

Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

**«Αναλυτικές και Ρυθμιστικές Προσεγγίσεις στον Καθορισμό
Πρότυπων Ποιότητας Θεραπευτικών Αντισωμάτων και Άλλων
Πρωτεϊνών»**

Κοψαχείλη Άννα

Επιβλέπων καθηγητής: Θεόδωρος Χριστόπουλος

Θεσσαλονίκη, Ιούνιος 2026

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του/της φοιτητή/φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

**«Αναλυτικές και Ρυθμιστικές Προσεγγίσεις στον Καθορισμό
Πρότυπων Ποιότητας Θεραπευτικών Αντισωμάτων και Άλλων
Πρωτεϊνών»**

Κοψαχείλη Άννα

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας
Επιβλέπων Καθηγητής:
Θεόδωρος Χριστόπουλος
Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Πατρών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Χριστόπουλο Θεόδωρο, για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς επίσης και για την άψογη συνεργασία μας.

Θεωρώ καθήκον μου να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την στήριξη που έλαβα καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	12
1. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	19
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	19
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	19
1.2.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΕΝΖΥΜΙΚΗ Ή ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	19
1.2.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΔΡΑΣΗ	19
1.2.3 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΜΒΟΛΙΑ-ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ	20
1.2.4 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	20
1.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ	21
1.4 ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ	22
1.5 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	23
1.5.1 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	24
1.5.2 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	24
1.5.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	25
1.5.4 ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	26
1.6 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	26
1.7 ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ	27
2. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	28
2.1 ΔΟΜΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	29
2.2 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ	31
2.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	32
2.3.1 ΟΨΩΝΙΣΜΟΣ	33
2.3.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ	34
2.3.3 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΣΟΛΑΒΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ADCC)	36
2.3.4 ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	37
2.4 ΤΑΞΕΙΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	38
2.4.1 Ανοσοσφαιρίνη M (IgM)	39
2.4.2 Ανοσοσφαιρίνη A (IgA)	40
2.4.3 Ανοσοσφαιρίνη G (IgG)	42
2.4.4 Ανοσοσφαιρίνη D (IgD)	42
2.4.5 Ανοσοσφαιρίνη E (IgE)	43

3. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	43
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	44
3.2 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	44
3.3 ΡΟΛΟΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	46
3.4 ΕΞΕΛΙΞΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	47
3.5 ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	49
3.6 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ.....	50
3.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	50
3.7.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΒΡΙΔΩΜΑΤΟΣ.....	50
3.7.2 ΧΙΜΑΙΡΙΚΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	51
3.7.3 ΑΝΘΡΩΠΟΠΗΜΕΝΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	53
3.7.4 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ.....	53
3.7.5 ΕΤΕΡΟΣΥΖΕΥΓΜΑΤΑ Ή ΔΙΕΙΚΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	53
3.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	55
3.9 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	57
3.10 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	57
3.11 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	59
4. ΚΡΙΣΙΜΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	60
4.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ CQAs ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	60
4.1.1 ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ (IDENTITY).....	60
4.1.1.1 ΠΡΩΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ.....	61
4.1.1.2 ΑΝΩΤΕΡΗ ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (HOS).....	61
4.1.2 ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ (PURITY AND IMPURITIES).....	61
4.1.2.1 ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ (SIZE VARIANTS).....	62
4.1.2.2 ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΦΟΡΤΙΟΥ (CHARGE VARIANTS).....	63
4.1.2.3 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ (PTMs).....	64
4.1.2.4 ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗ (AGGREGATION).....	64
4.1.3 ΔΟΜΙΚΗ ΑΚΕΡΑΙΟΤΗΤΑ (STRUCTURAL INTEGRITY).....	65
4.1.4 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ (STABILITY).....	65
4.1.4.1 ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ.....	65
4.1.4.2 ΦΥΣΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ.....	66
4.1.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ (POTENCY).....	67
4.1.6 ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ (IMMUNOGENICITY).....	68
5. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	68
5.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	68

5.1.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (RPLC)	69
5.1.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΓΕΘΩΝ (SEC)	69
5.1.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ (ΙΕΧ).....	71
5.1.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (HILIC, HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY).....	72
5.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	74
5.2.1 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΖΩΝΗΣ (CZE)	74
5.2.2 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ (CGE)	75
5.2.3 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ (CIEF).....	76
5.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	76
5.3.1 ΜΟΝΟΔΙΑΣΤΑΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ¹ H	77
5.3.2 ΠΟΛΥΔΙΑΣΤΑΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ¹ H.....	78
5.3.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FTIR).....	78
5.3.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ (CD).....	79
5.4 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	80
5.4.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC-MS).....	80
5.5 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	80
5.5.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	81
5.5.2 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ	81
5.6 ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ	82
5.6.1 ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΠΛΑΣΜΟΝΙΩΝ (SURFACE PLASMON RESONANCE, SPR).....	82
5.6.2 ΣΥΜΒΟΛΟΜΕΤΡΙΑ ΒΙΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ (BIO-LAYER INTERFEROMETRY, BLI).....	83
6. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ CQAs ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	83
6.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ	84
6.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ	84
6.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΔΟΜΙΚΗ ΑΚΕΡΑΙΟΤΗΤΑ	84
6.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ.....	85
6.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	86
6.6 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	86
7.ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	87
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	87
7.2 ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	87
7.3 ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΙCH ΓΙΑ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	88

7.4 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	92
7.5 ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ QUALITY BY DESIGN (QbD)	92
7.6 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ (QUALITY RISK MANAGEMENT, QRM)	93
7.7 ΣΥΓΚΡΙΣΙΜΟΤΗΤΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (COMPARABILITY ASSESSMENT)	95
7.8 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ (QUALITY SPECIFICATIONS)	95
8. ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ ΦΑΡΜΑΚΑ	96
8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	96
8.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	96
8.3 ΟΡΙΣΜΟΙ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	97
8.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	97
8.5 ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	98
8.5.1 ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ	98
9. ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ	101
9.1 BIOBETTERS	101
9.2 BIOSUPERIORS	102
9.3 NEXT-GENERATION BIOLOGICS	102
9.4 ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	103
10. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	103
10.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	103
10.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ (MULTI-ATTRIBUTE METHOD, MAM)	104
10.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ-ΔΕΥΤΕΡΙΟΥ (HDX-MS)	104
10.4 ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY, PAT)	105
10.5 ΔΟΚΙΜΗ ΕΚΔΟΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (REAL-TIME RELEASE TESTING, RTRT)	106
10.6 ΤΕΧΝΗΤΗ ΝΟΗΜΟΣΥΝΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΜΑΘΗΣΗ (AI/ML)	106
10.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	108

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι θεραπευτικές πρωτεΐνες και κυρίως τα μονοκλωνικά αντισώματα συγκαταλέγονται στις αναπτυσσόμενες κατηγορίες βιοφαρμακευτικών προϊόντων με συνεχώς αυξανόμενο ρόλο στη θεραπευτική αντιμετώπιση πολλών νοσημάτων.

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη συστηματική μελέτη σχετικά με τις σύγχρονες αναλυτικές και ρυθμιστικές προσεγγίσεις που καθορίζουν τα πρότυπα ποιότητας των θεραπευτικών αντισωμάτων και άλλων πρωτεϊνών. Αρχικά παρουσιάζονται οι βασικές κατηγορίες θεραπευτικών πρωτεϊνών, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους σε σύγκριση με τα συμβατικά φαρμακευτικά μόρια, καθώς και οι φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Στη συνέχεια αναλύονται η δομή, οι λειτουργίες και οι κατηγορίες των αντισωμάτων, με ιδιαίτερη έμφαση στα μονοκλωνικά αντισώματα, στην εξέλιξη των τεχνολογιών παραγωγής τους και στους μηχανισμούς μέσω των οποίων ασκούν τη θεραπευτική τους δράση.

Ακολουθεί ανάλυση των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας (CQAs), εστιάζοντας σε χαρακτηριστικά των θεραπευτικών πρωτεϊνών όπως ταυτότητα, καθαρότητα, δομική ακεραιότητα, σταθερότητα, βιολογική δραστικότητα και ανοσογονικότητα. Παράλληλα, αναλύονται οι πιο βασικές σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές χαρακτηρισμού και ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών που επιστρατεύονται για τον ποιοτικό έλεγχο (χρωματογραφικές, ηλεκτροφορητικές, φασματοσκοπικές, φασματομετρικές, ηλεκτροχημικές και εξειδικευμένες βιοφυσικές τεχνικές μελέτης μοριακών αλληλεπιδράσεων). Ακολούθως, συσχετίζονται τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας με τις κατάλληλες αναλυτικές μεθόδους.

Επιπρόσθετα, η εργασία εμβαθύνει στο ισχύον ρυθμιστικό πλαίσιο των θεραπευτικών πρωτεϊνών, δίνοντας έμφαση στις κατευθυντήριες οδηγίες ICH που υφίστανται για τα βιοφαρμακευτικά προϊόντα και στις απαιτήσεις για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων. Παρουσιάζονται οι αρχές Quality by Design, QbD, της διαχείρισης κινδύνου ποιότητας (Quality Risk Management, QRM) σε συνδυασμό με την αξιολόγηση συγκρισιμότητας (comparability assessment) και τον καθορισμό προδιαγραφών ποιότητας (quality specifications) αποτελώντας μάλιστα βασικούς πυλώνες των ρυθμιστικών προσεγγίσεων των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Αναλύονται επίσης τα βασικά χαρακτηριστικά και οι κατηγορίες των βιοομοειδών φαρμάκων, καθώς και οι σύγχρονες εξελίξεις στον τομέα των βιολογικών θεραπειών (biobetters, biosuperiors, next-generation biologics).

Η εργασία ολοκληρώνεται με την ανάδειξη μελλοντικών τάσεων που συμβάλλουν στη διαμόρφωση του αναλυτικού και ρυθμιστικού ελέγχου των θεραπευτικών πρωτεϊνών, όπως η μέθοδος πολλαπλών χαρακτηριστικών (Multi-Attribute Method, MAM), η φασματομετρία μάζας ανταλλαγής υδρογόνου-δευτερίου (HDX-MS), οι διεργασίες αναλυτικής τεχνολογίας (Process Analytical Technology, PAT), οι δοκιμές έκδοσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time Release Testing, RTRT) και οι εφαρμογές τεχνητής νοημοσύνης και μηχανικής μάθησης (AI/ML).

Συμπερασματικά, η παρούσα διπλωματική αναδεικνύει την καθοριστική σημασία που έχουν οι αναλυτικές και οι σύγχρονες ρυθμιστικές προσεγγίσεις στη διασφάλιση των προτύπων ποιότητας των θεραπευτικών πρωτεϊνών, συμβάλλοντας κατά αυτό τον

τρόπο στην ανάπτυξη ασφαλών, αποτελεσματικών και ποιοτικών βιοφαρμακευτικών προϊόντων.

Λέξεις-Κλειδιά: Θεραπευτικές πρωτεΐνες, Μονοκλωνικά αντισώματα, Κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας, Βιοομοειδή φάρμακα

ABSTRACT

Therapeutic proteins and particularly monoclonal antibodies, represent one of the fastest-growing categories of biopharmaceutical products, playing an increasingly important role in the treatment of a wide range of diseases.

The aim of this thesis is to provide a comprehensive analysis of the contemporary analytical and regulatory approaches that define the quality standards for therapeutic antibodies and other therapeutic proteins. Initially, the main categories of therapeutic proteins are presented, along with their distinctive characteristics compared to conventional small-molecule drugs and their pharmacokinetic properties. Subsequently, the structure, functions, and classes of antibodies are analyzed, with particular emphasis on monoclonal antibodies, the evolution of their production technologies, and the mechanisms through which they exert their therapeutic effects.

The thesis then focuses on Critical Quality Attributes (CQAs), focusing on characteristics of therapeutic proteins, including identity, purity, structural integrity, stability, biological activity, and immunogenicity. In parallel, the most important modern analytical techniques used for protein characterization and quality control are examined, including chromatographic, electrophoretic, spectroscopic, spectrometric, electrochemical, and specialized biophysical methods for the investigation of molecular interactions. Consequently, the critical quality attributes are systematically correlated with the appropriate analytical methods.

In addition, the thesis provides an in-depth review of the current regulatory framework governing therapeutic proteins, with particular emphasis on the International Council for Harmonisation (ICH) guidelines for biopharmaceutical products and the requirements for analytical method validation. The principles of Quality by Design (QbD), Quality Risk Management (QRM), combined with comparability assessment, and quality specifications are also presented as core pillars of the regulatory approaches applied to biopharmaceutical products. Moreover, the fundamental characteristics and categories of biosimilar products are analyzed, as well as recent advances in the field of biological therapies, including biobetters, biosuperiors, and next-generation biologics.

The thesis concludes by highlighting emerging trends that are shaping the future of analytical and regulatory control of therapeutic proteins, such as the Multi-Attribute Method (MAM), Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HDX-MS), Process Analytical Technology (PAT), Real-Time Release Testing (RTRT), and applications of Artificial Intelligence and Machine Learning (AI/ML).

In conclusion, this thesis emphasizes the critical role of advanced analytical methodologies and modern regulatory approaches in ensuring the quality standards of therapeutic proteins, thereby contributing to the development of safe, effective, and high-quality biopharmaceutical products.

Keywords: Therapeutic proteins, Monoclonal antibodies, Critical Quality Attributes (CQAs), Biosimilar products

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAV (Adeno-associated virus): Αδενοσυσχετιζόμενος ιός

ADAs (Anti-Drug Antibodies): Αντιφαρμακευτικά αντισώματα

ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity): Εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα

ADCs (Antibody-Drug Conjugates): Συζευγμένα Αντισώματα-Φάρμακα

AEX (Anion Exchange Chromatography): Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ανιόντων

AI (Artificial Intelligence): Τεχνητή Νοημοσύνη

BGE (Background electrolyte): Ηλεκτρολύτης Υποβάθρου

BLI (Bio-Layer Interferometry): Συμβολομετρία βιοστρωμάτων

CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-cell): Χιμαιρικός Υποδοχέας Αντιγόνου T κυττάρων

CD (Circular Dichroism): Κυκλικός διχρωισμός

CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity): Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από συμπλήρωμα

CDRs (Complementarity-Determining Regions): Υπερμεταβλητές περιοχές πρόσδεσης αντιγόνου

CE-MS (Capillary electrophoresis-mass spectrometry): τριχοειδής ηλεκτροφόρηση συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

CE-SDS (Capillary Electrophoresis - Sodium Dodecyl Sulfate): Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση με δωδεκυλοθειικό νάτριο

CEX (Cation Exchange Chromatography): Χρωματογραφία Ανταλλαγής Κατιόντων

CGE (Capillary Gel Electrophoresis): Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτής

CGE-SDS (Capillary Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate): Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτής με δωδεκυλοθειικό νάτριο

cIEF (Capillary isoelectric focusing): Τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση

CMAs (Critical Material Attributes): Κρίσιμα Χαρακτηριστικά Υλικών

CPPs (Critical Process Parameters): Κρίσιμες Παράμετροι Διεργασίας

CQAs (Critical Quality Attributes): Κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας

CRINEPT (Cross Relaxation-Enhanced Polarization Transfer): Μεταφορά Πόλωσης Ενισχυμένης από Διασταυρούμενη Χαλάρωση

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat): Ομαδοποιημένες, κανονικά διαχωρισμένες, κοντές παλινδρομικές επαναλήψεις

CZE (Capillary Zone Electrophoresis): Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης

CZE-MS (Capillary Zone Electrophoresis-Mass Spectrometry): Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας

dIgA (Dimeric IgA): διμερής IgA

DoE (Design of experiments): Σχεδιασμός πειραμάτων

DPPD (Dipeptide transport ATP-binding protein): Ανασυνδυασμένα καθαρισμένα παραγωγα πρωτεϊνης

DPV (Differential Pulse Voltammetry): Διαφορική Παλμική Βολταμετρία

EGF (Epidermal Growth Factor): Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor): Υποδοχέας Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα

EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy): Ηλεκτροχημική Φασματοσκοπία Εμπέδησης

EMA (European Medicines Agency): Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων

EOF (Electro-Osmotic Flow): Ηλεκτροσμωτική ροή

ESI (Electrospray Ionization): Ιοντισμός Ηλεκτροψεκασμού

ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry): Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού Ηλεκτροψεκασμού

Fab (Fragment antigen-binding): Σύνδεση αντιγόνου-θραύσματος

Fc (Fragment crystallizable): κρυσταλλώσιμο θραύσμα

FcR (Fc receptor): Υποδοχέας Fc

FcRn (neonatal Fc receptor): Νεογνικός υποδοχέας Fc

FDA (Food and Drug Administration): Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων

FMEA (Failure Mode and Effects Analysis): Ανάλυση Τρόπων και Επιπτώσεων Αστοχίας

FPLC-NMR (Fast Protein Liquid Chromatography with Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy): Ταχεία Υγρή Χρωματογραφία Πρωτεϊνών με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

FTA (Fault Tree Analysis): Ανάλυση Δέντρου Σφαλμάτων

FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance): Κυκλοτρονικός Συντονισμός Ιόντων με Μετασχηματισμό Fourier

FTICR-MS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance with Mass Spectrometry): Κυκλοτρονικός Συντονισμός Ιόντων με Μετασχηματισμό Fourier συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy): Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier

Gal (galactose): Γαλακτόζη

GalNAc (N-Acetylgalactosamine): N-Ακετυλογαλακτοζαμίνη

GC-MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry): Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας

GI (gastrointestinal): Γαστρεντερική

GlcN (Glucosamine): Γλυκοζαμίνη

GMP (Good Manufacturing Practices): Καλές Πρακτικές Παραγωγής

HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points): Ανάλυση Κινδύνου & Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου

HCPs (Host Cell Proteins): Πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή

HDX-MS (Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry): Φασματομετρία μάζας ανταλλαγής υδρογόνου-δευτερίου

HER (Human Epidermal Growth Factor Receptor): Υποδοχέας του Ανθρώπινου Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2): Υποδοχέας του Ανθρώπινου Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα τύπου 2

HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography): Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης

HMW (High Molecular Weight): Προϊόντα υψηλού μοριακού βάρους

¹H-NMR (Proton Nuclear Magnetic Resonance): Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός Πρωτονίου

HOS (Higher Order Structure): Ανώτερη Δομή

HPC (Hydroxypropyl cellulose): Υδροξυπροπυλοκυτταρίνη

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography): Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

HPLC-MS (High-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry): Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας

HPMC (Hydroxypropyl Methylcellulose): Υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη

ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use): Το Διεθνές Συμβούλιο για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φάρμακα για Ανθρώπινη Χρήση

icIEF (imaged Capillary Isoelectric Focusing): Απεικονιζόμενη τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση

ICs (Immune Complexes): Ανοσοσυμπλέγματα

IEF (Isoelectric Focusing): Ισοηλεκτρική Εστίαση

IEX (Ion Exchange Chromatography): Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Ig (Immunoglobulin): Ανοσοσφαιρίνη

IgA/ IgD/ IgE/ IgG/ IgM: Ανοσοσφαιρίνη A, D, E, G, M

IM (intramuscular): Ενδομυϊκή

IMMS (Ion mobility-mass spectrometry): Φασματοσκοπία μάζας κινητικότητας ιόντων

INN (International Nonproprietary Name): Διεθνής Μη Κατοχυρωμένη Ονομασία

IR (Infrared): Υπέρυθρο

ISD (In-Source Decay): Διάσπαση εντός πηγής

IV (intravenous): Ενδοφλέβια

J (Joining chain): Αλυσίδα σύνδεσης

kDa (kilodalton): Κιλοντάλτον (μονάδα μέτρησης)

LC-HRMS (Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry): Υγρή Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Ανάλυσης

LC-MS (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry): Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας

LIF (Laser-Induced Fluorescence): Φασματοσκοπία Εκπομπής Φθορισμού

LMW (Low Molecular Weight): Χαμηλού Μοριακού Βάρους

LOD (Limit of Detection): Όριο ανίχνευσης

LOQ (Limit of Quantitation): Όριο ποσοτικοποίησης

LPA (Linear Polyacrylamide): Γραμμικό πολυακρυλαμίδιο

mAbs (Monoclonal Antibodies): Μονοκλωνικά αντισώματα

MAC (Membrane Attack Complex): Σύμπλεγμα επίθεσης μεμβράνης

MALDI-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry): Φασματομετρία Μάζας συνδυασμένη με ιονισμό εκρόφησης με Υποβοήθηση από υλικό μήτρας και λέιζερ

MALS (Multi-Angle Light Scattering): Σκέδαση Φωτός Πολλαπλών Γωνιών

MAM (Multi-Attribute Method): Μέθοδος Πολλαπλών Χαρακτηριστικών

MASP-1 (Mannose-binding lectin serine protease 1): Πρωτεάση σερίνης-1 που σχετίζεται με τη λεκτίνη της μαννόζης

MASP-2 (Mannose-binding lectin serine protease 2): Πρωτεάση σερίνης-2 που σχετίζεται με τη λεκτίνη της μαννόζης

MBL (Mannose binding lectin): Λεκτίνη συνδεδεμένη με μαννόζη

ML (Machine Learning): Μηχανική μάθηση

mRNA (messenger RNA): αγγελιοφόρο RNA

Near-UV CD (Near-Ultraviolet Circular Dichroism): Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού σε Εγγύς Υπεριώδη Περιοχή

NeuAC (N-Acetylneuraminic acid): N-ακετυλονευραμινικό οξύ

NHL (Non-Hodgkin Lymphoma): Λέμφωμα μη Hodgkin

NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares): Μη γραμμικές επαναληπτικές μέθοδοι μερικών ελαχίστων τετραγώνων

NK (Natural killers): Φυσικά φονικά κύτταρα

NMR (Nuclear Magnetic Resonance): Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

PAT (Process Analytical Technology): Διεργασίες Αναλυτικής Τεχνολογίας

PCA (Principal Component Analysis): Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών

PDB (Protein Data Bank): Βάση δεδομένων πρωτεϊνών

PEO (Poly(ethylene oxide): Πολυαιθυλενοξείδιο

PGSTE (Pulsed Gradient Stimulated Echo): Ηχώ διέγερσης παλμικού πεδίου με διαβάθμιση

pI (isoelectric point): Ισοηλεκτρικό σημείο

pIgR (Polymeric Immunoglobulin Receptor): Υποδοχέας Πολυμερών Ανοσοσφαιρινών

PROFILE (PROtein Fingerprint by Line shape Enhancement): Ενίσχυση δακτυλικού αποτυπώματος πρωτεΐνης με σχήμα γραμμής

PROFOUND (Protein Fingerprint Observed Using NIPALS Decomposition): Πρωτεϊνικό αποτύπωμα που παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας την αποσύνθεση NIPALS

PTMs (Post-Translational Modifications): Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

QA (Quality attributes): Ποιοτικά Χαρακτηριστικά

QbD (Quality by Design): Ποιότητα εκ σχεδιασμού

QRM (Quality Risk Management): Διαχείριση Κινδύνου Ποιότητας

QTPP (Quality Target Product Profile): Προφίλ Προϊόντος Στόχου Ποιότητας

RI (Refractive Index): Δείκτης διάθλασης

RP-HPLC (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography): Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης

RP-LC (Reversed-Phase Liquid Chromatography): Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

RTRT (Real Time Release Testing): Δοκιμή έκδοσης σε πραγματικό χρόνο

SC (Subcutaneous): Υποδόρια

scFv-Fc (Single-chain variable fragment fused to crystallizable fragment): μονοαλυσιδωτό μεταβλητό τμήμα συγχωνευμένο με κρυσταλλώσιμο θραύσμα

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis): Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

SEC (Size Exclusion Chromatography): Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

SE-UHPLC (Size-Exclusion Ultra High-Performance Liquid Chromatography): Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους υπερυψηλής πίεσης

sIgA (secretory immunoglobulin A): εκκριτική ανοσοσφαιρίνη Α

sIgM (secretory immunoglobulin M): εκκριτική ανοσοσφαιρίνη Μ

siRNA (small interfering RNA): μικρό παρεμβαλλόμενο RNA

SPCE (Screen Printed Carbon Electrode): ηλεκτρόδιο άνθρακα με τυπωμένη οθόνη

SPE (Solid Phase Extraction): Εκχύλιση στερεάς φάσης

SPR (Surface Plasmon Resonance): Συντονισμός επιφανειακού πλάσμονιου

TETA (Triethylenetetramine): Τριαιθυλενοτετραμίνη

Tmax (Time to maximum concentration): Χρόνος για να προσεγγίσει ένα φάρμακο τη μέγιστη συγκέντρωση

TNF (Tumor Necrosis Factor): Παράγοντας νέκρωσης όγκων

TROSY (Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy): Φασματοσκοπία βελτιστοποιημένης εγκάρσιας χαλάρωσης

UV (Ultraviolet radiation): Υπεριώδης ακτινοβολία

VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor): Υποδοχέας Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα

WHO (World Health Organization): Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

2D-LC-MS (Two-Dimensional Liquid Chromatography with Mass Spectrometry): Δυσδιάστατη υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

MB: μοριακό βάρος

1. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Οι θεραπευτικές πρωτεΐνες αποτελούν βιολογικά δραστικά μακρομόρια κατάλληλα για χρήση σε πρόληψη, διάγνωση ή θεραπεία ασθενειών. Πρόκειται κατά κύριο λόγο για ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά παράγωγα που μιμούνται, ενισχύουν ή τροποποιούν φυσιολογικές βιολογικές λειτουργίες. Οι θεραπευτικές πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από υψηλή μοριακή μάζα, πολύπλοκη τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή, ευαισθησία σε φυσικοχημικές μεταβολές και εξάρτηση της δραστικότητάς τους από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση, γεγονός που τις διαφοροποιεί αισθητά από τα κλασικά φάρμακα που είναι μικρομοριακά (Dimitrov, 2012).

Αποτελούν βασική κατηγορία των βιοφαρμάκων (biopharmaceuticals) παραγόμενα μέσω της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA και αντιπροσωπεύουν σημαντικό ποσοστό των καινοτόμων εγκεκριμένων θεραπειών τα τελευταία έτη, ιδιαίτερα στην ογκολογία, την αυτοανοσία, την αιματολογία, το διαβήτη και τα σπάνια νοσήματα.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η κατηγοριοποίηση των θεραπευτικών πρωτεϊνών μπορεί να γίνει βάση της δομής, της λειτουργίας ή του μηχανισμού δράσης τους (Dimitrov, 2012). Όσον αφορά τις κατηγορίες βάση της λειτουργίας τους διακρίνονται οι ακόλουθες 4 ομάδες (Εικόνα 1)(Kumar et al., 2024):

1.2.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΕΝΖΥΜΙΚΗ Ή ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Στη συγκεκριμένη κατηγορία συγκαταλέγονται ορμόνες καθώς επίσης και αυξητικοί παράγοντες που αποτελούν ρυθμιστές ανάπτυξης και μεταβολισμού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ορμονών είναι η ινσουλίνη και η αυξητική ορμόνη ενώ παράδειγμα αυξητικού παράγοντα αποτελεί η ερυθροποιητίνη. Επιπλέον συγκαταλέγονται και οι κυτοκίνες όπως οι ιντερφερόνες, οι ιντερλευκίνες, και οι παράγοντες νέκρωσης όγκου που αποτελούν μικρές διαλυτές πρωτεΐνες με δράση κυτταρικών σημάτων ρυθμίζοντας το ανοσοποιητικό σύστημα (Kumar et al, 2024).

1.2.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΔΡΑΣΗ

Σε αυτή την κατηγορία ταξινομούνται πρωτεΐνες οι οποίες έχουν σχεδιαστεί με τρόπο που μπορούν να ανιχνεύουν αντιγόνα και να προσδένονται σε αυτά, ενεργοποιώντας ταυτόχρονα το ανοσοποιητικό σύστημα για να επέλθει η καταστροφή τους. Τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal

antibodies, mAbs), τα οποία όπως θα αναλυθεί και σε παρακάτω κεφάλαιο αποτελούν ανοσοσφαιρίνες οι οποίες έχουν παραχθεί από Β-λεμφοκύτταρα και ως ειδικό στόχο έχουν ένα αντιγόνο.

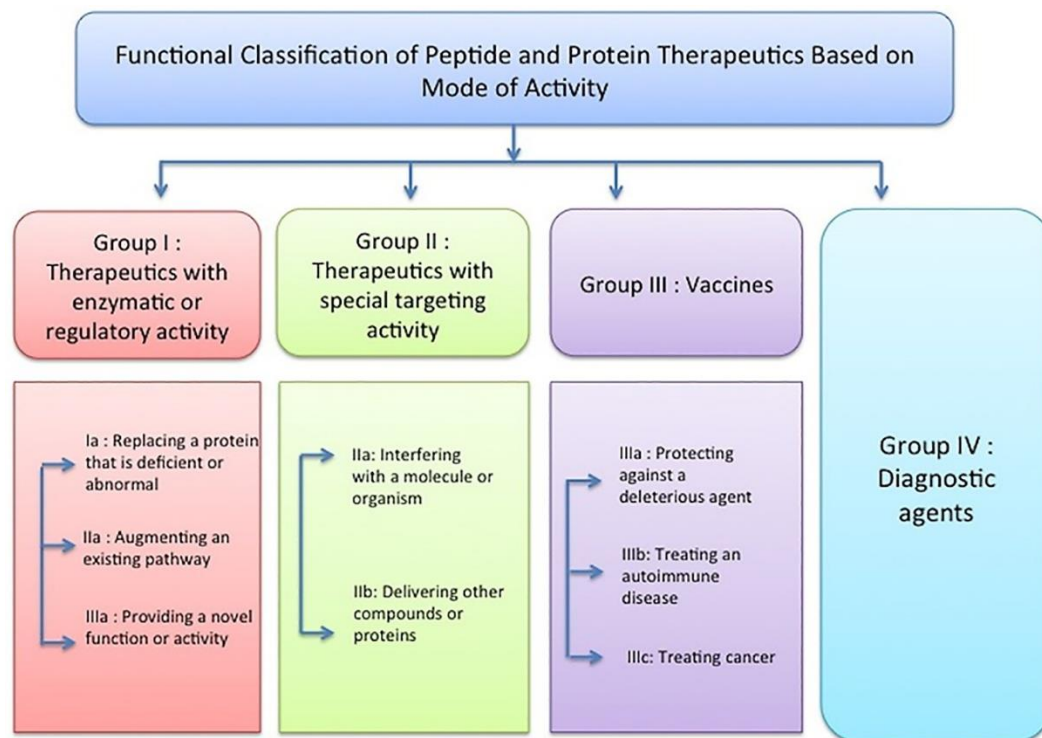
Επιπλέον παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες σύντηξης (fusion proteins) που περιέχουν την Fc περιοχή αντισωμάτων για αυξημένη διάρκεια ζωής και λειτουργικότητα. Στις πρωτεΐνες σύντηξης συνδυάζονται δύο διαφορετικά τμήματα-δομές πρωτεϊνών ώστε να επέλθει βελτιστοποίηση της φαρμακοκινητικής και της λειτουργίας.

1.2.3 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΜΒΟΛΙΑ-ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ

Πρόκειται για πρωτεΐνες οι οποίες χρησιμοποιούνται με στόχο την πρόκληση ανοσολογικής απόκρισης. Παράδειγμα αποτελεί το εμβόλιο έναντι ιού της ηπατίτιδας Β καθώς και έναντι ιού ανθρώπινων θηλωμάτων. Επιπλέον υποκατηγορία είναι αντι-ρέζους (Rh) IgG εμβόλιο, που χρησιμοποιείται στην τακτική πρόληψη μετά τον τοκετό με Rh (D) ανοσοποίηση σε Rh (D) αρνητικές γυναίκες (Kumar et al., 2024).

1.2.4 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι διαγνωστικές πρωτεΐνες αποτελούν πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση ασθενειών, όπως η ανίχνευση μολυσματικών ασθενειών και η ανίχνευση καρκίνου ως απεικονιστικός παράγοντας (Campos-Neto et al., 2001; Sodee et al., 2000). Αυτές οι πρωτεΐνες καθαρίζονται και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται για ιατρική διαγνωστική (in vivo και in vitro) (Kumar et al., 2024). Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών αποτελούν ανασυνδυασμένα καθαρισμένα παράγωγα πρωτεΐνης (DPPD) για τη διάγνωση της έκθεσης σε φυματίωση καθώς επίσης και πρωτεΐνες για απεικόνιση οξείας φλεβικής θρόμβωσης και για ανίχνευση καρκίνου του προστάτη (Campos-Neto et al., 2001; Coler et al., 2000; Sodee et al. 2000).



Εικόνα 1: Ταξινόμηση θεραπευτικών πρωτεϊνών (Usmani et al., 2017).

1.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ

Αρχικά αναφορικά με το μοριακό βάρος τα μικρομοριακά φάρμακα έχουν μικρό μέγεθος συνήθως κάτω από 900Da με συνέπεια να μπορούν να διαπερνούν με σχετική ευκολία τις κυτταρικές μεμβράνες δρώντας κατά αυτό τον τρόπο σε στόχους εντός του κυττάρου. Αντιθέτως οι θεραπευτικές πρωτεΐνες αποτελούν μακρομόρια μεγάλου μοριακού βάρους (5000-150.000 Da), γεγονός που περιορίζει την δράση τους κατά βάση σε στόχους εξωκυττάριους καθώς επίσης και σε υποδοχείς που εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια.

Αναφορικά με την δομή τους τα μικρομοριακά φάρμακα χαρακτηρίζονται από σταθερή και απλή χημική δομή σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζουν αρκετά πιο πολύπλοκη δομή με τέσσερα επίπεδα οργάνωσης (πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή). Μάλιστα χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρωτεϊνών αποτελεί η μεγάλη ετερογένεια τους λόγω των διαφορετικών ισομορφών που προκύπτουν από τις διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Σχετικά με την μέθοδο παραγωγής, τα μικρομοριακά φάρμακα παράγονται με την διαδικασία της χημικής σύνθεσης ενώ οι θεραπευτικές πρωτεΐνες βασίζονται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA κατά την οποία γίνεται εισαγωγή σε ένα κύτταρο ξενιστή του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας επιθυμητής πρωτεΐνης.

Σε αντίθεση με τα μικρομοριακά φάρμακα όπου εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα και πολλές φορές αποκλίσεις στις συνθήκες αποθήκευσης δεν επηρεάζουν τη δραστικότητα τους, οι θεραπευτικές πρωτεΐνες είναι αρκετά ευαίσθητες. Πιο συγκεκριμένα, κυριαρχεί φυσική αστάθεια με συνέπεια να προκύπτουν μεταβολές στην τρισδιάστατη δομή τους οδηγώντας έτσι και σε απώλεια της δραστικότητάς τους. Επιπλέον, συχνό φαινόμενο είναι η τάση για συσσωμάτωση που προκαλεί και αυτή με την σειρά της μείωση της δραστικότητας.

Τέλος, τα μικρά μόρια σπανίως ευθύνονται για ανοσολογική απόκριση εν αντιθέσει με τις θεραπευτικές πρωτεΐνες όπου πάντα είναι πιθανός ο κίνδυνος για πρόκληση ανοσολογικής απόκρισης. Η ανοσογονικότητα των θεραπευτικών πρωτεϊνών που επηρεάζεται από παράγοντες όπως η δομή των πρωτεϊνών, η τάση για συσσωμάτωση, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και η οδός χορήγησης, συμβάλλει πιθανότατα στη μείωση της αποτελεσματικότητας και στην πρόκληση ανεπιθύμητων ενεργειών.

Ακολουθεί πίνακας (Πίνακας 1) στον οποίον αποτυπώνεται η σύγκριση μεταξύ μικρομοριακών φαρμάκων και θεραπευτικών πρωτεϊνών.

Πίνακας 1: Σύγκριση μικρομοριακών φαρμάκων με θεραπευτικές πρωτεΐνες.

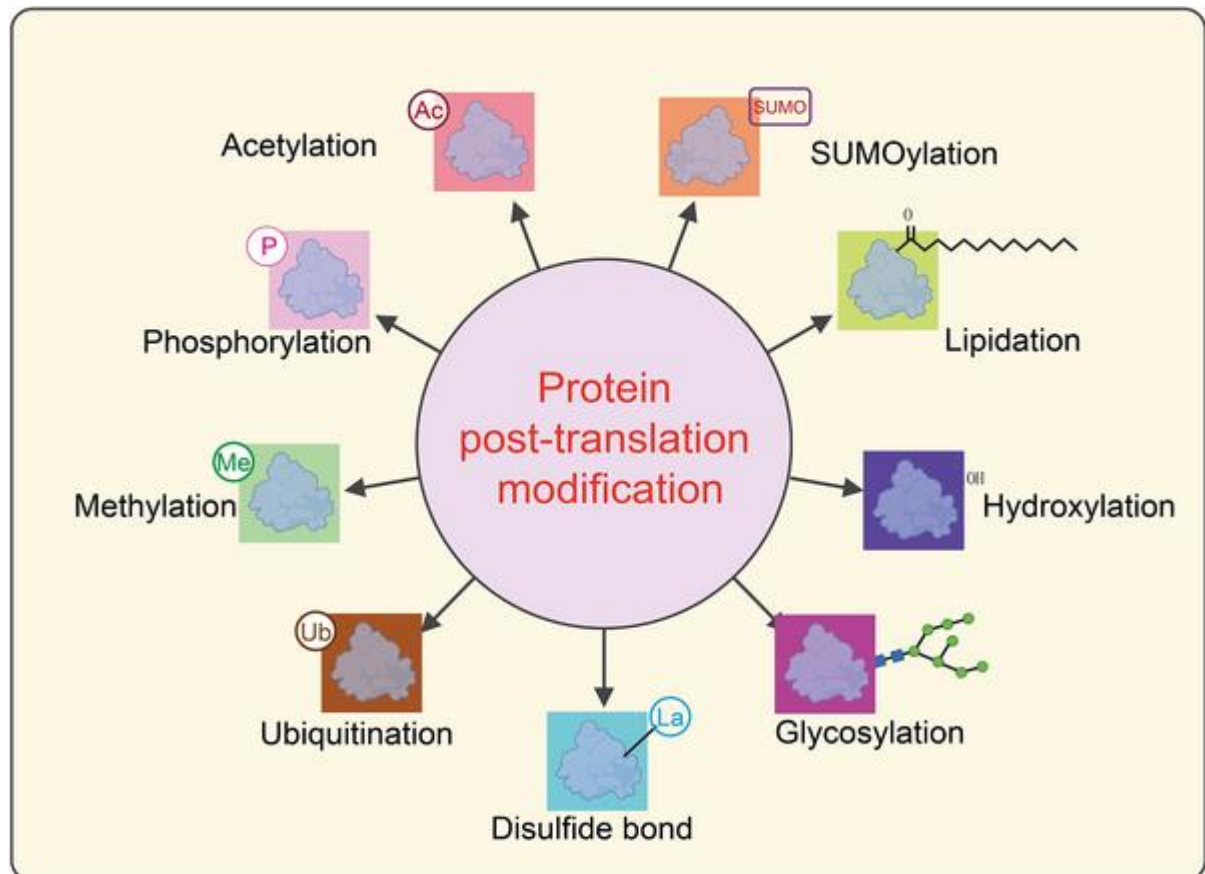
Χαρακτηριστικό	Μικρομοριακά φάρμακα	Θεραπευτικές πρωτεΐνες
Μέγεθος	Μικρό	Μεγάλο
Δομή	Απλή	Πολύπλοκη
Παραγωγή	Χημική σύνθεση	Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA
Σταθερότητα	Υψηλή	Ευαίσθητες (τάση για συσσωμάτωση)
Ανοσογονικότητα	Σπάνια	Πιθανή

1.4 ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Αναφορικά με την δομή θεραπευτικών πρωτεϊνών, είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη ακολουθώντας τα κλασικά επίπεδα πρωτεϊνικής δομής (πρωτοταγής / δευτεροταγής/ τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή).

Η πλειονότητα των βιοφαρμακευτικών προϊόντων με βάση πρωτεΐνες που έχουν εγκριθεί ή βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές φέρουν κάποια μορφή μετα-μεταφραστικής τροποποίησης (PTM) (Εικόνα 2), η οποία μπορεί να επηρεάσει βαθιά τη διαλυτότητα, την ανοσογονικότητα καθώς και τις ιδιότητες των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη θεραπευτική τους εφαρμογή, (Walsh & Jefferis, 2006). Ενώ η γλυκοζυλίωση αντιπροσωπεύει την πιο κοινή και σύνθετη τροποποίηση, ορισμένα προϊόντα

χαρακτηρίζονται από πρόσθετες, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της ακετυλίωσης, της γ-καρβοξυλίωσης, της β-υδροξυλίωσης, της θείωσης, της οξείδωσης, της απαμίδωσης, του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών και της πρωτεολυτικής επεξεργασίας (Walsh & Jefferis, 2006; Walsh, 2010). Η σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας είναι κατανοητή για πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, αλλά παραμένει ατελής για άλλες, ιδιαίτερα στην περίπτωση σύνθετων τροποποιήσεων, όπως η γλυκοζυλίωση.



Εικόνα 2: Ταξινόμηση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που υφίστανται οι θεραπευτικές πρωτεΐνες (Chen et al., 2025).

1.5 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η φαρμακοκινητική είναι ο κλάδος που συμπεριλαμβάνει διεργασίες απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απομάκρυνσης των θεραπευτικών πρωτεϊνών. Η κατανόηση μάλιστα της φαρμακοκινητικής είναι απαραίτητη έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η ανάπτυξη, η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια βιοφαρμακευτικών προϊόντων.

1.5.1 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Σε αντίθεση με τα μικρά μόρια, τα οποία χορηγούνται συχνά μέσω από του στόματος χορήγησης, οι θεραπευτικές πρωτεΐνες χορηγούνται σχεδόν αποκλειστικά μέσω παρεντερικών οδών, όπως ενδοφλέβια (IV), υποδόρια (SC) ή ενδομυϊκή (IM) ένεση. Το μοριακό μέγεθος, η υδροφιλικότητα και η γαστρική αποικοδόμηση είναι οι κύριοι παράγοντες που εμποδίζουν τη γαστρεντερική (GI) απορρόφηση θεραπευτικών πρωτεϊνών (Keizer et al., 2010).

Από την άποψη της ευκολίας, η SC χορήγηση θεραπευτικών πρωτεϊνών είναι συχνά μια προτιμώμενη οδός (Vugmeyster et al., 2012). Η απορρόφηση γίνεται μέσω του λεμφικού συστήματος. Συγκεκριμένα, η καταλληλότητα της SC δοσολογίας για αυτοχορήγηση μεταφράζεται σε σημαντικά μειωμένο κόστος θεραπείας. Η απορρόφηση θεραπευτικών πρωτεϊνών από το σημείο ένεσης SC σε σύγκριση με τα μικρά μόρια θεωρείται πιο αργή και οι ρυθμοί απορρόφησης εξαρτώνται από το μέγεθος του μορίου. Για παράδειγμα, μετά από υποδόρια χορήγηση, ο χρόνος για την επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης (T_{max}) στους ανθρώπους για τα πεπτίδια είναι της τάξης των ωρών, ενώ η T_{max} για τα mAbs είναι γενικά αρκετές ημέρες (Lichtenstein et al., 2008; Mannaerts et al., 1998).

Γενικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν τις παραμέτρους απορρόφησης της SC πιστεύεται ότι περιλαμβάνουν εγγενή χαρακτηριστικά του ατόμου για ένα δεδομένο είδος (όπως σωματικό βάρος, φύλο, ηλικία, επίπεδο δραστηριότητας), χαρακτηριστικά του είδους σε σχέση με τη μορφολογία και τη φυσιολογία του δέρματος (όπως ο μέγιστος όγκος ένεσης SC που ποικίλλει ανά είδος, η καταβολική ικανότητα στο σημείο ένεσης ή/και στο λεμφικό σύστημα, η ροή αίματος της SC), χαρακτηριστικά της φαρμακευτικής ουσίας και του προϊόντος (παρουσία Fc, αλληλεπιδράσεις στόχου, φορτίο, σύνθεση, συγκέντρωση δόσης, συνολική δόση) και τρόπος χορήγησης (σημείο ένεσης, χρόνος ένεσης, βάθος ένεσης, κατάσταση αναισθησίας) (Keizer et al., 2010; Lin, 2009).

1.5.2 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η κατανομή των θεραπευτικών πρωτεϊνών στους ιστούς συνήθως περιορίζεται λόγω του μεγέθους των μορίων, σε αντίθεση με τα φάρμακα μικρών μορίων που τείνουν να έχουν υψηλότερη διείσδυση στους ιστούς. Εκτός από το μέγεθος, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή μιας θεραπευτικής πρωτεΐνης στους ιστούς περιλαμβάνουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. σχήμα και φορτίο), τις ιδιότητες σύνδεσης (π.χ., πρόσληψη μέσω υποδοχέα), την οδό χορήγησης (π.χ., ενδοφλέβια έναντι υποδορίως, σύνθεση) και τη διαδικασία παραγωγής (η οποία μπορεί να επηρεάσει τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση) (Vugmeyster et al., 2012). Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να τροποποιηθούν μέσω ορθολογικού σχεδιασμού για τη ρύθμιση των ιδιοτήτων διείσδυσης στους ιστούς ενός

βιοθεραπευτικού μορίου. Η χορήγηση θεραπευτικών βιολογικών προϊόντων σε ιστούς ή στόχους είναι ένας απαιτητικός, αλλά και πολύ ελκυστικός τομέας για φαρμακευτική έρευνα. Για τα mAbs και άλλες μεγάλες θεραπευτικές πρωτεΐνες, ο αναφερόμενος όγκος κατανομής μετά από ενδοφλέβια χορήγηση είναι κοντά στον όγκο του πλάσματος, γεγονός που υποδηλώνει περιορισμένη κατανομή στους ιστούς (Dong et al., 2011). Παρά την περιορισμένη διείσδυση στους ιστούς, τα μεγάλα βιοθεραπευτικά, όπως τα mAbs, συχνά έχουν αποτελεσματικότητα ακόμη και σε περιπτώσεις όπου η θέση δράσης πιστεύεται ότι είναι ο ιστός, υποδεικνύοντας ότι είναι δυνατό να σχεδιαστεί ένα θεραπευτικό σχήμα έτσι ώστε η έκθεση στους ιστούς να είναι επαρκής για να ρυθμίσει τον στόχο στη θέση δράσης. Αξίζει να σημειωθεί πως οι θεραπευτικές πρωτεΐνες παραμένουν κατά κύριο λόγο στο αγγειακό διαμέρισμα και στο διάμεσο υγρό των ιστών.

Η πρόσληψη θεραπευτικών πρωτεϊνών στα κύτταρα μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μεταφορέων που προκαλούνται από υποδοχείς (π.χ., υποδοχείς Fc, που συχνά οδηγούν σε ανακύκλωση του μορίου) ή άλλων διεργασιών εσωτερίκευσης, όπως ενδοκυττάρωση ή πινोकυττάρωση (που συχνά οδηγεί σε αποικοδόμηση του μορίου). Έχει επίσης αναφερθεί κατανομή στους ιστούς που προκαλείται από στόχους για ορισμένα mAbs (Urva & Balthasar, 2010; Vugmeyster et al., 2010). Έχουν αναφερθεί υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκων στους νεφρούς και το ήπαρ για πεπτίδια, πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους και ολιγονουκλεοτίδια (Amantana & Iversen, 2005). Κατά την πρόσληψη από τους ιστούς, ο μεταβολισμός των πρωτεϊνικών φαρμάκων θα συμβεί στους ιστούς πριν τα υπολείμματα των μορίων αποβληθούν από το σώμα ως μικρότερα πεπτίδια και προϊόντα αποικοδόμησης αμινοξέων ή ανακυκλωθούν για σύνθεση σε άλλες πρωτεΐνες στο σώμα.

1.5.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι θεραπευτικές πρωτεΐνες απομακρύνονται από την κυκλοφορία ή το ενδιάμεσο υγρό μέσω διαφόρων οδών: αποικοδόμηση μέσω πρωτεόλυσης, κάθαρση που προκαλείται από υποδοχέα Fcγ, κάθαρση που προκαλείται από στόχο, μη ειδική ενδοκυττάρωση και σχηματισμός ανοσοσυμπλεγμάτων (ICs) ακολουθούμενοι από μηχανισμούς κάθαρσης που προκαλούνται από συμπλήρωμα ή υποδοχέα Fc. Ενώ η πρωτεόλυση συμβαίνει ευρέως στο σώμα, η κινητική δεν είναι πλήρως κατανοητή, ειδικά για μεγάλες θεραπευτικές πρωτεΐνες όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs). Μόλις απορροφηθεί από τα κύτταρα, ένα βιοθεραπευτικό φάρμακο μπορεί να μεταβολιστεί σε μικρότερα πεπτίδια ή ελεύθερα αμινοξέα τα οποία μετέπειτα αποβάλλονται ή επαναχρησιμοποιούνται με στόχο την σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Ο μεταβολισμός σε αμινοξέα ή πεπτίδια δύναται να πραγματοποιηθεί στην κυκλοφορία από τα υπάρχοντα φαγοκύτταρα ή από κύτταρα-στόχους με αντιγόνο ή σε ιστούς μέσω συμβολής διαφόρων κυττάρων. Όσον αφορά μόρια με Fc (συμπεριλαμβανομένων θεραπευτικών

mAbs, και πρωτεϊνών σύντηξης), η σύνδεση της περιοχής Fc με γ -υποδοχείς Fc προκαλεί πιθανή εσωτερίκευση και ακολούθως αποικοδόμηση από λυσοσώματα στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (π.χ., μακροφάγα και μονοκύτταρα) (Keizer et al., 2010; Mould & Green, 2010; Raghavan & Bjorkman, 1996). Εναλλακτικά, σε ενδοθηλιακά κύτταρα, αυτά τα μόρια με Fc δεν αποικοδομούνται λόγω σύνδεσης με προστατευτικούς υποδοχείς [νεογνικός υποδοχέας Fc (FcRn)], συμβάλλοντας έτσι σε μεγάλους χρόνους ημιζωής (έως 4 εβδομάδες) αυτών των πρωτεϊνών (Vugmeyster et al., 2012).

1.5.4 ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η αποβολή των προϊόντων που προκύπτουν από την αποικοδόμηση πρωτεϊνών και των βιολογικών προϊόντων χαμηλού μοριακού βάρους (MB) ($MB < 30$ kDa) πραγματοποιείται μέσω νεφρικής απέκκρισης (Vugmeyster et al., 2012). Βιβλιογραφικά έχει αναλυθεί εκτενώς η διαδικασία της νεφρικής διήθησης, μεταφοράς και μεταβολισμού πρωτεϊνών χαμηλού MB (Maack et al., 1979). Αναλόγως του μοριακού τους μεγέθους, της δομής και του φορτίου τους, γίνεται παρεμπόδιση των πρωτεϊνών στο πειραματικό φίλτρο. Ωστόσο, οι μηχανισμοί επαναρρόφησης πεπτιδίων και πρωτεϊνών στο νεφρό χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση.

Σε περιπτώσεις ραδιοσημασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων ή πρωτεϊνών σύντηξης Fc, γίνεται ανάκτηση του μεγαλύτερου ποσοστού της ραδιενεργού δόσης στα ούρα (Vugmeyster et al., 2012). Επιπλέον σε θεραπευτικές πρωτεΐνες όπως ινσουλίνη και επιδερμικός αυξητικός παράγοντας η αποβολή πραγματοποιείται μέσω χολικής απέκκρισης. Πιο συγκεκριμένα έγινε αποικοδόμηση πρωτεϊνών στο ήπαρ, και μετέπειτα απέκκριση τους στη χολή (LaRusso, 1984).

1.6 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA έχει καταστήσει εφικτή την παραγωγή θεραπευτικών πρωτεϊνών σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης, όπως κύτταρα θηλαστικών, βακτήρια, ζυμομύκητες, καθώς και διαγονιδιακά φυτά και ζώα, τόσο σε επίπεδο εργαστηριακό όσο και σε βιομηχανικό. Τα παραγόμενα βιομόρια αξιοποιούνται ευρέως ως θεραπευτικοί παράγοντες, ως εμβόλια και ως διαγνωστικά αντιδραστήρια. Η χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών συνοδεύεται από σημαντικά πλεονεκτήματα, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η μειωμένη πιθανότητα ανοσολογικής απόρριψης, ο περιορισμένος κίνδυνος μικροβιακής επιμόλυνσης και η ελαχιστοποίηση της έκθεσης σε παθογόνους παράγοντες ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης (Leader et al., 2008).

Παράλληλα, ο τομέας της βιοεπεξεργασίας έχει παρουσιάσει αξιοσημείωτη πρόοδο τα τελευταία έτη, ενισχύοντας την ποιότητα και την αποδοτικότητα της παραγωγικής

διαδικασίας. Ενδεικτικά, έχουν εισαχθεί συστήματα υψηλής απόδοσης, όπως πλάκες μικροτιτλοδότησης, μίνι βιοαντιδραστήρες βασισμένοι σε στήλες φυσαλίδων ή μικροπλάκες, καθώς και βιοαντιδραστήρες μικρής κλίμακας με μηχανική ανάδευση. Επιπλέον, η εφαρμογή συνεχών διεργασιών ανοδικής κατεργασίας, η υιοθέτηση της φιλοσοφίας «ποιότητα εκ σχεδιασμού» (Quality by Design, QbD) και η αξιοποίηση τεχνικών συνεχούς χρωματογραφίας συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση της καθαρότητας, της αναπαραγωγιμότητας και της συνολικής απόδοσης του τελικού προϊόντος (Tripathi & Shrivastava et al., 2019). Η βιοτεχνολογική φύση των θεραπευτικών πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την πρωτεϊνική μηχανική και τη τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA έχει συμβάλλει καθοριστικά στην δυνατότητα μοριακού σχεδιασμού των θεραπευτικών πρωτεϊνών και στον ακριβή έλεγχο βιοφυσικών ιδιοτήτων μέσω της ικανότητας επιμήκυνσης χρόνου ημίσειας ζωής, ελάττωσης της ανοσογονικότητας και μέσω βελτίωσης της συγγένειας δέσμευσης.

Επιπρόσθετα, στα πλεονεκτήματα τους, συγκαταλέγονται η υψηλή εξειδίκευση στόχευσης και η υψηλή εκλεκτικότητα. Ως επακόλουθο, ελαχιστοποιούν τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις, περιορίζουν την εκτός-στόχου τοξικότητα και αυξάνουν το θεραπευτικό εύρος τους. Χαρακτηρίζονται από υψηλή αποτελεσματικότητα σε στοχευμένες θεραπείες λόγω της ανάπτυξης εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Οι θεραπευτικές πρωτεΐνες δεν περιορίζονται σε μία μόνο κατηγορία νοσημάτων, αλλά χρησιμοποιούνται ευρέως σε ενδοκρινολογικές διαταραχές, σε αιματολογικά νοσήματα, σε κακοήθειες, σε φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα καθώς επίσης και σε σπάνιες γενετικές παθήσεις αποδεικνύοντας έτσι τη βιολογική τους προσαρμοστικότητα και τη δυνατότητα αξιοποίησής τους σε πληθώρα θεραπευτικών πεδίων.

1.7 ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ

Παρόλα τα πλεονεκτήματα τους που μόλις προαναφέρθηκαν, οι θεραπευτικές πρωτεΐνες εμφανίζουν κάποιες ουσιώδεις προκλήσεις που χρειάζεται να ξεπεραστούν. Η κατανόηση μάλιστα αυτών των προκλήσεων είναι χρήσιμη για μια ολοκληρωμένη και κριτική προσέγγιση του αντικείμενου για να εξασφαλιστούν ασφάλεια και αποτελεσματικότητα (Kumar et al., 2024).

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στη χρήση θεραπευτικών πρωτεϊνών ήταν η ταχεία αποδόμησή τους λόγω των σύντομων χρόνων ημιζωής (Kumar et al., 2024). Επίσης λόγω της γρήγορης νεφρικής κάθαρσης και της εμφανούς ενζυματικής δράσης τους κατά τη συστηματική κυκλοφορία, αυτά τα θεραπευτικά πρωτεϊνικά μόρια έχουν σύντομη διάρκεια ζωής στο αίμα. Έτσι ώστε να αντισταθμιστεί αυτό το μειονέκτημά τους, απαιτείται χορήγηση υψηλότερης δόσης για να διατηρηθεί μια επιθυμητή συγκέντρωση για μια επιθυμητή περίοδο στον ορό του αίματος. Μάλιστα, έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί μερικές τεχνολογίες για την παράταση του χρόνου

ημιζώης των θεραπευτικών πρωτεϊνών, όπως είναι η βιοσύζευξη/γενετική σύντηξη, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση με την προσάρτηση του πεπτιδίου σε φυσικά/συνθετικά πολυμερή και η χορήγηση μέσω μεσολάβησης φορέα (Tripathi and Shrivastava, 2019).

Επιπλέον πρόκληση αποτελεί η μεγάλη ετερογένεια των θεραπευτικών πρωτεϊνών η οποία οφείλεται στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, στην αναδίπλωση και στην συσσωμάτωση η οποία επιδρά στη σταθερότητα, στην ανοσογονικότητα και στην φαρμακοκινητική της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να υπάρχουν μεταβολές στην ασφάλεια και στην αποτελεσματικότητα (Jiskoot et al., 2012). Με σκοπό να ξεπεραστεί η συγκεκριμένη πρόκληση, γίνεται χρήση προηγμένων κυτταρικών σειρών καθώς επίσης και βελτιωμένων συνθηκών καλλιέργειας και καινούργιων τεχνικών καθαρισμού (Walsh, 2018). Έχει αναφερθεί μάλιστα πως μέσω εισαγωγής ενός δισουλφιδικού δεσμού στην περιοχή Fc ενός μονοκλωνικού αντισώματος βελτιώθηκε η αναδίπλωση και η σταθερότητά του (Zeng et al., 2018).

Μια ακόμα σημαντική πρόκληση αποτελεί το υψηλό κόστος παραγωγής των θεραπευτικών πρωτεϊνών, περιορίζοντας έτσι την προσβασιμότητά τους στους ασθενείς. Το κόστος καθορίζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η πολυπλοκότητα της διαδικασίας παραγωγής, οι κανονιστικές απαιτήσεις και τα ζητήματα πνευματικής ιδιοκτησίας. Με σκοπό να μειωθεί το κόστος παραγωγής, προτείνεται εντατικοποίηση των διαδικασιών και βελτιστοποίηση των διαδικασιών χρησιμοποιώντας προηγμένη ανάλυση και αυτοματοποίηση.

Επιπλέον πρόκληση αποτελεί το γεγονός ότι παρά την εμφανή πρόοδο και την διευρυμένη εφαρμογή τους οι θεραπευτικές πρωτεΐνες έχουν ακόμα περιορισμένη διείσδυση σε ορισμένους ιστούς όπως σε διάφορους τύπους καρκίνους και στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Dimitrov, 2012). Με στόχο να ξεπεραστούν αυτές οι προκλήσεις, αναπτύσσονται νέες δομές όπως τα διειδικά αντισώματα και οι πρωτεΐνες πολλαπλών στόχων (Dimitrov, 2012).

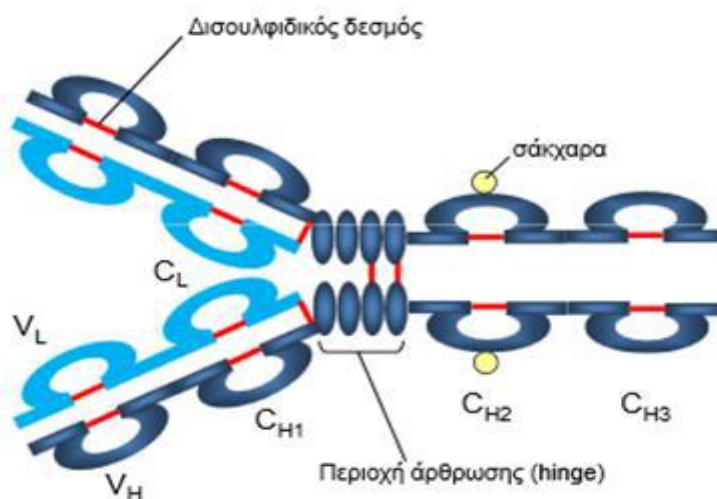
2. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Όπως έχει ήδη ειπωθεί κατηγορία θεραπευτικών πρωτεϊνών με ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελούν τα αντισώματα, μια από τις πιο πετυχημένες κατηγορίες βιοφαρμάκων με τεράστια σημασία στη σύγχρονη φαρμακευτική βιοτεχνολογία. Τα αντισώματα επίσης γνωστά ως ανοσοσφαιρίνες αποτελούν πρωτεΐνες παραγόμενες από το ανοσοποιητικό σύστημα και συγκεκριμένα από τα Β-λεμφοκύτταρα με στόχο την αναγνώριση και μετέπειτα την εξουδετέρωση παθογόνων-ξένων εισβολέων.

2.1 ΔΟΜΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Στο ξεκίνημα της δεκαετίας του 1970 μέσω κρυσταλλογραφικών μελετών με ακτίνες Χ ανακαλύφθηκε η τρισδιάστατη δομή αντισωμάτων. Αξιοσημείωτος είναι ο αριθμός των δομών τμημάτων αντισωμάτων που έχουν καταγραφεί στην βάση δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank, PDB). Η αναδίπλωση περιοχών των αντισωμάτων καθώς επίσης και κάποια βασικά χαρακτηριστικά που αφορούν τις θέσεις πρόσδεσης αντιγόνων συμπεριλαμβάνονται στην δομή των αντισωμάτων (Berman et al., 2000) .

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες (Ig) είναι γλυκοπρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος οι οποίες συντίθενται από Β λεμφοκύτταρα με κύρια λειτουργία τους, την αναγνώριση αντιγόνων. Αναφορικά με την δομή τους, είναι υπαίτια της εξειδίκευσης και της αποτελεσματικότητάς τους. Έχουν χαρακτηριστικό σχήμα που μοιάζει με το γράμμα Y (Edelman & Benacerraf, 1962) και αποτελούνται από συνολικά 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες εκ των οποίων παρουσιάζεται ομοιότητα ανά δύο. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από 2 όμοιες βαριές αλυσίδες (heavy chains, H) και 2 όμοιες ελαφριές αλυσίδες (light chains, L), εκ των οποίων οι βαριές έχουν μήκος περίπου 446 αμινοξέα και μοριακό βάρος 55 kDa και οι ελαφριές μήκος 219 αμινοξέα και μοριακό βάρος 22 kDa. Οι 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες συγκρατούνται μέσω ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών και μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (ηλεκτροστατικές και υδροφοβικές) δημιουργώντας κατά αυτό τον τρόπο ετεροδιμερή (H-L) (Εικόνα 3) (Wang et al., 2007).

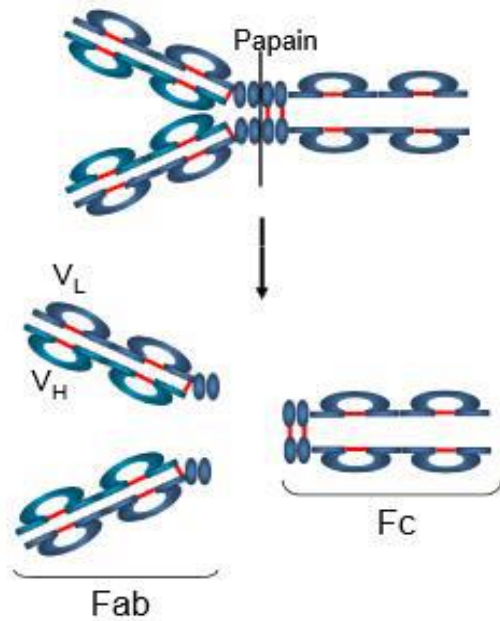


Εικόνα 3: Απεικόνιση δομής αντισωμάτων

Στον άνθρωπο, οι ελαφριές αλυσίδες αντιστοιχούν σε 2 τύπους, κ (kappa) και λ (lambda) και δομικά κάθε μια συμπεριλαμβάνει 2 περιοχές μια μεταβλητή (VL) και μια σταθερή (CL). Η μεταβλητή περιοχή κοντά στο αμινικό άκρο έχει 100-110 αμινοξέα και για την ελαφριά αλυσίδα χαρακτηρίζεται ως VL ενώ για τη βαριά αλυσίδα ως VH, παρουσιάζοντας ποικιλομορφία (Schroeder & Cavacini, 2010). Η σταθερή περιοχή αντιστοιχεί σε CL (ελαφριά αλυσίδα) και σε CH (βαριά αλυσίδα), η οποία μάλιστα χαρακτηρίζεται από μεγάλη συντηρητικότητα (Davies et al., 1975). Η διάκριση των βαριών αλυσίδων είναι σε 5 τύπους, επονομαζόμενους και ως υποτύπους (α, γ, δ, ε και μ) οι οποίες μάλιστα είναι υπεύθυνες για το που ανήκει η ανοσοσφαιρίνη (IgA, IgG, IgD, IgE, και IgM) καθώς κάθε μια διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο. Οι IgA, IgG και IgD αποτελούνται από 1 μεταβλητή και 3 σταθερές περιοχές ενώ οι IgE και IgM από 1 μεταβλητή αλλά από 4 σταθερές περιοχές. Μέσω μιας συνδετικής αλυσίδας J υπάρχει δυνατότητα σχηματισμού διμερών και πενταμερών στην IgA και IgM αντίστοιχα (Chiu et al, 2019).

Σχετικά με τον τρόπο ανακάλυψης της δομής των αντισωμάτων, προέκυψε από πολλά πειραματικά δεδομένα με επικρατέστερο το κλασικό πείραμα πέψης της ανοσοσφαιρίνης Γ (IgG) με την χρήση παπαΐνης (πρωτεολυτικό ένζυμο) που πραγματοποιήθηκε το 1950, δίνοντας 3 θραύσματα εκ των οποίων τα 2 πανομοιότυπα μεταξύ τους ενώ το τρίτο διέφερε. Τα 2 πανομοιότυπα θραύσματα είχαν δράση αντιγονικής δέσμησης, και επονομάστηκαν θραύσματα Fab (Fabs: fragments antigen binding) ενώ το τρίτο θραύσμα που δεν διέθετε αντιγονική ειδικότητα επονομάστηκε κρυσταλλώσιμο θραύσμα ή Fc (Fc: fragment crystallizable) καθώς ανακαλύφθηκε πως έπειτα από αποθήκευσή του σε χαμηλή θερμοκρασία προκαλούνταν κρυστάλλωσή του (Bentley, 1994; Kindt et al., 2007) .

Το θραύσμα Fab εμπεριέχει μια ολόκληρη ελαφριά αλυσίδα και περιοχές της βαριάς αλυσίδας. Αποτελούνται επίσης και από την περιοχή πρόσδεσης του αντιγόνου, ενώ οι εναπομείναντες περιοχές από την βαριά αλυσίδα στελεχώνουν το θραύσμα Fc (Εικόνα 4). Τα θραύσματα Fab απαρτίζονται πιο συγκεκριμένα από την σύζευξη των δομικών περιοχών, VL (μεταβλητή περιοχή) και CL (σταθερή περιοχή) των ελαφριών αλυσίδων καθώς και των περιοχών CH1 (σταθερή περιοχή) και VH (μεταβλητή περιοχή) των βαριών αλυσίδων. Μέσω σύνδεσης των περιοχών VH και VL προκύπτει η περιοχή σύνδεσης με το αντιγόνο, ενώ από τις βαριές αλυσίδες, σταθερές περιοχές CH2 και CH3 σχηματίζουν το Fc θραύσμα (Chiu et al., 2019). Επομένως, κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από 2 πανομοιότυπα θραύσματα Fab τα οποία είναι προσδεδεμένα στο αντιγόνο στο αμινοτελικό τμήμα μεταβλητής περιοχής, και 1 θραύσμα Fc που ευθύνεται για την δράση των αντισωμάτων και την ρύθμιση χρόνου ημίσειας ζωής και είναι προσδεδεμένο στο καρβοξυτελικό τμήμα καθεμίας βαριάς αλυσίδας.



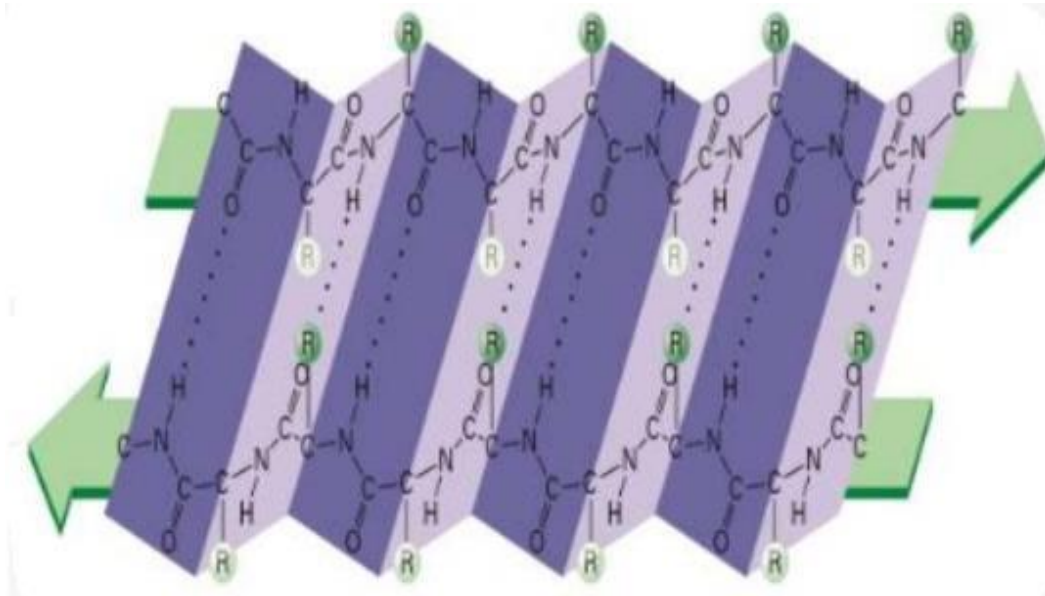
Εικόνα 4: Fab και Fc θραύσματα ανοσοσφαιρίνης.

2.2 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ

Οι ανοσοσφαιρίνες παρουσιάζουν τέσσερα επίπεδα οργάνωσης. Αρχικά η πρωτοταγής δομή, είναι η αμινοξική αλληλουχία της πολυπεπτιδικής αλληλουχίας που είναι υπεύθυνη για τον καθορισμό των μεταβλητών και των σταθερών περιοχών των ελαφριών και των βαριών αλυσίδων. Η δευτεροταγής δομή προκύπτει από την αναδίπλωση που συμβαίνει σε κάθε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα γύρω από τον εαυτό της, οδηγώντας σε αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα (β-sheets) (Kindt et al., 2007) (Εικόνα 5). Ανάμεσα στους πεπτιδικούς δεσμούς γειτονικών πεπτιδικών αλυσίδων υπάρχουν οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι συγκρατούν την δευτεροταγή αυτή δομή. Μέσω επιπλέον αναδίπλωσης των αλυσίδων, προκύπτουν συμπαγείς σφαιρικές επικράτειες συνδεδεμένες κάθε μια με τη γειτονική. Η σύνδεση προκύπτει λόγω επέκτασης της αλυσίδας του εξωτερικού τμήματος των β πτυχωτών φύλλων, σχηματίζοντας έτσι την τριτοταγή δομή. Τέλος η τεταρτοταγής δομή προκύπτει μέσω αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις βαριές και ελαφριές αλυσίδες που οδηγούν σε λειτουργικές επικράτειες, καθιστώντας το μόριο κατάλληλο για ειδική δέσμευση αντιγόνου. Ο τρόπος με τον οποίον προκύπτει η αναδίπλωση των ανοσοσφαιρινών καλείται «ανοσοσφαιρινική αναδίπλωση». Μέσω της συγκεκριμένης αναδίπλωσης, προκύπτουν 2 πτυχωτά φύλλα, όπου το κάθε ένα από αυτά εμπεριέχει αντιπαράλληλους β-κλώνους οι οποίοι συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου. Τα πτυχωτά φύλλα έπειτα από σύνδεση με θηλειές διαφορετικών μεγεθών (loops), σχηματίζουν δομή που μοιάζει με σάντουιτς, με τα υδρόφιλα αμινοξέα στους β κλώνους να συναντώνται στο εξωτερικό ενώ τα υδρόφοβα στο εσωτερικό. Η

συγκεκριμένη δομή, συγκρατείται με δισουλφιδικούς δεσμούς (Chiu et al., 2019, Harris et al., 1998). Αξίζει να σημειωθεί πως μέσω της ανοσοφαιρικής αναδίπλωσης προκύπτουν στην επιφάνεια β φύλλων μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, επιτρέποντας κατά αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη δεσμών ανάμεσα σε επικράτειες είτε πανομοιότυπες είτε μη πανομοιότυπες. Επίσης μέσω της αναδίπλωσης δημιουργούνται θηλειές με διαφορετικό μήκος και αλληλουχία αμινοξέων που συμβάλλουν στην δέσμευση του αντιγόνου στις ανοσοσφαιρίνες (Kindt et al., 2007, Wilson & Stanfield, 1994).

Αναφορικά με τις σταθερές και τις μεταβλητές περιοχές έχουν παρόμοιες δομές. Η μεταβλητή έχει πιο μακριά δομή με τέσσερις β-κλώνους, αντιπαράλληλους μεταξύ τους, στο ένα πτυχωτό φύλλο και πέντε στο άλλο ενώ η σταθερή περιοχή έχει τέσσερις β-κλώνους επίσης αντιπαράλληλους, σε ένα και τρεις στο άλλο πτυχωτό φύλλο. Επιπλέον η μεταβλητή περιοχή συγκριτικά με την σταθερή δεν είναι τόσο συμπαγής σχηματίζοντας μάλιστα πιο μεγάλες θηλειές που συνδέουν τους β-κλώνους (Chiu et al., 2019).



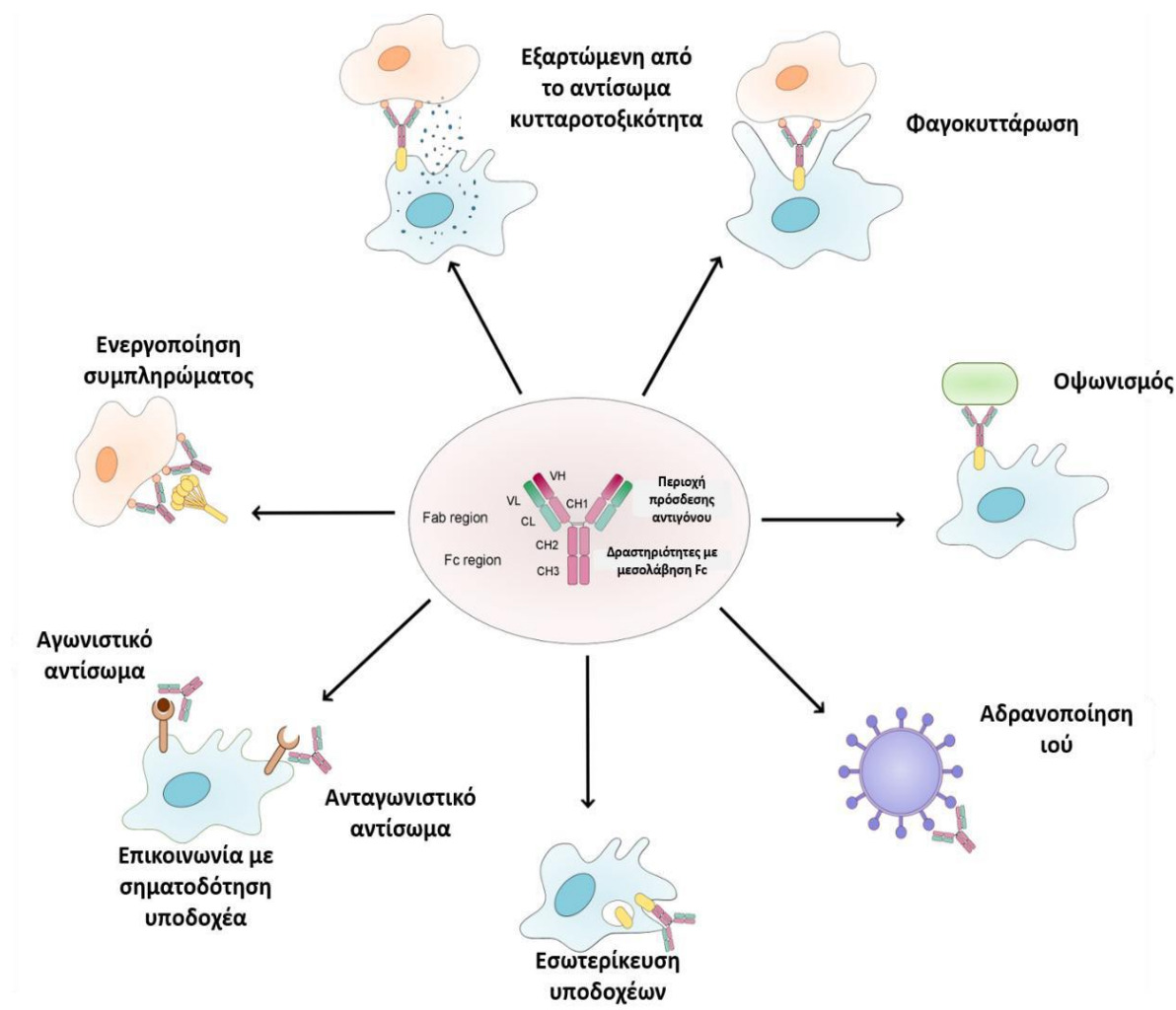
Εικόνα 5: Δομή β-πτυχωτού φύλλου (Kindt et al., 2007).

2.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Οι ανοσοσφαιρίνες συναντώνται στην επιφάνεια Β κυττάρων ως διαμεμβρανικοί υποδοχείς που αναγνωρίζουν διαλυτά αντιγόνα ή εκκρίνονται από πλασματοκύτταρα συμμετέχοντας στη χυμική ανοσία.

Καθοριστικός είναι ο ρόλος τους και στην άμυνα του οργανισμού όπου για να δράσουν αποτελεσματικά ενάντια σε παθογόνα δεν αρκεί απλά η αναγνώριση αντιγόνου και η

σύνδεση σε αυτά, αλλά προϋποθέτει την απόκριση ώστε να εξαλειφθεί το παθογόνο (Kindt et al., 2007). Στις αποκρίσεις συμβάλλουν οι σταθερές περιοχές της βαριάς αλυσίδας οι οποίες δίνουν έναυσμα για αλληλεπιδράσεις με άλλα κύτταρα, πρωτεΐνες, ιστούς (υπεύθυνες για την χυμική ανοσία) και όχι οι μεταβλητές περιοχές παρόλο που αυτές ευθύνονται για την δέσμευση των αντιγόνων. Όσον αφορά τον τρόπο λειτουργίας τους, ακολουθούν τέσσερις βασικές περιπτώσεις (Εικόνα 6).

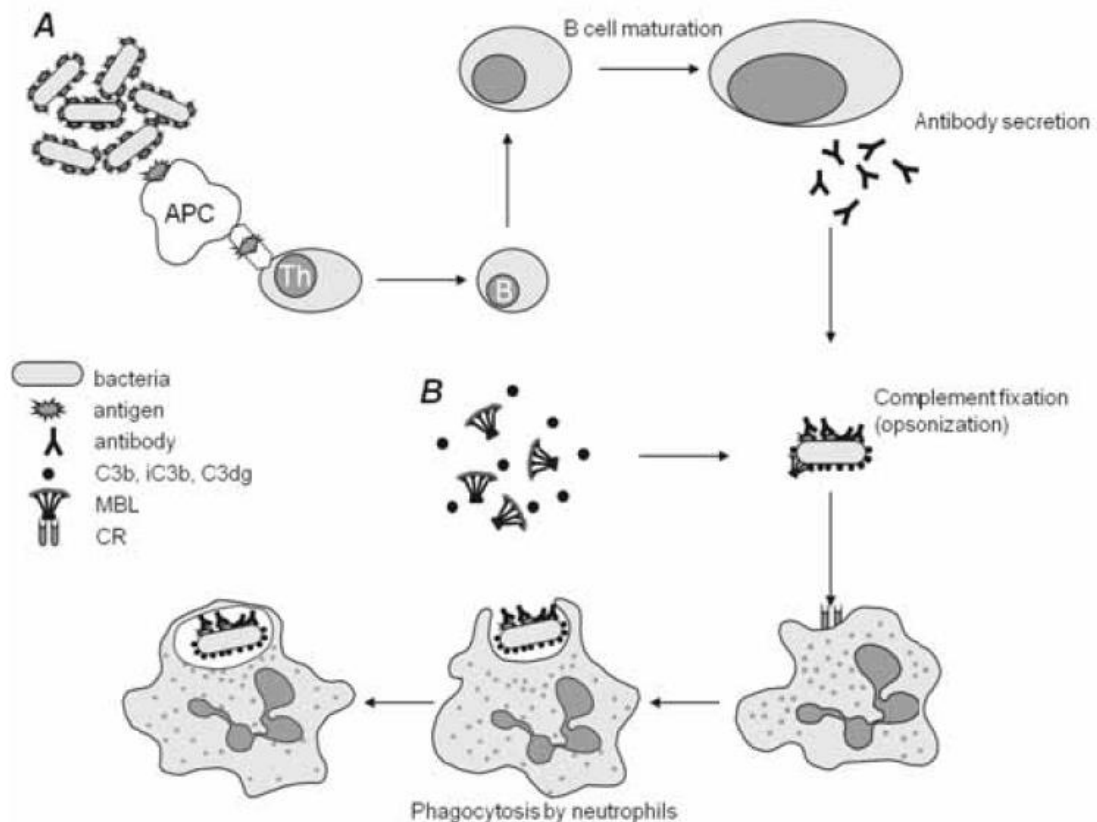


Εικόνα 6: Βασικές λειτουργίες που παρουσιάζουν τα αντισώματα. (Casadevall et al., 2004)

2.3.1 ΟΨΩΝΙΣΜΟΣ

Οψωνισμός ονομάζεται η διαδικασία μέσω της οποίας ενεργοποιείται η φαγοκυττάρωση από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα των αντιγόνων, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στην αντιβακτηριακή άμυνα (Casadevall et al., 2004). Στα ουδετερόφιλα και στα μακροφάγα επιφανειακά συναντώνται πρωτεϊνικά μόρια, Fc υποδοχείς (FCR) υπεύθυνα για την δέσμευση σταθερής περιοχής ανοσοσφαιρινών οδηγώντας σε φαγοκυττάρωση συμπλέγματος αντιγόνου-αντίσωμα

και καταστροφή παθογόνου (Εικόνα 7). Οξειδωτική καταστροφή ή ενζυμική διάσπαση ή διάσπαση μεμβράνης παθογόνου από αντιμικροβιακά πεπτίδια συνεπάγεται φαγοκυττάρωση (Kindt et al., 2007).

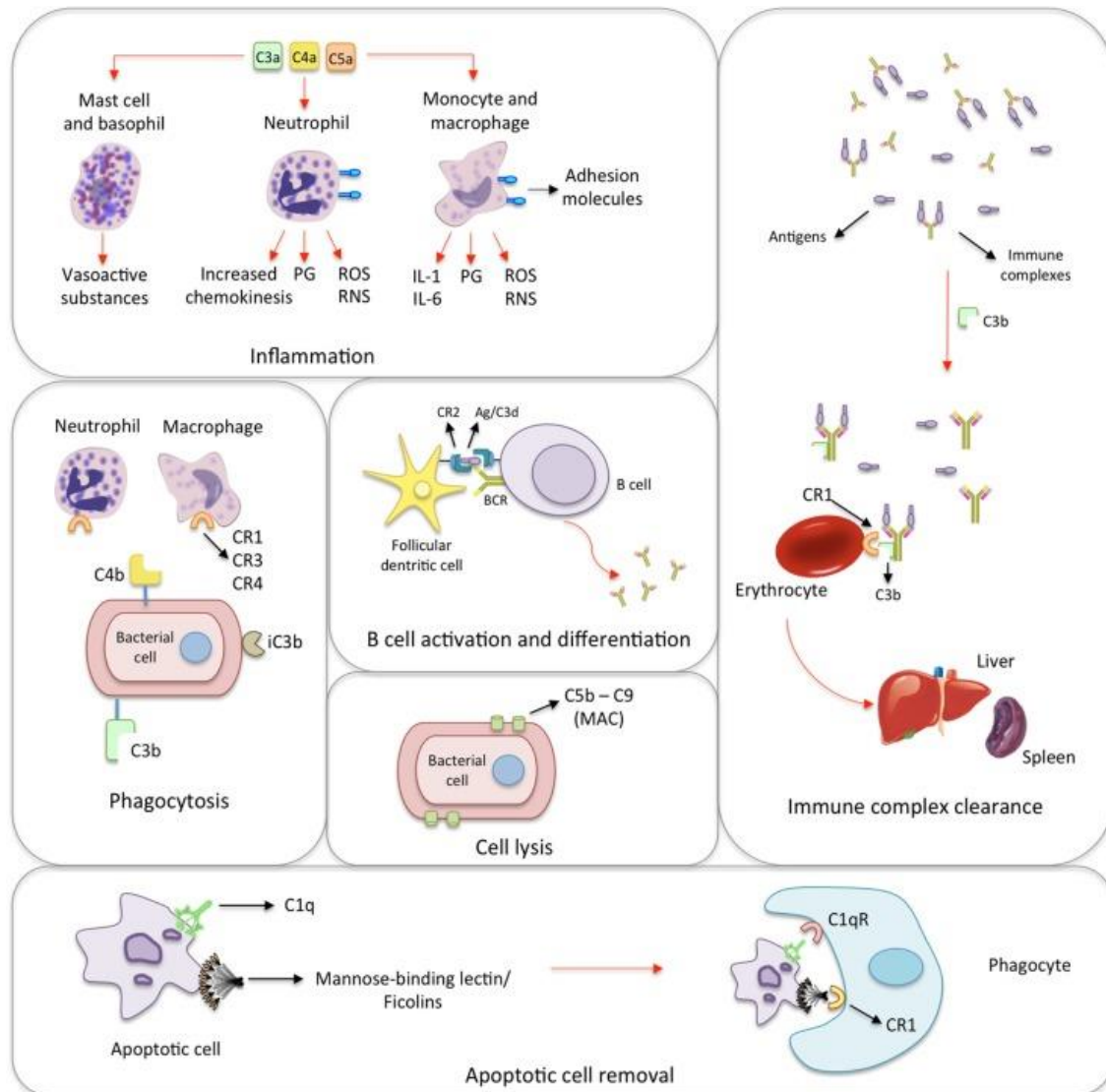


Εικόνα 7: Διαδικασία οψωνισμού (Brouwer et al., 2009).

2.3.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ

Το σύστημα συμπληρώματος αποτελεί κομμάτι της έμφυτης ανοσίας και αποτελείται από διαλυτές πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες ορού με την ικανότητα διαπερατότητας κυτταρικών μεμβρανών. Η ενεργοποίηση γίνεται μέσω IgM καθώς και μερικών υποκατηγοριών IgG (IgG1, IgG2, IgG3). Αναφορικά με τον συμβολισμό των συστατικών του, χρησιμοποιούνται αριθμοί (C1-C9), γράμματα (πχ παράγοντας D) καθώς και ονομασίες (ομόλογος περιοριστικός παράγοντας), όπως επίσης και τα γράμματα «a» και «b» όπου αντιστοιχούν σε παραγωγή μικρών ή μεγάλων θραυσμάτων κατόπιν ενεργοποίησης συστατικού. Μέσω της ενεργοποίησης των συστατικών συμπληρώματος προκύπτει αλληλεπίδραση τους με συνέπεια να επιτρέπεται η συμμετοχή τους σε διάφορες ανοσολογικές λειτουργίες όπως λύση ξένων κυττάρων, ιών και βακτηρίων / οψωνισμό που καταλήγει σε φαγοκυττάρωση /

έκκριση ανοσορυθμιστικών μορίων / πυροδότηση φλεγμονωδών αντιδράσεων / καθαρισμό συμπλόκων μέσω ηπατικών κυττάρων και κυττάρων σπλήνας (Εικόνα 8).

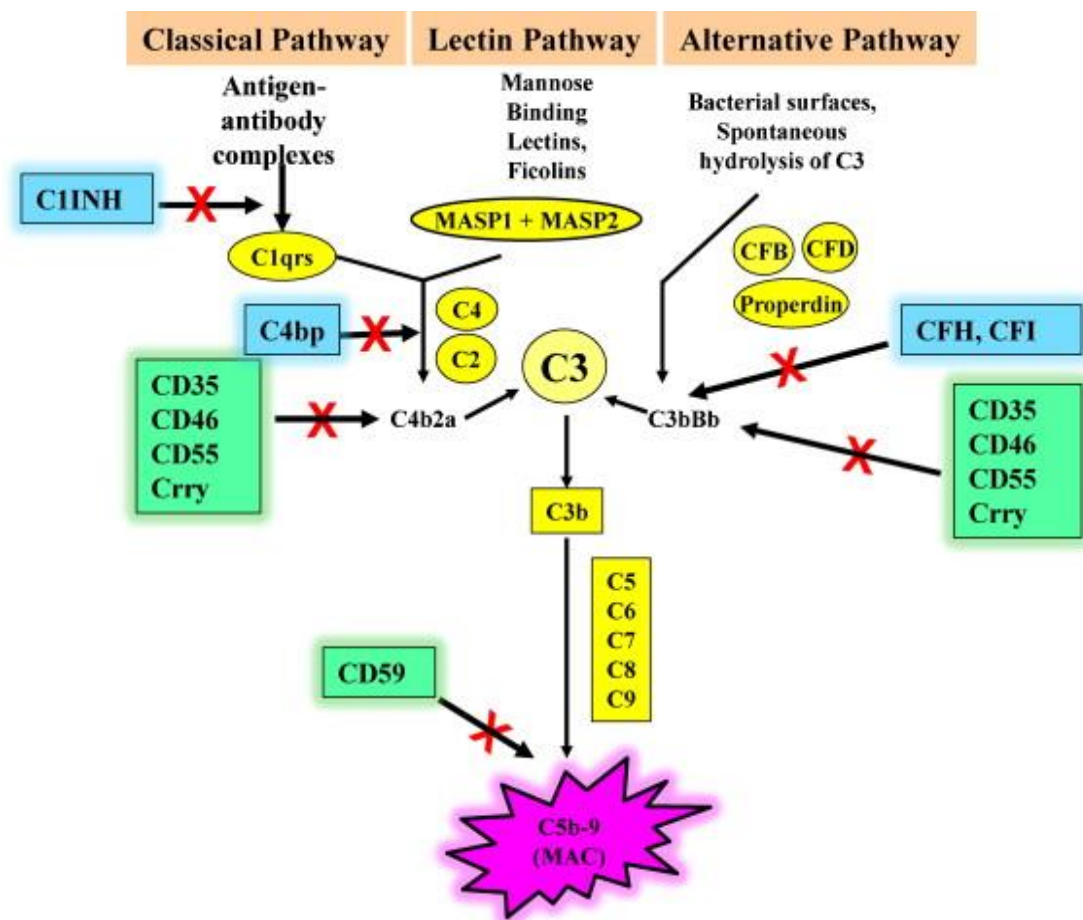


Εικόνα 8: Βιολογικές λειτουργίες συστήματος συμπληρώματος. (Beltrame et al., 2015).

Το σύστημα του συμπληρώματος ενεργοποιείται μέσω τριών μονοπατιών, του κλασσικού μονοπατιού (classical pathway), του εναλλακτικού μονοπατιού (alternative pathway) και του μονοπατιού λεκτίνης (lectin pathway) (Εικόνα 9). Μέσω και των τριών οδών ενεργοποιείται η λυτική οδός και το σύμπλοκο λύσης μεμβράνης (MAC, membrane attack complex) το οποίο σηματοδοτεί την λύση παθογόνων.

Η κλασσική οδός πυροδοτείται από την σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος και ξεκινά με σύμπλεγμα C1 που δεσμεύεται σε αντίσωμα. Η εναλλακτική οδός αντιθέτως από την κλασσική ενεργοποιείται από ιούς, μύκητες, βακτήρια και καρκινικά κύτταρα, όντας

ανεξάρτητη από αντισώματα. Για να ενεργοποιηθεί το εναλλακτικό μονοπάτι το θραύσμα C3b δεσμεύεται στην αμινομάδα ή υδροξυλομάδα υδατανθράκων ή πρωτεϊνών, επιφανειακά των μικροβίων. Τέλος η οδός της λεκτίνης, είναι παρόμοια με την κλασσική οδό με κάποιες διαφοροποιήσεις στον τρόπο ενεργοποίησής της, όπου ενεργοποιείται μέσω δέσμευσης πρωτεϊνικού συμπλόκου MBL (mannose binding lectin) και των συνδεδεμένων με αυτήν πρωτεασών MASP-1 και MASP-2 οι οποίες αναγνωρίζουν και προσδένονται σε γλυκοπρωτεΐνες ή σε υδατάνθρακες που εκφράζονται στην επιφάνεια μικροοργανισμών.



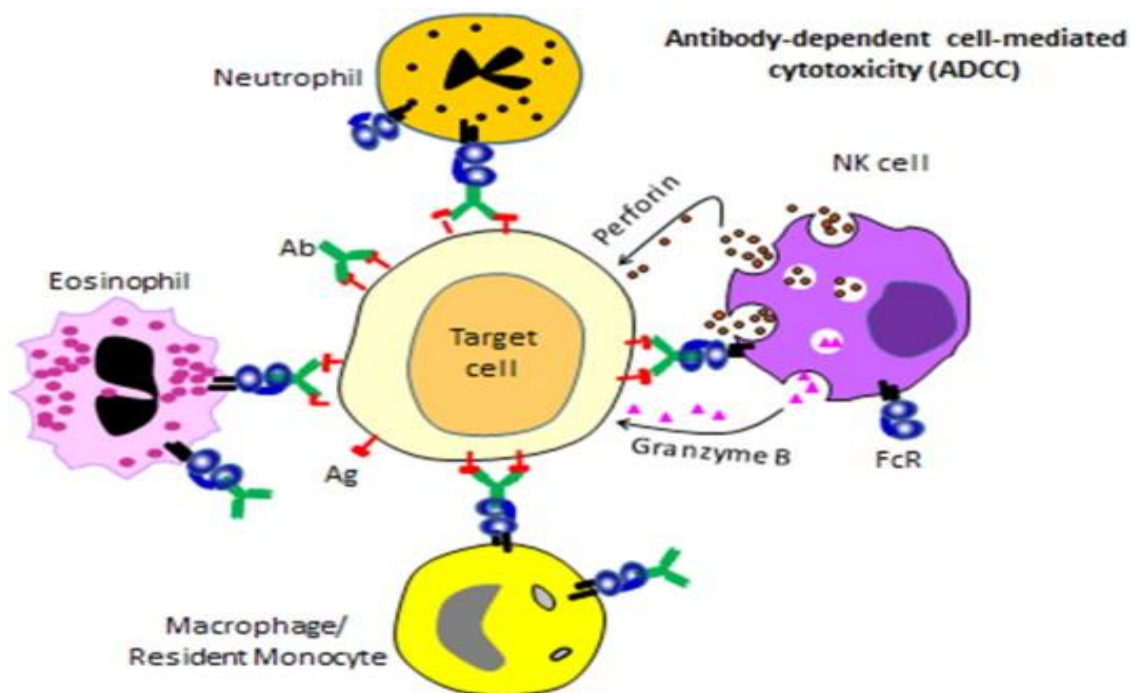
Εικόνα 9: Οδοί ενεργοποίησης συστήματος συμπληρώματος (Bora et al., 2015).

2.3.3 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΣΟΛΑΒΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ADCC)

Όταν η αναγνώριση και πρόσδεση ενός αντισώματος στο κύτταρο-στόχο πραγματοποιείται μέσω Fc υποδοχέων (FcR) που εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, μακροφάγα, μονοκύτταρα, και φυσικά φονικά (NK) κύτταρα, η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται ως εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (ADCC).

Στον μηχανισμό αυτό, τα κύτταρα προσδένονται μέσω των FcR υποδοχέων τους στο Fc τμήμα των αντισωμάτων που είναι ήδη συνδεδεμένα με αντιγόνα στην επιφάνεια του κυττάρου-στόχου, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίησή τους και τελικά στη λύση του κυττάρου-στόχου (Carter, 2001, Casadevall et al., 2004). Η ειδικότητα των συμμετεχόντων στη διαδικασία αντισωμάτων, καθορίζει τη στόχευση των παραπάνω κύτταρων (μη αντιγονοειδικά), καθώς τα αντισώματα λειτουργούν σαν βοηθητικοί υποδοχείς στο δραστικό κύτταρο για την αναγνώριση κυττάρου-στόχου και τελικώς τη θανάτωση του.

Κατόπιν πρόσδεσης μη ειδικών κυτταροτοξικών κυττάρων (μακροφάγων, μονοκυττάρων, ουδετερόφιλων, ηωσινοφίλων και NK κυττάρων) μέσω Fc υποδοχέων με Fc τμήμα αντισώματος (δεσμευμένο σε επιφανειακά αντιγόνα κυττάρου) επέρχεται άνοδος της μεταβολικής δραστηριότητας με συνέπεια την έκκριση παραγόντων (λυτικών ενζύμων, παραγόντων νέκρωσης όγκων-TNF, περφορίνες και θερμμπαίνες) που τελικά οδηγεί σε καταστροφή κυττάρων-στόχων (Εικόνα 10) (Kindt et al., 2007; Igietseme et al., 2014).



Εικόνα 10: Απεικόνιση μηχανισμού ADCC (Igietseme et al., 2014).

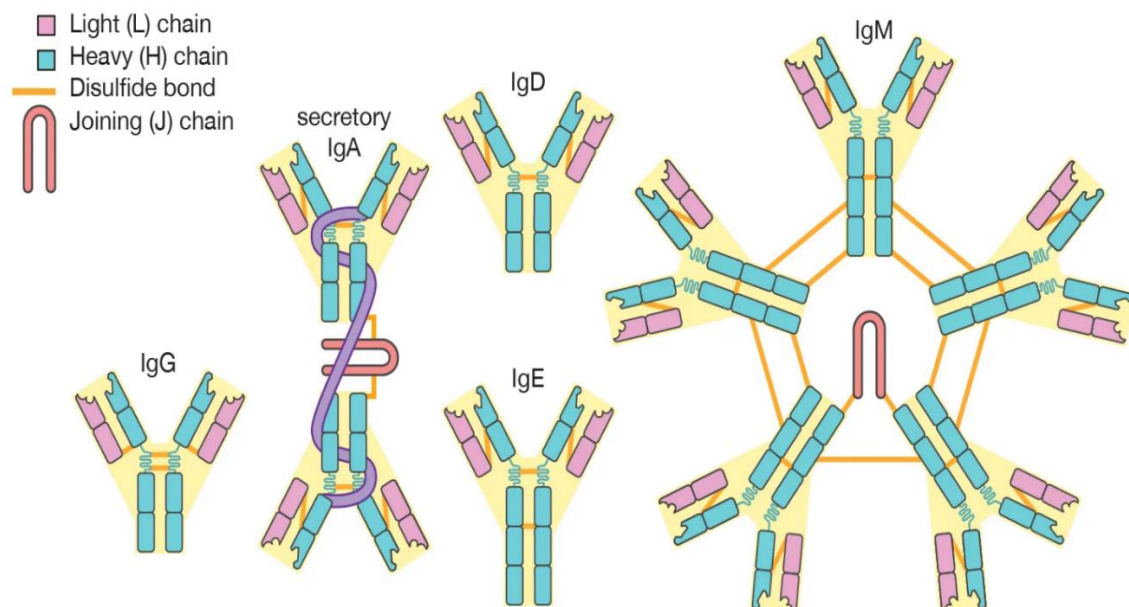
2.3.4 ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ

Η φαγοκυττάρωση συγκαταλέγεται στις βασικές λειτουργίες αντισωμάτων που εντάσσεται στην φυσική ανοσία. Πιο συγκεκριμένα, τα αντισώματα λειτουργούν με τρόπο που επισημαίνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς ώστε να είναι πιο εύκολα

αναγνωρίσιμοι από τα φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα). Σε πρώτο στάδιο υπάρχει έλξη και κίνηση των μακροφάγων προς υποστρώματα που παράγονται μέσω χημειοταξίας. Ακολούθως, τα αντιγόνα (ολόκληρα κύτταρα βακτηρίων και ιικά σωματίδια) προσκολλάν στην μεμβράνη των μακροφάγων και έτσι επιτυγχάνεται η άμεση φαγοκυττάρωσή τους ενώ η φαγοκυττάρωση βακτηρίων με κάψα καθώς και απομονωμένων πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται δύσκολη. Μέσω της προσκόλλησης αντιγόνων προκύπτουν μεμβρανικές προεκβολές (ψευδοπόδια) που περικλείουν το προσκολλώμενο υλικό. Έπειτα μέσω της διαδικασίας της σύντηξης ψευδοποδίων εσωκλείεται το υλικό σε μια δομή μεμβράνης (κυστίδιο), αποκαλούμενη ως φαγόςωμα, με συνέπεια να εισέρχεται σε μια ενδοκυτταρική επεξεργασία, όπου το φαγόςωμα κατευθύνεται εσωτερικά του κυττάρου, συντήκεται με λυσοσώματα δημιουργώντας έτσι το φαγολυσόσωμα. Υδρολυτικά ένζυμα όπως η λυσοζύμη κ.ά πέπτουν τα φαγοκυτταρωμένα σωματίδια και τα προϊόντα πέψης τελικά απομακρύνονται μέσω εξωκυττάρωσης.

2.4 ΤΑΞΕΙΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Ο διαχωρισμός των ανοσοσφαιρινών γίνεται σε πέντε διαφορετικές τάξεις οι οποίες διαφοροποιούνται μεταξύ τους βάση των βαριών αλυσίδων που διαθέτουν (μ, α, γ, δ και ε) και επομένως οι τάξεις που προκύπτουν είναι: IgM, IgA, IgG, IgD και IgE αντίστοιχα (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Οι 5 κύριες τάξεις ανοσοσφαιρινών: IgG, IgA, IgD, IgE και IgM(Humphrey et al., 2026).

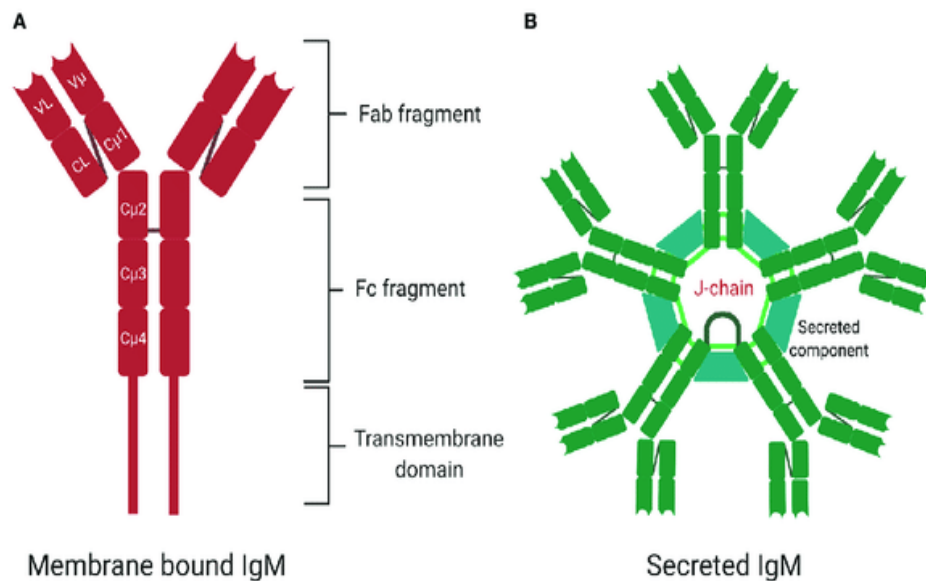
Αναφορικά με τις βαριές αλυσίδες, η σύνδεση τους πραγματοποιείται με ελαφριές αλυσίδες τύπου κ και τύπου λ (Kindt et al., 2007). Κάθε τάξη ανοσοσφαιρίνης συνδέεται με διαφορετική βιολογική λειτουργία καθώς επίσης και με διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες. Το κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ όλων είναι πως η έκκριση τους προέρχεται από Β ώριμα κύτταρα. Στον ορό του αίματος κυριαρχούν ποσοτικά οι ανοσοσφαιρίνες IgG, IgA και IgM, σε αντίθεση με τις IgD και IgE, οι οποίες ανιχνεύονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

2.4.1 Ανοσοσφαιρίνη Μ (IgM)

Η ανοσοσφαιρίνη Μ, μοριακού βάρους 970kDa, συναντάται σε ποσοστό 10% των συνολικών ανοσοσφαιρινών αποτελώντας μάλιστα την πρώτη εκφραζόμενη στο έμβρυο σε σειρά ανοσοσφαιρίνη (εκφράζεται γύρω στις πρώτες 20 εβδομάδες) και την πρώτη παραγόμενη και εκκρινόμενη από Β ώριμα κύτταρα κατά την ανοσοποιητική απόκριση και ακολούθως παράγεται η IgG. Μάλιστα χαρακτηρίζεται ως φυσικό αντίσωμα καθώς έχει την ικανότητα να συνδυαστεί με ορισμένα αντιγόνα.

Την δομούν τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, εκ των οποίων οι δύο βαριές αλυσίδες είναι τύπου μ και άλλες δύο τύπου κ ή λ ελαφριές αλυσίδες. Αποτελεί μονομερές ή πενταμερές με την μονομερή μορφή της να συναντάται σαν μεμβρανικό αντίσωμα των Β κυττάρων μοριακού βάρους 180kDa. Σχετικά με την πενταμερή μορφή, μοριακού βάρους 900kDa η σύνδεση γίνεται μέσω δισουλφιδικών δεσμών, περιέχει μάλιστα ένα πολυπεπτίδιο (αλυσίδα J - joining chain) με την ιδιότητα σύνδεσης στα Fc τμήματα μονομερών μέσω δισουλφιδικών δεσμών (Εικόνα 12).

Εμφανίζεται μέσα στα αγγεία μόνο χωρίς να μπορεί να διεισδύσει σε όλα τα υγρά του σώματος όπως η IgG. Επιπλέον δεν διέρχεται μέσω πλακούντα όμως ενεργοποιεί το μονοπάτι συμπληρώματος και επάγει τον οψωνισμό, προάγοντας κυρίως την ενεργοποίηση μακροφάγων ικανών να θανατώνουν βακτήρια.



Εικόνα 12: Η δομή της δεσμευμένης στη μεμβράνη και εκκρινόμενης ανοσοσφαιρίνης M (sIgM).

(Α) Μια μονομερής δομή της ανοσοσφαιρίνης M (IgM) περιέχει θραύσματα Fab, θραύσμα Fc και διαμεμβρανική ουρά σηματοδότησης που προσκολλάται σε υποδοχείς Fc στην επιφάνεια των B κυττάρων. Η μονομερής μορφή του αντισώματος αποτελείται από ένα ζεύγος βαριών και ένα ζεύγος ελαφριών αλυσίδων. (Β) Μια πενταμερής δομή είναι η πιο φυσικά απαντημένη μορφή με πέντε μονομερή που συγκρατούνται μεταξύ τους από μια J-αλυσίδα.

2.4.2 Ανοσοσφαιρίνη A (IgA)

Η ανοσοσφαιρίνη A αναγνωρίζεται ως η σημαντικότερη ανοσοσφαιρίνη παρόλο που συναντάται στον ορό του αίματος σε ποσοστό μόλις 15% καθώς κυριαρχεί σε οροβλεννογόνες εκκρίσεις (σάλιο, δάκρυα, γάλα, πρωτόγαλα), σε ρινικές, τραχειοβρογχικές και ουρογεννητικές εκκρίσεις. Την συναντάμε επίσης και σε βλέννα παραγόμενη από βλεννογόνους πεπτικού, αναπνευστικού και ουρογεννητικού συστήματος, ενισχύοντας την τοπική ανοσία σε περιπτώσεις παρουσίας σε βλεννογόνους. Αξίζει να σημειωθεί πως η συγκεκριμένη ανοσοσφαιρίνη δεν δύναται να διέλθει μέσω του πλακούντα και να περάσει στον ορό των νεογνών όμως μπορεί να ληφθεί μέσω του μητρικού γάλακτος και σε χρονικό διάστημα 4-6 μηνών μετά από την γέννηση ενός εμβρύου συνήθως εμφανίζεται στο αίμα όπου σταδιακά αυξάνεται φτάνοντας στο μέγιστο κατά την εφηβεία.

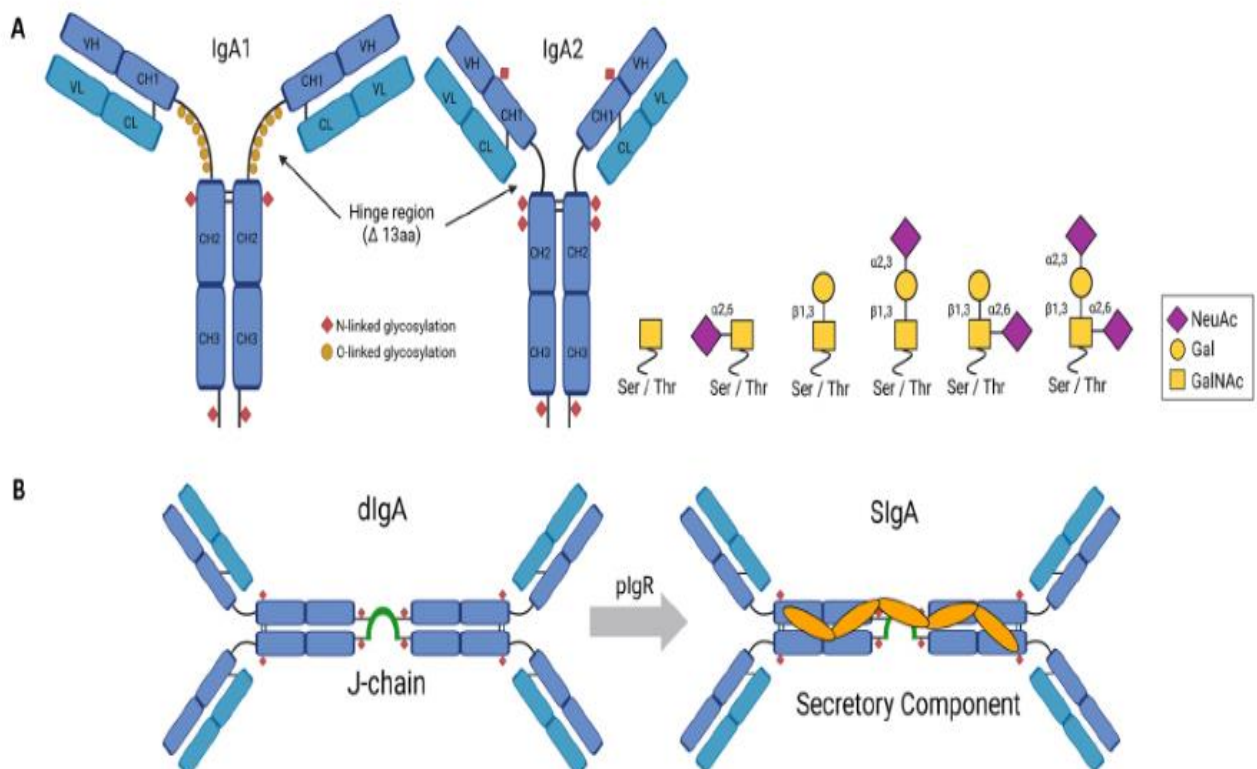
Όσον αφορά την δομή της έχει τέσσερις χαρακτηριστικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες δυο εκ των οποίων είναι τύπου α βαριές αλυσίδες και δύο είναι τύπου κ ή λ ελαφριές. Στον ανθρώπινο ορό αποτελεί μονομερές ενώ στα περισσότερα θηλαστικά, παρουσιάζεται κυρίως ως πολυμερές (διμερές, τριμερές ή τετραμερές με πιο συχνή την διμερή μορφή του). Στις πολυμερείς μορφές χαρακτηριστική είναι μια επιπλέον αλυσίδα J και σε περιπτώσεις εκκρίσεων η IgA εκκριτική ανοσοσφαιρίνη με διμερή ή

τετραμερή μορφή διαθέτει τόσο J αλυσίδα όσο και μια επιπλέον πολυπεπτιδική αλυσίδα (MB 70kDa) που είναι εμπλουτισμένη με κυστεΐνη, επονομαζόμενη ως εκκριτικό συστατικό.

Διακρίνονται δύο υποτάξεις της IgA (IgA1 και IgA2) που παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις σε 18 αμινοξέα στην περιοχή του αρμού. Η IgA1 (υπόταξη που επικρατεί σε ορό) έχει μακρύτερη αμινοξική ακολουθία 13 αμινοξέων (Εικόνα 13) σε σύγκριση με την IgA2 (υπόταξη που επικρατεί σε εκκρίσεις), γεγονός που καθιστά την IgA2 ευάλωτη σε βακτηριακές πρωτεάσες. Η IgA2 ταξινομείται στις παραλλαγές IgA2m(1) και IgA2m(2) και οι πολυπεπτιδικές της αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και όχι μέσω δισουλφιδικών δεσμών.

Αναφορικά με την εκκριτική IgA (slgA) εμφανίζεται σαν διμερές και μπορεί να συγκαταλέγεται είτε στην IgA1 είτε στην IgA2 υπόταξη και όπως προαναφέρθηκε δομείται από εκκριτικό συστατικό και αλυσίδα J. Μέσω της παρουσίας της slgA στο μητρικό γάλα επέρχεται προστασία του νεογνού από μολύνσεις για τον πρώτο μήνα της ζωής του καθώς δεν έχει πλήρως λειτουργικό ανοσοποιητικό σύστημα.

Η slgA έχει καθοριστικό ρόλο στην προστασία από βακτήρια σαλμονέλας, χολέρας και γονόρροιας καθώς και από ιούς πολιομυελίτιδας, γρίπης και ρετροϊούς, ενώ όταν απουσιάζει ή ελαττώνεται προκαλεί ανοσοανεπάρκεια (Kindt et al., 2007). Μικροοργανισμοί της ανώτερης αναπνευστικής οδού παράγουν πρωτεάσες ικανές για διάσπαση IgA1.



Εικόνα 13: Σχηματική δομή των IgA1, IgA2 και sIgA (Scheurer et al., 2023).

(Α) Η IgA1 εκφράζει πολλαπλές θέσεις Ο-γλυκοζυλίωσης σερίνης και θρεονίνης στην περιοχή άρθρωσης, τροποποιημένες είτε από σιαλικό οξύ (NeuAc), γαλακτόζη (Gal) είτε από Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη (GalNAc). Η IgA2 δεν διαθέτει τις αντίστοιχες θέσεις Ο-γλυκοζυλίωσης στην περιοχή άρθρωσης και έχει μόνο θέσεις Ν-γλυκοζυλίωσης τροποποιημένες από γλυκοζαμίνη (GlcN) και χαμηλότερο επίπεδο σιαλυλίωσης. (Β) Η εκκριτική IgA (sIgA) παράγεται από διμερή IgA (dIgA) κατά τον διμερισμό μέσω της J-αλυσίδας 15-kDa σε πλασματοκύτταρα ιστών και μέσω σύνδεσης με το pIgR σε επιθηλιακά κύτταρα. Κατά τη μετατόπιση στην αυλική θέση το εκκριτικό συστατικό, SC διασπάται και έτσι επέρχεται σταθεροποίηση της dIgA για να σχηματιστεί sIgA.

2.4.3 Ανοσοσφαιρίνη G (IgG)

Η ανοσοσφαιρίνη G αποτελεί την επικρατέστερη κατηγορία ανοσοσφαιρινών στον ορό του αίματος με ποσοστό περίπου 75-80%. Δομείται από τέσσερις αλυσίδες εκ των οποίων οι δύο είναι τύπου γ βαριές αλυσίδες και οι άλλες δύο τύπου κ ή λ ελαφριές αλυσίδες. Αποτελεί την μοναδική ανοσοσφαιρίνη η οποία διέρχεται μέσω του πλακούντα και περνά από την μητέρα στο έμβρυο, παρέχοντας στο νεογέννητο προστασία κατά την διάρκεια των πρώτων μηνών ζωής (Valenzuela & Schaub, 2018). Επιπλέον μπορεί να γίνει έκκριση της IgG στο γάλα με τρόπο προφυλακτικό για το νεογνό καθώς συμβάλλει στην ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας. Αξιοσημείωτη είναι η προστατευτική δράση της στην ανοσία, με την ιδιότητα αντικής και αντιβακτηριακής δράσης. Παράλληλα είναι ικανές να προκαλούν εξουδετέρωση τοξινών και ενεργοποίηση μακροφάγων, συμπληρώματος και πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων.

Διακρίνονται τέσσερις υποτάξεις της IgG (IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4) σύμφωνα με την ακολουθία αμινοξέων όπως αυτή εμφανίζεται στην γ αλυσίδα παρουσιάζοντας διαφοροποιήσεις ως προς τον αριθμό και την θέση δισουλφιδικών δεσμών που συναντώνται στην περιοχή του αρμού μεταξύ των δυο βαριών αλυσίδων. Ο αριθμός των υποτάξεων εξαρτάται από την συγκέντρωση τους στον ορό (Aschermann et al, 2010). Παρουσιάζουν επιπρόσθετες διαφοροποιήσεις στην βιολογική δράση (πχ στην ικανότητα σύνδεσης με Fc κυτταρικούς υποδοχείς για IgG όπου οι IgG1 και IgG3 συμβάλλουν στην επαγωγή οψωνισμού). Μεταξύ των υποτάξεων, οι IgG1, 2 και 4 έχουν την ιδιότητα να διαπερνούν τον πλακούντα παρέχοντας προστασία στο έμβρυο ενώ η IgG1 είναι καθοριστική για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

2.4.4 Ανοσοσφαιρίνη D (IgD)

Η ανοσοσφαιρίνη D με μοριακό βάρος 150kDa, αποτελεί μια ανοσοσφαιρίνη η οποία συναντάται σε χαμηλή ποσότητα στον ορό αίματος, σε ποσοστό κάτω του 1% των συνολικών ανοσοσφαιρινών. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της αντιστοιχεί σε 30 μg/ml δηλαδή σε 0,2% του συνόλου ανοσοσφαιρίνης που υπάρχει στον ορό.

Αναφορικά με την δομή της έχει ένα ζεύγος βαριών αλυσίδων δ σε συνδυασμό με ένα ζεύγος ελαφριών αλυσίδων κ ή λ. Η ανακάλυψη της έγινε το 1964, σε πάσχοντα με πολλαπλό μυέλωμα όμως η ακριβής βιολογική λειτουργία της είναι άγνωστη ακόμα και μέχρι σήμερα. Λόγω της παρουσίας της στην κυτταρική μεμβράνη Β λεμφοκυττάρων έχει πιθανώς συνδεθεί με την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων από αντιγόνα. Έχει επίσης την ιδιότητα πρόσδεσης σε βασεόφιλα καθώς και σε μαστικά κύτταρα επάγοντας με αυτό τον τρόπο την ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων ώστε τελικά να επιτυγχάνεται παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων που συνεισφέρουν στην προστασία του αναπνευστικού συστήματος (Chen & Cerutti, 2011).

2.4.5 Ανοσοσφαιρίνη E (IgE)

Η ανοσοσφαιρίνη E με μοριακό βάρος 190kDa, αποτελεί ανοσοσφαιρίνη η οποία συναντάται σε πολύ χαμηλή ποσότητα στον ορό αίματος, σε ποσοστό περίπου 0,005% των συνολικών ανοσοσφαιρινών, με συγκέντρωση 0,3 μg/ml. Αύξηση της συγκέντρωσης της παρατηρείται σε περιπτώσεις υπερευαισθησίας όπως πχ σε άσθμα, κνίδωση και αναφυλακτικό σοκ. Αναφορικά με τα δομικά της χαρακτηριστικά, την δομούν 2 βαριές αλυσίδες τύπου ε και 2 ελαφριές αλυσίδες τύπου κ ή λ. Παρουσιάζει τον πιο μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, τον πιο υψηλό ρυθμό πίεσης καθώς επίσης και τον πιο χαμηλό ρυθμό σύνθεσης. Δεσμεύεται στην επιφάνεια κυτταρικής μεμβράνης μαστοκυττάρων καθώς και βασεόφιλων. Μετά την πρόσδεση στους μεμβρανικούς υποδοχείς, του συμπλόκου IgE-αντιγόνο ενεργοποιείται η αποκοκκίωση, η μεταφορά δηλαδή κοκκίων από τα βασεόφιλα και τα μαστοκύτταρα στην πλασματική μεμβράνη, απελευθερώνοντας στο εξωκυττάριο περιβάλλον το περιεχόμενο τους (απελευθέρωση ισταμίνης ή σεροτονίνης υπεύθυνη για πυροδότηση αλλεργικών αντιδράσεων). Η ανοσοσφαιρίνη E έχει δείχθει ότι συμβάλλει στις λοιμώξεις που προκαλούνται από παράσιτα (έλμινθες) γεγονός που αιτιολογεί την αυξημένη συγκέντρωσή της στον ορό σε τέτοιες καταστάσεις (Gould et al, 2003).

3. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Η κατανόηση της δομής, των τάξεων, των βιολογικών λειτουργιών και ιδιοτήτων των αντισωμάτων έχει συμβάλλει καθοριστικά στην αξιοποίηση τους στη σύγχρονη φαρμακευτική έρευνα και ανάπτυξη, καθιστώντας τα ιδιαίτερα ελκυστικά μόρια κατάλληλα για θεραπευτικές εφαρμογές.

Μάλιστα η ανάγκη να παραχθούν αντισώματα με σταθερό μοριακό προφίλ, υψηλή ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα, ειδικότητα καθώς επίσης και στόχευση ενός μόνο στόχου, συνέβαλλε στην απομόνωση και παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων.

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies, mAbs) αποτελούν ομοιογενή πληθυσμό καθώς έχουν ως προέλευσή τους έναν Β κλώνο που είναι μοναδικός και είναι ειδικά σε ένα αντιγονικό επίτοπο. Έχουν επίσης την ιδιότητα της ατέρμονης παραγωγής *in vitro*. Αποτελούν μάλιστα μια κατηγορία θεραπευτικών αντισωμάτων ευρέως και ταχέως αναπτυσσόμενων που διερευνώνται τελευταία από πληθώρα φαρμακευτικών εταιρειών καθώς εμφανίζουν υψηλή θεραπευτική αποτελεσματικότητα και ελάχιστες παρενέργειες (Fekete et al, 2013a). Ο FDA (Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ) και ο EMA (Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων) έχουν εγκρίνει πληθώρα θεραπευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Πάνω από $\frac{3}{4}$ του συνόλου των μονοκλωνικών αντισωμάτων, αξιοποιούνται ως θεραπευτικό μέσο για αυτοάνοσα νοσήματα (ρευματοειδής αρθρίτιδα), παχυσαρκία, καρδιαγγειακά νοσήματα, μολυσματικές ασθένειες, χρόνια νοσήματα (άσθμα, οστεοπόρωση) καθώς και σε διάφορες μορφές καρκίνου (παχέος εντέρου, μαστού, πνεύμονα) (Fekete et al, 2013a).

3.2 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η ονοματολογία των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) διέπεται από ένα δυναμικό πλαίσιο κανόνων που θεσπίζει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) μέσω του προγράμματος Διεθνών Μη Κατοχυρωμένων Ονομασιών (International Nonproprietary Names - INN). Η δομή αυτών των ονομάτων έχει υποστεί σημαντικές τροποποιήσεις, με την πλέον πρόσφατη και ριζική αλλαγή να τίθεται σε ισχύ από τον Δεκέμβριο του 2021.

Μέχρι το 2021, η ονοματολογία βασιζόταν στη χρήση της κατάληξης -mab, η οποία συνοδευόταν από δύο ενθέματα (substems) που προσδιόριζαν τον θεραπευτικό στόχο και την προέλευση του μορίου καθώς επίσης και από το πρόθεμα. Αναφορικά με το πρόθεμα, αποτελούσε μια μοναδική και τυχαία επιλεγμένη συλλαβή για τη δημιουργία ευφωνίας και τη διαφοροποίηση του σκευάσματος. Το ένθεμα στόχου (target infix) υποδείκνυε την παθολογία-στόχο και το ένθεμα προέλευσης (source infix), προσδιόριζε τη σύνθεση του αντισώματος (Πίνακας 2) (Mayrhofer & Kunert, 2019).

Πίνακας 2: Ονοματολογία μονοκλωνικών αντισωμάτων (Mayrhofer & Kunert, 2019).

ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ					
ΠΡΟΘΕΜΑ	ΕΝΘΕΜΑ ΣΤΟΧΟΥ		ΕΝΘΕΜΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ		ΚΑΤΑΛΗΞΗ
Τυχαία επιλεγμένη συλλαβή που δημιουργεί ευφωνία	-o(s)-	Bone	-u-	Human	-mab
	-v(i)-	Viral	-o-	Mouse	
	-b(a)-	Bacterial	-a-	Rat	
	-l(i)-	Immunomodulating	-e-	Hamster	
	-c(i)-	Cardiovascular	-i-	Primate	
	-k(i)-	Interleukin as target	-xi-	Chimeric	
	-t(u)-	Miscellaneous tumor	-zu-	Humanized	
	-tox(a)-	Toxin as target	-axo-	Rat/mouse hybrid	
	-f(u)-	Fungal	-xizu-	Combination of humanized & chimeric	
	-n(e)-	Neural	-vet-	Veterinary use	

Λόγω του τεράστιου αριθμού νέων μορίων, και προκειμένου να αντανακλώνται καλύτερα οι τεχνολογικές εξελίξεις ο WHO, από το 2022 αποφάσισε την κατάργηση της κατάληξης -mab για τις νέες εγκρίσεις, αντικαθιστώντας τη με τέσσερις διακριτές κατηγορίες που περιγράφουν τη δομή του αντισώματος (Πίνακας 3) (Guimaraes et al., 2022).

Πίνακας 3: Αντικαταστάσεις κατάληξης -mab (Guimaraes et al., 2022).

Κατάληξη	Περιγραφή	Χαρακτηριστικά
-tug	Unmodified immunoglobulins	Μονοειδικά αντισώματα πλήρους μήκους με μη τροποποιημένες σταθερές περιοχές (Fc).
-bart	Antibody artificial	Μονοειδικά αντισώματα πλήρους μήκους με τεχνητά τροποποιημένες σταθερές περιοχές.
-mig	Multi-specific immunoglobulins	Διειδικά ή πολυειδικά αντισώματα, ανεξαρτήτως δομής ή μορφής.
-ment	Antibody fragments	Αποσπάσματα αντισωμάτων (π.χ. scFv-Fc) που περιλαμβάνουν τουλάχιστον μία μεταβλητή περιοχή.

Μάλιστα αξίζει να αναφερθεί πως στο νέο σύστημα, το ένθεμα προέλευσης (source infix) έχει καταργηθεί πλήρως, καθώς θεωρήθηκε ότι δεν προσέδιδε ουσιαστική κλινική πληροφορία, αντιθέτως, περιόριζε τις δυνατότητες ονοματοδοσίας. Επιπλέον,

με την αναθεώρηση του 2021, ορισμένα ενθέματα στόχου εξειδικεύτηκαν περαιτέρω. Για παράδειγμα, το ένθεμα -li- (ανοσοτροποποιητικά) διαχωρίστηκε σε: -pru- (για ανοσοκατασταλτικά) / -sto- (για ανοσοδιεγερτικά)/ -ler-(για αντισώματα που στοχεύουν αλλεργιογόνα) (Guimaraes et al., 2022).

Μελλοντικές εξειδικεύσεις και αναθεωρήσεις των ενθεμάτων στόχου είναι εξίσου αναγκαίες. Είχε προταθεί να καταργηθούν πλήρως όπως ακριβώς συνέβη και με τα ενθέματα προέλευσης όμως τελικά αποφασίστηκε η διατήρησή τους καθώς δίνουν πολύτιμες κλινικές πληροφορίες όσον αφορά τη δράση και τις πιθανές παρενέργειες των αντισωμάτων. Μια αλλαγή αποτελεί η διεύρυνση του ενθέματος -ki- που ενώ αρχικά αναφερόταν αποκλειστικά σε ιντερλευκίνες, πλέον περιλαμβάνει το σύνολο των κυτταροκινών και των υποδοχέων τους (τόσο των διαλυτών όσο και των δεσμευμένων στη μεμβράνη). Επίσης, προτάθηκε επαναπροσδιορισμός του ενθέματος -gro-, όπου το προγενέστερο ένθεμα -gros- (περιορισμένο σε αυξητικούς παράγοντες σκελετικών μυών) απλοποιήθηκε σε -gro-, καλύπτοντας πλέον το ευρύ φάσμα των αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους γενικότερα. Τέλος ορισμένες κατηγορίες παρέμειναν σταθερές, λόγω της σαφήνειάς τους, όπως τα -ba- (βακτήρια), -fung- (μύκητες), -toxa- (τοξίνες), -vi- (ιοί) και -vet- (κτηνιατρική χρήση).

Επομένως διαπιστώνεται πως τα παραπάνω στοιχεία αποτελούν τη βάση για τη σωστή ταυτοποίηση και φαρμακοεπαγρύπνηση των βιολογικών παραγόντων στη σύγχρονη θεραπευτική.

3.3 ΡΟΛΟΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα μέσω των μηχανισμών δράσης τους έχουν διαφοροποιημένους ρόλους. Μπορούν να δράσουν σαν ανταγωνιστές καθώς είναι σχεδιασμένα να συνδέονται σε συγκεκριμένους στόχους (συνήθως υποδοχείς μορίων) προκαλώντας αναστολή της λειτουργίας τους, παρεμποδίζοντας την σύνδεση υποδοχέων με τον φυσικό τους συνδέτη. Στρατολογώντας κύτταρα του ανοσοποιητικού επιτυγχάνεται καταστροφή παθογόνων κυττάρων. Λειτουργούν επίσης ως εξειδικευμένοι μεταφορικοί παράγοντες με τρόπο που επιτρέπουν την στοχευμένη αναγνώριση και μεταφορά σε νοσούντα κύτταρα των θεραπευτικών ουσιών (Pigge, 2008). Τα τελευταία χρόνια βιοχημικές εταιρείες δραστηριοποιούνται κυρίως στον τομέα της ανάπτυξης των θεραπευτικών αντισωμάτων αξιοποιώντας έναν από τους παραπάνω ρόλους ή συνδυασμό αυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν αντικαρκινικά μονοκλωνικά αντισώματα σχεδιασμένα για να αναγνωρίζουν και να προσδένονται σε καρκινικούς στόχους, συμβάλλοντας στην καταστροφή(από T-κύτταρα του ανοσοποιητικού) και στην αναστολή ανάπτυξης τους.

3.4 ΕΞΕΛΙΞΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

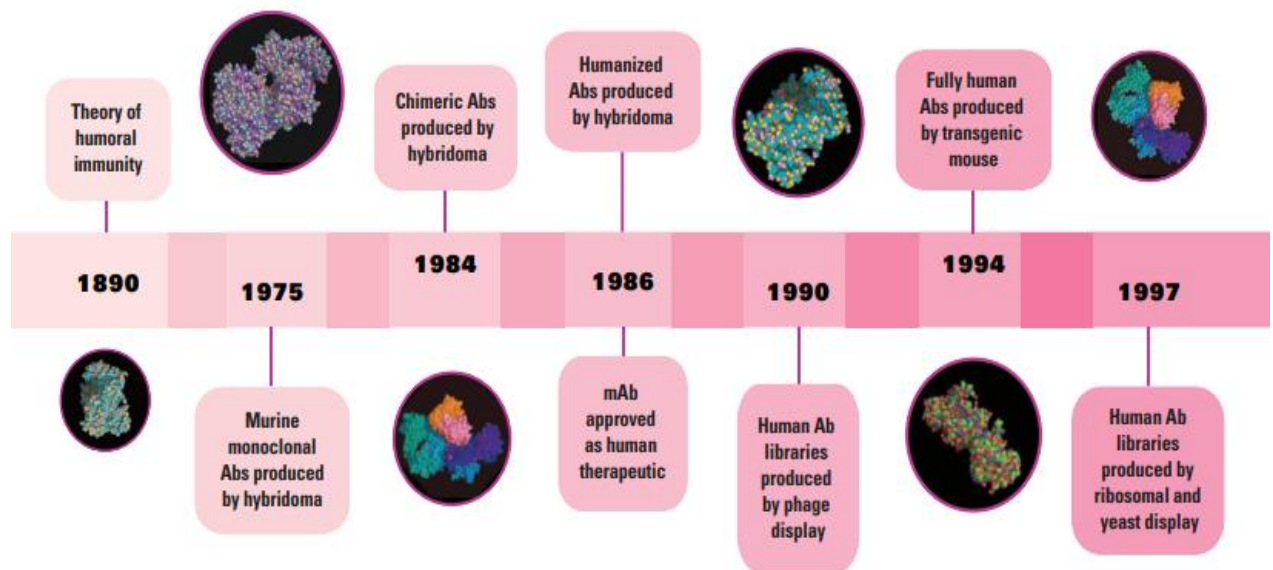
Αναφορικά με την ιστορική αναδρομή των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Εικόνα 14) μπορεί να ταυτιστεί με επανάσταση στη Βιοϊατρική καθώς πλέον τα αντισώματα αξιοποιούνται και εξελίσσονται από «εργαστηριακά εργαλεία» σε πολύ ισχυρά και αποδοτικά θεραπευτικά μέσα. Δυο ήταν τα πιο καθοριστικά στάδια στην ανακάλυψη των θεραπευτικών αντισωμάτων, πρωταρχικά το 1890 η ανακάλυψη θεραπείας με ορό και έπειτα το 1975 η ανάπτυξη μεθόδου για παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Το 1890 ο Emil von Behring και ο Shibasaburo Kitasato ανακάλυψαν πως ο ορός αίματος ζώων ανθεκτικών σε τέτανο ή διφθερίτιδα μπορεί να αξιοποιηθεί για ανοσία (παθητική) άλλων ζώων, ανακάλυψη που οδήγησε τον Behring σε απονομή βραβείου Nobel το 1901. Το 1900, ο Paul Ehrlich, ο οποίος τιμήθηκε με το Βραβείο Nobel το 1908, διατύπωσε την επιλεκτική θεωρία και ανέπτυξε το μοντέλο των πλευρικών αλυσίδων, επιδιώκοντας να ερμηνεύσει την προέλευση των αντισωμάτων του ορού. Το μοντέλο υποστήριζε πως τα αιμοποιητικά κύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους εξειδικευμένους υποδοχείς (υποδοχείς πλευρικής αλυσίδας), οι οποίοι διαθέτουν δομική συμπληρωματικότητα προς συγκεκριμένους μολυσματικούς παράγοντες, κατά το πρότυπο «κλειδί-κλειδαριά». Η πρόσδεση του παθογόνου παράγοντα στον αντίστοιχο υποδοχέα οδηγεί στην εξουδετέρωσή του, ενώ ταυτόχρονα επάγει την αυξημένη παραγωγή και έκκριση όμοιων υποδοχέων από το κύτταρο, οι οποίοι απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ως διαλυτά αντισώματα. Αργότερα, το 1957, ο Frank Macfarlane Burnet διατύπωσε τη θεωρία της κλωνικής επιλογής (clonal selection theory), η οποία αποτέλεσε θεμελιώδη λίθο της σύγχρονης ανοσολογίας. Βάσει της θεωρίας αυτής, κάθε λεμφοκύτταρο εκφράζει στην κυτταρική του μεμβράνη έναν υποδοχέα με προκαθορισμένη ειδικότητα σύνδεσης έναντι ενός και μόνο αντιγόνου. Η αναγνώριση και δέσμευση του ειδικού αντιγόνου από τον αντίστοιχο υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση του λεμφοκυττάρου, το οποίο υφίσταται κλωνικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, παράγοντας πληθυσμό θυγατρικών κυττάρων με πανομοιότυπη ανοσολογική ειδικότητα. Με τον τρόπο αυτό εξηγείται η εξαιρετική εξειδίκευση και η ενίσχυση της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης.

Ο Rodney Robert Porter και ο Gerald Maurice Edelman διερεύνησαν την μοριακή δομή των αντισωμάτων σηματοδοτώντας μια καινούργια αρχή στην κατανόηση και αξιοποίηση των ανοσοσφαιρινών, κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο αλλά και σε πρακτικό. Το 1953, ο Porter απέδειξε πειραματικά ότι το μόριο του αντισώματος μπορεί να υποστεί ενζυμικό διαχωρισμό, αναδεικνύοντας έτσι τη διάκριση μεταξύ των περιοχών δέσμευσης του αντιγόνου και των περιοχών που αλληλεπιδρούν με το σύστημα του συμπληρώματος. Ακολούθως, το 1969, ο Edelman διευκρίνισε την πρωτοταγή δομή των ανοσοσφαιρινών, αποδεικνύοντας ότι κάθε μόριο αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, συγκεκριμένα δύο βαριές (heavy chains) και δύο ελαφριές (light chains), οι οποίες συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Τα ευρήματα αυτά θεμελίωσαν τη σύγχρονη αντίληψη για την αρχιτεκτονική και τη

λειτουργική οργάνωση των αντισωμάτων, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην ανάπτυξη βιοτεχνολογικών και θεραπευτικών εφαρμογών.

Καθοριστικό σημείο στην ιστορία της ανοσοτεχνολογίας αποτέλεσε το 1975 η ανάπτυξη της τεχνολογίας υβριδώματος από το Georges Köhler και César Milstein, μια τεχνολογία βασιζόμενη στο γεγονός ότι υγιή Β λεμφοκύτταρα συντήκονται με κύτταρα μυελώματος, επιτρέποντας κατά αυτό τον τρόπο τη δημιουργία κυτταρικών σειρών ικανών να εκκρίνουν απεριόριστες ποσότητες μονοκλωνικών αντισωμάτων με προκαθορισμένη ειδικότητα. Η συμβολή των δύο επιστημόνων αναγνωρίστηκε διεθνώς και τους απονεμήθηκε βραβείο Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1984. Η κλινική αξιοποίηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων ξεκίνησε το 1986 με την κυκλοφορία του Muromonab-CD3, του πρώτου εγκεκριμένου μονοκλωνικού αντισώματος για την πρόληψη και αντιμετώπιση της απόρριψης μοσχεύματος. Το 1988, η ερευνητική ομάδα του Greg Winter παρήγαγε το πρώτο ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα, ανοίγοντας τον δρόμο για τη μείωση της ανοσογονικότητας των θεραπευτικών αντισωμάτων. Στη συνέχεια, το 1989 ένα από τα πρώτα επιτυχημένα θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα ήταν το Rituximab, το οποίο εγκρίθηκε για τη θεραπευτική αντιμετώπιση του λεμφώματος non-Hodgkin (NHL), σηματοδοτώντας σημαντική πρόοδο στην ογκολογική ανοσοθεραπεία. Το 1990, αναπτύσσεται η τεχνολογία έκθεση στον φάγο (phage display) επεκτείνοντας με τεράστια επιτυχία την δημιουργία βιβλιοθηκών ανθρώπινων αντισωμάτων, μια εξέλιξη που επέτρεψε την παραγωγή πλήρως ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Ακολούθησε μια χρονιά ορόσημο για τα μονοκλωνικά αντισώματα, το 1997, όπου αναπτύχθηκαν δυο βασικές τεχνικές *in vitro* απεικόνισης (απεικόνιση σε ριβοσώματα-ribosomal display και απεικόνιση σε ζυμομύκητες- yeast display), υπερπηδώντας τους περιορισμούς των παλαιότερων μεθόδων (υβριδώματα). Το πρώτο ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα που έλαβε κανονιστική έγκριση ήταν το Trastuzumab για θεραπεία του HER2-θετικού καρκίνου του μαστού. Μετέπειτα την χρονιά 2002 το 1^ο απόλυτα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα, έλαβε έγκριση, το Adalimumab, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπευτική αντιμετώπιση αυτοάνοσων νοσημάτων. Τέλος, το 2006 εγκρίθηκε το Panitumumab, μονοκλωνικό αντίσωμα χρήσιμο στην αντιμετώπιση μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου, εδραιώνοντας περαιτέρω τον ρόλο των μονοκλωνικών αντισωμάτων στην εξατομικευμένη αντικαρκινική θεραπεία.



Εικόνα 14: Ιστορική εξέλιξη μονοκλωνικών αντισωμάτων (Piggee, 2008).

3.5 ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η σημαντική ομοιότητα που παρουσιάζουν τα μονοκλωνικά αντισώματα ως προς τη μοριακή τους αρχιτεκτονική, τις συνθήκες καλλιέργειας και τις μεθόδους καθαρισμού, επέτρεψε τη μεταφορά τεχνογνωσίας από την ανάπτυξη ενός αντισώματος στην παραγωγή άλλων, διευκολύνοντας την καθιέρωσή τους ως βιοφαρμακευτικοί παράγοντες. Ωστόσο, η αξιοποίησή τους ως θεραπευτικά μόρια συνοδεύεται από ουσιώδεις προκλήσεις. Τα mAbs, ως σύνθετες γλυκοπρωτεΐνες, υφίστανται κατάλληλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (γλυκοζυλίωση) και σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς προκειμένου να διατηρήσουν τη φυσιολογική τους διαμόρφωση και τη βιολογική δραστηριότητά τους. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι δυνατόν να επηρεάσουν όχι μόνο τη στερεοδιάταξη και τη λειτουργικότητα του μορίου, αλλά και την ανοσογονικότητά του (Filipula, 2007).

Η αυξημένη μοριακή πολυπλοκότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων τα καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητα σε μεταβολές που ενδέχεται να προκύψουν κατά τη διαδικασία παραγωγής. Μικρές διαφοροποιήσεις στις συνθήκες καλλιέργειας ή επεξεργασίας μπορούν να οδηγήσουν σε ετερογένεια μεταξύ των επιμέρους μορίων. Οι μεταβολές αυτές περιλαμβάνουν χημικές ή ενζυμικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν το φορτίο των πεπτιδικών αλυσίδων, συμπεριλαμβανομένων τροποποιήσεων όπως η απαμιδίωση, η απομάκρυνση του καρβοξυτελικού καταλοίπου λυσίνης, η αποκοπή του αμινοτελικού γλουταμινικού οξέος και η οξείδωση καταλοίπων μεθειονίνης και διαφοροποιήσεις στο πρότυπο γλυκοζυλίωσης. Επιπλέον, μεταβολές στο μοριακό μέγεθος, οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε συσσωμάτωση ή σε λανθασμένο σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών, συμβάλλουν περαιτέρω στη διαμόρφωση ενός

ετερογενούς πληθυσμού μορίων. Το σύνολο αυτών των παραγόντων ενισχύει τη συνολική ετερογένεια των IgG, με δυνητικές επιπτώσεις στην ασφάλεια, την ποιότητα και την αποτελεσματικότητα του τελικού βιοφαρμακευτικού προϊόντος (Fekete et al., 2013a).

3.6 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ

Τα θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων μοριακών στόχων που εμπλέκονται σε παθολογικές διεργασίες, γεγονός που μεταφράζεται συνήθως σε ευνοϊκότερο προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών σε σύγκριση με τα συμβατικά φάρμακα μικρού μοριακού βάρους. Η στοχευμένη τους δράση περιορίζει την αλληλεπίδραση με μη επιθυμητούς βιολογικούς μηχανισμούς, συμβάλλοντας έτσι σε μεγαλύτερη θεραπευτική ακρίβεια. Επιπροσθέτως, λόγω του αυξημένου μοριακού τους μεγέθους και της πρωτεϊνικής τους φύσης, τα mAbs δεν μεταβολίζονται μέσω των κλασικών ηπατικών ενζύμων. Αντιθέτως, απομακρύνονται κυρίως μέσω μηχανισμών πρωτεολυτικής αποικοδόμησης, ενδοκυττάρωσης κατόπιν πρόσδεσης σε υποδοχείς και, σε ορισμένες περιπτώσεις, μέσω της καταβολικής οδού που σχετίζεται με το ίδιο το αντιγόνο-στόχο.

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σε βιολογικά δείγματα, των θεραπευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων όπως το πλάσμα ή ο ορός, θεωρείται γενικά λιγότερο πολύπλοκη σε σύγκριση με τις αναλύσεις φαρμάκων μικρού μοριακού βάρους, κυρίως λόγω της διακριτής πρωτεϊνικής τους φύσης. Γεγονός αποτελεί πως οι σύγχρονες αναλυτικές προσεγγίσεις αντιμετωπίζουν σημαντικές προκλήσεις. Ένα από τα βασικά ζητήματα αφορά την επιλεκτική ανίχνευση συγκεκριμένων θεραπευτικών mAbs, τα οποία διαφέρουν από τις ανοσοσφαιρίνες IgG κυρίως ως προς τη μεταβλητή περιοχή τους, ενώ μοιράζονται κοινές σταθερές περιοχές. Δεδομένου ότι οι ανοσοσφαιρίνες IgG απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα, η διάκριση του φαρμακευτικού αντισώματος από το φυσιολογικό ανοσοσφαιρινικό υπόβαθρο απαιτεί αναλυτικές μεθόδους υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης (Todoroki et al., 2020).

3.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

3.7.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΒΡΙΔΩΜΑΤΟΣ

Η αξιοποίηση των αντισωμάτων ως διαγνωστικών και θεραπευτικών εργαλείων σηματοδοτήθηκε από την ανάπτυξη της τεχνολογίας των μονοκλωνικών αντισωμάτων μέσω της μεθόδου υβριδωμάτων. Η προσέγγιση αυτή αποτελεί μια κλασική μέθοδο που βασίστηκε στη σύντηξη ενεργοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων ποντικού, τα οποία παράγουν ειδικά αντισώματα, με αθάνατες κυτταρικές σειρές μυελώματος ποντικού. Η συνέπεια αυτής της σύντηξης ήταν η δημιουργία υβριδικών κυτταρικών κλώνων

(υβριδώματα), οι οποίοι συνδυάζουν την ικανότητα απεριόριστου πολλαπλασιασμού με τη δυνατότητα σύνθεσης και έκκρισης αντισωμάτων καθορισμένης ειδικότητας (Köhler & Milstein, 1975).

Η τεχνολογία αυτή επέτρεψε την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι πρακτικά οποιουδήποτε αντιγονικού στόχου, προσφέροντας υψηλή εξειδίκευση και αναπαραγωγιμότητα. Ωστόσο, η απευθείας κλινική εφαρμογή μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού στον άνθρωπο συνοδεύτηκε από σημαντικούς περιορισμούς. Αρχικά, τα αντισώματα ζωικής προέλευσης αναγνωρίζονται συχνά ως ανοσολογικά ξένα μειώνοντας τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και ενδέχεται να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Επιπλέον, οι σταθερές περιοχές των ποντικών ανοσοσφαιρινών δεν αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με τους ανθρώπινους Fc υποδοχείς και τα συστατικά του συμπληρώματος, με αποτέλεσμα ανεπαρκή ενεργοποίηση των μηχανισμών τελεστή (effector functions) στον ανθρώπινο οργανισμό (Chiu & Gilliland, 2016).

3.7.2 ΧΙΜΑΙΡΙΚΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα χιμαιρικά μονοκλωνικά αντισώματα (Εικόνα 15) αποτελούν γενετικά τροποποιημένα μόρια, στα οποία συνδυάζονται δομικά στοιχεία διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Συγκεκριμένα, η μεταβλητή περιοχή (variable region), η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και δέσμευση του αντιγόνου, προέρχεται από μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, ενώ η σταθερή περιοχή (constant region) αντικαθίσταται από την αντίστοιχη ανθρώπινη αλληλουχία ανοσοσφαιρίνης (Kohler & Milstein 1975).

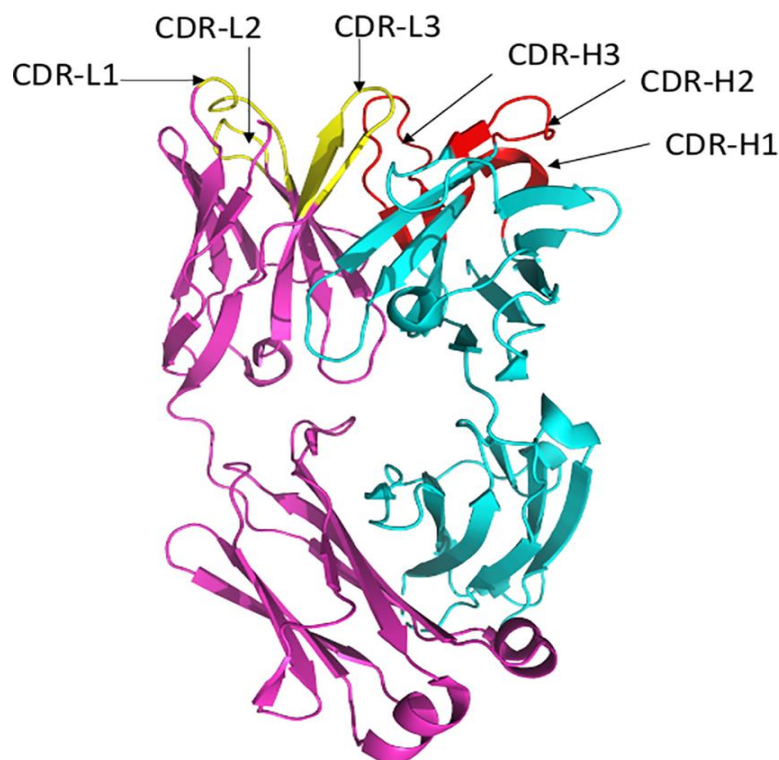
Η παραγωγή τους βασίζεται σε τεχνολογίες κλωνοποίησης ανασυνδυασμένου DNA. Στο πλαίσιο αυτό, απομονώνονται από το γονίδιο ανοσοσφαιρίνης ποντικού οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις μεταβλητές περιοχές (VH και VL), καθώς και τα απαραίτητα ρυθμιστικά στοιχεία (όπως ο υποκινητής και η οδηγός αλληλουχία). Οι αλληλουχίες αυτές συντήκονται με ανθρώπινα εξώνια που κωδικοποιούν τη σταθερή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης. Το ανασυνδυασμένο γονίδιο (χίμαιρα) εκφράζεται σε κατάλληλα συστήματα παραγωγής, οδηγώντας στη σύνθεση ενός υβριδικού αντισώματος με μικτή μοριακή σύσταση (Neuberger et al., 1985). Τα παραγόμενα αντισώματα είναι σε ένα ποσοστό 70% ανθρώπινα με καθορισμένη αντιγονική εξειδίκευση από γονίδια ποντικών. Το υπόλοιπο 30% αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη ποντικού. Αυτά τα ποσοστά συνεισφέρουν στο να μην προκαλείται ανοσολογική απάντηση.

Η μεταβλητή περιοχή ποντικού είναι υπεύθυνη για τον αποκλειστικό καθορισμό της αντιγονικής εξειδίκευσης των χιμαιρικών αντισωμάτων δεδομένου ότι αυτή περιέχει τα συμπληρωματικά καθοριστικά τμήματα (CDRs) που αναγνωρίζουν τον ισότυπο.

Όσον αφορά τα CDRs, πρόκειται για μια συνεργική διάταξη 6 υπερμεταβλητών τμημάτων, τρία εκ των οποίων εντοπίζονται στο μεταβλητό τμήμα της βαριάς αλυσίδας και τρία στο αντίστοιχο μεταβλητό τμήμα της ελαφριάς αλυσίδας (Chiu & Gilliland, 2016; Shrestha et al., 2021) (Εικόνα 15). Αντιθέτως, η ανθρώπινη σταθερή περιοχή προσδίδει στο μόριο τις βιολογικές ιδιότητες του αντίστοιχου ισοτόπου, συμπεριλαμβανομένης της αλληλεπίδρασης με υποδοχείς Fc και της ενεργοποίησης μηχανισμών όπως η ADCC και η CDC (κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από συμπλήρωμα).

Η ενσωμάτωση ανθρώπινων σταθερών περιοχών μειώνει σημαντικά τον αριθμό των ξενικών (μη ανθρώπινων) επιτόπων, γεγονός που συνεπάγεται χαμηλότερη ανοσογονικότητα σε σύγκριση με τα πλήρως ποντικού μονοκλωνικά αντισώματα. Ωστόσο, η παρουσία των μεταβλητών περιοχών ποντικού συνεπάγεται ότι το μόριο εξακολουθεί να φέρει μη ανθρώπινες αλληλουχίες. Κατά συνέπεια, παραμένει δυνατή η ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης έναντι του θεραπευτικού αντισώματος, ιδιαίτερα μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση.

Συνολικά, τα χημικά αντισώματα αποτέλεσαν σημαντικό μεταβατικό στάδιο στην εξέλιξη των θεραπευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, γεφυρώνοντας το χάσμα μεταξύ των πλήρως ποντικού και των εξανθρωπισμένων ή πλήρως ανθρώπινων αντισωμάτων, με σαφή βελτίωση στο προφίλ ανοσογονικότητας και κλινικής ανεκτικότητας.



Εικόνα 15: Διάταξη υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) (Shrestha et al., 2021).

3.7.3 ΑΝΘΡΩΠΟΠΗΜΕΝΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα ανθρωποποιημένα μονοκλωνικά αντισώματα (Εικόνα 16) είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να διατηρούν αποκλειστικά τις υπερμεταβλητές περιοχές πρόσδεσης του αντιγόνου (CDRs) που προέρχονται από το ποντίκι, δηλαδή τα τμήματα που καθορίζουν τη συμπληρωματικότητα με τον επίτοπο του αντιγόνου-στόχου. Αντιθέτως, το υπόλοιπο μόριο —συμπεριλαμβανομένων των σταθερών και των πλασμιωτικών περιοχών— αντικαθίσταται από αντίστοιχες ανθρώπινες αλληλουχίες, με στόχο τη μέγιστη δυνατή ομοιότητα με τα φυσικά ανθρώπινα ανοσοσφαιρινικά μόρια. Αποτελούνται περίπου από 85-90% από ανθρώπινες αλληλουχίες ενώ περίπου 10-15% είναι οι υπερμεταβλητές περιοχές (CDRs) προερχόμενες από ποντίκι (Jones et al., 1986).

Η στρατηγική αυτή μειώνει σημαντικά την ανοσογονικότητα σε σύγκριση με τα χημικά αντισώματα. Παράλληλα, τα ανθρωποποιημένα αντισώματα διατηρούν τις φυσιολογικές εκτελεστικές λειτουργίες των ανθρώπινων IgG, όπως την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος και τη διαμεσολάβηση κυτταροτοξικών ή φαγοκυτταρικών μηχανισμών μέσω αλληλεπίδρασης με τους Fc υποδοχείς (FcRs) (Jones et al., 1986; Kindt et al., 2007).

3.7.4 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Η ανάπτυξη των αντισωμάτων αποκλειστικά ανθρώπινης προέλευσης (Εικόνα 16) κατέστη εφικτή χάρη στην εξέλιξη προηγμένων βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται τεχνικές κατευθυνόμενης μοριακής ποικιλομορφίας, όπως οι μέθοδοι τυχαίας μεταλλαξιγένεσης (random mutagenesis), καθώς και η αξιοποίηση βιβλιοθηκών φάγων (phage display libraries) που επιτρέπουν την επιλογή πεπτιδίων ή θραυσμάτων αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια σύνδεσης. Παράλληλα, καθοριστικό ρόλο διαδραμάτισε η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών, στα οποία έχουν ενσωματωθεί ανθρώπινες γονιδιακές περιοχές ανοσοσφαιρινών. Τα μοντέλα αυτά επιτρέπουν την παραγωγή αντισωμάτων με ανθρώπινη αλληλουχία, περιορίζοντας σημαντικά την ανοσογονικότητα και βελτιώνοντας τη θεραπευτική τους αξιοποίηση (McCafferty et al., 1990).

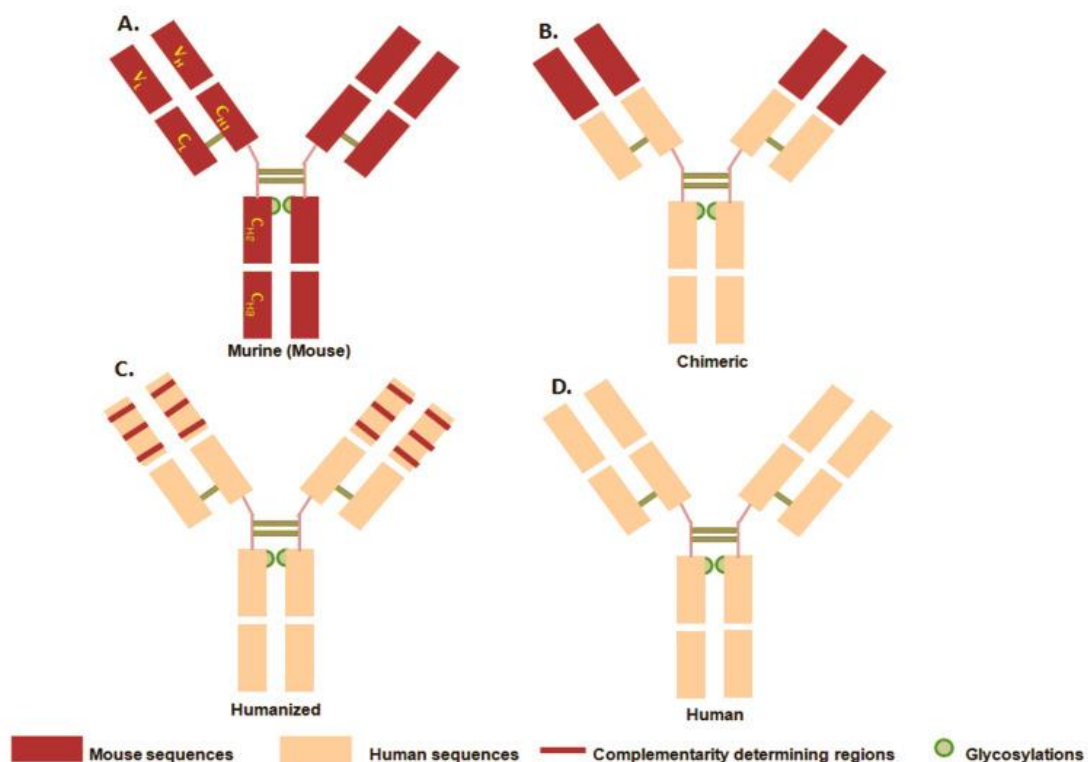
3.7.5 ΕΤΕΡΟΣΥΖΕΥΓΜΑΤΑ Ή ΔΙΕΙΚΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα διειδικά αντισώματα ή ετεροσυζεύγματα αποτελούν υβριδικές μοριακές οντότητες που συνδυάζουν δύο διαφορετικές αντιγονικές ειδικότητες σε ένα ενιαίο μόριο. Αρχικά, η παραγωγή τους επιτυγχάνεται είτε μέσω χημικής σύζευξης δύο διακριτών μονοκλωνικών αντισωμάτων είτε μέσω της δημιουργίας υβριδωμάτων προερχόμενων από σύντηξη κυτταρικών σειρών που εκκρίνουν διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα. Οι μέθοδοι αυτές οδηγούσαν συνήθως στη δημιουργία ετερογενούς

μίγματος αντισωματικών μορφών, το οποίο περιλάμβανε τόσο μονοειδικά όσο και διειδικά μόρια. Ως εκ τούτου, απαιτούνταν περαιτέρω διαδικασίες καθαρισμού και διαχωρισμού προκειμένου να απομονωθούν τα λειτουργικά διειδικά αντισώματα.

Η πρόοδος της γενετικής μηχανικής επέτρεψε τον ορθολογικό σχεδιασμό διειδικών μορίων με προκαθορισμένη δομή και λειτουργικότητα, μειώνοντας τα προβλήματα ετερογένειας. Στις σύγχρονες κατασκευές, το ένα τμήμα του αντισώματος φέρει ειδικότητα έναντι επιφανειακού αντιγόνου ανοσοδραστικών κυττάρων – όπως κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) ή ενεργοποιημένα μακροφάγα – ενώ το δεύτερο τμήμα στοχεύει ειδικά αντιγόνα που εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η φυσική προσέγγιση και λειτουργική σύζευξη του ανοσοκυττάρου με το νεοπλασματικό κύτταρο, ενισχύοντας την εκλεκτική κυτταροτοξική δράση (Kindt et al., 2007).

Η τεχνολογία αυτή έχει συμβάλει καθοριστικά στην ανάπτυξη καινοτόμων ανοσοθεραπευτικών στρατηγικών, επιτρέποντας τη στοχευμένη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι κακοηθών κυττάρων με αυξημένη αποτελεσματικότητα και ελεγχόμενη ειδικότητα.



Εικόνα 16: Τύποι μονοκλωνικών αντισωμάτων (Alhazmi & Albratty, 2023).

3.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Οι τρόποι με τους οποίους δρουν τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ποικίλοι και στοχεύουν κυρίως στην κινητοποίηση των φυσιολογικών ανοσολογικών μηχανισμών, οδηγώντας τελικά στην ενδυνάμωση της ανοσολογικής ανταπόκρισης (Modjtahedi et al., 2012). Οι μηχανισμοί αυτοί ταξινομούνται σε ορισμένες κατηγορίες (Εικόνα 17).

Αναστολή της λειτουργίας των υποδοχέων επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)

Το μονοκλωνικό αντίσωμα συνδέεται με τον υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου, εμποδίζοντας τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) να προσδεθεί σε αυτόν. Η παρεμπόδιση αυτή αναστέλλει τα σήματα που εμπλέκονται στις διεργασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα την καταστολή της κυτταρικής ωρίμανσης και την πρόκληση απόπτωσης (Kindt et al., 2007, Li et al., 2010).

Αναστολή της αγγειογένεσης μέσω στόχευσης αγγειογενετικών παραγόντων

Η ανάπτυξη και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων. Ορισμένα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν ειδικούς αγγειογενετικούς παράγοντες, αποτρέποντας, περιορίζοντας ή αναστέλλοντας τον σχηματισμό νέου αγγειακού δικτύου. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου στον όγκο, συμβάλλοντας στον περιορισμό της ανάπτυξής του.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) επιστρατεύονται στη θεραπευτική φαρέτρα κατά του καρκίνου μέσω ποικίλων στρατηγικών, οι οποίες στοχεύουν τόσο στην αναστολή των αυξητικών σημάτων όσο και στην ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης. Μια βασική στρατηγική αφορά την παρεμπόδιση της σύνδεσης αυξητικών παραγόντων με τους ομόλογους υποδοχείς τους, όπως ο VEGFR (υποδοχέας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα), περιορίζοντας έτσι την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων (Minna et al., 1982).

Ανασταλτική δράση διμερισμού υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (HER receptors)

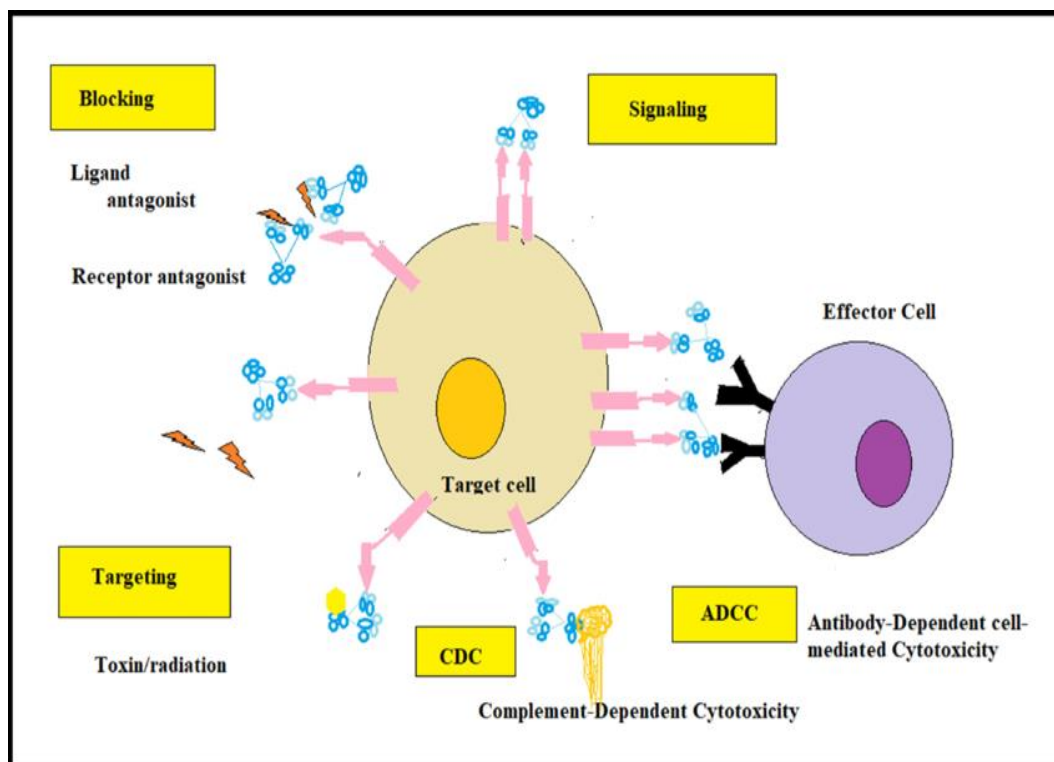
Αντίστοιχα, στην οικογένεια των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (HER receptors), τα αντισώματα δρουν ανασταλτικά στον διμερισμό των υποδοχέων. Αυτή η παρέμβαση ανακόπτει τη μεταγωγή ενδοκυττάρων σημάτων, οδηγώντας τελικά σε σημαντική επιβράδυνση της ογκογόνου ανάπτυξης (Foy & Matsuuchi 2001).

Ενίσχυση της Ενδογενούς Ανοσολογικής Απόκρισης

Πέραν της άμεσης αναστολής, τα mAbs λειτουργούν ως ανοσοτροποποιητές, ενισχύοντας τους φυσιολογικούς αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης του Fc τμήματος-θραύσματος του αντισώματος με τους υποδοχείς Fc (FcRs) των δραστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killers), τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Αυτή η σύνδεση πυροδοτεί εξειδικευμένους κυτταροτοξικούς μηχανισμούς, όπως την κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα που είναι εξαρτώμενη από αντίσωμα (ADCC) και την κυτταροτοξικότητα που είναι εξαρτώμενη από συμπλήρωμα (CDC), εντείνοντας την καταστροφή των στοχευμένων καρκινικών κυττάρων.

Στοχευμένη Μεταφορά Κυτταροτοξικών Παραγόντων

Τέλος, τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ως οχήματα μεταφοράς (vectors) υψηλής ακρίβειας για τη μεταφορά βιοδραστικών μορίων. Μέσω της σύζευξής τους με δραστικές ουσίες, (κυτταροστατικές τοξίνες, εξειδικευμένα ένζυμα, ραδιοϊσότοπα), τα mAbs διασφαλίζουν την εκλεκτική απόδοση του θεραπευτικού φορτίου απευθείας στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια του καρκινικού κυττάρου. Η προσέγγιση αυτή μεγιστοποιεί τη λυτική δράση επί του στόχου, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις παράπλευρες απώλειες στους υγιείς ιστούς.



Εικόνα 17: Μηχανισμοί δράσης μονοκλωνικών αντισωμάτων (Kaur & Chaudhary, 2021).

3.9 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα συγκαταλέγονται στις ταχύτερα εξελισσόμενες και πλέον υποσχόμενες κατηγορίες φαρμακευτικών παραγόντων στην σύγχρονη ιατρική. Η εφαρμογή τους επεκτείνεται στη θεραπεία αυτοάνοσων παθήσεων, καρδιαγγειακών και λοιμωδών νοσημάτων, στη μεταμόσχευση οργάνων (νεφρών) και στην αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου. Σε περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο προσφέρουν βελτιωμένη ποιότητα ζωής συγκριτικά με άλλες διαθέσιμες θεραπείες (Modjtahedi et al., 2012). Η υψηλή τους εξειδίκευση ως προς τον μοριακό στόχο τους, τα καθιστά πιο ακριβή και περισσότερο αποτελεσματικά σε σύγκριση με τα συμβατικά φάρμακα (μικρά μόρια). Χάρη στην ικανότητα που παρουσιάζουν για επιλεκτική πρόσδεση σε συγκεκριμένα αντιγόνα, τα mAbs μπορούν να παρεμποδίζουν επιλεκτικά αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην πρόληψη δυσλειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος. Μέσω τεχνικών γενετικής μηχανικής, δύναται η ειδική στόχευση εξειδικευμένων πρωτεϊνικών μορίων ή κυτταρικών πληθυσμών αναλόγως των απαιτήσεων σε θεραπεία. Η υψηλή ακρίβεια στη σύνδεση αντιγόνου-στόχου η δυνατότητα συνεχούς παραγωγής αντισωμάτων και βελτιστοποίησης καθώς και η μειωμένη αναγνώριση ως ξένων στοιχείων από οργανισμό ασθενούς, ελαχιστοποιούν τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Κατ' αυτό τον τρόπο, η χρήση τους κρίνεται επιτυχημένη, παρουσιάζουν αυξημένο προφίλ ασφάλειας, μειωμένη τοξικότητα και μειωμένο κόστος και χρόνο παραγωγής (Modjtahedi et al. 2012).

3.10 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα mAbs αποτελούν μακρομοριακές πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη χορήγησή τους κυρίως μέσω παρεντερικών οδών. Η ενέσιμη μορφή, αν και διασφαλίζει τη βιοδιαθεσιμότητα και τη δομική τους ακεραιότητα, ενδέχεται να μειώνει τη συμμόρφωση ορισμένων ασθενών λόγω της επεμβατικότητας της διαδικασίας. Στο πλαίσιο αυτό, σύγχρονες ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται στην ανάπτυξη εναλλακτικών φαρμακοτεχνικών μορφών, όπως από του στόματος σκευάσματα, με στόχο τη βελτίωση της αποδοχής από τους ασθενείς. Η επιτυχής διαμόρφωση τέτοιων μορφών προϋποθέτει την προστασία των αντισωμάτων από την ενζυμική αποδόμηση και τις ακραίες συνθήκες του γαστρεντερικού περιβάλλοντος, ώστε να διατηρούνται σταθερά, να παρατείνεται ο χρόνος παραμονής τους στον οργανισμό και να επιτυγχάνεται ενδεχομένως μείωση της συχνότητας χορήγησης, μεγιστοποιώντας το θεραπευτικό όφελος.

Παράλληλα, η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων συνοδεύεται από ιδιαίτερα αυξημένο κόστος, γεγονός που περιορίζει τη δυνατότητα μαζικής παραγωγής. Λόγω πολύπλοκης τριτοταγής και τεταρτοταγής δομής που συγκρατείται από δισουλφιδικούς δεσμούς, παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε φυσικοχημικές μεταβολές. Η

παραγωγή τους βασίζεται κυρίως σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών σε τεράστιες ποσότητες, οι οποίες απαιτούν εξειδικευμένες υποδομές, αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες και δαπανηρές διαδικασίες καθαρισμού και ποιοτικού ελέγχου (Chames et al., 2009). Λόγω της δυνατότητας στόχευσης ενός μόνο κυτταρικού τύπου σε περιπτώσεις νόσων υψηλής αντιγονικής ποικιλότητας, είναι χρήσιμο να παραχθούν παραπάνω από ένα αντισώματα.

Ένα επιπρόσθετο μειονέκτημα αφορά τη φυσική τους αστάθεια, ιδίως την τάση σχηματισμού συσσωματωμάτων σε υψηλές συγκεντρώσεις (Wang et al., 2009). Ο σχηματισμός συσσωματωμάτων δύναται να περιορίσει τη βιολογική δραστηριότητα των αντισωμάτων και να αυξήσει τον κίνδυνο ανοσογονικότητας στους ασθενείς (Wang, 2005). Ακόμη και χαμηλά ποσοστά συσσωματωμάτων πιθανόν να επιφέρουν σημαντικές επιπτώσεις (Chennamsetty et al., 2010). Επιπλέον, από τη βιοσύνθεση και την επεξεργασία έως την αποθήκευση, τη μεταφορά και την τελική χορήγηση τα μονοκλωνικά αντισώματα εκτίθενται σε ποικίλες καταπονήσεις, όπως μεταβολές θερμοκρασίας, ακραίες διακυμάνσεις pH και υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα και τη φαρμακολογική τους απόδοση (Cromwell et al., 2006).

Καθίσταται, επομένως, αναγκαίος ο σχεδιασμός τόσο των παραγωγικών διεργασιών όσο και των θεραπευτικών πρωτοκόλλων χορήγησης, συμπεριλαμβανομένης της προσαρμογής της δοσολογίας, με σκοπό τη βελτιστοποίηση του προφίλ ασφάλειας και αποτελεσματικότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στη συσχέτιση μεταξύ σχηματισμού συσσωματωμάτων και εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών, καθώς έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η παρουσία τους μπορεί να συμβάλλει στην πρόκληση ανοσολογικών αντιδράσεων στους ασθενείς (Rosenberg, 2006). Σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες λόγω χρήσης αντισωμάτων, που ομοιάζουν με τις παρενέργειες έπειτα από χημειοθεραπείες, προκύπτουν σε περιπτώσεις καρκίνου. Έχουν αναφερθεί σοβαρές περιπτώσεις αλλεργικών αντιδράσεων, οι οποίες, αν και εμφανίζονται σπάνια, ενδέχεται σε εξαιρετικά μικρό ποσοστό περιστατικών να καταλήξουν ακόμη και σε θανατηφόρα έκβαση. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί αιματολογικές διαταραχές, όπως μείωση των κυττάρων του αίματος, καθώς και καρδιαγγειακές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένης της καρδιακής ανεπάρκειας και ενός περιορισμένου αλλά υπαρκτού κινδύνου εμφράγματος του μυοκαρδίου. Παράλληλα, καταγράφονται δερματικές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως έλκη και εξανθήματα, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να έχουν ως επιπλοκή σοβαρές λοιμώξεις ή να συνοδεύονται από αιμορραγικά επεισόδια.

Πέραν των μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα πρωτεϊνικά μόρια γενικότερα εκδηλώνουν μια εγγενή τάση για διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες δύνανται να οδηγήσουν στον σχηματισμό ολιγομερών ή πολυμερών δομών. Οι δομές αυτές ενδέχεται να οργανώνονται είτε σε υψηλού βαθμού τάξης ινιδιακά συσσωματώματα, όπως τα

αμυλοειδή ινίδια, είτε σε ορισμένα άμορφα, σφαιρικά συσσωματώματα. Τα προαναφερθέντα συσσωματώματα μέσω τεχνικών όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία μπορεί να είναι ορατά ή ημι-ορατά καταλήγοντας συχνά στον σχηματισμό ινιδίων ή ιζημάτων (Agrawal et al., 2011). Στο πλαίσιο αυτό, έχει αναπτυχθεί εκτενής ερευνητική δραστηριότητα με στόχο τη διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και τη συσσωμάτωση των μονοκλωνικών αντισωμάτων, προκειμένου να κατανοηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα, τη βιοδιαθεσιμότητα και την ανοσογονικότητά τους.

3.11 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η σύγχρονη βιοτεχνολογική έρευνα έχει επικεντρωθεί στη στοχευμένη τροποποίηση των αντισωμάτων, με στόχο τη βελτιστοποίηση κρίσιμων βιολογικών και φαρμακολογικών χαρακτηριστικών τους. Οι στρατηγικές βελτίωσης εστιάζουν κυρίως σε τρεις άξονες.

Ο πρώτος άξονας αναφέρεται στην ελαχιστοποίηση της ανοσογονικότητας. Η ανάπτυξη χιμαιρικών, εξανθρωποποιημένων και πλήρως ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) αποτέλεσε καθοριστικό βήμα προς την κατεύθυνση αυτή, περιορίζοντας την πιθανότητα ανεπιθύμητων ανοσολογικών αντιδράσεων και αυξάνοντας την κλινική τους ασφάλεια (Piggee, 2008).

Ο δεύτερος άξονας σχετίζεται με την ενίσχυση της συγγένειας δέσμευσης μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος. Η αυξημένη συγγένεια δύναται να βελτιώσει τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες των αντισωμάτων, επιτρέποντας αποτελεσματικότερη δράση ακόμη και σε χαμηλότερες δόσεις (Nissim & Chernajovsky, 2008). Φυσιολογικά, η επαναλαμβανόμενη έκθεση σε ένα αντιγόνο οδηγεί σε παραγωγή αντισωμάτων που εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια, μέσω της διαδικασίας της ωρίμανσης συγγένειας (affinity maturation). Τα αντισώματα που προκύπτουν από διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα υφίστανται αυτή τη διαδικασία *in vivo*, σε αντίθεση με εκείνα που η παραγωγή τους γίνεται αποκλειστικά σε κυτταρικές καλλιέργειες. Γι αυτό τον λόγο, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές κατευθυνόμενης εξέλιξης, οι οποίες περιλαμβάνουν στοχευμένες μεταλλάξεις στις μεταβλητές περιοχές των ανοσοσφαιρινών, διατηρώντας παράλληλα την εξειδίκευση ως προς το αντιγόνο. Μεταξύ των προσεγγίσεων αυτών συγκαταλέγονται η τροποποίηση της μεταβλητής περιοχής της ελαφράς αλυσίδας, αφήνοντας ανέπαφη την βαριά αλυσίδα και δημιουργώντας βιβλιοθήκες ανοσοσφαιρινών με ποικίλες αμινοξικές αντικαταστάσεις.

Ο τρίτος άξονας βελτιστοποίησης επικεντρώνεται στη σταθερή περιοχή Fc του αντισώματος, η οποία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον χρόνο ημίσειας ζωής, στη βιοκατανομή και στις εκτελεστικές ανοσολογικές λειτουργίες (όπως η ενεργοποίηση

του συμπληρώματος και η κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα). Η τροποποίηση της αμινοξικής σύστασης της περιοχής Fc, καθώς και των γλυκοζυλιώσεων που τη συνοδεύουν, αποτελεί βασική στρατηγική για τη ρύθμιση της σταθερότητας, της αποτελεσματικότητας και του ανοσολογικού προφίλ των θεραπευτικών αντισωμάτων (Piggee, 2008).

Συνολικά, η βελτιστοποίηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων συνιστά μια πολυπαραγοντική διαδικασία, η οποία συνδυάζει τεχνικές μοριακής μηχανικής και πρωτεϊνικού σχεδιασμού με στόχο την παραγωγή ασφαλέστερων και περισσότερο αποτελεσματικών βιοθεραπευτικών παραγόντων.

4. ΚΡΙΣΙΜΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας (Critical Quality Attributes, CQAs) αποτελούν μια παράμετρο αξιολόγησης βιοφαρμακευτικών προϊόντων (θεραπευτικών πρωτεϊνών και μονοκλωνικών αντισωμάτων). Σύμφωνα με διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ποιότητας ορίζονται ως φυσικές, χημικές, βιολογικές ή μικροβιολογικές ιδιότητες οι οποίες είναι αναγκαίο να είναι εντός κάποιων επιτρεπτών προκαθορισμένων ορίων στοχεύοντας στην διασφάλιση ποιότητας, κλινικής αποτελεσματικότητας, σταθερότητας και ασφάλειας ενός προϊόντος. Τα CQAs αποτελούν το πρώτο και πιο καθοριστικό βήμα στην προσέγγιση QbD (ποιότητα μέσω σχεδιασμού) η οποία αποτελεί μια νέα προσέγγιση στην ανάπτυξη θεραπευτικών πρωτεϊνών, προάγοντας την πλήρη κατανόηση ενός προϊόντος καθώς και της διαδικασίας παρασκευής του.

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας που παρατηρούνται γενικά στις βιοφαρμακευτικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των ακαθαρσιών και ουσιών που σχετίζονται με το προϊόν, των ακαθαρσιών που σχετίζονται με τη διαδικασία, των χαρακτηριστικών του προϊόντος και των ρύπων, αξιολογούνται ένα προς ένα για τον αντίκτυπό τους στη βιολογική δραστηριότητα, στο φαρμακοκινητικό και στο φαρμακοδυναμικό προφίλ, στην ανοσογονικότητα και στο συνολικό προφίλ ασφάλειας και τοξικότητας.

4.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ CQAs ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

4.1.1 ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ (IDENTITY)

Οι πρωτοταγείς και οι ανώτερης τάξης δομές είναι μια αλληλουχία αμινοξέων και μια μοναδική αναδίπλωση της πρωτεΐνης, αντίστοιχα, αποτελώντας μάλιστα ποιοτικά

χαρακτηριστικά που υποδεικνύουν την ταυτότητα της πρωτεΐνης. Με σκοπό την διασφάλιση αποτελεσματικότητας και ασφάλειας καθώς και για την αποφυγή λαθών κατά την παραγωγή, απαιτείται η σωστή ταυτότητα (αλληλουχία και αναδίπλωση) θεραπευτικών πρωτεϊνών (Maas et al., 2007).

4.1.1.1 ΠΡΩΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ

Η πρωτοταγής δομή των θεραπευτικών πρωτεϊνών αποτελεί βασική παράμετρο για την ταυτοποίησή και επιτυγχάνεται μέσω τεχνικών φασματομετρίας μάζας (LC-MS). Με την αξιοποίηση των συγκεκριμένων τεχνικών, γίνεται ακριβής προσδιορισμός της μοριακής μάζας καθώς επίσης ανιχνεύονται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έπειτα από ανάλυση του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z). Η τεχνική LC-MS/MS αξιοποιείται με σκοπό την υψηλή εξειδίκευση χαρτογράφηση πεπτιδίων (peptide mapping) συμβάλλοντας παράλληλα και στην επιβεβαίωση της αμινοξικής αλληλουχίας.

Συμπληρωματικά για την επιβεβαίωση ταυτότητας σύμφωνα με φυσικοχημικές ιδιότητες, χρησιμοποιούνται μέθοδοι ανάλυσης όπως η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPLC), η ισοηλεκτρική εστίαση (IEF), η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEX), η ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE, CZE) και η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC). Επιπλέον για τη χαρτογράφηση πεπτιδίων γίνεται χρήση της μεθόδου LC-UV, παρέχοντας το «αποτύπωμα» της πρωτεΐνης. Συνοπτικά λοιπόν, οι παραπάνω τεχνικές προσφέρουν αξιόπιστη και ολοκληρωμένη επιβεβαίωση της ταυτότητας των θεραπευτικών πρωτεϊνών (Limpikirati et al., 2024).

4.1.1.2 ΑΝΩΤΕΡΗ ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (HOS)

Η ανώτερη δομή των θεραπευτικών πρωτεϊνών (Higher-Order Structure, HOS) αποτελεί κρίσιμο χαρακτηριστικό ποιότητας που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη σταθερότητα και τη βιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών. Έτσι ώστε να επιτευχθεί χαρακτηρισμός της HOS, χρησιμοποιούνται διάφορες φασματοσκοπικές και θερμικές τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD) και η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) για χαρακτηρισμό δευτεροταγούς δομής, καθώς και η φθορισμομετρία και η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού στο εγγύς υπεριώδες (Near-UV CD) για χαρακτηρισμό τριτοταγούς δομής. Επιπλέον, τεχνικές υψηλής ανάλυσης, όπως η φασματοσκοπία NMR και η φασματομετρία μάζας ανταλλαγής υδρογόνου-δευτερίου (HDX-MS), παρέχουν πληροφορίες για δομικές μεταβολές.

4.1.2 ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ (PURITY AND IMPURITIES)

Σε αντίθεση με τα μικρομοριακά φάρμακα, οι θεραπευτικές πρωτεΐνες συναντώνται σε αρκετές παραλλαγές όπως παραλλαγές μεγέθους, φορτίου και μετα-μεταφραστικές

παραλλαγές-τροποποιήσεις (PTMs). Το ICH Q6B ταξινομεί τις παραλλαγές που σχετίζονται με ένα θεραπευτικό μόριο σε ουσίες και ακαθαρσίες που σχετίζονται με το προϊόν (ICH, 1999). Οι ουσίες αυτές ονομάζονται μοριακές παραλλαγές του επιθυμητού θεραπευτικού οι οποίες είναι δραστικές και δεν έχουν επιβλαβή επίδραση στην ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα (Xu et al., 2019), π.χ. ορισμένες παραλλαγές φορτίου και γλυκάνης. Οι ακαθαρσίες είναι μοριακές παραλλαγές των οποίων τα προφίλ αποτελεσματικότητας και ασφάλειας δεν είναι συγκρίσιμα με εκείνα του επιθυμητού θεραπευτικού (Xu et al., 2019). Παραδείγματα είναι οι πρόδρομες ουσίες (προπρωτεΐνες), τα είδη υψηλού μοριακού βάρους και τα προϊόντα αποικοδόμησης. Οι ακαθαρσίες περιγράφονται ως οποιοδήποτε συστατικό που δεν είναι η χημική οντότητα που ορίζεται για μια πρώτη ύλη και ένα συστατικό σκευάσματος, και δεν έχει θεραπευτικό όφελος και μπορεί να ενέχει κινδύνους για τοξικότητα και δυσμενή επίδραση στη σταθερότητα του φαρμάκου. Εκτός από τις ακαθαρσίες που σχετίζονται με το προϊόν, οι «ακαθαρσίες που σχετίζονται με τη διαδικασία» προέρχονται από τις διαδικασίες παρασκευής (Xu et al., 2019). Παραδείγματα είναι τα κυτταρικά υποστρώματα (π.χ., πρωτεΐνες κυττάρου ξενιστή (HCPs), DNA κυττάρου ξενιστή), η κυτταροκαλλιέργεια (π.χ., επαγωγείς, αντιβιοτικά ή συστατικά μέσου) και η επεξεργασία (π.χ. πρωτεΐνη A).

Η καθαρότητα και οι ακαθαρσίες συνήθως προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό μεθόδων, καθώς είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η απόλυτη καθαρότητα των θεραπευτικών πρωτεϊνών και τα αναλυτικά αποτελέσματα εξαρτώνται από τη μέθοδο, συγκεκριμένα το μέγεθος, το φορτίο και τις παραλλαγές PTMs (Xu et al., 2019). Οι ακαθαρσίες των θεραπευτικών πρωτεϊνών αποτελούν τα πιο δύσκολα χαρακτηριστικά ποιότητας που πρέπει να καθοριστούν στις προδιαγραφές.

4.1.2.1 ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ (SIZE VARIANTS)

Οι παραλλαγές μεγέθους ανήκουν στην κατηγορία προσμίξεων θεραπευτικών πρωτεϊνών, περιλαμβάνοντας μορφές που έχουν μοριακό βάρος που διαφοροποιείται από το αναμενόμενο και διαχωρίζονται σε προϊόντα που έχουν υψηλό μοριακό βάρος (high molecular weight, HMW) και σε αυτά με χαμηλό μοριακό βάρος (low molecular weight, LMW).

Τα είδη HMW περιλαμβάνουν ολιγομερή πρωτεϊνών και συσσωματώματα τα οποία έχουν προκύψει είτε από λανθασμένη αναδίπλωση είτε από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Τα συσσωματώματα (aggregates) είναι αποτέλεσμα ομοιοπολικών ή μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, που σχηματίζονται στο στάδιο της παραγωγής, του καθαρισμού ή της αποθήκευσης και συνδέονται με υψηλό κίνδυνο ανοσογονικότητας καθώς και ελάττωση της βιολογικής δραστηριότητας (Maas et al., 2007; Rosenberg, 2006). Τα προϊόντα LMW σχηματίζονται λόγω χημικής αστάθειας ή πρωτεολυτικής αποικοδόμησης προκαλώντας μεταβολές στην δομική ακεραιότητα και

στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης (Xu et al., 2019; Ambrogelly et al., 2018; Beck et al., 2013).

Η εκτίμηση παραλλαγών μεγέθους είναι σημαντική προδιαγραφή ποιότητας. Στον χαρακτηρισμό παραλλαγών μεγέθους χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως η χρωματογραφία SEC (χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους), η ηλεκτροφόρηση CE-SDS (τριχοειδής ηλεκτροφόρηση με δωδεκυλοθειικό νάτριο) και η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου), οι οποίες προσφέρουν αξιόπιστα αποτελέσματα όσον αφορά το μέγεθος της πρωτεΐνης με προσιτό κόστος. Η SEC χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση προϊόντων HMW, καθώς διεξάγεται σε φυσικές συνθήκες που βοηθούν στη διατήρηση μη ομοιοπολικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, ενώ η CE-SDS, η οποία έχει υψηλότερη ανάλυση μεγέθους, είναι κατάλληλη για την ανάλυση προϊόντων LMW (Limpikirati et al., 2024).

Ο έλεγχος μάλιστα των παραλλαγών αυτών έχει μεγάλη σημασία καθώς επιδρούν στη σταθερότητα, στην ασφάλεια και στην αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών πρωτεϊνών.

4.1.2.2 ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΦΟΡΤΙΟΥ (CHARGE VARIANTS)

Οι παραλλαγές φορτίου αντικατοπτρίζουν μεταβολές στο ηλεκτρικό φορτίο των θεραπευτικών πρωτεϊνών και είναι αποτέλεσμα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και χημικών μεταβολών (Limpikirati et al., 2024). Οι παραλλαγές φορτίου είναι υπαίτιες για μεταβολή φυσικοχημικών ιδιοτήτων, βιολογικής δραστηριότητας, σταθερότητας και φαρμακοκινητικής συμπεριφοράς των θεραπευτικών πρωτεϊνών. Επομένως η αξιολόγηση τους αποτελεί ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό ποιοτικών χαρακτηριστικών (CQAs).

Αναλόγως των μεταβολών που υφίσταται το ηλεκτρικό φορτίο διαχωρίζονται σε όξινες (χαμηλότερο ισοηλεκτρικό φορτίο από την κύρια πρωτεΐνη) και βασικές παραλλαγές (υψηλότερο ισοηλεκτρικό φορτίο από την κύρια πρωτεΐνη).

Στον χαρακτηρισμό παραλλαγών φορτίου χρησιμοποιούνται τεχνικές που επιτρέπουν τον διαχωρισμό βάσει ισοηλεκτρικού σημείου (pI) ή βάσει καθαρού φορτίου όπως η χρωματογραφία IEX (χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής) (Bailey et al., 2018; Navas et al., 2020) και η τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (cIEF) (Lee et al., 2023; Wang et al., 2022).

Ο έλεγχος μάλιστα των παραλλαγών αυτών έχει μεγάλη σημασία καθώς επιδρούν στη σταθερότητα των θεραπευτικών πρωτεϊνών διασφαλίζοντας ομοιογένεια και ποιότητα παραγόμενου προϊόντος.

4.1.2.3 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ (PTMs)

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συγκαταλέγονται ως ένα από τα πιο σημαντικά κρίσιμα ποιοτικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν οι θεραπευτικές πρωτεΐνες. Πρόκειται για τροποποιήσεις που επηρεάζουν τη δομή, τη βιολογική δραστηριότητα, την ασφάλεια και την σταθερότητα των βιοφαρμακευτικών προϊόντων, με τρόπο που μέσω συγκεκριμένων συνθηκών αποθήκευσης και επεξεργασίας τις καθιστούν επιρρεπείς σε δημιουργία συσσωματωμάτων καθώς επίσης και ευάλωτες σε αποικοδόμηση.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων αποτελούν η γλυκοζυλίωση, η απαμίνωση, η φωσφορυλίωση, η οξείδωση, η ισομερίωση καθώς και η αποκοπή πεπτιδικών τμημάτων. Η γλυκοζυλίωση μάλιστα αποτελεί κρίσιμη τροποποίηση που επηρεάζει καθοριστικά το φαρμακοκινητικό προφίλ και την ανοσογονικότητα (Delobel, 2021; Rosenberg, 2006). Αντιστοίχως, η οξείδωση πιθανόν να επιφέρει μεταβολές στη δομή και στη λειτουργικότητα μιας πρωτεΐνης και η απαμίνωση αλλαγές στη διαμόρφωση μιας θεραπευτικής πρωτεΐνης.

Επιπλέον, οι PTMs εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες καλλιέργειας, αποθήκευσης και επεξεργασίας καθώς και από τις διαδικασίες καθαρισμού, γεγονός που καθιστά αναγκαίο τον ενδελεχή έλεγχο όσον αφορά την διασφάλιση ποιότητας.

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών PTMs είναι ένα πολύ σημαντικό, αν και δύσκολο έργο στην πρωτεωμική. Οι τροποποιήσεις πρωτεϊνών όπως η φωσφορυλίωση και η γλυκοζυλίωση έχουν αποδειχθεί δύσκολο να διερευνηθούν με τρόπο ρουτίνας. Η τεχνική υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα πετυχημένη και αποδοτική μέθοδος (Boersema et al., 2008).

4.1.2.4 ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗ (AGGREGATION)

Η συσσωμάτωση αποτελεί κρίσιμο ποιοτικό χαρακτηριστικό των θεραπευτικών πρωτεϊνών καθώς συνδέεται άμεσα με την σταθερότητα, το προφίλ ασφάλειας, την αποδοτικότητα των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, ο όρος συσσωμάτωση συνδέεται με τον σχηματισμό δομών που παρουσιάζουν υψηλότερο μοριακό βάρος μέσω σχηματισμού αλληλεπιδράσεων είτε ομοιοπολικών είτε μη ομοιοπολικών, προκύπτοντας έτσι διμερή, ολιγομερή καθώς και αδιάλυτες μορφές.

Αναφορικά με τους μηχανισμούς σχηματισμού συσσωμάτωσης οι κυριότεροι εξ αυτών είναι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (ηλεκτροστατικές δυνάμεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) και ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (μέσω δισουλφιδικών δεσμών και οξειδωτικών αλληλεπιδράσεων).

Παράλληλα, παράγοντες που συμβάλλουν στη δημιουργία συσσωματωμάτων αποτελούν οι διάφορες μεταβολές θερμοκρασίας και pH καθώς επίσης και διάφορες προσμίξεις και μηχανικές καταπονήσεις (κατάψυξη-απόψυξη).

Μέσω της συσσωμάτωσης επέρχονται επιπτώσεις όσον αφορά την ποιότητα ενός φαρμακευτικού προϊόντος. Συγκεκριμένα πιθανόν να προκαλεί ελάττωση της βιολογικής δραστηριότητας, αύξηση του κινδύνου ανοσογονικότητας καθώς επίσης ενδέχεται να επηρεάζει και το φαρμακοκινητικό προφίλ.

4.1.3 ΔΟΜΙΚΗ ΑΚΕΡΑΙΟΤΗΤΑ (STRUCTURAL INTEGRITY)

Η δομική ακεραιότητα είναι ίσως το πλέον θεμελιώδες κρίσιμο ποιοτικό χαρακτηριστικό γιατί μέσω της τρισδιάστατης διαμόρφωσης καθορίζεται η βιολογική λειτουργία των θεραπευτικών πρωτεϊνών. Στην πραγματικότητα το συγκεκριμένο ποιοτικό χαρακτηριστικό συνδέει μεταξύ τους τα υπόλοιπα κρίσιμα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Αποτελεί μάλιστα ένα χαρακτηριστικό άμεσα συνδεδεμένο με την θεραπευτική δράση, την σταθερότητα και την ασφάλεια των θεραπευτικών πρωτεϊνών.

Μεταβολές σε κάποιο από τα κρίσιμα ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως στη συσσωμάτωση ή στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συμβάλλει σε τροποποίηση της διαμόρφωσης μιας πρωτεΐνης με συνέπεια, η σταθερότητα όσον αφορά την διαμόρφωση να χαρακτηρίζεται αναγκαία για τον έλεγχο ποιότητας και αποτελεσματικότητας. Ταυτόχρονα η βιολογική δραστηριότητα συμπληρώνει τη δομική ακεραιότητα καθώς μπορεί να θεωρηθεί ως λειτουργική ακεραιότητα μιας πρωτεΐνης.

4.1.4 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ (STABILITY)

Η σταθερότητα αποτελεί βασικό CQA μιας θεραπευτικής πρωτεΐνης καθώς αναφέρεται στην διατήρηση φυσικοχημικών, βιολογικών αλλά και λειτουργικών χαρακτηριστικών στην διάρκεια παραγωγής, επεξεργασίας, αποθήκευσης και χορήγησης του προϊόντος. Μάλιστα η εξασφάλιση της σταθερότητας είναι αναγκαία καθώς επηρεάζει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια ενός προϊόντος.

4.1.4.1 ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Αποαμίδωση (Deamidation)

Η αποαμιδίαση συγκαταλέγεται στις χημικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα στις θεραπευτικές πρωτεΐνες. Πρόκειται για μια μη ενζυμική αντίδραση καταλοίπων ασπαραγίνης τα οποία μετατρέπονται σε ασπαρτικό ή γλουταμινικό οξύ. Μέσω της συγκεκριμένης τροποποίησης και λόγω μεταβολών στο φορτίο και στη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης επηρεάζεται η δομή και η βιολογική δραστηριότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Adav, 2025).

Οξείδωση (Oxidation)

Η οξείδωση αποτελεί χημική αντίδραση στην οποία επηρεάζονται κυρίως τα αμινοξέα μεθειονίνη και τρυπτοφάνη. Παράγοντες όπως έκθεση στο φως και συνθήκες αποθήκευσης επιταχύνουν την διαδικασία. Μέσω οξείδωσης επηρεάζονται οι πρωτεΐνες σε πολλαπλά επίπεδα προκύπτοντας μεταβολές στη σταθερότητα της τριτοταγούς δομής και απώλεια της δραστηριότητας (Schöneich, 2022).

Γλυκοζυλίωση και γλυκοξείδωση

Η γλυκοζυλίωση και η γλυκοξείδωση είναι μηχανισμοί χημικής αποικοδόμησης θεραπευτικών πρωτεϊνών οι οποίες προκαλούν αλλοιώσεις στη δομή των βιολογικών φαρμάκων, επηρεάζουν την βιολογική δραστηριότητα αλλά και την ανοσογονικότητα και τον χρόνο ημίσειας ζωής.

Πρωτεολυτικός κατακερματισμός

Ο πρωτεολυτικός κατακερματισμός αποτελεί μορφή χημικής αποικοδόμησης και ταξινομείται κυρίως σε ενζυμικό και σε μη ενζυμικό. Ο κατακερματισμός μπορεί να δημιουργήσει θραύσματα με διαφορετικά μοριακά βάρη και έτσι να επιφέρει συνέπειες στην δραστηριότητα, στην λειτουργικότητα, στην ανοσογονικότητα και στην αλλαγή φαρμακοκινητικής μιας θεραπευτικής πρωτεΐνης.

4.1.4.2 ΦΥΣΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Συσσωμάτωση (Aggregation)

Η συσσωμάτωση αποτελεί το πιο συχνό φαινόμενο φυσικής αποικοδόμησης συμβάλλοντας στην αποσταθεροποίηση των θεραπευτικών πρωτεϊνών. Υπάρχουν τα διαλυτά συσσωματώματα τα οποία έχουν μικρό μέγεθος και είναι ορατά με γυμνό μάτι και τα αδιάλυτα συσσωματώματα τα οποία είναι μεγάλες πρωτεΐνες με τάση να καθιζάνουν. Οι συσσωματωμένες μορφές έχουν ως άμεση επίδραση την μείωση της αποτελεσματικότητας και την αύξηση της ανοσογονικότητας.

Καθίζηση (Precipitation)

Η καθίζηση προκύπτει ως το τελευταίο στάδιο εκτεταμένης συσσώρευσης. Στην πραγματικότητα τα αδιάλυτα συσσωματώματα είναι τόσο μεγάλα που πλέον δεν υφίσταται η αιώρησή τους, μειώνεται η διαλυτότητά τους και έτσι σχηματίζεται ένα ίζημα προσδίδοντας θολερότητα στο διάλυμα. Κατά αυτό τον τρόπο επηρεάζεται κυρίως η ομοιομορφία του προϊόντος.

Αποδιάταξη (Denaturation)

Η αποδιάταξη επέρχεται λόγω εξωτερικού στρες όπως παράδειγμα λόγω μεταβολών θερμοκρασίας, pH ή μηχανικής καταπόνησης. Οι δεσμοί σπάνε και η διαμόρφωση της πρωτεΐνης τροποποιείται μερικώς ή πλήρως με αποτέλεσμα μείωση βιολογικής δραστηριότητας και αποσταθεροποίησης του μορίου.

4.1.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ (POTENCY)

Η βιολογική δραστηριότητα αποτελεί βασικό CQA των θεραπευτικών πρωτεϊνών, αποτελώντας μάλιστα αναπόσπαστο μέρος των προδιαγραφών ποιότητας. Η δραστηριότητα αντανακλά επίσης τη βιολογική λειτουργία της θεραπευτικής πρωτεΐνης και σχετίζεται άμεσα με τον μηχανισμό δράσης της αποτελώντας βασική προϋπόθεση για την κλινική αποτελεσματικότητα.

Βιολογικές δοκιμασίες (bioassays) συνεισφέρουν στην αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας και πρέπει να έχουν υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία με σκοπό την ανίχνευση ακόμα και ανεπαίσθητων αλλαγών στη δραστηριότητα. Διακρίνονται σε δοκιμασίες σύνδεσης (binding assays), πχ Elisa και συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (SPR) υπεύθυνες για την εκτίμηση της συγγένειας δέσμευσης με τον στόχο και σε λειτουργικές δοκιμασίες (functional assays) πχ κυτταροβιολογικές δοκιμές υπεύθυνες για τον μηχανισμό δράσης (Limpikirati et al., 2024).

Για πιο πολύπλοκες θεραπευτικές πρωτεΐνες όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα, η αξιολόγηση της δραστηριότητας είναι πιο περίπλοκη λόγω πολλαπλών μηχανισμών δράσης (Dash et al., 2021; Goulet, & Atkins 2020; White et al., 2019) γεγονός που καθιστά αναγκαίο τον σχεδιασμό κατάλληλων βιοδοκιμασιών.

Η βιολογική δραστηριότητα συνδέεται με την HOS καθώς μεταβολές που επηρεάζουν τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών πιθανόν άμεσα να επηρεάζουν και τη λειτουργικότητά τους. Επομένως, οι βιοδοκιμασίες μπορούν να παρέχουν ένδειξη για την δομική ακεραιότητα μιας πρωτεΐνης. Γενικά, λόγω του ότι οι βιολογικές δοκιμασίες υπόκεινται σε ευρύτερο φάσμα παραλλαγών από αυτό των φυσικοχημικών δοκιμών (Dash et al., 2021; White et al., 2019), απαιτούν επικύρωση της καταλληλότητάς τους. Εάν μια μεταβλητότητα επηρεάζει την αξιοπιστία της δοκιμής ισχύος, ενδέχεται να χρειαστούν περαιτέρω φυσικοχημικές δοκιμές για να δοθεί μια επιπλέον επιβεβαίωση σχετικά με την δομή και την δραστηριότητα.

4.1.6 ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ (IMMUNOGENICITY)

Η ανοσογονικότητα αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό κρίσιμο ποιοτικό χαρακτηριστικό που συνδέεται με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα μιας πρωτεΐνης. Αντικατοπτρίζει την ικανότητα πρόκλησης ανεπιθύμητης ανοσολογικής απόκρισης η οποία οδηγεί σε παραγωγή αντισωμάτων έναντι του φαρμάκου (ADAs, anti-drug antibodies).

Η ανοσογονικότητα επηρεάζεται άμεσα από άλλα κρίσιμα ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως η συσσωμάτωση, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και οι δομικές τροποποιήσεις μιας πρωτεΐνης. Επομένως, απαιτείται έλεγχος και αξιολόγηση σε συστηματικό επίπεδο ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα των θεραπευτικών πρωτεϊνών.

5. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η κατανόηση και ο προσδιορισμός σε βάθος των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας (CQAs) των θεραπευτικών πρωτεϊνών επιτυγχάνονται μέσω εφαρμογής αναλυτικών τεχνικών. Πιο συγκεκριμένα για την διασφάλιση ποιότητας, αποτελεσματικότητας αλλά και ασφάλειας κατά την διαδικασία παραγωγής θεραπευτικών αντισωμάτων και πρωτεϊνών συμβάλλουν καθοριστικά οι αναλυτικές τεχνικές χαρακτηρισμού, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται αποκρυπτογράφηση των δομικών, ρυθμιστικών και λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών. Οι αναλυτικές μέθοδοι στις οποίες συμπεριλαμβάνονται χρωματογραφικές, ηλεκτροφορητικές, φασματοσκοπικές και ηλεκτροχημικές μέθοδοι, αξιοποιούνται με σκοπό να προσδιορίζονται η καθαρότητα, η ομοιογένεια, η σταθερότητα και η δραστηριότητα των πρωτεϊνών, αποτελώντας μάλιστα τον κυρίαρχο πυλώνα στην φαρμακευτική ανάπτυξη και στον ποιοτικό έλεγχο των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Με σκοπό να επιλεγεί η καταλληλότερη αναλυτική τεχνική χρειάζεται πλήρης γνώση των υπό αξιολόγηση CQAs.

5.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Αναφορικά με τις χρωματογραφικές μεθόδους, διαχωρίζουν τα συστατικά μεταξύ δύο φάσεων σύμφωνα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες (ουβικιτίνωση, γλυκοζυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, μεθυλίωση) δημιουργούν παραλλαγές οι οποίες διαχωρίζονται με ευκολία (Černý et al., 2013).

5.1.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (RPLC)

Η RPLC είναι μια από τις κοινές τεχνικές που έχει πολύ καλή ανάλυση στην αξιολόγηση των πρωτεϊνικών παραλλαγών που προκύπτουν από διαφορετικές χημικές αντιδράσεις ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι παραλλαγές αυτές ακόμα και σε μικρή ποσότητα ευθύνονται για σημαντικές δομικές και βιολογικές τροποποιήσεις, συμβάλλοντας σε μείωση της δραστηριότητας των πρωτεϊνών.

Η εφαρμογή και ο συνδυασμός τεχνικών RPLC-MS (φασματομετρία μάζας) επιτρέπει τον διαχωρισμό υπομονάδων αντισωμάτων, όπως ελαφρών και βαριών αλυσίδων ή περιοχών Fab και Fc, καθώς επίσης και ανίχνευση ειδικών χημικών μεταβολών (απαμίνωση, ισομερίωση, οξείδωση), συμβάλλοντας σημαντικά στην αξιολόγηση της ποιοτικής και ποσοτικής ετερογένειας των mAbs (Yan et al., 2007). Η RPLC, ως υποκατηγορία της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), βασίζεται σε αντιστροφή της πολικότητας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης σε σχέση με τη συμβατική κανονική φάση. Η συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της ευελιξίας στον διαχωρισμό κάθε είδους ουσίας που πρόκειται να αναλυθεί.

Παραδοσιακά, η ανάλυση θεραπευτικών mAbs με RPLC πραγματοποιείται σε σχετικά αυστηρές συνθήκες, όπως υψηλές θερμοκρασίες (80-90°C) και αυξημένες συγκεντρώσεις οργανικών τροποποιητών, ωστόσο μέσω αξιοποίησης υλικών στατικής φάσης η ανάλυση πραγματοποιείται σε ηπιότερες συνθήκες, βελτιώνοντας την ευαισθησία ανίχνευσης και μειώνοντας την πιθανότητα δημιουργίας τεχνητών προϊόντων αποικοδόμησης (Bobaly et al., 2018). Σε περιπτώσεις μελέτης της σταθερότητας πρωτεϊνών, ο συνδυασμός της RPLC με ανιχνευτές σκέδασης φωτός πολλαπλών γωνιών παρέχει πληροφορίες για τη μοριακή μάζα και τη σύσταση κάθε χρωματογραφικής κορυφής, ενισχύοντας τον χαρακτηρισμό μονομερών μορφών, συσσωματωμάτων και θραυσμάτων.

Ο πλήρης χαρακτηρισμός της πρωτεϊνικής αλληλουχίας μέσω χαρτογράφησης πεπτιδίων δεν είναι πάντοτε εφικτός, γιατί τα υδρόφιλα από την φύση τους πεπτίδια, σε ορισμένες περιπτώσεις, δύναται να παρουσιάσουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τη στήλη, περιορίζοντας έτσι την απόδοση της RPLC-MS (Whitmore & Gennaro, 2012).

5.1.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΓΕΘΩΝ (SEC)

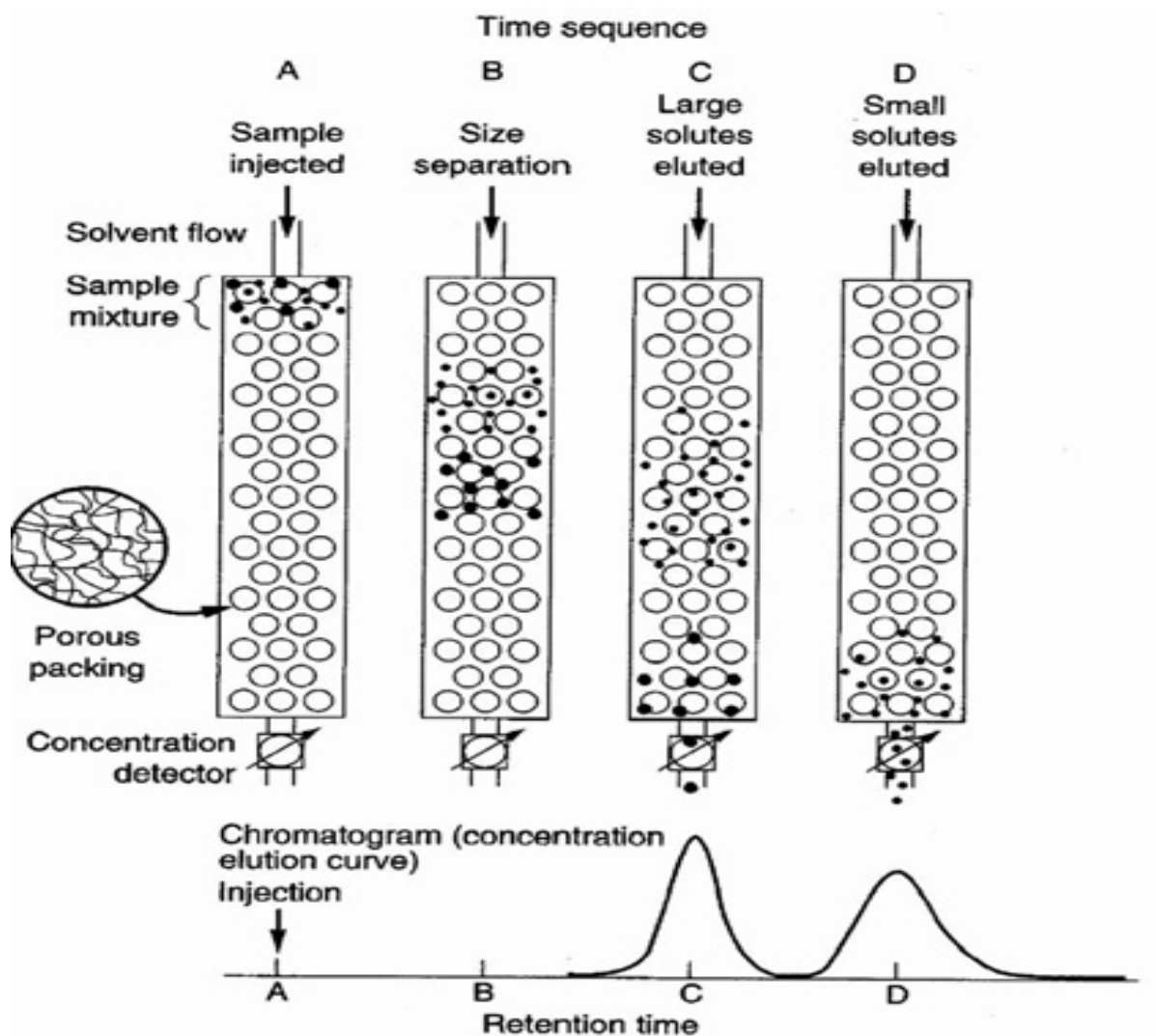
Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (Size Exclusion Chromatography, SEC) αποτελεί βασική τεχνική για τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό των θεραπευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων από προσμίξεις που σχετίζονται με διαφοροποιήσεις στο μοριακό τους μέγεθος και δυνητικά μπορούν να επηρεάσουν την ασφάλεια και την ανοσογονικότητα των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Η τεχνική βασίζεται στη διέλευση των μορίων μέσω πορώδους στατικής φάσης, όπου τα μεγαλύτερα μόρια

εκλούνται ταχύτερα, ενώ μικρότερα μόρια εισέρχονται στους πόρους και εκλούνται σε μεταγενέστερο χρόνο (Huang et al., 2018). Η διαχωριστική ικανότητα της στήλης συνδέεται αναλογικά με την τετραγωνική ρίζα του μήκους της στήλης, γεγονός που εξηγεί την ανάγκη στηλών μεγάλου μήκους σε περιπτώσεις πολύπλοκων δειγμάτων (Hong et al., 2012).

Στη βιοφαρμακευτική παραγωγή, η SEC χρησιμοποιείται ευρέως για τον ποιοτικό έλεγχο των αντισωμάτων, δεδομένου ότι απαιτούνται ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα καθαρότητας για τη θεραπευτική τους εφαρμογή. Η απόδοση της ανάλυσης (χρονική διάρκεια και ακρίβεια) επηρεάζεται από παραμέτρους όπως η ροή της κινητής φάσης, το φορτίο δείγματος και το μήκος της στήλης, ενώ η αύξηση του μήκους της στήλης συνδέεται με βελτιωμένη ικανότητα διαχωρισμού (Hong et al., 2012; Huang et al., 2018). Πρόσφατες εξελίξεις περιλαμβάνουν τη χρήση στηλών μικρότερης διαμέτρου και μικρότερων σωματιδίων πλήρωσης, ενισχύοντας την ανάλυση προκαλώντας όμως ταυτόχρονα υψηλές πιέσεις και πιθανή υποβάθμιση των δειγμάτων (Fekete et al., 2013b).

Η σύζευξη της SEC με πολλαπλούς ανιχνευτές, όπως υπεριώδη (UV), δείκτη διάθλασης (RI), ιξωδόμετρο (IV) και σκέδαση φωτός πολλαπλών γωνιών (MALS), συμβάλλει στον χαρακτηρισμό της μοριακής μάζας, της σύστασης και της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών (Hong et al., 2012). Επιπλέον, η ανάπτυξη της μεθόδου χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους υπερυψηλής πίεσης (SE-UHPLC), προσφέρει βελτιωμένη απόδοση, βελτιωμένη ανάλυση και ταχύτερο διαχωρισμό, καθιστώντας τη μέθοδο κατάλληλη για εφαρμογές σε σύγχρονα εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου (Yang et al., 2015).

Η ανάλυση νέων, πιο πολύπλοκων βιοθεραπευτικών προϊόντων όπως διειδικά αντισώματα, συζεύγματα αντισώματος-φαρμάκου (ADCs) και υδρόφοβες πρωτεΐνες απαιτεί προσαρμογή των συνθηκών ανάπτυξης και εκτέλεσης της SEC, συμπεριλαμβανομένης της τροποποίησης της κινητής φάσης ή της χρήσης πολλαπλών στηλών σε σειρά για αποτελεσματικότερο και ταχύτερο διαχωρισμό (Arakawa et al., 2010; Fekete et al., 2013b). Ωστόσο, η τεχνική παρουσιάζει περιορισμούς όταν πρόκειται για πρωτεΐνες με παρόμοια μεγέθη. Σε τέτοιες περιπτώσεις η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία (IEX), κρίνεται καταλληλότερη κυρίως εάν έχουν διαφορετικό ισοηλεκτρικό σημείο (Du et al., 2012).



Εικόνα 18: Τρόπος διαχωρισμού πρωτεϊνών στη SEC (Yau et al., 1979).

5.1.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ (IEX)

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (Ion Exchange Chromatography, IEX) αποτελεί τεχνική για τον καθαρισμό και τον αναλυτικό χαρακτηρισμό θεραπευτικών πρωτεϊνών (με διαφορετικό ηλεκτρικό φορτίο) βασιζόμενη σε αλληλεπιδράσεις (ηλεκτροστατικές) ανάμεσα στη στατική φάση και σε ομάδες της πρωτεΐνης που είναι φορτισμένες (Fekete et al., 2015). Διακρίνεται σε χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων (CEX) και ανιόντων (AEX), με την πρώτη να χρησιμοποιείται ευρύτερα στην ανάλυση μονοκλωνικών αντισωμάτων, λόγω της υψηλής διακριτικής της ικανότητας σε παραλλαγές φορτίου (Fekete et al., 2015).

Η IEX εφαρμόζεται ως ενδιάμεσο στάδιο καθαρισμού, επιτρέποντας τον αποτελεσματικό διαχωρισμό της πρωτεΐνης-στόχου από πρωτεΐνες ξενιστή, συσσωματώματα και άλλες προσμίξεις. Παράλληλα, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού ισομορφών, διαφορετικών ολιγομερών μορφών και τροποποιημένων πρωτεϊνών, όπως

γλυκοπρωτεϊνών, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην αξιολόγηση της ετερογένειας των βιοφαρμακευτικών προϊόντων (Farnan & Moreno, 2009; Li et al., 2013; Pabst et al., 2008; Quan et al., 2008).

Σε αντίθεση με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, η IEX χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό ευελιξίας, καθώς η απόδοσή της επηρεάζεται από πολλαπλές παραμέτρους, όπως η ιοντική ισχύς, το pH, ο ρυθμός ροής, η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος, το φορτίο δείγματος, καθώς και τα χαρακτηριστικά της ρητίνης (Amartely et al., 2018). Η προσρόφηση των πρωτεϊνών εξαρτάται τόσο από τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους όσο και από τις λειτουργικές συνθήκες της μεθόδου, γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων αυτών για αξιόπιστα αποτελέσματα (Ishihara & Yamamoto, 2005).

Σύγχρονες εξελίξεις στην IEX περιλαμβάνουν την χρήση νέων υλικών στατικής φάσης, όπως εξειδικευμένες ρητίνες κατιοντοανταλλαγής υψηλής απόδοσης, αυξάνοντας την απόδοση και την αποτελεσματικότητα αναφορικά με την απομάκρυνση προσμίξεων από κύτταρα ξενιστή (Urmann et al., 2010). Επίσης, ο συνδυασμός της τεχνικής IEX με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης συμβάλλει στον χαρακτηρισμό των παραλλαγών φορτίου των πρωτεϊνών (Füssl et al., 2018). Τέλος, πρόσφατες έρευνες αναφέρουν πως αλλαγές και βελτιώσεις στους μηχανισμούς έκλουσης και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης, στήλης και κινητής φάσης, αυξάνουν την αξιοπιστία και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (Baek et al., 2020).

5.1.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (HILIC, HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY)

Η υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπιδράσης (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) αποτελεί μία εξειδικευμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας, που χαρακτηρίζεται από την αξιοποίηση μιας στατικής φάσης (υδρόφιλης) και μιας οργανικής κινητής φάσης (υδρόφοβης) (Alpert & Andrews, 1988). Βασίζεται στη χρήση πολικής στατικής φάσης, όπως το πυρίτιο (McCalley & Neue, 2008), κυάνιο, αμίδιο ή τροποποιημένες πολικές επιφάνειες, σε συνδυασμό με κινητή φάση που περιέχει μικρό ποσοστό υδατικού διαλύματος (συνήθως $\geq 2,5\%$ v/v) και υψηλή αναλογία οργανικού διαλύτη, κυρίως ακετονιτριλίου (Alpert, 1990). Η HILIC (Zhou & Lucy, 2010, Karlsson et al., 2005) είναι μια παραλλαγή της χρωματογραφίας κανονικής φάσης και ονομάζεται επίσης χρωματογραφία «υδατικής κανονικής φάσης». Στην πράξη, οι διαχωρισμοί πραγματοποιούνται συνήθως με 5–40% υδατική φάση ή ρυθμιστικά διαλύματα, ενώ η τεχνική είναι συμβατή και με βαθμιδωτή έκλουση. Ο όρος HILIC καθιερώθηκε από τον Alpert το 1990, αν και η βασική αρχή της μεθόδου ανάγεται σε παλαιότερες εφαρμογές, όπως ο διαχωρισμός σακχάρων τη δεκαετία του 1970 με χρήση αμινοπροπυλο-τροποποιημένων στηλών πυριτίου σε υψηλά ποσοστά ακετονιτριλίου. Ακόμη νωρίτερα, το 1941, οι Martin και Synge είχαν επιτύχει

διαχωρισμό αμινοξέων σε στήλη πυριτίου χρησιμοποιώντας υδατοκορεσμένο χλωροφόρμιο, αποδίδοντας τον μηχανισμό σε κατανομή μεταξύ ενός λεπτού υδάτινου στρώματος στην επιφάνεια της στατικής φάσης και της οργανικής φάσης. Μετέπειτα αποδείχθηκε ότι η παρουσία μη αναμίξιμου οργανικού διαλύτη δεν είναι απαραίτητη, γεγονός που συνάδει με τον τρόπο λειτουργίας της HILIC.

Στη HILIC, οι πολικές, υδρόφιλες και ιοντισμένες ενώσεις εμφανίζουν αυξημένη συγκράτηση σε σχέση με μη πολικά ή υδρόφοβα μόρια, γεγονός που αποτελεί το αντίθετο της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (Boersema et al., 2008). Για παράδειγμα, ενώσεις όπως το τολουόλιο εκλούνται σχεδόν άμεσα σε συνθήκες HILIC, ενώ συγκρατούνται έντονα σε στήλες C18. Αντίθετα, μόρια όπως η ουρακίλη, που χρησιμοποιούνται ως δείκτες νεκρού όγκου στην αντίστροφη φάση, παρουσιάζουν σημαντική κατακράτηση στη HILIC. Αυξημένη περιεκτικότητα σε νερό στη κινητή φάση οδηγεί συνήθως σε μείωση της συγκράτησης των αναλυτών. Η σειρά έκλουσης των ενώσεων παρουσιάζει ομοιότητες με εκείνη της κανονικής φάσης, γι' αυτό και η HILIC συχνά αναφέρεται ως «υδατική κανονική φάση». Επιπλέον, η παρουσία σημαντικών ποσοτήτων νερού συμβάλλει στην απενεργοποίηση των δραστικών θέσεων της επιφάνειας του πυριτίου, με αποτέλεσμα τη βελτίωση του σχήματος των κορυφών, ιδιαίτερα για έντονα πολικές ενώσεις, σε σύγκριση με την κλασική κανονική φάση.

Η τεχνική HILIC θεωρείται συμπληρωματική της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, κυρίως λόγω της διαφορετικής σειράς έκλουσης και της ικανότητάς της να συγκρατεί αποτελεσματικά υδρόφιλα μόρια που είναι δύσκολο να αναλυθούν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Επιπρόσθετα, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε οργανικό διαλύτη της κινητής φάσης ευνοεί τη χρήση της σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας, καθώς βελτιώνει τη διαδικασία εκ νέου φωσφορικής και αποδιαλύτωσης στην ιοντοποίηση ηλεκτροψεκασμού, οδηγώντας σε σημαντική αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης. Παράλληλα, επιτρέπει την άμεση ανάλυση δειγμάτων που έχουν υποστεί εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) σε στήλες C18, χωρίς την ανάγκη εκτεταμένης επεξεργασίας, προσφέροντας ταυτόχρονα ορθογωνικότητα μεταξύ των σταδίων προετοιμασίας και ανάλυσης. Επιπλέον, το χαμηλό ιξώδες της κινητής φάσης, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε ακετονιτρίλιο, επιτρέπει τη χρήση υψηλότερων ρυθμών ροής και αυξημένη διάχυση των αναλυτών, γεγονός που οδηγεί σε βελτιωμένη αποδοτικότητα διαχωρισμού. Αυτό αντανακλάται και στη μορφή των καμπυλών van Deemter, όπου η περιοχή που σχετίζεται με τη μεταφορά μάζας είναι πιο επίπεδη σε σύγκριση με την αντίστροφη φάση, επιτρέποντας καλύτερη απόδοση ακόμη και σε υψηλές ταχύτητες ροής.

5.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Στην ανάλυση θεραπευτικών πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE). Η αναλυτική αυτή μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτροκινητική μετακίνηση των μορίων μέσα σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, επιτρέποντας τον διαχωρισμό τους και διατηρώντας παράλληλα την δομή των πρωτεϊνών (Alhazmi et al., 2015; Alhazmi et al., 2017; Staub et al., 2009). Ο συνδυασμός της CE με φασματομετρία μάζας (CE-MS) ενισχύει σημαντικά τις δυνατότητες ταυτοποίησης, αυξάνοντας την αναλυτική ευαισθησία και εκλεκτικότητα της μεθόδου (Staub et al., 2009).

Οι κυριότερες παραλλαγές της τεχνικής που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται συμβάλλοντας στον λεπτομερή χαρακτηρισμό της ετερογένειας και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, είναι η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE), η τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (cIEF) και η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτώματος (CGE) (Lechner et al., 2019).

5.2.1 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΖΩΝΗΣ (CZE)

Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) αποτελεί την πιο απλουστευμένη και πιο θεμελιώδη μορφή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, γνωστή και ως ηλεκτροφόρηση ελεύθερου διαλύματος. Η αρχή διαχωρισμού βασίζεται στις διαφορές της αναλογίας φορτίου προς μάζα, ενώ η εφαρμογή ομοιόμορφου ηλεκτρικού πεδίου σε ένα σταθερό σε ένταση ρυθμιστικό περιβάλλον εξασφαλίζει την μετακίνηση κατά μήκος του τριχοειδούς. Όσον αφορά την ανάλυση μονοκλωνικών αντισωμάτων, η CZE αποτελεί μια ευέλικτη, ευρέως χρησιμοποιούμενη και οικονομικά αποδοτική τεχνική, προσφέροντας μάλιστα υψηλή ανάλυση και αποτελεσματικότητα για τον χαρακτηρισμό ετερογενειών σε πολλαπλά επίπεδα (Dadouch et al., 2020).

Ένα βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η ανεπιθύμητη προσρόφηση των πρωτεϊνών στο τοίχωμα του τριχοειδούς, μεταβάλλοντας την ακρίβεια, την απόδοση και την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, οδηγώντας ακόμη και σε απώλειες δείγματος (Staub et al., 2011). Με σκοπό την αποφυγή προσρόφησης, εφαρμόζονται στρατηγικές ελέγχου της ηλεκτροοσμωτικής ροής (EOF), καθώς και χρήση επικαλύψεων στον ηλεκτρολύτη υποβάθρου. Οι επικαλύψεις αυτές μπορεί να είναι δυναμικές, με πολυμερή τύπου υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνης (HPMC), υδροξυπροπυλοκυτταρίνης (HPC) καθώς και πολυαμίνες όπως η τριαιθυλενοτετραμίνη (TETA) ή πολυαιθυλενοξειδίο (PEO) (Goyon et al., 2018; Nguyen et al., 2016; Shi et al., 2012). Αντίστοιχα, οι μόνιμες επικαλύψεις, όπως το γραμμικό πολυακρυλαμίδιο (LPA) ή η πολυβινυλική αλκοόλη, προσφέρουν μεγαλύτερη σταθερότητα και καλύτερη αναπαραγωγιμότητα, αν και απαιτούν πιο σύνθετη προετοιμασία (Belon et al., 2018; Haselberg et al., 2018).

Η CZE συχνά συνδυάζεται με ανιχνευτικές τεχνικές, όπως φασματομετρία μάζας (MS) ή οπτικούς ανιχνευτές (UV, LIF), για την διευκόλυνση δομικού χαρακτηρισμού, ενίσχυση της ευαισθησίας και της ταυτοποίησης. Αξίζει να αναφερθεί πως μέσω σύζευξης ESI-MS επιτυγχάνεται χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών (Dadouch et al., 2020).

5.2.2 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ (CGE)

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση σε γέλη (CGE) αποτελεί παραλλαγή της CZE, στην οποία χρησιμοποιείται γέλη εντός του τριχοειδούς, επιτρέποντας τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών κυρίως βάσει μεγέθους. Η μέθοδος εφαρμόζεται ευρέως από τη δεκαετία του 1990 στην ανάλυση μονοκλωνικών αντισωμάτων, προσδιορίζοντας το φαινομενικό μοριακό βάρος, την καθαρότητα, τη σταθερότητα και την ετερογένεια μεγέθους των προϊόντων (Kotia & Raghani, 2010; Lacher et al., 2010; Rustandi et al., 2008; Szekrényes et al., 2016).

Κατά την διάρκεια της ανάλυσης, τα δείγματα θερμαίνονται με υψηλές συγκεντρώσεις SDS, ώστε να καταστραφεί η ανώτερη δομή των πρωτεϊνών χωρίς όμως να προκληθεί διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών, οδηγώντας σε ομοιόμορφη φόρτιση των μορίων. Η χρήση αναγμένων και μη αναγμένων συνθηκών επιτρέπει την διερεύνηση της δομικής ετερογένειας. Πιο συγκεκριμένα, η αναγμένη CE-SDS χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό θραυσμάτων, ενώ η μη αναγμένη για τον έλεγχο της συσσωμάτωσης και της καθαρότητας (Lechner et al., 2019).

Η ανίχνευση στην CGE πραγματοποιείται κυρίως με υπεριώδη ακτινοβολία ή φθορισμό, με την φασματοσκοπία εκπομπής φθορισμού (LIF) να υπερέχει σε ευαισθησία σε σύγκριση με την UV (Lechner et al., 2019). Οι έρευνες για τον κατακερματισμό μέσω CGE συνδράμουν στην κατανόηση των μηχανισμών αποικοδόμησης των mAbs και στη βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής και αποθήκευσης (Li et al., 2017; Wang et al., 2019).

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνικής, ο συνδυασμός της CGE-SDS με φασματομετρία μάζας παρουσιάζει εμπόδια λόγω της καταστολής ιόντων. Για την αντιμετώπιση αυτών των εμποδίων, έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές απομάκρυνσης του SDS, όπως ισοταχοφόρηση, χρήση οργανικών διαλυτών ή επιφανειοδραστικών ουσιών και κυκλοδεξτρινών (Borza et al., 2018). Επιπλέον, μέσω εφαρμογής δισδιάστατων συστημάτων όπως CGE-SDS σε συνδυασμό με CZE-MS επιτυγχάνεται καλύτερη διάκριση υπομονάδων και προσμίξεων των αντισωμάτων, βελτιώνοντας σημαντικά την αναλυτική απόδοση (Wang et al., 2019).

5.2.3 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ (CIEF)

Η τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (cIEF) αποτελεί μία εξειδικευμένη τεχνική διαχωρισμού βάσει του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) των μορίων. Στην μέθοδο αυτή δημιουργείται κατά μήκος του τριχοειδούς σωλήνα μια διαβάθμιση pH, όπου τα μόρια των μονοκλωνικών αντισωμάτων μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου μέχρι να φτάσουν τελικώς σε σημείο όπου το συνολικό τους φορτίο μηδενίζεται και το pH ισούται με το pI τους (Kahle et al., 2019). Επιπλέον, όσο προσεγγίζεται αυτό το σημείο, η διαλυτότητα των πρωτεϊνών μειώνεται, γεγονός που μπορεί να επιφέρει καθίζηση και επομένως απαιτείται για τον λόγο αυτό η προσεκτική επιλογή τόσο του ρυθμιστικού διαλύματος όσο και του ηλεκτρολύτη υποβάθρου (BGE) (Borza et al., 2018).

Για την εκτέλεση της ανάλυσης, το δείγμα περιέχει το προς ανάλυση αντίσωμα, αμφολύτες φορέων, δείκτες pI καθώς επίσης και διάφορα πρόσθετα. Πρόσθετα, όπως τα επιφανειοδραστικά και τα μετουσιωτικά, περιορίζουν την συσσωμάτωση και τη καθίζηση των πρωτεϊνών μετά την εστίαση. Η ουρία αποτελεί το συχνότερα χρησιμοποιούμενο πρόσθετο, παρόλο που λόγω μετουσιωτικής δράσης της, επιφέρει μεταβολές στο φαινόμενο pI (He et al., 2011). Εναλλακτικά, χρήση ενώσεων χωρίς απορρυπαντικό, όπως η ταυρίνη και η σουλφοβεταΐνη μπορούν να αξιοποιηθούν αντί για ουρία, στην ανάλυση απεικόνισης cIEF (απεικονιζόμενη τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση, icIEF), επιτρέποντας αξιόπιστο διαχωρισμό, καλή ανάλυση και επαναληψιμότητα.

Παράλληλα, τεχνικοί περιορισμοί προκύπτουν λόγω χρήσης μη πτητικών αμφολυτών και προσθέτων υψηλών συγκεντρώσεων, καθώς και λόγω αραιωτικής επίδρασης (He et al., 2009). Πρόσφατες εξελίξεις στις μεθόδους cIEF και συνδυασμού μεθόδων icIEF με MS, διευρύνουν τις δυνατότητες χαρακτηρισμού των παραλλαγών φορτίου των βιοθεραπευτικών πρωτεϊνών.

Η cIEF λόγω πολυπαραγοντικής φύσης, επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους και άρα η βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάλυσης κρίνεται απαραίτητη. Μέσω της προσέγγισης σχεδιασμού πειραμάτων (Design of Experiments, DoE) έχει επιτευχθεί συστηματική διερεύνηση και ρύθμιση αναλυτικών παραμέτρων όπως η σύσταση του δείγματος (π.χ. συγκεντρώσεις αμφολυτών, ουρίας, L-αργινίνης και άλλων προσθέτων), συμβάλλοντας σημαντικά στην βελτιστοποίηση της μεθόδου όσον αφορά τον διαχωρισμό, την ανάλυση, τις θέσεις κορυφών και την επαναληψιμότητα (Ghasriani et al., 2016; Kahle et al., 2019; Mack et al., 2019; Maeda et al., 2010).

5.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Αναλυτικές μέθοδοι όπως οι ηλεκτροφορητικές και οι χρωματογραφικές τεχνικές έχουν συμβάλει καθοριστικά στην απεικόνιση της ομοιοπολικής δομής των

πρωτεϊνών (αλληλουχίες αμινοξέων και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις) όμως δεν διαθέτουν πληροφορίες για την αποσαφήνιση υψηλής τάξης δομών (HOS) μονοκλωνικών αντισωμάτων (Poppe et al., 2013). Στον προσδιορισμό τριτοταγών δομών των mAbs καθώς επίσης και στην αποσαφήνιση HOS, αξιοποιούνται προηγμένες φασματοσκοπικές μέθοδοι όπως ο κυκλικός διχρωϊσμός (CD) και η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) (Kiss et al., 2018). Η φασματοσκοπική τεχνική, NMR (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός) προσδιορίζει την τρισδιάστατη (3D) δομή, παρέχοντας τις HOS και επομένως αποτελεί την καλύτερη μέθοδο χαρακτηρισμού της δομής των θεραπευτικών πρωτεϊνών. Διαφορετικές παραλλαγές της τεχνικής NMR με έμφαση σε πειράματα NMR 1D ^1H , 2D ^1H - ^{15}N και ^1H - ^{13}C έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για τον χαρακτηρισμό των HOS των mAbs (Alhazmi & Albratty, 2023).

5.3.1 ΜΟΝΟΔΙΑΣΤΑΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ^1H

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H NMR) αποτελεί μια μέθοδο για την αποτύπωση «δακτυλικών αποτυπωμάτων» των μονοκλωνικών αντισωμάτων, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τη δομική τους ταυτότητα (Ghasriani et al., 2016). Λόγω όμως ορισμένων περιορισμών που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μέθοδος, έχουν προταθεί προηγμένες αναλυτικές προσεγγίσεις, όπως η μέθοδος PGSTE (ηχώ διέγερσης παλμικού πεδίου με διαβάθμιση) και PROFILE (PROtein Fingerprint by Line shape Enhancement). Επιπλέον αναλυτικές μέθοδοι όπως η PROFOUND (Protein Fingerprint Observed Using NIPALS Decomposition), η οποία βασίζεται σε συνδυασμό τεχνικών ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) και ειδικότερα στον αλγόριθμο NIPALS, επιτρέπουν την αποτελεσματική επεξεργασία και ερμηνεία φασματικών δεδομένων (Elliott et al., 2021).

Η μονοδιάστατη ^1H NMR αποκαλύπτει τη δημιουργία παροδικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και φυσικοχημικών ιδιοτήτων του διαλύματος, όπως το ιζώδες (Kheddo et al., 2016; Kheddo et al., 2017). Επιπρόσθετα, η συνδυαστική χρήση τεχνικών όπως η ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC)-NMR, η CD, η SEC και η MALS (σκέδαση φωτός πολλαπλών γωνιών) έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική για την περιγραφή της ανώτερης δομής (HOS) των θεραπευτικών αντισωμάτων (Chen et al., 2016).

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ένταση του σήματος στη μονοδιάστατη ^1H NMR αξιοποιείται ως δείκτης σταθερότητας των πρωτεϊνικών σκευασμάτων, επιτρέποντας την παρακολούθηση διεργασιών αποικοδόμησης, όπως η συσσωμάτωση και ο κατακερματισμός των μορίων (Bramham et al., 2020). Τέλος, ο συνδυασμός NMR υγρής φάσης με τεχνικές όπως η κρυοηλεκτρονική μικροσκοπία και η δυναμική σκέδαση φωτός έχει αναδειχθεί ως ιδιαίτερα χρήσιμος για τον χαρακτηρισμό συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, πληροφορώντας για τη δομή, τη σύνθεση, τη

σταθερότητα και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιποσωμάτων και πεπτιδίων, καθώς και για τα προφίλ απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών (Doyen et al., 2021).

5.3.2 ΠΟΛΥΔΙΑΣΤΑΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ^1H

Τα πολυδιάστατα φάσματα NMR προσφέρουν τη δυνατότητα διαχωρισμού και ανάλυσης επιμέρους φασμάτων, επιτρέποντας την αποκάλυψη ενός πλήρως «δακτυλικού αποτυπώματος» για πρωτεϊνικά μόρια. Μέσω της εφαρμογής μονοδιάστατων και πολυδιάστατων τεχνικών NMR, όπως η 1D ^1H NMR, καθώς και οι 2D ^1H – ^{15}N και ^1H – ^{13}C , αναγνωρίζονται ποιοτικά χαρακτηριστικά (Quality Attributes, QA) και η ανώτερη δομή (Higher Order Structure, HOS) των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Brinson et al., 2019). Δεδομένου ότι τα χαρακτηριστικά αυτά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε δομικές μεταβολές, ακόμη και μικρές διαφοροποιήσεις μπορεί να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα και την ασφάλεια των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Οι τεχνικές 2D-NMR επιτρέπουν τον ακριβή ατομικό προσδιορισμό των δομικών στοιχείων, προσδιορίζοντας επίσης την πρωτοταγή έως και την τεταρτοταγή δομή των θεραπευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (Brinson et al., 2019).

Η εφαρμογή πολυδιάστατης NMR για την ανάλυση δομής σε άθικτα αντισώματα παρουσιάζει προκλήσεις, κυρίως λόγω της ταχείας εγκάρσιας χαλάρωσης και της περιορισμένης μοριακής κινητικότητας. Επομένως με σκοπό την αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών, έχουν αναπτυχθεί εξειδικευμένες προσεγγίσεις, όπως η δευτερίωση θέσεων πρωτονίων (^1H) και η χρήση μεθόδων όπως η TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) και η CRINEPT (Cross-Correlated Relaxation-Enhanced Polarization Transfer), οι οποίες βελτιώνουν την ευαισθησία και την ποιότητα των φασμάτων (Tugarinov et al., 2003). Επιπλέον, έχει προταθεί και η ανίχνευση μέσω ^{15}N , CRINEPT, η οποία επιτρέπει την υψηλής ευαισθησίας ανάλυση μη δευτεριωμένων πρωτεϊνών με υψηλό μοριακό βάρος. Παράλληλα, η 2D NMR έχει συμβάλει στην κατανόηση της δομής των θεραπευτικών αντισωμάτων μέσω απόκτηση δομικών στοιχείων, όπως οι δισουλφιδικοί δεσμοί, καθώς και μέσω αξιολόγησης μοριακών αλληλεπιδράσεων όπως η πεγκυλίωση (Phyo et al., 2021).

5.3.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FTIR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) αποτελεί μέθοδος φασματοσκοπίας απορρόφησης που επιτρέπει τη διερεύνηση των ζωνών δόνησης των μορίων, λαμβάνοντας πληροφορίες για λειτουργικές ομάδες, όπως οι δεσμοί N–H και C=O. Η FTIR συνδυαστικά με τεχνική φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD), αξιοποιείται για τον δομικό χαρακτηρισμό πρωτεϊνών παρέχοντας πληροφορίες για

δευτεροταγή και τριτοταγή δομή των βιομορίων (Arunkumar et al., 2019; Tokunaga et al., 2020).

Στον χαρακτηρισμό των θεραπευτικών πρωτεϊνών σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η γλυκοζυλίωση, μία από τις συχνότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε ποσοστό περίπου 60% των βιοφαρμακευτικών προϊόντων και κυρίως στα μονοκλωνικά αντισώματα. Η εφαρμογή FTIR έχει αξιοποιηθεί στη συγκριτική ανάλυση του προφίλ γλυκοζυλίωσης και των μονοσακχαριτών σε αρκετά θεραπευτικά αντισώματα, αποκαλύπτοντας φασματικές διακυμάνσεις (Derenne et al., 2020; Lin et al., 2015).

Παράλληλα, καινοτόμες φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως η φασματομετρία μάζας κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier FT-ICR-MS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry) συμβάλλουν στην κατανόηση δομής-λειτουργίας των πρωτεϊνών (Chavez et al., 2022). Επιπλέον, μέθοδοι όπως η MALDI-MS με διάσπαση εντός της πηγής (in-source decay, ISD) ταξινομεί την πρωτοταγή δομή των αντισωμάτων (N- και C-τελικά άκρα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων).

5.3.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ (CD)

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism, CD) αποτελεί μια οπτική τεχνική, που βασίζεται στις ηλεκτρονικές μεταβάσεις που λαμβάνουν χώρα στην περιοχή μήκος κύματος του άπω υπεριώδους (UV). Χρησιμοποιείται ευρέως σαν τεχνική για να επιτευχθεί προσδιορισμός της ανώτερης δομής των πρωτεϊνών, καθώς και διαμορφωτικών μεταβολών σε μονοκλωνικά αντισώματα κατά τη διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων (Barnett et al., 2018). Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί βασικό εργαλείο για τον χαρακτηρισμό δευτεροταγών και τριτοταγών δομών για την ανάλυση ποικίλων πρωτεϊνών (Yao et al., 2018).

Η CD έχει πληθώρα πλεονεκτημάτων που τη διαφοροποιούν από άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως η μικρή ποσότητα δείγματος που απαιτείται. Επιπλέον πλεονεκτεί καθώς δεν προϋποθέτει ιδιαίτερη προεπεξεργασία για την αποκάλυψη εναντιομερών και επιτρέπει την ανάλυση σε υδατικά διαλύματα, προσεγγίζοντας έτσι φυσιολογικές συνθήκες (Miles et al., 2021; Yao et al., 2018). Ωστόσο, παρά τα παραπάνω πλεονεκτήματα, παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς, κυρίως λόγω των χαμηλής έντασης φασματοσκοπικών σημάτων, που επιδρούν στην ακρίβεια των μετρήσεων.

Η CD έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα βοηθητική στην κατανόηση θεραπευτικών αντισωμάτων κυρίως όσον αφορά την αξιολόγηση των μεταβολών στη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή του bevacizumab σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH, (Sousa et al., 2017). Παράλληλα, η τεχνική έχει αξιοποιηθεί για τη συγκριτική ανάλυση νέων αντισωμάτων, συμβάλλοντας στον προσδιορισμό της δομής και της λειτουργίας

τους (Sousa et al., 2017) και επιτρέποντας τον ακριβή χαρακτηρισμό της δευτεροταγούς δομής, (α-έλικες και β-φύλλα) (Miles et al., 2021). Επομένως, η φασματοσκοπία CD αποτελεί ισχυρή μέθοδο ποιοτικού χαρακτηρισμού πρωτεϊνών τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιοφαρμακευτικό επίπεδο.

5.4 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

5.4.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC-MS)

Η Φασματομετρία Μάζας (MS) αποτελεί μια καθοριστική μέθοδο για τον λεπτομερή δομικό χαρακτηρισμό των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs). Μέσω της μεθόδου πολλαπλών χαρακτηριστικών (Multi-Attribute Method - MAM) επετεύχθη ανάλυση κρίσιμων ποιοτικών παραμέτρων. Επίσης, με σκοπό την αντιμετώπιση της αυξανόμενης πολυπλοκότητας και των προκλήσεων των σύγχρονων μορφών αντισωμάτων, την τελευταία δεκαετία γίνεται χρήση προηγμένων τεχνικών διαδιάστατης υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (2D-LC-MS) (Rogers et al., 2017; Zobel-Roos et al., 2017). Ο συνδυασμός αυτών των μεθόδων, παρουσιάζουν ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων 1D-LC-MS (σε επίπεδο πεπτιδίου) και 1D-LC-UV (σε επίπεδο άθικτης πρωτεΐνης), συμβάλλοντας τελικά σε υψηλότερη διακριτική ικανότητα και αξιοπιστία (Camperi et al., 2021).

Παράλληλα, η πρόοδος της τεχνολογίας MS και η ένταξη της φασματοσκοπίας μάζας κινητικότητας ιόντων (Ion Mobility Mass Spectrometry - IMMS) στις αναλύσεις των βιοφαρμακευτικών βιομηχανιών σταδιακά έχει αναβαθμίσει την ικανότητα ταυτοποίησης πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων επιτόπου-παρατόπου. Η αποτελεσματικότητα τεχνικής LC-MS έχει επιβεβαιωθεί και μέσω εφαρμογής στην ποσοτικοποίηση θεραπευτικών σχημάτων (πχ του ανθρωποποιημένου IgG1 mAb κατά του ιού του απλού έρπητα) (Skeene et al., 2021).

Η βιβλιογραφία έχει επίσης αναδείξει την MS σαν μια τεχνική χαρακτηρισμού σύνθετων πρωτεϊνών σύντηξης Fc (Duivelshof et al., 2021). Συνοψίζοντας λοιπόν, η τεχνική LC-MS αποτελεί ένα εναλλακτικό ερευνητικό εργαλείο φασματοσκοπίας, το οποίο συνεισφέρει με ακρίβεια στον δομικό χαρακτηρισμό και στην ποσοτικοποίηση θεραπευτικών πρωτεϊνών σε εμπορικό επίπεδο.

5.5 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι αναδεικνύονται πολύτιμα εργαλεία όσον αφορά κυρίως τον δομικό χαρακτηρισμό των μονοκλωνικών αντισωμάτων κυρίως σε διαγνωστικές εφαρμογές. Αποτελούν καινοτόμο προσέγγιση, υπερτερώντας έναντι ορισμένων κλασικών μεθόδων (όπως η HPLC, η GC-MS και η ELISA) καθώς πραγματοποιούνται

ταχύτητα, έχουν χαμηλότερο κόστος εξοπλισμού και προσφέρουν απλότητα και υψηλή ευαισθησία.

5.5.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η αξιοποίηση ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που ενσωματώνουν τεχνικές όπως η Διαφορική Παλμική Βολταμετρία (DPV) και η Ηλεκτροχημική Φασματοσκοπία Εμπέδησης (EIS), συνέβαλλε δραστικά στην μελέτη πρωτεϊνών. Η EIS χρησιμοποιείται ευρέως με στόχο την ανάλυση αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος και κατά κύριο λόγο γίνεται χρήση της σε ανοσοαισθητήρες χωρίς επισήμανση (label-free). Αποτελεί μη καταστροφική τεχνική, ιδιαίτερα ευαίσθητη που επιτρέπει την ανάλυση σε πραγματικό χρόνο. Αναφορικά με την DPV, έχει καθοριστική σημασία στον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία, ταχύτητα και χαμηλό κόστος, επιτρέποντας μάλιστα την ανίχνευση σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η SPCE (Screen-printed carbon electrodes) αποτελεί μια επιπρόσθετη ηλεκτροχημική αναλυτική τεχνική κατάλληλη για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών με εμφανώς καλύτερη απόδοση και ταχύτητα από τεχνικές όπως η HPLC-MS και η ELISA (Pérez-Fernández et al., 2019). Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει μεγάλη κινητικότητα στον ερευνητικό χώρο προσπαθώντας να αναπτυχθούν εξελιγμένοι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι περιλαμβάνουν ανοσοαισθητήρες και αισθητήρες DNA/αптаμερή που μέσω των αναλυτικών αποτελεσμάτων τους και μέσω εφαρμογής ηλεκτροχημικού μορφοτροπέα, αξιοποιούν την ικανότητα βιοαναγνώρισης-δέσμευσης μεταξύ αντιγόνου και αντισωμάτων. Πρόσφατα, ο ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας που βασίζεται στην ELISA έγινε δημοφιλής λόγω της ικανότητας σύζευξης της οπτικής ELISA με μεθόδους ηλεκτροχημείας.

5.5.2 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ

Ο πλήρης χαρακτηρισμός δομής των mAbs μέσω τεχνικών φασματομετρίας μάζας εμφανίζει ορισμένες προκλήσεις όπως η παρουσία δισουλφιδικών δεσμών, οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που εμφανίζουν, καθώς και η πολυπλοκότητα λόγω μεγάλου μοριακού μεγέθους (Thompson et al., 2013). Λύση στους παραπάνω περιορισμούς έδωσε μια μέθοδος ηλεκτροχημικής ανάλυσης, η οποία αναπτύχθηκε με στόχο να ξεπεραστούν δυσκολίες όσον αφορά τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Πιο χαρακτηριστικά, αξιοποιήθηκε ένα ηλεκτροχημικό κύτταρο με μαγνητικό πεδίο (15 T), που κατόπιν συνδέθηκε απευθείας με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) και φασματόμετρο μάζας κυκλοτρονικού συντονισμού μετασχηματισμού Fourier (FTICR), αναλύοντας τις ελαφριές αλυσίδες των αντισωμάτων μέσω tandem MS/MS,

χωρίς να παρεμβάλλονται βαριές αλυσίδες. Μέσω της τεχνικής FTICR-MS επετεύχθη πλήρης διαχωρισμός ισοτοπικών κατανομών και ταυτοποίηση πολλών προϊόντων προσθήκης καθώς και άλλων δομικών παραλλαγών (Nicolardi et al., 2014).

Συμπερασματικά λοιπόν, οι ηλεκτροχημικές τεχνικές αποτελούν ισχυρό εργαλείο για τον δομικό χαρακτηρισμό και για την ποσοτική ανάλυση των mAbs. Οι μέθοδοι ηλεκτροχημείας και η χρήση τους στην ανάλυση θεραπευτικών πρωτεϊνών και αντισωμάτων, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών καθώς πλεονεκτήματα τους όπως η υψηλή επιλεκτικότητα και ευαισθησία, η ταχύτητα, το μειωμένο κόστος και οι ελάχιστες απαιτήσεις δειγματοληψίας, τις καθιστούν κατάλληλες και ιδιαιτέρως ελκυστικές (Arya & Estrela, 2018). Η σύζευξή τους με προηγμένες φασματομετρικές προσεγγίσεις ενισχύει τις δυνατότητες ανίχνευσης βιομορίων, συμβάλλοντας στην περαιτέρω ανάπτυξη της βιοφαρμακευτικής έρευνας. Παρόλα αυτά καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ενίσχυσης των ηλεκτροχημικών ανοσοαισθητήρων καλλιεργώντας παράλληλα νέες ιδέες για τη σύζευξη αντισωμάτων.

5.6 ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

Οι βιοφυσικές τεχνικές μελέτης αλληλεπιδράσεων στοχεύουν στην γρήγορη αξιολόγηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων σε πραγματικό χρόνο χωρίς να απαιτούνται ραδιενεργές ή φθορίζουσες επισημάνσεις. Σε αυτές τις βιοφυσικές τεχνικές συγκαταλέγονται ο συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (SPR) και η συμβολομετρία βιοστρώματος (BLI). Οι δύο τεχνικές θεωρούνται συμπληρωματικές με ευρεία χρήση στον αναλυτικό χαρακτηρισμό και στην αξιολόγηση των θεραπευτικών πρωτεϊνών.

5.6.1 ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΠΛΑΣΜΟΝΙΩΝ (SURFACE PLASMON RESONANCE, SPR)

Ο συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων αποτελεί μια από τις κυρίαρχες μεθόδους μελέτης βιομοριακών αλληλεπιδράσεων χωρίς να γίνεται χρήση επισημάνσεων (label-free method). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αλληλεπίδραση του προσπίπτοντος φωτός με τα ελεύθερα ηλεκτρόνια τα οποία είναι τοποθετημένα στην επιφάνεια ενός λεπτού μετάλλου. Υπό τις κατάλληλες συνθήκες μήκους κύματος, πόλωσης και γωνίας πρόσπτωσης, πραγματοποιείται απορρόφηση των φωτονίων προκύπτοντας ταλάντωση ηλεκτρονίων (πλασμονίων) με ταυτόχρονη ενίσχυση ηλεκτρικού πεδίου (Heinrich et al., 2010).

Η τεχνική SPR εφαρμόζεται με σκοπό τον προσδιορισμό κινητικών παραμέτρων (σταθερά σύνδεσης, σταθερά αποσύνδεσης και σταθερά ισορροπίας συγγένειας) , συγγένειας σύνδεσης και μελέτη αλληλεπιδράσεων.

Πλεονεκτεί συγκριτικά με άλλες αναλυτικές τεχνικές καθώς δίνει την δυνατότητα ανάλυσης σε πραγματικό χρόνο και δεν απαιτεί την χρήση επισημάνσεων. Αποτελεί μια μέθοδο που χρησιμοποιείται στην αξιολόγηση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και σε μελέτες σταθερότητας καθώς και δομικής ακεραιότητας ενός μορίου.

5.6.2 ΣΥΜΒΟΛΟΜΕΤΡΙΑ ΒΙΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ (BIO-LAYER INTERFEROMETRY, BLI)

Η συμβολομετρία βιοστρώματος (BLI) αποτελεί μια οπτική τεχνική η οποία επιτρέπει την μελέτη μοριακών αλληλεπιδράσεων σε πραγματικό χρόνο χωρίς να υπάρχει ανάγκη για φθορίζοντες δείκτες. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε μια δέσμη φωτός η οποία αντανακλάται από δυο επιφάνειες σε έναν βιοαισθητήρα. Το μόριο-στόχος ακινητοποιείται στην άκρη της επιφάνειας του αισθητήρα και όταν μετέπειτα το δεύτερο μόριο προσδεθεί στο πρώτο, ακολουθεί αύξηση πάχους του βιοστρώματος, με συνέπεια την μεταβολή του οπτικού σήματος (Shah & Duncan, 2014).

Οι πληροφορίες που παρέχει η BLI είναι παραπλήσιες με αυτές της SPR έχοντας ως βασικές εφαρμογές της, τον χαρακτηρισμό κινητικών σύνδεσης, συγγένειας δέσμευσης και αλληλεπιδράσεων (πρωτεΐνης – πρωτεΐνης, μικρών μορίων με πρωτεΐνες) καθώς επίσης και τον ποσοτικό προσδιορισμό. Πλεονεκτεί σε σύγκριση με άλλες τεχνικές λόγω της υψηλής της απόδοσης, της ευκολίας χρήσης και της δυνατότητας εύκολης και γρήγορης ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων.

Επιπρόσθετα, η μέθοδος BLI αποτελεί ένα εργαλείο που εξυπηρετεί στον αναλυτικό χαρακτηρισμό των βιοφαρμακευτικών προϊόντων, παρέχοντας πληροφορίες για την λειτουργική συμπεριφορά και δευτερευόντως ενδείξεις για την δομική ακεραιότητα ενός μορίου καθώς αξιολογούν δομικές μεταβολές. Εφαρμόζεται σε μελέτες σταθερότητας με στόχο την παρακολούθηση μεταβολών οι οποίες πιθανόν να επέρχονται από τις διαδικασίες της οξείδωσης, της αποαμίδωσης και της γλυκοζυλίωσης.

6. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ CQAs ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η αξιολόγηση και η εις βάθος κατανόηση των κρίσιμων ποιοτικών χαρακτηριστικών τα οποία κρίνονται αναγκαία για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα ενός βιοφαρμακευτικού προϊόντος, καθορίζουν την διασφάλιση ποιότητας των θεραπευτικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, ο χαρακτηρισμός των κρίσιμων ποιοτικών χαρακτηριστικών πραγματοποιείται μέσω εφαρμογής επικυρωμένων αναλυτικών τεχνικών που προαναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα.

Σύμφωνα και με ορισμένες κατευθυντήριες οδηγίες, η επιλογή της καταλληλότερης αναλυτικής μεθόδου στηρίζεται στο υπό διερεύνηση κρίσιμο ποιοτικό χαρακτηριστικό (Πίνακας 4). Μάλιστα, απαιτείται συνδυασμός αναλυτικών τεχνικών καθώς μια μόνο αναλυτική μέθοδος δεν παρέχει πλήρη κατανόηση ενός CQA.

6.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ

Η επιβεβαίωση της ταυτότητας αξιολογείται βάσει της πρωτοταγούς δομής καθώς και της ανώτερης δομής των πρωτεϊνών. Ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής επιτυγχάνεται μέσω της αναλυτικής μεθόδου υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (CE-MS) και μέσω MALDI-MS με διάσπαση εντός πηγής (MALDI-MSD) ενώ η ανώτερη δομή (HOS) επαληθεύεται μέσω τεχνικών φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD), φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), φασματομετρίας μάζας ανταλλαγής υδρογόνου με δευτέριο (HDX-MS), σκέδασης φωτός πολλαπλών γωνιών (MALS) και φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

6.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ

Η αξιολόγηση της καθαρότητας μιας πρωτεΐνης και ο εντοπισμός τυχόν προσμίξεων αξιολογούνται μέσω παραμέτρων όπως παραλλαγές μεγέθους, παραλλαγές φορτίου, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και συσσωμάτωση. Οι παραλλαγές μεγέθους προσδιορίζονται μέσω χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC), ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με δωδεκυλοθειικό νάτριο (CE-SDS), οι παραλλαγές φορτίου μέσω τεχνικών χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής (IEX) και τριχοειδούς ισοηλεκτρικής εστίασης (cIEF), οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μέσω υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RPLC), υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης HILIC συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (HILIC-MS) και υγρής χρωματογραφίας που συνδυάζεται με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) και η συσσωμάτωση μέσω τεχνικών χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC) και τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με δωδεκυλοθειικό νάτριο (CE-SDS).

6.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΔΟΜΙΚΗ ΑΚΕΡΑΙΟΤΗΤΑ

Η δομική ακεραιότητα σχετίζεται με τον προσδιορισμό της ανώτερης δομής (HOS), την ύπαρξη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και έλεγχο συσσωμάτωσης. Επομένως, εφαρμόζονται συνδυαστικά οι ακόλουθες αναλυτικές τεχνικές: φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR),

φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), φασματομετρία μάζας ανταλλαγής υδρογόνου με δευτέριο (HDX-MS), σκέδαση φωτός πολλαπλών γωνιών (MALS) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για προσδιορισμό της ανώτερης δομής, υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPLC), υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης HILIC συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (HILIC-MS) και υγρή χρωματογραφίας που συνδυάζεται με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) για προσδιορισμό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) για προσδιορισμό της συσσωμάτωσης.

6.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Η αξιολόγηση της σταθερότητας απαιτεί τον συνδυασμό πολλών αναλυτικών τεχνικών λόγω της επίδρασης των μηχανισμών αποικοδόμησης σε ποικίλα επίπεδα της πρωτεϊνικής δομής. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται συμβάλλουν στην ανίχνευση χημικών και δομικών τροποποιήσεων καθώς επίσης και συσσωματωμάτων και μεταβολών στη βιολογική δραστηριότητα. Οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι χρωματογραφικές τεχνικές όπως η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC), η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (IEX), η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-LC) και η υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης HILIC. Εφαρμόζονται επιπλέον ηλεκτροφορητικές τεχνικές όπως η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE), η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτώματος (CGE-SDS) και η τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (cIEF). Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD) αποτελούν φασματοσκοπικές τεχνικές που εφαρμόζονται για την αξιολόγηση της σταθερότητας των θεραπευτικών πρωτεϊνών ενώ η υγρή χρωματογραφία που συνδυάζεται με φασματομετρία μάζας (LC-MS) αποτελεί επίσης μια ισχυρή τεχνική αξιολόγησης. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά την χημική αποικοδόμηση για την αξιολόγηση της αποαμίδωσης εφαρμόζονται οι τεχνικές IEX, CZE, LC-MS, για την οξείδωση RP-LC και LC-MS, για την γλυκοζυλίωση HILIC και LC-MS και για τον πρωτεολυτικό κατακερματισμό SEC και CGE-SDS. Η SPR και η BLI αποτελούν βιοφυσικές τεχνικές που δρουν συμπληρωματικά και προσδίδουν ένα πιο ολοκληρωμένο προφίλ στον χαρακτηρισμό των θεραπευτικών πρωτεϊνών. Αναφορικά με την φυσική αποικοδόμηση, η συσσωμάτωση αξιολογείται μέσω μεθόδων SEC και FTIR, η καθίζηση μέσω SEC και η αποδιάταξη μέσω CD και FTIR. Επομένως για την πλήρη αξιολόγηση της σταθερότητας απαιτείται συνδυασμός αναλυτικών, με σκοπό την παροχή πληροφοριών σχετικών με φυσικές, χημικές και λειτουργικές μεταβολές ενός πρωτεϊνικού μορίου.

6.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η βιολογική δραστηριότητα αξιολογείται μέσω δοκιμασιών σύνδεσης και λειτουργικών δοκιμασιών. Οι δοκιμασίες σύνδεσης προσδιορίζονται μέσω των αναλυτικών μεθόδων ELISA, SPR, BLI, EIS και SPCE ενώ οι λειτουργικές δοκιμασίες μέσω κυτταρικών δοκιμασιών.

6.6 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ

Η ανοσογονικότητα δεν αποτελεί άμεσα μετρήσιμο κρίσιμο ποιοτικό χαρακτηριστικό, αλλά αξιολογείται μέσω συνδυασμού άμεσων και έμμεσων προσεγγίσεων. Για να επιβεβαιωθεί έμμεσα η ανοσογονικότητα αξιολογούνται κυρίως κρίσιμα ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως η συσσωμάτωση και οι προσμίξεις, με τις αναλυτικές μεθόδους που εφαρμόζονται να είναι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) για προσδιορισμό συσσωμάτωσης και ανοσοενζυμικές μέθοδοι όπως η ELISA για τις προσμίξεις. Η ανοσογονικότητα αξιολογείται άμεσα μέσω δοκιμασιών ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι φαρμάκου (ADA assays) μέσω της τεχνικής της ELISA.

Πίνακας 4: Πίνακας συσχέτισης CQAs και αναλυτικών τεχνικών.

Κρίσιμο ποιοτικό χαρακτηριστικό CQA	Υποκατηγορία CQA	Αναλυτική τεχνική
Ταυτότητα (Identity)	<i>Πρωτοταγής δομή</i>	<i>LC-MS/MS, CE-MS, MALDI-MSD</i>
	<i>Ανώτερη δομή (HOS)</i>	<i>CD, IR, FTIR, NMR, MALS HDX-MS</i>
Καθαρότητα & Προσμίξεις (Purity & Impurities)	<i>Παραλλαγές μεγέθους</i>	<i>SEC, CE-SDS, SDS-PAGE</i>
	<i>Παραλλαγές φορτίου</i>	<i>IEX, cIEF</i>
	<i>Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις</i>	<i>RPLC, HILIC-MS, LC-MS/MS</i>
	<i>Συσσωμάτωση</i>	<i>SEC, CE-SDS</i>
Δομική ακεραιότητα (Structural Integrity)	<i>Ανώτερη δομή (HOS)</i>	<i>CD, IR, FTIR, NMR, MALS HDX-MS, SPR, BLI</i>
	<i>Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις</i>	<i>RPLC, HILIC-MS, LC-MS/MS</i>
	<i>Συσσωμάτωση</i>	<i>SEC, CE-SDS</i>
Σταθερότητα (Stability)	<i>Αποαμίδωση</i>	<i>IEX, CZE, LC-MS, SPR, BLI</i>
	<i>Οξείδωση</i>	<i>RP-LC, LC-MS, SPR, BLI</i>
	<i>Γλυκοζυλίωση</i>	<i>HILIC, LC-MS, SPR, BLI</i>
	<i>Πρωτεολυτικός κατακερματισμός</i>	<i>SEC, CGE-SDS</i>
	<i>Συσσωμάτωση</i>	<i>FTIR, SEC</i>

	<i>Καθίζηση</i>	<i>SEC</i>
	<i>Αποδιάταξη</i>	<i>CD, FTIR</i>
Βιολογική δραστηριότητα (Potency)	<i>Δοκιμασίες σύνδεσης</i>	<i>ELISA, SPR, BLI, EIS, SPCE</i>
	<i>Λειτουργικές δοκιμασίες</i>	<i>Κυτταρικές δοκιμές (Cell-based assays)</i>
Ανοσογονικότητα (Immunogenicity)	<i>Συσσωμάτωση</i>	<i>SEC</i>
	<i>Προσμίξεις-αντισώματα έναντι φαρμάκου (ADA)</i>	<i>SEC, ELISA</i>

7.ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ρύθμιση των θεραπευτικών πρωτεϊνών και γενικότερα των βιοφαρμακευτικών προϊόντων είναι θεμέλιος πυλώνας προκειμένου να διατηρούνται σταθερά τα χαρακτηριστικά ποιότητας και να εξασφαλίζεται η ασφαλής και αποτελεσματική χορήγησή τους στους ασθενείς. Λόγω της εγγενούς πολυπλοκότητας των βιολογικών μορίων και της ευαισθησίας τους στις συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης, απαιτείται ένα αυστηρά καθορισμένο και διεθνώς εναρμονισμένο ρυθμιστικό πλαίσιο που καλύπτει ολόκληρο τον κύκλο ζωής προϊόντος, από την ανάπτυξη έως τη φαρμακοεπαγρύπνηση (Food and Drug Administration, 2011; Ter Horst et al., 2021).

7.2 ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Η ρύθμιση και η αξιολόγηση των βιολογικών φαρμάκων επιτυγχάνεται μέσω διεθνών οργανισμών όπως ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA), ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) και το Διεθνές Συμβούλιο για την εναρμόνιση των τεχνικών απαιτήσεων για τα φαρμακευτικά προϊόντα για ανθρώπινη χρήση (ICH).

Ο EMA αποτελεί τον βασικότερο ευρωπαϊκό οργανισμό που αξιολογεί, εποπτεύει, παρακολουθεί και παράλληλα εγκρίνει τα διάφορα βιοφαρμακευτικά προϊόντα. Για αδειοδότηση απαιτείται πλήρης χαρακτηρισμός προϊόντος, συμμόρφωση του με ορθές πρακτικές παραγωγής (GMP) καθώς επίσης και έλεγχος ανοσογονικότητας και σταθερότητας (EMA, 2019).

Ο FDA αποτελεί μια κρατική υπηρεσία των Ηνωμένων Πολιτειών, που σκοπό της έχει την διαφύλαξη της δημόσιας υγείας διαμέσω αξιολόγησης, ρύθμισης και μετέπειτα αδειοδότησης των βιολογικών φαρμάκων. Απαιτείται προσοχή κατά την παραγωγή,

έλεγχος των κρίσιμων ποιοτικών χαρακτηριστικών καθώς επίσης και συνεχής έλεγχος αφότου κυκλοφορήσει ένα προϊόν (Food and Drug Administration, 2011).

Το ICH αποτελεί ένα διεθνές συμβούλιο που συνδέει τις ρυθμιστικές αρχές με τη φαρμακοβιομηχανία θέτοντας ως στόχο την ανάπτυξη τεχνικών προτύπων ποιότητας διασφαλίζοντας την σωστή ανάπτυξη, την έγκριση, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα για τα φαρμακευτικά προϊόντα (VanDuyse et al., 2021).

7.3 ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ICH ΓΙΑ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Οι κατευθυντήριες οδηγίες ICH χαρακτηρίζονται ως ο πυλώνας για το ρυθμιστικό πλαίσιο των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Η σημασία των κατευθυντήριων οδηγιών είναι αυξημένη κυρίως όσον αφορά τα βιολογικά φάρμακα, καθώς πρόκειται για προϊόντα με υψηλή δομική πολυπλοκότητα, ετερογένεια και αυξημένη ευαισθησία σε μεταβολές της παραγωγικής διαδικασίας (ICH, 1998).

Η σειρά κατευθυντήριων οδηγιών ICH Q1 αποτελεί το βασικό διεθνές ρυθμιστικό πλαίσιο για την αξιολόγηση της σταθερότητας φαρμακευτικών προϊόντων και ουσιών. Οι οδηγίες αυτές, οι οποίες εκδόθηκαν από τον ICH, βασίζονται σε μια επιστημονικά τεκμηριωμένη και προσανατολισμένη στον κίνδυνο προσέγγιση, αποσκοπώντας στη διατήρηση υψηλού επιπέδου ποιότητας και στην εξασφάλιση της ασφάλειας και της κλινικής απόδοσης των φαρμακευτικών προϊόντων κατά τη συνολική πορεία τους, από τον σχεδιασμό και την παραγωγή έως τη διάθεσή τους. Παράλληλα, έχουν σχεδιαστεί με τρόπο που επιτρέπει την ευρεία εφαρμογή τους σε διεθνές επίπεδο, διευκολύνοντας την εναρμόνιση των ρυθμιστικών απαιτήσεων μεταξύ διαφορετικών χωρών και οργανισμών.

Η θεμελιώδης οδηγία της σειράς είναι η ICH Q1A(R2), η οποία καθορίζει τις γενικές αρχές σχεδιασμού και αξιολόγησης μελετών σταθερότητας για φαρμακευτικές ουσίες και τελικά προϊόντα. Η οδηγία αυτή επικεντρώνεται σε τέσσερις βασικούς άξονες: την επιλογή των κατάλληλων παρτίδων για μελέτη, τον σχεδιασμό των πρωτοκόλλων σταθερότητας, την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τις απαιτήσεις συνεχούς παρακολούθησης της σταθερότητας. Ειδικότερα, παρέχονται λεπτομερείς οδηγίες σχετικά με την επιλογή αντιπροσωπευτικών παρτίδων παραγωγής, τις συνθήκες αποθήκευσης, τα συστήματα συσκευασίας και τον σχεδιασμό μακροχρόνιων, ενδιάμεσων και επιταχυνόμενων μελετών σταθερότητας. Επιπλέον, περιγράφονται οι απαιτήσεις για δοκιμές άγχους, η αξιολόγηση σημαντικών μεταβολών στα χαρακτηριστικά του προϊόντος και η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων σταθερότητας (Food and Drug Administration, 2004).

Η ICH Q1A(R2) αφορά κυρίως συμβατικά φαρμακευτικά προϊόντα μικρού μοριακού βάρους, ενώ οι υπόλοιπες οδηγίες της σειράς Q1 αναπτύχθηκαν συμπληρωματικά για

την κάλυψη ειδικότερων ζητημάτων. Η οδηγία ICH Q1B εστιάζει στη φωτοσταθερότητα (Baertschi et al., 2010), παρέχοντας κατευθυντήριες γραμμές με απώτερο σκοπό να αξιολογηθεί η επιρροή της έκθεσης στο φως στη σταθερότητα νέων φαρμακευτικών ουσιών και προϊόντων. Αντίστοιχα, η ICH Q1C επεκτείνει την εφαρμογή της κατευθυντήριας οδηγίας Q1A(R2) σε νέες φαρμακοτεχνικές μορφές διαφορετικής δοσολογίας, ενώ η ICH Q1D εισάγει τις στρατηγικές bracketing και matrixing, οι οποίες επιτρέπουν τη μείωση του αριθμού των απαιτούμενων δειγμάτων και δοκιμών μέσω στατιστικά τεκμηριωμένων προσεγγίσεων (Food and Drug Administration, 2003). Επιπλέον, η οδηγία ICH Q1E παρέχει οδηγίες σχετικά με την αξιολόγηση και ερμηνεία των δεδομένων σταθερότητας, καθώς και με τη χρήση στατιστικών μεθόδων για την εκτίμηση της διάρκειας ζωής των προϊόντων (Food and Drug Administration, 2004). Η οδηγία ICH Q1F, η οποία αφορούσε κλιματικές ζώνες III και IV, αποσύρθηκε το 2006, με τις σχετικές απαιτήσεις να ενσωματώνονται σε περιφερειακές κατευθυντήριες οδηγίες και οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO).

Παρότι οι οδηγίες της σειράς ICH Q1 σχεδιάστηκαν αρχικά για μικρομοριακά φάρμακα, εφαρμόζονται και στα βιοφαρμακευτικά προϊόντα. Ωστόσο, τα βιολογικά φάρμακα και τα συμβατικά χημικά φάρμακα παρουσιάζουν μεταξύ τους ουσιώδεις διαφορές, γεγονός που καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη εξειδικευμένων κατευθυντήριων οδηγιών. Τα μικρομοριακά φάρμακα χαρακτηρίζονται συνήθως από σαφώς καθορισμένη χημική δομή, σχετικά απλές προσμίξεις και καλά τεκμηριωμένες αναλυτικές μεθόδους. Αντίθετα, τα βιοφαρμακευτικά προϊόντα αποτελούν εξαιρετικά πολύπλοκα μακρομόρια, τα οποία παράγονται σε ζωντανά κύτταρα και εμφανίζουν σημαντική δομική και λειτουργική ετερογένεια. Η παραγωγική διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε παρουσία προσμίξεων που σχετίζονται με το προϊόν ή τη διαδικασία, ενώ παράλληλα τα βιολογικά προϊόντα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το φως, η οξείδωση και οι μηχανικές καταπονήσεις. Επιπλέον, η πιθανότητα βιολογικής επιμόλυνσης είναι σημαντικά αυξημένη λόγω της χρήσης κυτταρικών συστημάτων παραγωγής.

Οι ιδιαιτερότητες αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη της οδηγίας ICH Q5C, η οποία αφορά ειδικά τη σταθερότητα βιοτεχνολογικών και βιολογικών προϊόντων. Η οδηγία εφαρμόζεται κυρίως σε καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες. Εφαρμόζεται επιπλέον σε πολυπεπίδια που προέρχονται από κυτταρικά συστήματα, από ιστούς ή βιολογικά υγρά και καθορίζει τις απαιτήσεις για τον σχεδιασμό και την αξιολόγηση μελετών σταθερότητας βιοφαρμάκων. Σύμφωνα με την ICH Q5C, η αξιολόγηση της σταθερότητας δεν περιορίζεται μόνο σε φυσικοχημικές δοκιμές, αλλά περιλαμβάνει επίσης τη βιολογική δραστηριότητα, τις μεταβολές της καθαρότητας, τις δομικές αλλοιώσεις και την εμφάνιση συσσωματωμάτων. Η συγκεκριμένη οδηγία δίνει ιδιαίτερη έμφαση στον αναλυτικό χαρακτηρισμό των βιοφαρμάκων, καθώς η σταθερότητα ενός βιολογικού προϊόντος συνιστά ένα χαρακτηριστικό άμεσα

σχετιζόμενο με την ταυτότητα, τον βαθμό καθαρότητας και τη λειτουργική απόδοση του. Για τον προσδιορισμό της βιολογικής δραστηριότητας προτείνονται κυτταρικές βιοδοκιμές και ανοσοενζυμικές μέθοδοι, όπως οι δοκιμασίες ELISA, ενώ για την παρακολούθηση της καθαρότητας και των παραλλαγών μεγέθους χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC-HPLC), η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση CE-SDS. Η SEC-HPLC θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική για την ανίχνευση συσσωματωμάτων υψηλού μοριακού βάρους, τα οποία σχετίζονται με μειωμένη σταθερότητα και αυξημένο κίνδυνο ανοσογονικότητας. Παράλληλα, τεχνικές όπως η χρωματογραφία ιονανταλλαγής και η ισοηλεκτρική εστίαση χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση παραλλαγών φορτίου, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν τη βιολογική λειτουργία και τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά των πρωτεϊνών.

Εκτός από τον φυσικοχημικό και βιολογικό χαρακτηρισμό, η ICH Q5C συνιστά τη συστηματική παρακολούθηση της εμφάνισης, της συγκέντρωσης πρωτεΐνης και των πιθανών μεταβολών στη δομή των προϊόντων κατά την αποθήκευση (ICH, 1998). Η εφαρμογή ολοκληρωμένων προγραμμάτων σταθερότητας αποτελεί κρίσιμο στοιχείο για να διασφαλιστεί η ποιότητα των βιοφαρμάκων και να τεκμηριωθεί η διάρκεια ζωής και οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης των προϊόντων αυτών.

Πίνακας 5: Κατευθυντήριες οδηγίες ICH για σταθερότητα φαρμάκου (Auclair & Rathore, 2023).

ICH Code	Guideline Title
Q1A(R2)	Stability Testing of New Drug Substances and Products
Q1B	Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products
Q1C	Stability Testing for New Dosage Forms
Q1D	Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products
Q1E	Evaluation of Stability Data
Q1F	Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV*
Q5C	Stability testing of Biotechnological/Biological Products

Επιπρόσθετα των οδηγιών που αναφέρθηκαν παραπάνω και σχετίζονται με την σταθερότητα, κυρίαρχο ρόλο στο ρυθμιστικό πλαίσιο διαδραματίζουν και οι ακόλουθες κατευθυντήριες οδηγίες: ICH Q5E, Q6B, Q8, Q9 και Q10 συμβάλλοντας στον αναλυτικό χαρακτηρισμό, στην συγκρισιμότητα, στο σχεδιασμό της παραγωγικής διαδικασίας καθώς και στη διαχείριση ποιότητας (ICH, 1998; Haddad & Greene, 2019; Ter Horst et al., 2021; VanDuyse et al., 2021).

Η κατευθυντήρια οδηγία ICH Q5E αναφέρεται σε μελέτες συγκρισιμότητας όσον αφορά αλλαγές στο κομμάτι της παραγωγικής διαδικασίας. Αν αναλογιστεί κανείς πως ακόμα και μηδαμινές μεταβολές στις συνθήκες, στην αποθήκευση ή στην επεξεργασία μπορούν να επιδράσουν στα CQAs, η παρούσα οδηγία συνδυάζεται με συγκρίσεις φυσικοχημικές και βιολογικές με τρόπο που να αποδεικνύεται πως δεν επηρεάζεται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του υπό μελέτη προϊόντος.

Επιπλέον η οδηγία ICH Q6B σχετίζεται με προδιαγραφές ποιότητας των βιοτεχνολογικών προϊόντων, ορίζοντας μάλιστα χαρακτηριστικά όπως η ταυτότητα, η καθαρότητα, η ακεραιότητα και η βιολογική δραστηριότητα θεραπευτικών πρωτεϊνών (ICH, 1999). Αναγκαία κρίνεται επίσης η παρακολούθηση ορισμένων περαιτέρω παραμέτρων (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, παραλλαγές στο φορτίο και στο μέγεθος, παρουσία προσμίξεων και δημιουργία συσσωματωμάτων).

Οι αρχές του Quality by Design (QbD) συνδράμουν στην ανάπτυξη βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Αρχές που έχουν στηριχθεί στην οδηγία ICH Q8, μέσω της οποίας γίνεται αντιληπτή η σχέση μεταξύ των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας, των κρίσιμων παραμέτρων διεργασίας (Critical Process Parameters, CPPs) και των χαρακτηριστικών των πρώτων υλών ή των ενδιάμεσων προϊόντων. Μέσω της εφαρμογή του QbD επιτυγχάνεται καλύτερος έλεγχος παραγωγικής διαδικασίας, ελάττωση της μεταβλητότητας και αύξηση της αναπαραγωγιμότητας και της αξιοπιστίας των βιοφαρμακευτικών προϊόντων.

Η κατευθυντήρια οδηγία ICH Q9 είναι συμπληρωματική της ICH Q8 και αναφέρεται στη διαχείριση κινδύνου ποιότητας (quality risk management). Πιο συγκεκριμένα αφορά την συστηματική αναγνώριση, την αξιολόγηση και τον έλεγχο δυνητικών κινδύνων, σχετιζόμενων με την ποιότητα. Αποτελεί μια οδηγία ιδιαίτερα κρίσιμη λόγω της αυξημένης πολυπλοκότητας και ευαισθησίας στα διάφορα στάδια παραγωγής και αποθήκευσης ενός προϊόντος.

Η κατευθυντήρια οδηγία ICH Q10 αφορά το φαρμακευτικό σύστημα ποιότητας το οποίο αφορά τον κύκλο ζωής ενός προϊόντος, από το στάδιο της ανάπτυξης, της παραγωγής μέχρι και την αξιολόγηση και παρακολούθηση μετά την κυκλοφορία του. Μάλιστα μέσω της συγκεκριμένης οδηγίας προωθείται η απόδοση των διαδικασιών και η διατήρηση σταθερότητας στην ποιότητα ενός προϊόντος.

Συνολικά λοιπόν, οι κατευθυντήριες οδηγίες ICH αποτελούν θεμελιώδεις και αναπόσπαστο κομμάτι της ρυθμιστικής προσέγγισης στον ποιοτικό έλεγχο των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Μέσω της εφαρμογής τους επιτυγχάνεται αξιολόγηση παραμέτρων σημαντικών όπως η διατήρηση των απαιτούμενων προτύπων ποιότητας, η ασφαλής χρήση και η θεραπευτική απόδοση των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Ταυτοχρόνως, διασφαλίζεται η εναρμόνιση των διεθνών κανονιστικών απαιτήσεων και εξασφαλίζονται υψηλά πρότυπα παραγωγής και ελέγχου ποιότητας.

7.4 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Αναφορικά με τον ποιοτικό έλεγχο βιοφαρμακευτικών προϊόντων, η επικύρωση αναλυτικών μεθόδων, αποτελεί απαραίτητη διαδικασία καθώς επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Μέσω των ρυθμιστικών αρχών επιβεβαιώνεται η αναπαραγωγιμότητα και η αξιοπιστία των δεδομένων όσον αφορά το στάδιο της ανάπτυξης, της έγκρισης και μετέπειτα της κυκλοφορίας των φαρμακευτικών προϊόντων (Limpikirati et al., 2024).

Το διεθνές ρυθμιστικό πλαίσιο όσον αφορά την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων στηρίζεται κυρίως στις ακόλουθες κατευθυντήριες οδηγίες ICH Q2(R2) και ICH Q14. Η ICH Q2(R2) αναφέρεται στις βασικές παραμέτρους επικύρωσης συμπεριλαμβάνοντας τις έννοιες της γραμμικότητας (linearity), της ειδικότητας (specificity), της ακρίβειας (accuracy), της επαναληψιμότητας (precision), της ανθεκτικότητας (robustness) και του ορίου ανίχνευσης (LOD) και ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) (Cassidy et al., 2025).

Αντίστοιχα, η οδηγία ICH Q14 αφορά μια πιο ολοκληρωμένη και πιο σύγχρονη προσέγγιση, βασιζόμενη στον κύκλο ζωής, με τρόπο που η επικύρωση αναλύεται σαν ένα μέρος μιας διαδικασίας ελέγχου και βελτιστοποίησης (Cassidy et al., 2025). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την ICH Q14 απαιτείται καθορισμός του αναλυτικού προφίλ στόχου, πλήρης προσδιορισμός κρίσιμων παραμέτρων για να επιτευχθεί κατανόηση της διεργασίας και τέλος συνεχής παρακολούθηση με σκοπό την επιβεβαίωση της απόδοσης ενός φαρμάκου με την πάροδο των χρόνων.

Συνολικά, ο συνδυασμός των ICH Q2(R2) και ICH Q14 περιορίζει το ρίσκο ανάλυσης ενώ παράλληλα ενισχύει τις ρυθμιστικές εγκρίσεις και εγγυάται πως ο ποιοτικός έλεγχος των θεραπευτικών πρωτεϊνών συνάδει με τα διεθνή πρότυπα ασφάλειας (Cassidy et al., 2025).

7.5 ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ QUALITY BY DESIGN (QbD)

Η QbD στις θεραπευτικές πρωτεΐνες πρόκειται για ένα πλαίσιο ανάπτυξης που εστιάζει στην ενσωμάτωση ποιότητας από το στάδιο του σχεδιασμού καθορίζοντας τα πρότυπα ποιότητας και ελέγχοντας τα προϊόντα, διαχειρίζοντας τον κίνδυνο ποιότητας. Οι αρχές της QbD αξιοποιούνται συστηματικά στην φαρμακευτική ανάπτυξη. Πρόκειται για μια προσέγγιση που έχει προωθηθεί από τον FDA και έχει ενσωματωθεί πλήρως στις κατευθυντήριες γραμμές ICH. Συγκεκριμένα η QbD βασίζεται κυρίως στο τρίπτυχο των ακόλουθων κατευθυντήριων οδηγιών: ICH Q8 (φαρμακευτική ανάπτυξη), ICH Q9 (διαχείριση κινδύνου ποιότητας) και ICH Q11 (ανάπτυξη και παρασκευή

φαρμακευτικών ουσιών). Θεμελιώδης αρχή της QbD είναι ο έλεγχος του προϊόντος όχι μόνο στο τελικό στάδιο αλλά και κατά τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη της διαδικασίας παραγωγής. Η QbD εφαρμόζει μια προσέγγιση στο σχεδιασμό και στην ανάπτυξη προϊόντων, ενισχύοντας παραμέτρους όπως η ικανότητα ανάπτυξης, η ταχύτητα, η αποδοτικότητα και ο σχεδιασμός σκευασμάτων, εντοπίζοντας μάλιστα αποτυχίες στην παραγωγική διαδικασία (Yu et al., 2014). Μέσω της εφαρμογής της QbD επιτυγχάνεται ευελιξία και ασφάλεια στο στάδιο της παραγωγής, με μειωμένα ποσοστά αποτυχίας και διασφάλιση σταθερότητας στην ποιότητα. Περιλαμβάνει 1) ένα προφίλ προϊόντος-στόχου ποιότητας (QTPP) που προσδιορίζει τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας (CQAs) του φαρμακευτικού προϊόντος, 2) σχεδιασμό και κατανόηση προϊόντος, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού των κρίσιμων χαρακτηριστικών υλικού (CMAs), 3) σχεδιασμό και κατανόηση διαδικασίας, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού των κρίσιμων παραμέτρων διαδικασίας (CPPs), συνδέοντας τα CMAs και τα CPPs με τα CQAs, 4) μια στρατηγική ελέγχου (control strategy) που περιλαμβάνει προδιαγραφές για την φαρμακευτική ουσία, το έκδοχο και το φαρμακευτικό προϊόν, καθώς και ελέγχους για κάθε βήμα της διαδικασίας παρασκευής και 5) ικανότητα διαδικασίας και συνεχής βελτίωση (Yu et al., 2014). Η QbD απαιτεί κατανόηση των διαδικασιών και των προϊόντων που ενσωματώνουν την επιστήμη και τη διαχείριση του κινδύνου ποιότητας (QRM). Στην προσέγγιση QbD, το προφίλ προϊόντος-στόχου ποιότητας (QTPP), τα CQAs, οι κρίσιμες παράμετροι διαδικασίας (CPPs) και τα κρίσιμα χαρακτηριστικά υλικού (CMAs) ορίζονται και αξιολογούνται με βάση τους κινδύνους ποιότητας. Η φιλοσοφία QbD είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την PAT και την RTRT, επιτρέποντας τη συνεχή παρακολούθηση και τον προληπτικό έλεγχο της παραγωγής. Συμπερασματικά λοιπόν, η ενσωμάτωση της QbD στην ανάπτυξη θεραπευτικών πρωτεϊνών συνεισφέρει αποτελεσματικά στην βαθύτερη επιστημονική κατανόηση, περιορίζει σε σημαντικό βαθμό το ποσοστό αποτυχίας των παρτίδων (batch failures) και ταυτοχρόνως διασφαλίζει τη σταθερότητα της θεραπευτικής δράσης. Εν ολίγοις, πρόκειται για το θεμέλιο λίθο του σύγχρονου ρυθμιστικού ελέγχου.

7.6 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ (QUALITY RISK MANAGEMENT, QRM)

Η παραγωγή και ο έλεγχος ποιότητας στις θεραπευτικές πρωτεΐνες, εμφανίζουν μεγάλη πολυπλοκότητα λόγω της ετερογένειας ως προς την δομή. Η παραγωγική διαδικασία επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, καθώς ακόμα και μικρές αλλαγές στο στάδιο της παραγωγής μπορούν να τροποποιήσουν τα CQAs (πχ μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συσσωμάτωση, βιολογική δραστηριότητα). Επομένως, κρίνεται αναγκαίο να αξιολογούνται και να εντοπίζονται οι πιθανοί κίνδυνοι προκειμένου να εξασφαλίζεται η υψηλού επιπέδου ποιότητας και η ελαχιστοποίηση πιθανών κινδύνων που σχετίζονται με την ασφάλειά του.

Η διαχείριση κινδύνου ποιότητας (quality risk management, QRM) αποτελεί την πλέον θεμελιώδη διαδικασία που στοχεύει στον εντοπισμό, στον έλεγχο και στην αξιολόγηση των κινδύνων που προκύπτουν. Η διαχείριση κινδύνου ποιότητας συμπεριλαμβάνεται στην κατευθυντήρια οδηγία ICH Q9 που αποτελεί μάλιστα διεθνές πρότυπο για διαχείριση κινδύνων.

Η διαδικασία QRM περιλαμβάνει τέσσερα στάδια, πρωταρχικά την αξιολόγηση-αναγνώριση κινδύνου, ακολούθως τον έλεγχο κινδύνου, την ανασκόπηση κινδύνου και τέλος την επικοινωνία κινδύνου. Μέσω της αξιολόγησης κινδύνου αξιολογείται η πιθανότητα εμφάνισης ενός κινδύνου, οι συνέπειες και η σοβαρότητα τους καθώς επίσης και η δυνατότητα να ανιχνευθούν άμεσα. Στο στάδιο του ελέγχου κινδύνου, αξιολογείται ο κίνδυνος και κατά πόσο μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτός ή απορριπτέος σε περίπτωση που μπορούν να ληφθούν μέτρα για περιορισμό κινδύνου. Σε επόμενο στάδιο, μέσω ανασκόπησης κινδύνου γίνεται επανεκτίμηση των αποτελεσμάτων των μέτρων ελέγχου και ταυτόχρονα ελέγχονται πιθανοί νέοι κίνδυνοι που μπορεί να επέλθουν. Στο τελικό στάδιο της QRM, δίνονται πληροφορίες για τους κινδύνους στους διάφορους εμπλεκόμενους.

Για την υλοποίηση και την πρακτική εφαρμογή της QRM γίνεται χρήση διαφόρων εργαλείων ποιοτικής ανάλυσης, κατάταξης και καταγιγισμού ιδεών, όπως το FMEA (Failure Mode and Effects Analysis), το HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) και το FTA (Fault Tree Analysis) που αποσκοπούν στην ποιοτική ή ποσοτική αξιολόγηση των πιθανών κινδύνων.

Αναφορικά με την εφαρμογή τους στις θεραπευτικές πρωτεΐνες, η QRM βοηθά στον προσδιορισμό CQAs, CPPs και CMAs. Η QRM αξιολογώντας την πιθανότητα κινδύνου αξιολογεί παράλληλα τους διάφορους παράγοντες που επιδρούν στη σταθερότητα, στην δομή, στην ανοσογονικότητα και στην βιολογική δραστηριότητα ενός προϊόντος, αναπτύσσοντας έτσι στρατηγικές ελέγχου με σκοπό την διασφάλιση σταθερότητας στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος. Αξίζει να σημειωθεί πως η QRM συνδέεται άρρηκτα με την QbD. Η QRM συνολικά βελτιώνει την διαδικασία αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα, την αξιοπιστία, την σταθερότητα και την απόδοση, εξαλείφοντας μάλιστα αποτυχίες και αποκλίσεις στην παραγωγική διαδικασία με συνέπεια την διασφάλιση των απαιτούμενων προτύπων ποιότητας για τα θεραπευτικά αντισώματα. Γι' αυτό λοιπόν, ρυθμιστικές αρχές όπως ο FDA, ο EMA και το ICH εφαρμόζουν την συγκεκριμένη προσέγγιση καθόλη την διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας. Επομένως η QRM αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του σύγχρονου ρυθμιστικού πλαισίου όσον αφορά τις θεραπευτικές πρωτεΐνες.

7.7 ΣΥΓΚΡΙΣΙΜΟΤΗΤΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (COMPARABILITY ASSESSMENT)

Οι θεραπευτικές πρωτεΐνες αποτελούν πολύπλοκα βιολογικά προϊόντα των οποίων τα διάφορα CQAs μπορούν να επηρεαστούν ακόμα και από μικρές τροποποιήσεις στο στάδιο της παραγωγής. Η αξιολόγηση συγκρισιμότητας (comparability assessment) είναι μια θεμελιώδης διαδικασία της σύγχρονης βιοφαρμακευτικής ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για μια διαδικασία αξιολόγησης ενός προϊόντος που έχει υποστεί διάφορες τροποποιήσεις, στα στάδια της παραγωγής ή της επεξεργασίας ή της σύνθεσης, με το αρχικό προϊόν, εξετάζοντας κατά πόσο έχει επηρεαστεί και κατά πόσο διαφέρουν παράγοντες όπως ασφάλεια, αποτελεσματικότητα και ποιότητα (Food and Drug Administration, 2005).

Η κατευθυντήρια οδηγία για την συγκρισιμότητα είναι η ICH Q5E που έχει δημοσιευθεί από το ICH και χρησιμοποιείται από τον EMA και τον FDA. Η αξιολόγηση συγκρισιμότητας εφαρμόζεται σε διάφορες περιπτώσεις όπως σε αλλαγές κυτταρικής σειράς, αλλαγές στη διαδικασία καλλιέργειας, αλλαγές σε διεργασίες καθαρισμού, σύνθεσης ή συσκευασίας. Αξίζει να αναφερθεί πως η συγκρισιμότητα αξιολογεί το ποσοστό που επηρεάζονται τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας, όπως η ταυτότητα, η ανώτερη δομή, οι παραλλαγές μεγέθους και φορτίου καθώς και η βιολογική δραστηριότητα, από τις αλλαγές στην παραγωγική διαδικασία. Η εξέλιξη των αναλυτικών μεθόδων και κυρίως της φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-HRMS) έχει συμβάλει σημαντικά στην επιτάχυνση της ανίχνευσης μικρών διαφοροποιήσεων μεταξύ των υπό σύγκριση προϊόντων (Beck et al., 2015).

Επομένως, η αξιολόγηση συγκρισιμότητας είναι μια διαδικασία πυλώνας για την διασφάλιση ποιότητας καθώς επίσης και για την εξασφάλιση ασφάλειας και αποτελεσματικότητας στις θεραπευτικές πρωτεΐνες.

7.8 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ (QUALITY SPECIFICATIONS)

Οι προδιαγραφές ποιότητας (quality specifications) χαρακτηρίζονται σαν προκαθορισμένα κριτήρια, αναλυτικές διαδικασίες και κριτήρια αποδοχής τα οποία πρέπει να πληρούνται σε ένα βιοφαρμακευτικό προϊόν ώστε αυτό το προϊόν να θεωρηθεί κατάλληλο για χρήση, πριν την διάθεση του στην αγορά (ICH, 1998). Για την ακρίβεια αποτελούν το επίσημο πλαίσιο αποδοχής ανάμεσα στον κατασκευαστή ενός προϊόντος και τις αρμόδιες ρυθμιστικές αρχές, διασφαλίζοντας την ποιότητα. Εφαρμόζονται με σκοπό την συμμόρφωση με τα πρότυπα ποιότητας, αποτελεσματικότητας και ασφάλειας (ICH, 1998).

Η ανάπτυξη προδιαγραφών ποιότητας απαιτεί ενδελεχή γνώση ενός προϊόντος καθώς και των CQAs και των σταδίων παραγωγής. Τα κριτήρια τα οποία αξιοποιούνται για

να επιλεχθούν οι προδιαγραφές είναι οι μελέτες σταθερότητας, τα δεδομένα που χαρακτηρίζουν ένα προϊόν, τα δεδομένα που αποκτώνται από τις παρτίδες ανάπτυξης και παραγωγής καθώς και η αξιολόγηση δυνητικών κινδύνων που μπορούν να επέλθουν επηρεάζοντας αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του τελικού προϊόντος.

Αναφορικά με τις θεραπευτικές πρωτεΐνες οι προδιαγραφές ποιότητας απαιτούν ελέγχους ταυτότητας, καθαρότητας-προσμίξεων, περιεκτικότητας, παραλλαγών μεγέθους και φορτίου, γλυκοζυλίωσης, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, βιολογικής δραστηριότητας και σταθερότητας (ICH, 1998) , με τα αποδεκτά όρια να διαμορφώνονται σύμφωνα με τις απαιτήσεις που διατυπώνονται από τις ρυθμιστικές αρχές και με τις μεταβολές στην παραγωγική διαδικασία (Rathore & Winkle, 2009).

Επιπρόσθετα, η QbD επηρεάζει τον καθορισμό των προδιαγραφών προτύπων ποιότητας μέσω κατανόησης προϊόντος και διαχείρισης κινδύνων. Επομένως, οι προδιαγραφές ποιότητας είναι αποτέλεσμα συνδυασμού αξιολόγησης αναλυτικών, ρυθμιστικών και παραγωγικών δεδομένων διασφαλίζοντας σταθερή ποιότητα καθόλη τη διάρκεια κύκλου ζωής των θεραπευτικών πρωτεϊνών (Rathore & Winkle, 2009).

8. ΒΙΟΟΜΟΙΔΗ ΦΑΡΜΑΚΑ

8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια μέσω της ταχείας ανάπτυξης βιοτεχνολογικών φαρμάκων έχουν διευρυνθεί αρκετά οι θεραπείες πολλών χρόνιων και σοβαρών ασθενειών. Λόγω λήξης των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας που προάσπιζαν τα βιολογικά φάρμακα, αναπτύχθηκε μια καινοτόμος κατηγορία φαρμακευτικών προϊόντων, τα επονομαζόμενα ως βιοομοειδή (biosimilars).

8.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΒΙΟΟΜΟΙΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Στις αρχές του 2000, επήλθε λήξη των πατεντών που προστάτευαν τα βιολογικά φάρμακα. Πρώτη ρυθμιστική αρχή που αναφέρθηκε στα βιοομοειδή ήταν ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA), το 2004 όπου παρουσίασε τα βιοομοειδή ως ένα παρόμοιο αντίγραφο βιολογικού προϊόντος. Μια χρονιά αργότερα, η ίδια ρυθμιστική αρχή, αδειοδότησε τα βιοομοειδή μέσω ανάπτυξης ενός κανονιστικού πλαισίου και κατευθυντήριων γραμμών, καθώς οι ήδη υπάρχοντες γενικοί κανονισμοί για τα μικρομοριακά φάρμακα δεν εφάρμοζαν στην συγκεκριμένη κατηγορία (Knezevic & Griffiths, 2017; Schellekens et al., 2016). Το 2006 αποτέλεσε μια χρονιά ορόσημο καθώς πραγματοποιήθηκε η έγκριση από τον EMA του πρώτου βιοομοειδούς φαρμάκου στην Ευρώπη (Farhat et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για τη

σωματοτροπίνη, μια ανθρώπινη αυξητική ορμόνη, επονομαζόμενη ως Omnitrope. Στη συνέχεια το 2007 και το 2008 τα βιοομοειδή που έλαβαν έγκριση ήταν η ερυθροποιητίνη και η φιλγραστίνη αντίστοιχα (Nixon et al., 2018). Το έτος 2013, στην Ευρώπη έλαβε έγκριση το πρώτο βιοομοειδές μονοκλωνικό αντίσωμα (Nixon et al., 2018). Το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα αποτέλεσε η ινφλιξιμάμπη, ένα χημειοθεραπευτικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε διάφορες ασθένειες. Στην Ευρώπη μάλιστα, τα εγκεκριμένα βιοομοειδή είναι διπλάσια σε σύγκριση με τις ΗΠΑ. Αξίζει να ειπωθεί πως το πρώτο εγκεκριμένο βιοομοειδές (φιλγραστίνη) από τον FDA (Αμερικάνικος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων στις ΗΠΑ) χρονολογείται το 2015. Η αρχικά αργή ανάπτυξη στις ΗΠΑ εξελίχθηκε σε ραγδαία καθώς από το 2015 έως και μέχρι σήμερα έχουν λάβει έγκριση πάνω από 60 βιοομοειδή από τον FDA.

8.3 ΟΡΙΣΜΟΙ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Βιβλιογραφικά έχουν εμφανιστεί πολλές ονομασίες για να ορίσουν τα βιοομοειδή, με αποτέλεσμα να υπάρχει μια σύγχυση. Αναφορικά με τον όρο “follow-on biologics” που έχει χρησιμοποιηθεί για τα βιοομοειδή, δεν χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα εύστοχος καθώς μπορεί να υποδεικνύει βιολογικά φάρμακα 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς.

Ο ορισμός που έχει προέλθει από τον EMA για τα βιοομοειδή είναι ένα αντίγραφο πανομοιότυπο (όσον αφορά την δομή, την ασφάλεια, την βιολογική δράση και την αποτελεσματικότητα) και με ένα ήδη εγκεκριμένο βιολογικό φάρμακο, εφόσον έχει υποστεί ελέγχους συγκρισιμότητας (Declerck et al., 2017; Dorner & Kay, 2015).

Ο ορισμός που έχει δοθεί από τον FDA για τα βιοομοειδή είναι ένα παρόμοιο βιολογικό προϊόν με ένα προϋπάρχον προϊόν αναφοράς χωρίς αξιοσημείωτες κλινικές διαφορές κυρίως σύμφωνα με το επίπεδο ασφάλειας, την καθαρότητα, την απόδοση και την θεραπευτική δράση του (Cohen & Kay, 2017).

Ο WHO έχει ορίσει τα βιοομοειδή ως βιοθεραπευτικά προϊόντα (similar biotherapeutic product, SBP) που ομοιάζουν με εγκεκριμένα προϊόντα αναφοράς ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, τη θεραπευτική τους απόδοση και το προφίλ ασφάλειάς τους.

Ο ορισμός που έχει δοθεί από τον Health Canada για τα βιοομοειδή, είναι βιολογικά φάρμακα που έχουν ήδη εγκριθεί στον Καναδά και είναι παρόμοια με τα βιολογικά φάρμακα αναφοράς.

8.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Οι κατηγορίες βιολογικών φαρμάκων που έχει δοθεί έγκριση σε βιοομοειδές φάρμακο είναι ακολούθως οι πολυσακχαρίτες (ηπαρίνες χαμηλού μοριακού βάρους) και οι

πρωτεΐνες (μονοκλωνικά αντισώματα, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, πρωτεΐνες σύντηξης) (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Κατηγορίες βιολογικών φαρμάκων που έχει δοθεί έγκριση από ΕΕ σε ένα βιοομοειδές.

Κατηγορίες βιολογικών φαρμάκων	Υποκατηγορία	Βιοομοειδές εγκεκριμένο από ΕΕ
Πολυσακχαρίτες	Ηπαρίνες χαμηλού ΜΒ	Νατριούχος ενοξαπαρίνη
Πρωτεΐνες	Αυξητικοί παράγοντες	Εποετίνη/ Φιλγραστίμη/Πεγκφιλγραστίμη
	Ορμόνες	Ινσουλίνη/ Θυλακιοτροπίνη άλφα/ Σωματοτροπίνη
	Πρωτεΐνες σύντηξης	Ετανεрсέπτη
	Μονοκλωνικά αντισώματα	Ινφλιξιμάμπη/ Ριτουξιμάμπη/ Μπεβασιζουμάμπη/ Τραστουζουμάμπη

8.5 ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

8.5.1 ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ

Τα βιοομοειδή φαρμακευτικά προϊόντα αποτελούν μια κατηγορία βιολογικών θεραπειών που αναπτύσσονται μετά τη λήξη της πατέντας ενός ήδη εγκεκριμένου βιολογικού φαρμάκου. Σε γενικές γραμμές, μπορούν να θεωρηθούν ως το λειτουργικό ανάλογο των γενόσημων φαρμάκων για τα βιολογικά προϊόντα, αν και η επιστημονική και ρυθμιστική τους προσέγγιση διαφέρει σημαντικά λόγω της αυξημένης μοριακής πολυπλοκότητας των βιολογικών παραγόντων. Η έγκριση των βιοομοειδών πραγματοποιείται από διεθνείς ρυθμιστικούς οργανισμούς όπως ο FDA και ο EMA, οι οποίοι απαιτούν την τεκμηρίωση υψηλού βαθμού ομοιότητας με το προϊόν αναφοράς όσον αφορά παραμέτρους όπως η ποιότητα, το επίπεδο ασφάλειας και η κλινική απόδοση.

Τα γενόσημα φάρμακα, αποτελούν μικρά χημικά μόρια που αναπαράγουν με ακρίβεια τη δραστική ουσία του πρωτότυπου φαρμάκου. Η παραγωγή τους βασίζεται σε καθορισμένες διαδικασίες χημικής σύνθεσης, οι οποίες οδηγούν σε ιδιαίτερα προβλέψιμα και επαναλήψιμα προϊόντα. Λόγω της απλής και σαφώς καθορισμένης χημικής τους δομής, τα γενόσημα φάρμακα μπορούν να αναπαραχθούν ως σχεδόν πανομοιότυπα αντίγραφα του αρχικού προϊόντος. Τα φάρμακα αυτά περιέχουν το ίδιο δραστικό συστατικό, στην ίδια φαρμακοτεχνική μορφή και ισχύ, ενώ χορηγούνται μέσω της ίδιας οδού χορήγησης και προορίζονται για τις ίδιες θεραπευτικές ενδείξεις

με το φάρμακο αναφοράς. Επιπλέον, πρέπει να παρουσιάζουν παρόμοια φαρμακοκινητική συμπεριφορά, δηλαδή να απελευθερώνουν με τον ίδιο ρυθμό τη δραστική ουσία στον οργανισμό και στην ίδια έκταση, γεγονός που τεκμηριώνεται μέσω μελετών βιοϊσοδυναμίας.

Ακριβώς όπως συμβαίνει και με τα βιοομοειδή, έτσι και τα γενόσημα κυκλοφορούν μετά από όταν επέλθει λήξη του διπλώματος ευρεσιτεχνίας ενός αρχικού φαρμάκου. Ακόμα ένα κοινό γνώρισμα αποτελεί ο στόχος που είναι η αποτελεσματικότερη θεραπεία με όσο το δυνατόν μειωμένο κόστος, έχοντας μάλιστα την ίδια δραστηριότητα με το πρωτότυπο φάρμακο. Ο αυστηρός έλεγχος για την ποιότητα και για την ασφάλεια από ρυθμιστικούς οργανισμούς είναι ακόμα ένα κοινό χαρακτηριστικό των γενόσημων και των βιοομοειδών με την διαφοροποίηση πως στα γενόσημα η διαδικασία έγκρισης είναι πιο απλουστευποιημένη. Αξίζει να ειπωθεί πως τα διαφορετικά γνωρίσματα μεταξύ βιοομοειδών φαρμάκων και γενόσημων είναι ποικίλα.

Ένα στοιχείο που διαφοροποιεί τα βιοομοειδή από τα γενόσημα φάρμακα είναι η ανάγκη για εκτεταμένη συγκριτική αξιολόγηση πριν από την έγκρισή τους. Ενώ για τα γενόσημα φάρμακα απαιτούνται κυρίως μελέτες βιοϊσοδυναμίας σε υγιείς εθελοντές, η ανάπτυξη ενός βιοομοειδούς προϊόντος περιλαμβάνει ένα πολύ πιο σύνθετο πρόγραμμα αξιολόγησης. Αρχικά πραγματοποιείται εκτεταμένος αναλυτικός χαρακτηρισμός του μορίου, ώστε να αποδειχθεί η δομική και λειτουργική συνάφεια του έναντι του προϊόντος αναφοράς. Στη συνέχεια διεξάγονται συγκριτικές προκλινικές και κλινικές μελέτες, οι οποίες αξιολογούν το φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ, καθώς και τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του βιοομοειδούς προϊόντος.

Η ανοσογονικότητα συγκαταλέγεται στους παράγοντες αξιολόγησης των βιοομοειδών. Λόγω της πρωτεϊνικής φύσης των βιολογικών φαρμάκων, υπάρχει πιθανότητα το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς να αναγνωρίσει το θεραπευτικό μόριο ως ξένο και να αναπτύξει αντισώματα έναντι του φαρμάκου. Μέσω ανάπτυξης αντισωμάτων εναντίον του φαρμάκου, προκύπτουν ορισμένες κλινικές συνέπειες όπως μειωμένη αποτελεσματικότητα, μεταβολή φαρμακοκινητικής και εμφάνιση μη επιθυμητών ανοσολογικών αντιδράσεων. Το ανοσολογικό προφίλ θεμελιώνεται μέσω της διάρκειας, της οδού και της συχνότητας χορήγησης καθώς επίσης και από ορισμένα ατομικά ιδιαίτερα γνωρίσματα του ασθενούς. Μικρές δομικές διαφοροποιήσεις μεταξύ ενός βιοομοειδούς και του φαρμάκου αναφοράς (τροποποιήσεις στην 3D δομή, στην ύπαρξη συσσωματωμάτων και στη γλυκοζυλίωση) μπορεί να επηρεάσουν το επίπεδο ανοσογονικότητας, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την προσεκτική αξιολόγηση αυτού του παράγοντα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της κλινικής αξιολόγησης.

Οι διαφοροποιήσεις που εμφανίζονται μεταξύ των δύο κατηγοριών φαρμάκων είναι εμφανείς και στο επίπεδο της μοριακής δομής και της δομικής πολυπλοκότητας. Τα γενόσημα φάρμακα αποτελούνται συνήθως από σχετικά μικρά μόρια με μοριακό βάρος

της τάξης μερικών εκατοντάδων dalton, γεγονός που επιτρέπει την πλήρη χημική ταυτοποίησή τους και χαρακτηρίζονται από απλή και πλήρως καθορισμένη χημική δομή. Αντίθετα, τα βιομοειδή προϊόντα, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα, μπορεί να έχουν μοριακό βάρος που υπερβαίνει τα 150.000 dalton και χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά πολύπλοκη τρισδιάστατη δομή και πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Η πλήρης κατανόηση και ο χαρακτηρισμός αυτών των μορίων απαιτούν προηγμένες αναλυτικές τεχνικές υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης.

Επιπλέον, τα γενόσημα φάρμακα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό χημικής σταθερότητας, γεγονός που διευκολύνει την αποθήκευση και τη μεταφορά τους. Αντίθετα, τα βιομοειδή, όπως και τα πρωτότυπα βιολογικά φάρμακα, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η έκθεση στο φως και η μηχανική καταπόνηση. Για τον λόγο αυτό απαιτούν αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες αποθήκευσης και διακίνησης ώστε να διατηρείται η δομική τους ακεραιότητα και η βιολογική τους δραστικότητα.

Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται επίσης στη διαδικασία ανάπτυξης και στο οικονομικό κόστος παραγωγής των δύο κατηγοριών φαρμάκων. Η ανάπτυξη ενός γενόσημου φαρμάκου είναι σχετικά απλή και οικονομικά λιγότερο απαιτητική, καθώς βασίζεται κυρίως σε καθιερωμένες διαδικασίες χημικής σύνθεσης και σε περιορισμένο αριθμό κλινικών μελετών. Αντίθετα, η ανάπτυξη ενός βιομοειδούς προϊόντος είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα βιοτεχνολογική διαδικασία που απαιτεί σημαντικές επενδύσεις, λόγω της ανάγκης για εκτεταμένες αναλυτικές, προκλινικές και κλινικές μελέτες. Συχνά η διαδικασία ανάπτυξης ενός βιομοειδούς μπορεί να διαρκέσει αρκετά χρόνια πριν το προϊόν καταστεί διαθέσιμο στην αγορά. Συγκεκριμένα, ένα γενόσημο είναι διαθέσιμο στην αγορά σε χρονικό διάστημα 2-3 έτη ενώ τα βιομοειδή απαιτούν 7-8 έτη μέχρι να λάβουν έγκριση για κυκλοφορία.

Τέλος, μετά την έγκριση και την κυκλοφορία ενός βιομοειδούς φαρμάκου στην αγορά, απαιτείται συνεχής παρακολούθηση της ασφάλειας μέσω συστημάτων φαρμακοεπαγρύπνησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόζονται και πρόσθετες μελέτες μετά την κυκλοφορία του προϊόντος, με στόχο την ενδελεχέστερη αποσαφήνιση του προφίλ ασφάλειας και της θεραπευτικής δράσης του φαρμάκου σε πραγματικές συνθήκες κλινικής χρήσης. Η διαδικασία αυτή συνοδεύεται συχνά από την εφαρμογή ειδικών σχεδίων διαχείρισης κινδύνου, τα οποία στοχεύουν στην εξασφάλιση της ασφαλούς χρήσης των βιομοειδών θεραπειών.

Ένα επιπλέον ζήτημα που σχετίζεται με τα βιομοειδή αφορά την κατανόηση και αποδοχή τους από επαγγελματίες υγείας και ασθενείς. Σε αρκετές περιπτώσεις, τα βιομοειδή συγχέονται με τα γενόσημα φάρμακα, γεγονός που οφείλεται εν μέρει στη λανθασμένη αντίληψη ότι και οι δύο κατηγορίες αποτελούν απλά αντίγραφα των αρχικών φαρμάκων. Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι σημαντικό ποσοστό του κοινού δεν διαθέτει επαρκή γνώση σχετικά με τα βιολογικά φάρμακα και τις ιδιαιτερότητες

των βιοομοειδών. Συνολικά λοιπόν, τα γενόσημα και τα βιοομοειδή έχουν εμφανείς διαφορές μεταξύ τους.

9. ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Ο ταχέως αναπτυσσόμενος κλάδος της βιοτεχνολογίας έχει συμβάλλει καθοριστικά στην αξιοποίηση βιολογικών φαρμάκων και κυρίως θεραπευτικών πρωτεϊνών. Η αξιοποίηση των βιοομοειδών που προαναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, είναι εξίσου καθοριστική καθώς προσφέρουν διευρυμένη πρόσβαση ασθενών σε ιδιαίτερα αποτελεσματικές και ασφαλείς βιολογικές θεραπείες. Κατόπιν εφαρμογής διαφόρων αυστηρών ελέγχων (προκλινικά και κλινικά) τα βιοομοειδή είναι συνδεδεμένα με την διασφάλιση υψηλής ποιότητας, ασφάλειας και αποτελεσματικότητας. Παρόλο που η συγκεκριμένη κατηγορία προϊόντων αποτελεί μια καινοτομία της σύγχρονης φαρμακευτικής έρευνας, υπάρχει ολοένα και αυξανόμενη ανάγκη για ανακάλυψη νέων βελτιωμένων βιολογικών φαρμάκων χρησιμοποιώντας ως «καλούπι» τα ήδη υπάρχοντα θεραπευτικά μόρια, τροποποιώντας και ενισχύοντας όμως ορισμένα χαρακτηριστικά τους. Έτσι, η σύγχρονη φαρμακευτική βιοτεχνολογία έχει αναπτύξει μια κατηγορία βιολογικών φαρμάκων, τα επονομαζόμενα βιοκαλύτερα (biobetters) ή βιοανώτερα (biosuperiors) καθώς επίσης και βιολογικά φάρμακα επόμενης γενιάς (next-generation biologics). Οι παραπάνω νέες αναπτυσσόμενες κατηγορίες βιολογικών φαρμάκων παρουσιάζουν βελτιστοποίηση χαρακτηριστικών που αφορούν την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια, την χορήγηση καθώς και την φαρμακοκινητική. Είναι επομένως φυσικό επακόλουθο πως η ανάπτυξη των συγκεκριμένων προϊόντων αντικατοπτρίζει μια εμφανώς βελτιστοποιημένη εκδοχή θεραπευτικών πρωτεϊνών.

9.1 BIOBETTERS

Ο όρος biobetter, το 2007 έγινε για πρώτη φορά γνωστός μέσω μιας διάσκεψης βιοεπενδυτών της Ινδίας, καθώς χρησιμοποιήθηκε από τον διευθύνοντα σύμβουλο μιας πολυεθνικής φαρμακευτικής εταιρείας και έκτοτε αναφέρεται συχνά παρότι δεν είναι σαφώς διευκρινισμένος ο συγκεκριμένος όρος. Αποτελούν νέα βελτιστοποιημένα φάρμακα, διαφοροποιημένα από τα υπάρχοντα προϊόντα και αξιολογούνται από τις ρυθμιστικές αρχές μέσω μιας τυπικής διαδικασίας έγκρισης.

Αποτελούν βιοφαρμακευτικά προϊόντα με δομικές και λειτουργικές τροποποιήσεις με στόχο την επίτευξη βέλτιστης απόδοσης συγκριτικά με προϊόντα αναφοράς που έχουν ήδη εγκριθεί (Weise et al., 2011). Οι εισαχθέντες τροποποιήσεις αφορούν αλλαγές στα πρότυπα γλυκοζυλίωσης και στην αμινοξική αλληλουχία πρωτεϊνών που επιδρούν

στην φαρμακοκινητική. Συγκεκριμένα, εμφανίζουν πιο μεγάλη διάρκεια ημίσειας ζωής, υψηλότερη αποτελεσματικότητα, αποδοτικότητα, ασφάλεια, σταθερότητα και μειωμένη ανοσογονικότητα και πιο εύκολο δοσολογικό σχήμα. Στην πραγματικότητα, παρόλο που εμφανίζουν αυξημένο κόστος, οι μειωμένες ανάγκες στη δοσολογία ή ακόμα και η δυνατότητα για μια εφάπαξ δόση, συμβάλλει σε μείωση κόστους (Kesik-Brodacka, 2018).

Το εντυπωσιακό με τα biobetters είναι πως η λήξη πατέντας προϊόντος αναφοράς δεν κρίνεται αναγκαία για την κυκλοφορία τους. Επιπλέον, ακόμα και χωρίς δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, η απόκτηση άδειας κυκλοφορίας ισοδυναμεί με αποκλειστικότητα του προϊόντος. Συμπερασματικά λοιπόν, τα οφέλη του συγκεκριμένου προϊόντος είναι πολλά με δυνατότητα να αλλάζουν δραστικά τα υπάρχοντα πρωτόκολλα θεραπείας.

9.2 BIOSUPERIORS

Πρόκειται για μια εξελιγμένη κατηγορία βιολογικών φαρμάκων με εμφανώς ανώτερη θεραπευτική απόδοση σε σύγκριση με το αρχικό προϊόν. Παρότι συνδέονται στενά εννοιολογικά με τα biobetters, η συγκεκριμένη κατηγορία αναφέρεται σε ένα βελτιωμένο προϊόν με ακόμα καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα, μεγαλύτερη διάρκεια δράσης και βελτιωμένο προφίλ όσον αφορά την ασφάλεια (Pathak et al., 2023).

Η αυξημένη απόδοση που έχουν σχετίζεται με παραμέτρους όπως ο περιορισμός ανεπιθύμητων ενεργειών, η ευκολία χορήγησης, η μείωση δοσολογίας, η βελτίωση της φαρμακοκινητικής και η αύξηση αποτελεσματικότητας (Pathak et al., 2023).

Οι βελτιώσεις που εμφανίζονται στα biosuperiors πραγματοποιούνται μέσω ορισμένων βιοτεχνολογικών παρεμβάσεων προηγμένης τεχνολογίας όπως τροποποιήσεις στη γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών, χημικές τροποποιήσεις στη μοριακή δομή, σύντηξη πρωτεϊνών ή τροποποιήσεις της αμινοξικής αλληλουχίας, διαδικασίες εξανθρωπισμού αντισωμάτων καθώς επίσης και πεγκυλίωση με σκοπό την αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής και αύξηση σταθερότητας (Pathak et al., 2023).

Επομένως, πρόκειται για ένα καινοτόμο προϊόν του βιοτεχνολογικού τομέα που συνδέεται άμεσα με την εξελικτική πορεία βιολογικών θεραπειών προσφέροντας αξιομνημόνευτα θεραπευτικά οφέλη στους ασθενείς.

9.3 NEXT-GENERATION BIOLOGICS

Με τον όρο next-generation biologics αναφερόμαστε σε μια καινοτόμο υποκατηγορία βιολογικών φαρμάκων που στοχεύουν σε πιο αποτελεσματικά, περισσότερο ασφαλή και εξατομικευμένα θεραπευτικά αποτελέσματα συγκριτικά με τα βιολογικά προϊόντα 1^{ης} γενιάς.

Ορισμένοι παράγοντες που συμβάλλουν στην αυξημένη θεραπευτική δράση τους, είναι η υψηλή ακρίβεια στόχευσης, οι μειωμένες ανεπιθύμητες ενέργειες, η αυξημένη αποτελεσματικότητα και η μεγάλη διάρκεια δράσης.

Στα βιολογικά φάρμακα επόμενης γενιάς ανήκουν τα διειδικά ή πολυειδικά αντισώματα με ικανότητα ταυτόχρονης αναγνώρισης πάνω από έναν στόχο. Επίσης συμπεριλαμβάνονται συζευγμένα αντισώματα-φάρμακα (ADCs, Antibody-Drug Conjugates) που αποτελούνται από μονοκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με κάποιο ισχυρό χημειοθεραπευτικό φάρμακο αποτελώντας έτσι μια αποτελεσματική, στοχευμένη θεραπεία. Ανήκουν επίσης κυτταρικές θεραπείες CAR-T, γονιδιακές θεραπείες που αξιοποιούν AAV (adeno-associated virus, αδενο-σχετιζόμενους με ιό) φορείς καθώς επίσης και θεραπείες που βασίζονται σε CRISPR, mRNA, siRNA.

Η ανάπτυξη των φαρμάκων αυτών είναι αλληλένδετη με εξατομικευμένη θεραπεία υψηλής απόδοσης και ποιότητας. Αντιπροσωπεύουν μάλιστα την εξέλιξη των σύγχρονων βιολογικών θεραπειών μέσω αξιοποίησης τεχνολογιών μοριακής μηχανικής αλλά και βιοτεχνολογίας.

9.4 ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μέσω των προαναφερθέντων θεραπευτικών πρωτεϊνών αντικατοπτρίζεται η ραγδαία πρόοδος της βιοτεχνολογίας στον κλάδο της φαρμακολογίας με στόχο την βελτιστοποίηση την ήδη υπάρχοντων θεραπευτικών πρωτεϊνών. Μέσω της ανάπτυξης τους δημιουργείται επίσης και η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα όσον αφορά τον έλεγχο ποιότητας, την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και τον αναλυτικό χαρακτηρισμό τους. Επομένως κρίνεται αναγκαία η αναλυτική και η ρυθμιστική προσέγγιση αναφορικά με την ανάπτυξη και την αξιολόγηση των πρωτεϊνών αυτών.

10. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

10.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι παραδοσιακές αναλυτικές τεχνικές για τον έλεγχο ποιότητας σταδιακά αντικαθίστανται από τεχνικές υψηλής ανάλυσης που αξιολογούν κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας (CQAs). Παράλληλα, όσον αφορά τον ρυθμιστικό έλεγχο, εφαρμόζονται καινοτόμα αναλυτικά εργαλεία.

10.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ (MULTI-ATTRIBUTE METHOD, MAM)

Οι συμβατικές μέθοδοι ανάλυσης που έχουν αναφερθεί εκτενώς στο κεφάλαιο 5 πληροφορούν για την ποιότητα βιοφαρμακευτικών προϊόντων, υστερώντας όμως σε επίπεδο ανάλυσης τροποποιήσεων των αμινοξέων. Μέσω της μεθόδου Multi-Attribute Method (MAM) οι περιορισμοί αυτοί μειώνονται. Πρόκειται για μια τεχνική που συνδυάζει την υγρή χρωματογραφία και την φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-HRMS) (Millán-Martín et al., 2023). Αποτελεί μια αναλυτική πλατφόρμα που αξιολογεί και παρακολουθεί ταυτοχρόνως πολλά κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας σε μια μόνο ανάλυση, αντικαθιστώντας τις συμβατικές μεθόδους και προσδιορίζοντας την πρωτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης καθώς και προσμίξεις, ανιχνεύοντας μάλιστα μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται σε δύο στάδια, όπου στο πρώτο χαρακτηρίζεται το προϊόν και ταυτοποιούνται οι τροποποιήσεις και οι παράμετροι που χρειάζεται να αξιολογηθούν, ενώ ακολούθως στο επόμενο στάδιο γίνεται στοχευμένη παρακολούθηση και οι παράμετροι ποσοτικοποιούνται. Η συγκεκριμένη τεχνική πλεονεκτεί σε σύγκριση με τις συμβατικές καθώς προσφέρει δυνατότητα ταυτόχρονης ποσοτικοποίησης διαφόρων μεταβολών σημαντικών για την ποιότητα θεραπευτικών πρωτεϊνών. Προσφέρει υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα και πλήρη κατανόηση μοριακής ετερογένειας θεραπευτικών πρωτεϊνών καθιστώντας την, την πλέον υποσχόμενη υποψήφια τεχνολογία για μελλοντική ενσωμάτωση στις διαδικασίες ελέγχου ποιότητας βιοφαρμακευτικών προϊόντων.

10.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ-ΔΕΥΤΕΡΙΟΥ (HDX-MS)

Η φασματομετρία μάζας ανταλλαγής υδρογόνου - δευτερίου (HDX-MS) χαρακτηρίζεται ως η πλέον προηγμένη μέθοδος χαρακτηρισμού ανώτερης δομής (HOS) θεραπευτικών πρωτεϊνών. Κρίνεται ολοένα και πιο σημαντική μέθοδος λόγω των πληροφοριών που παρέχει σχετικά με την διαμόρφωση και τις δομικές μεταβολές. Πρόκειται για μια μέθοδο όπου πραγματοποιείται ανταλλαγή υδρογόνου με δευτέριο, με τον ρυθμό ανταλλαγής να επηρεάζεται άμεσα από την διαθεσιμότητα και την προσβασιμότητα των περιοχών της πρωτεΐνης και την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου. Αξιολογεί την χαρτογράφηση δομικών αλλαγών και μελετά αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών (Masson et al., 2017). Επιπλέον αξιολογεί τις επιδράσεις των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, των μεταλλάξεων καθώς και των συνθηκών αποθήκευσης στη σταθερότητα των θεραπευτικών πρωτεϊνών.

Παρόλες τις προκλήσεις λόγω της πολυπλοκότητας που παρουσιάζει σαν τεχνική και λόγω της πολύπλοκης επεξεργασίας των δεδομένων, οι εξελίξεις στα βιοπληροφορικά εργαλεία και στις μεθόδους φασματομετρίας μάζας προβλέπεται να διευρύνουν τις εφαρμογές της HDX-MS. Επομένως, λόγω της καθοριστικής συνεισφοράς της μεθόδου στον χαρακτηρισμό της ανώτερης δομής, της σταθερότητας και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών, η συγκεκριμένη μέθοδος αναμένεται να αξιοποιηθεί ακόμα περισσότερο μελλοντικά.

10.4 ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY, PAT)

Η διεργασία αναλυτικής τεχνολογίας αποτελεί μια σύγχρονη προσέγγιση ελέγχου ποιότητας η οποία έχει εισαχθεί από τον FDA, αποσκοπώντας στην κατανόηση και στην αξιολόγηση των διεργασιών κατά τη διάρκεια παραγωγής. Σε αντίθεση με συμβατικές προσεγγίσεις που ελέγχουν μόνο το τελικό προϊόν, η PAT αποτελεί μέθοδο σχεδιασμού ανάλυσης και συνεχή έλεγχο που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια παραγωγής ώστε να αξιολογηθεί αν το τελικό προϊόν πληροί όλες τις επιθυμητές προδιαγραφές, επιτρέποντας μάλιστα ανίχνευση αποκλίσεων και ελέγχοντας τα CQAs και την απόδοση (Shaikh et al., 2018). Στην πραγματικότητα, μετρούνται και αξιολογούνται κρίσιμες παράμετροι διεργασίας (CPPs) καθιστώντας τις δοκιμές περισσότερο αποτελεσματικές.

Η μέθοδος στηρίζεται στην πλήρη κατανόηση των παραγωγικών διαδικασιών καθώς και στην συλλογή δεδομένων συνεχώς και σε πραγματικό χρόνο. Μάλιστα η συνεχής συλλογή πληροφοριών μειώνει τις αποκλίσεις και βελτιστοποιεί την σταθερότητα και την απόδοση κατά την παραγωγή. Η PAT, μέθοδος για τον αναλυτικό και ρυθμιστικό έλεγχο θεραπευτικών πρωτεϊνών βελτιστοποιεί την ποιότητα, την απόδοση και την ασφάλεια των παραγωγικών διεργασιών. Η πολυπλοκότητα της παραγωγικής διαδικασίας μπορεί να επηρεάσει κρίσιμα χαρακτηριστικά όπως η γλυκοζυλίωση, η συσσωμάτωση, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και η βιολογική δραστηριότητα. Η δυνατότητα συνεχούς παρακολούθησης παραμέτρων κατά τη παραγωγική διαδικασία συμβάλλει στη διατήρηση της σταθερότητας και της συγκρισιμότητας του προϊόντος, ενισχύοντας παράλληλα τη συμμόρφωση με τις ρυθμιστικές απαιτήσεις. Στα επόμενα χρόνια, η αξία της αναμένεται να μεγιστοποιηθεί λόγω του ότι συνδέεται άρρηκτα με τις αρχές του QbD καθώς και λόγω των διάφορων τεχνολογικών εξελίξεων που θα συνεισφέρουν στην πλήρη αυτοματοποίηση στις μεθόδους παρακολούθησης και αξιολόγησης της παραγωγής.

10.5 ΔΟΚΙΜΗ ΕΚΔΟΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (REAL-TIME RELEASE TESTING, RTRT)

Η RTRT αποτελεί μια σύγχρονη μέθοδο που αξιολογεί την ποιότητα ενός προϊόντος μέσω ελέγχου κρίσιμων παραμέτρων καθόλη την διάρκεια της παραγωγής και όχι αξιολογώντας μόνο το τελικό προϊόν. Πιο συγκεκριμένα, η RTRT μέσω ελέγχου CQAs και CPPs αξιολογεί και ελέγχει την ποιότητα ενός προϊόντος σε πραγματικό χρόνο (Markl et al., 2020).

Η εφαρμογή της RTRT είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις αρχές του QbD και της PAT, χρησιμοποιώντας διάφορα στατιστικά μοντέλα και προηγμένες αναλυτικές τεχνικές. Κατά αυτό τον τρόπο συλλέγει δεδομένα κατά την παραγωγική διαδικασία τα οποία χρησιμοποιεί ώστε να επιβεβαιώσει την συμμόρφωση ενός προϊόντος με προκαθορισμένες προδιαγραφές ποιότητας, εξοικονομώντας πολύτιμο χρόνο και προσφέροντας μέγιστη αποτελεσματικότητα και αποδοτικότητα. Επίσης, πλεονεκτεί όσον αφορά το κόστος, την ευκολία και την ταχύτητα ποιοτικού ελέγχου.

Παρόλα τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, υπάρχουν και αρκετές προκλήσεις σχετικά με τον όγκο διαχείρισης δεδομένων. Η RTRT θεωρείται αρκετά υποσχόμενη στρατηγική στις μελλοντικές τάσεις αναλυτικού και ρυθμιστικού ελέγχου θεραπευτικών πρωτεϊνών η οποία μάλιστα αναμένεται να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω λόγω της εξέλιξης της PAT και της αξιοποίησης μέσω των τεχνητής νοημοσύνης.

10.6 ΤΕΧΝΗΤΗ ΝΟΗΜΟΣΥΝΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΜΑΘΗΣΗ (AI/ML)

Η πολυπλοκότητα των θεραπευτικών πρωτεϊνών συνδέεται με αυξημένο όγκο αναλυτικών δεδομένων τόσο στο στάδιο της ανάπτυξης, παραγωγής και ποιοτικού ελέγχου. Τεχνολογίες που επιταχύνουν την εξαγωγή και ερμηνεία συμπερασμάτων των συλλεχθέντων δεδομένων είναι η τεχνητή νοημοσύνη και η μηχανική μάθηση. Πρόκειται για επαναστατικές τεχνολογίες που μπορούν να προβλέψουν την δομή των πρωτεϊνών, να σχεδιάσουν de novo και να βελτιστοποιήσουν πρωτεΐνες. Μέσω των συγκεκριμένων τεχνολογιών, παρέχεται η δυνατότητα δημιουργίας δοκιμαστικών μοντέλων που συμβάλλουν στην σταθερότητα και στην μείωση χρόνου ανάπτυξης και αξιολόγησης προϊόντων. Πρόσφατα, οι εξελίξεις στη βαθιά μάθηση έχουν επιτρέψει την πρόβλεψη της δομής των πρωτεϊνών με σχεδόν πειραματική ακρίβεια, η οποία έχει καταλύσει και την πρόοδο στον σχεδιασμό πρωτεϊνών (Wang et al., 2024). Το AlphaFold και το RoseTTAFold αποτελούν προηγμένα μοντέλα βασισμένα στην τεχνητή νοημοσύνη που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της ανώτερης δομής (HOS) των πρωτεϊνών με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία. Τα συγκεκριμένα μοντέλα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην δομική βιολογία (Wang et al., 2024). Οι τεχνολογίες τεχνητής νοημοσύνης και μηχανικής μάθησης έχουν ενσωματωθεί στην

PAT και στην RTRT με τρόπο που αυτοματοποιούν και επιταχύνουν τον έλεγχο. Σε ρυθμιστικό πλαίσιο, οργανισμοί όπως ο FDA και ο EMA ενσωματώνουν ολοένα και περισσότερο την τεχνητή νοημοσύνη και την μηχανική μάθηση στην φαρμακευτική βιομηχανία. Μάλιστα, η συνεισφορά τους είναι καθοριστικής σημασίας για τον ποιοτικό και ρυθμιστικό έλεγχο των θεραπευτικών πρωτεϊνών καθώς δημιουργούν αυτοματοποιημένα, έξυπνα και αποτελεσματικά συστήματα διασφάλισης ποιότητας.

10.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εξελίξεις και μελλοντικές τάσεις στον κλάδο των θεραπευτικών πρωτεϊνών συμπεριλαμβάνουν προηγμένες αναλυτικές μεθόδους, αυτοματοποιημένα συστήματα ελέγχου και νέες ρυθμιστικές προσεγγίσεις. Καινοτόμες αναλυτικές μέθοδοι όπως η MAM και η HDX-MS προσελκύουν το ενδιαφέρον καταλαμβάνοντας ολοένα και πιο κυρίαρχο ρόλο, προσφέροντας βαθύτερη κατανόηση των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας, λεπτομερή αξιολόγηση της πρωτοταγούς και ανώτερης δομής, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και της μοριακής ετερογένειας. Η ενσωμάτωση της PAT, η εφαρμογή της RTRT και η αξιοποίηση προηγμένων αναλυτικών τεχνολογιών συνδυαστικά με την τεχνητή νοημοσύνη και την μηχανική μάθηση, αναμένεται να αποτελέσουν βασικά στοιχεία των μελλοντικών εφαρμογών, επιταχύνοντας τον έλεγχο ποιότητας και την παραγωγική διαδικασία ενός προϊόντος. Ταυτοχρόνως, οι σύγχρονες ρυθμιστικές αρχές βασίζονται σε μια ολοκληρωμένη στρατηγική καθόλη τη διάρκεια ζωής ενός προϊόντος, στοχεύοντας στην αξιοποίηση μεθόδων και ενσωματώνοντας νέες τεχνολογίες που θα εγγυώνται διασφάλιση ποιότητας, αποτελεσματικότητα και ασφάλεια θεραπευτικών πρωτεϊνών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adav S. S. (2025). Advances in the Study of Protein Deamidation: Unveiling Its Influence on Aging, Disease Progression, Forensics and Therapeutic Efficacy. *Proteomes*, 13(2), 24. <https://doi.org/10.3390/proteomes13020024>

Agrawal, N. J., Kumar, S., Wang, X., Helk, B., Singh, S. K., & Trout, B. L. (2011). Aggregation in protein-based biotherapeutics: computational studies and tools to identify aggregation-prone regions. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(12), 5081–5095. <https://doi.org/10.1002/jps.22705>

Alhazmi, H. A., Deeb, S. E., Nachbar, M., Redweik, S., Albishri, H. M., El-Hady, D. A., & Wätzig, H. (2015). Optimization of affinity capillary electrophoresis for routine investigations of protein-metal ion interactions. *Journal of separation science*, 38(20), 3629–3637. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500182>

Alhazmi, H. A., Al Bratty, M., Javed, S. A., & Lalitha, K. G. (2017). Investigation of transferrin interaction with medicinally important noble metal ions using affinity capillary electrophoresis. *Die Pharmazie*, 72(5), 243–248. <https://doi.org/10.1691/ph.2017.6170>

Alhazmi, H. A., & Albratty, M. (2023). Analytical Techniques for the Characterization and Quantification of Monoclonal Antibodies. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(2), 291. <https://doi.org/10.3390/ph16020291>

Alpert A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of chromatography*, 499, 177–196. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)96972-3)

Alpert, A. J., & Andrews, P. C. (1988). Cation-exchange chromatography of peptides on poly(2-sulfoethyl aspartamide)-silica. *Journal of chromatography*, 443, 85–96. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)94785-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)94785-x)

Amantana, A., & Iversen, P. L. (2005). Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Current opinion in pharmacology*, 5(5), 550–555. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.07.001>

Amartely, H., Avraham, O., Friedler, A., Livnah, O., & Lebendiker, M. (2018). Coupling Multi Angle Light Scattering to Ion Exchange chromatography (IEX-MALS) for protein characterization. *Scientific reports*, 8(1), 6907. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25246-6>

Ambrogelly, A., Gozo, S., Katiyar, A., Dellatore, S., Kune, Y., Bhat, R., Sun, J., Li, N., Wang, D., Nowak, C., Neill, A., Ponniah, G., King, C., Mason, B., Beck, A., & Liu, H. (2018). Analytical comparability study of recombinant monoclonal antibody therapeutics. *mAbs*, 10(4), 513–538. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1438797>

Arakawa, T., Ejima, D., Li, T., & Philo, J. S. (2010). The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(4), 1674–1692. <https://doi.org/10.1002/jps.21974>

Arunkumar, R., Drummond, C. J., & Greaves, T. L. (2019). FTIR Spectroscopic Study of the Secondary Structure of Globular Proteins in Aqueous Protic Ionic Liquids. *Frontiers in chemistry*, 7, 74. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00074>

Arya, S. K., & Estrela, P. (2018). Recent Advances in Enhancement Strategies for Electrochemical ELISA-Based Immunoassays for Cancer Biomarker Detection. *Sensors* (Basel, Switzerland), 18(7), 2010. <https://doi.org/10.3390/s18072010>

Aschermann, S., Lux, A., Baerenwaldt, A., Biburger, M., & Nimmerjahn, F. (2010). The other side of immunoglobulin G: suppressor of inflammation. *Clinical and experimental immunology*, 160(2), 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04081.x>

Auclair, J., & Rathore, A. S. (2023). Analytical methods to determine the stability of biopharmaceutical products. *LCGC North America*, 41(1), 23–27. <https://doi.org/10.56530/lcgc.na.qc1477t9>

Baek, J., Schwahn, A. B., Lin, S., Pohl, C. A., De Pra, M., Tremintin, S. M., & Cook, K. (2020). New Insights into the Chromatography Mechanisms of Ion-Exchange Charge Variant Analysis: Dispelling Myths and Providing Guidance for Robust Method Optimization. *Analytical chemistry*, 92(19), 13411–13419. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02775>

Baertschi, S. W., Alsante, K. M., & Tønnesen, H. H. (2010). A critical assessment of the ICH guideline on photostability testing of new drug substances and products (Q1B): Recommendation for revision. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(7), 2934–2940. <https://doi.org/10.1002/jps.22076>

Bailey, A. O., Han, G., Phung, W., Gazis, P., Sutton, J., Josephs, J. L., & Sandoval, W. (2018). Charge variant native mass spectrometry benefits mass precision and dynamic range of monoclonal antibody intact mass analysis. *mAbs*, 10(8), 1214–1225. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1521131>

Barnett, G. V., Balakrishnan, G., Chennamsetty, N., Meengs, B., Meyer, J., Bongers, J., Ludwig, R., Tao, L., Das, T. K., Leone, A., & Kar, S. R. (2018). Enhanced Precision of Circular Dichroism Spectral Measurements Permits Detection of Subtle Higher Order Structural Changes in Therapeutic Proteins. *Journal of pharmaceutical sciences*, 107(10), 2559–2569. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.06.007>

- Beck, A., Wagner-Rousset, E., Ayoub, D., Van Dorsselaer, A., & Sanglier-Cianféroni, S. (2013). Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Analytical chemistry*, 85(2), 715–736. <https://doi.org/10.1021/ac3032355>
- Beck, A., Debaene, F., Diemer, H., Wagner-Rousset, E., Colas, O., Van Dorsselaer, A., & Cianféroni, S. (2015). Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 50(2), 285–297. <https://doi.org/10.1002/jms.3554>
- Belov, A. M., Zang, L., Sebastiano, R., Santos, M. R., Bush, D. R., Karger, B. L., & Ivanov, A. R. (2018). Complementary middle-down and intact monoclonal antibody proteoform characterization by capillary zone electrophoresis - mass spectrometry. *Electrophoresis*, 39(16), 2069–2082. <https://doi.org/10.1002/elps.201800067>
- Beltrame, M. H., Catarino, S. J., Goeldner, I., Boldt, A. B., & de Messias-Reason, I. J. (2015). The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Frontiers in pediatrics*, 2, 148. <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00148>
- Bentley G. A. (1994). Twenty years of antibody structure. *Research in immunology*, 145(1), 31–33. [https://doi.org/10.1016/s0923-2494\(94\)80038-3](https://doi.org/10.1016/s0923-2494(94)80038-3)
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bobály, B., D'Atri, V., Lauber, M., Beck, A., Guillaume, D., & Fekete, S. (2018). Characterizing various monoclonal antibodies with milder reversed phase chromatography conditions. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1096, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.039>
- Boersema, P. J., Mohammed, S., & Heck, A. J. (2008). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(1), 151–159. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1865-7>
- Bora, N. S., Matta, B., Lyzogubov, V. V., & Bora, P. S. (2015). Relationship between the complement system, risk factors and prediction models in age-related macular degeneration. *Molecular immunology*, 63(2), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.07.012>
- Borza, B., Szigeti, M., Szekrenyes, A., Hajba, L., & Guttman, A. (2018). Glycosimilarity assessment of biotherapeutics 1: Quantitative comparison of the N-glycosylation of the innovator and a biosimilar version of etanercept. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 153, 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.021>

- Bramham, J. E., Podmore, A., Davies, S. A., & Golovanov, A. P. (2020). Comprehensive Assessment of Protein and Excipient Stability in Biopharmaceutical Formulations Using ^1H NMR Spectroscopy. *ACS pharmacology & translational science*, 4(1), 288–295. <https://doi.org/10.1021/acspsci.0c00188>
- Brinson, R. G., Marino, J. P., Delaglio, F., Arbogast, L. W., Evans, R. M., Kearsley, A., Gingras, G., Ghasriani, H., Aubin, Y., Pierens, G. K., Jia, X., Mobli, M., Grant, H. G., Keizer, D. W., Schweimer, K., Stähle, J., Widmalm, G., Zartler, E. R., Lawrence, C. W., Reardon, P. N., ... Wikström, M. (2019). Enabling adoption of 2D-NMR for the higher order structure assessment of monoclonal antibody therapeutics. *mAbs*, 11(1), 94–105. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1544454>
- Brouwer, N., Frakking, F. N., van de Wetering, M. D., van Houdt, M., Hart, M., Budde, I. K., Strengers, P. F., Laursen, I., Houen, G., Roos, D., Jensenius, J. C., Caron, H. N., Dolman, K. M., & Kuijpers, T. W. (2009). Mannose-binding lectin (MBL) substitution: recovery of opsonic function in vivo lags behind MBL serum levels. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(5), 3496–3504. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900445>
- Camperi, J., , Goyon, A., , Guillaume, D., , Zhang, K., , & Stella, C., (2021). Multi-dimensional LC-MS: the next generation characterization of antibody-based therapeutics by unified online bottom-up, middle-up and intact approaches. *The Analyst*, 146(3), 747–769. <https://doi.org/10.1039/d0an01963a>
- Campos-Neto, A., Rodrigues-Júnior, V., Pedral-Sampaio, D. B., Netto, E. M., Owendale, P. J., Coler, R. N., Skeiky, Y. A., Badaró, R., & Reed, S. G. (2001). Evaluation of DPPD, a single recombinant Mycobacterium tuberculosis protein as an alternative antigen for the Mantoux test. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 81(5-6), 353–358. <https://doi.org/10.1054/tube.2001.0311>
- Carter P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature reviews. Cancer*, 1(2), 118–129. <https://doi.org/10.1038/35101072>
- Casadevall, A., Dadachova, E., & Pirofski, L. A. (2004). Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(9), 695–703. <https://doi.org/10.1038/nrmicro974>
- Cassidy, B., Bloomingdale, T., & Carmody, J. (2025). Navigating ICH Q2(R2) compliance in analytical method validation: A gap analysis toolkit to streamline risk assessment and change management. *Journal of pharmaceutical sciences*, 114(6), 103749. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2025.103749>
- Černý, M., Skalák, J., Cerna, H., & Brzobohatý, B. (2013). Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *Journal of proteomics*, 92, 2–27. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.040>

Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*, 157(2), 220–233. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>

Chavez, J. D., Park, S. G., Mohr, J. P., & Bruce, J. E. (2022). Applications and advancements of FT-ICR-MS for interactome studies. *Mass spectrometry reviews*, 41(2), 248–261. <https://doi.org/10.1002/mas.21675>

Chen, K., & Cerutti, A. (2011). The function and regulation of immunoglobulin D. *Current opinion in immunology*, 23(3), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.01.006>

Chen, K., Long, D. S., Lute, S. C., Levy, M. J., Brorson, K. A., & Keire, D. A. (2016). Simple NMR methods for evaluating higher order structures of monoclonal antibody therapeutics with quinary structure. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 128, 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.007>

Chen, X., Yuan, Y., Zhou, F., Li, L., Pu, J., Zeng, Y., & Jiang, X. (2025). Lactylation: From Homeostasis to Pathological Implications and Therapeutic Strategies. *MedComm*, 6(6), e70226. <https://doi.org/10.1002/mco2.70226>

Chennamsetty, N., Voynov, V., Kayser, V., Helk, B., & Trout, B. L. (2010). Prediction of aggregation prone regions of therapeutic proteins. *The journal of physical chemistry. B*, 114(19), 6614–6624. <https://doi.org/10.1021/jp911706q>

Chiu, M. L., & Gilliland, G. L. (2016). Engineering antibody therapeutics. *Current opinion in structural biology*, 38, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.012>

Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 8(4), 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>

Cohen, S., & Kay, J. (2017). Biosimilars: implications for rheumatoid arthritis therapy. *Current opinion in rheumatology*, 29(3), 260–268. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000379>

Coler, R. N., Skeiky, Y. A., Ovendale, P. J., Vedvick, T. S., Gervassi, L., Guderian, J., Jen, S., Reed, S. G., & Campos-Neto, A. (2000). Cloning of a Mycobacterium tuberculosis gene encoding a purified protein derivative protein that elicits strong tuberculosis-specific delayed-type hypersensitivity. *The Journal of infectious diseases*, 182(1), 224–233. <https://doi.org/10.1086/315677>

Cromwell, M. E., Hilario, E., & Jacobson, F. (2006). Protein aggregation and bioprocessing. *The AAPS journal*, 8(3), E572–E579. <https://doi.org/10.1208/aapsj080366>

Dadouch, M., , Ladner, Y., , Bich, C., , Larroque, M., , Larroque, C., , Morel, J., , Bonnet, P. A., , & Perrin, C., (2020). An in-line enzymatic microreactor for the middle-up analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis. *The Analyst*, 145(5), 1759–1767. <https://doi.org/10.1039/c9an01906e>

Dash, R., Singh, S. K., Chirmule, N., & Rathore, A. S. (2021). Assessment of Functional Characterization and Comparability of Biotherapeutics: a Review. *The AAPS journal*, 24(1), 15. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00671-0>

Davies, D. R., Padlan, E. A., & Segal, D. M. (1975). Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annual review of biochemistry*, 44, 639–667. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.44.070175.003231>

Declerck, P., Danesi, R., Petersel, D., & Jacobs, I. (2017). The Language of Biosimilars: Clarification, Definitions, and Regulatory Aspects. *Drugs*, 77(6), 671–677. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0717-1>

Delobel A. (2021). Glycosylation of Therapeutic Proteins: A Critical Quality Attribute. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2271, 1–21. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1241-5_1

Derenne, A., Derfoufi, K. M., Cowper, B., Delporte, C., & Goormaghtigh, E. (2020). FTIR spectroscopy as an analytical tool to compare glycosylation in therapeutic monoclonal antibodies. *Analytica chimica acta*, 1112, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.038>

Dimitrov D. S. (2012). Therapeutic proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 899, 1–26. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_1

Dong, J. Q., Salinger, D. H., Endres, C. J., Gibbs, J. P., Hsu, C. P., Stouch, B. J., Hurh, E., & Gibbs, M. A. (2011). Quantitative prediction of human pharmacokinetics for monoclonal antibodies: retrospective analysis of monkey as a single species for first-in-human prediction. *Clinical pharmacokinetics*, 50(2), 131–142. <https://doi.org/10.2165/11537430-000000000-00000>

Dörner, T., & Kay, J. (2015). Biosimilars in rheumatology: current perspectives and lessons learnt. *Nature reviews. Rheumatology*, 11(12), 713–724. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.110>

Doyen, C., Larquet, E., Coureux, P. D., Frances, O., Herman, F., Sablé, S., Burnouf, J. P., Sizun, C., & Lescop, E. (2021). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: A Multifaceted Toolbox to Probe Structure, Dynamics, Interactions, and Real-Time In Situ Release Kinetics in Peptide-Liposome Formulations. *Molecular pharmaceutics*, 18(7), 2521–2539. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00037>

Du, Y., Walsh, A., Ehrick, R., Xu, W., May, K., & Liu, H. (2012). Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *mAbs*, 4(5), 578–585. <https://doi.org/10.4161/mabs.21328>

Duivelshof, B. L., Murisier, A., Camperi, J., Fekete, S., Beck, A., Guillaume, D., & D'Atri, V. (2021). Therapeutic Fc-fusion proteins: Current analytical strategies. *Journal of separation science*, 44(1), 35–62. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000765>

EDELMAN, G. M., & BENACERRAF, B. (1962). On structural and functional relations between antibodies and proteins of the gamma-system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(6), 1035–1042. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.6.1035>

Elliott, K. W., Delaglio, F., Wikström, M., Marino, J. P., & Arbogast, L. W. (2021). Principal Component Analysis of 1D ¹H Diffusion Edited NMR Spectra of Protein Therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 110(10), 3385–3394. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.06.027>

European Medicines Agency. (2019). *Guideline on the quality of biological active substances and medicinal products*. [EMA Official Website](https://www.ema.europa.eu/en/quality/regulatory-guidance)

Farhat, F., Torres, A., Park, W., de Lima Lopes, G., Mudad, R., Ikpeazu, C., & Abi Aad, S. (2018). The Concept of Biosimilars: From Characterization to Evolution-A Narrative Review. *The oncologist*, 23(3), 346–352. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0126>

Farnan, D., & Moreno, G. T. (2009). Multiproduct high-resolution monoclonal antibody charge variant separations by pH gradient ion-exchange chromatography. *Analytical chemistry*, 81(21), 8846–8857. <https://doi.org/10.1021/ac901408j>

Fekete, S., Gassner, A. L., Rudaz, S., Schappler, J., & Guillaume, D. (2013a). Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *Trends in Analytical Chemistry*, 42, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.012>

Fekete, S., Ganzler, K., & Guillaume, D. (2013b). Critical evaluation of fast size exclusion chromatographic separations of protein aggregates, applying sub-2 μ m particles. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 78–79, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.013>

Fekete, S., Beck, A., Fekete, J., & Guillaume, D. (2015). Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: salt gradient approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 102, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.035>

Filpula, D. (2007). Antibody engineering and modification technologies.

Biomolecular Engineering, 24(2), 201 215.

<https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.03.004>

Food and Drug Administration, HHS (2003). International Conference on Harmonisation: guidance on Q1D bracketing and matrixing designs for stability testing of new drug substances and products; availability. Notice. *Federal register*, 68(11), 2339–2340.

Food and Drug Administration, HHS (2004). International Conference on Harmonisation; evaluation of stability data; availability. Notice. *Federal register*, 69(110), 32010–32011.

Food and Drug Administration, HHS (2005). International Conference on Harmonisation; guidance on Q5E Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in Their Manufacturing Process; availability. Notice. *Federal register*, 70(125), 37861–37862.

Foy, S. P., & Matsuuchi, L. (2001). Association of B lymphocyte antigen receptor polypeptides with multiple chaperone proteins. *Immunology letters*, 78(3), 149–160. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(01\)00256-5](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(01)00256-5)

Füssl, F., Cook, K., Scheffler, K., Farrell, A., Mittermayr, S., & Bones, J. (2018). Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies Using Direct Coupled pH Gradient Cation Exchange Chromatography to High-Resolution Native Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, 90(7), 4669–4676. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05241>

Ghasriani, H., Hodgson, D. J., Brinson, R. G., McEwen, I., Buhse, L. F., Kozłowski, S., Marino, J. P., Aubin, Y., & Keire, D. A. (2016). Precision and robustness of 2D-NMR for structure assessment of filgrastim biosimilars. *Nature biotechnology*, 34(2), 139–141. <https://doi.org/10.1038/nbt.3474>

Gould, H. J., Sutton, B. J., Beavil, A. J., Beavil, R. L., McCloskey, N., Coker, H. A., Fear, D., & Smurthwaite, L. (2003). The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annual review of immunology*, 21, 579–628. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141103>

Goulet, D. R., & Atkins, W. M. (2020). Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 109(1), 74–103. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>

Goyon, A., Francois, Y. N., Colas, O., Beck, A., Veuthey, J. L., & Guillaume, D. (2018). High-resolution separation of monoclonal antibodies mixtures and their charge variants

by an alternative and generic CZE method. *Electrophoresis*, 39(16), 2083–2090.
<https://doi.org/10.1002/elps.201800131>

Guimaraes Koch, S. S., Thorpe, R., Kawasaki, N., Lefranc, M. P., Malan, S., Martin, A. C. R., Mignot, G., Plückthun, A., Rizzi, M., Shubat, S., Weisser, K., & Balocco, R. (2022). International nonproprietary names for monoclonal antibodies: an evolving nomenclature system. *mAbs*, 14(1), 2075078.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2075078>

Haddad, G., & Greene, A. (2019). Quality Risk Management Competency Model-Case for the Need for QRM Competencies. *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, 73(4), 331–344. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2019.009944>

Harris, L. J., Skaletsky, E., & McPherson, A. (1998). Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *Journal of molecular biology*, 275(5), 861–872.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1508>

Haselberg, R., De Vijlder, T., Heukers, R., Smit, M. J., Romijn, E. P., Somsen, G. W., & Domínguez-Vega, E. (2018). Heterogeneity assessment of antibody-derived therapeutics at the intact and middle-up level by low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 1044, 181–190.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.024>

He, X. Z., Que, A. H., & Mo, J. J. (2009). Analysis of charge heterogeneities in mAbs using imaged CE. *Electrophoresis*, 30(5), 714–722.
<https://doi.org/10.1002/elps.200800636>

He, Y., Isele, C., Hou, W., & Ruesch, M. (2011). Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary. *Journal of separation science*, 34(5), 548–555.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201000719>

Heinrich, L., Tissot, N., Hartmann, D. J., & Cohen, R. (2010). Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity. *Journal of immunological methods*, 352(1-2), 13–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.10.002>

Hong, P., Koza, S., & Bouvier, E. S. (2012). Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 35(20), 2923–2950.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724>

Huang, T. Y., Chi, L. M., & Chien, K. Y. (2018). Size-exclusion chromatography using reverse-phase columns for protein separation. *Journal of chromatography. A*, 1571, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.020>

Igietseme, J. U., Zhu, X., & Black, C. M. (2014). Fc receptor-dependent immunity. In M. E. Ackerman & F. Nimmerjahn (Eds.), *Antibody Fc* (pp. 269–281). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394802-1.00015-7>

International Conference on Harmonisation; guidance on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. Notice. Food and Drug Administration, HHS. (1999). Federal register, 64(159), 44928–44935.

International Conference on Harmonisation. Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products. Annex to the ICH Harmonised Tripartite Guideline for the Stability Testing of New Drug Substances and Products. (1998). *Developments in biological standardization*, 93, 211–219.

Ishihara, T., & Yamamoto, S. (2005). Optimization of monoclonal antibody purification by ion-exchange chromatography. Application of simple methods with linear gradient elution experimental data. *Journal of chromatography. A*, 1069(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.040>

Jiskoot, W., Randolph, T. W., Volkin, D. B., Middaugh, C. R., Schöneich, C., Winter, G., Friess, W., Crommelin, D. J., & Carpenter, J. F. (2012). Protein instability and immunogenicity: roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(3), 946–954. <https://doi.org/10.1002/jps.23018>

Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., & Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069), 522–525. <https://doi.org/10.1038/321522a0>

Kahle, J., Stein, M., & Wätzig, H. (2019). Design of experiments as a valuable tool for biopharmaceutical analysis with (imaged) capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 40(18-19), 2382–2389. <https://doi.org/10.1002/elps.201900162>

Karlsson, G., Winge, S., & Sandberg, H. (2005). Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of chromatography. A*, 1092(2), 246–249. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.025>

Kaur, N., & Chaudhary, V. (2021). Biotherapeutics and its applications in Microbiology. *Environment Conservation Journal*, 22, 63–78. <https://doi.org/10.36953/ECJ.2021.SE.2207>

Keizer, R. J., Huitema, A. D., Schellens, J. H., & Beijnen, J. H. (2010). Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clinical pharmacokinetics*, 49(8), 493–507. <https://doi.org/10.2165/11531280-000000000-00000>

Kesik-Brodacka M. (2018). Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(3), 306–322. <https://doi.org/10.1002/bab.1617>

Kheddo, P., Cliff, M. J., Uddin, S., van der Walle, C. F., & Golovanov, A. P. (2016). Characterizing monoclonal antibody formulations in arginine glutamate solutions using ¹H NMR spectroscopy. *mAbs*, 8(7), 1245–1258. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1214786>

Kheddo, P., Bramham, J. E., Dearman, R. J., Uddin, S., van der Walle, C. F., & Golovanov, A. P. (2017). Investigating Liquid-Liquid Phase Separation of a Monoclonal Antibody Using Solution-State NMR Spectroscopy: Effect of Arg·Glu and Arg·HCl. *Molecular pharmaceuticals*, 14(8), 2852–2860. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00418>

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Kuby Immunology*. 6th Edition. New York: W.H. Freeman and Company; 2007.

Kiss, R., Fizil, Á., & Szántay, C., Jr (2018). What NMR can do in the biopharmaceutical industry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 147, 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.004>

Knezevic, I., & Griffiths, E. (2017). WHO standards for biotherapeutics, including biosimilars: an example of the evaluation of complex biological products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1407(1), 5–16. <https://doi.org/10.1111/nyas.13434>

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>

Kotia, R. B., & Raghani, A. R. (2010). Analysis of monoclonal antibody product heterogeneity resulting from alternate cleavage sites of signal peptide. *Analytical biochemistry*, 399(2), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.01.008>

Kumar, V., Barwal, A., Sharma, N., Mir, D. S., Kumar, P., & Kumar, V. (2024). Therapeutic proteins: developments, progress, challenges, and future perspectives. *3 Biotech*, 14(4), 112. <https://doi.org/10.1007/s13205-024-03958-z>

Lacher, N. A., Roberts, R. K., He, Y., Cargill, H., Kearns, K. M., Holovics, H., & Ruesch, M. N. (2010). Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs. *Journal of separation science*, 33(2), 218–227. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900597>

- LaRusso N. F. (1984). Proteins in bile: how they get there and what they do. *The American journal of physiology*, 247(3 Pt 1), G199–G205. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1984.247.3.G199>
- Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(1), 21–39. <https://doi.org/10.1038/nrd2399>
- Lechner, A., Giorgetti, J., Gahoual, R., Beck, A., Leize-Wagner, E., & François, Y. N. (2019). Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016-2018. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1122-1123, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.05.014>
- Lee, J. J., Lee, N., Seo, Y. J., & Kim, I. (2023). Consistency of Product Quality for SB5, an Adalimumab Biosimilar. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 37(2), 271–277. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00581-x>
- Li T. (2010). Patient selection in non-small cell lung cancer: Histologic versus molecular subtypes?. *Journal of thoracic disease*, 2(4), 189–191. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2010.11.9>
- Li, K., Liu, S., Xing, R., Yu, H., Qin, Y., Li, R., & Li, P. (2013). High-resolution separation of homogeneous chitooligomers series from 2-mers to 7-mers by ion-exchange chromatography. *Journal of separation science*, 36(7), 1275–1282. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200935>
- Li, W., Yang, B., Zhou, D., Xu, J., Li, W., & Suen, W. C. (2017). Identification and characterization of monoclonal antibody fragments cleaved at the complementarity determining region using orthogonal analytical methods. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1048, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.019>
- Lichtenstein, G. R., Panaccione, R., & Mallarkey, G. (2008). Efficacy and safety of adalimumab in Crohn's disease. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 1(1), 43–50. <https://doi.org/10.1177/1756283X08092548>
- Limpikirati, P. K., Mongkoltipparat, S., Denchaipradit, T., Siwasophonpong, N., Pornnopparat, W., Ramanandana, P., Pianpaktr, P., Tongchusak, S., Tian, M. T., & Pisitkun, T. (2024). Basic regulatory science behind drug substance and drug product specifications of monoclonal antibodies and other protein therapeutics. *Journal of pharmaceutical analysis*, 14(6), 100916. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.12.006>

Lin J. H. (2009). Pharmacokinetics of biotech drugs: peptides, proteins and monoclonal antibodies. *Current drug metabolism*, 10(7), 661–691. <https://doi.org/10.2174/138920009789895499>

Lin, J. C., Glover, Z. K., & Sreedhara, A. (2015). Assessing the Utility of Circular Dichroism and FTIR Spectroscopy in Monoclonal-Antibody Comparability Studies. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(12), 4459–4466. <https://doi.org/10.1002/jps.24683>

Maack, T., Johnson, V., Kau, S. T., Figueiredo, J., & Sigulem, D. (1979). Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. *Kidney international*, 16(3), 251–270. <https://doi.org/10.1038/ki.1979.128>

Maas, C., Hermeling, S., Bouma, B., Jiskoot, W., & Gebbink, M. F. (2007). A role for protein misfolding in immunogenicity of biopharmaceuticals. *The Journal of biological chemistry*, 282(4), 2229–2236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605984200>

Mack, S., Arnold, D., Bogdan, G., Bousse, L., Danan, L., Dolnik, V., Ducusin, M., Gwerder, E., Herring, C., Jensen, M., Ji, J., Lacy, S., Richter, C., Walton, I., & Gentalen, E. (2019). A novel microchip-based imaged CIEF-MS system for comprehensive characterization and identification of biopharmaceutical charge variants. *Electrophoresis*, 40(23-24), 3084–3091. <https://doi.org/10.1002/elps.201900325>

Maeda, E., Urakami, K., Shimura, K., Kinoshita, M., & Kakehi, K. (2010). Charge heterogeneity of a therapeutic monoclonal antibody conjugated with a cytotoxic antitumor antibiotic, calicheamicin. *Journal of chromatography. A*, 1217(45), 7164–7171. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.022>

Mannaerts, B. M., Geurts, T. B., & Odink, J. (1998). A randomized three-way cross-over study in healthy pituitary-suppressed women to compare the bioavailability of human chorionic gonadotrophin (Pregnyl) after intramuscular and subcutaneous administration. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(6), 1461–1464. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.6.1461>

Markl, D., Warman, M., Dumarey, M., Bergman, E. L., Folestad, S., Shi, Z., Manley, L. F., Goodwin, D. J., & Zeitler, J. A. (2020). Review of real-time release testing of pharmaceutical tablets: State-of-the art, challenges and future perspective. *International journal of pharmaceutics*, 582, 119353. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119353>

Masson, G. R., Jenkins, M. L., & Burke, J. E. (2017). An overview of hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 12(10), 981–994. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1363734>

- Mayrhofer, P., & Kunert, R. (2019). Nomenclature of humanized mAbs: Early concepts, current challenges and future perspectives. *Human antibodies*, 27(1), 37–51. <https://doi.org/10.3233/HAB-180347>
- McCalley, D. V., & Neue, U. D. (2008). Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1192(2), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.049>
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), 552–554. <https://doi.org/10.1038/348552a0>
- Miles, A. J., , Janes, R. W., , & Wallace, B. A., (2021). Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. *Chemical Society reviews*, 50(15), 8400–8413. <https://doi.org/10.1039/d0cs00558d>
- Millán-Martín, S., Jakes, C., Carillo, S., & Bones, J. (2023). Multi-attribute method (MAM) to assess analytical comparability of adalimumab biosimilars. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 234, 115543. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115543>
- Minna, J. D., Bunn, P. A., Jr, Carney, D. N., Cohen, M. H., Cuttita, F., Fosiack, B. E., Jr, Gazdar, A. F., Ihde, D. C., Johnston-Early, A., Matthews, M. J., Makuch, R., Oie, H., Rosen, S., Lichter, A., & Glatstein, E. (1982). Experience of the National Cancer Institute (USA) in the treatment and biology of small cell lung cancer. *Bulletin du cancer*, 69(1), 83–93.
- Modjtahedi, H., Ali, S., & Essapen, S. (2012). Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: advances and challenges. *British medical bulletin*, 104, 41–59. <https://doi.org/10.1093/bmb/lds032>
- Mould, D. R., & Green, B. (2010). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 24(1), 23–39. <https://doi.org/10.2165/11530560-000000000-00000>
- Navas, N., Hermosilla, J., Torrente-López, A., Hernández-Jiménez, J., Cabeza, J., Pérez-Robles, R., & Salmerón-García, A. (2020). Use of subcutaneous tocilizumab to prepare intravenous solutions for COVID-19 emergency shortage: Comparative analytical study of physicochemical quality attributes. *Journal of pharmaceutical analysis*, 10(6), 532–545. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.06.003>
- Neuberger, M. S., Williams, G. T., Mitchell, E. B., Jouhal, S. S., Flanagan, J. G., & Rabbitts, T. H. (1985). A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature*, 314(6008), 268–270. <https://doi.org/10.1038/314268a0>

Nguyen, T. T., Petersen, N. J., & Rand, K. D. (2016). A simple sheathless CE-MS interface with a sub-micrometer electrical contact fracture for sensitive analysis of peptide and protein samples. *Analytica chimica acta*, 936, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.002>

Nicolardi, S., Deelder, A. M., Palmblad, M., & van der Burgt, Y. E. (2014). Structural analysis of an intact monoclonal antibody by online electrochemical reduction of disulfide bonds and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 86(11), 5376–5382. <https://doi.org/10.1021/ac500383c>

Nissim, A., & Chernajovsky, Y. (2008). Historical development of monoclonal antibody therapeutics. *Handbook of experimental pharmacology*, (181), 3 18. https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_1

Nixon, N. A., Hannouf, M. B., & Verma, S. (2018). The evolution of biosimilars in oncology, with a focus on trastuzumab. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 25(Suppl 1), S171–S179. <https://doi.org/10.3747/co.25.3942>

Pabst, T. M., Carta, G., Ramasubramanyan, N., Hunter, A. K., Mensah, P., & Gustafson, M. E. (2008). Separation of protein charge variants with induced pH gradients using anion exchange chromatographic columns. *Biotechnology progress*, 24(5), 1096–1106. <https://doi.org/10.1002/btpr.53>

Pathak, A., Singh, S. P., Tiwari, A., Tripathi, A. M., Jahan, T., & Singh, D. B. (2023). Biosimilar, biobetter, and biosuperior therapeutic proteins. In *Protein-based therapeutics* (pp. 325–353). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-19-8249-1_12

Pérez-Fernández, B., Mercader, J. V., Checa-Orrego, B. I., de la Escosura-Muñiz, A., & Costa-García, A. (2019). A monoclonal antibody-based immunosensor for the electrochemical detection of imidacloprid pesticide. *The Analyst*, 144(9), 2936–2941. <https://doi.org/10.1039/c9an00176j>

Phyo, P., Zhao, X., Templeton, A. C., Xu, W., Cheung, J. K., & Su, Y. (2021). Understanding molecular mechanisms of biologics drug delivery and stability from NMR spectroscopy. *Advanced drug delivery reviews*, 174, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.02.007>

Piggee C. (2008). Therapeutic antibodies coming through the pipeline. *Analytical chemistry*, 80(7), 2305–2310. <https://doi.org/10.1021/ac086033v>

Poppe, L., Jordan, J. B., Lawson, K., Jerums, M., Apostol, I., & Schnier, P. D. (2013). Profiling formulated monoclonal antibodies by (1)H NMR spectroscopy. *Analytical chemistry*, 85(20), 9623–9629. <https://doi.org/10.1021/ac401867f>

Quan, C., Alcalá, E., Petkovska, I., Matthews, D., Canova-Davis, E., Taticek, R., & Ma, S. (2008). A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior. *Analytical biochemistry*, 373(2), 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.09.027>

Raghavan, M., & Bjorkman, P. J. (1996). Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annual review of cell and developmental biology*, 12, 181–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.181>

Rathore, A. S., & Winkle, H. (2009). Quality by design for biopharmaceuticals. *Nature biotechnology*, 27(1), 26–34. <https://doi.org/10.1038/nbt0109-26>

Rogers, R. S., Abernathy, M., Richardson, D. D., Rouse, J. C., Sperry, J. B., Swann, P., Wypych, J., Yu, C., Zang, L., & Deshpande, R. (2017). A View on the Importance of "Multi-Attribute Method" for Measuring Purity of Biopharmaceuticals and Improving Overall Control Strategy. *The AAPS journal*, 20(1), 7. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0168-3>

Rosenberg A. S. (2006). Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *The AAPS journal*, 8(3), E501–E507. <https://doi.org/10.1208/aapsj080359>

Rustandi, R. R., Washabaugh, M. W., & Wang, Y. (2008). Applications of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products. *Electrophoresis*, 29(17), 3612–3620. <https://doi.org/10.1002/elps.200700958>

Schellekens, H., Smolen, J. S., Dicato, M., & Rifkin, R. M. (2016). Safety and efficacy of biosimilars in oncology. *The Lancet. Oncology*, 17(11), e502–e509. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30374-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30374-6)

Scheurer, S., Junker, A. C., He, C., Schülke, S., & Toda, M. (2023). The Role of IgA in the Manifestation and Prevention of Allergic Immune Responses. *Current allergy and asthma reports*, 23(10), 589–600. <https://doi.org/10.1007/s11882-023-01105-x>

Schöneich C. (2022). Advanced Oxidation Processes in Pharmaceutical Formulations: Photo-Fenton Degradation of Peptides and Proteins. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8262. <https://doi.org/10.3390/ijms23158262>

Schroeder, H. W., Jr, & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>

Shaikh R, O'Brien DP, Croker DM, Walker GM (2018) The development of a pharmaceutical oral solid dosage forms. In: Computer aided chemical engineering. Elsevier, New York, pp 27–65

Shah, N. B., & Duncan, T. M. (2014). Bio-layer interferometry for measuring kinetics of protein-protein interactions and allosteric ligand effects. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (84), e51383. <https://doi.org/10.3791/51383>

Shi, Y., Li, Z., Qiao, Y., & Lin, J. (2012). Development and validation of a rapid capillary zone electrophoresis method for determining charge variants of mAb. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 906, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.08.022>

Skeene, K., Khatri, K., Soloviev, Z., & Lapthorn, C. (2021). Current status and future prospects for ion-mobility mass spectrometry in the biopharmaceutical industry. *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*, 1869(12), 140697. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140697>

Sodee, D. B., Malguria, N., Faulhaber, P., Resnick, M. I., Albert, J., & Bakale, G. (2000). Multicenter ProstaScint imaging findings in 2154 patients with prostate cancer. The ProstaScint Imaging Centers. *Urology*, 56(6), 988–993. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00824-4](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00824-4)

Sousa, F., Sarmiento, B., & Neves-Petersen, M. T. (2017). Biophysical study of bevacizumab structure and bioactivity under thermal and pH-stresses. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 105, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.019>

Staub, A., Schappler, J., Rudaz, S., & Veuthey, J. L. (2009). CE-TOF/MS: fundamental concepts, instrumental considerations and applications. *Electrophoresis*, 30(10), 1610–1623. <https://doi.org/10.1002/elps.200800782>

Staub, A., Guillarme, D., Schappler, J., Veuthey, J. L., & Rudaz, S. (2011). Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(4), 810–822. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.01.031>

Szekrényes, Á., Park, S. S., Santos, M., Lew, C., Jones, A., Haxo, T., Kimzey, M., Pourkaveh, S., Szabó, Z., Susic, Z., Feng, P., Váradi, C., de l'Escaille, F., Falmagne, J. B., Sejwal, P., Niedringhaus, T., Michels, D., Freckleton, G., Hamm, M., Manuilov, A., ... Guttman, A. (2016). Multi-Site N-glycan mapping study 1: Capillary electrophoresis - laser induced fluorescence. *mAbs*, 8(1), 56–64. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1107687>

Ter Horst, J. P., Turimella, S. L., Metsers, F., & Zwieters, A. (2021). Implementation of Quality by Design (QbD) Principles in Regulatory Dossiers of Medicinal Products in

the European Union (EU) Between 2014 and 2019. *Therapeutic innovation & regulatory science*, 55(3), 583–590. <https://doi.org/10.1007/s43441-020-00254-9>

Thompson, N. J., Rosati, S., Rose, R. J., & Heck, A. J. (2013). The impact of mass spectrometry on the study of intact antibodies: from post-translational modifications to structural analysis. *Chemical communications* (Cambridge, England), 49(6), 538–548. <https://doi.org/10.1039/c2cc36755f>

Todoroki, K., Mizuno, H., Sugiyama, E., & Toyo'oka, T. (2020). Bioanalytical methods for therapeutic monoclonal antibodies and antibody drug conjugates: A review of recent advances and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 179, 112991. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112991>

Tokunaga, Y., Takeuchi, K., Okude, J., Ori, K., Torizawa, T., & Shimada, I. (2020). Structural Fingerprints of an Intact Monoclonal Antibody Acquired under Formulated Storage Conditions via ¹⁵N Direct Detection Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of medicinal chemistry*, 63(10), 5360–5366. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00231>

Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 420. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>

Tugarinov, V., Hwang, P. M., Ollerenshaw, J. E., & Kay, L. E. (2003). Cross-correlated relaxation enhanced ¹H/¹³C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 125(34), 10420–10428. <https://doi.org/10.1021/ja030153x>

Urmann, M., Graalfs, H., Joehnck, M., Jacob, L. R., & Frech, C. (2010). Cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies: characterisation of a novel stationary phase designed for production-scale purification. *mAbs*, 2(4), 395–404. <https://doi.org/10.4161/mabs.12303>

Urva, S. R., & Balthasar, J. P. (2010). Target mediated disposition of T84.66, a monoclonal anti-CEA antibody: application in the detection of colorectal cancer xenografts. *mAbs*, 2(1), 67–72. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.1.10781>

U.S. Food and Drug Administration. (2011). Process validation: General principles and practices. [FDA Official Website](https://www.fda.gov/oc/ohrt/process-validation-general-principles-and-practices)

Usmani, S. S., Bedi, G., Samuel, J. S., Singh, S., Kalra, S., Kumar, P., Ahuja, A. A., Sharma, M., Gautam, A., & Raghava, G. P. S. (2017). THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. *PloS one*, 12(7), e0181748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181748>

- Valenzuela, N. M., & Schaub, S. (2018). The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. *Transplantation*, 102(1S Suppl 1), S7–S13. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001816>
- VanDuyse, S. A., Fulford, M. J., & Bartlett, M. G. (2021). ICH Q10 Pharmaceutical Quality System Guidance: Understanding Its Impact on Pharmaceutical Quality. *The AAPS journal*, 23(6), 117. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00657-y>
- Vugmeyster, Y., DeFranco, D., Pittman, D. D., & Xu, X. (2010). Pharmacokinetics and lung distribution of a humanized anti-RAGE antibody in wild-type and RAGE-/- mice. *mAbs*, 2(5), 571–575. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.13089>
- Vugmeyster, Y., Xu, X., Theil, F. P., Khawli, L. A., & Leach, M. W. (2012). Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. *World journal of biological chemistry*, 3(4), 73–92. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i4.73>
- Walsh G. (2010). Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug discovery today*, 15(17-18), 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.009>
- Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature biotechnology*, 24(10), 1241–1252. <https://doi.org/10.1038/nbt1252>
- Walsh G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature biotechnology*, 36(12), 1136–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>
- Wang W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceuticals. *International journal of pharmaceutics*, 289(1-2), 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.014>
- Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K., & Nema, S. (2007). Antibody structure, instability, and formulation. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(1), 1–26. <https://doi.org/10.1002/jps.20727>
- Wang, X., Das, T. K., Singh, S. K., & Kumar, S. (2009). Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies. *mAbs*, 1(3), 254–267. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.3.8035>
- Wang, W. H., Cheung-Lau, J., Chen, Y., Lewis, M., & Tang, Q. M. (2019). Specific and high-resolution identification of monoclonal antibody fragments detected by capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate using reversed-phase HPLC with top-down mass spectrometry analysis. *mAbs*, 11(7), 1233–1244. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1646554>
- Wang, Y., Zheng, C., Zhuang, C., Fu, Q., Zhang, B., Bian, Y., Qi, N., & Zhu, J. (2022). Characterization and pre-clinical assessment of a proposed biosimilar to its originator

Omalizumab. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 178, 106292. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106292>

Wang, J., Watson, J. L., & Lisanza, S. L. (2024). Protein Design Using Structure-Prediction Networks: AlphaFold and RoseTTAFold as Protein Structure Foundation Models. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 16(7), a041472. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041472>

Weise, M., Bielsky, M. C., De Smet, K., Ehmann, F., Ekman, N., Narayanan, G., Heim, H. K., Heinonen, E., Ho, K., Thorpe, R., Vleminckx, C., Wadhwa, M., & Schneider, C. K. (2011). Biosimilars-why terminology matters. *Nature biotechnology*, 29(8), 690–693. <https://doi.org/10.1038/nbt.1936>

White, J. R., Abodeely, M., Ahmed, S., Debaue, G., Johnson, E., Meyer, D. M., Mozier, N. M., Naumer, M., Pepe, A., Qahwash, I., Rocnik, E., Smith, J. G., Stokes, E. S., Talbot, J. J., & Wong, P. Y. (2019). Best practices in bioassay development to support registration of biopharmaceuticals. *BioTechniques*, 67(3), 126–137. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0031>

Whitmore, C. D., & Gennaro, L. A. (2012). Capillary electrophoresis-mass spectrometry methods for tryptic peptide mapping of therapeutic antibodies. *Electrophoresis*, 33(11), 1550–1556. <https://doi.org/10.1002/elps.201200066>

Wilson, I. A., & Stanfield, R. L. (1994). Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Current opinion in structural biology*, 4(6), 857–867. [https://doi.org/10.1016/0959-440x\(94\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0959-440x(94)90267-4)

Xu, Y., Wang, D., Mason, B., Rossomando, T., Li, N., Liu, D., Cheung, J. K., Xu, W., Raghava, S., Katiyar, A., Nowak, C., Xiang, T., Dong, D. D., Sun, J., Beck, A., & Liu, H. (2019). Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies. *mAbs*, 11(2), 239–264. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1553476>

Yan, B., Valliere-Douglass, J., Brady, L., Steen, S., Han, M., Pace, D., Elliott, S., Yates, Z., Han, Y., Balland, A., Wang, W., & Pettit, D. (2007). Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1164(1-2), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.063>

Yang, R., Tang, Y., Zhang, B., Lu, X., Liu, A., & Zhang, Y. T. (2015). High resolution separation of recombinant monoclonal antibodies by size-exclusion ultra-high performance liquid chromatography (SE-UHPLC). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 109, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.032>

Yao, H., Wynendaele, E., Xu, X., Kosgei, A., & De Spiegeleer, B. (2018). Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 147, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.031>

Yau, W. W., Kirkland, J. J., & Bly, D. D. (1979). *Modern size-exclusion liquid chromatography*. John Wiley & Sons.

Yu, L. X., Amidon, G., Khan, M. A., Hoag, S. W., Polli, J., Raju, G. K., & Woodcock, J. (2014). Understanding pharmaceutical quality by design. *The AAPS journal*, 16(4), 771–783. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9598-3>

Zeng, F., Yang, C., Gao, X., Li, X., Zhang, Z., & Gong, R. (2018). Comprehensive elucidation of the structural and functional roles of engineered disulfide bonds in antibody Fc fragment. *The Journal of biological chemistry*, 293(49), 19127–19135. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005367>

Zhou, T., & Lucy, C. A. (2010). Separation of carboxylates by hydrophilic interaction liquid chromatography on titania. *Journal of chromatography. A*, 1217(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.016>

Zobel-Roos, S., Mouellef, M., Siemers, C., & Strube, J. (2017). Process Analytical Approach towards Quality Controlled Process Automation for the Downstream of Protein Mixtures by Inline Concentration Measurements Based on Ultraviolet/Visible Light (UV/VIS) Spectral Analysis. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 6(4), 24. <https://doi.org/10.3390/antib6040024>

Υπεύθυνη δήλωση συγγραφέα:

«Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν. 1599/1986 η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής εργασίας και δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/ δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.»