

Pročišćavanje i svojstva virusa zaušnjaka i ospica

Sviben, Dora

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:593988>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Dora Sviben

**PURIFICATION AND PROPERTIES OF MUMPS
AND MEASLES VIRUS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Dora Sviben

**PROČIŠĆAVANJE I SVOJSTVA VIRUSA
ZAUŠNJAKA I OSPICA**

DOKTORSKI RAD

Mentorice:
dr.sc. Beata Halassy
dr. sc. Marija Brgles

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Dora Sviben

PURIFICATION AND PROPERTIES OF MUMPS AND MEASLES VIRUS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
dr.sc. Beata Halassy
dr. sc. Marija Brgles

Zagreb, 2018.

ZAHVALE

Najprije želim zahvaliti...

...svojim mentoricama, na podršci, strpljenju i pomoći u izradi ovog rada, na trudu i ulaganju u moje obrazovanje, a najviše na pruženoj prilici da surađujem s njima i izradim ovu disertaciju.

... svim svojim kolegama i kolegicama u CIPZB-u, a najviše Maji i Tihani, na ugodnom društvu, dobroj radnoj atmosferi, laboratorijskim druženjima, i naravno, kolačima. ☺

...profesorima, asistentima i kolegama s kojima sam se susrela na PMF-u kroz sve godine, a posebno onima na Zavodu za biokemiju, na prenesenom znanju i vještinama, pomoći, pruženim prilikama i uvijek dobroj atmosferi.

Posebno htjela...

...Ivi i Branimiru, koji su uvijek tu kad je kriza, na smijehu, društvu, nevjerojatnoj vjeri i povjerenju u mene i podršci kad je bilo najteže – oduvijek, zauvijek,

...Barbari, Faruku, Vedranu i Mariji – na svim ovim godinama i druženjima, smijehu, pozitivni, podršci i vjerovanju da ja to mogu – nije važno koliko ste daleko, uvijek ste tu.

...Mirsadi, mom Macu, jedinoj pravoj kolegici i suborcu kroz doktorski studij, na zajedničkim ispitima, seminarima i brzopoteznim motivacijskim kavama – sad si ti na redu. ☺

...Ivani, Marini, Boženi, Studenki i Vojkanu, na motivirajućim razgovorima i dobroj zabavi uz čašu vina nakon zajedničke patnje na treningu – pomogli ste više nego što možete zamisliti.

...mojoj majci, najboljoj prijateljici s najduljim stažem, na bezuvjetnoj podršci u svakom trenutku, ljubavi i nepokolebljivoj vjeri u mene.

Last, but not least, I want to thank Vici, Edita, Sam, Cristina, Steffi, Rudi, Nicole, Ben, Mätti, Vanessa, Hörby, Stefan, Lukas, Andy and Karin for teaching me new things, showing me new worlds, making me laugh, and above all else, making me feel like I belong, like I am home.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
PROŠIRENI SAŽETAK.....	XVII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Građa i sastav virusnih čestica MuV-a i MeV-a.....	4
2.1.1. Proteinski sastav virusnih čestica MuV-a i MeV-a.....	4
2.1.2. Lipidni sastav virusnih čestica.....	8
2.2. Heterogenost virusnih suspenzija	8
2.3. Stabilnost virusnih čestica	10
2.4. Pročišćavanje i koncentriranje virusnih čestica	11
2.4.1. Ultracentrifugiranje.....	12
2.4.2. Ultrafiltracija i dijafiltracija	13
2.4.3. Kromatografsko pročišćavanje virusa.....	14
2.4.3.1. Kromatografija isključenjem po veličini (SEC).....	16
2.4.3.2. Kromatografija hidrofobnih interakcija (HIC).....	16
2.4.3.3. Kromatografija ionske izmjene (IEX).....	18
2.4.3.4. Afinitetna (AC) i imunoafinitetna kromatografija (IAC).....	18
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. Standardne kemikalije.....	20
3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi.....	21
3.1.3. Boje	21
3.1.4. Enzimi, proteini.....	21
3.1.5. Sastojci mikrobioloških hranjivih podloga i medija	21
3.1.6. Stanične kulture i virusni sojevi.....	21
3.1.7. Kromatografske kolone i punila	21
3.1.8. Ostali materijal.....	22
3.2. Stanične kulture i proizvodnja virusa	22
3.2.1. Stanične kulture	22
3.2.2. Proizvodnja virusa i neinficiranih kontrola.....	22
3.3. Određivanje koncentracije i veličine čestica.....	23

3.3.1. Određivanje koncentracije infektivnih virusnih čestica.....	23
3.3.2. Određivanje veličine i koncentracije ukupnih čestica	24
3.4. Određivanje koncentracije proteina i DNA.....	25
3.4.1. Određivanje koncentracije proteina po Ehresmannu.....	25
3.4.2. Konjugacija HRP-a na antitijela anti-Vero-IgG za uspostavu testa ELISA.....	25
3.4.3. Određivanje ukupnih HCP-a u virusnim uzorcima metodom enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi, ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay).....	26
3.4.4. Detekcija stanične DNA u pročišćenim virusnim uzorcima	27
3.5. Ispitivanje stabilnosti proteina i virusa.....	29
3.5.1. Ispitivanje stabilnosti proteina metodom diferencijalne skenirajuće fluorimetrije.....	29
3.5.2. Određivanje stabilnosti virusa u otopinama aminokiselina i soli	29
3.5.3. Određivanje stabilnosti virusa u ovisnosti o temperaturi.....	30
3.5.4. Određivanje stabilnosti virusa pri različitim pH vrijednostima.....	30
3.5.5. Ispitivanje utjecaja staklenih i plastičnih reakcijskih tubica na koncentraciju ukupnih čestica u virusnim suspenzijama	30
3.5.6. Ispitivanje utjecaja pipetiranja i vorteksiranja na virusne čestice.....	31
3.5.7. Analiza podataka	31
3.6. Pročišćavanje virusa i neinficiranih kontrola ultracentrifugiranjem	31
3.7. Pročišćavanje virusa i neinficiranih kontrola dijalizacijom.....	31
3.8. Kromatografske metode	31
3.8.1. Kromatografija isključenjem po veličini, SEC	32
3.8.2. Izolacija antitijela iz seruma zamorčića za uspostavu ELISA-e za određivanje ukupnih staničnih proteina prisutnih u uzorcima virusa	33
3.8.3. Kromatografija hidrofobnih interakcija za pročišćavanje virusa	33
3.8.4. Kromatografija ionske izmjene za pročišćavanje virusa.....	34
3.8.5. Afinitetna i imunoafinitetna kromatografija za pročišćavanje proteina i virusa	34
3.9. Elektroforetske metode.....	35
3.9.1. Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE).....	35
3.9.2. Dvodimenzionalna gel elektroforeza	36
3.9.3. Western blot.....	36
3.10. Analiza proteina i lipida spektrometrijom masa.....	37
3.10.1. Razgradnja proteina tripsinom u gelu, ekstrakcija i pročišćavanje peptida	37
3.10.2. Analiza proteina spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF-MS.....	38
3.10.3. Izolacija lipida iz staničnih i virusnih uzoraka	41

3.10.4. Razdvajanje lipida dvodimenzijском tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti, 2D-HPTLC	42
3.10.5. Analiza lipida spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF-MS	42
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	44
4.1. Heterogenost virusnih suspenzija i suspenzija ekstracelularnih vezikula - veličina i koncentracija ukupnih i infektivnih čestica u početnim uzorcima	44
4.2. Ispitivanje stabilnosti virusa i proteina	50
4.2.1. Ispitivanje stabilnosti proteina metodom DSF i SEC-HPLC	50
4.2.2. Određivanje stabilnosti virusa u otopinama aminokiselina i soli koje se koriste u postupcima pročišćavanja	64
4.2.3. Određivanje stabilnosti virusa u otopinama - ispitivanje potencijalnih stabilizatora ...	67
4.2.4. Određivanje stabilnosti virusa u ovisnosti o temperaturi	70
4.2.5. Stabilnost virusa pri različitim pH vrijednostima	72
4.2.6. Utjecaj staklenih i plastičnih tubica na koncentraciju ukupnih čestica	74
4.2.7. Utjecaj pipetiranja i vorteksiranja na virusne čestice	75
4.3. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a ultracentrifugiranjem	77
4.4. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a ultrafiltracijom	83
4.5. Kromatografske metode pročišćavanja MuV-a i MeV-a	85
4.5.1. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a kromatografijom hidrofobnih interakcija	85
4.5.2. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a kromatografijom ionske izmjene	94
4.5.3. Pročišćavanje proteina i MuV-a afinitetnom i imunoafinitetnom kromatografijom	96
4.6. Istraživanje proteoma i lipidoma MuV-a i MeV-a	111
4.6.1. Proteomi MuV-a i MeV-a pročišćenih UC-om	112
4.6.1.1. MuV	112
4.6.1.2. MeV	118
4.6.2. Proteomi MuV-a i MeV-a pročišćenih HIC-om	125
4.6.2.1. MuV	125
4.6.2.2. MeV	128
4.6.3. Proteom MuV-a pročišćenog IAC-om	130
4.6.4. Proteomi pročišćenih ECV-a i usporedba s virusnim proteomima	131
4.6.5. Lipidomi MuV-a i MeV-a pročišćenih UC-om	139
§ 5. ZAKLJUČAK	141
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ	143
6.1. Popis aminokiselina	143
6.2. Popis kratica	143
§ 7. LITERATURNI IZVORI	148

§ 8. DODATAK.....	LVIII
§ 9. ŽIVOTOPIS	LXI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

PROČIŠĆAVANJE I SVOJSTVA VIRUSA ZAUŠNJAKA I OSPICA

Dora Sviben

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji, Rockefellerova 10, Zagreb

Virusi zaušnjaka (MuV) i ospica (MeV) uzrokuju istoimene bolesti u ljudi koje se mogu spriječiti cijepljenjem, a dobivaju na značaju i u onkolitičkoj viroterapiji. Cjelovitost i čistoća virusnih čestica osiguravaju učinkovitost i sigurnost ovakvih proizvoda, stoga je njihovo pročišćavanje i koncentriranje izuzetno važno u biotehnologiji, ali i temeljnim istraživanjima. Ciljevi ovog rada su ispitati pročišćavanje MuV-a i MeV-a kromatografijom hidrofobnih interakcija (HIC) i ionske izmjene (IEX), imunoafinitetnom kromatografijom (IAC), ultracentrifugiranjem (UC) i dijafiltracijom (DF), ispitati stabilnost virusa u uvjetima pročišćavanja i čuvanja te istražiti njihove lipidome i proteome. Rezultati pokazuju da IEX nije prikladan za pročišćavanje MuV-a i MeV-a, dok HIC i IAC daju relativno visoke prinose infektivnih virusa (60-70%). Na kromatografske prinose značajno utječe promjenjiva heterogenost početnih virusnih uzoraka. Analiza proteoma virusa potvrdila je prisutnost svih strukturnih virusnih proteina te staničnih proteina aktina, aneksina, ciklofilina A, integrina $\beta 1$ i moezina, a njihov značaj u virionima tek treba utvrditi.

(163+LXIII stranica, 51 slika, 37 tablica, 213 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: heterogenost virusnih suspenzija / kromatografsko pročišćavanje / stabilnost virusa / virus ospica / virusni proteini / virus zaušnjaka

Mentorice: dr. sc. Beata Halassy, zn. savj.
dr. sc. Marija Brgles, zn. sur.

Rad prihvaćen: 06. lipnja 2018.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Marko Močibob
2. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
3. dr. sc. Andreja Ambriović-Ristov, zn. savj.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

PURIFICATION AND PROPERTIES OF MUMPS AND MEASLES VIRUS

Dora Sviben

Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology, Rockefellerova 10, Zagreb

Mumps (MuV) and measles (MeV) virus cause mumps and measles in humans, both preventable by vaccination, but they are gaining importance in oncolytic virotherapy. Viral particle integrity and purity ensure efficacy and safety of such products, therefore their purification and concentration is exceptionally important both in biotechnology and basic research. The aims of this work are to investigate purification of MuV and MeV by hydrophobic interaction (HIC), ion-exchange (IEX) and immunoaffinity chromatography (IAC), ultracentrifugation (UC) and diafiltration (DF), investigate virus stability under used purification and storage conditions and investigate their lipidomes and proteomes. Results deem IEX unsuitable for MuV and MeV purification, while HIC and IAC yield relatively high recoveries of infective viruses (60-70%). Chromatographic yields are significantly influenced by initial virus sample heterogeneity. Analysis of virus proteomes confirmed the presence of all structural viral proteins and cellular proteins actin, annexins, cyclophilin A, integrin β 1 and moesin, but their significance in virions remains to be determined.

(163+LXIII pages, 51 figures, 37 tables, 213 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: chromatographic purification / measles virus / mumps virus / viral proteins / viral suspension heterogeneity / virus stability

Supervisors: Dr. Beata Halassy, Senior Scientist
Dr. Marija Brgles, Research Associate

Thesis accepted: June 6th, 2018

Reviewers:

1. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
2. Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor
3. Dr. Andreja Ambriović-Ristov, Senior Scientist



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

PROŠIRENI SAŽETAK

1. INTRODUCTION

Mumps (MuV) and measles (MeV) virus are members of the family *Paramyxoviridae*, which cause mumps and measles in humans, respectively, both preventable by vaccination^I. Lately they are gaining importance as oncolytic viruses – a group of viruses selectively infecting and killing tumor cells, while normal tissue remains uninfected^{II}. MuV and MeV recognize sialic acid and CD46 respectively, and use these receptors for attachment and subsequent entry to the cells. These receptors are often overexpressed on tumor cells thus rendering them more susceptible to virus infection and lysis^{II,III}.

In order to ensure their efficacy, virus particles have to be completely and correctly assembled, while their purity ensures the safety of such products. Impurities in virus preparations may arise from production and purification processes – from cell cultures, reagents and additives (*e.g.* albumin, antibiotics), from host cells (*e.g.* proteins, nucleic acids, proteoglycans, glycosaminoglycans, extracellular vesicles), from the process itself (*e.g.* extractables, leachables) or from the viruses (*e.g.* aggregates, non-enveloped nucleocapsids, empty virus envelopes, defective interfering particles, *etc.*)^{IV,V}. Purification and concentration of viruses are therefore exceptionally important for biotechnology and application of viruses in medicine, but also for acquiring pure virus particles for basic research.

^I R. A. Lamb, G. D. Parks, in D. M. Knipe, P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, p. 957–995.

^{II} S. J. Russell, *Cancer Gene Ther.* **9** (2002) 961–966.

^{III} O. V. Matveeva, *Mol. Ther. - Oncolytics* **2** (2015) 15011.

^{IV} P. Nestola, C. Peixoto, R. R. J. S. Silva, P. M. Alves, J. P. B. Mota, M. J. T. Carrondo, *Biotechnol. Bioeng.* **112** (2015) 843–857.

^V M. W. Wolff, U. Reichl, *Expert Rev. Vaccines* **10** (2011) 1451–1475.

The aim of virus particle downstream processing (DSP) is safe, highly purified product containing maximal concentration of infective viral particles^{IV}. Improvements in upstream processing (USP) resulted in moving the bottleneck of viral particle production to DSP. The most often used methods for virus purification are ultracentrifugation (UC), ultra- and diafiltration (UF, DF) and chromatographic methods. Lately, the latter are gaining importance since they enable fast, efficient and reproducible purification of viral particles, and are easily scaled up^{VI}.

The aim of this research was to investigate the purification of MuV and MeV by different chromatographic methods, UC and DF, as well as to investigate their stability under conditions used during DSP (changes in pH, temperature, buffer and solution composition – *e.g.* amino acids, sugars, and salts). The most important monitored parameter was the concentration of infective viral particles (determined by *in vitro* virus titration test), but total particle concentration and their size were also monitored (determined by nanoparticle tracking analysis, NTA). Purity of viruses was assessed by monitoring content and composition of host cell proteins (HCPs) by ELISA and mass spectrometry (MS), while polymerase chain reaction (PCR) was used to monitor the removal of host cell genomic DNA. The hypothesis was that complete viral particles, appropriate for medical purposes and basic research, can effectively be separated from heterogeneous virus particle suspensions by various purification methods, primarily chromatography-based.

2. LITERATURE OVERVIEW

2.1 Structure and composition of MuV and MeV particles

MuV and MeV are enveloped, non-segmented, negative single-stranded RNA viruses. They are pleomorphic in shape with diameters in range 100 – 900 nm^{VII-XII}. Genomes of MuV and MeV encode for 9 and 8 viral proteins, respectively (Tables 1 and 2).

^{VI} M. de las Mercedes Segura, A. Kamen, A. Garnier, *Biotechnol. Adv.* **24** (2006) 321–337.

^{VII} S. A. Rubin, C. J. Sauder, K. M. Carbone, in D. M. Knipe, P. M. Howley (ur.), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, p.1024–1041.

^{VIII} H. Duc-Nguyen, E. N. Rosenblum, *J. Virol.* **1** (1967) 415–429.

^{IX} D. E. Griffin, in D. M. Knipe, P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, p. 1042–1069.

^X K. Weiss, D. Salzig, Y. Röder, J. Gerstenberger, M. D. Mühlebach, K. Cichutek, R. Pörtner, P. Czermak, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **9** (2013) 243–254.

^{XI} E. Daikoku, C. Morita, T. K. Kohno, K. Sano, *Bull. Osaka Med. Coll.* **53** (2007) 107–114.

^{XII} B. G. Ray, R. H. Swain, *J. Pathol. Bacteriol.* **67** (1954) 247–252.

Table 1. Proteins coded by MuV genome (strain L-Zagreb, GenBank:AY685921.1)

protein	CDS	N_{aa}	M_r	pI	accession number (UniProt)
nucleoprotein, NP	146 – 1795	549	61336	5.24	Q5SC49
phosphoprotein, P	1979 – 3152	391	41595	7.82	Q5SC57
V	1979 – 2653	224	24096	8.86	Q5SC47
I	1979 – 2490	171	18302	10.04	Q5SC46
matrix protein, M	3228 – 4481	375	41580	9.52	Q5SC54
fusion protein, F_0^*	4546 – 6162	538	58730	8.13	Q5SC53
fusion protein fragment 1, F_1^*	-	436	47345	5.99	-
fusion protein fragment 2, F_2^*	-	102	11402	9.67	-
small hydrophobic protein, SH	6268 – 6441	57	6833	9.82	Q5SC52
hemagglutinin-neuraminidase, HN^*	6614 – 8362	582	64127	7.79	Q5SC51
RNA-dependent RNA-polymerase, L	8468 – 11815	2261	256819	6.18	Q5SC50

CDS – coding sequence of genomic RNA, N_{aa} – number of amino acids in the protein, * - glycoproteins, real M_r differs from theoretical because of posttranslationally added glycans

Viral RNA is packed into a filamentous complex called ribonucleocapsid (RNP), composed of nucleoprotein (NP or N) which interacts with genomic RNA, phosphoprotein (P) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, also termed large protein, L). RNP is connected to matrix protein (M) located directly under the lipid envelope^{XIII, XIV}.

Lipid bilayer of MuV and MeV is spiked with two types of glycoproteins: attachment glycoprotein (HN or H) responsible for virus attachment to the cells, and fusion glycoprotein (F) responsible for virus and cell membrane fusion^{XV}. F is synthesized as an inactive precursor, and cleavage by cell protease furin yields an active form composed of two fragments (F_1 and F_2) linked by disulfide bonds^{VII, IX}.

^{XIII} R. L. Kingston, W. A. Baase, L. S. Gay, *J. Virol.* **78** (2004) 8630–8640.

^{XIV} R. W. Ruigrok, T. Crépin, D. Kolakofsky, *Curr. Opin. Microbiol.* **14** (2011) 504–510.

^{XV} F. El Najjar, A. P. Schmitt, R. E. Dutch, *Viruses* **6** (2014) 3019–3054.

Table 2. Proteins coded by MeV genome (strain Edmonston-Zagreb, GenBank: AY486083.1)

protein	CDS	N_{aa}	M_r	pI	accession number (UniProt)
nucleoprotein, N	108 – 1685	525	58131	5.15	Q89933
phosphoprotein, P	1807 – 3330	507	53957	5.07	Q77M25
V	1807 – 2705	299	32074	4.80	Q77M24
C	1829 – 2389	186	21037	10.31	Q77M23
matrix protein, M	3438 – 4445	335	37749	9.24	Q6RXY8
fusion protein, F ₀ *	5449 – 7110	553	59864	8.87	O93055
fusion protein fragment 1, F ₁ *	-	438	47069	6.28	-
fusion protein fragment 2, F ₂ *	-	115	12812	11.46	-
hemagglutinin, H*	7271 – 9124	617	69162	6.74	Q9IC33
RNA-dependent RNA-polymerase, L	9234 – 15785	2183	247747	8.40	Q77M22

During P gene transcription, polymerase can insert one or more G nucleotides on specific sites in mRNA, or can use a second initiator methionine codon, thus yielding two more transcripts which code for proteins V/I in MuV and V/C in MeV^{XVI,XVII}. These are non-structural viral proteins, and are unnecessary for virus replication under some conditions^{XVIII}. They appear to aid host cell immune response evasion by blocking interferon signaling^{XIX,XX}.

MuV's genome additionally codes for small hydrophobic protein (SH) whose function is still unclear, but it might also aid immune response evasion by blocking TNF α signaling^{XXI}.

^{XVI} R. G. Paterson, R. A. Lamb, *J. Virol.* **64** (1990) 4137–4145.

^{XVII} W. J. Bellini, G. Englund, S. Rozenblatt, H. Arnheiter, C. D. Richardson, *J. Virol.* **53** (1985) 908–919.

^{XVIII} F. Radecke, M. A. Billeter, *Virology* **217** (1996) 418–421.

^{XIX} P. Xu, P. Luthra, Z. Li, S. Fuentes, J. A. D'Andrea, J. Wu, S. Rubin, P. A. Rota, B. He, *J. Virol.* **86** (2012) 1768–1776.

^{XX} K. M. Schuhmann, C. K. Pfaller, K. Conzelmann, *J. Virol.* **85** (2011) 3162–3171.

^{XXI} R. L. Wilson, S. M. Fuentes, P. Wang, E. C. Taddeo, A. Klatt, A. J. Henderson, B. He, *J. Virol.* **80** (2006) 1700–1709.

^{XXII} M. McCarthy, R. T. Johnson, *J. Gen. Virol.* **46** (1980) 15–27.

^{XXIII} S. C. Jensik, S. Silver, *J. Virol.* **17** (1976) 363–373.

^{XXIV} B. K. Rima, M. W. Roberts, W. D. McAdam, S. J. Martin, *J. Gen. Virol.* **46** (1980) 501–505.

^{XXV} C. Örvell, *J. Gen. Virol.* **41** (1978) 527–539.

^{XXVI} G. Herrler, R. W. Compans, *Virology* **119** (1982) 430–438.

^{XXVII} H. Naruse, Y. Nagai, T. Yoshida, M. Hamaguchi, T. Matsumoto, S. Isomura, S. Suzuki, *Virology* **112** (1981) 119–130.

^{XXVIII} W. E. Mountcastle, P. W. Choppin, *Virology* **78** (1977) 463–474.

^{XXIX} P. T. Swoveland, *J. Virol. Methods* **13** (1986) 333–341.

^{XXX} D. L. J. Tyrrell, E. Norrby, *J. Gen. Virol.* **39** (1978) 219–229.

^{XXXI} W. W. Hall, S. J. Martin, *J. Gen. Virol.* **19** (1973) 175–188.

^{XXXII} B. K. Rima, S. J. Martin, *J. Gen. Virol.* **44** (1979) 135–144.

^{XXXIII} J. M. Hardwick, R. H. Bussell, *J. Virol.* **25** (1978) 687–692.

^{XXXIV} M. C. Graves, S. M. Silver, P. W. Choppin, *Virology* **86** (1978) 254–263.

Proteomes of MuV and MeV were mostly investigated during 1970s and 1980s, before MS development, and relied mostly on electrophoretic separation of proteins, and detection of newly synthesized proteins by radioactively labeled amino acids^{XXII-XXXIV}. At most, 6 viral proteins were detected – HN/H, P, NP/N, M and F, and some authors reported L as well. Only recently was MuV's proteome investigated by MS, reporting also 6 viral proteins, but here V was detected instead of F^{XXXV}.

Apart from virus coded proteins, various enveloped viruses also contain HCPs^{XXXVI}. The role of HCPs in virus life cycle, as well as the mechanism of their uptake is still unclear. Indications exist that HCPs are specifically incorporated via direct interactions with viral proteins^{XXXVII,XXXVIII}, but they might also be present nonspecifically, especially in the case of highly abundant cytosolic HCPs^{XXXIX}. HCPs can also be present as contamination arising from ECVs^{XL,XLI}. Hitherto, investigations of viral proteomes revealed the presence of numerous HCPs in virus preparations: actin, actin-binding proteins cofilin and filamin, tubulins, annexins, heat shock proteins and chaperones, complement regulatory proteins and tetraspanins, histones, translation related proteins (*e.g.* elongation factors), proteins related to intracellular and vesicular transport (Arf, Rab), redox regulation proteins (thioredoxin, peroxiredoxin) as well as some glycolysis related proteins (enolase, phosphoglycerate kinase, glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase)^{XXXVI-XXXIX,XLII-LX}. Even early investigations of MuV and MeV indicated the presence of actin^{XXV,XXVII,XXX}, while recent article on MuV reported also fibronectin, clathrin and histones^{XXXV}.

-
- ^{XXXV} M. Brgles, M. Bonta, M. Šantak, M. Jagušić, D. Forčić, B. Halassy, G. Allmaier, M. Marchetti-Deschmann, *Viol. J.* **13** (2016) 9.
- ^{XXXVI} R. Cantin, S. Méthot, M. J. Tremblay, *J. Virol.* **79** (2005) 6577–6587.
- ^{XXXVII} E. K. Franke, H. E. Yuan, J. Luban, *Nature* **372** (1994) 359–362.
- ^{XXXVIII} K. Michael, B. G. Klupp, T. C. Mettenleiter, A. Karger, *J. Virol.* **80** (2006) 1332–1339.
- ^{XXXIX} E. Chertova, O. Chertov, L. V. Coren, J. D. Roser, C. M. Trubey, J. W. Bess, R. C. Sowder, E. Barsov, B. J. Hood, R. J. Fisher, K. Nagashima, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, J. D. Lifson, D. Ott, *J. Virol.* **80** (2006) 9039–9052.
- ^{XL} J. W. Bess, R. J. Gorelick, W. J. Bosche, L. E. Henderson, L. O. Arthur, *Virology* **230** (1997) 134–144.
- ^{XL I} P. Gluschankof, I. Mondor, H. R. Gelderblom, Q. J. Sattentau, *Virology* **230** (1997) 125–133.
- ^{XLII} M. L. Shaw, K. L. Stone, C. M. Colangelo, E. E. Gulcicek, P. Palese, *PLoS Pathog.* **4** (2008) e1000085.
- ^{XLIII} A. Radhakrishnan, D. Yeo, G. Brown, M. Z. Myaing, L. R. Iyer, R. Fleck, B.-H. Tan, J. Aitken, D. Sanmun, K. Tang, A. Yarwood, J. Brink, R. J. Sugrue, *Mol. Cell. Proteomics* **9** (2010) 1829–1848.
- ^{XLIV} L. M. Kattenhorn, R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Hidde, B. M. Kessler, *J. Virol.* **78** (2004) 11187–11197.
- ^{XLV} R. M. Giuffre, D. R. Tovell, C. M. Kay, D. L. Tyrrell, *J. Virol.* **42** (1982) 963–968.
- ^{XLVI} L. Ulloa, R. Serra, A. Asenjo, N. Villanueva, *Virus Res.* **53** (1998) 13–25.
- ^{XLVII} S. Cudmore, I. Reckmann, W. Michael, *Trends Microbiol.* **5** (1997) 142–148.
- ^{XLVIII} G. Brown, H. W. Rixon, J. Steel, J. T. P. McDonald, A. R. Pitt, S. Graham, R. J. Sugrue, *Virology* **338** (2005) 69–80.
- ^{XLIX} M. Moerdyk-Schauwecker, S.-I. Hwang, V. Z. Grdzlishvili, *Viol. J.* **6** (2009) 166.
- ^L D. E. Ott, L. V. Coren, D. G. Johnson, B. P. Kane, R. C. Sowder, Y. D. Kim, R. J. Fisher, X. Z. Zhou, K. P. Lu, L. E. Henderson, *Virology* **266** (2000) 42–51.
- ^{LI} E. Johannsen, M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, E. Kieff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 16286–16291.
- ^{LII} C. Chung, C. Chen, M. Ho, C. Huang, *J. Virol.* **80** (2006) 2127–2140.
-

Unlike viral proteins, viral lipid envelopes are in no way coded, but acquired from host cell membranes from which virus budding occurs by mechanism still unknown. Investigation of lipid compositions of several viruses gave different results: in some cases, lipid composition of viral envelopes was quite similar to plasma membrane^{LXI,LXII}, while in others significant differences were observed^{LXIII,LXIV} which are usually explained by virus budding from specific membrane domains such as lipid rafts^{LXV,LXVI}. It was shown in the case of MuV that virus lipid composition depends also on lipid composition of plasma membrane of host cells used for virus production^{XXXV}.

If ECVs are present in virus preparations used for proteome and lipidome investigations, they will affect the determined lipid and protein compositions, and this must not be disregarded during such investigations.

2.2. Heterogeneity of virus suspensions

Virus suspensions are very heterogeneous, genetically and structurally^{LXVII,LXVIII}. They contain swarms of viruses with similar, but not identical genomic RNA sequence, and apart from completely and correctly assembled, infective viral particles, such suspensions contain also different non-infective viral particles (*e.g.* non-enveloped RNPs, empty viral envelopes, aggregates, defective interfering particles (DIPs)) which are considered to be impurities, but their separation from intact viral particles is very difficult due to their similarities^V. Total-to-infective particles ratios can vary from 10:1 to 10,000:1, depending on the virus and particle quantification method used^{LXIX,LXX}.

^{LIII} S. A. Moyer, S. C. Baker, S. M. Horikami, *J. Gen. Virol.* **71** (1990) 775–783.

^{LIV} R. L. Pietropaolo, T. Compton, *J. Virol.* **71** (1997) 9803–9807.

^{LV} R. L. Pietropaolo, T. Compton, *J. Gen. Virol.* **80** (1999) 1807–1816.

^{LVI} E. V. Ryzhova, A. V. Harrist, T. Harvey, F. Gonza, *J. Virol.* **80** (2006) 2694–2704.

^{LVII} T. Rai, A. Mosoian, M. D. Resh, *J. Virol.* **84** (2010) 9783–9792.

^{LVIII} M. Biswas, J. B. Johnson, S. R. P. Kumar, G. D. Parks, E. Subbiah, *J. Virol.* **86** (2012) 12708–12716.

^{LIX} A. Vanderplasschen, E. Mathew, M. Hollinshead, R. B. Sim, G. L. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** (1998) 7544–7549.

^{LX} M. J. Tremblay, J.-F. Fortin, R. Cantin, *Immunol. Today* **19** (1998) 346–351.

^{LXI} L. Kalvodova, J. L. Sampaio, S. Cordo, C. S. Ejsing, A. Shevchenko, K. L. Simons, *J. Virol.* **83** (2009) 7996–8003.

^{LXII} R. Chan, P. D. Uchil, J. Jin, G. Shui, D. E. Ott, W. Mothes, M. R. Wenk, *J. Virol.* **82** (2008) 11228–11238.

^{LXIII} A. Merz, G. Long, M.-S. Hiet, B. Brügger, P. Chlanda, P. Andre, F. Wieland, J. Krijnse-Locker, R. Bartenschlager, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 3018–3032.

^{LXIV} M. Lorizate, T. Sachsenheimer, B. Glass, A. Habermann, M. J. Gerl, H. G. Kräusslich, B. Brügger, *Cell. Microbiol.* **15** (2013) 292–304.

^{LXV} T. Suzuki, Y. Suzuki, *Biol. Pharm. Bull.* **29** (2006) 1538–1541.

^{LXVI} B. Brügger, B. Glass, P. Haberkant, I. Leibrecht, F. Wieland, H. G. Kräusslich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (2006) 2641–2646.

^{LXVII} J. Ivančić-Jelečki, D. Forčić, M. Jagušić, T. Košutić-Gulija, R. Mažuran, M. Lang Balija, O. Isakov, N. J. Shomron, *Vaccine* **34** (2016) 2383–2389.

M. Šantak, M. Markušić, M. Lang Balija, S. Keč Kopač, R. Jug, C. Örvell, J. Tomac, D. Forčić, *Microbes Infect.* **17** (2015) 228–236.

^{LXIX} S. Heider, C. Metzner, *Virology* **462–463** (2014) 199–206.

^{LXX} H. Chen, L. Ngo, S. Petrovskaya, Y. Gao, M. Laassri, S. Rubin, *J. Virol. Methods* **233** (2016) 6–9.

ECVs also contribute to this ratio. ECVs are produced by virtually all types of cells, with diameters ranging from 30 to 1000 nm. They have lipid envelopes, and contain various cellular proteins and nucleic acids^{LXXI,LXXII}. No clear line exists between ECVs and non-infectious viral particles produced by infected cells, and ECVs and enveloped viruses show striking similarities regarding particle size and density, thus making their distinction and separation virtually impossible by currently available methods, meaning every virus preparation is in fact mixture of ECVs and viral particles. Unfortunately, ECVs are often disregarded in viral proteome investigations, probably due to difficulties in separation and differentiation between two types of particles, as well as lack of awareness that both types of particles are secreted from the cells during infection.

2.3. Stability of viral particles

The best known use of MuV and MeV is in live attenuated viral vaccine, and lately they are gaining interest for use in oncolytic virotherapy. In both cases, it is important to preserve their infectivity during upstream processing (USP) and DSP, hence knowing and monitoring virus stability during DSP is important since it enables highest infective virus recoveries. Viruses are usually highly sensitive to changes in pH, temperature, but also buffer composition (*e.g.* sugars, salts, amino acids, *etc.*). Cell line and virus strain used for virus production can also affect virus stability, as it can be seen for MuV and MeV^{LXXIII-LXXXII}.

Investigation of virus stability is very important in vaccine production, distribution and storage because higher infective virus yields, and greater virus stability in storage formulations

^{LXXI} E. Nolte-’t Hoen, T. Cremer, R. C. Gallo, L. B. Margolis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113** (2016) 9155–9161.

^{LXXII} A. Takahashi, R. Okada, K. Nagao, Y. Kawamata, A. Hanyu, S. Yoshimoto, M. Takasugi, S. Watanabe, M. T. Kanemaki, C. Obuse, E. Hara, *Nat. Commun.* **8** (2017) 15287.

^{LXXIII} L. D. Schlehuber, I. J. McFadyen, Y. Shu, J. Carignan, P. W. Duprex, W. R. Forsyth, J. H. Ho, C. M. Kitsos, G. Y. Lee, D. A. Levinson, S. C. Lucier, C. B. Moore, N. T. Nguyen, J. Ramos, A. B. Weinstock, J. Zhang, J. A. Monagle, C. R. Gardner, J. C. Alvarez, *Vaccine* **29** (2011) 5031–5039.

^{LXXIV} F. L. Black, *Virology* **7** (1959) 184–192.

^{LXXV} A. Kohn, D. Yassky, *Virology* **17** (1962) 157–163.

^{LXXVI} F. Rapp, J. S. Butel, C. Wallis, *J. Bacteriol.* **90** (1965) 132–135.

^{LXXVII} A. P. Waterson, J. G. Cruickshank, *Virology* **15** (1961) 379–382.

^{LXXVIII} J. Kissmann, S. F. Ausar, A. Rudolph, C. Braun, S. P. Cape, R. E. Sievers, M. J. Federspiel, S. B. Joshi, R. C. Middaugh, *Hum. Vaccin.* **4** (2008) 350–359.

^{LXXIX} K. Weiss, D. Salzig, M. D. Mühlebach, K. Cichutek, R. Pörtner, P. Czermak, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **8** (2012) 81–98.

^{LXXX} M. L. Weil, D. Beard, D. G. Sharp, J. W. Beard, *J. Immunol.* **60** (1948) 561–582.

^{LXXXI} M. L. Weil, D. Beard, J. W. Beard, *Exp. Biol. Med.* **68** (1948) 308–309.

^{LXXXII} R. Leprat, M. Aymard, *Arch. Virol.* **61** (1979) 273–281.

^{LXXXIII} S. T. Andreadis, C. M. Roth, J. M. Le Doux, J. R. Morgan, M. L. Yarmush, *Biotechnol. Prog.* **15** (1999) 1–11.

^{LXXXIV} T. Rodrigues, M. Carmo, M. J. T. Carrondo, P. M. Alves, P. E. Cruz, *J. Gene Med.* **9** (2007) 233–243.

reduce the costs of production, shipment and storage of vaccines, which are especially problematic in parts of the world where storage of vaccines at low temperatures is hard to achieve or even impossible^{LXXIII,LXXVIII}.

2.4. Purification and concentration of viral particles

Viral particles differ in their shape, size, composition and surface structures. The surface of viral particles defines their physicochemical properties such as charge number and distribution, distribution of hydrophobic amino acids, presence of glycans, *etc.* Those properties, as well as isoelectric point (pI), presence or absence of lipid envelope and particle stability in general, affect the choice and effectiveness of purification methods^{IV,V}. Most often used methods are UC, UF and DF, and chromatographic methods, or combination thereof.

UC is often used for purification and concentration on laboratory scale, but due to limited processing volume it is generally not applicable for industrial purposes. UC can easily concentrate viral particles up to 100 × in one step, but the problem is limited purification and the infectivity does not increase proportionally to concentration factor, probably due to long processing times and strong shear forces imposed on viral particles^{IV-VI,LXXXIII,LXXXIV}. Density gradient UC can yield purer samples, but none of the approaches eliminates copurification of ECVs. Additionally, media used for creating density gradients (*e.g.* CsCl, sucrose) are hyperosmotic, hence can be detrimental for virus infectivity. Depending on the virus, recoveries in UC vary from 50 – 100%, whereas for MeV it was found to be a mere 2%^{LXXXV-LXXXIX}.

UF and DF are often used as alternatives to UC, their advantages being cheaper equipment, shorter processing time, milder processing conditions and easy scale up^{IV-VI}. DF enables buffer exchange, thus providing a possibility to remove salts or other additives present in the starting media, including lower molecular mass proteins, if membranes with large enough pores are used. However, when such membranes are used, pore size must be carefully selected in order to prevent virus entrapment, and thus lower infective virus recoveries^{VI,XC}. The main drawback of UF and DF is membrane fouling due to virus or protein entrapment because it limits the

^{LXXXV} J. C. Burns, T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano, J. K. Yee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90** (1993) 8033–8037.

^{LXXXVI} W. R. Beyer, M. Westphal, W. Ostertag, D. Von Laer, *J. Virol.* **76** (2002) 1488–1495.

^{LXXXVII} J. Gatlin, M. W. Melkus, A. Padgett, P. F. Kelly, J. V. Garcia, *J. Virol.* **75** (2001) 9995–9999.

^{LXXXVIII} J. Reiser, *Gene Ther.* **7** (2000) 910–913.

^{LXXXIX} M. Njayou, G. Quash, *J. Virol. Methods* **32** (1991) 67–77.

^{XC} T. Rodrigues, M. J. T. Carrondo, P. M. Alves, P. E. Cruz, *J. Biotechnol.* **127** (2007) 520–541.

maximum volume which can be processed. It is also important to monitor membrane pressure in order to prevent infective virus loss due to shear stress under increased pressure^{V,VI}. UF and DF yield 20 - 96% of infective virus particles, depending on the virus and quantification method used^{XCI-XCVI}.

Chromatographic methods enable fast, reproducible and effective separation of different biomacromolecules and viruses, and are easily scaled up^{VI}. Media used for virus purification can be porous particles columns, membrane adsorbers or monoliths^{IV,XCVII}. Monoliths are increasingly being used for virus purification because mass transfer occurs by convection instead of diffusion which results in high dynamic binding capacity for viruses and low back pressure of monoliths, even at higher flow rates. This poses less shear stress on viral particles, thus yielding better recoveries than porous particles columns. Chromatographic methods for virus purification include hydrophobic interaction chromatography (HIC), ion-exchange chromatography (IEX), affinity (AC) and immunoaffinity chromatography (IAC), multimodal chromatography and size exclusion chromatography (SEC).

SEC is the only method that necessarily uses porous beads columns. It has wide use in virus purification since it ensures good separation of viruses from smaller molecules (*e.g.* free proteins, DNA fragments), it can be used for all viruses and is compatible with most buffers, thus enabling the choice of the buffer which ensures maximal stability of the virus^{XCVII}. SEC's drawbacks are sample dilution, relatively low capacity and flow rates, and the inability to fractionate viral particles by their size, thus separating aggregates or non-enveloped nucleocapsids from completely assembled viral particles^V.

HIC is based on interaction between immobilized hydrophobic ligand and hydrophobic surfaces of macromolecules or viruses^{XCVIII}. Butyl and phenyl ligands are used most often used, but recently a new ligand was developed, available only as monolith, commercially known as

^{XCI} E. Papanikolaou, G. Kontostathi, E. Drakopoulou, M. Georgomanoli, E. Stamateris, K. Vougas, A. Vlahou, A. Maloy, M. Ware, N. P. Anagnou, *Virus Res* **175** (2013) 1–11.

^{XCII} D. Nehring, R. Pörtner, M. Schweizer, K. Cichutek, P. Czermak, *Desalination* **245** (2009) 614–620.

^{XCIII} H. Kotani, P. B. Newton, S. Zhang, Y. L. Chiang, E. Otto, L. Weaver, R. M. Blaese, W. F. Andreson, G. J. McGarrity, *Hum. Gene Ther.* **5** (1994) 19–28.

^{XCIV} T. Vicente, C. Peixoto, M. J. T. Carrondo, P. M. Alves, *Gene Ther.* **16** (2009) 766–775.

^{XCV} M. Makino, G. Ishikawa, K. Yamaguchi, Y. Okada, K. Watanabe, Y. Sasaki-Iwaki, S. Manabe, M. Honda, K. Komuro, *Arch. Virol.* **139** (1994) 85–96.

^{XCVI} M. Kuiper, R. M. Sanches, J. A. Walford, N. K. H. Slater, *Biotechnol. Bioeng.* **80** (2002) 445–453.

^{XCVII} P. Gagnon, in M. C. Flickinger (Ed.), *Encyclopedia of industrial biotechnology: Bioprocess, bioseparation, and cell technology*, Wiley, New York, 2010, p. 1–21.

^{XCVIII} J. A. Queiroz, C. T. Tomaz, J. M. Cabral, *J. Biotechnol.* **87** (2001) 143–159.

CIM OH^{XCIX} which results in weaker interaction, leading to easier elution and more favorable elution conditions. Hydrophobic interactions are more pronounced in the presence of salts, hence binding to the column occurs at high salt concentrations (usually 1-2 mol/L (NH₄)₂SO₄), and elution is achieved by lowering salt concentrations in elution buffer. HIC's main drawback is virus sensitivity to high salt concentrations, but it was still successfully employed in virus purification, yielding 25 – 89% of infective viruses^{C-II}. Its advantage is especially effective removal of genomic DNA^{V,CIII}.

IEX is most often used for chromatographic purification of viruses^{XCVII}. Elution can be achieved by changes in pH or increasing ionic strength of elution buffer, the latter usually being the method of choice, however both changes in pH and higher salt concentrations may decrease virus infectivity. Disadvantage of IEX is relatively low specificity, resulting in genomic DNA (especially in anion-exchange chromatography, AEX) and HCP copurification. Nonetheless, virus purification by IEX has proven to be successful, yielding 15 - 100% of infective virus^{CIV-CX}.

AC is based on specific, reversible adsorption of molecules to immobilized ligand. In IAC, that ligand is the antibody specific for a certain antigen^{V,XCVII}. Elution in AC can be specific or nonspecific. Specific elution is mild and uses a ligand which competes for the binding site on the column or the molecule, but is usually not applicable in IAC. Nonspecific elution is based on weakening the interactions between immobilized ligand and the molecule of interest, usually by change in pH, and sometimes by changes in ionic strength or eluent polarity. Unfortunately, to break such strong interactions, very low pH (pH 1 – 3), chaotropic salts at high concentrations or denaturing agents have to be used, and this can be detrimental for viruses, proteins and the column itself^{XCVII}. Efficient elution was achieved at slightly less acidic pH (pH 4) upon adding

^{XCIX}<http://www.biaseparations.com/interactions/category/31-hydrophobic/category/109-oh> (accessed: January 4th 2018)

^C C. S. Burden, J. Jin, A. Podgornik, D. G. Bracewell, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **880** (2012), 82–89.

^{CI} H. Li, Y. Yang, Y. Zhang, S. Zhang, Q. Zhao, Y. Zhu, X. Zou, M. Yu, G. Ma, Z. Su, *Protein Expr. Purif.* **113** (2015) 23–29.

^{CII} M. W. Wolff, C. Siewert, S. P. Hansen, R. Faber, U. Reichl, *Biotechnol. Bioeng.* **107** (2010) 312–320.

^{CIII} M. M. Diogo, J. A. Queiroz, D. M. F. Prazeres, *J. Chromatogr. A* **1069** (2005) 3–22.

^{CIV} D. Forčić, M. Brgles, J. Ivančić-Jelečki, M. Šantak, B. Halassy, M. Barut, R. Jug, M. Markušić, A. Štrancar, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879** (2011) 981–986.

^{CV} E. M. Adriaenssens, S. M. Lehman, K. Vandersteegen, D. Vandenneuvel, D. L. Philippe, A. Cornelissen, M. R. J. Clokie, A. J. García, M. De Profit, M. Maes, R. Lavigne, *Virology* **434** (2012) 265–270.

^{CVI} M. Zaveckas, S. Snipaitis, H. Pesliakas, J. Nainys, A. Gedvilaite, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **991** (2015) 21–28.

^{CVII} H. M. Oksanen, A. Domanska, D. H. Bamford, *Virology* **434** (2012) 271–277.

^{CVIII} F. Smrekar, M. Ciringer, A. Štrancar, A. Podgornik, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 2438–2444.

^{CIX} S. T. Mundle, M. Giel-Moloney, H. Kleanthous, K. V. Pugachev, S. F. Anderson, *Vaccine* **33** (2015) 4255–4260.

^{CX} M. Banjac, E. Roethl, F. Gelhart, P. Kramberger, B. Lah Jarc, M. Jarc, A. Štrancar, T. Muster, M. Peterka, *Vaccine* **32** (2014) 2487–2492.

arginine to the eluent^{CXI,CXII}, and this is likely the consequence of Arg acting as nonspecific protein-protein interaction suppressor, as well as aggregation suppressor^{CXIII-CXVI}. This approach might not be applicable for viruses, due to their sensitivity to elevated Arg concentrations^{CXVII,CXVIII}. For AC purification of viruses heparin and lectin columns, and immobilized metal affinity chromatography (IMAC) were used, as well as streptavidin columns for purification of biotinylated viral vectors, with recoveries in range 16 – 97%^{V,VI,CXIX,CXX}. IAC purification of MeV was also reported, with recovery of 100%, however the test used to quantify the virus only confirms virus presence, not its infectivity^{LXXXIX}.

3. EXPERIMENTAL

Vero cells were maintained in minimal essential medium with Hank's salts (MEM-H) with 10% fetal calf serum (FCS) and 50 µg/mL neomycin. Cells in suspension were infected with MuV or MeV at multiplicity of infection of 0.001 and 0.005, respectively, in media containing 2% FCS. After 24 h the media was replaced with the media without FCS, and viruses were grown until cytopathic effect was observed.

Cell culture supernatants were collected and clarified (cellular debris was removed) by centrifugation 25 min at 3000 × g or microfiltration on 0.45 µm PVDF syringe filters. ECVs were prepared by collecting cell culture supernatant of non-infected Vero cells, and treated in the same manner as virus suspensions.

Concentration of infective viral particles was determined by cell culture infective dose 50 assay (CCID₅₀), as described previously^{CXXI,CXXII}. Virus sample aliquots were stabilized immediately after different experiments, unless stated otherwise, and stored at 4 or -20 °C until the assay. Aliquots of starting virus suspensions (prior to microfiltration or centrifugation) were also stabilized, as well as after clarification in order to evaluate the influence of clarification on virus infectivity (virus titer). CCID₅₀ assay value obtained for sample after microfiltration was

^{CXI} T. Arakawa, J. S. Philo, K. Tsumoto, R. Yumioka, D. Ejima, *Protein Expr. Purif.* **36** (2004) 244–248.

^{CXII} D. Ejima, R. Yumioka, K. Tsumoto, T. Arakawa, *Anal. Biochem.* **345** (2005) 250–257.

^{CXIII} A. Cirkovas, J. Sereikaite, *Biologicals* **39** (2011) 181–188.

^{CXIV} K. Shiraki, A. Hirano, Y. Kita, A. H. Koyama, T. Arakawa, *Drug Discov. Ther.* **4** (2010) 326–333.

^{CXV} C. Lange, R. Rudolph, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10** (2009) 408–414.

^{CXVI} T. Arakawa, K. Tsumoto, Y. Kita, B. Chang, D. Ejima, *Amino Acids* **33** (2007) 587–605.

^{CXVII} H. Yamasaki, K. Tsujimoto, A. Hajime Koyama, D. Ejima, T. Arakawa, *J. Pharm. Sci.* **97** (2008) 3067–3073.

^{CXVIII} J. T. Mccue, K. Selvitelli, D. Cecchini, R. Brown, *Biotechnol. Prog.* **30** (2014) 108–112.

^{CXIX} M. de las Mercedes Segura, A. Kamen, P. Trudel, A. Garnier, *Biotechnol. Bioeng.* **90** (2005) 391–404.

^{CXX} L. Opitz, J. Salaklang, H. Büttner, U. Reichl, M. W. Wolff, *Vaccine* **25** (2007) 939–947.

^{CXXI} D. Forčić, T. Košutić-Gulija, M. Šantak, R. Jug, J. Ivančić-Jelečki, M. Markušić, R. Mažuran, *Vaccine* **28** (2010) 1887–1892.

^{CXXII} Report „Live measles virus vaccine“ in *Manual of laboratory methods Document WHO/VSQ/97.04*, World Health Organization, Geneva, 1997, p. 79–82.

used as a reference value for recovery calculations, unless stated otherwise. Stabilizer used is proprietary to Institute of Immunology, Inc., Zagreb, Croatia, hence its composition cannot be disclosed.

Size and total particle concentration were determined by nanoparticle tracking analysis (NTA), using Nanosight LM10 (Malvern) which can measure particle size in range 10 - 1000 nm^{CXXIII}. High concentration samples were diluted in PBS to concentrations $(2 - 8) \times 10^8$ particles/mL, Brownian motion of every sample was monitored for 60 s in triplicate, and the video was processed by NTA 3.1 or 3.2 software for size and concentration determination. The ratio of mean, mode and D90 parameter (denotes that 90% of particles have the indicated diameter or smaller) of experimental and the reference sample were calculated, and the mean value of the three ratios was taken as the size percentage of experimental to reference sample. Total particle recoveries were also expressed relatively to the reference sample which was in this case aliquot of unstabilized virus suspension after microfiltration, unless stated otherwise.

Protein concentration in samples was determined by measuring absorbance at 228.5 and 234.5 nm, for samples diluted to concentrations ranging from 5 to 200 µg/mL, and calculated according to Ehresmann^{CXXIV}.

HCPs in samples were monitored by indirect ELISA as described previously^{CXXV}. Briefly, microtiter plate was coated overnight with anti-Vero-IgG antibodies (10 µg/mL), washed and the remaining sites were blocked by 2 h incubation in 0.5% BSA. The plate was washed, standard (Vero cell lysate in water) and samples were applied in appropriate dilutions, incubated 2 h at 37 °C followed by washing and 2 h incubation with horseradish peroxidase-conjugated antibodies, HRP-anti-Vero-IgG. The plate was washed and incubated 30 min with 0.6 mg/mL *o*-phenilendiamine dihydrochloride in citrate-phosphate buffer (pH 5) with addition of 1 µL of 30% H₂O₂ per mL of substrate. The reaction was stopped by addition of 12.5% H₂SO₄ and absorbance at 492 nm was measured.

Detection of genomic DNA was performed by PCR after isolation and extraction of DNA from virus samples as described previously^{CXXVI}. In PCR, primers for single-copy gene of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used.

^{CXXIII} B. Carr, M. Wright, *Nanoparticle tracking analysis - A review of applications and usage 2010-2012*, NanoSight Ltd, Wiltshire, 2013, p. 1–193.

^{CXXIV} B. Ehresmann, P. Imbault, J. H. Weil, *Anal. Biochem.* **54** (1973) 454–463.

^{CXXV} D. Sviben, D. Forčić, T. Kurtović, B. Halassy, M. Brgles, *Arch. Virol.* **161** (2016) 1455–1467.

^{CXXVI} D. Sviben, D. Forčić, J. Ivancic-Jelecki, B. Halassy, M. Brgles, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1054** (2017) 10–19.

Stability of model proteins was monitored by differential scanning fluorimetry (DSF). Solutions containing 25 µg of protein (human immunoglobulin G, hIgG, human serum albumin, HSA, or ovalbumin, OVA) in desired formulations were mixed with 1× *Sypro Orange* dye in final volume of 50 µL and transferred to 96-well plate suitable for fluorescence measurements in qPCR instrument. In the software, the reporter dye was set to TAMRA, and passive reference to “none”. The plate was incubated 10 min at 5 °C, after which fluorescence intensity was measured with increasing temperature at rate 1 °C/min in range 5 – 94 °C.

Stability of MuV and MeV in different formulations was assessed after incubation of viruses in selected formulations for 2 or 24 h at room temperature in the dark. Formulations incubated 2 h were stabilized afterwards, as opposed to those incubated 24 h which were immediately subjected to CCID₅₀ assay, without adding the stabilizer. Reference sample for formulations incubated 2 h was the sample in which PBS was added instead of other additives. Particle size and concentration were determined in all samples by NTA method.

Thermal stability of MuV and MeV was assessed after incubation of viruses for 24 h at 4, 21 or 37 °C in the dark, whereas stability at different pH values was assessed after incubation 2 h at room temperature in the dark. After incubation, particle size and concentration were determined by NTA, and samples were stabilized and stored at 4 °C until CCID₅₀ assay.

Potential adhesion of viral particles to plastic and glass tubes was tested by virus suspension incubation in plastic and glass reaction tubes for 2, 4, 6 and 24 h at 21 °C after which particle size and concentration were determined by NTA and compared to the reference sample values measured directly after microfiltration.

Aliquots of virus suspensions were subjected to 1, 3, and 5 minutes of up-and-down pipetting or vortexing (performed also during 10 min), at the highest speed. Particle size, total and infective particle concentrations were determined and compared to the reference sample.

Statistical data analysis was performed in GraphPad Prism (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com) using ANOVA with Kruskal-Wallis test or Mann-Whitney test with $p < 0.05$. Software was also used to plot curves obtained by DSF and to determine T_m from inflection point of sigmoidal curves.

Viruses and ECVs were purified by UC in preparative ultracentrifuge *Beckmann Coulter XL-80K* equipped with SW28 rotor in polyallomeric cuvettes at 141 000 × g for 1, 2 or 4 hours at 4 °C. Pellets were resuspended in PBS and aliquots taken for further analyses.

Viruses and ECVs were purified by DF using UF units with PES or RC membranes, with molecular weight cut off (MWCO) 100 kDa. Units were centrifuged 15 min at $1000 \times g$, at 4 °C. Retentates were washed twice with 50 mL PBS, concentrated, and aliquots of retentates and permeates taken for further analyses.

Chromatographies were performed on *ÄKTApurifier 100* (GE Healthcare) equipped with a *P-900* pump, *UV-900* UV detector, conductivity and pH detector *pH/C-900*, at room temperature, unless stated otherwise. Protein samples were injected through 2 mL loop, whereas 150 mL loop was used for virus samples. Aliquots of flow through (FT) and eluates (E) were collected for analysis by CCID₅₀, NTA and ELISA.

SEC was used to determine the shares of monomers, dimers and polymers in protein samples of hIgG, HSA and OVA to evaluate their stability. 2 mg/mL protein solutions were prepared in 500 µL of desired formulations, incubated 28 days at 37 °C and 50 µL of sample was injected on *TSK-GEL G3000SW_{XL}* column (*Tosoh Bioscience*) with corresponding guard column at constant flow rate of 0.7 mL/min with isocratic elution in phosphate-sulfate buffer (0.04 mol/L Na₂HPO₄, 0.06 mol/L NaH₂PO₄ × H₂O, 0.1 mol/L Na₂SO₄, 7.7 mol/L NaN₃, pH 6.7) for 35 minutes on *Waters HPLC* equipped with *Waters 600* pump, *Waters 717* autosampler and *Waters 2996 PDA* detector. Water and test mixture containing proteins of known molecular weight were also injected to the column prior to experimental samples.

HIC purification of viruses was performed on commercial *CIMmultus OH* columns (*Bia Separations*) with column volume 1 mL, channel size 6 µm (large channel), and disks with volume 0.34 mL, channel size 1.4 µm (small channel), at constant flow rate 3 – 10 mL/min in triplicates. Binding buffer contained 0.5 – 2 mol/L (NH₄)₂SO₄, 20 - 50 mmol/L MOPS or HEPES at pH 7.3, and step gradient elution was used with decreasing concentrations of (NH₄)₂SO₄ in the buffer. Final eluate contained only 20 - 50 mmol/L MOPS or HEPES. (NH₄)₂SO₄ concentration in the sample was adjusted by diluting virus suspension in 3 mol/L (NH₄)₂SO₄ to match binding buffer. 10⁵ - 10¹⁰ CCID₅₀/mL of infective viral particles were injected per run, and when ECVs were purified $(0.1 - 4.5) \times 10^{11}$ total particles were injected.

IEX was performed on *CIMmultus QA*, DEAE or SO₃ (1 mL, 6 µm) and QA disk (0.34 mL, 1.4 µm) at constant flow rate 1 – 10 mL/min in triplicates. Binding buffer was 50 mmol/L phosphate buffer or Tris at pH 7.3, and step gradient elution with 0.5 and 1.0 mol/L NaCl was used. 10⁵ - 10¹⁰ CCID₅₀/mL of infective viral particles were injected per run.

AC was used for hIgG purification on *CIM Protein G* disk (0.34 mL, 1.4 μm). IAC for purification of OVA, MuV and MeV was performed on *CIMmultus Epoxy* columns (1 mL, 6 μm) and *CIMac HIDA* (0.1 mL, 6 μm) columns with immobilized polyclonal antibodies (pAb) according to manufacturer's instructions. Flow rate was 2 mL/min, binding buffer was 20 mmol/L MOPS, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.3, and elution was achieved by adding high molarity (0.75 – 1.5 mol/L) amino acids (Arg, Ser, imidazole, or the combinations thereof) to the binding buffer (pH kept at 7.3) – *i.e.* native elution, followed by classical elution with 20 mmol/L Gly, 0.15 mol/L NaCl, pH 2.3. Samples contained 1 mg/mL of proteins, 10^7 – 10^{10} CCID₅₀/mL of infective viral particles or $(2 - 4) \times 10^{10}$ ECVs.

Commercially available gels *Novex NuPAGE 4-12% Bis-Tris* (1 mm, with 10 or 12 wells, *Invitrogen*) were used for SDS-PAGE which was performed in *XCell SureLock TM Mini-Cell* (*Invitrogen*) for 45 min at 180 V in buffer containing 50 mmol/L MES, 50 mmol/L Tris, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, pH 7.3 under reducing conditions. Samples were mixed with *NuPAGE LDS 4x* sample buffer (*Invitrogen*) before loading to the gel. Gels were stained by *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), and excess dye was removed by soaking the gels in 50% methanol and water. If protein bands were too faint after CBB staining, silver staining was used for detection. Gel was sensitized in 0.8 mol/L Na₂S₂O₃ \times 5 H₂O, washed in water, incubated 20 min in 5.9 mmol/L AgNO₃, washed and developed in 0.19 mol/L Na₂CO₃, 0.04% formaldehyde (v/v) until bands were visible. The reaction was stopped by transferring the gel to 5% acetic acid (v/v).

For two-dimensional gel electrophoresis (2D-GE) proteins were first separated by isoelectric focusing (IEF) followed by SDS-PAGE. IEF was performed on commercial *ZOOM Strip pH 3-10 linear* strips in *ZOOM IPGRunner* (*Invitrogen*). Samples were mixed with rehydration buffer (8 mol/L urea, 2% CHAPS, 0.5% (v/v) *ZOOM Carrier Ampholytes pH 3 – 10 L*, 0.002% bromophenol blue, 20 mmol/L DTT), strips were rehydrated and IEF was performed 20 min at 200 V, 15 min at 450 V, 15 min at 750 V and 6 h at 2000 V. Following IEF, strips were reduced, alkylated and separated on *ZOOM NuPAGE 4-12% Bis-Tris* gels (1 mm, *Invitrogen*) suitable for SDS-PAGE after IEF according to manufacturer's instructions.

Proteins were transferred to *Amersham Hybond-P* PVDF membrane (*GE Healthcare*) from the gels using *XCell II Blot Module* (*Invitrogen*) in 1 \times *NuPAGE Transfer Buffer* (*Invitrogen*) with 20% methanol, according to manufacturer's instructions. Membrane was blocked with 2% BSA, washed, incubated with HRP-anti-Vero IgG, washed again and *Pierce ECL Plus* kit

(*Thermo Fisher Scientific*) was used for detection. The visualization was performed on *Typhoon™ FLA 9500* imager (*GE Healthcare*).

Protein bands for MALDI-TOF/TOF-MS analysis were excised from the gels, subjected to *in gel* digestion by trypsin, peptides were extracted and purified by *C₁₈ ZipTips* (*Millipore*) as previously described^{CCXXVII}. Peptides were dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/acetonitrile (ACN, 1:1, v/v) and mixed with the matrix, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 4-6 mg/mL in 0.1% TFA/ACN (1:1, v/v)) directly on the MALDI target. Peptide mass fingerprint (PMF) and MS/MS spectra were taken on *ultrafleXtreme* instrument (*Bruker Daltonics*), processed by *FlexAnalysis 3.4.76.0* and *BioTools 3.2 SR* softwares and proteins were identified by search against NCBIProt databases “Other viruses”, “Primates” and “Contaminants” using *Mascot* software (www.matrixscience.com), as previously described^{XXXV}.

Lipids were isolated by Bligh-Dyer extraction^{CCXXVIII} from Vero cell pellets, MuV and MeV samples purified by UC, spotted on silica plate (*Merck*), separated by two-dimensional high performance thin-layer chromatography (2D-HPTLC), detected by spraying with primuline and visualized under UV light ($\lambda=366$ nm). Plate material containing lipids was scratched from the plate, lipids were extracted twice by chloroform/methanol/water 10:10:0.1 (v/v/v) solution, dried and prior to MS analysis dissolved in 20 mg/mL 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP) in methanol, spotted to the MALDI target and analyzed by MALDI-TOF/TOF-MS. Lipids were identified by comparing obtained spectra to the spectra of lipid standards and by using LIPID MAPS database^{CXXIX}.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Heterogeneity of starting virus samples

Starting sample for investigation of MuV and MeV is virus suspension containing infective, various non-infective viral particles, and ECVs^{XL,XLI,LXVIII,LXXI}. Since MuV and MeV cause cytopathic effect, cellular debris may also be present which has to be removed by clarification

^{CXXVII} M. Brgles, T. Kurtović, L. Kovačić, I. Križaj, M. Barut, M. Lang Bališa, G. Allmaier, M. Marchetti-Deschmann, B. Halassy, *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 293–304 (2014).

^{CXXVIII} E. G. Bligh, W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37** (1959) 911–917.

^{CXXIX} E. Fahy, M. Sud, D. Cotter, S. Subramaniam, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) 606–612

by centrifugation of microfiltration, the latter being faster and more suitable for larger sample volumes.

Starting samples were aliquoted before and after clarification procedures and subjected to analysis by CCID₅₀ assay and NTA (Tables 3 and 4) in order to evaluate the effects of clarification on the samples. Results are given as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Table 3. Size and concentration of total and infective particles prior to clarification. Results are given as mean \pm SEM.

	<i>n</i>	<i>d</i> / nm	mode / nm	D90 / nm	$C_{\text{total particles}} / \text{mL}^{-1}$	titer / logCCID ₅₀ mL ⁻¹
MuV	67	210.5 \pm 2.29	159.8 \pm 4.49	309.1 \pm 3.23	(3.1 – 24.8) $\times 10^8$	4.1 – 8.7
MeV	70	200.8 \pm 2.87	136.4 \pm 3.01	306.9 \pm 4.27	(2.9 – 83.2) $\times 10^8$	3.7 – 8.2
ECV	38	189.5 \pm 2.82	122.4 \pm 3.41	291.4 \pm 5.14	(2.4 – 14.6) $\times 10^8$	na

na - not applicable

Size of MuV and MeV is in good agreement with literature data^{VII-XII}. Virus suspension heterogeneity is visible in the fact that virus titer determined by CCID₅₀ assay (which does not exactly represent infective particle concentration, but it correlates) varies much more than total particle concentration. It should be noted that CCID₅₀ shows high variability with 95% confidence interval of ± 0.3 log units which contributes to data dissipation, but remains the only method enabling monitoring of infective viral particle concentrations.

Infectivity in Table 4 is expressed relatively to sample prior to clarification, but size and total particle concentration of centrifuged samples is given relatively to microfiltrated sample because this step is prerequisite for chromatographic purification of viruses due to system requirements. Conditions used should not result in removal of viral, virus-like particles and ECVs.

Table 4. Size and concentration of total and infective particles after clarification by microfiltration or centrifugation. Results are given as mean \pm SEM.

		<i>n</i>	<i>d</i> / nm	mode / nm	D90 / nm	<i>C</i> _{total particles} / mL ⁻¹	titer / %
microfiltration	MuV	72	216.5 \pm 1.84	169.6 \pm 4.43	313.8 \pm 2.60	(3.1 – 29.1) \times 10 ⁸	87 \pm 7.5
	MeV	73	206.0 \pm 2.38	143.1 \pm 3.61	309.6 \pm 3.36	(3.0 – 87.6) \times 10 ⁸	62 \pm 5.8
	ECV	39	199.0 \pm 3.80	143.5 \pm 6.47	294.4 \pm 5.98	(3.2 – 28.0) \times 10 ⁸	na
centrifugation		<i>n</i>	size / %		<i>C</i> _{total particles} / %		titer / %
	MuV	18	98 \pm 6.0		76 \pm 9.0		62 \pm 8.9
	MeV	16	91 \pm 7.0		77 \pm 17.5		23 \pm 4.8

Centrifuged samples show lower infectivity, as well as lower total particle concentrations and reduction in particle size, thus implying microfiltration is the method of choice for viral particle clarification in order to preserve maximal virus infectivity. The losses occurring during microfiltration likely arise from mechanical stress due to pressure, membrane fouling or mechanical disruption of particles due to passing through narrowed membrane pores caused by membrane fouling^{XC}.

Comparison of results obtained for particle size, total and infective particle concentration after microfiltration depending on the day of the harvest (Figures 1 and 2) imply significant changes in infective particle concentration in the starting samples, whereas size and total particle concentration do not vary as much.

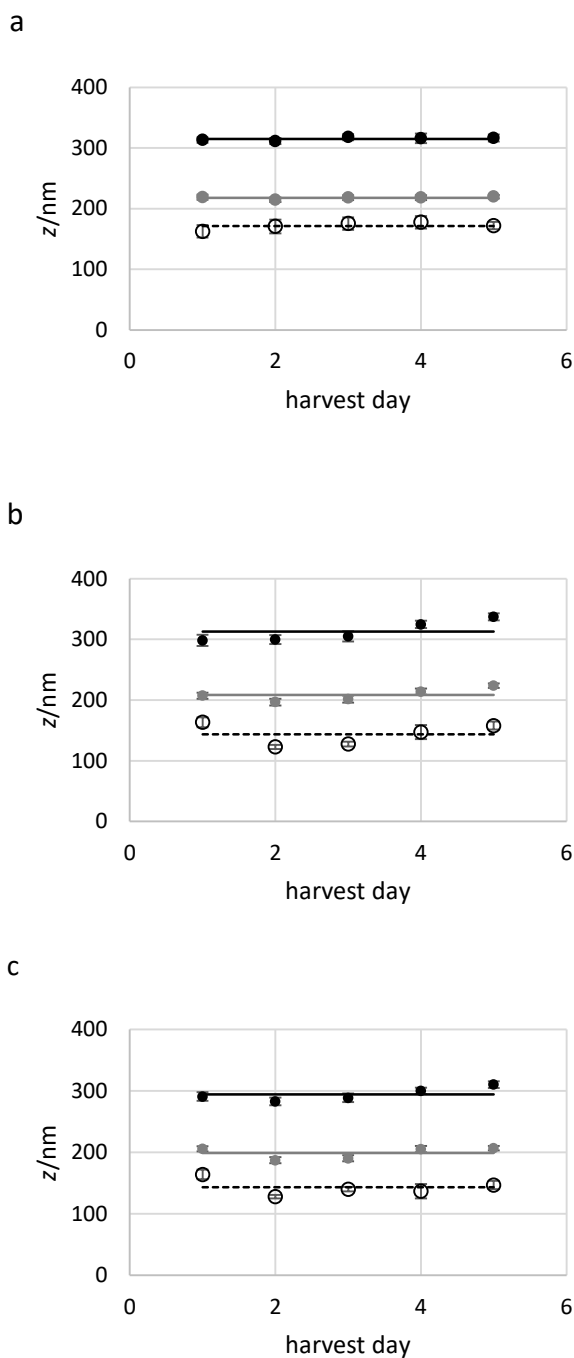


Figure 1. Particle size in microfiltrated starting sample of MuV (a), MeV (b) and ECVs (c) depending on the day of the harvest ($n \geq 8$). Grey dots and lines – mean particle diameter, white dots and dotted line – particle diameter mode, black dots and lines – D90. Results are given as mean \pm SEM, straight lines represent total mean value of each parameter.

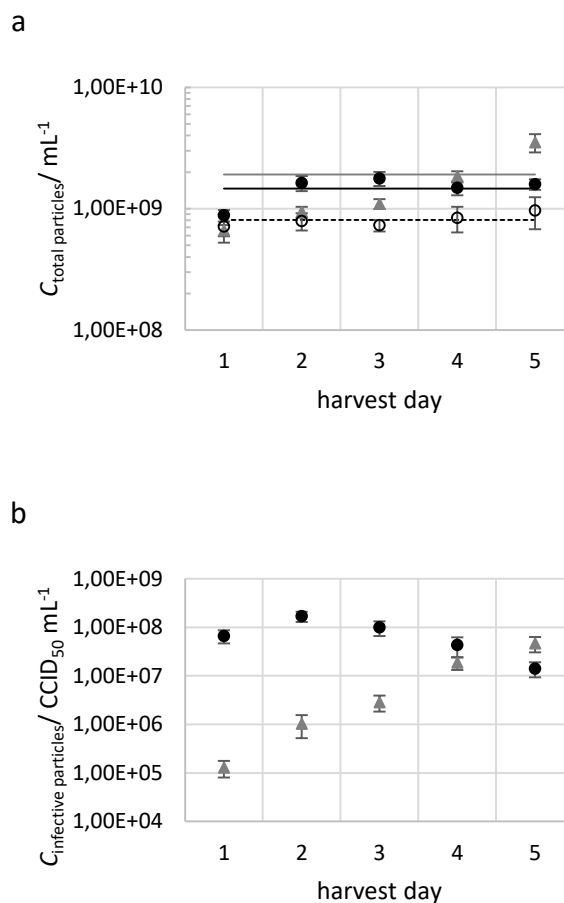


Figure 2. Concentration of total (a) and infective (b) particles in microfiltrated starting samples of MuV (black dots and lines), MeV (grey triangles and lines) and ECVs (circles and dotted line) depending on the day of the harvest ($n \geq 8$). Results are given as mean \pm SEM, straight lines represent total mean value of each parameter.

Comparison of total particle concentrations between ECVs and viruses in Figure 2a implies that, if the production of ECVs is unaffected during infection, up to 40% of particles in starting virus suspensions might be ECVs. All of this confirms high heterogeneity of starting virus suspensions, especially regarding total-to-infective particle ratios which differ from day to day (Figure 3). This ratio is much higher for MeV than for MuV, but in line with previous reports^{LXIX,LXX}. These variations likely have impact on purification processes, as well as to protein and lipid composition of virus samples.

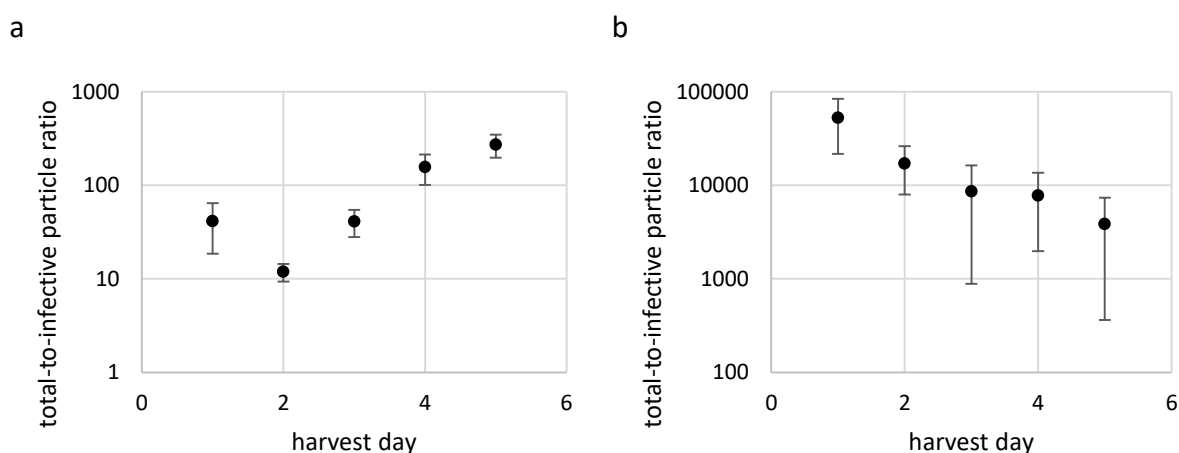


Figure 3. Total-to-infective particle ratio in starting samples of MuV (a) and MeV (b) depending on the day of the harvest. Results are given as mean \pm SEM, $n \geq 12$.

4.2. Investigation of protein and virus stability

DSF is a high-throughput method used for protein stability investigation. It is based on measuring fluorescence intensity of a dye such as *Sypro Orange* during thermal denaturation of proteins. Protein denaturation exposes hydrophobic regions to which the dye binds and increases the fluorescence signal, hence measurements can be performed in qPCR instruments. When fluorescence intensity is plotted vs. temperature, sigmoidal curves are obtained, and inflection point corresponds to melting temperature, T_m which correlates to protein stability.

DSF was used for investigation of the stability of three model proteins, hIgG, HSA, and OVA, which differ in their structures, in order to establish which formulations enhance all three proteins' stability and if they could be used for virus stability as well. In total, 194 different formulations were examined, and the method proved to be very precise and reproducible as suggested by intra- and inter-day coefficients of variation (CV) which did not exceed 3 and 1.7%, respectively, which meets the regulatory criteria (15 - 20%). Since HSA results were

sometimes difficult to interpret, more focus was aimed on hIgG and OVA results. Stability of proteins in several selected formulations was also tested by SEC-HPLC to determine if, and to what extent, protein aggregation occurs and if correlation can be established between two methods used for protein stability estimation (Figure 4).

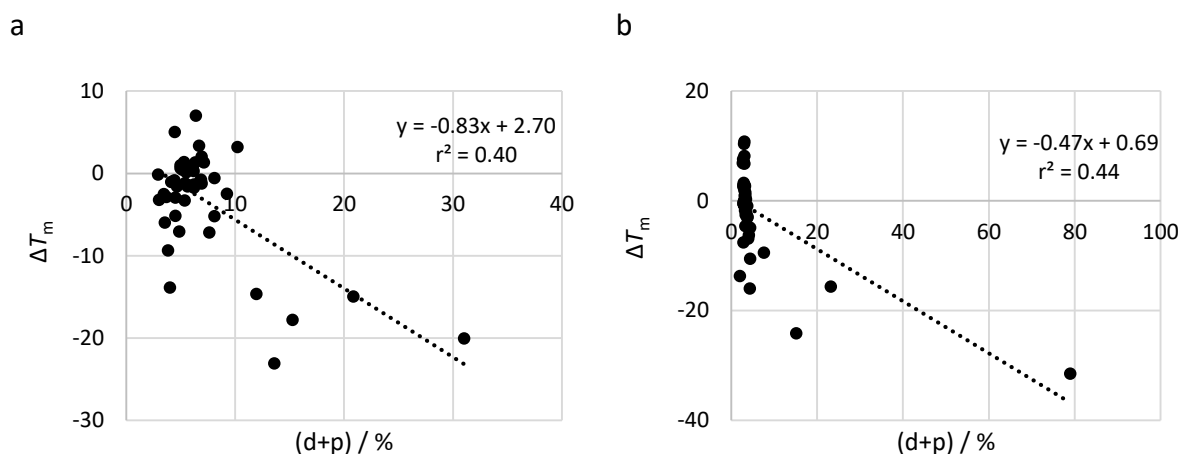


Figure 4. Correlation between protein stability determined by DSF and SEC-HPLC for hIgG (a) and OVA (b).

Although formulations which cause dramatic drop in T_m also lead to protein aggregation, generally no correlation between the two methods can be established, meaning that protein stability regarding its propensity to aggregate cannot be predicted by DSF. For protein therapeutics it is especially important that they do not contain aggregates since they can cause immune reaction and adverse effects upon administration^{CXXX-CXXXII}.

When stabilizing effects of different formulations for hIgG vs. OVA were compared, strong correlation between DSF results ($r=0.88$) was observed, implying tested formulations generally have similar stabilizing or destabilizing impact on these proteins. However, when such comparison was performed for SEC-HPLC results, no correlation could be observed.

High concentrations of sucrose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ showed the most stabilizing effects, in line with previous results^{CXXXIII,CXXXIV}. Although such high concentrations are not applicable for final formulations, they may be useful in product stabilization during DSP. Addition of

^{CXXX} W. Wang, *Int. J. Pharm.* **289** (2005) 1–30.

^{CXXXI} M. E. Cromwell, E. Hilario, F. Jacobson, *AAPS J.* **8** (2006) E572–E579.

^{CXXXII} S. Frokjaer, D. E. Otzen, *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (2005) 298–306.

^{CXXXIII} G. Graziano, *Int. J. Biol. Macromol.* **50** (2012) 230–235.

^{CXXXIV} F. Ahmad, C. C. Bigelow, *J. Protein Chem.* **5** (1986) 355–367.

caprylate ions ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$) or lowering pH to pH 4 resulted in significant protein destabilization as confirmed by both methods.

Impact of concentration of Arg, Ser, Gly, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COONa}$, Na_2SO_4 , sucrose, maltose and glucose on protein stability was also tested. All additives except Arg and $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COONa}$ showed mild stabilization effect with increasing concentrations. This is in line with known use of amino acids and sugars as stabilizers for proteins and viruses^{LXXVIII,CXXX,CXXXII,CXXXV-CXXXVIII}, but opposed to known role of Arg in protein stabilization by aggregation suppression^{CXIII-CXVI}. In that context it is also interesting to mention that hIgG and OVA formulations with 0.75 mol/L Arg contained around 15 and 23% of polymers, respectively.

Impact of protein concentration on T_m was also examined and it was established that increasing protein concentration from 0.5 mg/mL to 2 and 10 mg/mL results in 3 and 10% lower determined T_m s, respectively, as well as in curves of lower quality. pH, buffer component and concentration screening implied that hIgG and OVA are relatively insensitive to buffer concentration changes ranging from 20 to 100 mmol/L, that the buffer component itself in general does not significantly influence protein stability, and that these proteins are most stable at physiological conditions, as expected. This, however, might not apply to proteins in general, hence individual analysis for proteins of interest is needed.

The influence of denaturing agents such as urea, guanidinium hydrochloride and KSCN at concentrations ranging from 0.1 to 6 mol/L was also tested since it is known that traces of such agents may help protein stabilization^{CXXXIX}. It was noticed that only the highest concentrations of such agents result in complete denaturation of all tested proteins, but no stabilization effect for these proteins was observed at low concentrations (0.1 mol/L).

Investigation of virus stability in solutions containing high concentrations of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, imidazole, Ser, Arg, MgSO_4 , NaCl and MgCl_2 which are mostly used in chromatographies (HIC, IEX, AC and IAC) was also evaluated (Figure 5). MuV and MeV diluted in solutions containing high concentrations of sulfate ions ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4) had the highest virus titer after incubation, probably due to the protective role of sulfate ions previously described^{LXXXVI},

^{CXXXV} S. Nema, R. J. Brendel, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **65** (2011) 287–332.

^{CXXXVI} S. F. Ausar, M. Espina, J. Brock, N. Thyagarayapuran, R. Repetto, L. Khandke, C. R. Middaugh, *Hum. Vaccin.* **3** (2007) 94–103.

^{CXXXVII} M. Barne, US patent no. 4,500,512, 1985, p. 173–179.

^{CXXXVIII} K. Branovic, D. Forčić, J. Ivančić, A. Štrancar, M. Barut, T. Košutić-Gulija, R. Zgorelec, R. Mažuran, *J. Virol. Methods* **110** (2003) 163–171.

^{CXXXIX} S. Boivin, S. Kozak, R. Meijers, *Protein Expr. Purif.* **91** (2013) 192–206.

but it was interesting to see that such high salt concentrations, which can assert high osmotic pressure, did not result in virus inactivation. Incubation in imidazole resulted in almost complete virus inactivation, as previously described^{VI,X,LXXVI,LXXVIII}. It was also interesting to see that incubation in PBS results in great infectivity loss. Therefore, additional experiments were performed in which viruses were diluted by MOPS, PBS or MEM-H and immediately stabilized (no incubation), and it was noticed that 30 - 45% of infectivity was lost during such dilution step.

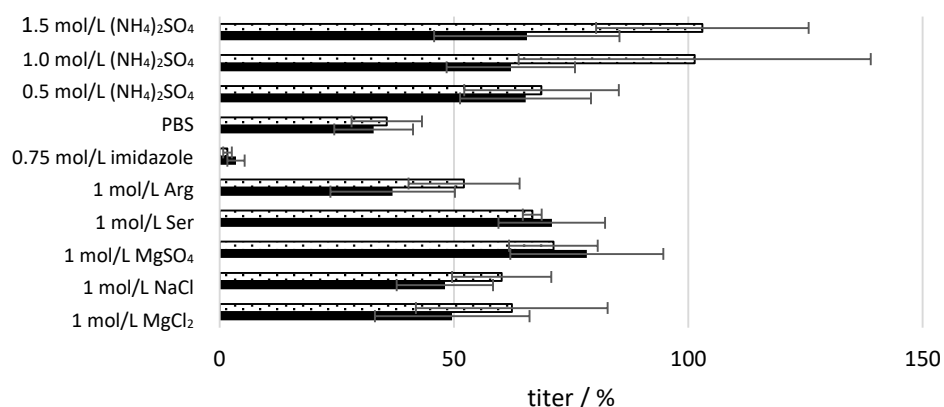


Figure 5. Infectivity of MeV (black bars) and MuV (white bars) in solutions after 2 h incubation at room temperature in the dark. Results are given as mean \pm SEM, $n \geq 3$.

The underlying reason of this phenomena is still unclear, but it is possible that dilution poses stress on viral particles resulting in infectivity loss^{CXL}.

Some of the solutions tested in protein stabilization, which showed stabilizing effects, and could be potential stabilizers in vaccines, were tested for their ability to stabilize MuV and MeV during 24 h incubation at room temperature. MuV appeared to be quite stable in all tested formulations (Figure 6), losing no more than 25% of infectivity, whereas for MeV that loss ranged from 25 – 70%, depending on the formulation. The best formulations contained Na₂SO₄ and Arg, again in line with protective role of sulfate ions and Arg^{LXXVI,LXXVIII,CXXXVII}. Arg destabilized MeV which might imply that used concentrations were too high causing adverse effects, as shown for high Arg concentrations when protein stability was investigated.

^{CXL} J. F. Wright, T. Le, J. Prado, J. Bahr-Davidson, P. H. Smith, Z. Zhen, J. M. Sommer, G. F. Pierce, G. Qu, *Mol. Ther.* **12** (2005) 171–178.

Significant changes in particle size were not noticed in any of the tested formulations at 2 or 24 h, and changes in particle concentrations occurred in some formulations containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Arg and maltose, but this is probably due to enhanced light scattering from the particles occurring under such conditions.

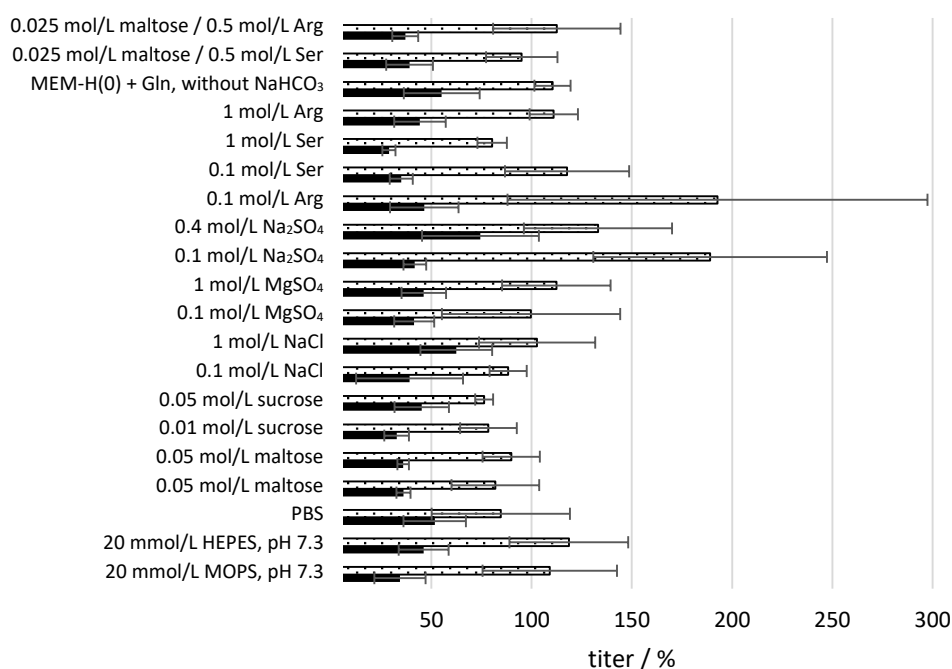


Figure 6. Infectivity of MeV (black bars) and MuV (white bars) in tested solutions after 24 h incubation at room temperature. Results are given as mean \pm SEM, $n=3$.

When thermal stability of MuV and MeV was assessed (Figure 7), it was established that infectivity is greatly affected at 37 °C, however, the difference in virus infectivity after incubation at 4 and 21 °C was not statistically significant. This is interesting since MeV is reported to be sensitive to elevated temperatures^{X,LXXIV,LXXV}, but differences might be due to different MeV strains or different cells used for virus production. After comparison of these results with results obtained in formulation testing with virus incubation 24 h at 21 °C, it seems that MeV infectivity loss could mostly be attributed to thermal inactivation, while all tested formulations stabilize MuV equally well. Since this is unlikely, the correct interpretation of results is probably hampered by high CCID₅₀ assay variability, and performing larger number of experiment replicates might give better insights. No changes in particle size and concentration were noticed during these experiments.

pH stability of MuV and MeV was tested in range pH 2.2 – 9.0. Particle size remained unaffected at all tested pHs except at pH 9.9 where MuV and MeV aggregated. Total particle concentration showed unexpected rise at pH 3.0 – 4.5 which correlated with increased virus titers under the same conditions, especially for MuV (Figure 8). One possible hypothesis was that adhesion of viral particles to plastic reaction tubes occurs at physiological pH, and that lowering pH results in better viral envelope hydration, thus making it more polar, leading to weaker adhesion to polypropylene tubes and more viral particles present in the suspension^{LXXVIII}. When experiments were carried out to test if adhesion occurs in plastic or glass tubes (incubation for 2, 4, 6 and 24 h followed by NTA measurements) no evidence of it were found. However, it cannot be excluded that adhesion is a very fast process which cannot be observed by methods here used. Another possibility is that lower pH enhances virus entry to the cells as shown for Newcastle disease virus (NDV)^{CXLI}, although the mechanism itself has not yet been elucidated. It should be noted that this does not necessarily reflect greater viral particle stability at lower pH, but possibly greater cell susceptibility to infection under such conditions.

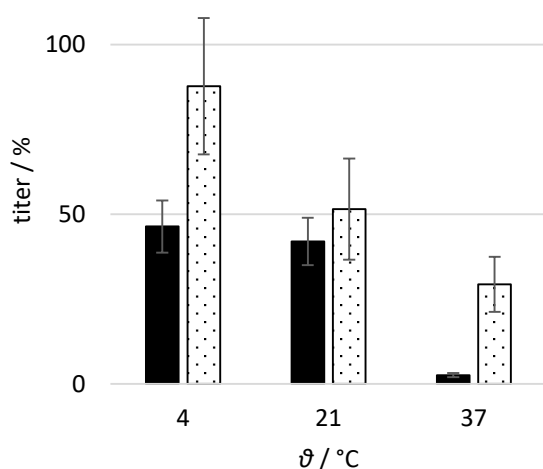


Figure 7. Impact of incubation temperature on infectivity of MeV (black bars) and MuV (white bars). Results are given as mean \pm SEM, $n \geq 4$.

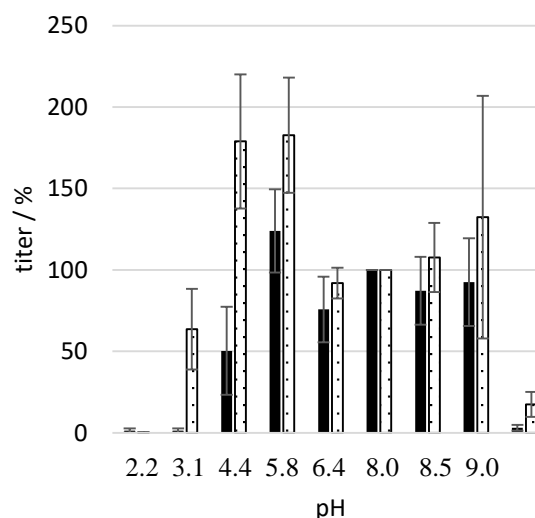


Figure 8. Impact of pH on infectivity of MeV (black bars) and MuV (white bars). Results are given as mean \pm SEM, $n \geq 5$.

Since virus samples are suspensions, their proper homogenization is a prerequisite for sample manipulation, especially after *e.g.* UC. Generally, pipetting and vortexing are used for homogenization, and here it was aimed to evaluate the impact of such processes on MuV and MeV. Virus samples were subjected to pipetting (1, 3 or 5 minutes) and vortexing (1, 3, 5 or 10 minutes). By determination of viral particle size, total and infective particle concentration, it was established that pipetting shows no impact on MuV and MeV, however prolonged vortexing (longer than 1 minute) resulted in significant decrease in particle size and both total and infective particle concentrations. Although sample homogenization usually takes up to a minute, meaning both pipetting and vortexing are suitable methods, in cases when firm virus particle pellets are formed (*e.g.* after UC), prolonged pipetting should be the method of choice to ensure proper sample resuspension.

When discussing results on virus stability, it should be kept in mind that different cells used for virus production, as well as the use of different virus strains, may result in viral particles of different properties thus affecting viral particle stability under different conditions.

4.3. Purification of MuV and MeV by ultracentrifugation

UC is still widely used as laboratory-scale purification and concentration method. Although the recommended approach for paramyxovirus purification such as MuV and MeV is sucrose gradient UC, here one-step UC was used due to its simplicity, but also due to possible negative effects of sucrose solutions used for gradient formation^{VI}. Purification of MuV and MeV by UC 1, 2 and 4 hours resulted in maximum recovery of approximately 10% of infective virus for both MuV and MeV, after 2 h UC, although statistical analysis revealed that differences in infective virus recoveries after 1, 2 or 4 h of UC were not significant. Normally, recoveries after UC range from 1 – 100%, but high recoveries are usually obtained only for VSV-pseudotyped retro- and lentiviral vectors (VSV – vesicular stomatitis virus)^{LXXXV,LXXXVII-LXXXIX,CXLII,CXLIII}.

During UC, HCPs in supernatants and pellets were monitored by indirect ELISA using polyclonal antibodies specific for Vero cell lysate. The amount of HCPs in supernatants is decreasing, and increasing in the pellets, indicating that most HCPs are present inside viral particles, ECVs or in some kind of complex with them, since free proteins do not pellet under the conditions used. This enables separation of viral particles and ECVs from free proteins in

^{CXLII} W. R. Beyer, M. Westphal, W. Ostertag, D. Von Laer, *J. Virol.* **76** (2002) 1488–1495.

^{CXLIII} P. Lotfian, M. S. Levy, R. S. Coffin, T. Fearn, P. Ayazi-Shamlou, *Biotechnol. Prog.* **19** (2003) 209–215.

cell culture supernatant, however UC likely results in significant ECV copurification with viral particles. When non-infected Vero cell culture supernatant was subjected to UC for 2 h in order to isolate ECVs from it, similar results were obtained as for viruses, with approximately 20% of particles present in the pellet, in comparison to around 30% of total particles pelleted when viruses were purified by UC.

Since heterogeneity of starting virus samples can greatly affect the purification process, its impact on purification by UC was evaluated and it was shown that recoveries increase at later harvest days, as well as the amount of viral proteins when the samples are analyzed by SDS-PAGE (Figure 9). This is expected for MeV since number of infective particles in the starting sample increases throughout five-day harvest period, but unexpected for MuV since number of infective particles in the starting sample decreases during this period, whereas total particle concentration remains roughly the same (Figure 2). This underlines the strong impact of virus suspension heterogeneity on purification and concentration of MuV and MeV. For ECV, no clear trend can be observed, and the amounts of proteins appear not to differ from day to day during five-day harvest.

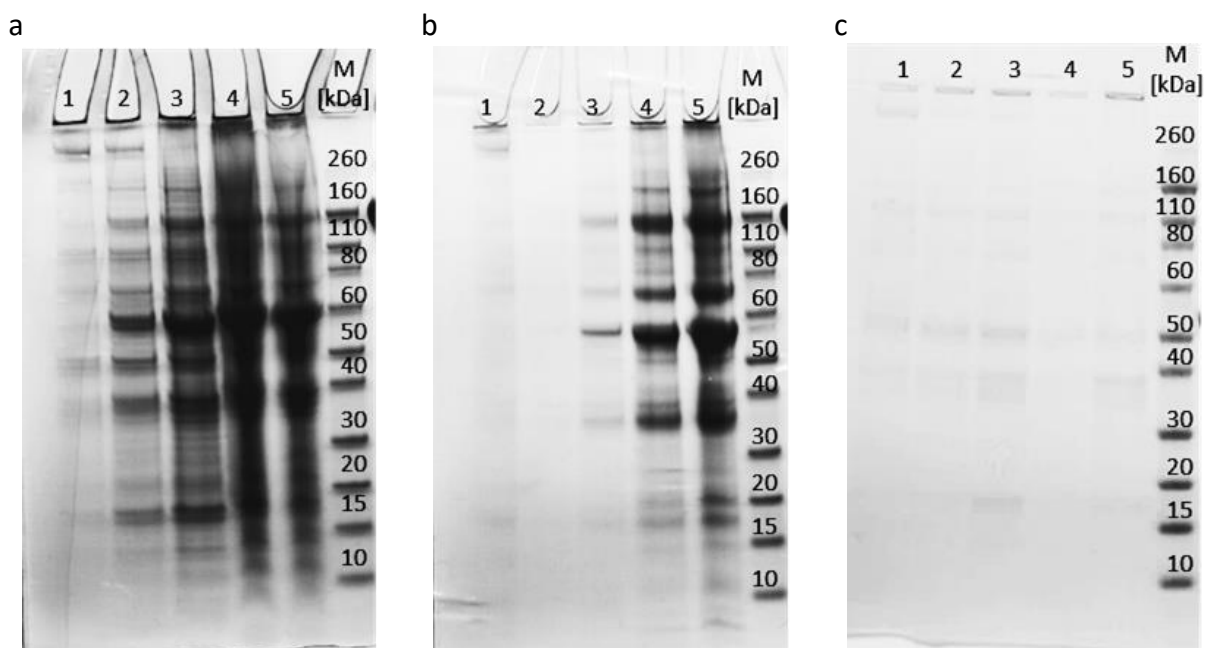


Figure 9. Protein content of MuV (a), MeV (b) and ECVs (c) purified by UC during five-day harvest.

4.4. Purification of MuV and MeV by DF

DF and UF are alternatives to virus purification and concentration by UC, and their main advantage is applicability for large-scale processes. Here, DF was performed on two types of membranes – PES and RC, both with MWCO 100 kDa. DF resulted in considerably higher infective virus recoveries than UC (16 – 39%), as well as in somewhat higher total particle recovery, with no significant impact on particle size. This is in line with previous reports which found DF to be a more gentle processing method than UC, generally leading to better recoveries^{XCI,CXLIV}. No significant differences in virus recoveries were observed when different membranes were used. No infective, or any other particles were detected in permeates. The amounts of HCPs in permeates were also below limits of detection, whereas more than 50% of HCPs from the starting samples were present in the retentates. When samples were analyzed by SDS-PAGE (Figure 10), it revealed that large amounts of proteins smaller than 100 kDa were present, which is in line with most of them being present inside viral particles or ECVs.

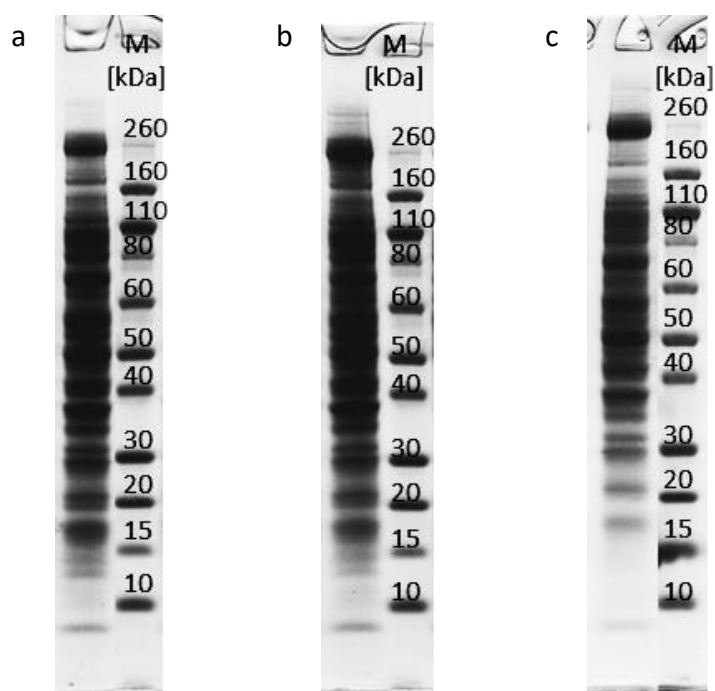


Figure 10. Samples of MuV (a), MeV (b) and ECVs (c) purified by DF.

4.5. Chromatographic purification of MuV and MeV

The heterogeneity of virus samples, total-to-infective particle ratios and their day-to-day variability affect the chromatographic processes, as well as calculated recoveries. Since pumping the virus through the chromatographic system itself may cause stress on virus particles, recoveries of infective MuV and MeV were determined after passing through the system without a column, at flow rates 2 – 10 mL/min. It was established that just pumping the virus suspension through the system may result in loss of up to 35% of infective MuV, and up to even 85% of infective MeV, however, increasing flow rates from 2 to 10 mL/min does not seem to increase the infectivity loss.

Purification of MuV and MeV by HIC resulted in up to 60% recovery of infective viral particles when large channel columns (6 μm) were used, and the best results were achieved when 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was used in the binding buffer. At lower $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations, the binding of MuV and MeV to the column is weaker, resulting in high infective particle concentrations in the flow-through fraction (FT), whereas higher $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations result in better virus binding to the column, but show negative effects to infectivity due to virus sensitivity to high salt concentrations. Virus sensitivity to salt, and the loss of infectivity due to passing through the chromatography system represent the biggest limitations in improving the obtained recoveries. Monitoring particle size in elution fractions revealed that fractions with higher $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations contain smaller particles, and this was confirmed by establishing that incubation of starting virus samples in 0.5, 1, 1.5 and 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ did not result in particle size reduction due to osmotic pressure or any other causes. Purity of HIC obtained eluates was evaluated by monitoring the presence of host cell DNA and HCPs. It was shown that HIC successfully removed host cell DNA from eluates, as previously described^{CIII}, confirming this method's suitability for purification of vaccines and biopharmaceuticals. Monitoring the amounts of HCPs present in HIC fractions revealed that most HCPs were still present in HIC eluates. This HCPs may arise from HCPs inside the viral particles, copurified free HCPs or ECVs. When suspension of ECVs, *i.e.* cell culture supernatant from non-infected Vero cells was purified on HIC column at optimal conditions for virus purification (1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the binding buffer), FT contained more particles than in the case of virus purification, indicating weaker binding of ECVs to the column under used conditions, however, significant amount of particles (17%) was still present in the eluate without added salt (where

most infective particles also elute), and this fraction also contained the highest HCP concentration. This confirms the copurification of ECVs or free HCPs by HIC.

As mentioned before, the heterogeneity of virus suspensions may affect chromatographic recoveries, and this was confirmed by two five-day cycles in which three chromatographies were performed each day in triplicates, and a clear trend was observed – higher infective particle concentration in the starting sample results in lower chromatography recovery, and this recovery depends more on total-to-infective particle ratio than on the number of total particles injected to the column. This is likely the consequence of inevitable particle loss during chromatography as earlier described, which appears as a lower loss at low infective particle concentrations, but increases with increased infective particle concentration. Variations in virus production, as well as their impact on recovery and purity of virus preparations have been previously described^{CII}, and insight in such trends may decrease such variations and contribute to production optimization.

IEX is most often used for virus purification due to its simplicity. Here, MuV and MeV were purified both on anion and cation monolithic exchangers with large pores (6 µm), however, IEX proved to be unsuitable for purification of these viruses. When cation exchanger SO₃ was used, most infective particles remained in FT indicating that MuV and MeV do not bind to cation exchangers at neutral pH optimal for virus infectivity. When anion exchange was used, all viral particles were bound to the used columns (DEAE, QA), since no infective particles were detected in FT, however elution with up to 2 mol/L NaCl resulted in no more than 17% recovery of infective viral particles in the eluates. This indicates very strong binding of enveloped viruses such as MuV and MeV on anion exchangers, probably due to high negative charge produced by phospholipid head-groups in lipid bilayer at neutral pH. Further increase in salt concentration or a change in pH may result in better elution from anion-exchange columns, however previously described sensitivity of MuV and MeV to such conditions would likely result in further infective viral particle loss.

AC and IAC are highly specific methods for biomacromolecules purification and concentration, but their main drawback are harsh elution conditions which can impair the functionality of purified molecules. Therefore, the aim here was to investigate alternative approach enabling elution under native conditions. The hypothesis was that free amino acids from the solution (eluent) at high molarity could compete for antibody surface binding, thus displacing the antigen from the binding site, even at neutral pH. Investigations of

complementarity-determining regions of antibody-antigen complexes showed that some amino acids were more abundant than others, *e.g.* Arg, meaning that Arg is more likely to interact (specifically or nonspecifically) with other proteins or ligands. Hence Arg was chosen as the most prominent candidate for native elution approach. Additionally, imidazole was used as aromatic amino acid representative (due to low histidine solubility), serine as polar amino acid representative, and glycine since it is a small amino acid evenly distributed on protein surface and interior. Native elution approach was first tested on two model proteins – OVA with anti-OVA monolithic column (with large channels), and hIgG with protein G monolithic disk (also with large channels), the latter being AC instead of IAC. Proteins were eluted by high molarity amino acid solutions (native elution), followed by elution with low pH buffer (pH 2.3, *i.e.* classical elution). Solutions containing Arg, Ser and imidazol, and their combinations have proven to be moderately effective, with elution recoveries up to 42 and 29% for OVA and hIgG, respectively. The lower efficiency of this elution approach in hIgG-protein G pair might arise from differences in their contact site, *i.e.* stronger inherent interaction between these molecules. Although these recoveries are moderate, analysis of eluates by SEC-HPLC showed that hIgG eluates obtained by amino acids do not contain aggregates, unlike neutralized eluates obtained after elution at pH 2.3, meaning such elution approach might contribute to better protein stability. Screening of different amino acid concentrations showed increasing elution efficiency with increased amino acid concentrations, implying the competing mechanism of this elution approach.

Following protein purification by AC and IAC with native elution, the same approach was tested for MuV and MeV using anti-MuV and anti-MeV specific monolithic columns with large channels. Unfortunately, recoveries obtained using anti-MeV column were very low, hence experiments were limited to MuV purification on anti-MuV column. Up to 70% of infective MuV was successfully recovered by native elution approach using high molarity amino acid solutions such as 0.75 mol/L Arg / 0.75 mol/L Ser. Numerous non-infective, smaller particles were present in the FT during this purification, indicating successful separation of smaller, non-infective viral particles and ECVs from whole, infective viruses. Higher recoveries obtained for MuV in comparison to model proteins may arise from the nature of MuV-anti-MuV interaction, as well as from steric effects due to viral particle size resulting in more efficient MuV elution. High efficiency of Arg, Ser and imidazole as eluents supports the hypothesis that these amino acids are more abundant on antigen-antibody contact sites. Arg was already successfully used

as an eluent in AC, in combination with acidic pH (pH 4.0)^{CXI}, but this was the first time it was successfully used at neutral pH and in combination with other amino acids which were previously shown not to be effective in AC^{CXII}. When amount of HCPs in fractions obtained by IAC was determined, both FT and E1 contained about 25% of HCPs in comparison to the starting sample. These HCPs may originate from inside the viral particles, be present as free proteins, or arise from contaminating ECVs. In spite of its high specificity, here described IAC still does not offer the possibility to completely separate ECVs from MuV particles. Although the neutralization activity of polyclonal anti-MuV antibodies was confirmed, MuV purified by UC was used for raising such antibodies, and such UC purified sample likely contains significant amounts of ECVs^{XL,XLI}. This can raise antibodies against HCPs present in ECVs envelope, thus resulting in copurification of ECVs even in IAC. A possible solution to this problem is IAC column with immobilized monoclonal antibodies specific for virus surface glycoproteins (HN and F in MuV), but this approach still does not guarantee isolation of only viral particles since ECVs and viruses use the same mechanisms to exit the cells and appear to bud from the same membrane microdomains^{LXXI,CXLV,CXLVI}. This means some ECVs might accidentally incorporate viral surface proteins into their lipid envelopes and hence copurify even using IAC. The attempt to purify ECVs on anti-MuV specific column confirmed that about 30% of ECVs and about 20% of HCPs are present in the eluate from anti-MuV column, confirming that even IAC does not offer an ideal solution to ECV copurification.

For all three chromatographic methods, HIC, IEX and IAC, purification of viruses using small channel (1.4 μm) monolithic columns was evaluated. Although this channel size is theoretically suitable for MuV and MeV with approximate diameter of 200 nm, these columns were proven unsuitable in all cases since obtained recoveries were very low (the highest recovery was 6% for MuV purified by HIC), probably due to shear stress imposed on the viral particles during passing through such smaller channels or due to particle entrapment inside the channels. The latter however seems improbable since no back pressure occurred during chromatographies.

^{CXLV} A. de Gassart, C. Géminard, B. Février, G. Raposo, M. Vidal, *Proteins* **102** (2003) 4336–4344.

^{CXLVI} T. Skotland, K. Sandvig, A. Llorente, *Prog. Lipid Res.* **66** (2017) 30–41.

4.6. Investigation of MuV and MeV proteome and lipidome

Genomes of MuV and MeV are well explored, but only recently the proteome of MuV was investigated by MS^{XXXV}, whereas MeV's proteome has not yet been investigated by MS. Genomes of MuV and MeV encode for 9 and 8 proteins (Tables 1 and 2, respectively), but the question remains if all of these proteins are synthesized, and which are actually present inside the viral particles. Additionally, it is of great importance to identify HCPs present in virus preparations, as well as trying to establish which HCPs are present inside viral particles, and which are just a contamination, arising from free proteins in the sample, or ECVs. Presence of ECVs has largely been disregarded in viral proteome research, probably due to difficulties in separation of ECVs from viral particles, or the lack of awareness that both types of particles are secreted during infection and copurified by all available methods. Here, MuV, MeV and ECVs were purified by HIC, IAC and UC, and a comparative analysis was carried out to try and establish which HCPs are present inside the viral particles, and which are more likely to be a contamination. All chromatographic samples were subjected to UC for concentration prior to SDS-PAGE, and this step also removes any free proteins present in the sample. In all virus samples the presence of infective particles was confirmed by CCID₅₀ assay.

When MuV was purified by UC, numerous bands were observed, and 6 out of 9 viral proteins were detected (Figure 11): L, HN, NP, M, V and F₂. HN was detected in up to 4 bands, indicating it may exist in several glycoforms, as well as that it is present as dimer and monomer, as previously described^{XXXV,CXLVII}. Only fragment F₂ of protein F was detected, at M_r slightly higher than expected, likely due to glycosylation. NP was detected in several bands at M_r lower than theoretically calculated from the amino acid sequence. The comparison of peptides present in the PMF spectra indicates C-truncated forms of the protein are present, which might arise from events during transcription or translation which result in synthesis of truncated proteins, or due to protein degradation during sample manipulation, as previously described^{XXXV}. L, M and V were detected around their theoretical M_r s. V is a result of alternative transcription of the P gene, and was until now considered a non-structural protein, therefore it is interesting to see that it is in fact incorporated into viral particles. Proteins I and SH remained undetected. I, like V, arises from alternative transcription of the P gene, and is also considered a non-structural

^{CXLVII} M. N. Waxham, D. C. Merz, J. S. Wolinsky, *J. Virol.* **59** (1986) 392–400.

protein. So far it was only found in the infected cells^{VII,XVI}. Function of SH is still not completely clear. It was found in infected cells, but appears not to be necessary for virus replication^{XXI,CXLVIII}.

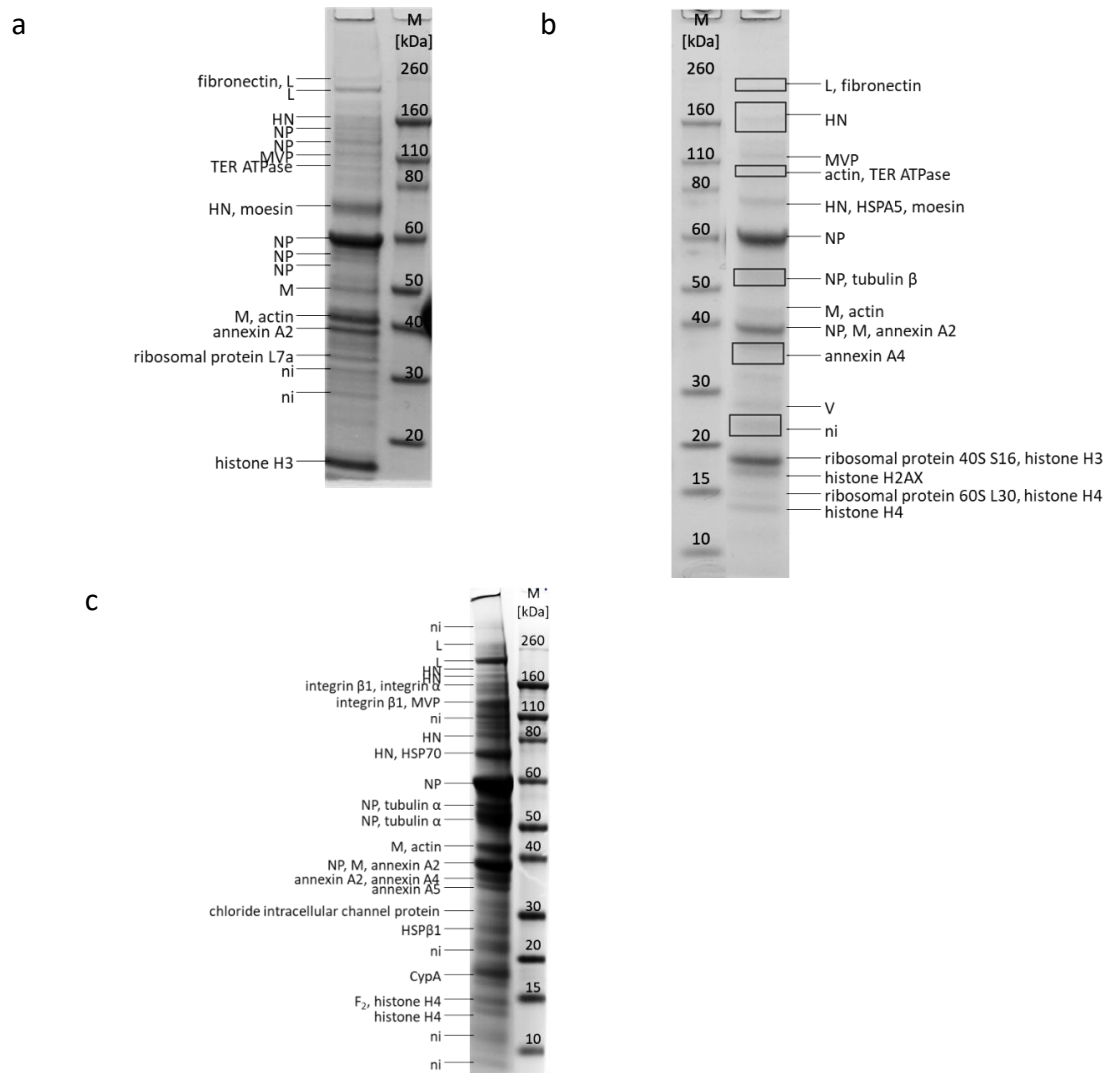


Figure 11. MALDI-TOF/TOF-MS analysis of 3 separate MuV samples purified by UC. HSP – heat shock protein. Rectangles denote larger gel pieces possibly containing several faint bands. TER ATPase – transitional endoplasmic reticulum ATPase, MVP – major vault protein, HSPA5 – heat shock protein A5, CypA – cyclophilin A, ni – not identified.

Both I and SH may have remained undetected due to their low abundance, or complete absence from MuV particles. P was not detected which is surprising since it was previously found in MuV purified by UC^{XXXV}. It may be due to afore mentioned starting sample heterogeneity and its effects on purification processes (Figure 9), resulting in varying viral protein concentrations in the samples from day to day, and thus affecting which proteins are detected by MS. Some

authors also report P may be more sensitive to cellular protease degradation in comparison to other viral proteins, which might also prevent its detection^{CXLIX}.

When this sample was resolved by 2D-GE, surprisingly only NP and P were detected, alongside with numerous HCPs. The underlying cause for such result needs to be investigated further.

In MeV purified by UC 7 out of 9 viral proteins were detected (Figure 12): L, H, P, N, F₁, M and C.

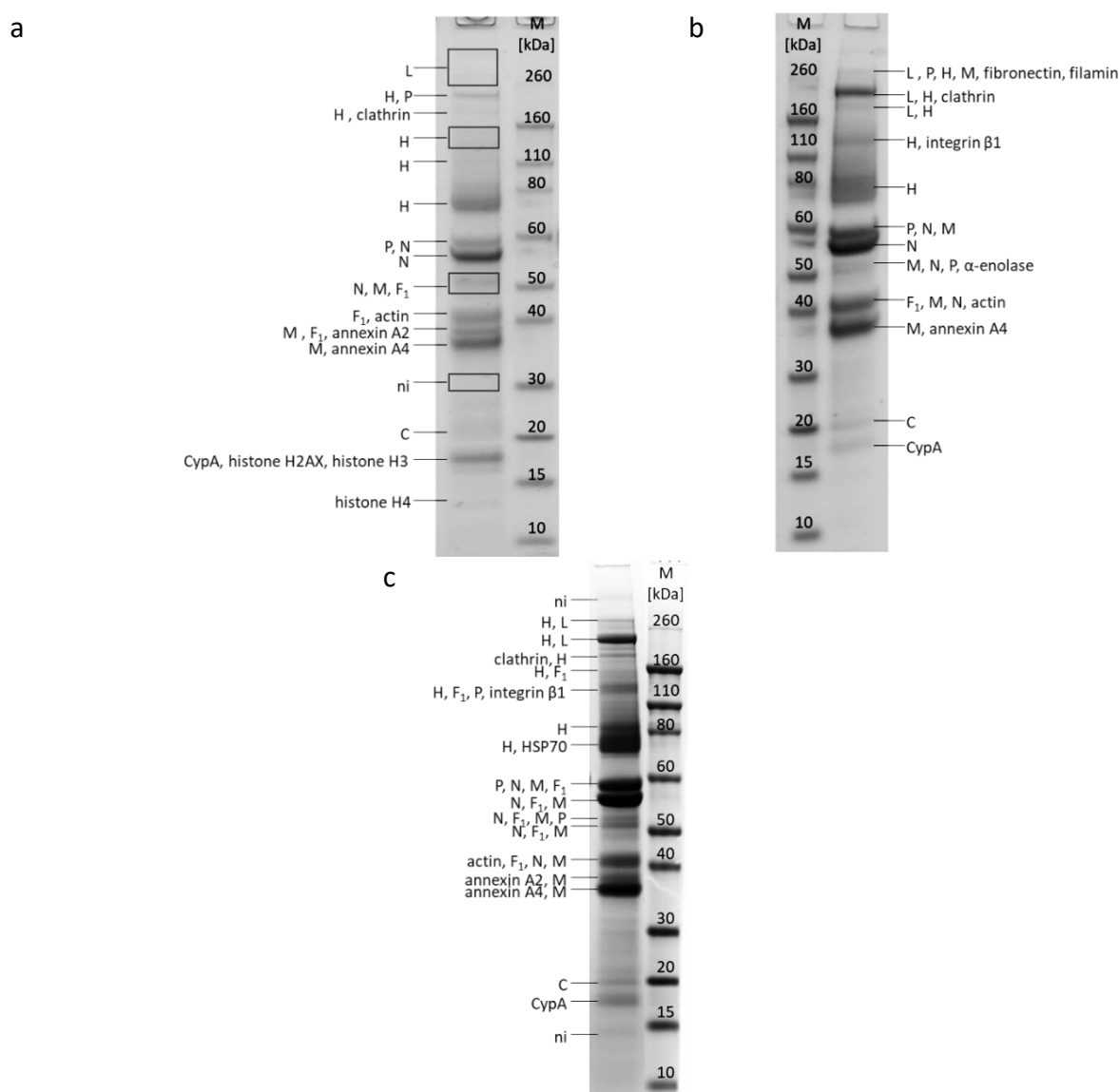


Figure 12. MALDI-TOF/TOF-MS analysis of 3 separate MeV samples purified by UC. HL – heavy chain. Rectangles denote larger gel pieces possibly containing several faint bands.

^{CXLVIII} K. Takeuchi, K. Tanabayashi, M. Hishiyama, A. Yamada, *Virology* **225** (1996) 156–162.

^{CXLIX} R. Cox, T. J. Green, S. Purushotham, C. Deivanayagam, G. J. Bedwell, P. E. Prevelige, M. Luo, *J. Virol.* **87** (2013) 7558–7568.

For the first time C was detected in a MeV sample. V and C arise from alternative transcription of the P gene (like V and I in MuV), are considered non-structural proteins, and are not necessary for MeV replication in Vero cells^{IX,XVII,XVIII}, therefore it is very interesting to see that C is synthesized and packed into MeV virions. It was previously detected only in infected cells. The intensity of the band visible on the gel supports the hypothesis that in some samples it might not be detected due to its low abundance.

L was detected in bands around its theoretical M_r . H was detected in multiple bands at M_r s equal or higher than theoretical, indicating different glycoforms are present, as well as dimer and monomer^{XXXIII}. N was detected at M_r s equal and lower to theoretical, which is in line with previously described results indicating truncated forms or degradation products of N are present^{XXIX}. Here, proteins F and M were detected in multiple bands with M_r s higher than theoretical. The reason for this phenomena is for now unclear. It was previously described that M in MeV presents as a doublet of bands close to theoretical M_r , as well as that it does not migrate as a discrete band on the gel, but forms a smear^{CL}. For F some of these bands may contain palmitoylated F_1^{CL} or F_0 , however with currently available data this cannot be confirmed. Another possible explanation is the translation of polycistronic mRNAs created during virus replication^{CLII}. Cross-contamination as a cause of this phenomena in this, and all other samples where this occurs, has been excluded due to meticulous sample handling and special focus on preventing cross-contamination. Protein P was also found in 2 – 3 bands. The high M_r bands (higher than 110 kDa) most likely contain aggregates. Since P is heavily phosphorylated, the bands at approximately 60 and 53 kDa likely contain phosphorylated and non-phosphorylated protein, respectively. The position of P at approximately 60 kDa is likely the consequence of gel retardation due to high negative charge as a result of extensive phosphorylation.

When this sample was subjected to 2D-GE, only 3 or 4 viral proteins were detected – N, M, P and possibly V. At approximately 31 kDa, the M_r corresponding to V, peptides were detected which correspond both to V and P amino acid sequence, hence unambiguous confirmation whether this is P or V is currently not possible.

^{CL} C. Pohl, P. W. Duprex, G. Krohne, B. K Rima, S. Schneider-Schaulies, *J. Gen. Virol.* **88** (2007) 1243–1250.

^{CLJ} M. Caballero, J. Carabana, J. Ortego, R. Fernandez-Munoz, M. L. Celma, *J. Virol.* **72** (1998) 8198–8204.

^{CLII} M. A. Afzal, G. D. Elliott, B. K. Rima, C. Örvell, *J. Gen. Virol.* **71** (1990) 615–619.

When MuV was purified by HIC, 7 out of 9 viral proteins were detected (Figure 13): L, HN, NP, P, M, F and V. In this sample, both a precursor protein F_0 , and its fragment F_1 were detected at their corresponding M_r s.

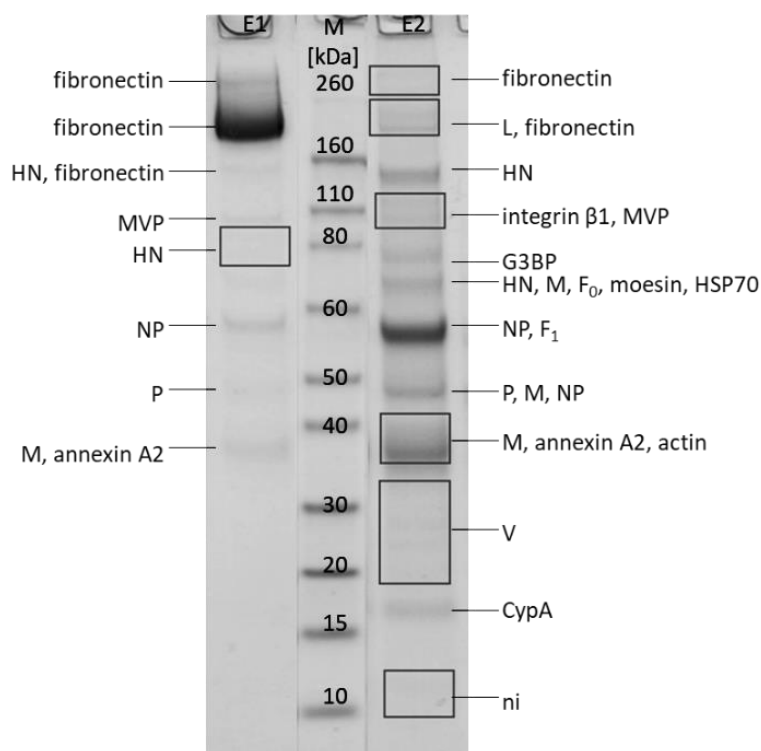


Figure 13. MALDI-TOF/TOF-MS analysis of HIC purified MuV. E1 – 0.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluate, E2 – 50 mmol/L HEPES eluate, G3BP – galectin-3-binding protein. Rectangles denote larger gel pieces possibly containing several faint bands.

In HIC purified MeV 5 out of 8 viral proteins were confirmed (Figure 14): H, P, N, F_1 and M. Proteins L, V and C probably remained undetected due to their low abundance. For L another possibility is that, since it co-migrates with very abundant fibronectin, peptide ionization suppression prevented its detection.

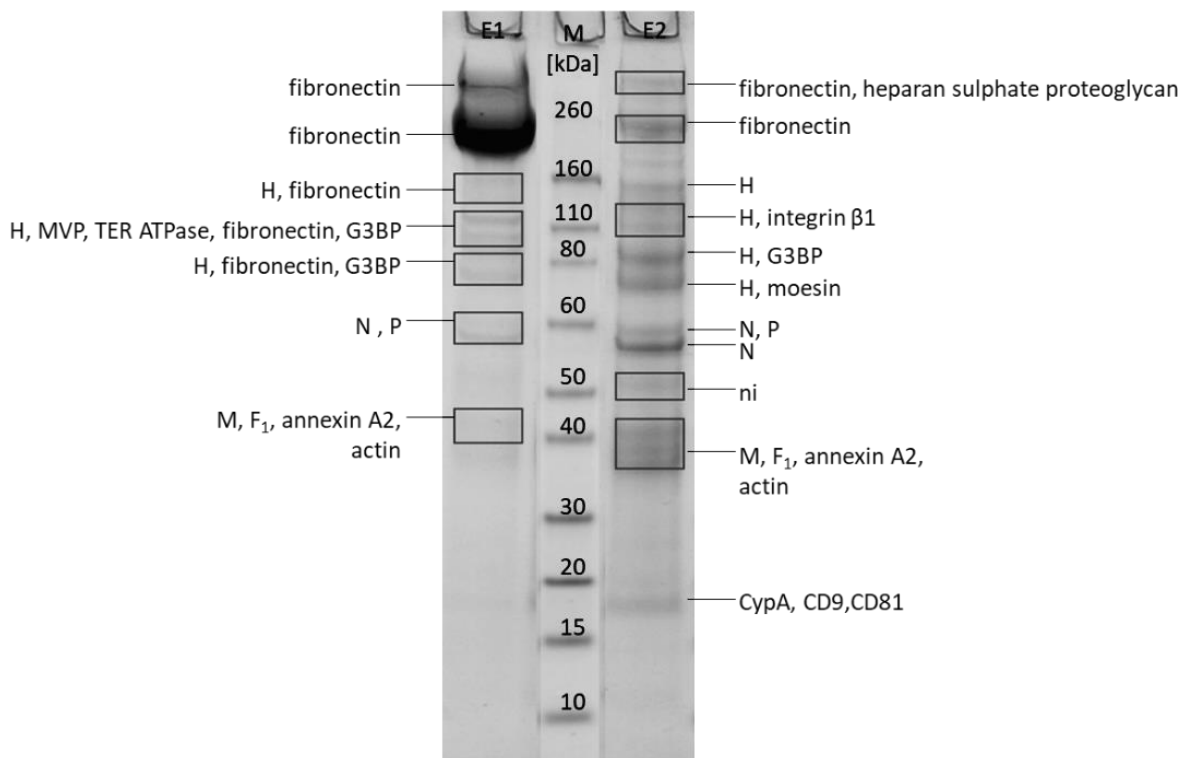


Figure 14. MALDI-TOF/TOF-MS analysis of HIC purified MeV. E1 – 0.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluate, E2 – 50 mmol/L HEPES eluate. Rectangles denote larger gel pieces possibly containing several faint bands.

Comparison of two HIC elution fractions for both MuV and MeV reveals different protein patterns. This, alongside with more infective particles present in fraction E2, is in line with the hypothesis that such fractions contain different particles, *i.e.* they contain different subpopulations of viruses^{LXVIII}, and potentially of ECVs.

In MuV purified by IAC, 6 out of 9 viral proteins were detected (Figure 15): L, HN, F, NP, M and V. All three forms of F were detected here: F₀, F₁ and F₂. All were detected at their respective M_r s, except for F₂ which was detected in three bands at M_r higher than theoretical. This is likely due to different glycosylation of F₂, or due to diffuse nature of glycosylated proteins^{XXX}.

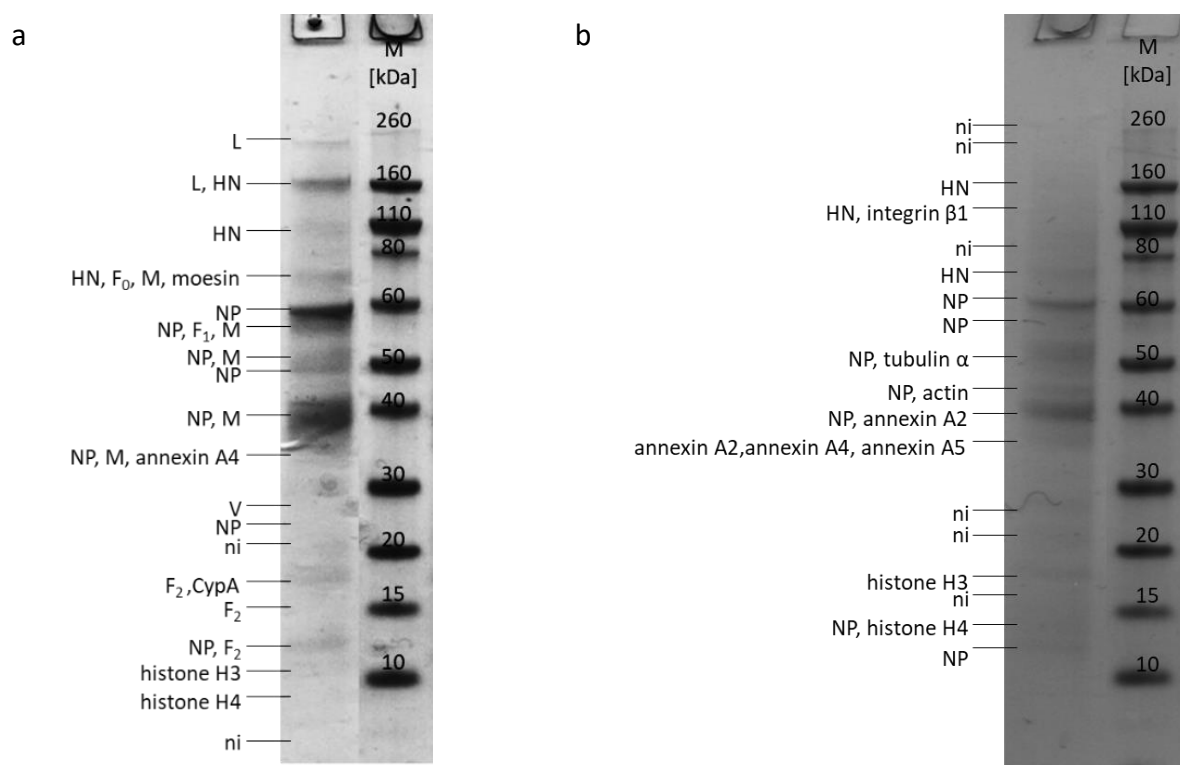


Figure 15. MALDI-TOF/TOF-MS analysis from 2 separate MuV samples purified by IAC.

Since ECVs are the major contaminant of virus preparations, the proteomes of ECVs purified from non-infected Vero cell culture supernatant by different methods (UC, HIC, IAC, Figure 16) were analyzed and HCPs present in ECVs were compared to HCPs present in MuV and MeV samples. Annexins, actin and CypA were detected in all analyzed samples of viruses and ECVs, which, in combination with previous reports^{XXII,XXIII,XXVII,XXXXXXVI,XXXVII,XLII,LIII-LVI}, strongly supports the hypothesis that these HCPs are incorporated into virions. Integrin β1 and moesin were also detected in both viruses and ECVs, indicating that these HCPs are also present inside the virions as previously reported^{XLIX,L}. Fibronectin was present in all samples except MuV purified by IAC and ECVs, and it was especially abundant in E1 fraction obtained by HIC. High (NH₄)₂SO₄ concentrations might have caused fibronectin aggregation^{CLIII,CLIV} during HIC, forming large aggregates which copurified during HIC, and then pelleted during UC concentration of the samples.

^{CLIII} R. C. Bollineni, I. J. Guldvik, H. Grönberg, F. Wiklund, I. G. Mills, B. Thiede, *Analyst* **140** (2015) 8109–8117.

^{CLIV} M. J. van den Heuvel, B. J. Jefferson, R. M. Jacobs, *J. Virol.* **79** (2005) 8164–8170.

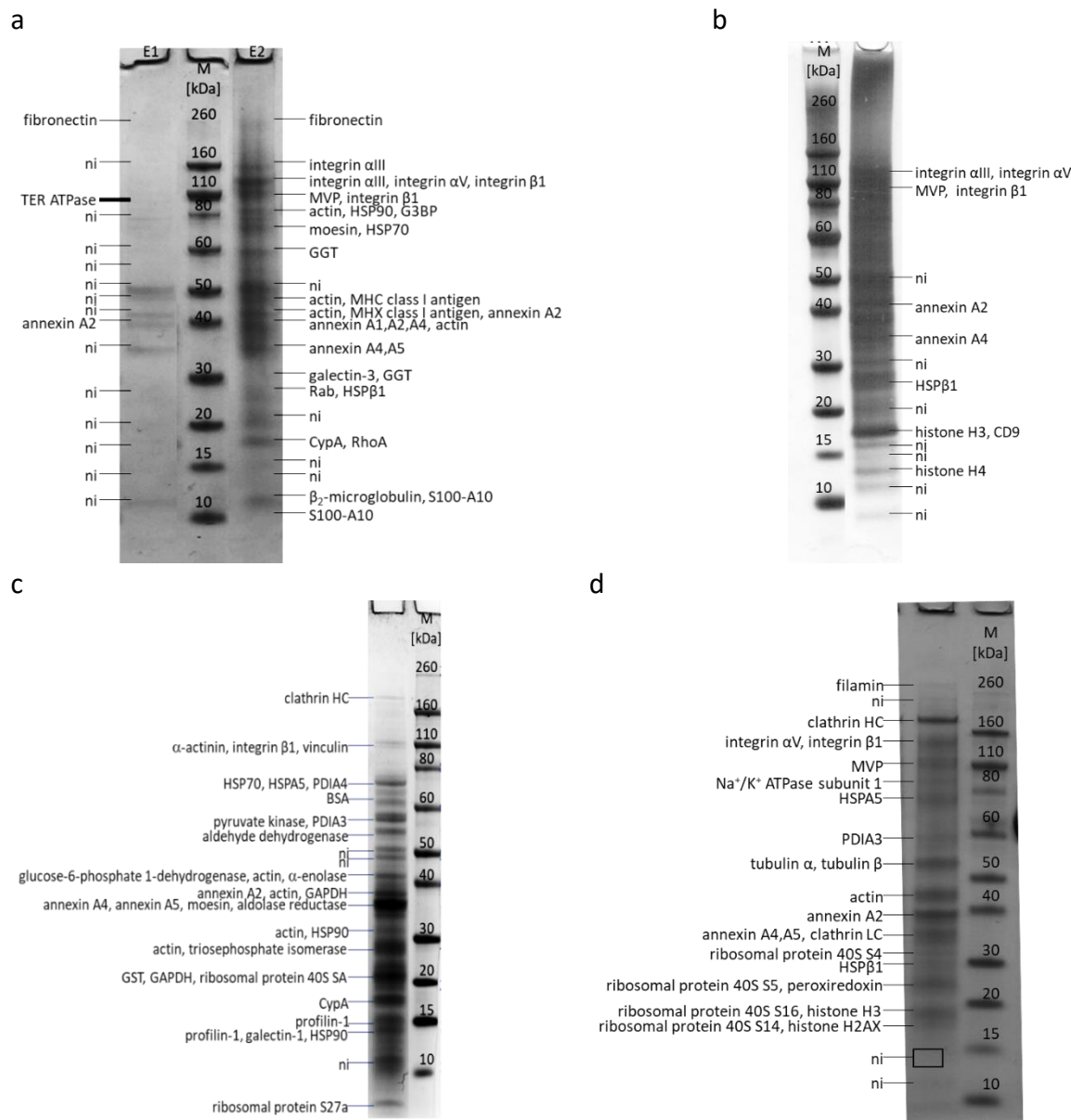


Figure 16. MALDI-TOF/TOF-MS analysis of ECVs purified by HIC (a), IAC (b) and UC (c, d). GGT - gamma-glutamyl-transferase, MHC I – major histocompatibility complex I, PDIA4 – protein-disulfide-isomerase A4, GST – glutathione-*S*-transferase. Rectangles denote larger gel pieces possibly containing several faint bands.

All detected HCPs were previously reported in purified virus preparations^{XXXVI-XXXVIII,XLII,XLIII-XLVI,XLIX,LI-LIII,LX}, but it should be kept in mind that some of them might arise from copurified ECVs. Also, protein composition of ECVs may change in response to viral infection which further underlines that the problem of ECV copurification must not be overlooked.

Preliminary investigation of MeV and MuV lipidome was also carried out on samples purified by UC. Lipidome of MuV has previously been investigated^{XXXV}, but this was the first

investigation of MeV's lipidome. Comparison of lipid composition of MuV and MeV with lipids extracted from Vero cells revealed no significant differences, *i.e.* lipid composition of these viruses resembles to lipid composition of Vero cells. This is in line with previous results obtained for MuV, VSV and some retroviruses^{XXXV,LXI,LXII}.

5. CONCLUSION

Virus suspensions are highly heterogeneous material and their heterogeneity can affect the results of purification processes.

MuV and MeV are sensitive to changes in pH, temperature and high salt concentrations, however addition of sulfates and amino acids (Ser, Arg) can contribute to their stability. These viruses are also quite sensitive to shear stress, hence for clarification the method of choice is microfiltration instead of centrifugation, for resuspension pipetting is better than vortexing, and for concentration DF is better than UC. In general, MeV is more sensitive than MuV since it shows greater infectivity loss when subjected to the same treatment.

MuV and MeV can be quite successfully purified by HIC or IAC using large channel monolithic columns with recoveries up to 60 - 70%, and high molarity solution of amino acids can successfully be used for elution at neutral pH in IAC. Small channel columns and IEX are not suitable for MuV and MeV chromatographic purifications. Sensitivity of MuV and MeV to passing through chromatographic system itself, and their sensitivity to high salt concentrations are the main factors limiting higher recoveries.

Viral suspensions contain significant amounts of ECVs which cannot be separated from MuV and MeV by currently available methods, and their presence may affect the results of MuV's and MeV's proteome and lipidome investigations. Such analysis revealed that all structural viral proteins are present in MuV and MeV, and undetected viral proteins are not essential for virus replication under used conditions. Results imply that actin, annexins, CypA, integrin β 1 and moesin are in fact incorporated inside the virions of MuV and MeV. Regarding lipid composition of MuV and MeV, it resembles greatly to lipid composition of host cells (Vero).

§ 1. UVOD

Virusi predstavljaju jedinstvenu skupinu organizama u prirodi. Mogu se smatrati makromolekulskim kompleksima koji se sastoje od nukleinskih kiselina i proteina te lipida, ukoliko su obavijeni lipidnom ovojnicom. Virusi su najmanji organizmi sposobni za replikaciju, međutim nemaju vlastiti metabolizam zbog čega nužno napadaju stanice te koriste njihove mehanizme za vlastito umnožavanje. Virusi inficiraju i eukariotske i prokariotske organizme koji pripadaju u sve tri domene života – eukarije, bakterije i arheje¹.

Virusi zaušnjaka (engl. *mumps virus*, MuV) i ospica (engl. *measles virus*, MeV) pripadaju porodici virusa *Paramyxoviridae*, a uzrokuju istoimene bolesti u ljudi koje se mogu spriječiti cijepljenjem². U novije vrijeme ovi, kao i brojni drugi virusi, predmet su pojačanog istraživačkog interesa zbog njihove moguće primjene u onkolitičkoj viroterapiji³. Onkolitički virusi su skupina virusa koja selektivno inficira i oštećuje tumorske stanice, dok normalna tkiva u pravilu ostaju neinficirana⁴. Cjepni sojevi MuV-a i MeV-a prepoznaju i za ulazak u stanicu koriste stanične receptore čija je ekspresija značajno povišena na tumorskim stanicama – u slučaju MeV-a to je stanični receptor CD46, dok su kod MuV-a to glikoproteini koji na sebi nose vezanu sijalinsku kiselinu^{3,5}. Ekspresija virusnih površinskih glikoproteina na membrani inficirane stanice omogućava njihovo vezanje na receptore na površini susjednih stanica i dovodi do fuzije inficirane stanice sa susjednim, neinficiranim. Time nastaju tzv. sinciciji (engl. *syncytia*), velike višejezgrene strukture koje u konačnici podliježu apoptozi^{5,6}, odnosno dolazi do uništavanja tumorskih stanica. Uz to dolazi i do oslobađanja tumorskih antigena koje mogu vezati antigen-prezentirajuće stanice i time dodatno potaknuti antitumorski imunološki odgovor^{5,7}.

Kako bi se osigurala njihova učinkovitost, virusne čestice moraju biti cjelovite i ispravno strukturirane, te visokog stupnja čistoće kako bi takvi pripravci bili sigurni za upotrebu. Nečistoće u virusnim uzorcima mogu potjecati od procesa proizvodnje i pročišćavanja – iz staničnih kultura odnosno reagensa i aditiva (npr. albumin, antibiotici), od stanica na kojima se virusi proizvode (npr. stanični proteini, nukleinske kiseline, proteoglikani, glikozaminoglikani, ekstracelularne vezikule), od instrumenata i pribora koji se koriste u proizvodnji i skladištenju (engl. *extractables*, *leachables*) ili od samih virusa (npr. agregati, gole nukleokapside, prazne virusne ovojnice, defektne interferirajuće čestice)^{8,9}. Pročišćavanje i koncentriranje ovih virusa

stoga su od iznimne važnosti za biotehnologiju i njihovu primjenu u medicini, ali i za dobivanje čistih virusnih čestica koje omogućavaju temeljna istraživanja.

Cilj svakog procesa proizvodnje profilaktičkog ili terapijskog virusnog cjepiva je dobiti što čišći proizvod sa što većom koncentracijom infektivnih virusnih čestica, a koji je siguran za upotrebu⁸. Poboljšanjem procesa uzgoja i proizvodnje virusa (engl. *upstream processing*) tzv. usko grlo u proizvodnji cjepiva i drugih virusnih pripravaka pomaknulo se prema pročišćavanju virusnih čestica (engl. *downstream processing*). Osim u biotehnologiji, visoka čistoća virusnih pripravaka važna je i u temeljnim istraživanjima MuV-a i MeV-a, osobito za istraživanje proteoma i lipidoma koji su, u usporedbi s genomom, relativno skromno istraženi.

Za pročišćavanje virusnih čestica najčešće se koriste metode ultracentrifugiranja, ultra- i dijafiltracije te kromatografske metode. Pritom kromatografske metode sve više dobivaju na značaju obzirom da omogućavaju brzo, efikasno i reproducibilno pročišćavanje makromolekula i virusa, a lako ih je prevesti s laboratorijske na industrijsku skalu¹⁰.

Svrha ovog rada je istražiti mogućnosti pročišćavanja MuV-a i MeV-a različitim kromatografskim postupcima, ultracentrifugiranjem i dijafiltracijom, kao i ispitivanje njihove stabilnosti u različitim uvjetima kojima su virusi izloženi prilikom samih postupaka pročišćavanja (promjena pH vrijednosti, sastav korištenih pufera i otopina – prisutnost soli, aminokiselina i šećera, temperatura, itd.). Pritom je kao najbitniji parametar praćena količina infektivnih virusnih čestica (određivana *in vitro* testom titracije virusa), ali i koncentracija ukupnih čestica u virusnim suspenzijama, kao i njihova veličina (određivana metodom praćenja nanočestica, engl. *nanoparticle tracking analysis*, NTA). Čistoća virusa dobivenih različitim postupcima pročišćavanja praćena je određivanjem sadržaja i sastava staničnih proteina (engl. *host cell protein*, HCP) metodama spektrometrije masa i testom ELISA, a praćeno je i uklanjanje stanične genomske DNA (određivano lančanom reakcijom polimeraze, engl. *polymerase chain reaction*, PCR).

Ciljevi ovoga rada su:

- pronaći uvjete pri kojima je moguće pročistiti i koncentrirati MuV i MeV kromatografskim metodama, ultracentrifugiranjem i dijafiltracijom, uz što veće iskorištenje (prinos) infektivnog virusa i čistoću
- utvrditi utjecaj pH, temperature i različitih komponenti otopina (aminokiseline, šećeri, soli) na biofizička svojstva virusa (veličina čestica, infektivnost) kako bi

se odabrali uvjeti najveće stabilnosti virusa, kako prilikom pročišćavanja, tako i u konačnom produktu

- karakterizirati proteom i lipidom pročišćenih virusnih čestica.

Pritom je glavna hipoteza ovog rada da je iz heterogene suspenzije virusnih čestica različitim postupcima pročišćavanja, a prvenstveno kromatografskim, moguće učinkovito izdvojiti cjelovite virusne čestice visoke čistoće prikladne i za medicinsku primjenu, ali i temeljna istraživanja.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Građa i sastav virusnih čestica MuV-a i MeV-a

MuV i MeV su virusi čija je genetička informacija pohranjena u nesegmentiranoj, negativno orijentiranoj jednolančanoj molekuli RNA. Ovi virusi obavijeni su lipidnom ovojnicom koja potječe od plazmatske membrane stanice domaćina, oblikom su pleomorfni, a njihov promjer je u rasponu 100 - 900 nm¹¹⁻¹⁶.

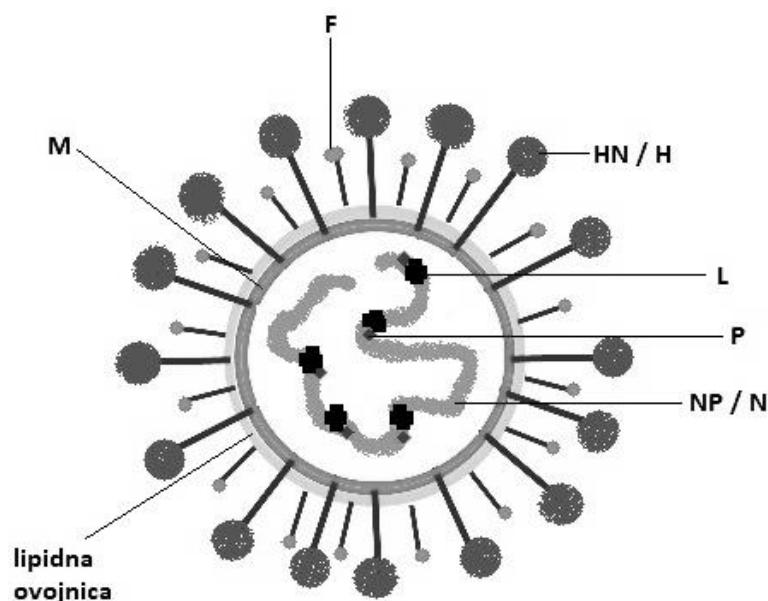
2.1.1. Proteinski sastav virusnih čestica MuV-a i MeV-a

Genomske RNA cjepnih sojeva MuV-a (L-Zagreb) i MeV-a (Edmonston-Zagreb) korištenih u ovom radu sastoje se redom od 15384 odnosno 15894 parova baza (engl. *base pairs*, bp), a kodiraju za ukupno 9 odnosno 8 proteina koji su dani u tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Proteini kodirani genomom MuV-a (soj L-Zagreb, GenBank: AY685921.1).

protein	CDS	N_{ak}	M_r	pI	pristupni broj (UniProt)
nukleoprotein, NP	146 – 1795	549	61336	5,24	Q5SC49
fosfoprotein, P	1979 – 3152	391	41595	7,82	Q5SC57
V	1979 – 2653	224	24096	8,86	Q5SC47
I	1979 – 2490	171	18302	10,04	Q5SC46
protein matriksa, M	3228 – 4481	375	41580	9,52	Q5SC54
fuzijski protein, F ₀ *	4546 – 6162	538	58730	8,13	Q5SC53
fragment 1 fuzijskog proteina, F ₁ *	-	436	47345	5,99	-
fragment 2 fuzijskog proteina, F ₂ *	-	102	11402	9,67	-
mali hidrofobni protein, SH	6268 – 6441	57	6833	9,82	Q5SC52
hemaglutinin-neuraminidaza, HN*	6614 – 8362	582	64127	7,79	Q5SC51
RNA-ovisna RNA-polimeraza, L	8468 – 11815	2261	256819	6,18	Q5SC50

CDS – kodirajuća sekvenca u genomskoj RNA, N_{ak} – broj aminokiselina u proteinu; * - glikoproteini čija se stvarna molekulska masa razlikuje od teorijski izračunate iz aminokiselinskog slijeda zbog posttranslacijski dodanih šećernih ostataka.



Slika 1. Shematski prikaz virusne čestice MuV-a odnosno MeV-a. Nisu prikazani nestrukturani proteini V, I i SH za MuV, odnosno V i C za MeV.

Tablica 2. Proteini kodirani genomom MeV-a (soj Edmonston-Zagreb, GenBank: AY486083.1).

protein	CDS	N_{ak}	M_r	pI	pristupni broj (UniProt)
nukleoprotein, N	108 – 1685	525	58131	5,15	Q89933
fosfoprotein, P	1807 – 3330	507	53957	5,07	Q77M25
V	1807 – 2705	299	32074	4,80	Q77M24
C	1829 – 2389	186	21037	10,31	Q77M23
protein matriksa, M	3438 – 4445	335	37749	9,24	Q6RXY8
fuzijski protein, F_0^*	5449 – 7110	553	59864	8,87	O93055
fragment 1 fuzijskog proteina, F_1	-	438	47069	6,28	-
fragment 2 fuzijskog proteina, F_2^*	-	115	12812	11,46	-
hemaglutinin, H^*	7271 – 9124	617	69162	6,74	Q9IC33
RNA-ovisna RNA-polimeraza, L	9234 – 15785	2183	247747	8,40	Q77M22

Virusna RNA pakira se u filamentozni kompleks koji se naziva ribonukleokapsida (engl. *ribonucleocapsid*, RNP) ili samo nukleokapsida, a sastoji se od nukleoproteina (NP za MuV, odnosno N za MeV) koji ostvaruje interakciju s genomskom RNA, a preko fosfoproteina (P)

stupa u interakciju i s RNA-ovisnom RNA-polimerazom (engl. *RNA-dependent RNA-polymerase*, RdRp ili *large protein*, L). Ovakva RNP je povezana s proteinom matriksa (engl. *matrix protein*, M) koji se nalazi direktno ispod lipidne ovojnice virusa (slika 1)¹⁷⁻²⁰.

U lipidnoj ovojnici MuV-a i MeV-a nalaze se dva tipa glikoproteina: tzv. proteini za vezanje virusa na površinu stanice (engl. *attachment proteins*) – hemaglutinin – neuraminidaza (HN) kod MuV-a i hemaglutinin (H) kod MeV-a. Drugi tip glikoproteina je tzv. fuzijski protein (engl. *fusion protein*, F) koji je odgovoran za fuziju virusne ovojnice i stanične membrane²¹. Protein F sintetizira se u obliku neaktivnog prekursora F₀. Nakon njegovog cijepanja staničnom proteazom furinom, koja prepoznaje aminokiselinski motiv RRHKKR, nastaje biološki aktivna forma proteina koja se sastoji od fragmenata F₁ i F₂ povezanih disulfidnim mostovima^{11,13}.

Prilikom transkripcije gena za protein P, polimeraza L može dati tri različita transkripta mRNA. Kod MuV-a najduži transkript nastaje prepisivanjem cijelog gena, a služi za sintezu proteina P, dok kraći transkripti, koji služe za sintezu proteina V i I, nastaju umetanjem jednog ili više nukleotida G na specifičnom mjestu u mRNA. Kod MeV-a prepisivanje gena u cijeloj dužini također daje transkript za protein P, dok kraći transkripti nastaju umetanjem nukleotida G na specifično mjesto u mRNA za protein V ili korištenjem drugog inicijatorskog metioninskog kodona za protein C^{13,22,23}. V i I odnosno V i C smatraju se nestrukturim proteinima virusa, a u nekim uvjetima nisu neophodni za njihovu replikaciju²⁴⁻²⁷. Protein V iz MuV-a te proteini V i C iz MeV-a pomažu virusima u izbjegavanju imunološkog odgovora domaćina time što blokiraju staničnu signalizaciju posredovanu interferonom²⁷⁻³¹. Uloga proteina I kod MuV-a još nije razjašnjena, a njegova prisutnost je za sad potvrđena samo u inficiranim stanicama²².

Genom MuV-a dodatno kodira za mali hidrofobni protein (engl. *small hydrophobic protein*, SH) čija funkcija još uvijek nije razjašnjena, iako postoje indikacije da također potpomaže infekciju, odnosno virusu omogućava izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina time što blokira signaliziranje pomoću faktora TNF- α (engl. *tumor necrosis factor α*)³².

Proteinski sastav virusnih čestica MuV-a i MeV-a uglavnom je istraživani 1970-ih i 1980-ih godina³³⁻⁴⁵, prije razvoja spektrometrije masa (engl. *mass spectrometry*, MS) kao danas najmoćnije metode u identifikaciji proteina⁴⁶. Ta istraživanja u pravilu su se oslanjala na elektroforetske metode za određivanje molekulskih masa proteina, u kombinaciji s obilježavanjem novosintetiziranih proteina radioaktivnim aminokiselinama (smjese aminokiselina obilježene izotopom ¹⁴C, ³H-leucinom ili ³⁵S-metioninom) te detekcijom

virusnih glikoproteina pomoću ³H-glukoamina. U većini slučajeva, nađeno je da virusne čestice sadrže maksimalno 6 virusnih proteina – u svim istraživanjima detektirani su HN/H, P, NP/N, M i F, dok je u nekima pronađen i protein L^{33,35,37,41,43}. Nedavno je proteom MuV-a po prvi put istražen MS-om te je također detektirano 6 virusnih proteina, s tim da je u uzorku detektiran protein V, ali ne i F⁴⁷.

Osim virusnih proteina koji su kodirani virusnim genomom, pronađeno je da različiti virusi obavijeni lipidnom ovojnicom također sadrže HCP-e, unutar virusnih čestica, ali i u lipidnom dvosloju⁴⁸. Uloga HCP-a u virusnim česticama, kao i mehanizam njihova unošenja u virusne čestice još nisu u potpunosti razjašnjeni. Postoje indikacije da se HCP-i specifično ugrađuju u virusne čestice kroz direktne interakcije s virusnim proteinima^{49–51}, ali oni mogu biti uključeni i nespecifično⁵², pogotovo kad se radi o visoko zastupljenim citoplazmatskim proteinima jer su naprosto prisutni na mjestu sklapanja i pupanja virusne čestice. Neka istraživanja ukazuju da HCP-i mogu stabilizirati virusne proteine ili olakšati infekciju jer omogućavaju virusu izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina. Međutim, detektirani HCP-i mogu biti prisutni i kao onečišćenje koje potječe od ekstracelularnih vezikula (engl. *extracellular vesicles*, ECV) prisutnih u virusnim pripravcima^{53,54}.

Dosadašnja istraživanja virusnih proteoma otkrila su prisutnost brojnih HCP-a u virusnim pripravcima. Nađeni su proteini citoskeleta (aktin, aktin-vezujući proteini kofilin i filamin, proteini mikrotubula)^{48,49,51,55–65}, aneksini^{48,49,51,52,56,61,64,66–69}, proteini toplinskog šoka (engl. *heat shock protein*, HSP) i šaperoni (HSP70, HSP90, ciklofilin A, ubikvitin)^{48–50,55,58,60,61,63,64}, regulatorni proteini komplementa i tetraspanini (CD35, CD46, CD55, CD59, CD9, CD81)^{48,49,55,70,71}, histoni^{64,72}, proteini vezani uz translaciju (elongacijski faktori 1α i 2)^{56,63}, proteini vezani uz unutarstanični i vezikularni transport (Arf, Rab) te proteini uključeni u redoks regulaciju (tiodoksin, peroksiredoksin)⁶⁴. Nađeni su i neki proteini vezani uz glikolizu (enolaza, fosfoglicerat-kinaza, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza), a postavljena je hipoteza da ti proteini kod virusa imaju drugačije uloge od onih koje se inače smatraju njihovim glavnim funkcijama⁴⁹. Specifično za MuV i MeV, već su rana istraživanja pokazala prisutnost staničnog proteina aktina u virusnim pripravcima^{36,38,41}, dok su u novije vrijeme u uzorcima MuV-a detektirani i fibronektin, klatrin i histoni⁴⁷.

Prisutnost HCP-a u virusnim pripravcima je važna i za bazična istraživanja biologije virusa, ali i za industriju proizvodnje cjepiva jer to znači da cjepivo ne nosi samo virusne antigene, već i antigene koji potječu iz stanice domaćina, u vidu HCP-a.

2.1.2. Lipidni sastav virusnih čestica

Za razliku od proteinskog sastava virusa, koji je većim dijelom kodiran virusnom genetičkom informacijom, sastav lipidne ovojnice virusa nije ni na koji način kodiran, već virusne čestice na još nerazjašnjen način preuzimaju dijelove lipidne ovojnice iz staničnih membrana iz kojih pupaju. Istraživanja različitih virusa dala su različite rezultate – u nekim slučajevima je nađeno da sastav virusne ovojnice pokazuje veliku sličnost plazmatskoj membrani^{73,74}, dok su u drugim slučajevima uočene značajne razlike u sastavu virusne ovojnice i plazmatske membrane^{75,76}. Obzirom da velik broj obavijenih virusa pupa iz specifičnih membranskih domena kao što su lipidne splavi, to predstavlja jedno moguće objašnjenje u slučajevima kada se sastav plazmatske membrane značajno razlikuje od sastava virusne ovojnice^{77,78}. Za MuV je pokazano i da lipidni sastav virusne ovojnice značajno ovisi vrsti stanica iz kojih pupa, tj. o lipidnom sastavu njihovih membrana, kada se za proizvodnju virusa koriste različite vrste stanica, primjerice stanice Vero i stanice pilećih fibroblasta (engl. *chicken embryo fibroblast*, CEF)⁴⁷.

Prisutnost ECV-a u virusnim pripravcima ne utječe samo na njihov proteinski, već može utjecati i na lipidni sastav zbog čega njihova prisutnost ne bi smjela biti zanemarena niti prilikom istraživanja lipidnog sastava virusa. Ovojnice ECV-a često su obogaćene lipidima prisutnima u lipidnim splavima, bilo zato što ove čestice pupaju iz ovakvih domena ili sudjeluju u sortiranju i transportu staničnih proteina vezanih uz njih⁷⁹⁻⁸¹, što utječe na lipidni sastav virusnih pripravaka ukoliko oni sadrže ECV-e.

2.2. Heterogenost virusnih suspenzija

Virusne suspenzije su vrlo heterogene, genetski i strukturno^{82,83}. Obzirom na relativno nisku točnost (engl. *fidelity*) RNA-ovisnih RNA polimeraza uslijed minimalnih mehanizama za provjeru odnosno popravak pogreške (engl. *proofreading activity*), stopa mutacija u genomima RNA virusa iznosi oko 10^{-4} mutacija po nukleotidu. To znači da populacije RNA virusa uvijek postoje kao skupine (engl. *swarms*) sličnih varijanti virusa čija se sekvenca genomske RNA može razlikovati od tzv. konsenzus-sekvence (engl. *consensus, master sequence*).

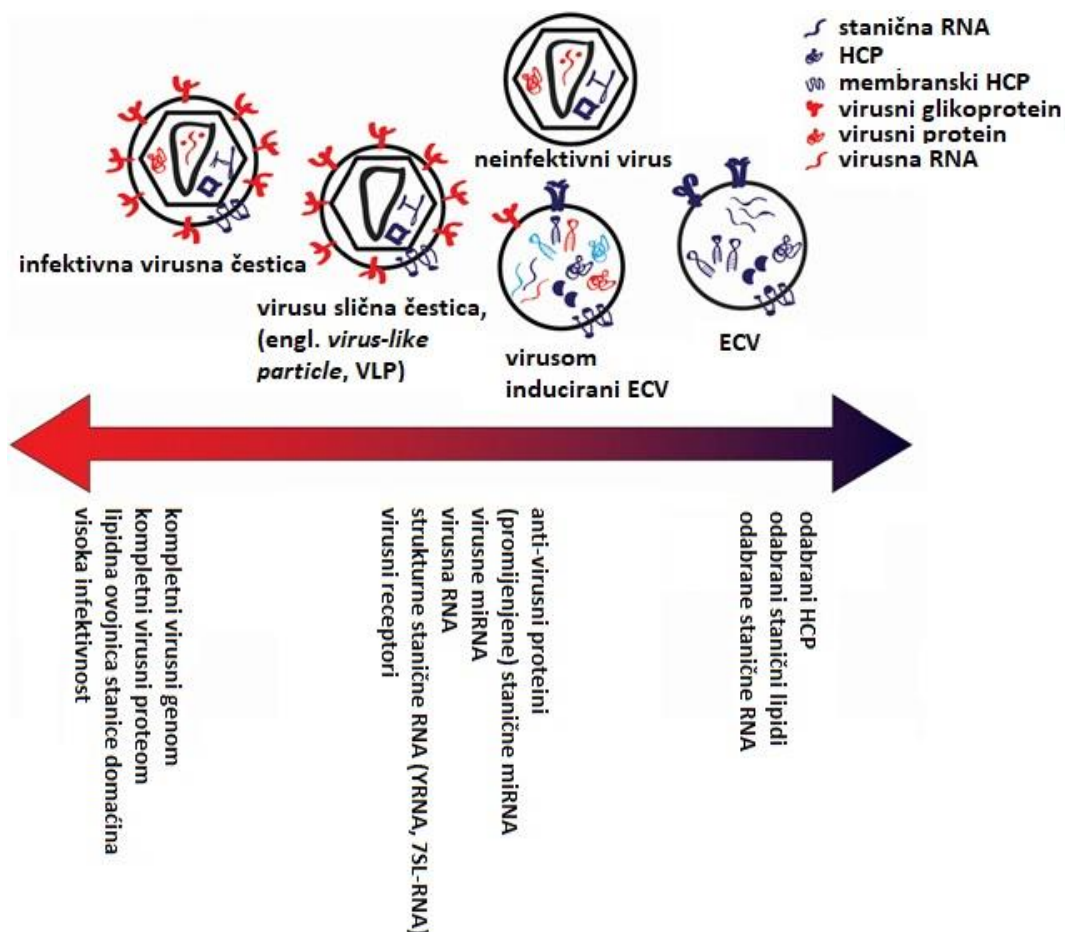
Uz to, virusna suspenzija, osim cjelovitih i ispravno strukturiranih virusnih čestica koje su sposobne inficirati stanice, sadrži i različite krnje, neinfektivne virusne čestice. To mogu biti neobavijene ribonukleokapside, prazne virusne ovojnice, agregati virusnih čestica ili defektne interferirajuće čestice (engl. *defective interfering particles*, DIP)^{9,83}. Neke od tih čestica, iako su same po sebi neinfektivne, mogu imati biološku funkciju pa tako primjerice DIP pokazuju

negativan utjecaj na replikaciju infektivnog virusa, a pokazano je i da smanjuju neurovirulentnost divljeg tipa MuV-a⁸³.

Različite vrste neinfektivnih čestica prisutnih u virusnim suspenzijama u pravilu se smatraju nečistoćama, a zbog njihove sličnosti s cjelovitim infektivnim virusnim česticama u pravilu ih je vrlo teško odvojiti⁹. Ovisno o metodama korištenima za kvantifikaciju ukupnih i infektivnih čestica u uzorku te o vrsti virusa, istraživanja su pokazala da njihov omjer može varirati od 10:1 do čak 10 000:1⁸⁴⁻⁸⁶. Valja uzeti u obzir da se u neinfektivne čestice pritom ubrajaju i ECV-i i različite krnje virusne čestice, što pokazuje da heterogenost virusnih suspenzija predstavlja veliku komplikaciju, primjerice pri istraživanju proteoma i lipidoma virusa, ali i općenito u istraživanju odnosa strukture i funkcije virusnih čestica. Zbog toga se aktivno istražuju potencijalne nove metode i pristupi koji bi omogućili dobivanje homogene suspenzije cjelovitih, infektivnih virusnih čestica prikladne za temeljna istraživanja, ali i medicinsku primjenu.

Kao što je spomenuto, ECV-i utječu na omjer ukupnih i infektivnih čestica u virusnim suspenzijama. ECV-i su čestice koje proizvode praktički sve vrste stanica, veličine su 30 - 1000 nm, obavijene lipidnom ovojnicom, a osim proteina sadržavaju i nukleinske kiseline (DNA, RNA)⁸⁷⁻⁸⁹. ECV-i, kao i virusi s lipidnom ovojnicom koriste slične mehanizme za izlazak iz stanice, slični su u svom lipidnom sastavu (bogat glikosfingolipidima i kolesterolom), ali i veličini te gustoći zbog čega razdvajanje centrifugiranjem u gradijentu gustoće ne osigurava odvajanje ECV-a od obavijenih virusa. Drugi problem predstavlja nepostojanje jasne granice između virusa, različitih vrsta neinfektivnih virusnih čestica i ECV-a koje stanice proizvode za vrijeme infekcije (slika 2), zbog čega njihovo odvajanje niti detekcija nije osigurano niti metodama koje prate molekule specifične za pojedine čestice (npr. virusni proteini za virusne čestice, odnosno acetilkolinesteraza ili receptor CD45 kao markeri za ECV-e)⁸⁷. Iz toga slijedi da je svaki virusni pripravak zapravo smjesa ECV-a i virusnih čestica. U literaturi su opisani neki pokušaji dobivanja virusnih pripravaka bez ECV-a. Jedan pristup je korištenje kuglica na čiju su površinu vezana antitijela specifična za receptor CD45, što omogućava imunoafinitetno uklanjanje čestica koje nose navedeni receptor na svojoj površini iz uzorka (engl. *immunoaffinity depletion*). Drugi pristup je tretiranje uzorka proteazama zbog uklanjanja površinskih proteina prije ultracentrifugiranja u gradijentu gustoće, što bi trebalo ECV-e učiniti lakšima od virusnih čestica i time spriječiti njihovo supročišćavanje s virusima^{49,52}. Unatoč tome, prisutnost ECV-a u virusnim pripravcima još je uvijek često zanemarena u istraživanjima

virusnih proteoma ili su oni spomenuti tek kao manja kontaminacija⁵⁵. Uzrok tome su vjerojatno spomenuti problemi odvajanja ECV-a i obavijenih virusa u kombinaciji s nedovoljnom svijesti o činjenici da se oba tipa čestica istovremeno luče iz stanica za vrijeme infekcije.



Slika 2. Strukturne sličnosti obavijenih virusa i ECV-a (preuzeto i prilagođeno iz E. Nolte-t Hoen i sur., *Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives?*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113** (2016) 9155–9161).

2.3. Stabilnost virusnih čestica

MuV i MeV važni su, osim za temeljna istraživanja biologije virusa, i za terapijske svrhe. Njihova najpoznatija primjena je u pripremi živog atenuiranog virusnog cjepiva (engl. *live attenuated viral vaccine*), a u novije vrijeme dobivaju na važnosti kao potencijalni lijekovi u onkolitičkoj viroterapiji^{3,6}. Za obje primjene ključno je da virusi prilikom proizvodnje i pročišćavanja zadrže visoku infektivnost.

Virusne čestice predstavljaju složene makromolekulske komplekse koji su zbog svoje veličine i složenosti vrlo osjetljivi. Obzirom da svaki postupak pročišćavanja predstavlja

određeni stres za virusne čestice te može dovesti do smanjenja infektivnosti, važno je praćenje i poznavanje stabilnosti virusa pri uvjetima korištenim tijekom pročišćavanja jer to omogućava najveći prinos infektivnog virusa^{8,9}. Poznato je da su virusi osjetljivi na promjenu pH vrijednosti, povišenu temperaturu, ali i na sastav otopine u kojoj se nalaze (šećeri, soli, aminokiseline, itd.).

Na stabilnost virusa u različitim uvjetima može utjecati i vrsta stanica koje su korištene za uzgoj virusa. Naime, budući da lipidna ovojnica MuV-a i MeV-a potječe od stanice domaćina, kod MuV-a i MeV-a proizvedenih na različitim vrstama stanica ona će se razlikovati po svom lipidnom sastavu, ali i po sastavu prisutnih membranskih HCP-a što može utjecati na svojstva virusa. Primjerice, MuV i MeV proizvedeni na različitim vrstama stanica mogu pokazivati različitu ovisnost infektivnosti o pH vrijednosti, različitu temperaturnu stabilnost ili biti skloniji agregaciji ili nekoj drugoj strukturnoj promjeni. Slično, stabilnost virusa može varirati i u ovisnosti o tome koji virusni soj je korišten u istraživanju⁹⁰. Sve ovo potvrđuju i do sada opisana istraživanja stabilnosti MeV-a⁹⁰⁻⁹⁶ i MuV-a⁹⁷⁻⁹⁹.

Istraživanje stabilnosti virusa iznimno je važno u proizvodnji cjepiva jer očuvanje infektivnosti virusa za vrijeme proizvodnje i pročišćavanja povećava prinos infektivnog virusa čime se smanjuju troškovi proizvodnje. Pronalaženje prikladne formulacije koja osigurava stabilnost cjepiva za vrijeme skladištenja, pogotovo pri povišenim temperaturama, pak smanjuje troškove skladištenja i omogućava lakšu distribuciju cjepiva u dijelovima svijeta gdje je vrlo teško ili nemoguće osigurati čuvanje cjepiva pri niskim temperaturama^{90,95}.

2.4. Pročišćavanje i koncentriranje virusnih čestica

Visoka čistoća i koncentracija virusnih pripravaka važne su za temeljna istraživanja, a pogotovo za medicinsku primjenu virusnih čestica. S napretkom u uzgoju i proizvodnji virusa (engl. *upstream processing*), koji rezultira velikim količinama virusa, usko grlo u proizvodnji pomaknulo se prema metodama pročišćavanja i koncentriranja virusnih čestica (engl. *downstream processing*, DSP)⁸.

Glavni cilj DSP-a je uklanjanje različitih nečistoća iz virusnih pripravaka, a koje mogu potjecati od samog procesa proizvodnje i pročišćavanja – iz staničnih kultura odnosno reagensa i aditiva (npr. albumin, antibiotici), od stanica na kojima se virusi proizvode (npr. HCP-i, nukleinske kiseline, proteoglikani, glikozaminoglikani, ECV-i), od instrumenata i pribora koji

se koriste (engl. *extractables*, *leachables*) ili od samih virusa (npr. agregati, gole nukleokapside, prazne virusne ovojnice, DIP)^{8,9}.

Virusne čestice razlikuju se po svojoj veličini, obliku, sastavu i površinskim strukturama. Površina virusnih čestica određuje njihova specifična fizikalno-kemijska svojstva kao što su količina i raspodjela naboja, raspodjela hidrofobnih aminokiselina, prisutnost glikana zbog posttranslacijskih modifikacija, itd. Te karakteristike, kao i izoelektrična točka virusa (pI), postojanje lipidne ovojnice i općenito stabilnost čestica, utječu na odabir i uspješnost metoda pročišćavanja^{8,9}.

Obzirom na stroge zahtjeve za čistoću virusnih pripravaka koje postavljaju regulatorne agencije, i na složenost virusnih čestica, zadovoljavajuća čistoća virusnih pripravaka može se postići tek kombinacijom više metoda. Najčešće se koriste ultracentrifugiranje, ultrafiltracija i dijafiltracija te kromatografske metode, odnosno njihove kombinacije.

2.4.1. Ultracentrifugiranje

Za pročišćavanje i koncentriranje virusa na laboratorijskoj skali često se koristi ultracentrifugiranje (UC), ali ono u pravilu nije primjenjivo na industrijskoj skali zbog ograničenih volumena koji se mogu procesirati^{8,10,100}.

Prednost UC-a je relativno brzo i lako koncentriranje virusnih čestica u jednom koraku i to čak do 100 puta, a centrifugiranje u gradijentu gustoće omogućava odvajanje praznih nukleokapsida od cjelovitih virusnih čestica^{8,9,100}.

Glavni nedostatak UC-a je taj da se infektivnost koncentriranog virusa ne povećava proporcionalno s faktorom koncentracije, najvjerojatnije zbog dugog vremena procesiranja, ali i jakih sila kojima su virusne čestice izložene prilikom UC-a^{8-10,100,101}. Iako UC u gradijentu gustoće može dati nešto čišći virusni pripravak od UC-a u jednom koraku, niti jedna od metoda ne isključuje supročišćavanje čestica slične gustoće kao što su ECV-i. Dodatni problem je što mediji korišteni za postizanje gradijenta gustoće, kao što su cezijev klorid i saharoza, stvaraju hiperosmotske uvjete koji mogu imati negativan utjecaj na infektivnost virusnih čestica. Uz to, visoka viskoznost saharoznih otopina povezuje se i s gubitkom strukture površinskih virusnih proteina što također uzrokuje pad infektivnosti^{10,102}.

UC se danas često koristi za koncentriranje i pročišćavanje retrovirusnih i lentivirusnih vektora, uz prinose koji variraju u rasponu 50 – 100%¹⁰³⁻¹⁰⁶. Jedini izvještaj o pokušaju pročišćavanja MeV-a UC-om navodi da je iskorištenje iznosilo svega 2% virusa (određeno

testom hemaglutinacije), što potvrđuje da ova metoda može ozbiljno narušiti infektivnost virusnih čestica¹⁰⁷.

2.4.2. Ultrafiltracija i dijafiltracija

Ultrafiltracija (UF) i dijafiltracija (DF) se često koriste kao alternativne metode koncentriranja virusnih čestica^{8-10,84}. UF predstavlja koncentriranje virusnih čestica u samo jednom koraku, bez izmjene pufera, dok DF podrazumijeva ispiranje, odnosno izmjenu pufera u kojem se nalaze virusne čestice (ili neke druge makromolekule). Stoga je DF-om moguće ukloniti ili zamijeniti soli ili neke druge aditive prisutne u početnim mediju⁸. UF i DF se često koriste za koncentriranje ili izmjenu pufera u virusnim suspenzijama prije kromatografskih pročišćavanja.

Ukoliko se koriste membrane većih pora, UF i DF se mogu koristiti za djelomično pročišćavanje virusnih čestica obzirom da manje nečistoće, poput slobodnih proteina koji su prisutni kao onečišćenja u uzorku, mogu proći u permeat, dok će virusne čestice zaostati u retentatu. Nađeno je da virusni pripravci pročišćeni DF-om pokazuju veću čistoću, a u nekim slučajevima je nađeno i da virusni proteini pokazuju bolju aktivnost nakon pročišćavanja virusa DF-om, najvjerojatnije jer je iz virusne suspenzije uklonjen inhibitor aktivnosti virusnih proteina^{10,106,108}.

Prilikom korištenja membrana s većim porama za procesiranje virusnih suspenzija UF-om ili DF-om potrebno je paziti da veličina pora membrane bude manja od virusnih čestica, u protivnom može doći do zarobljavanja virusa unutar pora što rezultira smanjenim prinosom infektivnog virusa^{10,102}. Upravo je zarobljavanje nečistoća u porama membrane (engl. *membrane fouling*) glavni nedostatak UF-a i DF-a jer ograničava volumen koji je moguće procesirati na membrani, a potrebno je i praćenje odnosno reguliranje tlaka koji pritom nastaje na membrani kako uslijed njegove pojave ne bi došlo do gubitka infektivnih virusnih čestica^{9,10}.

Prednosti UF-a i DF-a pred UC-om su jeftinija oprema, kraće vrijeme procesiranja, mogućnost primjene na industrijskoj skali i relativno blagi uvjeti procesiranja virusnih čestica⁸⁻¹⁰.

Pročišćavanje i koncentriranje virusa UF-om ili DF-om rezultira prinosima između 20 – 96%, ovisno o korištenom virusu te metodi koja je korištena za kvantifikaciju infektivnih virusnih čestica¹⁰⁹⁻¹¹⁷. Usporedba rezultata dobivenih za pročišćavanje lentivirusnog vektora UC-om i UF-om pokazala je da je infektivnost virusnog vektora bolje očuvana prilikom pročišćavanja UF-om, kao i da takvi pripravci pokazuju nižu citotoksičnost⁸⁴.

2.4.3. Kromatografsko pročišćavanje virusa

Kromatografske metode pročišćavanja virusa omogućavaju brzo, ponovljivo i učinkovito odvajanje različitih biomakromolekula i virusa, a prikladne su za upotrebu na industrijskoj skali zbog čega danas sve više dobivaju na važnosti¹⁰.

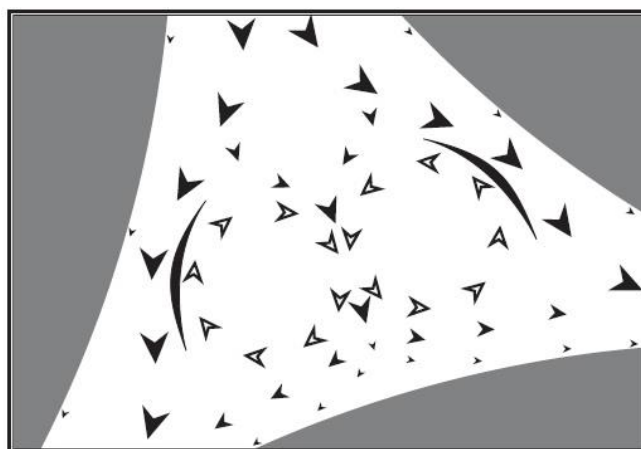
Za pročišćavanje virusa mogu se koristiti stacionarne faze u obliku pakiranih kolona s poroznim zrcima (engl. *porous particle-based media*), adsorpcijskih membrana (engl. *membrane adsorbers*) ili monolitnih kolona (engl. *monoliths*)^{8,118}. Iako se kolone s poroznim zrcima često koriste i vrlo su učinkovite za pročišćavanje malih molekula i proteina, imaju dva glavna nedostatka prilikom pročišćavanja virusa: (1) veličina pora u pravilu nije dovoljno velika za difuziju virusnih čestica kroz njih što rezultira niskim veznim kapacitetom takvih kolona i (2) ograničeni protok zbog visokog tlaka⁸. Osim toga, prolazak pufera kroz prostor između zrnaca punila kolone stvara vrtloge (engl. *eddies*) koji doprinose širenju pikova u kromatogramu, a stvaraju se i zone sa suprotnim smjerovima protoka (engl. *counter current flow*) u kojima su virusne čestice izložene snažnim silama (engl. *shear forces*) koje mogu narušiti njihovu infektivnost (slika 3)¹¹⁸.

Za razliku od toga, monolitne kolone sastoje se od jednog bloka punila, a karakterizira ih mreža kanala koja izgledom može podsjećati na spužvu (slika 4)¹¹⁸. U monolitnim kolonama prijenos mase odvija se konvekcijom, a ne difuzijom kao kod kolona punjenih zrcima, zbog čega monolitne kolone pokazuju visok dinamički vezni kapacitet za makromolekule i dobro razlučivanje i pri visokim brzinama protoka. Kod monolita ne dolazi do pojave vrtloga zbog čega makromolekule eluiraju u oštrijim, koncentriranijim pikovima. Zbog toga, kao i zbog visoke poroznosti monolita, a slijedom toga i niskog tlaka za vrijeme kromatografije, smanjuje se rizik od oštećenja virusnih čestica zbog čega se monolitne kolone sve češće koriste u pročišćavanju virusa^{119–122}, pogotovo za proizvodnju živih atenuiranih virusnih cjepiva¹¹⁸.

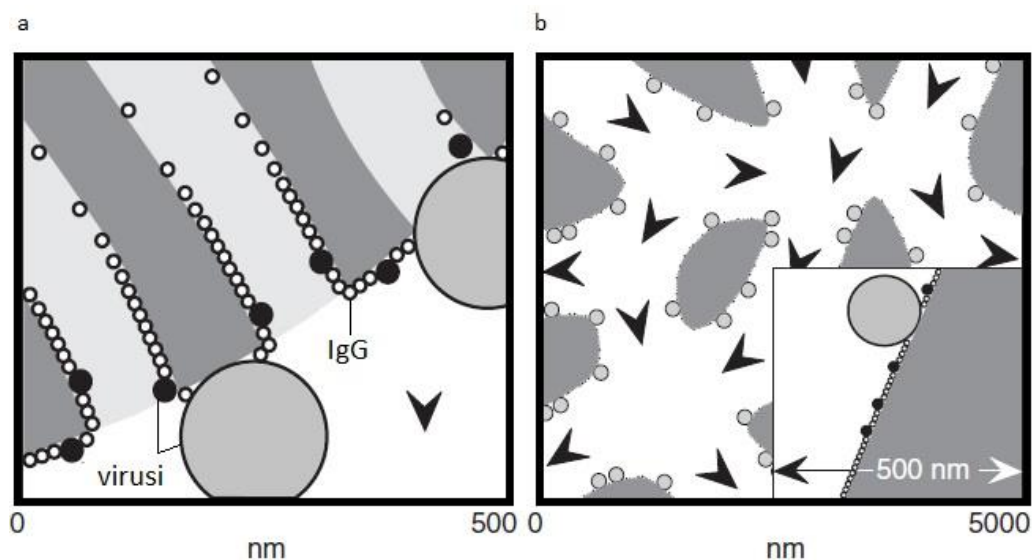
Adsorpcijske membrane su slične monolitnim kolonama, proizvedene su od jednog komada materijala i također imaju velike kanale, iako nešto manje od monolitnih kolona. U pravilu imaju niži kapacitet i slabiju razlučivost zbog čega se rjeđe koriste^{8,118}.

Za pročišćavanje virusa najčešće se koriste kromatografija hidrofobnih interakcija (engl. *hydrophobic interaction chromatography*, HIC), kromatografija ionske izmjene (engl. *ion-exchange chromatography*, IEX), afinitetna i imunoafinitetna kromatografija (engl. *affinity chromatography*, AC; *immunoaffinity chromatography*, IAC), multimodalna kromatografija

(engl. *mixed mode, multimodal chromatography*) i kromatografija isključenjem po veličini (engl. *size exclusion chromatography, SEC*) odnosno gel-filtracija.



Slika 3. Vrtlog (engl. *eddy*) nastaje uslijed protoka pufera između zrnaca punila kolone. Siva područja predstavljaju punilo, a bijela prostor između zrnaca. Strelice pokazuju smjer protoka pri čemu crne pokazuju smjer primarnog protoka pufera, a bijele vrtložni protok. Dvije crne linije pokazuju zone u kojima nastaju jake sile koje mogu oštetiti virusne čestice. Preuzeto i prilagođeno iz P. Gagnon, *Chromatographic purification of virus particles*, u M. C. Flickinger (ur.) *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, Wiley, New Jersey, 2010, str. 1-21.



Slika 4. Prikaz punila kolone s poroznim zrcima (a) i monolitne kolone (b). Veličina kanala u monolitnoj koloni je mnogo veća od pora na zrcima punjenih kolona što omogućava lakši prolaz virusnim česticama. Siva područja predstavljaju punilo, a bijela slobodan prostor. Strelice pokazuju smjer protoka. Preuzeto i prilagođeno iz P. Gagnon, *Chromatographic purification of Virus Particles*, u M. C. Flickinger (ur.) *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, Wiley, New Jersey, 2010, str. 1-21.

2.4.3.1. Kromatografija isključenjem po veličini (SEC)

SEC ima široku primjenu u pročišćavanju virusa jer se može primijeniti za sve viruse, a omogućava iznimno dobro odvajanje virusa od slobodnih proteina, fragmenata DNA i ostalih malih molekula. SEC podržava korištenje različitih pufera što u pravilu omogućava odabir onog pufera koji osigurava najbolju stabilnost virusnih čestica ili izmjenu pufera u neki povoljniji za konačni pripravak virusa¹¹⁸. Za razliku od ostalih kromatografskih metoda, SEC se nužno izvodi na kolonama punjenim poroznim zrcima.

Kolone koje se inače koriste za pročišćavanje proteina SEC-om zapravo su efikasnije za pročišćavanje virusa nego proteina. Budući da je cilj SEC-a pri pročišćavanju virusa samo odvojiti molekule koje ulaze u čestice punila kolone od virusa koji eluiraju u praznom volumenu kolone, moguće je koristiti kraće kolone jer takvo odvajanje nije toliko osjetljivo na visinu stupca. U praksi se za pročišćavanje virusa SEC-om koriste kolone s najvećom veličinom pora na zrcima, a koje su još uvijek manje od virusnih čestica jer omogućavaju najbolje odvajanje manjih molekula od virusa. I dok prilikom pročišćavanja proteina maksimalni volumen koji se može injektirati na kolonu iznosi do 5% volumena stupca, pri pročišćavanju virusa teoretski je moguće na kolonu injektirati količinu virusa koja odgovara čak do 40% volumena stupca, iako se to u praksi rijetko koristi kako bi se dobilo što bolje odvajanje virusa od ostalih molekula^{9,118}.

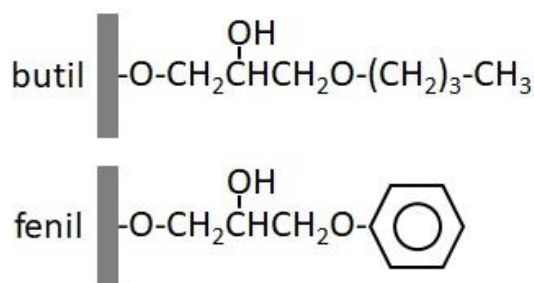
Nedostaci SEC-a su razrjeđivanje uzorka, relativno niski kapacitet i relativno niske brzine protoka⁹. Uz to, SEC ne omogućava odvajanje virusnih čestica po veličini, odnosno nije moguće odvojiti cjelovite virusne čestice od manjih (npr. neobavijenih kapsida) ili većih (npr. virusnih agregata)¹¹⁸. Osim toga, iako bi idealno punilo kolone za SEC trebalo biti potpuno inertno, to nije uvijek tako. Punila su često blago hidrofobna, mogu sadržavati nabijene skupine ili mnogo hidroksilnih skupina što može dovesti do vezanja virusa na punilo kolone zbog čega dio virusa više ne eluira u praznom volumenu kolone. S druge strane, elektrostatske interakcije stacionarne faze s nabijenim molekulama u virusnoj suspenziji mogu rezultirati elucijom dijela takvih molekula u praznom volumenu.

SEC se ipak vrlo često koristi kao završni korak u pročišćavanju virusa (engl. *polishing step*)^{8,10}.

2.4.3.2. Kromatografija hidrofobnih interakcija (HIC)

HIC se temelji na interakciji hidrofobnog liganda vezanog na stacionarnu fazu kolone s hidrofobnim dijelovima makromolekula odnosno virusa¹²³. Kao ligandi se najčešće koriste

fenilni i butilni ligandi (slika 5), pri čemu fenilni ligandi bolje vežu proteine s aromatskim aminokiselinama, a butilni s alifatskim¹¹⁸. Oba liganda mogu uzrokovati jako vezanje hidrofobnih makromolekula na stacionarnu fazu što u konačnici može rezultirati denaturacijom proteina^{9,118,123}.



Slika 5. Fenilni i butilni ligandi vezani na stacionarnu fazu u HIC-u.

Relativno nedavno razvijen je novi oblik liganda za HIC koji je trenutno dostupan samo u obliku monolitne kolone, komercijalnog naziva CIM OH¹²⁴. Ovakav ligand nastaje hidrolizom epoksi-skupina koje su vezane na polimetakrilatni nosač, a vezanje proteina odnosno virusa na ovakav ligand je slabije nego u slučaju fenilnih i butilnih liganada što rezultira lakšom elucijom i općenito povoljnijim uvjetima za pročišćavanje makromolekula.

Hidrofobne interakcije izraženije su u prisutnosti soli zbog čega se vezanje na kolone odvija pri relativno visokim koncentracijama soli. Najčešće se u puferu za vezanje koristi 1 – 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dok se elucija postiže smanjenjem koncentracije soli u elucijskom puferu¹¹⁸.

Nedostatak korištenja $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je moguće nastajanje amonijaka pri alkalnom pH, odnosno potencijalni problem precizne kontrole pH otopine. Kao zamjena mogu se koristiti K_3PO_4 , Na_2SO_4 i natrijev citrat, soli koje također snažno potiču hidrofobne interakcije. Problem ovih soli je što mogu izazvati taloženje virusa i proteina zbog čega se ponekad koristi NaCl, ali on slabo potiče hidrofobne interakcije zbog čega su potrebne još više koncentracije soli (2 – 3 mol/L).

Nedostatak HIC-a je osjetljivost virusa i proteina na visoke koncentracije soli, ali unatoč tome ova metoda je svejedno uspješno korištena za pročišćavanje nekih virusa s iskorištenjima od 25 – 89%, ovisno o vrsti virusa i kolone^{121,125,126}. Posebna prednost HIC-a je uspješno uklanjanje genomske DNA obzirom da se dvolančane nukleinske kiseline slabo vežu na hidrofobnu stacionarnu fazu^{9,126,127}.

2.4.3.3. Kromatografija ionske izmjene (IEX)

IEX je danas najčešće korištena metoda za kromatografsko pročišćavanje virusa¹¹⁸. Moguće je pročišćavanje na anionskim izmjenjivačima (engl. *anion-exchange chromatography*, AEX) koji vežu negativno nabijene molekule ili kationskim izmjenjivačima (engl. *cation-exchange chromatography*, CEX) koji vežu pozitivno nabijene molekule. Izmjenjivači se mogu podijeliti na jake i slabe, pa tako kvaterni amini (engl. *quaternary amine*, QA) spadaju u skupinu jakih anionskih izmjenjivača, dok dietilaminoetil (DEAE) spada u kategoriju slabih anionskih izmjenjivača. Najčešće korišteni kationski izmjenjivači su sulfonatni ligandi (SO₃) kao predstavnik jakih kationskih izmjenjivača, odnosno karboksimetil (CM) kao predstavnik slabih. Prednost se u pravilu daje jakim izmjenjivačima jer nisu toliko osjetljivi na male promjene u pH vrijednostima što ih čini stabilnijima u pogledu kapaciteta i selektivnosti.

U teoriji, makromolekule se vežu na anionske izmjenjivače pri pH vrijednostima koje su više od jedne pH jedinice iznad njihovog pI, dok se na kationske izmjenjivače vežu pri pH vrijednostima nižim od pI, ali vezanje na ionske izmjenjivače može znatno ovisiti o raspodjeli naboja na površini makromolekula¹¹⁸.

Elucija s ionskih izmjenjivača može se postići promjenom pH u elucijskom puferu ili povećanjem ionske jakosti elucijskog pufera. Drugi način se češće koristi, ali i promjena pH i dodatak soli mogu narušiti infektivnost virusa zbog čega je potrebno pažljivo praćenje procesa⁹.

Nedostatak IEX-a je relativno niska specifičnost, odnosno često dolazi do supročišćavanja stanične DNA (osobito ako se koristi AEX) i HCP-a koji se pri korištenim uvjetima mogu vezati na ionske izmjenjivače⁹. Korištenje linearnog ili stupnjevitog gradijenta za eluciju može djelomično poboljšati odvajanje virusa od takvih nečistoća.

Pročišćavanje virusa korištenjem IEX-a na monolitnim kolonama dosad se pokazalo vrlo uspješnim, s iskorištenjima od 15 do 100%, ovisno o virusu^{120,128–133}. Pritom su najbolji rezultati u pravilu bili dobiveni pročišćavanjem AEX-om, dok je pročišćavanje CEX-om davalo nešto lošije prinose.

2.4.3.4. Afinitetna (AC) i imunoafinitetna kromatografija (IAC)

AC se bazira na specifičnoj, reverzibilnoj adsorpciji makromolekula i virusa na ligand koji je imobiliziran na stacionarnoj fazi. U slučaju IAC-a, taj ligand je antitijelo koje prepoznaje željeni antigen^{9,118}. Prednost AC-a i IAC-a je visoko učinkovito pročišćavanje i koncentriranje željene makromolekule ili virusa u jednom koraku.

Elucija u AC-u može biti specifična ili nespecifična¹³⁴. Specifična elucija je blaga metoda elucije, a temelji se na dodatku određenog liganda u elucijski pufer koji kompetira za vezanje na imobilizirani ligand ili makromolekulu odnosno virus. Specifična elucija u pravilu nije dostupna za IAC. Nespecifična elucija se temelji na slabljenju interakcija između liganda i vezane makromolekule ili virusa. Slabljenje interakcija u pravilu se postiže promjenom pH, a ponekad i promjenom ionske jakosti ili polarnosti eluenta. Ovisno o jakosti interakcija, potrebno je koristiti pufer izrazito niske pH vrijednosti (pH 1-3), kaotropne soli koje sadrže SCN⁻, CF₃COO⁻, ClO₄⁻, I⁻ ili Cl⁻ pri visokim koncentracijama (1,5 – 8 mol/L), a ponekad čak i denaturirajuće reagens (urea, gvanidin hidroklorid)^{118,134-136} što je problematično jer ovakvi uvjeti mogu uzrokovati denaturaciju proteina, odnosno drastično narušiti infektivnost virusa, a mogu oštetiti i samu (imuno)afinitetnu kolonu odnosno imobilizirano antitijelo.

Najčešće se za nespecifičnu eluciju u AC-u i IAC-u koriste upravo puferi niskog pH, ali je pokazano da oni mogu uzrokovati konformacijske promjene, denaturaciju i agregaciju proteina zbog čega se istražuju mogućnosti elucije pri nešto višim pH vrijednostima (oko pH 4)^{118,137}. Pokazano je da dodatak Arg ili njegovih derivata u elucijski pufer može omogućiti dobru eluciju u AC-u oko pH 4, dok to nije slučaj za druge aminokiseline pri tim uvjetima^{138,139}. Pokazano je da Arg smanjuje nespecifične interakcije među proteinima, djeluje kao supresor agregacije, a suzbija i nespecifično vezanje proteina na stacionarnu fazu kolona u SEC-u¹⁴⁰⁻¹⁴⁴. Arg interagira s polarnim, aromatskim i nabijenim aminokiselinama, može stvarati vodikove veze i s pozitivno i negativno nabijenim aminokiselinama, ostvaruje kation- π interakcije s aromatskim aminokiselinskim ograncima, a gvanidinska skupina oslabljuje hidrofobne interakcije^{118,145}. Korištenje Arg u IAC-u za pročišćavanje virusa može predstavljati problem zbog osjetljivosti virusa na povišene koncentracije Arg^{146,147}.

Metode AC-a za pročišćavanje virusa uključuju pročišćavanje virusa na heparinskim i lektinskim kolonama, pročišćavanje na imobiliziranom metalnom ionu (engl. *immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) koje se koristi za pročišćavanje virusnih vektora koji nose histidinski privjesak (engl. *His-tag*) i pročišćavanje biotiniziranih virusnih vektora na streptavidinu, s prinosima virusa od 16 do 97%^{9,10,148,149}. Opisano je i pročišćavanje MeV-a IAC-om uz prinos od praktički 100% kad je količina virusa mjerena testom hemaglutinacije, međutim ovaj test ne potvrđuje infektivnost virusnih čestica, već samo njihovu prisutnost u uzorku¹⁰⁷.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Acetonitril (ACN) (*Merck*), α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (HCCA) (*Sigma*), agarozna (*Bethesda Research Laboratories*), amonijak (NH_3) (*Kemika*), amonijev hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3) (*Applichem*), amonijev sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (*Applichem*), 2-bis(2-hidroksietil)amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol (Bis-Tris) (*Sigma*), 3-((3-kolamidopropil)-dimetilamonij)-1-propansulfonat (CHAPS) (*Sigma*), ditiotreitol (DTT) (*Sigma*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Fluka*), etanol (*Merck*), fenol (*Kemika*), formaldehid (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glukoza (*Kemika*), gvanidin hidroklorid (GuHCl) (*Sigma*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (HEPES) (*Applichem*), jodoacetamid (IAA) (*Sigma*), imidazol (*Merck*), izoamilni alkohol (*Kemika*), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (*Kemika*), kalijev klorid (KCl) (*Kemika*), kalijev tiocijanat (KSCN) (*Applichem*), kloridna kiselina (HCl) (*Kemika*), kloroform (CHCl_3) (*Kemika*), limunska kiselina (*Kemika*), magnezijev sulfat (MgSO_4) (*Kemika*), maltoza (*Merck*), 2-(*N*-morfolino)-etansulfonska kiselina (MES) (*Sigma*), metanol (*Merck*), mravlja kiselina (HCOOH) (*Kemika*), 3-(*N*-morfolino)-propansulfonska kiselina (MOPS) (*Applichem*), natrijev acetat (CH_3COONa) (*Fluka*), natrijev azid (NaN_3) (*Kemika*), natrijev citrat (*Kemika*), natrijev dihidrogenfosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Sigma*), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (*Kemika*), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3) (*Kemika*), natrijev hidroksid (NaOH) (*T.T.T.*), natrijev kaprilat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COONa}$) (*Merck*), natrijev karbonat (Na_2CO_3) (*Kemika*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), natrijev perjodat (NaIO_4) (*Merck*), natrijev sulfat (Na_2SO_4) (*Kemika*), natrijev tetrahidroborat (NaBH_4) (*Sigma*), natrijev tiosulfat pentahidrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) (*Kemika*), octena kiselina (CH_3COOH) (*Kemika*), *o*-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) (*Sigma*), *p*-aminobenzojeva kiselina (*Kemika*), saharoza (*Serva*), srebrov nitrat (AgNO_3) (*Kemika*), sumporna kiselina (H_2SO_4) (*Kemika*), 2,4,6-trihidroksiacetofenon (*Sigma*), timerosal (*Sigma*), trifluoroctena kiselina (TFA, CF_3COOH) (*Sigma*), tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (*Sigma*), Tween 20 (*Serva*), urea (*Kemika*), vodikov peroksid (H_2O_2) (*Kemika*).

3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

Arginin (Arg) (*Applichem*), deoksiribonukleotidi (dNTP) (*GE Healthcare*), glicin (Gly) (*Fluka*), serin (Ser) (*Applichem*)

3.1.3. Boje

Bromfenol plavo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Sigma*), etidij bromid (*Sigma*), Sypro Orange (*Molecular Probes*), primulin (*Sigma*)

3.1.4. Enzimi, proteini

Albumin iz seruma goveda (BSA) (*Santa Cruz Biotechnology*), goveđi γ -globulin (*Sigma*), ljudski imunoglobulin G za intravensku upotrebu (hIgG) (*Imunološki zavod d.d.*), ljudski albumin iz seruma za intravensku upotrebu (HSA) (*Imunološki zavod d.d.*), *OneTaq* polimeraza (*New England BioLabs*), ovalbumin (OVA) (*Serva*), peroksidaza iz hrena (HRP) (*Sigma*), proteinaza K (*GE Healthcare*), RNAza A (*GE Healthcare*) - korištena u detekciji genomske DNA PCR-om, RNAza A (*Sigma*) - korištena u test-smjesi za SEC, tiroglobulin (*Sigma*), tripsin, svinjski (*Roche*)

3.1.5. Sastojci mikrobioloških hranjivih podloga i medija

Fetalni teleći serum, FCS (*Invitrogen*), minimalni esencijalni medij s Hankovim solima, MEM-H (*Applichem*), neomicin (*Gibco-Life Technologies*)

3.1.6. Stanične kulture i virusni sojevi

Stanice bubrega zelenog afričkog majmuna, Vero (*Europska zbirka životinjskih staničnih kultura*, engl. *European Collection of Animal Cell Culture*, ECACC), soj virusa zaušnjaka L-Zagreb (*Imunološki zavod d.d.*), soj virusa ospica Edmonston-Zagreb (*Imunološki zavod d.d.*)

3.1.7. Kromatografske kolone i punila

Monolitne CIM (engl. *convective interaction media*) kolone: *CIMmultus DEAE*, *CIMmultus QA*, *CIMmultus SO₃*, *CIMmultus OH*, *CIMac HIDA*, *CIMmultus Epoxy*, *CIM Protein G* (*Bia Separations*), kolona *TSK-GEL[®] G3000SW_{XL}* i predkolona *TSK-GEL[®] Guardcolumn* (*Tosoh Bioscience*), *HiTrap[™] MabSelect[™] Xtra* (*GE Healthcare*), Sephadex G-25 Medium (*Pharmacia*)

3.1.8. Ostali materijal

Amfoliti *ZOOM Carrier Ampholytes pH 3 – 10 (Invitrogen)*, filteri s polietersulfonskom (PES) membranom veličine pora 0,22 μm (*TPP*), filteri s polivinilidenfluoridnom (PVDF) membranom veličine pora 0,45 μm (*Millipore*), gelovi *ZOOM Strip pH 3-10 linear (Invitrogen)*, gelovi *Novex NuPAGE Bis-Tris 4 – 12% (Invitrogen)*, kalibracijski standard *Peptide calibration Mix 4 (LaserBio Labs)*, pribor *Pierce ECL Prime (Thermo Fisher Scientific)* za kemifluorescentnu detekciju imobiliziranih antitijela konjugiranih na HRP, PVDF membrana za western blot *Amersham Hybond-P (GE Healthcare)*, mikrotitarske pločice prikladne za upotrebu u qPCR instrumentima *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)*, mikrotitarske pločice za test ELISA (*Costar*), mikrotitarske pločice za test određivanja CCID_{50} (*TPP*), nastavci za pipete *Zip-Tip C₁₈ (Millipore)*, pufer *OneTaq (New England BioLabs)*, pločice *HPTLC silica gel 60 (Merck)*, pufer *NuPAGE LDS 4 \times (Invitrogen)*, pufer za prijenos na membranu *20 \times NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen)*, ultrafiltracijske jedinice s PES membranama koje propuštaju molekule molekulske mase manje od 10, 50 i 100 kDa (*Sartorius*), ultrafiltracijske jedinice s membranama od regenerirane celuloze (RC) koje propuštaju molekule molekulske mase manje od 100 kDa (*Millipore*).

3.2. Stanične kulture i proizvodnja virusa

3.2.1. Stanične kulture

Stanice Vero održavane su u mediju MEM-H uz dodatak 10% FCS-a i 50 $\mu\text{g/mL}$ neomicina.

3.2.2. Proizvodnja virusa i neinficiranih kontrola

Stanice Vero inficirane su MeV-om ili MuV-om u suspenziji uz multiplicitet infekcije (engl. *multiplicity of infection*, MOI) 0,001 za MuV odnosno 0,005 za MeV, u mediju MEM-H s 2% FCS-a, pri čemu MOI označava prosječnu količinu virusa dodanu po stanici u infekciji¹. Nakon 24 h medij je zamijenjen medijem bez dodatka FCS-a te su virusi dalje uzgajani do pojave citopatskog efekta. Supernatant inficirane stanične kulture je prvi put prikupljen četvrti dan nakon infekcije, a prikupljan je do osmog dana nakon infekcije, osim u slučaju pojave potpunog citopatskog efekta. Eventualni stanični ostaci uklonjeni su iz supernatanta centrifugiranjem 25 min pri $3000 \times g$ ili mikrofiltracijom kroz PVDF filter veličine pora 0,45 μm pomoću šprice.

Neinficirane kontrole (ECV-i) pripremljene su prikupljanjem supernatanta neinficirane kulture stanica Vero koji je potom tretiran na isti način kao supernatanti koji su sadržavali MuV ili MeV.

3.3. Određivanje koncentracije i veličine čestica

3.3.1. Određivanje koncentracije infektivnih virusnih čestica

Koncentracija infektivnih virusnih čestica određivana je testom polovične infektivne doze, CCID₅₀ (engl. *cell culture infective dose 50*) prema ranije opisanom protokolu^{150,151}.

Ukratko, pripremljena su pretpostavljena početna razrjeđenja virusa u MEM-H(N)-u te je takva otopina nanosena u drugi stupac mikrotitarske pločice s 96 jažica nakon čega je u pločici pripravljeno dodatnih 9 serijskih razrjeđenja virusa koja se razlikuju za faktor 3. U prvi i zadnji stupac mikrotitarske pločice dodan je samo medij MEM-H(N). Na isti način pripremljeni su laboratorijski referensi za MuV odnosno MeV za koje je početno razrjeđenje iznosilo 1:60 000 odnosno 1:10 000. U mikrotitarsku pločicu zatim je dodana suspenzija stanica Vero koja je sadržavala $1,6 \times 10^5$ stanica/mL za određivanje infektivnosti MuV-a, odnosno $1,2 \times 10^5$ stanica/mL za određivanje infektivnosti MeV-a. Pločice su inkubirane 7 dana pri 35 °C u atmosferi s 5% CO₂ nakon čega je zabilježena pojava citopatskog efekta u jažicama. Koncentracija infektivnih virusnih čestica izražena je kao broj infektivnih doza 50 u mililitru virusnog uzorka (CCID₅₀/mL), gdje je CCID₅₀ količina virusa koja uzrokuje pojavu citopatskog efekta u 50% testiranih jažica, a vrijednost logCCID₅₀/mL (titar virusa) određena je pomoću Spearman - Kärberove jednadžbe.

Alikvoti virusnih uzoraka iz različitih eksperimenata stabilizirani su odmah po završetku eksperimenta, osim ako nije drugačije navedeno, te su pohranjeni na 4 °C ili -20 °C do određivanja koncentracije infektivnih virusnih čestica. Stabilizirani su i alikvoti početnih virusnih suspenzija prije i nakon mikrofiltracije ili centrifugiranja kako bi se odredio utjecaj ovih postupaka na infektivnost virusa. Vrijednost CCID₅₀ za mikrofiltrirani uzorak zadana je kao vrijednost netretiranog, kontrolnog uzorka te je korištena za izračunavanje iskorištenja infektivnih virusnih čestica tijekom i nakon procesa pročišćavanja, osim ako nije drugačije naglašeno. Za stabilizaciju virusnih uzoraka korišten je stabilizator Imunološkog zavoda d.d čiji je sastav poslovna tajna zbog čega ne može biti naveden.

3.3.2. Određivanje veličine i koncentracije ukupnih čestica

Za određivanje veličine i koncentracije ukupnih čestica korištena je metoda praćenja nanočestica (engl. *nanoparticle tracking analysis*, NTA) za koju je korišten instrument *Nanosight LM10* (Malvern). Instrument se sastoji od klasičnog optičkog mikroskopa, kamere sCMOS i jedinice LM10 s izvorom crvene laserske svjetlosti ($\lambda=642$ nm). Ovom metodom prati se raspršenje svjetlosti crvenog lasera sa čestica. Kamerom se snima video zapis Brownovog gibanja čestica te se zatim preko Stokes - Einsteinove jednadžbe (jednadžba 1) može izračunati njihov hidrodinamički radijus, r_h ¹⁵².

$$\overline{(x, y)^2} = \frac{4k_B T}{3r_h \pi \eta}$$

Jednadžba 1. Stokes – Einsteinova jednadžba. $\overline{(x, y)^2}$ je prosječan put koji su čestice prešle, k_B je Boltzmanova konstanta, T temperatura, a η koeficijent viskoznosti otopine.

Načelno se ovom metodom može mjeriti veličina čestica u rasponu 10 - 1000 nm. Mjerenjem broja čestica u vidnom polju poznatih dimenzija te uz poznavanje volumena ćelije, ova metoda omogućava izračunavanje ukupne koncentracije čestica.

Uzorci visoke koncentracije ukupnih čestica razrijeđeni su puferom PBS (8,1 mmol/L Na_2HPO_4 , 2,1 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,15 mol/L NaCl, pH 7,3) do koncentracije 2 - 8 $\times 10^8$ čestica/mL. Navedena koncentracija odgovara 10 – 50 čestica u vidnom polju za vrijeme snimanja, a omogućava optimalnu statističku obradu podataka programskim alatom. Svaki uzorak sniman je 3 puta po 60 sekundi, a tako dobiveni video-zapisi analizirani su programskim alatom NTA 3.1 ili NTA 3.2 (*Malvern*). Za usporedbu veličine čestica u uzorcima korištena su tri parametra koje programski alat izračunava: srednja vrijednost, mod i vrijednost D90 koja iskazuje da 90% čestica ima promjer jednak ili manji od navedenog. Određeni su omjeri srednje vrijednosti, moda i D90 ispitivanog uzorka prema kontrolnom (početnom) uzorku. Srednja vrijednost izračunatih omjera predstavlja razliku veličine ispitivanog uzorka prema kontrolnom. Iskorištenja ukupnih (infektivnih i neinfektivnih) čestica izražena su također preko omjera ukupnih čestica u ispitivanom uzorku prema kontrolnom. Kao kontrolni (početni) uzorci korišteni su alikvoti početnih virusnih suspenzija uzeti odmah nakon mikrofiltracije, osim ako nije drugačije navedeno.

3.4. Određivanje koncentracije proteina i DNA

3.4.1. Određivanje koncentracije proteina po Ehresmannu

Metoda se zasniva na mjerenju apsorbancije pri 228,5 i 234,5 nm pri čemu apsorbancija proteina raste smanjenjem valne duljine, odnosno koncentracija proteina se određuje iz razlike apsorbancija pri ove dvije valne duljine¹⁵³. Apsorbancija molekula tRNA i rRNA na ove dvije valne duljine je jednaka što ovu metodu čini pogodnom za određivanje koncentracije proteina i u kompleksnim biološkim uzorcima poput staničnih ekstrakata koji sadrže i molekule RNA.

Uzorci se razrijede do masene koncentracije u rasponu $\gamma=5 - 200 \mu\text{g/mL}$, izmjeri se apsorbancija pri 228,5 i 234,5 nm, te se masena koncentracija u mg/mL može izračunati prema jednadžbi 2.

$$\gamma = (A_{228,5} - A_{234,5}) * 0,3175 * R \text{ [mg/mL]}$$

Jednadžba 2. Izračunavanje masene koncentracije proteina, pri čemu R predstavlja razrjeđenje početnog uzorka proteina. Preuzeto iz B. Ehresmann, P. Imbault i J. H. Weil, *Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's*, *Anal. Biochem.* **54** (1973) 454–463.

Apsorbancija je mjerena na spektrofotometru *Thermo Scientific Multiskan Spectrum 1500* u kvarenim kivetama s duljinom optičkog puta 1 cm, a kao referentna otopina korištena je odgovarajuća otopina koja nije sadržavala protein.

3.4.2. Konjugacija HRP-a na antitijela anti-Vero-IgG za uspostavu testa ELISA

Peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) je glikoprotein, a njegova konjugacija s antitijelima IgG može se postići oksidacijom šećernih skupina do aldehida. Novonastale aldehidne skupine mogu reagirati s amino-skupinama tvoreći Schiffove baze¹⁵⁴.

Antitijela anti-Vero-IgG izolirana iz seruma zamorčića (odjeljak 3.8.2.) prebačena su pomoću PES jedinice za UF koja zadržava molekule veće od 10 kDa (engl. *molecular weight cut-off*, MWCO) u 0,1 mol/L karbonatni pufer (0,074 mol/L NaHCO₃, 0,026 mol/L Na₂CO₃, pH 9,4). Prije konjugacije s HRP-om, antitijela su bila pohranjena preko noći na 4 - 8 °C.

Oksidacija šećernih skupina HRP-a izvršena je pomoću natrijeva perjodata, NaIO₄. HRP i NaIO₄ pripremljeni su otapanjem u otopini NaHCO₃ (0,1 mol/L, pH 8,1). Pripremljeno je 0,5 mL otopine HRP-a konačne koncentracije 20 mg/mL i 0,5 mL otopine NaIO₄ konačne

koncentracije 9,35 mmol/L. Otopine HRP-a i NaIO_4 su pomiješane te inkubirane 2 h pri sobnoj temperaturi u tami. Po završetku inkubacije, 1 mL otopine aktiviranog HRP-a dodano je u 2 mL otopine antitijela anti-Vero-IgG u karbonatnom puferu. Množinski omjer antitijela anti-Vero-IgG:HRP iznosio je 1:1,2. Otopina je prebačena u zataljenu kapalicu u koju je prethodno dodano oko 0,6 g punila *Sephadex G-25 Medium* tako da je punilo apsorbiralo svu tekućinu. Smjesa je inkubirana preko noći pri sobnoj temperaturi u tami. Konjugat HRP-anti-Vero-IgG eluiran je s 11,5 mL otopine NaHCO_3 (0,1 mol/L, pH 8,1). Eluatu je dodano 575 μL svježe priređene otopine NaBH_4 (0,13 mol/L NaBH_4 u 0,1 mol/L NaOH) te je otopina inkubirana 30 min pri sobnoj temperaturi u tami uz miješanje. Nakon 30 minuta u otopinu je dodano još 1,15 mL otopine NaBH_4 te je otopina dodatno inkubirana 1 h pri temperaturi 2 - 8 °C u tami uz miješanje. Zatim je u otopinu dodano 13,5 mL zasićene otopine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ te je otopina inkubirana 2 h pri 2 - 8 °C u tami uz miješanje. Dodatkom $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dolazi do taloženja konjugiranih i nekonjugiranih antitijela anti-Vero-IgG koja su od neizreagiranog HRP-a u supernatantu odvojena centrifugiranjem 30 minuta pri $3000 \times g$. Talog je otopljen u 5 mL pufera PBS-C (28 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 72 mmol/L Na_2HPO_4 , 0,1 mol/L NaCl , pH 7,2) te je volumen nadopunjen do 10 mL. Antitijela HRP-anti-Vero-IgG i anti-Vero-IgG ugušćena su pomoću PES jedinice za UF (MWCO 10 kDa) do otprilike 1 mL. Antitijela su dodatno isprana 2 puta s 10 mL pufera PBS-C te ugušćena do konačnog volumena 0,75 mL nakon čega su razrijeđena 1:1 puferom PBS-C. Smjesa antitijela HRP-anti-Vero-IgG i anti-Vero-IgG razrijeđena je s glicerolom u omjeru 1:1 te alikvotirana i pohranjena pri -20 °C.

3.4.3. *Određivanje ukupnih HCP-a u virusnim uzorcima metodom enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi, ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)*

Mikrotitarska pločica obložena je otopinom antitijela anti-Vero-IgG izoliranih iz seruma zamorčića. Konačna masena koncentracija antitijela iznosila je 10 $\mu\text{g/mL}$ u 0,05 mol/L karbonatnom puferu (0,035 mol/L NaHCO_3 , 0,015 mol/L Na_2CO_3 , pH 9,6) te je 100 μL otopine nanoseno u svaku jažicu.

Pločica je inkubirana 2 h pri 37 °C ili preko noći pri sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije pločica je isprana 3 puta puferom za ispiranje, PBST (0,14 mol/L NaCl , 7,75 mmol/L Na_2HPO_4 , 2,70 mmol/L KCl , 1,50 mmol/L KH_2PO_4 , 0,25 mmol/L timerosal, 0,05% Tween 20). Eventualno preostala slobodna mjesta na pločici blokirana su inkubacijom 2 h pri 37 °C s 200

μL pufera za blokiranje i inkubaciju (0,5%-tna otopina BSA u puferu PBST). Po završetku inkubacije pločica je isprana 2 puta puferom PBST.

Potom su nanosena binarna serijska razrjeđenja standarda (lizat stanica Vero u vodi) u rasponu od 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$ do 0,47 $\text{ng}/\mu\text{L}$ staničnih proteina po jažici te virusni uzorci u dva razrjeđenja (u pravilu nerazrijeđeni virusni uzorak te virusni uzorak razrijeđen 1:4 s puferom za blokiranje i inkubaciju). Pločica je inkubirana 2 h pri 37 °C nakon čega je isprana 3 puta puferom PBST.

Slijedila je inkubacija sa 100 μL otopine konjugata HRP-anti-Vero-IgG u puferu za blokiranje i inkubaciju u omjeru 1:4000. Pločica je inkubirana još 2 h pri 37 °C nakon čega je isprana 3 puta puferom PBST.

Detekcija je izvršena pomoću reakcije HRP-a sa supstratom, *o*-fenilendiamin dihidrokloridom (OPD). OPD je otopljen u citrat-fosfatnom puferu (0,05 mol/L limunska kiselina, 0,1 mol/L NaH_2PO_4 , pH 5,0) do konačne koncentracije 0,6 mg/mL te je u otopinu neposredno prije upotrebe dodano 1 μL 30%-tnog H_2O_2 po 1 mL otopine OPD-a. Na pločicu je nanoseno 100 μL otopine OPD-a po jažici te je pločica inkubirana 30 minuta pri sobnoj temperaturi u tami. Razvija se narančasto obojenje uslijed nastanka 2,3-diaminofenazina koji je produkt reakcije OPD-a s HRP-om.

Reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 μL 12,5%-tne H_2SO_4 u svaku jažicu nakon čega je pomoću spektrofotometra *Thermo Scientific Multiskan Spectrum 1500* izmjerena apsorbancija pri 492 nm.

3.4.4. Detekcija stanične DNA u pročišćenim virusnim uzorcima¹

Za detekciju stanične DNA u pročišćenim virusnim uzorcima korištena je metoda PCR. Po potrebi uzorci su prije pripreme odsoljeni pomoću PES UF jedinica (MWCO 100 kDa).

250 μL uzorka pomiješano je s istim volumenom pufera (0,1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris/HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8,0) te je dodano 5 μL 10%-tnog SDS-a i 1 μg RNaze A. Smjesa je inkubirana 1,5 h pri 37 °C nakon čega je u nju dodano 50 μg proteinaze K te inkubirano dodatno 3 h pri 56 °C. U uzorak je potom dodano 250 μL fenola i 250 μL kloroforma za ekstrakciju DNA, nakon čega je uzorak centrifugiran 5 min pri 12 000 $\times g$ zbog odvajanja faza. Vodena faza je odvojena te dodatno ekstrahirana s približno jednakim volumenima kloroforma

¹ detekciju stanične DNA izvele su dr. sc. J. Ivančić-Jelečki i R. Jug

i izoamilnog alkohola. Uzorak je ponovo centrifugiran 5 min pri $12\,000 \times g$, vodena faza je odvojena te joj je dodano 0,1 volumena 3 mol/L CH_3COONa i 2,5 volumena 96%-tnog etanola za taloženje DNA koje se odvijalo preko noći, pri -20°C . Zatim je uzorak centrifugiran 45 min pri $12\,000 \times g$, talog je ispran s 1 mL 70%-tnog etanola i otopljen u 10 μL 10 mmol/L Tris/HCl, pH 8,0.

Ovako izolirana DNA dodana je u reakcijsku smjesu za PCR koja je sadržavala pufer *OneTaq* 1 \times (20 mmol/L Tris/HCl, 22 mmol/L NH_4Cl , 22 mmol/L KCl, 1,8 mmol/L MgCl_2 , 0,06% IGEPAL CA-630, 0,05% Tween 20, pH 8,9) i ostale potrebne komponente (tablica 3). Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 50 μL .

Korištene početnice bile su specifične za gen prisutan u samoj jednoj kopiji u genomskoj DNA, a koji kodira za gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (GAPDH). Sekvenca uzvodne početnice bila je AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG, a nizvodne TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA. Postavke programa PCR-a dane su u tablici 4. Duljina nastalog produkta iznosi 257 nukleotida. DNA je analizirana pomoću agaroznog gela (1,5%), a detektirana je pomoću etidij bromida. Granica detekcije DNA iznosila je 40 ng/mL.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za PCR.

sastojak	<i>c</i>
deoksiribonukleotidi (dNTP)	10 $\mu\text{mol/L}$ (svaki)
polimeraza <i>OneTaq</i>	1,25 U
uzvodna početnica (engl. <i>forward primer</i>)	20 pmol
nizvodna početnica (engl. <i>reverse primer</i>)	20 pmol

Tablica 4. Program PCR-a.

korak	broj ponavljanja	<i>t</i> / min	θ / $^\circ\text{C}$
početna denaturacija	1	3	94
denaturacija		0,5	94
sparivanje početnica	40	0,5	60
produljenje		0,5	68
završno produljenje	1	7	68

3.5. Ispitivanje stabilnosti proteina i virusa

3.5.1. Ispitivanje stabilnosti proteina metodom diferencijalne skenirajuće fluorimetrije

Uzorci proteina za ispitivanje stabilnosti metodom diferencijalne skenirajuće fluorimetrije (engl. *differential scanning fluorimetry*, DSF, engl. *thermal shift assay*) pripremljeni su na sljedeći način: hIgG, OVA ili HSA pomiješani su s koncentriranom ispitivanom otopinom (odjeljak 4.2.1., tablica 12) i s 5 µL boje *Sypro Orange* (originalna otopina koncentracije 5000× razrijeđena do 10× u vodi) tako da je konačna koncentracija proteina u smjesi konačnog volumena 50 µL iznosila 0,5, 2 ili 10 mg/mL, a boje 1×. Smjesa je promiješana pipetiranjem te prenesena u pločicu s 96 jažica pogodnu za mjerenje fluorescencije. Odmah potom pločica je podvrgnuta mjerenju u instrumentu za qPCR *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR*. Pločica je najprije u instrumentu inkubirana 10 min pri 5 °C, a zatim je mjeren intenzitet fluorescencije uz postupno podizanje temperature za 1 °C/min u temperaturnom rasponu od 5 – 94 °C. Za detekciju fluorescencije u programskom alatu *7500 System Software* kao reporterska boja (engl. *reporter dye*) postavljena je TAMRA, dok je postavka pasivne reference (engl. *passive reference*) postavljena na „none“.

3.5.2. Određivanje stabilnosti virusa u otopinama aminokiselina i soli

Stabilnost MuV-a i MeV-a u različitim otopinama aminokiselina i soli ispitana je primarno pomoću testa određivanja CCID₅₀ nakon inkubacije virusnih suspenzija u otopinama. Ispitivane otopine pripremljene su u puferu (20 mmol/L MOPS, pH 7,3) kako pH vrijednost tih otopina ne bi utjecala stabilnost virusa te su sterilizirane filtracijom kroz PES filter veličine pora 0,22 µm. Napravljena su dva različita seta eksperimenata.

1 mL virusne suspenzije pomiješan je s 1 mL ispitivane otopine aminokiselina, soli ili šećera dvostruko veće koncentracije kako bi se dobila suspenzija željene konačne koncentracije ispitivane aminokiseline, soli ili šećera. U prvom setu eksperimenata (odjeljak 4.2.2.) otopine su inkubirane 2 h u mraku pri sobnoj temperaturi. Pripremljen je i dodatni uzorak u kojem je virusna suspenzija pomiješana s 1 mL otopine pufera PBS te je izložen istim uvjetima kao i ostali virusni uzorci. Po završetku inkubacije, virusne suspenzije su pomiješane sa stabilizatorom do testa određivanja CCID₅₀.

U drugom setu eksperimenata (odjeljak 4.2.3.) korištene su dodatne otopine, drugačijeg sastava nego u prvom setu te su inkubirane 24 h pri 21 – 24 °C, a zatim odmah podvrgnute testu određivanja CCID₅₀, bez prethodnog dodatka stabilizatora.

U svim virusnim uzorcima određena je i koncentracija i veličina čestica metodom NTA. Stabilnost virusa u svim ispitanim uvjetima i u oba seta eksperimenata izražena je relativno prema kontrolnim uzorcima definiranim u odjeljcima 3.3.1. i 3.3.2.

3.5.3. Određivanje stabilnosti virusa u ovisnosti o temperaturi

Stabilnost virusa u ovisnosti o temperaturi ispitana je testom određivanja CCID₅₀ i metodom NTA nakon inkubacije virusnih suspenzija MuV-a i MeV-a 24 h u mraku pri temperaturama 4, 21 i 37 °C bez dodatka aditiva ili stabilizatora. Veličina i infektivnost virusa izražene su prema kontrolnom uzorku, dok je koncentracija ukupnih čestica izražena prema uzorku koji je inkubiran 24 h pri 4 °C kako bi se isključio eventualni utjecaj adhezije virusnih čestica na površinu reakcijskih tubica.

3.5.4. Određivanje stabilnosti virusa pri različitim pH vrijednostima

Stabilnost MuV-a i MeV-a pri različitim vrijednostima pH ispitivana je testom određivanja CCID₅₀ i metodom NTA nakon inkubacije 2 h, pri sobnoj temperaturi, u mraku. Unaprijed izračunati volumen pufera 1 mol/L Tris (pH 10,0) ili 1 mol/L limunske kiseline (pH 1,4) pomiješan je s medijem MEM-H u konačnom volumenu 0,5 mL te je takvoj otopini dodana virusna suspenzija do konačnog volumena 2 mL čime je postignuta željena pH vrijednost u otopini, a pH je dodatno provjeren pomoću pH-metra. Pripremljen je i kontrolni virusni uzorak u koji je umjesto pufera za podešavanje pH dodano samo 0,5 mL medija MEM-H, čime ne dolazi do promjene pH vrijednosti virusne suspenzije, te je stabilnost virusa pri ostalim pH vrijednostima izražena relativno prema njemu.

3.5.5. Ispitivanje utjecaja staklenih i plastičnih reakcijskih tubica na koncentraciju ukupnih čestica u virusnim suspenzijama

Zbog mogućnosti adhezije čestica na stijenke plastičnih i staklenih reakcijskih tubica korištenih prilikom eksperimenata ispitano je postoji li razlika u koncentraciji i veličini ukupnih čestica ovisno o materijalu od kojeg su izrađene tubice. Alikvoti virusnih suspenzija MuV-a i MeV-a filtriranih kroz PVDF filter veličine pora 0,45 µm inkubirani su u plastičnim ili staklenim tubicama 2, 4, 6 i 24 h pri 21 °C nakon čega je u uzorcima određena koncentracija i veličina ukupnih čestica metodom NTA te uspoređena s vrijednostima izmjerenima za početni uzorak neposredno nakon mikrofiltracije.

3.5.6. Ispitivanje utjecaja pipetiranja i vorteksiranja na virusne čestice

Alikvoti virusnih suspenzija MuV-a i MeV-a filtriranih kroz PVDF filter veličine pora 0,45 μm prebačeni su u plastične reakcijske tubice volumena 2 mL te miješani pipetiranjem 1, 3 i 5 minuta ili vorteksiranjem 1, 3, 5 i 10 minuta. U ovako tretiranim uzorcima određena je veličina te koncentracija ukupnih i infektivnih čestica.

3.5.7. Analiza podataka

Statistička analiza podataka o stabilnosti virusa izvedena je u programu *GraphPad Prism* (verzija 5.00 za Windows, GraphPad Software, San Diego, California, SAD, www.graphpad.com). Za analizu je korištena neparametarska analiza varijancije (ANOVA) uz korištenje Kruskal - Wallisovog testa, dok je za pojedinačne usporedbe dvaju setova podataka korišten dvostrani Mann - Whitneyev test. Pritom su p -vrijednosti niže od 0,05 smatrane statistički značajnima.

Isti programski alat korišten je i za crtanje krivulja dobivenih eksperimentima DSF-a te određivanje vrijednosti T_m iz točke infleksije sigmoidalnih krivulja.

3.6. Pročišćavanje virusa i neinficiranih kontrola ultracentrifugiranjem

UC virusa i neinficiranih kontrola izvedeno je u preparativnoj ultracentrifugi *Beckmann Coulter XL-80K* opremljenoj rotorom SW28, u polialomernim kivetama pri $141\,000 \times g$ u trajanju 1, 2 ili 4 h pri 4 °C. Nastali talozi resuspendirani su u 250-1000 μL pufera PBS, a alikvoti resuspendiranih taloga i supernatanta uzeti su za daljnje analize.

3.7. Pročišćavanje virusa i neinficiranih kontrola dijafiltracijom

DF virusa i neinficiranih kontrola izvršen je na UF jedinicama s membranama od PES-a ili RC-a uz MWCO 100 kDa. UF jedinice sa suspenzijama virusa i neinficiranih kontrola centrifugirane su 15 min pri $1000 \times g$ pri 4 °C. Retentati su isprani dva puta s 50 mL pufera PBS, ugušćeni do željenog volumena, a njihovi alikvoti i alikvoti permeata uzeti za daljnje analize.

3.8. Kromatografske metode

Svi kromatografski postupci izvedeni su na sustavu za preparativnu kromatografiju visoke djelotvornosti *ÄKTApurifier 100* (*GE Healthcare*) opremljenom pumpom *P-900*, UV

detektorom *UV-900*, konduktometrom i pH-metrom *pH/C-900*, pri sobnoj temperaturi, osim ako nije drugačije navedeno. Proteinski uzorci te uzorci seruma injektirani su na kolonu pomoću petlje za injektiranje volumena 2 mL, dok su virusni uzorci injektirani na kolonu pomoću petlje za injektiranje volumena 150 mL, osim ako nije navedeno drugačije. Alikvoti svih početnih uzoraka, nevezanih frakcija (NF) i eluata (E), a kod virusa i alikvot iz 150 mL-ske petlje za injektiranje na kraju eksperimenta, sakupljani su za analize testom određivanja CCID₅₀, metodom NTA i ELISA-om, osim ako nije drugačije navedeno.

3.8.1. Kromatografija isključenjem po veličini, SEC

SEC je korišten za određivanje količine monomera, dimera i polimera u proteinskim uzorcima hIgG-a, HSA i OVA za ocjenjivanje stabilnosti proteina.

Za ispitivanje stabilnosti proteina pripremljene su otopine koje su sadržavale 2 mg/mL proteina pomiješanog s otopinama koje su sadržavale tvari stabilizirajućeg ili destabilizirajućeg djelovanja (prema rezultatima DSF-a) pri navedenim koncentracijama (odjeljak 4.2.1., tablica 12) tako da je konačni volumen otopine iznosio 500 µL. Otopine su inkubirane 28 dana u termostatu pri 37 °C nakon čega su centrifugirane 30 min pri 3000 × g, a po potrebi i filtrirane kroz PVDF filter veličine pora 0,45 µm zbog uklanjanja eventualno prisutnih većih agregata ili taloga koji bi oštetio kromatografsku kolonu.

Kromatografija je izvođena na sustavu za analitičku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) Waters opremljenom četverokanalnom visokotlačnom pumpom s kontrolnom pločom (*Waters 600*), detektorom s nizom fotodioda (engl. *photodiode array detector*, *Waters 2996*) i sustavom za automatsko injektiranje uzoraka (engl. *autosampler*, *Waters 717plus*). Korištena je gel-filtracijska kolona *TSK-GEL G3000SW_{XL}* s odgovarajućom pretkolonom pri konstantnom protoku 0,7 mL/min uz izokratnu eluciju u fosfosulfatnom puferu (0,04 mol/L Na₂HPO₄, 0,06 mol/L NaH₂PO₄ × H₂O, 0,1 mol/L Na₂SO₄, 7,7 mmol/L NaN₃, pH 6,7). Svaki kromatografski eksperiment trajao je 35 min, a injektirano je 50 µL uzorka. Prije injektiranja proteinskih uzoraka provedena su dva testna eksperimenta – u jednom je na kolonu injektirano 50 µL vode, a u drugom 50 µL tzv. test smjese koja sadržava proteine poznate molekulske mase (tablica 5) čime se omogućava izračunavanje molekulskih masa proteina u eksperimentalnim uzorcima.

Tablica 5. Sastav test-smjese za gel-filtraciju.

sastojak	$\gamma / \text{g L}^{-1}$	M_r
tiroglobulin, goveđi	0,50	670 000
γ -globulin, goveđi	1,00	150 000
OVA	1,00	44 287
RNaza A	1,50	13 700
<i>p</i> -aminobenzojeva kiselina	0,01	137,1

3.8.2. Izolacija antitijela iz seruma zamorčića za uspostavu ELISA-e za određivanje ukupnih staničnih proteina prisutnih u uzorcima virusa

Antitijela iz seruma zamorčića pročišćena su na koloni *HiTrapTM MabSelectTM Xtra*. Volumen kolone iznosi 1 mL, a dinamički vezni kapacitet kolone prema specifikaciji proizvođača iznosi 40 mg hIgG-a po 1 mL punila.

Serum zamorčića razrijeđen je u omjeru 1:1 s puferom za vezanje na kolonu (20 mmol/L MOPS, 0,15 mol/L NaCl, pH 7,2) te profiltriran kroz PVDF filter veličine pora 0,45 μm prije injektiranja na kolonu. Alikvot profiltriranog i razrijeđenog seruma uzet je za analizu denaturirajućom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE) te za određivanje koncentracije proteina u serumu metodom po Ehresmannu. Kromatografija se odvijala uz konstantan protok od 2 mL/min. NF je prikupljen za analizu pomoću SDS-PAGE-a. Antitijela su eluirana s kolone puferom niske pH vrijednosti (20 mmol/L Gly, 0,15 mol/L NaCl, pH 2,3), a sakupljana su u epruvetu s 50 μL neutralizacijskog pufera (1 mol/L Tris, pH 10). Alikvot eluata uzet je za određivanje koncentracije i analizu pomoću SDS-PAGE-a. Eluat antitijela ugušćen je i odsoljen pomoću UF jedinica s PES filterima, MWCO 10 kDa, pri čemu je za odsoljavanje korišten gore opisani pufer za vezanje na kolonu ili specifičan pufer potreban za daljnju obradu antitijela (npr. konjugacija s HRP-om, odjeljak 3.4.2.)

3.8.3. Kromatografija hidrofobnih interakcija za pročišćavanje virusa

HIC za pročišćavanje virusa ispitan je na komercijalno dostupnim kolonama *CIMmultus OH*. Korištena je kolona ukupnog volumena 1,0 mL s promjerom kanala 6 μm te kolona u obliku diska ukupnog volumena 0,34 mL s promjerom kanala 1,4 μm . Kromatografije su izvođene pri

konstantnom protoku od 3-10 mL/min, ovisno o eksperimentu, a eksperimenti su izvođeni minimalno u triplikatu. Pufer za vezanje na kolonu sadržavao je 20 - 50 mmol/L HEPES ili MOPS, pH 7,3 te $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u rasponu 0,5 - 2,0 mol/L. Elucija s kolone postignuta je stepenastim smanjenjem koncentracije $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u elucijskom puferu, pri čemu je posljednji eluat dobiven u puferu koji je sadržavao samo 20 - 50 mmol/L HEPES ili MOPS, pH 7,3.

Prije nanošenja na kolonu, virusni uzorci te uzorci neinficiranih kontrola razrijeđeni su u puferu s 3 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 - 50 mmol/L HEPES ili MOPS, pH 7,3 tako da konačna koncentracija $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u suspenziji odgovara koncentraciji u korištenom puferu za vezanje. Injektirani virusni uzorci sadržavali su između 10^5 i 10^{10} CCID₅₀/mL infektivnih virusnih čestica, dok su injektirani uzorci neinficiranih kontrola sadržavali $(0,1 - 4,5) \times 10^{11}$ ukupnih čestica određenih metodom NTA.

3.8.4. Kromatografija ionske izmjene za pročišćavanje virusa

IEX za pročišćavanje virusa ispitan je na kolonama *CIMmultus QA*, *CIMmultus DEAE* i *CIMmultus SO₃*. Korištene kolone bile su ukupnog volumena 1,0 mL, s promjerom kanala 6 μm, a dodatno je kromatografija izvedena i na koloni QA u obliku diska ukupnog volumena 0,34 mL, veličine kanala 1,4 μm. Kromatografije su izvođene pri konstantnom protoku od 1 do 10 mL/min, ovisno o eksperimentu, a eksperimenti su izvođeni minimalno u triplikatu. Za vezanje na kolonu korišten je 50 mmol/L fosfatni pufer ili 50 mmol/L Tris pri pH 7,3, a elucija je postignuta stepenastim gradijentom dodatkom 0,5 i 1,0 mol/L NaCl u pufer za vezanje. Injektirani virusni uzorci sadržavali su između 10^5 i 10^{10} CCID₅₀/mL infektivnih virusnih čestica.

3.8.5. Afinitetna i imunoafinitetna kromatografija za pročišćavanje proteina i virusa

Za pročišćavanje hIgG-a AC-om korištena je kolona *CIM Protein G* u obliku diska ukupnog volumena 0,34 mL s promjerom kanala 1,4 μm.

Za pročišćavanje OVA, MuV-a i MeV-a IAC-om korištene su kolone *CIMmultus Epoxy* ukupnog volumena 1,0 mL s promjerom kanala 6 μm i *CIMac HIDA* ukupnog volumena 0,1 mL s promjerom kanala 6 μm na čije su epoksi- odnosno hidrazinske skupine imobilizirana odgovarajuća poliklonska antitijela za OVA, MuV ili MeV prema uputama proizvođača.

Kromatografije su izvedene pri konstantnom protoku 2 mL/min. Ekvilibracija kolone, vezanje uzorka te ispiranje nespecifično vezanih nečistoća izvršeno je u puferu za vezanje (20 mmol/L MOPS, 0,15 mol/L NaCl, pH 7,3). Elucija je postignuta korištenjem ispitivane otopine

aminokiselina (Arg, Ser ili imidazol kao zamjenu za His, odnosno njihove smjese) visoke molarnosti pri pH 7,3 u tzv. nativnim uvjetima, a zatim i puferom niskog pH (20 mmol/L Gly, 0,15 mol/L NaCl, pH 2,3) u tzv. klasičnim uvjetima.

Svi proteinski uzorci pripremljeni su u konačnoj koncentraciji 1 mg/mL, a eksperimenti su izvedeni najmanje u triplicatu. Virusni uzorci injektirani na kolonu sadržavali su između 10^7 i 10^{10} CCID₅₀/mL infektivnih virusnih čestica. Uzorci injektiranih neinficiranih kontrola sadržavali su $(2 - 4) \times 10^{10}$ ukupnih čestica određenih metodom NTA.

3.9. Elektroforetske metode

3.9.1. Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE)

Za SDS-PAGE korišteni su komercijalno dostupni poliakrilamidni gelovi *Novex NuPAGE 4-12% Bis-Tris* gelovi debljine 1 mm s 10 ili 12 jažica, a elektroforeza je izvođena u sustavu *XCell SureLock™ Mini-Cell* 45 min pri 180 V u puferu za elektroforezu (50 mmol/L MES, 50 mmol/L Tris, 0,1% SDS, 1 mmol/L EDTA, pH 7,3). Elektroforeza je izvođena u reducirajućim uvjetima u prisutnosti ditionitrola (DTT). Uzorci su pripremljeni tako da na svakih 6,5 µL uzorka dodano 2,5 µL pufera *NuPAGE LDS 4×* (konačna koncentracija u uzorku: 106 mmol/L Tris HCl, 141 mmol/L Tris, 2% LDS, 10% glicerol, 0,51 mmol/L EDTA, 0,22 mmol/L SERVA Blue G250, 0,175 mmol/L fenol crveno, pH 8,5) te 1 µL reducirajućeg agensa (500 mmol/L DTT). Po završetku elektroforeze, gelovi su bojani otopinom *Coomassie Brilliant Blue (CBB)* (0,1% *Coomassie Brilliant Blue R-250* (w/v), 10% octena kiselina (v/v), 40% metanol (v/v)) 1 h pri sobnoj temperaturi, a zatim su odbojavani 1 h pri sobnoj temperaturi u otopini 50%-tnog metanola te 1 h pri sobnoj temperaturi u vodi.

U slučaju slabe vidljivosti proteinskih pruga nakon bojanja gela CBB-om, proteini su detektirani naknadnim bojanjem srebrom. Pritom je gel najprije inkubiran 1 min u senzitivirajućoj otopini (0,8 mmol/L Na₂S₂O₃ × 5 H₂O) nakon čega je dvaput ispran u vodi. Slijedila je inkubacija gela u otopini AgNO₃ (5,9 mmol/L) 20 min nakon čega je gel ponovno dvaput ispran u vodi te potom prebačen u otopinu za razvijanje (0,19 mol/L Na₂CO₃, 0,04% formaldehid (v/v)) do pojave pruga proteina. Bojanje je prekinuto prebacivanjem gela u otopinu za zaustavljanje (5% octena kiselina (v/v)).

3.9.2. Dvodimenzionalna gel elektroforeza

Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2D-GE) izvedena je razdvajanjem proteina prema njihovim izoelektričnim točkama, a zatim prema molekulskoj masi. Za izoelektrično fokusiranje (IEF) korišteni su komercijalno dostupni gelovi *ZOOM Strip pH 3-10* s linearnim rasponom pH vrijednosti od pH 3 do pH 10 te aparatura *ZOOM IPGRunner (Invitrogen)*.

Uzorci za IEF pripremljeni su tako da je 15 μ L uzorka pomiješano sa 185 μ L pufera za rehidraciju gela (8 mol/L urea, 2% CHAPS, 0,5% (v/v) *ZOOM Carrier Ampholytes pH 3-10 L*, 0,002% bromfenol plavo, 20 mmol/L DTT). Uzorak u puferu za rehidraciju i gelovi su nanoseni u kazetu za rehidraciju gelova prema uputama proizvođača te inkubirani 1 h ili preko noći pri sobnoj temperaturi. Potom je kazeta s rehidriranim gelovima prenesena u aparaturu za IEF koji je provođen 20 min pri 200 V, 15 min pri 450 V, 15 min pri 750 V te 6 h pri 2000 V. Po završetku IEF-a, kazeta s gelovima je uklonjena iz aparature te pohranjena na -20 °C preko noći. Prije razdvajanja pomoću SDS-PAGE-a, gelovi su podvrgnuti ekvilibraciji u puferu *NuPAGE LDS 1 \times* za uzorke s dodatkom reducirajućeg agensa (DTT) potresanjem na rotacijskoj platformi 15 min pri sobnoj temperaturi. Zatim su gelovi podvrgnuti alkilaciji sa 125 mmol/L jodoacetamidom (IAA) u puferu *NuPAGE LDS 1 \times* za uzorke (bez dodatka DTT-a), također uz potresanje na rotacijskoj platformi kroz 15 min pri sobnoj temperaturi. Po završetku alkilacije, gelovi su odmah preneseni na gelove *ZOOM NuPAGE 4-12% Bis-Tris* debljine 1 mm prikladne za SDS-PAGE nakon IEF-a te je iznad gela nanoseno 400 μ L 0,5% agaroze kako bi se spriječilo podizanje gela iz jažice za vrijeme trajanja elektroforeze. SDS-PAGE i detekcija proteina u gelovima izvedeni su na način opisan u prethodnom odjeljku.

3.9.3. Western blot

Gelovi nakon SDS-PAGE-a ili 2D-GE-a, a prije bojenja CBB-om ili srebrom, prebačeni su u aparaturu za prijenos na membranu, *XCell II Blot Module (Invitrogen)* s PVDF membranom *Amersham Hybond-P* u puferu za prijenos *NuPAGE[®] Transfer Buffer* uz dodatak 20% metanola. Prijenos je izveden u aparaturi *XCell SureLock[™] Mini-Cell* prema uputama proizvođača, 1 h pri 30 V.

Po završetku prijenosa, membrana je uklonjena iz aparature za prijenos te su slobodna mjesta na membrani blokirana inkubacijom u 2%-tnoj otopini BSA u puferu PBST, 1 h pri sobnoj temperaturi uz potresanje. Membrana je potom dobro isprana u puferu PBST te inkubirana s HRP-anti-Vero IgG razrijeđenim u puferu PBST 1:1000, 1 h pri sobnoj temperaturi

uz potresanje. Membrana je ponovno dobro isprana te je detekcija izvršena pomoću komercijalno dostupnog pribora *Pierce ECL Prime* koji sadrži kemifluorescentni supstrat za detekciju HRP-a. Antitijelima obilježeni proteini vizualizirani su pomoću sustava *TyphoonTM FLA 9500* (*GE Healthcare*).

3.10. Analiza proteina i lipida spektrometrijom masa

3.10.1. Razgradnja proteina tripsinom u gelu, ekstrakcija i pročišćavanje peptida

Proteinske pruge za analizu MS-om izrezane su iz gelova, prebačene u tubice sa 100 µL vode te pohranjene pri -20 °C do razgradnje. Prilikom razgradnje proteina, voda je uklonjena, a gel je usitnjen pomoću nastavka za pipete u kockice približne veličine 1 mm³.

Komadići gela isprani su 3 puta s 15-20 µL ultračiste vode (UHQ) i 15-20 µL acetonitrila (ACN) i inkubirani 15 min. Uklonjena je sva tekućina te je dodano dovoljno ACN-a da prekrije komadiće gela. Nakon što se gel skupio te poprimio bijelu boju, ACN je uklonjen te je gel rehidriran 15 min u 15-20 µL otopine NH₄HCO₃ (100 mmol/L, pH 8,5) nakon čega je na gel dodan isti volumen ACN-a (otopina NH₄HCO₃/ACN 1:1 (v/v)) te je smjesa inkubirana 15 min. Po završetku inkubacije uklonjena je sva tekućina te su komadići gela posušeni u vakuum centrifugi. Gel je potom rehidriran u 15-20 µL svježe pripremljene reducirajuće otopine (10 mmol/L DTT u 100 mmol/L NH₄HCO₃, pH 8,5) te inkubiran 45 min uz potresanje u termomiješalici pri 56 °C. Reakcijske tubice su potom ohlađene na sobnu temperaturu i po potrebi kratko centrifugirane kako bi se s njihovog čepa uklonio kondenzat. Višak redukcijske otopine je uklonjen, a na gel je odmah dodano 15-20 µL svježe pripremljene alkilacijske otopine (54 mmol/L IAA u 100 mmol/L NH₄HCO₃, pH 8,5) te je smjesa inkubirana 30 min pri sobnoj temperaturi u mraku nakon čega je alkilacijska otopina uklonjena, a gel inkubiran 5 min s 15-20 µL otopine NH₄HCO₃. U smjesu je zatim dodan jednak volumen ACN-a te je smjesa inkubirana narednih 15 min nakon čega je uklonjena sva tekućina te je gel posušen u vakuum centrifugi.

Komadići gela rehidrirani su u 1 – 5 µL otopine tripsina (0,1 µg/µL tripsina u 10 µL 10 mmol/L HCl pomiješano s 90 µL pufera za digestiju (95% 50 mmol/L NH₄HCO₃, pH 8,5, 5% ACN)) te inkubirani 45 min pri sobnoj temperaturi. Korišteni volumen otopine tripsina ovisio je o procijenjenoj količini proteina prisutnog u gelu, a dodano je otprilike 10 ng tripsina na 1 µg proteina. Nakon inkubacije eventualni višak otopine je uklonjen te zamijenjen s 15 – 20 µL pufera za digestiju bez enzima (95% 50 mmol/L NH₄HCO₃, pH 8,5, 5% ACN). Razgradnja

proteina odvijala se preko noći pri 37 °C u termomiješalici uz potresanje. Nakon prekonnočne razgradnje, reakcijske tubice su kratko centrifugirane kako bi se uklonio eventualni kondenzat s čepa tubice.

Slijedila je ekstrakcija peptida iz gela: u reakcijsku smjesu dodano je 15 – 20 µL ACN-a, inkubirano 15 min te je supernatant prebačen u čistu reakcijsku tubicu. Peptidi su još dva puta ekstrahirani inkubacijom s 1% HCOOH i ACN (1:1, v/v) te UHQ i ACN (1:1, v/v), a svi supernatanti su spojeni. Otapalo je uklonjeno u vakuum centrifugi, nakon čega su peptidi pohranjeni pri -20 °C do pročišćavanja.

Peptidi su pročišćeni pomoću nastavaka za pipete *Zip-Tip C₁₈*. Ovakvi nastavci sadrže malu količinu (0,6 µL) kromatografskog punila C₁₈ u vrhu nastavka te omogućavaju pročišćavanje i/ili koncentriranje peptida i proteina manjih molekulskih masa (do 50 kDa) kromatografijom obrnutih faza. Prije pročišćavanja peptidi su otopljeni u 10 µL otopine 0,1% trifluoroctene kiseline (TFA). Nastavak *Zip-Tip* najprije je hidriran u otopini 0,1% TFA/ACN (1:1, v/v) pipetiranjem 3 × 10 µL otopine, a zatim ekvilibriran pipetiranjem 3 × 10 µL otopine 0,1% TFA. Peptidi su vezani na stacionarnu fazu u vrhu nastavka pipetiranjem otopine 3 puta nakon čega je nastavak ispran 3 puta s 10 µL otopine 0,1% TFA. Peptidi su eluirani s 10 µL otopine 0,1% TFA/ACN (1:1, v/v) te s 10 µL ACN-a i posušeni u vakuum centrifugi.

3.10.2. Analiza proteina spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF-MS

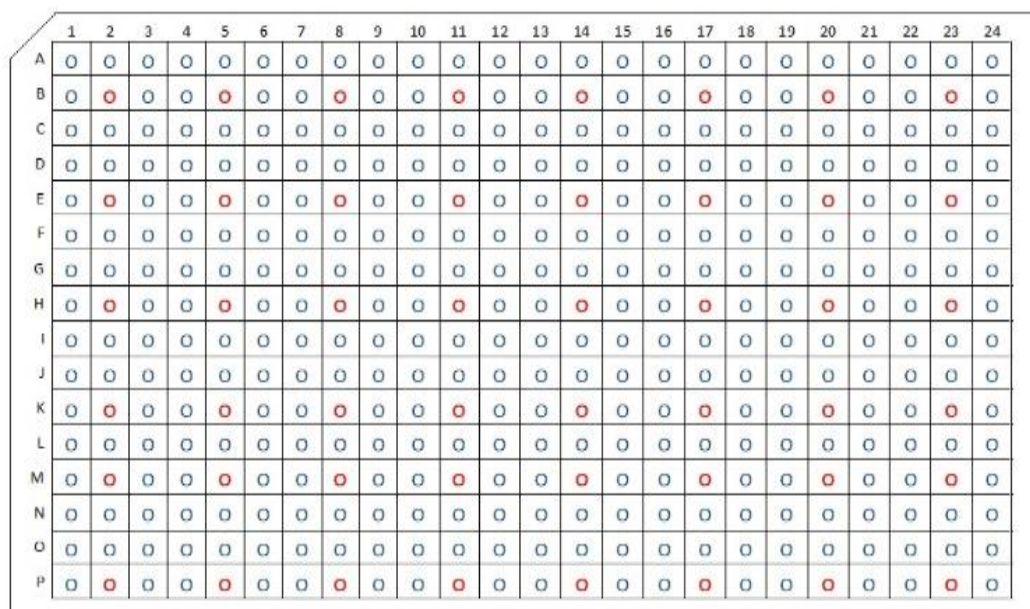
Nakon pročišćavanja, peptidi su otopljeni u 2,5 µL otopine 0,1% TFA/ACN (1:1, v/v) te je po 1 µL otopine peptida nanesen na pločicu za MALDI (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization*) (*MTP Ground Steel Plate, Bruker*) u duplikatu. Na uzorak nanesen na pločicu dokapano je 1 µL matrice, α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline, HCCA (4-6 mg/mL u 0,1% TFA/ACN (1:1, v/v)) te je uzorak pomiješan s matricom pipetiranjem gore-dolje.

Spektri peptida snimani su na instrumentu *ultrafleXtreme* (Bruker Daltonics) koji kao analizator masa koristi analizator vremena leta (engl. *time-of-flight*, TOF). Instrument je kalibriran pomoću komercijalno dostupne smjesa peptida (*Peptide calibration Mix 4*, tablica 6). Otopina ovih peptida razrijeđena je u 0,1% TFA/ACN (1:1, v/v) tako da konačna otopina sadrži 100 fmol/L neurotenzina, te je kao takva korištena za kalibraciju instrumenta, a uzorci za kalibraciju nanesen su na pločicu na isti način kao i eksperimentalni uzorci. Kako bi se izbjegli pomaci u očitanim vrijednostima m/z koji se mogu javiti zbog razlike u visini pločice

za MALDI-MS na različitim dijelovima pločice, uzorci za kalibraciju nanoseni su na pločicu kao što je prikazano na slici 6.

Tablica 6. Kalibracijski standard za snimanje spektara masa peptida (prema specifikacijama proizvođača).

peptid	m/z (ion $[M+H]^+$)
fragment bradikinina 1-5	573,3150
ljudski angiotenzin II	1046,5424
neurotenzin	1672,9176
fragment adenokortikotropnog hormona (engl. <i>adenocorticotropic hormone</i> , ACTH) [18 – 39]	2465,1989
oksidirani β -lanac goveđeg inzulina	3494,6514



Slika 6. Shematski prikaz pločice za MALDI-MS s 384 pozicije za nanošenje uzoraka. Točke za kalibraciju instrumenta označene su crveno dok su točke korištene za mjerenje eksperimentalnih uzoraka označene plavo.

Snimljeni su spektri otiska prsta peptida (engl. *peptide mass fingerprint*, PMF), uz uključeno ionsko zrcalo (engl. *reflectron*) metodom MALDI-TOF-MS. Spektri su obrađeni pomoću programskih alata *FlexAnalysis 3.4.76.0* (Bruker Daltonics) i *BioTools 3.2*. SR te je izvršena identifikacija proteina pretraživanjem baze podataka NCBIprot za viruse i primata uz pomoć programskog alata *Mascot* (www.matrixscience.com). Također, pretraživana je i baza podataka

poznatih kontaminacija uzoraka. Pritom su korišteni sljedeći parametri: dozvoljeni broj propuštenih mjesta cijepanja tripsinom: 2; konstantna posttranslacijska modifikacija proteina: karbamidometilacija Cys; varijabilne posttranslacijske modifikacije: N-terminalna acetilacija, C-terminalna amidacija, gubitak amonijaka na N-terminalnom Cys, deamidacija, Gln→pyro-Glu (N-terminalni Gln), oksidacija Met, His i Trp, fosforilacija Ser, Tyr i Thr; tolerancija pogreške u određenoj vrijednosti m/z za peptid: 200 ppm (slika 7).

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name: Dora Sviben Email: dsviben@unizg.hr

Search title: _____

Database(s): Vertebrates_EST, contaminants, cRAP, NCBIProt, SwissProt Enzyme: Trypsin

Allow up to: 2 missed cleavages

Taxonomy: Viruses

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Acetyl (Protein N-term), Amidated (Protein C-term), Ammonia-loss (N-term C), Gln->pyro-Glu (N-term Q)

Protein mass: _____ kDa Peptide tol. ±: 200 ppm

Mass values: MH⁺ M_r M-H⁺ Monoisotopic: Average

Data input: _____

Decoy: Report top: AUTO hits

Start Search ... Reset Form

Slika 7. Pretraživanje baze podataka za identifikaciju proteina metodom otiska prsta peptida uz korištenje programskog alata *Mascot*. Preuzeto s www.matrixscience.com.

Najintenzivniji peptidi u spektru PMF odabrani su za sekvenciranje spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF-MS (MS/MS). Odabrani peptidi fragmentirani su unutar kolizijske ćelije u instrumentu te su snimljeni spektri nastalih fragmenata koji omogućavaju određivanje sekvence peptida. Ova metoda korištena je za dodatnu potvrdu da je protein ispravno identificiran metodom PMF, a posebno je dragocjena u slučaju kada identifikacija metodom PMF nije bila uspješna (primjerice zbog većeg broja proteina prisutnih u uzorku ili niskog intenziteta peptida). Obrada spektara te identifikacija peptida izvršena je uz korištenje istih

alata i postavki kao i za spektre PMF, uz toleranciju određivanja vrijednosti m/z u MS/MS spektru u iznosu od 1,0 Da (slika 8).

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name: Dora Sviben Email: dsviben@unizg.hr

Search title: _____

Database(s): contaminants (AA), NCBIprot (AA)

Amino acid (AA): cRAP, SwissProt

Nucleic acid (NA): Environmental_EST, Fungi_EST, Human_EST, Invertebrates_EST, Mammals_EST, Mus_EST

Taxonomy: . . Viruses

Enzyme: Trypsin Allow up to: 2 missed cleavages

Quantitation: None

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (HW), Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y)

Peptide tol. ±: 200 ppm # ¹³C: 0 MS/MS tol. ±: 1 Da

Peptide charge: 1+ Monoisotopic: Average

Data file: Choose File (No file chosen)

Data format: Mascot generic Precursor: _____ m/z

Instrument: MALDI-TOF-TOF Error tolerant:

Decoy: Report top: AUTO hits

Start Search ... Reset Form

Slika 8. Pretraživanje baze podataka za identifikaciju peptida uz korištenje programskog alata *Mascot*. Preuzeto s www.matrixscience.com.

3.10.3. Izolacija lipida iz staničnih i virusnih uzoraka

Stanični uzorak za izolaciju lipida bio je talog neinficiranih stanica Vero dobiven iz 23 mL suspenzije stanica ($2,59 \times 10^6$ stanica/mL) resuspendiran u 200 μ L vode u staklenoj bočici. Na 50 μ L uzorka dodano je 850 μ L vode te 4 mL smjese CHCl_3 /metanol 1:1 (v/v). Smjesa je vorteksirana te inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. U smjesu je zatim dodano 1,25 mL vode i 1,25 mL CHCl_3 , smjesa je dobro promiješana te ostavljena da se odvoje faze. Organska (donja) faza je izolirana te ostavljena u digestoru pri sobnoj temperaturi dok otapalo nije u potpunosti isparilo. Lipidi su preko noći pohranjeni pri 4°C, nakon čega su otopljeni u 50 μ L CHCl_3 te je 5 μ L nanoseno na HPTLC pločicu (odjeljak 3.10.4.).

Lipidi su izolirani iz virusnih uzoraka MuV-a i MeV-a pročišćenih UC-om. Za svakih 50 μ L virusne suspenzije u smjesu je dodano 190 μ L mješavine CHCl_3 /metanol 1:1 (v/v), smjesa je vorteksirana, inkubirana 1 h pri sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje te je zatim u nju

dodano 140 μL CHCl_3 i 70 μL vode. Smjesa je promiješana te ostavljena da se odvoje faze nakon čega je organska faza izolirana te je otapalo ostavljeno da ispari. Lipidi su preko noći pohranjeni pri 4 °C, a zatim otopljeni u 20 μL CHCl_3 te je sav volumen nanesen na HPTLC pločicu.

3.10.4. Razdvajanje lipida dvodimenzijском tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti, 2D-HPTLC

Lipidi su razdvojeni dvodimenzijском tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high performance thin-layer chromatography*, HPTLC) na HPTLC pločicama (*HPTLC silica gel 60*) dimenzija 10 × 10 cm. Lipidi su nanesen 1 cm od ruba pločice te razdvojeni u dvije dimenzije. Sustav otapala za prvu dimenziju sadržavao je $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ (konc.) 10:5:1 (v/v/v), dok je sustav otapala za drugu dimenziju sadržavao $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ 10:3:3,5:0,3 (v/v/v/v). Razvijanje pločice zaustavljeno je kada je fronta otapala dosegla 5 cm ispod gornjeg ruba pločice. Pločice su posušene sušilom za kosu, poprskane otopinom primulina (0,05% primulin u smjesi aceton/voda 8:2 (v/v)) te su lipidi vizualizirani pod UV svjetlom ($\lambda=366$ nm).

S dijelova pločice koji su sadržavali lipide ostrugan je silika-gel te prebačen u reakcijske tubice. Lipidi su iz takvog materijala ekstrahirani dodatkom 250 μL smjese $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 10:10:0,1 (v/v/v) nakon čega je smjesa centrifugirana 5 minuta pri $7378 \times g$ te je supernatant odvojen u čistu reakcijsku tubicu. Postupak je ponovljen još jednom, a zatim je otapalo iz spojenih supernatanata upareno u vakuum centrifugi. Izolirani lipidi čuvani su na -20 °C do analize MS-om.

3.10.5. Analiza lipida spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF-MS

Uzorci lipida nakon ekstrakcije otopljeni su u 4 μL matrice, 20 mg/mL 2,4,6-trihidroksiacetofenona (THAP), te je 1 μL uzorka nakapan na pločicu za MALDI (*MTP Stainless Steel Plate, Bruker*) u duplikatu. Za kalibraciju instrumenta korištena je otopina ricinusova ulja (0,5 μL u 1 mL metanola uz dodatak NaCl, tablica 7) .

Uzorci za kalibraciju nanesen su na više mjesta na pločici kao što je opisano i za uzorke za kalibraciju prilikom analize peptida. Snimljeni su spektri izoliranih lipida MALDI-MS te MALDI-MS/MS. Lipidi su identificirani usporedbom sa spektrima standarda lipida te uz pomoć baze podataka LIPID MAPS¹⁵⁵.

Tablica 7. Kalibracijski standard za snimanje spektara masa lipida.

signal	tip iona	<i>m/z</i>
Na	Na ⁺	22,99000
K	K ⁺	38,96000
THAP, C ₈ H ₉ O ₄	[M+H] ⁺	169,05000
THAP, C ₈ H ₈ O ₄ Na	[M+Na] ⁺	191,03000
THAP, C ₈ H ₈ O ₄ K	[M+K] ⁺	207,01000
triricinoleilglicerol, C ₅₇ H ₁₀₄ O ₉ Na	[M+Na] ⁺	955,76000

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Heterogenost virusnih suspenzija i suspenzija ekstracelularnih vezikula - veličina i koncentracija ukupnih i infektivnih čestica u početnim uzorcima

Početni uzorak u istraživanju MuV-a i MeV-a jest virusna suspenzija koja je zapravo supernatant stanične kulture. Osim cjelovitih virusa, u takvoj suspenziji nalaze se i različite neinfektivne virusne čestice (npr. agregati, gole nukleokapside, prazne virusne ovojnice, defektne interferirajuće čestice), nečistoće koje potječu od reagensa i aditiva korištenih za uzgoj stanične kulture (albumin, antibiotici) ili nečistoće koje potječu od samih stanica (npr. stanični proteini, nukleinske kiseline, proteoglikani, glikozaminoglikani, ECV-i)^{53,54,83,87,89}. Uz to, infekcija stanica MuV-om ili MeV-om izaziva citopatski efekt (engl. *cytopathic effect*, CPE) – morfološke promjene u stanicama koje se mogu očitovati kao zaokruživanje (engl. *rounding*), smanjenje ili bubrenje stanica, povećana lomljivost, fuzija odnosno formiranje sincicija (engl. *syncytia*), agregacija, liza ili odvajanje stanica od površine spremnika za uzgoj¹⁵⁰. Zbog lize stanica koju CPE može izazvati, početni uzorak virusa, osim raznih virusnih čestica i ECV-a, može sadržavati i veće fragmente stanica.

Budući da virusi s lipidnom ovojnicom kakvi su MuV i MeV sličje ECV-ima strukturom, veličinom i gustoćom, a zbog korištenja istih bioloških mehanizama i puteva izlaska iz stanice su slični i po svom proteinskom i lipidnom sastavu, virusne čestice MuV-a i MeV-a je praktički nemoguće razlikovati od ECV-a⁸⁷, a time i gotovo nemoguće razdvojiti trenutno dostupnim metodama (npr. kromatografskim metodama, ultracentrifugiranjem) zbog čega treba imati u vidu da određeni udio ukupnih čestica detektiranih u virusnim uzorcima otpada i na ECV-e te to treba uzeti u obzir pri razmatranju podataka o veličini i koncentraciji ukupnih čestica.

Budući da uslijed CPE-a početni uzorak može sadržavati veće fragmente stanica, njih je potrebno ukloniti prije daljnje obrade ili upotrebe virusne suspenzije. Za uklanjanje većih staničnih ostataka mogu se koristiti centrifugiranje ili mikrofiltracija pri čemu je potonja metoda brža te pogodnija za veće volumene uzoraka¹⁰.

Netretiranim uzorcima supernatanata staničnih kultura te uzorcima nakon mikrofiltracije ili centrifugiranja određena je infektivnost testom određivanja CCID₅₀, a određene su i veličina i

koncentracija ukupnih čestica metodom NTA (tablice 8 i 9). Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška (engl. *standard error of the mean*, SEM). Cilj je bio odrediti utjecaj postupaka mikrofiltracije i centrifugiranja na uzorak. Pri razmatranju rezultata valja uzeti u obzir da prisutnost staničnih ostataka u netretiranim uzorcima može utjecati na rezultate dobivene metodom NTA u tim uzorcima (npr. pomak srednje vrijednosti veličine čestica prema većim vrijednostima, viša ukupna koncentracija čestica), dok oni ne utječu na rezultate testa određivanja CCID₅₀. Ovdje valja napomenuti da titar virusa, tj. broj infektivnih čestica dobiven testom određivanja CCID₅₀ ne predstavlja točno broj infektivnih čestica, ali korelira s njime^{150,156}. Test CCID₅₀ time omogućava određivanje koncentracije infektivnih čestica, ali se radi o biološkom testu koji pokazuje visoku varijabilnost – rezultati 95%-tnog intervala pouzdanosti ovog testa nalaze se u intervalu od $\pm 0,3$ logaritamske jedinice (prema regulatornim zahtjevima za metode kvantifikacije virusa u proizvodnji cjepiva). Iako se taj interval donekle može smanjiti povećanjem broja testiranih uzoraka te ponavljanjem samog testa na istom uzorku, ovo doprinosi disipaciji dobivenih rezultata što treba uzeti u obzir prilikom njihovog razmatranja.

Prema dobivenim rezultatima, promjer oba virusa kreće se oko 200 nm što je u skladu s literaturnim podacima koji navode da je očekivani promjer čestica MuV-a i MeV-a u rasponu 100 – 900 nm¹²⁻¹⁶. U netretiranim uzorcima uočava se da količina ukupnih čestica varira samo za jedan red veličine, dok količina infektivnih čestica (titar virusa) varira za čak do četiri reda veličine u različitim početnim uzorcima. Za uzorke podvrgnute mikrofiltraciji odnosno centrifugiranju infektivnost za oba tipa uzoraka izražena je kao postotak zadržane infektivnosti u odnosu na netretirani uzorak, dok su veličine i koncentracije centrifugiranih uzoraka izražene kao postotak u odnosu na mikrofiltrirani uzorak. Glavni razlog tome je što se mikrofiltracija češće koristi od centrifugiranja u slučajevima kad se virusne suspenzije pročišćavaju kromatografskim postupcima zbog zahtjeva kromatografskog sustava (u protivnom može doći do začepjenja kolone ili cijevi sustava). Obzirom na veličinu čestica određenu u netretiranim suspenzijama, filter veličine pora 0,45 μm trebao bi omogućiti prolaz najvećeg broja čestica bez utjecaja na njih, dok su korištene brzine centrifugiranja ($3000 \times g$) teoretski preniske da bi u danom vremenskom periodu dovele do njihovog taloženja.

Tablica 8. Veličina i koncentracija ukupnih i infektivnih čestica u suspenzijama prije tretmana za uklanjanje staničnih ostataka. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM.

	<i>n</i>	<i>d</i> / nm	mod / nm	D90 / nm	<i>C</i> _{ukupne čestice} / mL ⁻¹	titar / logCCID ₅₀ mL ⁻¹
MuV	67	210,5 \pm 2,29	159,8 \pm 4,49	309,1 \pm 3,23	(3,1 – 24,8) \times 10 ⁸	4,1 – 8,7
MeV	70	200,8 \pm 2,87	136,4 \pm 3,01	306,9 \pm 4,27	(2,9 – 83,2) \times 10 ⁸	3,7 – 8,2
ECV	38	189,5 \pm 2,82	122,4 \pm 3,41	291,4 \pm 5,14	(2,4 – 14,6) \times 10 ⁸	np

np - nije primijenjivo

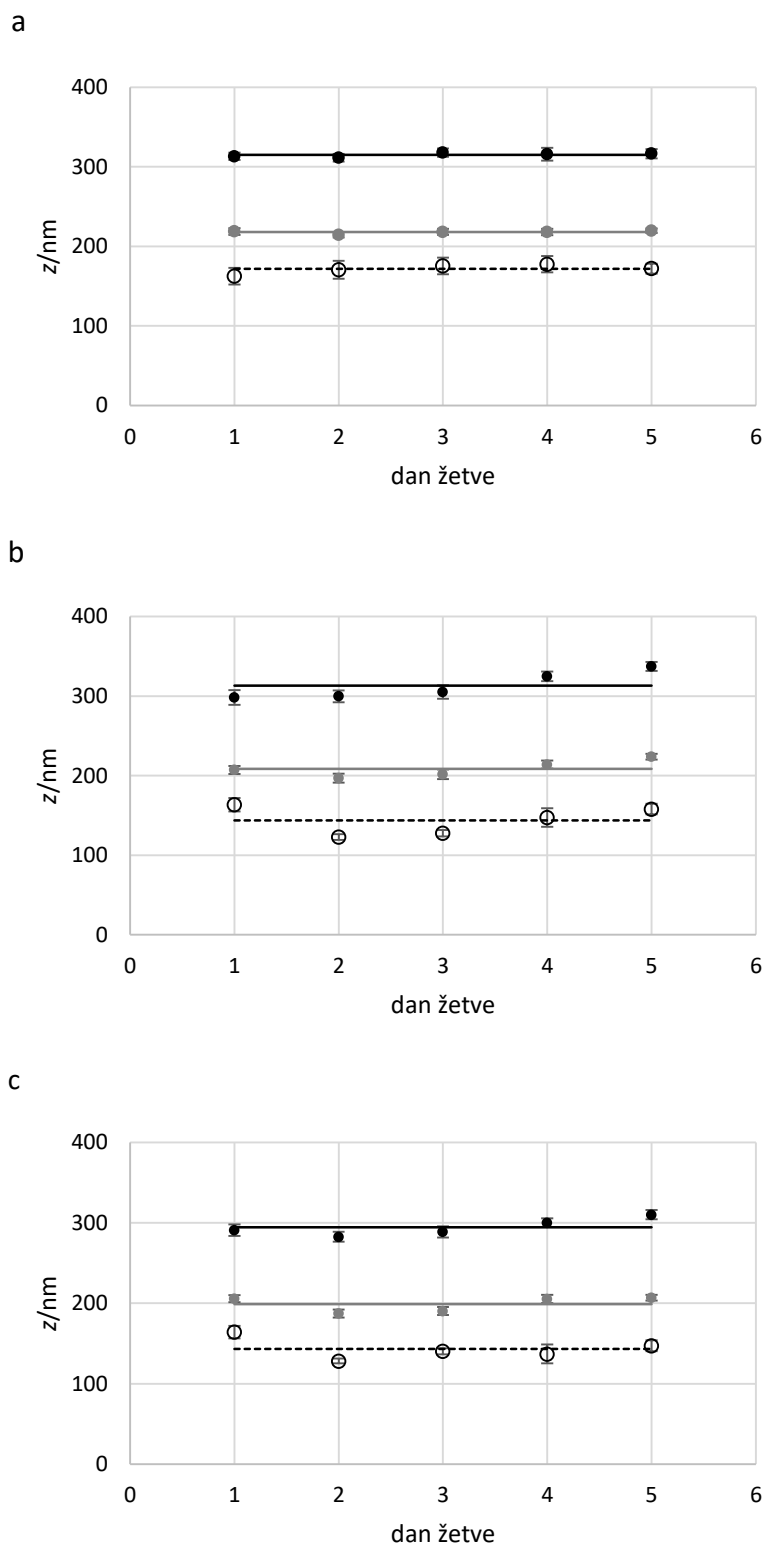
Tablica 9. Veličina i koncentracija ukupnih i infektivnih čestica u suspenzijama nakon tretmana za uklanjanje staničnih ostataka mikrofiltracijom ili centrifugiranjem. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM. Infektivnost je izražena kao postotak zadržane infektivnosti u odnosu na netretirani uzorak, dok su veličine i koncentracije centrifugiranih uzoraka izražene kao postotak u odnosu na mikrofiltrirani uzorak.

	<i>n</i>	<i>d</i> / nm	mod / nm	D90 / nm	<i>C</i> _{ukupne čestice} / mL ⁻¹	titar / %	
mikrofiltracija	MuV	72	216,5 \pm 1,84	169,6 \pm 4,43	313,8 \pm 2,60	(3,1 – 29,1) \times 10 ⁸	87 \pm 7,5
	MeV	73	206,0 \pm 2,38	143,1 \pm 3,61	309,6 \pm 3,36	(3,0 – 87,6) \times 10 ⁸	62 \pm 5,8
	ECV	39	199,0 \pm 3,80	143,5 \pm 6,47	294,4 \pm 5,98	(3,2 – 28,0) \times 10 ⁸	np
centrifugiranje	<i>n</i>	veličina / %		<i>C</i> _{ukupne čestice} / %	titar / %		
	MuV	18	98 \pm 6,0	76 \pm 9,0	62 \pm 8,9		
	MeV	16	91 \pm 7,0	77 \pm 17,5	23 \pm 4,8		

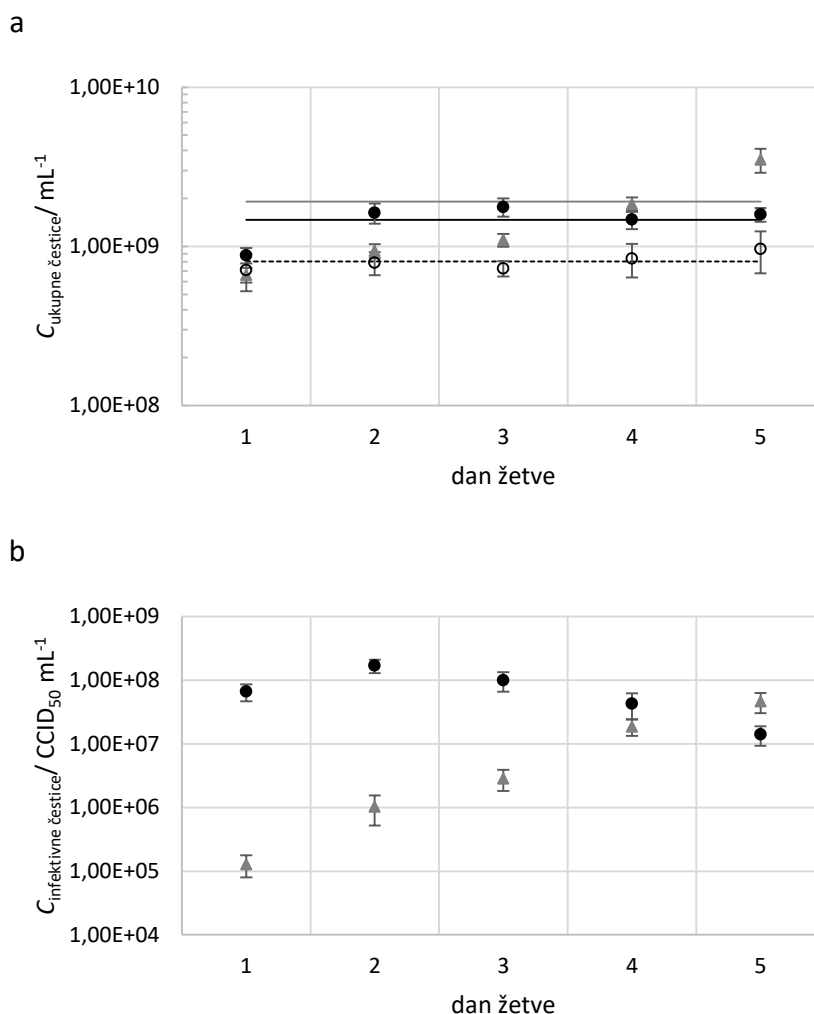
Usporedbom veličine čestica prije i poslije filtracije uviđa se da je promjer čestica nakon filtracije nešto veći, kao i parametar D90. Slično, čini se da dolazi do blagog porasta koncentracije ukupnih čestica prisutnih u suspenziji. Ovakav rezultat je neočekivan jer bi uklanjanje eventualno prisutnih čestica većih od 450 nm trebalo dovesti do smanjenja srednjih vrijednosti za veličinu čestica, ali i pada koncentracije ukupnih čestica. Uzrok ovog fenomena zasad je nejasan. Kod centrifugiranih uzoraka virusnih suspenzija uočava se smanjenje čestica i pad njihove koncentracije što je u skladu s pretpostavkom da u uvjetima centrifugiranja može doći do taloženja većih čestica odnosno staničnih ostataka prisutnih u netretiranim suspenzijama. Usporedbom titra virusa filtriranih i centrifugiranih uzoraka s titrom netretiranih

uzoraka uočava se pad, ali centrifugiranje pokazuje znatno veći negativni utjecaj na infektivnost virusnih suspenzija u usporedbi s mikrofiltracijom. Izgledno je da centrifugalne sile rezultiraju većim mehaničkim stresom na čestice, ali postoji i mogućnost da dolazi do taloženja većih virusnih čestica što rezultira smanjenom infektivnošću¹⁰². Obzirom da prilikom mikrofiltracije ne dolazi do smanjenja veličine ili ukupnog broja čestica, gubitak infektivnosti vjerojatnije je posljedica mehaničkog stresa kojem su virusne čestice izložene za vrijeme mikrofiltracije kao što su pojava tlaka, zagađenje membrane ili mehanička oštećenja čestica zbog prolaska kroz sužene pore membrane uslijed njezina zagađenja (engl. *membrane fouling*)¹⁰². Dobiveni rezultati pokazuju da je mikrofiltracija bolja metoda za uklanjanje staničnih ostataka iz početnih uzoraka jer, osim što je brža i jednostavnija, posebice u slučaju velikih volumena uzoraka, bolje čuva infektivnost virusa.

Uspoređeni su i rezultati dobiveni za veličinu čestica te koncentraciju ukupnih i infektivnih čestica po danima žetve, nakon mikrofiltracije (slike 9 i 10). Rezultati pokazuju da postoje zamjetne razlike u količini infektivnih čestica prisutnih u virusnim suspenzijama koje ovise o danu žetve (slika 10 b), dok veličina i koncentracija ukupnih čestica ne pokazuje toliku varijabilnost (slike 9 i 10 a). MeV pokazuje blagi trend porasta veličine čestica od 2. do 5. dana žetve, a također dolazi i do porasta broja infektivnih i ukupnih čestica u početnoj suspenziji. Titar MeV-a u ispitivanim uzorcima varirao je od 3,1 do 8,0 logCCID₅₀/mL, dok je koncentracija ukupnih čestica varirala od 8,5 do 9,9 logaritamskih jedinica/mL pri čemu su obje vrijednosti bile najveće 8. dan nakon infekcije (5. dan žetve). Porast veličine čestica u skladu je s porastom broja infektivnih čestica obzirom da su ECV-i nešto manji od MeV-a (3 – 6%), a za očekivati je da su i neinfektivne virusne čestice manje od infektivnih (osim u slučaju neinfektivnih agregata).



Slika 9. Veličina čestica u filtriranom početnom uzroku MuV-a (a), MeV-a (b) i ECV-a (c) ovisno o danu žetve. Sive točke i linija – srednja vrijednost promjera čestica, bijele točke i crtkana linija – mod promjera čestica, crne točke i linije – vrijednost D90. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 8$. Ravne linije predstavljaju ukupnu srednju vrijednost svakog od ispitivanih parametara.



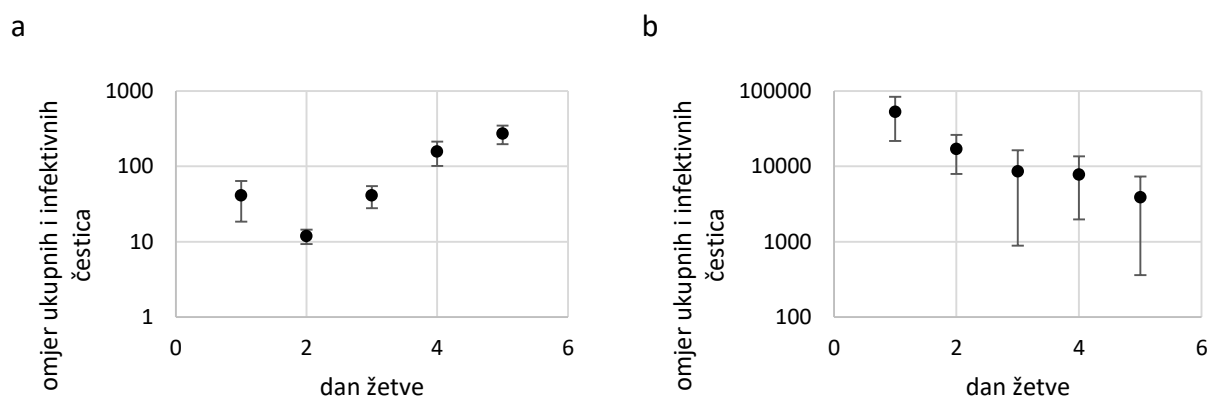
Slika 10. Koncentracija ukupnih (a) i infektivnih (b) čestica u filtriranom početnom uzorku MuV-a (crne točke i linije), MeV-a (sivi trokutići i linije) i ECV-a (bijele točke i crtkana linija) ovisno o danu žetve. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 8$. Linije predstavljaju ukupnu srednju koncentraciju ukupnih čestica.

Za MuV veličina čestica ne pokazuje zamjetne promjene po danima. Titar MuV-a kretao se od 5,0 do 8,5 logCCID₅₀/mL, a koncentracija ukupnih čestica od 8,5 do 9,5 logaritamskih jedinica/mL. Najviša koncentracija ukupnih čestica izmjerena 6. dan nakon infekcije (3. dan žetve), dok je titar virusa najviši 5. dan nakon infekcije (2. dan žetve), nakon čega opada.

Koncentracija i veličina ECV-a ne varira znatno od dana do dana, a u prosjeku je koncentracija ECV-a u supernatantima neinficiranih staničnih kultura iznosila oko 40% ukupne koncentracije čestica u virusnim suspenzijama (slika 10a, omjer srednjih vrijednosti predstavljenih linijama). Uz pretpostavku da proizvodnja ECV-a nije znatno povećana ili

smanjena prilikom infekcije, to bi značilo da oko 40% ukupnih čestica u virusnim suspenzijama može otpadati na ECV-e koji se mogu smatrati kontaminacijom što nije zanemarivo.

Opisane pojave dovode do promjene omjera ukupnih i infektivnih čestica od dana do dana (slika 11). Omjer je mnogo veći za MeV nego za MuV – za MuV je različitim eksperimentalnim pristupima već ranije pokazano da omjer ukupnih prema infektivnim česticama iznosi od 100:1 do 1000:1⁸⁶, dok u ovim uzorcima on varira otprilike od 10:1 do 1000:1. Za MeV taj omjer varira od otprilike 1000:1 do čak 100 000:1, a za oba virusa omjer značajno ovisi o danu žetve, pri čemu za MeV pada, dok za MuV raste prema kasnijem danu žetve. Ovo potvrđuje izrazitu heterogenost virusnih suspenzija te postojanje značajnih razlika u početnim uzorcima od dana do dana što sigurno može utjecati na rezultate kromatografskih pročišćavanja takvih uzoraka, ali i na njihov proteinski odnosno lipidni sastav obzirom na različite udjele infektivnih i neinfektivnih čestica (a koje se mogu razlikovati po svom proteinskom i lipidnom sastavu) u uzorcima od dana do dana.



Slika 11. Promjena omjera količine ukupnih i infektivnih čestica u početnom uzorku MuV-a (a) i MeV-a (b) ovisno o danu žetve. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 12$.

4.2. Ispitivanje stabilnosti virusa i proteina

4.2.1. Ispitivanje stabilnosti proteina metodom DSF i SEC-HPLC

DSF je visoko-protočna metoda koja se često koristi za određivanje stabilnosti proteina zbog svoje jednostavnosti i kratkog vremena trajanja. Zasniva se na mjerenju fluorescencije neke boje kao primjerice *Sypro Orange*, a prati termičku denaturaciju proteina u prisutnosti boje. Denaturacijom proteina dolazi do izlaganja njegovih hidrofobnih regija otolini, a time i

fluorescentnoj boji čiji se intenzitet fluorescencije pojačava vezanjem na hidrofobne dijelove proteina. Uzorak koji sadrži protein i boju postupno se zagrijava te se mjeri njegova fluorescencija zbog čega su za izvođenje ovih eksperimenata pogodni instrumenti za kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR). Prikazom ovisnosti intenziteta fluorescencije o temperaturi dobiva se sigmoidalna krivulja čija točka infleksije odgovara temperaturi T_m (engl. *melting temperature*) pri kojoj se 50% proteina nalazi u denaturiranom obliku, a temperatura T_m može se korelirati sa stabilnošću proteina pri određenim uvjetima.

Metoda DSF ovdje je korištena za ispitivanje stabilnosti tri modelna proteina različitih struktura: hIgG, OVA i HSA, s ciljem da se odredi sastav formulacija koje stabiliziraju sva tri različita proteina, a za koje bi se onda ispitalo mogu li poslužiti i za stabilizaciju virusa MuV-a i MeV-a. Ispitane su ukupno 194 različite otopine koje su sadržavale jednu ili kombinaciju nekoliko tvari (aminokiseline, šećeri, soli), a koje bi mogle imati stabilizirajući učinak na proteine (prilog 1)^{95,157–159}. Svi eksperimenti su izvedeni na sva tri proteina – hIgG, HSA i OVA, u triplicatu. Pri analizi rezultata veći naglasak stavljen je na hIgG i OVA jer su se mjerenja izvedena za HSA u nekim slučajevima pokazala nedovoljno jasnima za interpretaciju. Kod HSA postoje dva tranzicijska prijelaza prilikom razmatanja proteina^{160,161}, međutim oni nisu uvijek bili vidljivi. Iako je za očekivati da njihova vidljivost ovisi o utjecaju ispitivane otopine na stabilnost HSA, pojava jednog ili dva prijelaza nije bila ujednačena u replikatima izvedenim u otopinama istog sastava, a nije uočen niti neki obrazac (npr. stabilizacijski ili destabilizacijski utjecaj otopina, pojava dva prijelaza samo u otopinama s nekim aditivom i sl.) koji utječe na vidljivost jednog ili dva prijelaza. Općenito, čini se da je HSA sam po sebi osjetljiviji i manje stabilan u usporedbi s hIgG i OVA, barem u ovdje ispitivanim uvjetima.

Rezultati validacije koja je izvedena za sva tri proteina (tablice 10 i 11) pokazuju da je metoda DSF vrlo precizna i reproducibilna. Validacija je izvedena pri tri uvjeta u kojima svaki od proteina pokazuje najniži, srednji i najviši T_m . Koeficijenti varijacije (engl. *coefficient of variation*, CV) unutar odnosno između dana su prilično niski za sva tri proteina i u pravilu ne prelaze 3%. Iznimka su CV-i određeni za HSA pri najnižim T_m vrijednostima, ali to nije neočekivano obzirom da se radi o uvjetima koji značajno destabiliziraju protein te da su rezultati za HSA bili manje reproducibilni od onih za hIgG i OVA. Preporučena vrijednost CV-a određena unutar odnosno između testova iznosi 15%¹⁶², što ukazuje na zadovoljavajuću preciznost metode.

Tablica 10. Koeficijent varijacije unutar testa određen za metodu DSF za hIgG, OVA i HSA pri tri različita T_m -a, gdje je T_m je dan kao srednja vrijednost \pm SEM ($n=3$).

T_m	$T_m / ^\circ\text{C}$			CV unutar dana / %		
	IgG	OVA	HSA	IgG	OVA	HSA
nizak	$45 \pm 0,2$	$53 \pm 0,5$	$44 \pm 1,2$	1,5	3,0	8,4
srednji	$68 \pm 0,2$	$74 \pm 0,4$	$65 \pm 0,4$	1,1	1,6	2,1
visok	$71 \pm 0,3$	$82 \pm 0,2$	$84 \pm 0,4$	1,4	1,0	1,6

Tablica 11. Koeficijent varijacije između testova određen za metodu DSF za hIgG, OVA i HSA pri tri različita T_m -a, gdje je T_m je dan kao srednja vrijednost \pm SEM ($n=3$).

T_m	$T_m / ^\circ\text{C}$			CV između dana / %		
	IgG	OVA	HSA	IgG	OVA	HSA
nizak	$45 \pm 0,2$	$54 \pm 0,4$	$47 \pm 1,6$	0,9	1,7	8,2
srednji	$67 \pm 0,2$	$73 \pm 0,3$	$65 \pm 0,3$	0,9	1,0	1,3
visok	$71 \pm 0,2$	$81 \pm 0,2$	$83 \pm 0,3$	0,6	0,6	0,9

U odabranim otopinama koje su prilikom ispitivanja metodom DSF pokazivale znatniji stabilizirajući ili destabilizirajući učinak dodatno je metodom SEC-HPLC ispitano dolazi li, i u kojoj mjeri, do agregacije proteina (tablica 12). Rezultati DSF analize izraženi su kao ΔT_m prema T_m određenom za referentni uzorak u 20 mmol/L MOPS-u, pH 7,3. Za SEC-HPLC je kao referentni uzorak korišten svježi uzorak pripremljen neposredno prije eksperimenta, tj. nije bio inkubiran kao ostali uzorci ispitivani ovom metodom kako bi se odredilo kako izgleda stvarni početni materijal.

Tablica 12. Usporedba ΔT_m -a određenog DSF-om za hIgG, OVA i HSA s udjelom dimera i polimera određenih SEC-HPLC-om u ispitivanim smjesama (srednja vrijednost \pm SEM, $n=3$). pH svih otopina podešen je na pH 7,3 osim ako nije drugačije navedeno.

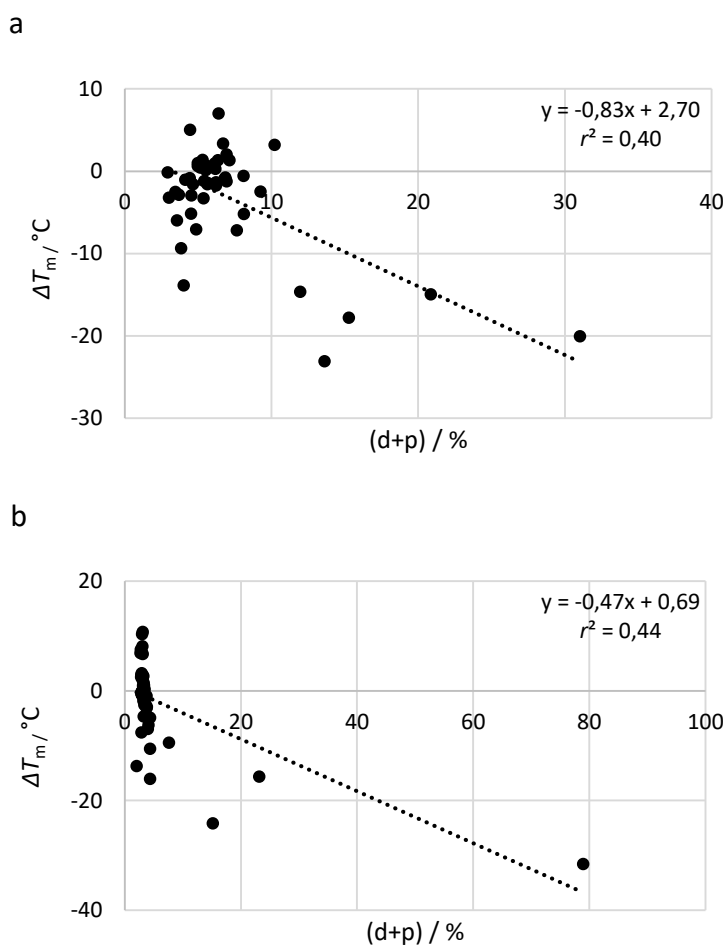
protein metoda	hIgG		OVA		HSA	
	DSF	SEC-HPLC	DSF	SEC-HPLC	DSF	SEC-HPLC
	$T_m / ^\circ\text{C}$	(d+p) / %	$T_m / ^\circ\text{C}$	(d+p) / %	$T_m / ^\circ\text{C}$	(d+p) / %
referentni uzorak						
20 mmol/L MOPS, pH 7,3	68 \pm 0,3	14,7 \pm 0,12	74 \pm 0,1	3,3 \pm 0,31	65 \pm 0,3	4,5 \pm 0,13
sastav ispitivane otopine						
20 mmol/L MOPS, pH 7,3	-	7,6 \pm 0,13	-	3,0 \pm 0,04	-	4,6 \pm 0,53
20 mmol/L HEPES, pH 7,5	-1 \pm 0,0	8,1 \pm 0,48	0	3,0 \pm 0,04	-4 \pm 0,4	4,0 \pm 0,22
PBS	-1 \pm 0,3	5,4 \pm 0,00	-1 \pm 0,1	2,9 \pm 0,19	1 \pm 0,3	4,6 \pm 0,70
0,2 mol/L citratni pufer, pH 4,0	-23 \pm 0,3	13,6 \pm 7,45	-17 \pm 0,0	no	-4 \pm 1,7	no
0,2 mol/L acetatni pufer, pH 4,0	-14 \pm 0,5	4,0 \pm 0,58	-14 \pm 0,4	2,0 \pm 0,04	-8 \pm 0,3	3,4 \pm 0,81
0,2 mol/L acetatni pufer, pH 5,6	-1 \pm 0,2	4,4 \pm 0,58	0	3,0 \pm 0,00	8 \pm 0,5	5,2 \pm 0,33
0,12 mol/L CH ₃ (CH ₂) ₆ COONa	-15 \pm 0,3	20,9 \pm 0,30	-24 \pm 0,2	15,2 \pm 2,84	18 \pm 0,2	4,6 \pm 0,23
20% glicerol	0	2,9 \pm 0,05	-5 \pm 0,2	4,4 \pm 0,18	-1 \pm 0,1	5,1 \pm 0,28
35% saharoza	2 \pm 0,4	6,9 \pm 0,09	1 \pm 0,3	3,3 \pm 0,14	1 \pm 0,7	5,2 \pm 0,37
20% saharoza	1 \pm 0,5	6,4 \pm 0,35	3 \pm 0,1	3,0 \pm 0,15	0	5,3 \pm 0,21
5% saharoza	0	6,2 \pm 0,00	-1 \pm 0,1	3,0 \pm 0,39	-10 \pm 1,0	5,1 \pm 0,52
0,15 mol/L GuHCl	-5 \pm 0,4	4,5 \pm 0,48	-8 \pm 0,3	2,9 \pm 0,20	no	5,3 \pm 0,22
2 mol/L urea	-7 \pm 0,2	76 \pm 1,17	-6 \pm 0,5	4,1 \pm 0,05	-18 \pm 3,0	2,0 \pm 0,22
0,75 mol/L imidazol	-15 \pm 0,4	12,0 \pm 0,68	-16 \pm 0,4	4,4 \pm 0,36	no	4,2 \pm 0,24
0,75 mol/L Gly	1 \pm 0,2	6,1 \pm 0,00	3 \pm 0,3	2,9 \pm 0,05	-2 \pm 0,2	4,9 \pm 0,14
1 mol/L NaCl	-3 \pm 0,1	5,4 \pm 0,01	1 \pm 0,5	3,1 \pm 0,12	8 \pm 0,0	5,5 \pm 0,03

1 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	1 ± 0,4	7,1 ± 0,02	7 ± 0,6	2,9 ± 0,17	8 ± 0,3	5,6 ± 0,26
0,75 mol/L Ser	1 ± 0,2	5,0 ± 0,02	3 ± 0,1	3,2 ± 0,04	4 ± 0,3	5,2 ± 0,29
2 mol/L NaCl	-1 ± 0,7	6,2 ± 0,30	7 ± 0,8	3,1 ± 0,05	10 ± 0,3	5,5 ± 0,15
3 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	no	no	no	no	6 ± 0,3	no
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L imidazol	-18 ± 0,3	15,3 ± 1,70	-16 ± 0,5	23,2 ± 0,29	no	4,4 ± 0,42
0,3 mol/L Arg / 0,3 mol/L imidazol	-9 ± 0,5	3,8 ± 0,14	-9 ± 0,4	7,6 ± 0,20	no	4,3 ± 0,19
0,15 mol/L Arg / 0,15 mol/L imidazol	-6 ± 0,2	3,6 ± 0,40	-7 ± 0,6	4,0 ± 0,13	0	4,5 ± 0,21
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L Ser	-3 ± 0,2	3,5 ± 0,25	1 ± 0,3	3,3 ± 0,14	no	5,4 ± 0,14
0,3 mol/L Arg / 0,3 mol/L Ser	-3 ± 0,4	3,0 ± 0,22	-2 ± 0,9	3,4 ± 0,11	5 ± 0,6	5,2 ± 0,17
0,15 mol/L Arg / 0,15 mol/L Ser	-3 ± 0,2	3,7 ± 0,24	-3 ± 0,6	3,4 ± 0,03	4 ± 0,5	5,3 ± 0,07
0,15 mol/L Arg / 0,15 mol/L Gly	-3 ± 0,2	4,5 ± 0,07	-2 ± 0,6	3,5 ± 0,05	3 ± 0,3	3,6 ± 1,75
20% saharoza / 1 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	3 ± 0,5	6,7 ± 0,09	10 ± 0,2	3,0 ± 0,05	8 ± 0,3	5,6 ± 0,09
35% saharoza / 0,5 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	5 ± 0,3	4,5 ± 0,00	8 ± 0,4	3,1 ± 0,11	9 ± 0,1	6,1 ± 0,12
0,75 mol/L Gly / 0,05 mol/L NaCl	1 ± 0,5	5,0 ± 0,00	3 ± 0,1	2,9 ± 0,08	6 ± 0,0	5,3 ± 0,11
0,12 mol/L CH ₃ (CH ₂) ₆ COONa / 0,25 mol/L NaCl	-20 ± 0,8	31,0 ± 2,21	-32 ± 1,1	78,9 ± 0,22	15 ± 0,5	4,2 ± 0,31
0,1 mol/L Bis Tris, pH 6,0 / 0,05 mol/L NaCl	-5 ± 0,4	8,1 ± 0,30	-5 ± 0,2	3,3 ± 0,10	5 ± 0,9	5,6 ± 0,10
0,1 mol/L glukoza / 0,5 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	-2 ± 0,2	5,6 ± 0,40	3 ± 0,5	2,9 ± 0,02	5 ± 1,2	5,7 ± 0,22
0,25 mol/L NaCl / 0,75 mol/L Gly	0	5,2 ± 0,02	2 ± 0,2	3,1 ± 0,30	9 ± 0,5	5,3 ± 0,25
35% saharoza / 1 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	7 ± 0,2	6,4 ± 0,18	11 ± 0,7	3,1 ± 0,29	10 ± 0,6	5,9 ± 0,23
0,1 mol/L maltoza / 0,75 mol/L Gly	1 ± 0,0	5,3 ± 0,00	3 ± 0,1	3,1 ± 0,00	6 ± 0,3	4,7 ± 0,34
0,1 mol/L maltoza / 0,05 mol/L NaCl / 0,3 mol/L Gly	1 ± 0,1	5,6 ± 0,37	-1 ± 0,4	2,9 ± 0,11	6 ± 0,2	5,0 ± 0,07
32 mmol/L CH ₃ (CH ₂) ₆ COONa / 0,16 mol/L NaCl / 2mmol/L KCl	-7 ± 0,4	4,9 ± 0,12	-11 ± 0,8	4,4 ± 0,12	20 ± 0,4	4,5 ± 0,18
5% glukoza	0	5,5 ± 0,25	-1 ± 0,2	3,8 ± 0,01	-1 ± 1,0	4,6 ± 0,27
0,15 mol/L NaCl	-1 ± 0,9	5,7 ± 0,28	-2 ± 0,7	3,2 ± 0,27	5 ± 0,5	5,2 ± 0,09

75 mmol/L Arg / 30 mmol/L glukoza	-1 ± 0,5	4,1 ± 0,04	-3 ± 0,1	3,8 ± 0,11	6 ± 0,4	5,1 ± 0,21
75 mmol/L Arg / 30 mmol/L maltoza	-2 ± 0,2	4,7 ± 0,29	-3 ± 0,1	3,8 ± 0,31	4 ± 1,0	5,0 ± 0,06
75 mmol/L Ser / 30 mmol/L glukoza	-1 ± 0,1	6,9 ± 0,07	0	3,1 ± 0,08	-3 ± 0,4	5,0 ± 0,00
75 mmol/L Ser / 30 mmol/L maltoza	-1 ± 0,3	6,8 ± 0,11	-1 ± 0,3	3,0 ± 0,17	-3 ± 0,2	4,7 ± 0,09
75 mmol/L Gly / 30 mmol/L glukoza	-1 ± 0,2	6,9 ± 0,05	0	2,9 ± 0,10	-2 ± 1,0	4,8 ± 0,11
75 mmol/L Gly / 30 mmol/L maltoza	-1 ± 0,1	6,9 ± 0,16	-1 ± 0,4	3,1 ± 0,04	-4 ± 0,7	4,9 ± 0,00
2 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	3 ± 1,0	no	no	3,3 ± 0,55	8 ± 0,4	6,8 ± 0,24
1 mol/L Na ₂ SO ₄	3 ± 0,6	10,2 ± 0,33	8 ± 1,4	2,8 ± 0,07	8 ± 0,3	5,7 ± 0,21
1 mol/L MgSO ₄	-2 ± 0,2	6,2 ± 0,18	0	3,4 ± 0,43	no	5,0 ± 0,06
2 mol/L MgSO ₄	-3 ± 1,2	9,3 ± 0,27	7 ± 0,3	2,7 ± 0,02	no	5,5 ± 0,06

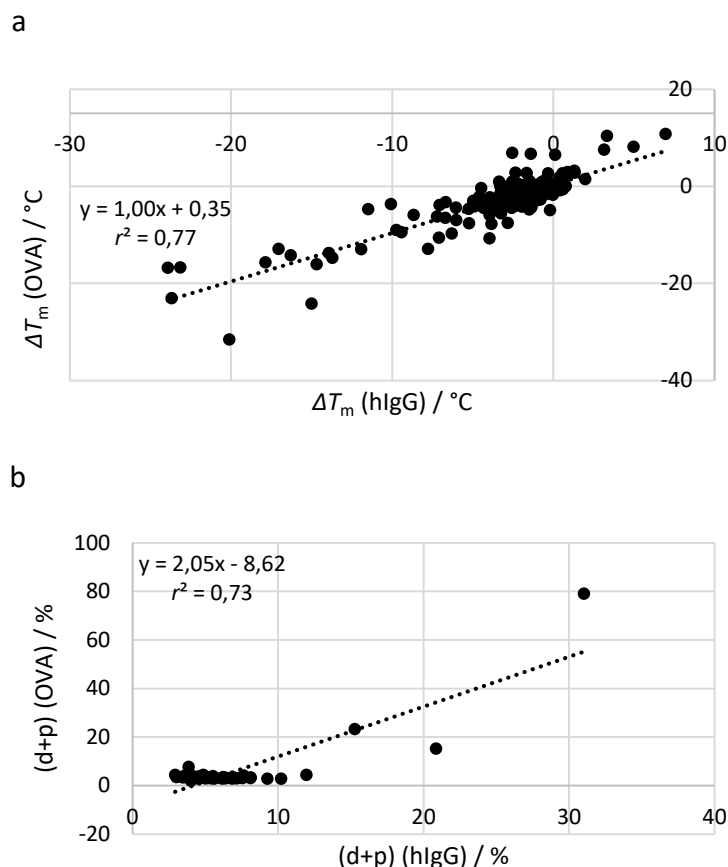
no – krivulja dobivena DSF-om nije bila pogodna za očitavanje T_m ; u SEC-HPLC-u nije bilo pikova koji odgovaraju proteinu – došlo je do potpunog taloženja proteina za vrijeme inkubacije

Usporedba rezultata dobivenih pomoću DSF-a i SEC-HPLC-a pokazala je da formulacije koje rezultiraju najvišim udjelom polimera također dovode do znatnog pada vrijednosti T_m (slika 12), ali da ne postoji korelacija između dviju metoda. Iako se uočava da drastične promjene u određenom T_m rezultiraju i povećanim udjelom dimera i polimera u uzorku, DSF se ne može koristiti za predviđanje sklonosti proteina agregaciji već je za to potrebno koristiti druge metode kao što je primjerice SEC-HPLC. Stabilnost proteina u pogledu sprječavanja agregacije iznimno je važna kod terapijskih proteina budući da agregati mogu izazvati imunološki odgovor te brojne nuspojave ukoliko su prisutni u korištenom pripravku¹⁶³⁻¹⁶⁵.



Slika 12. Korelacija rezultata stabilnosti proteina dobivenih metodom DSF i SEC-HPLC za hIgG (a) i OVA (b). Svaki T_m odnosno (d+p) je srednja vrijednost triplikata.

Rezultati ispitivanja stabilnosti proteina DSF-om pokazali su da otopine koje imaju stabilizirajući efekt za hIgG u pravilu stabiliziraju i OVA – pokazana je jaka pozitivna korelacija između T_m ($r=0,88$) određenih u istim otopinama za oba proteina, međutim takva korelacija nije uočena kod rezultata dobivenih SEC-HPLC-om (slika 13).



Slika 13. Korelacija rezultata stabilnosti hIgG i OVA dobivenih metodom DSF (a) i SEC-HPLC (b). Svaki T_m odnosno (d+p) je srednja vrijednost triplicate.

Formulacija koja pokazuje najviši T_m za oba proteina je 35% saharoza / 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a pokazala se kao odlična i prilikom ispitivanja agregacije proteina – sa samo 0,3% polimera u uzorku hIgG-a, odnosno 0,1% u uzorku OVA. Valja napomenuti da se niti hIgG niti OVA nisu taložili pri ovako visokim koncentracijama $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. I saharoza i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ otprije su poznati kao stabilizatori proteina. Saharoza se isključuje iz proteinskih domena što povećava gustoću pakiranja proteina, odnosno protein zauzima konformaciju u kojoj je najmanja površina izložena otapalu. U ovakvim uvjetima denaturacija, koja rezultira povećanjem površine dostupne otapalu, nije favorizirana jer je potrebno više energije za taj proces^{166,167}. Sulfatni ioni, kao i acetatni i fosfatni, su također otprije poznati po svom stabilizacijskom učinku na proteine¹⁶⁸. Iako ovako visoke koncentracije aditiva nisu prikladne za konačne formulacije bioloških lijekova, mogu biti korisne za stabilizaciju proteina prilikom pročišćavanja i obrade.

Zahtjevi regulatornih agencija navode da hIgG za terapijske svrhe tj. intravensku upotrebu smije sadržavati maksimalno 3% polimera odnosno agregata hIgG-a, dok udio monomera i dimera mora prelaziti 90%¹⁶⁹. Samo otopine koje su pokazivale izrazito veliki pad T_m -a (≥ 10

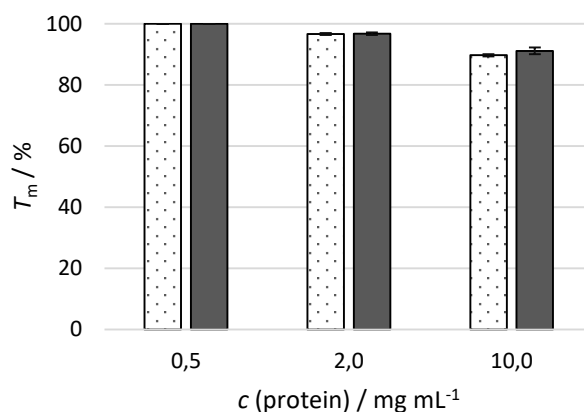
°C) nisu zadovoljavale ovakav uvjet što zapravo ukazuje na prilično dobru stabilnost hIgG-a pri različitim uvjetima.

Otopine koje su pokazale najveći destabilizirajući učinak sadržavale su citratni pufer pri pH 4,0 odnosno smjesu 0,12 mol/L $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COONa}$ / 0,25 mol/L NaCl. Nizak pH u citratnom puferu rezultira niskim vrijednostima T_m , a izaziva i jaku agregaciju i taloženje proteina za vrijeme inkubacije u takvom puferu. Čini se da sama puferska komponenta igra ulogu u stabilnosti hIgG-a budući da acetatni pufer pri pH 4,0 pokazuje T_m za 10 °C viši nego u citratnom puferu i u acetatnom puferu ne dolazi do agregacije niti precipitacije proteina. Za OVA nije uočena značajna razlika u T_m -u ili količini proteinskih agregata određenoj SEC-HPLC-om u uzorcima u citratnom odnosno acetatnom puferu pri pH 4,0, ali oba pufera uzrokovala su precipitaciju proteina – u prisutnosti citrata oko 81% proteina iz početnog uzorka je precipitalo, dok je za acetat taj iznos bio oko 23% (određeno iz omjera površine pika referentnog uzorka proteina i uzorka proteina u navedenim puferima). Ovi agregati nisu detektirani pomoću SEC-HPLC-a jer su prije kromatografske analize uklonjeni centrifugiranjem ili filtracijom kako ne bi došlo do začepljenja i oštećenja kolone. Pojava da su hIgG i OVA stabilniji u acetatnom puferu pri pH 4,0 u skladu je s ranije opisanim stabilizacijskim učinkom acetata na proteine¹⁶⁸, kao i s ranije pokazanom većom sklonošću hIgG-a da agregira u citratnim puferima¹⁷⁰, ali u suprotnosti s istraživanjima koja su pokazala da su proteini nestabilni u acetatnim puferima pri pH 5, dok su se citratni puferi pokazali kao dobri za stabilizaciju proteina pri pH 6¹⁵⁹. Ovakvi rezultati potvrđuju potrebu za individualnim pristupom svakom proučavanom proteinu.

Formulacije koje sadrže kaprilat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$) ne dovode do precipitacije proteina, ali pokazuju značajan porast udjela proteinskih agregata u uzorku – oko 17% za hIgG odnosno 14% za OVA ukoliko je u otopini prisutan samo 0,2 mol/L $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COONa}$, do 30% za hIgG odnosno čak 80% za OVA ukoliko se u otopini nalazi i 0,25 mol/L NaCl. Ono što je iznimno zanimljivo je da kaprilatni ioni stabiliziraju HSA i to kroz specifične interakcije¹⁷¹. Pozitivan utjecaj kaprilata na stabilnost HSA pri povišenim temperaturama podupiru rezultati dobiveni DSF-om koji pokazuju da u prisutnosti kaprilatnih iona dolazi do porasta T_m -a između 15 i 20 °C, a što je u skladu s korištenjem kaprilatnih iona za stabilizaciju HSA za intravensku upotrebu koji je prilikom proizvodnje izložen povišenoj temperaturi za vrijeme pasterizacije^{172,173}.

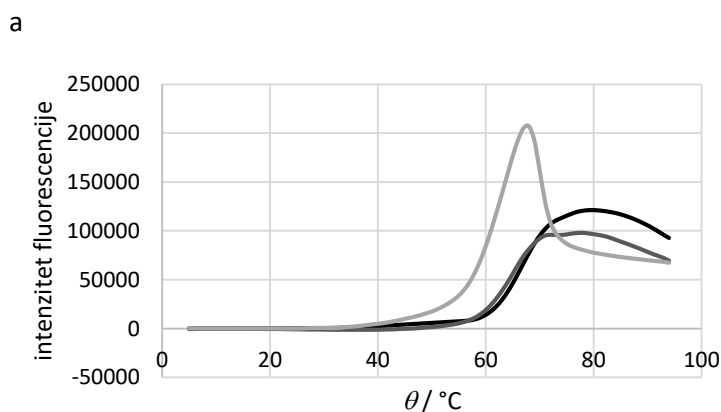
U navedenim otopinama (tablica 12) ispitan je i utjecaj koncentracije hIgG i OVA u reakcijskoj smjesi na T_m određen DSF-om (slika 14). Povećanje koncentracije hIgG i OVA rezultiralo je padom vrijednosti T_m -a kod oba proteina, i to za 3% pri koncentraciji 2 mg/mL,

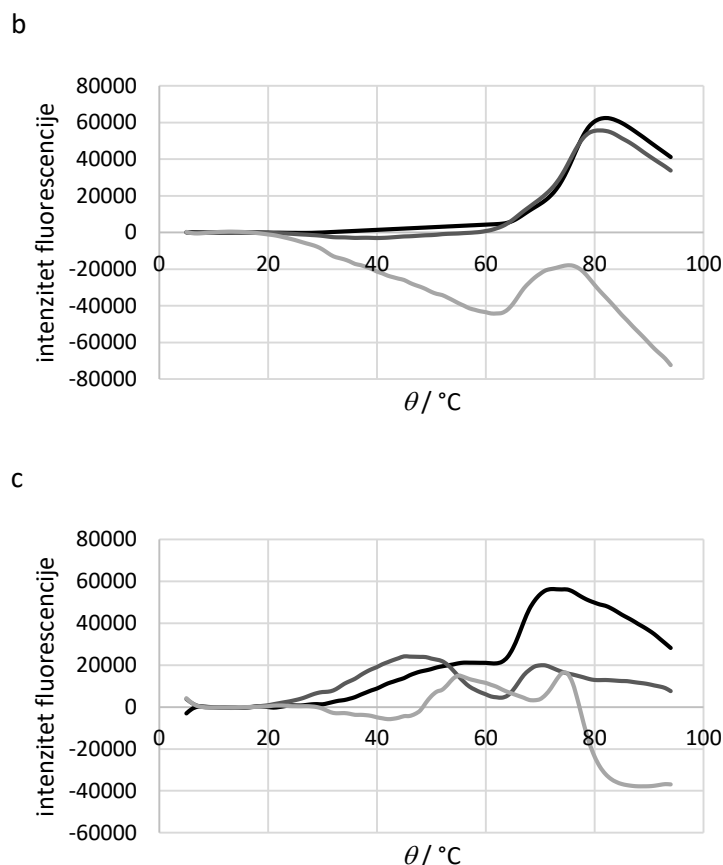
odnosno za 10% za pri koncentraciji 10 mg/mL. U pravilu je to očekivano jer veća koncentracija proteina lakše rezultira agregacijom u nepovoljnim uvjetima, a sklonost proteina agregaciji se u pravilu povezuje s njegovom stabilnošću^{165,174}.



Slika 14. Utjecaj koncentracije proteina na određeni T_m za hIgG (bijeli stupci) i OVA (sivi stupci). T_m određen pri 0,5 mg/mL ima zadanu vrijednost 100%, a dobiven je kao srednja vrijednost \pm SEM svih T_m -ova dobivenih pri toj koncentraciji proteina ($n=3$).

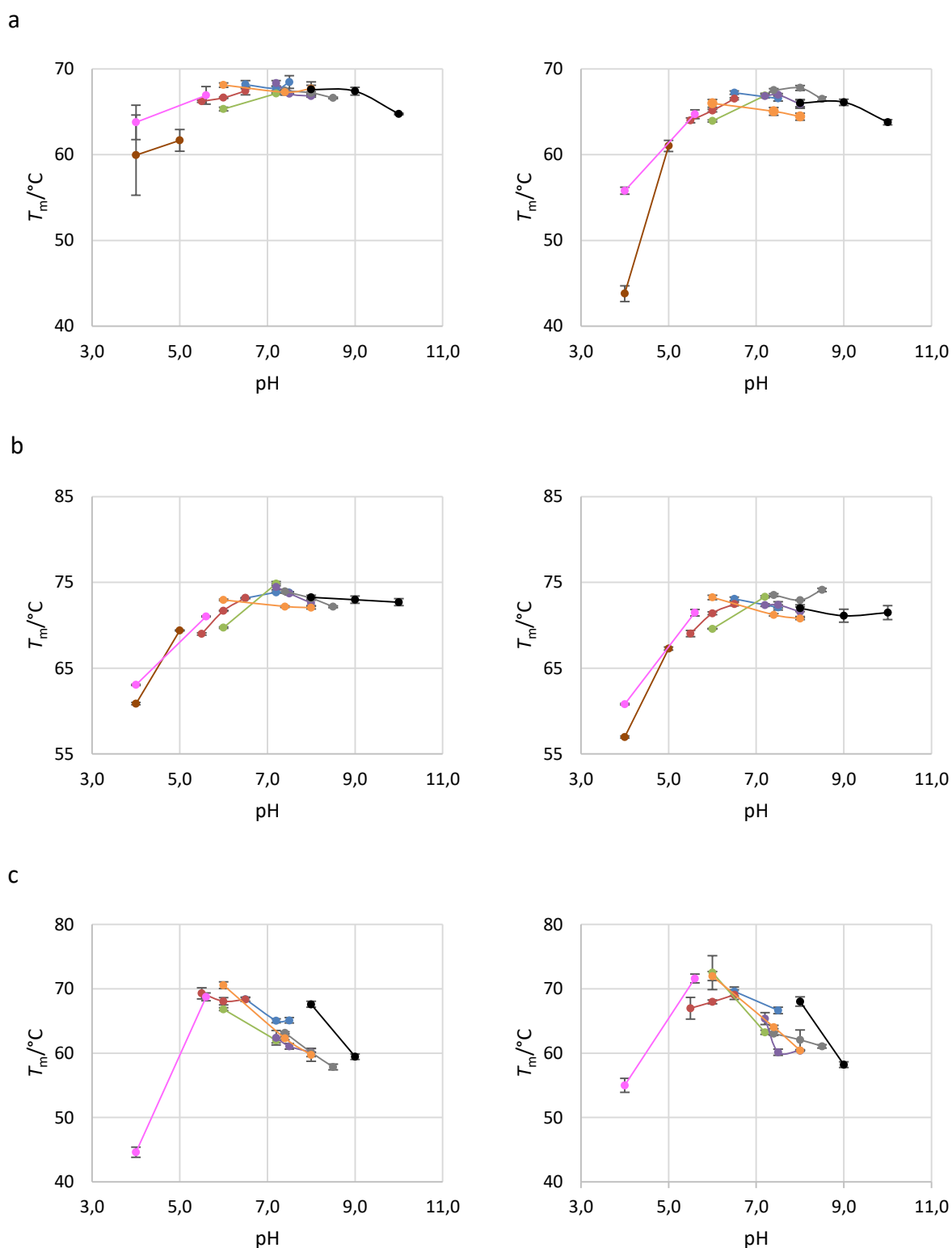
Uočeno je i da više koncentracije proteina rezultiraju krivuljama lošije kvalitete (slika 15), što djelomice može biti posljedica agregacije proteina. Agregacija je uočena u vidu zamućenja otopine u nekim uzorcima s 2 i 10 mg/mL proteina po završetku DSF-a, ali nije opažena korelacija između krivulja lošije kvalitete i pojave agregacije. Pritom je za hIgG bilo moguće očitati T_m iz svih krivulja dobivenih pri višim koncentracijama, za OVA bilo problematično očitati T_m iz većine krivulja pri koncentraciji 10 mg/mL, dok je za HSA problematično bilo već i očitavanje T_m iz krivulja pri 2 mg/mL. Ovo ponovo potvrđuje dobru stabilnost hIgG-a u različitim uvjetima.





Slika 15. Usporedba krivulja dobivenih DSF-om pri različitim koncentracijama hIgG (a), OVA (b) i HSA (c) u PBS-u. Crna linija – 0,5 mg/mL proteina, tamnosiva linija – 2 mg/mL proteina, svijetlosiva linija – 10 mg/mL proteina.

Ispitana je stabilnost ovih proteina u različitim puferima pri različitim pH vrijednostima, a pritom su ispitane dvije koncentracije puferskih komponenti – 20 mmol/L i 100 mmol/L (slika 16). Sva tri proteina pokazuju očekivano ponašanje u rasponu pH vrijednosti od pH 4 do pH 10, pri čemu su najviše vrijednosti T_m određene oko fiziološkog pH kao što je i očekivano. Čini se da puferne komponente kao takve ne pokazuju znatan utjecaj na stabilnost proteina (osim citrata i acetata što je već komentirano), pogotovo pri fiziološkim uvjetima. Povećanje koncentracije puferne komponente rezultira tek blagim sniženjem T_m -a. Ipak, utjecaj pH i pufernih komponenata te njihovih koncentracije na stabilnost proteina može značajno varirati ovisno o proteinu o kojem se radi, kao što je vidljivo na primjeru hIgG-a u citratu i acetatu pri pH 4 i dvije različite koncentracije pufera. Vidljivo je da je HSA nestabilniji pri alkalnom pH u usporedbi s hIgG i OVA, a kada se u obzir uzmu i gore dobiveni rezultati o utjecaju kaprilatnih iona na stabilnost ova tri proteina, očigledno je da je nužna individualna analiza za svaki protein za koji se žele odrediti najpovoljniji uvjeti.



Slika 16. Utjecaj pH u različitim puferima pri koncentraciji 20 mmol/L (lijevo) i 100 mmol/L (desno) na stabilnost hIgG (a), OVA (b) i HSA (c). plavo – MOPS, crveno – MES, zeleno – Bis-Tris, ljubičasto – HEPES, sivo – Tricin, narančasto – fosfatni pufer, crno – Tris, smeđe – citratni pufer, ružičasto – acetatni pufer. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=3$.

Metodom DSF ispitan je i utjecaj tvari koje se uobičajeno koriste za denaturaciju proteina, kao što su urea, gvanidin hidroklorid (GuHCl) i KSCN, na stabilnost proteina. Pritom je ispitano više koncentracija, obzirom da male koncentracije GuHCl i uree mogu pomoći u stabilizaciji proteina sklonih agregaciji¹⁵⁸. Rezultati pokazuju da niže koncentracije (2 ili 4 mol/L) mogu denaturirati neke proteine (tablica 13), ali samo najviše koncentracije mogu osigurati potpunu denaturaciju svih proteina. Pritom su GuHCl i KSCN efikasniji od uree u denaturaciji pri nižim koncentracijama, vjerojatno zato jer kao nabijene vrste bolje kompetiraju za elektrostatske interakcije od neutralne uree.

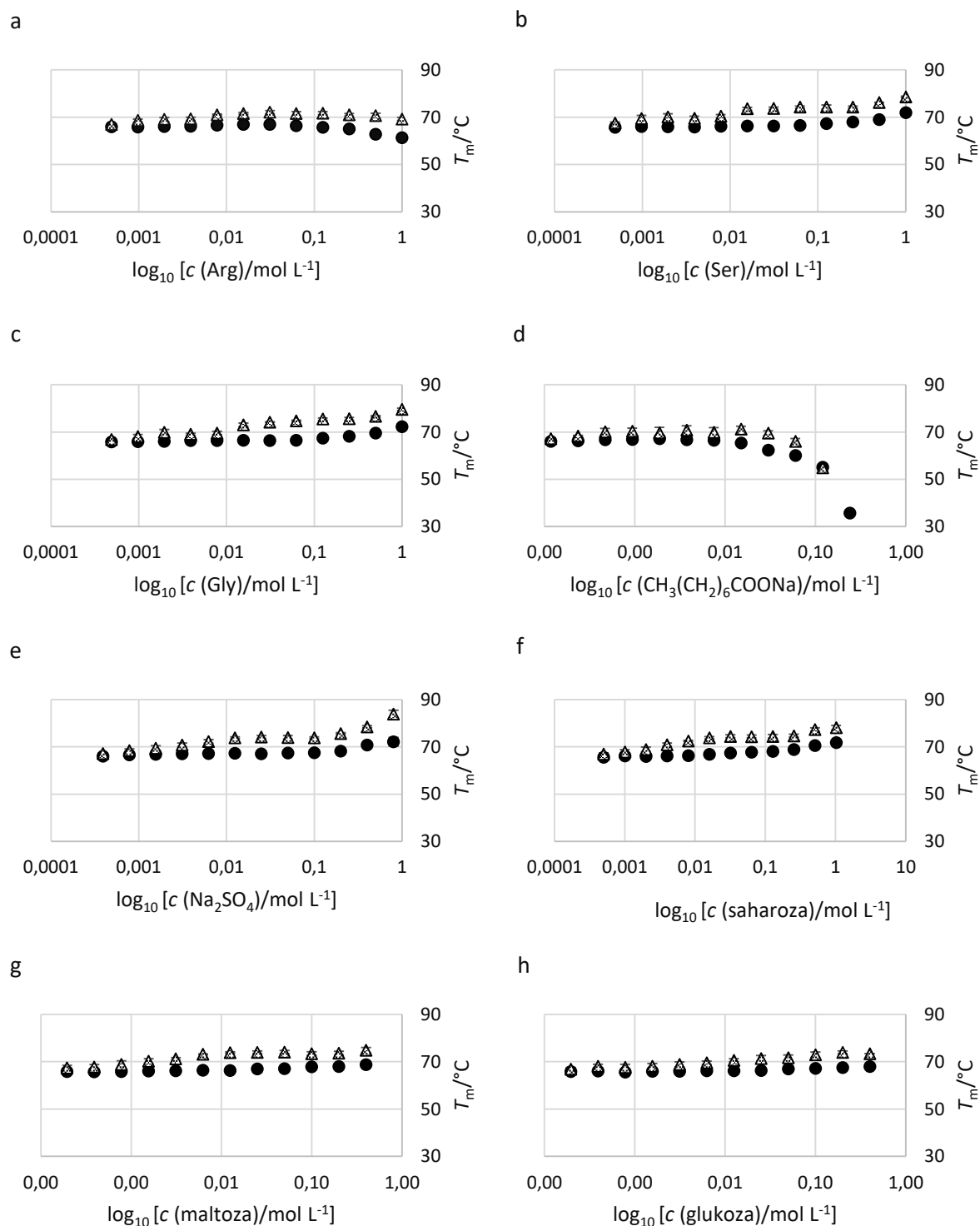
Tablica 13. Utjecaj različitih koncentracija denaturirajućih tvari na stabilnost proteina. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=3$.

$c / \text{mol L}^{-1}$		6,0	4,0	2,0	1,0	0,5	0,1
		$T_m / ^\circ\text{C}$					
hIgG	GuHCl	pd	pd	no	$44 \pm 0,2$	$54 \pm 0,4$	$62 \pm 0,4$
	urea	pd	$51 \pm 0,5$	$61 \pm 0,2$	$63 \pm 0,3$	$66 \pm 0,2$	$66 \pm 0,5$
	KSCN	pd	pd	no	$51 \pm 0,6$	$58 \pm 0,3$	$66 \pm 0,1$
OVA	GuHCl	pd	pd	pd	$51 \pm 0,8$	$59 \pm 0,2$	$66 \pm 0,3$
	urea	pd	$60 \pm 0,3$	$68 \pm 0,5$	$70 \pm 0,6$	$71 \pm 0,3$	$71 \pm 0,3$
	KSCN	pd	pd	$55 \pm 0,5$	$61 \pm 0,2$	$65 \pm 0,2$	$70 \pm 0,4$
HSA	GuHCl	pd	pd	pd	no	$58 \pm 0,9$	no
	urea	pd	pd	$47 \pm 3,0$	$52 \pm 0,9$	$65 \pm 0,5$	$66 \pm 0,2$
	KSCN	pd	pd	pd	no	no	$67 \pm 1,1$

pd – potpuno denaturirano već na početku mjerenja

no – nije određeno (krivulja nije bila pogodna za očitavanje T_m -a)

Pomoću DSF-a ispitan je utjecaj koncentracije odabranih aditiva na stabilnost hIgG i OVA u serijski razrijeđenim otopinama Arg, Ser, Gly, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COONa}$, Na_2SO_4 , saharoze, maltoze i glukoze (slika 17).



Slika 17. Utjecaj koncentracije Arg (a), Ser (b), Gly (c), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COONa}$ (d), Na_2SO_4 (e), saharoze (f), maltoze (g) i glukoze (h) na stabilnost hIgG (crne točke) i OVA (bijeli trokutići). Koncentracija proteina u reakcijskim smjesama iznosila je 0,5 mg/mL. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=3$.

Pokazalo se da povećane koncentracije kaprilata i Arg rezultiraju smanjenom vrijednošću T_m -a, dok druge otopine pokazuju blagi stabilizacijski učinak s porastom koncentracije. Aminokiseline poput Ser i Gly te šećeri često se koriste kao stabilizatori proteina, ali i virusa^{95,157,163,165,175,176}, a ovi rezultati su u skladu s time. Arg se često svrstava pod stabilizatore, iako on ne stabilizira proteine kao neke druge aminokiseline koje stabiliziraju strukturu, već djeluje kao inhibitor agregacije proteina^{140–143}. Ovi eksperimenti pokazuju da Arg u koncentracijama do 30 mmol/L dovodi do blagog porasta T_m , što ukazuje na pozitivne efekte prisutnosti Arg, ali daljnji porast njegove koncentracije dovodi do pada T_m -a, odnosno Arg pokazuje destabilizacijski učinak. Zanimljivost je da je analizom SEC-HPLC utvrđeno da visoke koncentracije Arg i imidazola (0,75 mol/L za svaki od aditiva) potiču stvaranje značajne količine agregata (tablica 12). Taj efekt se kod hIgG-a može pripisati djelovanju imidazola jer do znatne agregacije dolazi i u otopini koja sadrži samo 0,75 mol/L imidazol, ali OVA pokazuje znatno veću agregaciju u formulacijama koje sadrže Arg i imidazol u usporedbi s formulacijama koje sadrže samo imidazol. Ovo je neočekivano obzirom na gore spomenutu dobro poznatu ulogu Arg kao supresora i inhibitora agregacije^{141,142}.

4.2.2. Određivanje stabilnosti virusa u otopinama aminokiselina i soli koje se koriste u postupcima pročišćavanja

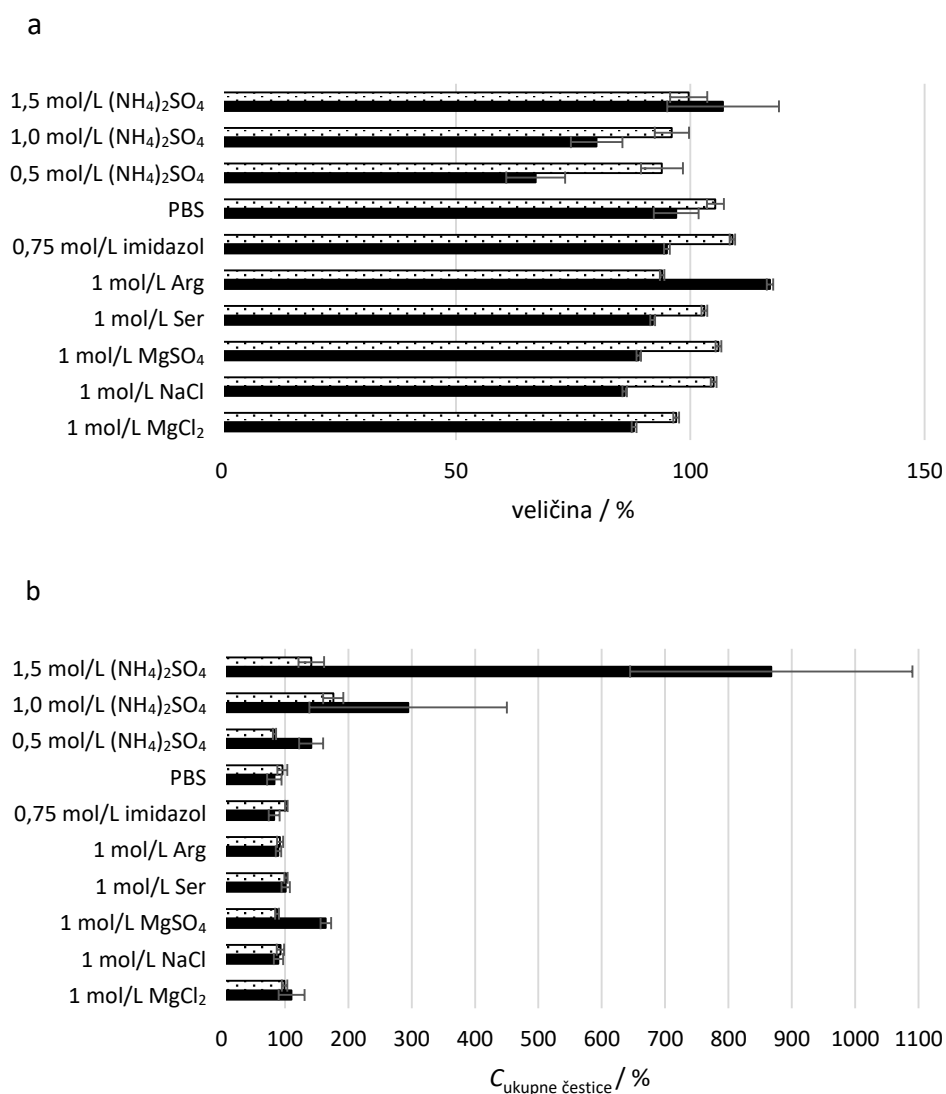
Kao i kod pročišćavanja i koncentriranja proteina, tako se i prilikom pročišćavanja i koncentriranja virusa mogu koristiti različiti aditivi i puferi, a koji mogu imati stabilizacijski ili destabilizacijski učinak. Sve to znatno utječe na kvalitetu konačnog virusnog pripravka, a pogotovo na količinu infektivnih čestica za koju je cilj da bude što veća. Stoga je ispitan utjecaj nekih aminokiselina i soli koje se koriste prvenstveno u kromatografijama (HIC, IEX, AC i IAC) na infektivnost MuV-a i MeV-a.

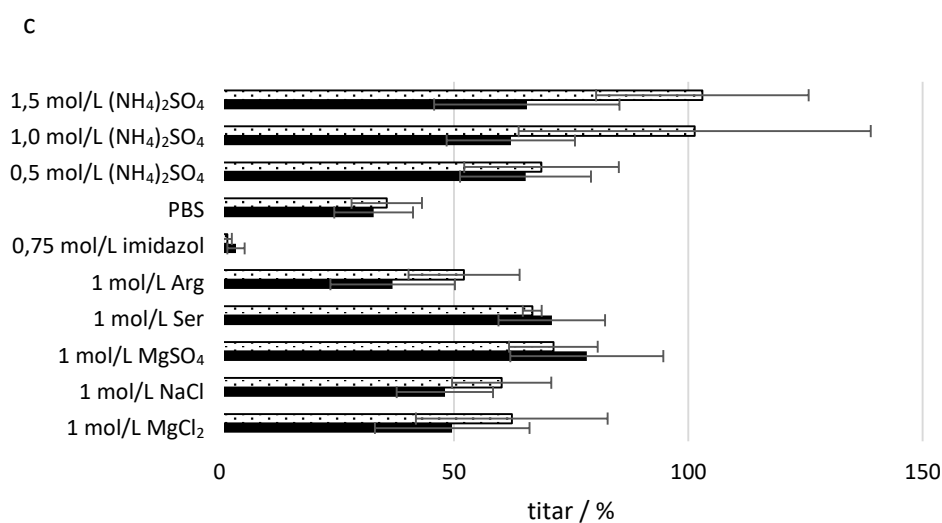
Utjecaj na veličinu i koncentraciju ukupnih čestica također je ispitan, ali valja uzeti u obzir da visoke koncentracije tvari u otopinama mogu utjecati na viskoznost otopina tj. virusnih suspenzija, što utječe na samu analizu NTA, ali mogu dovesti i do smanjenja virusnih čestica uslijed visokog osmotskog tlaka, odnosno povećanja uslijed agregacije. U slučaju kad su iz literature bili poznati podaci o koeficijentu viskoznosti, kao što je to u slučaju $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ¹⁷⁷, korekcija je unesena u programski alat koji izračunava veličinu čestica. U ostalim slučajevima, veličina čestica u otopinama visokih koncentracija ispitivanih tvari izmjerena je neposredno nakon pripreve. Pod pretpostavkom da u tom kratkom vremenskom periodu nije došlo do značajne agregacije ili smanjenja čestica zbog osmoze, uočena razlika u veličini je u takvim

uzorcima u potpunosti pripisana razlici u viskoznosti mjenenog uzorka u odnosu na početni, odnosno taj podatak korišten je kao referentna vrijednost za procjenu je li došlo do agregacije ili smanjenja čestica u uzorku.

Sastav otopina ponekad može utjecati i na raspršenje svjetlosti s čestica zbog čega usporedivost rezultata u otopinama različitog sastava nije uvijek moguća, ali trenutno ne postoji način kojim bi se ovaj problem mogao zaobići.

MuV i MeV inkubirani su 2 h pri 21 °C u različitim otopinama (slika 18) nakon čega je određen titar virusa testom određivanja CCID₅₀.





Slika 18. Veličina (a), koncentracija ukupnih čestica (b) i infektivnost (c) MeV-a (crni stupići) i MuV-a (bijeli stupići) u otopinama učestalo korištenim prilikom kromatografskih pročišćavanja virusa nakon inkubacije 2 h pri sobnoj temperaturi u mraku. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 3$.

Postotak zadržane infektivnosti u ovom slučaju računat je prema mikrofiltriranom početnom uzorku koji je odmah stabiliziran kako bi se procijenilo na koji način na infektivnost djeluje inkubacija virusa u odabranoj otopini, a ne samo dodatak aditiva virusnoj suspenziji.

Slika 18 pokazuje rezultate eksperimenata u kojima je ispitivana stabilnost virusa u otopinama koje se učestalo koriste prilikom kromatografskih pročišćavanja virusa, zbog čega su virusi inkubirani samo 2 h u tim otopinama. Rezultati pokazuju da MeV najbolje zadržava infektivnost u otopinama koje sadrže MgSO₄, Ser i (NH₄)₂SO₄ te pritom nakon dva sata zadržava 65 – 78% infektivnosti. MuV najbolje zadržava infektivnost u otopinama s visokim koncentracijama (NH₄)₂SO₄ gdje praktički ne dolazi do gubitka infektivnosti, a očuvanje visokog postotka infektivnosti uočeno je i u otopini s MgSO₄. Zanimljivo je uočiti da povećanje koncentracije (NH₄)₂SO₄ od 0,5 do 1,5 mol/L nije pokazalo pozitivan učinak na stabilnost MeV-a, ali jest u slučaju MuV-a gdje povećanje koncentracije s 0,5 na 1,0 mol/L pokazuje porast očuvane infektivnosti za 30%. Ovakvi rezultati u otopinama koje sadrže sulfatne ione mogu se objasniti njihovom ranije uočenom stabilizacijskom ulogom⁹³, ali je iznenađujuće da visoke koncentracije soli, pogotovo (NH₄)₂SO₄, koje mogu stvoriti visoki osmotski tlak¹⁰ nisu dovele do gubitka infektivnosti virusa. Valja napomenuti da (NH₄)₂SO₄ i imidazol mogu u testu određivanja CCID₅₀ izazvati citotoksični efekt zbog čega je test moguće izvesti samo na uzorcima s visokom koncentracijom infektivnih čestica koja omogućava velika razrjeđenja početnih otopina.

Inkubacija MuV-a i MeV-a u otopinama koje sadrže $MgCl_2$ i $NaCl$ dovodi do smanjenja infektivnosti virusa, dok inkubacijom u otopinama imidazola dolazi do gotovo potpune inaktivacije virusa što je već i ranije uočeno^{10,14,93,95}.

Aminokiseline poput Ser i Arg često se koriste kao stabilizatori u cjepivima i drugim biofarmaceutskim pripravcima^{95,178} stoga je očekivan rezultat da Ser doprinosi stabilnosti MeV-a. Arg djeluje kao inhibitor agregacije proteina^{140–143}, a pokazano je i da djeluje kao dobar stabilizator virusa u cjepivima⁹⁵, ali u ovom slučaju dodatak Arg nije pokazao stabilizirajući učinak. Razlog tome je vjerojatno visoka koncentracija Arg koja, kao što je pokazano na primjeru hIgG i OVA, može uzrokovati protuefekt.

Posebnu zanimljivost u ovim rezultatima predstavlja uzorak u kojem su MuV i MeV inkubirani u otopini PBS-a koji simulira fiziološke uvjete, a u kojem virusi tijekom 2 h gube gotovo 65% početne infektivnosti. Početna pretpostavka bila je da se takav rezultat javlja zbog niske točnosti i visoke varijabilnosti testa određivanja CCID₅₀ zbog čega su izvedeni dodatni eksperimenti u kojima su virusne suspenzije razrijeđene s PBS-om, MEM-H-om ili MOPS-om i odmah stabilizirane, bez prethodne inkubacije, nakon čega je određena infektivnost virusa u takvim uzorcima. Rezultati su pokazali da uslijed samog razrjeđivanja virusa ovim otopinama dolazi do pada infektivnosti MeV-a na 57%, odnosno kod MuV-a na 70%. Slični rezultati dobiveni su za PBS i u eksperimentima u kojima su virusi inkubirani 24 h, a za MeV je i inkubacija u 20 mmol/L MOPS-u odnosno HEPES-u dala slične rezultate (odjeljak 4.2.3, slika 19), međutim inkubacija MuV-a 24 h u MOPS-u i HEPES-u pokazala je znatno bolje očuvanje infektivnosti nego u PBS-u. Uzrok ovog fenomena zasad je nejasan, ali postoji mogućnost da samo razrjeđivanje virusa predstavlja stres i rezultira smanjenom infektivnošću kao što je pokazano za adenovirus¹⁷⁹.

Usporedba veličine čestica u ispitivanim otopinama ne ukazuje na pojavu agregacije ili na smanjenje čestica uslijed visokog osmotskog tlaka. Slično je i s koncentracijom ukupnih čestica u uzorku, ali otopine koje sadrže sulfatne ione očito na neki način doprinose boljem raspršenju svjetlosti s čestica budući da je u takvim uzorcima metodom NTA detektirano znatno više čestica nego u početnom uzorku.

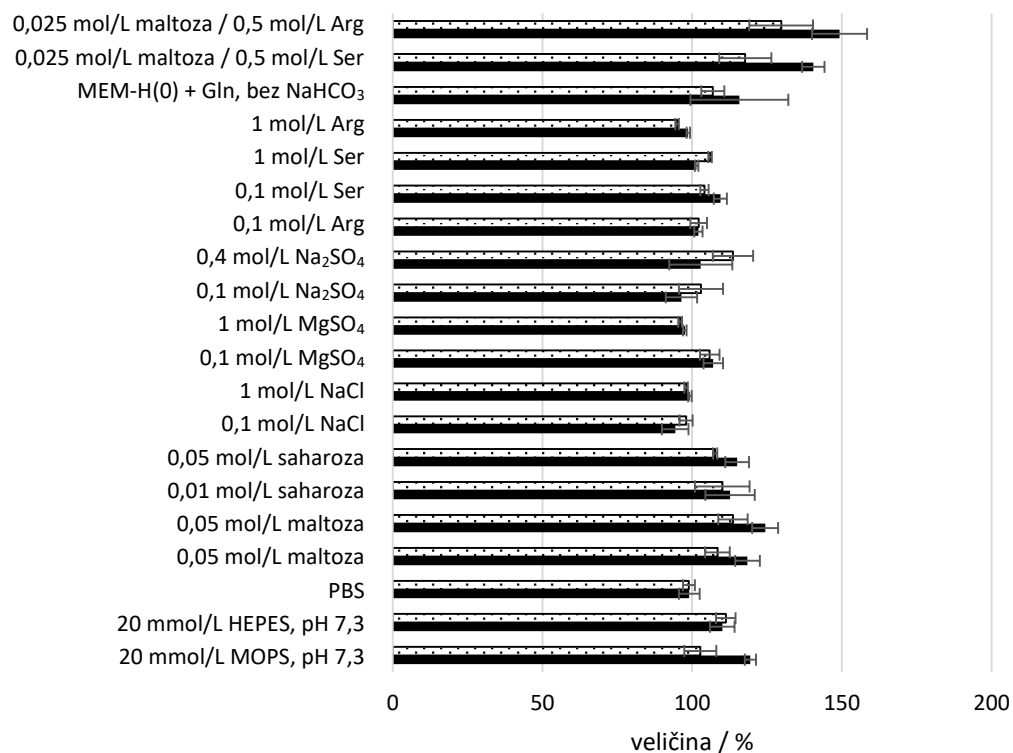
4.2.3. *Određivanje stabilnosti virusa u otopinama - ispitivanje potencijalnih stabilizatora*

MuV i MeV inkubirani su 24 h pri 21 °C u različitim otopinama koje bi mogle imati stabilizirajući učinak na viruse, nakon čega je testom određivanja CCID₅₀ određen titar virusa (bez prethodne stabilizacije), a izmjerene su i veličina te koncentracija ukupnih čestica u

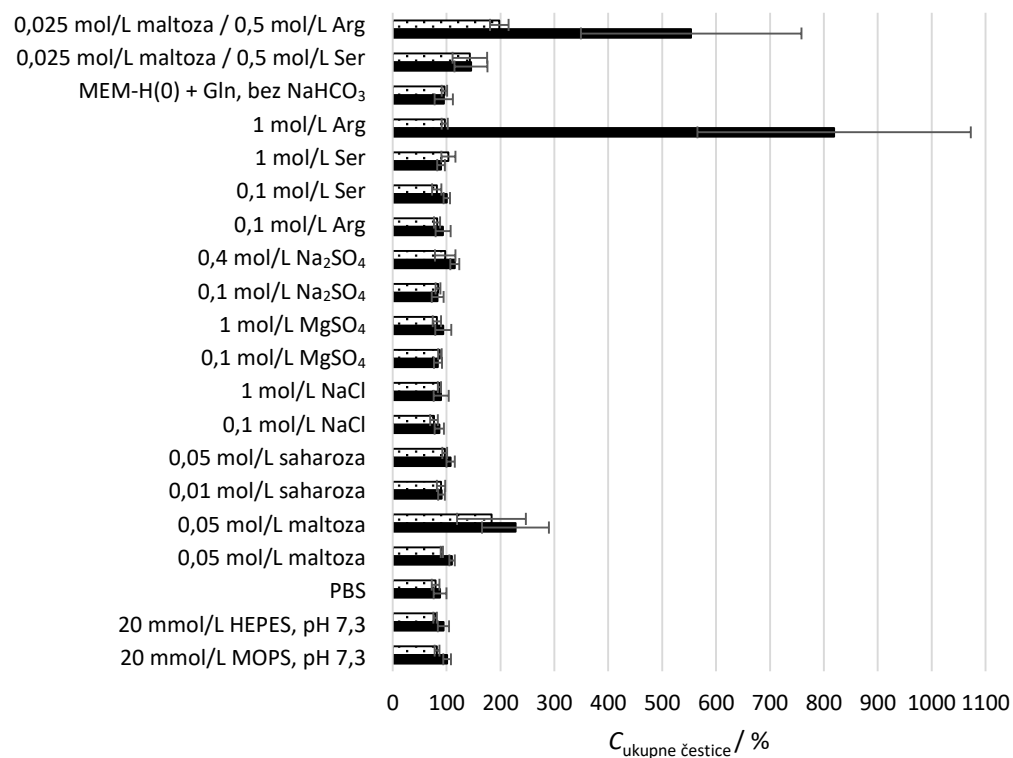
uzorcima (slika 19). Ove otopine odabrane su temeljem rezultata dobivenih ispitivanjem stabilnosti modelnih proteina DSF-om, a potencijalni su kandidati za konačnu formulaciju cjepiva. Inkubacija je trajala 24 h pri sobnoj temperaturi budući da je jedan od problema u proizvodnji, transportu i administraciji cjepiva održavanje tzv. „hladnog lanca“ (engl. *cold chain*) tj. čuvanje cjepiva pri niskim temperaturama koje osiguravaju održavanje dovoljne količine infektivnih čestica u cjepivu. Brojna istraživanja danas su stoga usmjerena na pronalaženje formulacija koje osiguravaju temperaturnu stabilnost cjepiva kroz što dulji vremenski period, što bi omogućilo smanjenje troškova transporta i čuvanja cjepiva^{90,95,180,181}.

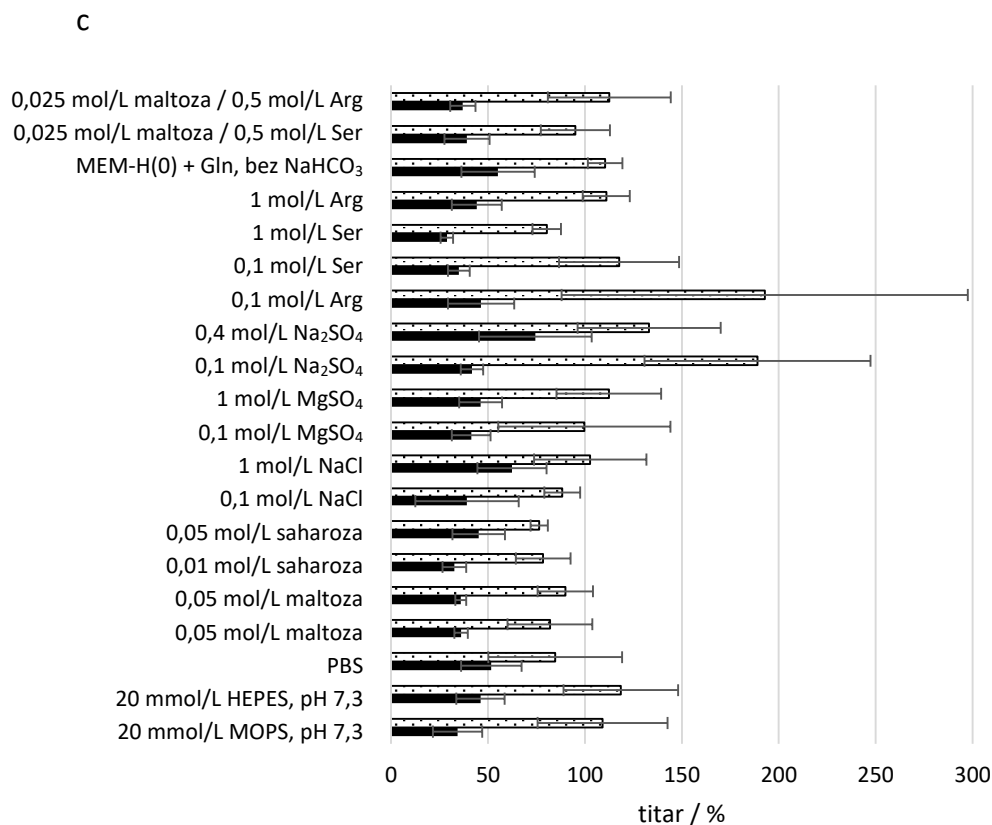
Dobiveni rezultati pokazuju da u svim testiranim otopinama MuV ne gubi više od 25% infektivnosti kroz 24 h, za razliku od MeV-a koji gubi između 25 i 70% infektivnosti, ovisno o formulaciji u kojoj se nalazi. MuV pokazuje najveću zadržanu infektivnost u otopinama koje sadrže 0,1 mol/L Arg i Na₂SO₄ što je opet u skladu s poznatom ulogom Arg kao stabilizatora^{95,178} te opisanom protektivnom ulogom sulfatnih iona⁹³, a slično se pokazalo i za MeV kod kojeg je maksimalni broj infektivnih čestica prisutan u otopini s 0,4 mol/L Na₂SO₄. Općenito se čini da je MeV osjetljiviji od MuV-a što bi moglo objasniti zašto viša koncentracija sulfatnih iona bolje stabilizira MeV. Iznenađujuće, Arg nije pokazao stabilizacijski učinak na MeV, ali obzirom da je na primjeru proteina pokazano da visoke koncentracije Arg mogu imati suprotni učinak, moguće je da su ovdje ispitane koncentracije Arg previsoke tj. da bi još niže koncentracije Arg bolje stabilizirale MeV. Zanimljivo je i da Ser, koji se pokazao kao dobar stabilizator kroz 2 h, ne doprinosi stabilizaciji MeV kroz 24 h, dapače, u otopini 1 mol/L Ser MeV pokazuje najmanji postotak zadržane infektivnosti nakon 24 h. MuV pokazuje najveći gubitak infektivnosti u 0,05 mol/L saharozu što je neočekivano obzirom da je saharoza učestalo korišteni stabilizator i za viruse i proteine.

a



b





Slika 19. Veličina (a), koncentracija ukupnih čestica (b) te infektivnost (c) MeV-a (crni stupići) i MuV-a (bijeli stupići) u otopinama učestalo korištenim u stabilizatorima cjepiva nakon inkubacije 24 h pri sobnoj temperaturi u mraku. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=3$.

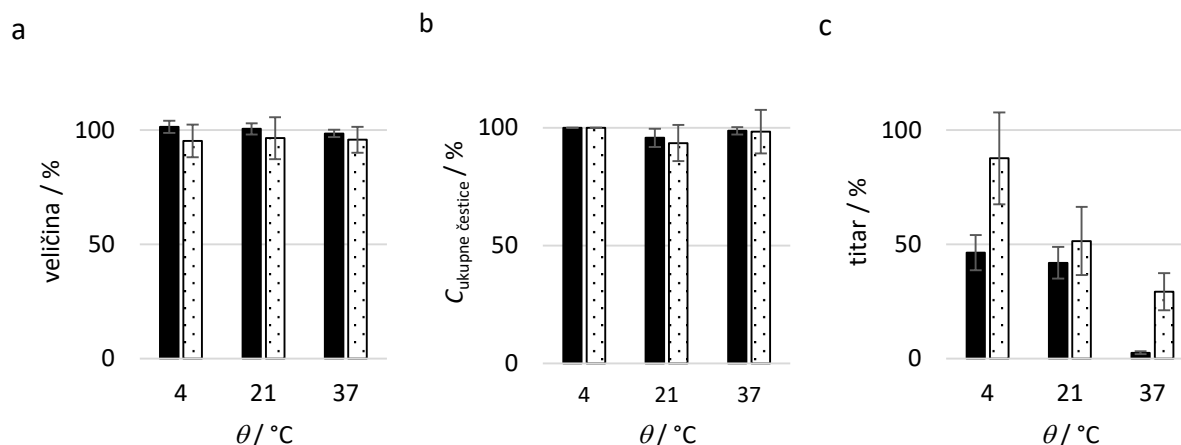
Zanimljivo je da oba virusa zadržavaju visoki udio infektivnih čestica u otopini 1 mol/L NaCl - oko 60% za MeV, dok za MuV nije uočen gubitak infektivnosti. Ovo je u suprotnosti s rezultatima dobivenima prilikom inkubacije tijekom 2 h, ali postoje indicije da i visoke koncentracije NaCl mogu doprinijeti stabilnosti ovih virusa⁹³.

Usporedba veličine čestica niti u ovim uvjetima ne ukazuje na pojavu agregacije ili na smanjenje čestica, a i koncentracija ukupnih čestica u uzorku ostaje konstantna, s iznimkom otopina koje sadrže Arg i maltozu, a koje očito također doprinose boljem raspršenju svjetlosti s čestica obzirom na znatno više izmjerene koncentracije čestica u takvim uzorcima.

4.2.4. Određivanje stabilnosti virusa u ovisnosti o temperaturi

Za ispitivanje stabilnosti MuV-a i MeV-a u ovisnosti o temperaturi, virusne suspenzije inkubirane su 24 h pri 4, 21 i 37 °C (slika 20). Rezultati pokazuju da su MuV i MeV stabilni pri sve tri ispitane temperature obzirom na veličinu i koncentraciju ukupnih čestica. Ispitivanje infektivnosti pokazalo je međutim da je MuV znatno stabilniji od MeV-a što se najbolje vidi

pri 37 °C jer MuV nakon 24 h zadržava oko 30% infektivnosti, dok kod MeV-a to iznosi samo 2%. Rezultati ukazuju na to da pri temperaturi od 21 °C MeV pokazuje jednaku stabilnost kao i pri 4 °C, dok se za MuV na prvi pogled čini da dolazi do značajnog pada infektivnosti, ali je statistička analiza podataka pokazala da razlike između rezultata pri 4 i 21 °C nisu statistički značajne niti za jedan od virusa.

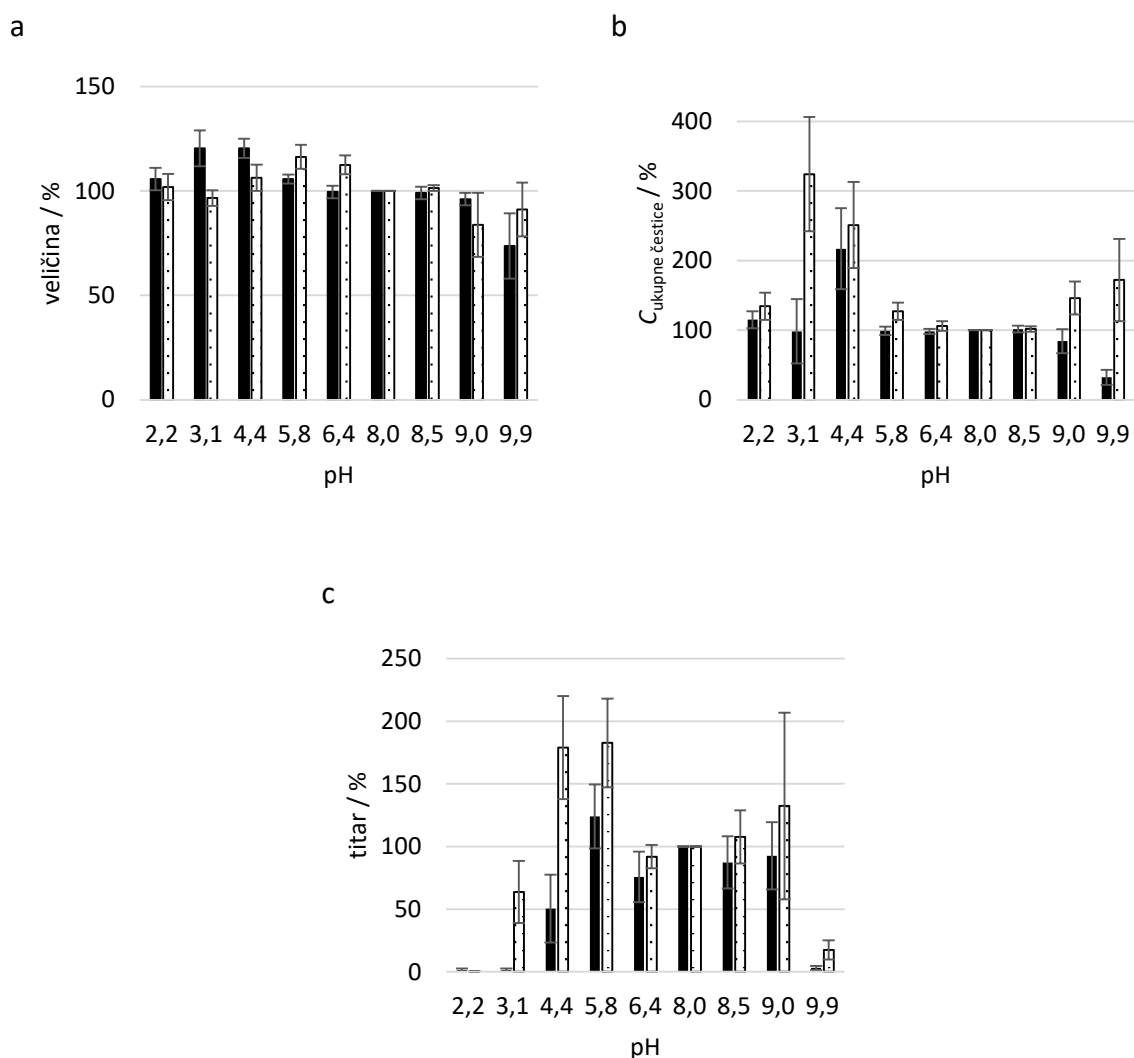


Slika 20. Utjecaj temperature na veličinu (a), koncentraciju ukupnih čestica (b) te infektivnost (c) MeV-a (crni stupići) i MuV-a (bijeli stupići). Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 4$.

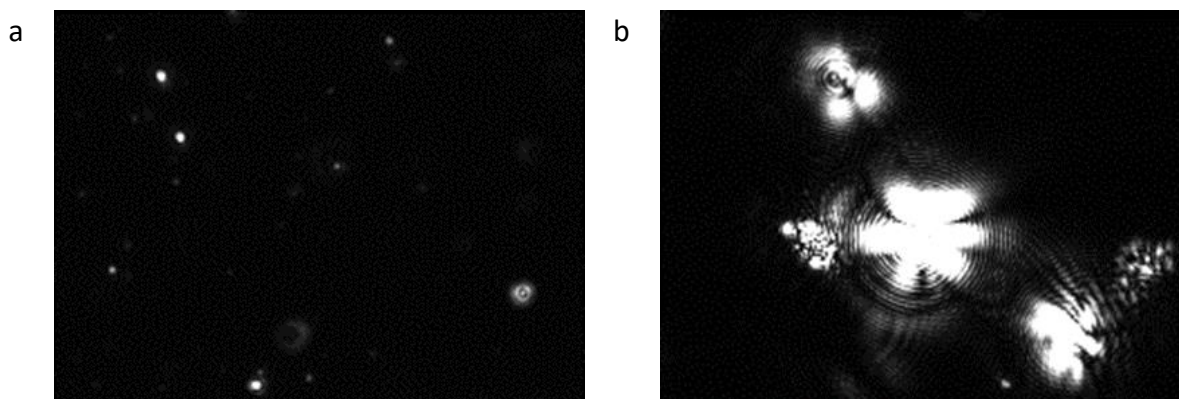
Ovo je zanimljivo jer je otprije poznato kako je MeV prilično osjetljiv na povišene temperature^{14,91,92}. Uzrok drugačijim rezultatima od onih opisanih u literaturi može biti razlika u korištenim virusnim sojevima ili stanicama korištenim za uzgoj virusa. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da zapravo nema razlike u stabilnosti ovih virusa pri 4 i 21 °C, ali MuV pokazuje bolje očuvanje infektivnosti od MeV pri svim ispitanim temperaturama. Kad se ovi rezultati usporede s rezultatima ispitivanja stabilnosti virusa u otopinama koje su potencijalni kandidati za formulacije u cjepivima (također kroz 24 h), može se zaključiti da se gubitak infektivnosti u uzorcima MeV-a zapravo može u potpunosti pripisati termičkoj inaktivaciji virusa. S druge strane, rezultati dobiveni za MuV mogu se interpretirati kao da sve ispitane otopine stabiliziraju MuV što nije vjerojatno. Izgledno je da visoka varijabilnost testa određivanja CCID₅₀ i njegova ograničena točnost u ovom slučaju otežavaju ispravnu interpretaciju rezultata. Moguće rješenje problema bilo bi izvođenje znatno većeg broja eksperimenata što bi rezultiralo smanjenim rasapom podataka i omogućilo bolju interpretaciju.

4.2.5. Stabilnost virusa pri različitim pH vrijednostima

Ispitana je stabilnost oba virusa u rasponu pH vrijednosti od pH 2,2 do pH 9,9 (slika 21). Usporedbom veličine virusnih čestica u otopinama različitih pH vrijednost uočava se da promjena pH ne utječe značajno na veličinu čestica osim pri izrazito alkalnim uvjetima (slika 21a) pri čemu dolazi do agregacije. Pritom valja naglasiti da veličina čestica pri pH 9,9 koju izračunava programski alat nije realna jer su agregati čestica jasno vidljivi pomoću kamere instrumenta (slika 22), međutim analiza video-zapisa Brownovog gibanja čestica podcjenjuje veličinu čestica, najvjerojatnije zbog vrlo intenzivnog raspršenja svjetlosti što uzrokuje pogreške u izračunu.



Slika 21. Utjecaj pH na veličinu (a), koncentraciju ukupnih čestica (b) te infektivnost (c) MeV-a (crni stupići) i MuV-a (bijeli stupići). Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 5$



Slika 22. Primjer virusa promatranog kroz mikroskop instrumenta Nanosight. MeV pri fiziološkom pH (a) i pri izrazito alkalnom pH (b). Slično su izgledali i uzorci MuV-a u istim uvjetima.

Ovi rezultati u suprotnosti su s ranijim istraživanjima MeV-a⁹⁵ koji su pokazali da niski pH rezultira agregacijom virusnih čestica. Ipak, neslaganje rezultata može biti posljedica korištenja različitih sojeva MeV-a, kao i različiti eksperimentalni uvjeti korišteni za postizanje željene pH vrijednosti.

Analiza koncentracije virusnih čestica u navedenom rasponu pH vrijednosti pokazuje da koncentracija čestica ostaje nepromijenjena osim pri pH 3,0 – 4,5 pri kojem dolazi do neočekivanog porasta izmjerene koncentracije ukupnih čestica kod oba virusa. Iako su kasniji rezultati ukazivali na to da ne dolazi do adhezije čestica na površinu plastičnih tubica (odjeljak 4.2.6.), ostaje mogućnost da se radi o vrlo brzom procesu koji nije moguće uočiti, odnosno moguće je da pH smanjuje adheziju čestica na površinu reakcijskih tubica jer u takvim uvjetima membrana virusa postaje bolje hidratirana, a time i polarnija⁹⁵ što bi objasnilo slabiju adheziju na reakcijske tubice izrađene od nepolarnog polipropilena pri nižem pH. Rezultati dobiveni pri pH 9,9 za MeV u skladu su s pojavom agregacije čestica jer dolazi do značajnog pada ukupnog broja čestica. Za MuV to nije primijećeno, vjerojatno ponovo zbog pogrešaka u izračunu uzrokovanih intenzivnim raspršenjem svjetla s agregata.

Utjecaj pH vrijednosti na infektivnost MeV-a pokazuje da virus zadržava barem dio infektivnosti u rasponu pH 5,8 – 9,0, dok je za MuV taj raspon nešto širi – od pH 4,4 do 9,0. Raspon pH vrijednosti u kojima MeV barem djelomično zadržava infektivnost je nešto širi nego što se nalazi u literaturi, ali je u skladu sa zaključcima takvih istraživanja da iznimno kiseli ili alkalni uvjeti imaju poguban efekt za infektivnost MeV-a^{14,91}. Rezultati dobiveni za stabilnost MuV-a načelno su u skladu s onima dostupnima u literaturi^{97,98}.

Zanimljivo, za oba virusa uočen je neočekivani porast infektivnosti pri pH 5,8 (za MuV i pH 4,4) koji djelomično korelira s porastom koncentracije ukupnih čestica u uzorku. To ukazuje da bi to zaista mogla biti posljedica smanjenje adhezije virusnih čestica na površinu tubica što bi rezultiralo povećanim brojem slobodnih infektivnih čestica u virusnoj suspenziji koja se dodaje stanicama u testu određivanja CCID₅₀. Druga mogućnost je da je ulazak virusa u stanice, odnosno sama infekcija, potpomognuta pri nižem pH zbog čega virusi pokazuju prividno veću infektivnost. Primjerice, pokazano je da je za neuraminidaznu aktivnost proteina HN MuV-a optimalan pH 4,6, odnosno da raspon optimalnog pH varira između pH 4,0 – 5,5 ovisno o soju MuV-a⁹⁹. Za srodan virus bolesti Newcastle (engl. *Newcastle disease virus*, NDV) također je pokazano da je infektivnost iznimno dobro očuvana pri niskim pH vrijednostima te da blago kiseli uvjeti poput pH 5 mogu poboljšati ulazak NDV-a u stanice^{180,182–184}. Iako sam mehanizam još nije razjašnjen, nije isključeno da sniženje pH vrijednosti potpomaže ulazak MuV-a u stanice domaćina istim mehanizmom kao kod NDV-a. Valja naglasiti da ovakvi rezultati ne odražavaju nužno veću stabilnost virusnih čestica pri nižim pH vrijednostima, već mogu biti i posljedica veće podložnosti stanica infekciji u takvim uvjetima.

Kod razmatranja svih rezultata dobivenih prilikom ispitivanja stabilnosti MuV-a i MeV-a u različitim uvjetima (pH, temperatura, sastav otopine) valja u obzir uzeti da se ovi virusi mogu proizvesti u različitim vrstama stanica. U ovom slučaju su oba virusa proizvedena na stanicama Vero, ali soj MeV-a Edmonston-Zagreb se najčešće proizvodi u stanicama fibroblasta iz ljudskog plućnog tkiva, MRC-5 (engl. *medical research council cell strain 5*), dok se soj MuV-a L-Zagreb najčešće proizvodi u stanicama CEF. Obzirom da virusi svoju lipidnu ovojnica preuzimaju od stanice domaćina, razlike u sastavu lipidnih ovojnica virusa proizvedenih na različitim vrstama stanica mogu rezultirati različitim svojstvima virusnih čestica kao što su pH raspon u kojem će virusne čestice zadržavati infektivnost, stabilnost u ovisnosti o temperaturi, sklonost agregaciji te podložnost raznim drugim strukturnim promjenama, što treba uzeti u obzir prilikom uspoređivanja rezultata različitih istraživanja.

4.2.6. Utjecaj staklenih i plastičnih tubica na koncentraciju ukupnih čestica

Obzirom da su tijekom eksperimenata virusni alikvoti sakupljeni u plastične (polipropilenske) tubice, pretpostavljeno je da je moguća adhezija određenog dijela čestica na stijenkama takvih tubica. U prilog ovoj pretpostavci išli su i rezultati povećane koncentracije čestica pri niskom pH koji bi trebao smanjiti potencijalnu adheziju čestica na nepolarnu površinu tubica (odjeljak 4.2.5.). Inkubacija virusnih uzoraka u staklenim i plastičnim tubicama kroz 2, 4, 6 i 24 h

pokazala je da ne dolazi do značajne promjene u veličini ili koncentraciji čestica u uzorcima čuvanim u plastičnim ili staklenim tubicama u usporedbi s uzorkom koji je izmjeren metodom NTA odmah nakon mikrofiltracije (tablica 14).

Tablica 14. Utjecaj inkubacije virusne suspenzije u različitim reakcijskim tubicama na veličinu i koncentraciju ukupnih čestica. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 3$.

t / h	veličina / %				C _{ukupne čestice} / %			
	MuV		MeV		MuV		MeV	
	staklo	plastika	staklo	plastika	staklo	plastika	staklo	plastika
2	92 \pm 3,9	93 \pm 1,9	102 \pm 2,7	104 \pm 2,6	102 \pm 5,6	99 \pm 6,2	96 \pm 3,9	98 \pm 4,6
4	98 \pm 6,7	97 \pm 4,0	96 \pm 3,2	99 \pm 1,5	98 \pm 9,4	102 \pm 9,1	96 \pm 7,9	103 \pm 5,2
6	98 \pm 5,4	99 \pm 5,1	102 \pm 0,5	100 \pm 1,6	97 \pm 7,6	105 \pm 8,2	96 \pm 8,0	101 \pm 6,2
24	98 \pm 11,1	94 \pm 2,8	102 \pm 3,2	102 \pm 3,2	103 \pm 14,9	99 \pm 11,6	87 \pm 4,5	89 \pm 10,2

Iako dobiveni rezultati ne ukazuju na pojavu adhezije, ona ne može biti u potpunosti isključena jer je moguće da se radi o vrlo brzom procesu koji se odvija u kratkom vremenu između uzorkovanja i mjerenja uzorka metodom NTA. Osim toga, kad je potrebno razrijediti uzorak prije mjerenja zbog previsoke koncentracije čestica, razrjeđenja su također pripremana u plastičnim tubicama što također omogućava adheziju.

4.2.7. Utjecaj pipetiranja i vorteksiranja na virusne čestice

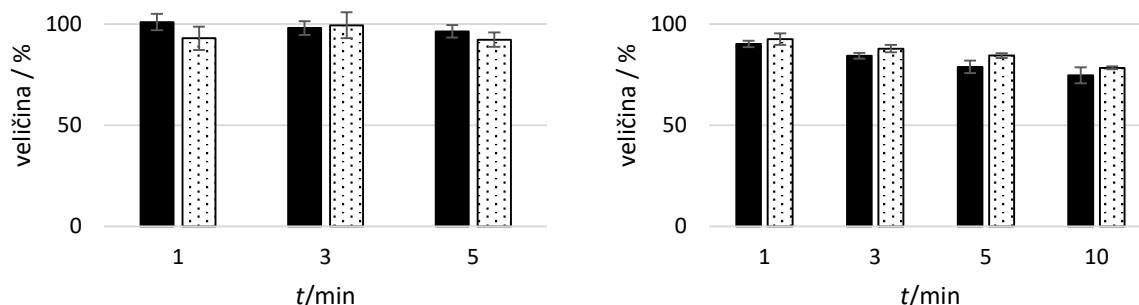
Obzirom da su virusni uzorci zapravo suspenzije, iznimno je važno da takvi uzorci budu homogenizirani prije bilo kakve manipulacije njima. Također, uspješna resuspenzija takvih uzoraka poslije primjerice ultracentrifugiranja je također vrlo važna. U laboratorijskim uvjetima, za resuspenziju i homogenizaciju virusnih uzoraka u pravilu se koriste pipetiranje ili vorteksiranje.

Kako bi se provjerio utjecaj ovih metoda na čestice prisutne u virusnim suspenzijama, alikvoti virusnih suspenzija podvrgnuti su pipetiranju (1 - 5 min) ili vorteksiranju (1 - 10 min) nakon čega su izmjerene veličina i koncentracija ukupnih čestica te određen titar virusa u uzorcima (slika 23).

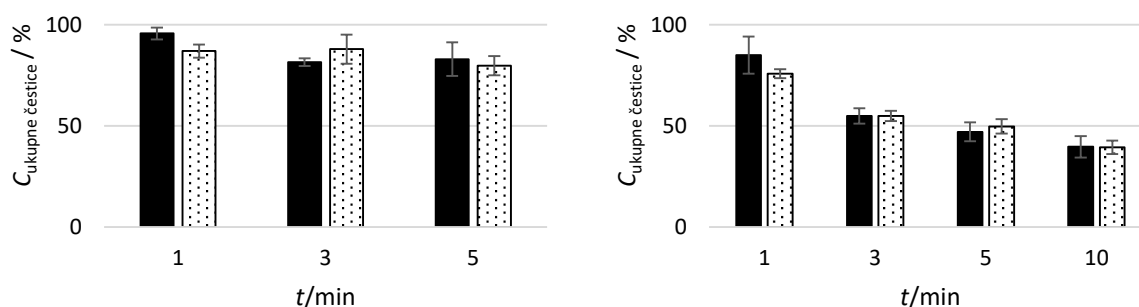
Pokazalo se da pipetiranje koje traje od 1 do 5 minuta nema utjecaja na veličinu niti koncentraciju ukupnih čestica, kao niti na infektivnost. Vorteksiranje, s druge strane, pokazuje

jasnu korelaciju produženog vremena vorteksiranja s padom veličine, koncentracije i infektivnosti čestica.

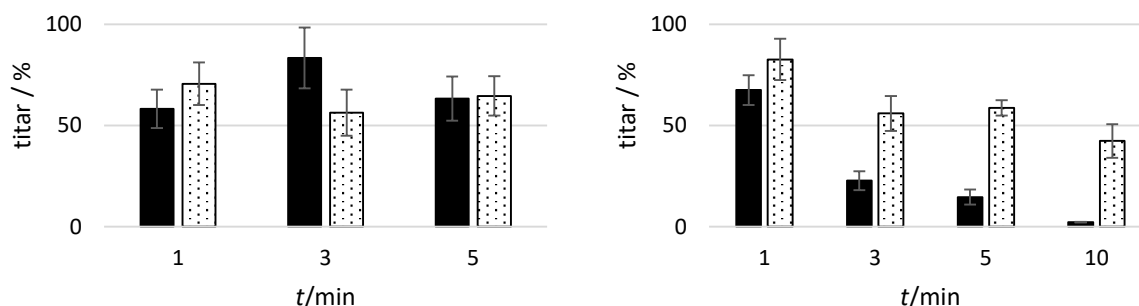
a



b



c



Slika 23. Utjecaj pipetiranja (lijevo) i vorteksiranja (desno) na veličinu (a), koncentraciju ukupnih čestica (b) i infektivnost (c) MeV-a (crni stupići) i MuV-a (bijeli stupići). Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 4$.

Obzirom da homogenizacija ili resuspenzija uzoraka ovim tehnikama najčešće traje kraće od minute, iz dobivenih rezultata može se zaključiti da u takvom slučaju ne postoji značajna razlika između dvije metode. Ipak, postupci poput ultracentrifugiranja lako mogu rezultirati vrlo

čvrstim talozima koji su problematični za resuspenziju te mogu zahtijevati dulje vrijeme za resuspenziju. U nekim slučajevima moguće je na talog dodati pufer te inkubirati smjesu preko noći kako bi se postigla resuspenzija⁸⁴, ali to nije idealna opcija za sve viruse, pogotovo za MeV koji prekonocnom inkubacijom čak i pri 4 °C gubi gotovo 50% svoje infektivnosti (odjeljak 4.2.4.). Iz rezultata se vidi da bi u takvom slučaju produljeno pipetiranje moglo biti zadovoljavajuća metoda za kvalitetnu resuspenziju u relativno kratkom vremenskom roku čime bi se izbjegao gubitak infektivnosti virusa, barem u slučaju MuV-a i MeV-a. Osim toga, rezultati ukazuju da sile kojima su virusi izloženi tijekom duljeg vorteksiranja znatno utječu na stabilnost samih virusnih čestica. Moguće je da dolazi do narušavanja lipidne ovojnice MuV-a i MeV-a što bi objasnilo smanjenje veličine čestica te pad infektivnosti obzirom da se u ovojnici MuV-a i MeV-a nalaze glikoproteini odgovorni za prihvata i ulazak virusa u stanica. Osim toga, već je ranije pokazano da vorteksiranje može uzrokovati denaturaciju proteina¹⁸⁵, iz čega slijedi da gubitak strukture virusnih glikoproteina uslijed vorteksiranja također može biti uzrok pada infektivnosti MuV-a i MeV-a.

4.3. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a ultracentrifugiranjem

UC se još uvijek često koristi kao metoda za pročišćavanje i koncentriranje virusa na laboratorijskoj skali budući da omogućava postizanje velikih koncentracija virusnih čestica. Iako se kao preporučena metoda za pročišćavanje paramiksovirusa kao što su MuV i MeV češće navodi UC uz gradijent gustoće u saharozu, ovdje je istraženo pročišćavanje i koncentriranje virusa bez gradijenta gustoće. Razlozi tome su jednostavnost, ali i problemi da hiperosmolarnost saharoznih otopina korištenih za stvaranje gradijenta gustoće može dovesti do gubitka infektivnosti virusnih čestica, dok visoka viskoznost takvih otopina može uzrokovati gubitak strukture kod površinskih proteina što također može rezultirati padom infektivnosti MuV-a i MeV-a¹⁰.

Usporedba UC-a MuV-a i MeV-a (tablica 15) nakon 1, 2 i 4 h pokazala je da je infektivnost virusa u talogu najbolje očuvana nakon 2 h, iako je statistička analiza pokazala da razlike u infektivnosti nakon 1, 2 i 4 h nisu značajne. Slične vrijednosti zadržane infektivnosti (oko 10%) ukazuju na to da MuV i MeV pokazuju sličnu podložnost silama kojima su izloženi tijekom UC-a. U literaturi su dostupni podaci za razne viruse kod kojih infektivnost nakon UC-a varira od 1 do 100%, iako su visoka iskorištenja najčešće dobivena za retro- i lentivirusne vektore koji sadrže protein G iz virusa vezikularnog stomatitisa (engl. *vesicular stomatitis virus*, VSV)^{103–107,186}. Ovdje je vidljivo da dulje trajanje UC-a rezultira smanjenom infektivnošću,

najvjerojatnije upravo zbog duljeg izlaganja virusa silama koje rezultiraju gubitkom infektivnosti, dok se čini da kraće vrijeme UC-a ne dovodi do dovoljno dobrog taloženja virusa što opet rezultira smanjenom infektivnošću u talogu. Ovakve zaključke podupiru i rezultati mjerenja NTA.

Tablica 15. Pročišćavanje i koncentriranje MuV-a i MeV-a UC-om 1, 2 i 4 h, $141\ 000 \times g$ pri $4\ ^\circ\text{C}$. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM.

		MuV			MeV		
<i>t</i> / h		1	2	4	1	2	4
veličina / %	<i>n</i>	9	9	7	14	12	11
	S	$69,9 \pm 4,29$	$54,5 \pm 3,17$	$65,3 \pm 5,84$	$79,7 \pm 4,22$	$63,5 \pm 1,90$	$61,5 \pm 2,22$
	T	$81,4 \pm 3,62$	$83,3 \pm 5,69$	$86,4 \pm 3,55$	$93,9 \pm 2,28$	$89,7 \pm 2,21$	$81,1 \pm 2,09$
Cukupne čestice / %	<i>n</i>	9	9	7	14	12	11
	S	$22,3 \pm 1,77$	$27,5 \pm 5,86$	$15,3 \pm 5,77$	$48,2 \pm 16,79$	$26,1 \pm 7,37$	$5,8 \pm 1,11$
	T	$23,7 \pm 2,35$	$33,5 \pm 3,27$	$34,4 \pm 5,70$	$30,1 \pm 5,08$	$25,2 \pm 2,37$	$26,9 \pm 1,57$
titar / %	<i>n</i>	6	27	21	13	8	25
	S	no	no	no	no	no	no
	T	$7,7 \pm 2,75$	$10,7 \pm 1,40$	$3,6 \pm 0,59$	$6,7 \pm 1,96$	$10,3 \pm 3,43$	$6,0 \pm 1,35$
HCP / %	<i>n</i>	10	10	11	5	7	7
	S	$19,1 \pm 3,64$	no	no	$10,7 \pm 3,09$	$7,1 \pm 2,87$	$1,4 \pm 0,60$
	T	$3,5 \pm 1,80$	$17,4 \pm 3,05$	$37,1 \pm 6,13$	$17,2 \pm 6,14$	$46,1 \pm 6,13$	$65,0 \pm 4,45$

no – vrijednost nije određena jer je bila ispod granice kvantifikacije za test određivanja CCID₅₀, odnosno ispod granice detekcije za ELISA-u; S – supernatant; T – talog.

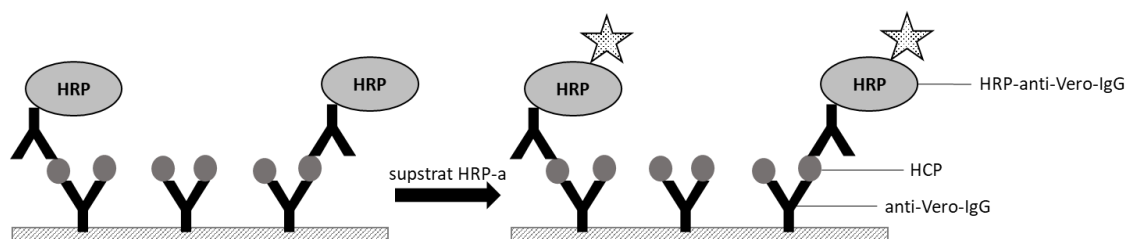
Mjerenja veličine čestica pokazala su da veličina čestica u supernatantima značajno pada s vremenom trajanja UC-a, a slično je vrijedilo i za koncentraciju čestica u supernatantu, iako taj pad kod MuV-a nije bio statistički značajan. To odgovara pretpostavci da se najprije talože veće čestice, a u prilog tome ide i rezultat koji pokazuje da supernatanti nakon 1 h UC-a još uvijek sadrže znatnu količinu čestica, iako je njihova infektivnost zanemariva. To ponovo podupire hipotezu da virusne suspenzije sadrže relativno velik broj neinfektivnih čestica – ECV-a, virusnih ili virusima sličnih čestica koje su neinfektivne iz nekog drugog razloga⁸⁴. Ovi rezultati ukazuju da su takve neinfektivne čestice manje od infektivnih, što je zapravo u skladu s pretpostavkom da se bi se moglo raditi o neobavijenim nukleokapsidama ili praznim lipidnim ovojnicama, ali i ECV-ima za koje su raniji rezultati već pokazali da su nešto manji od virusnih čestica (3 – 6%, tablice 8 i 9).

Veličina čestica u resuspendiranim talozima bila je nešto manja od one u početnim uzorcima, ali nije značajno ovisila o trajanju UC-a. Smanjenje čestica može biti posljedica sila

kojima su one izložene tijekom UC-a, primjerice gubitku vode iz čestica uslijed djelovanja centrifugalnih sila.

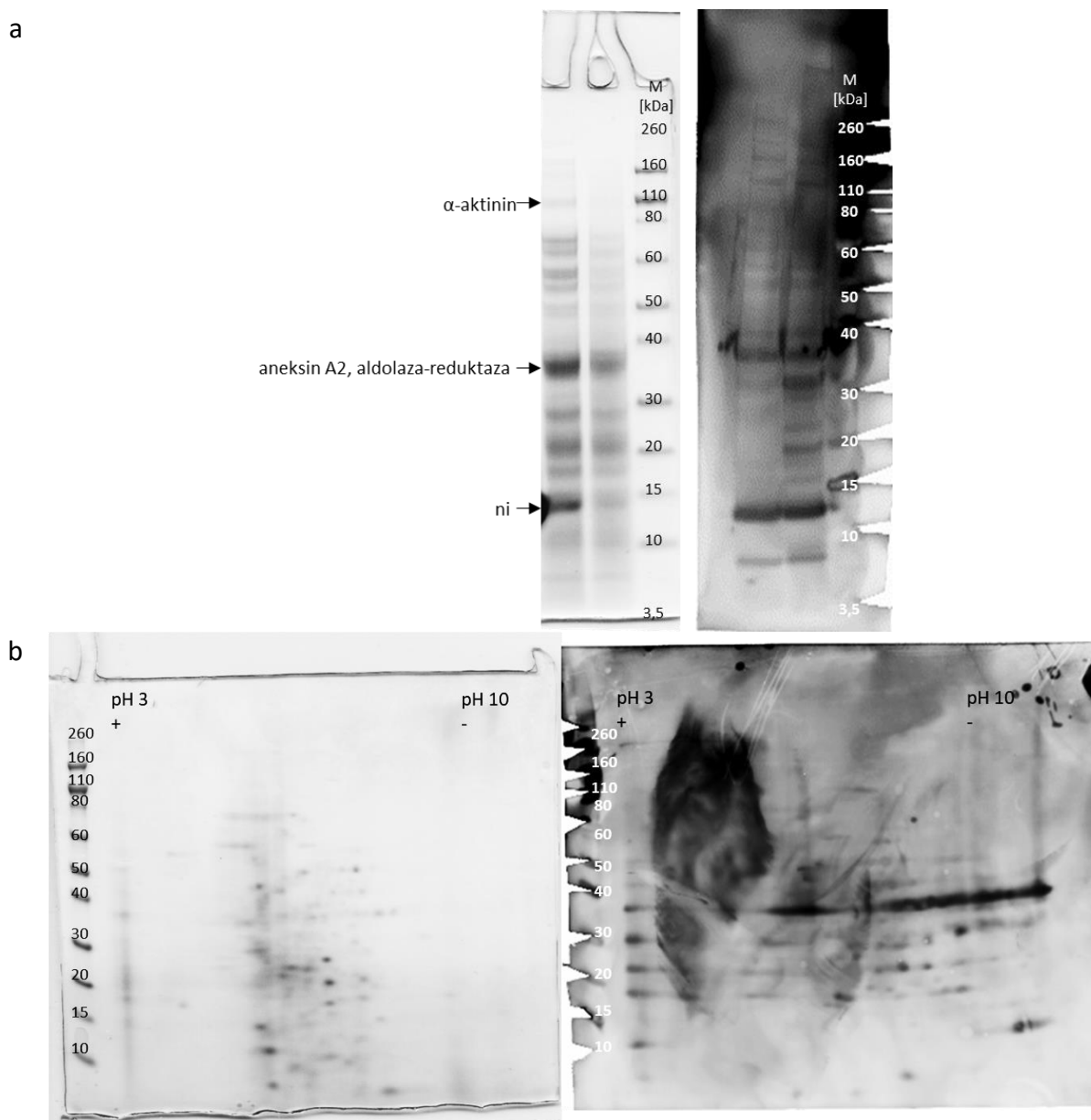
Iskorištenje ukupnih čestica je osjetno ispod 100% što ukazuje na ograničenja metode NTA, ali i na mogućnost da se prilikom UC-a gubi određeni dio čestica. Moguće je da dolazi do adhezije virusnih čestica na površinu polialomernih kiveta ili do oštećenja i raspada određenog broja čestica uslijed centrifugalnih sila što bi bilo u skladu i s činjenicom da dulje vrijeme UC-a ne rezultira porastom infektivnosti u nastalim talozima.

Uspješnost pročišćavanja MuV-a i MeV-a UC-om ispitana je praćenjem količine HCP-a prisutnih u virusnim uzorcima. Količina prisutnih HCP-a određena je pomoću tzv. indirektna ELISA-e (engl. *indirect ELISA*, „sandwich“ *ELISA*, slika 24) u kojoj su korištena poliklonska antitijela iz seruma zamorčića dobivena imunizacijom s lizatom stanica Vero (anti-Vero-IgG i HRP-anti-Vero-IgG).



Slika 24. Shematski prikaz ELISA-e za određivanje količine HCP-a u virusnim uzorcima.

Kako bi se provjerila sposobnost korištenih antitijela da prepoznaju HCP-e, napravljen je western blot u kojem su proteini iz uzorka lizata stanica Vero, koji služi kao standard u ELISA-i, detektirani pomoću antitijela HRP-anti-Vero-IgG (slika 25). Uočava se da antitijela anti-Vero-IgG pri ovim uvjetima prepoznaju velik broj HCP-a stanica Vero, a najbolje prepoznaju tri proteinske komponente pri otprilike 13, 38 i 110 kDa. Odgovarajuće pruge izrezane su iz gela, analizirane MS-om te je utvrđeno da pruga pri 110 kDa pripada α -aktininu, pruga pri 38 kDa (koja je najzastupljenija u lizatu stanica) sadrži aneksin A2 i aldolaza-reduktazu, dok identifikacija proteina u prugi pri 13 kDa nije bila uspješna.



Slika 25. Analiza uzorka lizata stanica Vero razdvojenog (a) SDS-PAGE-om (ukupno 50 μ g proteina) i (b) 2D-GE-om (ukupno 400 μ g proteina). Desno od gelova prikazane su membrane s istim uzorkom na kojima je izvedena detekcija HCP-a western blotom pomoću HRP-anti-Vero-IgG. Na slici (a) u desnu jažicu nanesen je lizat koji je prethodno istaložen hladnim etanolom preko noći, a u lijevu lizat koji nije taložen. Za analizu 2D-GE-om korišten je lizat taložen hladnim etanolom preko noći.

Iako ovakva metoda kvantifikacije nije savršena jer je moguće da HCP-i visoke zastupljenosti i imunogeničnosti budu odgovorni za najveći dio signala u testu, dok slabo zastupljeni HCP-i niže imunogeničnosti ostanu nedetektirani zbog premale količine antitijela, ovakva ELISA još uvijek predstavlja tzv. zlatni standard za određivanje širokog spektra HCP-a prisutnih u uzorku¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

Analiza virusnih uzoraka prikupljenih prilikom pročišćavanja UC-om pokazala je da se sadržaj HCP-a značajno smanjuje u supernatantima, a povećava u talozima s duljim vremenom UC-a. To ukazuje da je većina HCP-a u nekoj vrsti kompleksa s virusnim česticama ili ECV-ima, odnosno unutar virusnih čestica ili ECV-a. Tu hipotezu podupire činjenica da sedimentacijski koeficijenti slobodnih proteina nisu dovoljni da bi doveli do taloženja proteina pri ovakvim uvjetima UC-a, a upravo zbog ovog razloga UC je korisna metoda za odvajanje virusa i ECV-a od slobodnih proteina u suspenziji. Ukupne bilance, koje su manje od 100% kad se zbroje količine HCP-a u supernatantima i talozima, također su u skladu s pretpostavkom da dolazi do adhezije dijela čestica na površinu kiveta.

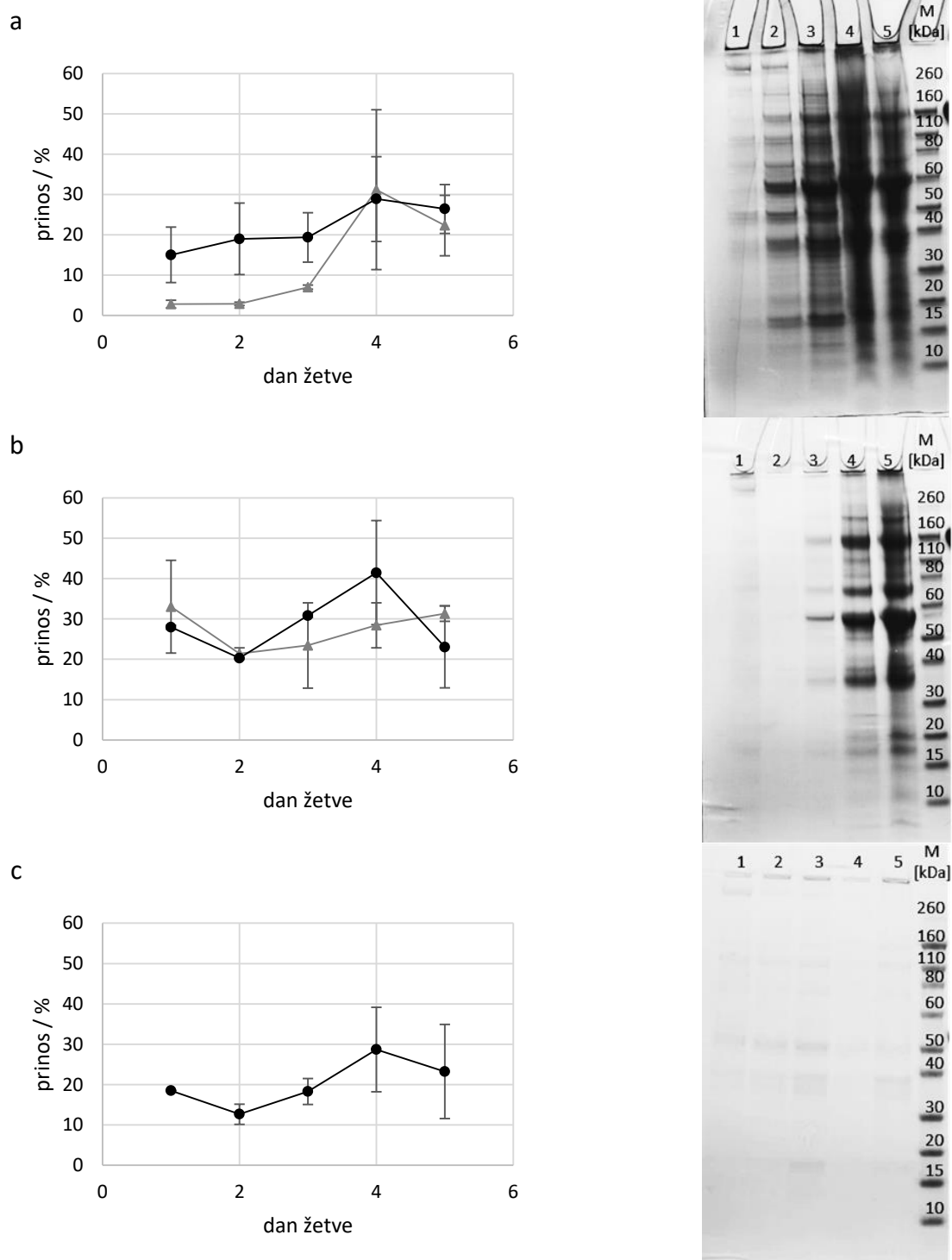
Obzirom da UC ne omogućava razdvajanje virusa od ECV-a, ispitano je pročišćavanje ECV-a UC-om 2 h koje se pokazalo kao optimalno za viruse (tablica 16).

Tablica 16. Pročišćavanje ECV-a UC-om 2 h pri $141\,000 \times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=5$.

	veličina / %	$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	HCP / %
supernatant	$81,8 \pm 2,67$	$7,4 \pm 2,07$	$36,6 \pm 8,52$
talog	$81,6 \pm 2,28$	$20,3 \pm 3,01$	$27,4 \pm 15,98$

Veličina i koncentracija čestica u resuspendiranim talozima pokazuje isti trend kao i kod virusa. Sadržaj HCP-a u supernatantima znatno je veći nego kod virusnih uzoraka, a veći je i od sadržaja HCP-a u talogu. Ovo ukazuje na mogućnost da je u neinficiranim supernatantima kultura prisutan veći broj slobodnih proteina u suspenziji, ili da su takvi slobodni proteini skloniji interakcijama s virusnim česticama odnosno njihovim površinskim proteinima u virusnim suspenzijama nego što je to slučaj s ECV-ima i njihovim površinskim proteinima.

Obzirom na heterogenost početnih virusnih suspenzija, ispitano je postoji li tjedni trend prilikom pročišćavanja virusa odnosno ECV-a UC-om (slika 26). Kod virusa se uočava trend porasta prinosa u kasnijim danima žetve, što potvrđuje i količina proteina prisutna na gelovima. I dok je za MeV to očekivano obzirom da prema kraju tjedna raste broj i ukupnih i infektivnih čestica, za MuV je to neočekivano obzirom da broj infektivnih čestica pada, dok broj ukupnih čestica stagnira (slika 10, odjeljak 4.1.). Ovakvi rezultati potvrđuju snažan utjecaj heterogenosti virusnih suspenzija na postupke pročišćavanja i koncentriranja virusa. Kod ECV-a prinos ne pokazuje jasan trend, a iz gela se uočava da je količina čestica po danima žetve vrlo slična.



Slika 26. Ovisnost prinosa ukupnih i infektivnih čestica nakon pročišćavanja UC-om o danu žetve MuV-a (a), MeV-a (b) i ECV-a kroz dva ciklusa petodnevnih žetvi. S desne strane grafova dani su gelovi na koje je nanesen jednaki volumen uzorka od svakog dana žetve. Crne točke – ukupne čestice, sivi trokutići – infektivne čestice. Svaka točka predstavlja rezultat dan kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=2$.

4.4. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a ultrafiltracijom

UF i DF su alternativne metode UC-u za pročišćavanje i koncentriranje virusnih čestica na laboratorijskoj skali, ali su UF i DF, za razliku od UC-a, pogodne i za korištenje na industrijskoj skali zbog čega su u zadnje vrijeme predmet interesa u farmaceutskoj industriji.

DF MuV-a i MeV-a izveden je na dvije vrste membrana – PES i RC - pri čemu su obje membrane imale MWCO 100 kDa. Cilj je bio odrediti učinkovitost ovih membrana za koncentraciju i pročišćavanje MuV-a i MeV-a (tablica 17).

Tablica 17. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a UF-om na membranama PES i RC. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM.

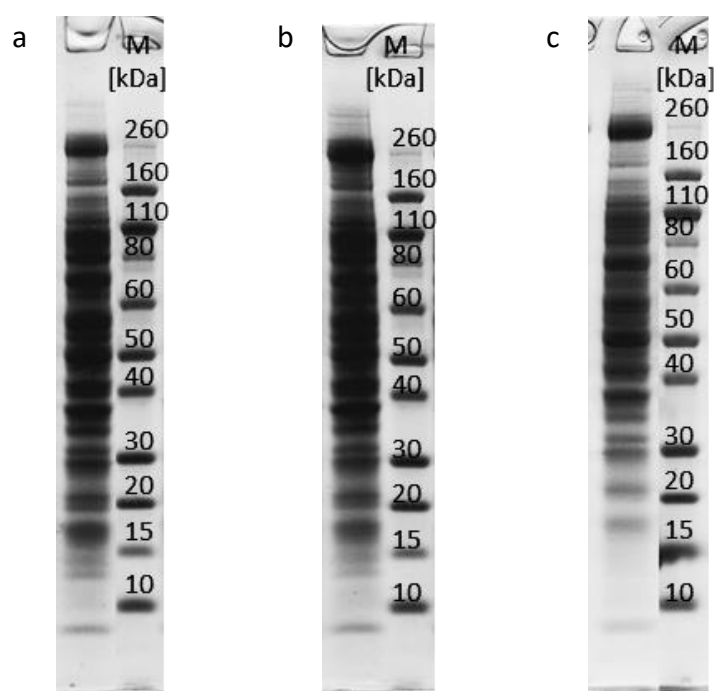
membrana	MuV		MeV	
	PES	RC	PES	RC
<i>n</i>	12	10	15	15
veličina / %	P	no	no	no
	R	94,2 \pm 4,87	94,1 \pm 2,67	92,5 \pm 4,73
Cukupne čestice / %	P	no	no	no
	R	35,1 \pm 4,37	47,4 \pm 6,59	37,4 \pm 3,05
titar / %	P	no	no	no
	R	26,2 \pm 8,45	39,2 \pm 10,45	20,7 \pm 4,85
HCP / %	P	no	no	no
	R	51,1 \pm 5,93	61,6 \pm 4,39	59,7 \pm 5,95

no – vrijednost nije određena jer je bila ispod granice kvantifikacije ili granice detekcije; P – permeat; R – retentat.

Količina virusa u permeatima bila je zanemariva, tj. ispod granice detekcije za test CCID₅₀, a isto je vrijedilo i za određivanje HCP-a pomoću ELISA-e. Mjerenjima NTA bilo je moguće detektirati svega nekoliko čestica u vidnom polju zbog čega mjerenja nisu bila pouzdana, odnosno bila su ispod granice kvantifikacije za koncentraciju, a zbog nepouzdanosti takvih mjerenja nije određena niti veličina čestica.

Veličina čestica u retentatima je, slično kao i kod UC-a, bila nešto manja u odnosu na početni uzorak. Prinosi ukupnih čestica u retentatima bili su vrlo slični za oba virusa uz nešto više prinose infektivnih čestica za MuV, a nije uočena niti značajna razlika između različitih

korištenih membrana. Slično kao kod UC-a, veći broj čestica izmjeren metodom NTA uglavnom je korelirao i s većim brojem infektivnih čestica, ali za razliku od UC-a, DF rezultira znatno boljim prinosom infektivnih čestica, što je ranije uočeno i kod drugih virusa^{84,190}. I kod DF-a je zbroj infektivnih odnosno ukupnih čestica u permeatima i retentatima osjetno niži nego u početnim uzorcima što ukazuje na gubitak čestica i u ovoj metodi. Moguće je da dolazi do adsorpcije određenog broja čestica na membranu ili spremnik, ili da su neke manje čestice iz početnog uzorka uhvaćene i zarobljene u porama membrane¹⁹¹. Velike količine HCP-a izgledno su posljedica prisutnosti ECV-a u retentatima, ali i činjenice da u retentatima zaostaje i određena količina slobodnih proteina prisutnih u početnoj suspenziji. Obzirom da zbog velike količine materijala u virusnim suspenzijama može doći do začepljenja pora membrane (engl. *membrane fouling*), to može rezultirati i zaostajanjem HCP-a manjih od 100 kDa u retentatima. Zaostajanje HCP-a unutar pora membrane, u kombinaciji s relativno velikim volumenom permeata s niskom koncentracijom HCP-a, moglo bi objasniti zašto je bilanca za HCP-e iznosi samo 50 - 60%. Analiza retentata SDS-PAGE-om (slika 27) pokazuje prisutnost velikog broja proteina molekulske mase ispod 100 kDa što je u skladu s gore iznesenim pretpostavkama.



Slika 27. Uzorci MuV-a (a), MeV-a (b) i ECV-a (c) pročišćeni DF-om. Svi uzorci koncentrirani su s 600 mL iz početne suspenzije do približno 0,4 mL konačnog uzorka pri čemu su uzorci prebačeni u PBS.

4.5. Kromatografske metode pročišćavanja MuV-a i MeV-a

Kod razmatranja rezultata svih kromatografskih pročišćavanja virusa važno je uzeti u obzir da virusni uzorci sadrže heterogenu populaciju infektivnih i neinfektivnih virusnih čestica⁸³, ali i da sadrže ECV-e^{53,54,87} te da količina i omjer spomenutih čestica varira od dana do dana. Sve to utječe na sam kromatografski proces, kao i na dobivena iskorištenja.

Budući da već sam prolazak kroz kromatografski sustav može predstavljati stres za virusne čestice, ispitan je utjecaj propuštanja virusa kroz kromatografski sustav bez kolone, pri različitim protocima (tablica 18). Tlak sustava prilikom kromatografija (bez i s monolitnim kolonama) uvijek je iznosio 0 MPa. Usporedbom titra virusa početnog uzorka nakon mikrofiltracije, koji je nanesen na kolonu, s titrom virusa nakon prolaska kroz kromatografski sustav, uočeno je da dolazi do gubitka infektivnosti. Dok je za MuV taj gubitak između 10 i 35%, za MeV on iznosi čak i do 85%, ali pritom povećanje protoka s 2 na 10 mL/min ne dovodi do povećanog gubitka infektivnih virusnih čestica. Ovakvi rezultati su u skladu s ranije opisanima rezultatima (odjeljak 4.2.), koji zajedno ukazuju na općenito veću osjetljivost MeV-a u odnosu na MuV.

Tablica 18. Infektivnost virusa nakon prolaska kroz kromatografski sustav bez kolone u odnosu na infektivnost početnog uzorka nanesenog na kolonu, pri različitim brzinama protoka, F . Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM.

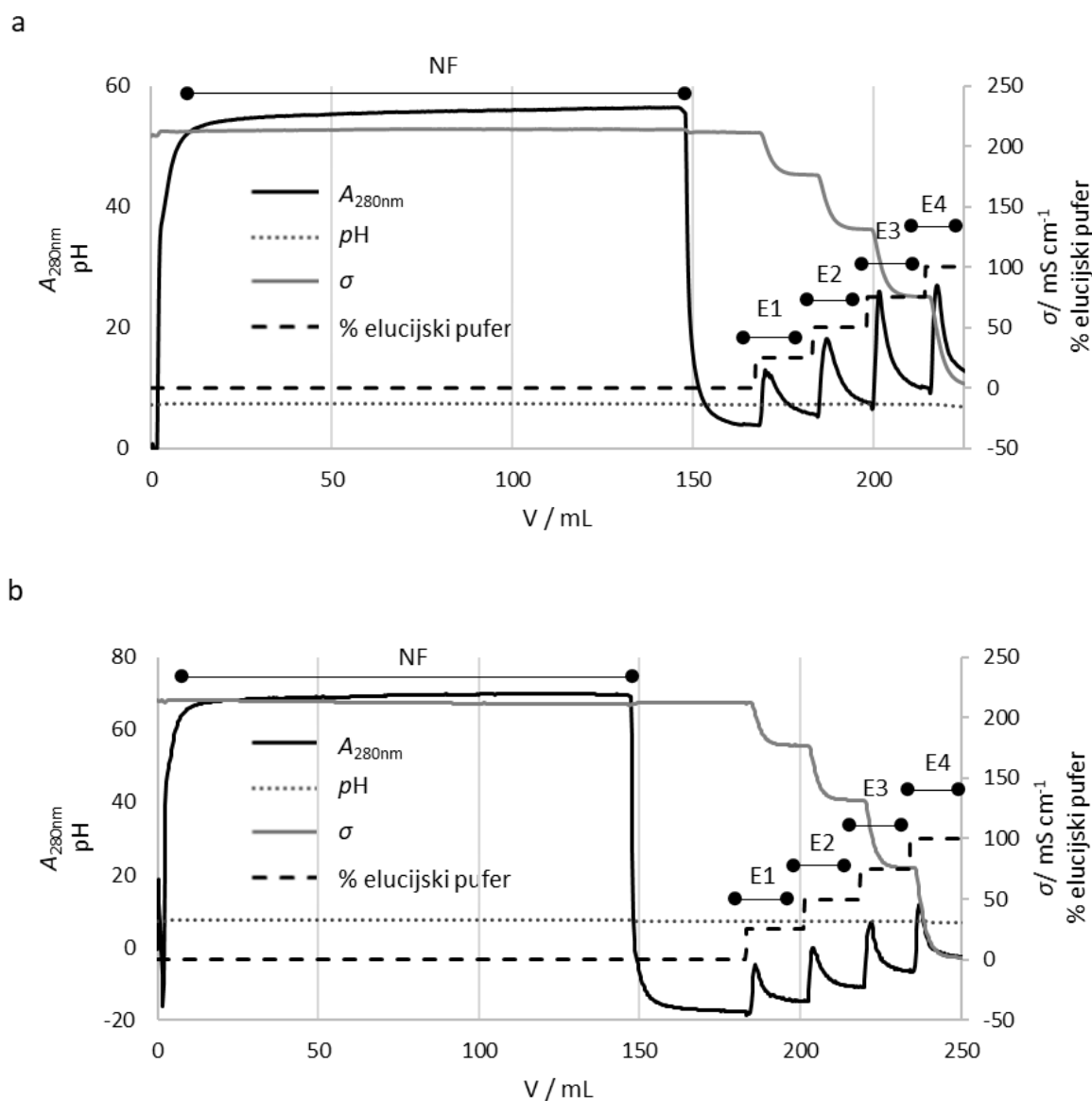
$F / \text{mL min}^{-1}$	titar / %			
	n	MuV	n	MeV
2	11	$81 \pm 8,7$	9	$16 \pm 2,1$
5	6	$67 \pm 9,3$	9	$21 \pm 3,3$
10	6	$91 \pm 7,3$	9	$15 \pm 2,2$

4.5.1. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a kromatografijom hidrofobnih interakcija

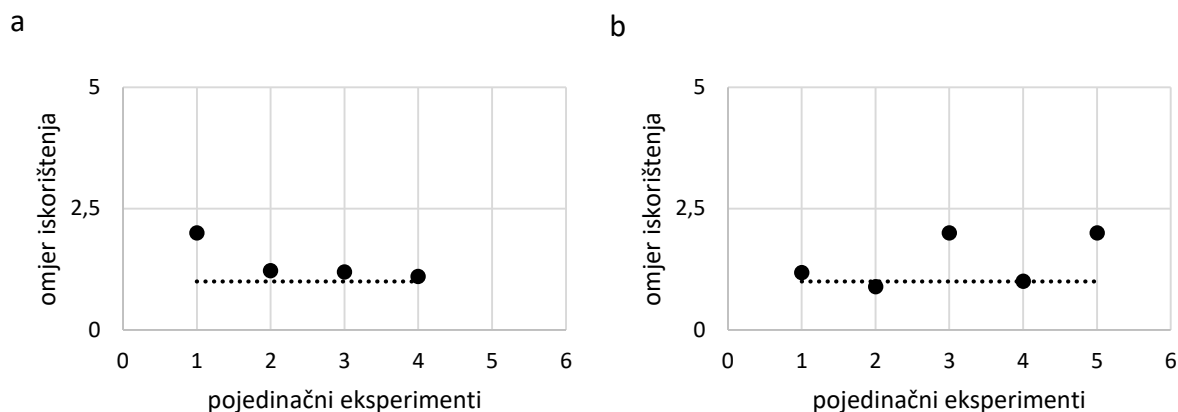
Istražena je mogućnost pročišćavanja MuV-a i MeV-a HIC-om na komercijalno dostupnim *CIMmultus OH* monolitnim kolonama. Virusi su vezani na kolonu u puferu s 20 – 50 mmol/L MOPS ili HEPES, pri pH 7,3 koji je sadržavao 0,5 – 2,0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (slika 28).

Iako je propuštanjem virusa kroz kromatografski sustav bez kolone uočeno da povećanje protoka do 10 mL/min ne utječe negativno na infektivnost virusa, provjereno je vrijedi li to i kad virusi prolaze kroz monolitnu kolonu, odnosno utječe li brzina protoka na iskorištenje

kromatografije. U tu svrhu uspoređeni su rezultati dobiveni pri protoku 3 mL/min i 10 mL/min (slika 29). Rezultati pokazuju da ne postoji značajna razlika u količini infektivnih i ukupnih čestica koje eluiraju s kolone pri ova dva protoka, zbog čega su daljnji eksperimenti izvođeni pri protoku $F=5$ mL/min koji omogućuje izvođenje eksperimenta u relativno kratkom vremenskom roku, a omogućava i preciznije sakupljanje uzoraka koje je izvođeno ručno.



Slika 28. Primjer kromatograma dobivenih prilikom pročišćavanja MuV-a (a) i MeV-a (b) HIC-om na koloni CIM OH s velikim kanalima, $F=3$ mL/min. Pufer za vezanje: 20 mmol/L MOPS, 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,3. Elucijски pufer: 20 mmol/L MOPS, pH 7,3. NF – nevezana frakcija, E – eluat.



Slika 29. Utjecaj prolaska virusa kroz kromatografski sustav s monolitnom kolonom *CIM OH* s velikim kanalima (6 μm) na infektivnost MuV (a) i MeV (b). Prikazan je omjer iskorištenja dobivenih pri protoku $F=3$ mL/min i $F=10$ mL/min, linija predstavlja vrijednost omjera 1.

Maksimalni prinosi HIC-a iznosili su oko 60% infektivnog virusa za oba virusa (tablica 19). Iz rezultata je vidljivo da koncentracija $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u puferu za vezanje utječe na vezanje virusa na kolonu. Ukoliko pufer za vezanje sadrži samo 0,5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, velika količina infektivnih čestica prisutna je u NF-u. Povećanje koncentracije $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u puferu za vezanje poboljšava vezanje virusa na kolonu, kao što je očekivano i već ranije opisano¹²⁶. Pri koncentraciji $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ od 1,5 ili 2,0 mol/L infektivne čestice više nisu prisutne u NF-u, a koncentracija ukupnih čestica je ispod granice detekcije metodom NTA. Ipak, pri najvišim koncentracijama $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dolazi do smanjenog prinosa kromatografije u pogledu infektivnih čestica u eluatima obzirom na osjetljivost virusa na visoke koncentracije soli. To predstavlja najveće ograničenje za povećanje prinosa HIC-a, uz već spomenute gubitke zbog samog propuštanja kroz kromatografski sustav. Za optimalno pročišćavanje virusa HIC-om potrebni su uvjeti pri kojima se na kolonu može vezati maksimalna količina virusa, a da pritom koncentracija soli nema poguban efekt na infektivnost virusa. U slučaju MuV-a i MeV-a to se postiže korištenjem pufera za vezanje s 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ budući da je pritom količina infektivnih virusnih čestica u NF-u zanemariva, a dobiva se maksimalna količina infektivnih čestica u eluatima.

Tablica 19. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a HIC-om na monolitnoj koloni *CIM OH* s velikim kanalima (6 μm). Koncentracija $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u nevezanoj frakciji (NF) jednaka je onoj u puferu za vezanje. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=6$.

frakcija	NF	E1	E2	E3	E4	ukupno iskorištenje (NF + \sum E)
MuV						
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	0,5	0	-	-	-	-
veličina / %	$96 \pm 5,0$	$101 \pm 2,3$	-	-	-	-
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	$41 \pm 1,5$	$16 \pm 1,7$	-	-	-	57
titar / %	$68 \pm 8,6$	$21 \pm 2,9$	-	-	-	89
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	1,0	0,5	0	-	-	-
veličina / %	$61 \pm 6,0$	$98 \pm 3,4$	$99 \pm 1,5$	-	-	-
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	$6 \pm 0,3$	$12 \pm 0,9$	$22 \pm 2,8$	-	-	40
titar / %	$3 \pm 0,6$	$15 \pm 2,9$	$40 \pm 6,9$	-	-	58
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	1,5	1,0	0,5	0	-	-
veličina / %	no	$57 \pm 1,8$	$72 \pm 5,9$	$75 \pm 3,0$	-	-
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	0	$5 \pm 0,8$	$13 \pm 1,6$	$25 \pm 2,2$	-	43
titar / %	0	$2 \pm 0,5$	$32 \pm 10,1$	$30 \pm 5,3$	-	64
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	2,0	1,5	1,0	0,5	0	-
veličina / %	no	$38 \pm 0,9$	$51 \pm 4,5$	$78 \pm 8,6$	$86 \pm 8,4$	-
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	0	$3 \pm 0,6$	$8 \pm 2,2$	$17 \pm 3,8$	$25 \pm 6,4$	53
titar / %	0	0	$1 \pm 0,1$	$10 \pm 2,7$	$21 \pm 2,5$	32
MeV						
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	0,5	0	-	-	-	-
veličina / %	$73 \pm 5,8$	$90 \pm 3,5$	-	-	-	-
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	$29 \pm 5,1$	$31 \pm 4,8$	-	-	-	60
titar / %	$34 \pm 8,7$	$57 \pm 15,2$	-	-	-	91
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	1,0	0,5	0	-	-	-
veličina / %	$76 \pm 6,2$	$95 \pm 3,0$	$112 \pm 3,3$	-	-	-
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	$16 \pm 1,9$	$18 \pm 2,0$	$29 \pm 11,8$	-	-	63
titar / %	$1 \pm 0,0$	$3 \pm 0,8$	$52 \pm 10,5$	-	-	56
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	1,5	1,0	0,5	0	-	-
veličina / %	no	$79 \pm 5,4$	$85 \pm 3,6$	$108 \pm 2,3$	-	-
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	0	$7 \pm 1,0$	$21 \pm 2,2$	$26 \pm 1,4$	-	54
titar / %	0	$1 \pm 0,4$	$14 \pm 8,5$	$45 \pm 6,3$	-	60
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	2,0	1,5	1,0	0,5	0	-
veličina / %	no	no	$88 \pm 1,6$	$101 \pm 7,4$	$106 \pm 4,1$	-
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	0	0	$8 \pm 3,6$	$18 \pm 2,7$	$30 \pm 5,1$	56
titar / %	0	0	$2 \pm 1,3$	$12 \pm 7,3$	$39 \pm 19,1$	53

no – nije određeno zbog nedovoljnog broja čestica u uzorku

Kvantifikacija virusa metodom NTA pokazuje da je ukupno iskorištenje u pravilu oko 50% što ukazuje na ograničenje same metode. Kao što je spomenuto u odjeljku 4.2.2., jedan od problema je usporedba koncentracija čestica u otopinama drugačijeg sastava zbog razlike u viskoznosti i raspršenju svjetlosti, ali kada se uzorci nalaze u istom ili vrlo sličnom mediju, rezultati su usporedivi, ponovljivi i koreliraju s dobivenim prinosima infektivnih virusa. Važna prednost metode NTA pred testom određivanja CCID₅₀ je mogućnost određivanja koncentracije ukupnih čestica paralelno s izvođenjem kromatografskog eksperimenta, što omogućava brzi uvid tijekom eksperimenta, za razliku od testa određivanja CCID₅₀ koji je dugotrajan.

Veličina čestica određena je u svim sakupljenim frakcijama MuV-a i MeV-a, kao i u početnim uzorcima. Problem različite viskoznosti otopina koje sadrže (NH₄)₂SO₄, a koja utječe na izračun veličine čestica, ovdje je riješen uvođenjem korekcije koeficijenta viskoznosti budući da je on poznat za otopine (NH₄)₂SO₄¹⁷⁷. Podaci o omjeru veličine u početnim uzorcima i frakcijama (tablica 19) pokazuju da frakcije s višim koncentracijama (NH₄)₂SO₄ sadrže manje čestice. Budući da ovako visoke koncentracije soli mogu stvoriti visok osmotski tlak koji može dovesti do smanjenja čestica, ispitano je da li je to uzrok opaženog smanjenja čestica ili prilikom HIC-a dolazi do razdvajanja čestica po veličini. Stoga su MuV i MeV inkubirani 2 h u otopinama koje su sadržavale 0,5, 1, 1,5 i 2,0 mol/L (NH₄)₂SO₄ nakon čega je određena veličina čestica (tablica 20).

Tablica 20. Omjer veličine MuV-a i MeV-a određene u otopinama (NH₄)₂SO₄ nakon inkubacije 2 h prema veličini početnog uzorka. Rezultati su dani kao srednja vrijednost ± SEM.

c (NH ₄) ₂ SO ₄ / mol L ⁻¹	n	veličina / %			
		MuV	n	MeV	
0,5	19	85 ± 1,4	14	80 ± 3,8	
1,0	19	89 ± 2,7	14	86 ± 3,5	
1,5	19	90 ± 2,1	14	93 ± 1,6	
2,0	19	81 ± 3,2	19	102 ± 3,4	

Rezultati ukazuju na to da dolazi do određenog smanjenja čestica u navedenim otopinama, međutim ono ne korelira s porastom koncentracije (NH₄)₂SO₄, a i uočeno smanjenje čestica u kromatografskim frakcijama je značajnije u odnosu na ovdje uočeno (čak do 60% u frakcijama, u usporedbi s maksimalno 20% u eksperimentima ispitivanja veličine navedenima u tablici 20).

Ovo ukazuje da prilikom pročišćavanja MuV-a i MeV-a HIC-om zaista dolazi do separacije čestica po veličini, pri čemu najveće smanjenje u veličini čestica pokazuju upravo one frakcije s najmanjom infektivnošću. U nekim slučajevima čini se da su čestice u eluatima nešto veće od početnih, a uzrok tome je izgledno to što je izračunata prosječna veličina čestica u početnom uzorku pomaknuta prema manjim vrijednostima upravo zbog velikog broja manjih, neinfektivnih čestica prisutnih u uzorku. Manje neinfektivne čestice mogu biti ECV-i, ali i razne vrste neinfektivnih virusnih čestica koje su prisutne u virusnim suspenzijama.

Osim kolona s velikim kanalima (6 μm), istražena je mogućnost pročišćavanja MuV-a i MeV-a na *CIM OH* kolonama s malim kanalima (1,4 μm). Obzirom da su virusne čestice veličine oko 0,2 μm , njihovo pročišćavanje trebalo bi biti moguće i na koloni s manjom veličinom kanala (tablica 21). Rezultati su međutim pokazali da kolone s malim kanalima nisu prikladne za pročišćavanje MuV-a i MeV-a jer su iskorištenja vrlo niska. I ovdje je uočljivo da veličina eluiranih čestica prati isti trend uočen kod kromatografija na kolonama s velikim kanalima.

Tablica 21. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a HIC-om na koloni s malim kanalima (1,4 μm). Koncentracija $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u NF-u jednaka je onoj u puferu za vezanje. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=3$.

frakcija	NF	E1	E2	E3	E4
MuV					
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	1,5	1,0	0,5	0	-
veličina / %	-	$55 \pm 3,5$	$70 \pm 11,8$	$88 \pm 1,7$	-
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	0	$4 \pm 1,3$	$12 \pm 4,4$	$20 \pm 1,8$	-
titar / %	0	0	$1 \pm 0,6$	$6 \pm 2,0$	-
MeV					
$c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) / \text{mol L}^{-1}$	2,0	1,5	1,0	0,5	0
veličina / %	-	$51 \pm 2,3$	$49 \pm 2,7$	$54 \pm 3,7$	$67 \pm 1,2$
$C_{\text{ukupne čestice}} / \%$	0	0	$1 \pm 0,2$	$2 \pm 0,3$	$17 \pm 3,5$
titar / %	0	0	0	0	$1 \pm 0,3$

Frakcije dobivene HIC-om pri optimalnim uvjetima (1,0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u puferu za vezanje) testirane su na prisutnost genomske DNA stanica Vero PCR-om kako bi se provjerila uspješnost pročišćavanja virusa. Prije izvođenja PCR-a, uzorci s visokom koncentracijom soli DF-om su prebačeni u PBS kako ne bi došlo do inhibicije PCR reakcije. Analiza je potvrdila

prisutnost genomske DNA u početnim uzorcima i NF-u, ali ne i u eluatima. Pritom je granica detekcije za DNA iznosila 40 ng/mL. Otprije je poznato da se dvolančane nukleinske kiseline slabo vežu na hidrofobna punila kolona korištenih u HIC-u¹²⁷ što ovu metodu čini posebno pogodnom za pročišćavanje bioloških lijekova i cjepiva, obzirom da zahtjevi regulatornih agencija navode da takvi pripravci ne smiju sadržavati više od 10 ng genomske DNA stanica domaćina po dozi⁹. Ovo potvrđuje pogodnost HIC-a za pročišćavanje bioloških pripravaka, odnosno uklanjanje genomske DNA iz njih. Valja naglasiti da propisane doze cjepiva za MeV i MuV iznose redom 3,0 log CCID₅₀/dozi odnosno 4,3 log CCID₅₀/dozi što znači da bi eluate dobivene HIC-om bilo potrebno dodatno razrijediti za upotrebu u cjepivima, odnosno i količine genomske DNA bile bi ispod propisane granice od 10 ng/dozi⁹.

Uspješnost pročišćavanja MuV-a i MeV-a HIC-om ispitana je i praćenjem količine HCP-a prisutnih u virusnim uzorcima (tablica 22). Uočava se da eluati i dalje sadrže značajne količine HCP-a koji mogu potjecati od HCP-a prisutnih unutar samih virusnih čestica, ali i od ECV-a ili slobodnih HCP-a supročišćenih HIC-om.

Tablica 22. Udio HCP-a prisutnih u uzorcima MuV-a i MeV-a pročišćenih HIC-om na monolitnoj koloni ili disku *CIM OH*. Udio je dan kao postotak mase HCP-a prisutan u ispitivanom uzorku u odnosu na početni uzorak. Rezultati su dani kao srednja vrijednost ± SEM.

frakcija	veličina kanala kolone	<i>n</i>	NF	E1	E2	E3	E4	NF + ΣE	
MuV									
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹	6 μm	8	0,5	0	-	-	-	-	
HCP / %			48 ± 5,2	23 ± 9,9				71	
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹		29	1,0	0,5	0	-	-		
HCP / %			12 ± 2,9	6 ± 0,8	38 ± 4,5	-	-	57	
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹		7	1,5	1,0	0,5	0	-		
HCP / %			no	4 ± 2,2	10 ± 3,4	31 ± 6,1	-	44	
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹		9	2,0	1,5	1,0	0,5	0		
HCP / %			no	3 ± 0,5	2 ± 0,5	7 ± 2,1	29 ± 4,8	40	
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹		1,4 μm	3	1,5	1,0	0,5	0	-	
HCP / %					no	4 ± 2,2	8 ± 4,0	34 ± 3,6	-

MeV	veličina kanala kolone	<i>n</i>	NF	E1	E2	E3	E4	NF + ΣE
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹		6	0,5	0	-	-	-	
HCP / %			44 ± 11,9	74 ± 7,6				118
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹	6 μm	32	1,0	0,5	0	-	-	
HCP / %			12 ± 3,8	9 ± 0,9	26 ± 2,3	-	-	46
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹		10	1,5	1,0	0,5	0	-	
HCP / %			no	1 ± 0,4	8 ± 2,2	53 ± 8,1	-	62
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹		7	2,0	1,5	1,0	0,5	0	
HCP / %			no	3 ± 1,0	8 ± 0,5	7 ± 1,8	44 ± 3,2	61
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹	1,4 μm	3	2,0	1,5	1,0	0,5	0	
HCP / %				no	2 ± 0,5	4 ± 0,7	14 ± 1,2	89 ± 21,1

no – ispod granice detekcije i kvantifikacije; pri kromatografijama na kolonama s kanalima promjera 1,4 μm ova frakcija nije sakupljena

Stoga su izvedene kromatografije u kojima je početni uzorak predstavljala suspenzija ECV-a odnosno supernatant neinficirane kulture stanica Vero kako bi se procijenilo u kojoj mjeri se ECV-i pročišćavaju HIC-om. ECV-i su pročišćeni na koloni s velikim kanalima, pri optimalnim uvjetima za viruse (1,0 mol/L (NH₄)₂SO₄ u puferu za vezanje) kako bi se dobio uvid u supročišćavanje ECV-a s virusima u tim uvjetima (tablica 23).

Tablica 23. Pročišćavanje ECV-a HIC-om na monolitnoj koloni *CIM OH* s velikim kanalima. Rezultati su dani kao srednja vrijednost ± SEM, *n*=5. Sve vrijednosti dane su u odnosu na početni uzorak suspenzije ECV-a nakon mikrofiltracije.

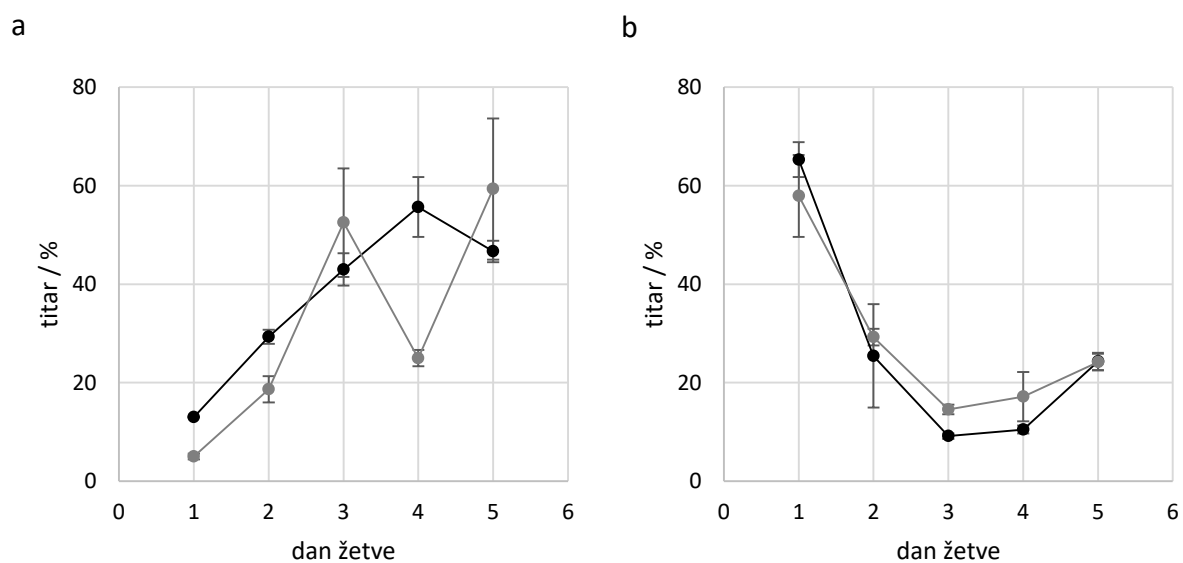
frakcija	NF	E1	E2
<i>c</i> ((NH ₄) ₂ SO ₄) / mol L ⁻¹	1,0	0,5	0
veličina / %	61 ± 5,9	85 ± 5,3	99 ± 5,9
<i>C</i> _{ukupne čestice} / %	19 ± 3,3	6 ± 0,8	17 ± 1,5
HCP / %	no	5 ± 0,6	19 ± 3,0

no - ispod granice detekcije i kvantifikacije

Uočava se da veličina ECV-a u različitim frakcijama prati isti trend kao i kod virusa. Dio ECV-a zaostaje pri ovim uvjetima u NF-u, ali otprilike jednaki eluiraju u frakciji bez soli koja prilikom pročišćavanja virusa sadrži maksimalnu količinu infektivnih virusnih čestica. Sadržaj HCP-a također je najviši u toj frakciji što ukazuje na to da prilikom pročišćavanja virusa HIC-om dolazi

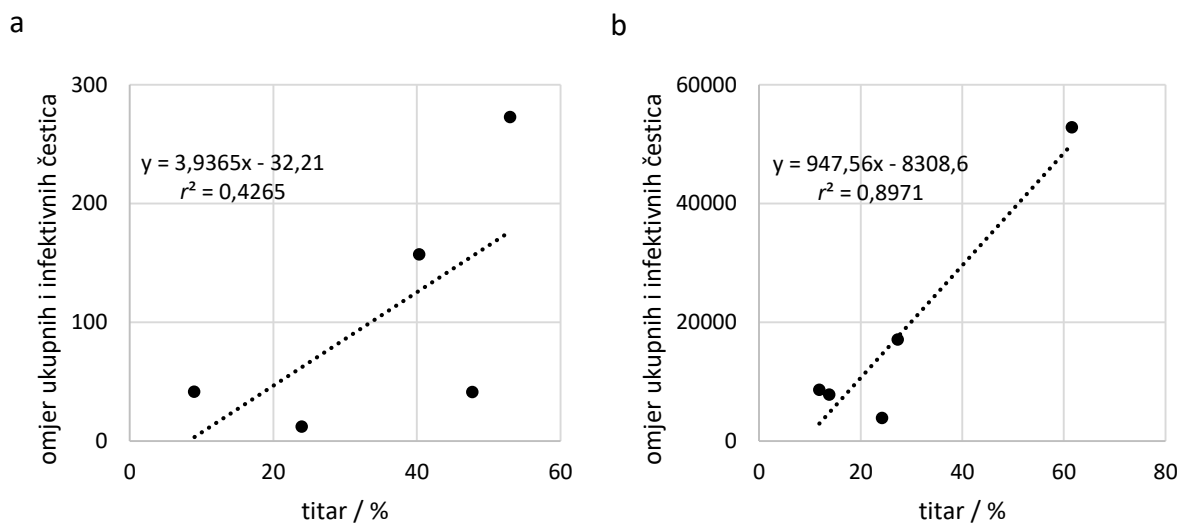
do supročišćavanja ECV-a ili slobodnih HCP-a iz supernatanta stanične kulture. Ukoliko proizvodnja ECV-a nije znatno povećana ili smanjena tijekom infekcije, ovakvi rezultati ukazuju na to da virusi pročišćeni HIC-om i dalje sadrže nezanemarljivu količinu ECV-a. To znači da značajna količina HCP-a detektiranih u eluatima virusa dobivenih HIC-om potječe od ECV-a ili slobodnih HCP-a, iako dio HCP-a svakako može potjecati i iz HCP-a ugrađenih u same virusne čestice. Iako trenutno ne postoji propisana maksimalna dozvoljena količina HCP-a u biološkim pripravcima, cilj svakog postupka pročišćavanja i dalje je smanjiti njihovu količinu na minimum kako bi se spriječile eventualne nuspojave prilikom primjene takvih pripravaka.

Obzirom na ranije uočenu heterogenost virusnih suspenzija, tj. varijabilnost omjera ukupnih i infektivnih čestica od dana do dana (slika 11, odjeljak 4.1.), ispitan je utjecaj tog fenomena na prinos infektivnih virusnih čestica nakon pročišćavanja HIC-om. Izvođeni su triplikati kromatografija u istom danu, pri optimalnim uvjetima (1,0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u puferu za vezanje), te su pokusi ponovljeni kroz dva ciklusa petodnevnih žetvi za svaki virus (slika 30).



Slika 30. Ovisnost prinosa infektivnog MuV-a (a) i MeV-a (b) nakon HIC-a o danu žetve kroz dva ciklusa petodnevnih žetvi. Rezultati za svaki dan su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=3$.

Rezultati su pokazali nisku varijabilnost unutar dana i jasan trend kroz pet dana. Korelacija omjera ukupnih i infektivnih čestica s prinosom kromatografije ovisno o danu žetve daje Pearsonov koeficijent korelacije $r=0,65$ za MuV, odnosno $r=0,95$ za MeV što ukazuje na jaku do vrlo jaku korelaciju (slika 31).

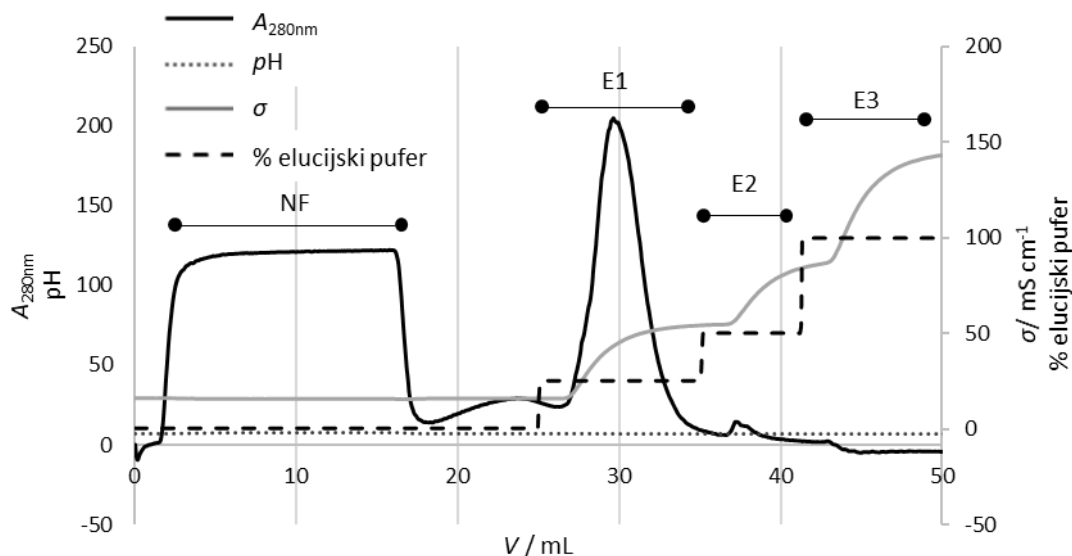


Slika 31. Korelacija omjera ukupnih i infektivnih čestica s prinosom kromatografije ovisno o danu žetve za MuV (a) i MeV (b).

Kad se u obzir uzme trend koji pokazuje omjer ukupnih prema infektivnim česticama za oba virusa (slika 11), te trend uočen u prinosima infektivnih virusa pročišćenih HIC-om (slika 30), uočava se da veća koncentracija infektivnih čestica u početnom uzorku rezultira nižim prinosom infektivnog virusa u kromatografiji. Prinos više ovisi o omjeru ukupnih i infektivnih čestica, negoli o ukupnom broju čestica injektiranom na kolonu obzirom da je isti trend uočen kad je na kolonu injektirano 50 i 300 mL virusne suspenzije. Ovisnost prinosa o omjeru ukupnih prema infektivnim česticama vjerojatno je posljedica neizbježnog gubitka dijela čestica tijekom kromatografije koji se očituje kao manji gubitak kad je koncentracija infektivnih čestica manja, a raste s porastom broja infektivnih čestica. Varijacije u proizvodnji virusa te njihov utjecaj na iskorištenje i čistoću virusnih pripravaka su otprije poznati¹²⁶, a uočavanje ovakvih trendova moglo bi doprinijeti smanjenju varijacija u proizvodnji te pomoći u optimizaciji proizvodnje na velikoj skali, kao i u proizvodnji ujednačenijih virusnih pripravaka.

4.5.2. Pročišćavanje MuV-a i MeV-a kromatografijom ionske izmjene

IEX je jedan od najčešće korištenih tipova kromatografije za pročišćavanje virusa zbog svoje jednostavnosti i mogućnosti elucije virusa promjenom ionske jakosti, uz zadržavanje optimalnog pH. Pročišćavanje MeV-a i MuV-a ispitano je na monolitnim kolonama s anionskim (QA i DEAE) i kationskim (SO_3) izmjenjivačima (slika 32).



Slika 32. Primjer kromatograma prilikom pročišćavanja MeV-a IEX-om na monolitnoj koloni *CIM QA* s velikim kanalima, $F=2$ mL/min. Pufer za vezanje: 50 mmol/L fosfatni pufer, pH 7,3. Elucijski pufer: 50 mmol/L MOPS, 2 mol/L NaCl, pH 7,3. NF – nevezana frakcija, E – eluat.

Početni eksperimenti pročišćavanja MeV-a na ionskim izmjenjivačima pokazali su da se sve infektivne čestice MeV-a vežu na anionske izmjenjivače QA i DEAE budući da infektivne čestice nisu detektirane u NF-u. Kad je korišten kationski izmjenjivač SO_3 , većina infektivnih čestica ostala je u NF-u zbog čega pročišćavanje na njemu nije dalje ispitivano. Ranije je pokazano da su virusi najstabilniji pri pH 7,3 (odjeljak 4.2.5., slika 21), stoga je pH svih korištenih pufera podešen na navedenu vrijednost, a elucija je postignuta povećanjem ionske jakosti dodatkom NaCl u elucijski pufer (tablica 24). Kao puferi za vezanje ispitani su 50 mmol/L fosfatni pufer, 50 mmol/L Tris/HCl pufer, a ispitana je i elucija s puferom u koji je dodano 50 mmol/L $MgSO_4$ obzirom da sulfatni ioni pokazuju protektivni učinak na virus MeV-a (odjeljak 4.2.2.)⁹³. Pokazalo se da QA daje bolje prinose od DEAE, ali su oni i dalje bili vrlo niski – maksimalni prinos iznosio je oko 17%. Ispitana je i mogućnost elucije s 2 mol/L NaCl, međutim eluirana je vrlo mala količina infektivnih čestica.

Pročišćavanje MuV-a također je izvedeno na monolitnim kolonama *CIM QA*, *CIM DEAE* i *CIM SO_3* . I za MuV se pokazalo da se virusne čestice snažno vežu na anionske izmjenjivače, dok je vezanje na kationski izmjenjivač bilo slabo. Međutim, ukupna iskorištenja IEX-a za MuV bila su još niža nego za MeV zbog čega daljnji eksperimenti nisu izvođeni.

Tablica 24. Pročišćavanje MeV-a IEX-om na anionskim izmjenjivačima. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM.

izmjenjivač	QA			QA			QA	QA	DEAE
<i>n</i>	5			13			3	4	3
veličina kanala kolone / μm	6			6			6	1,4	6
<i>F</i> / mL min^{-1}	2			10			1,2 - 5		
pufer za vezanje	50 mmol/L fosfatni pufer, pH 7,3			50 mmol/L fosfatni pufer, pH 7,3			50 mmol/L Tris/HCl, pH 7,3		
frakcija	NF	E1	E2	NF	E1	E2	E1	E1	E1
c_{NaCl} u elucijskom puferu / mol L^{-1}	-	0,5	1,0	-	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
titar / %	0	$1 \pm 0,4$	$10 \pm 3,3$	0	$1 \pm 0,2$	$10 \pm 2,7$	$17 \pm 6,6$	$<0,1$	$4 \pm 3,3$

U IEX-u je, kao i u HIC-u, ispitana mogućnost pročišćavanja virusa na monolitnim kolonama s malim kanalima (1,4 μm), ali kao što se vidi iz tablice 24, iskorištenja su bila praktički zanemariva, što je u skladu s rezultatima dobivenima prilikom korištenja takvih kolona u HIC-u.

Kod oba virusa očigledno je da dolazi do snažnog vezanja na anionske izmjenjivače što je najvjerojatnije posljedica velikog negativnog naboja koji nose virusne čestice s lipidnom ovojnicom. Naime, polarne glave fosfolipida okrenute su prema površini lipidne ovojnice, a pri korištenom fiziološkom pH, koji omogućava održavanje infektivnosti čestica, većina fosfolipida negativno je nabijena¹⁹². Za postizanje elucije virusa u AEX-u očito je potreban elucijski pufer koji zahtjeva grube uvjete elucije poput promjene pH ili još više ionske jakosti od ovdje korištene. Budući da je pokazano da su MuV i MeV vrlo osjetljivi na promjenu pH, ali i na visoke koncentracije soli (odjeljak 4.2.2. i 4.2.5.), takvi uvjeti doveli bi do značajnog gubitka infektivnog virusa zbog čega je zaključeno da AEX nije pogodan za pročišćavanje MeV-a i MuV-a.

4.5.3. Pročišćavanje proteina i MuV-a afinitetnom i imunoafinitetnom kromatografijom

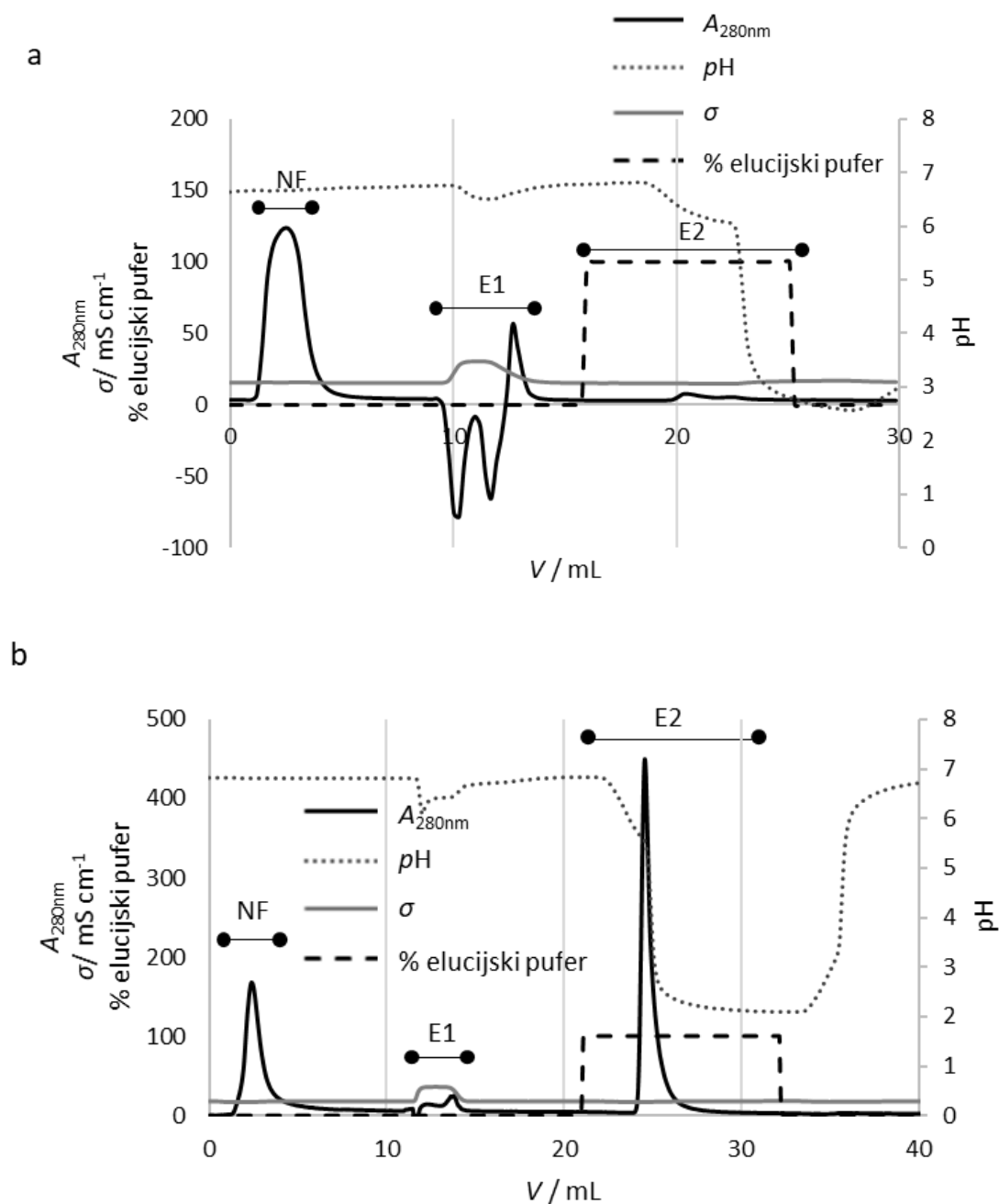
IAC je visoko specifična metoda za pročišćavanje i koncentriranje biomakromolekula u jednom koraku zbog čega je potencijalno iznimno korisna. Međutim, glavni nedostatak ove metode, i

razlog zbog kojeg ona nije u širokoj primjeni, jesu uvjeti elucije koji moraju biti takvi da naruše snažnu interakciju antigena i antitijela, a koji u pravilu znatno narušavaju strukturu i funkcionalnost biomakromolekula. Stoga je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio ispitati alternativne uvjete elucije koji bi omogućili eluciju pri nativnim uvjetima, odnosno osigurali eluciju u uvjetima koji održavaju biološku aktivnost biomakromolekula.

Obzirom da je kontaktna površina antitijelo-antigen sastavljena od aminokiselina, pretpostavljeno je da bi slobodne aminokiseline u otopini mogle kompetirati za vezanje na površinu antitijela i time istisnuti antigen s veznog mjesta čak i pri neutralnom pH. Taj proces bio bi utoliko učinkovitiji ukoliko otopina sadrži visoke koncentracije aminokiselina koje se pojavljuju u kontaktnom mjestu antigen-antitijelo. Istraživanja kontaktnih površina antigen-antitijelo pokazala su da su neke aminokiseline zastupljenije od drugih^{193–197} te da dostupnost aminokiselina na površini proteina korelira s njihovom hidrofilnošću¹⁹⁸, odnosno da su na površini proteina češće prisutne aminokiseline manjeg hidropatskog indeksa kao što je Arg. Veća učestalost Arg na površini proteina povećava vjerojatnost će upravo on stupati u specifične i nespecifične interakcije s drugim proteinima, a ovo objašnjava već spomenuti fenomen da Arg sprječava nespecifične protein-protein interakcije, odnosno smanjuje agregaciju proteina te nespecifično vezanje proteina na punila kromatografskih kolona^{142,144}. Arg vjerojatno smanjuje interakcije između proteina tako što kompetira za interakcije s nabijenim, polarnim i aromatskim aminokiselinama preko svojih nabijenih N- i C-krajeva, ali i preko gvanidinske skupine bočnog ogranka¹⁴⁵. Iz ovih razloga, Arg je odabran kao najizgledniji kandidat za uspješnu nativnu eluciju. Dodatno su odabrani imidazol, kao predstavnik aromatskih aminokiselina, obzirom na relativno nisku topljivost His u vodi, te Ser kao predstavnik polarnih aminokiselina. Utjecaj Gly je također ispitan obzirom da je to mala aminokiselina podjednako prisutna na površini i u unutrašnjosti proteina.

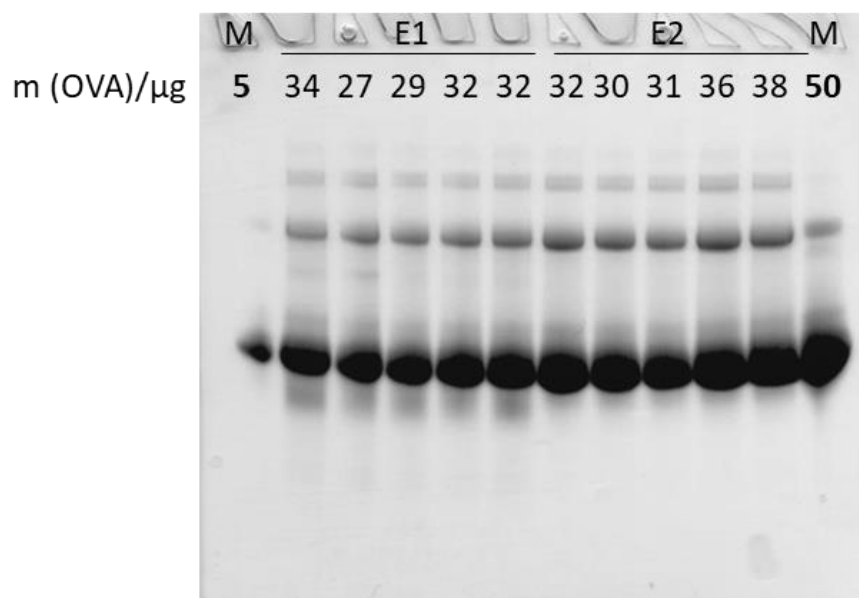
Uspješnost elucije u nativnim uvjetima najprije je ispitana na dva modelna proteina – OVA- u pročišćavanom IAC-om na anti-OVA koloni te hIgG-u pročišćavanom AC-om na koloni s proteinom G (slika 33). U oba slučaja, proteini su najprije eluirani smjesom aminokiselina visoke molarnosti pri neutralnom pH (pH 7,3; E1), a zatim i puferom s niskim pH (pH 2,3; E2) koji predstavlja tzv. zlatni standard za eluciju u IAC-u te AC na kolonama s proteinom G. Uspješnost elucije procijenjena je pomoću mase eluiranih proteina u svakoj od frakcija, a koja je određena spektrofotometrijski, metodom po Ehresmannu¹⁵³ (odjeljak 3.4.1.). U većini slučajeva, apsorbancija aminokiselina interferirala je s određivanjem koncentracije proteina zbog čega su svi eluati prije određivanja koncentracije proteina prebačeni u pufer koji je

sadržavao 20 mmol/L MOPS, 0,15 mol/L NaCl, pH 7,3. Za izmjenu pufera korištene su UF jedinice s MWCO 5 kDa, a prethodno je potvrđeno da pritom ne dolazi do značajnih gubitaka proteina.



Slika 33. Primjer kromatograma dobivenih prilikom pročišćavanja OVA IAC-om (a) i hIgG-a AC-om (b), $F=2\ mL/min$. Pufer za vezanje: 20 mmol/L MOPS, 0,15 mol/L NaCl, pH 7,3. Elucijski pufer: 0,75 mol/L Arg, 0,75 mol/L Ser, pH 7,3 (E1), 20 mmol/L Gly, pH 2,3 (E2). NF – nevezana frakcija, E – eluat.

Za potvrdu spektrofotometrijski određene koncentracije OVA u eluatima korištena je i elektroforeza SDS-PAGE. OVA iz dobivenih eluata istaložen je hladnim etanolom, a talozi nanoseni na gel paralelno s poznatim količinama OVA (slika 34) te se pokazalo da je spektrofotometrijski određena koncentracija u skladu s onom procijenjenom na gelu.



Slika 34. Primjer gela korištenog za procjenu mase OVA eluiranog s anti-OVA kolone smjesom 0,75 mol/L Arg i 0,75 mol/L imidazola pri pH 7,3 (E1), a zatim s 20 mmol/L Gly i 0,15 mol/L NaCl pri pH 2,3 (E2), $n=5$. Iznad svake pruge naznačena je masa OVA u uzorku određena spektrofotometrijski. Jažice označene s M sadrže standard OVA čija je poznata masa (5 tj. 50 µg) nanescena na gel.

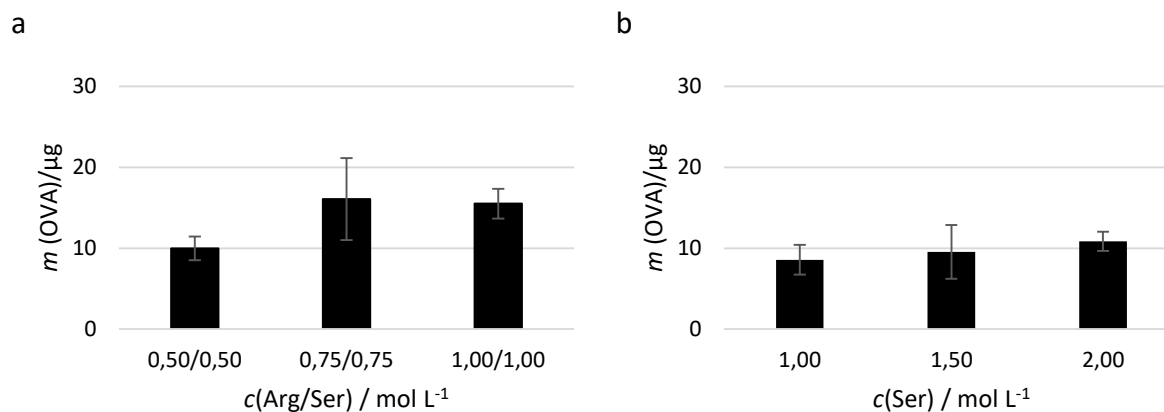
Specifičnost anti-OVA kolone provjerena je tako da je na kolonu injektiran hIgG. Pokazalo se da ne dolazi do vezanja hIgG-a, odnosno da je anti-OVA kolona specifična.

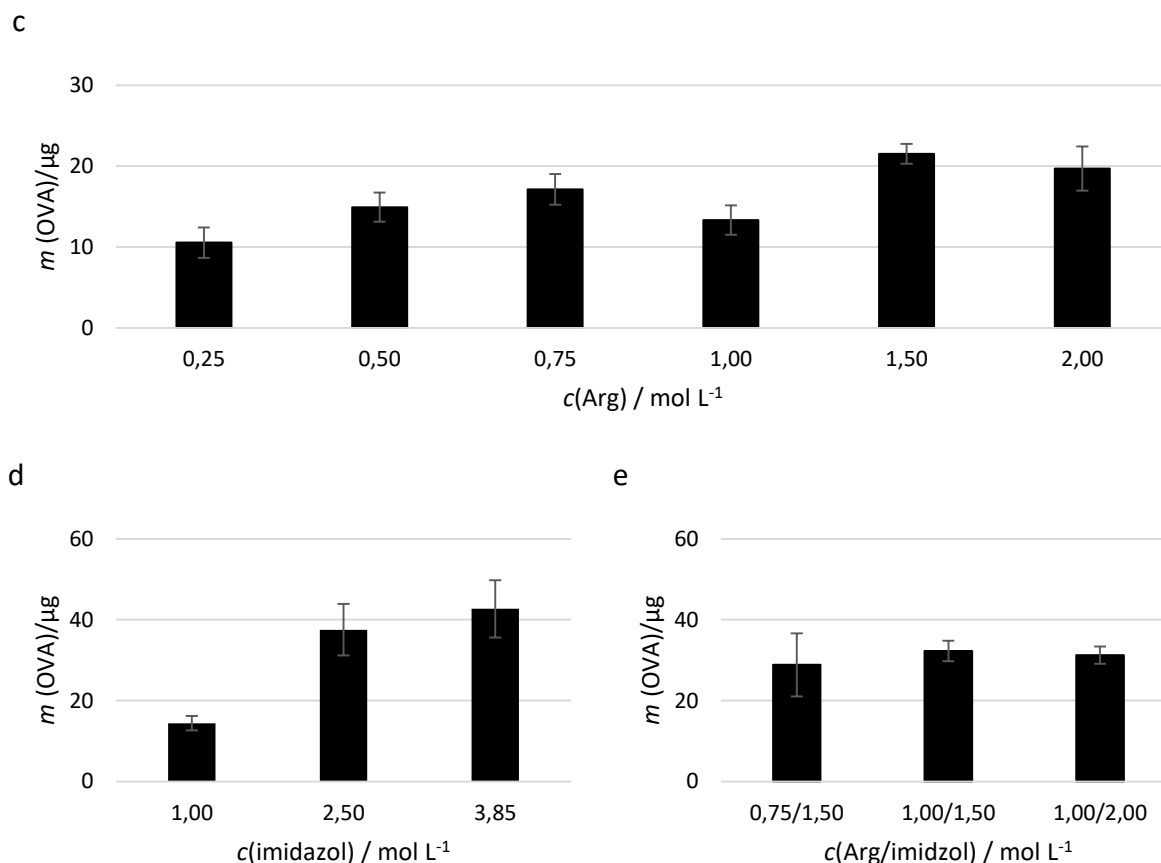
Rezultati elucije OVA s anti-OVA kolone dani su u tablici 25. Uočava se da je ukupni vezni kapacitet anti-OVA kolone prilično nizak i iznosi samo oko 60 µg, ali su rezultati reproducibilni te u skladu s ranije dobivenima za sličan tip imunoafinitetnih kolona¹⁹⁹. Kao najučinkovitije otopine za eluciju pokazale su se otopine koje sadrže Arg, Ser i imidazol te njihove kombinacije, a sve pri neutralnim pH vrijednostima.

Tablica 25. Elucija OVA s anti-OVA kolone u IAC-u pri nativnim i klasičnim uvjetima. E1 – elucija smjesom aminokiselina pri pH 7,3; E2 – elucija puferom niskog pH (20 mmol/L Gly, 0,15 mol/L NaCl, pH 2,3). Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 3$.

otopina	E1		E2		E1 + E2
	m (OVA) / μg	w (ukupnog OVA injektiranog na kolonu) / %	m (OVA) / μg	w (ukupnog OVA injektiranog na kolonu) / %	m (OVA) / μg
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L Ser	16,8 \pm 4,21	29	41,8 \pm 6,63	71	58,6
0,75 mol/L Ser / 0,75 mol/L imidazol	17,5 \pm 3,14	29	42,5 \pm 1,19	71	60,0
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L imidazol	25,1 \pm 1,69	39	39,3 \pm 0,62	61	64,4
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L Gly	16,2 \pm 8,16	28	41,9 \pm 6,97	72	58,1
0,75 mol/L Ser / 0,75 mol/L Gly	7,9 \pm 1,74	14	47,7 \pm 3,99	86	55,6
1,5 mol/L Arg	21,6 \pm 4,85	34	41,8 \pm 2,76	66	63,4
1,5 mol/L imidazol	25,8 \pm 2,88	42	35,4 \pm 3,74	58	61,2
1,5 mol/L Ser	7,8 \pm 1,89	14	48,5 \pm 3,94	86	56,3
1,5 mol/L Gly	11,7 \pm 4,99	20	47,1 \pm 3,22	80	58,8
2 mol/L NaCl	14,7 \pm 3,64	24	46,0 \pm 4,13	76	60,7
20 mmol/L Gly / 0,15 mol/L NaCl, pH 2,3	-	-	57,5 \pm 5,79	100	57,5
prosječna masa OVA eluiranog s kolone / μg					59,5 \pm 2,77

Ispitivanje uspješnosti elucije u IAC-u u ovisnosti o koncentraciji aminokiselina pokazalo je da u većini slučajeva uspješnost elucije raste s porastom koncentracije aminokiselina (slika 35).





Slika 35. Utjecaj koncentracije aminokiselina u smjesi na uspješnost native elucije OVA s anti-OVA kolone u IAC-u pri neutralnom pH . Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 3$.

Porast uspješnosti elucije s porastom koncentracije aminokiselina podržava hipotezu o kompeticijskom mehanizmu elucije aminokiselinama. Valja naglasiti da su odabrane koncentracije aminokiselina bile ograničene njihovom topljivošću u vodi.

Budući da se na kontaktnom mjestu antigen-antitijelo učestalo nalaze nabijene i polarne aminokiseline, moglo bi se pretpostaviti da su elektrostatske interakcije ključne za održavanje ove veze. Stoga je ispitana i učinkovitost elucije otopinama visoke ionske jakosti prije i nakon elucije s aminokiselinskim otopinama (tablica 26).

Tablica 26. Utjecaj pufera visoke ionske jakosti na eluciju OVA s anti-OVA kolone pri nativnim uvjetima prije (eksperiment 1) i poslije (eksperiment 2) elucije s aminokiselinskom smjesom. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 3$.

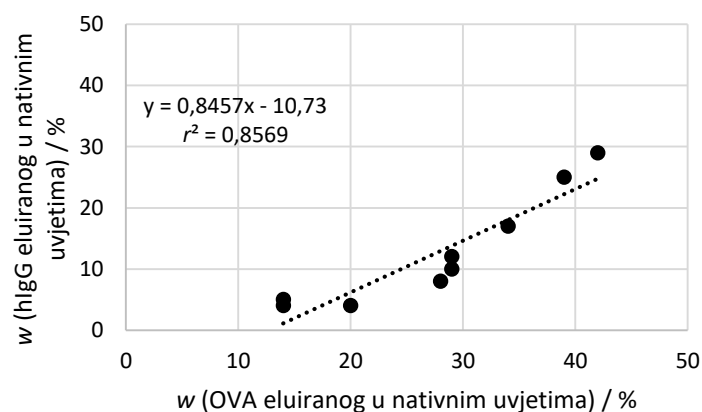
eksperiment 1			eksperiment 2		
redoslijed elucije	eluens	m (OVA) / μ g	redoslijed elucije	eluens	m (OVA) / μ g
1	2 mol/L NaCl, 20 mmol/L MOPS, pH 7,3	17,1 \pm 3,28	1	1 mol/L Ser, 1 mol/L Arg, 1 mol/L imidazol	21,8 \pm 2,12
2	1 mol/L Ser, 1 mol/L Arg, 1 mol/L imidazol	12,1 \pm 2,13	2	2 mol/L NaCl, 20 mmol/L MOPS, pH 7,3	2,1 \pm 0,60
3	20 mmol/L Gly, pH 2,3	24,4 \pm 2,53	3	20 mmol/L Gly, pH 2,3	27,2 \pm 1,32

Obzirom da sama otopina 2 mol/L NaCl uspješno eluira oko 32% ukupnog OVA vezanog na kolonu, izgledno je da ključnu ulogu u interakciji OVA-anti-OVA igraju upravo elektrostatske interakcije. Međutim, kad se isti eluens primijeni nakon elucije s otopinom aminokiselina, eluira samo dodatnih 4% OVA što ukazuje da otopina aminokiselina ne narušava samo elektrostatske interakcije antigena i antitijela, već izgledno postoji još neki mehanizam kojim ona narušava navedenu interakciju.

Aminokiselinske otopine ispitane u nativnoj eluciji OVA s anti-OVA kolone potom su ispitane u AC-u hIgG-a na koloni s proteinom G (tablica 27). Pokazalo se da je uspješnost elucije općenito niža u odnosu na OVA-anti-OVA sustav, ali prati isti trend (Pearsonov koeficijent korelacije $r=0,93$, slika 36). Uzrok smanjenoj uspješnosti elucije mogu biti razlike na kontaktnom mjestu protein G-hIgG, odnosno snažnija interakcija molekula u ovome paru.

Tablica 27. Elucija hIgG s kolone s proteinom G u AC-u pri nativnim i klasičnim uvjetima. E1 – elucija smjesom aminokiselina pri neutralnom pH; E2 – elucija puferom niskog pH (20 mmol/L Gly, 0,15 mol/L NaCl, pH 2,3). Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n \geq 3$.

otopina	E1		E2		E1+E2
	m (hIgG) / μg	w (ukupnog hIgG injektiranog na kolonu) / %	m (hIgG) / μg	w (ukupnog hIgG injektiranog na kolonu) / %	m (hIgG) / μg
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L Ser	129,1 \pm 14,18	12	937,9 \pm 70,17	88	1067,0
0,75 mol/L Ser / 0,75 mol/L imidazol	127,4 \pm 19,94	10	1134,5 \pm 273,58	90	1261,9
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L imidazol	344,2 \pm 23,33	25	1028,7 \pm 56,97	75	1372,9
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L Gly	93,1 \pm 14,81	8	1063,3 \pm 84,02	92	1156,4
0,75 mol/L Ser / 0,75 mol/L Gly	45,5 \pm 9,67	4	1056,6 \pm 94,44	96	1102,1
1,5 mol/L Arg	203,1 \pm 23,74	17	971,8 \pm 49,68	83	1174,9
1,5 mol/L imidazol	334,8 \pm 38,71	29	833,4 \pm 15,17	71	1168,2
1,5 mol/L Ser	47,5 \pm 10,03	5	911,7 \pm 189,61	95	959,2
1,5 mol/L Gly	41,1 \pm 6,39	4	1023,1 \pm 42,09	96	1064,2
2 mol/L NaCl	59,6 \pm 5,12	5	1197,6 \pm 49,25	95	1257,2
20 mmol/L Gly / 0,15 mol/L NaCl, pH 2,3	-	-	1470,5 \pm 129,68	100	1470,5
prosječna masa hIgG eluiranog s kolone / μg				1186,8 \pm 146,79	



Slika 36. Korelacija masenih udjela eluiranog OVA u IAC-u i hIgG-a u AC-u istim aminokiselinskim smjesama.

Iako su prinosi prilikom elucije proteina aminokiselinskim otopinama u IAC-u i AC-u relativno niski, analiza eluata hIgG-a kromatografijom SEC-HPLC pokazala je da, za razliku od neutraliziranih eluata dobivenih elucijom pri pH 2,3, aminokiselinski eluati ne sadrže agregate hIgG-a (tablica 28). Pojava agregata u neutraliziranim eluatima hIgG-a u je skladu s pojavama opisanim u literaturi¹³⁷, što znači da bi mogućnost elucije pri neutralnom pH mogla doprinijeti većoj stabilnosti konačnih proizvoda IgG-a. Osim toga, budući da se upravo aminokiseline poput Arg i Ser učestalo koriste kao stabilizatori proteina, njihov stabilizirajući efekt mogao bi biti posebno koristan pri pročišćavanju nestabilnih proteina, kod kojih bi taj efekt mogao kompenzirati niži prinos zbog relativno niske uspješnosti elucije u odnosu na eluciju u klasičnim uvjetima (pri niskom pH).

Tablica 28. Raspodjela molekula hIgG-a po veličini u uzorcima dobivenima elucijom u AC-u u nativnim (pH 7,3) i klasičnim (pH 2,3) uvjetima.

sastav eluensa	uzorak	polimer / %	dimer / %	monomer / %
	početni uzorak hIgG	0,06	16,54	83,40
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L imidazol	E1 (Arg/imidazol)	0	6,04	93,95
	E1 (PBS)*	0	5,96	94,04
	E2 (pH 2,3)	0	2,15	97,85
	E2 (neutraliziran)	0,29	5,48	94,23
	E2 (PBS)*	0,34	5,63	94,04
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L Ser	E1 (Arg/imidazol)	0	0,68	99,32
	E1 (PBS)*	0	2,99	97,01
	E2 (pH 2,3)	0,15	3,63	96,22
	E2 (neutraliziran)	0,37	6,11	93,53
	E2 (PBS)*	0,42	6,96	92,89
1,5 mol/L imidazol	E1 (Arg/imidazol)	0	3,73	96,27
	E1 (PBS)*	0	6,05	93,93
	E2 (pH 2,3)	0,30	3,49	94,78
	E2 (neutraliziran)	0,54	6,11	93,35
	E2 (PBS)*	0,37	6,17	93,45

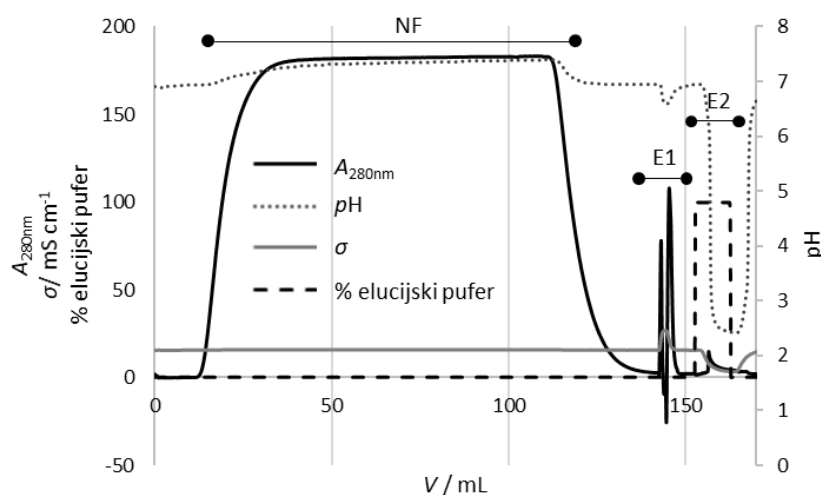
* - uzorci su prebačeni u PBS pomoću UF jedinica s MWCO 100 kDa

Aminokiseline koje su se pokazale kao najbolji eluensi u IAC-u i AC-u s modelnim proteinima zatim su ispitane u IAC-u za pročišćavanje MuV-a. Budući da zadnji korak elucije s imunoafinitetnih kolona koristi pufer pH vrijednosti 2,3 koja je u pravilu pogubna za infektivnost MuV-a (odjeljak 4.2.4), za određivanje prinosa tog koraka kromatografije metoda NTA je mnogo informativnija.

Pripremljene su imunoafinitetne kolone specifične za MeV i MuV na CIM kolonama s epoksi- i hidrazidnim skupinama. Preliminarni eksperimenti na kolonama s antitijelima

imobiliziranim na hidrazidnim skupinama pokazali su da vezanje virusa na kolonu nije bilo uspješno, zbog čega su svi daljnji eksperimenti izvođeni na kolonama na kojima su antitijela imobilizirana na epoksi-skupine.

Najprije je provjerena specifičnost pripremljenih kolona, na način da je suspenzija MuV-a injektirana na kolonu s imobiliziranim antitijelima specifičnima za MeV (anti-MeV kolona). Dobiveni NF sadržavao je oko 40% infektivnog MuV-a koji je injektiran, dok je eluat s otopinom aminokiselina sadržavao manje od 1% infektivnog virusa. Ovo potvrđuje specifičnost kolone, ali još jednom potvrđuje i kako sam prolazak virusa kroz kromatografski sustav dovodi do gubitaka infektivnog virusa. Slično je pokazano i da se MeV ne veže na anti-MuV kolonu, međutim prinosi dobiveni pročišćavanjem MeV-a na anti-MeV koloni u početnim eksperimentima su također bili iznimno niski zbog čega su daljnji eksperimenti ograničeni na pročišćavanje MuV-a IAC-om (slika 37, tablica 29).



Slika 37. Primjer kromatograma dobivenog pročišćavanjem MuV-a IAC-om, $F=2$ mL/min. Elucijski pufer: 0,75 mol/L Arg, 0,75 mol/L Ser, pH 7,3 (E1), 20 mmol/L Gly, pH 2,3 (E2). NF – nevezana frakcija, E – eluat.

Tablica 29. Pročišćavanje MuV-a IAC-om na anti-MuV koloni s velikim kanalima. Prinos kromatografija izražen je preko postotka infektivnih čestica u eluatu u odnosu na početni uzorak koji je injektiran na kolonu. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM.

eluens	n	prinos kromatografije / %
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L Ser	12	$67,7 \pm 13,5$
0,75 mol/L Arg / 0,75 mol/L imidazol	10	$48,5 \pm 16,5$
1,5 mol/L Arg	7	$15,7 \pm 3,5$

Pokazalo se da otopine koje sadrže Arg i Ser odnosno Arg i imidazol u visokim koncentracijama uspješno eluiraju infektivni MuV s anti-MuV kolone. U tablici 30 dan je pregled nekoliko odabranih eksperimenata obzirom da heterogenost virusne suspenzije, gubitak infektivnosti virusa prilikom kromatografije i visoka varijabilnost testa određivanja CCID₅₀ doprinose nesigurnosti prilikom izračuna iskorištenja (vidljivo u eksperimentima 2 i 7 u kojima iskorištenja infektivnih čestica prelaze 100%). Koncentracija svake aminokiseline u eluensu iznosila je 0,75 mol/L, a koncentracija NaCl 2 mol/L, osim ako nije navedeno drugačije. NF je u nekim slučajevima podijeljen na dva volumena zbog jednostavnosti sakupljanja frakcije.

Tablica 30. Odabrani eksperimenti pročišćavanja MuV-a IAC-om.

eksperiment	frakcija	V / mL	veličina / %	C _{ukupne čestice} / mL ⁻¹	C _{ukupnih čestica} / %	titar virusa / logCCID ₅₀	titar / %
1	injektirano	70	100	$1,46 \times 10^{11}$		9,613	
	NF	50	86	$3,76 \times 10^{10}$	25,8	8,443	6,8
	NF	20	85	$1,90 \times 10^{10}$	13,0	8,283	4,7
	E1 (Arg/Ser)	6	101	$3,66 \times 10^{10}$	25,1	9,476	73,0
	E2 (NaCl)	5	104	$3,56 \times 10^9$	2,4	8,323	5,1
	E3 (pH 2,3)	4	93	$3,10 \times 10^9$	2,1	no	np
	iskorištenje:				68,4		89,6
2	injektirano	25	100	$5,20 \times 10^{10}$		9,166	
	NF	25	70	$1,27 \times 10^{10}$	24,4	6,889	0,5
	E1 (Arg/Ser)	5,5	99	$2,07 \times 10^{10}$	39,8	9,259	120,4
	E2 (NaCl)	5	97	$2,20 \times 10^9$	4,2	7,727	3,6
	E3 (pH 2,3)	4	74	$3,67 \times 10^9$	7,1	no	np
	iskorištenje:				75,5		128,1
3	injektirano	70	100	$1,17 \times 10^{11}$		10,008	
	NF	50	74	$3,32 \times 10^{10}$	28,4	8,875	7,4
	NF	20	78	$2,06 \times 10^{10}$	17,6	8,269	1,8
	E1 (1,5 mol/L Arg)	6,5	100	$3,84 \times 10^{10}$	32,8	9,631	42,0
	E2 (NaCl)	6	103	$4,57 \times 10^9$	3,9	7,925	0,8
	E3 (pH 2,3)	4	90	$2,81 \times 10^9$	2,4	7,242	0,2
iskorištenje:				85,1		52,2	
4	injektirano	24	100	$4,01 \times 10^{10}$		9,543	
	NF	24	72	$8,04 \times 10^9$	20,0	7,692	1,4
	E1 (1,5 mol/L Arg)	6	105	$1,95 \times 10^{10}$	48,6	9,432	77,4
	E2 (NaCl)	5	106	$2,37 \times 10^9$	5,9	7,339	0,6
	E3 (pH 2,3)	4	79	$1,13 \times 10^9$	2,8	5,512	0,01
iskorištenje:				77,3		79,4	

5	injektirano	50	100	$7,37 \times 10^{10}$		9,801	
	NF	50	85	$2,69 \times 10^{10}$	36,5	8,603	6,3
	E1 (Arg/imidazol)	6	115	$2,84 \times 10^{10}$	38,5	9,397	39,5
	E2 (pH 2,3)	4	99	$1,87 \times 10^{10}$	2,5	7,671	0,7
	iskorištenje:				77,5		46,5
6	injektirano	48	100	$7,08 \times 10^{10}$		9,783	
	NF	48	84	$3,24 \times 10^{10}$	45,7	8,346	8,4
	E1 (pH 2,3)	5	100	$6,70 \times 10^9$	9,5	7,410	0,4
	E2 (Arg/imidazol)	5	116	$1,15 \times 10^9$	16,2	9,139	22,7
	iskorištenje:				71,4		31,5
7	injektirano	50	100	$1,15 \times 10^{11}$		8,399	
	NF	50	79	$5,55 \times 10^{10}$	48,3	8,234	68,4
	E1 (Arg/imidazol)	5	104	$2,12 \times 10^{10}$	18,4	8,771	235,5
	E2 (pH 2,3)	5	83	$2,56 \times 10^9$	2,2	7,280	7,6
	iskorištenje:				68,9		311,5
8	injektirano	50	100	$1,15 \times 10^{11}$		8,399	
	NF	50	87	$6,65 \times 10^{10}$	57,8	7,638	17,3
	E1 (pH 2,3)	5	91	$3,52 \times 10^9$	3,1	5,684	0,2
	E2 (Arg/imidazol)	5	114	$1,23 \times 10^{10}$	10,7	7,877	30,1
	iskorištenje:				71,6		47,6

Iskorištenje kromatografija izraženo je preko postotka ukupnih ili infektivnih čestica u eluatu u odnosu na početni uzorak koji je injektiran na kolonu, a na isti način izražena je i veličina čestica. Rezultati pokazuju da se dio infektivnog MuV-a ne veže na kolonu, odnosno prisutan je u NF-u. Na kolonu je u eksperimentima bilo injektirano između 10^7 i 10^{10} CCID₅₀/mL infektivnih virusnih čestica, a dio njih je bio prisutan u NF-u i pri najmanjim količinama injektiranog MuV-a. Ovo bi moglo ukazivati da je dosegnut maksimalni vezni kapacitet kolone, međutim kad je na kolonu injektirana manja količina virusa (npr. $10^{8,399}$ infektivnih virusnih čestica, tablica 30, eksperimenti 7 i 8) od one koja je maksimalno eluirana s kolone ($10^{9,631}$ infektivnih virusnih čestica, tablica 30, eksperiment 3), dio infektivnih čestica je i dalje bio prisutan u eluatu. Također, ne uočava se korelacija količine injektiranog MuV-a s količinom virusa u NF-u. Ovo ukazuje da na prisutnost MuV-a u NF-u osim veznog kapaciteta kolone utječe i heterogenost virusne suspenzije koja izgledno igra ključnu ulogu u ovome fenomenu. U pravilu, količina infektivnog MuV-a u NF-u nije prelazila 10%.

Vidljivo je da su infektivne čestice prisutne gotovo isključivo u eluatima s aminokiselinama, ali i da je ukupna bilanca ispod 100%, što još jednom potvrđuje da i sam kromatografski proces dovodi do gubitka infektivnosti virusa. Određivanje koncentracije ukupnih čestica u uzorku metodom NTA pokazuje da je velik broj čestica prisutan u NF-u, ali one dominantno nisu

infektivne. Ovo ukazuje da je velik broj neinfektivnih čestica (virusnih ili ECV-a) prisutan u virusnoj suspenziji te da se one ne vežu na anti-MuV kolonu, odnosno da ih je ovom metodom moguće uspješno odvojiti od infektivnih čestica MuV-a. Oko 80% infektivnih čestica nalazi se u eluatu s aminokiselinskom smjesom što ukazuje na visoku učinkovitost elucije vezanih čestica smjesom aminokiselina.

Praćenje veličine čestica u eluatima i NF-u pokazuje da NF sadrži čestice manjeg promjera. Slično kao i prilikom pročišćavanja virusa HIC-om, ovo pokazuje da dolazi do separacije čestica i po veličini, odnosno da su manje čestice gotovo u pravilu i neinfektivne. Iako povećana viskoznost eluata zbog visoke koncentracije aminokiselina može uzrokovati mali prividni porast veličine čestica, izglednije je da je to posljedica velikog broja malih čestica prisutnih u početnom uzorku koje, kao što je objašnjeno za HIC, utječu na pomak prosječne veličine prema nižim vrijednostima.

Kada je elucija izvedena obrnutim redosljedom – najprije s puferom niskog pH, a tek zatim smjesom aminokiselina (tablica 30, eksperimenti 6 i 8) uočena je zanimljivost da značajan udio infektivnog MuV-a još uvijek eluira s aminokiselinama. Pri razmatranju ovih rezultata ipak treba uzeti u obzir da je, zbog tehničkih ograničenja, ali i zbog što manjeg izlaganja imunoafinitetne kolone nepovoljnim uvjetima (pufer niskog pH), elucija s imunoafinitetnih kolona napravljena injektiranjem samo 2 mL eluata (2 volumena kolone). To je manje od optimalnog volumena elucije, ali je odabrano kako ne bi došlo do oštećenja imobiliziranih antitijela.

Mogućnost pročišćavanja MuV-a na koloni s malim kanalima ispitana je i u IAC-u (tablica 31). Iako u NF-u nije detektiran infektivni MuV, prinosi su bili iznimno niski u usporedbi s kromatografijama izvedenim na koloni s velikim kanalima. I ovdje je uočen trend porasta efikasnosti elucije s porastom koncentracije aminokiselina u smjesi.

Tablica 31. Pročišćavanje MuV-a IAC-om na anti-MuV koloni s malim kanalima. Prinos infektivnih virusa izražen je preko postotka infektivnih čestica u eluatu u odnosu na početni uzorak koji je injektiran na kolonu. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM.

eluens	<i>n</i>	prinos / %
0,5 mol/L Arg/ 0,5 mol/L Ser	4	5 \pm 0,8
0,75 mol/L Arg/ 0,75 mol/L Ser	6	11 \pm 2,6

Obzirom na rezultate dobivene HIC-om, IEX-om i IAC-om, može se zaključiti kako kolone s malim kanalima nisu pogodne za pročišćavanje ovih virusa jer daju znatno niža iskorištenja u

odnosu na kolone s velikim kanalima. Najvjerojatniji uzrok tome je stres (engl. *shear stress*) kojem su virusne čestice izložene prilikom prolaska kroz manje kanale, dok je druga mogućnost da virusne čestice ostaju zarobljene u manjim kanalima, ali obzirom da ne dolazi do porasta tlaka tijekom kromatografija, ta je opcija manje izgledna.

Iz rezultata je vidljivo da su smjese Arg i Ser odnosno Arg i imidazola dobri eluensi i u IAC-u MuV-a, iako visoke koncentracije imidazola (pogotovo iznad 1 mol/L) mogu biti štetne za infektivnost virusa. Ovakve smjese omogućavaju eluciju oko 50% ukupnih, odnosno oko 80% infektivnih čestica što predstavlja vrlo dobar prinos koji je viši nego za modelne proteine. Razlog tome vjerojatno leži u prirodi interakcije MuV-anti-MuV, a izgledno je i da sterički efekti zbog veličine virusnih čestica doprinose većoj učinkovitosti elucije MuV-a u odnosu na proteine.

Činjenica da su se otopine koje sadrže Arg i imidazol pokazale kao iznimno dobri eluensi i za proteine i viruse u IAC-u podupire pretpostavku da su upravo Arg i His te druge aromatske aminokiseline zastupljenije na kontaktnoj površini antitijelo-antigen. Arg je već ranije korišten kao eluens u afinitetnoj kromatografiji¹³⁸, ali i dalje u kombinaciji sa sniženim pH (pH 4,0) što upućuje na postojanje drugih ili dodatnih mehanizama koji narušavaju interakciju antitijelo-antigen i utječu na vodikove veze u takvom kompleksu. Visoka djelotvornost Arg kao eluensa pri sniženom pH izgledno je kombinacija dvaju mehanizama: dodatak Arg smanjuje protein-protein interakcije uslijed visoke zastupljenosti Arg na površini proteina i na kontaktnim površinama između dva proteina, a sniženi pH slabi vodikove veze između antitijela i antigena. Ovdje je pak pokazano da Arg uspješno djeluje kao eluens i pri neutralnom pH te u kombinaciji s drugim aminokiselinama iako one nisu ranije pokazale značajan doprinos u eluciji antigena u afinitetnoj kromatografiji¹³⁹.

Uspješnost pročišćavanja MuV-a IAC-om ispitana je praćenjem količine HCP-a prisutnih u pročišćenim uzorcima (tablica 32).

Tablica 32. Udio HCP-a prisutnih u uzorcima MuV-a pročišćenih IAC-om. Udio je dan kao postotak mase HCP-a prisutan u ispitivanom uzorku u odnosu na početni uzorak. Koncentracija svake komponente u E1 iznosila je 0,75 mol/L. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=8$.

frakcija	HCP / %
NF	25 \pm 5,8
E1 (Arg/Ser ili Arg/imidazol)	25 \pm 5,5
E2 (pH 2,3)	0

Uočava se da je podjednaka količina HCP-a prisutna u NF-u i u aminokiselinskom eluatu, dok HCP-i nisu detektirani u eluatu niskog pH. Slično kao za kvantifikaciju HCP-a u uzorcima pročišćenima HIC-om, bilanca iznosi oko 50% što ukazuje na ograničenje ove metode. Moguće je da nizak pH eluata E2 ometa točno određivanje HCP-a u takvim uzorcima. Prisutnost relativno velike količine HCP-a u eluatu E1 može se objasniti time da virusne čestice također sadrže HCP-e kao što je ranije komentirano^{48-52,65}, ali postoji mogućnost da se oni supročišćavaju kao slobodni proteini ili unutar ECV-a. Naime, iako je IAC visoko specifična metoda, na kolonu su imobilizirana poliklonska antitijela (engl. *polyclonal antibodies*, pAb) proizvedena imunizacijom zamorčića MuV-om koji je pročišćen UC-om. Tako pročišćeni uzorak MuV-a izgledno i dalje sadrži značajne količine ECV-a^{53,54} što znači da neka stvorena antitijela mogu prepoznavati i HCP-e prisutne na površini ECV-a. Iako je testom neutralizacije virusa pokazano da ova pAb neutraliziraju MuV, neka antitijela zasigurno prepoznaju i HCP-e koji su bili prisutni u pripravku za imunizaciju. Ovaj problem bi se u teoriji donekle mogao riješiti imobilizacijom monoklonskih antitijela (engl. *monoclonal antibodies*, mAb) specifičnih za površinske proteine virusa (proteini HN i F kod MuV-a) na kolonu, međutim niti takav pristup ne bi jamčio izolaciju samo virusnih čestica. Naime, ECV-i i virusi koriste iste mehanizme izlaska iz stanice, a čini se da ECV-i i virusi uglavnom pupaju iz istih membranskih mikrodomena^{79,81,87} što znači da prilikom pupanja ECV-i mogu u svoju membranu slučajno ugraditi površinske proteine virusa. To u konačnici znači da će mAb specifična na površinske proteine virusa prepoznavati takve ECV-e i supročistiti ih sa česticama virusa, odnosno da zbog prirode ECV-a i virusa te njihove sličnosti trenutno nije dostupna metoda kojom se mogu dobiti virusni pripravci bez prisutnih ECV-a. Obzirom na to, ispitano je pročišćavanje ECV-a dobivenih iz neinficiranih supernatanata kulture stanica Vero na anti-MuV koloni (tablica 33).

Tablica 33. Pročišćavanje ECV-a IAC-om na anti-MuV koloni s velikim kanalima. Sve vrijednosti dane su u odnosu na početni uzorak suspenzije ECV-a nakon mikrofiltracije. Koncentracija svake komponente u E1 iznosila je 0,75 mol/L. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=4$.

frakcija	NF	E1	
		(Arg/Ser ili Arg/imidazol)	E2 (pH 2,3)
veličina / %	70 \pm 3,6	106 \pm 4,9	109 \pm 9,3
Cukupne čestice / %	33 \pm 4,3	30 \pm 4,3	4 \pm 0,7
HCP / %	32 \pm 14,4	21 \pm 4,4	0

I u ovom slučaju veličina ECV-a u različitim frakcijama prati isti trend kao i kod virusa. Čini se da u IAC-u ipak nešto veći dio ECV-a zaostaje u NF-u, ali u E1, koji prilikom kromatografskog pročišćavanja MuV-a sadrži najveći dio infektivnih čestica, i dalje zaostaju značajne količine ECV-a odnosno HCP-a. Ovi rezultati dalje potvrđuju pretpostavku da se ECV-i (a potencijalno i neki slobodni HCP-i prisutni u supernatantu stanične kulture) supročišćavaju i ovom metodom, izgledno upravo zbog određenog udjela imobiliziranih pAb koja su specifična na površinske proteine ECV-a koji su bili prisutni u pripravku MuV-a korištenom za imunizaciju u proizvodnji antitijela.

4.6. Istraživanje proteoma i lipidoma MuV-a i MeV-a

Genomi MuV-a i MeV-a dobro su istraženi, ali proteom MuV-a je tek nedavno prvi put istražen pomoću MS-a, dominantne metode u području istraživanja proteoma virusa⁴⁶. S druge strane, proteom MeV-a još nije istraživani MS-om. Genomi MuV-a i MeV-a kodiraju redom za 9 odnosno 8 proteina (tablice 1 i 2, odjeljak 2.1.1.), ali je važno istražiti jesu li svi ili samo neki od njih uistinu sintetizirani i prisutni u virusnim česticama. Uz to, iznimno je važno i pokušati identificirati koji HCP-i su prisutni unutar virusnih čestica, a koji su tek kontaminacija, prisutni kao slobodni proteini ili unutar prisutnih ECV-a. Prisutnost ECV-a do sada je često zanemarivana prilikom istraživanja virusnih proteoma, a ona otežava određivanje koji su HCP-i prisutni unutar virusnih čestica. Kako bi se pokušao razriješiti taj problem, provedena je komparativna analiza rezultata dobivenih nakon što su virusi i ECV-i pročišćeni metodama opisanima u odjeljcima 4.3. – 4.5.

Proteomi MuV-a i MeV-a pročišćenih UC-om i HIC-om, a za MuV još i IAC-om, analizirani su i uspoređeni međusobno, ali i s proteomima ECV-a pročišćenih iz supernatanata neinficiranih kultura stanica Vero istim metodama koje su korištene za pročišćavanje virusa. Svi uzorci dobiveni kromatografskim postupcima koncentrirani su UC-om prije podvrgavanja razdvajanju elektroforezom kako bi se postigla koncentracija virusnih proteina dovoljna za detekciju u gelu, ali to predstavlja i dodatni korak pročišćavanja koji omogućava uklanjanje slobodnih proteina koji su se eventualno supročistili u kromatografskim frakcijama budući da pri korištenim uvjetima (UC 2 h pri $141\ 000 \times g$) ne dolazi do taloženja slobodnih proteina. U tablici 34 dan je pregled svih uzoraka analiziranim MS-om iz kojeg se vidi da su infektivne čestice bile prisutne u svim analiziranim virusnim pripravcima.

Tablica 34. Koncentracija ukupnih i infektivnih čestica u uzorcima analiziranim MS-om.

		MuV	MeV	ECV	
		3	3	2	
<i>n</i>		(a) no	(a) 11,934		
UC	log ($C_{\text{ukupne čestice}} / \text{mL}^{-1}$)	(b) 12,002	(b) 11,387	(c) 11,700	
		(c) 12,310	(c) 11,873	(d) 11,939	
	log CCID ₅₀ /mL	(a) 6,422	(a) 9,135	-	
		(b) 7,946	(b) 9,765	-	
	(c) 7,085	(c) 7,705	-		
		1	1	1	
HIC ^{#*}	E1	log ($C_{\text{ukupne čestice}} / \text{mL}^{-1}$)	9,026	8,619	8,379
		log CCID ₅₀ /mL	7,835	5,641	no
	E2	log ($C_{\text{ukupne čestice}} / \text{mL}^{-1}$)	9,462	9,113	8,874
		log CCID ₅₀ /mL	8,174	6,333	no
		2	0	1	
IAC [#]	log ($C_{\text{ukupne čestice}} / \text{mL}^{-1}$)	(a) no	-	8,798	
		(b) 9,200	-		
	log CCID ₅₀ /mL	(a) no	-	-	
		(b) 6,832	-	-	

(a), (b), (c) – podaci koji odgovaraju uzorcima označenim na isti način na odgovarajućim slikama u daljnjem tekstu; # - uzorak je dobiven spajanjem eluata dobivenih kroz 4 uzastopna dana; * - koncentracija ukupnih i infektivnih izračunata je kao srednja vrijednost za spojene eluate nakon koncentriranja UC-om na temelju podataka o prinosu UC-a danom u odjeljku 4.3.

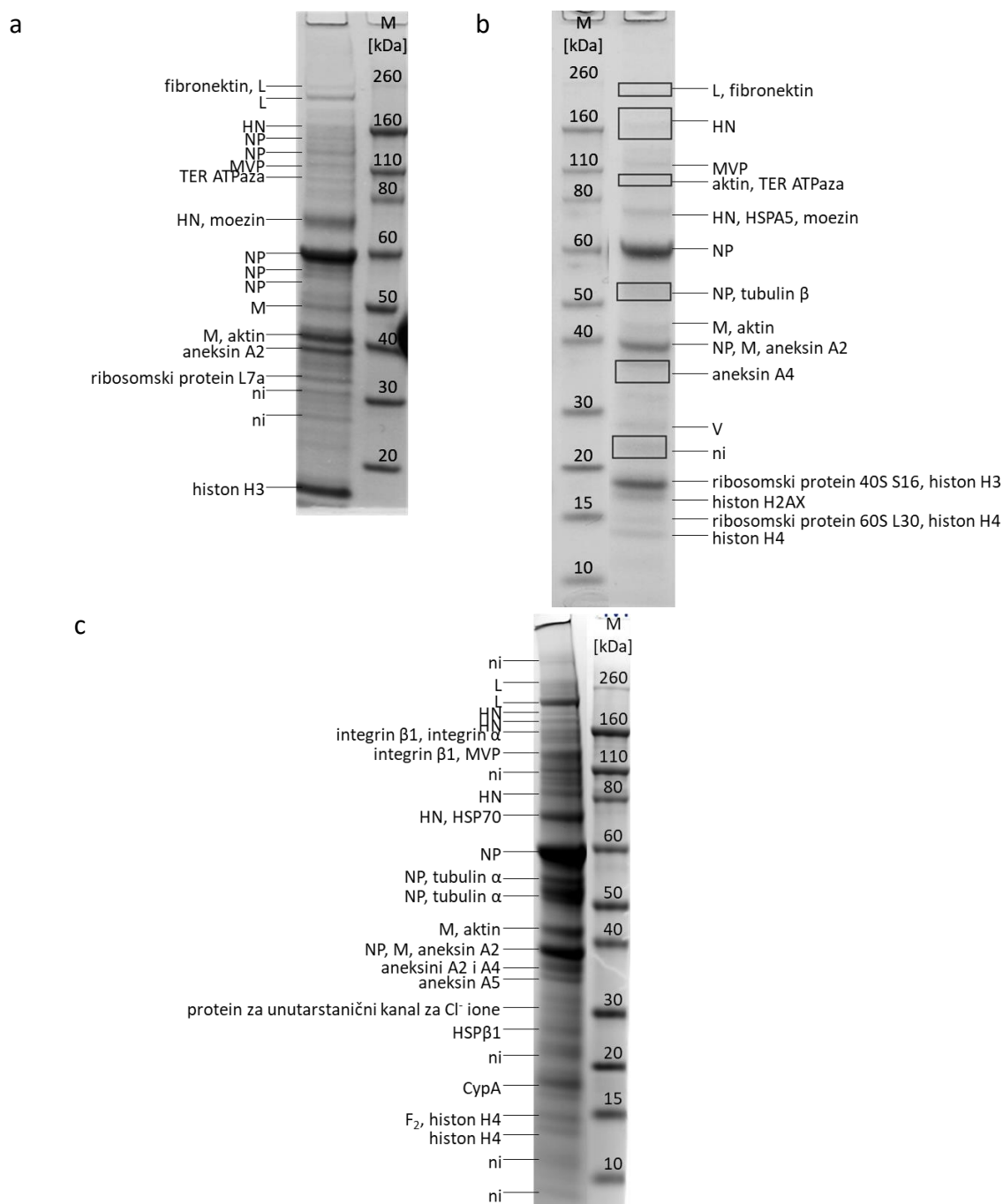
4.6.1. Proteomi MuV-a i MeV-a pročišćenih UC-om

4.6.1.1. MuV

Analiza tri odvojena uzorka MuV-a pročišćenog UC-om pokazuje prisustvo brojnih pruga. Ovdje je detektirano ukupno 6 virusnih proteina (slika 38): L, HN, NP, M, V i F₂.

Protein HN detektiran je pri molekulskim masama sličnim teorijski izračunatoj iz njegove aminokiselinske sekvence (tablica 1, odjeljak 2.1.1.), i to kao monomer i dimer, što je već ranije opisano^{47,200}. Eventualna odstupanja od teorijski izračunatog M_r za HN posljedica su posttranslacijski dodanih šećera budući da se radi o glikoproteinu. U uzorku na slici 38 c detektiran je u 4 pruge što ukazuje i na prisutnost različitih glikoformi.

Protein NP detektiran je pri molekulskim masama jednakim i manjim od teorijske (61 kDa, tablica 1), u 3 – 4 pruge u rasponu od 39 do 61 kDa. Usporedba detektiranih peptida u spektrima PMF (slika 39) ukazuje na moguće skraćivanje proteina na C-kraju kao što je ranije opisano u literaturi⁴⁷. Pruge nižih molekulskih masa (39 – 55 kDa) mogu potjecati od skraćenih formi proteina nastalih uslijed promjena u transkripciji ili translaciji, ili od degradacijskih produkata proteina NP^{40,47}.



Slika 38. MALDI-TOF/TOF-MS analiza pruga izrezanih iz 3 zasebna uzorka MuV-a pročišćenog UC-om koji su navedeni u tablici 34 (a, b i c). TER ATPaza – tranzicijska ATPaza endoplazmatskog retikuluma, MVP - većinski protein ribonukleoproteinskog citoplazmatskog organela (engl. *major vault protein*) HSP – protein toplinskog šoka (engl. *heat shock protein*), CypA – cikofilin A, ni – nije identificirano. Kvadrati označavaju veće dijelove gela koji su izrezani, a koji mogu sadržavati veći broj slabo vidljivih pruga.



Slika 39. Peptidi detektirani u spektru PMF proteina NP u prugama u uzorku na slici 38c. Crna linija – približna molekulska masa 61 kDa, plava linija – približna molekulska masa 55 kDa, crvena linija - približna molekulska masa 53 kDa, zelena linija – približna molekulska masa 39 kDa. Sekvenca peptida koji su sekvencirani MS/MS-om ispisana je podebljano. Strelice označavaju peptide koji su sekvencirani samo u jednoj prugi.

Ovdje je protein F prvi puta detektiran u uzorku MuV-a analiziranom MS-om, ali je detektiran samo njegov fragment F_2 , s molekulskom masom oko 15 kDa prema procjeni iz pozicije na gelu. Zreli protein F sastoji se od fragmenata F_1 i F_2 koji su povezani disulfidnim vezama, a nastaju cijepanjem prekursorskog proteina F_0 . Teorijski M_r fragmenta F_2 iznosi 11 kDa (tablica 1), ali obzirom da se radi o glikoproteinu, razlika u masi izgledno je posljedica posttranslacijski dodanih šećera.

Proteini L i M detektirani su u dvije pruge. Iz gela procijenjene molekulske mase pri kojima su detektirani načelno su u skladu s teorijski izračunatim masama iz njihovih aminokiselinskih

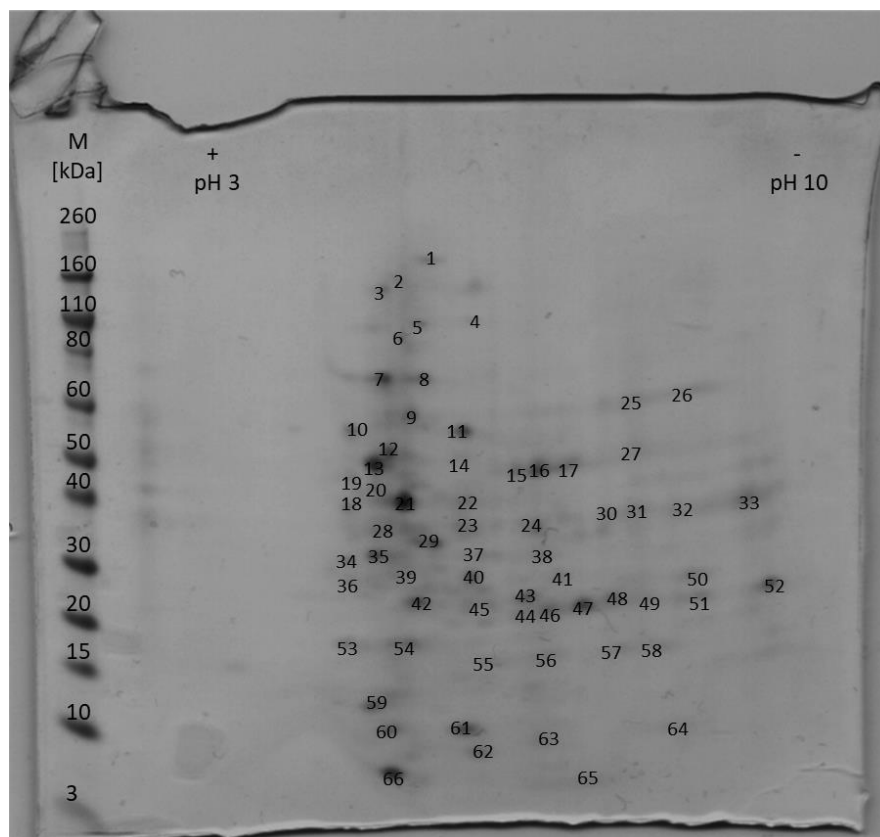
sljedova (tablica 1). I dok uzrok pojave proteina L u dvije pruge visokih molekulskih masa ostaje nerazjašnjen, pojava dubleta pruga proteina M oko 37 – 39 kDa već je ranije uočena kod proteina M MeV-a, a isto tako je uočeno i da protein M ne putuje kao diskretna pruga već dolazi do razvlačenja (engl. *smear*) pruge na gelu, čak i pri reducirajućim uvjetima²⁰¹. Izgledno je da se protein M MuV-a pojavljuje u dubletu pruga iz istog razloga kao i M MeV-a, iako uzrok tome još nije u potpunosti razjašnjen.

Protein P nije detektiran u ovim uzorcima što je neočekivano prvenstveno obzirom da je ranije nađen u uzorcima MuV-a pročišćenim UC-om⁴⁷. Uzroci tome mogu biti različiti, ali najizgledniji je u ovom slučaju varijabilnost količine ukupnih i infektivnih virusnih čestica (slike 10 i 11, odjeljak 4.1.) i količine virusnih proteina od dana do dana žetve (slika 26, odjeljak 4.3.) iz čega slijedi da količina virusnih proteina u početnim suspenzijama također varira od dana do dana što može značajno utjecati na detektirane virusne proteine. Neki izvještaji govore o tome da je MuV P osjetljiviji na djelovanje proteaza u usporedbi s ostalim virusnim proteinima, slično kao i MeV P^{40,202} što bi također moglo utjecati na njegovu detekciju.

Detektiran je i protein V, dok su proteini I i SH ostali nedetektirani. Proteini V i I produkti su alternativne transkripcije gena za protein P, a smatraju se nestrukturnim proteinima²² zbog čega je značajno uočiti da se V ipak ugrađuje u virione. U literaturi je opisana uloga proteina V kao proteina koji potpomaže infekciju MuV-om tako što inhibira signalizaciju interferonom, dok funkcija proteina I nije još razjašnjena^{22,28,30,31}. Protein I zasad nije detektiran u virionima, iako je njegova ekspresija potvrđena u inficiranim stanicama^{11,22}. Ovo može objasniti zašto nije detektiran u uzorcima MuV-a, ali postoji mogućnost i da nije detektiran zbog vrlo niskih koncentracija u virionima MuV-a.

Protein SH nije detektiran u uzorcima MuV-a, a do sad je otkriven samo u inficiranim stanicama. Funkcija proteina SH još nije razjašnjena, ali bi mogao sudjelovati u izbjegavanju imunološkog odgovora domaćina tako što blokira apoptozu posredovanu faktorom TNF- α ³². Protein SH vjerojatno nije detektiran zbog svoje niske koncentracije, ali obzirom da je pokazano da nije neophodan za rast virusa^{32,203}, moguće je da nije prisutan u virionima, odnosno da zato nije detektiran u uzorcima MuV-a.

Kad je uzorak na slici 38 c podvrgnut razdvajanju na 2D-GE, neočekivano su detektirana samo dva virusna proteina - NP i P uz brojne HCP-e (slika 40, tablica 35).



Slika 40. MALDI-TOF/TOF-MS analiza točkica izrezanih iz uzorka MuV-a pročišćenog UC-om (tablica 34 i slika 38, uzorak c) nakon razdvajanja 2D-GE-om. Popis identificiranih proteina dan je u tablici 35.

Nejasno je zašto su samo ta dva proteina detektirana, obzirom da je u istom uzorku nakon razdvajanja samo SDS-PAGE-om detektirano 6 virusnih proteina. Pritom je protein P detektiran pri odgovarajućoj pI vrijednosti (pI oko 7,8), ali u nekoliko točkica – jednoj pri molekularnoj masi koja odgovara teorijski izračunatoj iz njegove aminokiselinske sekvence, te u dvije pri znatno nižoj molekularnoj masi od teorijske što je neočekivano. Prisutnost proteina P pri nižoj molekularnoj masi je u skladu s gore spomenutom pretpostavkom o većoj podložnosti P razgradnji proteazama. Protein NP detektiran je u tri točke pri odgovarajućoj molekularnoj masi, ali dvije točke se nalaze pri pI vrijednosti oko 9 koja nije u skladu s teorijskom (pI 5,2).

Tablica 35. Proteini identificirani u uzorku MuV-a pročišćenom UC-om nakon razdvajanja pomoću 2D-GE-a (slika 40).

točka	protein	točka	protein
1	pleksin B2	35	aneksin A5
2	ni	36	protein 14-3-3 γ
3	integrin αV	37	ni
4	integrin $\alpha 3$	38	aneksin A2
5	nemišićni miozin, teški lanac	39	protein za unutarstanični kanal za Cl ⁻ ione
6	ni	40	HSP β 1
7	HSPA5	41	trioza-fosfat-izomeraza, fosfoglicerat-mutaza
8	HSP70 - mortalin	42	ubikvitin-karboksi-terminalna hidrolaza, sorcin
9	HSP60, NP	43	porin 31
10	protein-disulfid-izomeraza A3, PDIA3	44	superoksid-dismutaza, SOD
11	PDIA3	45	GST, aneksin A1
12	tubulin α	46	peroksiredoksin, SOD
13	tubulin β	47	SOD
14	heterogeni jezgreni ribonukleoprotein	48	P, SOD
15	α -enolaza, P	49	ni
16	α -enolaza	50	P
17	α -enolaza	51	SOD, peroksiredoksin
18	vimentin, aktin	52	peroksiredoksin
19	tubulin β	53	vimentin
20	aktin, HSP71	54	aneksin A2, Rab7-GTPaza
21	aktin	55	ni
22	aktin	56	CypA
23	aneksin A2, α -enolaza	57	CypA
24	aneksin A2, aldolaza-reduktaza	58	CypA
25	NP	59	galektin-1
26	NP	60	ni
27	ni	61	protein S100-A11
28	aneksin A2	62	protein S100-A11
29	aneksin A4	63	protein S100-A11
30	aneksin A2	64	ni
31	aneksin A2	65	ni
32	aneksin A2	66	ni
33	galektin-3		

U ovom uzorku detektiran je razmjerno velik broj HCP-a od kojih je većina već ranije pronađena u virusnim uzorcima pročišćenima UC-om. Teorijske molekulske mase detektiranih HCP-a, kao i njihove *pI* vrijednosti u načelu su u skladu s njihovim pozicijama na gelu. Neki HCP-i nađeni su i u točkama čiji *pI* se ne slaže s teorijskim, a jedno moguće objašnjenje zašto su neki HCP-i i virusni proteini prisutni u točkama s različitim *pI* mogu biti i nesavršenosti IEF-

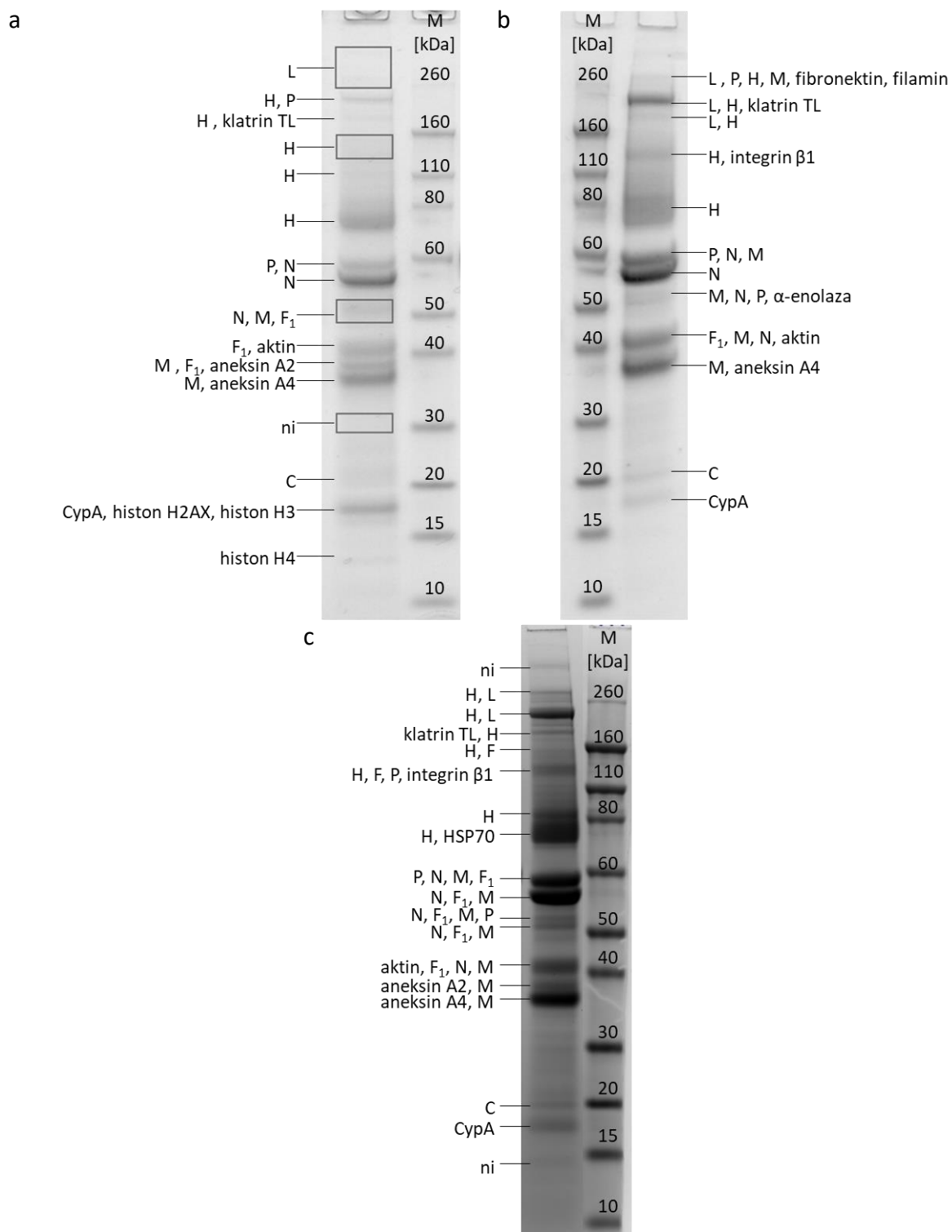
a. Iako je IEF izvođen 6 h pri 2000 V što bi trebalo biti dovoljno za potpuno fokusiranje, na gelu je još uvijek vidljivo djelomično razvlačenje točaka. Uzorci korišteni za IEF sadržavali su koncentracije soli koje su bile nešto više od optimalnih za IEF što je moglo dovesti do ovakvih rezultata.

Iznenadujuće je i da najintenzivnije točke na gelu pripadaju HCP-ima, a ne virusnim proteinima.

4.6.1.2. MeV

Analiza MeV-a pročišćenog UC-om u tri odvojena uzorka (slika 41) potvrdila je prisutnost 7 od 8 virusnih proteina: L, H, P, N, F₁, M i C. Protein C detektiran je prvi put u sva tri uzorka na poziciji koja odgovara teorijski izračunatoj molekularnoj masi iz njegovog aminokiselinskog slijeda (tablica 2, odjeljak 2.1.1.). Ovaj protein ranije je detektiran u inficiranim stanicama Vero, ali nije bio potvrđen unutar viriona MeV-a⁴³. Intenzitet pruga koje sadrže protein C ukazuje na njegovu slabu zastupljenost u virionima. Virusni proteini V i C produkti su alternativne transkripcije gena za protein P^{13,23}, slično kao proteini V i I kod MuV-a, a prema literaturi oni sudjeluju u izbjegavanju imunološkog odgovora domaćina^{13,24,27,29}. Ovi proteini ne smatraju se strukturnim proteinima MeV-a te je pokazano da nisu potrebni za replikaciju MeV-a u stanicama Vero^{13,24,25} zbog čega je iznimno zanimljivo otkriti da se C zaista sintetizira tijekom infekcije u tim stanicama te da se također pakira u virione MeV-a. Protein V i dalje nije detektiran, a razlog tome može biti njegova niska zastupljenost (još niža nego proteina C) ili jednostavno nije prisutan u virionima iz upravo gore navedenog razloga.

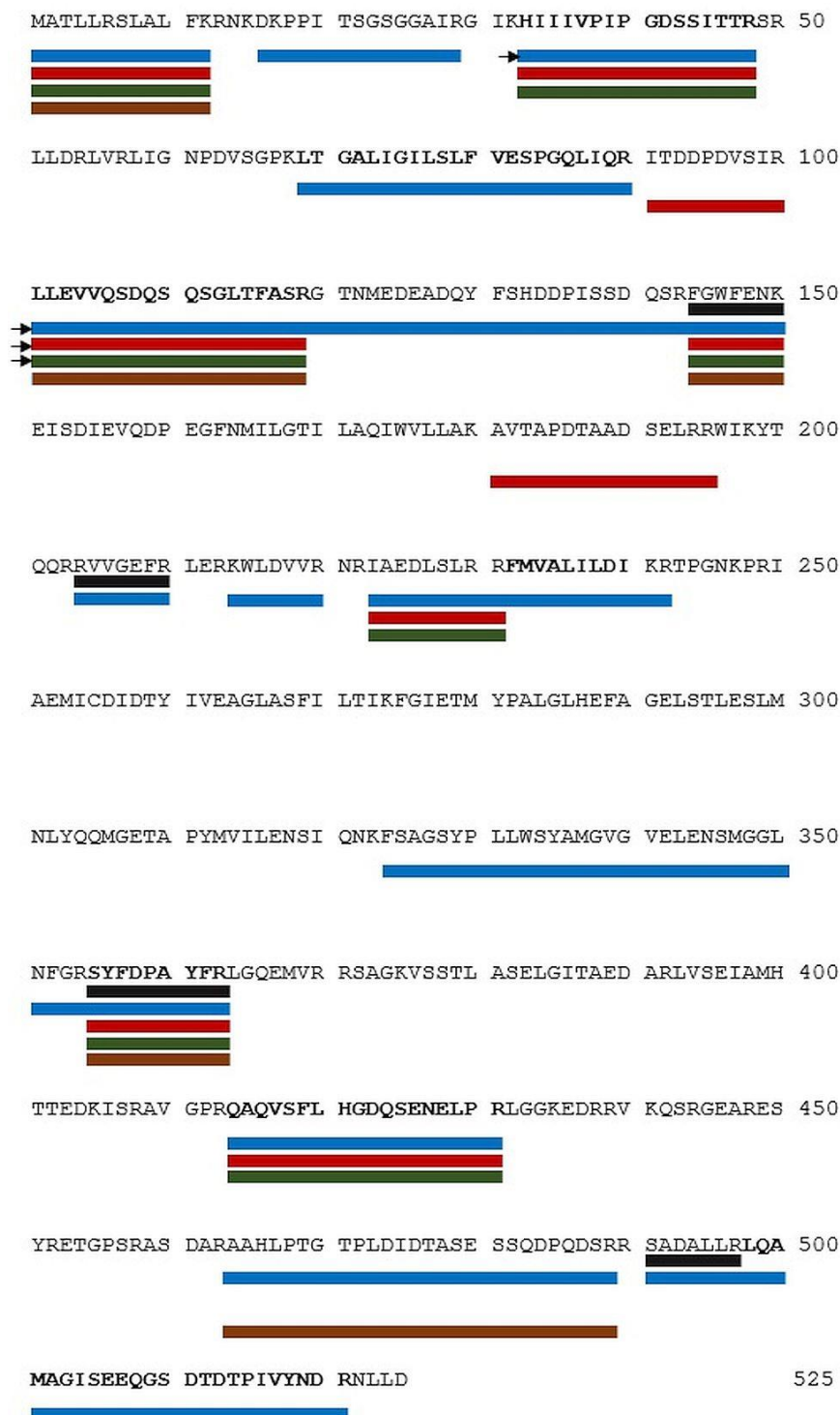
Protein H otkriven je u 5 do 7 pruga pri molekularnoj masi jednakoj ili većoj od teorijski izračunate na temelju njegovog aminokiselinskog slijeda (tablica 2). Obzirom da je H glikoprotein, ovakav rezultat ukazuje, osim na prisutnost dimera i monomera, kao što je ranije opisano⁴⁴, i na prisutnost različitih glikoformi u virusnim česticama.



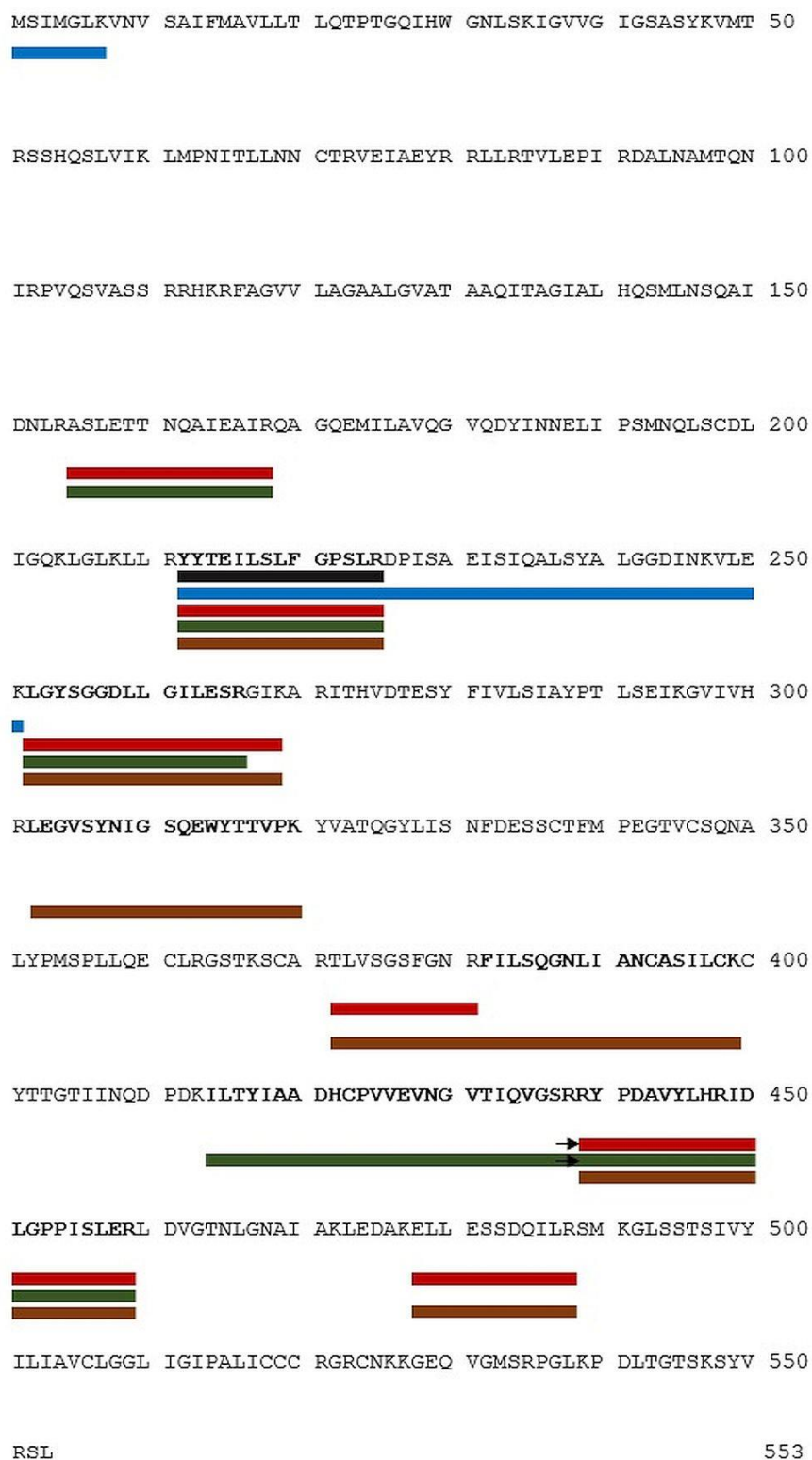
Slika 41. MALDI-TOF/TOF-MS analiza pruga izreznanih iz 3 zasebna uzorka MeV-a pročišćenog UC-om koji su navedeni u tablici 34 (a, b i c). TL – teški lanac. Kvadrati označavaju veće dijelove gela koji su izrezani, a koji mogu sadržavati veći broj slabo vidljivih pruga.

Protein N detektiran je u 3 do 5 pruga, pri molekularnoj masi približno jednakoj ili manjoj od teorijski izračunate (tablica 2), što je u skladu s ranijim rezultatima koji navode da pruge nižih molekularskih masa (40 – 55 kDa) potječu od njegovih skraćenih formi uslijed promjena u transkripciji ili translaciji ili od degradacijskih produkata^{40,47}. Protein N u prugi procijenjene molekularske mase od 57 kDa sekvenciran je MS/MS-om od pozicije 33 do 521 (slika 42) što ukazuje na to da protein nije skraćen na C-kraju, iako bi mogao biti skraćen na N-kraju obzirom da se nalazi pri nešto nižoj molekularskoj masi od teorijski izračunate, a prisutnost peptida s N-kraja proteina nije potvrđena. Usporedba peptida prisutnih u spektrima PMF dobivenih iz ostalih pruga u kojima je detektiran N ne omogućava konačne zaključke o tome je li protein N prisutan pri nižim molekularskim masama skraćen na N- ili C-kraju. Zanimljivo je da je intenzitet pruge pri 57 kDa viši od one pri 59 kDa (barem u uzorcima na slici 41a i b). To može biti posljedica nekih događaja u transkripciji ili translaciji koji rezultiraju nastankom skraćene forme proteina ili degradacije proteina proteazama tijekom pročišćavanja virusa, a što rezultira većom zastupljenošću skraćene forme proteina u uzorku.

Protein F je također prisutan u više pruga, ali su samo peptidi koji potječu iz fragmenta F₁ potvrđeni u uzorcima. Sekvencirani peptidi ne omogućavaju zaključke o formama proteina koje su prisutne u različitim prugama na gelu (slika 43). Pruga pri otprilike 40 kDa najvjerojatnije potječe od neglikoziliranog fragmenta F₁ obzirom da pozicija pruge na gelu odgovara izračunatoj molekularskoj masi (tablica 2) te je u skladu s ranijim izvještajima^{40,43,45}. Posebnost proteina F kod MeV-a je ta da je glikoziliran samo fragment F₂, za razliku od proteina F ostalih paramiksovirusa koji posjeduju glikozilacijska mjesta na oba fragmenta. Pretpostavka je da fragment F₂ kod MeV-a u pravilu ostaje nedetektiran prilikom bojenja gelova CBB-om zbog njegov difuzne prirode uslijed vezanih šećera⁴¹. Više pruga koje sadrže fragment F₁ prisutno je u rasponu molekularskih masa od 50 do 59 kDa koje su veće od teoretski izračunatih. Postoji mogućnost da neke od njih sadrže prekursorski protein F₀, različite forme proteina F uslijed promjena u transkripciji ili translaciji ili palmitoilirani fragment F₁²⁰⁴, ali trenutni rezultati ne mogu potvrditi niti jednu od navedenih hipoteza.



Slika 42. Peptidi detektirani u spektru PMF proteina N u prugama u uzorku na slici 41c. Crna linija – približna molekulska masa 59 kDa, plava linija – približna molekulska masa 57 kDa, crvena linija - približna molekulska masa 53 kDa, zelena linija – približna molekulska masa 51 kDa, smeđa linija – približna molekulska masa 42 kDa. Sekvenca peptida koji su sekvencirani MS/MS-om ispisana je podebljano. Strelice označavaju peptide koji su sekvencirani samo u jednoj prugi.



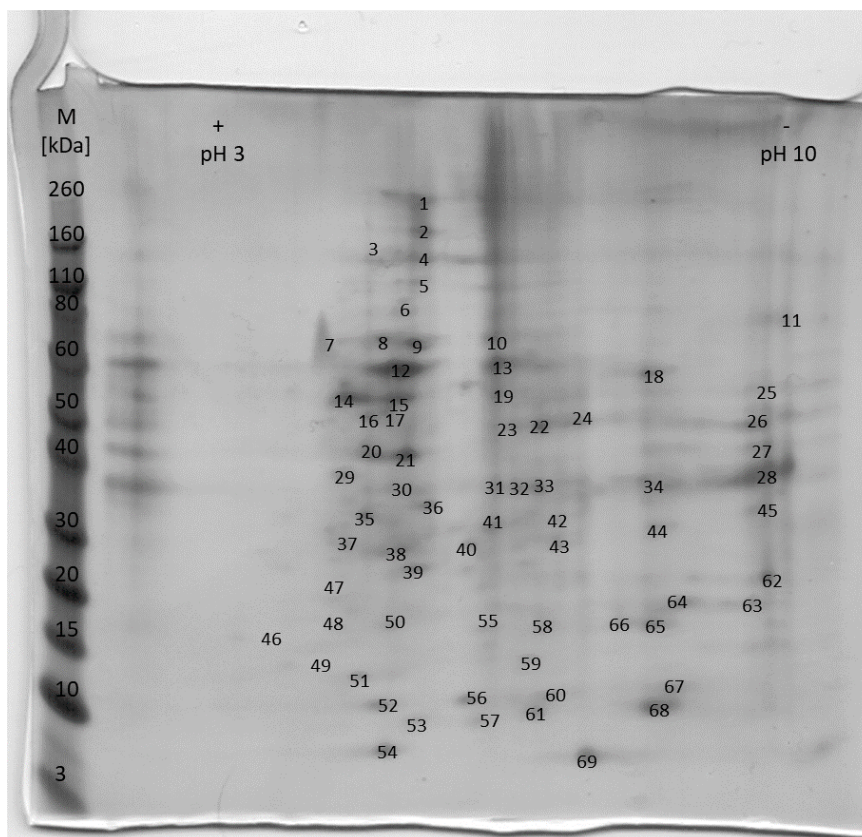
Slika 43. Peptidi detektirani u spektru PMF proteina F u prugama u uzorku na slici 41c. Crna linija – približna molekulska masa 59 kDa, plava linija – približna molekulska masa 57 kDa, crvena linija - približna molekulska masa 53 kDa, zelena linija – približna molekulska masa 51 kDa, smeđa linija – približna molekulska masa 42 kDa. Sekvenca peptida koji su sekvencirani MS/MS-om ispisana je podebljana. Strelice označavaju peptide koji su sekvencirani samo u jednoj prugi.

Protein P detektiran je u 2 odnosno 3 pruge. Pruge pri visokim molekulskim masama (iznad 110 kDa) najvjerojatnije sadrže nedisocirane agregate proteina P ili njegove agregate s drugim proteinima detektiranim u tim prugama. Pruge prisutne na otprilike 53 kDa odgovaraju teorijski izračunatoj molekulskoj masi proteina P na temelju njegove aminokiselinske sekvence što ukazuje da se u njima nalazi protein bez posttranslacijskih modifikacija. Obzirom da je P opsežno fosforiliran, pruge oko 60 kDa najvjerojatnije sadrže modificirani protein. P je već ranije detektiran u prugama u rasponu od 65 do 70 kDa, a izgledno je da je u njima prisutan zbog promijenjene mobilnosti u gelu uslijed velikog negativnog naboja koji je posljedica opsežne fosforilacije.

Protein M također se pojavljuje u više pruga, kao što je ranije uočeno za MuV. Kao što je spomenuto u prethodnom odjeljku, pojava dubleta pruga oko 37 – 39 kDa kod proteina M MeV-a već je ranije uočena²⁰¹, ali uzrok pojave M pri višim molekulskim masama zasad ostaje nerazjašnjen. Iako se čini da je biološki aktivan oblik proteina M dimer^{201,205}, to ne objašnjava pojavu više pruga u rasponu 40 – 60 kDa budući da je ta molekulska masa manja od one teorijski izračunate za dimer, a obzirom da je elektroforeza provedena u denaturirajućim i reducirajućim uvjetima, izgledno je da bi pritom došlo do disocijacije dimera. Promjene u transkripciji, kao što je primjerice stvaranje policistronskih RNA i njihova translacija, mogle bi objasniti pojavu proteina M pri molekulskim masama većim od teorijskih²⁰⁶.

Kod svih proteina koji se pojavljuju u više pruga mogućnost unakrsne kontaminacije pruga tijekom pripreme uzoraka za analizu MS-om je isključena zbog iznimno pažljivog rukovanja uzorcima te zbog posebne pažnje posvećene upravo sprječavanju te mogućnosti.

Kad je isti uzorak kao na slici 41 c podvrgnut razdvajanju na 2D-GE (slika 44), detektirana su samo 3 do 4 virusna proteina (tablica 36): potvrđeni su proteini N, P i M, dok je na gelu pri molekulskoj masi oko 31 kDa detektiran protein koji bi mogao biti protein V ili degradacijski produkt proteina P⁴⁰. Ovakav rezultat mogao bi biti u skladu s osjetljivošću proteina P na djelovanje proteaza što bi isto moglo objasniti njegovu pojavu pri nižim molekulskim masama^{40,43,45}. Obzirom da su detektirani peptidi prisutni u sekvenci oba proteina (P i V) nije moguće nedvosmisleno odrediti kojem proteinu pripadaju.



Slika 44. MALDI-TOF/TOF-MS analiza točaka izrezanih iz uzorka MeV-a pročišćenog UC-om (tablica 34 i slika 41, uzorak c) nakon razdvajanja 2D-GE-om. Popis identificiranih proteina dan je u tablici 36.

Proteini N, P i M nađeni su u više točaka. Načelno, njihova teorijska molekulska masa je u skladu s njihovim pozicijama na gelu. Neke od tih točaka su u skladu s teorijskim vrijednostima pI za te proteine ($pI(N)=5,2$; $pI(P)=5,1$, $pI(M)=9,2$), dok se druge pojavljuju pri neočekivanim pI vrijednostima. Trenutno uzrok toj pojavi nije jasan te su potrebni dodatni eksperimenti kako bi se on razlučio. Pozicija većine HCP-a na gelu odgovara njihovim teorijskim molekulskim masama i pI vrijednostima.

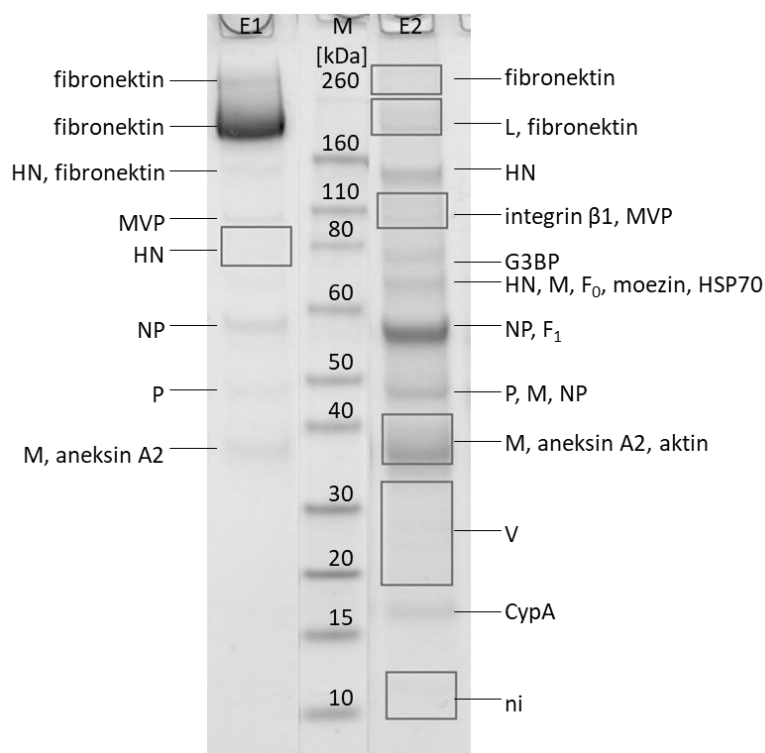
Tablica 36. Proteini identificirani u uzorku MeV-a pročišćenom UC-om nakon razdvajanja pomoću 2D-GE-a.

točka	protein	točka	protein
1	e	36	aneksin A4
2	e	37	protein 14-3-3 γ
3	e	38	ni
4	e	39	e
5	e	40	HSP β 1
6	N	41	P/V
7	e	42	e
8	HSPA5	43	trioza-fosfat-izomeraza
9	HSP71	44	HSP71
10	moezin	45	moesin
11	e	46	e
12	P	47	ni
13	N, P	48	laki lanac miozinskog regulatornog proteina
14	N, P	49	e
15	N, P	50	e
16	tubulin α	51	galektin-1
17	ni	52	e
18	ni	53	e
19	N	54	ni
20	aktin	55	e
21	aktin	56	ni
22	e	57	e
23	e	58	CypA
24	α -enolaza	59	e
25	e	60	e
26	e	61	ni
27	aktin	62	peroksiredoksin
28	M, P	63	kofilin
29	M, P	64	kofilin
30	ni	65	CypA
31	M	66	CypA
32	ni	67	ni
33	e	68	ni
34	e	69	ribosomski protein S27a
35	aneksin A5		

4.6.2. Proteomi MuV-a i MeV-a pročišćenih HIC-om

4.6.2.1. MuV

Analiza MuV-a pročišćenog HIC-om je po prvi put omogućila detekciju više od 6 virusnih proteina u jednom uzorku. Detektirano je 7 od 9 virusnih proteina (slika 45): L, HN, NP, P, M, F i V.



Slika 45. MALDI-TOF/TOF-MS analiza pruga izreznanih iz uzorka MuV-a pročišćenog HIC-om. E1 – eluat s 0,5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, E2 – eluat s 50 mmol/L HEPES-om, G3BP – galektin-3-vezujući protein. Kvadrati označavaju veće dijelove gela koji su izrezani, a koji mogu sadržavati veći broj slabo vidljivih pruga.

Protein HN ponovo je detektiran u dvije pruge koje svojom pozicijom na gelu odgovaraju teoretski izračunatim masama monomera i dimera proteina HN (tablica 1), kao što je već ranije opisano^{47,200}.

Protein NP detektiran je u dvije pruge pri otprilike 45 i 57 kDa, obje ispod teorijske molekulske mase NP-a (61 kDa, tablica 1). Usporedba peptida prisutnih u spektrima PMF (slika 46) ovih pruga ukazuje da obje pruge sadrže C-skraćene forme proteina što je već ranije opisano⁴⁷.



Slika 46. Peptidi detektirani u spektru PMF proteina NP u prugama u eluatu E2 na slici 45. Crna linija – približna molekulska masa 57 kDa, plava linija – približna molekulska masa 45 kDa. Sekvenca peptida koji su sekvencirani MS/MS-om ispisana je podebljano. Strelice označavaju peptide koji su sekvencirani samo u jednoj prugi. Siva zvjezdica označava poziciju 400 koja skraćivanjem proteina s C-kraja daje protein od 45 kDa, a crna poziciju 513 koja skraćivanjem proteina s C-kraja daje protein od 57 kDa.

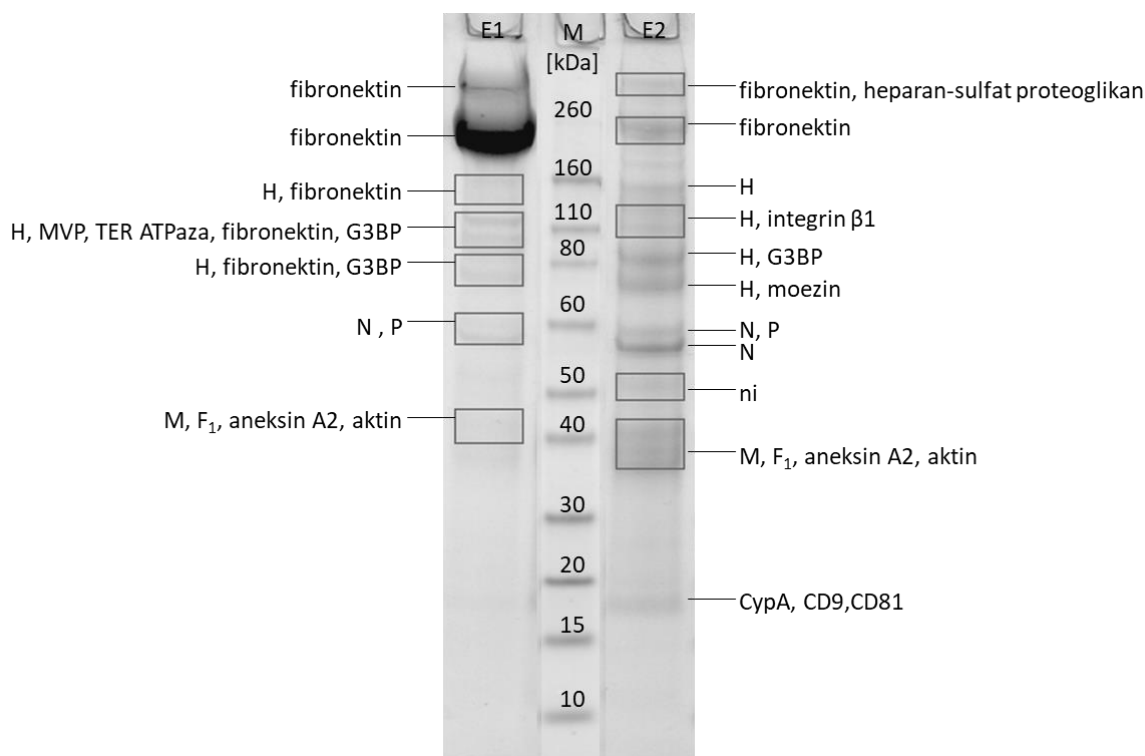
Peptidi koji odgovaraju dijelu sekvence na poziciji 461 – 513 u prugi pri 57 kDa nisu sekvencirani MS/MS-om, već samo opaženi u spektru PMF. Kad je iz aminokiselinskog slijeda proteina NP izračunata masa proteina koji sadrži aminokiseline 1 - 513, ona je odgovarala masi proteina NP procijenjenoj iz pozicije pruge na gelu (57 kDa). Kad je ista analiza napravljena za protein NP koji sadrži aminokiseline 1 - 400, odnosno za protein koji se na gelu nalazi pri otprilike 45 kDa, izračunata molekulska masa ponovo je bila u skladu s onom procijenjenom iz pozicije na gelu. Rezultati ukazuju da u ovom uzorku MuV-a nije prisutan cjeloviti NP (61 kDa).

Protein F detektiran je u dvije pruge, pri 65 i 57 kDa. U prugi pri 65 kDa detektirani su peptidi iz oba fragmenta, F₁ i F₂, a obzirom da je elektroforeza provedena pod reducirajućim uvjetima, to ukazuje na prisutnost nepocijepanog glikoziliranog prekursora F₀ u uzorku obzirom da teorijski izračunata molekulska masa neglikoziliranog F₀ iznosi oko 58 kDa^{35,37,38}. U prugi pri 57 kDa detektirani su samo peptidi iz fragmenta F₁, a izgledno je da se također radi o glikoziliranom fragmentu F₁ obzirom da prema aminokiselinskom slijedu njegova molekulska masa iznosi oko 47 kDa. Razlike u *M_r*-u ovih pruga određenom iz gela izgledno su posljedica posttranslacijski dodanih šećera budući da je F glikoprotein.

Proteini L, M, P i V detektirani su pri molekulskim masama koje su u skladu s teorijski izračunatima iz njihovih aminokiselinskih slijedova (tablica 1). Proteini I i SH ostali su nedetektirani.

4.6.2.2. MeV

MALDI-TOF/TOF-MS analiza MeV-a pročišćenog HIC-om potvrdila je prisutnost 5 od 8 virusnih proteina (slika 47): H, P, N, F₁ i M.



Slika 47. MALDI-TOF/TOF-MS analiza pruga izrezanih iz uzorka MeV-a pročišćenog HIC-om. E1 – eluat s 0,5 mol/L (NH₄)₂SO₄, E2 – eluat s 50 mmol/L HEPES-om. Kvadrati označavaju veće dijelove gela koji su izrezani, a koji mogu sadržavati veći broj slabo vidljivih pruga.

Protein H detektiran je u 3 odnosno 4 pruge u eluatima E1 i E2 pri molekularnoj masi jednakoj ili većoj od teorijski izračunate na temelju njegovog aminokiselinskog slijeda (tablica 2). Ovakav rezultat ponovo ukazuje na prisutnost različitih glikoformi uz dimer i monomer kao što je ranije opisano⁴⁴.

Protein N detektiran je u 2 pruge pri otprilike 59 i 55 kDa. Pruga pri 59 kDa odgovara teorijski izračunatoj molekularnoj masi proteina N (tablica 2), dok je pojava pruge pri 55 kDa u skladu s ranije opisanim rezultatima koji ukazuju na prisutnost skraćenih formi proteina pri nižim molekularnim masama⁴⁰. Zanimljivo je da usporedba peptida prisutnih u spektrima PMF ne upućuje da se u prugi pri 55 kDa nalazi skraćeni protein u odnosu na proteinu prugi pri 59 kDa, iako bi to trebalo potvrditi dodatnim sekvenciranjem peptida MS/MS-om (slika 48).



Slika 48. Peptidi detektirani u spektru PMF proteina N u prugama u eluatu E2 na slici 47. Crna linija – približna molekularna masa 59 kDa, plava linija – približna molekularna masa 55 kDa. Sekvenca peptida koji su sekvencirani MS/MS-om ispisan je podebljano.

Detektiran je i protein F, odnosno peptidi koji potječu iz njegovog fragmenta F₁. Izgledno je da se radi o neglikoziliranom fragmentu F₁ obzirom da pozicija pruge na gelu odgovara izračunatoj molekularnoj masi (tablica 2) te je u skladu s ranijim izvještajima^{40,43,45}.

Detektirani su još i virusni proteini M i P, pri molekularnim masama koje se dobro slažu s teoretski izračunatima iz njihovih aminokiselinskih sekvenci (tablica 2).

Virusni protein L vjerojatno ostaje nedetektiran zbog svoje relativno niske zastupljenosti te ko-migracije s ovdje znatno zastupljenijim fibronektinom što lako može rezultirati supresijom ionizacije peptida. Virusni proteini V i C vjerojatno nisu detektirani zbog svoje niske zastupljenosti, ili razloga ranije opisanih u odjeljku 4.6.1.2.

Usporedba dvije elucijske frakcije dobivene prilikom pročišćavanja MuV-a i MeV-a HIC-om, E1 i E2, otkriva različite obrasce pojave proteina kod oba virusa što je u skladu s koncentracijama ukupnih i infektivnih čestica navedenih u tablici 34. Veći broj virusnih proteina detektiran je u frakciji E2 što je u skladu s time da ta frakcija sadrži i više infektivnih čestica (odjeljak 4.5.1.). Ovakvi rezultati dodatno podupiru pretpostavku da se čestice prisutne u različitim frakcijama značajno razlikuju, odnosno da predstavljaju različite subpopulacije virusnih čestica⁸³, a potencijalno i ECV-a.

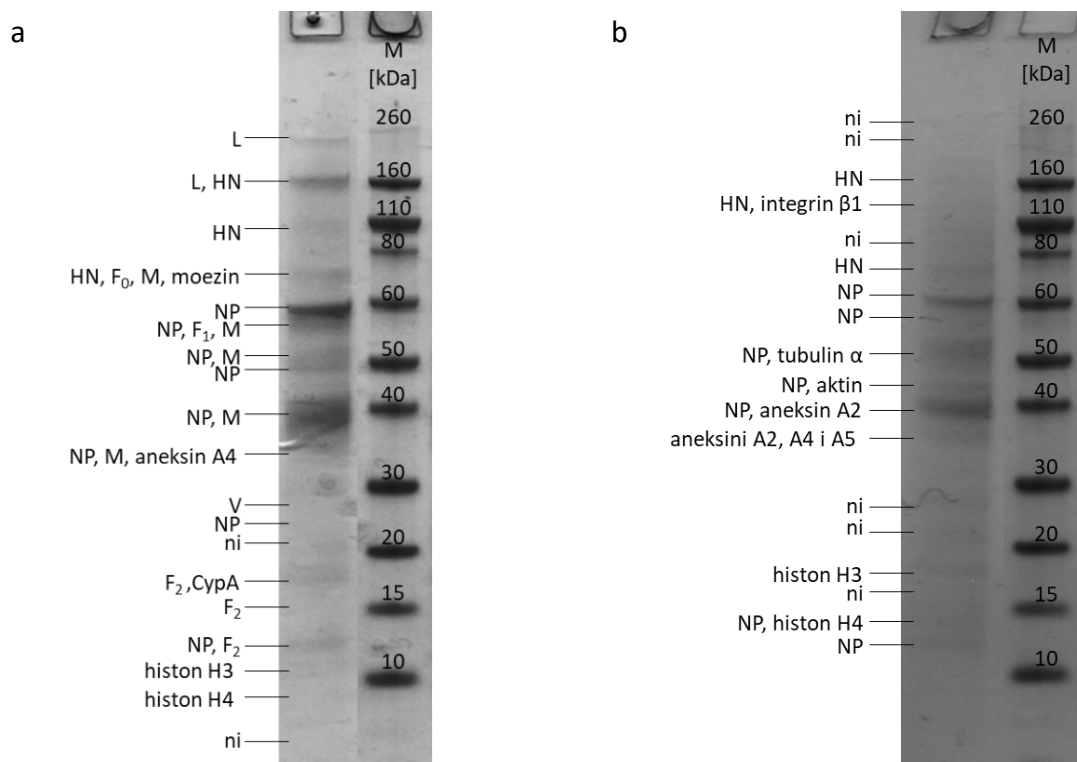
4.6.3. *Proteom MuV-a pročišćenog IAC-om*

Analiza MuV-a pročišćenog IAC-om potvrdila je prisutnost 6 od 9 virusnih proteina (slika 49): L, HN, F, NP, M i V. Po prvi puta su u jednom uzorku detektirana sva tri oblika proteina F: prekursor F₀ te oba fragmenta – F₁ i F₂. Fragment F₂ se pojavljuje u tri pruge prilično različitih masa, u rasponu otprilike od 13 do 17 kDa, što je više od teorijske molekularne mase ovog fragmenta (11 kDa). Ta pojava može potjecati od različito glikoziliranih fragmenata F₂ ili je protein detektiran u više pruga zbog svoje difuzne prirode uzrokovane glikozilacijom⁴¹.

Kao i u uzorcima MuV-a pročišćenima HIC-om i UC-om, proteini HN i NP pojavljuju se u više pruga pri čemu se HN nalazi pri molekularnoj masi jednakoj ili većoj od teorijske što ponovo ukazuje na različite glikoforme te prisutnost dimera i monomera, a NP se nalazi pri jednakoj ili manjoj od teorijske što je u skladu s prisutnošću C-skraćenih formi proteina opisanoj u odjeljku 4.6.1.2.

Iznenadjuće, protein P nije detektiran u ovim uzorcima što je neočekivano obzirom da je ranije nađen u uzorcima MuV-a pročišćenim UC-om⁴⁷ te u uzorku pročišćenom HIC-om. Kao što je ranije spomenuto, uzrok tome može biti varijabilnost količine virusnih proteina od dana

do dana žetve (slika 26), ali i ovisnost prinosa kromatografije o danu žetve (slika 30), što može značajno utjecati na detektirane virusne proteine.



Slika 49. MALDI-TOF/TOF-MS analiza pruga izrezanih iz 2 zasebna uzorka MuV-a pročišćenog IAC-om koji su navedeni u tablici 34 (a i b).

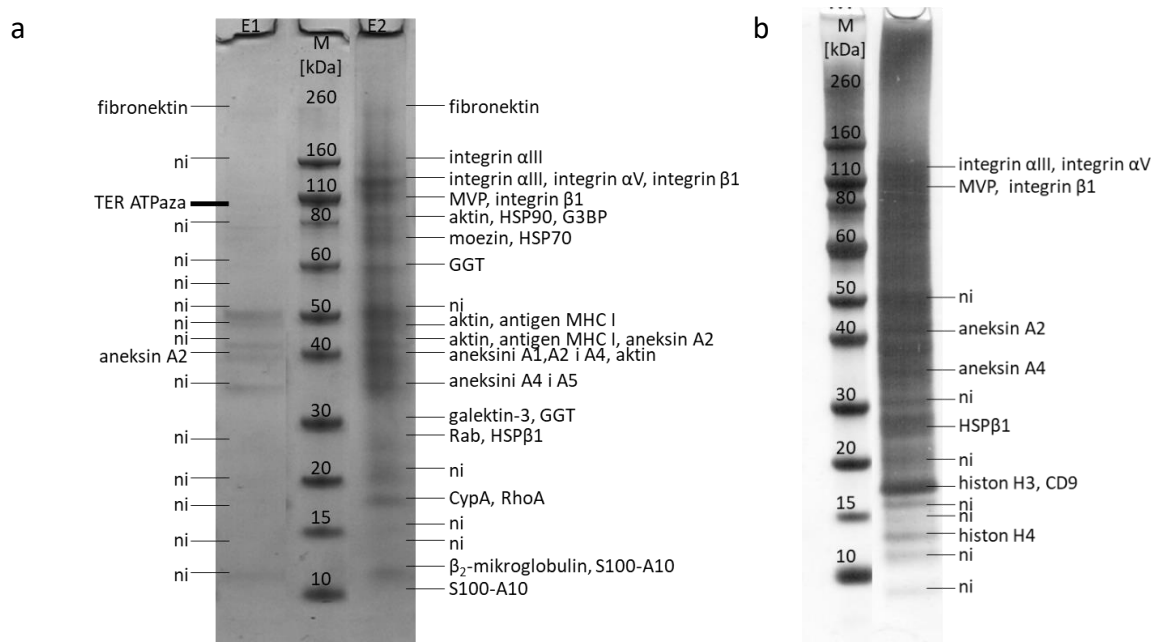
U uzorku na slici 49 a protein M ponovo je detektiran u više pruga pri molekulskim masama većim od teorijski izračunate. Kao što je spomenuto u odjeljku 4.6.1.2., čini se da bi promjene u translaciji i transkripciji mogle biti uzrok ovoj pojavi - iako transkripcijom genoma MuV-a u pravilu nastaju monocistronske RNA, neka istraživanja su pokazala da može doći i do stvaranja policistronskih RNA čija translacija bi mogla objasniti pojavu proteina M pri molekulskim masama većim od teorijskih²⁰⁶.

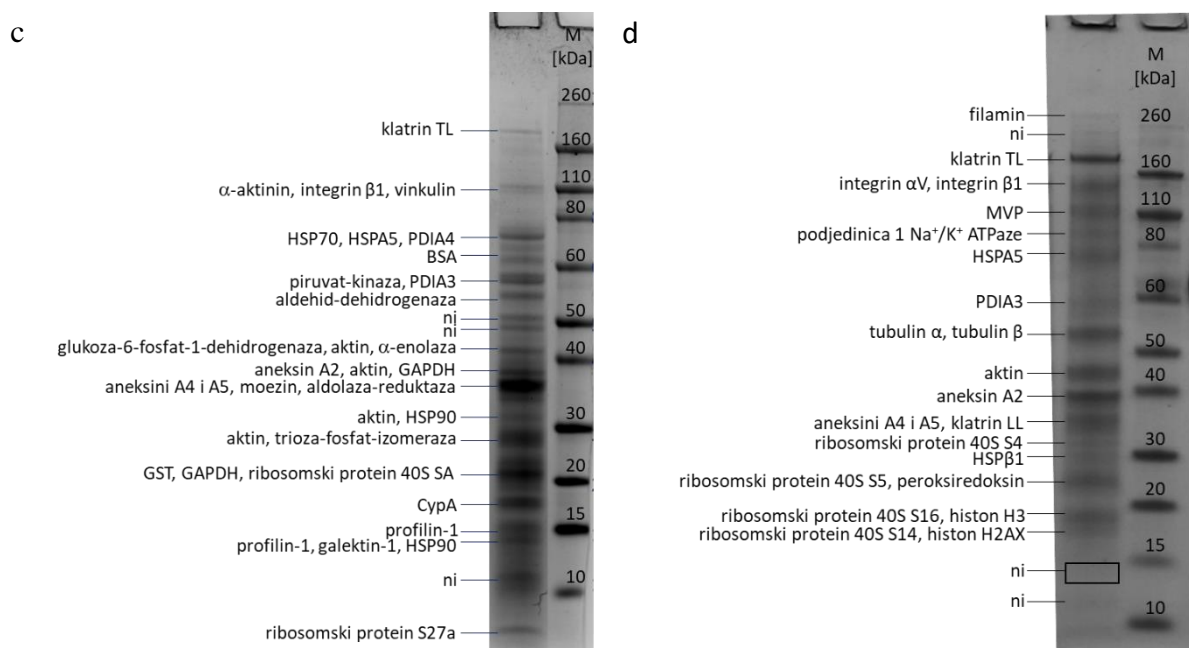
4.6.4. Proteomi pročišćenih ECV-a i usporedba s virusnim proteomima

Kao što je spomenuto u odjeljku 2.2., pokazano je da su ECV-i glavna nečistoća u virusnim pripravcima, kao i da čak do 40% čestica u polaznom materijalu za dobivanje čistih virusnih čestica može otpadati na ECV-e (odjeljak 4.1.). Osim što su ECV-i općenito slični virusima koji imaju lipidnu ovojnicu⁸⁷, ECV-i koje proizvode stanice Vero iznimno su slični MuV-u i

MeV-u i po veličini (tablice 8 i 9, odjeljak 4.1.). Zbog sličnosti ECV-a i virusa, trenutno dostupnim metodama gotovo je nemoguće dobiti uzorak virusa koja ne sadrži ECV-e što potvrđuju rezultati opisani u odjeljcima 4.3. – 4.5. koji pokazuju da se ECV-i supročišćavaju u istim frakcijama kao i virusne čestice, neovisno o metodama korištenim za pročišćavanje i koncentriranje virusa (UC, DF, kromatografske metode).

Ovdje je procjena koji HCP-i bi mogli biti prisutni unutar virusnih čestica po prvi puta napravljena pomoću usporedbe HCP-a prisutnih u virusnim pripravcima s HCP-ima prisutnima u ECV-ima proizvedenim na neinficiranim stanicama Vero, a koji su pročišćeni pomoću nekoliko različitih metoda kao i virusi. Na slici 50 prikazani su uzorci ECV-a pročišćenih iz stanica Vero različitim tehnikama. Svi proteini detektirani u ECV-ima se smatraju markerima za egzosome²⁰⁷ osim BSA koji je izgledno kontaminacija koja potječe iz medija za uzgoj stanica⁵⁶. Pregled svih HCP-a detektiranih u uzorcima MuV-a, MeV-a i ECV-a dan je u tablici 37. Iznenadujuće, neki HCP-i detektirani su samo u uzorcima MuV-a i MeV-a analiziranim pomoću 2D-GE.





Slika 50. MALDI-TOF/TOF-MS analiza pruga izrezanih iz uzoraka ECV-a pročišćenih HIC-om (a), IAC-om (b) i UC-om (c, d). GGT - gama-glutamil-transferaza, MHC I – veliki kompleks histokompatibilnosti I (engl. *major histocompatibility complex I*), PDIA4 – protein-disulfid-izomeraza A4, GAPDH – gliceralhid-3-fosfat-dehidrogenaza, GST – glutation-*S*-transferaza. Kvadrat označava veći dio gela koji je izrezan, a može sadržavati veći broj slabo vidljivih pruga.

protein	M_r / kDa	UC			HIC						IAC		
		ECV	MUV	MEV	E1			E2			ECV	MUV	
					ECV	MUV	MEV	ECV	MUV	MEV			
α -enolaza	47	+	2D	+									
aktin	42	+	+	+			+	+	+	+			+
antigen MHC I	41								+				
aneksini A1,A2,A4 I A5	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
aldolaza-reduktaza	36	+	2D										
GAPDH	36	+											
ribosomski protein 40S SA	33	+											
trioza-fosfat-izomeraza	31	+	2D	2D									
ribosomski protein L7a	30		+										
ribosomski protein 40S S4	30	+											
klatrin, laki lanac (LL)	27	+											
protein za unutarstanični kanal za Cl ⁻ ione	27		+										
galektin-3	26		2D					+					
CD9, CD81	25										+		
protein Rab 5	24							+					
glutation-S-transferaza (GST)	23	+	2D										
ribosomski protein 40S S5	23	+											
HSP β 1	23	+	+	2D				+				+	
RhoA	22							+					
peroksiredoksin	22	+	2D	2D									
CypA	18	+	+	+				+	+	+			+
ribosomski protein S27a	18	+		2D									
ribosomski protein 40S S16	16	+	+										
ribosomski protein 40S S14	16	+											
galektin-1	15	+		2D									
profilin-1	15	+											
histon H3	15	+	+	+								+	+

protein	$M_r^{\#}$ / kDa	UC			HIC						IAC		
					E1			E2					
		ECV	MUV	MEV	ECV	MUV	MEV	ECV	MUV	MEV	ECV	MUV	
histon H2AX	15	+	+	+									
β_2 -mikroglobulin	14	+											
ribosomski protein 60S L30	13		+										
S100-A11	12		2D					+					
histon H4	11		+	+								+	+
S100-A10	11							+					

[#]dana je molekulska masa monomera; 2D – protein je detektiran nakon 2D-GE, ali ne nakon SDS-PAGE

Fibronektin je prisutan u MuV-u i MeV-u, kao i u ECV-ima, a u posebno visokoj koncentraciji je prisutan u frakciji E1 dobivenoj nakon pročišćavanja HIC-om. Obzirom da čestice izolirane drugim metodama pročišćavanja ne sadrže ni približno tako visoke količine fibronektina, izglednije je da se on, pri korištenim uvjetima u HIC-u, supročišćava iz staničnog supernatanta koji je polazni materijal, nego da je prisutan unutar čestica u tako visokim količinama. Kako su svi uzorci koncentrirani UC-om prije razdvajanja pomoću SDS-PAGE, slobodni proteini koji se supročišćavaju kromatografijom trebali bi biti uklonjeni budući da korišteni uvjeti UC-a ($141\,000 \times g$ kroz 2 h) nisu dovoljni za njihovo taloženje. Međutim, visoke koncentracije $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (1 mol/L) u puferu za vezanje na kolonu korištenom u HIC-u mogu uzrokovati agregaciju, pa čak i precipitaciju fibronektina^{208,209}. Stoga fibronektin najvjerojatnije tvori velike proteinske agregate za vrijeme pročišćavanja HIC-om, a koji izgledno talože za vrijeme UC-a. Fibronektin je ranije pronađen u uzorcima MuV-a pročišćenog UC-om⁴⁷, a pronađen je i u ovim uzorcima u svim česticama pročišćenima UC-om. Njegova prisutnost u svim vrstama čestica ukazuje da bi mogao imati ulogu u formiranju samih čestica, međutim njegova odsutnost u uzorcima pročišćenima IAC-om ide u prilog hipotezi da je on samo kontaminacija.

Aktin, aneksini (A1, A2, A4 i A5) i CypA su detektirani u svim analiziranim uzorcima virusa i ECV-a što, u kombinaciji s prijašnjim izvještajima, snažno govori u prilog hipotezi da se ovi HCP-i zaista nalaze prisutni unutar virusnih čestica. Prisutnost aktina u MuV-u i MeV-u je već ranije otkrivena^{33,34,38,41,65}. Pokazano je da virusi koriste proteine citoskeleta kao što je aktin za transport virusnih komponenti unutar stanice, kao i za pupanje i sazrijevanje viriona^{49,65}. Nađeno je da aktin interagira s RNP-om MeV-a, a čini se da interagira s RNP-om, proteinom M i virusnim glikoproteinima i kod drugih paramiksovirusa^{57-59,65}. Aktin je vjerojatno odgovoran za održavanje arhitekture viriona⁵⁵ i ECV-a, stoga je njegova prisutnost u virusnim česticama očekivana. U virusima aktin možda ima i dodatnu funkciju, npr. kod nekoliko paramiksovirusa je nađeno da sudjeluje u transkripciji genoma^{59,60}.

Aneksini su prisutni u citoplazmi, ali mogu biti vezani i za površinu plazmatske membrane. Aneksin A2 veže stanični aktin te je uključen u organizaciju aktinskih vlakana u blizini plazmatske membrane⁴⁹. Pretpostavlja se da aneksin u virusnim česticama potpomaže prihvatanje virusa na stanicu domaćina i fuziju virusa sa stanicom, stoga je moguće da ovaj protein igra istu ulogu kod ECV-a, ali je pokazano i da se aneksin A2 transportira između stanica pomoću ECV-a⁸⁰. Iako postoje kontradiktorni izvještaji o ulozi aneksina A2 u stvaranju infektivnih virusnih

čestica⁶⁶⁻⁶⁹, moguće je da je on važan za stvaranje infektivnih virusa samo u nekim staničnim linijama⁶⁹.

CypA je visoko zastupljeni citosolni protein koji djeluje kao peptidil-prolil-izomeraza zbog čega se često klasificira i kao šaperon. Njegova prisutnost u virusnim česticama može biti posljedica njegove visoke zastupljenosti, odnosno slučajne prisutnosti na mjestu pupanja virusa. S druge strane, moguće je da je CypA uključen u virione kroz interakciju s virusnim proteinima zbog svoje uloge šaperona. Pretpostavlja se da CypA u nekim virusima pomaže formiranje virusnih čestica ili raspakiravanje (engl. *uncoating*) virusa nakon ulaska u stanicu, a pokazano je i da je potreban za proizvodnju infektivnog humanog virusa imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV), iako pritom ne mora biti sposoban vršiti svoju izomeraznu aktivnost^{48,50}.

Integrin $\beta 1$ i moezin dosljedno su detektirani u oba virusa i ECV-ima, neovisno o korištenoj metodi pročišćavanja. Njihova prisutnost i u uzorcima pročišćenima IAC-om podupire hipotezu da su uistinu uključeni u same virusne čestice. Integrin $\beta 1$ već je ranije pronađen u VSV-u⁶¹, dok je moezin nađen u HIV-u⁶². Budući da integrini djeluju kao membranski receptori i sudjeluju u povezivanju izvanstaničnog matriksa s plazmatskom membranom, a moezin je uključen u interakcije aktinskog citoskeleta s plazmatskom membranom, ovi proteini vjerojatno su prisutni na mjestu pupanja virusa što objašnjava njihovo uključivanje u virusne čestice. Imaju li oni dodatne specifične uloge u životnim ciklusima MuV-a i MeV-a zasad je nerazjašnjeno, iako se čini da bi mogli biti važni za unos virusa u stanice^{210,211}.

Tubulini su proteini citoskeleta za koje se smatra da također sudjeluju u transportu virusnih kapsida do mjesta pupanja⁶³. Predloženo je da su tubulini važni za sintezu RNA u MeV-u, odnosno da su dio kompleksa polimeraze⁶⁵. Prisutnost tubulina α u MuV-u pročišćenom IAC-om i u uzorcima pročišćenim UC-om podupire hipotezu da su tubulini također uključeni u virusne čestice, ali njihovu prisutnost trebalo bi potvrditi i u uzorcima pročišćenima HIC-om kako bi se donijeli daljnji zaključci. Slično vrijedi i za histone H3 i H4. Histoni su ranije detektirani u nekim virusima s dvolančanom molekulom DNA kao što su virus kravljih boginja (engl. *vaccinia virus*), majmunski virus 40 (engl. *simian virus 40*) te neki retrovirusi^{64,72}. Kod takvih virusa moglo bi se spekulirati da histoni igraju sličnu ulogu za virusnu DNA kao i za staničnu DNA, ali njihova uloga u virusima kao što su MeV i MuV je još nepoznata.

Heparan-sulfat proteoglikan i stanični antigeni CD9 i CD81 detektirani su samo u frakciji E2 MeV-a pročišćenog HIC-om, dok su ribosomski protein L7a i protein koji tvori

unutarstanični kanal za ione klora (engl. *chloride intracellular channel protein*) detektirani samo u MuV-u pročišćenom UC-om. Svi ovi proteini su navedeni kao markeri ECV-a²⁰⁷, ali nisu nađeni u uzorcima ECV-a zbog čega su potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo jesu li oni zaista prisutni unutar virusnih čestica.

G3BP je prisutan u svim česticama pročišćenima HIC-om, u frakciji E2, ali niti u jednom drugom uzorku. Ovo se može interpretirati kao da je G3BP kontaminacija koja potječe od ECV-a koji se supročišćavaju prilikom pročišćavanja virusa HIC-om. Ako je to zaista tako, to također ukazuje da se različiti ECV-i supročišćavaju (ili obogaćuju) ovisno o metodi korištenoj za pročišćavanje virusa. Za provjeru ove hipoteze potrebna su daljnja istraživanja.

Praktički svi ovdje detektirani HCP-i su već ranije nađeni u pripravcima pročišćenih virusa^{48–52,55–58,60,61,63–65,72}, ali ne smije se zaboraviti da supročišćeni ECV-i doprinose detektiranim HCP-ima^{53,54,87}. Osim toga, proteinski sastav ECV-a može se promijeniti za vrijeme infekcije virusima, zbog čega mogu nastati ECV-i drugačijeg proteinskog sastava. Sve to dodatno naglašava da problem supročišćavanja ECV-a s virusima ne smije biti zanemaren.

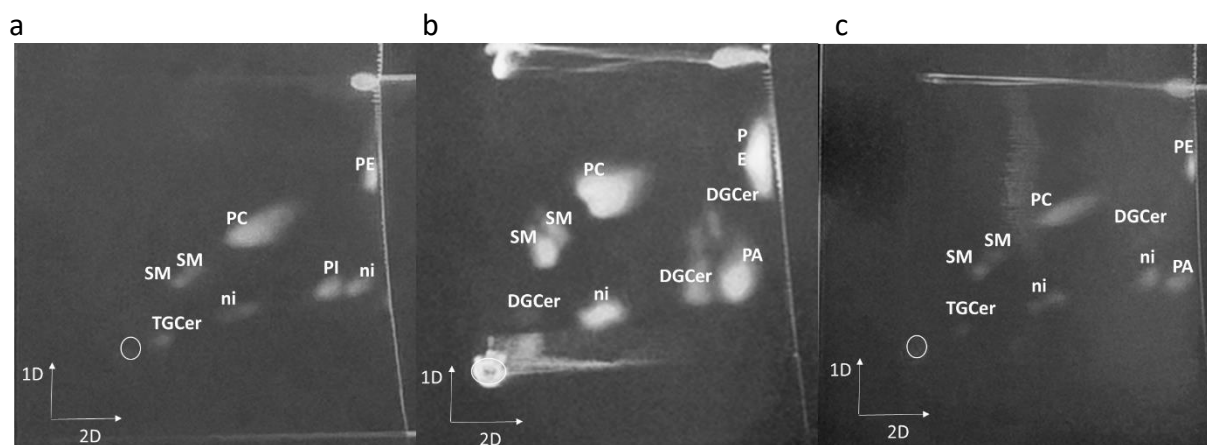
4.6.5. Lipidomi MuV-a i MeV-a pročišćenih UC-om

Napravljeno je preliminarno istraživanje lipidoma MeV-a i MuV-a. Lipidom MuV-a već je ranije istraživan⁴⁷, dok za MeV takva istraživanja još nisu rađena.

Lipidomi ovih virusa istraženi su na uzorcima MuV-a i MeV-a pročišćenih UC-om, a uspoređeni su s ukupnim lipidima izoliranim iz stanica Vero. Izolacija lipida napravljena je metodom po Blich-Dyeru nakon čega su lipidi razdvojeni pomoću 2D-HPTLC-a i analizirani MS-om (slika 51). Usporedba lipidnog sastava stanica Vero i oba virusa ne ukazuje na postojanje značajnih razlika. Dobiveni rezultati ukazuju na to da je lipidni sastav oba virusa sličan ukupnom lipidnom sastavu stanica Vero. Slični rezultati već su ranije objavljeni za MuV te VSV i neke retroviruse^{47,73,74}.

Metoda za istraživanje lipidnog sastava virusa bila je jednostavna, međutim kao takva ne omogućava uvid u slabije zastupljene klase lipida. Osim toga, prilikom ekstrakcije lipida iz stanica Vero izolirani su ukupni stanični lipidi, a ne samo lipidi iz plazmatske membrane iz koje pupaju MeV i MuV. Općeniti problem pri istraživanju lipidoma predstavlja činjenica da, iako većina metoda uspješno ekstrahira najzastupljenije klase lipida, postoje izražene razlike u ekstrakciji slabo zastupljenih klasa lipida, što se u konačnici može odraziti na rezultate

istraživanja^{212,213}. Moguće rješenje problema je korištenje više ekstrakcijskih tehnika kako bi se uspješno izolirale i manje zastupljene klase lipida.



Slika 51. MALDI-TOF-TOF/MS analiza lipida razdvojenih 2D-HPTLC-om nakon ekstrakcije iz taloga stanica Vero (a) i MuV-a (b) odnosno MeV-a (c) pročišćenih UC-om. SM – sfingomijelin, PC – fosfatidilkolin, PE – fosfatidiletanoamin, PA – fosfatidna kiselina, DGCer – diglikoceramid, TGCer – triglikoceramid, ni – nije identificirano. Smjerovi razvijanja pločice naznačeni su u donjem lijevom kutu, a točka nanošenja uzorka označena je krugom.

Primjena više ekstrakcijskih tehnika, koje bi omogućile ekstrakciju i detekciju manje zastupljenih klasa lipida, kao i metoda koje bi omogućile izolaciju lipida prisutnih samo u plazmatskoj membrani, možda bi pokazala da postoje značajnije razlike u lipidnom sastavu virusa u usporedbi sa stanicama Vero.

Ispitana je mogućnost izolacije lipida iz ECV-a proizvedenih na stanicama Vero, međutim količina izoliranog materijala bila je nedovoljna za daljnje analize. Prisutnost ECV-a u virusnim uzorcima ne bi trebala biti zanemarena niti kod istraživanja lipidoma virusa jer, iako se smatra da virusi i ECV-i učestalo koriste iste stanične puteve za pupanje^{79–81,87}, njihov lipidni sastav se može razlikovati što treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata.

Lipidni sastav virusa vrlo je važan jer sastav lipidne ovojnice nije kodiran, a lipidna ovojnica prva dolazi u kontakt s drugim stanicama koje će biti inficirane zbog čega njezin sastav može igrati važnu ulogu u infekciji virusima. Također, očekivano je da lipidni sastav virusa može ovisiti o stanicama u kojima je virus proizveden kao što je pokazano za MuV na stanicama CEF u usporedbi sa stanicama Vero⁴⁷, a što može utjecati na razna svojstva virusa, npr. stabilnost pri različitim pH vrijednostima i temperaturama (odjeljci 4.2.3. i 4.2.5.), uključujući i njegovu infektivnost.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Virusne suspenzije su vrlo heterogene, njihov sastav u pogledu ukupnih i infektivnih čestica značajno ovisi o danu žetve, a utječe i na prinose kromatografskih postupaka pročišćavanja virusa.
- MuV i MeV osjetljivi su na promjenu pH, temperature i na sastav otopine u kojem se nalaze. MuV i MeV barem djelomično zadržavaju infektivnost u rasponu pH 4,4 – 9,0, a pri pH > 9,0 dolazi do agregacije. MuV i MeV podjednako su stabilni pri temperaturama od 4 do 21 °C, dok je inaktivacija virusa pri 37 °C znatno izraženija. Dodatak sulfatnih soli te aminokiselina (Ser, Arg) u virusne suspenzije doprinosi stabilnosti MuV-a i MeV-a. Za uklanjanje staničnih ostataka iz virusnih suspenzija mikrofiltracija je pogodnija od centrifugiranja, dok je za homogenizaciju suspenzija pipetiranje pogodnije od vorteksiranja.
- UC i DF omogućavaju ograničeno pročišćavanje uz relativno niske prinose i čistoću.
- Kromatografskim pročišćavanjima HIC-om i IAC-om na monolitnim kolonama s velikim kanalima (6 µm) moguće je barem djelomično odvojiti neinfektivne od infektivnih čestica, uz relativno visok prinos infektivnih čestica MuV-a i MeV-a (60 – 70%). Za eluciju u IAC-u moguće je uspješno primijeniti otopine aminokiselina visoke molarnosti pri fiziološkom pH uz relativno visoke prinose (do 70%). Kolone s malim kanalima (1,4 µm) te pročišćavanje IEX-om nisu pogodni za MuV i MeV. Glavni ograničavajući faktori za veće prinose infektivnih MuV-a i MeV-a kromatografskim metodama su osjetljivost oba virusa na prolazak kroz kromatografski sustav te osjetljivost na visoke koncentracije soli korištene u puferima.
- MeV je osjetljiviji od MuV-a obzirom da u svim postupcima dolazi do većeg gubitka infektivnosti.
- Virusne suspenzije sadrže značajne količine ECV-a koje, zbog sličnosti s virusima s lipidnom ovojnicom kao što su MuV i MeV, nije moguće odvojiti od virusa trenutno dostupnim metodama pročišćavanja, što utječe na rezultate istraživanja proteoma i lipidoma MuV-a i MeV-a.

- Svi strukturni proteini MuV-a i MeV-a detektirani su u virusnim pripravcima, a virusni proteini koji nisu detektirani nisu neophodni za replikaciju virusa u stanicama Vero koje su korištene u ovim eksperimentima.
- Usporedba HCP-a u pripravcima MuV-a i MeV-a te ECV-a ukazuje da su aktin, aneksini, CypA, integrin $\beta 1$ i moezin prisutni unutar virusnih čestica. Lipidni sastav virusa sličan je lipidnom sastavu stanica domaćina (Vero).

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

6.1. Popis aminokiselina

Ala	A	alanin
Arg	R	arginin
Asn	N	asparagin
Asp	D	aspartat
Cys	C	cistein
Gln	Q	glutamin
Glu	E	glutamat
Gly	G	glicin
His	H	histidin
Ile	I	izoleucin
Leu	L	leucin
Lys	K	lizin
Met	M	metionin
Phe	F	fenilalanin
Pro	P	prolin
Ser	S	serin
Thr	T	treonin
Trp	W	triptofan
Tyr	Y	tirozin
Val	V	valin

6.2. Popis kratica

2D-GE	dvodimenzionalna gel elektroforeza (engl. <i>two-dimensional gel electrophoresis</i>)
AC	afinitetna kromatografija (engl. <i>affinity chromatography</i>)
ACN	acetonitril
AEX	kromatografija na anionskim izmjenjivačima (engl. <i>anion-exchange chromatography</i>)
BSA	albumin iz seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCID ₅₀	polovična infektivna doza u staničnoj kulturi (engl. <i>cell culture infective dose 50</i>)
CEF	stanice pilećih fibroblasta (engl. <i>chicken embryo fibroblast</i>)

CEX	kromatografija na kationskim izmjenjivačima (engl. <i>cation-exchange chromatography</i>)
CHAPS	3-((3-kolamidopropil)-dimetilamonij)-1-propansulfonat
CIM	konvektivni interakcijski medij (engl. <i>convective interaction media</i>)
CM	karboksimetil (engl. <i>carboxymethyl</i>)
CPE	citopatski efekt (engl. <i>cytopathic effect</i>)
CypA	ciklofilin A
DEAE	dietilaminoetil
DF	dijafiltracija (engl. <i>diafiltration</i>)
DIP	defektne interferirajuće čestice (engl. <i>defective interfering particles</i>)
DSF	diferencijalna skenirajuća fluorimetrija (engl. <i>differential scanning fluorimetry</i>)
DSP	pročišćavanje i priprema proizvoda (engl. <i>downstream processing</i>)
DTT	ditiotreitol
E	eluat
ECACC	europska zbirka životinjskih staničnih kultura (engl. <i>European Collection of Animal Cell Culture</i>)
ECV	ekstracelularne vezikule (engl. <i>extracellular vesicles</i>)
ELISA	enzimski imunotest na čvrstoj fazi (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
F	fuzijski protein (engl. <i>fusion protein</i>)
F ₀	prekursor fuzijskog proteina prije cijepanja staničnom proteazom furinom
F ₁	fragment 1 fuzijskog proteina
F ₂	fragment 2 fuzijskog proteina
FCS	fetalni teleći serum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
G3BP	galektin-3-vezujući protein (engl. <i>galectin-3 binding protein</i>)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza
GST	glutation-S-transferaza
H	hemaglutinin
HCCA	α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina
HCP	protein stanice domaćina (engl. <i>host cell protein</i>)
HEPES	N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina

HIC	kromatografija hidrofobnih interakcija (engl. <i>hydrophobic interaction chromatography</i>)
hIgG	ljudski imunoglobulin G (engl. <i>human immunoglobulin G</i>)
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HN	hemaglutinin-neuraminidaza
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPTLC	tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance thin-layer chromatography</i>)
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
HSA	albumin iz ljudskog seruma (engl. <i>human serum albumin</i>)
HSP	protein toplinskog šoka (engl. <i>heat shock protein</i>)
IAA	jodoacetamid (engl. <i>iodoacetamide</i>)
IAC	imunoafinitetna kromatografija (engl. <i>immunoaffinity chromatography</i>)
IEF	izoelektrično fokusiranje (engl. <i>isoelectric focusing</i>)
IEX	kromatografija ionske izmjene (engl. <i>ion-exchange chromatography</i>)
IMAC	afinitetna kromatografija na imobiliziranom metalnom ionu (engl. <i>immobilized metal affinity chromatography</i>)
L	veliki protein, polimeraza (engl. <i>large protein</i>)
M	protein matriksa (engl. <i>matrix protein</i>)
mAb	monoklonsko antitijelo (engl. <i>monoclonal antibody</i>)
MALDI	matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MEM	minimalni esencijalni medij (engl. <i>minimal essential medium</i>)
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)-etansulfonska kiselina
MeV	virus ospica (engl. <i>measles virus</i>)
MOI	multiplicitet infekcije (engl. <i>multiplicity of infection</i>)
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)-propansulfonska kiselina
MS	spektrometrija masa (engl. <i>mass spectrometry</i>)
MuV	virus zaušnjaka (engl. <i>mumps virus</i>)
MVP	većinski protein ribonukleoproteinskog citoplazmatskog organela (engl. <i>major vault protein</i>)

N	nukleoprotein virusa ospica
NDV	virus bolesti Newcastle (engl. <i>Newcastle disease virus</i>)
NF	nevezana frakcija
NP	nukleoprotein virusa zaušnjaka
NTA	analiza praćenja nanočestica (engl. <i>nanoparticle tracking analysis</i>)
OPD	<i>o</i> -fenilendiamin dihidroklorid
OVA	ovalbumin
pAb	poliklonsko antitijelo (engl. <i>polyclonal antibody</i>)
PBS	fosfatni pufer koji osigurava fiziološke uvjete (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDIA3	protein-disulfid-izomeraza A3
PDIA4	protein-disulfid-izomeraza A4
PES	polietersulfon
PMF	otisak prsta peptida (engl. <i>peptide mass fingerprint</i>)
PVDF	polivinilidenflourid
QA	kvaterni amin (engl. <i>quaternary amine</i>)
RC	regenerirana celuloza
RdRp	RNA-ovisna-RNA polimeraza (engl. <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RNP	ribonukleokapsida
SDS-PAGE	denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecilsulfata (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEC	kromatografija isključenjem po veličini (engl. <i>size-exclusion chromatography</i>)
SEM	Standardna pogreška (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SH	mali hidrofobni protein (engl. <i>small hydrophobic protein</i>)
SO3	sulfonatni kationski izmjenjivač
SOD	superoksid-dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i>)
TER ATPaza	ATPaza tranzicijskog endoplazmatskog retikuluma (engl. <i>transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>)
TFA	trifluoroctena kiselina

THAP	2,4,6-trihidroksiacetofenon (engl. <i>2,4,6-trihydroxyacetophenone</i>)
TNF- α	tumorski faktor nekroze α (engl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TOF	detektor vremena leta iona (engl. <i>time-of-flight</i>)
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UC	ultracentrifugiranje
UF	ultrafiltracija
Vero	stanice bubrega afričkog zelenog majmuna (engl. <i>African green monkey kidney cells</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. C. Condit, *Principles of virology*, u D. M. Knipe i P. M. Howley (ur.), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, str. 21–51.
2. R. A. Lamb i G. D. Parks, *Paramyxoviridae*, u D. M. Knipe i P. M. Howley (ur.), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, str. 957–995.
3. S. J. Russell, *RNA viruses as virotherapy agents*, *Cancer Gene Ther.* **9** (2002) 961–966.
4. S. J. Russell, K.-W. Peng, J. C. Bell, *Oncolytic virotherapy*, *Nat. Biotechnol.* **30** (2012) 1–13.
5. O. V. Matveeva, *Oncolysis by paramyxoviruses: multiple mechanisms contribute to therapeutic efficiency*, *Mol. Ther. - Oncolytics* **2** (2015) 15011.
6. P. Msaouel, I. D. Iankov, A. Dispenzieri, E. Galanis, *Attenuated oncolytic measles virus strains as cancer therapeutics*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13** (2012) 1732–1741.
7. V. Beljanski, C. Chiang, J. Hiscott, *The intersection between viral oncolysis, drug resistance, and autophagy*, *Biol. Chem.* **396** (2015) 1269–1280.
8. P. Nestola, C. Peixoto, R. R. J. S. Silva, P. M. Alves, J. P. B. Mota, M. J. T. Carrondo, *Improved virus purification processes for vaccines and gene therapy*, *Biotechnol. Bioeng.* **112** (2015) 843–857.
9. M. W. Wolff, U. Reichl, *Downstream processing of cell culture-derived virus particles*, *Expert Rev. Vaccines* **10** (2011) 1451–1475.
10. M. de las Mercedes Segura, A. Kamen, A. Garnier, *Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors*, *Biotechnol. Adv.* **24** (2006) 321–337.
11. S. A. Rubin, C. J. Sauder, K. M. Carbone, *Mumps virus*, u D. M. Knipe i P. M. Howley (ur.), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, str. 1024–1041.
12. H. Duc-Nguyen, E. N. Rosenblum, *Immuno-electron microscopy of the morphogenesis of mumps virus*, *J. Virol.* **1** (1967) 415–429.
13. D. E. Griffin, *Measles virus*, u D. M. Knipe i P. M. Howley (ur.), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, str. 1042–1069.
14. K. Weiss, D. Salzig, Y. Röder, J. Gerstenberger, M. D. Mühlebach, K. Cichutek, R. Pörtner, P. Czermak, *Influence of process conditions on measles virus stability*, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **9** (2013) 243–254.
15. E. Daikoku, C. Morita, T. K. Kohno, K. Sano, *Analysis of morphology and infectivity of measles virus particles*, *Bull. Osaka Med. Coll.* **53** (2007) 107–114.
16. B. G. Ray, R. H. Swain, *An investigation of the mumps virus by electron microscopy*, *J. Pathol.*

- Bacteriol.* **67** (1954) 247–252.
17. R. W. Ruigrok, T. Crépin, D. Kolakofsky, *Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses*, *Curr. Opin. Microbiol.* **14** (2011) 504–510.
 18. R. L. Kingston, W. A. Baase, L. S. Gay, *Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins*, *J. Virol.* **78** (2004) 8630–8640.
 19. M. Li, P. T. Schmitt, Z. Li, T. S. McCrory, B. He, A. P. Schmitt, *Mumps virus matrix, fusion, and nucleocapsid proteins cooperate for efficient production of virus-like particles*, *J. Virol.* **83** (2009) 7261–7272.
 20. L. Liljeroos, J. T. Huiskonen, A. Ora, P. Susi, S. J. Butcher, *Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 18085–18090.
 21. F. El Najjar, A. P. Schmitt, R. E. Dutch, *Paramyxovirus glycoprotein incorporation, assembly and budding: A three way dance for infectious particle production*, *Viruses* **6** (2014) 3019–3054.
 22. R. G. Paterson, R. A. Lamb, *RNA editing by G-nucleotide insertion in mumps virus P-gene mRNA transcripts*, *J. Virol.* **64** (1990) 4137–4145.
 23. W. J. Bellini, G. Englund, S. Rozenblatt, H. Arnheiter, C. D. Richardson, *Measles virus P gene codes for two proteins*, *J. Virol.* **53** (1985) 908–919.
 24. C. Escoffier, S. Manie, S. Vincent, C. P. Muller, P. Claude, M. Billeter, D. Gerlier, *Nonstructural protein C is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells*, *J. Virol.* **73** (1999) 1695–1698.
 25. F. Radecke, M. A. Billeter, *The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells*, *Virology* **217** (1996) 418–421.
 26. J. B. Patterson, D. Thomas, H. Lewicki, M. A. Billeter, M. B. A. Oldstone, *V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo*, *Virology* **267** (2000) 80–89.
 27. K. Takeuchi, M. Takeda, N. Miyajima, Y. Ami, N. Nagata, Y. Suzaki, J. Shahnewaz, S. Kadota, K. Nagata, *Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques*, *J. Virol.* **79** (2005) 7838–7844.
 28. P. Xu, P. Luthra, Z. Li, S. Fuentes, J. A. D'Andrea, J. Wu, S. Rubin, P. A. Rota, B. He, *The V protein of mumps virus plays a critical role in pathogenesis*, *J. Virol.* **86** (2012) 1768–1776.
 29. K. M. Schuhmann, C. K. Pfaller, K. Conzelmann, *The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF- κ B activity*, *J. Virol.* **85** (2011) 3162–3171.
 30. T. Kubota, N. Yokosawa, S. Yokota, N. Fujii, M. Tashiro, A. Kato, *Mumps virus V protein antagonizes interferon without the complete degradation of STAT*, *J. Virol.* (2005)**79** 4451–

- 4459
31. T. Kubota, N. Yokosawa, S. Yokota, N. Fujii, *C terminal CYS-RICH region of mumps virus structural V protein correlates with block of interferon α and γ signal transduction pathway through decrease of STAT 1- α* , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283** (2001) 255–259.
 32. R. L. Wilson, S. M. Fuentes, P. Wang, E. C. Taddeo, A. Klatt, A. J. Henderson, B. He, *Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus*, *J. Virol.* **80** (2006) 1700–1709.
 33. M. McCarthy, R. T. Johnson, *A comparison of the structural polypeptides of five strains of mumps virus*, *J. Gen. Virol.* **46** (1980) 15–27.
 34. S. C. Jensik, S. Silver, *Polypeptides of mumps virus*, *J. Virol.* **17** (1976) 363–373.
 35. B. K. Rima, M. W. Roberts, W. D. McAdam, S. J. Martin, *Polypeptide synthesis in mumps virus-infected cells*, *J. Gen. Virol.* **46** (1980) 501–505.
 36. C. Örvell, *Structural polypeptides of mumps virus*, *J. Gen. Virol.* **41** (1978) 527–539.
 37. G. Herrler, R. W. Compans, *Synthesis of mumps virus polypeptides in infected Vero cells*, *Virology* **119** (1982) 430–438.
 38. H. Naruse, Y. Nagai, T. Yoshida, M. Hamaguchi, T. Matsumoto, S. Isomura, S. Suzuki, *The polypeptides of mumps virus and their synthesis in infected chick embryo cells*, *Virology* **112** (1981) 119–130.
 39. W. E. Mountcastle, P. W. Choppin, *A comparison of the polypeptides of four measles virus strains*, *Virology* **78** (1977) 463–474.
 40. P. T. Swoveland, *Isolation of measles virus polypeptides from infected brain tissue by affinity chromatography*, *J. Virol. Methods* **13** (1986) 333–341.
 41. D. L. J. Tyrrell, E. Norrby, *Structural polypeptides of measles virus*, *J. Gen. Virol.* **39** (1978) 219–229.
 42. W. W. Hall, S. J. Martin, *Purification and characterization of measles virus*, *J. Gen. Virol.* **19** (1973) 175–188.
 43. B. K. Rima, S. J. Martin, *Effect of undiluted passage on the polypeptides of measles virus*, *J. Gen. Virol.* **44** (1979) 135–144.
 44. J. M. Hardwick, R. H. Bussell, *Glycoproteins of measles virus under reducing and nonreducing conditions*, *J. Virol.* **25** (1978) 687–692.
 45. M. C. Graves, S. M. Silver, P. W. Choppin, *Measles virus polypeptide synthesis in infected cells*, *Virology* **86** (1978) 254–263.
 46. T. M. Greco, B. A., Diner, I. M. Cristea, *The impact of mass spectrometry-based proteomics on fundamental discoveries in virology*, *Annu. Rev. Virol.* **1** (2014) 581–604.
 47. M. Brgles, M. Bonta, M. Šantak, M. Jagušić, D. Forčić, B. Halassy, G. Allmaier, M. Marchetti-Deschmann, *Identification of mumps virus protein and lipid composition by mass*

- spectrometry, *Viol. J.* **13** (2016) 9.
48. R. Cantin, S. Méthot, M. J. Tremblay, *Plunder and stowaways: Incorporation of cellular proteins by enveloped viruses*, *J. Virol.* **79** (2005) 6577–6587.
49. M. L. Shaw, K. L. Stone, C. M. Colangelo, E. E. Gulcicek, P. Palese, *Cellular proteins in influenza virus particles*, *PLoS Pathog.* **4** (2008) e1000085.
50. E. K. Franke, H. E. Yuan, J. Luban, *Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions*, *Nature* **372** (1994) 359–362.
51. K. Michael, B. G. Klupp, T. C. Mettenleiter, A. Karger, *Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47, or UL49 or envelope glycoprotein E*, *J. Virol.* **80** (2006) 1332–1339.
52. E. Chertova, O. Chertov, L. V. Coren, J. D. Roser, C. M. Trubey, J. W. Bess, R. C. Sowder, E. Barsov, B. J. Hood, R. J. Fisher, K. Nagashima, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, J. D. Lifson, D. Ott, *Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages*, *J. Virol.* **80** (2006) 9039–9052.
53. J. W. Bess, R. J. Gorelick, W. J. Bosche, L. E. Henderson, L. O. Arthur, *Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations*, *Virology* **230** (1997) 134–144.
54. P. Gluschankof, I. Mondor, H. R. Gelderblom, Q. J. Sattentau, *Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations*, *Virology* **230** (1997) 125–133.
55. A. Radhakrishnan, D. Yeo, G. Brown, M. Z. Myaing, L. R. Iyer, R. Fleck, B.-H. Tan, J. Aitken, D. Sanmun, K. Tang, A. Yarwood, J. Brink, R. J. Sugrue, *Protein analysis of purified respiratory syncytial virus particles reveals an important role for heat shock protein 90 in virus particle assembly*, *Mol. Cell. Proteomics* **9** (2010) 1829–1848.
56. L. M. Kattenhorn, R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Hidde, B. M. Kessler, *Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions*, *J. Virol.* **78** (2004) 11187–11197.
57. R. M. Giuffre, D. R. Tovell, C. M. Kay, D. L. Tyrrell, *Evidence for an interaction between the membrane protein of a paramyxovirus and actin*, *J. Virol.* **42** (1982) 963–968.
58. L. Ulloa, R. Serra, A. Asenjo, N. Villanueva, *Interactions between cellular actin and human respiratory syncytial virus (HRSV)*, *Virus Res.* **53** (1998) 13–25.
59. S. Cudmore, I. Reckmann, W. Michael, *Viral manipulations of the actin cytoskeleton*, *Trends Microbiol.* **5** (1997) 142–148.
60. G. Brown, H. W. Rixon, J. Steel, J. T. P. McDonald, A. R. Pitt, S. Graham, R. J. Sugrue, *Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus*

- polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection*, *Virology* **338** (2005) 69–80.
61. M. Moerdyk-Schauwecker, S.-I. Hwang, V. Z. Grdzlishvili, *Analysis of virion associated host proteins in vesicular stomatitis virus using a proteomics approach*, *Viol. J.* **6** (2009) 166.
62. D. E. Ott, L. V. Coren, D. G. Johnson, B. P. Kane, R. C. Sowder, Y. D. Kim, R. J. Fisher, X. Z. Zhou, K. P. Lu, L. E. Henderson, *Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1*, *Virology* **266** (2000) 42–51.
63. E. Johannsen, M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, E. Kieff, *Proteins of purified Epstein-Barr virus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 16286–16291.
64. C. Chung, C. Chen, M. Ho, C. Huang, *Vaccinia virus proteome: Identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles*, *J. Virol.* **80** (2006) 2127–2140.
65. S. A. Moyer, S. C. Baker, S. M. Horikami, *Host cell proteins required for measles virus reproduction*, *J. Gen. Virol.* **71** (1990) 775–783.
66. R. L. Pietropaolo, T. Compton, *Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II*, *J. Virol.* **71** (1997) 9803–9807.
67. R. L. Pietropaolo, T. Compton, *Interference with annexin II has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells*, *J. Gen. Virol.* **80** (1999) 1807–1816.
68. E. V. Ryzhova, A. V. Harnist, T. Harvey, F. Gonza, *Annexin 2: A novel human immunodeficiency virus type 1 gag binding protein involved in replication in monocyte-derived macrophages*, *J. Virol.* **80** (2006) 2694–2704.
69. T. Rai, A. Mosoian, M. D. Resh, *Annexin 2 is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle production but plays a cell type-dependent role in regulating infectivity*, *J. Virol.* **84** (2010) 9783–9792.
70. M. Biswas, J. B. Johnson, S. R. P. Kumar, G. D. Parks, E. Subbiah, *Incorporation of host complement regulatory proteins into Newcastle disease virus enhances complement evasion*, *J. Virol.* **86** (2012) 12708–12716.
71. A. Vanderplassen, E. Mathew, M. Hollinshead, R. B. Sim, G. L. Smith, *Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** (1998) 7544–7549.
72. M. J. Tremblay, J.-F. Fortin, R. Cantin, *The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1*, *Immunol. Today* **19** (1998) 346–351.
73. L. Kalvodova, J. L. Sampaio, S. Cordo, C. S. Ejsing, A. Shevchenko, K. L. Simons, *The lipidomes of vesicular stomatitis virus, semliki forest virus, and the host plasma membrane*

- analyzed by quantitative shotgun mass spectrometry, *J. Virol.* **83** (2009) 7996–8003.
74. R. Chan, P. D. Uchil, J. Jin, G. Shui, D. E. Ott, W. Mothes, M. R. Wenk, *Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides*, *J. Virol.* **82** (2008) 11228–11238.
75. A. Merz, G. Long, M.-S. Hiet, B. Brügger, P. Chlanda, P. Andre, F. Wieland, J. Krijnse-Locker, R. Bartenschlager, *Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome*, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 3018–3032.
76. M. Lorizate, T. Sachsenheimer, B. Glass, A. Habermann, M. J. Gerl, H. G. Kräusslich, B. Brügger, *Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines*, *Cell. Microbiol.* **15** (2013) 292–304.
77. T. Suzuki, Y. Suzuki, *Virus infection and lipid rafts*, *Biol. Pharm. Bull.* **29** (2006) 1538–1541.
78. B. Brügger, B. Glass, P. Haberkant, I. Leibrecht, F. Wieland, H. G. Kräusslich, *The HIV lipidome: A raft with an unusual composition*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (2006) 2641–2646.
79. A. de Gassart, C. Géminard, B. Février, G. Raposo, M. Vidal, *Lipid raft – associated protein sorting in exosomes*, *Proteins* **102** (2003) 4336–4344.
80. M. Valapala, J. K. Vishwanatha, *Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2*, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 30911–30925.
81. T. Skotland, K. Sandvig, A. Llorente, *Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward*, *Prog. Lipid Res.* **66** (2017) 30–41.
82. J. Ivančić-Jelečki, D. Forčić, M. Jagušić, T. Košutić-Gulija, R. Mažuran, M. Lang Balija, O. Isakov, N. J. Shomron, *Influence of population diversity on neurovirulence potential of plaque purified L-Zagreb variants*, *Vaccine* **34** (2016) 2383–2389.
83. M. Šantak, M. Markušić, M. Lang Balija, S. Keć Kopač, R. Jug, C. Örvell, J. Tomac, D. Forčić, *Accumulation of defective interfering viral particles in only a few passages in Vero cells attenuates mumps virus neurovirulence*, *Microbes Infect.* **17** (2015) 228–236.
84. E. Papanikolaou, G. Kontostathi, E. Drakopoulou, M. Georgomanoli, E. Stamateris, K. Vougas, A. Vlahou, A. Maloy, M. Ware, N. P. Anagnou, *Characterization and comparative performance of lentiviral vector preparations concentrated by either one-step ultrafiltration or ultracentrifugation*, *Virus Res* **175** (2013) 1–11.
85. S. Heider, C. Metzner, *Quantitative real-time single particle analysis of virions* *Virology* **462–463** (2014) 199–206.
86. H. Chen, L. Ngo, S. Petrovskaya, Y. Gao, M. Laassri, S. Rubin, *Purification of mumps virus particles of high viability*, *J. Virol. Methods* **233** (2016) 6–9.
87. E. Nolte-t Hoen, T. Cremer, R. C. Gallo, L. B. Margolis, *Extracellular vesicles and viruses:*

- Are they close relatives?*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113** (2016) 9155–9161.
88. A. Takahashi, R. Okada, K. Nagao, Y. Kawamata, A. Hanyu, S. Yoshimoto, M. Takasugi, S. Watanabe, M. T. Kanemaki, C. Obuse, E. Hara, *Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells*, *Nat. Commun.* **8** (2017) 15287.
89. S. El Andaloussi, I. Mäger, X. O. Breakefield, M. J. A. Wood, *Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities*, *Nat. Rev. Drug Discov.* **12** (2013) 347–357.
90. L. D. Schlehuber, I. J. McFadyen, Y. Shu, J. Carignan, P. W. Duprex, W. R. Forsyth, J. H. Ho, C. M. Kitsos, G. Y. Lee, D. A. Levinson, S. C. Lucier, C. B. Moore, N. T. Nguyen, J. Ramos, A. B. Weinstock, J. Zhang, J. A. Monagle, C. R. Gardner, J. C. Alvarez, *Towards ambient temperature-stable vaccines: The identification of thermally stabilizing liquid formulations for measles virus using an innovative high-throughput infectivity assay*, *Vaccine* **29** (2011) 5031–5039.
91. F. L. Black, *Growth and stability of measles virus*, *Virology* **7** (1959) 184–192.
92. A. Kohn, D. Yassky, *Growth of measles virus in KB cells*, *Virology* **17** (1962) 157–163.
93. F. Rapp, J. S. Butel, C. Wallis, *Protection of measles virus by sulfate ions against thermal inactivation*, *J. Bacteriol.* **90** (1965) 132–135.
94. A. P. Waterson, J. G. Cruickshank, *The nature of measles virus*, *Virology* **15** (1961) 379–382.
95. J. Kissmann, S. F. Ausar, A. Rudolph, C. Braun, S. P. Cape, R. E. Sievers, M. J. Federspiel, S. B. Joshi, R. C. Middaugh, *Stabilization of measles virus for vaccine formulation*, *Hum. Vaccin.* **4** (2008) 350–359.
96. K. Weiss, D. Salzig, M. D. Mühlebach, K. Cichutek, R. Pörtner, P. Czermak, *Key parameters of measles virus production for oncolytic virotherapy*, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **8** (2012) 81–98.
97. M. L. Weil, D. Beard, D. G. Sharp, J. W. Beard, *Purification, pH stability and culture of the mumps virus*, *J. Immunol.* **60** (1948) 561–582.
98. M. L. Weil, D. Beard, J. W. Beard, *pH stability, response to antibiotics and factors influencing egg-culture of mumps virus*, *Exp. Biol. Med.* **68** (1948) 308–309.
99. R. Leprat, M. Aymard, *Selective inactivation of hemagglutinin and neuraminidase on mumps virus*, *Arch. Virol.* **61** (1979) 273–281.
100. S. T. Andreadis, C. M. Roth, J. M. Le Doux, J. R. Morgan, M. L. Yarmush, *Large-scale processing of recombinant retroviruses for gene therapy*, *Biotechnol. Prog.* **15** (1999) 1–11.
101. T. Rodrigues, M. Carmo, M. J. T. Carrondo, P. M. Alves, P. E. Cruz, *Scaleable purification process for gene therapy retroviral vectors*, *J. Gene Med.* **9** (2007) 233–243.
102. T. Rodrigues, M. J. T. Carrondo, P. M. Alves, P. E. Cruz, *Purification of retroviral vectors for clinical application: Biological implications and technological challenges*, *J. Biotechnol.* **127**

- (2007) 520–541.
103. J. C. Burns, T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano, J. K. Yee, *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90** (1993) 8033–8037.
104. W. R. Beyer, M. Westphal, W. Ostertag, D. Von Laer, *Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: Generation, concentration, and broad host range*, *J. Virol.* **76** (2002) 1488–1495.
105. J. Gatlin, M. W. Melkus, A. Padgett, P. F. Kelly, J. V. Garcia, *Engraftment of NOD/SCID mice with human CD34(+) cells transduced by concentrated oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein*, *J. Virol.* **75** (2001) 9995–9999.
106. J. Reiser, *Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors*, *Gene Ther.* **7** (2000) 910–913.
107. M. Njayou, G. Quash, *Purification of measles virus by affinity chromatography and by ultracentrifugation: A comparative study*, *J. Virol. Methods* **32** (1991) 67–77.
108. D. P. Nayak, S. Lehmann, U. Reichl, *Downstream processing of MDCK cell-derived equine influenza virus*, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **823** (2005) 75–81.
109. R. W. Paul, D. Morris, B. W. Hess, J. Dunn, R. W. Overell, *Increased viral titer through concentration of viral harvests from retroviral packaging lines*, *Hum. Gene Ther.* **4** (1993) 609–615.
110. D. L. Miller, P. J. Meikle, D. S. Anson, *A rapid and efficient method for concentration of small volumes of retroviral supernatant*, *Nucleic Acids Res.* **24** (1996) 1576–1577.
111. M. de las Mercedes Segura, M. Puig, M. Monfar, M. Chillón, *Chromatography purification of canine adenoviral vectors*, *Hum. Gene Ther. Methods* **23** (2012) 182–197.
112. D. Nehring, R. Pörtner, M. Schweizer, K. Cichutek, P. Czermak, *Integrated inline filtration: A method to produce highly concentrated retroviral vector titer supernatant*, *Desalination* **245** (2009) 614–620.
113. H. Kotani, P. B. Newton, S. Zhang, Y. L. Chiang, E. Otto, L. Weaver, R. M. Blaese, W. F. Andreson, G. J. McGarrity, *Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy*, *Hum. Gene Ther.* **5** (1994) 19–28.
114. T. Vicente, C. Peixoto, M. J. T. Carrondo, P. M. Alves, *Purification of recombinant baculoviruses for gene therapy using membrane processes*, *Gene Ther.* **16** (2009) 766–775.
115. M. Makino, G. Ishikawa, K. Yamaguchi, Y. Okada, K. Watanbe, Y. Sasaki-Iwaki, S. Manabe, M. Honda, K. Komuro, *Concentration of live retrovirus with a regenerated cellulose hollow*

- fiber, *Arch. Virol.* **139** (1994) 85–96.
116. M. Kuiper, R. M. Sanches, J. A. Walford, N. K. H. Slater, *Purification of a functional gene therapy vector derived from Moloney murine leukaemia virus using membrane filtration and ceramic hydroxyapatite chromatography*, *Biotechnol. Bioeng.* **80** (2002) 445–453.
117. L. Maranga, P. Rueda, A. Antonis, C. Vela, J. Langeveld, J. Casal, M. J. T. Carrondo, *Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59** (2002) 45–50.
118. P. Gagnon, *Chromatographic Purification of Virus Particles*, u M. C. Flickinger (ur.), *Encyclopedia of industrial biotechnology: Bioprocess, bioseparation, and cell technology*, Wiley, New York, 2010, str. 1–21.
119. P. Kramberger, M. Peterka, J. Boben, M. Ravnikar, A. Štrancar, *Short monolithic columns - A breakthrough in purification and fast quantification of tomato mosaic virus*, *J. Chromatogr. A* **1144** (2007) 143–149.
120. D. Forčić, M. Brgles, J. Ivančić-Jelečki, M. Šantak, B. Halassy, M. Barut, R. Jug, M. Markušić, A. Štrancar, *Concentration and purification of rubella virus using monolithic chromatographic support*, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879** (2011) 981–986.
121. C. S. Burden, J. Jin, A. Podgornik, D. G. Bracewell, *A monolith purification process for virus-like particles from yeast homogenate*, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **880** (2012), 82–89.
122. A. R. Kattur Venkatachalam, M. Szyporta, T. K. Kiener, P. Balraj, J. Kwang, *Concentration and purification of enterovirus 71 using a weak anion-exchange monolithic column*, *Virol. J.* **11** (2014) 99.
123. J. A. Queiroz, C. T. Tomaz, J. M. Cabral, *Hydrophobic interaction chromatography of proteins*, *J. Biotechnol.* **87** (2001) 143–159.
124. <http://www.biaseparations.com/interactions/category/31-hydrophobic/category/109-oh>. (preuzeto: 4. siječnja 2018. god.)
125. H. Li, Y. Yang, Y. Zhang, S. Zhang, Q. Zhao, Y. Zhu, X. Zou, M. Yu, G. Ma, Z. Su, *A hydrophobic interaction chromatography strategy for purification of inactivated foot-and-mouth disease virus*, *Protein Expr. Purif.* **113** (2015) 23–29.
126. M. W. Wolff, C. Siewert, S. P. Hansen, R. Faber, U. Reichl, *Purification of cell culture-derived modified vaccinia ankara virus by pseudo-affinity membrane adsorbers and hydrophobic interaction chromatography*, *Biotechnol. Bioeng.* **107** (2010) 312–320.
127. M. M. Diogo, J. A. Queiroz, D. M. F. Prazeres, *Chromatography of plasmid DNA*, *J. Chromatogr. A* **1069** (2005). 3–22

128. E. M. Adriaenssens, S. M. Lehman, K. Vandersteegen, D. Vandenheuvel, D. L. Philippe, A. Cornelissen, M. R. J. Clokie, A. J. García, M. De Proft, M. Maes, R. Lavigne, *CIM® monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles*, *Virology* **434** (2012) 265–270.
129. M. Zaveckas, S. Snipaitis, H. Pesliakas, J. Nainys, A. Gedvilaite, *Purification of recombinant virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein using ion-exchange monolith chromatography*, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **991** (2015) 21–28.
130. H. M. Oksanen, A. Domanska, D. H. Bamford, *Monolithic ion exchange chromatographic methods for virus purification*, *Virology* **434** (2012) 271–277.
131. F. Smrekar, M. Ciringer, A. Štrancar, A. Podgornik, *Characterisation of methacrylate monoliths for bacteriophage purification*, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 2438–2444.
132. S. T. Mundle, M. Giel-Moloney, H. Kleanthous, K. V. Pugachev, S. F. Anderson, *Preparation of pure, high titer, pseudoinfectious Flavivirus particles by hollow fiber tangential flow filtration and anion exchange chromatography*, *Vaccine* **33** (2015) 4255–4260.
133. M. Banjac, E. Roethl, F. Gelhart, P. Kramberger, B. Lah Jarc, M. Jarc, A. Štrancar, T. Muster, M. Peterka, *Purification of Vero cell derived live replication deficient influenza A and B virus by ion exchange monolith chromatography*, *Vaccine* **32** (2014) 2487–2492.
134. B. V. Ayyar, S. Arora, C. Murphy, R. O’Kennedy, *Affinity chromatography as a tool for antibody purification*, *Methods* **56** (2012) 116–129.
135. M. A. Firer, *Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography*, *J. Biochem. Biophys. Methods* **49** (2001) 433–442.
136. A. C. Moser, D. S. Hage, *Immunoaffinity chromatography: An introduction to applications and recent developments*, *Bioanalysis* **2** (2010) 769–790.
137. P. Gagnon, R. Nian, D. Leong, A. Hoi, *Transient conformational modification of immunoglobulin G during purification by protein A affinity chromatography*, *J. Chromatogr. A* **1395** (2015) 136–142.
138. T. Arakawa, J. S. Philo, K. Tsumoto, R. Yumioka, D. Ejima, *Elution of antibodies from a protein-A column by aqueous arginine solutions*, *Protein Expr. Purif.* **36** (2004) 244–248.
139. D. Ejima, R. Yumioka, K. Tsumoto, T. Arakawa, *Effective elution of antibodies by arginine and arginine derivatives in affinity column chromatography*, *Anal. Biochem.* **345** (2005) 250–257.
140. A. Cirkovas, J. Sereikaite, *Different effects of L-arginine on the heat-induced unfolding and aggregation of proteins*, *Biologicals* **39** (2011) 181–188.
141. K. Shiraki, A. Hirano, Y. Kita, A. H. Koyama, T. Arakawa, *Potential application of arginine in interaction analysis*, *Drug Discov. Ther.* **4** (2010) 326–333.

142. C. Lange, R. Rudolph, *Suppression of protein aggregation by L-arginine*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10** (2009) 408–414.
143. T. Arakawa, K. Tsumoto, Y. Kita, B. Chang, D. Ejima, *Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations*, *Amino Acids* **33** (2007) 587–605.
144. D. Ejima, R. Yumioka, T. Arakawa, K. Tsumoto, *Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography*, *J. Chromatogr. A* **1094** (2005) 49–55.
145. D. Shukla, L. Zamolo, C. Cavallotti, B. L. Trout, *Understanding the role of arginine as an eluent in affinity chromatography via molecular computations*, *J. Phys. Chem.* **115** (2011) 2645–2654.
146. H. Yamasaki, K. Tsujimoto, A. Hajime Koyama, D. Ejima, T. Arakawa, *Arginine facilitates inactivation of enveloped viruses*, *J. Pharm. Sci.* **97** (2008) 3067–3073.
147. J. T. Mccue, K. Selvitelli, D. Cecchini, R. Brown, *Enveloped virus inactivation using neutral arginine solutions and applications in therapeutic protein purification processes*, *Biotechnol. Prog.* **30** (2014) 108–112.
148. M. de las Mercedes Segura, A. Kamen, P. Trudel, A. Garnier, *A novel purification strategy for retrovirus gene therapy vectors using heparin affinity chromatography*, *Biotechnol. Bioeng.* **90** (2005) 391–404.
149. L. Opitz, J. Salaklang, H. Büttner, U. Reichl, M. W. Wolff, *Lectin-affinity chromatography for downstream processing of MDCK cell culture derived human influenza A viruses*, *Vaccine* **25** (2007) 939–947.
150. D. Forčić, T. Košutić-Gulija, M. Šantak, R. Jug, J. Ivančić-Jelečki, M. Markušić, R. Mažuran, *Comparisons of mumps virus potency estimates obtained by 50% cell culture infective dose assay and plaque assay*, *Vaccine* **28** (2010) 1887–1892.
151. Izveštaj „Live measles virus vaccine“ u *Manual of laboratory methods Document WHO/VSQ/97.04*, Svjetska zdravstvena organizacija, Geneva, 1997, str. 79-82.
152. B. Carr, M. Wright, *Nanoparticle tracking analysis - A review of applications and usage 2010-2012*, NanoSight Ltd, Wiltshire, 2013, str. 1–193.
153. B. Ehresmann, P. Imbault, J. H. Weil, *Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's*, *Anal. Biochem.* **54** (1973) 454–463.
154. S. S. Wong, *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, 1991, str. 254.
155. E. Fahy, M. Sud, D. Cotter, S. Subramaniam, *LIPID MAPS online tools for lipid research*, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) 606–612.
156. J. W. Beard, D. G. Sharp, E. A. Eckert, *Tumor Viruses*, *Adv. Virus Res.* **3** (1955) 149–197.

157. S. F. Ausar, M. Espina, J. Brock, N. Thyagarayapuram, R. Repetto, L. Khandke, C. R. Middaugh, *High-throughput screening of stabilizers for respiratory syncytial virus: Identification of stabilizers and their effects on the conformational thermostability of viral particles*, *Hum. Vaccin.* **3** (2007) 94–103.
158. S. Boivin, S. Kozak, R. Meijers, *Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens*, *Protein Expr. Purif.* **91** (2013) 192–206.
159. M. Ristic, N. Rosa, S. A. Seabrook, J. Newman, *Formulation screening by differential scanning fluorimetry: How often does it work?*, *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.* **71** (2015) 1359–1364.
160. B. Farruggia, F. Rodriguez, R. Rigatuso, G. Fidelio, G. Picó, *The participation of human serum albumin domains in chemical and thermal unfolding*, *J. Protein Chem.* **20** (2001) 81–89.
161. M. Rezaei Tavirani, S. H. Moghaddamnia, B. Ranjbar, M. Amani, S. A. Marashi, *Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy*, *J. Biochem. Mol. Biol.* **39** (2006) 530–536.
162. *Guidline on bioanalytical method validation, Document EMEA/CHMP/EWP/192217/2009*, European Medicines Agency, London, 2011., str. 7-8
163. W. Wang, *Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics*, *Int. J. Pharm.* **289** (2005) 1–30.
164. M. E. Cromwell, E. Hilario, F. Jacobson, *Protein aggregation and bioprocessing*, *AAPS J.* **8** (2006) E572–E579.
165. S. Frokjaer, D. E. Otzen, *Protein drug stability: A formulation challenge*, *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (2005) 298–306.
166. G. Graziano, *How does sucrose stabilize the native state of globular proteins?*, *Int. J. Biol. Macromol.* **50** (2012) 230–235.
167. J. C. Lee, S. N. Timasheff, *The stabilization of proteins by sucrose*, *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 7193–7201.
168. F. Ahmad, C. C. Bigelow, *Thermodynamic stability of proteins in salt solutions: A comparison of the effectiveness of protein stabilizers*, *J. Protein Chem.* **5** (1986) 355–367.
169. M. Radosevich, T. Burnouf, *Intravenous immunoglobulin G: Trends in production methods, quality control and quality assurance*, *Vox Sang.* **98** (2010) 12–28.
170. D. Kameoka, E. Masuzaki, T. Ueda, T. Imoto, *Effect of buffer species on the unfolding and the aggregation of humanized IgG*, *J. Biochem.* **142** (2007) 383–391.
171. D. Faroongsarng, J. Kongprasertkit, *The role of caprylate ligand ion on the stabilization of human serum albumin*, *AAPS PharmSciTech* **15** (2014) 465–471.

172. P. Matejtschuk, C. H. Dash, E. W. Gascoigne, *Production of human albumin solution: A continually developing colloid*, *Br. J. Anaesth.* **85** (2000) 887–895.
173. M. Anraku, Y. Tsurusaki, H. Watanabe, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, *Stabilizing mechanisms in commercial albumin preparations: Octanoate and N-acetyl-L-tryptophanate protect human serum albumin against heat and oxidative stress*, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1702** (2004) 9–17.
174. A. L. Fink, *Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid*, *Fold. Des.* **3** (1998) 9–23.
175. S. Nema, R. J. Brendel, *Excipients and their role in approved injectable products: Current usage and future directions*. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **65** (2011) 287–332.
176. K. Branovic, D. Forčić, J. Ivančić, A. Štrancar, M. Barut, T. Košutić-Gulija, R. Zgorelec, R. Mažuran, *Application of short monolithic columns for improved detection of viruses*, *J. Virol. Methods* **110** (2003) 163–171.
177. chemistry.mdma.ch/hiveboard/rhodium/pdf/chemical-data/prop_aq.pdf (preuzeto 12. siječnja 2017. god.)
178. M. Barne, *Stabilizing agents for live viruses for preparing vaccines, and stabilized vaccines containing said stabilizing agents*, US patent br. 4,500,512, 1985, str. 173–179.
179. J. F. Wright, T. Le, J. Prado, J. Bahr-Davidson, P. H. Smith, Z. Zhen, J. M. Sommer, G. F. Pierce, G. Qu, *Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation*, *Mol. Ther.* **12** (2005) 171–178.
180. S. Rani, P. Gogoi, S. Kumar, *Spectrum of Newcastle disease virus stability in gradients of temperature and pH*, *Biologicals* **42** (2014) 351–354.
181. R. K. Jamil, M. Taqavian, Z. A. Sadigh, M. K. Shahkarami, F. Esna-Ashari, R. Hamkar, S. M. Hosseini, A. Hatami, *Evaluation of the thermal stability of a novel strain of live-attenuated mumps vaccine (RS-12 strain) lyophilized in different stabilizers*, *J. Virol. Methods* **199** (2014) 35–38.
182. H. E. Moses, C. A. Brandly, E. E. Jones, *The pH stability of viruses of Newcastle disease and fowl plague*, *Science* **80** (1947) 477–479.
183. M. K. Tolba, J. K. Eskarous, *pH-stability patterns of some strains of Newcastle disease and fowl-plague viruses*, *Arch. Microbiol.* **34** (1959) 333–338.
184. K. San Roman, E. Villar, I. Munoz-Baroso, *Acidic pH enhancement of the fusion of Newcastle disease virus with cultured cell*, *Virology* **260** (1999) 329 – 341.
185. M. Katakam, L. N. Bell, A. K. Banga, *Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone*, *J. Pharm. Sci.* **84** (1995) 713–716.

186. P. Lotfian, M. S. Levy, R. S. Coffin, T. Fearn, P. Ayazi-Shamlou, *Impact of process conditions on the centrifugal recovery of a disabled herpes simplex virus*, *Biotechnol. Prog.* **19** (2003) 209–215.
187. D. G. Bracewell, R. Francis, C. M. Smales, *The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control*, *Biotechnol. Bioeng.* **112** (2015) 1727–1737.
188. J. Zhu-Shimoni, C. Yu, J. Nishihara, R. M. Wong, F. Gunawan, M. Lin, D. Krawitz, P. Liu, W. Sandoval, M. Vanderlaan, *Host cell protein testing by ELISAs and the use of orthogonal methods*, *Biotechnol. Bioeng.* **111** (2014) 2367–2379.
189. F. Wang, D. Richardson, M. Shameem, *Host-cell protein measurement and control*, *BioPharm Int.* **28** (2015) 32–38.
190. K. Zimmermann, O. Scheibe, A. Kocourek, J. Muelich, E. Jurkiewicz, A. Pfeifer, *Highly efficient concentration of lenti- and retroviral vector preparations by membrane adsorbers and ultrafiltration*, *BMC Biotechnol.* **11** (2011) 55.
191. P. Nestola, D. L. Martins, C. Peixoto, S. Roederstein, T. Schleuss, P. M. Alves, P. B. José, M. J. T. Carrondo, *Evaluation of novel large cut-off ultrafiltration membranes for adenovirus serotype 5 (Ad5) concentration*, *PLoS One* **9** (2014) e115802.
192. P. Steppert, D. Burgstaller, M. Klausberger, E. Berger, P. Pereira Aguilar, T. A. Schneider, P. Kramberger, A. Tover, K. Nöbauer, E. Razzazi-Fazeli, A. Jungbauer, *Purification of HIV-1 gag virus-like particles and separation of other extracellular particles*, *J. Chromatogr. A* **1455** (2016) 93–101.
193. E. A. Kabat, T. T. Wu, H. Bilofsky, *Unusual distributions of amino acids in complementarity-determining segments of heavy and light chains of immunoglobulins and their possible roles in specificity of antibody-combining sites*, *J. Biol. Chem.* **252** (1977) 6609–6616.
194. E. A. Padlan, *On the nature of antibody combining sites: Unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands*, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **124** (1990) 112–124.
195. J. Janin, C. Chothia, *The structure of protein-protein recognition sites*, *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 16027–16030.
196. D. R. Davies, G. H. Cohen, *Interactions of protein antigens with antibodies*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** (1996) 7–12.
197. I. S. Mian, A. R. Bradwell, A. J. Olson, *Structure, function and properties of antibody binding sites*, *J. Mol. Biol.* **217** (1991) 133–151.
198. M. A. Moret, G. F. Zebende, *Amino acid hydrophobicity and accessible surface area*, *Phys. Rev. E* **75** (2007) 4–7.

199. M. Brgles, T. Kurtović, L. Kovačić, I. Križaj, M. Barut, M. Lang Balijsa, G. Allmaier, M. Marchetti-Deschmann, B. Halassy, *Identification of proteins interacting with ammodytotoxins in Vipera ammodytes ammodytes venom by immuno-affinity chromatography*, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 293–304.
200. M. N. Waxham, D. C. Merz, J. S. Wolinsky, *Intracellular maturation of mumps virus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein: Conformational changes detected with monoclonal antibodies*, *J. Virol.* **59** (1986) 392–400.
201. C. Pohl, P. W. Duprex, G. Krohne, B. K. Rima, S. Schneider-Schaulies, *Measles virus M and F proteins associate with detergent-resistant membrane fractions and promote formation of virus-like particles*, *J. Gen. Virol.* **88** (2007) 1243–1250.
202. R. Cox, T. J. Green, S. Purushotham, C. Deivanayagam, G. J. Bedwell, P. E. Prevelige, M. Luo, *Structural and functional characterization of the mumps virus phosphoprotein*, *J. Virol.* **87** (2013) 7558–7568.
203. K. Takeuchi, K. Tanabayashi, M. Hishiyama, A. Yamada, *The mumps virus SH protein is a membrane protein and not essential for virus growth*, *Virology* **225** (1996) 156–162.
204. M. Caballero, J. Carabana, J. Ortego, R. Fernandez-Munoz, M. L. Celma, *Measles virus fusion protein is palmitoylated on transmembrane-intracytoplasmic cysteine residues which participate in cell fusion*, *J. Virol.* **72** (1998) 8198–8204.
205. A. Förster, G. N. Maertens, P. J. Farrell, M. Bajorek, *Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus*, *J. Virol.* **89** (2015) 4624–4635.
206. M. A. Afzal, G. D. Elliott, B. K. Rima, C. Örvell, *Virus and host cell-dependent variation in transcription of the mumps virus genome*, *J. Gen. Virol.* **71** (1990) 615–619.
207. S. Mathivanan, R. J. Simpson, *ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA*, *Proteomics* **9** (2009) 4997–5000.
208. R. C. Bollineni, I. J. Guldvik, H. Grönberg, F. Wiklund, I. G. Mills, B. Thiede, *A differential protein solubility approach for the depletion of highly abundant proteins in plasma using ammonium sulfate*, *Analyst* **140** (2015) 8109–8117.
209. M. J. van den Heuvel, B. J. Jefferson, R. M. Jacobs, *Isolation of a bovine plasma fibronectin-containing complex which inhibits the expression of bovine leukemia virus p24*, *J. Virol.* **79** (2005) 8164–8170.
210. J. Schneider-Schaulies, L. M. Dunster, R. Schwartz-Albiez, G. Krohne, V. ter Meulen, *Physical association of moesin and CD46 as a receptor complex for measles virus*, *J. Virol.* **69** (1995) 2248–2256.
211. G. Cseke, M. S. Maginnis, R. G. Cox, S. J. Tollefson, A. B. Podsiad, D. W. Wright, T. S. Dermody, J. V. Williams, *Integrin $\alpha\beta 1$ promotes infection by human metapneumovirus*, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (2009) 1566–1571.
212. A. Reis, A. Rudnitskaya, G. J. Blackburn, N. M. Fauzi, A. R. Pitt, C. M. Spickett, *A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL*, *J. Lipid Res.* **54** (2013) 1812–1824.
213. S. Furse, M. R. Egmond, J. A. Killian, *Isolation of lipids from biological samples*, *Mol. Membr. Biol.* **0**, 1–10 (2015).

§ 8. DODATAK

Prilog 1. T_m određen za hIgG, OVA i HSA u svim ispitanim otopinama za koje on nije ranije naveden u tablicama 12 i 13. Rezultati su dani kao srednja vrijednost \pm SEM, $n=3$.

protein	hIgG		OVA		HSA	
sastav otopine	$T_m / ^\circ\text{C}$					
100 mmol/L MOPS, pH 6,5	67	\pm 0,2	73	\pm 0,4	70	\pm 1,2
100 mmol/L MOPS, pH 7,5	67	\pm 0,3	72	\pm 0,5	67	\pm 0,9
100 mmol/L MES, pH 5,5	64	\pm 0,3	69	\pm 0,6	67	\pm 2,9
100 mmol/L MES, pH 6,0	65	\pm 0,1	71	\pm 0,3	68	\pm 0,5
100 mmol/L MES, pH 6,5	67	\pm 0,1	72	\pm 0,4	69	\pm 1,3
100 mmol/L Bis-Tris, pH 6,0	64	\pm 0,1	70	\pm 0,1	73	\pm 4,6
100 mmol/L Bis-Tris, pH 7,2	67	\pm 0,3	73	\pm 0,2	63	\pm 0,6
100 mmol/L HEPES, pH 7,2	67	\pm 0,2	72	\pm 0,3	65	\pm 1,6
100 mmol/L HEPES, pH 7,5	67	\pm 0,1	72	\pm 0,6	60	\pm 0,8
100 mmol/L HEPES, pH 8,0	66	\pm 0,5	72	\pm 1,0	60	\pm 0,2
100 mmol/L Tricin, pH 7,4	68	\pm 0,2	74	\pm 0,3	63	\pm 0,5
100 mmol/L Tricin, pH 8,0	68	\pm 0,3	73	\pm 0,0	62	\pm 2,7
100 mmol/L Tricin, pH 8,5	67	\pm 0,2	74	\pm 0,3	61	\pm 0,5
200 mmol/L fosfatni pufer, pH 6,0	67	\pm 0,6	76	\pm 0,3	71	\pm 1,4
200 mmol/L fosfatni pufer, pH 7,4	67	\pm 0,4	75	\pm 0,8	66	\pm 0,3
200 mmol/L fosfatni pufer, pH 8,0	66	\pm 0,4	73	\pm 0,4	no	\pm no
250 mmol/L Tris, pH 8,0	65	\pm 0,7	72	\pm 0,4	68	\pm 0,7
250 mmol/L Tris, pH 9,0	66	\pm 0,4	71	\pm 0,6	no	\pm no
250 mmol/L Tris, pH 10,0	64	\pm 0,2	71	\pm 0,3	58	\pm 0,1
200 mmol/L natrijev citrat, pH 5,0	59	\pm 0,4	68	\pm 0,3	no	\pm no
0,01% Tween 20	64	\pm 0,1	68	\pm 0,4	66	\pm 0,4
0,05% Tween 20	no	\pm no	no	\pm no	no	\pm no
0,1% Tween 20	no	\pm no	no	\pm no	no	\pm no
0,01% Tween 80	65	\pm 0,1	69	\pm 0,5	66	\pm 0,3
0,05% Tween 80	no	\pm no	no	\pm no	no	\pm no
0,1% Tween 80	no	\pm no	no	\pm no	no	\pm no
0,5% CHAPS	65	\pm 0,3	66	\pm 0,3	no	\pm no
0,1% CHAPS	67	\pm 0,4	73	\pm 0,1	66	\pm 1,2
0,05% CHAPS	67	\pm 0,2	73	\pm 0,3	65	\pm 0,6
10% glicerol	66	\pm 0,2	69	\pm 0,2	66	\pm 0,8
5% glicerol	66	\pm 0,1	70	\pm 0,4	66	\pm 1,0
1% glicerol	66	\pm 0,2	70	\pm 0,6	65	\pm 0,6
10% saharoza	68	\pm 0,5	73	\pm 0,1	56	\pm 0,5
7,4 mol/L KSCN	no	\pm no	no	\pm no	no	\pm no
0,5 mol/L MgCl ₂	58	\pm 0,2	70	\pm 0,4	no	\pm no
0,1 mol/L MgCl ₂	63	\pm 0,5	72	\pm 0,6	no	\pm no
0,025 mol/L MgCl ₂	65	\pm 0,2	72	\pm 0,1	70	\pm 1,9
0,1 mol/L imidazol	66	\pm 0,2	70	\pm 0,2	66	\pm 0,1

0,01 mol/L imidazol	67	±	0,0	73	±	0,4	67	±	2,0
0,3 mol/L Gly	68	±	0,3	75	±	0,6	66	±	0,4
0,05 mol/L Gly	68	±	0,1	74	±	0,4	67	±	0,9
0,5 mol/L NaCl	65	±	0,2	74	±	0,9	72	±	0,9
0,25 mol/L NaCl	66	±	0,2	73	±	1,1	70	±	0,1
0,1 mol/L NaCl	67	±	0,2	73	±	0,4	67	±	0,6
0,05 mol/L NaCl	67	±	0,2	73	±	0,6	68	±	0,5
0,5 mol/L MgSO ₄	63	±	0,2	73	±	0,6	68	±	0,2
0,1 mol/L MgSO ₄	64	±	0,1	72	±	1,2	70	±	1,4
0,05 mol/L MgSO ₄	65	±	0,3	72	±	0,4	68	±	0,0
0,5 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	65	±	0,4	77	±	0,8	72	±	1,1
0,1 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	65	±	0,2	73	±	0,1	70	±	0,7
0,05 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	65	±	0,3	72	±	0,3	70	±	0,4
0,5 mol/L CaCl ₂	56	±	0,3	69	±	0,1	no	±	no
0,1 mol/L CaCl ₂	61	±	0,4	71	±	0,5	no	±	no
0,05 mol/L CaCl ₂	63	±	0,1	71	±	0,1	no	±	no
0,5 mol/L KCl	64	±	0,2	74	±	0,6	no	±	no
0,1 mol/L KCl	66	±	0,1	72	±	0,5	69	±	0,9
0,05 mol/L KCl	67	±	0,1	73	±	0,2	68	±	0,9
0,5 mol/L Na ₂ SO ₄	68	±	0,2	80	±	1,1	70	±	1,7
0,1 mol/L Na ₂ SO ₄	66	±	0,5	74	±	1,3	70	±	1,2
0,05 mol/L Na ₂ SO ₄	66	±	0,6	74	±	0,9	70	±	0,0
0,5 mol/L sorbitol	68	±	0,2	74	±	0,4	60	±	1,6
0,1 mol/L sorbitol	66	±	0,2	74	±	0,8	66	±	1,2
0,5 mol/L glukoza	67	±	0,3	74	±	0,7	67	±	0,5
0,1 mol/L glukoza	66	±	0,3	73	±	0,6	59	±	1,1
0,5 mol/L maltoza	68	±	0,1	76	±	0,5	61	±	2,2
0,1 mol/L maltoza	66	±	0,4	73	±	1,2	60	±	0,3
0,3 mol/L Ser	66	±	0,7	75	±	0,8	68	±	0,8
0,1 mol/L Ser	67	±	0,2	74	±	0,4	67	±	0,7
0,75 mol/L Arg	61	±	0,2	70	±	0,2	no	±	no
0,3 mol/L Arg	63	±	0,2	70	±	0,3	no	±	no
0,1 mol/L Arg	65	±	0,1	71	±	1,2	67	±	0,2
0,075 mol/L Asp	67	±	0,2	73	±	0,7	66	±	0,3
0,01 mol/L Asp	68	±	0,5	73	±	1,2	67	±	0,9
0,08 mol/L Ala	68	±	0,3	74	±	0,1	68	±	2,4
0,01 mol/L Ala	68	±	0,3	74	±	0,4	66	±	0,6
1 mmol/L DTT	65	±	0,1	70	±	0,3	61	±	0,4
0,05% NaN ₃	68	±	0,4	74	±	0,6	64	±	2,2
0,01% NaN ₃	68	±	0,4	73	±	0,1	65	±	1,0
20 mmol/L MOPS, pH 6,5	68	±	0,5	73	±	0,0	68	±	0,6
20 mmol/L MOPS, pH 7,5	68	±	0,7	74	±	0,2	65	±	0,8
20 mmol/L MES, pH 5,5	66	±	0,1	69	±	0,2	69	±	1,5
20 mmol/L MES, pH 6,0	67	±	0,1	72	±	0,1	68	±	1,0
20 mmol/L MES, pH 6,5	67	±	0,5	73	±	0,1	68	±	0,5
20 mmol/L Bis-Tris, pH 6,0	65	±	0,2	70	±	0,2	67	±	0,4
20 mmol/L Bis-Tris, pH 7,2	67	±	0,1	75	±	0,4	62	±	0,7
20 mmol/L HEPES, pH 7,2	68	±	0,3	74	±	0,6	62	±	2,0

20 mmol/L HEPES, pH 7,5	67 ± 0,0	74 ± 0,3	61 ± 0,8
20 mmol/L HEPES, pH 8,0	67 ± 0,1	73 ± 0,6	60 ± 0,1
20 mmol/L Tricin, pH 7,4	67 ± 0,1	74 ± 0,4	63 ± 0,3
20 mmol/L Tricin, pH 8,0	67 ± 0,2	73 ± 0,2	60 ± 1,1
20 mmol/L Tricin, pH 8,5	67 ± 0,1	72 ± 0,2	58 ± 0,8
20 mmol/L fosfatni pufer, pH 6,0	68 ± 0,3	73 ± 0,1	71 ± 0,9
20 mmol/L fosfatni pufer, pH 7,4	67 ± 0,3	72 ± 0,2	62 ± 0,5
20 mmol/L fosfatni pufer, pH 8,0	68 ± 0,8	72 ± 0,3	60 ± 1,7
20 mmol/L Tris, pH 8,0	68 ± 0,5	73 ± 0,4	68 ± 0,8
20 mmol/L Tris, pH 9,0	67 ± 0,5	73 ± 0,7	59 ± 0,7
20 mmol/L Tris, pH 10,0	65 ± 0,1	73 ± 0,7	no ± no
20 mmol/L natrijev citrat, pH 4,0	60 ± 4,7	61 ± 0,2	74 ± 0,3
20 mmol/L natrijev citrat, pH 5,0	62 ± 1,3	69 ± 0,1	69 ± 0,4
20 mmol/L natrijev acetat, pH 4,0	64 ± 2,0	63 ± 0,1	45 ± 1,4
20 mmol/L natrijev acetat, pH 5,6	67 ± 1,0	71 ± 0,1	69 ± 1,0
100 mmol/L fosfatni pufer, pH 6,0	66 ± 0,4	73 ± 0,4	72 ± 1,2
100 mmol/L fosfatni pufer, pH 7,4	65 ± 0,4	71 ± 0,2	64 ± 0,4
100 mmol/L fosfatni pufer, pH 8,0	64 ± 0,4	71 ± 0,2	60 ± 0,1
100 mmol/L Tris, pH 8,0	66 ± 0,4	72 ± 0,7	68 ± 1,3
100 mmol/L Tris, pH 9,0	66 ± 0,3	71 ± 1,3	58 ± 0,7
100 mmol/L Tris, pH 10,0	64 ± 0,3	71 ± 1,4	71 ± 3,6
100 mmol/L natrijev citrat, pH 4,0	44 ± 0,8	57 ± 0,2	no ± no
100 mmol/L natrijev citrat, pH 5,0	61 ± 0,6	67 ± 0,3	66 ± 1,3
100 mmol/L natrijev acetat, pH 4,0	56 ± 0,4	61 ± 0,2	55 ± 1,9
100 mmol/L natrijev acetat, pH 5,6	65 ± 0,4	71 ± 0,7	72 ± 1,2
10 mmol/L DTT	64 ± 0,2	68 ± 0,3	51 ± 1,1
20 mmol/L DTT	64 ± 0,6	66 ± 0,4	49 ± 1,2
50 mmol/L DTT	61 ± 0,1	64 ± 0,5	42 ± 1,3

no – krivulja dobivena DSF-om nije bila pogodna za očitavanje T_m

§ 9. ŽIVOTOPIS

Dora Sviben rođena je u Zagrebu 6.8.1990. gdje završila osnovnu i srednju školu (XV. gimnazija). Preddiplomski studij kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2009., a završila 2012. nakon čega upisuje diplomski studij (Analitička kemija, Biokemija) te je 2014. godine diplomirala je na Zavodu za biokemiju s radom „Heterologna ekspresija, pročišćavanje i karakterizacija proteina iz genomske okoline aminokiselina:[protein-nosač]-ligaze i protein-nosača iz *Agrobacterium fabrum C58*“ pod vodstvom doc. Dr. sc. J. Rokov Plavec i prof. dr. sc. I. Weygand-Đurašević. Za studentski rad „Sinteza i karakterizacija dioksomolibdenovih (VI) kompleksa s derivatima izoniazida“ izrađen s Markom Ciglerom, a pod vodstvom prof. dr. sc. V. Vrdoljak na Zavodu za opću i anorgansku kemiju 2013. nagrađena je Rektorovom nagradom, a dobitnica je i medalje Kemijskog odsjeka za izvrsnost u studiranju. Dobitnica je Stipendije Grada Zagreba za izvrsne studente (2012 – 2014).

Poslijediplomski studij kemije na PMF-u upisuje 2014., a od 2015. radi u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, najprije kao stručna suradnica u sustavu znanosti i visokog obrazovanja, a od 2017. kao asistentica. Kao asistentica sudjelovala je u izvođenju nastave Praktikum biokemije na PMF-u od 2016. do 2018. U sklopu međunarodne suradnje u razdoblju od veljače 2016. do kolovoza 2017. provela je ukupno 5 mjeseci na stručnom usavršavanju na Tehničkom Sveučilištu u Beču (*Technische Universität Wien*, Beč, Austrija) u laboratoriju prof. dr. sc. M. Marchetti-Deschmann i prof. dr. sc. G. Allmaiera.

Znanstvene publikacije

1. Sviben, D., Forčić, D., Ivančić-Jelečki, J., Halassy, B. i Brgles, M. Recovery of infective virus particles in ion-exchange and hydrophobic interaction chromatography is influenced by particle charge and total-to-infective particle ratio. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1054** (2017) 10–19.
2. Brgles, M., Sviben, D., Forčić, D. i Halassy, B. Nonspecific native elution of proteins and mumps virus in immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. A* **1447** (2016) 107–114.

3. Sviben, D., Forčić, D., Kurtović, T., Halassy, B. i Brgles, M. Stability, biophysical properties and effect of ultracentrifugation and diafiltration on measles virus and mumps virus. *Arch. Virol.* **161** (2016) 1455-1467.
4. Vrdoljak, V., Prugovečki, B., Pulić, I., Cigler, M., Sviben, D., Parlov Vuković, J., Novak, P., Matković-Čalogović, D. i Cindrić, M. Dioxidomolybdenum (VI) complexes with isoniazid-related hydrazones: solution-based, mechanochemical and UV-light assisted deprotonation. *New J. Chem.* **39** (2015) 7322-7332.

Sudjelovanja na skupovima, radionicama i tečajevima

1. 29th MassSpec Forum, 20.-21.02.2018., TU Wien, Beč, Austrija – sudjelovanje s posterom pod naslovom „Mass spectrometry-based investigation of mumps and measles virus proteome“ (autori: D. Sviben, D. Forčić, B. Halassy, G. Allmaier, M. Marchetti-Deschmann, M. Brgles)
2. 14th Slovenian – Croatian Waters Users' Meeting, 16.11.2017., Bled, Slovenija
3. GE Healthcare & LKB: Chromatography Seminar Zagreb, 26.10.2017. BIOCentar, Zagreb, Hrvatska
4. 25. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 19.-22.4.2017. Poreč, Hrvatska – sudjelovanje s usmenim priopćenjem pod naslovom „Investigation of mumps and measles virus proteome and lipidome“ (autori: D. Sviben, D. Forčić, B. Halassy, G. Allmaier, M. Marchetti-Deschmann, M. Brgles)
5. Praktični tečaj „Osnove proteomike“, 06. – 07.12.2016. BIOCentar, Zagreb, Hrvatska
6. 13th International „Greta Pifat Mrzljak“ School of Biophysics, 01.-10.09.2016. Hrvatska – sudjelovanje s posterskim priopćenjem „Stability of proteins and viruses determined by differential scanning fluorimetry“ (autori: D. Sviben, D. Forčić, B. Halassy, M. Zurawski, M. Brgles) te kratkim usmenim priopćenjem na istu temu
7. 10th Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine Summer School, 03.-09.07.2016. Dubrovnik, Hrvatska – sudjelovanje s posterskim priopćenjem „Measles virus proteome: virus proteins and host cell proteins“ (autori: D. Sviben, D. Forčić, B. Halassy, G. Allmaier, M. Marchetti-Deschmann, M. Brgles)
8. 16th International Chromatography School, 09.-10.06.2016. Zagreb, Hrvatska
9. 7th Monolith Summer School & Symposium, 29.05.-01.06.2016. Portorož, Slovenija – sudjelovanje s posterskim priopćenjima „Nonspecific native elution of proteins and

mumps virus in immunoaffinity chromatography“ (autori: M. Brgles, D. Sviben, D. Forčić, B. Halassy) i „Purification of mumps and measles virus by hydrophobic interaction chromatography on monolithic columns“ (autori: D. Sviben, D. Forčić, J. Ivančić-Jelečki, B. Halassy, M. Brgles), predavanje pod naslovom „Purification of mumps and measles virus by hydrophobic interaction chromatography on monolithic columns“ (predavač: D. Sviben)

10. Innomol New Platforms for Molecular Solutions in Research and Development Workshop, 11.-12.05.2016. Zagreb, Hrvatska
11. 27th MassSpec Forum, 23.-24.02.2016. TU Wien, Beč, Austrija
12. Taylor & Francis „How to Get Published“ roadshow, 30.10.2015. Zagreb, Hrvatska
13. Symposium & Workshop on Microscale Thermophoresis, 30.06.-01.07.2015. Zagreb, Hrvatska – sudjelovanje s posterskim priopćenjem „Impact of dissociation constant on immunoaffinity and affinity chromatography“ (autori: D. Sviben, B. Halassy, D. Forčić, M. Brgles)
14. Innomol Molecular Interactions Workshop, 01.-03.06.2015. Zagreb, Hrvatska
15. 24. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 21.-24.4.2015. Zagreb, Hrvatska – sudjelovanje s posterskim priopćenjem pod naslovom „Stability and biophysical properties of mumps and measles virus“ (autori: D. Sviben, B. Halassy, D. Forčić, M. Brgles)

Istraživanje je provedeno u okviru projekta Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji“, KK.01.1.1.01.0006, sufinanciranog sredstvima Europskog fonda za regionalni razvoj.