

## Annotatsioon

Käesolevas lõputöös uuriti terapeutilise bispetsiifilise antikeha ONK1102 stabiilsust erinevates stressitingimustes, eesmärgiga hinnata molekuli sobivust kliiniliseks kasutamiseks vähiravis. ONK1102 on laboratoorselt konstrueeritud antikeha, mis on suunatud vähirakkude pinnal leiduva Kladiin-6 antigeeni vastu. Kuid lisaks kasvajakuga seondumisele suudab see molekul seonduda ka immuunsüsteemi tapjarakkudega, viies need vahetusse kontakti. Selle tulemusel aktiveerub immuunvastus, mis võimaldab vähirakkude sihipärast ja efektiivset hävitamist. Kirjeldatud mehhanism muudab bispetsiifilised antikehad paljulubavaks ravimeetodiks kaasaegses meditsiinis, pakkudes alternatiivi traditsioonilistele raviviisidele, nagu keemia- ja kiiritusravi.

Töö keskendus ONK1102 molekuli käitumise mõistmisele erinevatel stressitingimustel, mis võivad esineda nii tootmise, säilitamise, transpordi kui ka manustamise faasis. Stressifaktoriteks valiti temperatuurid 40 °C ja 50 °C, külmutamise ja sulatamise tsüklid temperatuuridega -75 °C ja +37 °C, ning mehaaniline agitatsioon 20 °C-l kiirusega 500 rpm. Lisaks hinnati katse teises osas pH 3 ja pH 9 mõju valgule temperatuuridel 25°C ja 37°C. Katsed viidi läbi koostöös Eesti biotehnoloogiaettevõttega Icosagen Cell Factory OÜ. Valkude struktuuri analüüsimiseks kasutati biofüüsikalisi analüüsimeetodeid NanoDSF ja SLS.

Tulemused näitasid, et ONK1102 struktuuri mõjutavad kõige rohkem järgmised stressitingimused: temperatuur 50 °C, happelises keskkonnas (pH 3) kehatemperatuuril 37 °C ning aluselises keskkonnas (pH 9) pikemaajalise kokkupuute korral temperatuuril 37 °C. Samas ei täheldatud olulisi muutusi temperatuuril 40 °C, agitatsiooni käigus, sulatamise-külmutamise tsüklites ega pH-tingimustel temperatuuril 25 °C. See viitab asjaolule, et valk talub mõõdukalt teatud ulatuses füsioloogilisi ja tootmisprotsessile sarnanevaid tingimusi, kuid vajab tingimuste kordamist, et tagada tulemuste suurem reprodutseeritavus ja usaldusväärsus.

Katsete jooksul tehti mitmeid meetodilisi täpsustusi ja pisemaid muudatusi - näiteks valgu kontsentratsiooni mõõtmine protsessi vaheetappides. Lisaks kujunes oluliseks  $T_0$ -proovi ehk kontrollproovi usaldusväärsus, kuna see on määrava tähtsusega stressitingimustes toimunud muutuste hindamisel.

Töö tulemusel saadi väärtuslik ülevaade ONK1102 molekuli füüsikalise-keemilise stabiilsusest, mis aitab kaasa selle edasisele arendamisele ja kliiniliseks kasutamiseks sobilikkuse hindamisele. Lisaks pakub töö kasulikke teadmisi laiemalt terapeutiliste valkude stabiilsusanalüüsist, struktuurist ja kvaliteedikontrollist, aidates seeläbi kaasa innovatiivsete vähiravimite väljatöötamisele.

## Abstract

This thesis investigated the stability of the therapeutic bispecific antibody ONK1102 under various stress conditions, with the aim of assessing the molecule's suitability for clinical use in cancer treatment. ONK1102 is a laboratory-engineered antibody that targets the Claudin-6 antigen found on the surface of cancer cells. In addition to binding cancer cells, this molecule is capable of interacting with immune system killer cells, bringing them into direct contact with the tumor cells. As a result, an immune response is triggered, enabling targeted and effective destruction of cancer cells. This mechanism makes bispecific antibodies a promising treatment strategy in modern medicine, offering an alternative to traditional therapies such as chemotherapy and radiation therapy.

The study focused on understanding the behavior of the ONK1102 molecule under different stress conditions that may occur during manufacturing, storage, transportation, and administration. The stress factors tested included temperatures of 40 °C and 50 °C, freeze-thaw cycles at -75 °C and +37 °C, and mechanical agitation at 20 °C and 500 rpm. Additionally, in the second part of the experiment, the effect of pH 3 and pH 9 was evaluated at temperatures of 25 °C and 37 °C. The experiments were conducted in collaboration with the Estonian biotechnology company Icosagen Cell Factory OÜ. To analyze changes in the protein structure, biophysical methods such as NanoDSF and Static Light Scattering (SLS) were used.

The results showed that the ONK1102 structure was most affected under the following stress conditions: a temperature of 50 °C, acidic conditions (pH 3) at body temperature (37 °C), and prolonged exposure to alkaline conditions (pH 9) at 37 °C. In contrast, no significant structural changes were observed at 40 °C, under agitation, during freeze-thaw cycles, or at 25 °C across the tested pH conditions. These findings indicate that the molecule exhibits moderate tolerance to certain physiological and production-related conditions. However, repeating some of the conditions is necessary to ensure greater reproducibility and reliability of the results.

Several methodological refinements and minor modifications were made during the experiments, such as measuring protein concentration at intermediate process steps. The reliability of the  $T_0$  sample, or control sample, also proved critical, as it plays a key role in assessing changes occurring under stress conditions.

As a result, this study provided a valuable overview of the physicochemical stability of the ONK1102 molecule, supporting its further development and evaluation for clinical use. Additionally, the thesis offers useful insights into the broader analysis of therapeutic protein stability, structure, and quality control, thereby contributing to the development of innovative cancer treatments.