Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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]

[1] Dept 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

A B S T R A C T

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 76.76 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.

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

ارزیابی کارایی ماتریس تمایلی حاصله از واریانت بهبودیافتهٔ پپتید S3 در حذف اندوتوکسین از مادهٔ دارویی فعال استرپتوکیناز و مقایسهٔ عملکرد آن با ستون‌های تجاری

شاهین حدادیان [۱*]، مینا سپاهی [۱]، رضا آهنگری‌کهن [۱]

[۱] گروه نانو بیوتکنولوژی، گروه تحقیقات فن‌آوری‌های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

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 فن‌آوری‌های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

Email:

hadadian@yahoo.com

چکیده

مقدمه: اندوتوکسین یا همان لیپوپلی‌ساکارید (LPS) یکی از اجزای دیوارهٔ 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 نوترکیب 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 بهبودیافتهٔ پپتید ضدمیکروبی S3 موسوم به پپتید S3E3 بر روی رزین کروماتوگرافی سفاروز تولید شده است، برای حذف اندوتوکسین از مادهٔ دارویی فعال استرپتوکیناز استفاده گردید و عملکرد این ماتریس با عملکرد ماتریس تجاری یک‌بارمصرف دارای لیگاند S3 و رزین تعویض یونی مقایسه شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج بیان‌کنندهٔ این بود که ماتریس S3E3-S-Sepharose در مقایسه با ماتریس تمایلی تجاری بر پایهٔ 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 مادهٔ دارویی فعال استرپتوکیناز و سایر داروهای زیستی نوترکیب، کاندیدای مناسبی به‌نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: پپتید ضدمیکروبی S3، حذف اندوتوکسین، واریانت بهبودیافتهٔ S3، مادهٔ دارویی فعال استرپتوکیناز

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

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

«اندوتوکسین» یا همان لیپوپلی‌ساکارید (LPS) دیوارهٔ 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 تشکیل‌شده 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 آمفی‌فیلیک 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 همهٔ مراحل تقسیم سلولی، مرگ و لیز شدن دیوارهٔ سلول در محیط آزاد می‌شوند. ازآنجاکه 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؛ به‌عنوان‌مثال، در همهٔ محصولات نوترکیب که در میزبان باکتری گرم منفی بیان و تولید می‌شوند، اندوتوکسین حاصل از میزبان همواره در فرایند وجود دارد و لازم است در فرایند، مراحلی با هدف حذف آن از محصول اصلی طراحی و اجرا گردند (۵، ۳).

ماتریس‌های تمایلی حذف اندوتوکسین با استفاده از لیگاند پپتید ضدمیکروبی به علت سمیت پایین لیگاند و کارایی مناسب، ازجمله روش‌های حذف اندوتوکسین از فرآورده‌های دارویی است. ماتریس تمایلی S3E3-S-Sepharose که از تثبیت کووالان واریانت بهبودیافتهٔ پپتید ضدمیکروبی S3 بر روی رزین کروماتوگرافی سفاروز تهیه‌شده است، یک ماتریس تمایلی جدید برای حذف اندوتوکسین از فرآورده‌های دارویی زیستی است (۷، ۶). پپتید ضدمیکروبی 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 آمینهٔ لیزین و سه گلوتامیک‌اسید 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 غیراختصاصی و هتروژن پپتید S3 بر روی ماتریس آگاروز با لینکر دی‌آمینودی‌پروپیل‌آمین (DADPA) گزارش‌شده بود (۸)؛ اما تثبیت هتروژن پپتید از طریق گروه کربوکسیل موجود در انتهای C و سه اسید آمینهٔ گلوتامیک اسید، بازیابی اندک پروتئین‌های اسیدی و یک‌بار مصرف بودن ماتریس حاصله از معایب اصلی آن بود (۹). نویسندگان مقالهٔ حاضر در تحقیقات پیشین خود، با هدف امکان تثبیت اختصاصی پپتید ضدمیکروبی S3 از طریق گروه کربوکسیل آزاد در ترمینال C پپتید توانستند با حذف سه اسید آمینهٔ گلوتامیک اسید از پپتید S3، به واریانت بهبودیافتهٔ 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 بهبودیافته (S3E3) از پپتید S3، سه بار مثبت بیشتر بود؛ همچنین بر طبق نتایج پیش‌بینی خاصیت ضدمیکروبی از بانک اطلاعاتی آنلاین CAMP R3 (۱۱) و پیش‌بینی سمیت همولیتیک با استفاده از سرور HemoPI (۱۲)، واریانت S3E3 نسبت به پپتید S3، خاصیت ضدمیکروبی بیشتر و سمیت کمتری داشت. محققان مقالهٔ حاضر در تحقیقات پیشین خود، با استفاده از آزمون بازدارندگی واکنش LAL، به مقایسهٔ غلظت‌های خنثی‌سازی پنجاه‌درصدی اندوتوکسین (ENC50) در واکنش LAL پرداختند و غلظت میانگین ENC50 پپتیدهای S3 و S3E3 را به‌ترتیب ۱/۴۲ و ۰/۶۸۶ میکرومولار گزارش کردند (۱۳). به‌طور خلاصه، اساس این آزمون بر پایهٔ واکنش اندوتوکسین و LAL استوار است. در واکنش LAL، عامل C در حضور اندوتوکسین به آنزیم فعال

تبدیل می‌شود و آنزیم فعال‌شده باعث تغییر در ساختار سوبسترای کروموژنیک شکستن پیوند میان بخش پپتیدی آن و بخش مولد رنگ آن (پارا نیتروآنالین) می‌گردد و با آزاد شدن پارانیترو آنالین در محیط، باعث انتشار رنگ زرد (قابل‌اندازه‌گیری در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر) می‌شود (۳). در آزمون بازدارندگی واکنش LAL، اتصال پپتید ضدمیکروبی به LPS مانع از اتصال LPS به عامل C می‌گردد و درنتیجه، عامل C فعال‌شدهٔ کمتری تولید می‌شود و درنتیجه، باعث صدور رنگ زرد کمتری در تست کروموژنیک می‌گردد (۱۴). بر اساس این توضیحات، کاهش غلظت ENC50 واریانت بهبودیافتهٔ S3E3، بیان‌کنندهٔ افزایش میل تمایلی اتصال آن به LPS بود.

نویسندگان این مقاله در ادامه، واریانت بهبودیافتهٔ S3E3 را از طریق دو جایگاه مختلف ناحیهٔ کربوکسیل انتهایی و طریق جایگاه گروه سولفیدریل آزاد در اسید آمینهٔ سیستئین بر روی رزین سفاروز تثبیت کردند و با مقایسهٔ 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 حاصلهٔ 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 همهٔ تحقیقات پیشین یادشده، در همهٔ 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 مادهٔ دارویی فعال استرپتوکیناز بررسی شد. پروتئین استرپتوکیناز نوترکیب به علت داشتن بار منفی، نمونهٔ مناسبی برای احتمال اتلاف بسیار پروتئین ناشی از اتصال غیراختصاصی 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 دو روش 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 مادهٔ دارویی فعال استرپتوکیناز نوترکیب: از این ماتریس و ماتریس تجاری EndoBind به‌عنوان روش‌های پیشنهادی دوباره‌کاری 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 مقایسهٔ کارایی ماتریس‌های یادشده، ابتدا LPS به‌دست‌آمده 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 شناسنامهٔ کیفی این محصول تأمین شود. بر اساس شناسنامهٔ کیفی این محصول، محدودهٔ مجاز اندوتوکسین در هر صد هزار واحد بین‌المللی (IU) استرپتوکیناز، حداکثر ۱۰ واحد اندوتوکسین (EU) است. ازآنجاکه 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 تجمع‌یافتهٔ اندوتوکسین (CAC)، معادل 114000 EU/ml(۱۶، ۱۵)، تقریباً معادل ۰/۸۷۷ CAC است.

برای تخمین میزان ماتریس موردنیاز، در مورد ماتریس S3E3-S-Sepharose از مدل به‌دست‌آمده از تحقیق پیشین دربارهٔ 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

NaH2PO4.2H20 0.39 ،NaGlutamate.H2O 20.5 g/l) g/l و 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 معادلهٔ 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.

دربارهٔ 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.

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

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

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

ردیف	ماتریس کروماتوگرافی	ظرفیت جذب			حجم مورد نیاز µl
		اسمی	عملیاتی	واحد	
۱	S3E3-S-Sepharose	$^{*}2.71\times10^{6}$	6.775×10^{5}	EU/ ml of matrix	147.6≈150
۲	EndoBind	$^{**}2.0\times10^{5}$	5.0×10^{4}		2000
۳	Sepharose-DEAE-F.F.	$^{**}100$	$^{\#}15$	mg protein/ ml of matrix	677.7≈700

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

ماتریس‌ها با ده برابر حجم ماتریس، از محلول‌های متعادل‌سازی شامل بافر سدیم گلوتامات pH 7.2 (برای روش کروماتوگرافی تعایلی) و بافر tris-HCl 100 mM pH 8.0 (برای روش کروماتوگرافی تعویض یونی) متعادل‌سازی شدند. عملیات حذف اندوتوکسین از API استرپتوکیناز به‌صورت 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 تعایلی با دو برابر حجم ستون محلول سدیم کلراید M 25/0 و ستون تعویض یونی با دو برابر حجم ستون از محلول سدیم کلراید 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 (مرحلهٔ 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 (مرحلهٔ شویش). درنهایت، همهٔ 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 (مرحلهٔ احیا و درمجموع با ۱۰ برابر حجم ستون). در هریک از خروجی‌های ستون شامل FT، شستشو، شویش و احیا در ظروف شیشه‌ای عاری از اندوتوکسین (آون شده در

دمای C°250 به مدت ۳۰ دقیقه) جمع‌آوری شد و برای انجام آزمون اندازه‌گیری اندوتوکسین، نمونه‌برداری گردید. برای تعیین حجم خروجی ستون در هر مرحله از تخلیص از روش توزین استفاده شد. میزان اندوتوکسین در جریان‌های خروجی از طریق آزمون نقطهٔ نهایی کمّی کروموژنیک در طول‌موج 405 nm اندازه‌گیری گردید. غلظت پروتئین با استفاده از روش جذب نوری در طول‌موج 280 nm اندازه‌گیری و میزان بازیابی پروتئین محاسبه شد. ضریب خاموشی ۰/۰۱ درصد (mg/ml 1) پروتئین استرپتوکیناز معادل ۰/۹۴۹ لحاظ گردید (۱۷). در پایان، تأثیر این فرایند بر نتایج آزمون‌های 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 کروموژنیک نقطهٔ نهایی آزمون و با استفاده از سوبسترای کروموژنیک S-2251 صورت گرفت. اساس این آزمون بر پایهٔ تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین در حضور استرپتوکیناز استوار است. سوبسترای کروموژنیک که از اتصال پارانیتروآنیلین به یک توالی پپتیدی (Val-Leu-Lys) ساخته‌شده است که توسط پلاسمین پیوند میان نیتروآنیلین و گروه پپتیدی شکسته می‌شود و در اثر آزاد شدن پارانیتروآنیلین، طیف جذبی زردرنگ ناشی از نیتروآنیلین آزاد در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر قابل‌اندازه‌گیری است. ازآنجاکه پلاسمین فعال در اثر تأثیر استرپتوکیناز بر روی پلاسمینوژن تولید می‌گردد و پلاسمین نیز باعث هیدرولیز سوبسترای کروموژنیک و افزایش دانسیته نوری محلول می‌شود؛ درنتیجه، میزان جذب نوری (OD) با غلظت استرپتوکیناز ارتباط مستقیم دارد.

برای انجام آزمون از سوبسترای کروموژنیک mM 3، استاندارد داخلی با فعالیت IU/ml 4/524862 استفاده شد. غلظت نمونه‌های مورد آزمون با استفاده از اولترافیلتر با microcone با غشای KD 10 به غلظت mg/ml 10 تغلیظ شد و بافر آن با بافر حامل API تعویض گردید. نمونه‌ها شامل استاندارد و نمونه‌های مورد آزمون با رقت ۱ به ۱۰۰ تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های نهایی استاندارد و نمونه‌های مورد آزمون در سه غلظت IU/ml 7/177، ۱۱۸/۵ و ۷۹/۰۱ تهیه شد (برای تهیهٔ رقت‌های مذکور از نمونه‌های مورد آزمون، فعالیت بیولوژیک نمونه‌ها در ابتدا ۷۰۰، ۷۵۰، ۸۰۰ و ۸۵۰ هزار IU/ml تخمین زده شد). نمونهٔ کنترل حد بالا با فعالیت IU/ml600 با استفاده از استاندارد داخلی ساخته شد. برای کنترل حد پایین، از بافر فسفات نمکی (PBS) استفاده گردید. از هریک از نمونه¬ها (رقت‌های استاندارد، رقت‌های کنترل مثبت، کنترل حد بالا، کنترل حد پایین، رقت‌های تخمین‌های نمونه‌های مورد آزمون) µl 50 به داخل چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد و به هریک از چاهک‌ها µl 25 پلاسمای انسانی اضافه گردید. برای اطمینان از اختلاط محتویات چاهک‌ها، پلیت به‌آرامی به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه روی یک سطح صاف رفت‌وبرگشت حرکت داده شد. میکروپلیت به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور با دمای C°37 قرار گرفت. پس از پایان زمان انکوباسیون، به هریک از چاهک‌ها µl 50 از سوبسترای ۰/۷۵ میلی-مولار اضافه گردید و دوباره به مدت ۲۰ دقیقه در دمای C°37 درجه قرار داده شد؛ سپس برای توقف واکنش، به هریک از چاهک¬ها µl 25 اسید استیک ۲۰ درصد اضافه گردید و جذب نوری آن‌ها در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. نتایج خوانش میکروپلیت با استفاده از نرم‌افزار ParLin vol.1 به روش Parallel Line Assay تجزیه‌وتحلیل گردید و فعالیت زیستی آنزیم استرپتوکیناز مورد آزمون در مقایسه با آنزیم استاندارد تعیین شد. درنهایت، برای هریک از فرایندهای حذف اندوتوکسین، میزان فعالیت بیولوژیک نهایی بازیابی‌شده نسبت به نمونهٔ API اولیه محاسبه و گزارش گردید.

ارزیابی تأثیر فرایند حذف اندوتوکسین بر خلوص API فرآوری‌شدهٔ استرپتوکیناز از طریق کروماتوگرافی فاز معکوس با کارایی بالا (RP-HPLC): برای ارزیابی تأثیر روش‌های حذف اندوتوکسین با ماتریس‌های یادشده روی درصد خلوص محصول، از RP-HPLC با ستون C18 استفاده شد. فاز متحرک A شامل نسبت ۱ درصد حجمی تری‌فلورو استیک‌اسید (TFA) در آب تزریقی و فاز متحرک B شامل

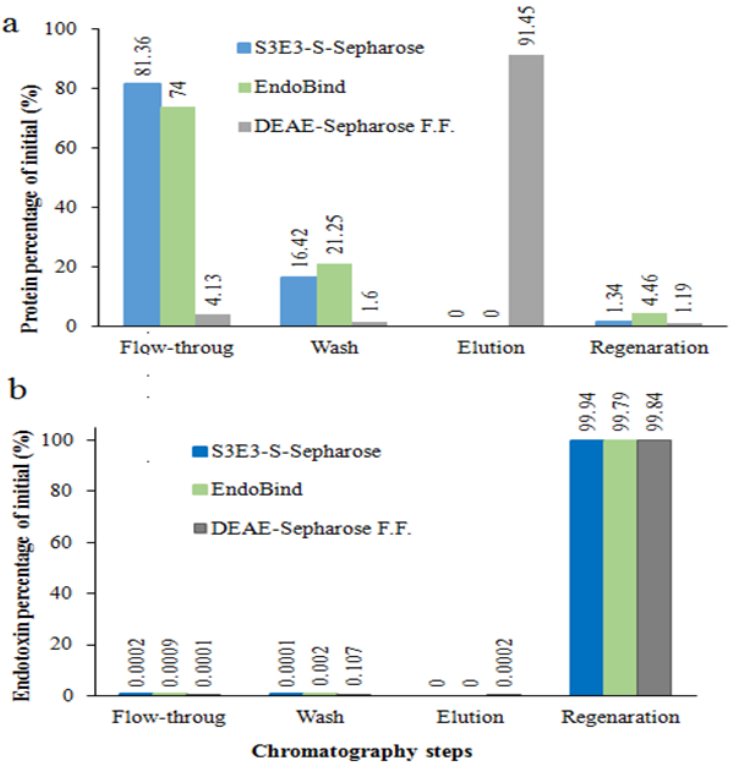
نسبت ۱ درصد حجمی TFA در استونیتریل تهیه گردید. نمونه‌ها با غلظت استرپتوکیناز تقریباً یکسان (از طریق رقیق‌سازی با بافر متعادل‌سازی هر ستون) تهیه شد و در هر آزمون 20 µl نمونه به ستون C18 اعمال و طی برنامهٔ گرادیانی، بر اساس جدول شمارهٔ ۲ از ستون خارج‌سازی گردید. تطابق کروماتوگرام نمونهٔ قبل و بعد و عدم مشاهدهٔ پیک اضافه نمایانگر نبودِ نشت مادهٔ 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.

جدول شماره ۲. . برنامهٔ گرادیانی 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

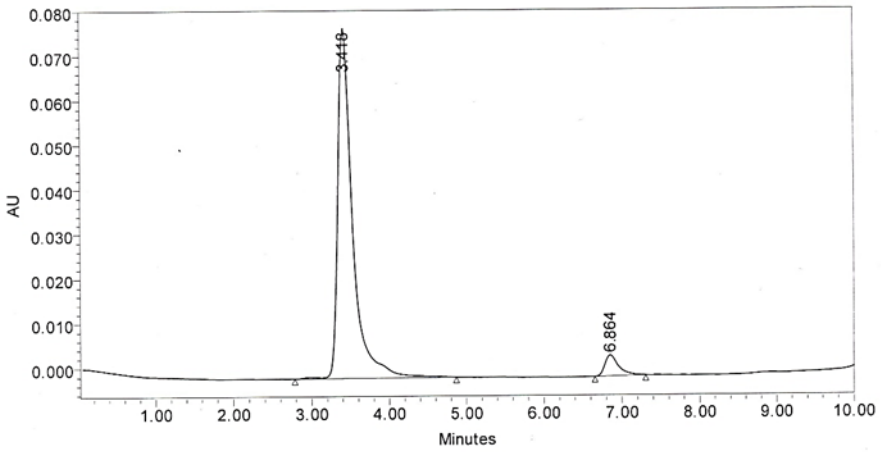
یافته‌های پژوهش

استفاده از ماتریس تمایلی S3E3-S-Sepharose در حذف اندوتوکسین از مادهٔ دارویی فعال استرپتوکیناز: مراحل حذف اندوتوکسین شامل اعمال نمونه، شستشو، شویش 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 شمارهٔ ۱ نشان داده‌شده است.



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

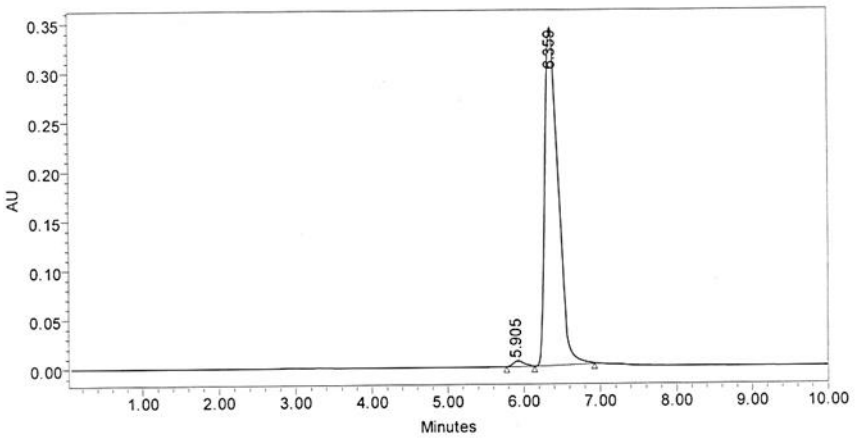
دو ستون‌های تمایلی S3E3-S-Sepharose و EndoBind، در حالت کروماتوگرافی منفی (عدم اتصال پروتئین هدف) عمل کردند و درنتیجه، جریان خروجی از ستون حین اعمال نمونه، موسوم به جریان FT جمع‌آوری گردید. در مرحلهٔ شستشوی این دو ستون با کلرید سدیم ۰/۲۵ مولار، بخشی از پروتئین متصل‌شده به ستون جداسازی شد که با توجه به غلظت اندک اندوتوکسین آن‌ها، خروجی مرحلهٔ شستشو و FT به‌صورت تجمیعی به‌عنوان محصول خروجی این ستون‌ها در نظر گرفته شد. در ستون کروماتوگرافی تعویض یونی، غلظت اندوتوکسین در مرحلهٔ شستشو حاوی سدیم‌دزوکسی‌کلات حدود EU/ml 1/74 بود و درنتیجه، تنها جریان خروجی ستون در مرحلهٔ شویش به‌عنوان محصول این ستون در نظر گرفته شد. برای بررسی تأثیر هریک از روش‌های مذکور بالا روی درصد خلوص محصول، ابتدا با هدف اطمینان از نبودِ نشت 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 گرادیانی جدول شمارهٔ ۲، در زمان ۳/۴ دقیقه، پیک این پپتید از ستون خارج و در کروماتوگرام نشان داده شد (شکل ۲).



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

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

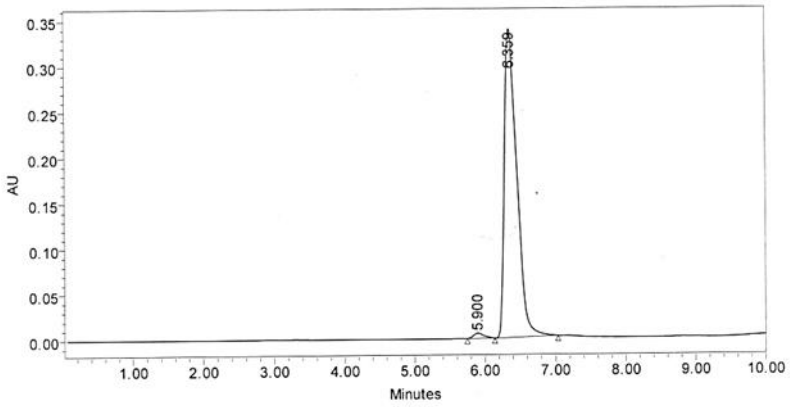
سپس نمونهٔ محصول مادهٔ دارویی فعال استرپتوکیناز بدون آلودگی اندوتوکسینی به‌عنوان نمونهٔ پیش (کروماتوگرام شکل شمارهٔ ۳) و نمونهٔ فرآوری‌شده با هریک از ماتریس‌ها به‌عنوان نمونه‌های پس از فرآوری به ستون HPLC اعمال گردید. همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۳ دیده می‌شود، پیک مربوط به استرپتوکیناز در زمان ماند ۶/۴ دقیقه از ستون خارج می‌گردد.



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

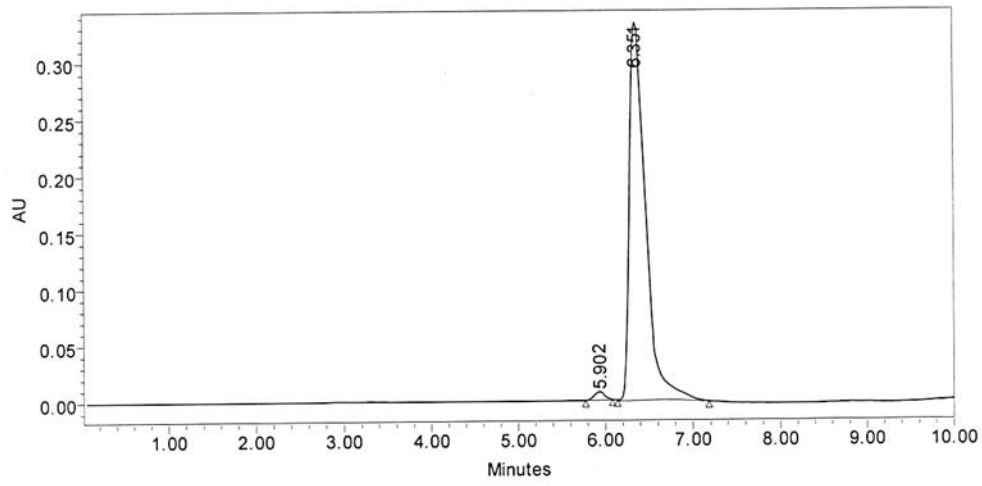
شکل شماره ۳. کروماتوگرام نمونهٔ API استرپتوکیناز به‌عنوان نمونهٔ کنترل پیش از فرآوری

در هریک از کروماتوگرام‌های مربوط به نمونه‌های استرپتوکیناز فرآوری‌شده با هریک از ستون‌های S3E3-S-Sepharose (شکل شمارهٔ ۴)، ستون تجاری EndoBind (شکل شمارهٔ ۵) و ستون کروماتوگرافی تعویض یونی (شکل شمارهٔ ۶)، پروفایل پیک دقیقاً مانند پیک نمونهٔ کنترل پیش از فرآوری بود؛ بنابراین، می‌توان گفت که هیچ‌یک از روش‌های فرآوری بر روی درصد خلوص محصول تأثیر منفی نداشتند. علاوه بر این، مشاهده نکردن پیک در زمان ۳/۴ دقیقه در کروماتوگرام نمونهٔ فرآوری‌شده با ستون تمایلی S3E3-S-Sepharose، بیان‌کنندهٔ نبودِ نشت این پپتید از ستون به محصول بود.



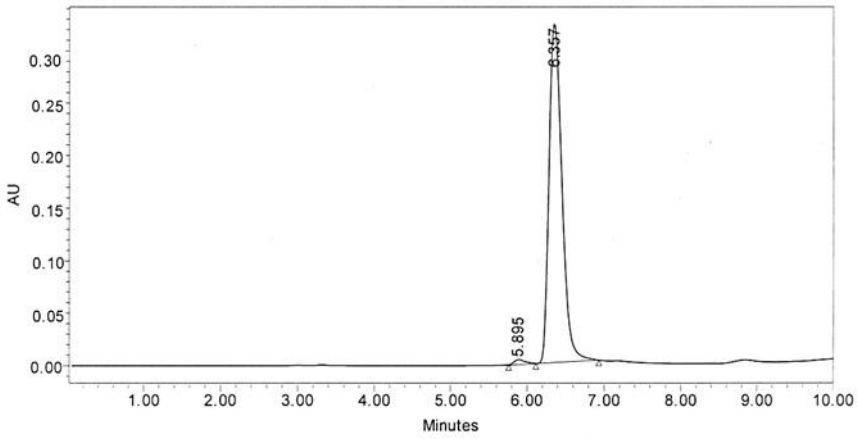
	RT	Area	% Area	Height
1	5.900	58076	1.39	5696
2	6.359	4105507	98.60	342546

شکل شماره ٤. کروماتوگرام نمونهٔ 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 نمونهٔ 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 ٦. کروماتوگرام نمونهٔ شویش کروماتوگرافی تعویض یونی

به‌طورکلی، مشاهده نکردن پیک اضافی در مقایسه با نمونهٔ پیش از فرآوری بیان‌کنندهٔ عدم نشت لیگاند یا هرگونه تغییر در ساختار پروتئین بود. برای بررسی تأثیر هریک از فرایندهای به‌کاربرده‌شده بر روی فعالیت بیولوژیک استرپتوکیناز، ابتدا نمونه‌های محصول جمع‌آوری‌شده 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 Parralell line با نرم‌افزار ParLin vol.1، تغییرات فعالیت بیولوژیک آن‌ها نسبت به نمونهٔ API استرپتوکیناز غیر آلوده ارزیابی گردید. نتایج مربوط به مقایسهٔ عملکرد هریک از روش‌ها در جدول شمارهٔ ۳ آورده شده است.

جدول شماره۳. . مقایسهٔ عملکرد روش‌های مختلف کروماتوگرافی تمایلی و تعویض یونی در حذف اندوتوکسین

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

همان‌طور که در جدول شمارهٔ ۳ گزارش‌شده است، روش تعویض یونی نسبت به سایر روش‌ها بازیابی، پروتئین کلی کمتری نسبت به سایر روش‌ها داشت. ازآنجاکه در روش کروماتوگرافی تعویض یونی، هدایت الکتریکی بالا مانع جذب جزء جذب‌شونده 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 KDa 10 استفاده شد. در این مرحله، بازدهی بازیابی پروتئین ۹۱/۲۶ درصد بود. ازآنجاکه در هریک از روش‌ها بازدهی بازیابی پروتئین حاصل‌ضرب مقادیر بازیابی پروتئین در هریک از مراحل است؛ بنابراین، روش تعویض یونی به علت نیاز به یک مرحلهٔ تعویض بافر بیشتر، بازدهی کمتری داشت. برخلاف روش کروماتوگرافی تعویض یونی، دو روش کروماتوگرافی تمایلی با ماتریس تهیه‌شده در این تحقیق و ماتریس تجاری، هر دو از نوع کروماتوگرافی منفی بودند؛ بدین معنی که در این دو ماتریس، عمدهٔ پروتئین بدون اتصال به ماتریس در جریان FT از ستون خارج گردید (به‌ترتیب حدود ۸۱/۴ 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 (به‌ترتیب حدود ۱۶/۴ درصد و ۲۱/۲ درصد)، درحالی‌که همچنان اندوتوکسین به ماتریس‌ها متصل بود. ازآنجاکه غلظت اندوتوکسین در پروتئین خروجی در مرحلهٔ شستشو بسیار اندک بود؛ بنابراین، برای جلوگیری از اتلاف پروتئین، خروجی شستشو به همراه خروجی FT به‌عنوان محصول این روش‌ها جمع‌آوری گردید. در روش تعویض یونی، پروتئین در جریان شویش از ماتریس جدا شد و بازیابی این مرحله طولانی (۹۱/۴ درصد) بود. در هر سه روش، پروتئین جمع‌آوری‌شده به‌عنوان محصول، نیاز به تغلیظ داشت. ازآنجاکه میزان بازیابی کلی هریک از روش‌ها از حاصل‌ضرب بازیابی پروتئین در ریز مراحل آن محاسبه شد؛ بنابراین، روش کروماتوگرافی تعویض یونی به سبب نیاز به

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، هرچند میزان پتنسی (فعالیت ویژه) محصول در هر سه روش به میزان جزئی کاهش یافت. در همهٔ روش‌ها پروتئین اتلاف‌شده و افت پتنسی باعث کاهش بازدهی فعالیت بیولوژیک گردید. در میان روش‌های استفاده‌شده، 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 نتیجه‌گیری

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 یادشده برای حذف اندوتوکسین از مادهٔ دارویی فعال استرپتوکیناز استفاده گردید و عملکرد ماتریس با عملکرد ماتریس تجاری بر پایهٔ 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 باقی‌ماندهٔ کمتر و به‌عبارت‌دیگر، بازدهی حذف اندوتوکسین بیشتر داشت. این افزایش بازدهی حذف اندوتوکسین توسط ماتریس S3E3-S-Sepharose را می‌توان 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 بیان‌کنندهٔ تأثیر مثبت حذف اسید آمینهٔ گلوتامیک اسید از ساختار آن و درنتیجه، افزایش بار مثبت این واریانت بر روی خاصیت خنثی‌کنندگی اندوتوکسین بود (۱۳). اثر افزایش بار مثبت و خاصیت آب‌گریزی پپتیدهای ضدمیکروبی در افزایش خواص ضدمیکروبی و خاصیت اتصال به LPS در تحقیقات مختلف گزارش‌شده است (۲۵-۲۰، ۱۴). افزایش بار مثبت باعث افزایش برهم‌کنش الکترواستاتیک میان نواحی دارای بار مثبت پپتیدهای ضدمیکروبی و فسفولیپیدهای دارای بار منفی غشای سلول باکتری و درنتیجه، افزایش خاصیت ضدمیکروبی پپتیدهای کاتیونی می‌گردد (۳۲-۲۶). علاوه بر ارتباط میان افزایش بار مثبت پپتید و افزایش خاصیت ضدمیکروبی آن، گزارش‌های اختصاصی در تأثیر این افزایش بار در افزایش خاصیت اتصال اندوتوکسین نیز وجود دارد؛ به‌عنوان‌مثال، افزودن بار خالص پپتید S3 از طریق جایگزینی دو اسید آمینهٔ گلایسین و گلوتامیک اسید آن با لیزین (واریانت SΔ3)، به افزایش خاصیت خنثی‌کنندگی LPS و افزایش خاصیت ضدمیکروبی آن پپتید منجر گردید (۳۳، ۱۴). اثر افزایش بار مثبت در افزایش قدرت تمایلی اتصال به LPS و خاصیت ضدمیکروبی برای پپتیدهای ضدمیکروبی دیگر نظیر واریانت‌های پپتید Buferin2 مشتق از بافت شکمی وزغ آسیایی موسوم به BF2B و BF2A (۳۴) یا پپتید ضدمیکروبی P6m که تعداد بسیاری اسید آمینهٔ آرژنین با بار مثبت دارد (۳۱) و یا پپتید ضدمیکروبی Ponericin W1 که حاوی تعداد فراوانی اسید آمینهٔ لیزین دارای بار مثبت است، (۳۲) نیز گزارش‌شده است. این افزایش تمایل به LPS می‌تواند ناشی از افزایش برهم‌کنش الکترواستاتیک میان نواحی بار مثبت پپتید و یون‌های فسفات (دارای بار منفی) لیپید A، LPS باشد. در اتصال LPS به پپتیدهای ضدمیکروبی، یون‌های بار منفی فسفات در مولکول LPS به اسید آمینه‌های دارای بار مثبت در پپتیدهای ضدمیکروبی 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، پپتیدS3 در ساختار توالی خود دو اسید آمینهٔ گلوتامیک اسید داشت؛ بنابراین، استفاده از روش تثبیت از طریق گروه کربوکسیل، به تثبیت هتروژن S3 از ناحیهٔ C ترمینال و/ یا

هریک از اسید آمینه‌های گلوتامیک اسید منجر گردید. در کروماتوگرافی تمایلی، هتروژن بودن لیگاند با پدیدهٔ انقطاع پیک ارتباط مستقیم دارد. پدیدهٔ 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 منافعی 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

1. Williams KL. Endotoxin relevance and control overview. Endotoxins: CRC Press; 2007. p. 47-66.
2. Williams KL. Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation: CRC Press; 2007.
3. Wang X, Quinn PJ. Endotoxins: structure, function and recognition. Springer Science & Business Media; 2010.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. High D. Endotoxin Removal from DNA using EndoBind-R™. 2007.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Khan HU. The role of Ion Exchange Chromatography in purification and characterization of molecules. Ion Exchange Technologies 2012:331-42. doi:10.5772/52537.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.