

Evaluation of the performance of affinity matrix produced from improved variants of S3 peptide to remove endotoxin from Active pharmaceutical ingredient of streptokinase and comparison with commercial matrices

Shahin Hadadian ^{1*} , Mina Sepahi ¹ , Reza Ahangari Cohan ¹ 

¹Dept of Nanobiotechnology, Group of New Technologies, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:

Received: Jan. 31, 2024

Received in Revised Form:

May. 18, 2024

Accepted: May. 28, 2024

Published Online: Oct. 05, 2024

*** Correspondence to:**

Shahin Hadadian

Dept of Nanobiotechnology,
Group of New Technologies,
Pasteur Institute of Iran,
Tehran, Iran

Email:

hadadian@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: Endotoxin or lipopolysaccharide (LPS) is one of the components of the wall of gram-negative bacteria, which, when in contact with blood, stimulates the immune system and causes fever and even serious adverse effects or death. Removing endotoxin is one of the most daunting challenges presented to the purification process in the production of recombinant biological drugs. Bacterial endotoxin (LPS) is resistant to heat and passes through sterilizing filters, and due to its dangerous side effects in living organisms, part of the target protein purification process is always related to removing this disturbing factor from the product.

Materials & Methods: The affinity matrix S3E3-S-Sepharose, which was produced by immobilizing the improved variant of antimicrobial peptide S3 called S3E3 peptide on Sepharose chromatography resin, was used to remove endotoxin from active pharmaceutical ingredient (API) of streptokinase, and the performance of this matrix was compared with the performance of a disposable commercial matrix (containing S3 peptide as its ligand) and with ion exchange chromatography resin.

Results: The statistical analysis of the results revealed that compared to commercial S3 matrices and ion exchange chromatography, the S3E3-S-Sepharose matrix had higher protein recovery (84.07% compared to 81.50 and 75.31%, respectively) and higher streptokinase biological activity recovery (81.95% vs. 27.76 and 61.54%, respectively).

Conclusion: As evidenced by the obtained results, the S3E3-S-Sepharose matrix seems to be a suitable candidate for use in the purification processes of Streptokinase API and other recombinant biopharmaceuticals.

Keywords: Active pharmaceutical ingredient of Streptokinase, Anti-microbial S3, Endotoxin removal, Improved variants of S3

How to cite this paper: Hadadian Sh, Sepahi M, Ahangari Cohan R. Effectiveness of process-based therapy in working memory and sleep quality in women suffering from anemia comorbid with generalized anxiety disorder. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2024;32(4):27-41.



ارزیابی کارایی ماتریس تمایلی حاصله از واریانت بهبودیافته پتید S3 در حذف اندوتوکسین از ماده دارویی فعال استرپتوکیناز و مقایسه عملکرد آن با ستون‌های تجاری

شاهین حدادیان^{۱*} ID، مینا سپاهی^۱ ID، رضا آهنگری کهن^۱ ID

^۱ گروه نانو بیوتکنولوژی، گروه تحقیقات فن آوری‌های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: اندوتوکسین یا همان لیپوپلی ساکارید (LPS) یکی از اجزای دیواره باکتری‌های گرم منفی است که در صورت تماس با خون، باعث تحریک دستگاه ایمنی و باعث بروز تب و حتی عوارض نامطلوب جدی یا مرگ می‌شود. حذف اندوتوکسین از مهم‌ترین چالش‌های فرایند تخلیص در تولید داروهای زیستی نو ترکیب است. اندوتوکسین باکتریایی (LPS) در برابر گرما مقاوم است و از فیلترهای سترون‌کننده نیز عبور می‌کند و به علت عوارض خطرناک آن در موجود زنده، همواره بخشی از مراحل تخلیص پروتئین هدف به حذف این عامل مزاحم از محصول مربوط است.

مواد و روش‌ها: از ماتریس تمایلی S3E3-S-Sepharose که از تثبیت واریانت بهبودیافته پتید ضد میکروبی S3 موسوم به پتید S3E3 بر روی رزین کروماتوگرافی سفاروز تولید شده است، برای حذف اندوتوکسین از ماده دارویی فعال استرپتوکیناز استفاده گردید و عملکرد این ماتریس با عملکرد تجاری یک بار مصرف دارای لیگاند S3 و رزین تعویض یونی مقایسه شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج بیان‌کننده این بود که ماتریس S3E3-S-Sepharose در مقایسه با ماتریس تمایلی تجاری بر پایه لیگاند S3 و کروماتوگرافی تعویض یونی، از بازده بازیابی پروتئین بیشتر (۸۴/۰۷ درصد در مقایسه با ۸۱/۵۰ درصد و ۷۵/۳۱ درصد) و بازیابی فعالیت بیولوژیک بیشتر (۸۱/۹۵ درصد در مقابل ۷۶/۲۷ درصد و ۶۱/۵۴ درصد) برخوردار بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که ماتریس S3E3-S-Sepharose برای استفاده در فرایندهای تخلیص ماده دارویی فعال استرپتوکیناز و سایر داروهای زیستی نو ترکیب، کاندیدای مناسبی به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: پتید ضد میکروبی S3، حذف اندوتوکسین، واریانت بهبودیافته S3، ماده دارویی فعال استرپتوکیناز

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴

نویسنده مسئول:

شاهین حدادیان

گروه نانو بیوتکنولوژی، گروه تحقیقات فن آوری‌های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

Email:

hadadian@yahoo.com

استناد: حدادیان شاهین، سپاهی مینا، آهنگری کهن رضا. ارزیابی کارایی ماتریس تمایلی حاصله از واریانت بهبودیافته پتید S3 در حذف اندوتوکسین از ماده دارویی فعال استرپتوکیناز و مقایسه عملکرد آن با ستون‌های تجاری. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، مهر ۱۴۰۳؛ ۳۲(۴): ۲۷-۴۱.



«اندوتوکسین» یا همان لیپوپلی ساکارید (LPS) دیواره باکتری‌های گرم منفی است که در صورت تماس با خون، باعث تحریک دستگاه ایمنی و باعث بروز تب و حتی عوارض نامطلوب جدی یا مرگ می‌شود (۱). بر اساس ملزومات کنترل کیفیت، محصولات تزریقی باید عاری از عوامل تب‌زا و در رأس آن‌ها اندوتوکسین باشند (۲). تقریباً سه‌چهارم سطح باکتری گرم منفی از LPS تشکیل شده است که در برهم‌کنش‌های سلول باکتری با محیط و سلول‌های میزبان پیرامون خود نقش مهمی ایفا می‌کند. به‌طور طبیعی، باکتری‌های گرم منفی محدودی هستند که LPS ندارند و به‌جای آن، ترکیبات آلفی‌فیلیک دیگری را حمل می‌کنند؛ بنابراین، غیر از موارد استثنا می‌توان اندوتوکسین یا همان LPS را به‌عنوان یکی از ویژگی‌های خاص باکتری‌های گرم منفی در نظر گرفت (۳). مولکول‌های LPS در همه‌ی مراحل تقسیم سلولی، مرگ و لیز شدن دیواره‌ی سلول در محیط آزاد می‌شوند. از آنجاکه باکتری‌ها می‌توانند در محیط‌هایی با کمبود مواد مغذی مانند آب و بافرها رشد کنند؛ بنابراین، اندوتوکسین‌ها تقریباً در همه‌جا یافت می‌شوند و فرایندهای دارویی و تجهیزات آن‌ها همواره در معرض خطر آلودگی به اندوتوکسین قرار دارند (۴). علاوه بر این، ریسک اندوتوکسین همواره ناشی از آلوده شدن محصول نیست و گاهی به علت میزبان استفاده‌شده در فرایند تولید، آلودگی ذاتی فرایند محسوب می‌گردد؛ به‌عنوان مثال، در همه‌ی محصولات نو ترکیب که در میزبان باکتری گرم منفی بیان و تولید می‌شوند، اندوتوکسین حاصل از میزبان همواره در فرایند وجود دارد و لازم است در فرایند، مراحل با هدف حذف آن از محصول اصلی طراحی و اجرا گردند (۵، ۳).

ماتریس‌های تمایلی حذف اندوتوکسین با استفاده از لیگاند پپتید ضد میکروبی به علت سمیت پایین لیگاند و کارایی مناسب، از جمله روش‌های حذف اندوتوکسین از فرآورده‌های دارویی است. ماتریس تمایلی S-3E3 Sepharose که از تثبیت کووالان واریانت بهبود یافته پپتید ضد میکروبی S3 بر روی رزین کروماتوگرافی سفاروز

تهیه شده است، یک ماتریس تمایلی جدید برای حذف اندوتوکسین از فرآورده‌های دارویی زیستی است (۶، ۷). پپتید ضد میکروبی S3 که از پروتئین فاکتور C موجود در همولنف خرچنگ نعل‌اسبی مشتق شده است، خاصیت سمیت بسیار اندک و تمایل بالایی برای اتصال به LPS دارد. پپتید S3 در توالی خود پایانه‌های N و C آزاد و همچنین سه اسید آمینه لیزین و سه گلو تامیک اسید و یک سیستئین دارد؛ بنابراین، تثبیت این پپتید با هریک از گروه‌های عاملی آمین نوع اول، کربوکسیل و سولفیدریل ممکن است. از این میان، تثبیت غیر اختصاصی و هتروژن پپتید S3 بر روی ماتریس آگاروز با لینکر دی‌آمینودی‌پروپیل آمین (DADPA) گزارش شده بود (۸)؛ اما تثبیت هتروژن پپتید از طریق گروه کربوکسیل موجود در انتهای C و سه اسید آمینه گلو تامیک اسید، بازیابی اندک پروتئین‌های اسیدی و یک‌بار مصرف بودن ماتریس حاصله از معایب اصلی آن بود (۹). نویسندگان مقاله حاضر در تحقیقات پیشین خود، با هدف امکان تثبیت اختصاصی پپتید ضد میکروبی S3 از طریق گروه کربوکسیل آزاد در ترمینال C پپتید توانستند با حذف سه اسید آمینه گلو تامیک اسید از پپتید S3، به واریانت بهبود یافته موسوم به S3E3 دست یابند که بر اساس نتایج بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی آن از سرور ProtParam از پرتال ExPASy (۱۰)، بار خالص واریانت بهبود یافته (S3E3) از پپتید S3، سه بار مثبت بیشتر بود؛ همچنین بر طبق نتایج پیش‌بینی خاصیت ضد میکروبی از بانک اطلاعاتی آنالین CAMP R3 (۱۱) و پیش‌بینی سمیت همولیتیک با استفاده از سرور HemoPI (۱۲)، واریانت S3E3 نسبت به پپتید S3، خاصیت ضد میکروبی بیشتر و سمیت کمتری داشت. محققان مقاله حاضر در تحقیقات پیشین خود، با استفاده از آزمون بازدارندگی واکنش LAL، به مقایسه غلظت‌های خنثی‌سازی پنجاه درصدی اندوتوکسین (ENC50) در واکنش LAL پرداختند و غلظت میانگین ENC50 پپتیدهای S3 و S3E3 را به ترتیب ۱/۴۲ و ۰/۶۸۶ میکرومولار گزارش کردند (۱۳). به‌طور خلاصه، اساس این آزمون بر پایه‌ی واکنش اندوتوکسین و LAL استوار است. در واکنش LAL، عامل C در حضور اندوتوکسین به آنزیم فعال

تبدیل می‌شود و آنزیم فعال شده باعث تغییر در ساختار سوبسترای کروموژنیک شکستن پیوند میان بخش پپتیدی آن و بخش مولد رنگ آن (پارا نیتروآنالین) می‌گردد و با آزاد شدن پارانیتر و آنالین در محیط، باعث انتشار رنگ زرد (قابل اندازه‌گیری در طول موج ۴۰۵ نانومتر) می‌شود (۳). در آزمون بازدارندگی واکنش LAL، اتصال پپتید ضد میکروبی به LPS مانع از اتصال LPS به عامل C می‌گردد و در نتیجه، عامل C فعال شده کمتری تولید می‌شود و در نتیجه، باعث صدور رنگ زرد کمتری در تست کروموژنیک می‌گردد (۱۴). بر اساس این توضیحات، کاهش غلظت ENC50 واریانت بهبود یافته S3E3، بیان‌کننده افزایش میل تمایلی اتصال آن به LPS بود.

نویسندگان این مقاله در ادامه، واریانت بهبود یافته S3E3 را از طریق دو جایگاه مختلف ناحیه کربوکسیل انتهایی و طریق جایگاه گروه سولفیدریل آزاد در اسید آمینه سیستئین بر روی رزین سفاروز تثبیت کردند و با مقایسه عملکرد دو ستون تمایلی حاصله در حذف اندوتوکسین از پروتئین مدل آلبومین، بازده حذف بیشتر اندوتوکسین و بازیابی بیشتر پروتئین را برای حالت تثبیت از طریق گروه سولفیدریل آزاد برای ماتریس تمایلی حاصله موسوم ماتریس S3E3-S-Sepharose گزارش نمودند (۶). آنان همچنین اثر pH، غلظت نمک و غلظت اندوتوکسین نمونه را روی ظرفیت جذب استاتیک ماتریس و میزان بازیابی پروتئین مدل‌سازی و بهینه‌سازی کردند (۷). در همه تحقیقات پیشین یادشده، در همه مراحل از پروتئین آلبومین به‌عنوان پروتئین مدل استفاده گردید؛ اما به حذف اندوتوکسین از محلول پروتئینی با شرایط بافری واقعی در عملیات تولید پرداخته نشده و همچنین تأثیر آن بر نتایج کنترل کیفی محصول در شرایط واقعی بررسی نشده است؛ بنابراین، در تحقیق حاضر عملکرد ماتریس تمایلی S3E3-S-Sepharose به‌عنوان بهترین ماتریس تمایلی حاصله از واریانت S3E3، برای حذف آلودگی اندوتوکسین در شرایط واقعی از ماده دارویی فعال استرپتوکیناز بررسی شد. پروتئین استرپتوکیناز نوترکیب به علت داشتن بار منفی، نمونه مناسبی برای احتمال اتلاف بسیار پروتئین ناشی از اتصال

غیر اختصاصی به ماتریس تمایلی بود. در پایان عملیات حذف اندوتوکسین، تأثیر این فرایند بر نتایج آزمون‌های اصلی کنترل کیفی این محصول شامل آلودگی اندوتوکسین، فعالیت بیولوژیک و درصد خلوص آن ارزیابی شد و با نتایج دوروش حذف اندوتوکسین با ماتریس تمایلی تجاری و روش کروماتوگرافی تعویض یونی-آنیونی مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

ارزیابی کارایی ماتریکس S3E3-S-Sepharose در حذف آلودگی اندوتوکسینی از ماده دارویی فعال استرپتوکیناز نوترکیب: از این ماتریس و ماتریس تجاری EndoBind به‌عنوان روش‌های پیشنهادی دوباره کاری و از رزین کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE Sepharose Fast Flow به‌عنوان روش باز فرآوری برای حذف اندوتوکسین از API استرپتوکیناز با غلظت پروتئین mg/ml 10 استفاده شد. برای مقایسه کارایی ماتریس‌های یادشده، ابتدا LPS به‌دست آمده از باکتری E. Coli O55: B5 به API استرپتوکیناز به میزانی اضافه گردید تا بار آلودگی اندوتوکسینی این محصول به میزان ۱۰۰۰ برابر حد مجاز آلودگی اندوتوکسین در شناسنامه کیفی این محصول تأمین شود. بر اساس شناسنامه کیفی این محصول، محدوده مجاز اندوتوکسین در هر صد هزار واحد بین‌المللی (IU) استرپتوکیناز، حداکثر ۱۰ واحد اندوتوکسین (EU) است. از آنجا که فعالیت بیولوژیک API استرپتوکیناز نوترکیب استفاده‌شده در این تحقیق 106 IU/ml بود؛ بنابراین، حداکثر میزان آلودگی مجاز آن 100 EU/ml محاسبه شد و به میزان هزار برابر معادل 100.000 EU/ml اندوتوکسین اضافه گردید. این میزان آلودگی، با فرض در نظر گرفتن غلظت بحرانی تشکیل فرم‌های تجمع‌یافته اندوتوکسین (CAC)، معادل 114000 EU/ml (۱۶، ۱۵)، تقریباً معادل CAC ۰/۸۷۷ است. برای تخمین میزان ماتریس مورد نیاز، در مورد ماتریس S3E3-S-Sepharose از مدل به‌دست آمده از تحقیق پیشین درباره مدل‌سازی شرایط عملیاتی این ماتریس، برای تخمین ظرفیت جذب استاتیک (SBC) استفاده شد (۷). برای این منظور، شرایط pH و قدرت یونی بافر API استرپتوکیناز

برای تخمین حجم ماتریس تعویض یونی مورد نیاز، توجه به اشغال بخش عمده ظرفیت ماتریکس توسط اندوتوکسین، بر اساس رویه جاری عملیاتی، ظرفیت جذب 15 mg برای هر 1 ml ماتریس در نظر گرفته شد. به منظور تعویض بافر API برای امکان اعمال به ستون تعویض یونی، از روش اولترافیلتر (micropcone, 10 KD) و بافر Tris-HCl 200mM, pH 8.0 استفاده گردید.

حجم‌های محاسبه‌شده از ماتریس‌های یادشده که در جدول شماره ۱ نشان داده شده‌اند. در ستون‌های کروماتوگرافی پلاستیکی دارای فیلتر نگه‌دارنده رزین که با قرار دادن در محلول سدیم هیدروکسید ۱ مولار به مدت دو ساعت و آب کشی با آب تزریقی، بهداشتی‌سازی شده بودند، ریخته شد.

NaH₂PO₄.2H₂O 0.39, NaGlutamate.H₂O 20.5 g/l و g/l (Na₂HPO₄ 1.39 g/l) اندازه‌گیری گردید (pH 7.2) و هدایت الکتریکی ۰.۷۵ mS/cm². با وارد کردن مقادیر pH، غلظت اندوتوکسین و غلظت نمک در معادله مدل تخمین زده‌شده، ظرفیت جذب استاتیک این ماتریس تخمین زده شد و میزان ظرفیت جذب عملیاتی حدود ۲۵ درصد SBC تخمین زده‌شده لحاظ گردید؛ سپس با تقسیم میزان آلودگی اندوتوکسین بر ظرفیت جذب عملیاتی، حجم مورد نیاز از ماتریس تعیین شد.

درباره ماتریس تجاری Endobind، میزان ظرفیت جذب ماتریس 200.000 EU/ml عنوان شده بود. برای اطمینان از اشباع نشدن ماتریس، میزان ظرفیت جذب عملیاتی معادل ۲۵ درصد مقدار عنوان‌شده در نظر گرفته شد و میزان ماتریس مورد نیاز محاسبه گردید.

جدول شماره ۱. مقادیر استفاده‌شده از هر یک از ماتریس‌ها برای حذف 100.000 EU/ml اندوتوکسین

حجم مورد نیاز μl	ظرفیت جذب			ماتریس کروماتوگرافی	ردیف
	واحد	عملیاتی	اسمی		
147.6~150	EU/ ml of matrix	6.775×10 ⁵	*2.71×10 ⁶	S3E3-S-Sepharose	۱
2000		5.0×10 ⁴	**2.0×10 ⁵	EndoBind	۲
677.7~700	mg protein/ ml of matrix	#15	**100	Sepharose-DEAE-F.F.	۳

*: ظرفیت جذب اسمی با استفاده از مدل حاصله در مرحله مدل‌سازی تخمین زده شد؛ **: بر اساس گواهی کیفیت تولیدکننده؛ #: بر اساس رویه جاری فرایند بازآوری API استرپتوکیناز

M 07/0 حاوی ۰/۰۱ درصد سدیم دوکسی کلات، به مدت ۱۵ دقیقه تماس داده شد و دوباره خروجی ستون در ظروف عاری از اندوتوکسین جمع‌آوری گردید (مرحله شستشو). ستون تعویض یونی با دو برابر حجم ستون محلول سدیم کلراید M 25/0 مشابه فوق تماس داده شد و خروجی ستون جمع‌آوری گردید (مرحله شویش). در نهایت، همه ستون‌ها با ۵ برابر حجم ستون از محلول سدیم کلراید M 2 به مدت ۱۵ دقیقه تماس داده شد و خروجی ستون جمع‌آوری گردید و سپس دوباره با ۵ برابر حجم ستون از این محلول شستشو داده شد (مرحله احیا و در مجموع با ۱۰ برابر حجم ستون). در هر یک از خروجی‌های ستون شامل FT، شستشو، شویش و احیا در ظروف شیشه‌ای عاری از اندوتوکسین (آون شده در

ماتریس‌ها با ده برابر حجم ماتریس، از محلول‌های متعادل‌سازی شامل بافر سدیم گلوتامات pH 7.2 (برای روش کروماتوگرافی تمایلی) و بافر 100 mM pH 8.0 tris-HCl (برای روش کروماتوگرافی تعویض یونی) متعادل‌سازی شدند. عملیات حذف اندوتوکسین از API استرپتوکیناز به صورت ناپیوسته صورت گرفت و پس از ۱۵ دقیقه تماس، انتهای ستون باز شد و محلول از ستون با نیروی جاذبه خارج و خروجی ستون (FT) جمع‌آوری گردید. ستون با یک حجم از بافر متعادل‌سازی شستشو داده شد و خروجی ستون به FT اضافه گردید؛ سپس ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی با دو برابر حجم ستون محلول سدیم کلراید M 25/0 و ستون تعویض یونی با دو برابر حجم ستون از محلول سدیم کلراید

دمای 25°C به مدت ۳۰ دقیقه) جمع آوری شد و برای انجام آزمون اندازه گیری اندوتوکسین، نمونه برداری گردید. برای تعیین حجم خروجی ستون در هر مرحله از تخلیص از روش توزین استفاده شد. میزان اندوتوکسین در جریان های خروجی از طریق آزمون نقطه نهایی کمی کروماتیک در طول موج 405 nm اندازه گیری گردید. غلظت پروتئین با استفاده از روش جذب نوری در طول موج 280 nm اندازه گیری و میزان بازیابی پروتئین محاسبه شد. ضریب خاموشی $0/01$ درصد (1 mg/ml) پروتئین استرپتوکیناز معادل $0/949$ لحاظ گردید (۱۷). در پایان، تأثیر این فرایند بر نتایج آزمون های اصلی کنترل کیفی این محصول شامل فعالیت بیولوژیک و درصد خلوص آن بررسی شد.

ارزیابی تأثیر فرایند حذف اندوتوکسین بر فعالیت بیولوژیک API فرآوری شده: فعالیت بیولوژیکی استرپتوکیناز به روش کروماتیک نقطه نهایی آزمون و با استفاده از سوبسترای کروماتیک S-2251 صورت گرفت. اساس این آزمون بر پایه تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین در حضور استرپتوکیناز استوار است. سوبسترای کروماتیک که از اتصال پارائیتروآنیلین به یک توالی پپتیدی (Val-Leu-Lys) ساخته شده است که توسط پلاسمین پیوند میان نیتروآنیلین و گروه پپتیدی شکسته می شود و در اثر آزاد شدن پارائیتروآنیلین، طیف جذبی زرد رنگ ناشی از نیتروآنیلین آزاد در طول موج 405 نانومتر قابل اندازه گیری است. از آنجاکه پلاسمین فعال در اثر تأثیر استرپتوکیناز بر روی پلاسمینوژن تولید می گردد و پلاسمین نیز باعث هیدرولیز سوبسترای کروماتیک و افزایش دانسیته نوری محلول می شود؛ در نتیجه، میزان جذب نوری (OD) با غلظت استرپتوکیناز ارتباط مستقیم دارد.

برای انجام آزمون از سوبسترای کروماتیک 3 mM ، استاندارد داخلی با فعالیت $4/524862\text{ IU/ml}$ استفاده شد. غلظت نمونه های مورد آزمون با استفاده از اولترافیلتر با 10 microcone با غشای KD 10 به غلظت 10 mg/ml تغلیظ شد و بافر آن با بافر حامل API تعویض گردید. نمونه ها شامل استاندارد و نمونه های مورد آزمون با رقت ۱ به ۱۰۰ تهیه

گردید. ۱ میلی لیتر از نمونه های نهایی استاندارد و نمونه های مورد آزمون در سه غلظت $7/177\text{ IU/ml}$ ، $118/5$ و $79/01$ تهیه شد (برای تهیه رقت های مذکور از نمونه های مورد آزمون، فعالیت بیولوژیک نمونه ها در ابتدا 700 ، 750 ، 800 و 850 هزار IU/ml تخمین زده شد). نمونه کنترل حد بالا با فعالیت 600 IU/ml با استفاده از استاندارد داخلی ساخته شد. برای کنترل حد پایین، از بافر فسفات نمکی (PBS) استفاده گردید. از هر یک از نمونه ها (رقت های استاندارد، رقت های کنترل مثبت، کنترل حد بالا، کنترل حد پایین، رقت های تخمین های نمونه های مورد آزمون) $50\text{ }\mu\text{l}$ به داخل چاهک های میکروپلیت ریخته شد و به هر یک از چاهک ها $25\text{ }\mu\text{l}$ پلاسمای انسانی اضافه گردید. برای اطمینان از اختلاط محتویات چاهک ها، پلیت به آرامی به مدت 30 – 20 ثانیه روی یک سطح صاف رفت و برگشت حرکت داده شد. میکروپلیت به مدت 10 دقیقه در انکوباتور با دمای 37°C قرار گرفت. پس از پایان زمان انکوباسیون، به هر یک از چاهک ها $50\text{ }\mu\text{l}$ از سوبسترای $0/75$ میلی-مولار اضافه گردید و دوباره به مدت 20 دقیقه در دمای 37°C درجه قرار داده شد؛ سپس برای توقف واکنش، به هر یک از چاهک ها $25\text{ }\mu\text{l}$ اسید استیک 20 درصد اضافه گردید و جذب نوری آن ها در طول موج 405 نانومتر قرائت شد. نتایج خوانش میکروپلیت با استفاده از نرم افزار ParLin vol.1 به روش Parallel Line Assay تجزیه و تحلیل گردید و فعالیت زیستی آنزیم استرپتوکیناز مورد آزمون در مقایسه با آنزیم استاندارد تعیین شد. در نهایت، برای هر یک از فرایندهای حذف اندوتوکسین، میزان فعالیت بیولوژیک نهایی بازیابی شده نسبت به نمونه API اولیه محاسبه و گزارش گردید.

ارزیابی تأثیر فرایند حذف اندوتوکسین بر خلوص API فرآوری شده استرپتوکیناز از طریق کروماتوگرافی فاز معکوس با کارایی بالا (RP-HPLC): برای ارزیابی تأثیر روش های حذف اندوتوکسین با ماتریس های یاد شده روی درصد خلوص محصول، از RP-HPLC با ستون C18 استفاده شد. فاز متحرک A شامل نسبت ۱ درصد حجمی تری فلورو استیک اسید (TFA) در آب تزریقی و فاز متحرک B شامل

گردید. تطابق کروماتوگرام نمونه قبل و بعد و عدم مشاهده پیک اضافه نمایانگر نبودن ماده اضافه به محصول یا تغییر نکردن ساختار پروتئین بود. درصد خلوص نمونه با استفاده از نسبت سطح زیر منحنی پیک به مجموع سطوح زیر منحنی پیک‌های احتمالی موجود تعیین گردید.

نسبت ۱ درصد حجمی TFA در استونیتریل تهیه گردید. نمونه‌ها با غلظت استرپتوکیناز تقریباً یکسان (از طریق رقیق‌سازی با بافر متعادل‌سازی هر ستون) تهیه شد و در هر آزمون 20 µl نمونه به ستون C18 اعمال و طی برنامه گرادپانی، بر اساس جدول شماره ۲ از ستون خارج‌سازی

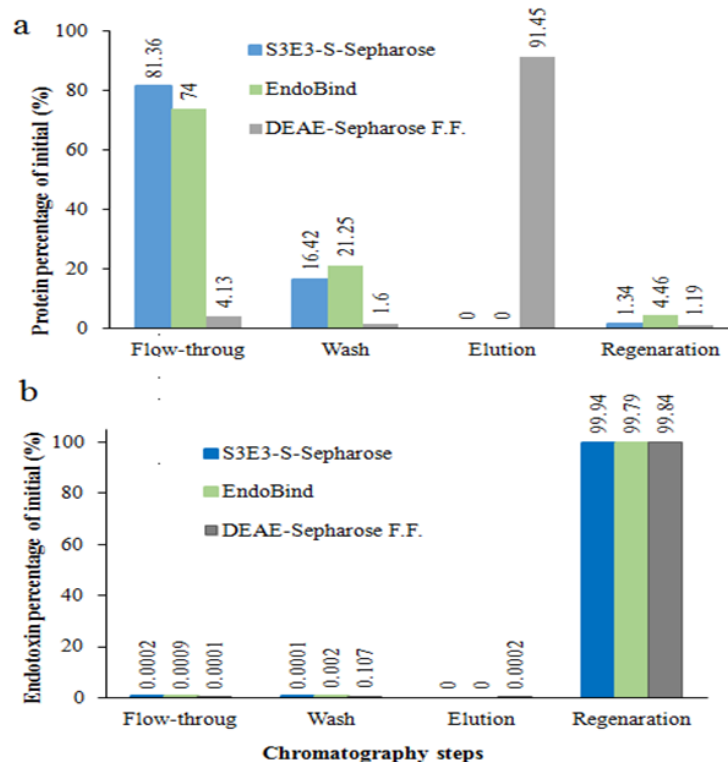
جدول شماره ۲. برنامه گرادپانی برای HPLC در آزمون درصد خلوص پروتئین استرپتوکیناز

زمان (دقیقه)	فاز متحرک A (درصد V/V)	فاز متحرک B (درصد V/V)
۰-۱	۶۸	۳۲
۱-۴	۶۸→۵۲	۳۲→۴۸
۴-۵	۵۲	۴۸
۵-۷	۰	۱۰۰
۷-۱۰	۶۸	۳۲

پروتئین (در کروماتوگرافی تعویض یونی) و احیای ستون برای هریک از ستون‌ها انجام شد. نتایج میزان پروتئین و اندوتوکسین باقی‌مانده در مقایسه با مقادیر اولیه در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

یافته‌های پژوهش

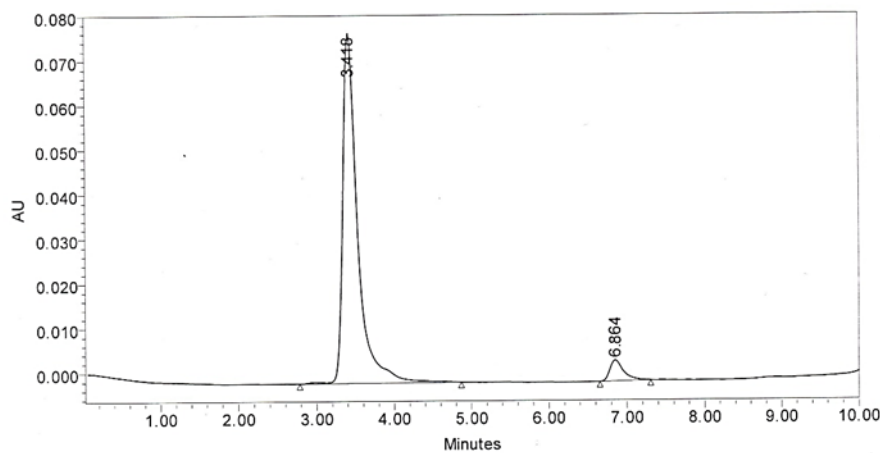
استفاده از ماتریس تمایلی S3E3-S-Sepharose در حذف اندوتوکسین از ماده دارویی فعال استرپتوکیناز: مراحل حذف اندوتوکسین شامل اعمال نمونه، شستشو، شویس



شکل شماره ۱. عملکرد ماتریس تمایلی S3E3-S-Sepharose در مقایسه با ماتریس‌های تمایلی تجاری و تعویض یونی. a. درصد پروتئین باقی‌مانده و b. درصد اندوتوکسین باقی‌مانده در خروجی هریک از مراحل تخلیص

سدیم دزوکسی کلات حدود 1/74 EU/ml بود و در نتیجه، تنها جریان خروجی ستون در مرحله شویش به عنوان محصول این ستون در نظر گرفته شد. برای بررسی تأثیر هریک از روش‌های مذکور بالا روی درصد خلوص محصول، ابتدا با هدف اطمینان از نبودن پپتید S3E3 به محصول و برای ثبت زمان ماند پیک مربوط به پپتید S3E3، این پپتید به ستون HPLC اعمال گردید و بر طبق شرایط گرادانی جدول شماره ۲، در زمان ۳/۴ دقیقه، پیک این پپتید از ستون خارج و در کروماتوگرام نشان داده شد (شکل ۲).

دو ستون‌های تمایلی S3E3-S-Sepharose و EndoBind، در حالت کروماتوگرافی منفی (عدم اتصال پروتئین هدف) عمل کردند و در نتیجه، جریان خروجی از ستون حین اعمال نمونه، موسوم به جریان FT جمع‌آوری گردید. در مرحله شستشوی این دو ستون با کلرید سدیم ۰/۲۵ مولار، بخشی از پروتئین متصل شده به ستون جداسازی شد که با توجه به غلظت اندک اندوتوکسین آن‌ها، خروجی مرحله شستشو و FT به صورت تجمعی به عنوان محصول خروجی این ستون‌ها در نظر گرفته شد. در ستون کروماتوگرافی تعویض یونی، غلظت اندوتوکسین در مرحله شستشو حاوی

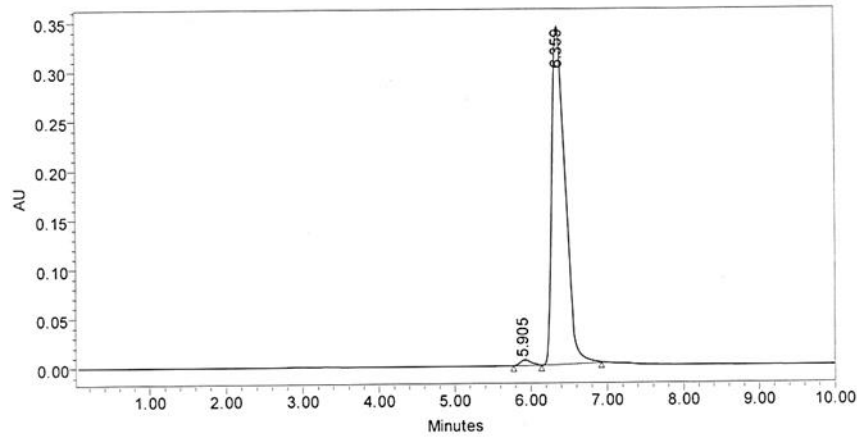


	RT	Area	% Area	Height
1	3.418	1035923	94.83	78436
2	6.864	56470	5.17	4704

شکل شماره ۲. کروماتوگرام نمونه پپتید خالص S3E3 برای تعیین زمان ماند پپتید

HPLC اعمال گردید. همان‌طور که در شکل شماره ۳ دیده می‌شود، پیک مربوط به استرپتوکیناز در زمان ماند ۶/۴ دقیقه از ستون خارج می‌گردد.

سپس نمونه محصول ماده دارویی فعال استرپتوکیناز بدون آلودگی اندوتوکسینی به عنوان نمونه پیش (کروماتوگرام شکل شماره ۳) و نمونه فرآوری شده با هریک از ماتریس‌ها به عنوان نمونه‌های پس از فرآوری به ستون

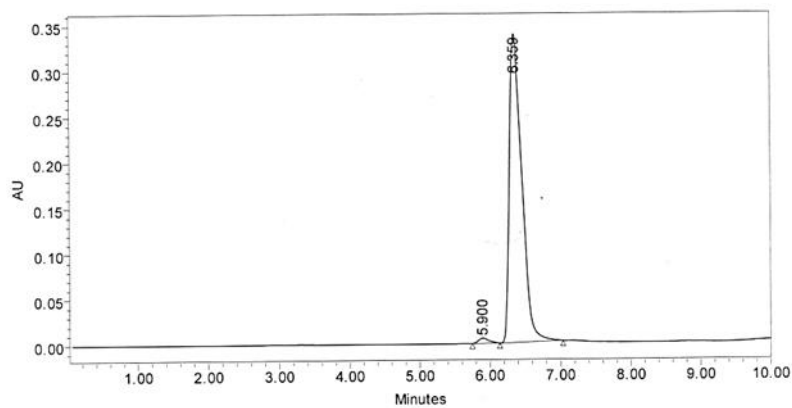


	RT	Area	% Area	Height
1	5.905	58072	1.37	5696
2	6.359	4181176	98.63	346599

شکل شماره ۳. کروماتوگرام نمونه API استرپتوکیناز به عنوان نمونه کنترل پیش از فرآوری

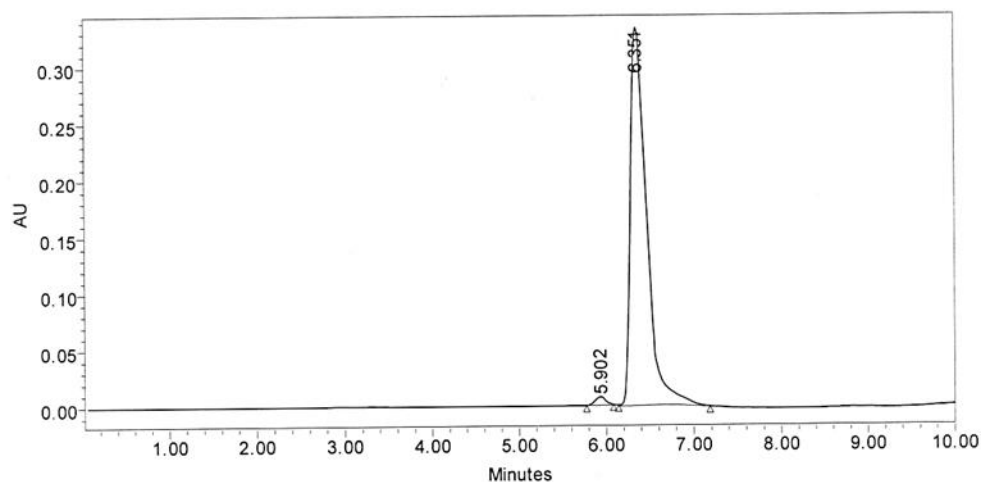
روش های فرآوری بر روی درصد خلوص محصول تأثیر منفی نداشتند. علاوه بر این، مشاهده نکردن پیک در زمان ۳/۴ دقیقه در کروماتوگرام نمونه فرآوری شده با ستون تمایلی S3E3-S-Sepharose، بیان کننده نبودن این پیتید از ستون به محصول بود.

در هریک از کروماتوگرام های مربوط به نمونه های استرپتوکیناز فرآوری شده با هریک از ستون های S3E3-S-Sepharose (شکل شماره ۴)، ستون تجاری EndoBind (شکل شماره ۵) و ستون کروماتوگرافی تعویض یونی (شکل شماره ۶)، پروفایل پیک دقیقاً مانند پیک نمونه کنترل پیش از فرآوری بود؛ بنابراین، می توان گفت که هیچ پیک از



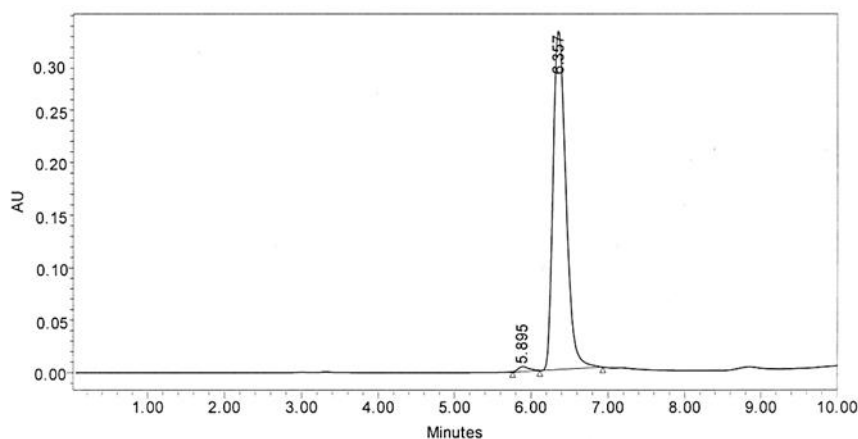
	RT	Area	% Area	Height
1	5.900	58076	1.39	5696
2	6.359	4105507	98.60	342546

شکل شماره ۴. کروماتوگرام نمونه مخلوط FT و Wash کروماتوگرافی تمایلی با ستون S3E3-S-Sepharose



	RT	Area	% Area	Height
1	5.902	58195	1.42	5843
2	6.351	4052311	98.58	340076

شکل شماره ۵. کروماتوگرام نمونه مخلوط FT و Wash کروماتوگرافی تمایلی با ستون EndoBind



	RT	Area	% Area	Height
1	5.89	62006	1.62	7509
2	6.357	3756564	98.38	323642

شکل شماره ۶. کروماتوگرام نمونه شویش کروماتوگرافی تعویض یونی

به طور کلی، مشاهده نکردن پیک اضافی در مقایسه با نمونه پیش از فرآوری بیان کننده عدم نشت لیگاند یا هرگونه تغییر در ساختار پروتئین بود. برای بررسی تأثیر هریک از فرایندهای به کار برده شده بر روی فعالیت بیولوژیک استرپتوکیناز، ابتدا نمونه‌های محصول جمع‌آوری شده از هریک از این فرایندها با استفاده از microcone به غلظت 10 mg/ml تغلیظ شد و سپس با استفاده از سوبسترای کروموژنیک و پلاسمای انسانی و با استفاده از روش آنالیز Parallell line با نرم‌افزار ParLin vol.1، تغییرات فعالیت بیولوژیک آن‌ها نسبت به نمونه API استرپتوکیناز غیر آلوده ارزیابی گردید. نتایج مربوط به مقایسه عملکرد هریک از روش‌ها در جدول شماره ۳ آورده شده است.

به طور کلی، مشاهده نکردن پیک اضافی در مقایسه با نمونه پیش از فرآوری بیان کننده عدم نشت لیگاند یا هرگونه تغییر در ساختار پروتئین بود. برای بررسی تأثیر هریک از فرایندهای به کار برده شده بر روی فعالیت بیولوژیک استرپتوکیناز، ابتدا نمونه‌های محصول جمع‌آوری شده از هریک از این فرایندها با استفاده از microcone به غلظت

جدول شماره ۳. مقایسه عملکرد روش‌های مختلف کروماتوگرافی تمایلی و تعویض یونی در حذف اندوتوکسین

S3E3-S-sepharose	EndoBind	DEAE-Sepharose F.F.	SK-API	شاخص ارزیابی
۹۲/۵۳	۹۱/۲۳	۹۱/۱	-	بازیابی پروتئین (درصد): مرحله کروماتوگرافی
-	-	۹۱/۲۶	-	بازیابی پروتئین (درصد): بازده تعویض بافر اولیه
۹۰/۸۵	۸۹/۳۴	۹۰/۵۸	-	بازیابی پروتئین (درصد): بازده تغلیظ نهایی
۸۴/۰۷	۸۱/۵	۷۵/۳۱	-	بازیابی پروتئین (درصد): کل فرایند حذف
۷۳۰۵۴/۹۸	۷۱۰۶۰/۰۸	۷۰۴۶۲/۶۸	۷۶۱۷۵/۹۱	(IU/mg) فعالیت بیولوژیک ویژه
۴/۱	۶/۷۲	۷/۵	-	درصد افت پتنتی (درصد)
۸۱/۹۵	۷۶/۲۷	۶۱/۵۴	-	درصد بازیابی فعالیت بیولوژیک کل یا همان درصد بازیابی دز (درصد)
۵/۵۴	۴/۵۲	۵/۶۸	-	لگاریتم حذف آلودگی
۰/۳۴۲	۳/۶۲۲	۰/۲۵۴	-	غلظت اندوتوکسین در نمونه تغلیظ شده نهایی فرایند حذف (EU/ml)
۹۸/۶۰	۹۸/۵۸	۹۸/۳۸	۹۸/۶۳	درصد خلوص (درصد)

درصد و ۷۴ درصد)؛ اما در روش تعویض یونی، پروتئین به همراه LPS به ماتریس متصل شد. در هر دو ماتریس تمایلی S3E3-S- Sepharose و ماتریس تجاری S3، بخشی از پروتئین استرپتوکیناز به علت اسیدی بودن و داشتن بار منفی، به لیگاندهای ماتریس‌ها متصل گردید که برای جداسازی آن، از یک مرحله شستشو با کلرید سدیم ۰/۲۵ مولار استفاده شد. در این حالت، استرپتوکیناز از ستون‌ها خارج گردید (به ترتیب حدود ۱۶/۴ درصد و ۲۱/۲ درصد)، درحالی که همچنان اندوتوکسین به ماتریس‌ها متصل بود. از آنجا که غلظت اندوتوکسین در پروتئین خروجی در مرحله شستشو بسیار اندک بود؛ بنابراین، برای جلوگیری از اتلاف پروتئین، خروجی شستشو به همراه خروجی FT به عنوان محصول این روش‌ها جمع‌آوری گردید. در روش تعویض یونی، پروتئین در جریان شویس از ماتریس جدا شد و بازیابی این مرحله طولانی (۹۱/۴ درصد) بود. در هر سه روش، پروتئین جمع‌آوری شده به عنوان محصول، نیاز به تغلیظ داشت. از آنجا که میزان بازیابی کلی هر یک از روش‌ها از حاصل ضرب بازیابی پروتئین در ریز مراحل آن محاسبه شد؛ بنابراین، روش کروماتوگرافی تعویض یونی به سبب نیاز به

همان‌طور که در جدول شماره ۳ گزارش شده است، روش تعویض یونی نسبت به سایر روش‌ها بازیابی، پروتئین کلی کمتری نسبت به سایر روش‌ها داشت. از آنجا که در روش کروماتوگرافی تعویض یونی، هدایت الکتریکی بالا مانع جذب جزء جذب شونده به ماتریس تعویض یونی می‌شود و لازم است هدایت الکتریکی نمونه پایین باشد (۱۹، ۱۸)، در روش بازفرآوری API استرپتوکیناز آلوده با ستون تعویض یونی، تعویض بافر آن با بافر tris-HCl ضروری بود. برای این منظور، از روش اولترافیلتر با غشای ۱۰ KDa استفاده شد. در این مرحله، بازدهی بازیابی پروتئین ۹۱/۲۶ درصد بود. از آنجا که در هر یک از روش‌ها بازدهی بازیابی پروتئین حاصل ضرب مقادیر بازیابی پروتئین در هر یک از مراحل است؛ بنابراین، روش تعویض یونی به علت نیاز به یک مرحله تعویض بافر بیشتر، بازدهی کمتری داشت. برخلاف روش کروماتوگرافی تعویض یونی، دو روش کروماتوگرافی تمایلی با ماتریس تهیه شده در این تحقیق و ماتریس تجاری، هر دو از نوع کروماتوگرافی منفی بودند؛ بدین معنی که در این دو ماتریس، عمده پروتئین بدون اتصال به ماتریس در جریان FT از ستون خارج گردید (به ترتیب حدود ۸۱/۴

یک مرحله اولترافیلتراسیون اضافه نسبت به سایر روش‌ها، بازیابی کلی کمتری داشت (۷۵/۳ درصد در مقابل ۸۴ درصد و ۸۱/۵ درصد). هر سه روش تأثیر نامطلوبی روی درصد خلوص محصول نداشتند، هر چند میزان پتسی (فعالیت ویژه) محصول در هر سه روش به میزان جزئی کاهش یافت. در همه روش‌ها پروتئین اتلاف شده و افت پتسی باعث کاهش بازدهی فعالیت بیولوژیک گردید. در میان روش‌های استفاده شده، بازدهی روش تمایلی با ماتریس این تحقیق نسبت به سایر روش‌ها، بازدهی فعالیت بیولوژیک بیشتری داشت (۸۲ درصد در مقابل ۷۶/۳ درصد مربوط به روش تمایلی با ماتریس تجاری و ۶۱/۵ درصد مربوط به روش تعویض یونی).

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق، برای بررسی عملکرد کارایی ماتریس تمایلی S3E3-S-Sepharose در حذف اندوتوکسین از محصول پروتئینی در شرایط عملیاتی واقعی، از ماتریس تمایلی یاد شده برای حذف اندوتوکسین از ماده دارویی فعال استرپتوکیناز استفاده گردید و عملکرد ماتریس با عملکرد ماتریس تجاری بر پایه لیگاند واریانت S3 و روش کروماتوگرافی تعویض آنیونی مقایسه و مشاهده شد که ستون تمایلی S3E3-S-Sepharose نسبت به دو ماتریس دیگر، کارایی بیشتری داشت (بازیابی بیشتر درصد پروتئین و فعالیت بیولوژیکی)؛ همچنین ستون تمایلی S3E3-S-Sepharose نسبت به ستون تمایلی تجاری، غلظت نهایی اندوتوکسین باقی مانده کمتر و به عبارت دیگر، بازدهی حذف اندوتوکسین بیشتر داشت. این افزایش بازدهی حذف اندوتوکسین توسط ماتریس S3E3-S-Sepharose را می توان به بیشتر بودن قدرت اتصال لیگاند آن یا همان واریانت S3E3 با لیگاند ماتریس تجاری (همان پپتید S3) مرتبط دانست. بر اساس تحقیق پیشین، میانگین مقدار ENC50 واریانت‌های S3E3 07/2 برابر (تقریباً ۵۲ درصد) کمتر از مقدار ENC50 پپتید S3 بود که بیان کننده تأثیر مثبت حذف اسید آمینه گلوتامیک اسید از ساختار آن و در نتیجه، افزایش بار مثبت این واریانت بر روی خاصیت خنثی کننده اندوتوکسین بود (۱۳). اثر افزایش بار مثبت و خاصیت آب‌گریزی پپتیدهای ضد میکروبی در

افزایش خواص ضد میکروبی و خاصیت اتصال به LPS در تحقیقات مختلف گزارش شده است (۲۵-۲۰، ۱۴). افزایش بار مثبت باعث افزایش برهم کنش الکترواستاتیک میان نواحی دارای بار مثبت پپتیدهای ضد میکروبی و فسفولیپیدهای دارای بار منفی غشای سلول باکتری و در نتیجه، افزایش خاصیت ضد میکروبی پپتیدهای کاتیونی می‌گردد (۳۲-۲۶). علاوه بر ارتباط میان افزایش بار مثبت پپتید و افزایش خاصیت ضد میکروبی آن، گزارش‌های اختصاصی در تأثیر این افزایش بار در افزایش خاصیت اتصال اندوتوکسین نیز وجود دارد؛ به‌عنوان مثال، افزودن بار خالص پپتید S3 از طریق جایگزینی دو اسید آمینه گلايسين و گلوتاميك اسيد آن با ليزين (واریانت SΔ3)، به افزایش خاصیت خنثی کننده LPS و افزایش خاصیت ضد میکروبی آن پپتید منجر گردید (۳۳)، اثر افزایش بار مثبت در افزایش قدرت تمایلی اتصال به LPS و خاصیت ضد میکروبی برای پپتیدهای ضد میکروبی دیگر نظیر واریانت‌های پپتید Buferin2 مشتق از بافت شکمی وزغ آسیایی موسوم به BF2B و BF2A (۳۴) یا پپتید ضد میکروبی P6m که تعداد بسیاری اسید آمینه آرژنین با بار مثبت دارد (۳۱) و یا پپتید ضد میکروبی Ponericin W1 که حاوی تعداد فراوانی اسید آمینه لیزین دارای بار مثبت است، (۳۲) نیز گزارش شده است. این افزایش تمایل به LPS می‌تواند ناشی از افزایش برهم کنش الکترواستاتیک میان نواحی بار مثبت پپتید و یون‌های فسفات (دارای بار منفی) لیپید A، LPS باشد. در اتصال LPS به پپتیدهای ضد میکروبی، یون‌های بار منفی فسفات در مولکول LPS به اسید آمینه‌های دارای بار مثبت در پپتیدهای ضد میکروبی متصل می‌شوند و میان شاخه‌های آسیل و انشعابات هیدروفوب LPS و نواحی هیدروفوب پپتید نیز، تعامل آب‌گریز برقرار می‌گردد. از سویی، در ماتریس تجاری، پپتید S3 از طریق از روش تثبیت از طریق اتصال گروه کربوکسیل به گروه آمین لینکر DADPA متصل شده بود (۳۵). همان‌طور که گفته شد، پپتید S3 در ساختار توالی خود دو اسید آمینه گلوتامیک اسید داشت؛ بنابراین، استفاده از روش تثبیت از طریق گروه کربوکسیل، به تثبیت هتروژن S3 از ناحیه C ترمینال و/ یا

هریک از اسید آمینه‌های گلو تامیک اسید منجر گردید. در کروماتوگرافی تمایلی، هتروژن بودن لیگاند با پدیده انقطاع پیک ارتباط مستقیم دارد. پدیده انقطاع پیک وقتی رخ می‌دهد که علی‌رغم ظرفیت خالی ماتریس کروماتوگرافی، بخشی از جزء جذب‌شونده بدون اتصال به ماتریس همراه با جریان FT از ستون خارج می‌شود و تنها بخشی از آن به ماتریس متصل می‌گردد. یکتایی گروه‌های سولفیدریل در واریانت S3E3 تحقیق حاضر، امکان تثبیت اختصاصی آن بر روی رزین‌های پایه یا لینکر دارای استیل ید (برای اتصال گروه سولفیدریل) فراهم کرد و این نیز می‌تواند یکی از علل عملکرد بهتر این ماتریس باشد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله از انستیتو پاستور ایران بابت حمایت مالی و معنوی و همچنین کارکنان بخش نانو بیوتکنولوژی برای همکاری صمیمانه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافی در این مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق

این مطالعه فاقد کارآزمایی بالینی بوده و کد اخلاق در مورد آن کاربرد نداشت.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در انجام تحقیق، آنالیز داده‌ها و نوشتن مقاله مشارکت نموده‌اند.

References

- Williams KL. Endotoxin relevance and control overview. *Endotoxins*: CRC Press; 2007. p. 47-66.
- Williams KL. *Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation*: CRC Press; 2007.
- Wang X, Quinn PJ. *Endotoxins: structure, function and recognition*. Springer Science & Business Media; 2010.
- Hirayama C, Sakata M. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;781:419-32. doi: 10.1016/s1570-0232(02)00430-0.
- Ongkudon CM, Chew JH, Liu B, Danquah MK. Chromatographic removal of endotoxins: A bioprocess engineer's perspective. *ISRN Chromatogr* 2012;2012. doi:10.5402/2012/649746.
- Sepahi M, Hadadian S, Ahangari Cohan R, Norouzian D. Lipopolysaccharide removal affinity matrices based on novel cationic amphiphilic peptides. *Prep Biochem Biotechnol* 2021;51:386-94. doi: 10.1080/10826068.2020.1821216.
- Sepahi M, Norouzian D, Cohan RA, Hadadian S. Optimization of the Endotoxin Removal Performance of Solid-Phase Conjugated S3E3 Antimicrobial Peptide Using Response Surface Methodology. *Int J Pept Res Ther* 2021;27:2029-37. doi:10.1007/s10989-021-10230-y.
- Ding JL, Ho B, Tan NS, inventors; Google Patents, assignee. Recombinant proteins and peptides for endotoxin biosensors, endotoxin removal, and anti-microbial and anti-endotoxin therapeutics patent US7297551 B2. 2004.
- High D. *Endotoxin Removal from DNA using EndoBind-R™*. 2007.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, New Jersey: Springer; 2005. pp. 571-607.
- Waghu FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* 2015;gkv1051. doi: 10.1093/nar/gkv1051.
- Chaudhary K, Kumar R, Singh S, Tuknait A, Gautam A, Mathur D, et al. A Web Server and Mobile App for Computing Hemolytic Potency of Peptides. *Sci Rep* 2016;6:22843. doi: 10.1038/srep22843.
- Sepahi M, Ahangari Cohan R, Hadadian S, Norouzian D. Effect of glutamic acid elimination/substitution on the biological activities of S3 cationic amphiphilic peptides. *Prep Biochem Biotechnol* 2020;50:664-72. doi:10.1080/10826068.2020.1725772.
- Tan NS, Ng MLP, Yau YH, Chong PKW, Ho B, Ding JL. Definition of endotoxin binding sites in horseshoe crab factor C recombinant sushi proteins and neutralization of endotoxin by sushi peptides. *FASEB J* 2000;14:1801-13. doi:10.1096/fj.99-0866com.
- Aurell CA, Wistrom AO. Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:119-23. doi: 10.1006/bbrc.1998.9773.
- Bergstrand A, Svanberg C, Langton M, Nydén M. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55: B5. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006;53:9-14. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.06.007.
- Taylor FB, Botts J. Purification and characterization of streptokinase with studies of streptokinase activation of plasminogen. *Biochem* 1968;7:232-42. doi:10.1021/bi00841a028.
- Khan HU. The role of Ion Exchange Chromatography in purification and characterization of molecules. *Ion Exchange Technologies* 2012:331-42. doi:10.5772/52537.
- Kisley L, Chen J, Mansur AP, Dominguez-Medina S, Kulla E, Kang MK, et al. High ionic strength narrows the population of sites participating in protein ion-exchange adsorption: A single-molecule study. *J Chromatogr A* 2014;1343:135-42. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.075.
- Pál T, Sonnevend Á, Galadari S, Conlon JM. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide, pseudin-2. *Regul Pept* 2005;129:85-91. doi: 10.1016/j.regpep.2005.01.015.
- Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 2001;501:146-50. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02648-5.
- Lyu Y, Yang Y, Lyu X, Dong N, Shan A. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. *Sci Rep* 2016;6:27258. doi:10.1038/srep27258.
- Yin LM, Edwards MA, Li J, Yip CM, Deber CM. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *J Biol Chem* 2012;287:7738-45. doi:10.1074/jbc.M111.303602.

24. Shang D, Li X, Sun Y, Wang C, Sun L, Wei S, et al. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide, temporin-1CEb from Chinese brown frog, *Rana chensinensis*. *Chem Biol Drug Des* 2012;79:653-62. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01363.x.
25. Eckert R, Qi F, Yarbrough DK, He J, Anderson MH, Shi W. Adding selectivity to antimicrobial peptides: rational design of a multidomain peptide against *Pseudomonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1480-8. doi:10.1128/AAC.50.4.1480-1488.2006.
26. Borah A, Deb B, Chakraborty S. A Crosstalk on Antimicrobial Peptides. *Int J Pept Res Ther* 2020;27:1-16. doi:10.1007/s10989-020-10075-x.
27. Kang Y, Luo RG. Effects of ionic strength and pH on endotoxin removal efficiency and protein recovery in an affinity chromatography. *Process Biochem* 2000;36:85-92. doi:10.1016/S0032-9592(00)00182-5.
28. Li J, Shang G, You M, Peng S, Wang Z, Wu H, et al. Endotoxin removing method based on lipopolysaccharide binding protein and polyhydroxyalkanoate binding protein PhaP. *Biomacromolecules* 2011;12:602-8. doi:10.1021/bm101230n.
29. Seyfi R, Kahaki FA, Ebrahimi T, Montazersaheb S, Eyvazi S, Babaeipour V, et al. Antimicrobial peptides (AMPs): roles, functions and mechanism of action. *Int J Pept Res Ther* 2020;26:1451-63. doi:10.1007/s10989-019-09946-9.
30. Gong H, Hu X, Zhang L, Fa K, Liao M, Liu H, et al. How do antimicrobial peptides disrupt the lipopolysaccharide membrane leaflet of Gram-negative bacteria? *J Colloid Interface Sci* 2023;637:182-92. doi:10.1016/j.jcis.2023.01.051.
31. Necula G, Bacalum M, Radu M. Interaction of Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptide with *E. coli* Outer Membrane—A Molecular Simulation Approach. *Int J Mol Sci* 2023;24:2005. doi:10.3390/ijms24032005.
32. He S, Deber CM. Interaction of designed cationic antimicrobial peptides with the outer membrane of gram-negative bacteria. *Sci Rep* 2024;14:1894. doi:10.1038/s41598-024-51716-1 2024;14:1894.
33. Yau YH, Ho B, Tan NS, Ng ML, Ding JL. High therapeutic index of factor C Sushi peptides: potent antimicrobials against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2820-5. doi:10.1128/AAC.45.10.2820-2825.2001.
34. Hao G, Shi YH, Tang YL, Le GW. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. *Peptides* 2009;30:1421-7. doi:10.1016/j.peptides.2009.05.016.
35. Ding JL, Zhu Y, Ho B. High-performance affinity capture-removal of bacterial pyrogen from solutions. *J Chromatogr B Biomed Appl* 2001;759:237-46. doi:10.1016/S0378-4347(01)00227-4.