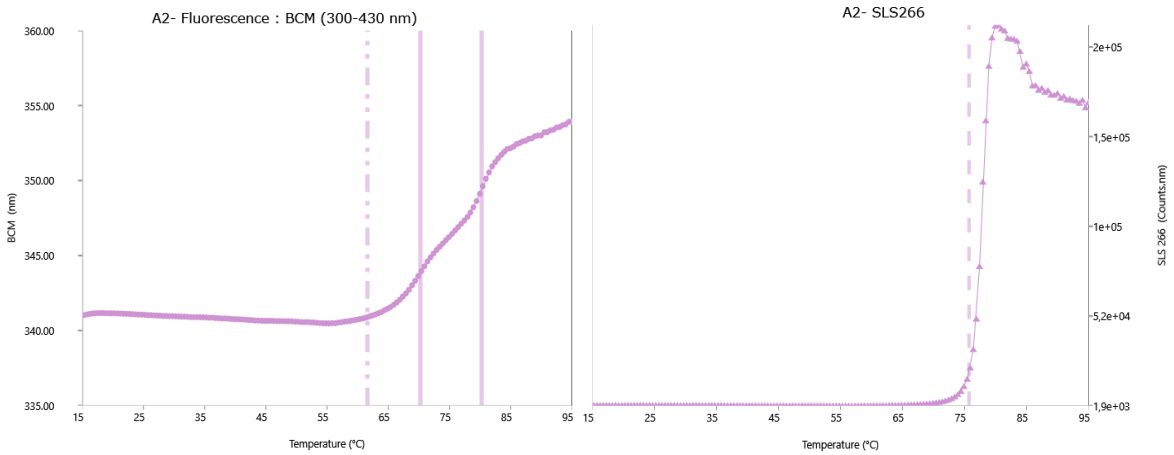
407 A90E HC



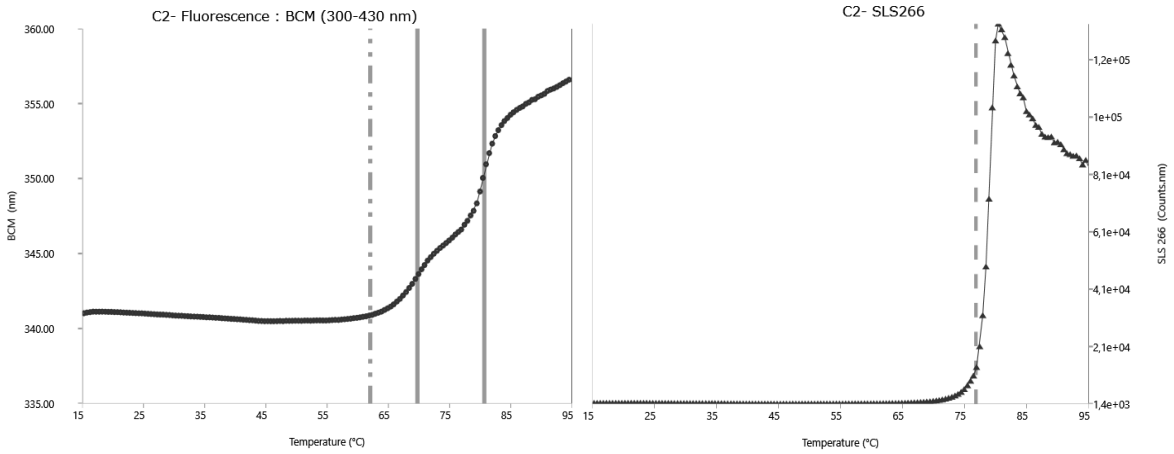
408 H116Q HC



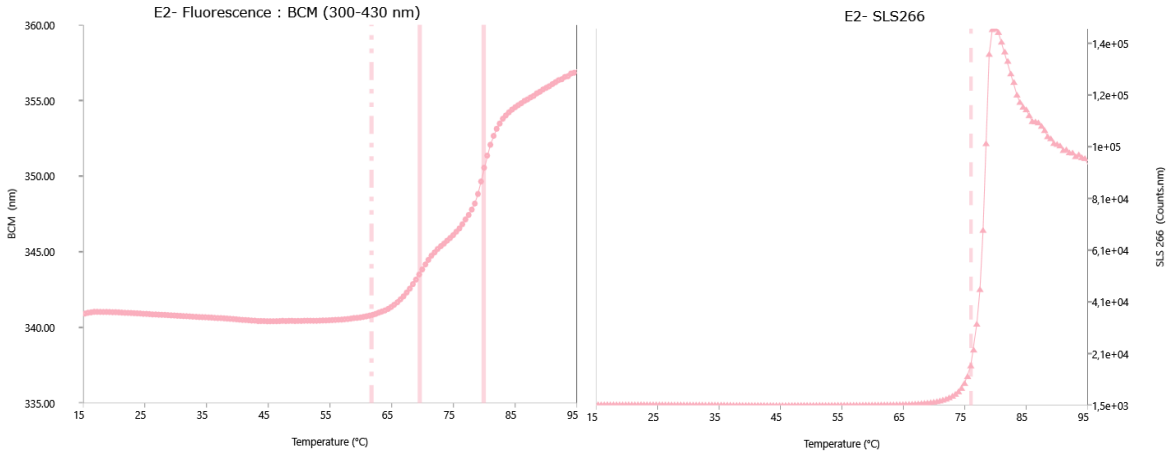
409 E119L HC



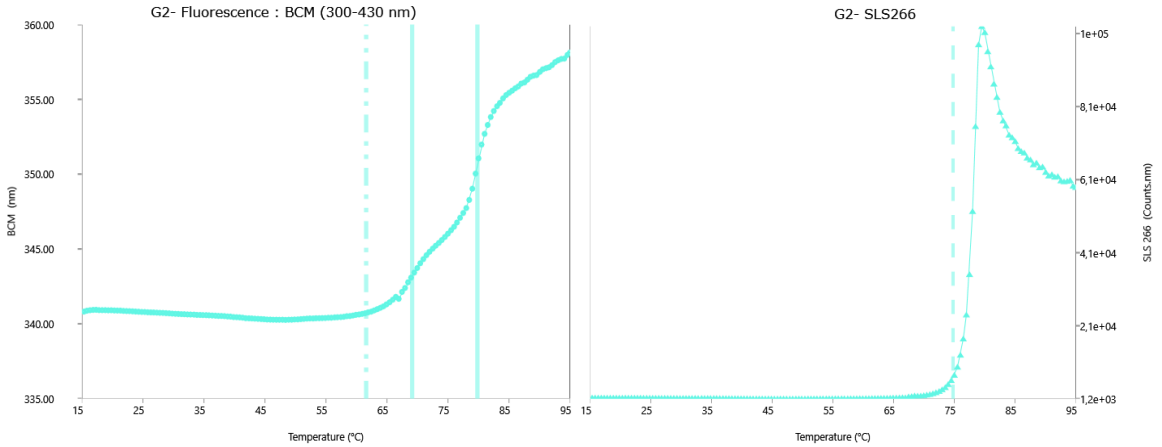
410 A1Q LC



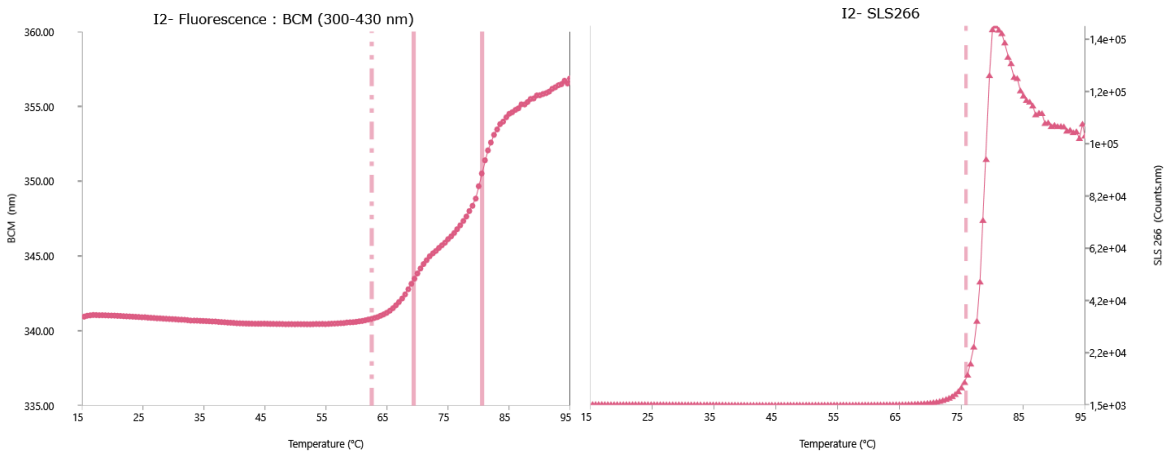
411 D54G LC



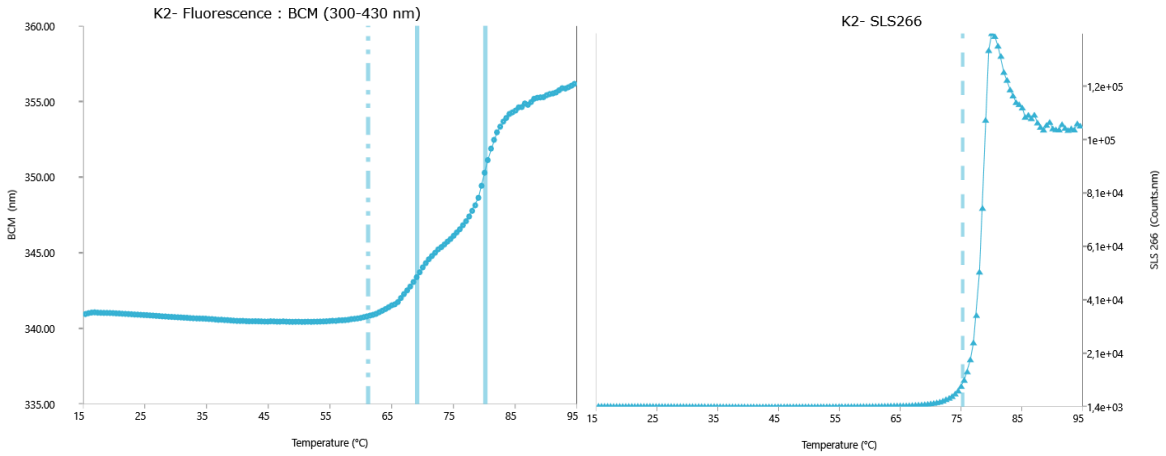
413 D5V HC



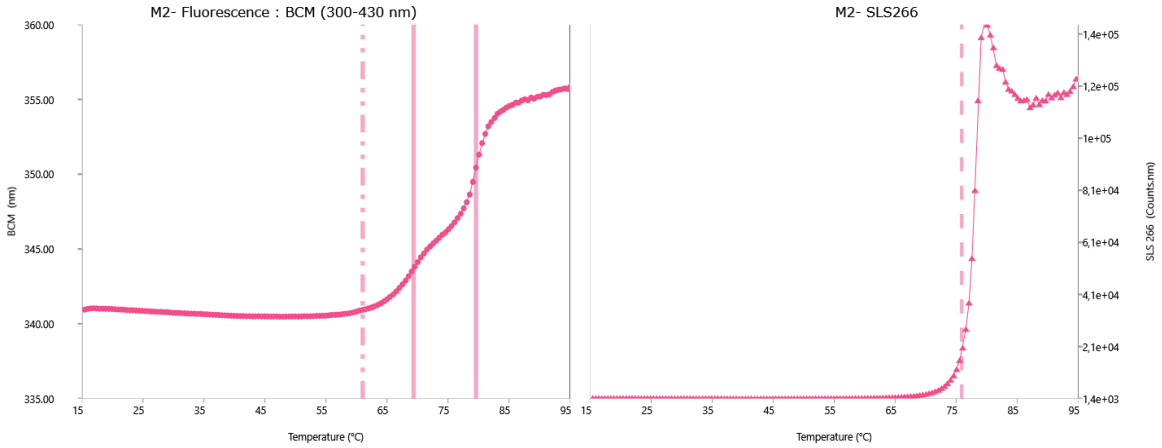
414 Q12V HC



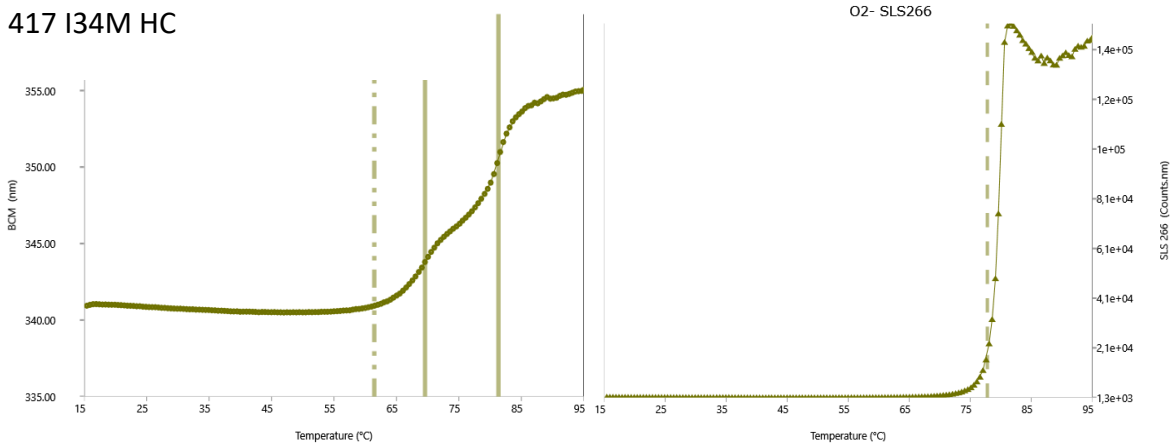
415 A17S HC



416 V21S HC



417 I34M HC



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Raimond Tilk,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Immunoglobuliin G omaduste parandamine keelemudelite abil GLUT1 vastase antikeha näitel“, mille juhendajad on Ave van der Hoek, Mihkel Saluri, Reet Kurg,

   reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Raimond Tilk

23.05.2025