



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Sanja Mateljak Lukačević

**UTJECAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA  
PROČIŠĆAVANJA NA SVOJSTVA  
TERAPIJSKIH IMUNOGLOBULINA G**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:

Dr.sc. Beata Halassy

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Sanja Mateljak Lukačević

**INFLUENCE OF DIFFERENT  
PURIFICATION PROTOCOLS ON THE  
THERAPEUTIC IMMUNOGLOBULIN G  
PROPERTIES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Dr.sc. Beata Halassy

Zagreb, 2021.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji, pod vodstvom dr. sc. Beate Halassy, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## UTJECAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA PROČIŠĆAVANJA NA SVOJSTVA TERAPIJSKIH IMUNOGLOBULINA G

SANJA MATELJAK LUKAČEVIĆ

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji  
Sveučilišta u Zagrebu

Terapijski imunoglobulini G (IgG-i) aktivna su komponenta antivenoma, biofarmaceutika koji se koriste u liječenju oboljenja uzrokovanih patogenim djelovanjem zmijskih otrova, a dobivaju se različitim metodama izolacije iz hiperimune životinjske plazme. No, iako pročišćeni, IgG-i u određenoj mjeri još uvijek izazivaju nuspojave koje se, između ostalog, pripisuju uvjetima samih proizvodnih postupaka za koje se pretpostavlja da različitim principima različito utječu na sigurnost ovih terapeutika i njihovu kliničku učinkovitost. Cilj rada bio je istražiti utjecaj najčešće primjenjivanih biokemijskih principa izolacije IgG-a iz jedinstvenog uzorka hiperimune konjske plazme na svojstva imunoglobulina koja se smatraju relevantnima i odgovornima za kvalitetu konačnog produkta. Svakim od pet ispitanih postupaka pročišćavanja (taloženje amonijevim sulfatom, taloženje neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom, kromatografija izmjenom aniona i kationa te afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A) dobiveni su IgG pripravci jedinstvenog sastava obzirom na udio agregata i profil zaostalih nečistoća, čija prisutnost može umanjiti njihovu stabilnost, a time i sigurnost primjene. Pojedini postupci uzrokovali su promjene u sastavu potklasa IgG-a, od kojih je, sa stajališta uloge u neutralizaciji toksičnih učinaka zmijskih otrova, od najvećeg značaja gubitak IgG(T) potklase uzrokovan kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A i kromatografijom izmjene kationa. Uočena je visoka negativna korelaciju između udjela agregata u pripravcima i termičke stabilnosti IgG-a, kao i sklonost daljnoj agregaciji proporcionalna početnom udjelu agregata. Budući da intenzitet i karakter nepovoljnih uvjeta postupaka pročišćavanja utječu na udio agregata u IgG preparatima, time također posredno djeluju i na njihovu stabilnost.

(159 stranica, 45 slika, 25 tablica, 205 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: IgG antivenomi, pročišćavanje plazme, IgG potklase, agregati, termička stabilnost

Mentorica: Dr. sc. Beata Halassy, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju

Ocjenjivači: Dr. sc. Julija Erhardt, znanstvena suradnica

Dr. sc. Tihana Kurtović, znanstvena suradnica

Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

## **INFLUENCE OF DIFFERENT PURIFICATION PROTOCOLS ON THE THERAPEUTIC IMMUNOGLOBULIN G PROPERTIES**

SANJA MATELJAK LUKAČEVIĆ

Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology  
University of Zagreb

Therapeutic immunoglobulins G (IgGs) represent an active component of antivenoms, biopharmaceuticals used in treatment of diseases caused by pathogenic action of snake venom, extracted by various refinement strategies from hyperimmune animal plasma. However, although purified, IgGs still cause to some extent side effects attributed, among other things, to the conditions of production procedure itself that presumably affect safety and also clinical effectiveness of these therapeutics. The aim of this study was to investigate the influence of the most commonly applied biochemical principles of IgG isolation from a unique sample of hyperimmune equine plasma on immunoglobulin properties that are considered relevant and responsible for the quality of the final preparation. Each of the five employed purification procedures (ammonium sulphate precipitation, caprylic acid precipitation of non-immunoglobulins, anion- and cation-exchange chromatography and protein A affinity chromatography) gave IgG sample of unique composition with respect to the aggregate share and the profile of residual impurities, whose presence may reduce stability of the final product and consequently also its safe application. Some procedures have caused changes in IgG subclass composition. The loss of IgG(T) subclass, caused by protein A affinity chromatography and cation-exchange chromatography, was of the greatest importance due to its dominant role in neutralizing the toxic effect of the snake venom. High negative correlation was observed between aggregate content in the preparations and thermal stability of IgGs as well as the tendency to further aggregation proportional to the initial share of the aggregates. Since the intensity and character of unfavorable purification protocols' conditions affect aggregate's share in IgG preparations, they indirectly affect their stability too.

(159 pages, 45 figures, 25 tables, 205 references, original in Croatian)

Keywords: IgG antivenoms, plasma processing, IgG subclasses, aggregates, thermal stability

Supervisor: Dr. Beata Halassy, Scientific Advisor with tenure

Reviewers: Dr. Julija Erhardt, Research Associate  
Dr. Tihana Kurtović, Research Associate  
Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>6</b>
2.1. ZMIJE OTROVNICE.....	6
2.1.1. EUROPSKE ZMIJE OTROVNICE.....	8
2.2. ZMIJSKI OTROVI – VARIJABILNOST, BIOKEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA FUNKCIJA .....	10
2.2.1. OTROV ZMIJA PORODICE <i>VIPERIDAE</i> - SASTAV I DJELOVANJE .....	15
2.3. MEDICINSKI PROBLEM OTROVANJA ZMIJSKIM VENOMOM.....	16
2.4. ANTIVENOMI .....	18
2.4.1. POVIJESNI PREGLED I PERSPEKTIVA RAZVOJA .....	18
2.4.2. VRSTE ANTIVENOMA .....	20
2.4.3. MEHANIZMI DJELOVANJA ATIVENOMA .....	22
2.4.4. NUSPOJAVE PRIMJENE ANTIVENOMA .....	23
2.5. PROIZVODNJA ANTIVENOMA .....	25
2.5.1. OPĆENITO .....	25
2.5.2. PROIZVODNI KORACI .....	27
<b>2.5.2.1. Prikupljanje venoma</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.2.2. Imunizacija životinja</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.2.3. Postupci pročišćavanja hiperimune plazme</b> .....	<b>28</b>
2.5.2.3.1. Taloženje solima.....	30
2.5.2.3.2. Taloženje neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom.....	31
2.5.2.3.3. Afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A .....	34
2.5.2.3.4. Ionsko-izmjenjivačke kromatografije.....	35
2.5.3. FORMULACIJA ANTIVENOMA.....	38
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>40</b>
3.1. MATERIJALI .....	40
3.2. METODE.....	40
3.2.1. POSTUPCI PROČIŠĆAVANJA IgG-a IZ HIPERIMUNE KONJSKE PLAZME .....	40
<b>3.2.1.1. Izdvajanje IgG-a taloženjem kaprilnom kiselinom</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2.1.2. Izdvajanje IgG-a taloženjem amonijevim sulfatom</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2.1.3. Izdvajanje IgG-a kromatografijom izmjene aniona</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2.1.4. Izdvajanje IgG-a kromatografijom izmjene kationa</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2.1.5. Izdvajanje IgG-a afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A .....</b>	<b>42</b>

<b>3.2.1.6. Dodatno pročišćavanje manje čistih IgG pripravaka.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.1.7. Uklanjanje agregata u pripravcima pročišćenih IgG-a.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.1.8. Dijafiltracija.....</b>	<b>44</b>
3.2.2. ANALITIČKE METODE .....	44
<b>3.2.2.1. Određivanje koncentracije proteina .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih IgG-a.....</b>	<b>45</b>
3.2.2.2.1. Određivanje koncentracije ukupnih IgG-a iz udjela IgG-a i proteinske koncentracije .....	45
3.2.2.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih IgG-a ELISA-om.....	45
3.2.2.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih IgG-a denzitometrijskom analizom.....	46
<b>3.2.2.3. Analiza čistoće međuprodukata i pročišćenih IgG pripravaka.....</b>	<b>46</b>
3.2.2.3.1. Kromatografija isključenjem po veličini .....	46
3.2.2.3.2. SDS-PAGE analiza.....	47
3.2.2.3.3. Identifikacija nečistoća spektrometrijom masa.....	48
3.2.2.3.3.1. Priprava uzoraka .....	48
3.2.2.3.3.2. Analiza i identifikacija proteina .....	49
<b>3.2.2.4. Određivanje udjela IgG-a.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.2.5. Određivanje udjela agregata u visokopročišćenim IgG pripravcima.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.2.6. Određivanje promjena u sastavu potklasa IgG pripravaka .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.2.7. In vivo test neutralizacije letalne toksičnosti.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.2.8. Određivanje termičke stabilnosti IgG-a metodom diferencijalne pretražne fluorimetrije .....</b>	<b>53</b>
3.3. OBRADA REZULTATA .....	54
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>55</b>
4.1. OPTIMIZACIJA POSTUPAKA IZOLACIJE IgG-a.....	55
4.1.1. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a TALOŽENJEM KAPRILNOM KISELINOM .....	55
4.1.2. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a TALOŽENJEM AMONIJEVIM SULFATOM.....	58
4.1.3. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a KROMATOGRAFIJOM IZMJENE ANIONA .....	61
4.1.4. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a KROMATOGRAFIJOM IZMJENE KATIONA.....	63
4.1.5. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a AFINITETNOM KROMATOGRAFIJOM POMOĆU IMOBILIZIRANOG PROTEINA A .....	65
4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA PROČIŠĆAVANJA NA KVALITATIVNE OSOBINE IMUNOGLOBULINSKIH PRIPRAVAKA .....	68
4.2.1. ČISTOĆA IgG UZORAKA .....	68

<b>4.2.1.1. Identifikacija rezidualnih proteinskih nečistoća u IgG uzorcima.....</b>	<b>72</b>
<b>4.2.1.2. Udio agregata u pročišćenim IgG uzorcima .....</b>	<b>81</b>
4.2.2. STABILNOST IgG-a U OVISNOSTI O TEMPERATURI .....	82
4.2.3. RASPODJELA IgGa, IgGb I IgG(T) POTKLASA U IgG UZORCIMA.....	84
4.2.4. NEUTRALIZACIJA LETALNE TOKSIČNOSTI <i>Vaa</i> OTROVA .....	88
4.3. UTJECAJ POSTUPAKA PROČIŠĆAVANJA NA STABILNOST IgG-a.....	89
4.3.1. UTJECAJ POHRANE TIJEKOM MJESEC DANA UZ ISPITIVANJE STABILIZIRAJUĆEG UČINKA SORBITOLA .....	89
4.3.2. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA POHRANE TIJEKOM 3 MJESECA .....	93
<b>4.3.2.1. Utjecaj pohrane pri različitim temperaturama .....</b>	<b>93</b>
<b>4.3.2.2. Utjecaj natrijevog kaprilata .....</b>	<b>97</b>
<b>4.3.2.3. Utjecaj kiselog pH.....</b>	<b>100</b>
4.3.3. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA POHRANE NA UZORKE DOBIVENE AC I CAP POSTUPCIMA NAKON DODATNOG UKLANJANJA AGREGATA.....	103
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>115</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>128</b>
<b>7. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>131</b>
<b>8. POPIS OZNAKA, SIMBOLA I KRATICA .....</b>	<b>154</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>156</b>



## 1. UVOD

Ugrizi zmija otrovnica ozbiljan su zdravstveni problem prisutan u gotovo svim dijelovima svijeta odgovoran za invalidnost više od 400 000 i preranu smrt više od 100 000 ljudi godišnje (Gutiérrez i sur., 2017). Posljedice otrovanja ne pogađaju samo žrtve već i njihove obitelji te širu društvenu zajednicu što ekonomski značajno opterećuje ponajviše siromašne zemlje Afrike, Azije i Latinske Amerike (Bawaskar i sur., 2017; Chippaux, 2017; Williams i sur., 2010), ali također, premda u znatno manjoj mjeri, i razvijene zemlje Europe i Sjeverne Amerike (Di Nicola i sur., 2021; Gutiérrez i sur., 2017; Lamb i sur., 2017). Ovaj problem prepoznala je i uvrstila na popis zanemarenih tropskih bolesti kategorije A Svjetska zdravstvena organizacija 2017. godine, te razvila opsežnu strategiju djelovanja s ciljem reduciranja smrtnosti i invaliditeta za 50% do kraja 2030. godine (WHO, 2019). Unatoč znatnim naporima i već ostvarenim iskoracima u smjeru implementacije monoklonskih antitijela u liječenju posljedica otrovanja zmijskim otrovima tzv. venomima (Laustsen i sur., 2018a; Pucca i sur., 2019), jedini učinkovit i znanstveno priznat pristup temelji se još uvijek na antivenomima (Ramos-Cerrillo i sur., 2008; Gutiérrez, 2011), biofarmaceuticima koji se uspješno primjenjuju u klinici već duže od stoljeća (Morais i Massaldi, 2009; Otero-Patiño i sur., 2012; Warrell, 2010). U svom sastavu ovi lijekovi sadrže specifična antitijela koja neutraliziraju zmijske toksine suzbijajući na taj način patofiziološke manifestacije otrovanja nakon ugriza (Gutiérrez i sur., 2017; Laustsen i sur., 2018a).

Antivenomi se proizvode imunizacijom velikih životinja, većinom konja i ovaca, jednim venomom ili smjesom više njih kao antigenom, iz čije se hiperimune plazme metodama pročišćavanja izdvajaju antitijela IgG klase. Postupci pročišćavanja neophodni su kako bi se odstranile preostale komponente životinjske plazme te tako smanjila učestalost pojavljivanja i intenzitet popratnih štetnih pojava do kojih može doći uslijed primjene veće količine proteina stranih ljudskom organizmu. Međutim, iako "pročišćeni", imunoglobulini osim terapijskog djelovanja, još uvijek uzrokuju neželjene nuspojave koje se manifestiraju kao reakcije rane i reakcije kasne preosjetljivosti, ovisno o vremenu pojavljivanja nakon kliničke primjene (Gutiérrez i sur., 2010; Morais, 2018). Patogeneza nuspojava do danas nije u potpunosti razjašnjena (León i sur., 2013, León i sur., 2018). Njihovo pojavljivanje povezuje se uz fizikalno-kemijska svojstva samog antivenoma (čistoća, udio agregata, specifična aktivnost, tip aktivne komponente lijeka), uz imunokemijska svojstva heterolognih IgG molekula animalnog porijekla zaostalih u preparatu nakon postupka pročišćavanja, te uz sam proizvodni postupak

tijekom kojega može doći do kontaminacije endotoksinima i virusima (León i sur., 2013; Raweerith i Ratanabanangkoon, 2003). Incidencija štetnih popratnih pojava u početku se pripisivala Fc dijelu imunoglobulinskih molekula zbog njegove sposobnosti aktivacije komplementa odgovornog za reakcije kasne preosjetljivosti. Budući da Fc dio nema neutralizacijsku aktivnost, u proizvodni proces implementiran je prije otprilike 60-tak godina korak enzimske razgradnje kojim se ovaj dio odcjepljuje od ostatka IgG molekule te se tako, umjesto cjelovitih IgG-a, dobivaju antivenomi koji u svom sastavu sadrže, ovisno o primijenjenom enzimu, samo njihove  $F(ab')_2$  ili Fab fragmente (WHO, 2016). Time se intenzitet nuspojava reducirao premda, suprotno od očekivanog, ne u zadovoljavajućoj mjeri. Također, neka klinička ispitivanja pokazala su da cjeloviti IgG antivenomi, pripremljeni taloženjem neimunoglobulinskih proteina plazme kaprilnom kiselinom, induciraju manje štetnih popratnih pojava nego antivenomi dobiveni postupkom precipitacije solima, a koji sadržavaju  $F(ab')_2$  ili Fab fragmente (León i sur., 2001; Otero i sur., 1999). Ovakvi rezultati upućivali su na mogućnost da proces prerade plazme, tijekom kojeg se nepovoljno utječe na strukturu imunoglobulina, sam po sebi može biti uzrokom nestabilnosti antivenoma, posebice ukoliko kasnije IgG-i budu izloženi stresnim uvjetima. Nedovoljno pročišćeni preparati sa zaostalim kontaminirajućim proteinima i/ili formiranim agregatima također se povezuju s izazivanjem neželjenih nuspojava (Laptoš i Omersel, 2018; Theakston i sur., 2003), neovisno o tome radi li se o IgG,  $F(ab')_2$  ili Fab antivenomima. Tome govori u prilog i činjenica da se za preparate s istim tipom djelatne tvari, a koji su dobiveni različitim metodama prerade plazme, navodi u literaturi učestalost štetnih reakcija u širokom rasponu od 5-80% (Theakston i sur., 2003). Humani imunoglobulinski preparati također pokazuju nestabilnost nastalu uslijed denaturacije IgG-a tijekom proizvodnje i/ili nakon pročišćavanja, što rezultira formiranjem agregata.

Iako se u proces pripreme antivenoma kontinuirano ulažu napor i uvode promjene s ciljem poboljšanja kvalitete ovog terapeutika (Raweerith i Ratanabanangkoon, 2003; Rojas, i sur., 1994), još uvijek ne postoji optimalan postupak kojim bi se dobio proizvod zadovoljavajuće učinkovitosti i sigurnosti uz istovremeno što niže troškove proizvodnje, te koji bi bio u skladu sa smjernicama propisanim od strane Svjetske zdravstvene organizacije. Idealnim procesom, imunoglobulini bi se trebali učinkovito izdvojiti od ostalih proteina plazme izvođenjem samo onih koraka koji ne narušavaju njihovu strukturnu stabilnost čime bi se osigurala visoka učinkovitost ovih terapeutika, a učestalost popratnih pojava svela na minimum. Temeljem navedene hipoteze, prednost se odnedavno daje protokolima u kojima se imunoglobulini tijekom cijelog postupka proizvodnje održavaju u otopini jer se smatra da u

takvim uvjetima dolazi do najmanjeg narušavanja njihove strukture. Takvi postupci već su dizajnirani na laboratorijskoj skali (Kurtović i sur., 2019), no ispitivanje njihove stabilnosti još uvijek nije provedeno. Nasuprot tome, pretpostavlja se da agresivniji postupci pročišćavanja, koji podrazumijevaju taloženje imunoglobulina visokim koncentracijama amonijevih ili natrijevih soli, razgradnju enzimima, vezanje za kromatografske nosače, a zatim eluiranje puferima povećane ionske jakosti ili niskog pH, uzrokuju prolazne konformacijske promjene (Gagnon i Nian, 2016; Morais i Massaldi, 2009) što ih čini nestabilnijima, podložnijima agregaciji te stoga manje učinkovitima i sigurnima za kliničku primjenu.

Proizvodnja antivenoma odvija se različitim, već rutinski primjenjivanim tehnološkim postupcima koji imaju svoje prednosti i nedostatke, kako s aspekta odnosa trošak/učinkovitost, tako i s aspekta sigurnosti lijeka. Postupak isoljavanja, kojim se imunoglobulini talože amonijevim ili natrijevim sulfatom, još uvijek je učestalo korištena metoda prerade hiperimune životinjske plazme unatoč poznatoj činjenici da daje produkt prinosa manjeg od 50% (Saetang i sur., 1997; Zolfagharian i Dounighi, 2013) te niže čistoće i visokog udjela agregata (Fernandes i sur., 2008; Jones i Landon, 2002; Otero i sur., 1999; Rojas i sur., 1994) koji najvjerojatnije nastaju kao posljedica narušene strukture IgG-a. Navedene nedostatke moguće je uspješno zaobići primjenom taloženja kaprilnom kiselinom kao alternativnim postupkom (Gutiérrez i sur., 2005; Rojas i sur., 1994) kojim se dobivaju pripravci bez agregata velike molekulske mase (Raweerith & Ratanabanangkoon, 2003) te čistoće veće od 90% i prinosa između 60 i 65%. (Rojas i sur., 1994). Kaprilna kiselina taloži sve ili većinu neželjenih plazmatskih proteina, dok IgG molekule ostavlja u otopini, te stoga najvjerojatnije ne utječe na njihov strukturni integritet (Al-Abdulla i sur., 2014; León i sur., 2018) čije narušavanje potiče formiranje agregata, kako se pokazalo u istraživanjima na humanim imunoglobulinima (Chen, Z. i sur., 2016; Gagnon i sur., 2015; Hari, Lau i sur., 2010).

Osim metoda taloženja, u pročišćavanju IgG-a ili njihovih fragmenata, primjenu nalaze i različiti tipovi kromatografija. U smislu čistoće i specifičnosti produkta najučinkovitija je afinitetna kromatografija obzirom da se zasniva na specifičnom i visokoafinitetnom vezanju Fc fragmenta antitijela na protein A ili protein G stacionarne faze. Adsorpcija na kromatografski nosač, a potom elucija vezanih IgG-a puferom niskog pH, uzrokuju nastanak prolaznih, ali opsežnih konformacijskih promjena što dovodi do nestabilnosti njihove strukture i stvaranja agregata nakon izlaganja IgG-a sekundarnom stresu kao što je dodatno sniženje pH (Gagnon i sur., 2015). Osim visoke cijene punila kolone i ograničenog kapaciteta vezanja uzorka (Li i sur.,

2019; Tao i sur., 2014), nedostatak ove kromatografije predstavlja i pad neutralizacijske aktivnosti ovako pročišćenih antitijela na oko 30% od početne vrijednosti (Raweerith i Ratanabanangkoon, 2003).

U procesu pripreve antivenoma na laboratorijskoj skali sve se češće upotrebljavaju i kromatografije ionske izmjene (IEX, engl. *ion-exchange chromatography*) kao završni korak finog pročišćavanja nakon inicijalnih postupaka enzimske digestije te taloženja solima ili kaprilnom kiselinom (Jones i Landon, 2002; León i sur., 2018; Lewis i Nail, 1997; Raweerith i Ratanabanangkoon, 2003), dok se u istu svrhu već rutinski primjenjuju u proizvodnji monoklonskih antitijela nakon izolacije afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (Li i sur., 2019; Shukla i sur., 2007). Kromatografija izmjenom aniona (AEX, engl. *anion-exchange chromatography*) smatra se boljim izborom budući da se kontaminirajući proteini vežu na matriks, dok IgG-i prolaze kroz kolonu nevezani (Khamehchian i sur., 2014; León i sur., 2018) čime njihova struktura ostaje sačuvana od bilo kojeg oblika manipulacije koja bi mogla imati negativan utjecaj na stabilnost preparata. Suprotno tome, u procesu kromatografije izmjene kationa (CEX, engl. *cation-exchange chromatography*), IgG-i uslijed vezanja privremeno stupaju u interakciju s funkcionalnim skupinama nosača, a potom eluiraju puferom povećane ionske jakosti, dok nečistoće slobodno prolaze kroz kolonu. Nedavno opisano nekonvencionalno ponašanje ciljnog proteina tijekom vezanja i eluiranja (Guo i Carta, 2014; Guo i sur., 2014) dovelo je do hipoteze da ovaj postupak destabilizira strukturu proteina i uzrokuje stvaranje agregata (Chen, Z. i sur., 2016).

Budući da navedeni postupci pročišćavanja koriste različite principe izdvajanja imunoglobulina od ostalih proteina hiperimune plazme, svi oni vrlo vjerojatno različito utječu na svojstva IgG-a koja se odnose na učinkovitost i sigurnost konačnog produkta. Postojeće spoznaje o utjecaju postupaka pročišćavanja na svojstva antivenoma potječu iz studija provedenih na uzorcima plazme porijeklom iz različitih životinjskih vrsta kao sustava sa jedinstvenim IgG profilima ili uzorcima plazme različitih specifičnosti i titra neutralizirajućih antitijela. Štoviše, ove studije nisu provedene u izravnoj usporedbi, pa su dosada dobiveni rezultati često proturječni, posebno u pogledu stabilnosti i učinkovitosti terapije. Prema trenutno dostupnim podacima u literaturi, ne postoji sustavno provedeno istraživanje kojim bi se rasvijetlio utjecaj najčešće korištenih protokola pročišćavanja na relevantna svojstva antivenoma. Stoga je cilj ovog istraživanja bio izolirati IgG molekule iz jedinstvenog uzorka hiperimune konjske plazme, dobivene imunizacijom konja otrovom poskoka (*Vipera*

*ammodytes ammodytes*, *Vaa*), primjenom pet različitih postupaka pročišćavanja, a zatim sve pročišćene IgG preparate usporedno analizirati obzirom na čistoću, stabilnost, sastav potklasa, učinkovitost neutralizacije letalne toksičnosti otrova i sadržaj zaostalih nečistoća. Istraživanje sam provela na osnovu sljedeće tri hipoteze:

1. Postupci pročišćavanja koji najmanje mijenjaju strukturu imunoglobulina istovremeno osiguravaju najveću stabilnost konačnog pripravka.
2. Različiti postupci pročišćavanja daju pripravke različitog udjela i sastava nečistoća što utječe na stabilnost imunoglobulina.
3. Različite metode pročišćavanja mijenjaju sastav IgG potklasa pripravaka što utječe na stabilnost, a moguće i na djelotvornost imunoglobulina da neutraliziraju letalnu toksičnost otrova *in vivo*.

Taloženje neimunoglobulinskih molekula kaprilnom kiselinom (CAP), taloženje IgG-a amonijevim sulfatom (ASP), kromatografija izmjenom aniona (AEX), kromatografija izmjenom kationa (CEX) te afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A (AC) postupci su kojima sam pročistila IgG-e. Svim dobivenim preparatima čistoću sam odredila tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *high performace liquid chromatography*) i SDS-PAGE analizom, a termičku stabilnost metodom diferencijalne pretražne fluorimetrije (DSF, engl. *differential scanning fluorimetry*). Zaostale kontaminirajuće proteine u uzorcima identificirala sam spektrometrijom masa (MS, engl. *mass spectrometry*). Raspodjelu IgG potklasa u pročišćenim uzorcima odredila sam odgovarajućom ELISA-om specifičnom za svaku pojedinu potklasu te ispitala da li se promjena njihovog sastava odražavala na učinkovitost neutralizacije letalne toksičnosti *Vaa* otrova *in vivo*.

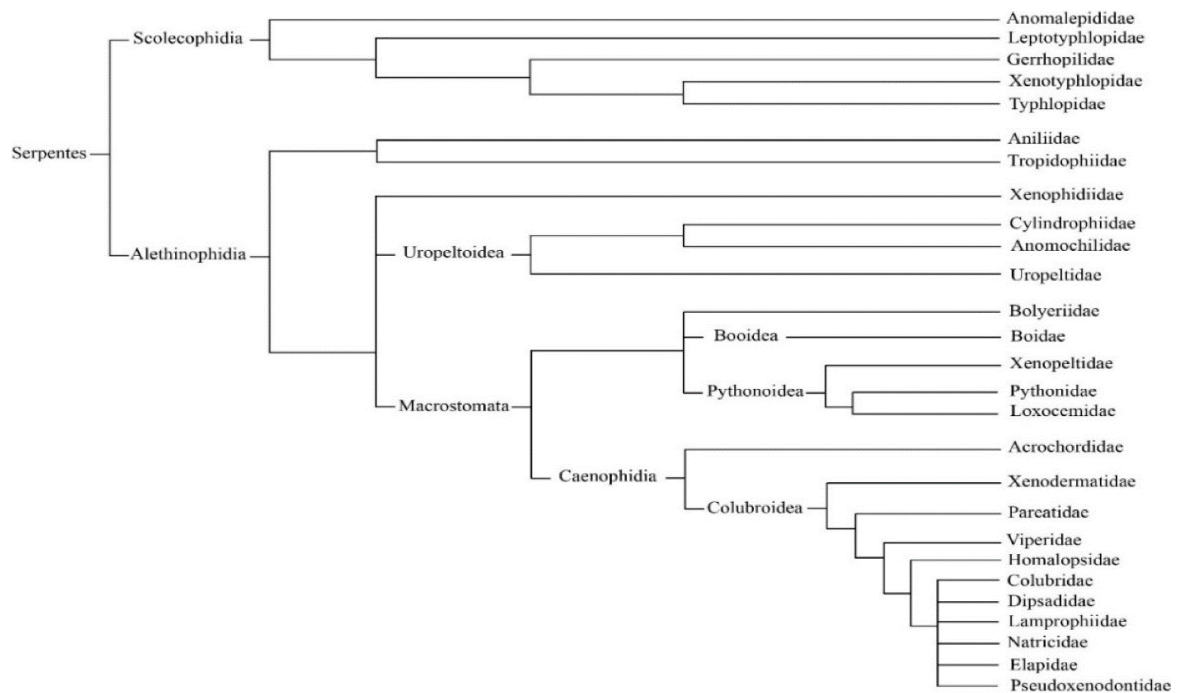
Obzirom da kontradiktornost trenutno dostupnih informacija vezanih za stabilnost i djelotvornost terapijskih IgG antivenoma, posebice onih vezanih uz utjecaj proizvodnih uvjeta, rezultati komparativne studije koju sam provela na jedinstvenom uzorku plazme predstavljati će važan znanstveni doprinos jasnijem određivanju smjernica kako dizajnirati siguran, učinkovit i održiv proizvodni postupak s ciljem dobivanja visokokvalitetnog lijeka.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. ZMIJE OTROVNICE

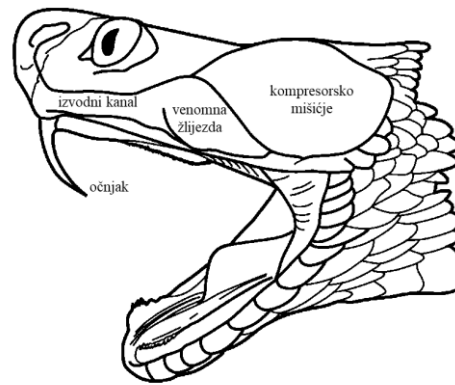
Životinjama otrovnicama (engl. *venomous animals*, fanerotoksične životinje) nazivamo one koje posjeduju specijalizirane egzokrine žlijezde i venomne aparate za proizvodnju otrova (engl. *venom*) (Isbister, 2010; Isbister i Kiernan, 2005) povezane s aplikacijskim sustavima (žalac, zubi, bodlje i slično) pomoću kojih aktivno ubrizgavaju otrov u tijelo žrtve s ciljem hvatanja plijena ili samoobrane (El-Aziz i sur., 2019). Za razliku od njih, otrovne životinje (engl. *poisonous animals*, kriptotoksične životinje) ne posjeduju specijalizirano tkivo za proizvodnju toksina već moraju biti progutane kako bi njihov otrov (engl. *poison*), akumuliran u organizmu konzumiranjem otrovnog plijena ili proizveden u nespecijaliziranim žlijezdama ili tkivima, izazvao toksično djelovanje (Isbister i Kiernan, 2005).

Među životinjama otrovnicama značajno mjesto zauzimaju zmije obzirom na njihovu široku geografsku rasprostranjenost i opasnost koju predstavljaju po zdravlje ljudi ukoliko s njima dođu u bliski kontakt. Zmije otrovnice nastanjuju gotovo sve zemlje na svim kontinentima osim Antarktike (Vitt i Caldwell, 2014). Kao egzotermni organizmi, rasprostranjene su u najvećem broju u toplim klimatskim područjima s najučestalijom incidencijom ugriza unutar tropskog pojasa Afrike, Azije, Latinske Amerike i Oceanije (Gutiérrez i sur., 2017). Zmije (lat. *Serpentes*) su klasificirane kao podred unutar razreda gmazova (lat. *Reptilia*) i reda ljuskaša (lat. *Squamata*). Dva glavna infrareda *Scolecophidia* (sljeparice) i *Alethinophidia* ("prave" zmije) obuhvaćaju oko 3600 vrsta raspoređenih u otprilike 27 porodica (El-Aziz i sur., 2019) (Slika 1). Sve otrovnice taksonomski pripadaju nadporodici *Colubroidea* ("napredne" zmije) koja obuhvaća više od 2500 vrsta i smatra se, s evolucijskog stajališta, najnaprednijom i najbolje specijaliziranom skupinom zmija. Među njima, vrste iz porodice *Viperidae* i *Elapidae* imaju daleko najveći medicinski značaj i smatraju se najopasnijima zbog broja ugriza i s njima povezanog morbiditeta, mortaliteta i invaliditeta što predstavlja značajan javnozdravstveni problem (Gutiérrez i sur., 2017; Kuch i sur., 2006; Warrell, 2019).



**Slika 1.** Klasifikacija zmija (preuzeto iz El-Aziz i sur., (2019). Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving. *Toxins*, 11(10), 1–25).

Titulu “najnaprednijih zmija“ ove otrovnice dobile su zbog posjedovanja sofisticirano dizajniranog venomnog aparata (Slika 2) koji im omogućuje vrlo brz i učinkovit unos otrova u tijelo žrtve u dovoljnoj količini da onesposobi ili usmrti plijen te kod ugrizanih ljudi uzrokuje ozbiljne, često po život opasne, patofiziološke manifestacije. Sastoji se od para specijaliziranih venomnih žlijezda velikog bazalnog lumena u koji secerniraju i pohranjuju proizvedeni otrov sastavljen od raznovrsnih toksičnih komponenti. Venomne žlijezde smještene su posteriorno u odnosu na nosnice te ispod i iza očiju, a okružene su kompresorskim mišićjem čijom se kontrakcijom kroz izvodne kanale povezane sa šupljim očnjacima u frontalnom dijelu gornje vilice aplicira otrov u tkivo recipijenta. Na svaku glavnu žlijezdu vezana je po jedna pomoćna za koju se pretpostavlja da ima ulogu u kondicioniranju toksina i aktivaciji njegovih litičkih komponenti koje se do trenutka izbacivanja drže inaktivnima niskom vrijednošću pH bazalnog lumena glavne žlijezde i endogenim inhibitorima. Ubod i ubrizgavanje otrova odvija se velikom brzinom nakon čega dolazi do disregulacije brojnih homeostatskih mehanizama u organizmu žrtve ugriza (Kuch i sur., 2006; Mackessy i Baxter, 2006).



**Slika 2.** Venomni aparat zmiya porodice *Viperidae* (preuzeto i prilagođeno iz Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 77–88).

### 2.1.1. EUROPSKE ZMIJE OTROVNICE

Ugrizi zmiya otrovnica relativno su rijetka pojava na području Europskog kontinenta gdje se godišnje bilježi 0,4 do 1,1 slučaj na 100 000 stanovnika. Posljedicama otrovanja podlegnu otprilike 4 žrtve ugriza. Međutim, upitno je koliko ovi podaci odražavaju stvarno stanje budući da prijavljivanje otrovanja zmijskim toksinima u Europi nije zakonski regulirano kao obavezno. Od svih zemalja jedino Švedska i Francuska kontinuirano provode evidenciju (Lamb i sur., 2017), stoga postoji realna osnova za pretpostavku da stvarni broj otrovanja zmijskim ugrizima premašuje navedeni (Di Nicola i sur., 2021). Europu karakterizira visoka geomorfološka i klimatska bioraznolikost što je čini pogodnim staništem brojnim zmijskim vrstama (Di Nicola i sur., 2021; Paolino i sur., 2020), uključujući i 14 zmiya otrovnica koje sve pripadaju potporodici *Viperinae* tzv. pravih „ljutica“. Među njima se nalaze vrste *Vipera ammodytes* (poskok), *V. berus* (riđovka) i *V. aspis* (talijanska ljutica) koje se zbog široke rasporostranjenosti na gusto naseljenim geografskim područjima, gdje uzrokuju brojne ugrize s visokom incidencijom morbiditeta, invaliditeta i mortaliteta, svrstavaju prema WHO kriterijima u kategoriju zmiya otrovnica od najvišeg medicinskog značaja (WHO, 2016). Svaka zmiya otrovnica producira otrov specifičnog biokemijskog sastava kojim se pokreću različiti mehanizmi patogenog djelovanja čiji se učinak odražava na težinu kliničke slike otrovanja (Chippaux, 2012). Varijacije u sastavu otrova, između ostalog, nastaju kao odgovor na adaptaciju vezanu uz prehrambene sklonosti ovisno o staništu pojedine vrste, a u cilju što učinkovitijeg savladavanja i usmrćivanja plijena (Casewell i sur., 2014a; Paulchamy, 2010). *V. aspis* autohtona je zmiya otrovnica centralne i južne Francuske, Švicarske i Italije gdje na nekim područjima stanište dijeli s *V. berus* vrstom koja nastanjuje još i sjevernoistočnu Europu,



uključujući i Ujedinjeno Kraljevstvo. *V. ammodytes* nastanjuje tek jugoistočnu Europu, područje koje primarno obuhvaća Balkanski poluotok (Zanetti i sur., 2018).

Obzirom na ozbiljnost envenomacijske patologije koja slijedi nakon ugriza i ubrizgavanja otrova u tijelo žrtve, poskok, *V. ammodytes* (Slika 3), prepoznat je kao najotrovnija i ujedno najveća europska zmija u čijem venomnom aparatu odrasle jedinke može biti pohranjeno između 10 i 45 mg otrova. Samo 20 mg otrova injektiranog jednim ugrizom već je dovoljna količina za postizanje toksičnog efekta u ljudi koji može imati letalan učinak (Karabuva i sur., 2016). Diferencijacija podvrsta poskoka još uvijek izaziva brojne kontroverze i do danas nije u potpunosti razjašnjena. Naime, postupak sistematizacije tradicionalno se temelji na razlikovanju morfoloških svojstava. To se pokazalo nedostatnim kriterijem nakon razvoja područja molekularne filogeografije, u kojem se koristi PCR analiza i životinjska mitohondrijska DNA kao genski dijagnostički marker. Analiza genoma otkrila je značajnu gensku varijabilnost unutar ove vrste čime se dovela u pitanje prethodno utvrđena taksonomija temeljena isključivo na morfološkim karakteristikama. No, unatoč brojnim dosada provedenim studijama, u svrhu što točnije klasifikacije, filogenetska sistematizacija *V. ammodytes* vrste još uvijek nije u potpunosti završena (Tomović i sur., 2010; Ursenbacher i sur., 2008). Zapažene fenotipske varijacije mogu se ispoljiti kao rezultat genotipskih varijacija ili nastati pod utjecajem samog okoliša ili kao posljedica udruženog djelovanja oba navedena faktora. Prema detaljno provedenoj studiji objavljenj 2006. godine znanstveno su potvrđene četiri podvrste koje nastanjuju geografski odijeljene regije s jasnim granicama distribucije (Tomovic, 2006):

1. *V. a. ammodytes* – sjeverna Italija, južna Austrija, Slovenija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Crna Gora, Srbija (osim krajnjeg juga), sjeverna Albanija, sjeverozapadna Makedonija i Bugarska te zapadna Rumunjska,
2. *V. a. meridionalis* – središnja Grčka, Peloponez i Ciklade
3. *V. a. montandoni* – jugoistočna Rumunjska, većina Bugarske, zapadna Turska, sjeveroistočna, sjeverna i sjeverozapadna Grčka, većina Makedonije, krajnji jug Srbije i središnji dio Albanije
4. *V. a. transcaucasiana* – istočna Turska, Gruzija i Armenija



**Slika 3.** Poskok, *Vipera ammodytes ammodytes*.

## **2.2. ZMIJSKI OTROVI – VARIJABILNOST, BIOKEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA FUNKCIJA**

Pojava otrova važna je adaptacija rasprostranjena širom životinjskog svijeta koja se neovisno i više puta tijekom evolucije razvijala u filogenetski širokom rasponu organizama (Casewell i sur., 2014a; Gutiérrez i sur., 2017), uglavnom u svrhu hvatanja plijena ili kao mehanizam obrane (El-Aziz i sur., 2019). Od svih životinja otrovnica, zbog brojnih slučajeva otrovanja koja uzrokuju u ljudi, najpoznatije su zmije čiji je venom najviše proučavan i najbolje karakteriziran (Ferraz i sur., 2019). Zmije otrovnice su predatori koje se otrovom služe prvenstveno za savladavanje plijena (Casewell i sur., 2014a) zbog čega su razvile jedinstveno građen venomni aparat čije specijalizirane žlijezde luče raznovrsne toksične komponente. Razvoj otrova i sustava za njegovu produkciju i sekreciju dogodio se prije 60 (Ferraz i sur., 2019) do 170 milijuna godina (Casewell, 2016), najvjerojatnije kao odgovor na novonastale uvjete u okolišu povezane s ubrzanom ekspanzijom ptica i malih, brzih sisavaca u istom periodu (Isbell, 2006) te predstavlja ključnu prilagodbu odgovornu za prelazak s mehaničkog (davljenjem) na kemijski (otrovom) način podčinjavanja plijena. Novorazvijeni način pribavljanja hrane omogućio je zmijama otrovnicama, osim efikasnije strategije lova, savladavanje i probavljanje dotada nedostupnih životinjskih vrsta koje veličinom nadilaze i njih same (Calvete i Sanz, 2007; Vidal, 2002). Nakon toga uslijedilo je intenzivno širenje i diversifikacija u pravcu razvoja tzv. “naprednih“ zmija (Fry i sur., 2006).

Od svih otrova koje nalazimo u prirodi, zmije otrovnice produciraju onaj najsloženijeg sastava budući da njihov sadržaj preko 100 različitih bioaktivnih molekula, uglavnom proteina i

peptida varijabilne toksičnosti koji ovisno o biološkoj ulozi, zasebno ili sinergističkim djelovanjem, izazivaju mnoštvo farmakoloških manifestacija u organizmu recipijenta u cilju njegove imobilizacije, paralize, usmrćivanja i probavljanja (Calvete i sur., 2007; Warrell, 2010). Izrazita heterogenost sadržaja otrova izražena je na gotovo svim filogenetskim razinama (Casewell i sur., 2020; El-Aziz i sur., 2019), a nastala je kao rezultat prirodnog procesa pozitivne selekcije uvjetovanog u velikoj mjeri trofičkim adaptacijama na određeni ekosistem, kao i interakcijama između predatora i plijena (Arbuckle, 2015; Gutiérrez i sur., 2017; Mackessy, 2010). Osim navedenog, svojstvu varijabilnosti pridonijeli su u različitom opsegu i razni drugi faktori. Tako je kod istih podvrsta rasprostranjenih na različitim geografskim lokalitetima primijećena neočekivano velika razlika u sastavu venoma (Alape-Girón i sur., 2008; Paulchamy, 2010). Neka istraživanja pokazala su da količina raspoloživog toksičnog sekreta, koncentracija proteina koje sadrži te udio pojedinih toksičnih komponenti podliježu promjenama u ovisnosti o dobi (Durban i sur., 2017; Mackessy, 2010) te, u znatno manjoj mjeri, spolu jedinke (Pimenta i sur., 2007). Pretpostavka o mogućem utjecaju sezonskih promjena dosad je našla svoje uporište samo na nekolicini primjera, uključujući i podvrstu *V. a. ammodytes* čijom je mužnjom tijekom zimskog perioda ustanovljeno odsustvo dviju ključnih toksičnih komponenti (Gubenšek i sur., 1974).

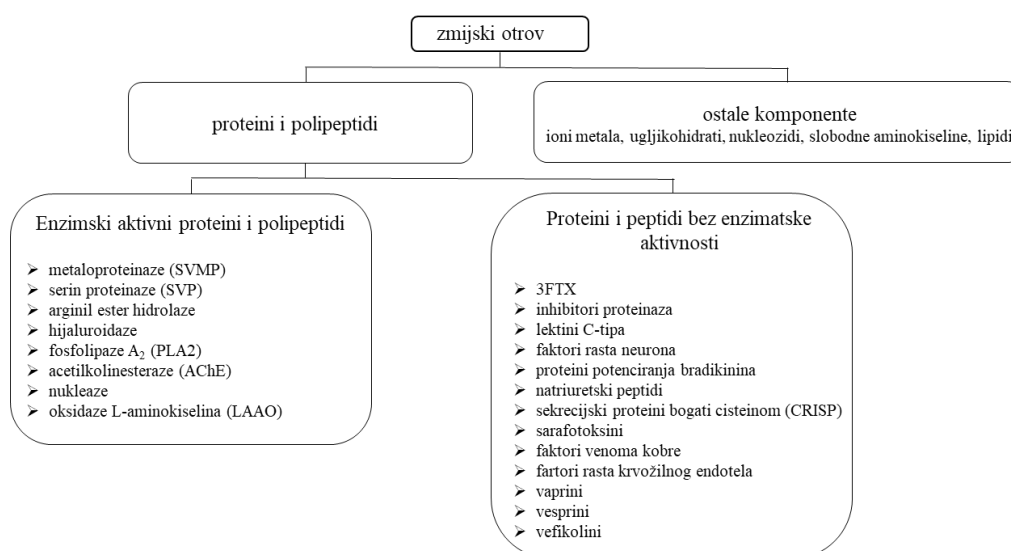
Međutim, ključni događaji u procesu kreiranja fenotipske varijabilnosti otrova i njegove funkcionalne inovativnosti odigravali su se na molekularnom nivou kroz opetovano dupliciranje usko ograničenog broja genskih obitelji (otprilike 5-10) (Casewell i sur., 2014a; Giorgianni i sur., 2020) koje su, prije evolucijske radijacije nadporodice *Colubroidea*, kodirale proteine s normalnim fiziološkim funkcijama, da bi nakon tog događaja bile regrutirane iz drugih organa u jedinstveni venomni proteom (Calvete i sur., 2007). Iznimku od toga čine CRISP i toksini iz grupe kalikreina za koje postoji pretpostavka da su nastale modifikacijom već postojećih proteina eksprimiranih u žlijezdama slinovnicama (Fry, 2005). Postavši dijelom venomnog aparata, mobilizirani geni primarnu funkciju kodiranja za proteine endofiziološkog učinka zamjenili su sasvim novom ulogom, kodirajući za proteine egzofiziološkog utjecaja koje nazivamo toksinima (Jackson i sur., 2016). Dupliciranje gena dovelo je do redundantnosti koja se neuobičajeno učestalo pojavljuje unutar genoma venomnog aparata (Chang i Duda, 2012) gdje mnogobrojne kopije gena ostaju neko vrijeme zaštićene od utjecaja negativne selekcije po principu kojeg se većina njih u konačnici ipak eliminira. Međutim, manji broj u procesu prirodne selekcije ostao je sačuvan stekavši novu funkciju koja svojom osobitošću pridonosi kvaliteti otrova u smislu njegove veće učinkovitosti u savladavanju plijena, pri čemu su

najvjerojatnije prednost imali sekrecijski proteini porijeklom iz funkcionalno različitih multigenjskih obitelji (Calvete i sur., 2007; Casewell i sur., 2020). Redundancija u egzofiziološkom sistemu kakav je venomni aparat zmija otrovnica očituje se kroz primjere postojanja dva ili više toksina, a često i više izoformi jednog toksina s istim ciljnim djelovanjem na molekularnoj razini. Primjer toga je *Pseudonaja modesta*, otrovnica iz porodice *Elapidae* u čijem je sekretu venomne žlijezde analizom transkriptoma identificirano 46 različitih izoformi 3FTx otrova neurotoksičnog djelovanja koje sve djeluju na isti postsinaptički nikotinski receptor za acetilkolin premda s različitim afinitetom za različite receptorske podtipove (Jackson i sur., 2013). Na funkcijskom nivou, redundancijom nastaju dva ili više različita toksina koji neovisno jedan o drugom i potencijalno različitim mehanizmima dovode do istog konačnog ishoda otrovanja po žrtvu ugriza (paraliza, imobilizacija, smrt), ispunjavajući na taj način primarnu funkciju otrova (Jackson i sur., 2016).

Bitno je naglasiti da osim genskih modifikacija, kao što su duplikacija, zatim potpuni ili parcijalni gubitak gena te nakupljanje sinonimnih i nesinonimnih zamjena (Casewell i sur., 2020), u generiranju kompozicijski i funkcionalno različitih koktela komponenti otrova prisutnih unutar srodnih zmijskih vrsta, od ključnog su značaja također kontrolni regulacijski mehanizmi transkripcijskih i translacijskih procesa. Premda su neke studije pokazale podudarnost između količine genskih transkripata specifičnih za toksine i proteine detektirane u otrovu (Aird i sur., 2013), mnoge druge opovrgnule su tu korelaciju (Durban i sur., 2011). Naime, analizom pojedinih duplikata gena, tzv. paraloga, unutar iste genske obitelji uočena je visoka transkripcijska aktivnost gena bez posljedično razmjernе proteomske zastupljenosti u sadržaju venoma ili u obrnutom slučaju, izrazito viša proteomska prisutnost u odnosu na količinu transkriptoma, što govori u prilog hipotezi da transkripcijski faktori diferencijalno djeluju isključivo na pojedinačne genske duplikate bez učinka pojačavanja ili suprimiranja cjelovite genske obitelji. Dodatno, opsežnim interspecifičnim varijacijacijama venoma pridonose i posttranslacijske modifikacije nastale proteolitičkim cijepanjem toksina čija je pojava ponajviše detektirana unutar genskih obitelji koje kodiraju za metaloproteaze (SVMP, engl. *snake venom metalloprotease*) i lektine C-tipa (CTL, engl. *C-type lectins*) za razliku od sekrecijskih fosfolipaza A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, engl. *phospholipase A<sub>2</sub>*) i sekrecijskih proteina bogatih cisteinom (CRISP, engl. *cysteine-rich secretory protein*) kod kojih ova vrsta modifikacije nije pronađena niti u jednom otrovu (Casewell i sur., 2014a). Većina proteina i peptida zmijskih otrova egzistiraju kao monomeri, dok se neki od njih kovalentnim i/ili nekovalentnim vezama udružuju u složene strukture kao homo- ili heteromeri što u pravilu dovodi do njihovog

snažnijeg toksičnog djelovanja putem povećanog afiniteta vezanja na ciljni receptor u organizmu žrtve. Ukoliko pri formiranju ovakvih kompleksa dođe do izlaganja aminokiselina dotada skrivenih u unutrašnjosti monomera u mogućnosti su steći potpuno novu funkciju koja se ostvaruje prepoznavanjem nove ciljane molekule (Doley i Kini, 2009).

Biokemijski gledano, zmijski otrovi složene su smjese sastavljene od različitih komponenti (Slika 4) uglavnom proteina i polipeptida koji čine 90-95% cjelokupne suhe tvari među kojima su neki enzimi, a neki biomolekule bez katalitičkih aktivnosti. U znatno manjoj mjeri u sastavu venoma nalazimo i organske molekule kao što su slobodne aminokiseline, lipidi, ugljikohidrati i nukleozidi te različite anorganske ione od kojih je najzastupljeniji natrij, zatim cink, kalcij i kadmij (El-Aziz i sur., 2019). Heterogenost venoma proizlazi upravo iz varijabilne zastupljenosti pojedinih sastavnih komponenti, ponajprije proteinskih budući da su one prisutne u najvećem udjelu i širokom dijapazonu različitih izoformi koje, bilo pojedinačno, bilo kao sastavni dijelovi kompleksnih struktura, izazivaju mnogostruke oblike homeostatskih poremećaja (Feola i sur., 2020). Većina njih u osnovi pripada samo malom broju glavnih multilokusnih genskih obitelji među kojima dominiraju sekrecijske fosfolipaze A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> engl. *phospholipase A<sub>2</sub>*), metaloproteinaze (SVMP, engl. *snake venom metalloprotease*), serinske proteinaze (SVSP, engl. *snake venom serine protease*) i 3FTX toksini (engl. *three-finger toxin*), dok sekundarne obitelji obuhvaćaju CRISP proteine, oksidaze L-aminokiselina (LAAO, engl. *L-amino acids oxidase*), proteine nalik lektinu C tipa (CTL, engl. *C-type lectin-like protein*) disintegrine te natriuretske peptide (Slagboom i sur., 2017).



**Slika 4.** Sastav zmijskog otrova (preuzeto i prilagođeno iz El-Aziz i sur., (2019). Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving. *Toxins*, 11(10), 1–25).

Kako su posljedice otrovanja uslijed ugriza zmija otrovnica prepoznate na globalnoj razini kao javnozdravstveni problem, većina istraživanja njihovog otrova usmjerena je na otkrivanje biokemijskih mehanizama pomoću kojih izazivaju patološke i s medicinskog stanovišta kritične učinke na različita tkiva i organske sustave prema kojima se dijele na tri osnovne skupine: neurotoksične, hemotoksične i citotoksične (Casewell i sur., 2020; Feola i sur., 2020). Poznata je činjenica da mnoge vrste zmija otrovnica posjeduju različite izoforme istih komponenti otrova kojima postižu višestruko toksično djelovanje (Ferraz i sur., 2019; Slagboom i sur., 2017) i rezultati brojnih istraživanja potkrepljuju ovu činjenicu. Primjer takve raznovrsnosti su toksini 3FTX obitelji, dominantno prisutni u otrovu mnogih zmija porodice *Elapidae*, koji imaju afinitet vezanja na višestruke ciljne molekule s različitim biološkim djelovanjem. Neki od njih primarno su odgovorni za posljedice neurotoksičnog fenotipa otrovanja (Slagboom i sur., 2017) kojeg ostvaruju vezanjem na postsinaptičke receptore različitih ionskih kanala inhibirajući prijenos neurotransmitera što u konačnici dovodi do neuromuskularne paralize dišnog sustava žrtve (Ferraz i sur., 2019; Gutiérrez i sur., 2017). Neke druge izoforme ovog toksina uzrokuju citotoksični učinak oštećujući lokalno tkivo putem interakcije s hemostatskim komponentama kao što su trombociti ili faktor X (Ferraz i sur., 2019). Nadalje, glavne komponente venoma zmija porodice *Viperidae* čini skupina metaloproteinaza ovisnih o ionima cinka (SVMP) koje posjeduju enzimsku aktivnost, a prema strukturi i vrsti proteinskih domena od kojih su sastavljene kategorizirane su u klase P-I, P-II i P-III (Fox i Serrano, 2008, 2009). Citotoksično djelovanje nekih od njih očituje se kroz razarajuće djelovanje na osnovne građevne komponente staničnih membrana što dovodi do obilnog krvarenja i pada krvnog tlaka, dok hemotoksična aktivnost narušava homeostazu krvožilnog sustava uzrokujući koagulopatiju nastalu aktivacijom ili cijepanjem faktora zgrušavanja krvi (Slagboom i sur., 2017). Serinske proteinaze proteini su karakteristični za sastav venoma porodice *Viperidae* koji katalitički cijepaju peptidnu vezu iza pozitivno nabijenih ili hidrofobnih aminokiselina. Njihov primarni efekt ispoljava se izazivanjem lokalnog oteknuća te pojavom hiperalgezije mehanizmima djelovanja koji još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, dok se hemotoksična aktivnost manifestira antagonističkim djelovanjem na koagulaciju krvi (Kang i sur., 2011).

Činjenica da postoje značajne varijacije u sastavu zmijskih otrova na inter- i intraspecifičnoj, pa čak i ontogenetičkoj razini, otežavajuća je okolnost zbog koje razvoj učinkovitog lijeka širokog spektra djelovanja protiv otrovanja uzrokovanog ugrizima medicinski značajnih zmija otrovnica predstavlja kompleksan izazov (Casewell i sur., 2014a;

Durban i sur., 2017; Jackson i sur., 2016), pogotovo kod nastojanja da se jednim terapeutikom neutraliziraju otrovi porijeklom iz više različitih vrsta (Ferraz i sur., 2019). Osjetan napredak u tom pravcu ostvaruje se zahvaljujući razvoju novog interdisciplinarnog pristupa koji pod zajedničkim nazivom tzv. “-omics“ tehnologija obuhvaća genomiku, transkriptomiku i proteomiku. Njegovom implementacijom omogućena je detaljna karakterizacija sve većeg broja konstituenata otrova čime se kontinuirano proširuju spoznaje koje povezuju njihovu strukturu s mehanizmima djelovanja i biološkom funkcijom (Jackson i sur., 2013), te se stvara baza podataka na osnovu koje je onda moguće predvidjeti učinkovitost antivenoma da neutralizira toksine i njihove brojne varijante (Casewell i sur., 2020).

Toksini koje produciraju zmijske odnedavno nisu interesantni samo s aspekta envenomacijskih patofizioloških učinaka koje izazivaju, već i kao bogat izvor multifunkcionalnih bioloških molekula koje se u sve većem opsegu primjenjuju kao platforme za dizajniranje novih lijekova zahvaljujući svojstvu njihove ogromne varijabilnosti i visoko izražene specifičnosti vezanja za ciljne molekule u tkivima, što su poželjne predispozicije svakog učinkovitog farmaceutika (Koh i Kini, 2012; Sajevec i sur., 2011). U sve većem broju već odobrenih i medicinski primijenjenih komponenti otrova, proteinaze, disintegrini i lektini C-tipa samo su neki primjeri venomnih konstituenata koji su zbog antikoagulacijskog djelovanja našli primjenu u kliničkoj praksi (Fatah, 2014; Slagboom i sur., 2017). Komponente zmijskih otrova također se često koriste kako u istraživanjima mehanizama normalnih fizioloških procesa, tako i u svojstvu alata pri postavljanju kliničkih dijagnoza primjer čega je toksin ekrin koji se primjenjuje u metodi za kvantificiranje izravnih trombinskih inhibitora (Nowak, 2003).

### 2.2.1. OTROV ZMIJA PORODICE *VIPERIDAE* - SASTAV I DJELOVANJE

Proteinske komponente toksičnog djelovanja venoma zmijske otrovnice pokazuju veliku biokemijsku varijabilnost i posljedično tome jednako raznolike mehanizme patogenog učinka (Latinović i sur., 2016). U sastavu njihovog otrova nalazi se između 50 i 200 toksičnih proteina (Slagboom i sur., 2017) koji su klasificirani u sljedeće četiri glavne skupine: (1) fosfolipaze A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>); (2) metaloproteinaze (SVMP); (3) serinske proteinaze (SVSP); (4) 3FTX toksini, te 6 sekundarnih proteinskih obitelji: (1) Kunitz peptidi; (2) sekrecijski proteini bogati cisteinom (CRISP); (3) oksidaze L-aminokiselina (LAAO); (4) lektini C tipa (CTL), (5) disintegrini; (6) natriuretski peptidi. Preostale komponente svrstavaju se u skupinu manje bitnih

(acetilkolinesteraze, hijaluronidaze, nukleotidaze, fosfodiesteraze, fosfolipaze B, faktor rasta neurona, faktor rasta krvožilnog endotela, vesprin/ohanin), zatim rijetkih (36 obitelji) i konačno, jedinstvenih proteinskih obitelji kojoj pripadaju toksini specifično prisutni u venomu samo jednog roda (Tasoulis i Isbister, 2017).

Sadržaj venoma porodice *Viperidae* odlikuje se posebno impresivnom heterogenošću s dominantno prisutnim enzimski aktivnim konstituentima što su potvrdili rezultati brojnih proteomskih istraživanja (Angulo i sur., 2008; Nawarak i sur., 2003; Sanz i sur., 2008; Sanz i sur., 2006) i zbog čega svaka vrsta pojedinačno raspolaže specifičnom smjesom otrovnih komponenti (Casewell i sur., 2020). Predstavnice ove porodice uzrokuju envenomaciju koja dovodi do različitih homeostatskih poremećaja izazvanih pretežito hemotoksičnim i citotoksičnim djelovanjem otrova. Klinička slika koja se pri tome razvija varira i premda ovisi o vrsti otrovnice koja je uzrokuje, karakteristično se manifestira kao drastično lokalno oštećenje tkiva na mjestu aplikacije otrova koje prati ekstenzivno krvarenje s progresivnim razvojem edema, pojavom boli i plikova, tahikardijom te hipotenzijom kao najočitijim simptomom sistemskog širenja otrova (Di Nicola i sur., 2021; Malina i sur., 2008; Warrell, 2005). U uznapređovalom stadiju otrovanja dolazi do razvoja dermonekroze i nekroze mišića za što su primarno odgovorni toksini koji pripadaju  $Zn^{2+}$ -ovisnim metaloproteinazama i fosfolipazama  $A_2$  iz grupe II. U rijetkim slučajevima pojavljuju se i simptomi neurotoksičnog djelovanja (Di Nicola i sur., 2021) većinom nastali nakon ugriza poskoka (*V. ammodytes*) u čijem se otrovu, ovisno o podvrsti, nalaze vipoksin, vaspin ili amoditoksini, specifične neurotoksične presinaptičke fosfolipaze  $A_2$  (Georgieva i sur., 2008; Hempel i sur., 2018; Zanetti i sur., 2018) odgovorne za pojavu pareze ili paralize kranijalnih živaca (Di Nicola i sur., 2021; Karabuva i sur., 2016). Među manje učestalim, ali ipak povremeno prisutnim, pojavljuju se simptomi koji se povezuju uz nefrotoksično i kardiotoksično djelovanje otrova ove porodice zmijski (Gutiérrez i sur., 2005b).

### 2.3. MEDICINSKI PROBLEM OTROVANJA ZMIJSKIM VENOMOM

Otrovanje venomom zmijski otrovnica značajan je i široko rasprostranjen medicinski problem. Procjenjuje se da oko 2,7 milijuna ljudi godišnje pati od posljedica envenomacije od čega između 81 000 i 138 000 završava fatalnim ishodom, dok u slučaju preživljenja u više od 400 000 slučajeva dovodi do trajnog invaliditeta (Gutiérrez i sur., 2017; WHO, 2019). Ovaj podatak ne iznenađuje ako uzmemo u obzir da zmijski otrovnice nastanjuju gotovo sve zemlje



koje se na zapadnoj polutki nalaze unutar geografskih širina 50° sjeverno i 50° južno te unutar istočne polutke između 65° sjeverno (Skandinavija) i 50° južno. Na kopnu ih nalazimo na nadmorskim visinama čak iznad 4000 metara, dok morske zmijske dosežu dubine veće od 100 metara ispod površine oceana (Warrell, 2010). No, unatoč širokoj geografskoj distribuciji, područja s najvećom incidencijom zmijskih ugriza obuhvaćaju prvenstveno topla tropska i suptropska područja južne i jugoistočne Azije, Subsaharske Afrike te Centralne i Južne Amerike (Harrison i sur., 2009; WHO, 2019; Williams i sur., 2010) u kojima stanovništvo zbog prirode poslova koje obavlja kao izvorom prihoda dolazi u bliski kontakt sa zmijama. U posebno rizičnu skupinu ubrajaju se poljoprivredni djelatnici i ribari između 10 i 40 godina starosti koji žive u ruralnim i u pravilu siromašnim područjima (Alirol i sur., 2010). Njihovom smrću ili osakaćivanjem smanjuje se radno sposobna populacija posljedice čega osjećaju kako obitelji samih žrtava, tako i šira društvena zajednica što ekonomski opterećuje ponajviše zemlje u razvoju niskog socioekonomskog statusa, ograničenog pristupa edukaciji i primjerenoj zdravstvenoj skrbi (Gutiérrez i sur., 2011; Harrison i sur., 2009).

Primjenom odgovarajućeg antivenoma, kao jedinog djelotvornog i znanstveno priznatog farmaceutika u tretiranju oboljelih od otrovanja zmijskim venomom, znatno je reducirana stopa smrtnosti, premda se još uvijek u mnogim slučajevima ne postiže odgovarajući terapijski učinak za što je velikim dijelom odgovorna poliklonska priroda ovih pripravaka koji često sadrže i antitijela nespecifična za otrovne komponente (Calvete i sur., 2007). Naime, zbog ogromne različitosti u sastavu venomskih sekreta, antivenomi proizvedeni korištenjem jedne ili više vrsta venoma zmijske s određenog geografskog područja često ne pokazuju križnu reaktivnost prema toksinima zmijske nekog drugog područja (Harrison et al., 2009; Senji Laxme i sur., 2019; Williams i sur., 2011), zbog čega su sva dosadašnja nastojanja proizvodnje univerzalnog lijeka bila neuspješna (Warrell, 2010). To je ujedno i razlog njegove visoke cijene i činjenice da upravo najpotrebitije siromašne zemlje ne mogu financijski podnijeti teret nabave ovog farmaceutika u dostatnim količinama (Alirol i sur., 2010; Guidolin i sur., 2016). Dodatno limitirajući faktor je otežana dostava u često teško dostupna područja s lošom infrastrukturom u kojima nije moguće osigurati tzv. "hladni lanac" distribucije neophodan za održavanje stabilnosti lijeka tekuće formulacije, a time u konačnici i njegove učinkovitosti (Al-Abdulla i sur., 2013; Gutiérrez i sur., 2011; Gutiérrez, 2018). Preporuka da se takva područja opskrbljuju temperaturno stabilnijim liofiliziranim pripravcima antivenoma često nije moguća s financijskog aspekta budući da postupak liofilizacije podiže troškove proizvodnje, a time i cijenu konačnog produkta (Segura i sur., 2009).

U nedostatku promptne medicinske pomoći i adekvatnog znanja te uz snažnu prisutnost tradicionalno-kulturološkog konteksta, žrtve ugriza nerijetko se za pomoć obraćaju lokalnim iscjeljiteljima čije metode, poput rezanja i podvezivanja ugriznih rana te liječenja raznim travama i biljnim napicima, osim što nemaju terapijski učinak, svojim štetnim djelovanjem pridonose pogoršanju razvoja bolesti (Gutiérrez, 2018; Otero-Patiño i sur., 2012; Theakston i sur., 2003).

Zbog svega navedenog, otrovanje nastalo ugrizima zmijske otrovnice prepoznala je kao zdravstveni problem od velikog značaja Svjetska zdravstvena organizacija, te ga je 2017. godine uvrstila na popis zanemarenih tropskih bolesti kategorije A, a godinu dana kasnije razvila opsežnu strategiju djelovanja s ciljem reduciranja smrtnosti i invaliditeta za 50% do kraja 2030. godine. U planu aktivnosti postavljena su četiri osnovna cilja koji obuhvaćaju edukaciju zdravstvenih radnika i lokalnog stanovništva u smislu preventivnog, ali i medicinski relevantnog djelovanja po otrovanju, jačanje zdravstvenog sustava, povećanje dostupnosti sigurnog i učinkovitog antivenoma te internacionalnu suradnju zemalja izravno pogođenih ovom bolešću s onima koje svojim resursima mogu pridonijeti zajedničkim naporima za uspješnu provedbu svih prethodno navedenih koraka u borbi protiv ove bolesti (WHO, 2019; Williams i sur., 2010).

## 2.4. ANTIVENOMI

### 2.4.1. POVIJESNI PREGLED I PERSPEKTIVA RAZVOJA

Otkriće serumske terapije davne 1890. godine bio je ključni događaj koji je prethodio kasnijem razvoju mnogobrojnih terapija za humanu uporabu među kojima svakako važno mjesto zauzima i ona namijenjena liječenju posljedica otrovanja zmijskim venomima. Navedene godine Behring i Kitasato proveli su eksperiment imunizirajući kuniće inaktiviranom kulturom bakterije *Clostridium tetani* čiju su krv potom inokulirali u trbušnu šupljinu miševa i time ih zaštitili od infektivnog djelovanja divljeg tipa iste bakterije. Opaženi fenomen naveo je ove znanstvenike na zaključak da krv imunizirane životinje sadrži medijatore koji imaju sposobnost neutralizacije stranih antigena što čini osnovnu postavku principa djelovanja humoralne imunosti. Dvije godine kasnije provedeno je prvo kliničko ispitivanje serumske terapije u liječenju difterije na ljudima koje je zbog loše kvalitete nepročišćenog seruma polučilo slab uspjeh. Međutim, već sljedeća klinička studija liječenja serumom dobivenog imunizacijom većih životinja pokazala je znatno veću učinkovitost i rezultirala oporavkom 77%

retirane populacije djece oboljele od iste bolesti (Pucca i sur., 2019). Nakon toga, Paul Erlich postavio je koncept pasivne i aktivne imunizacije uspostavivši po prvi puta postupak dobivanja visokokvalitetnog seruma protiv difterije na proizvodnoj skali pogodnog za primjenu u ljudi. Imunizacijom životinja malim dozama otrova čiju je količinu postepeno povećavao postigao je zaštitni učinak nakon njihovog izlaganja inače smrtonosnoj dozi istog toksina (Bordon, 2016). Istraživanjima tijekom narednih 30-tak godina postignut je ogroman napredak u razumijevanju djelovanja antiseruma i razvoja serumske terapije zahvaljujući spoznajama vezanima za mehanizam generiranja antigen-specifičnih antitijela, otkrivanjem njihove primarne, sekundarne i tercijarne strukture (Porter, 1959; Silverton i sur., 1977; Tiselius i Kabat, 1938), a s tim u vezi i funkcionalnih osobitosti.

Prvi pripravak zmijskog antivenoma datira s kraja 19. stoljeća kada je francuski liječnik Albert Calmette po prvi puta primijenio prethodno opisanu Erlichovu strategiju pasivnog imuniziranja. Opetovanom aplikacijom otrova kobre uz postepeno povećanje njegove količine i uz dodatak natrijevog ili kalcijevog hipoklorita, postigao je rezistenciju imuniziranih kunića na znatno veću količinu od originalno letalne doze zmijskog toksina (Pucca i sur., 2019). Ovaj antiserum je imao osim preventivnog i terapijski učinak u životinja što je tada bila indikacija mogućeg terapijskog djelovanja i u ljudi. Međutim, kunići kao male životinje proizvodile su nedostatne količine seruma, stoga je Calmette imunizirao magarce čiji serum, osim što je zadovoljio kvantitetom, također je pokazao i povećano terapijsko djelovanje zbog čega je ovaj pripravak postao prvi komercijalno dostupan antivenom (León i sur., 2013) koji je vrlo brzo našao svoje mjesto u klinici i to bez prethodno provedenih kliničkih ispitivanja (Warrell, 2010). Iako učinkovit u suzbijanju toksičnog djelovanja, izuzetno visoka incidencija popratnih pojava ukazala je na negativnu stranu primjene neobrađenog, sirovog antiseruma što je dovelo do spoznaje da je pročišćavanje preparacija animalnog porijekla nezaobilazan korak u pripravi terapijama namijenjenih humanoj uporabi (León i sur., 2013). Iza toga uslijedio je razvoj i prvog polivalentnog antivenomnog pripravka imunizacijom konja i mula smjesom venoma dvije zmijske otrovice, *Bothrops jararaca* i *Crotalus durissus terrificus*, za što je zaslužan brazilski liječnik Vital Brazil (Hawgood, 1992).

Tijekom narednih godina pa sve do danas mnogobrojne države, čije se stanovništvo susreće s problemom otrovanja zmijskim toksinima, usmjerile su svoja istraživanja u pravcu razvoja sigurnih i učinkovitih antivenoma (Gutiérrez i sur., 2011; Pucca i sur., 2019) specifičnih prvenstveno za otrove medicinski značajnih domicilnih otrovnica. No unatoč značajnim

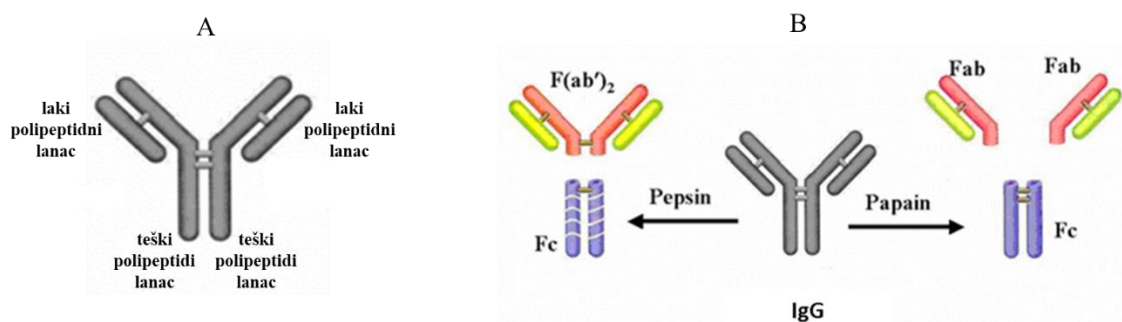
postignućima na području biotehnologije antivenomi dobiveni tradicionalnim načinom, putem imunizacije životinja iz čije se hiperimune plazme zatim različitim postupcima pročišćavanja izdvajaju specifična antitijela IgG klase, još uvijek su jedina vrsta terapeutika koji se primjenjuju u kliničkoj praksi (Jenkins i sur., 2019; León i sur., 2005; León i sur., 2014; Warrell, 2010). Pročišćavanje je neophodan korak proizvodnog procesa kojim se odstranjuju preostale životinjske komponente u cilju smanjenja pojavnosti i intenziteta popratnih štetnih pojava uslijed primjene veće količine proteina stranih ljudskom organizmu. No, iako pročišćeni, antivenomi još uvijek izazivaju u određenoj mjeri štetne popratne pojave (Lamb i sur., 2017; Watson i sur., 2020) zbog čega se kontinuirano ulažu naponi unutar znanstvene zajednice kako bi se poboljšali postojeći proizvodni postupci (Raweerith i Ratanabanangkoon, 2003; Rojas i sur., 1994) ili razvile potpuno nove platforme njihovog dizajniranja i proizvodnje (Laustsen i sur., 2018a). Pri tome uvelike pomaže razvoj novih metoda od kojih je već dobro poznata tehnologija prikaza antitijela kolekcijama bakteriofaga (Meng i sur., 1995) i tehnologija hibridoma primjenom kojih se nastoje dobiti monoklonska antitijela specifično usmjerena na neutralizaciju najrelevantnijih toksina zmijskog venoma odgovornih za nastajanje teških patoloških manifestacija envenomacije. Alternativni pravac razvoja terapeutika za liječenje otrovanja izazvanih zmijskim ugrizom u potpunosti isključuje antitijela te se bazira na drugim vrstama molekula kao što su primjerice oligonukleotidni aptameri (Chen, Y.J., i sur., 2016), nanočestice (Karain i sur., 2016), peptidi (Laustsen, 2016), te inhibitori malih molekula (Lewin i sur., 2016) za koje je sve dokazano da imaju sposobnost neutralizacije komponenti zmijskih venoma (Knudsen i Laustsen, 2018) premda niti jedna od njih nije još dosegla razinu kliničke primjene (Pucca i sur., 2019).

#### 2.4.2. VRSTE ANTIVENOMA

Jedini učinkovit i znanstveno priznat pristup liječenja posljedica otrovanja zmijskim venomima jest primjena antivenoma (León i sur., 2005; Vargas i sur., 2015), biofarmaceutika baziranih na specifičnim antitijelima koji se u kliničkoj praksi uspješno koriste već duže od stoljeća (Gutiérrez i sur., 2011; León i sur., 2018; Otero-Patiño i sur., 1998). Dobivaju se iz hiperimune plazme uglavnom velikih životinja (Gutiérrez i sur., 2017; Harrison i sur., 2006) različitim metodama pročišćavanja kojima se izdvajaju i koncentriraju antitijela IgG klase sa sposobnošću neutralizacije zmijskih toksina (Gutiérrez i sur., 2017; Laustsen i sur., 2018a). Ukoliko je imunizacija provedena jednim venomom kao antigenom, dobiveni antivenom nazivamo monospecifičnim jer je njegovo djelovanje primarno usmjereno na otrov zmije

korištene u postupku proizvodnje. Nasuprot tome, polispecifični antivenomi proizvode se imunizacijom smjesom venoma porijeklom iz različitih otrovnica (WHO, 2016) čime se postiže zaštita šireg spektra, iako moguće slabijeg intenziteta (Williams i sur., 2011). Također je poznato da se imunizacijom samo jednom vrstom otrova može proizvesti djelotvoran antivenom kojim se uspješno neutraliziraju križnoreaktivni venomi sličnog sastava toksičnih komponenti različitih vrsta zmijsa (Casewell i sur., 2014b; Casewell i sur., 2020; Kurtović i sur., 2021).

Prema obliku aktivne tvari razlikujemo antivenome koji u svom sastavu sadrže cjelovite imunoglobuline ili njihove Fab ili  $F(ab')_2$  fragmente (León i sur., 2018; Zolfagharian i Dounighi, 2013). Imunoglobulini G (150 kDa) su glikoproteini koji se sastoje od četiri polipeptidna lanca, dva identična laka (25 kDa) i dva identična teška lanca (50 kDa). Teški lanci međusobno, kao i po jedan teški i jedan laki lanac povezani su disulfidnim vezama dajući molekuli karakterističan oblik s dva identična mjesta za vezanje antigena (Fab, engl. *antigen-binding fragment*), sastavljena od varijabilne regije obje vrste lanaca, i Fc fragment (engl. *fragment crystallizable*) sačinjen od konstantne regije teških lanaca odgovoran za funkcionalne razlike različitih izotipova imunoglobulina (Slika 5A). Fc fragment je moguće odvojiti od ostatka IgG molekule uvođenjem dodatnog koraka enzimske razgradnje u proizvodni postupak primjenom pepsina, odnosno papaina, čime se umjesto cjelovitih imunoglobulina dobivaju antivenomi koji kao aktivnu tvar sadrže Fab ili  $F(ab')_2$  fragmente (Slika 5B).



**Slika 5.** Struktura imunoglobulina (A) i aktivne komponente antivenoma (B) (preuzeto iz Zolfagharian, H. i Mohammadpour Dounighi, N., (2013). Progress and improvement of the manufacturing process of snake antivenom. *Archives of Razi Institute*, 68 (1), 1–10).

Osnovni razlog zbog kojeg neki proizvođači odstranjuju Fc dio imunoglobulina je smanjenje količine proteina stranih ljudskom organizmu, koja se unosi aplikacijom, čime se ujedno smanjuje vjerojatnost nastanka nuspojava (Fernandes i sur., 2008; Kurtović i sur., 2020, 2019).

### 2.4.3. MEHANIZMI DJELOVANJA ATIVENOMA

Učinkovitost liječenja terapijskim antitijelima ili njihovim fragmentima u velikoj mjeri uvjetovana je brzinom njihove apsorpcije, zatim koncentracijom kojom dopiru do mjesta djelovanja otrova, te vremenu zadržavanja u tijelu i uklanjanju iz organizma. Navedeni procesi znatno ovise o strukturnim i biofizičkim svojstvima aktivnih komponenti antivenoma (Deng i sur., 2012; Liu, 2018), a njihova kombinacija definira farmakokinetički profil primijenjenog terapeutika (Laustsen i sur., 2018b). Molekulska masa komponenti antivenoma se pokazala jednim od najrelevantnijih faktora kako za brzinu njihove raspodjele, tako i za vrijeme potrebno za eliminaciju. Cjeloviti IgG-i, relativno velike molekulske mase (oko 150 kDa), kao i njihovi F(ab')<sub>2</sub> fragmenti (oko 100 kDa) sporije se eliminiraju iz organizma zbog čega dugotrajnije terapijski djeluju te stoga učinkovitije neutraliziraju hemotoksine koji također duže opstaju u organizmu pacijenata. Nasuprot tome, Fab fragmenti kao aktivne tvari male molekulske mase (oko 50 kDa), bolje djeluju protiv malih neurotoksičnih komponenti venoma zahvaljujući svojstvu brzog prodiranja u ciljna tkiva. Prema rezultatima nekih istraživanja brzina apsorpcije i volumen distribucije F(ab')<sub>2</sub> pripravaka, kao i njihova koncentracija u otrovom zahvaćenim tkivima, bile su veće u usporedbi s IgG antivenomima (Ismail i Abd-Elsalam, 1998), dok se uklanjanje manjih Fab u odnosu na veće F(ab')<sub>2</sub> fragmente odvija četiri do pet puta brže (Lalloo i Theakston, 2003). Dodatno, IgG-e i F(ab')<sub>2</sub> fragmente karakterizira svojstvo dvovalentnosti što im omogućava stvaranje velikih stabilnih multivalentnih imunokompleksa s antigenima otrova koje zatim uklanjaju fagocitne stanice, eliminirajući na taj način i toksine s mjesta u tkivima zahvaćenih otrovanjem. Opisani mehanizam djelovanja nije svojstven Fab fragmentima. Oni imaju jedno antigen-vezno mjesto, a zbog male molekulske mase distribuiraju se brzo i u velikom volumenu što je ujedno i razlog njihove brze eliminacije. Negativna strana primjene antivenoma baziranih na Fab fragmentima ispoljava se kroz često ponovno izbijanje simptoma envenomacije (Kurtović i sur., 2019; WHO, 2016). No unatoč upadljivoj razlici farmakokinetičkih profila ovih proizvoda, njihova sposobnost neutralizacije toksičnih učinaka nekih otrova pokazala se podjednakom (Theakston i sur., 2003).

Protiv lokalnih simptoma antivenomi pokazuju samo ograničeno uspješno djelovanje (Lalloo i Theakston, 2003) što se pripisuje brzom prodiranju toksina uz istovremenu nemogućnost antivenoma da savlada krvno-tkivnu barijeru (Gutiérrez i sur., 1998). Jednako neučinkoviti u tom pogledu su i antivenomi koji sadrže samo Fab ili F(ab')<sub>2</sub> fragmente imunoglobulina G (Al-Abdulla i sur., 2014).

No bez obzira na vrstu aktivnog sastojka, važno je napomenuti da antivenomi kao heterologni pripravci sadrže određenu količinu i drugih, neimunoglobulinskih proteina animalnog porijekla, zbog čega njihova primjena sa sobom nosi izvjestan rizik izazivanja štetnih popratnih pojava koje se javljaju kao posljedica unosa većih količina proteina stranih ljudskom organizmu, a zbog čije prisutnosti dolazi do aktivacije imunološkog sustava recipijenta (Morais i Massaldi, 2009). To je ujedno i razlog zbog kojega je za svaki pojedini slučaj ugriza zmije otrovnice potrebno prema kliničkoj slici utvrditi težinu otrovanja te donijeti odluku o nužnosti primjene terapije na temelju procjene dobrobiti antivenoma u odnosu na moguće nuspojave (Warrell, 2010).

#### 2.4.4. NUSPOJAVE PRIMJENE ANTIVENOMA

Ovisno o vremenskom okviru unutar kojeg se pojavljuju nuspojave dijelimo na reakcije rane i reakcije kasne preosjetljivosti (Gutiérrez i sur., 2010) koje se pokreću različitim molekularnim mehanizmima i uzrokuju prepoznatljive patofiziološke učinke. Reakcije rane preosjetljivosti nastaju unutar 24 sata od primjene antivenoma u 6-59% pacijenata (Laustsen i sur., 2018b), a klasificiraju se kao pirogene i anafilaktičke (León i sur., 2013). Anafilaktičke reakcije posredovane su IgE antitijelima koja se svojim Fc krajem vežu na bazofile ili mastocite, a nakon interakcije sa specifičnim antigenom, križno povezuju te induciraju degranulaciju i oslobađanje uglavnom histamina, ali i ostalih farmakoloških medijatora, koji dovode do lokalne upalne reakcije. Simptomi variraju od blagih, primjer kojih su temperatura, glavobolja, mučnina i znojenje, preko ozbiljnijih poput proširenja krvnih žila i pada krvnog tlaka te u najgorem slučaju, po život opasnog anafilaktičkog šoka. Alternativni put izazivanja upalnog anafilaktičkog procesa odvija se medijatornim djelovanjem komponenti komplekta čija se aktivacija pokreće prisutnošću formiranih kompleksa antigen-antitijelo ili drugih proteinskih agregata (Morais, 2018; Morais i Massaldi, 2009). Pirogena reakcija izravna je posljedica kontaminacije antivenomskih pripravaka uglavnom endotoksinima zaostalim tijekom proizvodnog procesa pripreme antivenoma (Machado i sur., 2006). Ove složene makromolekularne strukture, osim proteina i fosfolipida, sadrže lipopolisaharide, najčešće prisutne pirogene supstance u farmaceuticima biološkog porijekla koje su sastavni dijelovi stanične membrane gram-negativnih bakterija.

Istraživanja su pokazala da nastanak reakcija rane preosjetljivosti prvenstveno ovisi o kvaliteti antivenomskog pripravka, ali također i o dozi, te načinu (intravenski ili intramuskularno) i brzini aplikacije. Vjerojatnost njihove pojavnosti kreće se u širokom rasponu

od 3% do iznad 80% (Caron i sur., 2009; León i sur., 2013) od čega svega 5-10% podrazumijeva razvoj teških simptoma kao što su bronhospazam, angioedema i hipotenzija (Warrell, 2010). Većina njih, ukoliko je uočena pravovremeno, uspješno se suzbija intramuskularnom aplikacijom epinefrina (Warrell, 2010) kojim se ublažavaju i najteži simptomi (Caron i sur., 2009). Međutim, pokušaji da se njime djeluje preventivno nisu se pokazali učinkovitima u kliničkim studijama, jednako kao i primjena antihistamina i kortikosteroida (Morais, 2018).

Pojavu patoloških simptoma 5 do 14 dana po primjeni antivenoma pripisujemo reakcijama kasne preosjetljivosti, poznatim još pod zajedničkim nazivom serumska bolest koja se manifestira u 5-23% slučajeva (Laustsen i sur., 2018b). Tijekom navedenog perioda imunski sustav recipijenta, prepoznavši proteinske komponente antivenoma kao strane, proizvodi antitijela te se s njima udružuje u kompleksne strukture odgovorne za aktivaciju sustava komplementa. Neki od simptoma koji se razvijaju uključuju temperaturu, osip, razvoj artiritisa, limfadenopatiju te glomerulonefritis (León i sur., 2013; Morais, 2018; Morais i Massaldi, 2009).

Na osnovu nekoliko slučajeva iz kliničke prakse primijećeno je da se ponovnom aplikacijom antivenoma koji sadrži cjelovite IgG molekule ili njihove  $F(ab')_2$  fragmente, kod prethodno senzibiliziranih pacijenata nekim od navedenih preparata, proporcionalno s ukupnom količinom heterolognog proteinskog sadržaja povećava kako brzina, tako i incidencija pojavljivanja reakcija kasne preosjetljivost (LoVecchio i sur., 2003; Morais, 2018) što navodi na zaključak da su doza i koncentracija proteina u antivenomu ključni okidači ovih neželjenih nuspojava (León i sur., 2013).

Nejasno je koji mehanizmi potiču nuspojave nakon primjene antivenoma (León i sur., 2005). U početku se incidencija štetnih popratnih pojava pripisivala Fc dijelu imunoglobulinskih molekula zbog njegove sposobnosti aktivacije sustava komplementa (Fernandes i sur., 2008). Budući da Fc fragment nema ulogu u procesu neutralizacije, većina proizvođača odlučila se tada za uvođenje dodatnog koraka enzimske razgradnje pepsinom ili papainom, kojima se ovaj dio odcjepljuje od ostatka IgG molekula te dobivaju antivenomi koji umjesto cjelovitih imunoglobulina G sadržavaju u svom sastavu samo njihove Fab ili  $F(ab')_2$  fragmente, ovisno o primijenjenom enzimu (Theakston i sur., 2003). Time se intenzitet po život opasnih anafilaktičkih nuspojava doista reducirao, ali suprotno od očekivanog, ne u zadovoljavajućoj mjeri. Štoviše, antikomplementarna aktivnost je i dalje bila prisutna nakon primjene  $F(ab')_2$  antivenoma, dok su kliničke studije provedene na antivenomima istog sastava

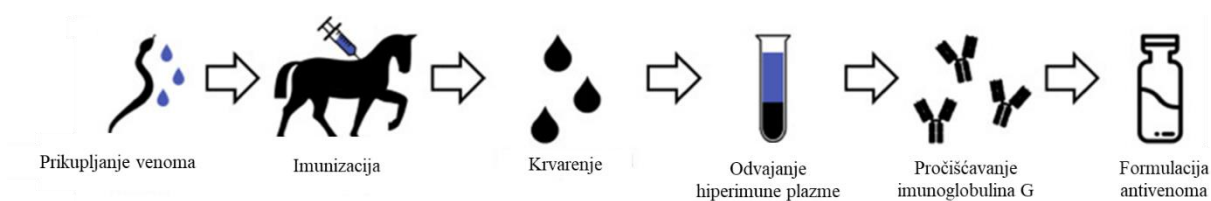


dobivenih postupkom taloženja solima visoke koncentracije pokazale veliku varijabilnost u sposobnosti izazivanja reakcija rane preosjetljivosti koja se kretala u širokom rasponu od 10 (Chippaux i sur., 1998) do 76% (Moran i sur., 1998). S druge strane nasumična klinička ispitivanja pokazala su da antivenomi dobiveni taloženjem neimunoglobulinskih molekula kaprilnom kiselinom koji sadrže cjelovite IgG molekule induciraju manje reakcija rane preosjetljivost od  $F(ab')_2$  ili IgG antivenoma dobivenih postupkom isoljavanja amonijevim sulfatom (Otero-Patiño i sur., 1998; Otero i sur., 1999). Ovakvi rezultati upućivali su na mogućnost da proces prerade plazme, tijekom kojeg se nepovoljno utječe na strukturu imunoglobulina ili njegovih fragmenata, sam po sebi može dovesti do stvaranja nepovoljnih fizikalno-kemijskih karakteristika antivenoma neovisno o aktivnoj tvari koju sadrži što dovodi do njegove nestabilnosti i pojave reakcija rane preosjetljivosti (Theakston i sur., 2003).

## 2.5. PROIZVODNJA ANTIVENOMA

### 2.5.1. OPĆENITO

Antivenomi kao farmaceutski preparati za humanu uporabu priređuju se u skladu sa strogim zahtjevima dobre proizvodne prakse (GMP, engl. *good manufacturing practice*) uz kontinuiranu kontrolu kvalitete svih kritičnih koraka proizvodnog postupka (Slika 6) od kojih svaki pridonosi jednakim udjelom identitetu, čistoći, sigurnosti i učinkovitosti konačnog produkta (WHO, 2016).



**Slika 6.** Prikaz osnovnih faza proizvodnje antivenoma (preuzeto i prilagođeno iz Knudsen, C. i sur., (2019). Engineering and design considerations for next-generation snakebite antivenoms. *Toxicon*, 167, 67-75).

Identitet antivenoma određen je izabranim životinjskim vrstama koje se koriste kao izvor venoma, odnosno specifičnošću imunoglobulina u sastavu antivenoma. Najvažnija svojstva koja određuju kvalitetu su sposobnost neutralizacije ciljnog venoma te čistoća

pripravka. Neutralizacijska sposobnost izravan je odraz kvalitete imunizacijskog postupka u uzvodnom dijelu proizvodnje, premda na nju može utjecati i postupak pročišćavanja. Čistoća dobivenog produkta ovisi o dizajnu procesa pročišćavanja. Naime, što je veća čistoća preparacije to je povoljniji odnos terapijskih IgG-a u odnosu na ukupnu količinu proteina čime se smanjuje unos heterolognih molekula, a time i mogućnost izazivanja nuspojava. Najvažniji uvjet koji mora zadovoljiti svaki pripravak jest sposobnost učinkovite neutralizacije toksina i zadržavanja u cirkulaciji sve dok se otrov širi s mjesta ugriza na što utječe nekoliko faktora kao što su vrsta aktivne supstance i njena specifičnost za otrov zmijske koja je dovela do oboljenja, doza antivenoma, vrijeme proteklo od otrovanja do primjene terapije, te težina simptoma envenomacije (León i sur., 2014).

Pripravci antivenoma također moraju biti stabilni i podnositi različite uvjete transporta i pohrane, poglavito visoku temperaturu i vlagu, što je odlika nepovoljnih klimatskih uvjeta često prisutnih u područjima s visokom incidencijom zmijskih ugriza. Nestabilnost produkta negativno se odražava na formiranje proteinskih agregata zbog kojih dolazi do gubitka učinkovitosti aktivne tvari terapeutika i pojave neželjenih popratnih pojava u recipijentima. Iako su primarno tekuće formulacije, stabilnost antivenoma moguće je povećati, a rok valjanosti produžiti liofilizacijom, postupkom kojim se biološki materijal u smrznutom stanju suši. Negativna strana uvođenja ovog koraka je dodatno povećanje troškova ionako skupog proizvodnog procesa pripreme lijeka što otežava njegovu dostupnost ekonomski inferiornim zemljama (Al-Abdulla i sur., 2013).

Unatoč kontinuiranim promjenama koje se uvode u proizvodni proces pripreme antivenoma s ciljem poboljšanja njegove kvalitete (León i sur., 2018; Raweerith i Ratanabanankoon, 2003; Rojas i sur, 1994), još uvijek nije dizajniran optimalan protokol kojim bi se dobio proizvod zadovoljavajuće učinkovitosti i sigurnosti uz prihvatljivo niske troškove proizvodnje. Idealnim procesom, imunoglobulini bi se trebali izdvojiti od ostalih proteina plazme primjenom što manjeg broja koraka koji ne narušavaju njihovu strukturu, čime bi se sačuvala stabilnost i neutralizacijska aktivnost, a učestalost popratnih pojava svela na minimum.

## 2.5.2. PROIZVODNI KORACI

### 2.5.2.1. Prikupljanje venoma

Proizvodni postupak pripreve antivenoma započinje prikupljanjem venoma podrijetlom iz jedne ili više vrsta zmija otrovnica od najvećeg medicinskog značaja za geografsko područje unutar kojega je namijenjena njegova primjena, a o čijem izboru ovisi kolika će mu biti učinkovitost, odnosno moć neutralizacije klinički najrelevantnijih toksičnih komponenti. Imajući u vidu veliku intra- i interspecifičnu varijabilnost zmijskih otrova potrebno je dobro promisliti o izboru vrsta zmija kao izvora venoma. Naime, upotrebom otrova porijeklom iz jedne vrste dobivaju se monospecifični antivenomi, čije je djelovanje ograničeno na tu vrstu ili na nekoliko srodnih vrsta zmija (obično pripadnica istog roda). Nasuprot tome, polispecifični antivenomi sadržavaju koktel IgG molekula djelotvornih spram otrova više vrsta otrovnica korištenih za njegovu produkciju (WHO, 2016).

### 2.5.2.2. Imunizacija životinja

Kvaliteta konačnog proizvoda ovisna je, između ostalog, i o imunizacijskoj shemi kojom se postepenom i opetovanom imunizacijom subletalnim količinama jednog venoma ili smjesom više njih potiče humoralni odgovor u imuniziranim životinjama s ciljem proizvodnje najvišeg mogućeg titra venom-neutralizirajućih antitijela (Kurtović et al., 2019). Pritom se koriste uglavnom domaće životinje koje se tretiraju prema strogim etičkim standardima u skladu s nacionalnim i međunarodnim konvencijama o uporabi i dobrobiti životinja (WHO, 2016).

Od samih početaka primjene serumske terapije konj je preferencijalni izbor proizvođača antivenoma budući da se uspješno uzgaja u gotovo svim klimatskim zonama, tolerira relativno velike količine venoma, a zbog svoje veličine daje, u odnosu na manje životinje, veće količine seruma (Lalloo i Theakston, 2003). U konjskom serumu dominantno prisutna je IgG klasa imunoglobulina koja, prema staroj nomenklaturi, sadrži pet potklasa: IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T) i IgG(B). Nakon identificiranja sedam gena koji kodiraju za konstantne regije teških imunoglobulinskih lanaca, uvedena je nova nomenklatura koja opisuje sedam potklasa označenih s IgG1- IgG7. U ovom radu koristila sam "stara" imena potklasa IgG-a zbog njihove dostupnosti na tržištu upravo pod tim nazivljem imajući u vidu da IgGa potklasa odgovara potklasi IgG1, IgGb potklasama IgG4 i IgG7, IgGc potklasi IgG6, te IgG(T) potklasama IgG3 i IgG5 (Lewis i sur., 2008). Činjenica da sve više ljudi pokazuje osjetljivost na konjske proteine,

naročito izražena kod ponovljene primjene antivenoma, povećava mogućnost izazivanja anafilaktičke reakcije (Morais i Massaldi, 2009). Najodgovornijom za to smatra se IgG(T) potklasa, koja je količinski druga najzastupljenija u normalnom serumu konja (Lewis i sur., 2008) i po svojoj funkciji dominantno odgovorna za neutralizacijsku aktivnost (Fernandes i sur., 2000a; Fernandes i sur., 2000b; León i sur., 2011), a zbog izraženog svojstva glikozilacije pokazuje potentno imunogenično djelovanje i veliku vjerojatnost izazivanja nuspojava (León i sur., 2011; Theakston i sur., 2003). U tom pogledu antivenomi ovčjeg porijekla smatraju se sigurnijima za upotrebu budući da ne sadrže IgG(T) antitijela i slabije su imunogenični, a kao osnovni nedostatak pripisuje im se produkcija malog volumena imunoterapeutika (Theakston i sur., 2003) te mogućnost kontaminiranja istog prionima (WHO, 2016).

Deve, kao animalni model još uvijek korišten samo u eksperimentalne svrhe, predstavljaju posebno atraktivnu alternativu u razvoju antivenoma zbog činjenice da preko 50% njihovih imunoglobulina G ne sadrži laki lanac, što znači da se specifično i jednako učinkovito prepoznavanje antigena odvija putem samo jedne varijabilne domene unutar teškog lanca čijim se proteolitičkim cijepanjem dobiva takozvani VHH fragment veličine svega 15 kDa. U odnosu na papainom pocijepani Fab dio imunoglobulina G uobičajene strukture čija molekulska masa iznosi 60 kDa, vjerojatnost izazivanja popratnih štetnih pojava VHH pripremkom značajno je manja (Harrison i sur., 2006; Khomehchian i sur., 2014; Shawki i sur., 2017). Kada se tome pridoda brzi prodor u otrovom zahvaćena tkiva, te svojstvo visoke termostabilnosti, očito je da postoje konkretni temelji potencijalne primjene ovih terapeutika u klinici čemu u prilog govore i rezultati preliminarnih istraživanja u suzbijanju lokalnih i sistemskih posljedica otrovanja venomom *Echis ocellatus* kao medicinski značajne otrovnice zapadne Afrike (Harrison i sur., 2006).

### **2.5.2.3. Postupci pročišćavanja hiperimune plazme**

U nizvodnom postupku pripreme antivenoma koriste se različiti postupci pročišćavanja s ciljem izdvajanja što čistih imunoglobulina G uz istovremeno odstranjenje preostalih komponenti hiperimune životinjske plazme u najvećoj mogućoj mjeri. Standardni protokol za pročišćavanje antivenoma ne postoji, stoga proizvođači koriste različite metodologije (WHO, 2016) putem kojih nastoje dobiti što kvalitetniji proizvod u što manje koraka (León i sur., 2018). Međutim, iako "pročišćeni", imunoglobulini osim terapijskog djelovanja, još uvijek izazivaju brojne klinički značajne neželjene popratne pojave (De Silva, 2015; Raweerith i Ratanabanangkoon, 2003) koje se naročito ispoljavaju nakon intravenske aplikacije (Warrell,

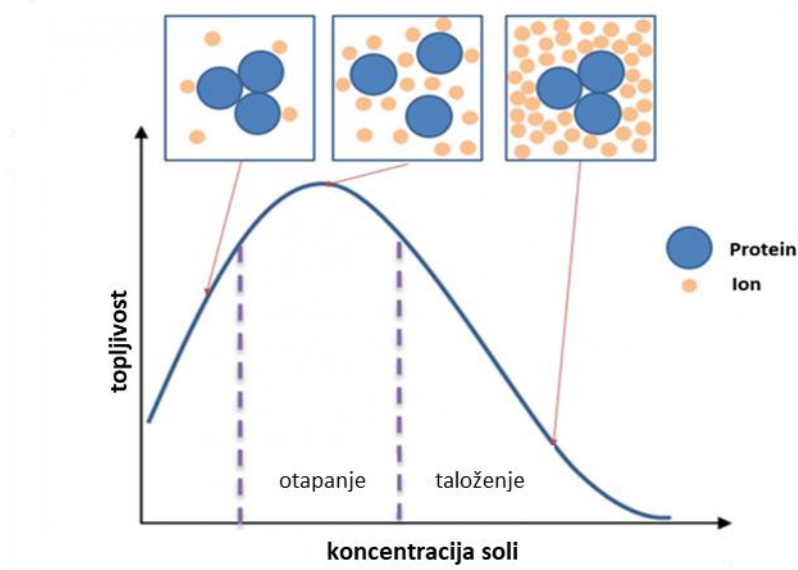
2010). Uzroci patogeneze nuspojava do danas nisu u potpunosti razjašnjeni premda postoje razne hipoteze koje ih dovode u vezu s fizikalno-kemijskim osobinama samog antivenoma (čistoća, udio agregata, specifična aktivnost, aktivna komponenta lijeka) (Segura i sur., 2013), imunokemijskim karakteristikama heterolognih IgG molekula animalnog porijekla zaostalih nakon pročišćavanja (León i sur., 2013), te s uvjetima samog proizvodnog postupka (WHO, 2016). Poznata je činjenica da antitijela pokazuju značajnu rezistenciju spram promjena uvjeta okoliša. No unatoč tome, zbog njihove terapijske namjene nužno je ozbiljno uzeti u obzir i najmanju mogućnost utjecaja okoline koja bi mogla rezultirati nastankom devijantne strukture IgG-a u odnosu na nativnu i stoga biti uzrokom štetnih posljedica nakon kliničke upotrebe (Laptoš i Omersel, 2018).

Proteinski terapeutici mogu biti izloženi brojnim stresnim uvjetima tijekom provedbe koraka proizvodnog dijela procesa proizvodnje kao što su pročišćavanje aktivne tvari, konačna formulacija, pohrana i isporuka. Pretpostavlja se da agresivniji postupci prerade plazme, koji uključuju korake taloženja IgG-a, vezanje na kromatografske nosače, a zatim eluciju puferima niskog pH ili povećane ionske jakosti, prolazno ili trajno narušavaju strukturu imunoglobulina. Zbog toga oni postaju skloniji formiranju agregata čija prisutnost nepovoljno djeluje na stabilnost, a time i sigurnost primjene lijeka (Hari i sur., 2010). Temeljem navedene hipoteze, prednost se odnedavno daje protokolima u kojima se imunoglobulini tijekom cijelog postupka proizvodnje održavaju u otopini, jer se u takvim uvjetima najmanje oštećuju i najmanje im se mijenja struktura. Takvi postupci dizajnirani su na laboratorijskoj skali (Kurtović i sur., 2020, 2019), a neki od njih već su našli svoju primjenu u proizvodnji visokoučinkovitih antivenoma na bazi ovčjih i konjskih cjelovitih imunoglobulinskih molekula (Abubakar i sur., 2010; Al-Abdulla i sur., 2013; Gutiérrez i sur., 2005a; Vargas i sur., 2015). Spoznaja da narušavanje strukture u postupku prerade plazme može rezultirati manje stabilnim proizvodom pronašla je svoju potvrdu i u istraživanjima vezanima za proizvodnju humaniziranih monoklonskih antitijela afinitetnom kromatografijom (Theakston i sur., 2003).

Izdvajanje terapijskih IgG-a iz hiperimune animalne plazme odvija se već rutinski primjenjivanim tehnološkim postupcima od kojih svaki ima svoje prednosti i nedostatke naročito značajne s aspekta sigurnosti lijeka. Obzirom na osnovni princip temeljem kojega razdvajaju molekule, dijelimo ih na metode taloženja i kromatografske metode koje se primjenjuju zasebno ili u kombinaciji pri čemu se neke od njih primjenjuju kao dodatni korak finog pročišćavanja.

## 2.5.2.3.1. Taloženje solima

Jedan od najstarijih i još uvijek učestalo primjenjivanih postupaka izolacije imunoglobulina na proizvodnoj skali je isoljavanje. To je postupak tijekom kojega se IgG-i dobivaju u talogu upotrebom visokih koncentracija soli ( $1,6\text{--}2,0\text{ mol dm}^{-3}$ ) (Fernandes i sur., 2008), uglavnom natrijevog ili amonijevog sulfata (Fernandes i sur., 2008; Jones i Landon, 2002; Rodrigues-Silva i sur., 1997), pri čemu se prednost daje potonjem zbog dostupnosti i niske cijene nabave (Hassan i sur., 2020). Princip djelovanja temelji se na slabljenju vodikovih veza između proteina i vode dodavanjem visokih koncentracija soli čime se molekule vode uklanjaju s proteina, a oni međusobno povezuju, agregiraju i precipitiraju (Hassan i sur., 2020) (Slika 7). Sol se iz preparacije uklanja centrifugiranjem ili dijafiltracijom, a imunoglobulini potom resuspendiraju u odgovarajućem puferu (Simsiriwong i sur., 2012). Ono što određuje količinu soli potrebnu za taloženje proteina od interesa jest broj njegovih polarnih grupa i molekulska masa, te pH otopine i temperatura na kojoj se odvija isoljavanje.



**Slika 7.** Princip taloženja proteina postupkom isoljavanja (preuzeto i prilagođeno sa <http://wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch450-and-ch451-biochemistry-defining-life-at-the-molecular-level/chapter-3-investigating-proteins>).

No bez obzira na dobro poznat molekularni mehanizam djelovanja, osnovni nedostatak ove metode je njezina slaba selektivnost zbog koje dobiveni pripravak, osim terapijskih antitijela, sadrži i značajan udio ostalih proteina plazme, što je u osnovi problem metodološke prirode. Naime, teško je precizno odrediti koncentraciju soli potrebnu za dobivanje visokog

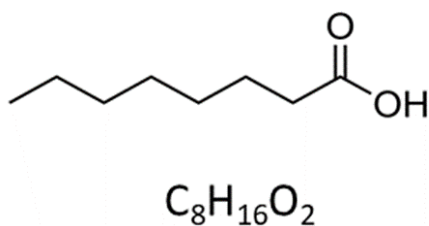
prinosa imunoglobulina uz istovremeno zadovoljavajuću čistoću preparata. Pri nižoj koncentraciji soli talože se uglavnom IgG molekule čime je zadovoljen kriterij čistoće, ali je prinos nizak, jer značajna količina antitijela i dalje zaostaje u otopini. S druge strane, pri višim koncentracijama soli, prinos imunoglobulina se znatno povećava, ali se istovremeno talože i velike količine nečistoća, prvenstveno albumina, zbog čega se smanjuje čistoća pripravka (Fernandes i sur., 2008). Postupak izolacije imunoglobulina isoljavanjem stoga se sastoji od dva koraka taloženja kako bi se variranjem koncentracije soli u svakom od njih dobio proizvod prihvatljivog omjera prinosa i kvalitete.

Izvedba metode taloženja solima ne zahtijeva sofisticiranu opremu, a zahvaljujući jednostavnosti te niskim troškovima proizvodnje stekla je veliku popularnost i široku primjenu na području prerade hiperimune plazme unatoč činjenici da daje produkt prinosa IgG-a manjeg od 50% (Raweerith i Ratanabanankoon, 2003; Zolfagharina i Dounighi, 2013), te niže čistoće i visokog udjela agregata (Fernandes i sur., 2008; Jones i Landon, 2002; Otero i sur., 1999; Rojas i sur., 1994). Agregacija vjerojatno nastaje kao posljedica narušene strukture imunoglobulina nastale uslijed promjene ionske jakosti (García i sur., 2002; Laptoš i Omersel, 2018; León et sur., 2001) kojoj su IgG-i izloženi dodatkom soli većih koncentracija te podvrgavanjem dodatnom stresu prelaskom iz otopine u talog, a zatim opet u otopinu. Obzirom da ne daje produkt zadovoljavajuće čistoće, ovaj postupak se ne primjenjuje samostalno već kao početni korak proizvodnje antivenoma iza kojega slijedi dodatno fino pročišćavanje kromatografijom ionske izmjene (León i sur., 2018; Raweerith i Ratanabanankoon, 2003). Veći broj konsektivnih faza, od kojih se sastoji opisani postupak, svakako predstavlja njegovu nepovoljnu karakteristiku zbog koje izvedba zahtijeva više vremena tijekom kojeg se mogućnost kontaminacije proizvoda dodatno povećava (Simsiriwong i sur., 2012).

#### 2.5.2.3.2. Talozenje neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom

Svi navedeni nedostaci postupka taloženja solima mogu se izbjeći upotrebom kaprilne kiseline (CA) kao alternativnog i učinkovitog precipitacijskog agensa za neimunoglobulinske proteine (Chen, Q. i sur., 2016c; Rojas i sur., 1994; Steinbuch i Audran, 1969; Trapp i sur., 2018) koji se koristi već u cijelom nizu proizvodnih postupaka pripreme IgG ili F(ab')<sub>2</sub> antivenoma porijeklom iz konjske i ovčje hiperimune plazme (Al-Abdulla i sur., 2013; Gutiérrez i sur., 2005a; Raweerith i Ratanabanankoon, 2003; Vargas i sur., 2015).

Kaprilna kiselina zasićena je kratkolančana masna kiselina od osam ugljikovih atoma čiji se alifatski lanac sastoji od osam ugljikovih atoma zbog čega se naziva i oktanoična kiselina (Slika 8).



**Slika 8.** Kaprilna kiselina

Njezina pKa vrijednost iznosi 4,89, a karakterizira je i slaba topljivost u vodi ( $\approx 4,85$  mmol dm<sup>-3</sup>) koja pri nižim vrijednostima pH dodatno slabi smanjenjem udjela deprotoniranih karboksilnih skupina te dominacijom alifatskih lanaca hidrofobnog karaktera. Dodatkom kaprilne kiseline u plazmu taloži se većina plazmatskih proteina, uglavnom dominantno zastupljen albumin ali i ostali kiseli proteini, dok bazični imunoglobulini ostaju intaktni u otopini (León i sur., 2014). Mehanizam njenog djelovanja nije u potpunosti poznat, međutim na temelju kvantitativnih analiza precipitacije albumina iz goveđeg seruma upotrebom različitih koncentracija kaprilne kiseline utvrđeno je da dolazi do izravne interakcije između molekula proteina i kiseline (Morais i Massaldi, 2012). Istraživanja vezanja molekula raznih lijekova na albumin humanog seruma otkrila su postojanje dva specifična vezna mjesta na njegovoj površini, Sudlowljevo mjesto I i II, koja se razlikuju prema afinitetu vezanja različitih vrsta molekula. Oba Sudlowljeva mjesta imaju afinitet za vezanje masnih kiselina premda se one kratkolančane, poput kaprilne kiseline, vežu prvenstveno na Sudlowljevo mjesto II (Fasano i sur., 2005). Slijedom gore navedenog, predloženi model djelovanja kaprilne kiseline temelji se na njenom hidrofobnom karakteru izraženom pri blago kiselom pH (pH  $\approx 5,4$ ). U takvim uvjetima, kaprilna kiselina veže se putem navedenih specifičnih veznih mjesta za molekule albumina čime dolazi do konformacijskih promjena u njihovoj strukturi i djelomičnog razmotavanja te otkrivanja dodatnih veznih mjesta. Porast broja vezanih molekula kaprilne kiseline izaziva povećanje hidrofobnosti proteina koji zatim međusobno stupaju u interakciju i u konačnici precipitiraju (Morais i Massaldi, 2012). Osim toga, blago kiseli pH odgovara pI vrijednosti albumina (pI = 5,3 – 6,0) i većine ostalih proteina plazme (pI = 4,4 – 5,3) (Miller i sur., 2004), a poznato je da su proteini slabije topljivi u otopini čiji pH odgovara pI proteina. Nasuprot tome, bazični imunoglobulini odupiru se djelovanju kaprilne kiseline i pri blago



kiselom pH ostaju trajno u topljivom obliku (Brodsky i sur., 2012; Trapp i sur., 2018) te tako najvjerojatnije sačuvani od bilo kakvog oblika manipulacije koji bi mogao nepovoljno djelovati na njihov strukturni integritet čijim se narušavanjem pokreće stvaranje agregata (Al-Abdulla i sur., 2014), što je dokazano u istraživanjima provedenima na humanim IgG-ima (Chen, Z. i sur., 2016; Gagnon i sur., 2015; Hari i sur., 2010).

Premda nespecifičan, ovaj jednostavan i financijski isplativ postupak u samo jednom koraku generira pripravak visoke čistoće i zadovoljavajućeg prinosa bez prisutnosti agregata velike molekulske mase (Raweerith i Ratanabanankoon, 2003; Zolfagharina i Dounighi, 2013). U cilju dobivanja što kvalitetnijeg proizvoda optimizacijom parametara (razrjeđenje hiperimune plazme kao početnog materijala, koncentracija kaprilne kiseline, pH vrijednost i temperatura pri kojoj se odvija taloženje) različiti proizvođači uspostavili su različite proizvodne protokole (Kumar i sur., 2016; Raweerith i Ratanabanankoon, 2003). Prema rezultatima ranih radova, postepenim dodavanjem kaprilne kiseline koncentracije 5% uz snažno miješanje u uvjetima pH vrijednosti između 5,5 i 6,0 dobiven je preparat visoke čistoće, zadovoljavajuće neutralizacijske aktivnosti i prinosa oko 60-65% (Rojas i sur., 1994). Recentna istraživanja utjecaja manjih koncentracija kaprilne kiseline na kvalitetu konačnog produkta pokazala su da je 2% optimalna koncentracija kojom se dobiva cjelovita frakcija IgG-a bez gubitaka i čistoće veće od 80%. Manje koncentracije od navedene značajno su narušavale čistoću preparata dok se većom čistoća povećavala iznad 90% uz gubitak dijela imunoglobulina u precipitatu (Kurtović i sur., 2019) i vidljivo zamućenje (Kumar i sur., 2016; Nudel i sur., 2012; Raweerith i Ratanabanankoon, 2003).

Iskustva u kliničkoj primjeni IgG antivenoma dobivenih iz hiperimune konjske plazme upotrebom ove metode pokazala su izrazito zadovoljavajuće rezultate čija je primjena rezultirala niskom incidencijom izazivanja reakcija rane preosjetljivosti (Otero-Patiño i sur., 1998; Otero i sur., 1999) što se povezuje s visokom čistoćom i odsustvom agregata u sastavu preparata. Pozitivnim svojstvima kaprilne kiseline svakako treba još pridodati odavno poznatu sposobnost inaktivacije virusa s lipidnom ovojnicom koji se potencijalno mogu prenijeti s konja na čovjeka (Theakston i sur., 2003). Međutim, završna faza postupka izolacije IgG-a koja zahtijeva opsežnu dijalizu kako bi se CA uklonila iz preparacije vremenski je zahtijevan proces koji sa sobom donosi rizik od bakterijske kontaminacije endotoksinima (Raweerith i Ratanabanankoon, 2003).

### 2.5.2.3.3. Afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A

Pored metoda taloženja, u pročišćavanju imunoglobulina G ili njihovih fragmenata, primjenu nalaze i različite vrste kromatografija kako na laboratorijskoj, tako i na proizvodnoj skali. Najučinkovitija je afinitetna kromatografija koja se temelji na specifičnom vezanju visokim afinitetom molekule od interesa na ligand kromatografske kolone čime se učinkovito odvaja od preostalih neželjenih komponenti. U proizvodnji monoklonskih antitijela ovaj postupak smatra se “zlatnim standardom“ zahvaljujući visokoj selektivnosti, jednostavnosti i brzini izvedbe kojom je moguće dobiti specifičan produkt čistoće veće od 98% (Tarrant i sur., 2012).

Kao biospecifične ligande, afinitetne kolone sadrže protein A, izoliran iz staničnog zida bakterije *Staphylococcus aureus*, ili protein G porijeklom iz streptokoknog baterijskog soja na koje se specifično i reverzibilno vežu antitijela svojim Fc krajem putem elektrostatskih i hidrofobnih interakcija te van der Waalsovih sila i/ili vodikovih veza (Grodzki i Berenstein, 2010). Osim navedenih, poznata je primjena i L proteina izoliranog iz bakterije *Peptostreptococcus magnus* na kojeg se osim humanih IgG molekula snažnim intenzitetom vežu i imunoglobulini klase A (Rodrigo i sur., 2015). Antitijela porijeklom iz različitih vrsta pokazuju različit afinitet spram vezanja na proteine A i G, kao što to čine i potklase imunoglobulina G unutar iste vrste (Ayyar i sur., 2012; Rodriguez i sur., 2020). Zbog toga je, uz variranje uvjeta (pH, temperatura, ionska jakost pufera) pri kojima se odvija postupak izolacije ovih biomolekula, iz uzoraka složenog sastava kakav je plazma, moguće izdvojiti frakciju ciljnih molekula visoke čistoće. Temeljem tog principa, razvoj primjene afinitetne kromatografije kretao se u pravcu dizajniranja različitih protokola s ciljem izolacije primarno potklasa najveće neutralizacijske aktivnosti. Godine 1991. Fernandes i suradnici (Fernandes i sur., 1991) uspjeli su iz hiperimune konjske plazme izolirati zasebno imunoglobuline IgG klase i IgG(T) potklase koje su u nastavku pokusa *in vivo* koristili kako bi dokazali da su za zaštitno djelovanje protiv otrova vrste *Bothrops jararaca* dominantno zaslužni imunoglobulini upravo potklase IgG(T). Nekoliko godina kasnije, nakon uspješne izolacije imunoglobulina IgGa pokazalo se da i ova potklasa, premda u manjoj mjeri, ima neutralizacijsko djelovanje (Fernandes i sur., 2000a; Fernandes i sur., 1997).

Velika čistoća i specifičnost poželjna su svojstva svakog antivenoma, jer se time smanjuje unos ukupnih proteina, kako terapijskih tako i onih bez terapijskog djelovanja, čime se značajno reducira vjerojatnost izbijanja štetnih popratnih pojava. Međutim, nakon vezanja

imunoglobulina na ligand kromatografskog nosača višestrukim vezama, potrebno je primijeniti pufer drastično niskog pH u rasponu vrijednosti 2,5-3,0 kako bi se nastale veze razorile i pročišćeni IgG-i dobili u eluatu (Ayyar i sur., 2012). Prema rezultatima nedavnih istraživanja, već prilikom adsorpcije IgG-a na protein A, koja se odvija pri fiziološkom pH, dolazi do denaturacije gornje trećine Cy2 domene Fc fragmenta, čija se struktura dodatno narušava u kiselim uvjetima tijekom elucije. Konformacijskim poremećajem zahvaćeni dio molekule tako postaje fleksibilniji, zbog čega gornja polovina molekule kolabira i preklopi se s njenim donjim dijelom što u konačnici rezultira upola manjom veličinom imunoglobulina G. Premda se ponovnim podizanjem pH na fiziološku vrijednost imunoglobulini vraćaju na nativnu veličinu, ovakve opsežne, mada prolazne konformacijske promjene destabiliziraju njihovu strukturu i potiču stvaranje agregata, što naročito dolazi do izražaja nakon izlaganja sekundarnom stresu kao što je dodatno izlaganje uvjetima pH nižeg od onog primijenjenog prilikom elucije (Gagnon i sur., 2015). Ne smije se zanemariti niti visoka cijena punila, te ograničeni kapacitet vezanja ciljnih molekula (Li i sur., 2019; Tao i sur., 2014), kao i broj uporaba kolone koji uz uočeni pad neutralizacijske aktivnosti ovako pročišćenih antitijela na oko 30% od početne vrijednosti predstavljaju višestruke nedostatke afinitetne kromatografije. Stoga se afinitetna kromatografija smatra financijski neisplativim postupkom te izvan platežne moći većine zemalja s brojnim žrtvama otrovanja (Kordzangene i sur., 2018; Raweerith i Ratanabanangkoon, 2003). Unatoč tome, zbog izrazite čistoće i specifičnosti proizvoda te selektivnosti postupka, afinitetna kromatografija i dalje izaziva jednaki interes znanstvene i industrijske zajednice unutar širokog spektra područja farmaceutike, biologije i biotehnologije te analitičke kemije i biofizike. Usporedo s poboljšanjima operativnih uvjeta ove metode (Rodriguez i sur., 2020) sustavno postoje pokušaji njene implementacije u proizvodnju antitoksina bilo kao samostalnog procesa (Kittipongwarakarn i sur., 2011) ili u sprezi s drugima (Fernandes i sur., 2008; Fernandes i sur., 1991).

#### 2.5.2.3.4. Ionsko-izmjenjivačke kromatografije

U procesu pripreme antivenoma izdvajanjem imunoglobulina G i njihovih fragmenata iz hiperimune animalne plazme sve se češće na laboratorijskoj skali upotrebljavaju i kromatografije ionske izmjene kao završni korak finog pročišćavanja nakon inicijalnih postupaka izolacije enzimskom digestijom, taloženjem solima ili kaprilnom kiselinom (Jones i Landon, 2002; León i sur., 2018; Lewis i Nail, 1997; Raweerith i Ratanabanangkoon, 2003), dok se u istu svrhu već rutinski primjenjuju u proizvodnji monoklonskih antitijela nakon

izolacije afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (Li i sur., 2019; Shukla i sur., 2007).

Princip razdvajanja ciljnih molekula proteina od onih neželjenih zasniva se na različitosti njihovih izoelektričnih (pI) točaka, koje predstavljaju onu pH vrijednost pri kojoj je ukupni naboj nekog proteina jednak nuli. Variranjem pH uvjeta i ionske jakosti pufera mobilne faze mijenja se ukupni naboj proteina, a time i afinitet prema funkcionalnim skupinama nosača stacionarne faze, prema čijem se naboju ionsko-izmjenjivačke kromatografije dijele na kromatografije izmjene aniona (AEX, engl. *anion-exchange chromatography*) i kromatografije izmjene kationa (CEX, engl. *cation-exchange chromatography*). Podešavanjem uvjeta, obje kromatografije mogu se izvesti na način da se molekule od interesa vežu na funkcionalne skupine ionskog izmjenjivača i naknadno eluiraju ili da prođu kroz stacionarnu fazu bez vezanja (Tablica 1) (Grönberg, 2018).

**Tablica 1:** Princip odvijanja ionsko-izmjenjivačkih kromatografija u ovisnosti o pH vrijednosti mobilne faze i ukupnog površinskog naboja molekula (preuzeto sa <https://www.bio-rad.com/de-at/applications-technologies/ion-exchange-chromatography?ID=LUSN6ZE8Z>).

Tip nosača	Kationski izmjenjivač	Anionski izmjenjivač
Ukupni naboj molekule	+	-
Naboj funkcionalnih skupina nosača	-	+
pH vrijednost mobilne faze	0,5 – 1,5 jedinica ispod pI vrijednosti proteina	0,5 – 1,5 jedinica iznad pI vrijednosti proteina

U kromatografiji u kojoj IgG-i ostvaruju prolaznu interakciju s funkcionalnim skupinama postoji mogućnost narušavanja njihove strukture prilikom vezanja i eluiranja, zbog čega se kromatografija izmjenom aniona smatra boljim izborom. Naime, podešavanjem pH mobilne faze na vrijednost višu od pI vrijednosti kiselih kontaminirajućih proteina njihov ukupni naboj poprima negativni predznak zbog čega se vežu na pozitivno nabijene funkcionalne skupine matriksa, dok istovremeno bazični imunoglobulini neometano prolaze kroz kolonu (Khomehchian i sur., 2014; León i sur., 2018) neporemećene strukture i očuvane stabilnosti.

Suprotno tome, u procesu kromatografije izmjene kationa IgG-i privremeno stupaju u interakciju s funkcionalnim skupinama nosača tako što se vežu na njih, a potom eluiraju puferom povećane ionske jakosti, dok nečistoće slobodno prolaze kroz kolonu. Međutim, nedavno je opisano devijantno ponašanje aglikoziliranih (Gillespie i sur., 2012) i glikoziliranih monoklonskih antitijela pročišćenih postupkom CEX koji su zatim analizirani kromatografijom isključenjem po veličini (SEC, engl. *size-exclusion chromatography*) (Guo i Carta, 2014; Guo i sur., 2014). Tijekom SEC-a neočekivano su se pojavila dva pika na kromatogramu što je dovelo do hipoteze da prethodno provedeni postupak CEX destabilizira strukturu proteina i uzrokuje stvaranje agregata (Chen, Z. i sur., 2016). Na tragu otprije poznate činjenice da su neka monoklonska antitijela sklona denaturaciji i agregaciji pri niskom pH (2,0 – 4,0) uz prisutnost soli visokih koncentracija (Fink i sur., 1994; Latypov i sur., 2012), u literaturi se nudi nekoliko mogućih objašnjenja ovog fenomena objavljenih od strane više istraživačkih skupina.

Prema jednome od njih, tijekom CEX postupka, prisutnost visokih koncentracija soli i proteina rezultira međusobnim povezivanjem IgG2 monoklonskih antitijela u reverzibilne kompleksne strukture koje formiraju jače veze s funkcionalnim skupinama kromatografske kolone te se stoga eluiraju u retencijskom vremenu različitom od onoga monomernih jedinica. Kao rezultat toga na kromatogramu se očitavaju dva pika (Luo i sur., 2014).

Guo i suradnici primijetili su da monoklonska antitijela pročišćavanjem postupkom CEX koja se u koloni zadržavaju tijekom dužeg vremenskog perioda ostvaruju jače interakcije s funkcionalnim skupinama, pri čemu dolazi do narušavanja njihove strukture i nastanka nestabilnih proteinskih međuprodukata. U postupku elucije, dio njih ponovno poprima nativnu konformaciju dok preostali formiraju agregate. Za razliku od navedenih, antitijelima koja se kraće zadržavaju unutar kolone te vežu slabijim vezama na kromatografski nosač, nativna struktura ostaje sačuvana. Posljedično navedenom, prilikom elucije, prvo se odvajaju slabije vezani monomeri, koji izlaze iz kolone u prvom piku istog retencijskog vremena kao i nativna antitijela, dok drugi pik sadrži smjesu prethodno jače vezanih monomernih struktura i njihovih agregata (Guo i Carta, 2014; Guo i sur., 2014).

Nadalje, teško je sa sigurnošću tvrditi da su uvjeti kojima su proteini izloženi u koloni tijekom cijelog vremena izvođenja postupka kromatografije izmjenom kationa stabilni, zahvaljujući složenom procesu održavanja ionske ravnoteže između mobilne i stacionarne faze, što se naročito odnosi na korak elucije. Nekoliko različitih istraživačkih skupina primijetilo je neočekivani pad pH vrijednosti u ovoj fazi pročišćavanja nastao upravo zahvaljujući korištenju

soli povećane ionske jakosti čiji kationi istiskuju H<sup>+</sup> ione stacionarne faze koji tako oslobođeni ulaze u mobilnu fazu i uzrokuju privremeno sniženje pH eluata (Ghose i sur., 2002; Pabst i Carta, 2007; Pérez i Frey, 2005).

Premda se princip djelovanja ionsko-izmjenjivačkih kromatografija bazira isključivo na elektrostatskim interakcijama između bioloških molekula i funkcionalnih skupina kromatografskog nosača suprotnog naboja, što ih ne čini visokoselektivnim metodama, jednostavnost, očuvanje biološke aktivnosti izdvojenih molekula te smanjenje troškova proizvodnje, karakteristike su zbog kojih raste interes za njihovu primjenu kao osnovnih metoda pročišćavanja. U tom kontekstu postupak CEX razmatra se kao alternativa afinitetnoj kromatografiji pomoću imobiliziranog proteina A, osobito ako se još uzme u obzir i da su kolone za kromatografiju ionskom izmjenom kemijski stabilnije, imaju veći kapacitet vezanja molekula te ne pokazuju sklonost utjecaju na konformaciju proteina (Guo i sur., 2014; Staby i sur., 2005).

### 2.5.3. FORMULACIJA ANTIVENOMA

Formulacija antivenomskih pripravaka, neovisno o tipu njihove aktivne tvari, važna je završna faza proizvodnog postupka kojom se nastoji maksimalno osigurati termička stabilnost, a time i neutralizacijska aktivnost konačnog proizvoda te spriječiti bakterijska ili gljivična kontaminacija (García i sur., 2002). Većina antivenoma tekuće je formulacije koja zahtijeva "hladni lanac" dostave i pohrane na temperaturi između 2-8 °C kako bi se sačuvala kvaliteta ovog farmaceutika tijekom 3 godine (Theakston i sur., 2003), što je izazovan zadatak s obzirom da se većina ugriza zmija otrovnica događa u ruralnim područjima klimatske zone IV koju karakteriziraju temperature oko 30 °C i relativna vlaga od 70% (Segura i sur., 2009). Navedeni problem može se riješiti postupkom liofilizacije primjenom kojeg nativna struktura aktivne komponente terapeutika ostaje zaštićena. Time se usporava stopa njene degradacije (Uversky i sur., 2017) te tako produžava period stabilnosti i rok trajanja na 5 godina (Theakston i sur., 2003) na sobnoj temperaturi uz uvjet pohrane u tami. Međutim, liofilizacija je delikatan postupak i ukoliko nije adekvatno optimiziran i pažljivo proveden može rezultirati proizvodom nezadovoljavajuće kvalitete (Chippaux i sur., 2015).

Pored navedenog, dodatak različitih ekscipijenata, supstanci bez izravne terapijske aktivnosti čija prisutnost doprinosi kvaliteti lijeka, već je dobro uhodana praksa nekih proizvođača kojom se povećava termička stabilnost proteina u otopinama (Wang, 1999).

Sorbitol se pokazao kao učinkovit stabilizirajući agens konjskih IgG-a i F(ab')<sub>2</sub> preparacija dobivenih afinitetnom kromatografijom (Rodrigues-Silva i sur., 1997) kao i F(ab')<sub>2</sub> antivenoma pročišćenih enzimskom digestijom pepsinom nakon taloženja amonijevim sulfatom (Rodrigues-Silva i sur., 1999). Međutim, niti sorbitol niti manitol nisu se pokazali dobrim stabilizatorima Fab produkata proizvedenih pročišćavanjem hiperimune ovčje plazme (Al-Abdulla i sur., 2003), dok su upravo suprotno djelovanje imali na IgG antivenome izolirane taloženjem kaprilnom kiselinom iz konjske plazme. Ovakvi rezultati ukazuju na mogućnost da bi učinkovitost poliola mogla ovisiti o aktivnoj tvari antivenoma ili profilu zaostalih kontaminirajućih komponenti u njihovom sastavu (Segura i sur., 2009).

Neki proizvođači dodaju fenol i krezol u koraku čuvanja sakupljene hiperimune plazme, zatim postupka pročišćavanja ili konačne formulacije antivenomnih pripravaka kako bi ih zaštitili od različitih patogena, dok ih drugi u potpunosti izbjegavaju (Theakston i sur., 2003) zbog potencijalnog učešća u izazivanju štetnih popratnih pojava (García i sur., 2002). Njihova primjena mora imati čvrsto opravdanje i nikako ne smije biti nadomjestak bilo kojeg aspekta GMP-a. Prema WHO smjernicama koncentracija fenola ne smije biti veća od 2,5 g/L, a krezola 3,5 g/L (WHO, 2016).

Garcia i suradnici dokazali su da prisustvo fenola i timerosala, kao prezervansa prisutnih u upotrebi, negativno utječe na fizikalno-kemijska svojstva polivalentnog IgG antivenoma dobivenog postupkom taloženja kaprilnom kiselinom. Nakon tri godine pohrane na temperaturi od 4 °C primjetili su zamućenje preparata, nastalo kao posljedica značajno povećane količine IgG agregata i dimernih struktura u usporedbi s istim preparatima koji nisu sadržavali sporne komponente, što je bio dokaz njihovog utjecaja na strukturu i stabilnost imunoglobulina (García i sur., 2002). U svrhu prevencije potencijanih zoonoza primjenom antivenoma animalnog porijekla potencijalno prihvatljivom alternativom pokazala se strategija formulacije konačnog produkta pri niskom pH. Tekuća preparacija imunoglobulina G, pročišćenih postupkom precipitacije kaprilnom kiselinom iz konjske plazme uz podešavanje pH na vrijednost 4,0 pokazala je nepromijenjenu neutralizacijsku moć protiv otrova *Vipera aspis* vrste kao i svojstvo inaktivacije virusa s lipidnom ovojnicom nakon 6 mjeseci pohrane pri 4 i 37 °C. Agregati nastali tijekom postupka podešavanja pH sačinjavali su 15-20% udjela sastava antivenoma i nisu se dodatno povećali tijekom vremena stabilitetne studije (Solano i sur., 2012).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

Kao ishodišni materijal istraživanja koristila sam uzorak hiperimune plazme dobiven imunizacijom konja otrovom poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*, Vaa) nabavljen od Imunološkog zavoda d.d. u Zagrebu. Prije primjene svakog postupka pročišćavanja IgG-a, hiperimunu konjsku plazmu (HKP) termički sam obradila zagrijavanjem na 56 °C tijekom 60 minuta uz miješanje u termomiješalici *ThermoMixer C* (Eppendorf, Njemačka) pri 350 rpm kako bih odstranila denaturirani fibrinogen. Termokoaguliranu plazmu sam centrifugirala u centrifugi *5810 R* (Eppendorf, Njemačka) (45 min,  $3200 \times g$ , 23 °C) te odvojila supernatant kao jedinstveni ulazni materijal za daljnje postupke pročišćavanja.

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. POSTUPCI PROČIŠĆAVANJA IgG-a IZ HIPERIMUNE KONJSKE PLAZME

Postupci koje sam koristila u istraživanju s ciljem pročišćavanja IgG-a iz hiperimune konjske plazme bazirani su na pet različitih principa, dva precipitacijska - taloženje neimunoglobulinskih molekula kaprilnom kiselinom i taloženje imunoglobulina amonijevim sulfatom te tri kromatografska - kromatografija izmjenom aniona, kromatografija izmjenom kationa i afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A.

##### 3.2.1.1. Izdvajanje IgG-a taloženjem kaprilnom kiselinom

U HKP, dva puta razrijeđen sa  $150 \text{ mmol dm}^{-3}$  natrijevim kloridom (NaCl) (Kemika, Hrvatska), dodavala sam kaprilnu kiselinu ( $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ ) (Sigma-Aldrich, SAD) kap po kap uz miješanje u termomiješalici (600 rpm) pri sobnoj temperaturi do konačne koncentracije 3% (V/V) pri čemu je pH otopine iznosio  $\approx 5,4$ . Miješanje sam zatim pojačala (750 rpm) te reakcijsku smjesu inkubirala tijekom 60 min. Nakon centrifugiranja ( $2800 \times g$ , 45 min, 23 °C), supernatant koji sadrži IgG-e odvojila sam dekantiranjem i zatim profiltrirala kroz filter s celulozno-acetatnom membranom veličine pora 5  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Njemačka). Preostalu kaprilnu kiselinu uklonila sam dijafiltracijom upotrebom Vivacell dijafiltracijske jedinice s polietersulfonskom (PES) membranom veličine pora 100 kDa (Sartorius, Njemačka) kojom sam ujedno IgG-e prebacila u  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer ( $m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,49 \text{ g}$ ,  $m(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}) = 27,36 \text{ g} / 1 \text{ L}$ , pH = 6,0). Odredila sam koncentraciju proteina u uzorku koristeći



uređaj *Thermo Scientific Multiskan Spectrum 1500* (Thermo Fischer Scientific, SAD), označila ga oznakom CAP i pohranila na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize.

### 3.2.1.2. Izdvajanje IgG-a taloženjem amonijevim sulfatom

Postupak taloženja IgG-a amonijevim sulfatom ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) (Fluka, Švicarska) provela sam u dva koraka postupkom koji su opisali Rojas i suradnici (1994) uz određene modifikacije kako slijedi. U prvom koraku taloženje sam provela 12%-tnim amonijevim sulfatom tako da sam pomiješala jednake volumene HKP-a i otopine 24%-tnog amonijevog sulfata ( $c = 240\text{ mg mL}^{-1}$ ) u  $150\text{ mmol dm}^{-3}$  natrijevom kloridu. Smjesu sam inkubirala 1 h uz snažno miješanje u termomiješalici (800 rpm,  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a zatim je ostavila preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja (30 min,  $3000 \times g$ ), supernatant (Sn1) s IgG-ima odvojila sam dekantiranjem te u njega dodala prah amonijevog sulfata do konačne koncentracije od 24% ( $c = 240\text{ mg mL}^{-1}$ ). Smjesu sam inkubirala (1 h, 800 rpm,  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i ostavila preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja (30 min,  $3000 \times g$ ,  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i dekantiranja supernatanta (Sn2), dobiveni talog (T2) koji sadrži IgG-e otopila sam u  $0,05\text{ mol dm}^{-3}$  MES puferu ( $m(\text{MES}) = 10,66\text{ g} / 1\text{ L} / \text{NaOH}$ ,  $\text{pH} = 5,5$ ) (AppliChem, Njemačka). Amonijev sulfat sam uklonila postupkom dijafiltracije koristeći isti pufer. U dobivenom uzorku sam odredila koncentraciju proteina, odvojila alikvot koji sam označila kao ASP1 i pohranila na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize.

### 3.2.1.3. Izdvajanje IgG-a kromatografijom izmjene aniona

Za izdvajanje IgG-a iz HKP-a kromatografijom izmjene aniona koristila sam izmjenjivač *Toyopearl Super Q-650S* (Tosoh Bioscience, Japan) s pozitivno nabijenim kvaternim aminima kao funkcionalnim skupinama stacionarne faze. Kao mobilnu fazu koristila sam  $0,025\text{ mol dm}^{-3}$  Tris pufer (Merck, SAD) s dodatkom  $0,035\text{ mol dm}^{-3}$  NaCl-a (Kemika, Hrvatska) ( $m(\text{Tris}) = 3,02\text{ g}$ ,  $m(\text{NaCl}) = 2,04\text{ g} / 1\text{ L} / \text{HCl}$ ,  $\text{pH} = 8,0$ ). Postupak sam provela "batch" načinom u kivetama od 10 mL. Neposredno prije nanošenja uzorka stacionarnu fazu sam ekvilibrirala njenim ispiranjem s 10 puta većim volumenom mobilne faze na sljedeći način. Alikvote originalne suspenzije izmjenjivača volumena  $1536\text{ }\mu\text{L}$  sam centrifugirala (2 min,  $500 \times g$ ), dekantirala proizvođački prezervans (20%-tni etanol (V/V)), te na dobiveni talog volumena  $1200\text{ }\mu\text{L}$  dodala 5 volumena mobilne faze. Izmjenjivač sam zatim istaložila centrifugiranjem (2 min,  $500 \times g$ ), te postupak ponovila s još 5 volumena mobilne faze. U svaku kivetu, na ekvilibriran i istaložen izmjenjivač volumena  $1200\text{ }\mu\text{L}$ , nanijela sam  $2500\text{ }\mu\text{L}$  HKP-a prethodno razrijeđenog 5 puta s mobilnom fazom i inkubirala u termomiješalici 1 h na  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz konstantno

miješanje (700 rpm). Potom sam izmjenjivač ponovno istaložila centrifugiranjem (1 min,  $500 \times g$ , 23 °C). Supernatante s IgG-ima sam pipetom pažljivo odvojila u zaseban spremnik. Na taloge sam dodala još 1 mL mobilne faze, centrifugirala (1 min,  $500 \times g$ , 23 °C) i dobivene supernatante prenijela u isti spremnik s onima prikupljenima u prethodnom koraku. Opisani postupak provela sam istovremeno u heksaplikatu kako bih proizvela dovoljnu količinu IgG-a za predviđene analize. Supernatante svih šest provedenih kromatografskih postupaka sakupila sam u jedinstveni uzorak, izmjerila koncentraciju proteina te odvojila alikvot kojeg sam označila oznakom AEX1 i pohranila na -20 °C do daljnjeg.

#### 3.2.1.4. Izdvajanje IgG-a kromatografijom izmjene kationa

Izdvajanje IgG-a iz HKP-a kromatografijom izmjene kationa provela sam na uređaju za preparativnu kromatografiju *ÄKTApurifier 100* (GE Healthcare, SAD) koristeći kao izmjenjivač monolitnu *CIMmultus<sup>TM</sup>* (engl. *Convective Interaction Media*)  $SO_3^-I$  kolonu ( $V = 1$  mL ili  $V = 80$  mL) (BIA Separations, Slovenija) s negativno nabijenim  $SO_3^-$  funkcionalnim skupinama. Kao pufer za vezanje koristila sam 0,02 mol  $dm^{-3}$  MES pufer ( $m$  (MES) = 4,27 g / 1 L / NaOH, pH = 6,0), a kao pufer za eluiranje 0,02 mol  $dm^{-3}$  MES s dodatkom 1 mol  $dm^{-3}$  NaCl-a ( $m$  (MES) = 4,27 g,  $m$  (NaCl) = 58,44 g / 1 L / NaOH, pH = 6,0). U svakom kromatografskom ponavljanju na prethodno ekvilibriranu kolonu nanosila sam HKP razrijeđen 10 puta s puferom za vezanje i profiltriran kroz filter s polivinilidenfluoridnom (PVDF) membranom veličine pora 0,45  $\mu m$  (Milipore, SAD). Na manju kolonu (1 mL) aplicirala sam 6 – 14 mL, a na veću (80 mL) 35 – 45 mL uzorka što se pokazalo optimalnim volumenom za postizanje najvećeg prinosa IgG-a. Tijekom kromatografskog pročišćavanja linearni protok je iznosio 170  $cm\ h^{-1}$ . Proteini su praćeni mjerenjem apsorbancije na 280 nm. Sve prikupljene eluate s IgG-ima sakupila sam u jedinstveni spremnik i isprala s 0,02 mol  $dm^{-3}$  MES puferom ( $m$  (MES) = 10,66 g / 1 L / NaOH, pH = 5,5) postupkom dijafiltracije čime sam ujedno uklonila i NaCl. U dobivenom uzorku izmjerila sam proteinsku koncentraciju. Izdvojeni alikvot označila sam oznakom CEX1 i pohranila na -20 °C do daljnjeg.

#### 3.2.1.5. Izdvajanje IgG-a afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina

##### A

Afinitetnu kromatografiju provela sam na uređaju za preparativnu kromatografiju *ÄKTApurifier 100* korištenjem dviju serijski povezanih *MabSelect<sup>TM</sup>* kolona ( $V = 2 \times 1$  mL) (GE Healthcare, SAD) s proteinom A iz bakterije *Staphylococcus aureus* kao ligandom. Kolone

sam ekvilibrirala s  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris puferom ( $m(\text{Tris}) = 2,42 \text{ g} / 1 \text{ L} / \text{HCl}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ) kojeg sam koristila i kao pufer za vezanje. U svakoj kromatografskoj analizi nanosila sam po  $5,6 \text{ mL}$  HKP-a prethodno razrijeđenog 2 puta s puferom za vezanje i profiltriranog kroz PVDF filter veličine pora  $0,45 \mu\text{m}$ . U fazi nanošenja i prolaska uzorka kroz nosač protok je iznosio  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Vezane proteine eluirala sam s  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  limunskom kiselinom ( $m(\text{limunska kiselina} \times \text{H}_2\text{O}) = 4,2 \text{ g} / 1 \text{ L}$ ,  $\text{pH} = 2,5$ ) (Kemika, Hrvatska) pri protoku od  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . U dobivenim IgG frakcijama pH sam vratila na vrijednost od oko 7 dodatkom  $100 - 150 \mu\text{L}$   $1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris pufera ( $m(\text{Tris}) = 121,14 \text{ g} / 1 \text{ L}$ ,  $\text{pH} = 10,0$ ) (Merck, SAD). Sve eluate objedinila sam u jedinstveni uzorak kojeg sam prebacila u  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer ( $\text{pH} = 6,0$ ) postupkom dijafiltracije te, nakon mjerenja koncentracije proteina, označila oznakom AC i pohranila na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  do daljnjeg.

### 3.2.1.6. Dodatno pročišćavanje manje čistih IgG pripravaka

IgG pripravke, dobivene opisanim principima pročišćavanja (3.2.1.1. – 3.2.1.5.) čistoće manje od 90% (ASP1, AEX1 i CEX1), dodatno sam pročistila taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom. Budući da su pripravci bili u različitim puferima, ovisno o uzvodnim koracima pročišćavanja, te su ujedno varirali u udjelu nečistoća, taloženje sam provodila prilagođenim koncentracijama kaprilne kiseline u rasponu od 0,5 do 2% (V/V), vodeći računa o konačnom pH reakcijske smjese kako je već opisano (4.1.). Sve dodatno pročišćene uzorke u konačnici sam prebacila u  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer ( $\text{pH} = 6,0$ ) postupkom dijafiltracije, nakon čega sam im odredila koncentraciju, označila ih oznakom 2 (ASP2, AEX2 i CEX2) te pohranila na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  do daljnjih analiza.

### 3.2.1.7. Uklanjanje agregata u pripravcima pročišćenih IgG-a

U kromatografiji izmjenom aniona, koju sam primijenila s ciljem uklanjanja agregata iz uzoraka IgG-a dobivenih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A, koristila sam monolitnu *CIMmultus QA* kolonu (BIA Separations, Slovenija) volumena  $0,34 \text{ mL}$  s pozitivno nabijenim kvaternim aminima kao funkcionalnim skupinama stacionarne faze. Postupak izolacije IgG-a taloženjem kaprilnom kiselinom, odnosno afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A neovisno sam provela pet puta. Svaki od uzoraka sam podvrgnula zasebno provedenim kromatografskim postupcima uklanjanja agregata. Prvo sam ih prebacila dijafiltracijom u  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$  pufer (Fluka, Švicarska) ( $m(\text{CH}_3\text{COONa}) = 1,64$

g / 1 L / HCl, pH = 5,0) koji sam u kromatografiji izmjenom aniona ujedno koristila i kao mobilnu fazu za vezanje. Pufer za eluiranje sadržavao je još i 1 mol dm<sup>-3</sup> NaCl. Po analizi sam aplicirala 2 mL uzorka prethodno profiltriranog kroz PVDF filter veličine pora 0,45 μm. I u koraku vezanja i u koraku eluiranja protok je iznosio 1 mL min<sup>-1</sup>. Prikupljene IgG uzorke prebacila sam postupkom dijafiltracije u 0,2 mol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer (pH = 6,0). Nakon mjerenja koncentracije proteina, uzorke sam označila oznakama AC (1-5), odnosno CAP (1-5) te ih pohranila na 4 °C do daljnjih analiza.

### 3.2.1.8. Dijafiltracija

Postupak dijafiltracije, bilo za uklanjanje soli (prvenstveno NaCl-a iz pufera za eluiranje), bilo za uklanjanje kaprilne kiseline iz IgG uzoraka tijekom procesa pročišćavanja, provodila sam centrifugiranjem na 2000 × g pri 20 °C korištenjem Vivacell centrifugalnih jedinica volumena 50 mL s membranom veličine pora 100 kDa (Sartorius, Njemačka). Istim načinom pročišćene IgG-e prebacivala sam u 0,2 mol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer (pH = 6,0). U svakom dijafiltracijskom postupku faktor izmjene pufera iznosio je najmanje 8000.

## 3.2.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.2.1. Određivanje koncentracije proteina

Masene koncentracije ( $\gamma$ ) proteina u uzorcima iz svih faza pročišćavanja IgG-a određivala sam koristeći spektrofotometrijsku metodu po Ehresmann-u (Ehresmann i sur., 1973) koja se zasniva na mjerenju apsorbancije pri valnim duljinama 228,5 i 234,5 nm. Koncentraciju proteina izračunala sam iz razlike dobivenih vrijednosti apsorbancija prema sljedećoj formuli:

$$\gamma = (A_{228,5 \text{ nm}} - A_{234,5 \text{ nm}}) \times 0,2553 \times \text{faktor razrjeđenja [mg mL}^{-1}\text{]}$$

u kojoj je broj 0,2553 vrijednost Ehresmannovog faktora za konjske IgG-e (Halassy i sur., 2019), molekule dominantno prisutne u svakom uzorku. Prije mjerenja, uzorke sam razrijedila do koncentracije koja daje vrijednosti apsorbancija u rasponu od 0,1 do 1 u kojem je ovisnost parametara linearna (Kurtović, 2013). Mjerenja sam obavila na *Thermo Scientific Multiscan Spectrum 1500* spektrofotometru (Thermo Fischer Scientific, SAD) u kvarcnim kivetama s duljinom optičkog puta 1 cm. Vodu tipa II pripravljenu upotrebom uređaja *PureLab Pulse 1* (Elga, UK) koristila sam kao referentnu otopinu.

### 3.2.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih IgG-a

#### 3.2.2.2.1. Određivanje koncentracije ukupnih IgG-a iz udjela IgG-a i proteinske koncentracije

Koncentraciju ukupnih IgG-a u visokopročišćenim pripravcima računala sam iz njihovog udjela određenog kromatografijom isključenjem po veličini kako je opisano u 3.2.2.3.1. i proteinske koncentracije odgovarajućeg uzorka (3.2.2.1.) prema formuli:

$$\gamma(\text{IgG}) = \gamma(\text{proteina}) [\text{mg mL}^{-1}] \times \text{udio IgG} [\%] / 100$$

#### 3.2.2.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih IgG-a ELISA-om

Koncentraciju ukupnih IgG-a u HKP-u i djelomično pročišćenim pripravcima određivala sam ELISA-om baziranoj na kvantifikaciji venom-specifične frakcije antitijela. Naime, udio specifičnih IgG-a je jednak i u plazmi ili djelomično pročišćenom pripravku i u produktu visoke čistoće dobivenim njihovim nizvodnim procesiranjem. Koncentraciju ukupnih IgG-a u svakom analiziranom uzorku izmjerila sam pomoću usporedno testiranog i za njega specifičnog standarda precizno određene koncentracije (Halassy i sur., 2019). Za mjerenje IgG-a u HKP-u kao standard sam koristila IgG pripravak dobiven postupkom taloženja neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom iz iste plazme čiju sam preciznu koncentraciju odredila kako je opisano u poglavlju 3.2.2.2.1.. Za mjerenje IgG-a u međuproduktima različitih, ovdje ispitivanih postupaka, kao standard koristila sam njihov IgG pripravak dobiven dodatnim korakom pročišćavanja kaprilnom kiselinom.

Otopinu zmijskog otrova (*Vipera ammodytes ammodytes*, Vaa) nabavljenu od Imunološkog zavoda d.d., Zagreb ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) priredila sam u puferu za oblaganje  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  karbonatnom puferu:  $m(\text{NaHCO}_3) = 0,29 \text{ g}$ ,  $m(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,16 \text{ g} / 100 \text{ mL}$ ,  $\text{pH} = 9,6$ ), te nanijela u volumenu od  $100 \mu\text{L}$  / bazenčiću mikrotitracijskih pločica (Costar, SAD) i inkubirala na sobnoj temperaturi preko noći. Pločice sam oprala tri puta vodom tipa II u peraču pločica MW-12A (Mindray, Kina). Slobodna mjesta na pločicama blokirala sam nanošenjem po  $200 \mu\text{L}$  / bazenčiću pufera za blokiranje / inkubaciju (0.5% (w/V) BSA (Sigma-Aldrich, SAD) u PBST (0.05% (V/V) Tween 20 u PBS puferu:  $m(\text{NaCl}) = 8 \text{ g}$ ,  $m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 1,1 \text{ g}$ ,  $m(\text{KCl}) = 0,2 \text{ g}$ ,  $m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,2 \text{ g}$ ,  $m(\text{timerosal}) = 0,1 \text{ g} / 1 \text{ L}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ).

Nakon inkubacije u termostatu (Memmert, Njemačka) tijekom 2 h pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  pločice sam oprala jedan put vodom tipa II. U međuvremenu sam priredila radna razrjeđenja uzoraka u inkubacijskom puferu. Prenošanjem po  $100 \mu\text{L}$  u sljedeći red bazenčića uzorke sam binarno

razrjeđivala ponavljanjem istog postupka do kraja pločice te ih potom inkubirala na sobnoj temperaturi preko noći. Pločice sam oprala tri puta vodom tipa II, a zatim dodala u svaki bazenčić 100  $\mu\text{L}$  otopine sekundarnog antitijela (kozji IgG specifičan za konjski  $\text{F(ab')}_2$  fragment) konjugiranog s peroksidazom iz hrena (*antibodies-online.com*, Njemačka) u razrjeđenju 1:25000 priređenom u inkubacijskom puferu. Nakon inkubacije (2 h, 37 °C), pločice sam oprala tri puta vodom tipa II, a zatim po bazenčiću nanijela 100  $\mu\text{L}$  otopine OPD-a (Sigma-Aldrich, SAD) ( $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pripremljenog u citrat-fosfatnom puferu ( $m$  (limunska kiselina  $\times \text{H}_2\text{O}$ ) = 1,03 g,  $m$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) = 141,96 g / 100 mL, pH = 5,0) sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kemika, Hrvatska) (0,5  $\mu\text{L}$  30%-tne (V/V) otopine / mL otopine OPD-a). Enzimsku reakciju, tijekom koje se razvija naračasto obojenje uslijed oksidacije OPD-a, po isteku polusatne inkubacije u tami, prekinula sam dodatkom 50  $\mu\text{L}$  12,5%-tne otopine  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Carlo Erba Reagents, Španjolska) po bazenčiću. Apsorbanciju sam mjerila pri valnoj duljini 492 nm na uređaju *Synergy HTX SI LFA* (BioTek Instruments Inc., SAD).

### 3.2.2.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih IgG-a denzitometrijskom analizom

Dobivene vrijednosti koncentracije ukupnih IgG-a dodatno sam potvrdila denzitometrijskom analizom uzoraka prethodno razdvojenih SDS-PAGE metodom kako je opisano u 3.2.2.3.2. Kao standard sam koristila IgG uzorak visoke čistoće i poznate koncentracije dobiven afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A. Uzorak sam nanijela u rasponu masa od 2 do 24  $\mu\text{g}$  zajedno s manje čistim IgG uzorcima čiju sam koncentraciju prilagodila rasponu baždarne krivulje. Dobivene proteinske pruge obojane 0,1%-tnom otopinom ( $m/V$ ) Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, SAD) snimila sam instrumentom *Amersham Imager 680* (GE Healthcare, SAD) upotrebom trans-iluminacije. Izmjerila sam intenzitet optičke gustoće proteinskih pruga standarda detektiranih na 150 kDa i prikazala u ovisnosti o poznatoj masi IgG-a. Iz dobivenog pravca izračunala sam masu, i posredno, koncentraciju ukupnih IgG-a u ispitivanim uzorcima.

### 3.2.2.3. Analiza čistoće međuprodukata i pročišćenih IgG pripravaka

#### 3.2.2.3.1. Kromatografija isključenjem po veličini

Udio IgG-a i agregata u pročišćenim uzorcima dobivenim različitim postupcima odredila sam kromatografijom isključenjem po veličini (SEC, engl. *size-exclusion chromatography*) kao metodom kojom se molekule razdvajaju na osnovu veličine. U tu svrhu koristila sam Waters (SAD) ili Shimadzu (Japan) sustav za analitičku kromatografiju visoke

djelotvornosti (HPLC, engl. *high-performance liquid chromatography*). Uzorke sam priredila u  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu (pH = 6,0) tako da koncentracija proteina bude  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  i centrifugirala 5 min pri  $3200 \times g$  ili profiltrirala kroz PVDF filter veličine pora  $0,45 \mu\text{m}$  kako bih odstranila eventualno prisutne čestice. Koristila sam *TSK-GEL G3000SW<sub>XL</sub>* kolonu dimenzija  $7,8 \times 300 \text{ mm}$  ili  $7,5 \times 600 \text{ mm}$  s *TSK-gel SW<sub>XL</sub>* pretkolonom dimenzija  $6,0 \times 40 \text{ mm}$  (Tosoh Bioscience, Japan) pri konstantnom protoku u rasponu od  $0,5 - 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , ovisno o veličini kolone, uz izokratnu eluciju s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatno-sulfatnim puferom ( $m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 6,14 \text{ g}$ ,  $m(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}) = 8,84 \text{ g}$ ,  $m(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 4 \text{ g}$ ,  $m(\text{NaN}_3) = 0,5 \text{ g} / 1 \text{ L}$ , pH = 6,7). Kromatografska analiza svakog, po  $50 \mu\text{L}$  injektiranog uzorka, trajala je  $17 - 45 \text{ min}$ , ovisno o veličini kolone i/ili brzini protoka. Uz uzorke, analizirala sam i  $50 \mu\text{L}$   $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnog pufera (pH = 6,0) i  $50 \mu\text{L}$  test smjese koja sadrži proteine poznatih molekulskih masa (Tablica 2) na temelju kojih sam zatim procjenjivala molekulske mase proteina u pojedinim kromatografskim pikovima. Tijekom SEC-HPLC analize proteinski sadržaj u uzorcima pratila sam mjerenjem apsorbancije pri  $280 \text{ nm}$ . Iz profila kromatograma dobivala sam podatke o čistoći i sastavu pojedinih međuprodukata i konačnih uzoraka.

**Tablica 2.** Sastav test smjese proteina za SEC-HPLC analizu.

Protein	$\gamma / \text{g L}^{-1}$	Mr
tiroglobulin, goveđi (Sigma-Aldrich, SAD),	0,50	670 000
$\gamma$ -globulin, goveđi (Sigma-Aldrich, SAD),	1,00	150 000
ovalbumin (Sigma-Aldrich, SAD),	1,00	44 287
RNaza A (Sigma-Aldrich, SAD),	1,50	13 700
<i>p</i> -aminobenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich, SAD)	0,01	137,1

### 3.2.2.3.2. SDS-PAGE analiza

HKP, međuprodukte i konačne pripreme analizirala sam SDS-PAGE metodom na *NuPAGE Novex Bis-Tris* gradijentnom gelu sa  $4 - 12\%$  (*w/V*) umreženosti (Invitrogen, SAD) u MOPS puferu (AppliChem, Njemačka) pod nereducirajućim uvjetima koristeći sustav za elektroforezu *Xcell SureLock Mini-Cell* prema uputi proizvođača (Invitrogen, SAD). Uzorke ( $m = 15 - 20 \mu\text{g}$ ) sam priredila razrjeđivanjem u vodi tipa II uz dodatak *NuPAGE LDS* pufera ( $4\times$ ) (Invitrogen, SAD). Osim uzoraka, na gel sam nanijela i *Sharp Pre-Stained* standard (Novex, SAD) s proteinima u rasponu molekulskih masa od  $3,5$  do  $260 \text{ kDa}$ . Dobivene

proteinske pruge sam detektirala bojanjem s 0,1%-tnom (*m/V*) otopinom Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, SAD).

### 3.2.2.3.3. Identifikacija nečistoća spektrometrijom masa

#### 3.2.2.3.3.1. Priprava uzoraka

Nakon provedenih postupaka pročišćavanja, IgG-e i zaostale kontaminirajuće proteine u pripremljenim preparacijama identificirala sam spektrometrijom masa na sljedeći način. Proteinske pruge, dobivene SDS-PAGE analizom, izrezala sam iz gela i pohranila u tubice sa 100  $\mu\text{L}$  ultračiste vode (UHQ) (*PureLab Classic UVUF* (Elga, UK) pri  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  do enzimske razgradnje. Nakon odmrzavanja, vodu iz tubica sam uklonila, a zatim proteinske pruge ponovno isprala dodatkom 100  $\mu\text{L}$  vode. Vodu iz tubica sam odstranila, te komadiće gela isprala tri puta sa 100  $\mu\text{L}$  otopine UHQ i acetonitrila (ACN) (Merck, SAD) u omjeru 1:1 (*V/V*) tijekom inkubacije u trajanju od 15 min. Potom sam uklonila svu tekućinu i dodala 100  $\mu\text{L}$  ACN-a. Kada su se gelovi skupili i poprimili bijelu boju, uklonila sam ACN i gelove rehidrirala tijekom 15 min sa 100  $\mu\text{L}$  100  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (AppliChem, Njemačka), a zatim na njih dodala isti volumen ACN-a. Smjesu sam inkubirala 15 min, uklonila svu tekućinu i gelove osušila u vakuum centrifugi *Vacufuge plus* (Eppendorf, Njemačka). Osušene komadiće gela rehidrirala sam sa 50  $\mu\text{L}$  svježe pripremljene reducirajuće otopine (10  $\text{mmol dm}^{-3}$  ditionitrol (DTT) (Sigma-Aldrich, SAD) u 100  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) i inkubirala u termomiješalici uz snažno miješanje pri  $56\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 45 min. Reakcijske tubice sam ohladila do sobne temperature, kratko centrifugirala da se kondenzat s čepa slegne, odstranila svu tekućinu i dodala 50  $\mu\text{L}$  svježe pripremljene alkilacijske otopine (54  $\text{mmol dm}^{-3}$  jodoacetamid (IAA) (Sigma-Aldrich, SAD) u 100  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Po isteku inkubacije pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min u tami, alkilacijsku otopinu sam uklonila, a gelove inkubirala 5 min sa 100  $\mu\text{L}$  otopine 100  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Dodala sam isti volumen ACN-a, te smjesu inkubirala narednih 15 min. Komadićima gela, kojima sam opisanom postupkom uklonila Coomassie Brilliant Blue R250 boju, odstranila sam zatim tekućinu te ih osušila u vakuum centrifugi.

Odbojane gelove rehidrirala sam dodatkom 1 – 20  $\mu\text{L}$  otopine tripsina (svinjski, Roche, Švicarska) (0,1  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  tripsina u 10  $\mu\text{L}$  10  $\text{mmol dm}^{-3}$  HCl-a + 90  $\mu\text{L}$  pufera za digestiju (95% (*m/V*) 50  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5% (*V/V*) ACN)) i inkubirala uz snažno miješanje (1000 rpm) tijekom 45 min pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Volumen dodane otopine tripsina odredila sam prema procjenjenoj masi proteina u gelu tako da omjer tripsina i mase proteina bude otprilike 1:100 (10 ng tripsina



na 1 µg proteina). Nakon inkubacije, eventualni višak otopine sam uklonila i zamijenila s 20 – 30 µL pufera za digestiju bez enzima. Enzimaska razgradnja proteina u gelovima odvijala se preko noći pri 37 °C u termomiješalici uz snažno miješanje, a zatim sam tubice kratko centrifugirala da se kondenzat s čepa slegne.

Usljedio je postupak ekstrakcije peptida iz gela kojeg sam započela dodatkom 50 µL 50 mmol dm<sup>-3</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Nakon inkubacije od 15 min dodala sam isti volumen ACN-a i ponovno inkubirala komadiće gela 15 min. Dobivene supernatante s ekstrahiranim peptidima prebacila sam u čiste reakcijske tubice, te ponovila ekstrahiranje peptida još dva puta inkubacijom sa 60 µL 1% (V/V) HCOOH (Kemika, Hrvatska) / ACN u omjeru 1:1 (V/V). Supernatante sam spojila, a zatim otapalo uklonila sušenjem u vakuum centrifugi. Uzorke peptida sam pohranila pri temperaturi 4 °C do sljedećeg dana.

U narednom koraku, peptide sam pročistila pomoću *Zip-Tip C<sub>18</sub>* nastavaka za pipete (Millipore, SAD) kako slijedi. Najprije sam peptide otopila u 10 µL 0,1%-tne (V/V) otopine trifluoroctene kiseline (TFA, CF<sub>3</sub>COOH) (Sigma-Aldrich, SAD). Zatim sam *Zip-Tip* nastavak hidrirala otopinom 0,1% TFA (V/V) / ACN u omjeru 1:1 (V/V) pipetiranjem 3 × 10 µL, a potom ekvilibrirala pipetiranjem 3 × 10 µL otopine 0,1%-tne (V/V) TFA. Otopljene peptide vezala sam na stacionarnu fazu *Zip-Tip C<sub>18</sub>* nastavka pipetiranjem otopine tri puta, nakon čega sam nastavak isprala tri puta s 10 µL otopine 0,1%-tne (V/V) TFA. Vezane peptide eluirala sam s 10 µL otopine 0,1% TFA (V/V) / ACN u omjeru 1:1 (V/V), te zatim dodatno eluirala s 10 µL ACN-a. Pročišćene peptide osušila sam u vakuum centrifugi.

#### 3.2.2.3.3.2. Analiza i identifikacija proteina

Pročišćene peptide otopila sam u 5 µL otopine 0,1% TFA (V/V) / ACN u omjeru 1:1 (V/V), a zatim u istoj otopini priredila matricu, α-cijano-4-hidroksicimetnu kiselinu (HCCA) (Sigma-Aldrich, SAD) u koncentraciji 3 mg mL<sup>-1</sup>. Jedan µL otopine peptida pomiješala sam s 1 µL otopine matrice, te potom nanijela po 1 µL tako dobivene otopine na pločicu za MALDI (engl. *matrix assisted laser desorption/ionisation*) (MPT Ground Steel Plate, Bruker, SAD).

Spektre peptida snimala sam na instrumentu *ultrafleXtreme* (Bruker Daltonics, SAD) kojim se mase analiziraju mjerenjem vremena leta (TOF, engl. *time-of-flight*). Prije početka snimanja i nakon svaka 2-3 snimljena uzorka, instrument sam kalibrirala pomoću komercijalno dostupne smjese peptida (*Peptide calibration Mix 4*, Tablica 3) (LaserBio Labs, Francuska), koju sam razrijedila s 0,1% (V/V) TFA / ACN u omjeru 1:1 (V/V). Uzorke za kalibraciju nanijela

sam na pločicu za MALDI na isti način kao i eksperimentalne uzorke pazeći pritom da ih rasporedim na različite dijelove pločice između eksperimentalnih uzoraka. Takvim rasporedom i učestalom kalibracijom izbjegla sam odstupanja od očitanih vrijednosti  $m/z$  veličina koja se mogu javiti zbog razlike u visini pločice za MALDI-TOF.

**Tablica 3.** Kalibracijski standard za snimanje spektara masa peptida.

Peptid	$m/z$ (ion $[M+nH]^{n+}$ )
Fragment bradikinina 1-5	573,672
Ljudski angiotenzin II	1046,202
Neurotenzin	1673,955
Fragment adenokortikotropnog hormona (engl. <i>adenocorticotropic hormone</i> , ACTH)	2466,709
Oksidirani $\beta$ -lanac goveđeg inzulina	3495,949

Spektre otiska prsta (engl. *peptide mass fingerprint*, PMF) snimala sam metodom MALDI-TOF-MS pomoću ionskog zrcala (engl. *reflectron*). Dobivene spektre obradila sam korištenjem programskog alata *FlexAnalysis 3.4.76.0* (Bruker Daltonics, SAD) i *BioTools 3.2.SR* te potom identificirala proteine pretraživanjem baze podataka NCBIprot za druge sisavce uz pomoć programskog alata Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Osim toga, pretraživala sam i bazu podataka poznatih kontaminanata uzoraka.

Prilikom pretraživanja postavila sam sljedeće parametre:

- dozvoljeni broj propuštenih mjesta cijepanja tripsinom: 1
- konstantna posttranslacijska modifikacija proteina: karbamidometilacija cisteina
- varijabilne posttranslacijske modifikacije proteina: N-terminalna acetilacija proteina, deamidacija asparagina i glutamina, oksidacija histidina i triptofana, oksidacija metionina
- tolerancija pogreške mase peptida:  $\pm 0,05 - 0,2$  Da

Za sekvenciranje spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF-MS (MS/MS) odabrala sam najintenzivnije peptide u PMF spektru koje sam fragmentirala unutar kolizijske ćelije u instrumentu te im snimila spektre. Ovom metodom dodatno sam potvrdila da je protein ispravno identificiran PMF metodom. Spektre sam obradila i peptide identificirala korištenjem istih alata i postavki kao i za PMF spektre, uz toleranciju pogreške mase fragmenta  $\pm 0,3 - 0,5$  Da.

### 3.2.2.4. Određivanje udjela IgG-a

Udio IgG-a u visokopročišćenim pripravcima određivala sam izračunom udjela površine ispod odgovarajućeg kromatografskog pika u ukupnoj površini ispod svih kromatografskih pikova dobivenih metodom kromatografije isključenjem po veličini, kao što je opisano u 3.2.2.3.1.

U manje čistim uzorcima, poput HKP-a, udio IgG-a izračunala sam iz rezultata koncentracije ukupnih IgG-a (metoda 3.2.2.2.) i koncentracije ukupnih proteina (metoda 3.2.2.1.) prema formuli:

$$\text{Udio IgG [\%]} = (\gamma(\text{IgG}) [\text{mg mL}^{-1}] / \gamma(\text{proteina}) [\text{mg mL}^{-1}]) \times 100$$

### 3.2.2.5. Određivanje udjela agregata u visokopročišćenim IgG pripravcima

Udio agregata u pojedinim uzorcima izračunala sam iz udjela zbroja površina svih kromatografskih pikova koji po retencijskom vremenu odgovaraju visokomolekulskim komponentama u ukupnoj površini kromatograma istog uzorka analiziranog metodom kromatografije isključenjem po veličini opisanom u 3.2.2.3.1.

### 3.2.2.6. Određivanje promjena u sastavu potklasa IgG pripravaka

Raspodjelu IgGa, IgGb i IgG(T) potklasa u HKP-u, kao i utjecaj različitih postupaka pročišćavanja na promjene u sastavu istih u IgG uzorcima, određivala sam ELISA-om kako slijedi. Mikrotitracijske pločice (Costar, SAD) sam obložila otopinom zmijskog venoma ili njegovih pojedinih komponenti u koncentraciji  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a zatim ih blokirala te nanijela binarna razrjeđenja HKP-a, odnosno uzoraka imunoglobulina pročišćenih različitim postupcima kako je opisano u poglavlju 3.2.2.2. Komponente venoma koje sam upotrijebila bili su amoditoksini (Atx) i hemoragini (H) (Institut Jožef Stefan, Ljubljana). Rekombinantni amoditoksin A (Atx A) po strukturi je identičan nativnom, a proizveden je metodom koju su razvili Liang i suradnici (Liang i sur., 1993). Ukupna hemoraginska frakcija (H) izolirana je otprije razvijenim protokolom (Leonardi i sur., 2002). Nakon inkubacije preko noći na sobnoj temperaturi, pločice sam oprala tri puta vodom tipa II. Mišja antitijela specifična za konjska IgGa (Bio-Rad, SAD) i IgGb (Bio-Rad, SAD) antitijela razrijedila sam  $1000\times$  u inkubacijskom puferu, nanijela  $100 \mu\text{L}$  / bazenčiću te inkubirala 2 h na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pločice sam oprala tri puta i zatim dodala  $100 \mu\text{L}$  / bazenčiću kozjih antitijela specifičnih za mišje IgG-e konjugiranih s

peroksidazom iz hrena (Cappel, Organon Teknika, SAD) koja sam razrijedila 4000× u inkubacijskom puferu. Imunoglobuline IgG(T) potklase detektirala sam pomoću kozjih IgG-a specifičnih za konjske IgG(T)-e konjugiranih s peroksidazom iz hrena (Abcam, UK) koja sam razrijedila 50000× u inkubacijskom puferu te nanijela 100 µL / bazečiću. Nakon inkubacije tijekom 2 h na 37 °C, pločice sam oprala tri puta vodom te dodatkom supstrata vizualizirala sve tri IgG potklase slijedeći postupke opisane u 3.2.2.2.2. Apsorbanciju sam mjerila pri valnoj duljini 492 nm na uređaju za mjerenje apsorbancije, fluorescencije i luminiscencije u mikrotitracijskim pločicama *Synergy HTX S1 LFA* (BioTek Instruments Inc., SAD) ili spektrofotometru *Thermo Scientific Multiskan Spectrum 1500* (Thermo Fischer Scientific, SAD). Mase navedenih IgG potklasa, koje daju vrijednost apsorbancije 1,0 pri valnoj duljini 492 nm u analiziranim uzorcima odredila sam iz krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ukupnih IgG-a istih uzoraka koristeći funkciju polinoma drugog stupnja ili prirodnog logaritma. Količinu svake potklase u uzorcima izrazila sam u odnosu na količinu iste u HKP-u kao početnom materijalu. Na taj sam način dobila faktor povećanja ili smanjenja količine pojedine IgG potklase kojim sam izrazila utjecaj primijenjenih postupaka pročišćavanja na promjenu međusobnog omjera IgGa, IgGb i IgG(T) potklasa u IgG preparatima.

### 3.2.2.7. *In vivo* test neutralizacije letalne toksičnosti

Za izvođenje testa neutralizacije letalne toksičnosti koristila sam odrasle srodne miševe soja NIH Ola/Hsd, mužjake i ženke, mase od 18 do 20 g, uzgojene u Imunološkom zavodu d.d., Zagreb. Miševi su za vrijeme pokusa bili smješteni u registriranoj nastambi Imunološkog Zavoda gdje su im hrana i voda bili ponuđeni *ad libitum*. S pokusnim životinjama rukovano je u skladu s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13) te Etičkim kodeksom Sveučilišta u Zagrebu (Pozitivno mišljenje etičkog povjerenstva broj: EP 110/2017).

Sposobnost IgG-a u pripremljenim uzorcima da neutraliziraju letalnu toksičnost *Vaa* otrova odredila sam testom neutralizacije letalne toksičnosti na miševima. Binarna serijska razrjeđenja svakog uzorka inkubirala sam s istim volumenom otopine otrova poznate koncentracije pri 37 °C tijekom 60 min, a zatim ih centrifugirala 5 min na 2000 rpm. Supernatanti su aplicirani intravenski ( $V = 0,5$  mL) skupinama po 6 miševa. Svaka životinja primila je približno 2,5 srednje letalne doze ( $LD_{50}$ , engl. *median lethal dose*) otrova pri čemu jedna predstavlja onu količinu suhe tvari (u µg) koja uzrokuje uginuće 50% miševa u testiranoj populaciji. Negativnu kontrolu testa predstavljala je grupa od dva miša kojima je aplicirana ista

količina otrova pomiješana s fiziološkom otopinom kako bih bila sigurna da korištena doza uzrokuje 100%-tnu smrtnost. Iz broja preživjelih životinja nakon 24 h odredila sam Spearman-Kärberovom metodom srednju efektivnu dozu (ED<sub>50</sub>, engl. *median effective dose*) analiziranih uzoraka izraženu kao volumen (u μL) koji neutralizira letalni učinak upotrijebljene količine otrova u 50% testiranih miševa. Njihovu neutralizacijsku učinkovitost izrazila sam kao zaštitnu moć (*R*), odnosno broj LD<sub>50</sub> doza zmijskog otrova koji neutralizira 1 mL nerazrijeđenog IgG pripravka pomoću sljedeće jednadžbe:

$$R = (Tv-1) / ED_{50}$$

Tv faktor je stvarni broj LD<sub>50</sub> doza apliciranih po mišu kojeg sam odredila iz broja preživjelih jedinki u pokusnim skupinama koje su primile niz koncentracija otrova podešenih da pokrivaju uski raspon oko njegove deklarirane toksičnosti (oko 2,5 LD<sub>50</sub>). Eksperiment sam ponovila najmanje dva puta i rezultate izrazila kao srednju vrijednost osim ako nije naznačeno drugačije.

### 3.2.2.8. Određivanje termičke stabilnosti IgG-a metodom diferencijalne pretražne fluorimetrije

Stabilnost IgG-a u uzorcima pratila sam diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom (DSF, engl. *differential scanning fluorimetry*; TSA, engl. *thermal shift assay*), postupkom kojim sam navedenim molekulama određivala temperaturu mekšanja (*T<sub>m</sub>*). Budući da se ovom metodom prati promjena fluorescencije u ovisnosti o porastu temperature prilikom koje dolazi do denaturacije proteina, primjenjivala sam je samo za analizu visokopročišćenih uzoraka jer bi zaostali proteini u manje čistim preparatima interferirali s dobivenim rezultatima. Uzorke IgG-a priredila sam u optičkim tubicama za mjerenje fluorescencije (Applied Biosystems, SAD) tako da sam u svaku dodala 45 μL ispitivanog uzorka (*m* = 25 μg) priređenog u 0,2 mol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu (pH = 6,0) i 5 μL boje *Sypro Orange* (Molecular Probes, SAD). Originalna otopina *Sypro Orange* boje bila je koncentrirana 5000×. Nakon što sam je razrijedila 10× s 0,2 mol dm<sup>-3</sup> fosfatnim puferom (pH = 6,0) i dodala u navedenom volumenu u reakcijsku smjesu, konačna koncentracija IgG-a, u smjesi konačnog volumena 50 μl, iznosila je 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, a boje 1×. Mjerenje sam obavila u instrumentu za kvantitativni PCR (qPCR) *7500 Real Time PCR* (Applied Biosystems, SAD) u kojem su tubice na početku mjerenja inkubirane 10 min na 5 °C, a zatim se temperatura podizala svake sljedeće minute za 1 °C do konačne vrijednosti od 94 °C. Tijekom opisanog postupka intenzitet fluorescencije je praćen programskim alatom *7500 System Software* u kojem sam kao reportersku boju (engl. *reporter*

*dye*) izabrala TAMRA boju, dok sam za pasivnu referencu (engl. *passive reference*) odabrala opciju “none“.

### 3.3. OBRADA REZULTATA

Rezultate svih provedenih analiza izrazila sam kao aritmetičku sredinu  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška. Program GraphPad Prism (verzija 5.00 za Windows, GraphPad Software, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) koristila sam za određivanje temperatura mekšanja ( $T_m$ ) iz točaka infleksija sigmoidnih krivulja dobivenih u eksperimentima DSF-a. Korelaciju između udjela agregata u visokopročišćenim uzorcima i  $T_m$  vrijednosti IgG-a izrazila sam kao  $r$  vrijednost izračunatu korištenjem programskog alata Statistica 13.5 (StatSoft, TIBCO Software Inc., SAD). Mjerna nesigurnost je dana u obliku 95%-tnog intervala pouzdanosti. Za pojedinačne usporedbe dviju grupa podataka koristila sam dvostrani Mann-Whitneyev U rang test u kojemu su pri razini signifikantnosti  $\alpha = 5\%$  statistički značajno različitim smatrane grupe podataka čije su izračunate U-vrijednosti manje ili jednake teorijskim U-vrijednostima.

## 4. REZULTATI

### 4.1. OPTIMIZACIJA POSTUPAKA IZOLACIJE IgG-a

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti utjecaj različitih postupaka izolacije IgG-a iz jedinstvenog uzorka hiperimune konjske plazme (HKP) na svojstva imunoglobulinskih pripravaka koja su odgovorna za kvalitetu ove vrste lijeka u smislu njihove učinkovitost i sigurnosti.

Kao polazni materijal koristila sam termički obrađeni HKP dobiven imunizacijom konja otrovom poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*, Vaa) iz kojega sam, koristeći pet različitih postupaka, pročišćavala IgG-e uz pretpostavku da specifični uvjeti svakoga od njih različito utječu na strukturu imunoglobulina, a time i stabilnost konačne preparacije. Metode kojima sam izolirala IgG-e bile su sljedeće:

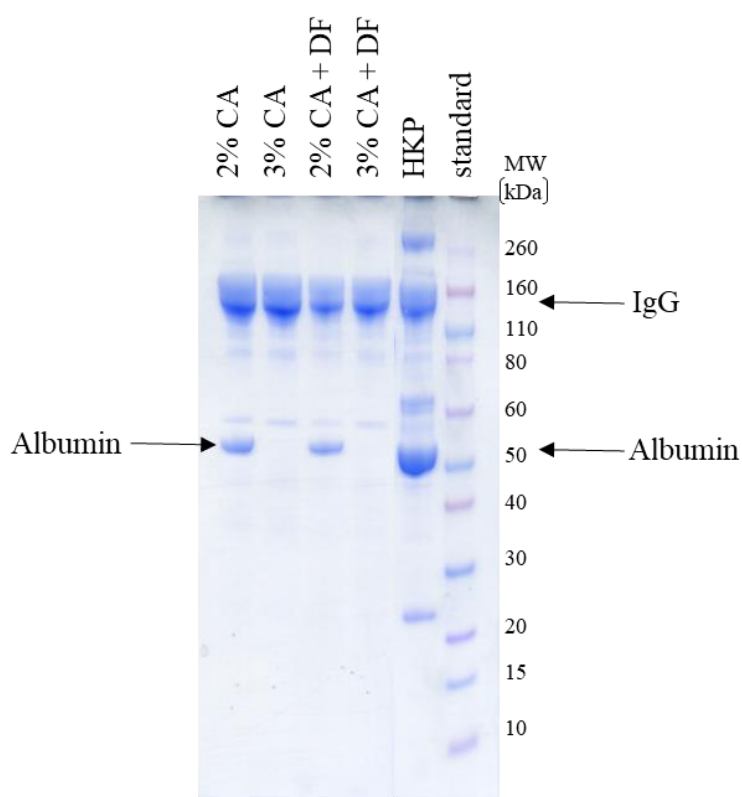
- taloženje kaprilnom kiselinom (CAP, engl. *caprylic acid precipitation*)
- taloženje amonijevim sulfatom (ASP, engl. *ammonium sulphate precipitation*)
- kromatografija izmjenom aniona (AEX, engl. *anion-exchange chromatography*)
- kromatografija izmjenom kationa (CEX, engl. *cation-exchange chromatography*)
- afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A (AC, engl. *affinity chromatography*)

Nakon izolacije, dobivenim IgG uzorcima uspoređivala sam čistoću, temperaturnu stabilnost i sastav najzastupljenijih potklasa, te također i sposobnost neutralizacije letalne toksičnosti otrova. U početnoj fazi istraživanja neophodno je bilo optimizirati svaki pojedini postupak kako bih definirala i uspostavila uvjete pročišćavanja koji će dati što čišće preparacije zadovoljavajućeg prinosa.

#### 4.1.1. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a TALOŽENJEM KAPRILNOM KISELINOM

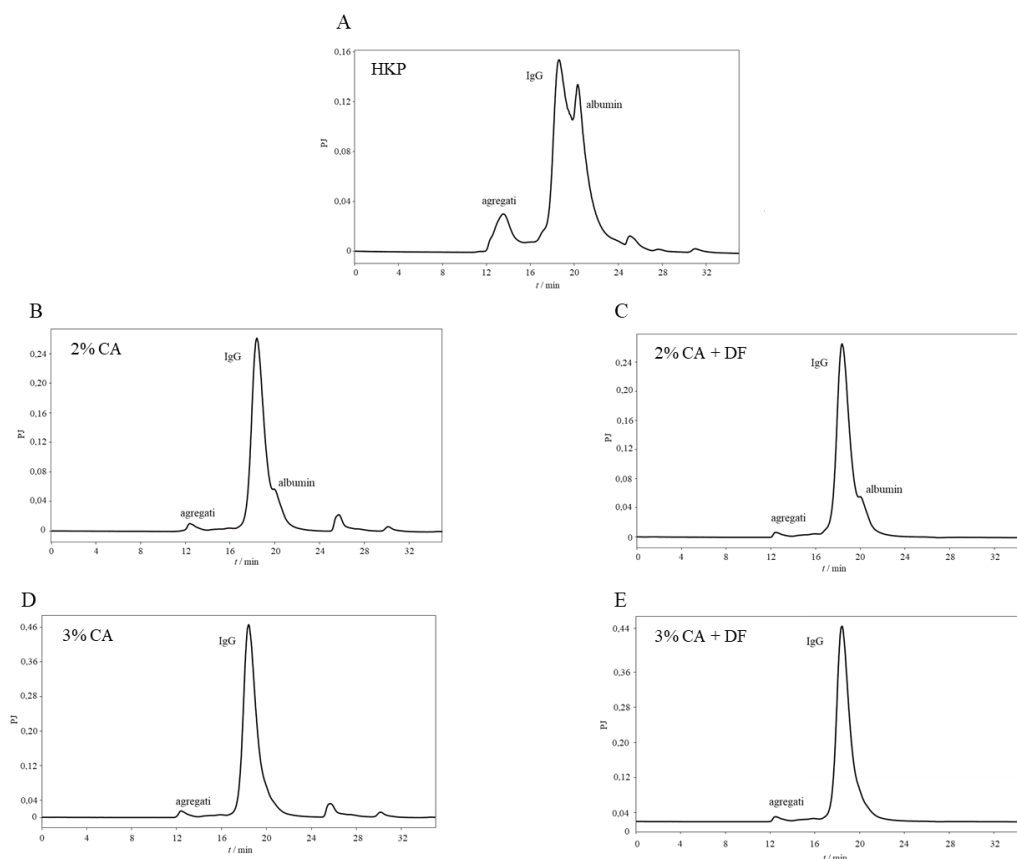
Prema podacima u literaturi, kaprilnom kiselinom (CA, engl. *caprylic acid*) u rasponu koncentracija od 1 do 3% (V/V) IgG-i se ne talože premda je uočeno da najniža koncentracija daje produkt bitno manje čistoće (Kurtović i sur., 2019). Međutim, jedno istraživanje pokazalo je da već 3% CA, uz većinu ostalih proteina plazme, ipak taloži i nešto IgG-a (Raweerith i Ratanabanangkoon, 2003). Uzevši navedeno u obzir, u svrhu optimizacije uvjeta pročišćavanja, postupak taloženja neimunoglobulinskih molekula ispitala sam primjenom CA u koncentraciji

2% (V/V) i 3% (V/V). Analiza čistoće SDS-PAGE-om (Slika 9) i SEC-HPLC-om (Slika 10) pokazala je da sam većom koncentracijom dobila IgG-e s manjim udjelom kontaminanata. Čistoća uzoraka pripremljenih s 2% CA iznosila je 82,2%, a onih taloženih s 3% CA 93,7% (Tablica 4). Na osnovu elektroforetske pokretljivosti u SDS-PAGE-u, zaostali albumin identificiran je kao dominantno onečišćenje preparata (Slika 9). S druge strane, prinos IgG-a nakon taloženja s 3% CA bio je nešto niži (84,8%) nego onaj dobiven primjenom 2% CA (88,2%) (Tablica 4). Postupkom dijafiltracije, uvedenim u svrhu uklanjanja CA, ujedno sam postigla dodatno pročišćavanje oba uzorka pri čemu je iskorištenje IgG-a ostalo nepromijenjeno (Slika 10, Tablica 4).



**Slika 9.** SDS-PAGE analiza čistoće IgG-a ( $m = 15 \mu\text{g}$ ) izdvojenih iz hiperimune konjske plazme (HKP) ( $m = 35 \mu\text{g}$ ) taloženjem kaprilnom kiselinom (CA) konačne koncentracije 2% (V/V) ili 3% (V/V) prije i nakon postupka dijafiltracije (DF) u nereducirajućim uvjetima na Bis-Tris gradijentnom gelu sa 4 – 12% (w/V) umreženosti. Proteinske pruge detektirane su bojanjem s 0,1%-tnom otopinom (m/V) Coomassie Brilliant Blue R250. MW (engl. *molecular weight*) – molekulska masa.





**Slika 10.** SEC-HPLC kromatogrami hiperimune konjske plazme (HKP) (A), IgG uzorka pročišćenog iz HKP-a taloženjem s 2% (V/V) kaprilne kiseline (CA) prije (B) i nakon dijafiltracije (DF) (C) i IgG uzorka pročišćenog s 3% (V/V) CA prije (D) i nakon DF (E). Kolona: *TSK-GEL G3000SW<sub>XL</sub>* (7,8 × 300 mm);  $c(\text{uzorak}) = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ ; protok:  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ; mobilna faza:  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatno-sulfatni pufer, pH = 6,7.

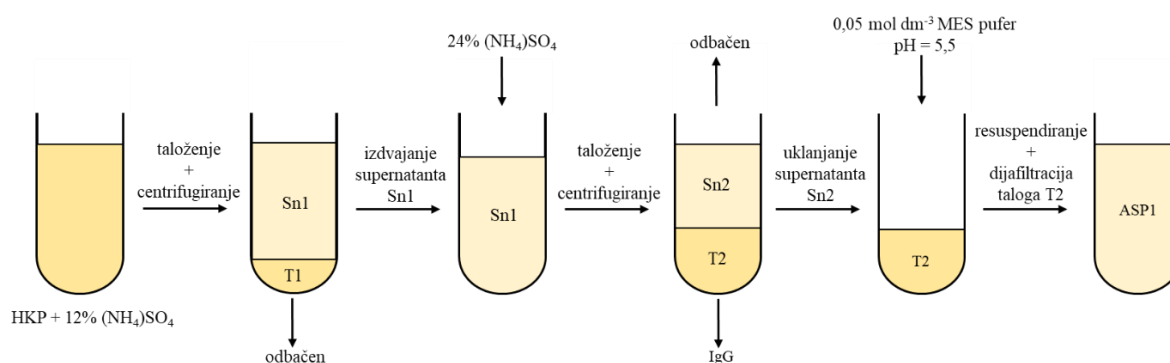
**Tablica 4.** Usporedba čistoće i prinosa IgG-a u uzorcima pročišćenima postupkom taloženja s 2% (V/V) i 3% (V/V) kaprilne kiseline (CA) prije i nakon dijafiltracije.

	Čistoća (%)		Prinos (%)	
	2% CA	3% CA	2% CA	3% CA
IgG-i	$82,2 \pm 1,4$ (n = 7)	$93,7 \pm 1,1$ (n = 6)	$88,2 \pm 3,3$ (n = 8)	$84,8 \pm 5,6$ (n = 6)
Dijafiltrirani IgG-i	$87,7 \pm 1,4$ (n = 8)	$97,7 \pm 1,2$ (n = 6)	$91,0 \pm 2,0$ (n = 8)	$86,7 \pm 6,5$ (n = 6)

Visoki prinos je bio poželjan, ali kako nije predstavljao prioritet ovog istraživanja, za taloženje sam odlučila koristiti 3% CA čime sam dobila gotovo potpuno čisti finalni produkt (97,7%) s prihvatljivim gubitkom IgG-a (< 15%) (Tablica 4).

#### 4.1.2. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a TALOŽENJEM AMONIJEVIM SULFATOM

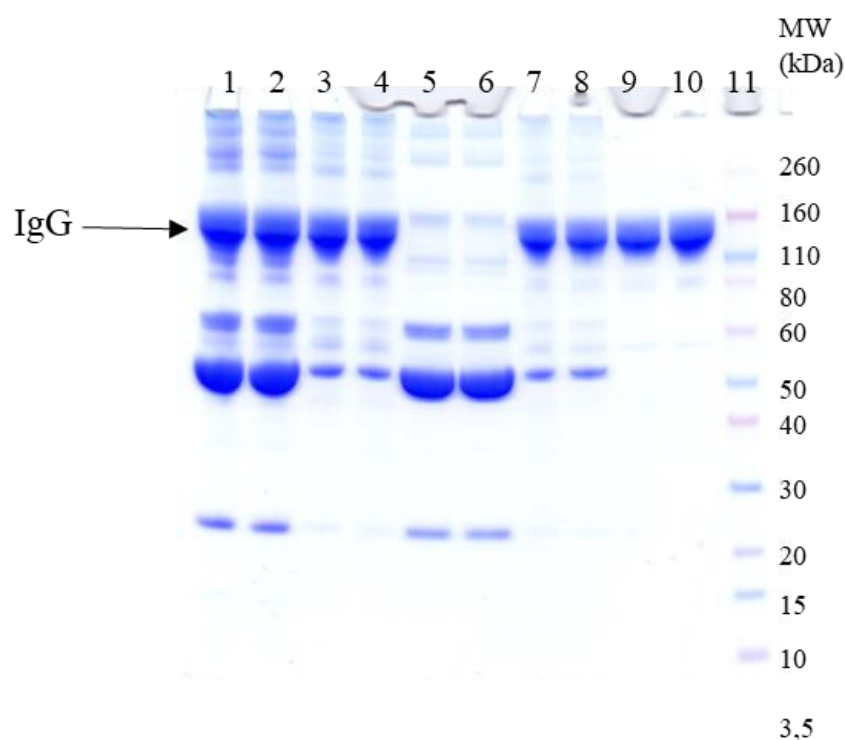
Taloženje IgG-a amonijevim sulfatom provela sam metodom isoljavanja koju su opisali Rojas i suradnici (1994). Ovim postupkom, dodatkom visoke koncentracije soli vodikove veze između proteina i molekula vode slabe. Posljedično tome, molekule vode vode uklanjaju se s površine proteina koji zatim međusobno formiraju veze, agregiraju i precipitiraju. Taloženje sam provela u dva koraka povećavajući koncentraciju otopine amonijevog sulfata s 12% (*m/V*) u prvom na 24% (*m/V*) u drugom koraku prema shemi postupka prikazanoj na Slici 11.



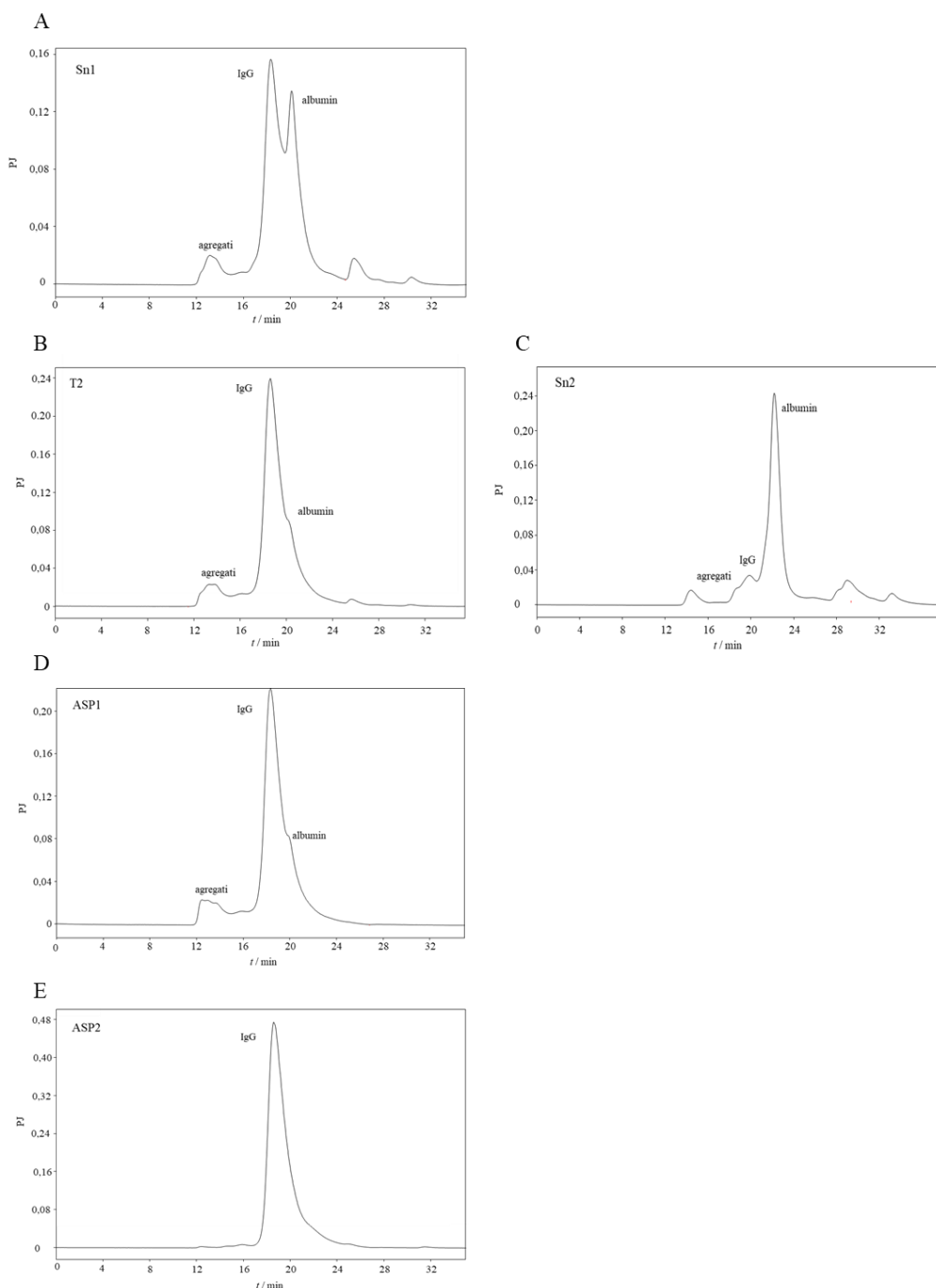
**Slika 11.** Shematski prikaz pročišćavanja IgG-a iz hiperimune konjske plazme (HKP) taloženjem amonijevim sulfatom. T – talog; Sn – supernatant; ASP1 – produkt taloženja amonijevim sulfatom.

Nakon prvog koraka taloženja, talog T1 s nečistoćama sam odbacila, a supernatant Sn1 (Slika 12; linije 1 i 2, Slika 13A) koji sadrži IgG-e podvrgnula drugom koraku taloženja tijekom kojeg su nečistoće dominantno zaostale u supernatantu Sn2 (Slika 12; linije 5 i 6, Slika 13C), a IgG-i se istaložili. Dobiveni talog T2 sam resuspendirala u 0,05 mol dm<sup>-3</sup> MES puferu (pH = 5,5) (Slika 12; linije 3 i 4, Slika 13B). Daljnjim korakom dijafiltracije uklonila sam amonijev sulfat i dobila IgG pripravak (ASP1) (Slika 12; linije 7 i 8, Slika 13D), čiji udio IgG monomera, procijenjen SEC-HPLC-om, od oko 80% (Slika 13D) nije bio zadovoljavajući za sve daljnje analize. Stoga sam alikvot ASP1 uzorka podvrgnula dodatnim koracima taloženja s 2% CA i

dijafiltracije kojima sam postigla čistoću od 96% u uzorku ASP2 (Slika 12; linije 9 i 10, Slika 13E).



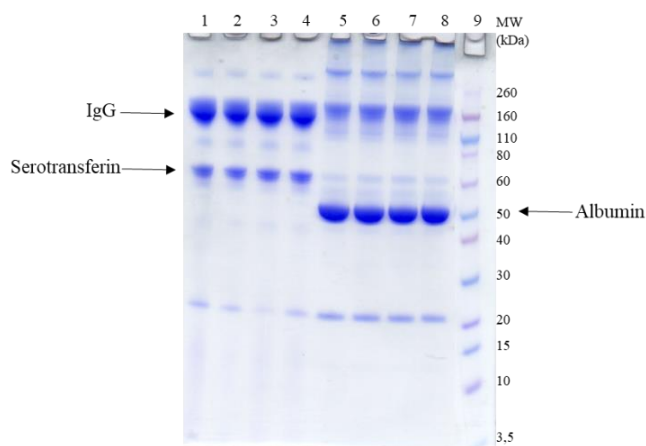
**Slika 12.** SDS-PAGE analiza čistoće međuprodukata ( $m = 20 \mu\text{g}$ ) u postupku izolacije IgG-a taloženjem amonijevim sulfatom provedena u nereducirajućim uvjetima na Bis-Tris gradijentnom gelu sa 4 – 12% ( $w/V$ ) umreženosti. Proteinske pruge detektirane su bojanjem s 0,1%-tnom otopinom ( $m/V$ ) Coomassie Brilliant Blue R250. Linije 1 i 2, supernatant s IgG-ima nakon prvog taloženja (Sn1); linije 3 i 4, talog s IgG-ima nakon drugog taloženja (T2) resuspendiran u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  MES puferu ( $\text{pH} = 5,5$ ); linije 5 i 6, supernatant sa zaostalim nečistoćama nakon drugog taloženja (Sn2); linije 7 i 8, resuspendirani talog T2 s IgG-ima nakon dijafiltracije (ASP1); linije 9 i 10, IgG uzorak nakon dodatnog koraka pročišćavanja taloženjem s 2% ( $V/V$ ) CA i dijafiltracije (ASP2); linija 11, standard. MW (engl. *molecular weight*) – molekulska masa.



**Slika 13.** SEC-HPLC kromatogrami pojedinih međuprodukata u postupku izolacije IgG-a taloženjem amonijevim sulfatom. Supernatant nakon prvog taloženja (Sn1) (A), resuspendirani talog nakon drugog taloženja (T2) (B), supernatant nakon drugog taloženja (Sn2) (C), resuspendirani talog T2 nakon dijafiltracije (ASP1) (D), dijafiltrirani IgG uzorak dobiven taloženjem s 2% (V/V) CA (ASP2) (E). Kolona: *TSK-GEL G3000SW<sub>XL</sub>* (7,8 × 300 mm);  $c(\text{uzorak}) = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ ; protok:  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ; mobilna faza:  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatno-sulfatni pufer, pH = 6,7.

#### 4.1.3. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a KROMATOGRAFIJOM IZMJENE ANIONA

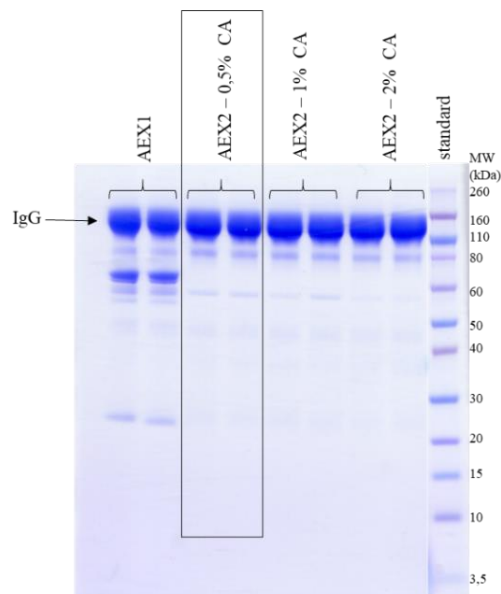
Kromatografijom izmjene aniona IgG-e sam pročistila “batch“ načinom na ionskom izmjenjivaču s pozitivno nabijenim kvaternim aminima kao funkcionalnim skupinama. Za vezanje sam koristila  $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris pufer s dodatkom  $0,035 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl-a ( $\text{pH} = 8,0$ ) čijom se primjenom u otprije provedenim pokusima postizala najveća čistoća preparata (Tunjić i sur., 2017). S obzirom na  $\text{pH}$  vrijednost pufera za vezanje, većina kiselih proteina plazme (ponajprije većinski zastupljenog albumina ( $\text{pI} \approx 5,3 - 6,0$ )) (Miller i sur., 2004) adsorbirala se za nosač, dok su se bazičnije IgG molekule ( $\text{pI} \approx 5,8 - 7,0$ ) (Miller i sur., 2004) zadržavale u supernatantu. Iznimku je činio jedan protein veličine od oko 60 kDa koji je zaostao u pročišćenom IgG uzorku (AEX1) (Slika 14; linije 1-4). Analiza masenom spektrometrijom pokazala je da se radi o serotransferinu (Tablica 9). Albumin, drugi najzastupljeniji protein plazme, uklonila sam u potpunosti i identificirala ga isključivo u eluiranim frakcijama (Slika 14; linije 5-8). IgG-i su većim dijelom ostali nevezani u otopini (Slika 14; linije 1-4).



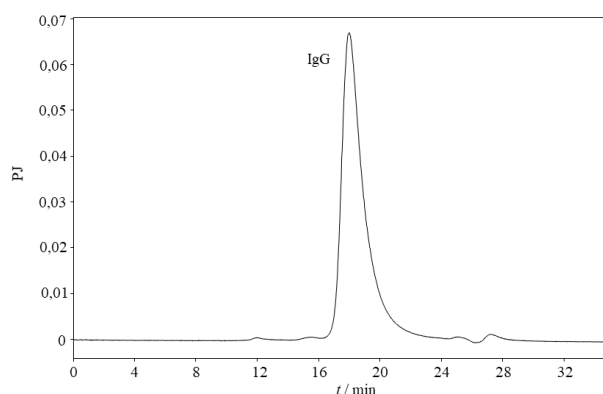
**Slika 14.** SDS-PAGE analiza čistoće međuprodukata ( $m = 15 \mu\text{g}$ ) u postupku izolacije IgG-a kromatografijom izmjene aniona provedena u nereducirajućim uvjetima na Bis-Tris gradijentnom gelu sa 4 – 12% ( $w/V$ ) umreženosti. Proteinske pruge detektirane su bojanjem s 0,1%-tnom otopinom ( $m/V$ ) Coomassie Brilliant Blue R250. Linije 1-4, uzorci AEX1 (supernatanti s nevezanim IgG-ima); linije 5-8, eluati; linija 9, standard. MW (engl. *molecular weigh*) – molekulska masa.

U dobivenom AEX1 uzorku udio IgG-a iznosio je samo oko 72% što nije bilo prihvatljivo za neke od planiranih analiza zbog čega sam ga dodatno pročistila taloženjem s CA. U tu svrhu ispitala sam učinkovitost uklanjanja nečistoća s tri različite koncentracije od

0,5%, 1% i 2%. Sa sve tri su dobivena podudarna iskorištenja *Vaa*-specifičnih IgG-a, međutim, već i ona najmanja se pokazala kao potpuno djelotvorna (Slika 15), dajući uzorak (AEX2) visokog udjela IgG monomera (98%), što sam dodatno potvrdila SEC-HPLC analizom (Slika 16).



**Slika 15.** SDS-PAGE analiza IgG produkta ( $m = 15 \mu\text{g}$ ) izoliranog postupkom kromatografije izmjenom aniona (AEX1) i dodatno pročišćenih uzoraka taloženjem kaprilnom kiselinom (CA) primjenjenoj u koncentraciji od 0,5%, 1%, odnosno 2% (V/V) (AEX2). Elektroforeza je provedena u nereducirajućim uvjetima na Bis-Tris gradijentnom gelu sa 4 – 12% (w/V) umreženosti. Proteinske pruge detektirane su bojanjem s 0,1%-tnom otopinom ( $m/V$ ) Coomassie Brilliant Blue R250. MW (engl. *molecular weight*) – molekulska masa.



**Slika 16.** Primjer SEC-HPLC kromatograma IgG uzorka pripremljenog kromatografijom izmjene aniona nakon dodatnog pročišćavanja taloženjem kaprilnom kiselinom koncentracije 0,5% (V/V). Kolona: *TSK-GEL G3000SW<sub>XL</sub>* (7,8 × 300 mm);  $c(\text{uzorak}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; protok:  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ; mobilna faza:  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatno-sulfatni pufer, pH = 6,7.

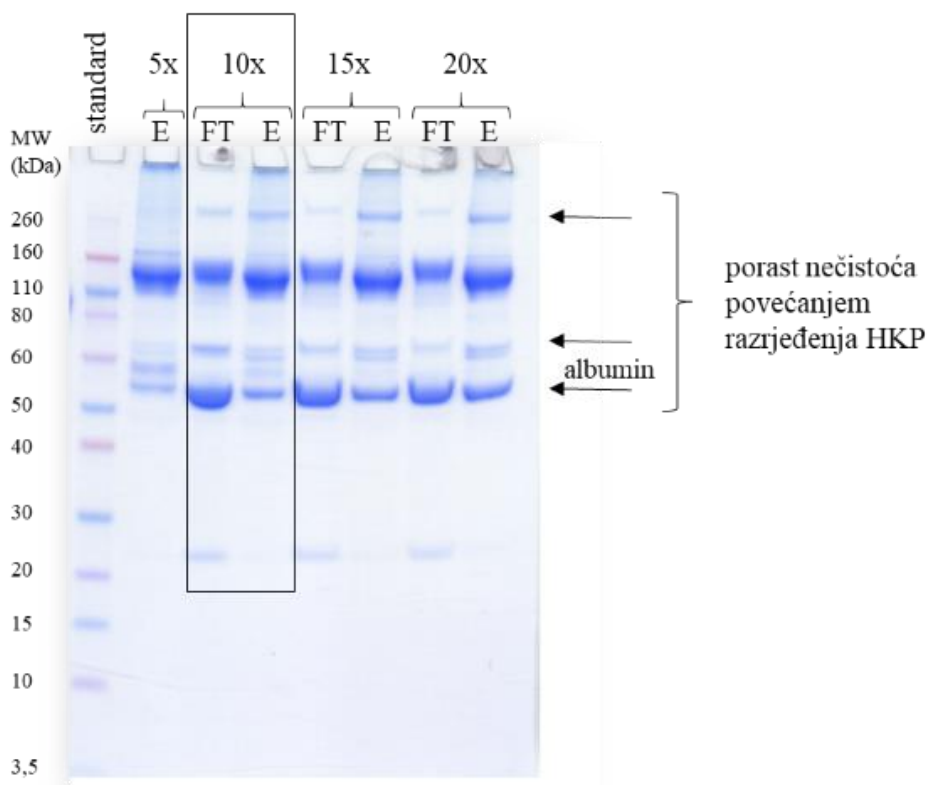
#### 4.1.4. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a KROMATOGRAFIJOM IZMJENE KATIONA

U postupku kromatografije izmjene kationa cilj mi je bio pronaći uvjete pri kojima će se za negativno nabijene funkcionalne skupine stacionarne faze dominantno vezati IgG-i što sam pokušala postići upotrebom  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  MES pufera pH vrijednosti 6,0 koja je dovoljno niža od pI vrijednosti većine molekula od interesa (pI (IgG)  $\approx 5,8 - 7,0$ ) (Miller i sur., 2004) te bi trebala pogodovati njihovom vezanju i odjeljivanju od preostalih proteina plazme.

Zbog gustoće, uzorak plazme nije bilo moguće prebaciti u pufer za vezanje postupkom dijafiltracije već sam ga morala istim adekvatno razrijediti prije nanošenja na kromatografsku kolonu. Stoga sam ispitala prinos eluiranih proteina i čistoću IgG uzoraka dobivenih iz plazme razrijeđene 5, 10, 15 i  $20\times$ . Prinos eluiranih proteina rastao je proporcionalno s povećanjem njenog razrjeđenja (Tablica 5), dok se istovremeno čistoća smanjivala, što se posebice očitovalo kao pojačavanje intenziteta vrpce koja na SDS-PAGE gelu po molekulskoj masi odgovara albuminu (Slika 17). Zaključila sam da je  $10\times$  razrijeđeni HKP najbolji odabir jer sam njime u dobivenim CEX1 uzorcima postigla optimalan odnos prinosa (33%) (Tablica 5) i čistoće (Slika 17).

**Tablica 5.** Prinos proteina iz uzoraka hiperimune konjske plazme (HKP) nanešene na kationski nosač u različitim razrjeđenjima pripremljenima u  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  MES puferu za vezanje, pH = 6,0.

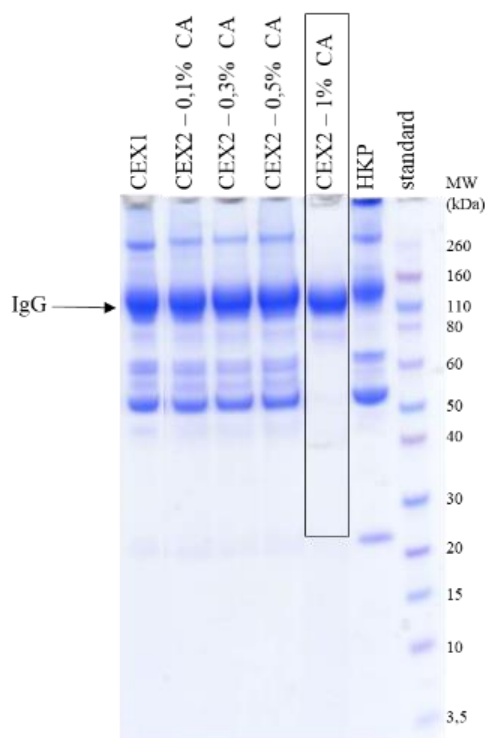
Faktor razrjeđenja HKP uzoraka puferom za vezanje	Prinos proteina (%)
5×	$15,0 \pm 0,6$ ( $n = 2$ )
10×	$33,3 \pm 1,7$ ( $n = 2$ )
15×	$39,6 \pm 2,8$ ( $n = 2$ )
20×	$46,2 \pm 0,9$ ( $n = 2$ )



**Slika 17.** SDS-PAGE analiza produkata (CEX1) ( $m = 15 \mu\text{g}$ ) dobivenih tijekom postupka optimizacije izolacije IgG-a kromatografijom izmjene kationa iz hiperimune konjske plazme (HKP) razrijeđene 5, 10, 15 i 20 $\times$ . Elektroforeza je provedena u nereducirajućim uvjetima na Bis-Tris gradijentnom gelu sa 4 – 12% ( $w/V$ ) umreženosti. Proteinske pruge detektirane su bojanjem s 0,1%-tnom otopinom ( $m/V$ ) Coomassie Brilliant Blue R250. E – eluat; FT – engl. *flow through*; MW (engl. *molecular weight*) – molekulska masa.

S ciljem uklanjanja zaostalih nečistoća iz CEX1 uzorka, pripremljenog iz 10 $\times$  razrijeđenog početnog materijala, dodatnim korakom pročišćavanja ispitala sam niz koncentracija CA u rasponu od 0,1 do 1% i pritom utvrdila da se tek s onom najvećom (1%) učinkovito uklanja udio kontaminirajućih proteina (Slika 18).



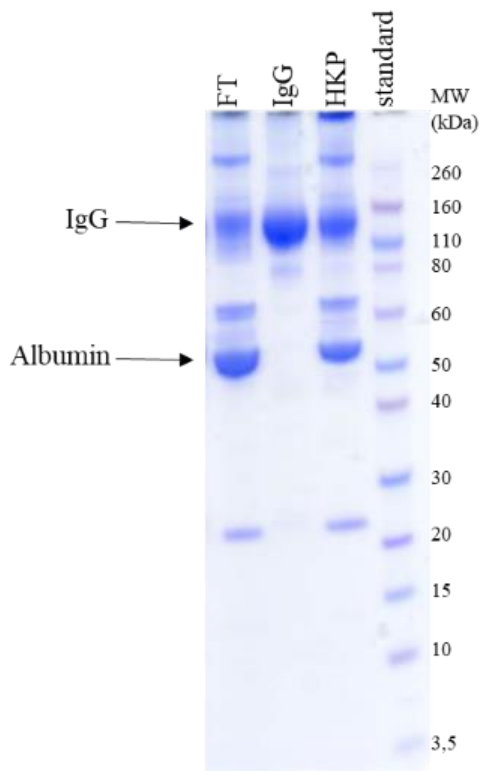


**Slika 18.** SDS-PAGE analiza čistoće CEX1 uzorka i CEX2 produkata dobivenih njegovim dodatnim pročišćavanjem ( $m = 20 \mu\text{g}$ ) nizom koncentracija kaprilne kiseline (CA) u rasponu od 0,1 do 1% (V/V) te usporedba s početnim materijalom – hiperimunom konjskom plazmom (HKP) ( $m = 35 \mu\text{g}$ ). Elektroforeza je provedena u nereducirajućim uvjetima na Bis-Tris gradijentnom gelu sa 4 – 12% (w/V) umreženosti, a proteinske pruge su detektirane bojanjem s 0,1%-tnom otopinom (m/V) Coomassie Brilliant Blue R250. MW (engl. *molecular weight*) – molekulska masa.

#### 4.1.5. OPTIMIZACIJA POSTUPKA IZDVAJANJA IgG-a AFINITETNOM KROMATOGRAFIJOM POMOĆU IMOBILIZIRANOG PROTEINA A

Zbog specifičnosti proteina A za Fc dio IgG-a, u primjeni postupka afinitetne kromatografije slijedila sam upute proizvođača *MabSelect* kolone bez potrebe za prilagođavanjem metode. Kao mobilnu fazu upotrijebila sam  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris pufer (pH = 7,4). Nakon nanošenja uzorka plazme vezane IgG-e sam eluirala puferom niskog pH ( $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  limunska kiselina, pH = 2,5) te ih neutralizirala dodatkom odgovarajućeg volumena  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris pufera (pH = 10,0). Dobivena IgG frakcija se odlikovala visokom čistoćom što je vidljivo na SDS-PAGE gelu (Slika 19). Albumin je u potpunosti zaostao u FT (engl. *flow through*) frakciji. Variranje brzine protoka prilikom vezanja ( $0,5$  i  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ) i eluiranja ( $1$  i  $2 \text{ mL min}^{-1}$ ) nije utjecalo na učinkovitost izolacije IgG-a jer je u svim eluatima njihova

koncentracija bila podjednaka ( $\approx 6,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Iako je prinos iznosio oko 55%, prikupljena količina IgG-a je bila dostatna za daljnja istraživanja.



**Slika 19.** SDS-PAGE analiza hiperimune konjske plazme (HKP) ( $m = 35 \mu\text{g}$ ) i frakcija dobivenih afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) ( $m = 20 \mu\text{g}$ ) provedena u nereducirajućim uvjetima na Bis-Tris gradijentnom gelu sa 4 – 12% ( $w/V$ ) umreženosti. Proteinske pruge su detektirane bojanjem s 0,1%-tnom otopinom ( $m/V$ ) Coomassie Brilliant Blue R250. MW (engl. *molecular weight*) – molekulska masa.

Opisanim postupcima sam uspostavila uvjete izvedbe svih pet metoda izolacije IgG-a iz HKP-a za dobivanje visoko pročišćenih pripravaka (Tablica 6).

**Tablica 6.** Sumarni prikaz optimiziranih uvjeta pročišćavanja IgG-a iz hiperimune konjske plazme (HKP) taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). AS – amonijev sulfat.

CAP	ASP	AEX	CEX	AC
		“batch”	monolitna CIMmultus SO <sub>3</sub> -1 kolona	kolona s imobiliziranim proteinom A
HKP razrijeđen 2× sa 150 mmol dm <sup>-3</sup> NaCl	HKP razrijeđen 2× s AS (12%)	HKP razrijeđen 5× s 0,025 mol dm <sup>-3</sup> Tris puferom + 0,035 mol dm <sup>-3</sup> NaCl (pH = 8,0)	HKP razrijeđen 10× s 0,02 mol dm <sup>-3</sup> MES puferom (pH = 6,0)	HKP razrijeđen 2× s 0,02 mol dm <sup>-3</sup> Tris puferom (pH = 7,4)
↓ 3% CA	↓ supernatant (IgG) + AS (24%)	↓	↓ IgG-i vezani	↓
↓ IgG-i u supernatantu	↓ IgG-i u talogu	↓ IgG-i u otopini (AEX1)	↓ IgG-i eluat u 0,02 mol dm <sup>-3</sup> MES puferu + 1 mol dm <sup>-3</sup> NaCl (pH = 6,0)	↓ IgG-i vezani
	↓ dijafiltracijom uklonjena sol		↓ dijafiltracijom uklonjena sol	↓
	↓ IgG-i u 0,05 mol dm <sup>-3</sup> MES puferu (pH = 5,5) (ASP1)		↓ IgG-i u 0,05 mol dm <sup>-3</sup> MES puferu (pH = 5,5) (CEX1)	↓ IgG-i u eluatu u 0,02 mol dm <sup>-3</sup> limunskoj kiselinu (pH ≈ 2,5)
	↓ 2% CA	↓ 0,5% CA	↓ 1% CA	↓ dodatak 1 mol dm <sup>-3</sup> Tris pufera (pH = 10,0)
↓ dijafiltracija	↓ dijafiltracija	↓ dijafiltracija	↓ dijafiltracija	↓ dijafiltracija
IgG-i u 0,2 mol dm <sup>-3</sup> fosfatnom puferu (pH = 6,0)				
CAP	ASP2	AEX2	CEX2	AC

Budući da je u ovom istraživanju naglasak bio na kvalitativnim svojstvima imunoglobulinskih preparata, zadovoljavajućim prinosom smatrala sam onu količinu koja je bila dovoljna za provedbu planiranih analiza, imajući na umu da se svaki od korištenih protokola može dodatno optimizirati i u tom smislu poboljšati. Prinos sam računala prema sljedećoj formuli:

$$[(\gamma\text{IgG}) / \gamma\text{IgG} \text{ u početnom uzorku}] \times \text{faktor razrjeđenja} \times 100\%.$$

Dobivene podatke o prinosu izrazila sam kao masu IgG-a u uzorcima dobivenima u dva zasebna pokusa iz 1 mL nerazrijeđenog HKP-a koji sadrži 22,9 ( $\pm$  0,69) mg mL<sup>-1</sup> IgG-a (Halassy i sur., 2019) (Tablica 7). Količine IgG-a dobivene u prvom u odnosu na drugi pokus pročišćavanjem CEX i AC metodama bile su 2-3 puta manje jer se kolonama u trenutku upotrebe u prvom pokusu broj primjena približavao maksimalno preporučenom te stoga više nisu učinkovito razdvajale molekule. Zamjenom “starih“ kolona novima, do tada nekorištenima, značajno se povećao prinos IgG-a (Tablica 7).

**Tablica 7.** Količina IgG-a (u mg) dobivena iz 1 mL nerazrijeđene hiperimune konjske plazme taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) u dva zasebna pokusa.

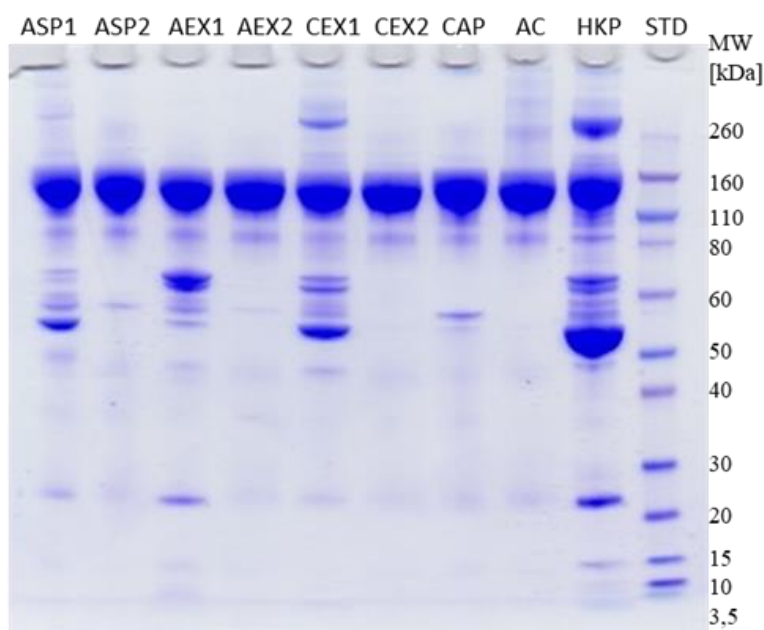
	ASP1	AEX1	CEX1	CAP	AC
	IgG (mg)				
1. pokus	14,42	12,45	3,99	18,69	6,18
2. pokus	18,11	13,25	11,23	18,03	12,33

## 4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA PROČIŠĆAVANJA NA KVALITATIVNE OSOBINE IMUNOGLOBULINSKIH PRIPRAVAKA

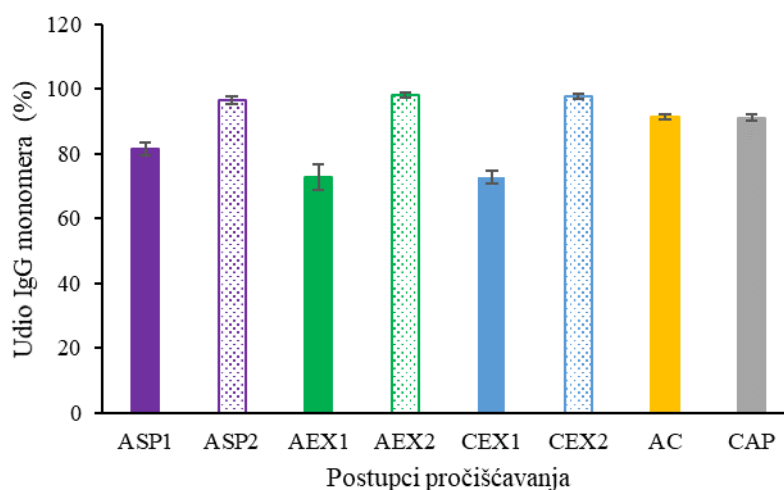
### 4.2.1. ČISTOĆA IgG UZORAKA

Primijenjenim postupcima pročišćavanja ukupnih IgG-a iz jedinstvenog pula HKP-a dobila sam pripravke različitog stupnja čistoće (Slika 20 i 21). Prema rezultatima SDS-PAGE (Slika 20) i SEC-HPLC analiza (Slika 22), precipitacija kaprilnom kiselinom i afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A dale su gotovo potpuno čiste produkte (CAP

i AC) u kojima je udio monomera, pojedinačnih molekula IgG-a, iznosio više od 90% (Tablica 8). Ovdje je važno primijetiti da se oba postupka provode u samo jednom koraku kojim se gotovo u potpunosti uklanjaju svi neželjeni proteini plazme (Slika 20). Nasuprot tome, pripravci dobiveni taloženjem amonijevim sulfatom (ASP1), te kromatografijom izmjene aniona (AEX1) i kationa (CEX1) sadržavali su značajne količine nečistoća (Slika 20) s udjelom monomera u rasponu od 72 do 81% (Tablica 8). Kao takvi, nisu bili pogodni za analizu stabilnosti IgG molekula u ovisnosti o temperaturi te sam ih stoga podvrgnula dodatnom pročišćavanju taloženjem s CA. Ovim korakom uspješno sam odstranila većinu zaostalih kontaminanata i time bitno povećala čistoću uzoraka (iznad 96%) (Slika 20 i 21, Tablica 8).



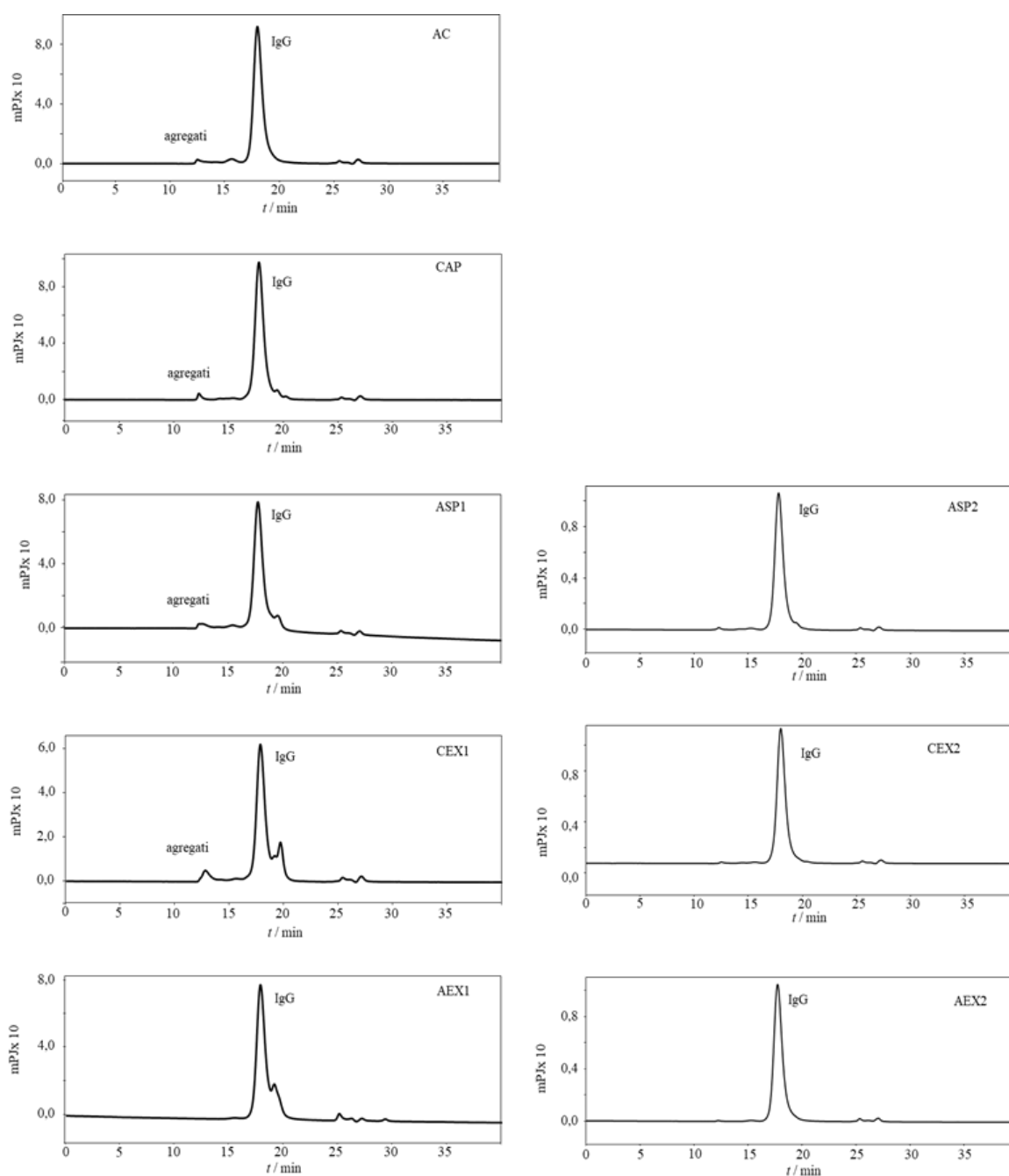
**Slika 20.** SDS-PAGE analiza hiperimune konjske plazme (HKP) ( $m = 35 \mu\text{g}$ ) i IgG-a ( $m = 20 \mu\text{g}$ ) izoliranih taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). Elektroforeza je provedena u nereducirajućim uvjetima na Bis Tris gradijentnom gelu sa 4 – 12% ( $w/V$ ) umreženosti. Proteinske pruge detektirane su bojanjem s 0,1%-tnom otopinom ( $m/V$ ) Coomassie Brilliant Blue R250. Uzorci označeni brojem "2" dodatno su pročišćeni taloženjem kaprilnom kiselinom. Standard molekulskih masa označen je kraticom STD. MW (engl. *molecular weight*) – molekulska masa.



**Slika 21.** Udio IgG monomera u uzorcima (čistoća u %) pročišćenima taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). Uzorci označeni brojem "2" dodatno su pročišćeni taloženjem kaprilnom kiselinom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja (Tablica 8)  $\pm$  standardna pogreška.

**Tablica 8.** Udio IgG monomera u uzorcima (čistoća u %) dobivenima taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), precipitacijom neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). Uzorci označeni brojem "2" dodatno su pročišćeni taloženjem kaprilnom kiselinom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška.

Postupak pročišćavanja	IgG monomeri (%)
ASP1	81,1 $\pm$ 1,8 ( $n = 3$ )
ASP2	96,6 $\pm$ 1,2 ( $n = 4$ )
AEX1	72,8 $\pm$ 3,9 ( $n = 3$ )
AEX2	98,0 $\pm$ 0,8 ( $n = 4$ )
CEX1	72,9 $\pm$ 1,9 ( $n = 3$ )
CEX2	97,8 $\pm$ 0,8 ( $n = 4$ )
AC	91,4 $\pm$ 0,7 ( $n = 9$ )
CAP	91,1 $\pm$ 0,9 ( $n = 9$ )

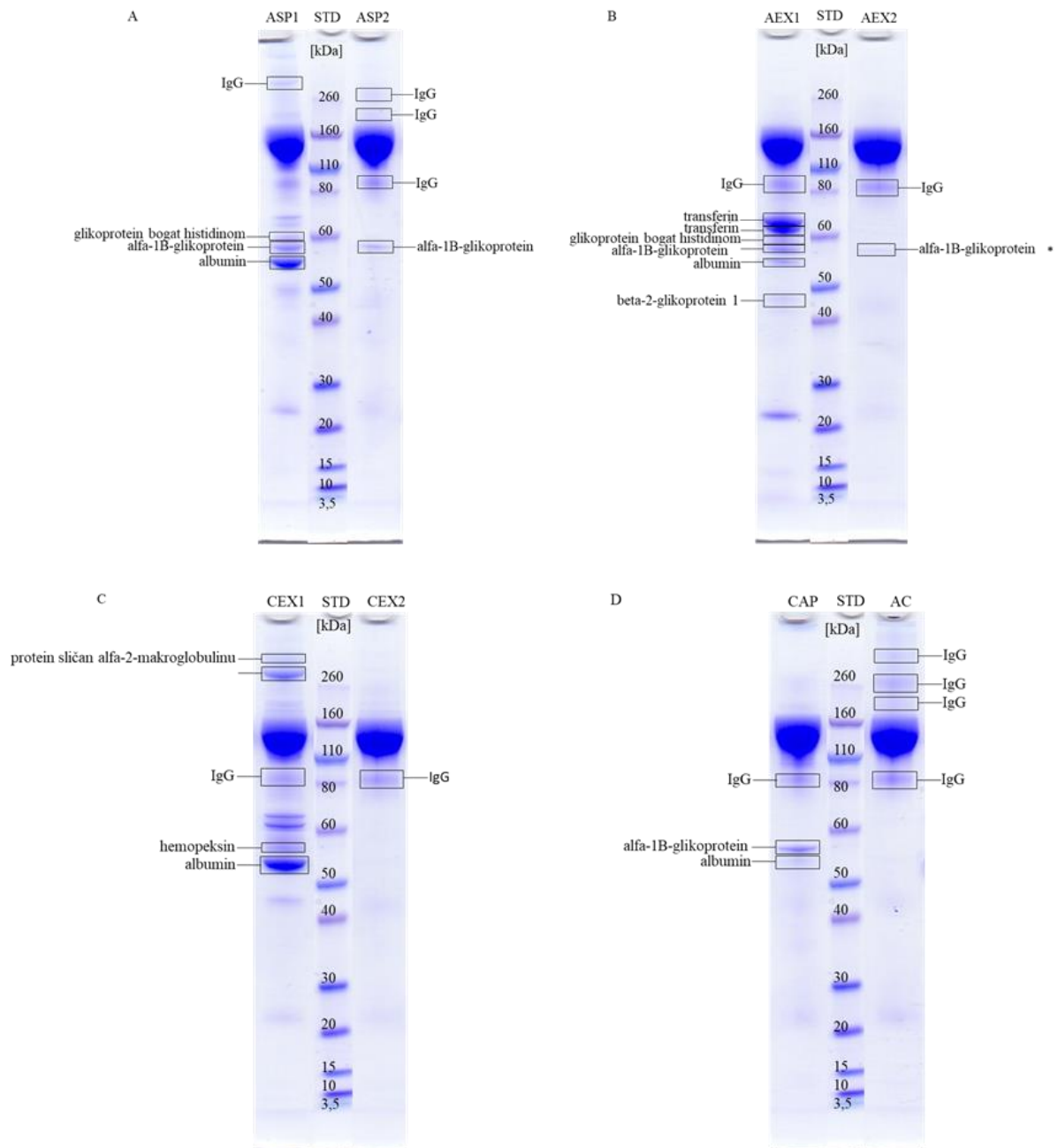


**Slika 22.** Primjeri SEC-HPLC kromatograma uzoraka IgG-a pročišćenih afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene kationa (CEX) i kromatografijom izmjene aniona (AEX). Uzorci označeni brojem "2" dodatno su pročišćeni taloženjem kaprilnom kiselinom. Kolona: *TSK-GEL G3000SW<sub>XL</sub>* (7,8 × 300 mm);  $c(\text{uzorak}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; protok:  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ; mobilna faza:  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatno-sulfatni pufer,  $\text{pH} = 6,7$ .

#### 4.2.1.1. Identifikacija rezidualnih proteinskih nečistoća u IgG uzorcima

Identifikaciju nečistoća u IgG pripravcima dobivenih različitim postupcima pročišćavanja obavila sam spektrometrijom masa (MS, engl. *mass spectrometry*), analitičkom metodom koja za karakterizaciju ioniziranih molekula koristi princip njihovog razdvajanja na osnovu razlike u omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Svaka metoda izolacije imunoglobulina rezultirala je karakterističnim profilom kontaminanata zaostalih u IgG frakcijama (Slika 23, Tablica 9). Kao glavni kontaminant uzorka pročišćenog metodom ASP (ASP1) (Slika 23A), odnosno CEX (CEX1) (Slika 23C) detektirala sam albumin, koji je u frakciji AEX1 (Slika 23B) i CAP (Slika 23D) bio prisutan samo u tragovima, dok je u potpunosti uklonjen iz IgG preparata pročišćenog afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) (Slika 23D). Uzorci ASP1 i AEX1 sadržavali su također glikoprotein bogat histidinom i alfa-1B-glikoprotein (Slika 23A i B). Uz navedene, uzorak AEX1 bio je onečišćen i transferinom te beta-2-glikoproteinom 1 (Slika 23B). Protein sličan alfa-2-makroglobulinu i hemopeksin rezidualni su proteini detektirani u uzorku pročišćenom protokolom CEX (CEX1) (Slika 23C). IgG-i iz postupka CAP, osim albuminom, bili su onečišćeni alfa-1B-glikoproteinom (Slika 23D). Dodatnim korakom pročišćavanja CA taloženjem uklonjena je većina nečistoća u svim IgG frakcijama, osim alfa-1B-glikoproteina koji se zadržao u uzorcima pročišćenima metodama ASP (ASP2) (Slika 23A) i AEX (AEX2) (Slika 23B).





**Slika 23.** Identifikacija proteina MALDI-TOF/TOF-MS analizom u IgG uzorcima pročišćenima taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) (A), kromatografijom izmjene aniona (AEX) (B), kromatografijom izmjene kationa (CEX) (C), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) (D) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) (D). Proteinske pruge dobivene su razdvajanjem molekula SDS-PAGE-om u nereducirajućim uvjetima. Uzorci označeni brojem "2" dodatno su pročišćeni taloženjem kaprilnom kiselinom. Uzorak označen s "\*" identificiran je samo PMF metodom. Standard je označen kraticom STD.

**Tablica 9.** Proteini identificirani MS/MS analizom u IgG uzorcima pročišćenima taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC).

Pruga	<i>m/z</i> (ion [M+H] <sup>+</sup> )	Protein	Kod proteina	Broj podudarnih spektara	Sekvenca peptida
ASP1	1775.98	IgG5, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86340.1	82	R.VPQVYVLAPHPDELAK.N
		IgG5, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86340.1		
		IgG4, teški lanac, parcijalno	AAS18415.1		
	1806.04	IgG2, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44761.1	54	R.VVSVLPIQHQDWLSGK.E
		IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44762.1		
	1992.98	glikoprotein bogat histidinom	XP_023479252.1	67	K.DSPVLFDFFEDTELYR.Q
	2048.99	alfa-1B-glikoprotein	XP_023507318.1	105	R.VSFHLDALAPGDGGLYTCR.Y
2854.40	105			R.REGDDQFLEVAEAPEDVVVTFPVHR.A	
2319.18	prekursor albumina	NP_001075972.1	105	K.LPESERLPCSENHLALALNR.L	
ASP2	2335.12	IgA, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	AAP80145.1	62	R.LSGKPTHVNVSVVMAEADGTCY
	2642.18	IgG5, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86340.1	109	K.DFYPPEIDVEWQSNEHPEPEGK.Y

Tablica 9. - nastavak

	1541.73	IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44762.1	63	K.DFYPTDIDIEWK.S
		IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1		
	2642.20	IgG5, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86340.1	123	K.DFYYPEIDVEWQSNEHPEPEGK.Y
	1763.87	IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44762.1	98	K.SQTYICNVAHPASSTK.V
		IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1		
		IgG6, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86341.1.1		
	2646.22	IgG5, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86340.1	80	K.DFYYPEIDVEWQSNEHPEPEGK.Y
	2048.99			63	R.VSFHLDALAPGDGGLYTCR.Y
	2698.32	alfa-1B-glikoprotein	XP_023507318.1	155	R.EGDDQFLEVAEAPEDVVVTFPVHR.A
	2747.46			105	R.THAAGDPSGPSAPVTIEELAAPPPVLR.V
AEX1	1541.73	IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44762.1	84	K.DFYPTDIDIEWK.S
		IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1		

Tablica 9. - nastavak

2143.01	IgG5, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86340.1	110	K.YSTTPAQLNSDGSYFLYSK.L
	IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijano	CAC44762.1		
	IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1		
1994.83	prekursor serotransferina	NP_001075415.2	78	K.CACSNHEPYFGYSGAFK.C
2686.32	transferin, parcijalno	AAF05482.1	79	K.HSTVLENLPQEADRDEYQLLCR.D
2714.37			94	R.SVDGKEDLIWGLLNQAQEHFGTEK.S
1097.50	prekursor serotransferina	NP_001075415.2	58	R.YYGYTGAFR.C
2301.10	transferin, parcijalno	AAC78365.1	101	K.AVTEFESCNLAEAPNHAVVSR.K
1178.56	glikoprotein bogat histidinom	XP_023479252.1	63	R.HFGHPFHSGR.H
1992.92			157	K.DSPVLFDFEFDETELYR.Q
2698.33	alfa-1B-glikoprotein	XP_023507318.1	149	R.EGDDQFLEVAEAPEDVVVTFPVHR.A
1932.05	prekursor albumina	NP_001075972.1	60	K.SLHTLFGDKLCTVATLR.A
2319.29			62	K.LPESERLPCSENHLALALNR.L
2431.15			124	K.NCDLFEEVGEYDFQNALIVR.Y
2291.08	beta-2-glikoprotein 1	XP_001499728.2	59	K.TSYVPGEEIVYSCQPGYVSR.G

Tablica 9. - nastavak

AEX2	1763.82	IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijano	CAC44762.1	100	K.SQTYICNVAHPASSTK.V
		IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1		
		IgG6, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86341.1		
	1794.02	IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1	84	R.VVSILAIQHKDWLSGK.E
1805.98		IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijano	CAC44762.1	72	R.VVSVLPIQHKDWLSGK.E
		IgG2, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44761.1		
		IgG5, konstantne regije teškog lanca, parcijalno	CAC86340.1		
CEX1	3049.59	predviđeno: protein sličan alfa-2-makroglobulinu	XP_008534363.1	83	R.EVLESLTEEA VKEDNSVHWTRPQKPK.A
	1654.89	predviđeno: protein sličan alfa-2-makroglobulinu	XP_008534363.1	88	R.AEHPFIVEEFVLPK.F
	1828.91			108	K.QLTFPLSSEPFQGSYK.V
	2518.08			160	K.VYDYYETDEFAIAEYNAPCGK.D
	3049.58			98	R.EVLESLTEEA VKEDNSVHWTRPQKPK.A

Tablica 9. - nastavak

	2037.07	IgG1, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44624.1	63	R.SQEPQVYVLAPHPDELSK.S
	2920.40	IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	AAS18414.1	64	K.ECGGCPTCPECLSVGPSVFIFPPKPK.D
	1914.03	hemopeksin	XP_005612174.1	91	R.FNPVSGEVPPKYPLDVR.D
	2752.37			111	K.SGAAATWTELPWPHEKVDGALCVEK.S
	2319.15	prekursor albumina	NP_001075972.1	76	K.LPESERLPCSENLALALNR.L
	2431.09			178	K.NCDLFEEVGEYDFQNALIVR.Y
	2559.19			175	K.K NCDLFEEVGEYDFQNALIVR.Y
CEX2	1763.83	IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijano	CAC44762.1	82	K.SQTYICNVAHPASSTK.V
		IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1		
		IgG6, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86341.1		
CAP	1804.61	IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijano	CAC44762.1	56	R.TISKPTGQPR.E
		IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1		K.TISKPTGQPR.E

Tablica 9. - nastavak

	1763.84	IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijano	CAC44762.1	85	K.SQTYICNVAHPASSTK.V
		IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1		
		IgG6, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86341.1		
	2037.04	IgG1, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44624.1	61	R.SQEPQVYVLAPHPDELSK.S
	1114.61	alfa-1B-glikoprotein	XP_023507318.1	76	R.ALWSGAVTPGR.D
	1877.99			84	R.HWADLVLSYVGPQHAGK.Y
	1935.14			59	R.VQEASAQVLRPGVSLRPK.C
	2747.47			194	R.THAAGDPSGPSAPVTIEELAAPPPVLR.V
	3035.55			107	K.DGVAQEPVQVGSPTIEHQFPLGAVTSDT R.G
	2431.15	prekursor albumina	NP_001075972.1	89	K.NCDLFEEVGEYDFQNALIVR.Y
	2504.24	albumin, parcijalno	AAG40944.1	106	K.LKPEPDAQCAAFQEDPKFLGK.Y
	2504.24	prekursor albumina	NP_001075972.1	105	K.LKPEPDAQCAAFQEDPKFLGK.Y
AC	1378.75	IgG1, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44624.1	60	K.VNNQALPQPIER.T
	1615.83			83	R.IQHQDWLSGKEFK.C
	2188.96			161	K.YSTTQAQQSDGSYFLYSK.L
	1775.97	IgG5, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC86340.1	88	R.VPQVYVLAPHPDELAK.N

Tablica 9. - nastavak

1378.77	IgG1, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44624.1	69	K.VNNQALPQPIER.T
1615.85			74	R.IQHQDWLSGKEFK.C
2037.07			94	R.SQEPQVYVLAPHPDELSK.S
2189.00			129	K.YSTTQAQQSDGSYFLYSK.L
1378.76	IgG1, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44624.1	58	K.VNNQALPQPIER.T
1615.85			72	R.IQHQDWLSGKEFK.C
2037.06			92	R.SQEPQVYVLAPHPDELSK.S
1541.72	IgG4, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44762.1	75	K.DFYPTDIDIEWK.S
	IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44763.1	75	K.DFYPTDIDIEWK.S
1880.99	IgG7 teški lanac, parcijalno	AAS18414.1	61	R.EPQVYVLAPHRDELSK.N
	IgG4 teški lanac, parcijalno	AAS18415.1	61	R.EPQVYVLAPHRDELSK.N
2037.03	IgG7, konstantna regija teškog lanca, parcijalno	CAC44624.1	65	R.SQEPQVYVLAPHPDELSK.S

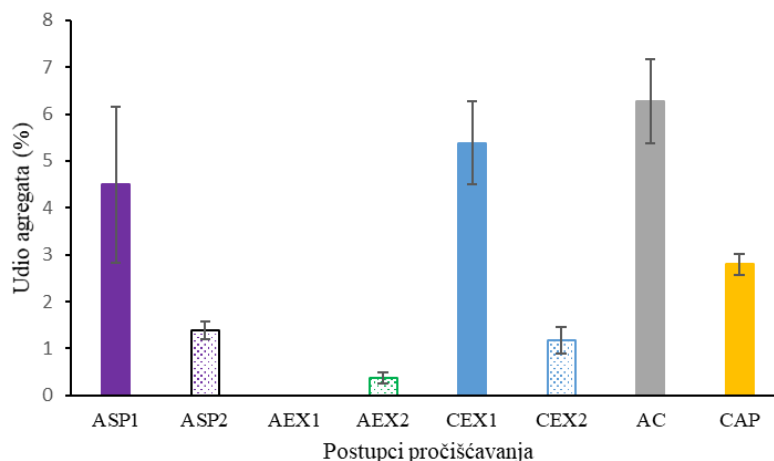


#### 4.2.1.2. Udio agregata u pročišćenim IgG uzorcima

IgG-i izolirani iz HKP-a različitim postupcima razlikovali su se po udjelu agregata (Tablica 10, Slika 24). Uzorak dobiven kromatografijom izmjene aniona (AEX1) jedini je u potpunosti bio bez agregata. Nasuprot tome, najveći postotak agregata sadržavao je uzorak pročišćen afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) (6,3%), zatim slijedom uzorci dobiveni postupkom CEX (CEX1) (5,4%) i taloženjem amonijevim sulfatom (ASP1) (4,5%) te na kraju IgG-i iz postupka CAP (2,8%). Nakon dodatnog koraka taloženja s CA uklonjena je značajna količina agregata iz preparata ASP1 i CEX1. Njihovi visokopročišćeni produkti (ASP2 i CEX2) sadržavali su manje od 1,5% udjela polimera.

**Tablica 10.** Udio agregata u IgG uzorcima pročišćenima taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). Uzorci označeni brojem "2" dodatno su pročišćeni taloženjem kaprilnom kiselinom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška.

Postupak pročišćavanja	Udio agregata (%)
ASP1	4,5 $\pm$ 1,7 ( $n = 3$ )
ASP2	1,4 $\pm$ 0,2 ( $n = 4$ )
AEX1	0,0 $\pm$ 0,0 ( $n = 3$ )
AEX2	0,4 $\pm$ 0,2 ( $n = 4$ )
CEX1	5,4 $\pm$ 0,9 ( $n = 3$ )
CEX2	1,2 $\pm$ 0,3 ( $n = 4$ )
AC	6,3 $\pm$ 0,9 ( $n = 9$ )
CAP	2,8 $\pm$ 0,2 ( $n = 9$ )

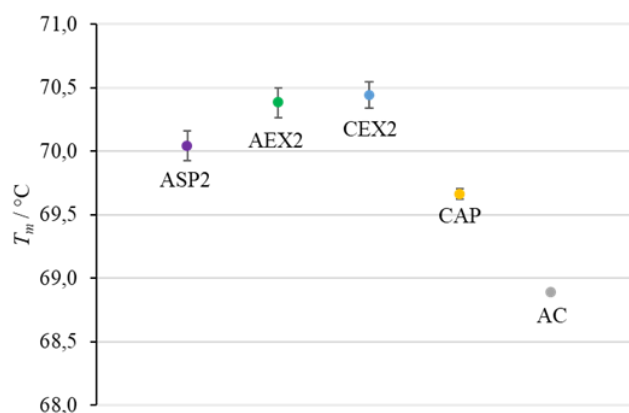


**Slika 24.** Udio agregata u IgG uzorcima pročišćenima taloženjem amonijevim sulfatom (AS), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CA) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). Uzorci označeni brojem "2" dodatno su pročišćeni taloženjem kaprilnom kiselinom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja (Tablica 10)  $\pm$  standardna pogreška.

#### 4.2.2. STABILNOST IgG-a U OVISNOSTI O TEMPERATURI

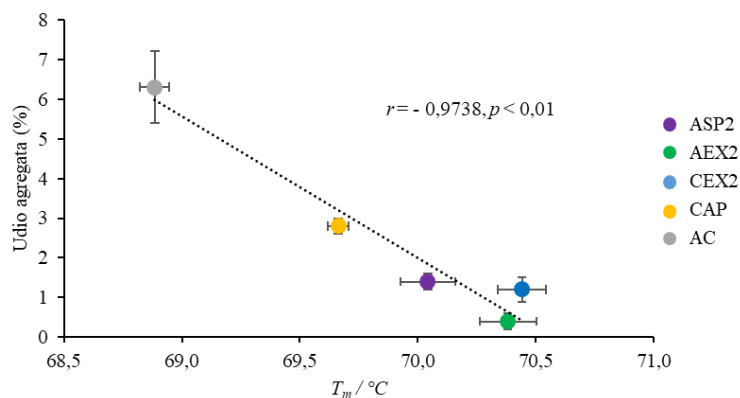
Termičku stabilnost visoko pročišćenih IgG-a izrazila sam temperaturom mekšanja  $T_m$  ( $T_m$ , engl. *melting temperature*) koju sam mjerila metodom diferencijalne pretražne fluorimetrije (DSF, engl. *differential scanning fluorimetry*). Ovim postupkom, uz postupno povećanje temperature, dolazi do denaturacije proteina i izlaganja njihovih hidrofobnih regija otopini na koje se zatim veže fluorescentna boja. Iz prikaza ovisnosti intenziteta fluorescencije o temperaturi dobila sam sigmoidnu krivulju čija točka infleksije odgovara temperaturi  $T_m$  pri kojoj se 50% proteina nalazi u denaturiranom obliku. Budući da nečistoće u IgG preparatima mogu interferirati s dobivenim rezultatima izuzetno je važno da analizirani uzorci budu što čišći. U samo jednom koraku taloženjem neimunoglobulinskih proteina s CA i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A dobila sam pripravke zadovoljavajuće kvalitete koji su sadržavali više od 90% IgG monomera (Tablica 8). Postupcima ASP, AEX i CEX čistoća dobivenih uzoraka kretala se u rasponu od 72-81%. Stoga sam ih za potrebe DSF analize dodatno pročistila dodatkom CA različitih koncentracija, prethodno određenih tijekom optimizacije parametara svake pojedine metode. Na taj način, dobila sam pripravke zadovoljavajućeg stupnja čistoće u kojima je udio IgG monomera bio iznad 90% (Tablica 8). Rezultati su pokazali da je većina IgG pripravaka podjednako termički stabilna s izmjerenom

vrijednošću  $T_m$  od oko 70 °C (Slika 25). Iznimku je činio uzorak izoliran postupkom AC kojem je vrijednost  $T_m$  bila za otprilike 1,5 °C niža u odnosu na ostale.



**Slika 25.** Stabilnost visokopročišćenih IgG-a ( $m = 25 \mu\text{g}$ ) izražena temperaturom  $T_m$  u uzorcima ASP2 ( $n = 15$ ), AEX2 ( $n = 16$ ), CEX2 ( $n = 19$ ), CAP ( $n = 37$ ) i AC ( $n = 38$ ) određena DSF analizom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška.

Između udjela agregata u IgG pripravcima i njihove termičke stabilnosti utvrdila sam statistički značajnu negativnu korelaciju ( $p < 0,01$ ) (Slika 26).



**Slika 26.** Korelacija između udjela agregata u IgG uzorcima pročišćenima taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) te afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) i njihove termičke stabilnosti. Rezultati udjela agregata i vrijednosti  $T_m$  izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Korelacija je izražena kao  $r$  vrijednost izračunata korištenjem programskog alata Statistica 13.5 (StatSoft, TIBCO Software Inc., SAD). Mjerna nesigurnost je dana u obliku 99%-tnog intervala pouzdanosti.

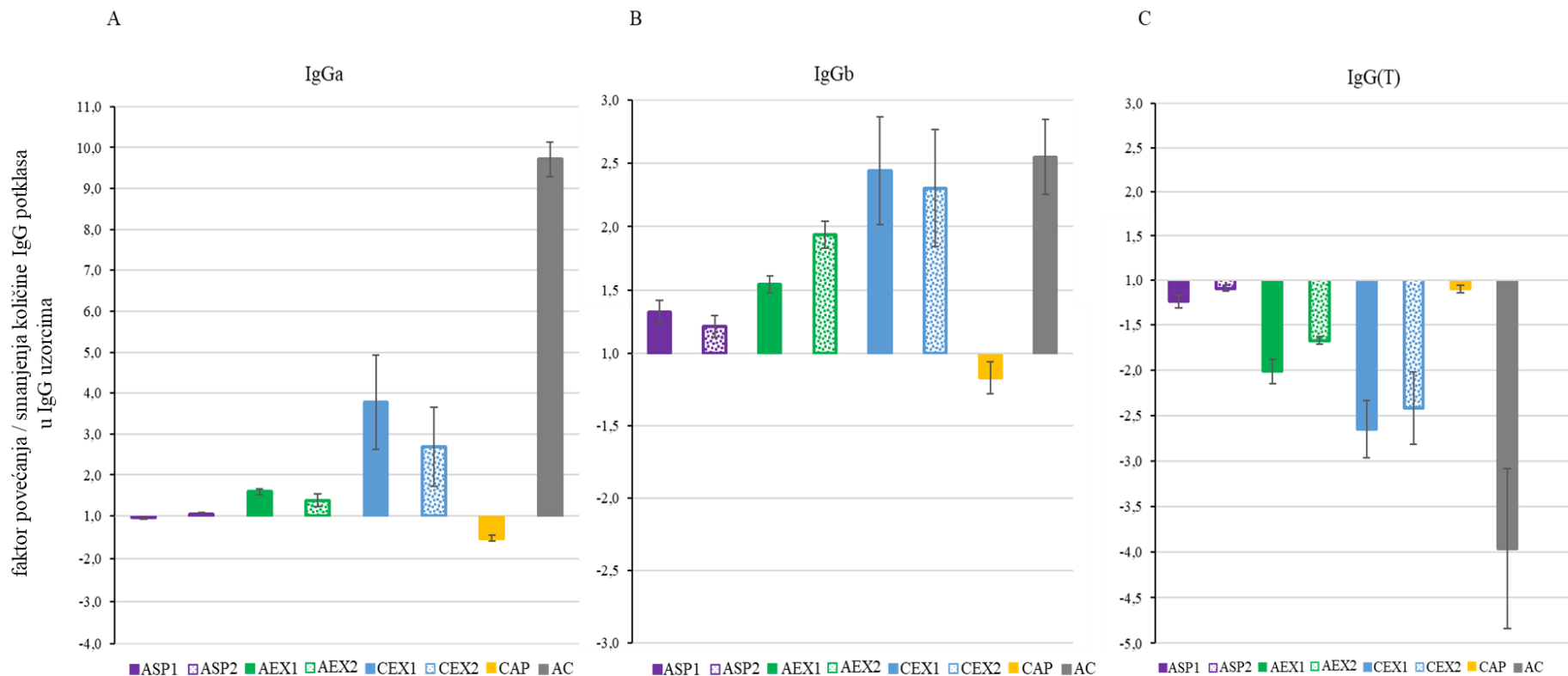
#### 4.2.3. RASPODJELA IgGa, IgGb I IgG(T) POTKLASA U IgG UZORCIMA

Utjecaj različitih metoda pročišćavanja na sastav i distribuciju IgGa, IgGb i IgG(T) potklasa u IgG uzorcima pratila sam ELISA testovima specifičnima za svaku pojedinu potklasu. Ovom metodom određivala sam masu IgG-a koja daje vrijednost apsorbancije 1,0 pri valnoj duljini od 492 nm. Uspoređivanjem rezultata s vrijednostima dobivenima za početni uzorak HKP-a mogla sam zaključiti dolazi li do promjene distribucije potklasa i u kojem smjeru. Naime, povećanje mase potrebne da bi se dosegla vrijednost apsorbancije 1,0 ukazivalo je na gubitak, dok je smanjenje iste upućivalo na obogaćenje uzorka pojedinom IgG potklasom (Tablica 11).

Budući da su potklase u plazmi zastupljene u bitno različitim količinama, zbog čega ih je nepregledno grafički prikazati na istoj skali, rezultate sam izrazila kao faktor povećanja ili smanjenja njihove količine u odnosu na HKP. Usporedbom dobivenih vrijednosti uočila sam da ispitani postupci različitim intenzitetom utječu na sastav potklasa konačnih uzoraka u smislu njihovog obogaćenja ili osiromašenja (Slika 27). Afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A (AC) pokazala se kao metoda koja daje produkt s najvećim odstupanjima, uzrokujući njegovo naglašeno obogaćenje IgGa i umjereno obogaćenje IgGb potklasom. Isti postupak je doveo do iznimnog gubitka IgG(T) potklase. Obje ionsko-izmjenjivačke kromatografije (CEX i AEX) pokazale su sličnu tendenciju narušavanja raspodjele potklasa, premda u manjoj mjeri. U uzorcima CEX1 i AEX1 zamijetila sam umjeren gubitak IgG(T), umjeren porast IgGb te blagi porast IgGa potklase. Preostale dvije metode izolacije (ASP i CAP) nisu bitno utjecale na relativnu distribuciju potklasa u konačnim preparacijama (ASP1 i CAP). U svim visokopročišćenim produktima, dobivenima dodatnim korakom taloženjem s CA (ASP2, AEX2 i CEX2), primijetila sam neznatno smanjenje količine ispitivanih potklasa u odnosu na njihove manje čiste uzorke (ASP1, AEX1, CEX1) iz prethodne faze procesiranja. Izuzetak je uzorak AEX2 kod kojeg je došlo do blagog obogaćenja IgGb potklasom.

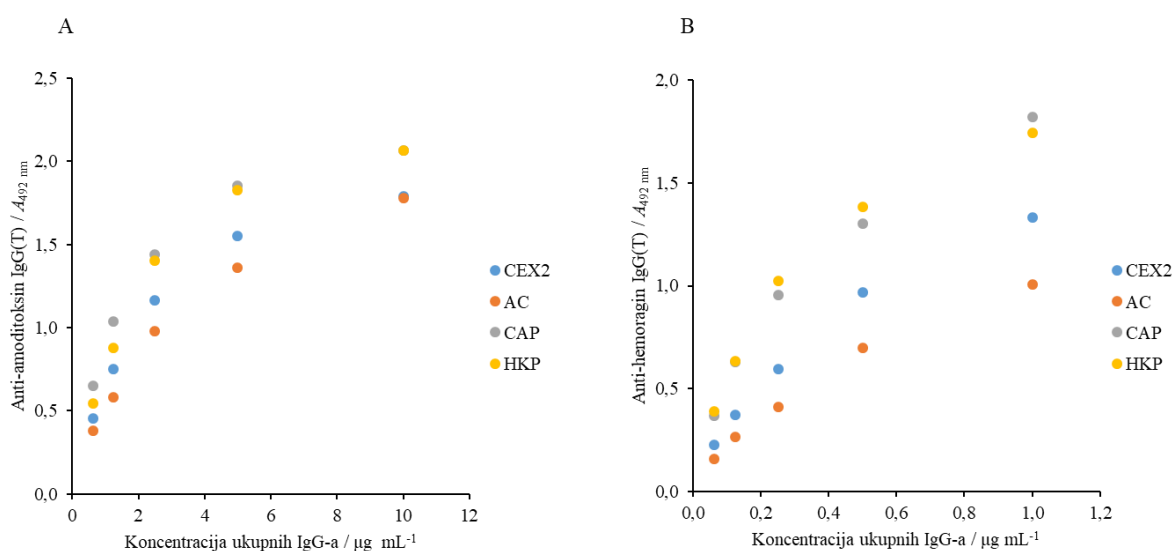
**Tablica 11.** Masa IgG-a u hiperimunoj konjskoj plazmi (HKP) i uzorcima pročišćenima taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene katina (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (CA) u bazenčiću mikrotitracijske pločice (100  $\mu$ L) potrebna za postizanje vrijednosti apsorbancije 1,0 pri valnoj duljini od 492 nm u ELISA testovima specifičnima za IgGa, IgGb odnosno IgG(T) potklasu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška.

Uzorak	IgGa $\mu\text{g} / 100 \mu\text{L}^{-1}$	IgGb $\mu\text{g} / 100 \mu\text{L}^{-1}$	IgG(T) $\text{ng} / 100 \mu\text{L}^{-1}$
ASP1	$1,20 \pm 0,06$ ( $n = 3$ )	$0,40 \pm 0,12$ ( $n = 5$ )	$13,30 \pm 1,94$ ( $n = 5$ )
ASP2	$1,24 \pm 0,08$ ( $n = 3$ )	$0,50 \pm 0,22$ ( $n = 4$ )	$10,60 \pm 1,10$ ( $n = 4$ )
AEX1	$0,85 \pm 0,05$ ( $n = 3$ )	$0,35 \pm 0,10$ ( $n = 5$ )	$18,52 \pm 2,69$ ( $n = 5$ )
AEX2	$0,95 \pm 0,11$ ( $n = 3$ )	$0,28 \pm 0,11$ ( $n = 4$ )	$15,94 \pm 2,35$ ( $n = 4$ )
CEX1	$0,90 \pm 0,04$ ( $n = 4$ )	$0,20 \pm 0,04$ ( $n = 5$ )	$24,56 \pm 1,14$ ( $n = 5$ )
CEX2	$1,01 \pm 0,12$ ( $n = 4$ )	$0,21 \pm 0,06$ ( $n = 4$ )	$21,27 \pm 0,91$ ( $n = 3$ )
CAP	$1,93 \pm 0,11$ ( $n = 4$ )	$0,71 \pm 0,32$ ( $n = 4$ )	$11,62 \pm 1,62$ ( $n = 4$ )
AC	$0,13 \pm 0,01$ ( $n = 4$ )	$0,20 \pm 0,07$ ( $n = 4$ )	$31,47 \pm 1,79$ ( $n = 3$ )
HKP	$1,26 \pm 0,04$ ( $n = 10$ )	$0,55 \pm 0,17$ ( $n = 5$ )	$9,94 \pm 1,36$ ( $n = 5$ )



**Slika 27.** Promjene udjela IgGa (A), IgGb (B) i IgG(T) (C) potklasa u IgG uzorcima nakon pročišćavanja taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). Svaki stupac predstavlja faktor povećanja (obogaćenja) ili smanjenja (osiromašenja) pojedine potklase u odnosu na količinu iste prisutne u hiperimunoj konjskoj plazmi (HKP). Vrijednost faktora obrnuto je proporcionalna faktoru za koji se količina IgG-a u ELISA testu mora povećati ili smanjiti kako bi dosegla apsorbanciju 1,0 pri valnoj duljini od 492 nm. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje 3 mjerenja ± standardna pogreška.

Gubitak IgG(T) potklase u uzorcima pročišćenima postupcima AC i CEX, u kojima je bio najizraženiji, provjerila sam ELISA testom za određivanje IgG(T) antitijela specifičnih za amoditoksine (Atx) i hemoragine (H), dvije najznačajnije skupine toksičnih komponenti *Vaa* otrova odgovorne za patofiziološke manifestacije otrovanja (Slika 28). Usporedbe radi, osim HKP-a kao referentnog uzorka, ispitala sam također i IgG preparat dobiven postupkom CAP u kojem je gubitak IgG(T) antitijela bio zanemariv (Slika 27C). Uzorke sam prvo razrijedila na istu početnu koncentraciju, koja je za određivanje anti-Atx IgG(T)-a iznosila  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a za određivanje anti-H IgG(T)-a  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , te ih potom dalje razrijedila binarno serijski u mikrotitracijskoj pločici. Rezultati koje sam dobila potvrdili su da je, u usporedbi s HKP-om i IgG preparatom dobivenim postupkom CAP, u AC i CEX2 uzorcima došlo do gubitka IgG(T) antitijela specifičnih i za Atx (Slika 28A) i za H frakciju venoma (Slika 28B), s obzirom da sam prilikom njihove analize manjak ispitivane potklase s ciljem postizanja konsenzusne vrijednosti apsorbancije morala nadomjestiti većom koncentracijom ukupnih IgG-a nanešenih po bazenčiću mikrotitracijske pločice (Tablica 12).



**Slika 28.** Imunoglobulini IgG(T) potklase specifični za amoditoksine (Atx) i hemoragine (H) u pročišćenim IgG uzorcima određeni ELISA testom. Atx- (A) i H-specifična IgG(T) antitijela (B) određena su u uzorcima dobivenima afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranom proteina A (AC), kromatografijom izmjene kationa (CEX2) i taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) te uspoređena s hiperimunom konjskom plazmom (HKP). Mikrotitracijske pločice obložene s Atx-om i H-om inkubirane su s IgG pripravcima i HKP-om podešenima na istu koncentraciju ukupnih IgG-a. Anti-Atx i anti-H IgG(T)-i vizualizirani su dodatkom anti-IgG(T) antitijela konjugiranih s HRP-om.

**Tablica 12.** Koncentracije ukupnih IgG-a u konačnim uzorcima dobivenima kromatografijom izmjene kationa (CEX), afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) i taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) te hiperimunnoj konjskoj plazmi (HKP) koje daju vrijednost apsorbancije 1,0 pri valnoj duljini od 492 nm u ELISA testu za određivanje IgG(T) potklasa specifičnih za amoditoksine (Atx) i hemoragine (H).

uzorak	Koncentracija ukupnih IgG-a / $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	Atx	H
CEX2	1,94	0,52
AC	3,08	0,98
CAP	1,48	0,30
HKP	1,47	0,24

#### 4.2.4. NEUTRALIZACIJA LETALNE TOKSIČNOSTI *Vaa* OTROVA

Nakon što sam potvrdila da postupci izolacije IgG-a u dobivenim preparatima mijenjaju sastav potklasa različitim intenzitetom, u nastavku istraživanja ispitivala sam da li takve promjene utječu na njihovu sposobnost neutralizacije letalne toksičnosti *Vaa* otrova *in vivo*. Test sam provela na miševima. Kako bih broj žrtvovanih životinja svela na najmanju moguću mjeru, testirala sam ograničeni broj uzoraka odabranih prema kriteriju najvećeg ili najmanjeg pomaka distribucije IgG potklasa u odnosu na HKP kao početni uzorak. IgG pripravke dobivene afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranom proteina A (AC) i kromatografijom izmjene kationa (CEX2) uvrstila sam u analizu zbog najveće promjene u sastavu IgG potklasa, dok sam uzorak dobiven taloženjem neimunoglobulinskih proteina s CA (CAP) odabrala zbog minimalnog odstupanja od originalnog omjera IgG potklasa. Budući da je uzorak CEX1 imao nisku čistoću (73%), neutralizacijsku sposobnost sam ispitala koristeći njegovu visokopročišćenu varijantu (CEX2) u kojoj je udio IgG-a iznosio 98% (Tablica 8). Uzorci AC i CAP imali su zadovoljavajuću čistoću (iznad 90%). Rezultati su pokazali da u postupku taloženja s CA IgG-i nisu izgubili neutralizacijsku učinkovitost. Naime, vrijednost specifične aktivnosti uzorka CAP ( $\text{LD}_{50} / \text{mg} = 1,07$ ) bila je podudarna s onom HKP-a ( $\text{LD}_{50} / \text{mg} = 1,03$ ). Nasuprot tome, IgG-i preostala dva ispitana uzorka pokazali su reduciranu neutralizacijsku moć. U odnosu na plazmu, vrijednost specifične aktivnosti uzorka CEX2 bila je upola manja ( $\text{LD}_{50} / \text{mg} = 0,45$ ), a preparata AC čak i više ( $\text{LD}_{50} / \text{mg} < 0,41$ ) (Tablica 13).



**Tablica 13.** *In vivo* učinkovitost hiperimune konjske plazme (HKP), visokopročišćenog preparata dobivenog kromatografijom izmjene kationa (CEX2) te uzoraka izoliranih afinitenom kromatografijom pomoću imobiliziranom proteina A (AC), odnosno taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) izražena kao broj LD<sub>50</sub> doza otrova koje neutraliziraju 1 mL nerazrijeđenog uzorka (*R*) te njihova specifična aktivnost [*R* /  $\gamma$ (IgG)]. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost iz pet neovisno izvedenih eksperimenata za HKP i dva neovisno izvedena eksperimenata za uzorke dobivene postupkom CEX i AC.

	HKP	CEX2	AC	CAP
<i>R</i> / LD <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup>	23,89 ( <i>n</i> = 5)	14,15 ( <i>n</i> = 2)	< 5,48 ( <i>n</i> = 2)	12,05 ( <i>n</i> = 1)
$\gamma$ (IgG) / mg mL <sup>-1</sup>	22,89	31,40	13,35	12,84
<i>R</i> / $\gamma$ (IgG)	1,03	0,45	< 0,41	1,07

### 4.3. UTJECAJ POSTUPAKA PROČIŠĆAVANJA NA STABILNOST IgG-a

U nastavku istraživanja ispitivala sam da li postupci pročišćavanja u kojima se IgG-i održavaju cijelo vrijeme u otopini (“blagi”) daju stabilnije pripravke u odnosu na one tijekom kojih dolazi do narušavanja njihove strukture uslijed izlaganja različitim nepovoljnim uvjetima (“agresivni”). “Blagi” uvjeti karakteristični su za CAP i AEX, a “agresivni” za ASP, CEX i AC postupke. Promjene u udjelu IgG monomera i agregata u uzorcima, kao i razlike u vrijednostima temperatura mekšanja IgG-a, pratila sam nizom stabilitetnih studija provedenih kako slijedi.

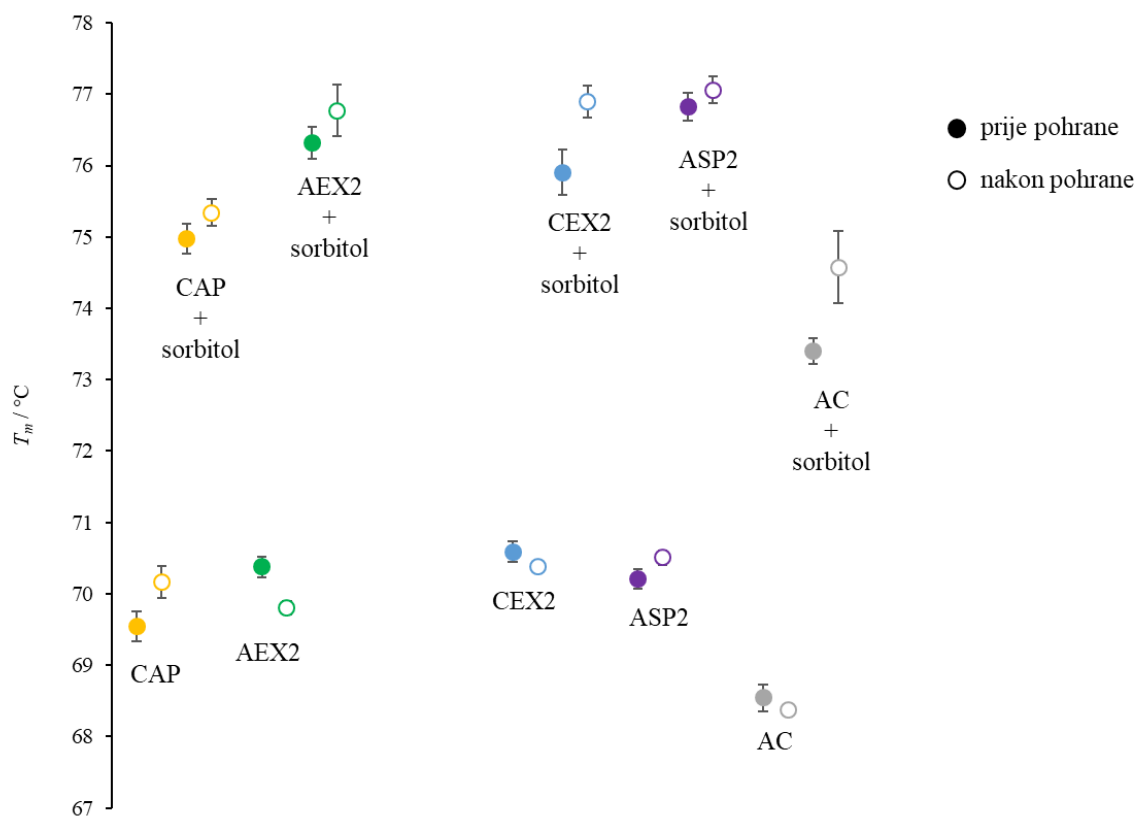
#### 4.3.1. UTJECAJ POHRANE TIJEKOM MJESEC DANA UZ ISPITIVANJE STABILIZIRAJUĆEG UČINKA SORBITOLA

U prvom pokusu, IgG pripravke izolirane pomoću pet opisanih metoda priredila sam u jednakoj koncentraciji ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i istom puferu ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer, pH = 6,0), sa ili bez dodatka sorbitola ( $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$ ) (Merck, SAD) kao stabilizatora, pohranila ih kroz mjesec dana na 37 °C te analizirala prije i nakon studije stabiliteta. Rezultati su pokazali da je u navedenim uvjetima kvaliteta visokopročišćenih uzoraka ostala očuvana. Jednomjesečnom pohranom udjeli IgG monomera i agregata nisu se bitno promijenili (Tablica 14), isto kao i  $T_m$  vrijednosti (Slika 29, Tablica 15).

**Tablica 14.** Udio IgG monomera i agregata u visokopročišćenim uzorcima dobivenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) prije i nakon pohrane na 37 °C tijekom mjesec dana određen SEC-HPLC analizom. Rezultati prije pohrane izraženi su kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška.

	Prije pohrane		Nakon pohrane	
	IgG monomeri (%)	Agregati (%)	IgG monomeri (%)	Agregati (%)
CAP	94,20 $\pm$ 3,06 ( $n = 2$ )	1,76 $\pm$ 0,32 ( $n = 2$ )	91,50	2,31
CAP + sorbitol			90,16	1,89
AEX2	98,03 $\pm$ 0,30 ( $n = 2$ )	0,30 $\pm$ 0,23 ( $n = 2$ )	98,31	0,00
AEX2 + sorbitol			98,59	0,00
CEX2	97,78 $\pm$ 0,91 ( $n = 2$ )	1,50 $\pm$ 0,03 ( $n = 2$ )	96,06	1,54
CEX2 + sorbitol			97,32	1,13
ASP2	97,62 $\pm$ 0,16 ( $n = 2$ )	1,09 $\pm$ 0,14 ( $n = 2$ )	96,17	1,56
ASP2 + sorbitol			96,70	1,54
AC	89,24 $\pm$ 0,49 ( $n = 2$ )	8,82 $\pm$ 0,05 ( $n = 2$ )	90,40	6,88
AC + sorbitol			92,81	5,26

Prije pohrane uzorci ASP2, AEX2, CEX2 i CAP imali su ujednačene  $T_m$  vrijednosti koje su se kretale oko 70 °C. Odstupanje sam izmjerila samo u onom pročišćenom afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) čija je  $T_m$  vrijednost bila za otprilike 1,5 °C niža. Dodatkom sorbitola povećala se termička stabilnost IgG-a u svim pripravcima. Naime, ovisno o primijenjenom postupku pročišćavanja, njihove vrijednosti  $T_m$  bile su za 5-7 °C više u odnosu na nestabilizirane uzorke. Nakon mjesec dana pohrane na 37 °C vrijednosti  $T_m$  bile su podudarne s onima izmjerenima na početku pokusa, neovisno o sorbitolu, što mi je bio pokazatelj da pohranom na povišenoj temperaturi nije došlo do narušavanja termičke stabilnosti IgG-a niti u jednom pripravku (Slika 29, Tablica 15).



**Slika 29.** Termička stabilnost visokopročišćenih IgG uzoraka ( $m = 25 \mu\text{g}$ ) dobivenih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) prije i nakon pohrane na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom mjesec dana. Tijekom studije stabilnosti po jedan alikvot svakog od navedenih pripravaka bio je stabiliziran sorbitolom ( $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Temperatura taljenja ( $T_m$ ) je određena DSF analizom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja svakog tipa uzorka (Tablica 15)  $\pm$  standardna pogreška.

**Tablica 15.** Vrijednosti  $T_m$  IgG-a u visokopročišćenim uzorcima izoliranih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) sa i bez dodatka sorbitola ( $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$ ), te prije i nakon pohrane na  $37 \text{ °C}$  tijekom mjesec dana. Analiza je provedena DSF-om. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška.

	$T_m / \text{°C}$	
	Prije pohrane	Nakon pohrane
CAP	$69,54 \pm 0,21 (n = 8)$	$70,17 \pm 0,23 (n = 10)$
CAP + sorbitol	$74,98 \pm 0,21 (n = 10)$	$75,34 \pm 0,19 (n = 9)$
AEX2	$70,38 \pm 0,15 (n = 10)$	$69,80 \pm 0,09 (n = 10)$
AEX2 + sorbitol	$76,32 \pm 0,22 (n = 9)$	$76,77 \pm 0,36 (n = 10)$
CEX2	$70,60 \pm 0,14 (n = 10)$	$70,39 \pm 0,07 (n = 10)$
CEX2 + sorbitol	$75,91 \pm 0,32 (n = 7)$	$76,89 \pm 0,22 (n = 10)$
ASP2	$70,21 \pm 0,14 (n = 10)$	$70,51 \pm 0,10 (n = 10)$
ASP2 + sorbitol	$76,82 \pm 0,20 (n = 9)$	$77,06 \pm 0,19 (n = 10)$
AC	$68,54 \pm 0,18 (n = 10)$	$68,37 \pm 0,05 (n = 10)$
AC + sorbitol	$73,40 \pm 0,18 (n = 10)$	$74,58 \pm 0,50 (n = 10)$

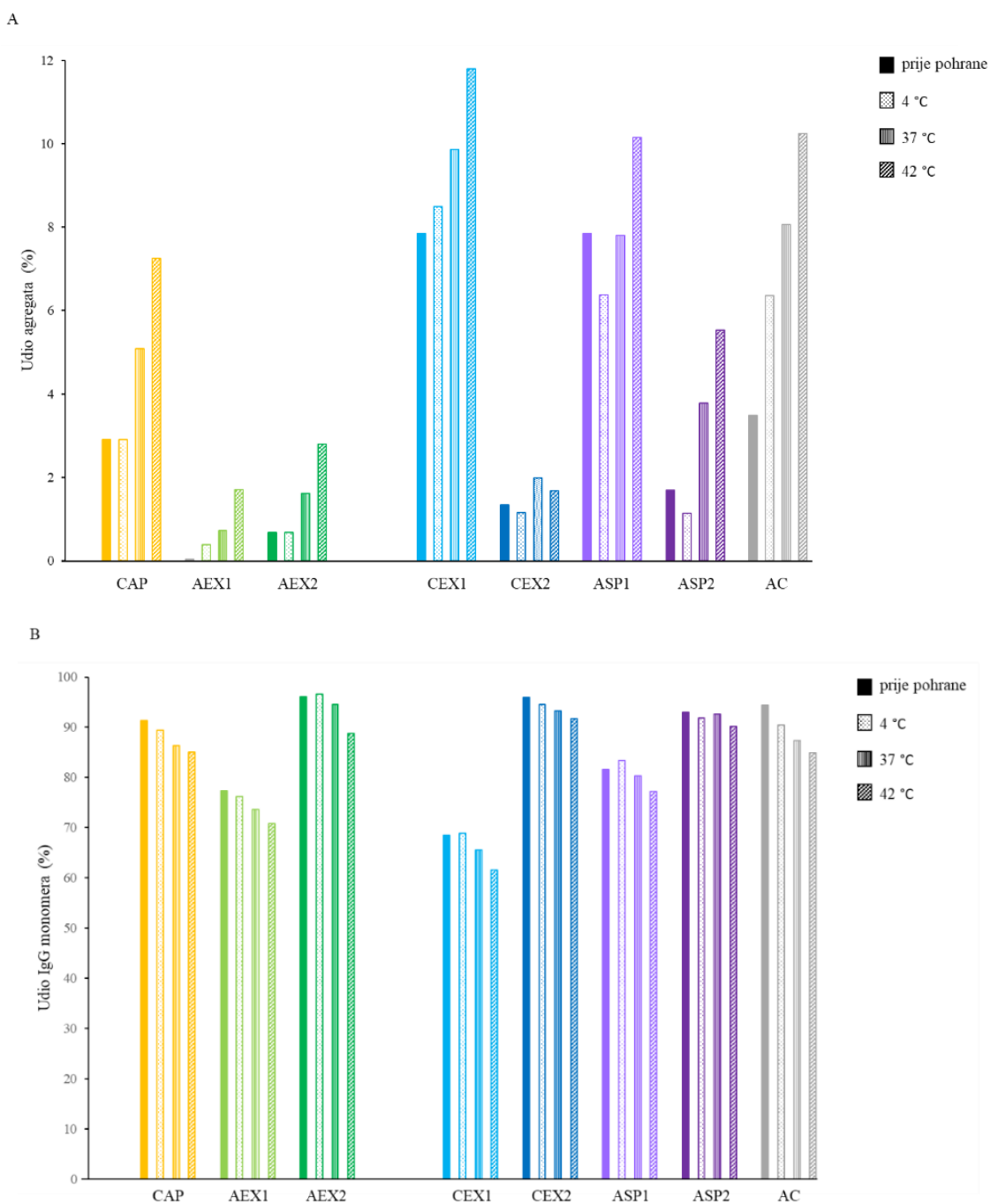
Zbog zamjetnog povećanja  $T_m$  vrijednosti IgG-a u uzorcima sa stabilizatorom u odnosu na one bez njega, očekivala sam da će formulacije bez sorbitola tijekom trajanja stabilitetne studije u većoj mjeri podlegnuti sve naglašenijem procesu agregacije. Međutim, udio agregata ostao je podjednak prije i nakon pohrane, neovisno o sorbitolu (Tablica 14), na osnovu čega sam zaključila da izloženost temperaturi od  $37 \text{ °C}$  tijekom mjesec dana za IgG-e ne predstavlja toliko nepovoljni okoliš da bi eventualne razlike u njihovoj stabilnosti i sklonosti agregaciji mogle doći do izražaja. Budući da uvjeti iz prvog pokusa nisu rezultirali bitnim razlikama u vrijednostima analiziranih parametara među uzorcima dobivenima različitim postupcima pročišćavanja, u sljedećem eksperimentu IgG-e sam podvrgnula nekolicini jačih stresnih uvjeta.

#### 4.3.2. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA POHRANE TIJEKOM 3 MJESECA

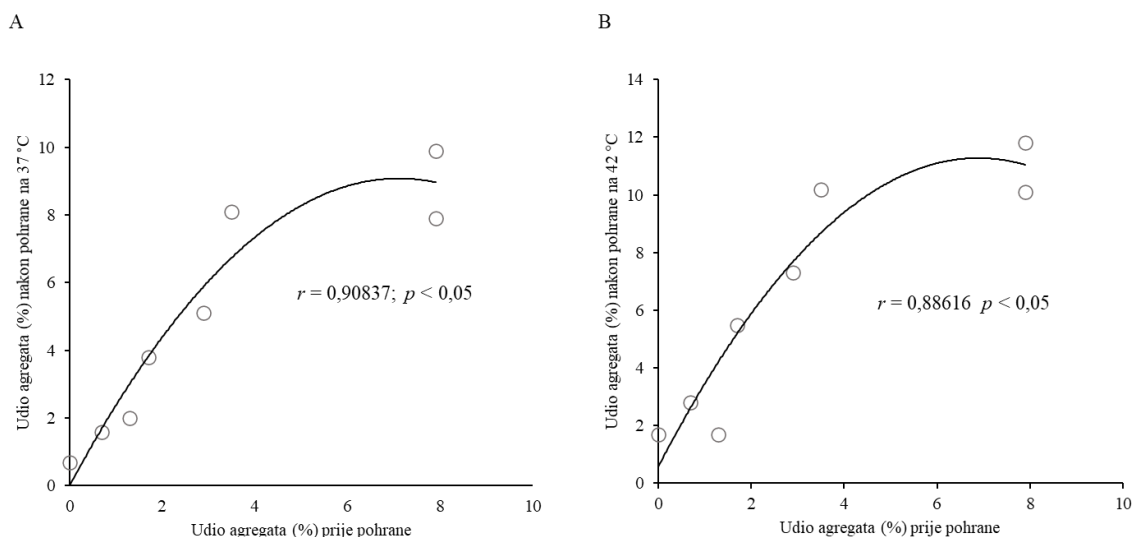
Kao i u prethodnom pokusu, IgG uzorke sam priredila u jednakoj koncentraciji ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i istom puferu ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer,  $\text{pH} = 6,0$ ). Vrijeme pohrane sam produžila na tri mjeseca, prateći stabilnost pri tri različite temperature:  $4$ ,  $37$  i  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ . Prema literaturnim podacima, kaprilat ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$ ) u formulacijama humanih IgG-a ne dovodi do precipitacije proteina, ali uzrokuje porast udjela agregata za oko  $17\%$ . Udio agregata se penje čak do  $30\%$  ukoliko je kaprilat u kombinaciji s NaCl-om (Sviben i sur., 2018). To je bio razlog zašto sam jedan set uzoraka priredila u otopini natrijevog kaprilata ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COONa}$ ) konačne koncentracije  $0,12 \text{ mol dm}^{-3}$  uz dodatak  $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl-a. Drugi, originalni set uzoraka ostavila sam u  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu ( $\text{pH} = 6,0$ ) te izložila izrazito kiselim uvjetima snižavanjem pH na vrijednost  $2,0$  pomoću  $6 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl-a. Nakon dvosatne inkubacije u kiselom mediju na sobnoj temperaturi, uzorcima sam vratila pH na početnu vrijednost ( $\text{pH} = 6,0$ ) sa  $6 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH. Oba seta uzoraka pohranila sam na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom narednih 90 dana.

##### 4.3.2.1. Utjecaj pohrane pri različitim temperaturama

Utjecaj različitih temperatura na udio IgG monomera, formiranje agregata i promjenu vrijednosti  $T_m$  IgG-a izoliranih metodama ASP, AEX, CEX, CAP i AC određivala sam prije i nakon pohrane tijekom 3 mjeseca na  $4$ ,  $37$  i  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ . Niža temperatura ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) nije imala značajniji učinak na udio IgG monomera i agregata, čije su vrijednosti uglavnom ostale nepromijenjene (Slika 30A i B). Suprotno tome, nakon pohrane na  $37$  i  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  uočila sam proporcionalno povećanje udjela agregata u svakom tipu IgG uzorka u odnosu na količinu prisutnu u onom početnom (Slika 30A, Slika 31A i B). S višim temperaturama također je povezano i smanjenje udjela monomera IgG-a (Slika 30B). Fenomen je najviše bio izražen kod pohrane uzorka AC na  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  nakon koje sam izmjerila najveći porast agregata od  $6,7\%$  (Slika 30A) te najveći gubitak IgG monomera od  $9,4\%$  (Slika 30B).

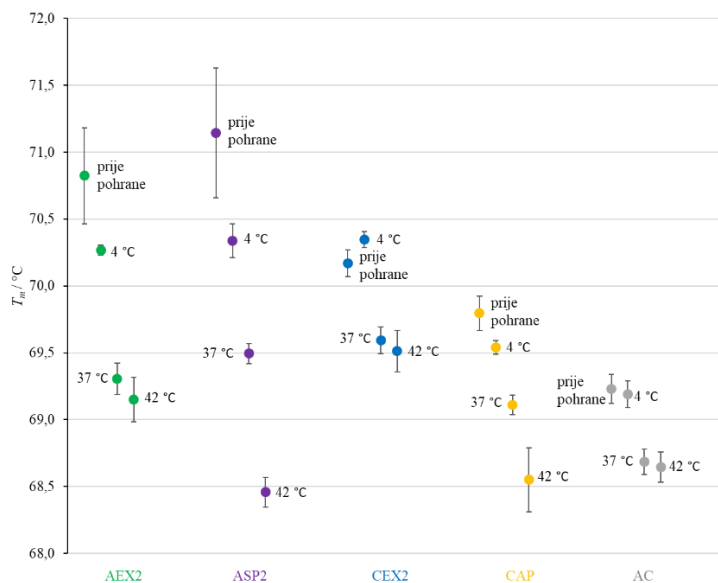


**Slika 30.** Udio agregata (A) i IgG monomera (B) u uzorcima ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) varijabilne čistoće izoliranih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) prikazan u ovisnosti o temperaturi pohrane (4, 37 i 42 °C) na početku i kraju stabilitetne studije u trajanju od 3 mjeseca.



**Slika 31.** Prikaz porasta udjela agregata u uzorcima varijabilne čistoće dobivenih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) nakon tri mjeseca pohrane na 37 °C (A) i 42 °C (B) u odnosu na udio istih određen prije pohrane. Korelacija između udjela agregata u uzorcima prije i nakon pohrane izražena je kao  $r$  vrijednost izračunata korištenjem programskog alata Statistica 13.5 (StatSoft, TIBCO Software Inc., SAD).

Nakon tri mjeseca pohrane pri 4 °C termička stabilnost svih IgG uzoraka ostala je gotovo nepromijenjena. Naime, izmjerene  $T_m$  vrijednosti bile su za manje od 1 °C niže u odnosu na one prije početka stabilitetne studije. Nasuprot tome, pohrana na 37 i 42 °C imala je negativan učinak na stabilnost IgG preparata što se očitovalo kao pad vrijednosti  $T_m$ -a svih uzoraka. Najveći sam izmjerila u uzorku ASP2 kojem se vrijednost  $T_m$  smanjila za 2,7 °C nakon tri mjeseca pri 42 °C (Slika 32, Tablica 16).



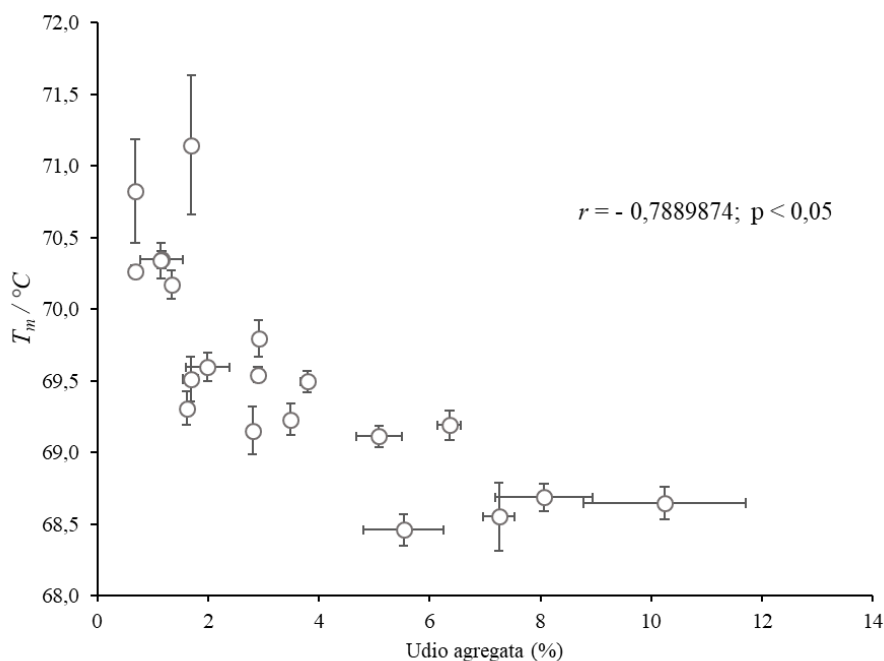
**Slika 32.** Termička stabilnost visokopročišćenih IgG-a ( $m = 25 \mu\text{g}$ ) izoliranih taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) u ovisnosti o temperaturi pohrane prije i nakon tri mjeseca na 4, 37 i 42 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja svakog tipa uzoraka (Tablica 16)  $\pm$  standardna pogreška.

**Tablica 16.** Termička stabilnost visokopročišćenih IgG-a određena DSF analizom prije i nakon 3 mjeseca pohrane na 4, 37 i 42 °C. Temperature  $T_m$  izražene su kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja svakog tipa uzoraka  $\pm$  standardna pogreška.

IgG frakcija	Temperatura $T_m$ (°C)			
	Prije pohrane	4 °C	37 °C	42 °C
AEX2	$70,82 \pm 0,36$ ( $n = 6$ )	$70,27 \pm 0,04$ ( $n = 10$ )	$69,31 \pm 0,12$ ( $n = 10$ )	$69,15 \pm 0,17$ ( $n = 10$ )
ASP2	$71,15 \pm 0,49$ ( $n = 10$ )	$70,34 \pm 0,13$ ( $n = 9$ )	$69,50 \pm 0,08$ ( $n = 10$ )	$68,46 \pm 0,11$ ( $n = 9$ )
CEX2	$70,17 \pm 0,10$ ( $n = 8$ )	$70,35 \pm 0,06$ ( $n = 11$ )	$69,60 \pm 0,10$ ( $n = 10$ )	$69,51 \pm 0,16$ ( $n = 9$ )
CAP	$69,80 \pm 0,13$ ( $n = 7$ )	$69,54 \pm 0,05$ ( $n = 9$ )	$69,11 \pm 0,07$ ( $n = 9$ )	$68,55 \pm 0,24$ ( $n = 8$ )
AC	$70,33 \pm 0,44$ ( $n = 9$ )	$69,19 \pm 0,10$ ( $n = 10$ )	$68,69 \pm 0,10$ ( $n = 10$ )	$68,65 \pm 0,11$ ( $n = 8$ )



Studijom pohrane u trajanju od 3 mjeseca, neovisno o temperaturi, potvrdila sam tendenciju negativne korelacije između udjela agregata i termičke stabilnosti IgG pripravaka (Slika 33).

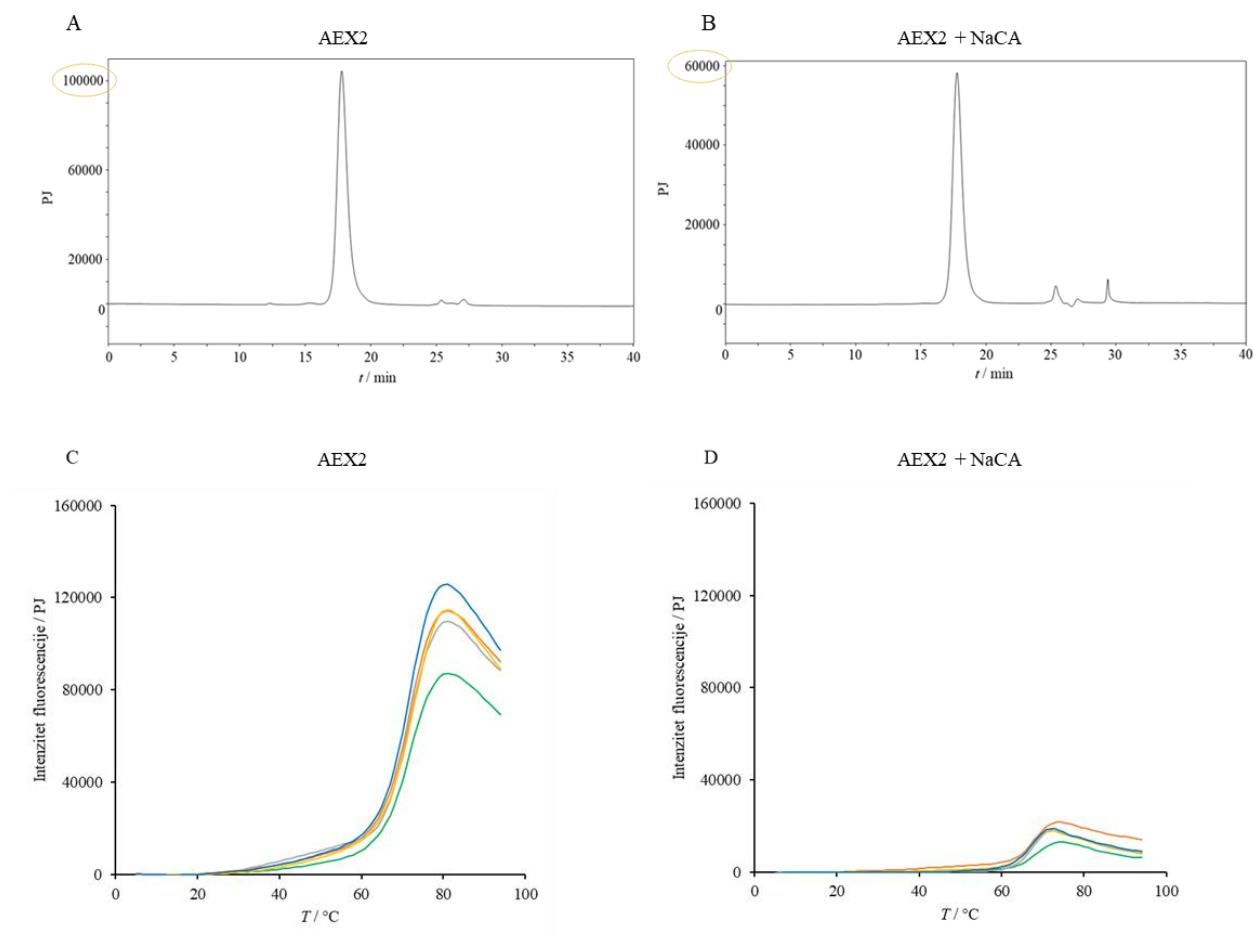


**Slika 33.** Negativna korelacija između termičke stabilnosti IgG-a izražene kao  $T_m$  vrijednost i udjela agregata u visokoprotišćenim uzorcima izoliranim taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) prije i nakon 3 mjeseca pohrane na 4, 37 i 42 °C. Rezultati vrijednosti  $T_m$ -a i udjela agregata izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Korelacija između udjela agregata i temperatura mekšanja prije i nakon pohrane izražena je kao  $r$  vrijednost izračunata korištenjem programskog alata Statistica 13.5 (StatSoft, TIBCO Software Inc., SAD). Mjerna nesigurnost je dana u obliku 95%-tnog intervala pouzdanosti.

#### 4.3.2.2. Utjecaj natrijevog kaprilata

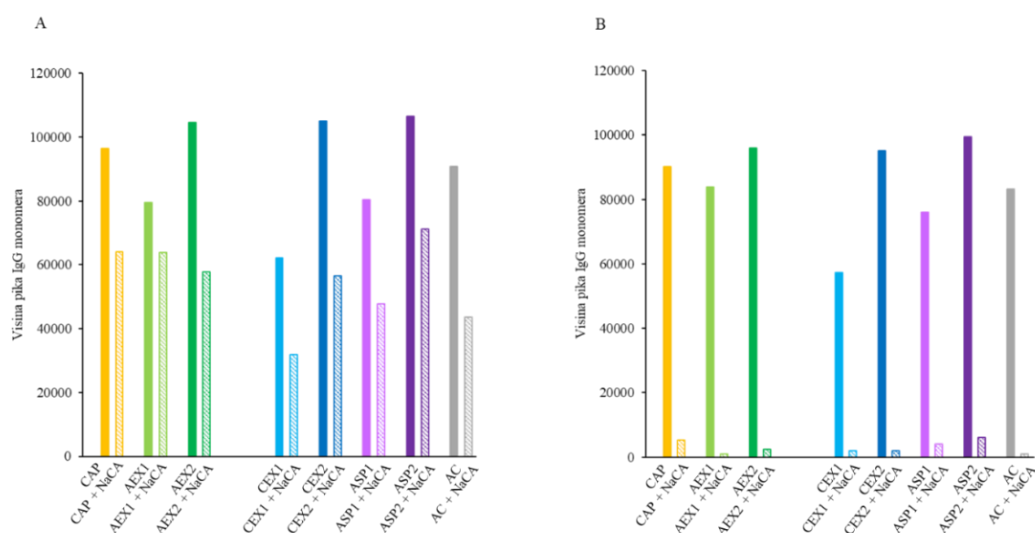
Kromatogrami dobiveni SEC-HPLC analizom uzoraka pripremljenih u natrijevom kaprilatu (NaCA) koncentracije 0,12 mol dm<sup>-3</sup> uz dodatak 0,25 mol dm<sup>-3</sup> NaCl-a pokazali su otprilike 40% niže vrijednosti maksimalne apsorbancije pikova koji po retencijskom vremenu odgovaraju IgG-ima (Slika 34B) u usporedbi s onima u 0,2 mol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu (pH =

6,0) (Slika 34A). Pored toga, zamijetila sam da rezultati DSF analize uzoraka tretiranih s NaCA daju sigmoidne krivulje bitno nižeg intenziteta fluorescencije (Slika 34C i D).



**Slika 34.** Primjer učinka natrijevog kaprilata na visokopročišćeni IgG uzorak dobiven kromatografijom izmjene aniona (AEX2). Rezultati SEC-HPLC (A i B) i DSF analiza (C i D) uzorka u otopini natrijevog kaprilata (NaCA) konačne koncentracije  $0,12 \text{ mol dm}^{-3}$  uz dodatak  $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl-a (B i D) u usporedbi s istim u  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu ( $\text{pH} = 6,0$ ) (A i C).

Zbog svega navedenog analizu sam provela tako što sam, umjesto površina, međusobno uspoređivala visine pikova IgG-a u otopini natrijevog kaprilata i onih u fosfatnom puferu čime sam pokazala da NaCA vidno potiče njihovo taloženje u svim preparatima, dovodeći do gubitka od 19-52% neposredno prije pohrane (Slika 35A, Tablica 17), odnosno do gubitka od 94-99% po završetku stabilitetne studije (Slika 35B, Tablica 17). Stoga uzorke tretirane s NaCA nisam bila u mogućnosti koristiti u daljnjim analizama.



**Slika 35.** Utjecaj otopine natrijevog kaprilata (NaCA) koncentracije  $0,12 \text{ mol dm}^{-3}$  uz dodatak  $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl-a na taloženje IgG-a u uzorcima pročišćenima taloženjem kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) prije (A) i nakon 3 mjeseca pohrane na  $37 \text{ °C}$  (B).

**Tablica 17.** Gubitak IgG monomera pod utjecajem natrijevog kaprilata (NaCA) u uzorcima izoliranim kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) prije i nakon 3 mjeseca pohrane na  $37 \text{ °C}$ . Rezultati na kraju stabilitetne studije izraženi su kao srednja vrijednost dva mjerenja.

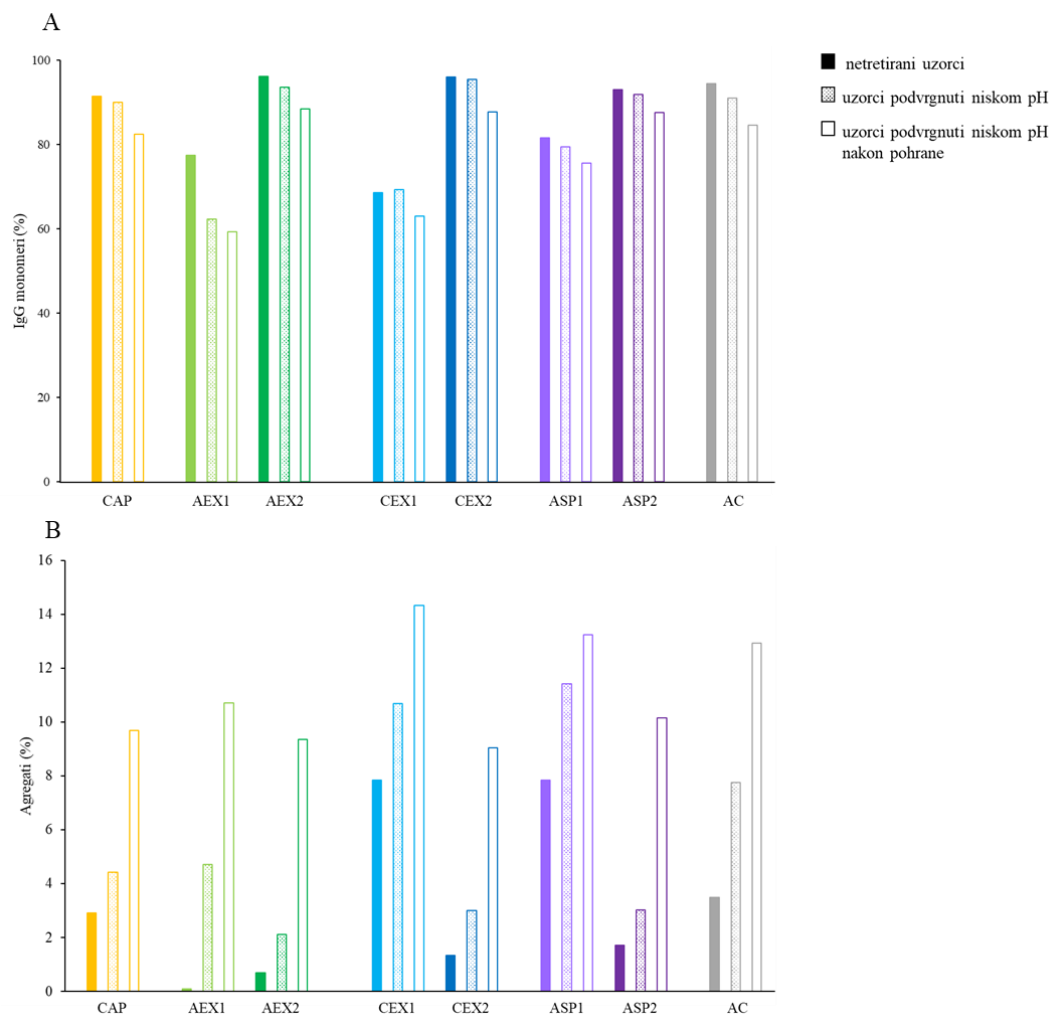
Uzorci	Gubitak IgG monomera (%)	
	Prije pohrane ( $n = 1$ )	Nakon pohrane ( $n = 2$ )
CAP + NaCA	33,7	94,1
AEX1 + NaCA	19,5	99,0
AEX2 + NaCA	44,7	97,5
CEX1 + NaCA	48,6	96,7
CEX2 + NaCA	46,2	97,9
ASP1 + NaCA	40,7	94,7
ASP2 + NaCA	33,3	93,9
AC + NaCA	52,0	98,8

### 4.3.2.3. Utjecaj kiselog pH

Prolazno izlaganje IgG-a izrazito niskom pH (pH = 2,0) tijekom 2 h na sobnoj temperaturi, a potom njegovo vraćanje na početnu vrijednost (pH = 6,0) rezultiralo je blagim padom udjela IgG monomera u većini ispitivanih uzoraka. Zamijećeni trend uočen je i nakon 3 mjeseca pohrane na 37 °C (Slika 36A) i bio je u skladu s povećanjem udjela agregata u uzorcima (Slika 36B, Tablica 18). Nisam zapazila povezanost između manje ili više nepovoljnih uvjeta kojima su IgG-i bili izloženi tijekom postupka izolacije i stupnja agregacije koji je nakon zakiseljavanja odražavao količinu određenu u početnom uzorku. To u pravilu znači da su uzorci koji su bili manje agregirani prije izlaganja niskom pH sadržavali manje agregata i nakon zakiseljavanja. S druge strane, oni s više agregata su imali veći postotak istih i nakon pH tretmana. Izuzetak tome jedino je bio uzorak djelomično pročišćen postupkom AEX (AEX1) u kojemu je udio agregata s 0,1% skočio na 4,7% nakon zakiseljavanja (Slika 36B, Tablica 18), dok je udio IgG monomera pao za 20% (Slika 36A), što sugerira da i količina i/ili profil kontaminirajućih proteina zaostalih nakon izolacije mogu utjecati na stabilnost imunoglobulinskih pripravaka.

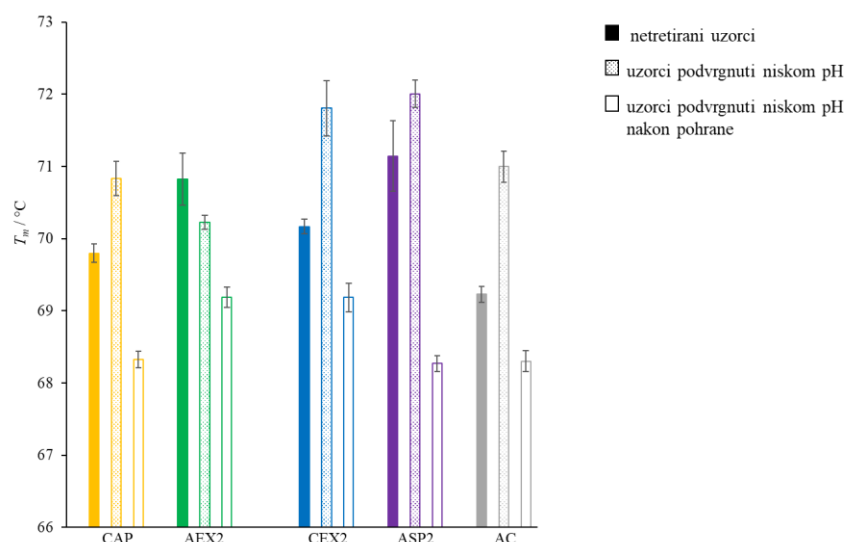
**Tablica 18.** Učinak prolaznog izlaganja IgG-a niskom pH (pH = 2,0) na formiranje agregata u uzorcima dobivenim postupcima CAP, AEX, CEX, ASP i AC prije i nakon 3 mjeseca pohrane na 37 °C. Udio agregata određen je SEC-HPLC metodom. Rezultati na kraju stabilitetne studije izraženi su kao srednja vrijednost dva mjerenja.

Uzorci	Udio agregata (%)		
	Netretirani niskim pH prije pohrane (n = 1)	Tretirani niskim pH prije pohrane (n = 1)	Tretirani niskim pH nakon pohrane (n = 2)
CAP	2,9	4,4	9,7
AEX1	0,1	4,7	10,7
AEX2	0,7	2,1	9,3
CEX1	7,9	10,7	14,3
CEX2	1,3	3,0	9,0
ASP1	7,9	11,4	13,2
ASP2	1,7	3,0	10,1
AC	3,5	7,8	12,9



**Slika 36.** Učinak prolaznog izlaganja (2 h) IgG uzoraka izoliranih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) uvjetima niskog pH (pH = 2,0) na udio IgG monomera (A) i agregata (B) prije i nakon 3 mjeseca pohrane na 37 °C.

DSF analiza pokazala je da kratkotrajno izlaganje kiselim uvjetima ima prolazno pozitivan učinak na termičku stabilnost IgG-a (Slika 37). Vrijednosti  $T_m$ -a svih zakiseljenih uzoraka, uz iznimku AEX2, bile su više u odnosu na one netretirane. No ipak, nakon 3 mjeseca pohrane u svim ispitanim preparatima izmjerila sam vrijednosti temperatura mekšanja snižene za 1-3 °C (Tablica 19). Ovakav pad termičke stabilnosti IgG-a bio je u skladu sa zamijećenim porastom stupnja agregacije premda nisam mogla nedvosmisleno zaključiti da li bi za to mogli biti odgovorni uvjeti samih postupaka pročišćavanja koji u većoj ili manjoj mjeri mogu utjecati na strukturu IgG-a.



**Slika 37.** Vrijednosti temperatura mekšanja ( $T_m$ ) IgG-a izoliranih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranom proteina A (AC) nakon prolaznog izlaganja uzoraka uvjetima niskog pH prije i nakon 3 mjeseca pohrane pri 37 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja svake vrste uzoraka  $\pm$  standardna pogreška (Tablica 19).

**Tablica 19.** Učinak privremenog izlaganja (2 h) IgG-a ekstrahiranih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografijom izmjene aniona (AEX), kromatografijom izmjene kationa (CEX), taloženjem amonijevim sulfatom (ASP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) uvjetima niskog pH (pH = 2,0) na vrijednosti  $T_m$ -a prije i nakon 3 mjeseca pohrane pri 37 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja svake vrste uzoraka  $\pm$  standardna pogreška.

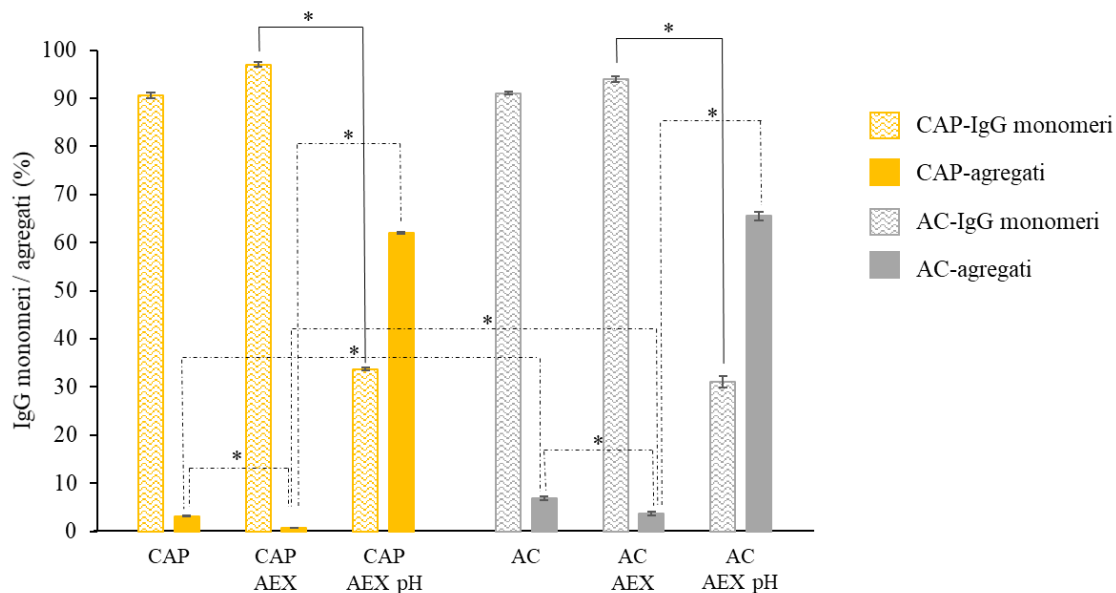
Uzorci	$T_m$ (°C)		
	Netretirani niskim pH prije pohrane	Tretirani niskim pH prije pohrane	Tretirani niskim pH nakon pohrane
CAP	69,80 $\pm$ 0,13 ( $n = 7$ )	70,83 $\pm$ 0,24 ( $n = 7$ )	68,33 $\pm$ 0,11 ( $n = 13$ )
AEX2	70,82 $\pm$ 0,36 ( $n = 6$ )	70,23 $\pm$ 0,10 ( $n = 7$ )	69,19 $\pm$ 0,14 ( $n = 13$ )
CEX2	70,17 $\pm$ 0,10 ( $n = 8$ )	71,81 $\pm$ 0,38 ( $n = 10$ )	69,19 $\pm$ 0,20 ( $n = 8$ )
ASP2	71,15 $\pm$ 0,49 ( $n = 10$ )	72,01 $\pm$ 0,19 ( $n = 8$ )	68,27 $\pm$ 0,11 ( $n = 8$ )
AC	69,23 $\pm$ 0,11 ( $n = 5$ )	71,00 $\pm$ 0,21 ( $n = 8$ )	68,30 $\pm$ 0,15 ( $n = 14$ )

#### 4.3.3. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA POHRANE NA UZORKE DOBIVENE AC I CAP POSTUPCIMA NAKON DODATNOG UKLANJANJA AGREGATA

Iz prethodno provedenih pokusa zapazila sam da je početna količina agregata, izmjerena nakon pročišćavanja IgG-a, dominantan čimbenik koji potiče njihovu daljnju agregaciju ukoliko se dodatno izlože stresnim uvjetima. Međutim, sklonost agregaciji nisam mogla pripisati isključivo primijenjenim postupcima, odnosno povezati je s blažim ili agresivnijim uvjetima pod kojima se pročišćavanje odvijalo, a koji bi kao takvi mogli poremetiti strukturu imunoglobulina, čineći ih u različitoj mjeri nestabilnima i podložnima agregiranju. Slijedom toga, cilj sljedećeg pokusa bio je u što većoj mjeri odstraniti agregate iz pripravaka kako bih eventualne razlike među njima, po pitanju stabilnosti i sklonosti agregaciji u nepovoljnim uvjetima, mogla pripisati samo utjecaju promjena u strukturi IgG-a. Od svih metoda, izabrala smo postupak taloženja neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) kao predstavnika blagih, a afinitetnu kromatografiju pomoću imobiliziranog proteina A (AC) kao predstavnika agresivnijih uvjeta izolacije IgG-a. Navedenim postupcima priredila sam po pet zasebnih uzoraka. Svaki sam potom dodatno pročistila kromatografijom izmjene aniona (AEX) na *CIMmultus* QA koloni u kombinaciji s  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  natrij acetatnim puferom za vezanje ( $\text{pH} = 5,0$ ), što su uvjeti pri kojima IgG-i neometano prolaze kroz kolonu, dok se preostale proteinske komponente zajedno s agregatima vežu za funkcionalne nosače stacionarne faze, kao što je poznato iz literature (Kurtović i sur., 2019) i naših, još neobjavljenih istraživanja koja provodimo na humanim IgG-ima. Visokopročišćene IgG uzorke, u kojima sam udio agregata svela na najmanju moguću mjeru, prebacila sam dijafiltracijom u  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer ( $\text{pH} = 6,0$ ), te svaki testirala na pojavnost agregata i termičku stabilnost prije i nakon tri mjeseca pohrane pri 4 i 42 °C. Utjecaj kisele sredine na stabilnost pripravaka ispitala sam tako što sam jednom setu od svakog tipa uzoraka tijekom 2 h snizila pH matriksa do vrijednosti 2,0, a zatim ga vratila na početnu.

Na početku pokusa analizirala sam čistoću IgG pripravaka i pojavnost agregata u njima. Postupak AC generirao je dvostruko više agregata (6,9%) nego CAP (3,2%) (Slika 38, Tablica 20) čime sam potvrdila rezultate prethodnih studija. Dodatnim korakom pročišćavanja kromatografijom izmjene aniona značajno sam reducirala njihov udio u oba tipa uzoraka označena s CAP AEX i AC AEX. Uzorak CAP AEX sadržavao je 4 puta manje agregata (0,7%). Udio onih u uzorku AC AEX smanjio se na gotovo pola (3,7%). Istovremeno, zamijetila sam porast udjela IgG monomera za 3-7% u oba visokopročišćena preparata. Nakon što sam ih

izložila uvjetima niskog pH (pH = 2,0) u uzorcima sam izmjerila značajno povećanje udjela agregata (62% u CAP AEX pH, odnosno 66% u AC AEX pH uzorku) i značajno smanjenje udjela IgG monomera (34% u CAP AEX pH, odnosno 31% u AC AEX pH uzorku) (Slika 38, Tablica 20).



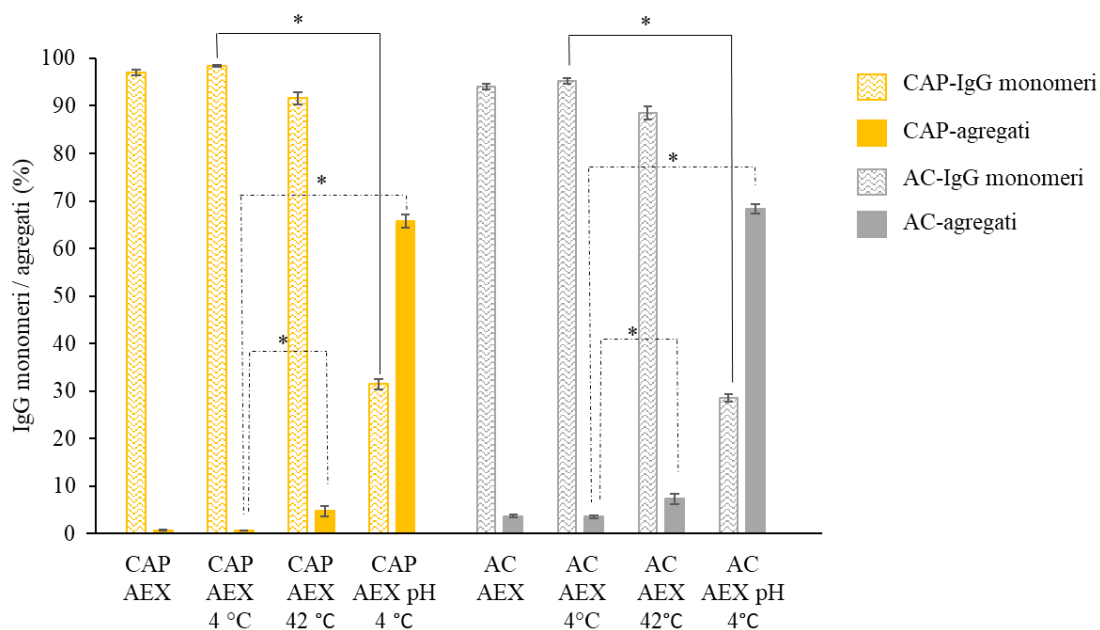
**Slika 38.** Udio IgG monomera i agregata u uzorcima pročišćenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A prije (CAP, AC) i nakon dodatnog pročišćavanja kromatografijom izmjene aniona (CAP AEX, AC AEX), te nakon izlaganja visokopročišćenih IgG-a niskom pH (CAP AEX pH, AC AEX pH) na početku stabilitetne studije. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja (Tablica 20)  $\pm$  standardna pogreška.  $*p < 0,05$ .



**Tablica 20.** Udio IgG monomera i agregata u uzorcima dobivenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A prije (CAP, AC) i nakon dodatnog pročišćavanja kromatografijom izmjene aniona (CAP AEX, AC AEX), te nakon izlaganja visokopročišćenih IgG-a niskom pH (CAP AEX pH, AC AEX pH) na početku stabilitetne studije. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška.

Uzorci	IgG monomeri (%)	Agregati (%)
CAP	90,64 $\pm$ 0,65 ( $n = 10$ )	3,16 $\pm$ 0,04 ( $n = 10$ )
CAP AEX	97,04 $\pm$ 0,55 ( $n = 10$ )	0,74 $\pm$ 0,05 ( $n = 10$ )
CAP AEX pH	33,70 $\pm$ 0,30 ( $n = 10$ )	61,95 $\pm$ 0,22 ( $n = 10$ )
AC	91,08 $\pm$ 0,29 ( $n = 9$ )	6,89 $\pm$ 0,39 ( $n = 9$ )
AC AEX	94,05 $\pm$ 0,59 ( $n = 9$ )	3,67 $\pm$ 0,33 ( $n = 9$ )
AC AEX pH	31,07 $\pm$ 1,23 ( $n = 9$ )	65,53 $\pm$ 0,85 ( $n = 8$ )

Po završetku pohrane visokopročišćenih uzoraka CAP AEX i AC AEX pri nižoj temperaturi (4 °C) tijekom tri mjeseca udio IgG monomera i agregata ostao je nepromijenjen, dok su povišena temperatura (42 °C) i kratkotrajno izlaganje uvjetima niskog pH u oba tipa uzoraka rezultirali povećanim formiranjem agregata (Slika 39, Tablica 21). Pohranom pri 42 °C njihov udio porastao je za otprilike 4% u odnosu na iste uzorke čuvane na nižoj temperaturi od 4 °C (Tablica 21). Izraziti porast agregata od oko 60%, izmjeren već na početku stabilitetne studije u oba tipa uzoraka izloženih kiselom okruženju (Tablica 20) porastao je za dodatna 4% po isteku 3 mjeseca (CAP AEX pH 4 °C, AC AEX pH 4 °C) (Tablica 21). Tako je ukupno povećanje agregata u uzorcima izloženima niskom pH u odnosu na one nezakiseljene iznosilo 65,1% u CAP AEX pH 4 °C, odnosno 64,3% u AC AEX pH 4 °C uzorku.

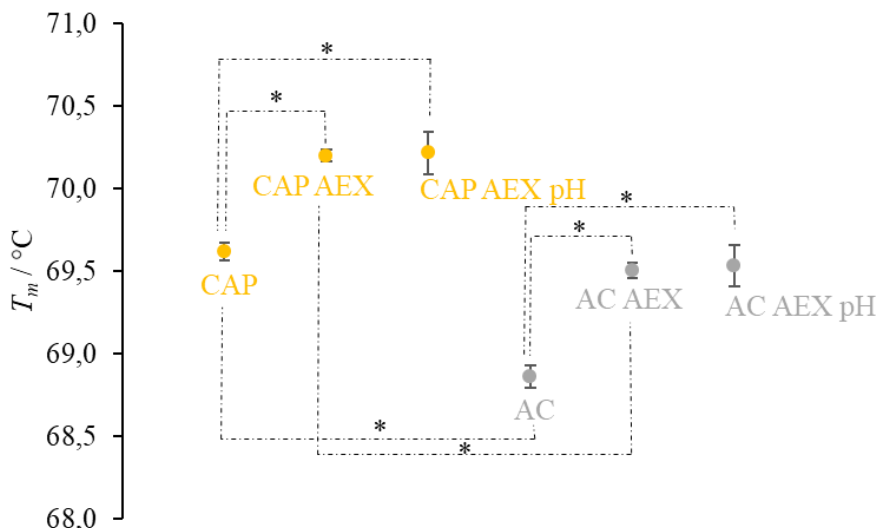


**Slika 39.** Učinak tromjesečne pohrane pri 4 i 42 °C na udio IgG monomera i agregata u uzorcima pročišćenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A nakon dodatnog pročišćavanja kromatografijom izmjene aniona (CAP AEX i AC AEX). Uzorci s oznakom “pH” kratkotrajno (2 h) su izloženi na početku stabilitetne studije kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja (Tablica 21)  $\pm$  standardna pogreška. \* $p < 0,05$ .

**Tablica 21.** Učinak tromjesečne pohrane pri 4 i 42 °C na udio IgG monomera i agregata u uzorcima pročišćenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A nakon dodatnog pročišćavanja kromatografijom izmjene aniona (CAP AEX i AC AEX). Uzorci s oznakom “pH” kratkotrajno (2 h) su izloženi na početku stabilitetne studije kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška.

Uzorci	Temperatura pohrane (°C)	IgG monomeri (%)	Agregati (%)
CAP AEX	4 °C	98,47 $\pm$ 0,21 ( $n = 10$ )	0,67 $\pm$ 0,03 ( $n = 10$ )
CAP AEX	42 °C	91,66 $\pm$ 1,27 ( $n = 10$ )	4,78 $\pm$ 1,06 ( $n = 10$ )
CAP AEX pH	4 °C	31,48 $\pm$ 1,06 ( $n = 10$ )	65,75 $\pm$ 1,35 ( $n = 10$ )
AC AEX	4 °C	95,17 $\pm$ 0,58 ( $n = 9$ )	3,57 $\pm$ 0,36 ( $n = 9$ )
AC AEX	42 °C	88,53 $\pm$ 1,37 ( $n = 9$ )	7,32 $\pm$ 1,02 ( $n = 9$ )
AC AEX pH	4 °C	28,58 $\pm$ 0,87 ( $n = 9$ )	68,38 $\pm$ 1,01 ( $n = 9$ )

DSF analizom uzoraka na početku stabilitetne studije još jednom sam potvrdila da se postupkom CAP dobiva termički stabilniji IgG produkt. Naime, njegova temperatura  $T_m$  je za 0,7 °C viša od one izmjerene za IgG produkt izoliran metodom AC. Visokopročišćeni preparati oba tipa uzoraka dobiveni dodatnim kromatografskim korakom pročišćavanja (CAP EAX i AC AEX) imali su proporcionalno više vrijednosti  $T_m$ , i to za 0,6 °C u odnosu na njihove inicijalne formulacije koje nisu bile podvrgnute uklanjanju agregata (CAP i AC) i one su ostale nepromijenjene i nakon izlaganja uvjetima niskog pH (CAP AEX pH i AC AEX pH) (Slika 40, Tablica 22).

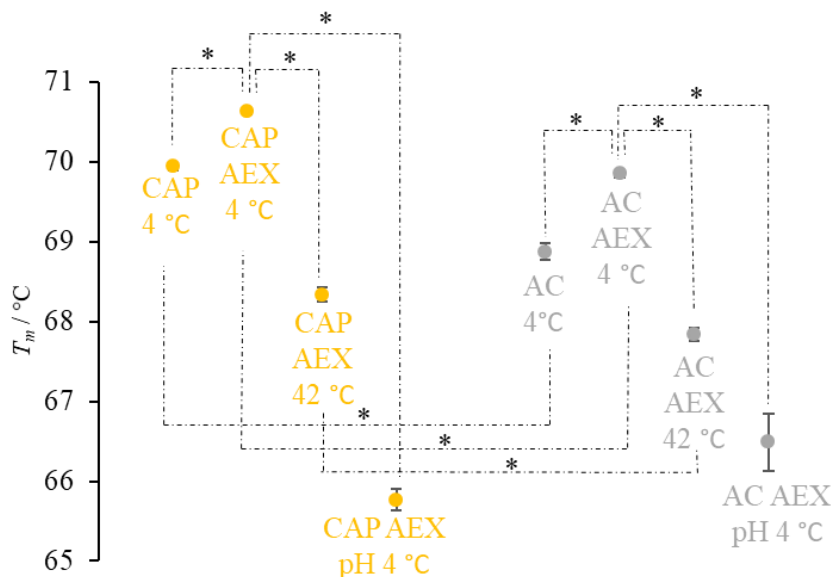


**Slika 40.** Termička stabilnost IgG preparata na početku stabilitetne studije pripremljenih i analiziranih u  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu (pH = 6,0). Uzorci CAP i AC izolirani su taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). Preparati CAP AEX i AC AEX dodatno su pročišćeni kromatografijom izmjene aniona. Uzorci s oznakom “pH” izloženi su tijekom 2 h kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $T_m$  temperatura svakog tipa uzorka (Tablica 22). \* $p < 0,05$ .

**Tablica 22.** Vrijednosti  $T_m$  IgG uzoraka izoliranih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) određene na početku stabilitetne studije. CAP AEX i AC AEX preparati dodatno su pročišćeni kromatografijom izmjene aniona. Uzorci s oznakom “pH” izloženi su tijekom 2 h kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja svakog tipa uzorka  $\pm$  standardna pogreška.

Uzorci	CAP	CAP AEX	CAP AEX pH	AC	AC AEX	AC AEX pH
$T_m$ (°C)	$69,6 \pm 0,05$ ( $n = 24$ )	$70,2 \pm 0,04$ ( $n = 25$ )	$70,2 \pm 0,13$ ( $n = 20$ )	$68,9 \pm 0,07$ ( $n = 24$ )	$69,5 \pm 0,05$ ( $n = 20$ )	$69,5 \pm 0,13$ ( $n = 17$ )

Po isteku tri mjeseca rezultati su pokazali da pohrana pri temperaturi od 4 °C nije imala utjecaj na termičku stabilnost uzoraka CAP i AC, kao niti na njihove produkte dobivene dodatnim kromatografskim korakom (CAP AEX, AC AEX) provedenim s ciljem smanjenja udjela agregata (Slika 41, Tablica 23). Naime, njihove vrijednosti  $T_m$  nisu se razlikovale u odnosu na one izmjerene na početku stabilitetne studije (Tablica 22). S druge strane, pohrana pri 42 °C rezultirala je smanjenom stabilnošću visokopročišćenih IgG-a u oba tipa uzoraka s obzirom da je kod njih došlo do smanjenja vrijednosti  $T_m$  za nešto više od 2 °C u odnosu na one koji su bili pohranjeni pri 4 °C. Zakiseljavanje, kao nepovoljan čimbenik, najviše je pridonijelo destabilizaciji imunoglobulina jer se temperatura  $T_m$  u uzorku AC AEX pH snizila za 3,4 °C, a u uzorku CA AEX pH čak za 4,9 °C u usporedbi s istim uzorcima koji nisu bili izloženi niskom pH (Slika 41, Tablica 23).

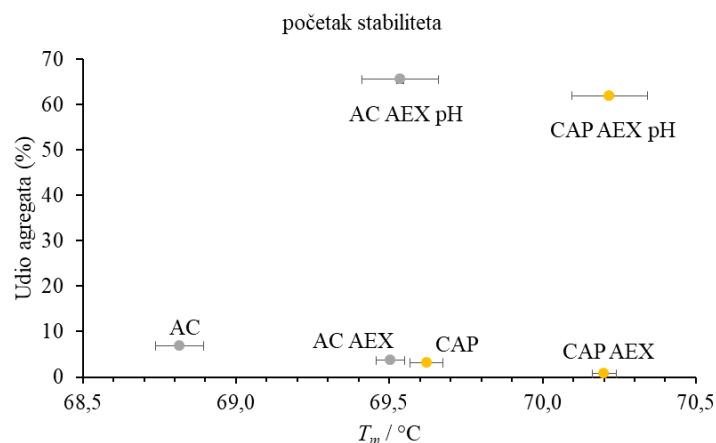


**Slika 41.** Termička stabilnost IgG preparata pripremljenih i analiziranih u 0,2 mol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu (pH = 6,0) nakon pohrane pri 4 i 42 °C tijekom 3 mjeseca trajanja stabilitetne studije. Uzorci CAP i AC izolirani su taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). Preparati CAP AEX i AC AEX dodatno su pročišćeni kromatografijom izmjene aniona. Uzorci s oznakom “pH” izloženi su tijekom 2 h kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja temperatura  $T_m$  svakog tipa uzoraka (Tablica 23). \* $p < 0,05$ .

**Tablica 23.** Vrijednosti  $T_m$  IgG uzoraka dobivenih taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) na kraju stabilitetne studije. Preparati CAP AEX i AC AEX dodatno su pročišćeni kromatografijom izmjene aniona. Uzorci s oznakom “pH” izloženi su tijekom 2 h kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati su izraženi su kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja svakog tipa uzoraka  $\pm$  standardna pogreška.

Uzorci	Temperatura pohrane (°C)	$T_m$ (°C)
CAP	4 °C	69,94 $\pm$ 0,04 ( $n = 25$ )
CAP AEX	4 °C	70,64 $\pm$ 0,04 ( $n = 25$ )
CAP AEX	42 °C	68,34 $\pm$ 0,09 ( $n = 22$ )
CAP AEX pH	4 °C	65,77 $\pm$ 0,14 ( $n = 19$ )
AC	4 °C	68,88 $\pm$ 0,10 ( $n = 23$ )
AC AEX	4 °C	69,85 $\pm$ 0,04 ( $n = 20$ )
AC AEX	42 °C	67,84 $\pm$ 0,08 ( $n = 18$ )
AC AEX pH	4 °C	66,49 $\pm$ 0,36 ( $n = 16$ )

Prikazom termičke stabilnosti analiziranih preparata IgG-a u odnosu na udio prisutnih agregata u njima određenih na početku stabilitetne studije, potvrdila sam već prethodno uočenu tendenciju negativne korelacije između ova dva parametra koja je bila prisutna u svim uzorcima osim u onima izloženima uvjetima niskog pH (Slika 42). Unatoč velikoj količini agregata (preko 60%), vrijednosti temperatura mekšanja zakiseljenih (CAP AEX pH i AC AEX pH) i njima odgovarajućih netretiranih uzoraka (CAP AEX i AC AEX) bile su podudarne (Tablica 24).

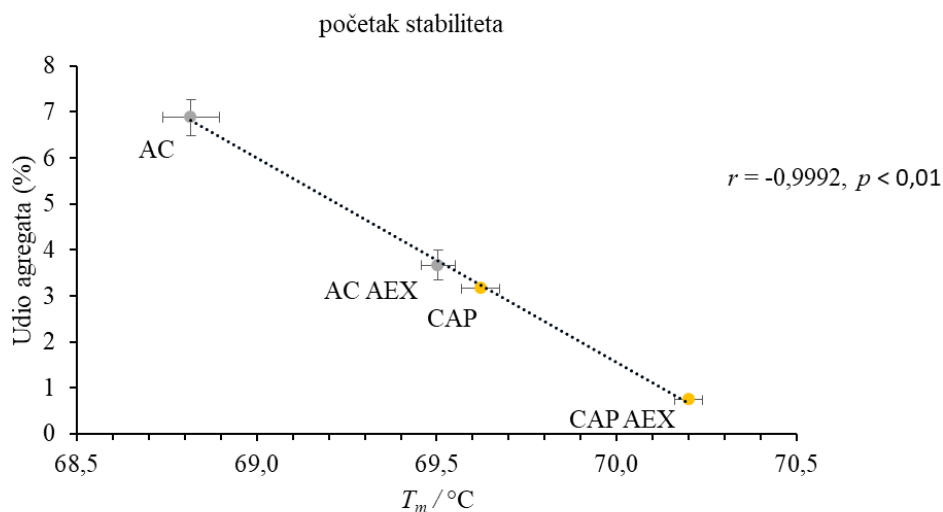


**Slika 42.** Negativna korelacija između termičke stabilnosti i udjela agregata u IgG uzorcima pročišćenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) na početku stabilitetne studije. Preparati CA AEX i AC AEX dodatno su pročišćeni kromatografijom izmjene aniona. Oni s oznakom “pH” izloženi su tijekom 2 h kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati vrijednosti  $T_m$  i udjela agregata (Tablica 24) izraženi su kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja  $\pm$  standardna pogreška.

**Tablica 24.** Vrijednosti temperatura mekšanja IgG-a i udjeli agregata u preparatima dobivenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) na početku stabilitetne studije. Uzorci CA AEX i AC AEX dodatno su pročišćeni kromatografijom izmjene aniona. Pripravci s oznakom “pH” izloženi su tijekom 2 h kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati su izraženi su kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja svakog tipa uzoraka  $\pm$  standardna pogreška.

Uzorci	$T_m$ (°C)	Agregati (%)
CAP	69,62 ± 0,05 ( $n = 24$ )	3,16 ± 0,04 ( $n = 10$ )
AC	68,82 ± 0,08 ( $n = 19$ )	6,89 ± 0,39 ( $n = 9$ )
CAP AEX	70,20 ± 0,04 ( $n = 25$ )	0,74 ± 0,05 ( $n = 10$ )
AC AEX	69,50 ± 0,05 ( $n = 19$ )	3,67 ± 0,33 ( $n = 9$ )
CAP AEX pH	70,22 ± 0,12 ( $n = 20$ )	61,95 ± 0,22 ( $n = 10$ )
AC AEX pH	69,54 ± 0,13 ( $n = 17$ )	65,53 ± 0,85 ( $n = 8$ )

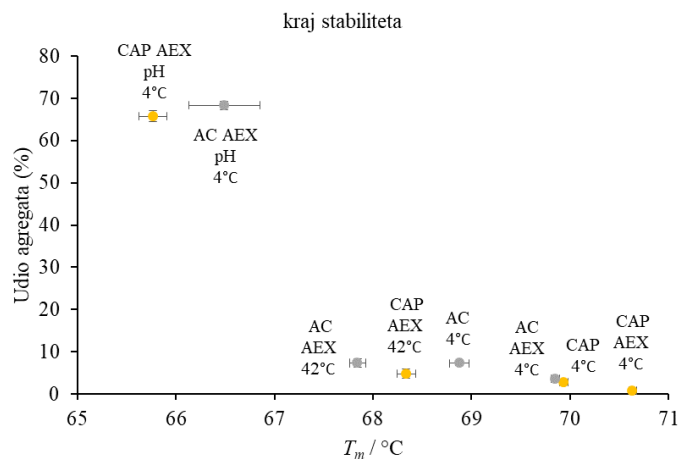
Izuzimanjem uzoraka AC AEX pH i CAP AEX pH iz grafičkog prikaza bila sam u mogućnosti prikazati jasnu negativnu korelaciju između ova dva parametra (Slika 43).



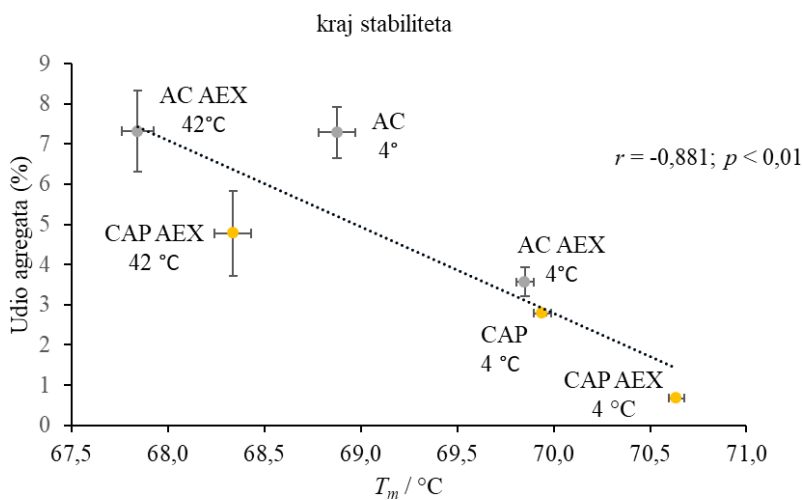
**Slika 43.** Negativna korelacija između termičke stabilnosti i udjela agregata u IgG uzorcima pročišćenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) na početku stabilitetne studije. Rezultati vrijednosti  $T_m$  i udjela agregata izraženi su kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja (Tablica 24)  $\pm$  standardna pogreška. Negativna korelacija izražena je kao  $r$  vrijednost izračunata korištenjem programskog alata Statistica 13.5 (StatSoft, TIBCO Software Inc., SAD). Mjerna nesigurnost je dana u obliku 99%-tnog intervala pouzdanosti.

Po završetku stabilitetne studije negativnu korelaciju između praćenih parametara potvrdila sam u svim IgG uzorcima, uključujući i preparate CAP AEX pH i AC AEX pH (Slika 44, Tablica 25) koji su tu pravilnost donekle narušavali prije pohrane. Ovisnost ova dva parametra pokazala se linearnom samo za uzorke koji su sadržavali niže udjele agregata (do 10 %) (Slika 45). Njihove vrijednosti  $T_m$  smanjivale su se proporcionalno s povećanjem udjela agregata. Negativnu korelaciju među njima izračunala sam i izrazila kao  $r$  vrijednost uz mjernu nesigurnost danu u obliku 99%-tnog intervala pouzdanosti. Svojstvo linearne ovisnosti temperatura mekšanja i udjela agregata izgubila se u uzorcima CAP AEX pH i AC AEX pH (Slika 44) koji sadrže preko 60% agregata, s obzirom da se njihove vrijednosti  $T_m$  nisu smanjile proporcionalno s porastom agregata (Tablica 25).





**Slika 44.** Negativna korelacija između termičke stabilnosti i udjela agregata u IgG preparatima pročišćenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) na kraju stabilitetne studije. Uzorci CA AEX i AC AEX dodatno su pročišćeni kromatografijom izmjene aniona. Oni s oznakom “pH” izloženi su tijekom 2 h kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati vrijednosti  $T_m$  i udjela agregata izraženi su kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja (Tablica 25)  $\pm$  standardna pogreška.



**Slika 45.** Negativna korelacija između termičke stabilnosti i udjela agregata u IgG uzorcima pročišćenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) na kraju stabilitetne studije. Rezultati  $T_m$  vrijednosti i udjela agregata izraženi su kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja (Tablica 25)  $\pm$  standardna pogreška. Negativna korelacija izražena je kao  $r$  vrijednost izračunata korištenjem programskog alata Statistica 13.5 (StatSoft, TIBCO Software Inc., SAD). Mjerna nesigurnost je dana u obliku 99%-tnog intervala pouzdanosti.

**Tablica 25.** Vrijednosti  $T_m$  IgG-a i udjeli agregata u preparatima dobivenima taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (CAP i AC) na kraju stabilitetne studije. CAP AEX i AC AEX uzorci dodatno su pročišćeni kromatografijom izmjene aniona, a oni s oznakom “pH” izloženi su tijekom 2 h kiselim uvjetima (pH = 2,0) nakon čega im je pH vraćen na početnu vrijednost (pH = 6,0). Rezultati su izraženi su kao srednja vrijednost  $n$  mjerenja svakog tipa uzoraka  $\pm$  standardna pogreška.

Uzorci	Temperatura pohrane (°C)	$T_m$ (°C)	Agregati (%)
CAP	4°C	69,94 $\pm$ 0,04 ( $n = 25$ )	2,79 $\pm$ 0,05 ( $n = 10$ )
AC	4°C	68,88 $\pm$ 0,10 ( $n = 23$ )	7,29 $\pm$ 0,64 ( $n = 10$ )
CAP AEX	4°C	70,64 $\pm$ 0,04 ( $n = 25$ )	0,67 $\pm$ 0,03 ( $n = 10$ )
AC AEX	4°C	69,85 $\pm$ 0,04 ( $n = 20$ )	3,57 $\pm$ 0,36 ( $n = 9$ )
CAP AEX	42°C	68,34 $\pm$ 0,09 ( $n = 22$ )	4,78 $\pm$ 1,06 ( $n = 10$ )
AC AEX	42°C	67,84 $\pm$ 0,08 ( $n = 18$ )	7,32 $\pm$ 1,02 ( $n = 9$ )
CAP AEX pH	4°C	65,77 $\pm$ 0,14 ( $n = 19$ )	65,75 $\pm$ 1,35 ( $n = 10$ )
AC AEX pH	4°C	66,49 $\pm$ 0,36 ( $n = 16$ )	68,38 $\pm$ 1,01 ( $n = 9$ )

## 5. RASPRAVA

Otrovanja uzrokovana ugrizima zmiya otrovnica ozbiljan su javnozdravstveni problem prisutan u gotovo svim dijelovima svijeta. Godišnje pogađa oko 2,7 milijuna ljudi od čega nekoliko stotina tisuća slučajeva završava smrću ili trajnim invaliditetom. Svjetska zdravstvena organizacija razvila je stoga cjelovitu strategiju djelovanja s ciljem reduciranja posljedica envenomacije za 50% do kraja 2030. godine (WHO, 2019). Budući da su specifični antivenomi jedini djelotvorni lijekovi u borbi protiv ove zanemarene tropske bolesti, jedan od ključnih aspekata navedene strategije jest tehnološko poboljšanje kako uzvodnih tako i nizvodnih postupaka njihove proizvodnje. Idealan postupak pripreme antivenoma bio bi onaj koji bi uz minimalne troškove u što manjem broju koraka i što kraćem vremenskom periodu generirao produkt visoke djelotvornosti i sigurnosti primjene u kliničkom okruženju. S tim ciljem, u ovom radu, sustavno sam istražila utjecaj pet različitih postupaka izdvajanja imunoglobulina G (IgG) iz hiperimune konjske plazme (HKP) specifične za otrov poskoka na svojstva aktivne tvari koja u konačnici određuju kvalitetu proizvoda. Izolacijom IgG-a iz jedinstvenog uzorka HKP-a, njihovom pohranom u identičnim uvjetima, a zatim usporednom analizom, dobila sam rezultate koje sam mogla izravno uspoređivati. Naglasak istraživanja bio je na usporedbi procesa čiji bi blagi uvjeti izolacije trebali čuvati IgG-e od bilo kakvih strukturnih poremećaja (taloženje neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP), kromatografija izmjenom aniona (AEX)) u odnosu na one agresivnije koji se povezuju s induciranjem prolaznih konformacijskih promjena različitog intenziteta (taloženje amonijevim sulfatom (ASP), kromatografija izmjenom kationa (CEX), afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A (AC)). Takvim pristupom ispitala sam hipotezu koja svoje uporište nalazi u dostupnoj literaturi, a prema kojoj postupci agresivnijih uvjeta djeluju destabilizirajuće na strukturu IgG-a, čineći ih tako podložnijima agregaciji (Gagnon i Nian, 2016; Guo i Carta, 2014; Hari i sur., 2010; G. León i sur., 2001; Morais i Massaldi, 2009).

Početak istraživanja posvetila sam optimizaciji odabranih postupaka pročišćavanja kako bih dobila IgG uzorke što veće čistoće, istovremeno vodeći računa da pripravljene količine budu dostatne za sve predviđene analize (Tablica 6). U tom smislu, postupak taloženja kaprilnom kiselinom (CAP), koji selektivno taloži gotovo sve neželjene plazmatske proteine, dok IgG-e ostavlja sačuvane u otopini (Brodsky i sur., 2012; León i sur., 2014; Steinbuch i Audran, 1969), pokazao se izuzetno učinkovitim (Slika 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, Tablica 4). Brojna provedena istraživanja upotrebe kaprilne kiseline u proizvodnji IgG antivenoma (EI-

Ekiaby i sur., 2015; Guidolin i sur., 2016; Rojas i sur., 1994) pokazuju da je IgG-e moguće izdvojiti njenom primjenom već u vrlo niskim koncentracijama u rasponu od 1 do 3%, iako se s onom najnižom dobiva onečišćen pripravak (Kurtović i sur., 2019), dok 3% CA dovodi do djelomičnog taloženja samih IgG-a (A. Fernandes i sur., 2008; Raweerith i Ratanabanankoon, 2003). Kako moje istraživanje nije bilo usmjereno postizanju što većeg prinosa, već mi je za njegovu provedbu bilo bitno ukloniti nečistoće, u postupku taloženja kaprilnom kiselinom koristila sam 3% CA kao kompromisnu koncentraciju kojom sam postigla najveću moguću čistoću IgG-a uz njihov minimalni gubitak (Tablica 4). Iako nespecifična, ova je metoda dala proizvod gotovo jednako visokog udjela aktivne tvari (> 90%) kao i visokospecifična afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A (Slika 21, Tablica 8). Osim toga, uzorak pripremljen postupkom CAP također se isprofilirao kao drugi najbolji preparat s obzirom na udio agregata (< 3%) (Slika 24, Tablica 10). Njegovom analizom masenom spektrometrijom (MS) identificirala sam dva neželjena proteina: albumin, prisutan samo u tragovima, i alfa-1B-glikoprotein (Slika 23D). Učinkovitu eliminaciju albumina, koji je najobilnije zastupljen neželjeni protein hiperimune konjske plazme, postupkom CAP opisali su također Fernandes i suradnici (2008). Pretpostavljam da bih ga dodatnim povećanjem koncentracije kaprilne kiseline također bila u mogućnosti eliminirati, ali time bih istovremeno vjerojatno negativno utjecala na ostala svojstva preparata poput pojave zamućenja, kako je već prethodno opisano u literaturi (Eursakun i sur. 2012; Kurtović i sur., 2019).

Iako nije sasvim razjašnjen, pretpostavljeni mehanizam djelovanja kaprilne kiseline temelji se na svojstvu njene djelomične hidrofobnosti, zbog kojeg pri blago sniženom pH (4,5 – 5,5) taloži kisele proteine plazme, dok bazičniji proteini, poput IgG-a, ostaju u otopini (Nudel i sur., 2012; Trapp i sur., 2018). Blago kiseli uvjeti, osim što odgovaraju vrijednosti pI albumina (5,3-6,0) i tako ga čine manje topljivim, također utječu na dodatno smanjenje topljivosti ionako slabo topljive kaprilne kiseline ( $pK_a = 4,89$ ), zbog čega hidrofobni karakter njenih alifatskih lanaca dolazi do izražaja. Posljedično tome kaprilna kiselina veže se na albumin, i to putem specifičnih veznih mjesta na njegovoj površini s visokim afinitetom za masne kiseline (Fasano i sur., 2005), što dovodi do konformacijskih promjena njegove strukture i otkrivanju novih veznih mjesta. Dodatnim vezanjem molekula kaprilne kiseline raste hidrofobnost proteina te se oni konačno međusobno povezuju i talože (Morais i Massaldi, 2012). Osim albuminu, kao količinski najzastupljenijem proteinu plazme (Fasano i sur., 2005), blago kiseli pH održava i druge plazmatske neimunoglobulinske proteine slabo topljivima jer se njihove pI vrijednosti također kreću u rasponu kiselih vrijednosti od 4,4-5,3 (Miller i sur., 2004) što također vjerojatno

pogoduje ostvarivanju hidrofobnih interakcija s kaprilnom kiselinom. Međutim, premda umjereno kiseo, alfa-1B-glikoprotein ipak se zadržao u uzorku (Slika 23D) i time pokazao otpornost spram utjecaja kaprilne kiseline. Isti fenomen uočili su El-Eikaby i suradnici prilikom izolacije humanih IgG-a pri čemu su među zaostalim proteinima detektirali albumin, alfa-1, alfa-2 i beta protein (2015). Ovakvi rezultati navode na zaključak da bi pod danim eksperimentalnim uvjetima ishod taloženja mogao ovisiti i o nekim drugim čimbenicima. Važno je naglasiti da postupak taloženja kaprilnom kiselinom nije utjecao na raspodjelu IgG potklasa u pročišćenom uzorku (Tablica 11, Slika 27), o čemu su već izvijestili Halassy i suradnici (2019), što je rezultat od posebnog značaja s obzirom da IgG(T) potklasa ima ključnu ulogu u neutralizaciji toksičnih komponenti otrova. Ovaj podatak bitan je u kontekstu dobivanja antivenoma kako s kliničkog, tako i s regulatornog aspekta posebno ako se uzme u obzir činjenica da je analiza raspodjele potklasa već našla svoju primjenu kao regulatorni zahtjev u kontroli kvalitete humanih imunoglobulina (Eu. Ph. 10.0, 2012).

Drugi ispitani postupak taloženja amonijevim sulfatom, kojim se IgG-i dobivaju u talogu, a potom resuspendiraju, u usporedbi s frakcionacijom posredovanom kaprilnom kiselinom znatno lošije ekstrahira IgG-e, dajući pripravke sa zamjetnom količinom nečistoća i agregata (Slika 12, 22, 23 i 24, Tablica 8), kako je već opisano u dostupnoj literaturi (Fernandes i sur., 2008; Kittipongwarakarn i sur., 2011; Zolfagharina i Dounighi, 2013). Najveći udio nečistoća činio je albumin dok su preostali kontaminanti bili prisutni u znatno manjoj količini zbog čega sam samo dva uspješno identificirala MS-om: glikoprotein bogat histidinom i alfa-1B-glikoprotein (Slika 23A). Zadnje navedeni zadržao se u uzorku i nakon dodatnog pročišćavanja postupkom CAP (Slika 23A) što potvrđuje njegovu rezistenciju prema učinku kaprilne kiseline koju sam uočila prilikom izolacije IgG-a ovom metodom kao samostalnim postupkom. Dobra strana primjene postupka taloženja amonijevim sulfatom je što ne remeti bitno sastav IgG potklasa (Tablica 11, Slika 27).

Zbog visoke specifičnosti vezanja za Fc fragment, afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A očekivano sam dobila gotovo potpuno čist IgG preparat (Slika 19, 20, 21, 22 i 23D, Tablica 8), premda s najvećim udjelom agregata (6,3%) (Slika 24, Tablica 10). Njihovo formiranje, također zamijećeno i u istraživanjima vezanima uz monoklonska antitijela, najvjerojatnije nastaje kao posljedica opsežnog, premda prolaznog narušavanja sekundarne i tercijarne strukture uslijed interakcija IgG-ligand i eluiranja puferom niske pH vrijednosti (pH = 3,5), te potom dodatnog izlaganja sekundarnom stresu (Gagnon i

Nian, 2016; Gagnon i sur., 2015). Budući da sam u svojim eksperimentima eluiranje provodila puferom još niže pH vrijednosti ( $\text{pH} = 2,5$ ), čime sam IgG-e izložila izrazito nepovoljnim uvjetima, ovakvo kiselo okruženje vjerojatno je bilo dovoljno da samo po sebi izazove agregaciju, čak i bez dodatnog izlaganja stresnim uvjetima. Nadalje, u usporedbi s distribucijom IgG potklasa u normalnoj konjskoj plazmi (Lewis i sur., 2008), afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A je od svih postupaka najviše utjecala na njihov relativni udio u pročišćenom preparatu koji je bio značajno ili umjereno obogaćen IgGa i IgGb potklasama (Slika 27A i B, Tablica 11), dok je istovremeno pretrpio izraziti gubitak IgG(T) potklase (Slika 27C, Tablica 11). Ovakvi rezultati su u skladu s otprije poznatim većim afinitetom proteina A za IgGa, odnosno IgGb potklasu konjskih IgG-a (Lewis i sur., 2008). Osim toga, bitno je naglasiti da IgG(T) potklasa prednjači po stupnju glikozilacije (Morais i Massaldi, 2009; Theakston i sur., 2003), zbog čega se odlikuje izuzetnom otpornošću spram procesa agregacije (Hari i sur., 2010). Stoga je realno za pretpostaviti da se njenim gubitkom i obogaćivanjem uzorka manje rezistentnim potklasama stvaraju uvjeti koji pogoduju formiranju agregata.

U ionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji (IEX) interakcije između naboja na površini makromolekula i suprotno nabijenih funkcionalnih skupina stacionarne faze moguće je modulirati promjenom pH vrijednosti i/ili ionske jakosti mobilne faze. Ovisno o pI vrijednostima molekula od interesa, operativni uvjeti mogu se podesiti tako da one slobodno prolaze kroz kolonu ili da se adsorbiraju te potom eluiraju. U mojoj studiji primarni cilj kromatografije izmjenom aniona (AEX), odnosno kationa (CEX) bio je da IgG-e pokušam što je moguće više pročistiti od albumina kao drugog najzastupljenijeg proteina u HKP-u (Halassy i sur., 2019). Prema 2D-PAGE analizi proteoma konjskog seruma procijenjeni rasponi pI vrijednosti albumina (5,3–6,0) i IgG-a (5,8–7,0) donekle se preklapaju (Lepczyński i sur., 2018; Miller i sur., 2004), zbog čega nisam očekivala da će ijedna od primijenjenih kromatografija imati toliku učinkovitost da u samo jednom koraku generira željeni produkt zadovoljavajuće čistoće. Međutim, udio IgG monomera u pripravcima na bazi postupka AEX i postupka CEX bio je prilično visok ( $> 72\%$ ) i usporediv s preparatom pročišćenim taloženjem amonijevim sulfatom (81%) (Slika 21, Tablica 8), kao još uvijek najčešće korištenim postupkom proizvodnje antivenoma (Kumar i sur., 2016). Postignuta čistoća preparata može se objasniti činjenicom da je većina proteina plazme kisela zbog čega ih je pod primijenjenim kromatografskim uvjetima u znatnoj mjeri moguće odvojiti od bazičnijih IgG-a.

Prema SEC-HPLC analizi, u uzorku AEX uopće nije bilo agregata (Slika 22), dok je preparat CEX njima obilovao (5,4%) i tek neznatno zaostajao za onim dobivenim afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (6,3%) (Tablica 10). Kao što je opisano u literaturi, tijekom postupka CEX, u koraku eluiranja puferom povećane ionske jakosti dolazi do prolaznog pada pH vrijednosti kao posljedice dinamičnog ravnotežnog odnosa između njegovih kationa i H<sup>+</sup> iona kolone (Ghose i sur., 2002; Pabst i Carta, 2007). Naime, Na<sup>+</sup> ioni u puferu za eluiranje prisutni su u većoj koncentraciji, a imaju i jači afinitet za negativno nabijene funkcionalne skupine nosača, zbog čega istiskuju H<sup>+</sup> ione stacionarne faze u mobilnu fazu, uzrokujući privremeno sniženje njene pH vrijednosti. Takvi prolazno nepovoljni uvjeti, koje karakterizira visoka koncentracija soli i niski pH, dovode do denaturacije proteina i stvaranja agregata koji se eliraju u dodatnom kromatografskom piknu (Chen, Z. i sur., 2016; Luo i sur., 2014). Prema rezultatima pojavnosti agregata u uzorcima CEX i AC mogla bih zaključiti da, unatoč većoj otpornosti IgG-a na promjene u okolini u odnosu na neke druge proteine (Laptoš i Omersel, 2018), uzastopno ili istovremeno izlaganje nepovoljnim uvjetima povezanima sa samim postupcima pročišćavanja značajno doprinosi destabiliziranju njihove strukture i posljedično tome pojavi agregata.

Profili nečistoća analizirani MS-om u oba IgG pripravka dobivena ionsko-izmjenjivačkim kromatografijama pokazali su visok stupanj podudarnosti. Među zaostalim proteinima dominirali su albumin i transferin (Slika 23B i C). U uzorku CEX prevladavao je albumin (Slika 23C), dok je transferin bio glavni rezidualni protein preparata AEX (Slika 23B). Unatoč neuspjelom pokušaju identifikacije MS-om, velika je vjerojatnost da se transferin zadržao i u uzorku CEX (Slika 23C) budući da sam njegovom analizom SDS-PAGE-om otkrila dvije bliske vrpce koje po položaju odgovaraju onima iz uzorka pročišćenog postupkom AEX, a u kojem sam potvrdila prisutnost spornog proteina (Slika 23B). Za razliku od uzorka priređenog AEX-om, pripravak CEX sadržavao je još hemopeksin i protein sličan alfa-2-makroglobulinu (Slika 23C). Hemopeksin je  $\beta_1$ -glikoprotein za kojeg je već poznato da se teško odvaja od preostalih proteina plazme, naročito transferina,  $\alpha_2$ -makroglobulina, glikoproteina bogatog histidinom i imunoglobulina (Mauk i sur., 2011). Unatoč svojoj nižoj pI vrijednosti blago kiseli alfa-1B-glikoprotein (Lepczyński i sur., 2018) nije se vezao za funkcionalne skupine kromatografskog nosača tijekom postupka AEX kako sam očekivala, već se zajedno s IgG-ima pojavio u nevezanoj IgG frakciji (Slika 23B), što potvrđuje činjenicu da ukupni površinski naboj nije jedini faktor koji utječe na odvajanje molekula tijekom kromatografskog pročišćavanja (Xu i Glatz, 2009). Poznato je naime da je jednako važna i distribucija naboja

koja, ovisno o aminokiselinskom slijedu proteina, može dovesti do formiranja jako nabijenih područja (“charge patches”) (Boubeta i sur., 2018) zaslužnih za devijantno kromatografsko ponašanje. Stoga pretpostavljam da je utjecaj pozitivno nabijenih područja na površini alfa-1B-glikoproteina prevladao njegov ukupni naboj, sprečavajući adsorpciju na funkcionalne skupine nosača.

U IgG uzorcima pročišćenima primjenom anionske, odnosno kationske kromatografije primijetila sam umjereni gubitak IgG(T) potklase (Tablica 11, Slika 27C) što je u skladu s njenom pI vrijednošću koja je niža od onih karakterističnih za ostale potklase konjskih IgG-a (Miller i sur., 2004).

Posebno značajnima smatram rezultate svojeg istraživanja koji se odnose na promjene relativnog udjela IgG potklasa specifičnih za *Vaa* otrov u konačnim proizvodima nastalih uslijed primjene različitih postupaka pročišćavanja. Kao što sam već spomenula, postupak AC najviše remeti sastav potklasa IgG-a generirajući uzorak znatno obogaćen IgGa (Slika 27A), umjereno obogaćen IgGb (Slika 27B) i značajno osiromašen potklasom IgG(T) (Slika 27C). Sličnu tendenciju preraspodjele također sam primijetila u preparatima AEX i CEX premda smanjenog intenziteta (Slika 27). Ovakva promjena sastava potklasa IgG-a može utjecati na njihova svojstva odgovorna kako za sigurnost, tako i za učinkovitost konačnog produkta. Naime, IgG uzorci AC i CEX, koji su primjenom obje metode bili prolazno podvrgnuti uvjetima niskog pH, imali su najveći sadržaj agregata. Navedeni rezultat u skladu je s istraživanjima provedenima na humanim monoklonskim antitijelima koja su pokazala da brzina i stupanj agregiranja, prouzrokovani izlaganjem niskim pH vrijednostima, snažno ovise o tipu IgG potklase (Hari i sur., 2010). Moguće je stoga da se pomakom u raspodjeli potklasa ovi uzorci obogaćuju onima koja su sklonija agregiranju u kiselom okruženju.

Nadalje, pretpostavku da bi se promjene u sastavu IgG potklasa mogle odraziti na učinkovitost neutralizacije letalne toksičnosti *Vaa* otrova potvrdila sam *in vivo* pokusima kojima sam dokazala da se uzorcima AC i CEX, kao onima s najvećim gubitkom IgG(T) potklase (Slika 27C), neutralizacijska aktivnost umanjila za više od 50% (Tablica 13). Reducirajući učinak afinitetne kromatografije pomoću imobiliziranog proteina A na neutralizacijsku sposobnost IgG-a već je otprije poznat (Kukongviriyapan i Ratanabanankoon, 1982), a svojim istraživanjem dokazala sam da je za to primarno i izravno odgovoran gubitak upravo potklase IgG(T) koja se generira u velikim količinama u serumu konja tijekom postupka hiperimunizacije (Fernandes i sur., 1991). Očekivano, uzorak dobiven taloženjem



neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom, bez pomaka u sastavu IgG potklasa, održao je istu neutralizacijsku aktivnost kao i HKP (Tablica 13), što je bilo u skladu s prethodno provedenim ispitivanjima na drugom uzorku *Vaa*-specifične plazme (Kurtović i sur., 2019).

Termičku stabilnost IgG-a pratila sam diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom (DSF), metodom koja zahtijeva visoku čistoću analiziranih uzoraka, s obzirom da bi zaostale kontaminirajuće proteinske komponente mogle interferirati s dobivenim vrijednostima temperatura mekšanja. Stoga sam nedovoljno čiste preparate ASP1, AEX1 i CEX1 dodatno pročistila taloženjem kaprilnom kiselinom koja ima izuzetnu sposobnost ekstrakcije IgG-a bez utjecaja na sastav potklasa. Primijenjenu koncentraciju CA (0,5-2%) prilagodila sam količini nečistoća u uzorcima kako bih ih učinkovito odstranila uz istovremeno zadržavanje optimalnog prinosa IgG-a prema prethodno optimiziranim uvjetima (Tablica 6). Ovim dodatnim korakom značajno sam povećala čistoću pripravaka (Slika 20 i 22) te tako udio IgG monomera povećala na više od 96% (Slika 21, Tablica 8). Osim toga, istovremeno sam smanjila količinu agregata (Slika 22, Tablica 10) što upućuje na zaključak da je taloženje kaprilnom kiselinom postupak čijom je primjenom moguća njihova učinkovita redukcija.

Rezultati DSF analize pokazali su da visokopročišćeni uzorci ASP2, AEX2 i CEX2 imaju vrlo slične vrijednosti temperatura mekšanja kao i udjela agregata, dok se preparati CAP i AC razlikuju u vrijednostima oba parametra međusobno i u odnosu na preostala tri (Tablica 10, Slika 25). Usporedbom dobivenih rezultata primijetila sam da  $T_m$  vrijednosti IgG-a padaju s porastom udjela agregata u uzorcima i time ustanovila postojanje visoke negativne korelacije među njima (Slika 26) na osnovu koje sam pretpostavila da su agregirane molekule IgG-a sklonije denaturaciji. Ovakav nalaz bio je u suprotnosti s objavljenim podacima u literaturi, prema kojima ne postoji povezanost između termičke stabilnosti i fizikalno-kemijskih svojstava analiziranih proteina (Sviben i sur., 2018). Moguće objašnjenje navedenog odstupanja leži u činjenici da sam ja određivala termičku stabilnost IgG-a priređenih uvijek u identičnim otopinama (vrsta i molarnost pufera) za razliku od autora druge studije koji su ispitivali utjecaj različitih otopina u kojima su se IgG-i nalazili na njihove temperature  $T_m$ .

Također, primijetila sam da IgG uzorak pročišćen postupkom AC ima zamjetno nižu vrijednost  $T_m$  (Slika 25) što može biti posljedica, ne samo najvećeg udjela agregata (Tablica 10), već i najizraženijeg pomaka u raspodjeli potklasa pri čemu bi veliki gubitak IgG(T)-a (Slika 27C, Tablica 11) mogao biti najzaslužniji za smanjenu termičku stabilnost. Slijedom toga mogla bih zaključiti da IgG potklase odlikuje varijabilna otpornost prema denaturaciji što su

također u svojoj studiji pokazali Hari i suradnici koji su, ispitujući termičku stabilnost monoklonskih antitijela, naveli jasnu razliku u tom svojstvu između IgG1 i IgG2 potklase (2010).

Na temelju rezultata prve faze istraživanja, utvrdila sam da agresivniji postupci izolacije koji uzrokuju prolazno narušavanje konformacije IgG-a (AC, ASP, CEX) generiraju uzorke sa statistički značajno većim udjelom agregata (AC, ASP1, CEX1) u odnosu na one blage (AEX, CAP) primjenom kojih takvo djelovanje izostaje (AEX1, CAP) (Tablica 10, Slika 24). Usto sam primijetila da sam primjenom dodatnog koraka taloženja kaprilnom kiselinom uklonila zaostale nečistoće iz manje čistih uzoraka (Slika 20), te također istovremeno odstranila i znatnu količinu agregata (Tablica 10, Slika 24). Rezultati DSF analize visokopročišćenih preparata pokazali su da IgG-i ekstrahirani postupcima blagih uvjeta nisu imali najveće vrijednosti  $T_m$  kako sam očekivala, već da su termički najstabilniji uzorci bili oni s najmanjim udjelom agregata. Štoviše, uočila sam pravilan obrnuto proporcionalan odnos između ova dva parametra (Slika 26). Odmah na početku stabilitetne studije, također sam potvrdila stabilizirajuće djelovanje sorbitola na IgG-e budući da su njegovim dodatkom temperatura mekšanja u svim uzorcima porasle za 5-7 °C (Slika 29, Tablica 15).

U daljnjim ispitivanjima, cilj mi je bio ispitati jesu li IgG-i ekstrahirani agresivnijim postupcima manje stabilni od onih dobivenih primjenom blagih operativnih uvjeta. U tu svrhu sam u preliminarnom pokusu svih pet uzoraka IgG-a izoliranih različitim postupcima sa i bez dodatka sorbitola kao stabilizatora pohranila tijekom mjesec dana pri 37 °C, što su uvjeti pod kojima dobiveni rezultati predstavljaju indicaciju stabilnosti pripravaka ekvivalentnu pohrani kroz 4 godine pri 4 °C (Al-Abdulla i sur., 2003). Neovisno o primijenjenoj metodi pročišćavanja, potvrdila sam već poznatu značajku sorbitola kao sigurnog i učinkovitog stabilizatora IgG pripravaka dobivenih iz hiperimune konjske plazme (Segura i sur., 2009), čijim se dodatkom uočeno povećanje vrijednosti temperatura mekšanja svih uzoraka za 5-7 °C prije početka stabilitetne studije održalo i po njenom završetku (Slika 29, Tablica 15). Vrijednosti  $T_m$  izmjerene prije i nakon mjesec dana bile su podudarne, kako u uzorcima koji su sadržavali sorbitol, tako i u onima bez stabilizatora (Tablica 15), a jednako tako nepromijenjeni su ostali i udjeli IgG monomera i agregata (Tablica 14). Slične rezultate objavili su Solano i suradnici prema kojima se izmjereni udio agregata u IgG antivenomima, formuliranim pri pH = 4,3, nije povećao kroz 6 mjeseci čuvanja pri temperaturi od 4 odnosno 37 °C (2012). Dobiveni rezultati ukazivali su na izuzetnu stabilnost ove vrste lijeka te me uputili na nužnost

podvrgavanja IgG-a agresivnijim ekperimentalnim čimbenicima okoliša pod utjecajem kojih bi se ispoljile eventualne razlike u njihovoj stabilnosti. Stoga sam u nastavku istraživanja ispitivala IgG uzorke bez dodatka sorbitola, a vrijeme pohrane produžila s jednog na tri mjeseca, što je prema regulatornim smjernicama najkraći period inkubacije nakon kojega je potrebno ispitati stabilitet proizvoda kako bi se dobile preliminarne informacije o njegovoj kvaliteti (WHO, 2016). Kroz navedeni vremenski period uzorke sam čuvala pri tri različite temperature: 4 °C – s pretpostavljeno najpovoljnijim djelovanjem na stabilnost IgG-a, 37 °C – već ispitanog utjecaja u prethodnom pokusu, te 42 °C kao ekstremno nepovoljnog temperaturnog faktora. Osim temperature, IgG-e sam također testirala izlaganjem jednog seta uzoraka djelovanju natrijevog kaprilata, a drugog prolaznom zakiseljavanju čime sam ih podvrgnula dodatno stresnim uvjetima djelovanjem kojih sam nastojala otkriti razlike u njihovoj stabilnosti.

Kao što sam očekivala, najniža temperatura pohrane (4 °C) nije bitno utjecala niti na jedan od praćenih parametara stabilnosti (Slika 30, 32, Tablica 16). Suprotno tome, povišene temperature (37 i 42 °C) negativno su se odrazile na kvalitetu uzoraka što se očitovalo kao povećanje količine agregata (Slika 30A i 31), smanjenje udjela IgG monomera (Slika 30B) i pad vrijednosti temperatura mekšanja (Slika 32, Tablica 16). Između udjela agregata i termičke stabilnosti IgG-a ponovno sam zamijetila postojanje negativne korelacije (Slika 33). Isti fenomen ovisnosti agregacije o temperaturi uočili su Rojas i suradnici koji su u svom radu pratili zamućenje tekućih formulacija antivenoma svaka tri mjeseca tijekom godine dana. Predvidljivo, temperatura pohrane pri 4 °C očuvala je originalne fizikalno-kemijske karakteristike IgG-a, dok je u preparatima čuvanima pri 23, 30 i 37 °C došlo do porasta zamućenja u vremenskoj i temperaturnoj ovisnosti uslijed stvaranja agregata velike molekulske mase (1990). Sprega gubitka monomernih struktura i ubrzane agregacije humanih monoklonskih antitijela IgG1 potklase pri povišenoj temperaturi već je opisana u literaturi kao proces kojim se oko prethodno stvorenog žarišta dodaju nove monomerne jedinice i potiče brži rast agregata (Singla i sur., 2016). Prethodno uočena tendencija pada temperature  $T_m$  s porastom udjela agregata zadržala se u uzorcima i nakon provedene stabilitetne studije (Slika 33).

Jedan od stresnih uvjeta kojima sam testirala stabilnost pripravaka pročišćenih različitim postupcima, od blagih do onih agresivnijih, podrazumijevao je njihovo izlaganje utjecaju natrijevog kaprilata koji prema objavljenim podacima u konačnoj koncentraciji od 0,12 mol dm<sup>-3</sup> uz dodatak 0,25 mol dm<sup>-3</sup> NaCl-a inducira polimerizaciju 29% IgG-a (Sviben i sur., 2018). Međutim, u mojim pokusima, gubitak IgG monomera već je prije pohrane bio prosječno

za 10% veći od navedenoga (Slika 35A, Tablica 17), da bi na kraju stabilitetne studije većina molekula polimerizirala (> 90%) (Slika 35B, Tablica 17) te bila uklonjena centrifugiranjem ili filtriranjem tijekom pripreme uzoraka za SEC-HLPC (Slika 34A i B), odnosno DSF analizu (Slika 34C i D), zbog čega ih nisam bila u mogućnosti koristiti u daljnjem istraživanju. Gotovo potpuni gubitak monomera u svim ispitanim uzorcima može se dovesti u vezu s činjenicom da su istovremeno bili izloženi djelovanju dva snažna nepovoljna čimbenika: natrijevom kaprilatu i povišenoj temperaturi (37 °C) čiji se utjecaj dodatno mogao pojačati njihovim potencijalno sinergističkim djelovanjem.

Prolaznim zakiseljavanjem uzoraka izgubio se samo manji udio IgG monomera čiji se blagi pad nastavio i kroz naredna tri mjeseca pohrane pri 37 °C (Slika 36A) uz istovremeno povećanje udjela agregata (Slika 36B). Na kraju stabilitetne studije, količina agregata proporcionalno se povećala u usporedbi s onom početnom u svim uzorcima osim u manje čistom preparatu AEX2 u kojem je skok bio nesrazmjern (Slika 36B, Tablica 18). Ovakvo odstupanje nastalo je pod mogućim utjecajem zaostalih nečistoća čiji je profil specifičan upravo za uzorak izoliran postupkom AEX.

DSF analiza provedena na početku studije neočekivano je pokazala da izlaganje niskom pH ima povoljan učinak na termičku stabilnost IgG-a budući da su temperature mekšanja u odnosu na netretirane uzorke bile povećane u svim uzorcima, osim u visokopročišćenom uzorku izoliranom postupkom AEX (AEX2) (Slika 37, Tablica 19). Prema literaturnim podacima, promjena pH vrijednosti otopine proteina može biti uzrokom pojačanog formiranja složenih agregatnih struktura pri čemu se među njima stvaraju nove molekulske interakcije (npr. vodikove i van der Waalove veze). Pod njihovim utjecajem dolazi do strukturne preraspodjele kojom se postiže termodinamički najstabilnija konformacija proteina zaslužna za povećanu termičku stabilnost, te posljedično tome i porast vrijednosti temperature mekšanja (Gao i sur., 2020). Međutim, uočeni fenomen je bio kratkotrajan jer su vrijednosti  $T_m$  nakon tri mjeseca pohrane pri 37 °C pokazale primjetan pad (Slika 37, Tablica 19) uz istovremeno značajan porast udjela agregata (Tablica 18), vjerojatno nastalih oko već formirane kritične jezgre prethodno opisanim mehanizmom, a čije prisustvo dodatno potiče agregaciju pri povišenoj temperaturi. Nukleizacija je postupak koji se u pravilu odvija sporo (Singla i sur., 2016) i zato sam porast količine agregata zamijetila kao funkciju ovisnu o vremenu. S povećanjem agregata smanjuje se broj veznih mjesta za fluorescentnu boju što se u DSF analizi očituje kao pad intenziteta fluorescencije te u konačnici, pomak temperature  $T_m$  prema nižoj vrijednosti.

Osim okolišnih uvjeta, istraživanja su nadalje pokazala da je intrinzička sklonost proteina agregaciji jedan od bitnih faktora koji određuje njihovu stabilnost, a prvenstveno ovisi o primanoj strukturi. Hidrofobne aminokiseline, inače sakrivene u unutrašnjosti proteina, predstavljaju žarišta agregacije (“hot spots“) koja se aktiviraju povišenjem temperature, međusobno formirajući jake ireverzibilne veze naročito učestale između  $\beta$ -nabranih struktura (Ghosh i sur., 2016; Uversky i sur., 2017) ujedno visoko zastupljene upravo u imunoglobulinima (Sviben i sur., 2018).

Dosadašnjim istraživanjima utvrdila sam i više puta pokazala da sklonost IgG-a agregaciji tijekom pohrane u različitim uvjetima ovisi o količini agregata prisutnih u uzorcima na početku stabilitetne studije, a koji su nastali kao posljedica uvjeta samih postupaka pročišćavanja. Drugim riječima, primijetila sam tendenciju nastavka procesa agregacije oko već formiranih agregatnih struktura kao ishodišta čiji se intenzitet povećavao proporcionalno s njihovim početnim udjelom. Kako bih provjerila zapaženi fenomen, u sljedećoj fazi istraživanja pokušala sam odstraniti agregate iz uzoraka u najvećoj mogućoj mjeri kako bih razlike u stabilnosti monomera pripisala isključivo razlikama u narušenosti konformacije IgG-a kao posljedici podvrgavanja postupcima pročišćavanja pod različitim uvjetima. U tu svrhu uzorke dobivene metodama AC i CAP dodatno sam pročistila kromatografijom izmjene aniona (AEX). Postupak CAP bio je predstavnik izolacije pod blagim, a AC pod agresivnijim uvjetima. Koristeći pufer pH vrijednosti ( $\text{pH} = 5,0$ ) dovoljno udaljene od pI vrijednosti imunoglobulina, osigurala sam uvjete u kojima su oni slobodno prolazili kroz kolonu. Jednako kao i u prethodnim pokusima, primarnim metodama pročišćavanja formirao se očekivani udio agregata, manji u CAP, a veći u uzorcima AC, koji se proporcionalno početnom udjelu bitno smanjio nakon provedenog dodatnog koraka AEX u oba tipa uzoraka (CAP AEX, AC AEX) (Slika 38, Tablica 20). No, agregate nisam uspjela u potpunosti odstraniti, vjerojatno zbog činjenice da su u određenoj mjeri svi proteini skloni agregaciji kao složenom procesu podložnom utjecaju mnogobrojnih čimbenika (Pallarès i Ventura, 2016). Vrijednosti  $T_m$  IgG-a visoke čistoće (CAP AEX i AC AEX) bile su više u usporedbi s njihovim manje čistim varijantama (CAP i AC) (Slika 40, Tablica 22), najvjerojatnije zahvaljujući manjem udjelu agregata u njihovom sastavu zaslužnom za veći stupanj stabilnosti.

Set visokopročišćenih uzoraka podvrgnut prolaznom djelovanju niskog pH kao stresnom faktoru već prije pohrane pri  $4\text{ }^\circ\text{C}$  sadržavao je znatno povećanu količinu agregata ( $> 60\%$ ) (Slika 38, Tablica 20) što, suprotno očekivanom, nije utjecalo na termičku stabilnost IgG-

a. Naime, temperature mekšanja uzoraka CAP AEX pH i AC AEX pH podudarale su se s vrijednostima  $T_m$  istih uzoraka koji nisu bili podvrgnuti niskom pH (CAP AEX i AC AEX) (Slika 40, Tablica 22). Negativan utjecaj ovog tretmana ispoljio se tek na kraju stabilitetne studije kroz pad vrijednosti  $T_m$ -a u obje vrste uzoraka za 3 °C (AC AEX pH), odnosno za 5 °C (CAP AEX pH) (Slika 41, Tablica 23) premda je, s obzirom na izrazito velik udio agregata (Slika 39, Tablica 21), bio manji od očekivanog. Ovakvo odstupanje od otprije uočene negativne korelacije (Slika 42) pripisala sam upravo prekomjernoj količini agregata čiji je utjecaj već opisan u literaturi (Bai i sur., 2019).

Visokopročišćeni IgG uzorci, po završetku stabilitetne studije, pokazali su jednaki obrazac ponašanja pri različitim uvjetima pohrane kao i u prethodnim pokusima. Pri nižoj temperaturi (4 °C) udio agregata je ostao nepromijenjen, dok se pohranom na 42 °C tijekom 3 mjeseca povećao proporcionalno početnom udjelu agregata (Slika 39, Tablica 21) uz istovremeno smanjenje vrijednosti temperatura mekšanja (Slika 41, Tablica 23). Veliki broj analiziranih uzoraka potkrijepio je postojanje negativne korelacije između udjela agregata i termičke stabilnosti IgG-a na početku stabilitetne studije (Slika 43, Tablica 24), ali i na njenom kraju (Slika 45, Tablica 25), što je upućivalo na zaključak da se proizvodnim postupcima koji generiraju više agregata dobivaju produkti veće sklonosti agregiranju nakon izlaganja nepovoljnim uvjetima. Budući da sam dokazala da postupci blagih uvjeta pročišćavanja doista induciraju nastajanje manje količine agregata od onih agresivnijih, mogu zaključiti da se njihovom primjenom dobivaju stabilniji pripravci očuvane konformacije IgG-a zbog čega postavljenu hipotezu na početku istraživanja smatram točnom.

U ovom radu usporednom analizom istražila sam i utvrdila utjecaj pet različitih postupaka pročišćavanja na nekoliko svojstava IgG-a relevantnih za kvalitetu konačnog produkta. Identificirala sam sastav zaostalih nečistoća i odredila udio agregata u pročišćenim uzorcima te ustanovila da uvjeti nekih procesa izolacije utječu na sastav potklasa IgG-a. Dokazala sam da je gubitak IgG(T) potklase, koji prvenstveno nastaje kao posljedica ekstrakcije IgG-a afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A, primarno odgovoran za smanjenu sposobnost IgG preparata da neutralizira letalnu toksičnost *Vaa* venoma. Od svih ispitanih protokola pročišćavanja, taloženje neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom istaknulo se kao ekonomski isplativ i lako izvediv postupak s velikom snagom ekstrakcije IgG-a kojim se dobiva uzorak niskog sadržaja agregata i nepromijenjenog sastava potklasa. Kromatografija izmjenom aniona pokazala se se kao osobito zanimljiva metoda zbog svojstva

generiranja produkta bez agregata i velikog potencijala finog pročišćavanja IgG-a ukoliko se provodi pri dovoljno niskom pH u odnosu na pI vrijednosti imunoglobulina G. Provedenim stabilitetnim studijama pri različitim uvjetima pohrane utvrdila sam da su IgG-i izuzetno stabilne molekule čija otpornost spram stresnih uvjeta prvenstveno ovisi o početnom udjelu agregata formiranih tijekom izvođenja primarnih postupaka pročišćavanja. Blagi operativni uvjeti izolacije kojima su IgG-i bili izloženi u postupku taloženja neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom i kromatografijom izmjene aniona najmanje su remetili njihovu konformaciju čime su izravno utjecali na formiranje najmanjeg udjela agregata u uzorcima, a time posredno i na povećanu termičku stabilnost IgG-a u odnosu na one dobivene primjenom agresivnijih postupaka.

Rezultati ovog istraživanja pružaju dokaze da je pri dizajniranju nizvodnog dijela proizvodnog postupka pripreve antivenoma bitno odabrati samo one korake koji ne utječu na distribuciju IgG potklasa te koji odstranjuju najviše nečistoća, istovremeno najmanje narušavajući strukturu IgG-a kako bi se dobio produkt stabilne aktivne tvari i tako osigurala njegova sigurna klinička primjena.

## 6. ZAKLJUČCI

- ◆ Različiti postupci pročišćavanja generirali su IgG uzorke različitog udjela i sastava zaostalih proteinskih nečistoća.
  - Albumin, kao drugi najzastupljeniji protein hiperimune konjske plazme, zadržao se u najvećoj količini u uzorcima pročišćenim postupkom isoljavanja amonijevim sulfatom (ASP) i kromatografijom izmjene kationa (CEX), dok je transferin bio glavni kontaminant preparata dobivenog kromatografijom izmjene aniona (AEX). Ostali neželjeni proteini činili su znatno manji udio nečistoća IgG uzoraka.
  - IgG preparat izoliran protein afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) jedini u svom sastavu nije sadržavao kontaminante, dok su uzorci pročišćeni taloženjem amonijevim sulfatom (ASP), kromatografijom izmjene aniona (AEX) i kromatografijom izmjene kationa (CEX) zahtijevali dodatno pročišćavanje taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) kako bih im mogla odrediti termičku stabilnost.
  - Pojavnost agregata u preparatu dobivenom kromatografijom izmjene aniona (AEX), nakon izlaganja stresnim uvjetima, ukazuje na mogućnost da bi sastav i količina zaostalih nečistoća mogli imati negativan utjecaj na stabilnost IgG-a. Naime, unatoč tome što navedeni uzorak nije sadržavao agregate neposredno nakon pročišćavanja, čije se prisustvo pokazalo glavnim okidačem za nastavak agregiranja (navedeno dolje niže), izlaganje niskoj pH vrijednosti kao stresnom čimbeniku dovelo je do formiranja njihove zamjetne količine u uzorku.
- ◆ Ispitani postupci pročišćavanja različito su utjecali na sastav IgG potklase pripravaka što se odrazilo na njihovu sposobnost neutralizacije letalne toksičnosti *Vaa* venoma.
  - Uzorci dobiveni protein afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) i kromatografijom izmjene kationa (CEX) pretrpjeli su najveći gubitak IgG(T) potklase zbog čega se njihova sposobnost specifične neutralizacijske aktivnosti smanjila za više od 50% u pokusima *in vivo*, čime je potvrđena dominantno neutralizacijska uloga ove potklase. Za razliku od njih, neutralizacijska djelotvornost uzorka pročišćenog taloženjem neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom



(CAP), u kojem nije došlo do gubitka IgG(T)-a, bila je jednaka specifičnoj aktivnosti hiperimune konjske plazme.

- ◆ Taloženje kaprilnom kiselinom (CAP) i kromatografija izmjenom aniona (AEX) postupci su pročišćavanja “blagih“ uvjeta koji su najmanje utjecali na strukturu IgG-a generirajući stabilnije pripravke s bitno manjim udjelom agregata u odnosu na taloženje amonijevim sulfatom (ASP) te kromatografiju izmjene kationa (CEX) i afinitetnu kromatografiju pomoću imobiliziranog proteina A (AC) kao predstavnike metoda “agresivnih“ uvjeta.
  - Taloženje neimunoglobulinskih proteina kaprilnom kiselinom (CAP) dodatno se izdvaja sposobnošću da u samo jednom proizvodnom koraku generira preparat visoke čistoće s udjelom IgG monomera većim od 90% i udjelom agregata manjim od 3% uz nepromijenjenu distribuciju analiziranih potklasa.
  - Kromatografija izmjenom aniona (AEX), pokazala se posebno interesantnom zbog potpunog izostanka utjecaja na formiranje agregata i velikog potencijala primjene u svrhu dodatnog finog pročišćavanja IgG-a uz obavezno izvođenje u uvjetima pH dovoljno niskog i udaljenog od pI vrijednosti imunoglobulina G.
  - Termička stabilnost bila je podjednaka u svim preparatima, osim u IgG uzorku izoliranom afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC) čija je temperatura mekšanja imala za 1,5 °C nižu vrijednost. Takav nalaz bio je u skladu s prisustvom najvećeg udjela agregata u njegovom sastavu i značajno poremećenom raspodjelom potklasa uzrokovanom gubitkom IgG(T) te obogaćenjem IgGa i IgGb potklasom.
  - Između udjela agregata u pripravcima i termičke stabilnosti IgG-a utvrđena je visoka negativna korelacija.
- ◆ Pročišćeni IgG-i pokazali su visok stupanj stabilnosti pri optimalnim uvjetima pohrane.
  - Dodatkom sorbitola kao stabilizatora proporcionalno se povećala termička stabilnost svih IgG-a, neovisno o metodi kojom su pročišćeni, a koja se održala i nakon mjesec dana pohrane pri temperaturi od 37 °C.

- 
- Pohrana tijekom tri mjeseca pri 4 °C pokazala se gotovo bez učinka na proces agregacije, udio IgG monomera i termičku stabilnost ispitanih IgG uzoraka.
  - ◆ Razlike u stabilnosti pročišćenih IgG pripravaka ispoljile su se njihovim izlaganjem raznim nepovoljnim uvjetima prije i tijekom pohrane kroz period od jednog ili tri mjeseca.
    - Povećanje temperature pohrane na 37 ili 42 °C, u svakoj vrsti izoliranih preparata, pratio je porast udjela agregata uz istovremeno smanjenje udjela IgG monomera kao i proporcionalan pad temperature mekšanja imunoglobulina G u odnosu na njihove početne vrijednosti.
    - Prolazno izlaganje uvjetima izrazito niskog pH kao stresnom čimbeniku potaknulo je formiranje agregata prije, te se nastavilo i tijekom tromjesečnog perioda pohrane uz istovremeno smanjenje udjela IgG monomera.
    - U nizu nepovoljnih uvjeta različitog karaktera, kojima su pročišćeni IgG-i bili izloženi tijekom stabilitetnih studija, utvrđena je pozitivna korelacija između količine agregata u uzorcima na početku i one prisutne na kraju tog perioda.
    - Pokušaj potpunog uklanjanja agregata iz IgG pripravaka, a time i utjecaja njihove početne količine na nastavak agregiranja, nije sasvim uspio budući da primjenom kromatografije izmjenom aniona (AEX) nisu u potpunosti odstranjeni već samo značajno smanjeni u preparatima pročišćenima taloženjem kaprilnom kiselinom (CAP) i afinitetnom kromatografijom pomoću imobiliziranog proteina A (AC). Izlaganjem tako dobivenih IgG uzoraka stresnim uvjetima uočen je isti obrazac procesa agregacije prema kojemu se količina agregata u preparatima na kraju promatranog perioda proporcionalno povećala ovisno o njihovoj količini na početku.
  - ◆ Količina agregata u uzorcima, nastala tijekom izolacije IgG-a, pokazala se kao glavni čimbenik koji određuje njihovu sklonost daljnjem agregiranju u nepovoljnim uvjetima. Budući da operativni uvjeti postupaka pročišćavanja izravno djeluju na udio agregata u uzorcima, iz navedenog se može zaključiti da svaki od njih posrednim djelovanjem također utječe i na stabilnost IgG-a. Stoga je u dizajniranju proizvodnog procesa pročišćavanja imunoglobulina G iz hiperimune konjske plazme važno izabrati one korake koji u najmanjoj mjeri induciraju proces agregacije.

## 7. POPIS LITERATURE

- Abubakar, I. S., Abubakar, S. B., Habib, A. G., Nasidi, A., Durfa, N., Yusuf, P. O., ... Warrell, D. A. (2010). Randomised controlled double-blind non-inferiority trial of two antivenoms for Saw-scaled or carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming in Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(7), 8–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000767>
- Aird, S. D., Watanabe, Y., Villar-briones, A., Roy, M. C., Terada, K., & Mikheyev, A. S. (2013). Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*) Steven. *BMC*, *14*(790), 1–26.
- Al-Abdulla, I., Casewell, N. R., & Landon, J. (2013). Long-term physicochemical and immunological stability of a liquid formulated intact ovine immunoglobulin-based antivenom. *Toxicon*, *64*, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.022>
- Al-Abdulla, I., Casewell, N. R., & Landon, J. (2014). Single-reagent one-step procedures for the purification of ovine IgG, F(ab')<sub>2</sub> and Fab antivenoms by caprylic acid. *Journal of Immunological Methods*, *402*(1–2), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.11.001>
- Al-Abdulla, I., Garnvwa, J. M., Rawat, S., Smith, D. S., Landon, J., & Nasidi, A. (2003). Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). *Toxicon*, *42*(4), 399–404. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00170-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00170-3)
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of Proteome Research*, *7*(8), 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>
- Alirol, E., Sharma, S. K., Bawaskar, H. S., Kuch, U., & Chappuis, F. (2010). Snake bite in south asia: A review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000603>
- Angulo, Y., Escolano, J., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of Central American pitvipers: Clues for rationalizing the distinct envenomation profiles of *Atropoides nummifer* and *Atropoides picadoi*. *Journal of Proteome Research*, *7*(2), 708–719. <https://doi.org/10.1021/pr700610z>

- Arbuckle, K. (2015). Evolutionary Context of Venom in Animals. *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins*, (2015), 1–23. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6727-0>
- Ayyar, B. V., Arora, S., Murphy, C., & O’Kennedy, R. (2012). Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, 56(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.10.007>
- Bai, N., Roder, H., Dickson, A., & Karanicolas, J. (2019). Isothermal Analysis of ThermoFluor Data can readily provide Quantitative Binding Affinities. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37072-x>
- Bawaskar, H. S., Bawaskar, P. H., & Bawaskar, P. H. (2017). Snake bite in India: a neglected disease of poverty. *The Lancet*, 390(10106), 1947–1948. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32175-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32175-X)
- Bordon, Y. (2016). The many sides of Paul Ehrlich. *Nature Immunology*, 17(S1), S6–S6. <https://doi.org/10.1038/ni.3601>
- Boubeta, F. M., Soler-Illia, G. J. A. A., & Tagliazucchi, M. (2018). Electrostatically Driven Protein Adsorption: Charge Patches versus Charge Regulation. *Langmuir*, 34(51), 15727–15738. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03411>
- Brodsky, Y., Zhang, C., Yigzaw, Y., & Vedantham, G. (2012). Caprylic acid precipitation method for impurity reduction: An alternative to conventional chromatography for monoclonal antibody purification. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(10), 2589–2598. <https://doi.org/10.1002/bit.24539>
- Calvete, J. J., Ju, P., & Sanz, L. (2007). Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*, 42, 1405–1414. <https://doi.org/DOI: 10.1002/jms.124>
- Caron, E. J., Manock, S. R., Maudlin, J., Koleski, J., Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., & Smalligan, R. D. (2009). Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: Was it prophylaxis or method of administration? *Toxicon*, 54(6), 779–783. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.001>
- Casewell, N. R. (2016). Venom Evolution: Gene Loss Shapes Phenotypic Adaptation. *Current Biology*, 26(18), R849–R851. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.082>
- Casewell, N. R., Al-Abdulla, I., Smith, D., Coxon, R., & Landon, J. (2014b). Immunological cross-reactivity and neutralisation of European viper venoms with the monospecific

- Vipera berus antivenom ViperaTab. *Toxins*, 6(8), 2471–2482.  
<https://doi.org/10.3390/toxins6082471>
- Casewell, N. R., Jackson, T. N. W., Laustsen, A. H., & Sunagar, K. (2020). Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(8), 570–581. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>
- Casewell, N. R., Wagstaff, S. C., Wuüster, W., Cook, D. A. N., Bolton, F. M. S., King, S. I., ... Harrison, R. A. (2014a). Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), 9205–9210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405484111>
- Chang, D., & Duda, T. F. J. (2012). Extensive and continuous duplication facilitates rapid evolution and diversification of gene families. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 2019–2029. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss068>
- Chen, Q., Toh, P., Sun, Y., Latiff, S. M. A., Hoi, A., Xian, M., ... Gagnon, P. (2016). Histone-dependent IgG conservation in octanoic acid precipitation and its mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9933–9941. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7719-x>
- Chen, Y. J., Tsai, C. Y., Hu, W. P., & Chang, L. Sen. (2016). DNA aptamers against Taiwan banded krait  $\alpha$ -bungarotoxin recognize Taiwan cobra cardiotoxins. *Toxins*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/toxins8030066>
- Chen, Z., Huang, C., Chennamsetty, N., Xu, X., & Li, Z. J. (2016). Insights in understanding aggregate formation and dissociation in cation exchange chromatography for a structurally unstable Fc-fusion protein. *Journal of Chromatography A*, 1460(2016), 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.023>
- Chippaux, J. P., Lang, J., Amadi Eddine, S., Fagoti, P., Rage, V., Peyrieux, J. C., ... Arhuro, E. (1998). Clinical safety of a polyvalent F(ab')<sub>2</sub> equine antivenom in 223 African snake envenomations: A field trial in Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(6), 657–662. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)90802-1](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90802-1)
- Chippaux, J. P., Stock, R. P., & Massougbdji, A. (2015). Antivenom Safety and Tolerance for the Strategy of Snake Envenomation Management. *Snake Venoms*, 1–16. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6648-8\\_25-1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6648-8_25-1)

- Chippaux, Jean Philippe. (2012). Epidemiology of snakebites in Europe: A systematic review of the literature. *Toxicon*, 59(1), 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.008>
- Chippaux, Jean Philippe. (2017). Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23(1), 1–2. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>
- De Silva, H. J. (2015). Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 81(3), 446–452. <https://doi.org/10.1111/bcp.12739>
- Deng, R., Jin, F., Prabhu, S., & Iyer, S. (2012). Monoclonal antibodies: What are the pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drug development? *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 8(2), 141–160. <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.643868>
- Di Nicola, M. R., Pontara, A., Kass, G. E. N., Kramer, N. I., Avella, I., Pampena, R., ... Paolino, G. (2021). Vipers of Major clinical relevance in Europe: Taxonomy, venom composition, toxicology and clinical management of human bites. *Toxicology*, 453(May 2019), 152724. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152724>
- Doley, R., & Kini, R. M. (2009). Protein complexes in snake venom. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(17), 2851–2871. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0050-2>
- Durban, J., Juárez, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., ... Calvete, J. J. (2011). Profiling the venom gland transcriptomes of costa rican snakes by 454 pyrosequencing. *BMC Genomics*, 12(259), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-259>
- Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A., & Calvete, J. J. (2017). Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts. *Journal of Proteome Research*, 16(9), 3370–3390. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00414>
- Ehresmann, B., Imbault, P., & Well, J. H. (1973). Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 454–463. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90374-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90374-6)

- El-Aziz, T. M. A., Soares, A. G., & Stockand, J. D. (2019). Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving. *Toxins*, *11*(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/toxins11100564>
- El-Ekiaby, M., Vargas, M., Sayed, M., Gorgy, G., Goubran, H., Radosevic, M., & Burnouf, T. (2015). Minipool Caprylic Acid Fractionation of Plasma Using Disposable Equipment: A Practical Method to Enhance Immunoglobulin Supply in Developing Countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003501>
- European Pharmacopoeia 10.0. (2012). HUMAN NORMAL IMMUNOGLOBULIN FOR INTRAVENOUS Immunoglobulinum humanum normale ad usum intravenosum. *European Pharmacopoeia 10.0*, 2862–2863.
- Eursakun, S., Simsiriwong, P., & Ratanabanangkoon, K. (2012). Studies on the fractionation of equine antivenom IgG by combinations of ammonium sulfate and caprylic acid. *Toxicon*, *60*(6), 1022–1029. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.005>
- Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., ... Ascenzi, P. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, *57*(12), 787–796. <https://doi.org/10.1080/15216540500404093>
- Fatah, C. (2014). Pathophysiological and Pharmacological Effects of Snake Venom Components: Molecular Targets. *Journal of Clinical Toxicology*, *04*(02). <https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000190>
- Feola, A., Marella, G. L., Carfora, A., Della Pietra, B., Zangani, P., & Campobasso, C. Pietro. (2020). Snakebite envenoming a challenging diagnosis for the forensic pathologist: A systematic review. *Toxins*, *12*(11), 1–19. <https://doi.org/10.3390/toxins12110699>
- Fernandes, A., Kaundinya, J. O., Daftary, G., Saxena, L., Banerjee, S., & Pattnaik, P. (2008). Chromatographic purification of equine immunoglobulin G F(ab)<sub>2</sub> from plasma. *Journal of Chromatography B*, *876*, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.030>
- Fernandes, I., Lima, E. X., Takehara, H. A., Moura-Da-Silva, A. M., Tanjoni, I., & Gutiérrez, J. M. (2000a). Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon*, *38*(5), 633–644. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00177-4)
- Fernandes, I., Takehara, H. A., & Mota, I. (1991). Isolation of IgGT from hyperimmune horse

- anti-snake venom serum: Its protective ability. *Toxicon*, 29(11), 1373–1379. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90124-A](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90124-A)
- Fernandes, I., Takehara, H. A., Santos, A. C. R., Cormont, F., Latinne, D., Bazin, H., & Mota, I. (1997). Neutralization of bothropic and crotalic venom toxic activities by IgG(T) and IgGa subclasses isolated from immune horse serum. *Toxicon*, 35(6), 931–936. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00177-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00177-8)
- Fernandes, I., Tavares, F. L., Sano-Martins, I. S., & Takehara, H. A. (2000b). Efficacy of bothropic antivenom and its IgG(T) fraction in restoring fibrinogen levels of Bothrops jararaca envenomed mice. *Toxicon*, 38(7), 995–998. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00209-3)
- Ferraz, C. R., Arrahman, A., Xie, C., Casewell, N. R., Lewis, R. J., Kool, J., & Cardoso, F. C. (2019). Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: From pain to hemorrhage and necrosis. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00218>
- Fink, A. L., Calciano, L. J., Goto, Y., Kurotsu, T., & Falleros, D. R. (1994). Classification of Acid Denaturation of Proteins: Intermediates and Unfolded States. *Biochemistry*, 33(41), 12504–12511. <https://doi.org/10.1021/bi00207a018>
- Fox, J. W., & Serrano, S. M. T. (2008). Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS Journal*, 275(12), 3016–3030. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>
- Fox, J. W., & Serrano, S. M. T. (2009). Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of Proteomics*, 72(2), 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.015>
- Fry, B. G. (2005). From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research*, 15(3), 403–420. <https://doi.org/10.1101/gr.3228405>
- Fry, B. G., Vidal, N., Norman, J. A., Vonk, F. J., Scheib, H., Ramjan, S. F. R., ... Hodgson, W. C. (2006). *Early evolution of the venom system in lizards and snakes*. 439(February). <https://doi.org/10.1038/nature04328>



- Gagnon, P., & Nian, R. (2016). Conformational plasticity of IgG during protein A affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1433*, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.022>
- Gagnon, P., Nian, R., Leong, D., & Hoi, A. (2015). Transient conformational modification of immunoglobulin G during purification by protein A affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1395*, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.080>
- Gao, K., Oerlemans, R., & Groves, M. R. (2020). Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. *Biophysical Reviews*, *12*(1), 85–104. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00619-2>
- García, M., Monge, M., León, G., Lizano, S., Segura, E., Solano, G., ... Gutiérrez, J. M. (2002). Effect of preservatives on IgG aggregation, complement-activating effect and hypotensive activity of horse polyvalent antivenom used in snakebite envenomation. *Biologicals*, *30*(2), 143–151. <https://doi.org/10.1006/biol.2002.0329>
- Georgieva, D., Risch, M., Kardas, A., Buck, F., Von Bergen, M., & Betzel, C. (2008). Comparative analysis of the venom proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *vipera ammodytes meridionalis*. *Journal of Proteome Research*, *7*(3), 866–886. <https://doi.org/10.1021/pr070376c>
- Ghose, S., McNerney, T. M., & Hubbard, B. (2002). pH transitions in ion-exchange systems: Role in the development of a cation-exchange process for a recombinant protein. *Biotechnology Progress*, *18*(3), 530–537. <https://doi.org/10.1021/bp020002i>
- Ghosh, R., Calero-Rubio, C., Saluja, A., & Roberts, C. J. (2016). Relating Protein-Protein Interactions and Aggregation Rates from Low to High Concentrations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *105*(3), 1086–1096. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.01.004>
- Gillespie, R., Nguyen, T., Macneil, S., Jones, L., Crampton, S., & Vunnum, S. (2012). Cation exchange surface-mediated denaturation of an aglycosylated immunoglobulin (IgG1). *Journal of Chromatography A*, *1251*, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.037>
- Giorgianni, M. W., Dowell, N. L., Griffin, S., Kassner, V. A., Selegue, J. E., & Carroll, S. B. (2020). The origin and diversification of a novel protein family in venomous snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(20), 10911–10920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920011117>

- Grodzki, A. C., & Berenstein, E. (2010). Antibody purification: affinity chromatography - protein A and protein G Sepharose. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 588, 33–41. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_5)
- Grönberg, A. (2018). Ion Exchange Chromatography. In *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes* (pp. 379–399). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00018-9>
- Gubenšek, F., Sket, D., Turk, V., & Lebez, D. (1974). Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. *Toxicon*, 12(2), 167–168. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(74\)90241-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(74)90241-4)
- Guidolin, F. R., Caricati, C. P., Marcelino, J. R., & da Silva, W. D. (2016). Development of Equine IgG Antivenoms against Major Snake Groups in Mozambique. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004325>
- Guo, J., & Carta, G. (2014). Unfolding and aggregation of a glycosylated monoclonal antibody on a cation exchange column. Part II. Protein structure effects by hydrogen deuterium exchange mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1356, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.038>
- Guo, J., Zhang, S., & Carta, G. (2014). Unfolding and aggregation of a glycosylated monoclonal antibody on a cation exchange column. Part I. Chromatographic elution and batch adsorption behavior. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 1356). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.037>
- Gutiérrez, J. M., Leon, G., Lomonte, B., & Angulo, Y. (2011). Antivenoms for Snakebite Envenomings. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 10(5), 369–380.
- Gutiérrez, J. M., Rojas, E., Quesada, L., León, G., Núñez, J., Laing, G. D., ... Rojas, G. (2005a). Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG: An alternative to the antivenom crisis in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(6), 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2004.09.014>
- Gutiérrez, José Mara, León, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A., & Chaves, F. (1998). Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 36(11), 1529–1538. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00145-7)

- Gutiérrez, José María. (2018). Global availability of antivenoms: The relevance of public manufacturing laboratories. *Toxins*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/toxins11010005>
- Gutiérrez, José María, Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews. Disease Primers*, *3*, 17063. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- Gutiérrez, José María, Rucavado, A., Escalante, T., & Díaz, C. (2005b). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, *45*(8), 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>
- Gutiérrez, José María, Williams, D., Fan, H. W., & Warrell, D. A. (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, *56*(7), 1223–1235. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.020>
- Halassy, B., Kurtović, T., Lang Baliija, M., Brgles, M., Tunjić, M., & Sviben, D. (2019). Concept of sample-specific correction of immunoassay results for precise and accurate IgG quantification in horse plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *164*, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.10.020>
- Hari, S. B., Lau, H., Razinkov, V. I., Chen, S., & Latypov, R. F. (2010). Acid-induced aggregation of human monoclonal IgG1 and IgG2: Molecular mechanism and the effect of solution composition. *Biochemistry*, *49*(43), 9328–9338. <https://doi.org/10.1021/bi100841u>
- Harrison, R. A., Hasson, S. S., Harmsen, M., Laing, G. D., Conrath, K., & Theakston, R. D. G. (2006). Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. *Toxicon*, *47*(3), 364–368. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.10.017>
- Harrison, Robert A., Hargreaves, A., Wagstaff, S. C., Faragher, B., & Laloo, D. G. (2009). Snake envenoming: A disease of poverty. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *3*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000569>
- Hassan, H. S., Najam, A., Parveen, G., Ali, H., Channa, R. A., & Adeel, S. S. (2020). An optimized method of IgG's precipitation with ammonium sulphate from hyper immune horse plasma for snake anti venom production. *International Journal of Molecular Biology: Open Access*, *5*(4), 166–169. <https://doi.org/10.15406/ijmboa.2020.05.00144>

- Hawgood, B. J. (1992). Pioneers of Anti-Venomous Serotherapy : Dr Vital Brazil (1865-1950). *Toxicon*, 30(5/6), 573–579.
- Hempel, B. F., Damm, M., Göçmen, B., Karis, M., Oguz, M. A., Nalbantsoy, A., & Süßmuth, R. D. (2018). Comparative venomics of the vipera ammodytes transcaucasiana and vipera ammodytes montandoni from turkey provides insights into kinship. *Toxins*, 10(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/toxins10010023>
- Isbell, L. A. (2006). Snakes as agents of evolutionary change in primate brains. *Journal of Human Evolution*, 51(March 2004), 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2005.12.012>
- Isbister, G. K. (2010). Antivenom efficacy or effectiveness: The Australian experience. *Toxicology*, 268(3), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.013>
- Isbister, G. K., & Kiernan, M. C. (2005). Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurology*, 4(April), 219–228.
- Ismail, M., & Abd-Elsalam, M. A. (1998). Pharmacokinetics of 125I-labelled IgG, F(ab')<sub>2</sub> and Fab fractions of scorpion and snake antivenins: Merits and potential for therapeutic use. *Toxicon*, 36(11), 1523–1528. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00144-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00144-5)
- Jackson, T. N. W., Koludarov, I., Ali, S. A., Dobson, J., Zdenek, C. N., Dashevsky, D., ... Fry, B. G. (2016). Rapid radiations and the race to redundancy: An investigation of the evolution of Australian elapid snake venoms. *Toxins*, 8(11), 1–24. <https://doi.org/10.3390/toxins8110309>
- Jackson, T. N. W., Sunagar, K., Undheim, E. A. B., Koludarov, I., Chan, A. H. C., Sanders, K., ... Fry, B. G. (2013). Venom down under: Dynamic evolution of Australian elapid snake toxins. *Toxins*, 5(12), 2621–2655. <https://doi.org/10.3390/toxins5122621>
- Jenkins, T. P., Fryer, T., Dehli, R. I., Jürgensen, J. A., Fuglsang-Madsen, A., Føns, S., & Laustsen, A. H. (2019). Toxin neutralization using alternative binding proteins. *Toxins*, 11(1), 1–28. <https://doi.org/10.3390/toxins11010053>
- Jones, R. G. A., & Landon, J. (2002). Enhanced pepsin digestion: A novel process for purifying antibody F(ab')<sub>2</sub> fragments in high yield from serum. *Journal of Immunological Methods*, 263(1–2), 57–74. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00031-5)
- Kang, T. S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M. T., Sinha, M., Kumar, R. P., ... Kini, R. M. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and

- mechanism of catalysis. *FEBS Journal*, 278(23), 4544–4576.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>
- Karabuva, S., Vrkić, I., Brizić, I., Ivić, I., & Lukšić, B. (2016). Venomous snakebites in children in southern Croatia. *Toxicon*, 112, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.01.057>
- Karain, B. D., Lee, M. K. H., & Hayes, W. K. (2016). C60 fullerenes as a novel treatment for poisoning and envenomation: A proof-of-concept study for snakebite. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(7), 7764–7771.  
<https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12851>
- Khamehchian, S., Zolfagharian, H., Dounighi, N. M., Tebianian, M., & Madani, R. (2014). Study on camel IgG purification: A new approach to prepare Naja Naja Oxiana antivenom as passive immunization for therapy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 10(6), 1633–1638. <https://doi.org/10.4161/hv.28531>
- Kittipongwarakarn, S., Hawe, A., Tantipolphan, R., Limsuwun, K., Khomvilai, S., Puttipipatkachorn, S., & Jiskoot, W. (2011). New method to produce equine antirabies immunoglobulin F(ab')<sub>2</sub> fragments from crude plasma in high quality and yield. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 189–195.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.018>
- Knudsen, C., & Laustsen, A. H. (2018). Tropical Medicine and Infectious Disease Recent Advances in Next Generation Snakebite Antivenoms. *Trop. Med. Infect. Dis.*, 3(2), 1–11.  
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020000>
- Koh, C. Y., & Kini, R. M. (2012). From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. *Toxicon*, 59(4), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.03.017>
- Kordzangene, A., Mohebat, R., Mosslemin, M., & Moghadam, A. T. (2018). Improvement of purification methods for F(ab')<sub>2</sub> fraction of equine hyperimmune plasma against scorpion venom. *Biomedical Research (India)*, 29(10), 1968–1973.  
<https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-17-986>
- Kuch, U., Müller, J., Mödden, C., & Mebs, D. (2006). Snake fangs from the Lower Miocene of Germany: Evolutionary stability of perfect weapons. *Naturwissenschaften*, 93(2), 84–87.  
<https://doi.org/10.1007/s00114-005-0065-y>
- Kukongviriyapan, V., & Ratanabanangkoon, K. (1982). SOME PARAMETERS OF

- AFFINITY CHROMATOGRAPHY IN THE PURIFICATION OF ANTIBODY AGAINST NAJA NAJA SIAMENSIS TOXIN 3. *Journal of Immunological Methods*, 49, 97–104.
- Kumar A, S., Singh R, D., & Kumar G, R. (2016). Development of Modified Caprylic Acid Fractionation Method for the Enhanced Yield and Purity of Equine Polyvalent Antisnake Venom Immunoglobulins. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 06(08), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000288>
- Kurtović, T. (2013). *Uloga glavnih toksičnih komponenti otrova poskoka (Vipera ammodytes) u njegovoj imunogenosti s posebnim osvrtom na hemoragične metaloproteinaze. Doktorska disertacija.*
- Kurtović, T., Brgles, M., Balijsa, M. L., Steinberger, S., Sviben, D., Marchetti-Deschmann, M., & Halassy, B. (2020). Streamlined downstream process for efficient and sustainable (Fab')<sub>2</sub> antivenom preparation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 26(July), 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0025>
- Kurtović, T., Lang Balijsa, M., Brgles, M., Sviben, D., Tunjić, M., Cajner, H., ... Halassy, B. (2019). Refinement strategy for antivenom preparation of high yield and quality. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007431. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007431>
- Kurtović, T., Lang Balijsa, M., Brvar, M., Dobaja Borak, M., Mateljak Lukačević, S., & Halassy, B. (2021). Comparison of Preclinical Properties of Several Available Antivenoms in the Search for Effective Treatment of Vipera ammodytes and Vipera berus Envenoming. *Toxins*, 13(211), 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxins13030211>
- Laloo, D. G., & Theakston, R. D. G. (2003). Snake antivenoms. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 41(3), 277–290. <https://doi.org/10.1081/CLT-120021113>
- Lamb, T., de Haro, L., Lonati, D., Brvar, M., & Eddleston, M. (2017). Antivenom for European Vipera species envenoming. *Clinical Toxicology*, 55(6), 557–568. <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1300261>
- Laptoš, T., & Omersel, J. (2018). The importance of handling high-value biologicals: Physico-chemical instability and immunogenicity of monoclonal antibodies (review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4), 3161–3168.

<https://doi.org/10.3892/etm.2018.5821>

- Latinović, Z., Leonardi, A., Šribar, J., Sajevic, T., Žužek, M. C., Frangež, R., ... Križaj, I. (2016). Venomics of *Vipera berus berus* to explain differences in pathology elicited by *Vipera ammodytes ammodytes* envenomation: Therapeutic implications. *Journal of Proteomics*, *146*, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.020>
- Latypov, R. F., Hogan, S., Lau, H., Gadgil, H., & Liu, D. (2012). Elucidation of acid-induced unfolding and aggregation of human immunoglobulin IgG1 and IgG2 Fc. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(2), 1381–1396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.297697>
- Laustsen, Andreas H., Karatt-Vellatt, A., Masters, E. W., Arias, A. S., Pus, U., Knudsen, C., ... McCafferty, J. (2018a). In vivo neutralization of dendrotoxin-mediated neurotoxicity of black mamba venom by oligoclonal human IgG antibodies. *Nature Communications*, *9*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06086-4>
- Laustsen, Andreas H., María Gutiérrez, J., Knudsen, C., Johansen, K. H., Bermúdez-Méndez, E., Cerni, F. A., ... Pucca, M. B. (2018b). Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*, *146*, 151–175. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>
- Laustsen, Andreas Hougaard. (2016). *Recombinant Antivenoms. PhD thesis.*
- León, G., Monge, M., Rojas, E., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2001). Comparison between IgG and F(ab')<sub>2</sub> polyvalent antivenoms: Neutralization of systemic effects induced by Bothrops asper venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. *Toxicon*, *39*(6), 793–801. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00209-9)
- León, Guillermo, Herrera, M., Segura, Á., Villalta, M., Vargas, M., & Gutiérrez, J. M. (2013). Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon*, *76*, 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.010>
- León, Guillermo, Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2005). Anticomplementary activity of equine whole IgG antivenoms: Comparison of three fractionation protocols. *Toxicon*, *45*(1), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.025>
- León, Guillermo, Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, Á., ...

- Gutiérrez, J. M. (2011). Immune response towards snake venoms. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 10(5), 381–398. <https://doi.org/10.2174/187152811797200605>
- León, Guillermo, Segura, Á., Gómez, A., Hernandez, A., Navarro, D., Villalta, M., ... María Gutiérrez, J. (2014). Industrial Production and Quality Control of Snake Antivenoms. *Toxinology*, 1–22. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6649-5\\_24-3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6649-5_24-3)
- León, Guillermo, Vargas, M., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Sánchez, A., ... Gutiérrez, J. M. (2018). Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon*, 151, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.084>
- Leonardi, A., Gubenšek, F., & Križaj, I. (2002). Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon*, 40(1), 55–62. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00188-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00188-X)
- Lepczyński, A., Ozgo, M., Dratwa-Chałupnik, A., Robak, P., Pyć, A., Zaborski, D., & Herosimczyk, A. (2018). An update on medium- and low-abundant blood plasma proteome of horse. *Animal*, 12(1), 76–87. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001409>
- Lewin, M., Samuel, S., Merkel, J., & Bickler, P. (2016). Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A2 and a possible pre-referral treatment for envenomation. *Toxins*, 8(248). <https://doi.org/10.3390/toxins8090248>
- Lewis, J. D., & Nail, S. L. (1997). The influence of ion exchange chromatography conditions on aggregation of equine IgG. *Process Biochemistry*, 32(4), 279–283. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00086-6)
- Lewis, M. J., Wagner, B., & Woof, J. M. (2008). The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. *Molecular Immunology*, 45(3), 818–827. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.158>
- Li, Y., Stern, D., Lock, L. L., Mills, J., Ou, S. H., Morrow, M., ... Cui, H. (2019). Emerging biomaterials for downstream manufacturing of therapeutic proteins. *Acta Biomaterialia*, 95, 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.015>
- Liang, N. S., Pungerčar, J., Križaj, I., Štrukelj, B., & Gubenšek, F. (1993). Expression of fully active ammodytoxin A, a potent presynaptically neurotoxic phospholipase A2, in



- Escherichia coli. *FEBS Letters*, 334(1), 55–59. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81679-T](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81679-T)
- Liu, L. (2018). Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein and Cell*, 9(1), 15–32. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0408-4>
- LoVecchio, F., Klemens, J., Roundy, E. B. A., & Klemens, A. (2003). Serum Sickness Following Administration of Antivenin (Crotalidae) Polyvalent in 181 Cases of Presumed Rattlesnake Envenomation. *Wilderness and Environmental Medicine*, 14(4), 220–221. [https://doi.org/10.1580/1080-6032\(2003\)14\[220:SSFAOA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(2003)14[220:SSFAOA]2.0.CO;2)
- Luo, H., Macapagal, N., Newell, K., Man, A., Parupudi, A., Li, Y., & Li, Y. (2014). Effects of salt-induced reversible self-association on the elution behavior of a monoclonal antibody in cation exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1362(October), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.048>
- Machado, R. L., de Arruda, E. J., Santana, C. C., & Bueno, S. M. A. (2006). Evaluation of a chitosan membrane for removal of endotoxin from human IgG solutions. *Process Biochemistry*, 41(11), 2252–2257. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.015>
- Mackessy, S. P. (2010). Section I . Reptile Toxinology, Systematics, and Venom Gland Structure. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. London, New York: Taylor & Francis Group.
- Mackessy, Stephen P., & Baxter, L. M. (2006). Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zoologischer Anzeiger*, 245(3–4), 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2006.01.003>
- Malina, T., Krecsak, L., & Warrell, D. A. (2008). Neurotoxicity and hypertension following European adder (*Vipera berus berus*) bites in Hungary: Case report and review. *Quarterly Journal of Medicine*, 101(10), 801–806. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcn079>
- Mauk, M. R., Smith, A., & Mauk, G. (2011). An alternative view of the proposed alternative activities of hemopexin. *Protein Science*, 20(5), 791–805. <https://doi.org/10.1002/pro.616>
- Meng, J., John, T. R., & Kaiser, I. I. (1995). Specificity and binding affinity of an anti-crotoxin combinatorial antibody selected from a phage-displayed library. *Biochemical Pharmacology*, 50(12), 1969–1977. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)02095-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)02095-0)
- Miller, I., Friedlein, A., Tsangaris, G., Maris, A., Fountoulakis, M., & Gemeiner, M. (2004).

- The serum proteome of *Equus caballus*. *Proteomics*, 4(10), 3227–3234. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400846>
- Morais, Victor. (2018). Antivenom therapy: Efficacy of premedication for the prevention of adverse reactions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0144-0>
- Morais, Victor, & Massaldi, H. (2012). A model mechanism for protein precipitation by caprylic acid: Application to plasma purification. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59(1), 50–54. <https://doi.org/10.1002/bab.68>
- Morais, VM, & Massaldi, H. (2009). Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 15(1), 2–18. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000100002>
- Moran, N. F., Newman, W. J., Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., & Wilkinson, D. (1998). High incidence of early anaphylactoid reaction to SAIMR polyvalent snake antivenom. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(1), 69–70. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)90959-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90959-2)
- Nawarak, J., Sinchaikul, S., Wu, C. Y., Liau, M. Y., Phutrakul, S., & Chen, S. T. (2003). Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis*, 24(16), 2838–2854. <https://doi.org/10.1002/elps.200305552>
- Nowak, G. (2003). The ecarin clotting time, a universal method to quantify direct thrombin inhibitors. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 33(4), 173–183. <https://doi.org/10.1159/000081505>
- Nudel, B. C., Perdoménico, C., Iácono, R., & Cascone, O. (2012). Optimization by factorial analysis of caprylic acid precipitation of non-immunoglobulins from hyperimmune equine plasma for antivenom preparation. *Toxicon*, 59(1), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.014>
- Otero-Patiño, R., Cardoso, J. L. C., Higashi, H. G., Nunez, V., Diaz, A., Toro, M. F., ... Cifuentes, R. (1998). A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for Bothrops snake bites in Uraba, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(2), 183–189. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.183>

- Otero-Patiño, Rafael, Segura, Á., Herrera, M., Angulo, Y., León, G., Gutiérrez, J. M., ... Ortiz, R. (2012). Comparative study of the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated [IgG and F(ab')<sub>2</sub>] antivenoms, in Bothrops asper bites in Colombia. *Toxicon*, 59(2), 344–355. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.017>
- Otero, Nu, V., Gutie, J. M., Dõâ, A., Miranda, E., Uribe, A. F., ... Arenas, L. C. (1999). A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in Bothrops and Porthidium snake bites in Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. *Toxicon*, 37(October 1998), 895–908.
- Pabst, T. M., & Carta, G. (2007). pH transitions in cation exchange chromatographic columns containing weak acid groups. *Journal of Chromatography A*, 1142(1 SPEC. ISS.), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.066>
- Pallarès, I., & Ventura, S. (2016). Understanding and predicting protein misfolding and aggregation: Insight from proteomics. *Proteomics*, 16(19), 2570–2581. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500529>
- Paolino, G., Di Nicola, M. R., Pontara, A., Didona, D., Moliterni, E., Mercuri, S. R., ... Pampena, R. (2020). Vipera snakebite in Europe: a systematic review of a neglected disease. In *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1111/jdv.16722>
- Paulchamy, C. (2010). Pharmacological perspectives of snake venoms from Viperidae family. *Internet Journal of Pharmacology*, 8(2), 9.
- Pérez, J. S., & Frey, D. D. (2005). Behavior of the inadvertent pH transient formed by a salt gradient in the ion-exchange chromatography of proteins. *Biotechnology Progress*, 21(3), 902–910. <https://doi.org/10.1021/bp040025s>
- Pimenta, D. C., Prezoto, B. C., Konno, K., Melo, R. L., Furtado, M. F., Camargo, A. C. M., & Serrano, Solange, M. T. (2007). Mass spectrometric analysis of the individual variability of Bothrops jararaca venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 1034–1042. <https://doi.org/10.1002/rcm.2931>
- Porter, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. *The Biochemical Journal*, 73(1959), 119–126. <https://doi.org/10.1042/bj0730119>

- Pucca, M. B., Cerni, F. A., Janke, R., Bermúdez-Méndez, E., Ledsgaard, L., Barbosa, J. E., & Laustsen, A. H. (2019). History of envenoming therapy and current perspectives. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01598>
- Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A. R., Chippaux, J. P., Olguín, L., Casasola, A., Guzmán, G., ... Stock, R. P. (2008). Characterization of a new polyvalent antivenom (Antivipmyn® Africa) against African vipers and elapids. *Toxicon*, 52(8), 881–888. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.09.002>
- Raweerith, R., & Ratanabanangkoon, K. (2003). Fractionation of equine antivenom using caprylic acid precipitation in combination with cationic ion-exchange chromatography. *Journal of Immunological Methods*, 282(1–2), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2003.07.014>
- Rodrigo, G., Gruvegård, M., & Van Alstine, J. (2015). Antibody Fragments and Their Purification by Protein L Affinity Chromatography. *Antibodies*, 4(3), 259–277. <https://doi.org/10.3390/antib4030259>
- Rodrigues-Silva, R., Antunes, G. F. C., Velarde, D. T., & Santoro, M. M. (1999). Thermal stability studies of hyperimmune horse antivenoms. *Toxicon*, 37(1), 33–45. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00101-3)
- Rodrigues-Silva, R., Martins, M. S., Magalhães, A., & Santoro, M. M. (1997). Purification and stability studies of immunoglobulins from *Lachesis muta muta* antivenom. *Toxicon*, 35(8), 1229–1238. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00015-9)
- Rodriguez, E. L., Poddar, S., Iftekhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., Ovbude, S., ... Hage, D. S. (2020). Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1157. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>
- Rojas, G., Espinoza, M., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. (1990). Effect of storage temperature on the stability of the liquid polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 28(1), 101–105. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90011-U](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90011-U)
- Rojas, G., Jimenez, M. J., Jose Maria, G., Jiménez, J. M., & Gutiérrez, J. M. (1994). CAPRYLIC ACID FRACTIONATION OF HYPERIMMUNE HORSE PLASMA : DESCRIPTION OF A SIMPLE PROCEDURE PRODUCTION. *Toxicon*, 32(3), 351–363.

- Saetang, T., Treamwattana, N., Suttijitpaisal, P., & Ratanabanangkoon, K. (1997). Quantitative comparison on the refinement of horse antivenom by salt fractionation and ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 700(1–2), 233–239. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00244-2)
- Sajevic, T., Leonardi, A., & Križaj, I. (2011). Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, 57(5), 627–645. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.006>
- Sanz, L., Escolano, J., Ferretti, M., Biscoglio, M. J., Rivera, E., Crescenti, E. J., ... Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *Journal of Proteomics*, 71(1), 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.10.004>
- Sanz, L., Lisle Gibbs, H., Mackessy, S. P., & Calvete, J. J. (2006). Venom proteomes of closely related *Sistrurus rattlesnakes* with divergent diets. *Journal of Proteome Research*, 5(9), 2098–2112. <https://doi.org/10.1021/pr0602500>
- Segura, álvaro, Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2013). Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals*, 41(2), 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.11.001>
- Segura, Á., Herrera, M., González, E., Vargas, M., Solano, G., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2009). Stability of equine IgG antivenoms obtained by caprylic acid precipitation: Towards a liquid formulation stable at tropical room temperature. *Toxicon*, 53(6), 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.012>
- Senji Laxme, R. R., Khochare, S., de Souza, H. F., Ahuja, B., Suranse, V., Martin, G., ... Sunagar, K. (2019). Beyond the ‘Big four’: Venom profiling of the medically important yet neglected Indian snakes reveals disturbing antivenom deficiencies. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007899>
- Shawki, A., Abd El-Baky, N., Ahmed, M., Linjawi, M. H., Aljaddawi, A. A., & Redwan, E. M. (2017). Simple Protocol for immunoglobulin G Purification from Camel “*Camelus dromedarius*” Serum. *Open Life Sciences*, 12(1), 143–155. <https://doi.org/10.1515/biol-2017-0017>
- Shukla, A. A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S., & Low, D. (2007). Downstream processing of monoclonal antibodies-Application of platform approaches. *Journal of*

- Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 848(1), 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.026>
- Silverton, E. W., Navia, M. A., & Davies, D. R. (1977). Three-dimensional structure of an intact human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(11), 5140–5144. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5140>
- Simsiriwong, P., Eursakun, S., & Ratanabanangkoon, K. (2012). A study on the use of caprylic acid and ammonium sulfate in combination for the fractionation of equine antivenom F(ab')<sub>2</sub>. *Biologicals*, 40(5), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.05.002>
- Singla, A., Bansal, R., Joshi, V., & Rathore, A. S. (2016). Aggregation kinetics for IgG1-based monoclonal antibody therapeutics. *AAPS Journal*, 18(3), 689–702. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9887-0>
- Slagboom, J., Kool, J., Harrison, R. A., & Casewell, N. R. (2017). Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *British Journal of Haematology*, 177(6), 947–959. <https://doi.org/10.1111/bjh.14591>
- Solano, S., Segura, Á., León, G., Gutiérrez, J. M., & Burnouf, T. (2012). Low pH formulation of whole IgG antivenom: Impact on quality, safety, neutralizing potency and viral inactivation. *Biologicals*, 40(2), 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.11.006>
- Staby, A., Sand, M. B., Hansen, R. G., Jacobsen, J. H., Andersen, L. A., Gerstenberg, M., ... Jensen, I. H. (2005). Comparison of chromatographic ion-exchange resins: IV. Strong and weak cation-exchange resins and heparin resins. *Journal of Chromatography A*, 1069(1), 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.094>
- Steinbuch, M., & Audran, R. (1969). The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 134(2), 279–284. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(69\)90285-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(69)90285-9)
- Sviben, D., Bertoša, B., Hloušek-Kasun, A., Forcic, D., Halassy, B., & Brgles, M. (2018). Investigation of the thermal shift assay and its power to predict protein and virus stabilizing conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 161, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.017>
- Tao, Y., Ibraheem, A., Conley, L., Cecchini, D., & Ghose, S. (2014). Evaluation of high-

- capacity cation exchange chromatography for direct capture of monoclonal antibodies from high-titer cell culture processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(7), 1354–1364. <https://doi.org/10.1002/bit.25192>
- Tarrant, R. D. R., Velez-Suberbie, M. L., Tait, A. S., Smales, C. M., & Bracewell, D. G. (2012). Host cell protein adsorption characteristics during protein a chromatography. *Biotechnology Progress*, 28(4), 1037–1044. <https://doi.org/10.1002/btpr.1581>
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., & Griffiths, E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, 41(5), 541–557. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00393-8)
- Tiselius, A., & Kabat, E. A. (1938). An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *Journal of Experimental Medicine*, 69(1), 119–132. <https://doi.org/10.1084/jem.69.1.119>
- Tomovic, L. (2006). Systematics of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus, 1758). *Herpetological Journal*, 16(2), 191–201.
- Tomović, L., Crnobrnja-Isailović, J., & Brito, J. C. (2010). The use of geostatistics and GIS for evolutionary history studies: The case of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*) in the Balkan Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101(3), 651–666. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01513.x>
- Trapp, A., Faude, A., Hörold, N., Schubert, S., Faust, S., Grob, T., & Schmidt, S. (2018). Multiple functions of caprylic acid-induced impurity precipitation for process intensification in monoclonal antibody purification. *Journal of Biotechnology*, 279(December 2017), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.001>
- Tunjić, M., Brgles, M., Kurtović, T., Cajner, H., & Halassy, B. (2017). Anion exchange chromatography in the batch mode as a method for purification of equine IgGs from the plasma. *Annual Meeting of the Croatian Immunological Society with EFIS on Tour*, 2.
- Ursenbacher, S., Schweiger, S., Tomović, L., Crnobrnja-Isailović, J., Fumagalli, L., & Mayer, W. (2008). Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): Evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan

- peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(3), 1116–1128. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.11.002>
- Uversky, V., Breydo, L., & Redington, J. (2017). When Good Goes Awry: The Aggregation of Protein Therapeutics. *Protein & Peptide Letters*, 24(4), 340–347. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170209153421>
- Vargas, M., Segura, Á., Villalta, M., Herrera, M., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2015). Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two phase system as a primary purification step. *Biologicals*, 43(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.10.003>
- Vidal, N. (2002). Colubroid systematics: Evidence for an early appearance of the venom apparatus followed by extensive evolutionary tinkering. *Journal of Toxicology - Toxin Reviews*, 21(1–2), 21–41. <https://doi.org/10.1081/TXR-120004740>
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2014). *Squamates-Part II. Snakes u: Gomes, K (ur.) Herpetology, An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles, Elsevier, London, Waltham, San Diego.*
- Wang, W. (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 185, 129–188.
- Warrell, D. A. (2005). Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes. *British Medical Journal*, 331(7527), 1244–1247. <https://doi.org/10.1136/bmj.331.7527.1244>
- Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)
- Warrell, D. A. (2019). Venomous Bites, Stings, and Poisoning: An Update. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 17–38. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.001>
- Watson, J. A., Lamb, T., Holmes, J., Warrell, D. A., Thwin, K. T., Aung, Z. L., ... Ashley, E. A. (2020). A Bayesian phase 2 model based adaptive design to optimise antivenom dosing: Application to a dose-finding trial for a novel Russell’s viper antivenom in myanmar. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(11), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008109>
- WHO. (2016). EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION Geneva , 17 to 21 October 2016 WHO Guidelines for the Production , Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. *World Health Organization*, (October), 1–138.



- WHO. (2019). A strategie for prevention and control. Retrieved from Snakebite envenoming website: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/324838/9789241515641-eng.pdf>
- Williams, D., Gutiérrez, J. M., Harrison, R., Warrell, D. A., White, J., Winkel, K. D., & Gopalakrishnakone, P. (2010). The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 89–91. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61159-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61159-4)
- Williams, D. J., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Wüster, W., Ratanabanangkoon, K., Paiva, O., ... Warrell, D. A. (2011). Ending the drought: New strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1735–1767. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.027>
- Xu, L., & Glatz, C. E. (2009). Predicting protein retention time in ion-exchange chromatography based on three-dimensional protein characterization. *Journal of Chromatography A*, 1216(2), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.075>
- Zanetti, G., Duregotti, E., Locatelli, C. A., Giampreti, A., Lonati, D., Rossetto, O., & Pirazzini, M. (2018). Variability in venom composition of European viper subspecies limits the cross-effectiveness of antivenoms. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28135-0>
- Zolfagharian, H., & Mohammadpour Dounighi, N. (2013). Progress and improvement of the manufacturing process of snake antivenom. *Archives of Razi Institute*, 68(1), 1–10. <https://doi.org/10.7508/ari.2013.01.001>

**8. POPIS OZNAKA, SIMBOLA I KRATICA**

A	apsorbancija
AC	afinitetna kromatografija (engl. <i>affinity chromatography</i> )
ACN	acetonitril
AEX	kromatografija izmjenom aniona (engl. <i>anion-exchange chromatography</i> )
ASP	taloženje amonijevim sulfatom (engl. <i>ammonium sulphate precipitation</i> )
Atx	Amoditoksin (engl. <i>ammodytoxin</i> )
BSA	albumin iz seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CA	kaprilna kiselina (engl. <i>caprylic acid</i> )
CAP	taloženje kaprilnom kiselinom (engl. <i>caprylic acid precipitation</i> )
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CEX	kromatografija izmjenom kationa (engl. <i>cation-exchange chromatography</i> )
DTT	ditiotreitol
DSF	diferencijalna pretražna fluorimetrija (engl. <i>differential scanning fluorimetry</i> )
ED <sub>50</sub>	srednja efektivna doza
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ELISA	enzimski imunotest na čvrstoj fazi (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
Eu.Ph.	Europska Farmakopeja (engl. <i>European Pharmacopoeia</i> )
Fab	engl. <i>antigen-binding fragment</i>
Fc	engl. <i>fragment crystallizable</i>
FT	engl. <i>flow through</i>
GMP	dobra proizvodna praksa (engl. <i>good manufacturing production</i> )
H	hemoragin
HCCA	$\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetna kiselina
HKP	hiperimuna konjska plazma (engl. <i>hyperimmune horse plasma</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
IAA	jodoacetamin (engl. <i>iodoacetamide</i> )
IEX	ionsko-izmjenjivačka kromatografija (engl. <i>ion-exchange chromatography</i> )
IgG	imunoglobulin G

---

IgG-HRP	imunoglobulin G konjugiran s peroksidazom iz hrena
kDa	kilodalton
LD <sub>50</sub>	srednja letalna doza
MALDI	matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i> )
MES	2-(N-morfolino)-etansulfonska kiselina
MOPS	3-(N-morfolino)-propansulfonska kiselina
MS	masena spektrometrija
MS/MS	tandemna masena spektrometrija
NaCA	natrijev kaprilat
OPD	<i>o</i> -fenilendiamin dihidroklorid (engl. <i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i> )
PGM	peptidoglikanski monomer
pI	izoelektrična točka (engl. <i>isoelectric point</i> )
PJ	proizvoljna jedinica
PMF	otisak prsta peptida (engl. <i>peptide mass fingerprint</i> )
rpm	okretaji po minuti (engl. <i>rounds per minute</i> )
QA	kvaterni amin (engl. <i>quaternary amine</i> )
R	zaštitna moć
SEC	kromatografija isključenjem po veličini (engl. <i>size-exclusion chromatography</i> )
SDS-PAGE	denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijeva dodecilsulfata (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
TFA	trifluor octena kiselina (engl. <i>trifluoroacetic acid</i> )
<i>T<sub>m</sub></i>	temperatura mekšanja (engl. <i>melting temperature</i> )
TOF	detektor vremena leta iona (engl. <i>time of flight</i> )
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
<i>Vaa</i>	lat. <i>Vipera ammodytes ammodytes</i>
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )

## 9. ŽIVOTOPIS

Sanja Mateljak Lukačević rođena je 06.02.1971. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu. Godine 1995. obranila je diplomski rad pod naslovom “Biljezi stanične opne limfocita miševa CBA s mamarnim karinomom (Mca)” izrađen pod vodstvom prof. dr. sc. Dunje Košute i time stekla zvanje diplomiranog inženjera biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, usmjerenje molekularna biologija. Nakon toga zapošljava se u Imunološkom zavodu u Odjelu za proizvodnju virusnih cjepiva, gdje se uz proizvodnju bavi i istraživačkim radom te 1997. godine upisuje poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Magistarski rad izradila je u Imunološkom zavodu u Laboratoriju za radioimunologiju i kemiju Odjela za istraživanje i razvoj pod mentorstvom prof. dr. sc. Jelke Tomašić. Godine 2005. magistrirala je s radom naslova “Imunogenost sintetskih peptida koji sadrže T- i B-epitope proteina virusa ospica i utjecaj peptidoglikanskog monomera (PGM) kao adjuvanta“. Godine 2008. obiteljski razlozi odvede je u inozemstvo gdje zadnjih pet mjeseci boravka tijekom 2016. godine radi u Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Tehnološkom sveučilištu u Singapuru kao znanstveni suradnik. Naredne dvije godine živi u Francuskoj, a prekinutu znanstvenu karijeru nastavila je 2018. kada se zapošljava u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu kao asistentica u sustavu znanosti i visokog obrazovanja, te upisuje doktorski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. U sklopu međunarodne suradnje tijekom svibnja 2019. godine boravi na stručnom usavršavanju na Tehničkom sveučilištu u Beču (*Technische Universität Wien*, Austrija) u laboratoriju prof. dr. sc. Martine Marchetti-Deschmann.

### STRUČNO USAVRŠAVANJE

1. Istraživački boravak na Tehničkom sveučilištu u Beču (*Technische Universität Wien*), Austrija, 02.05.-31.05.2019.
2. Western blotting workshop, 02.04.2019., Zagreb, Hrvatska
3. Praktična radionica “Analiza, identifikacija i kvantifikacija proteina spregnutim metodama tekućinske kromatografije i spektrometrije masa”, 26-28.02.2019. BIOCentar, Zagreb, Hrvatska
4. XIX. International Chromatography School, 10.–11.06.2019., Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska
5. Viral neurovirulence research and new alternatives for *in vivo* testing, 21.02.2019., Centar izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva, Zagreb, Hrvatska

6. Responsible Care and Use of Laboratory Animals Course, 08.03.2016., SingHealth Experimental Medicine Centre and SingHealth Office of Research, Singapur
7. Process Development, The science of Bioproduction, 16.11.2006., Invitrogen™, Minhen, Njemačka
8. Advances in Cell Culture for Clinic and Pharmaceutical Industry, Science and Technology International Courses, 18.-21.11.2001., Academic Business Centre of Leiden University, Leiden, Nizozemska
9. Current Good Manufacturing Practices for biotechnological products (short course), Science and Technology International Courses, 22.-23.11.2001., Academic Business Centre of Leiden University, Leiden, Nizozemska
10. Fifth International Course on Laboratory Animal Science and Experimental Design, 10.-21.01.2000., Department of Animal Breeding, Nutrition and Laboratory Animal Science Szent István University of Veterinary Science, Budimpešta, Mađarska
11. Effector Functions of Immune Cells, 11.14.10.1998., European Federation of Immunological Societies (EFIS) and Croatian Immunological Society, Dubrovnik, Hrvatska
12. Sixth International Summer School of Biophysics-Supramolecular Structure and Function, 15.27.09.1997., Rovinj, Hrvatska

#### PRIOPĆENJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2021, 23.-25.09.2021. – postersko priopćenje pod naslovom “Influence of production conditions on IgG-based snake antivenoms' stability properties“ (autori: S. Mateljak Lukačević, T. Kurtović, M. Brgles, S. Steinberger, M. Marchetti-Deschmann, J. Borić, B. Halassy)
2. First European Venom Network International Congress, 14-16-09.2021., online – postersko priopćenje pod naslovom “Quality-related properties of the whole IgG snake antivenoms obtained by five refinement protocols“ (autori: S. Mateljak Lukačević, T. Kurtović, M. Brgles, S. Steinberger, M. Marchetti-Deschmann, B. Halassy)
3. 4. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, 28.02.2020., Zagreb, Hrvatska – postersko priopćenje pod naslovom “Usporedba različitih postupaka izolacije terapijskih imunoglobulina G iz hiperimune konjske plazme“ (autori: S. Mateljak Lukačević, T. Kurtović, M. Brgles, S. Steinberger, M. Marchetti-Deschmann, B. Halassy)

4. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2019, 11.-12.10.2019., Rovinj, Hrvatska - postersko priopćenje pod naslovom "Comparative study of different whole IgG snake antivenom refinement strategies and their impact on the purified IgG features" (autori: S. Mateljak Lukačević, T. Kurtović, M. Brgles, S. Steinberger, M. Marchetti-Deschmann, B. Halassy)
5. 6th International Meeting on Toxinology, Venoms and Toxins, 28.-29.08.2019., Oxford, Ujedinjeno Kraljevstvo – postersko priopćenje pod naslovom "Comparison of five protocols for the whole IgG snake antivenom purification in terms of stability, purity and immunoglobulin subclass composition" (autori: S. Mateljak Lukačević, T. Kurtović, M. Brgles, B. Halassy)
6. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2018, 19.-20.10.2018., Zadar, Hrvatska - postersko priopćenje pod naslovom "The subtle change in the antivenom purification protocol affects differently intermediates and the final product" (autori: S. Mateljak Lukačević, T. Kurtović, M. Brgles, B. Halassy)
7. Third World Congress on Vaccines and Immunisation, 04.-09.06.2002., Opatija, Hrvatska - postersko priopćenje pod naslovom "Adjuvant effect of peptidoglycan monomer in immune reaction specific for synthetic peptides of measles virus origin" (autori: S. Mateljak, B. Halassy Špoljar, B. Dojnović, F.F. Bouche, M.M. Putz, P.C. Muller, J. Tomašić)
8. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2001, Zagreb, Hrvatska – postersko priopćenje pod naslovom "Immunogenicity of synthetic peptides of measles virus origin and influence of peptidoglycan monomer as adjuvant" (autori: S. Mateljak, B. Halassy Špoljar, B. Dojnović, F.F. Bouche, M.M. Putz, P.C. Muller, J. Tomašić)

#### POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

1. Kurtović, T.; Lang Balijsa, M.; Brvar, M.; Dobaja Borak, M.; Mateljak Lukačević, S.; Halassy, B. Comparison of Preclinical Properties of Several Available Antivenoms in the Search for Effective Treatment of *Vipera ammodytes* and *Vipera berus* Envenoming. *Toxins* 2021, 13, 211.
2. Mateljak Lukačević, S.; Kurtović, T.; Lang Balijsa, M.; Brgles, M.; Steinberger, S.; Marchetti-Deschmann, M.; Halassy, B. Quality-related properties of equine immunoglobulins purified by different approaches. *Toxins* 2020, 12, 798.

3. Košutic-Gulija, T.; Forčić, D.; Šantak, M.; Ramljak, A.; Mateljak Lukačević, S.; Mažuran, R. Genetic heterogeneity of L-Zagreb mumps virus vaccine strain. *Virology Journal* 2008 Jul 10, 5,79.
4. Halassy, B.; Mateljak, S.; B. Bouche, F. B.; Pütz, M. M.; Muller, C. P.; Frkanec, R.; Habjanec, L.; Tomašić, J. Immunogenicity of peptides of measles virus origin and influence of adjuvants. *Vaccine* 2006, 24(2), 185-194.

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost “Razvoj održivog procesa prerade antitoksina (ANTI TOX NEW)” (IP-09-2014).