

Peptidilääkkeiden aggregaation mittausmenetelmät

Detektioteknologian tutkimusryhmä

Laatija(t):

Kalle Mäntylä

20.06.2024

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Kandidutkielma

Oppiaine: Kemia

Tekijä(t): Kalle Mäntylä

Otsikko: Peptidilääkkeiden aggregaation mittausmenetelmät

Ohjaaja(t): Kari Kopra

Sivumäärä: 23 sivua

Päivämäärä: 20.06.2024

Peptidilääkkeiden suosio on kasvanut muutaman viime vuosikymmenen aikana huomattavasti ja on lupaava tulevaisuuden alue lääkekehityksessä. Peptidilääkkeet ovat peptidejä, joilla on jokin farmaseuttinen käyttötarkoitus. Peptideillä on taipumus aggregoitua, jossa väärin laskostuneet peptidit kerääntyvät ja kasautuvat yhteen. Peptidilääkkeiden tapauksessa aggregointia pyritään estämään, sillä se voi johtaa lääkkeen tarkoitetun vaikutuksen heikkenemiseen ja mahdollisesti myrkyllisyyden lisääntymiseen. Näin ollen peptidilääkkeiden aggregaation arviointi on tärkeää niiden tehokkuuden ja turvallisuuden varmistamiseksi farmaseuttisessa kehityksessä ja lopullisessa tuotteessa.

Tämä tutkielma perehtyy peptidilääkkeiden löytämiseen, mitä peptidien aggregaatio on, miten siihen voidaan vaikuttaa ja minkä takia se on olennaista peptidilääkkeiden kehityksessä. Pääasiana käydään läpi erilaisia menetelmiä, joita voidaan käyttää peptidilääkkeiden aggregaation arvioimiseen. Tutkielmassa käydään läpi spektroskooppisia menetelmiä, kuten UV-vis-absorptiota ja fluoresenssispektroskopiaa, jotka ovat helppoja ja nopeita tapoja tunnistaa aggregaatteja. Toiseksi käsitellään kromatografisia menetelmiä, kuten epäsymmetristä virtauskentän virtausfraktiointia (AF4) ja geelisuodatusta (SEC), jotka mahdollistavat aggregaattien kvantitatiivisen analyysin ja erottelun monimutkaisissa seoksissa. Lisäksi perehdymme dynaamisen valon sirontaan (DLS), kiinteä-tilan ydinmagneettiseen resonanssiin (ssNMR) ja transmissioelektronimikroskopiaan (TEM), jotka tarjoavat tietoa aggregaatin koosta ja rakenteesta. Käsittelemme kunkin menetelmän etuja ja haittoja, ja miten oikean menetelmän valinta riippuu esimerkiksi näytteen määrästä ja konsentraatiosta.

Avainsanat: peptidilääke, aggregaatio, spektroskopia, geelisuodatus, dynaamisen valon sironta

Sisällysluettelo

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1. | Lyhenneluettelo | 4 |
| 2. | Johdanto | 5 |
| 3. | Peptidilääkkeet | 6 |
| 2.1 | Peptidilääkkeiden löytäminen | 8 |
| 2.2 | Aggregaatio | 9 |
| 2.3 | Aggregaatioon vaikuttaminen | 10 |
| 3 | Mittausmenetelmiä aggregaattien arviointiin | 11 |
| 3.1 | UV-vis absorptio spektroskopia | 12 |
| 3.2 | Fluoresenssi spektroskopia | 13 |
| 3.3 | Epäsymmetrinen virtauskentän virtausfraktiointi..... | 15 |
| 3.4 | Geelisuodatus | 16 |
| 3.5 | Dynaaminen valonsironta | 17 |
| 3.6 | Kiinteä-tila ydinmagneettinen resonanssi | 18 |
| 3.7 | Transmissioelektronimikroskopia | 19 |
| 4. | Yhteenveto..... | 20 |
| 5. | Viitteet | 21 |

1. Lyhenneluettelo

GLP-1 = Glukagonin kaltainen peptidi 1

SPPS = Kiinteä-faasi peptidi synteesi

LPPS = Neste-faasi peptidi synteesi

PPI = Proteiini-Proteiini vuorovaikutus

ThT = Tioflaviini T

ssNMR = Kiinteä-tila ydinmagneettinen resonanssi

SEC = Geelisuodatus

DLS = Dynaaminen valonsironta

TEM = Transmissioelektronimikroskopia

AF4 = Epäsymmetrinen virtauskentän virtausfraktiointi

MALS = Monikulmavalonsironta

2. Johdanto

Peptidi on ketju aminohappoja, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa peptidisidoksin. Niiden molekyyliaino on 500-10,000 Da luokkaa, joka vastaa noin 5-100 aminohappoa. Tätä raskaampia molekyyliä kutsutaan proteiineiksi. Peptidilääkkeet ovat peptidejä, joilla on jokin farmaseuttinen tarkoitus. Ne ovat myös biologisia lääkkeitä, joiden määritelmä on valmiste, joka sisältää terveen elimistön tuottamaa ainetta. Peptidilääkkeet saapuivat lääkealalle 1920-luvulla insuliinin löytämisen ja kehittämisen kautta. Siitä lähtien peptidilääkkeitä on kehitetty useita kymmeniä, ja lääkkeitä on sovellettu monien sairauksien, kuten syövän hoitoon. Peptidien puhdistukseen ja synteisiin, rakenteen selvittämiseen ja sekvensointiin käytetyt tekniikat ovat edistyneet merkittävästi mikä on helpottanut peptidilääkkeiden kehitystä. Kiinteä-faasi peptidi synteesi (SPPS) on nopeampi, tehokkaampi ja taloudellisempi tapa syntetisoida peptidejä verrattuna aikaisempaan suosittuun neste-faasi peptidi synteisiin (LPPS). SPPS mahdollistaa pidempien peptidien synteessin (yli 5 aminohappoa), ja ylimääräisten reagenssien käyttöä, jotka nopeuttavat reaktioita. Nämä reagenssit voidaan myös poistaa helpommin verrattuna LPPS:sään. SPPS on suosittu teknologia syntetisoida peptidilääkkeitä.

Aggregaatio on luonnollinen ilmiö kaikille proteiineille ja peptideille. Tätä ilmiötä yleisesti pyritään välttämään tai estämään, sillä muodostuneet aggregaatit voivat johtaa ei-haluttuihin vaikutuksiin. Esimerkiksi elimistön sisäisessä aggregaatiossa muodostuneet proteiini aggregaatit ehdotetaan olevan osallisena lukuisiin sairauksiin, kuten Alzheimerin ja Parkinsonin tautiin. Peptidilääkkeiden tapauksessa aggregaatiota pyritään välttämään, sillä se voi johtaa peptidilääkkeen tarkoitetun vaikutuksen heikkenemiseen ja mahdolliseen myrkyllisyyteen. Koska aggregaatio voi mitätöidä peptidilääkkeen farmaseuttiset vaikutukset, sen estäminen lisää tuotteen elinikää. Aggregaatio voi johtaa lukuisiin ei-haluttuihin vaikutuksiin, joten aggregaation arviointi ja sen prosessin ymmärtäminen on tärkeä alue peptidilääkkeiden kehitykselle.

Aggregaattien analyysiin on kehitetty useita mittausmenetelmiä. Spektroskooppiset menetelmät, kuten UV-vis ja fluoresenssi, ovat nopeita tapoja peptidien arviointiin. Näitä menetelmiä voidaan suorittaa pienellä näytemäärällä, ja niiden toteutus ja saatavuus verrattuna

monimutkaisempiin menetelmiin, kuten ssNMR:ään, tekevät niistä ensimmäisen valinnan aggregoinnin arviointiin. ssNMR on erityisen hyvä lähestymistapa aggregaattien rakenneanalyysiin ja biologisten järjestelmien dynaamisen tiedon saamiseen. Kun halutaan kuvantaa aggregaatteja, kryo-transmissio-, lähetys- ja pyyhkäisyelektronimikroskoopit ovat arvokkaita metodeja. Nämä kuvantamistyökalut antavat tietoa morfologiasta ja topologiasta. Yleensä kuvantamista edeltää aggregaattien erottaminen, joka voidaan suorittaa esimerkiksi geelisuodatuksella.

Päätös siitä, mitä menetelmiä käytetään, riippuu pitkälti laboratoriolaitteiden saatavuudesta ja arvioinnista mitä analyysia aggregaateista halutaan suorittaa. Tässä työssä tullaan käsittelemään useita menetelmiä, joita voidaan käyttämään aggregaattien eri ominaisuuksien analyysiin, ja mitä asioita tulee harkita näytteiden valmistamisessa. Tarkoituksena on kehittää ymmärrystä millä tavoin menetelmät käyttävät peptidien ja niistä muodostuneiden aggregaattien ominaisuuksia hyväksi mittausten mahdollistamiseksi.

3. Peptidilääkkeet

Peptidi on pienikokoinen aminohappoketju, joka yleensä koostuu alle 50 aminohaposta. Sen rakenne voi olla stabiloitu esimerkiksi kovalenttisesti kahden kysteiinin rikkiatomien välillä muodostuneella disulfididisidoksella tai tyypillisillä ei-kovalenttisilla vuorovaikutuksilla.¹ Peptideitä käytetään lääkkeinä niiden ominaisuuksien vuoksi, ja koska niillä on luonnollisesti biologisia tehtäviä ihmiskehossa. Kehossa ne voivat toimia esimerkiksi agonistina, antagonistina, modulaattorina, välittäjänä, hormonina ja entsyymi-inhibiittorina. Näiden tehtävänä on välittää biokemiallinen viesti kohteelle, josta aiheutuu erilaisia biologisia vaikutuksia. Peptidilääkkeitä voidaan syntetisoida täyttämään jonkin näistä tehtävistä. Esimerkiksi, jos kahden proteiinin välistä vaikutusta halutaan estää, peptidejä voidaan syntetisoida proteiinivuorovaikutuksen inhibiittoreiksi.

Peptidilääkkeet voidaan jakaa kolmeen kategoriaan: natiivi, analogi ja heterologi. Natiivi peptidi on käytännössä sama kuin kehon luonnostaan tuottama peptidi. Useimmat peptidilääkkeet kuuluvat tähän kategoriaan, sillä nämä jäljittävät jotain kehon tunnettua peptidiä kohteeltaan ja vaikutukseltaan. Esimerkki natiivista peptidistä on hormoni insuliini, jota haima tuottaa normaalissa toiminnassa. Analogi on peptidi, jolla on sama käyttötarkoitus

kuin jollain natiivilla peptidillä, mutta sitä on modifoitu parantaakseen sen lääkeominaisuuksia. Modifointi käytännössä tarkoittaa aminohapon vaihtamista toiseen. Insuliinista on johdettu analogeja, jotka ovat esimerkiksi pitkä- tai nopeavaikutteisia. Heterologit ovat peptidejä, jotka ovat täysin itsenäisiä natiiveista peptideistä. Nämä peptidit löydetään esimerkiksi faaginäytön kautta, kuten romiplostimia, jota käytetään immunologisen trombosytopenian hoitoon.⁶ Peptidejä myös voidaan käyttää erilaisten lääkeaineiden kuljetukseen.³

Ymmärrys peptidien hyvistä ja huonoista ominaisuuksista auttaa lääkekehityksessä, varsinkin kun tiedetään mihin tarkoitukseen jotain lääkettä halutaan valmistaa. Peptidien pienikokoisuuden vuoksi peptideillä on suuri sitoutumisaffiniteetti ja korkea kohdespesifisyys. Tämä spesifisyys ja peptidien tapa olla kerääntymättä sisäelimiin vähentävät sivuoireiden ilmenemistä.² Huonoa puolena peptidilääkkeillä on heikko stabiilisuus *in vivo* ja ne poistuvat kehosta nopeasti. Peptidilääkkeiden merkittävät hyvät ja huonot puolet on listattu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Peptidilääkkeiden hyvät ja huonot ominaisuudet.

| Hyvät ominaisuudet | Huonot ominaisuudet |
|---|-------------------------------|
| Korkea vaikutusteho | Metabolinen epävakaus |
| Korkea kohdespesifisyys ja selektiivisyys | Heikko kalvon läpäisevyys |
| Laaja kohde valikoima | Huono oraalinen hyötyosuus |
| Alhainen myrkyllisyys | Huono liukoisuus |
| Vähän haittavaikutuksia | Nopea poistuminen |
| Alhainen kertyminen kudoksiin | Korkeat valmistuskustannukset |
| Korkea biologinen ja kemiallinen monimuotoisuus | Huono aktiivisuus |

2.1 Peptidilääkkeiden löytäminen

Useimmat peptidilääkkeet jäljittävät jotain peptidiä, jota keho tuottaa normaalissa toiminnassa. Peptidilääkkeiden kehityksen ensimmäisiä strategioita oli käyttää hyväksi luonnollisia peptidejä, joiden toiminnat tiedettiin hyvin. Tämä johti ensimmäiseen peptidilääkkeeseen, insuliiniin, joka säätelee ihmisen verensokeritasoja. Diabetesta voidaan myös hoitaa stimuloimalla kohteita, kuten GLP-1 reseptoria, joka lisää insuliinin tuotantoa. GLP-1 reseptorin agonisteista on johdettu useita analogisia peptidilääkkeitä, joiden tarkoituksena on parantaa agonistin vakautta.

Peptidilääke-ehdokkaiden löytämiselle on kehitetty ”peptidien rationaalinen suunnittelu”-teknologia, joka perustuu PPI:iden tunnettuun kiderakenteeseen.¹ PPI tarkoittaa proteiini-proteiini vuorovaikutusta, yleisimmin tarkoittaen osallistumista soluviestinnän säätelyyn. Peptidien rationaalinen suunnittelu, käyttäen laskennallista analyysia, pystyy tunnistamaan aminohappoja, jotka esiintyvät kahden vuorovaikutuksessa olevan proteiinin pinnalla. Pienempiin molekyyliin verrattuna, peptidit ovat parempia PPI:iden estäjiä tai aktivaattoreita. Tämä on koska peptidit ovat suurempia molekyyliä ja niillä on joustavampi runko pienempiin molekyyliin verrattuna.

Toisena peptidilääkkeiden löytämisteknologiana käytetään faaginäyttöä. Menetelmä perustuu bakteriofagien, eli bakteereja infektoivien virusten, kykyyn esittää peptidisekvenssejä niiden pinnalla. Näistä faageista ilmenee suuri määrä erilaisia peptidisekvenssejä, joita sitten voidaan inkuboida kohdemolekyylin kanssa. Peptidit erotetaan ei-sitoutuvista, ja sitoutuvien peptidien lääkinnällisiä mahdollisuuksia voidaan tutkia. Faaginäyttöä on käytetty muun muassa GLP-1 reseptorin agonistin analogien löytämiseen.¹

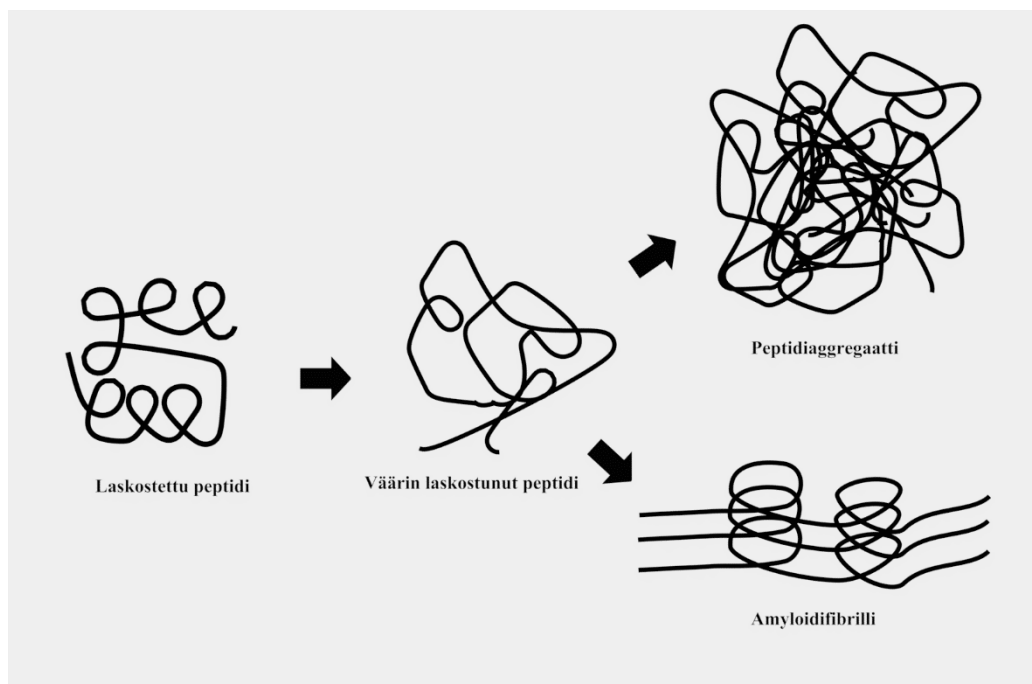
Yleisesti peptidilääkkeiden kehitys prosessi alkaa kohteen identifioinnilla ja kohteen fysiologisen roolin ymmärtämisellä. Kohteen tietämisen jälkeen arvioidaan, tunnetaanko jokin natiivi peptidi, joka tiedetään sitoutuvan haluttuun kohteeseen. Jos kohteella ei ole tunnettua natiivia peptidiä, tutkitaan, miten peptidilääkettä voidaan kehittää siten, että se olisi vuorovaikutuksessa kohteen kanssa halutulla tavalla. Potentiaalisia peptidilääkkeitä

syntetisoidaan ja testataan joko *in vitro* tai *in vivo*. Testauksessa arvioidaan, sitoutuuko peptidilääke kohdemolekyylisiin ja toimiiko se halutulla tavalla. Potentiaalisia peptidilääkkeitä, jotka läpäisevät ensimmäisen testin, on mahdollisuus optimoida muuttamalla niiden aminohappoketjuja. Käytännössä tämä tarkoittaa yhden aminohapon vaihtamista toiseen. Optimointi voi parantaa selektiivisyyttä, stabiilisuutta ja muita farmakologisia ominaisuuksia. Peptidiä muokataan siten, että peptidin vuorovaikutus halutun kohteen kanssa olisi mahdollisimman vahva ja spesifinen, jotta peptidilääkkeen haittavaikutukset ovat vähäiset tai jotta se vaikuttaa halutulla nopeudella, kuten insuliinin kohdalla.

Peptidilääkkeiden synteesiin käytetään yleisimmin SPPS teknologiaa. SPPS on sykli, jossa aminohappojen karboksyyli-ryhmä kiinnitetään kiinteään polymeerihartsiin. Polymeerihartsin tarkoitus on viedä aminoryhmän tai vapaat karboksyyli-ryhmät peptidin C-terminaaliin (C-terminaali on aminohappoketjun loppu, jossa on karboksyyli-ryhmä). Aminohappojen amiiniryhmät suojataan erilaisilla kemiallisilla ryhmillä, jotka poistetaan synteesin lopussa. Poistaminen tapahtuu, koska ne voivat aiheuttaa aggregaatiota ja ovat epäpuhtauksia peptidilääkkeessä. SPPS:llä saadaan aikaan tarkasti kontrolloitu ja tehokas peptidilääkesynteesi, mikä on erityisen tärkeää lääkekehityksessä, koska peptidilääkkeiden puhtaus ja tarkka sekvenssi ovat kriittisiä sen biologisen aktiivisuuden ja turvallisuuden kannalta.

2.2 Aggregaatio

Ajan kuluessa tai olosuhteiden muuttuessa, peptidien rakenne voi destabiloitua, joka voi johtaa aggregaatioon. Aggregaatiota voidaan yleisesti kuvata prosessina, joka johtaa peptidien kasautumiseksi useiksi polypeptidiketjuiksi, jotka voivat olla oligomeereja tai fibrillejä. Tämä prosessi on havainnollistettu kuvassa 1. Peptidilääkkeessä aggregaatit voivat johtaa vaikutuksen heikkenemiseen ja mahdollisesti myrkyllisyyden lisääntymiseen. Olosuhteet kuten paine, lämpötila ja agitaatio kaikki vaikuttavat aggregaatioon. Fysikaalisten parametrien lisäksi aggregaatioon vaikuttavat aminohapposekvenssi, konsentraatio, pH, nettovaraus, pinnat ja epäpuhtaudet.⁶ On huomioitavaa tutkimuksen kannalta, että aggregaattien koko ja muoto voivat vaihdella niitä aiheuttamien olosuhteiden mukaan. Käytännössä tämä tarkoittaa muodostuuko järjestäytyneitä vai epäjärjestyneitä aggregaatteja.



Kuva 1. Peptidilääkkeiden aggregaattien muodostuminen. Peptidin rakenne muuttuu, jolloin se voi muodostaa aggregaatteja, esimerkiksi olosuhteiden vaikutuksista. Väärin laskostunut peptidi voi joko muodostaa peptidiaggregaatteja tai amyloidifibrillejä. Peptidiaggregaatit ovat väärin laskoistuneiden peptidien kasaantumia. Amyloidifibrillit ovat liukenemattomia vesipitoisiin ympäristöihin ja muodostuvat β -levyrakenteista.

2.3 Aggregaatioon vaikuttaminen

Peptidien konsentraatiolla on huomattava vaikutus peptidien fyysiseen vakauteen ja siten aggregaatioon. Korkeat konsentraatiot tuovat esiin ongelmia kuten hapettumista, deamidointia ja aggregaatiota, jotka kaikki vaikuttavat peptidin vakauteen. Monet kineettiset tutkimukset ovat osoittaneet ydintymis-polymerisaatiomekanismin tapahtuvan korkeissa konsentraatioissa, joka johtaa amyloidifibrillien muodostumiseen. Ydintymis-polymerisaatiomekanismin ydintymis vaiheessa monomeerit tulevat yhteen muodostaen ytimen. Tämän jälkeisessä polymerisaatiossa lisää monomeerejä liittyy ytimen päihin. On todistettu, että alhaisissa konsentraatioissa ydintymis-polymerisaatiomekanismi ei ole merkittävä ongelma.⁷ Peptidilääkkeiden säilöntäkonsentraatio on ominainen kullekin peptidille, esimerkiksi insuliinia säilötään 1–10 $\mu\text{g/ml}$ ja oksitosiinia 16,7 $\mu\text{g/ml}$.²⁸

Aggregaatioon voidaan vaikuttaa puskurilla. Puskurin pH-arvo vaikuttaa vahvasti peptidin stabiilisuuteen. Lääkekehityksessä yleisimmät puskurit ovat asetaatti, sitraatti, histidiini, fosfaatti, Tris ja glysiini. Puskuriin voidaan lisätä inhibiittoreita tai/ja stabilaattoreja.

Inhibiittorit moduloivat fysikaalisia parametrejä, esimerkiksi pH:ta tai lämpötilaa, estäen aggregaattien muodostumista. Stabilaattorit voivat estää joko aggregaattien välisiä vuorovaikutuksia tai stabilisoimalla peptidien monomeeri tilaa, edistäen laskoutumista tai konformaatiovakautta. Stabilaattori voi sitoutua peptidin natiivitilaan estäen aggregaatiolle alttiiden laskostumattomien monomeerien muodostumista. Esimerkiksi insuliinin aggregaatiota pyritään estämään stabilisoimalla insuliinimolekyylin heksameeritilaa lisäämällä fenolia ja sinkkiä.

3 Mittausmenetelmiä aggregaattien arviointiin

Peptidiaggregaattien analyysissa on huomioitava useita tekijöitä, jotka vaikuttavat mittausmenetelmän valintaan. Mitattavan peptidin aminohapposekvenssin tietäminen avustaa esimerkiksi UV-vis spektroskopia mittauksissa, kun tiedetään mitä absorptiohuippuja odotetaan. Jotkin menetelmät, kuten DLS, tarvitsevat riittävän natiivi peptidi/aggregaatti suhteen, jotta tulosten resoluutio olisi hyvä. Analysoitavan näytteen konsentraatio ja sen puskuriliuoksen aineet tulee valita mittausmenetelmä kohtaisesti. Mittausmenetelmän valinta riippuu siitä, mitä aggregaattien ominaisuuksia halutaan tutkia. UV-vis spektroskopia ja fluoresenssi ovat menetelmiä, joista saadaan tietoa aggregaattien määrästä, kun taas SEC:tä ja AF4:ää käytetään aggregaattien erottamiseen natiivista peptidistä. Mitä enemmän tietoa halutaan saada aggregaateista, sitä monimutkaisempia menetelmiä vaaditaan. Esimerkiksi ssNMR antaa hyvin tietoa aggregaattien rakenteesta, mutta on ajallisesti ja taloudellisesti vaativa. Kuvantamista halutessa on hyvä ensin erottaa aggregaatit, esim. SEC, ja sitten kuvantaa ne, esim. TEM.

3.1 UV-vis absorptio spektroskopia

UV-vis spektroskopia on nopea ja yksinkertainen tapa mitata aggregaatiota. Tämä menetelmä mittaa ultravioletin ja näkyvän valon absorptioon määrän näytteessä. Menetelmässä tiettyä aallonpituutta omaavaa valoa ohjataan näytettä sisältävän kyvetin läpi kohti sensoria, joka mittaa näytteen läpäisevän valon.

Koska peptidilääke ja siitä muodostuneet aggregaatit absorboivat eri määrän valoa, menetelmää voidaan käyttää aggregaation analyysiin.⁸ Aggregaatteja voidaan mitata suorasti aggregaateista sironneen valon kautta tai epäsuorasti peptidirakenteen muuttumisen kautta. Epäsuorametodi tarkoittaa peptidien aromaattisten aminohappojen absorptioon mittaamista, jonka kautta voidaan nähdä peptidirakenteen muuttumista aggregaation yhteydessä. Peptidin eri aminohapot absorboivat valoa eri aallonpituuksilla ja peptidisidokset absorboivat valoa vahvasti 190 nm alueella ja heikosti 210-220 nm välillä. Aromaattisten aminohappojen maksimi absorbanssit ja aallonpituudet ovat lueteltu taulukossa 2. Tryptofaania ja tyrosiinia käytetään peptidikonsentraation määrittelyyn niiden vahvan absorptioon takia. Yleensä peptidien absorbanssi on lähellä nollaa yli 310 nm mutta, on havaittu, että joskus aromaattisia aminohappoja sisältämättömät peptidiaggregaatit absorboivat valoa yli 350 nm aallonpituudella.⁹

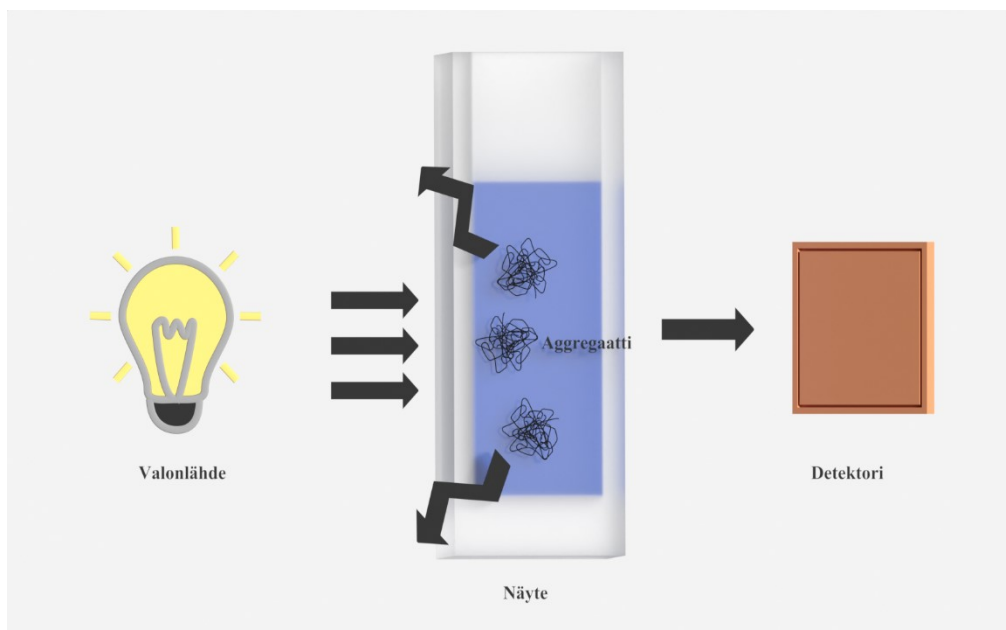
Aggregaatteja voidaan myös mitata suorasti, sillä niihin osunut valo siroaa ja siten tuleva valo heikkenee, kuten havainnollistettu kuvassa 2. Tämä aiheuttaa sameutta, joka voidaan laskea seuraavalla kaavalla:

$$\tau = -\ln(I/I_0) = -2.3 OD$$

missä $OD = A + S$. A on absorbanssi ja S on sironnut valo. Sameutta yleensä mitataan aallonpituudella, joka on yli 320 nm, missä aromaattisten aminohappojen absorbanssi on olematon ja havaitut absorbanssit ovat aggregaattien aiheuttamia. Aggregaation arvointiin voidaan myös käyttää aggregaatio indeksii, joka kuvaa aggregaation määrää näytteessä. Tämän kaava on seuraava:

$$AI = A_{350} / (A_{280} - A_{350}) * 100$$

A on absorbanssi alaindeksissä mainitussa aallonpituudessa. AI:n ollessa alle 3, näyte voidaan olettaa olevan ilman aggregaatiota, ja yli 30 kuvaa vahvaa aggregaatiota.



Kuva 2. Aggregaattien suora mittaus. Valonlähteestä tuleva valo osuu näytteessä oleviin aggregaatteihin ja siroaa. Vain osa tulevasta valosta läpäisee näytteen ja päätyy detektoriin.

UV-spektroskopiaa käytettäessä on hyvä tietää, että itse mittaus voi muuttaa peptidin rakennetta. Tutkimuksessa insuliinin absorbanssi aallonpituuksissa 276 nm ja 285 nm nousi sitä enemmän mitä pidempään näyte oli alttiina UV-valolle (276 nm).¹⁰ Näin ollen, saman näytteen mittauksen erot eivät välttämättä kuvaa aggregaation lisääntymistä, vaan peptidirakenteen muuttumista.

Taulukko 2. Aromaattisten aminohappojen absorbanssi ja fluoresenssi.

| Aminohappo | Absorbanssi | | Fluoresenssi | |
|-----------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| | λ max (nm) | ϵ max ($M^{-1} cm^{-1}$) | ϵ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$) | λ max (nm) |
| Tryptofaani | 280 | 5600 | 5500 | 355 |
| Tyrosiini | 275 | 1400 | 1490 | 204 |
| Fenyyialaniini | 258 | 200 | 200 | 282 |

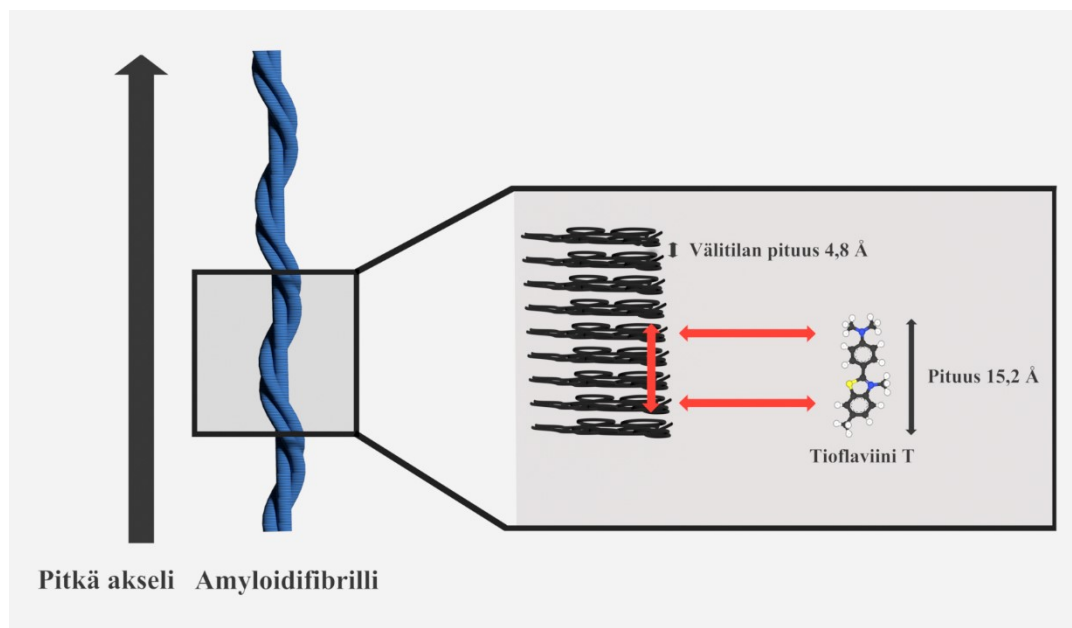
3.2 Fluoresenssi spektroskopia

Fluorofori on molekyyli, joka absorboi valoa tietyllä aallonpituudella ja säteilee eri aallonpituudella. Fluoresenssi tapahtuu fluoroforin virittyessä korkeammalle värähtelytasolle fotonien absorption vaikutuksesta ja myöhemmin viritystilän purkautuessa emittoi matalamman energiasen fotonin. Fluoresenssi sopii hyvin peptidien mittauksiin, sillä monet

peptidit sisältävät syklisiä aminohappoja, jotka toimivat fluoroforeina. Aggregaatiota tutkittaessa, tämä menetelmä on hyödyllinen sen herkkyyden vuoksi.¹¹

Fluoresenssi mittaukset perustuvat syklisten aminohappojen, tyrosiinin, tryptofaanin ja fenyylialaniini, fluoresenssi ominaisuuksiin. Tryptofaani ja tyrosiini voidaan virittää 275-280 nm välillä, ja fenyylialaniini 258 nm. Vastaavasti aminohappojen emissioaallonpituudet ovat 350 nm, 304 nm ja 282 nm. Peptidimolekyyleihin voidaan myös liittää fluoresoivia leimoja joko kovalenttisin tai ei-kovalenttisin sidoksin. Kovalenttinen sidos voidaan muodostaa esimerkiksi N-terminaaliin (aminohapposekvenssin amidiloppupää), tai suoraan lysiinin aminoryhmään tai kysteiinin tioliryhmään. Lysiini tai kysteiini voi olla missä tahansa aminohapposekvenssissä. Ei-kovalenttinen sitoutuminen tapahtuu yleensä, kun leimat sitoutuvat hydrofobisiin taskuihin, jotka voivat olla läsnä aggregaateissa. Käytettävän leiman valinta riippuu aggregaatin tyypistä. Yksi esimerkki käytetyistä leimoista on tioflaviini T (ThT), jolla on korkea selektiivisyys järjestyneille aggregaateille (Kuva 2). Muita käytettyjä leimoja ovat rodamiini b ja kongopunainen. Leimat eroavat niiden sitoutumistavan, viritys- ja emissioaallonpituuksien mukaan. On hyvä tietää, että suuri määrä kiinnittyneitä leimoja voi aiheuttaa aggregaatiota. Näin ollen, on hyvä suorittaa kokeita leimojen läsnä ja poissa ollessa.

Fluoresenssi mittauksia voidaan suorittaa reaaliaikaisesti tai päätepisteinä. Reaaliaikainen mittaus mahdollistaa peptidien aggregaation kinetiikan seuraamisen ajan kuluessa. Näin saadaan tietoa aggregoitumisnopeudesta ja -mekanismista ja voidaan seurata aggregaattien kasvua ja ydintymistä, ja esimerkiksi seurata reaaliajassa inhibiittorien vaikutusta. Päätepiste mittaukset ovat nopeampia, vähemmän dataa tuottavia verrattuna reaaliaikaisiin mittauksiin. Nämä tarjoavat tilannekuvan aggregoinnista tietyllä ajanhetkellä. Päätepiste mittaukset ovat hyviä esimerkiksi tarvittaessa verrata näytteitä, jotka ovat käsitelty eri olosuhteissa tai aineilla.



Kuva 2. ThT:n sitoutuminen amyloidifibrilliin. ThT sitoutuu sivuketjun kanaviin, jotka ovat pitkin amyloidifibrillien pitkää akselia.²⁷ Sitoutumiskohdan fibrillipinta on ehdotettu kattavan vähintään neljä β -juostetta.

Fluoresenssikokeita tehdessä on otettava huomioon näytteen absorptio, sillä sen korkea arvo voi aiheuttaa häiriötä tutkimustuloksiin. Korkea absorbanssi aiheuttaa virityssäteen vaimenemisen, ja seurauksena on, että ainoastaan virityssäteen puoleinen osa näytteestä fluoresoi. Yleisenä sääntönä on ehdotettu välttämään näytteitä, joiden absorbanssi on yli 0,05.¹⁰

3.3 Epäsymmetrinen virtauskentän virtausfraktiointi

Epäsymmetrinen virtauskentän virtausfraktiointi (AF4) on menetelmä, jota voidaan käyttää aggregaattien fraktiointiin ja erotukseen. Menetelmä perustuu liikkuvuuden eroihin virtauskentässä, joka on aiheutettu nestevirtauksella kalvon yli ja kanavan poikki. AF4 tekniikkaa on käytetty 2000-5000 Da painoisten (n. 20-50 aminohappoa) peptidien tutkimiseen.²⁹ AF4:n kyky erottaa alle mikrometrin kokoisia aggregaatteja on menetelmän vahvuus, joka on erityisen oleellista immunogeenisten aggregaattien tunnistamisessa.¹⁹

Menetelmää käyttäessä on tärkeää huomioida liikkuvan faasin koostumus, sillä neste voi johtaa vuorovaikutuksiin analyttien välillä. Faasin koostumus on hyvä olla samanlainen kuin näytteen matriisi. Tämä tarkoittaa valitsemalla faasin pH, ionivahvuus, suolat ja muut lisäaineet samanlaiseksi kuin näytteessä.²⁰ Oleellista erotusmenetelmille on näytteiden laimennus, joka

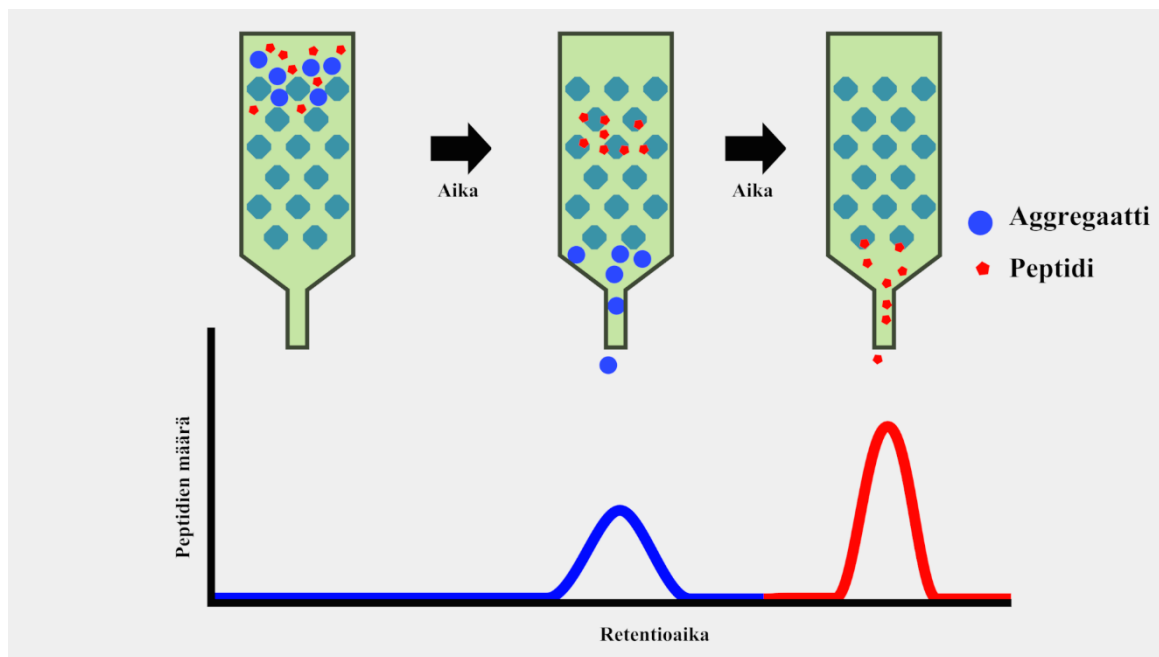
mahdollistaa dissosiaatiovakion määrittämiseen. Näyte laimennetaan AF4 mittauksen aikana 2-4x. Laimennus voi myös johtaa löyhien aggregaattien dissosiaatioon. Tutkimukset ovat ehdottaneet, että pienet ja suuret aggregaatit hajoavat pienemmiksi osiksi laimennuksen vaikutuksesta, joka johtaa tulosten vääristymiseen.¹¹

3.4 Geelisuodatus

Geelisuodatus (SEC), eli kokoerottelukromatografia, on tapa kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti arvioida aggregaatteja. Geelisuodatus perustuu molekyylien erotteluun niiden koon mukaan, ja koska aggregaattien molekyylikoko on suurempi kuin itse peptidilääkkeen. Näyte syötetään erottelumatriisin läpi, joka sisältää partikkeleita, jotka suodattavat molekyylit niiden kokojen mukaan. Tämän erottelumatriisin huokoskoko määrittelee minkä kokoisia partikkeleita menetelmä suodattaa, joten erottelumatriisi valitaan mitattavan peptidin mukaan. SEC:tä voidaan käytännössä käyttää kaikkien peptidien arviointiin, mutta jos partikkelikoot ylittävät 10 nm, AF4 on parempi vaihtoehto. SEC:n tehokkuus heikkenee mitä suurempia partikkelit ovat, sillä näytteen eri aineet voivat eluoitua yhdessä johtaen huonoon resoluutioon. Jotta mittaustulosten resoluutio olisi hyvä, suodatettujen molekyylien koko tulisi erota vähintään 10 prosenttia.

Detektiona SEC analyysissä yleensä käytetään UV:ta tai MALS:ia (Monikulmavalonsironta). UV:n aallonpituus asetetaan arvoon (214 tai 220 nm) missä peptidisidokset absorboivat sitä tehokkaasti. Alhainen aallonpituus (< 200 nm) on herkempi alhaisten konsentraation näytteille ja korkeampi aallonpituus (200–400 nm) sallii paremman dynaamisen alueen. Nämä kaksi aallonpituus aluetta voidaan yhdistää kahden aallonpituuden detektiolla saavuttaen kattavan analyysin, jolla voidaan laskea aggregaattien osuuden näytteessä. MALS:illa voidaan määrittää näytteen koko ja muoto, mutta jos halutaan tietää myös konsentraatio, MALS täytyy yhdistää toiseen mittausmenetelmään, kuten UV-detektioon. Tämä on, koska MALS on riippuvainen näytteen konsentraatiosta ja absorptiokertoimesta.¹² Detektiona voidaan myös käyttää fluoresenssia, mutta tämä vaatii peptidin sisältävän tryptofaania, jonka fluoresenssia mitataan. Tämä detektiotapa on tarkempi niissä tapauksissa missä apuaineet eluoituvat lähellä analysoitavaa peptidiä.

Näytteen laimennus, kolonnimateriaali tai altistuminen korkean ionivahvuuden liikkuville faaseille voi aiheuttaa muutoksia aggregaattien sisältöön ja kokojakaumaan.¹³ Tämän lisäksi on havaittu aggregaattien määrän kasvavan korkeamman paineen mukana.¹² Näytteitä on myös hyvä suodattaa tai sentrifugoida ennen analyysia, jotta näyte olisi mahdollisimman puhdas.



Kuva 2. Peptidilääkkeiden aggregaation havaitseminen käyttäen geelisuodatusta eli kokoeksklusiokromatografiaa. Molekyylien erottelu perustuu niiden kokoon. Suurimmat yhdisteet eluoituvat ensimmäisenä ja pienimmät viimeisenä. Peptidien liikettä hidastaa erottelumatriisin sisältämät huokoiset partikkelit, jotka sallivat suurempien aggregaattien liikkumisen partikkelien ohi.

3.5 Dynaaminen valonsironta

Dynaamisella valonsironnalla (DLS) voidaan päätellä aggregaattien kokojakaumaprofiili. Polarisaattorin läpi kohdistetaan monokromaattinen valonlähde näytteeseen ja tämä prosessi toistetaan lyhyillä aikaväleillä. Näytteen molekyylit diffraktoivat valoa kaikkiin suuntiin ja niistä sironnut valo menee toisen polarisaattorin läpi, joka kerätään valomonistimella. Tuloksena saadaan pilkkukuvio, josta voidaan päätellä aggregaattien kokojakauma, ja saadaan tietoa molekyylipainosta ja molekyylien pyörimissäteestä.¹⁴ Menetelmää voidaan käyttää peptidien analyysiin, joiden molekyylipaino on vähintään 1 kDa.

Näytteen konsentraatio on tärkeä käyttäessä DLS:ää. Liian korkea konsentraatio voi johtaa partikkeli-partikkeli vuorovaikutuksiin tai sironneen valo uudelleensiromiseen toisesta partikkelista, joka antaa väärän vaikutelman partikkeleiden todellisesta koosta. Liian alhainen konsentraatio johtaa kohinaan tuloksissa ja tekee koon määrittämisen hankalaksi. On ehdotettu, että näytteen konsentraatio asetetaan aluksi 1 mg/mL ja laimennetaan tarvittaessa. Käytetyn valon tehokkuus vaikuttaa minkä suuruisia konsentraatioita voidaan käyttää. Tutkimus vertaili 45 mW ja 100 mW valoja, ja havaittiin, että korkeammalla tehoisella valolla on korkeampi herkkyys.²⁶

DLS menetelmällä mittaukset voidaan tehdä muutamassa minuutissa, ja menetelmä voidaan suorittaa pienellä näyttemäärällä. Huonona puolena on, että pieni määrä suurikokoisia hiukkasia voi aiheuttaa vääristymiä mittaustuloksissa. On ehdotettu, että hiukkasten koko tulee erota vähintään kertoimella 3, jotta aggregaatit voidaan erottaa peptidistä.²⁴ DLS on tarkka, kun näytteen aggregaatiotaso on yli 5 %.²¹

3.6 Kiinteä-tila ydinmagneettinen resonanssi

Kiinteä-tila ydinmagneettinen resonanssi (ssNMR) on menetelmä, jolla voidaan tutkia kiinteitä aineita käyttäen ydinmagneettista resonanssia. Menetelmässä jatkuvassa magneettikentässä olevia ytimiä häiritään heikolla värähtelevällä magneettikentällä. Ytimet reagoivat häirintään aiheuttamalla sähkömagneettisen signaalin, jonka taajuus on ominainen magneettikentällä olevalle ytimelle.

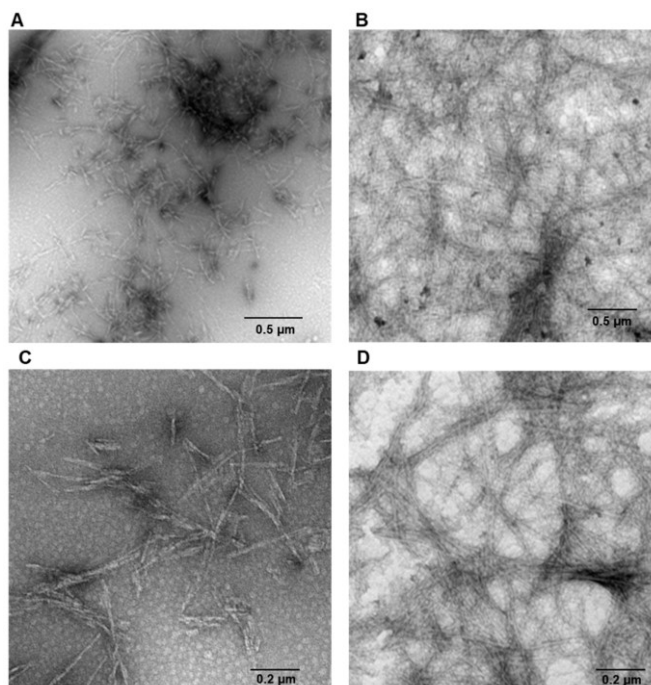
ssNMR-menetelmällä saadaan tietoa aggregaattien rakenteesta. ssNMR:n vahvuus on sen mahdollisuus tutkia näytteitä, joiden rakenne on ei-järjestelmällinen. Rakenteen lisäksi, ssNMR:n kautta voidaan saada tietoa aggregaattien vuorovaikutuksista ja dynamiikasta. Menetelmä on joustava tiettyjen ominaisuuksien kannalta, kuten näytteen lämpötilan ja pH arvon suhteen. Näytteiden valmistus usein sisältää isotooppimerkinnän, joka antaa parempaa tietoa rakenteesta.²³ Isotooppimerkintä voi olla aikaa vievä prosessi, ja aggregaattien vähäinen liukoisuus hankaloittaa sitä. Yleisesti mittaukset ssNMR:lla ovat ajallisesti vaativia. Yksinkertaisempi 1D mittaus (mitataan yhdessä ulottuvuudessa) voi kestää minuuteista tunteihin ja 2D mittaus (mitataan kahdessa ulottuvuudessa, esim. kahdella eri taajuudella) voi kestää jopa päiviä. 2D mittaus tietenkin antaa tarkempaa tietoa molekyylin rakenteesta. ssNMR ei pysty tarkasti arvioimaan rakenteellisesti järjestelmällisiä amyloidifibrillejä. Useat

tutkimukset ssNMR:llä johtivat tulosten alhaiseen resoluutioon, ja ehdottavat sen johtuen fibrillien kiertokulmista.¹⁵⁻¹⁶

ssNMR:n kehityksellä on lupaava tulevaisuus. Yleisesti NMR menetelmällä näytteitä mitataan kryogeenisissä lämpötiloissa, mutta ssNMR voisi sallia rakenteiden tutkimista fysiologisissa lämpötiloissa.²² Silti, ssNMR on varattu huippuluokan laboratorioille sen mukana tulevien kustannuksien ja vaatimuksien takia. Useimmat NMR-spektrometrit vaativat nestemäistä heliumia tai tyypeä suprajohtavien magneettien jäähdyttämiseen, jotta niiden toiminnallisuus pysyisi optimaalisena. Pääoma, joka tarvitaan pelkästään laitteiden hankintaan, on satoja tuhansia euroja ja toimintakustannukset yhden näytteen mittaamiseen voi olla satoja euroja.²⁶

3.7 Transmissioelektronimikroskopia

Transmissioelektronimikroskopia (TEM) on tapa kuvantaa aggregaattien muotoa, kokoa ja määrää. Näytteiden paksuus on hyvä olla alle 100 nm, sillä elektronit eivät pysty läpäisemään näytteitä, joiden paksuus ylittää 200 nm.¹⁷ Elektronimikroskopiolla voidaan arvioida aggregaatteja, joiden koko on vähintään 100 nm.



Kuva 3. TEM:llä kuvattu amyloidifibrillien muodostuminen insuliinissa. Peptidi analysoitiin 24 tunnin inkubaation jälkeen pH:ssa 7,0 (A, C) ja pH:ssa 1,8 (B, D).

Näytteet on hyvä valmistaa negatiivisella värjäyksellä ja jäädytetty-hydratoidussa tilassa, jotta saadaan kattava aggregaattianalyysi. Negatiivisessa värjäyksessä näyte laitetaan hiilikalvolle ja näyte inkuboidaan raskasmetalli-ioneja sisältävässä liuoksessa, jonka jälkeen näyte ilmakeivataan. Inkubointi parantaa kontrastia mittauksessa, joka tekee aggregaattien rakenteellisten yksityiskohtien näkeminen helpommaksi. On huomioitavaa, että ilmakeivatus voi johtaa ulkonäön muutoksiin. Jäädytetty-hydratoidussa tilassa näytteet uppopakastetaan kryogeeneisiin lämpötiloihin, esimerkiksi nestemäisessä etaanissa tai työssä. Verrattuna negatiiviseen värjäykseen, jäädytetty-hydratoidussa tilassa valmistetut näytteet antavat alhaisen kontrastin, mutta säilyttävät makromolekyylien rakenteet paremmin.¹⁸

4. Yhteenveto

Peptidilääkkeiden aggregaation arviointi on tärkeä osa lääkkeen laadunvalvonnan kannalta, ja koska aggregaatio on luonnollinen ilmiö peptideille, aggregaation tutkimus kuuluu olla osa lääkkeen kehitystä. Aggregaattien tiedetään lisäävän immuunivasteen riskiä, joten niiden vähentäminen lääketuotteesta on oleellista. Eri mittaamenetelmät mittaavat aggregaattien eri ominaisuuksia, joten kattavan tutkimuksen kannalta on hyvä ottaa käyttöön kattavan määrän menetelmiä. Koska näytteen valmistusprosessi voi vaikuttaa mittaustuloksiin, on hyvä käyttää käytetyn menetelmän suhteen ortogonaalista menetelmää, joka vahvistaa käytetyn menetelmän mittaustulosten laadun. Yhden menetelmän rajoituksia voidaan lieventää käyttämällä useita menetelmiä, vahvistaen ja ristiintarkistaen toistensa havaintoja. Aggregaattien tutkiminen antaa tietoa millä mekanismeilla niitä muodostuu ja siten mahdollistaa lääkkeen suunnittelun aggregaation estämisen kannalta. Tämä voidaan suorittaa joko lisäämällä aggregaatiota estäviä aineita peptidilääkkeeseen tai kehittämällä analogeja, jotka ovat vähemmän alttiita aggregaatiolle. Aggregaation estäminen lisää lääkkeen elinikää ja siten on taloudellinen hyöty sitä tuottavalle yhtiölle. Tämä tutkielma on kattanut pienen osan kaikista mahdollisista menetelmistä. Lisää menetelmiä löytyy esimerkiksi 2010 julkaistussa artikkelissa "Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development".

5. Viitteet

- [1] Wang, L., Wang, N., Zhang, W. et al. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Sig Transduct Target Ther* 7, 48 (2022).
- [2] Marqus, S., Pirogova, E. & Piva, T.J. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J Biomed Sci* 24, 21 (2017)
- [3] Thundimadathil J. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *J Amino Acids*. 2012, 967347 (2012)
- [4] Al Shaer, D., Al Musaimi, O., Albericio, F., de la Torre, B.G. 2023 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals* 17, 243 (2024)
- [5] Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des*. 81, 136-47 (2013)
- [6] Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem*. 26, 2700-2707 (2018)
- [7] Zapadka KL, Becher FJ, Gomes Dos Santos AL, Jackson SE. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus*. 7, 20170030 (2017)
- [8] Pignataro MF, Herrera MG, Dodero VI. Evaluation of Peptide/Protein Self-Assembly and Aggregation by Spectroscopic Methods. *Molecules*. 25, 4854 (2020)
- [9] Prasad S, Mandal I, Singh S, Paul A, Mandal B, Venkatramani R, Swaminathan R. Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein. *Chem Sci*. 8, 5416-5433 (2017)
- [10] Correia M, Neves-Petersen MT, Jeppesen PB, Gregersen S, Petersen SB. UV-light exposure of insulin: pharmaceutical implications upon covalent insulin dityrosine dimerization and disulphide bond photolysis. *PLoS One*. 7, e50733 (2012)
- [11] Bria, Carmen R. M.. Development of asymmetrical flow field-flow fractionation for the characterization of proteins, protein aggregation, and nanoparticles. Dissertation (2016)

- [12] Hong P, Koza S, Bouvier ES. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 35, 2923-2950 (2012)
- [13] Mahler, Hanns-Christian & Jiskoot, Wim. Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals. 9-36 (2012)
- [14] Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.* 8, 4 (2016)
- [15] Espargaró A, Busquets MA, Estelrich J, Sabate R. Amyloids in solid-state nuclear magnetic resonance: potential causes of the usually low resolution. *Int J Nanomedicine.* 10, 6975-6983 (2015)
- [16] van der Wel PCA. Insights into protein misfolding and aggregation enabled by solid-state NMR spectroscopy. *Solid State Nucl Magn Reson.* 88, 1-14 (2017)
- [17] Li S, Chang Y, Wang Y, Xu Q, Ge B. A review of sample thickness effects on high-resolution transmission electron microscopy imaging. *Micron.* 130, 102813 (2020)
- [18] Sung JJ, Pardeshi NN, Mulder AM, Mulligan SK, Quispe J, On K, Carragher B, Potter CS, Carpenter JF, Schneemann A. Transmission electron microscopy as an orthogonal method to characterize protein aggregates. *J Pharm Sci.* 104, 750-9 (2015)
- [19] Stevenson SG, Ueno T, Preston KR. Automated frit inlet/frit outlet flow field-flow fractionation for protein characterization with emphasis on polymeric wheat proteins. *Anal Chem.* 71, 8-14 (1999)
- [20] Giordani S, Marassi V, Placci A, Zattoni A, Roda B, Reschiglian P. Field-Flow Fractionation in Molecular Biology and Biotechnology. *Molecules.* 28, 6201 (2023)
- [21] Arnroth, C. A study of protein aggregation processes using Dynamic Light Scattering: Validation of the technique and experimental trial with an active pharmaceutical ingredient. Dissertation (2020)
- [22] Linser R. Solid-state NMR spectroscopic trends for supramolecular assemblies and protein aggregates. *Solid State Nucl Magn Reson.* 87, 45-53 (2017)

- [23] Huang D, Hudson BC, Gao Y, Roberts EK, Paravastu AK. Solid-State NMR Structural Characterization of Self-Assembled Peptides with Selective ^{13}C and ^{15}N Isotopic Labels. *Methods Mol Biol.* 1777, 23-68 (2018)
- [24] Kaszuba, M., Connah, M.T., McNeil-Watson, F.K. and Nobbmann, U. Resolving Concentrated Particle Size Mixtures Using Dynamic Light Scattering. *Particle & Particle Systems Characterization.* 24, 159-162 (2007)
- [25] Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H. and Kern, D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students[†]. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 40, 372-82 (2012)
- [26] A. Wong , P. M. Aguiar , T. Charpentier and D. Sakellariou. A low-cost strategy for ^{43}Ca solid-state NMR spectroscopy. *Chem. Sci.* 2, 815-818 (2011)
- [27] Krebs, M R H. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol.* 149, 30-7 (2005)
- [28] Nugrahadhi PP, Hinrichs WLJ, Frijlink HW, Schöneich C, Avanti C. Designing Formulation Strategies for Enhanced Stability of Therapeutic Peptides in Aqueous Solutions: A Review. *Pharmaceutics.* 15, 935 (2023)
- [29] Manning, Ryan R et al. Analysis of Peptides using Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation (AF4). *Journal of pharmaceutical sciences* vol. 110,12 (2021)