

**UČINKOVITA I ODRŽIVA PLATFORMA ZA PRIPRAVU VISOKO
KVALITETNIH IMUNOGLOBULINSKIH PRIPRAVAKA KAO BRZO
DOSTUPNIH TERAPEUTIKA U SITUACIJAMA IZNENADNIH
VIRUSNIH EPIDEMIJA**

TIHANA KURTOVIĆ

Sveučilište u Zagrebu

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji

U V O D

KONVALESCENTNA PLAZMA – LEKCIJE NAUČENE IZ PRIJAŠNJIH EPIDEMIJA

P R E D N O S T I

Klinički je efikasna. Ali, mora sadržavati dostatnu količinu neutralizirajućih antitijela i primijeniti se u dovoljno ranoj fazi hospitalizacije.

Dostupna je čim se u populaciji pojave prvi preboljeli.

Ne zahtijeva daljni razvoj ili preradu.

N E D O S T A C I

Sadrži i dodatne faktore od kojih su brojni pod sumnjom kao potencijalno štetni – protein S-aktivirajuće endoproteaze, vezikule sa virsnom mRNA/tkivnim faktorom, $\alpha(2)$ -antiplazmin, receptori za uPA na površini mijeloidnih stanica, afukozilirani IgG-i, autoantitijela...

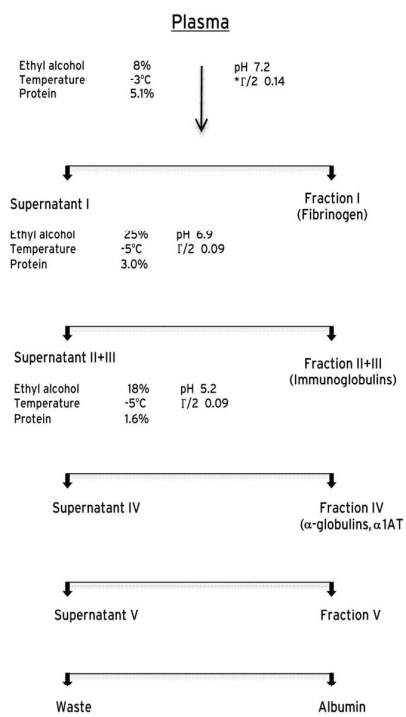
Nije standardizirana. Varijabilnost u razini neutralizirajućih antitijela može utjecati na njenu učinkovitost.

Može se dati samo u ograničenom volumenu.

Uslijed transfuzije neutralizirajuća antitijela se razrjeđuju do koncentracije koja ponekad nije dostatna za uspješan ishod liječenja.

UVOD

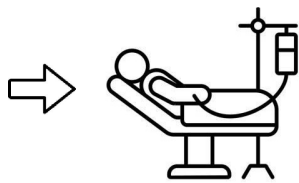
IZDVAJANJE IMUNOGLOBULINA IZ HUMANE PLAZME NA INDUSTRIJSKOJ SKALI



UVOD

SIGURNOST TERAPIJSKIH IgG-a – IgA i IgM U KONTEKSTU ŠTETNIH NUSPOJAVA

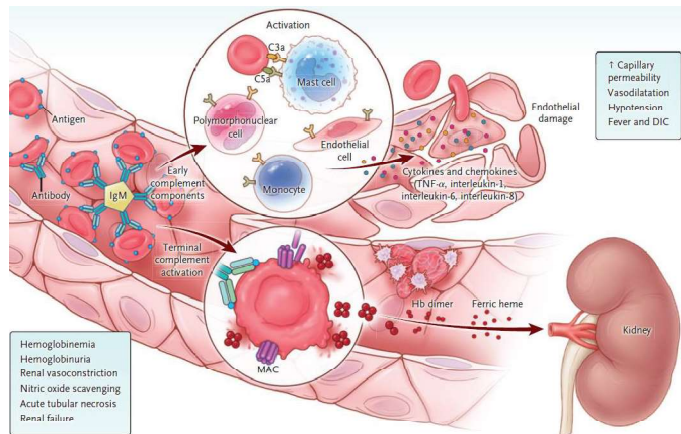
ANAFILAKTIČKE REAKCIJE



IgA DEFICIJENTI RECIPIJENT S anti-IgA ANTITIJELIMA

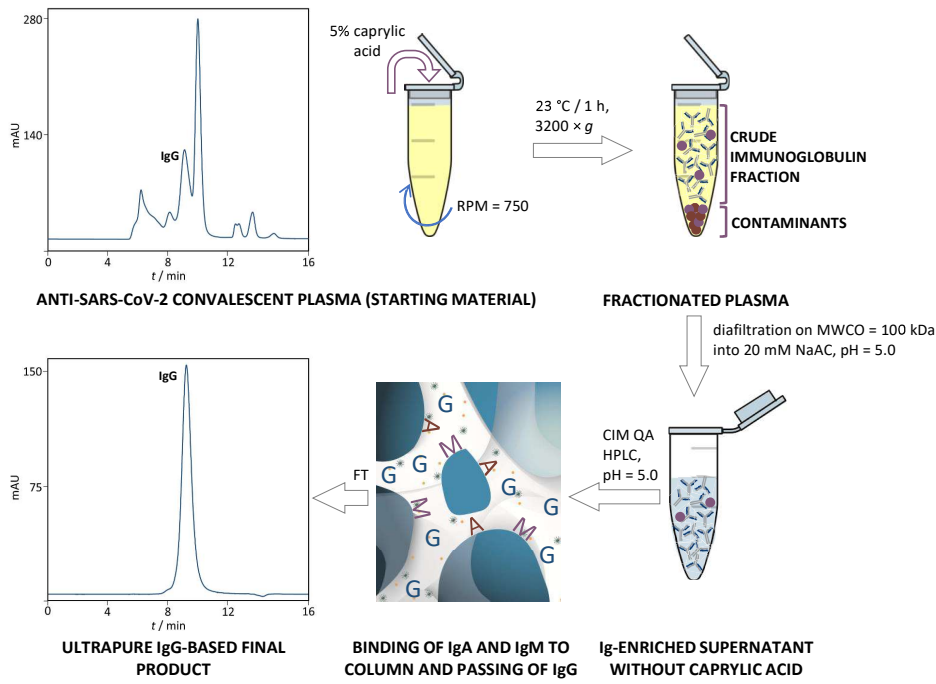
vezanje imunih kompleksa za FcγRIII na makrofagima, indukcija sinteze faktora aktivacije trombocita u mastocitima, agregacija trombocita, oslobađanje tromboksana/serotonina → anafilaksija praćena povećanom permeabilnošću endotela i vazodilatacijom

HEMOLITIČKE REAKCIJE



UVOD

OKOSNICA NOVE STRATEGIJE ZA PRIPRAVU TERAPIJSKIH IgG-a



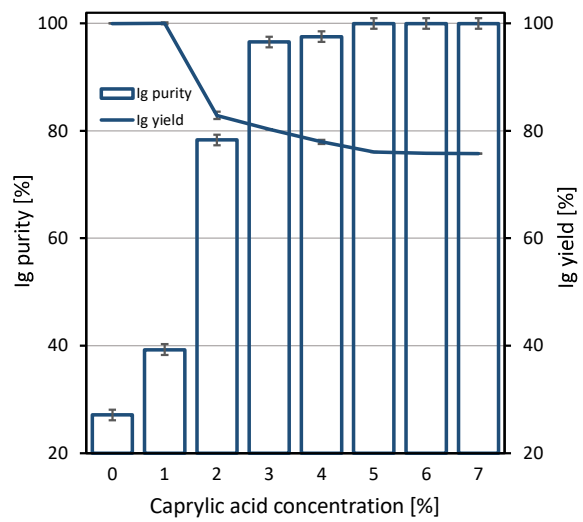
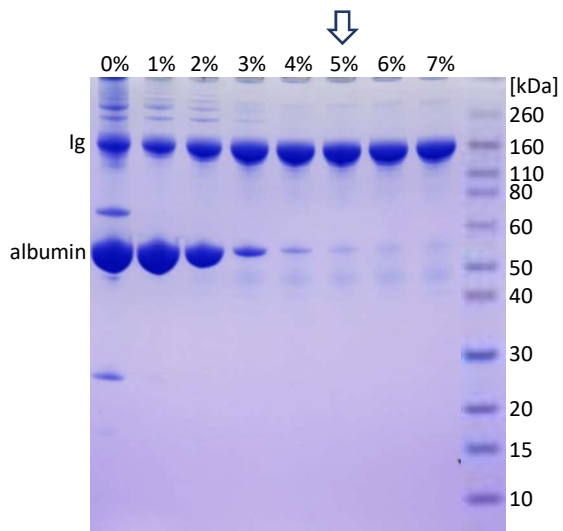
U V O D

ČISTOĆA I PRINOSI PO PROCESNIM KORACIMA

		IgG	IgA	IgM
Caprylic acid precipitation	Share in total proteins [%]	72.5 ± 4.9	9.8 ± 2.6	4.8 ± 3.2
	Share in immunoglobulins [%]	83.2 ± 2.2	11.8 ± 3.3	5.2 ± 3.4
	Recovery in relation to CCP [%]	84.6 ± 6.7	77.4 ± 11.2	42.6 ± 7.4
Diafiltration	Share in total proteins [%]	79.2 ± 7.6	10.7 ± 3.0	4.9 ± 3.5
	Share in immunoglobulins [%]	83.6 ± 2.6	12.9 ± 4.0	4.8 ± 3.3
	Recovery in relation to CCP [%]	81.8 ± 8.0	73.8 ± 9.6	40.1 ± 7.5
	Recovery in relation to previous step [%]	96.5 ± 3.2	95.9 ± 4.5	83.0 ± 12.1
Flow-through chromatography	Share in total proteins (immunoglobulins) [%]	99.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	$0.6 \times 10^{-3} \pm 0.4 \times 10^{-3}$
	Recovery in relation to CCP [%]	75.1 ± 1.8	4.1 ± 1.5	0.2 ± 0.1
	Recovery in relation to previous step [%]	93.0 ± 7.1	5.6 ± 2.0	1.0 ± 0.8

REZULTATI

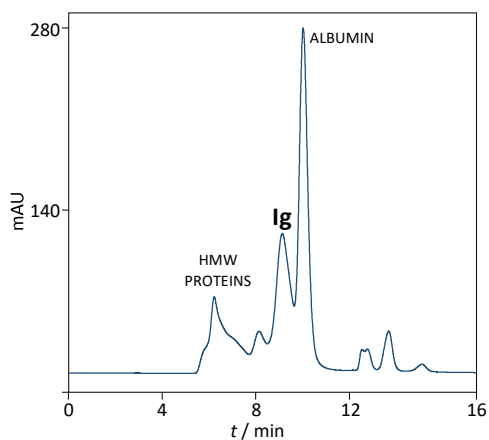
KORAK TALOŽENJA KAPRILNOM KISELINOM



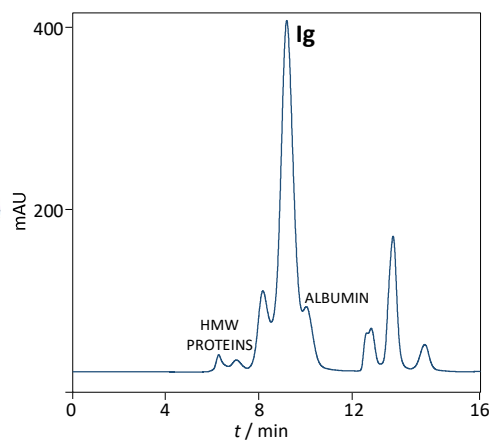
REZULTATI

KORAK TALOŽENJA KAPRILNOM KISELINOM

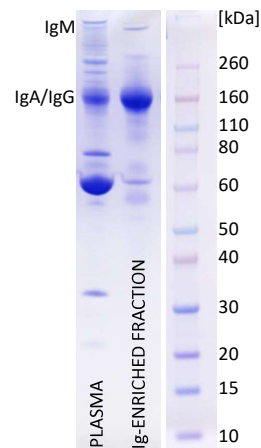
	IgG	IgA	IgM		
Caprylic acid precipitation	Share in total proteins [%]	72.5 ± 4.9	9.8 ± 2.6	4.8 ± 3.2	⇒ 87% IgG + IgA + IgM
	Share in immunoglobulins [%]	83.2 ± 2.2	11.8 ± 3.3	5.2 ± 3.4	
	Recovery in relation to CCP [%]	84.6 ± 6.7	77.4 ± 11.2	42.6 ± 7.4	



CONVALESCENT PLASMA



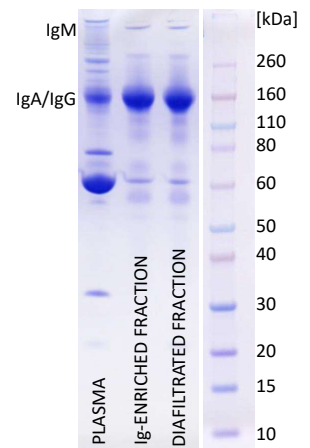
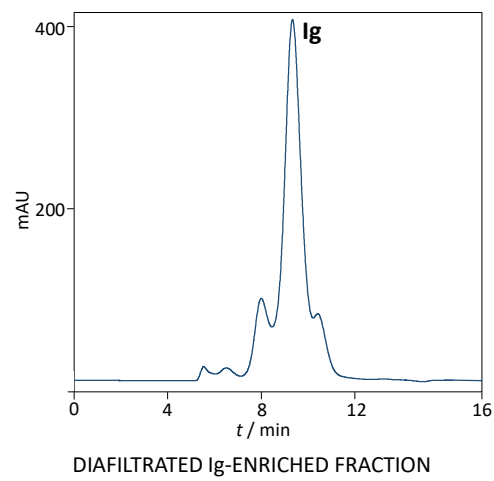
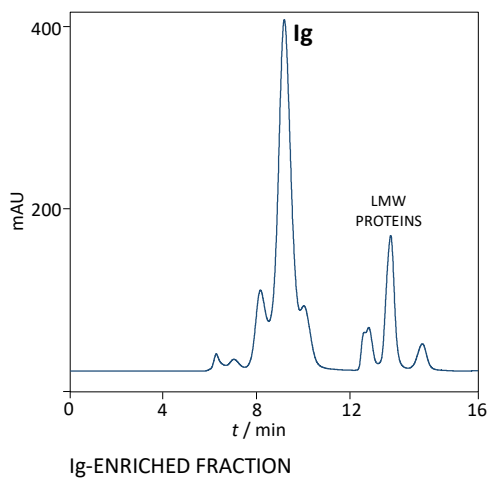
Ig-ENRICHED FRACTION



REZULTATI

KORAK DIJAFILTRACIJE

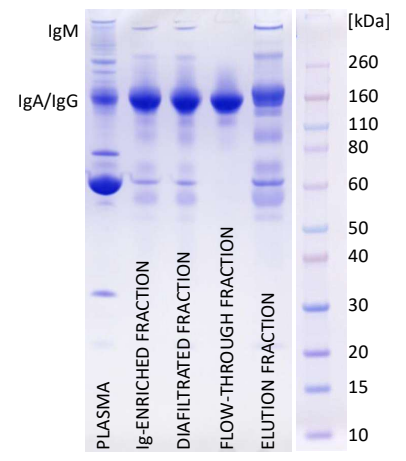
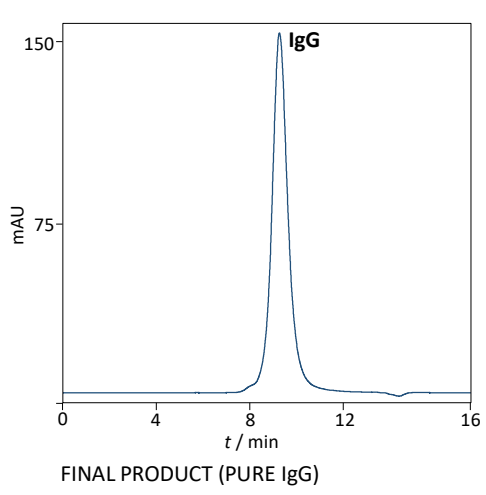
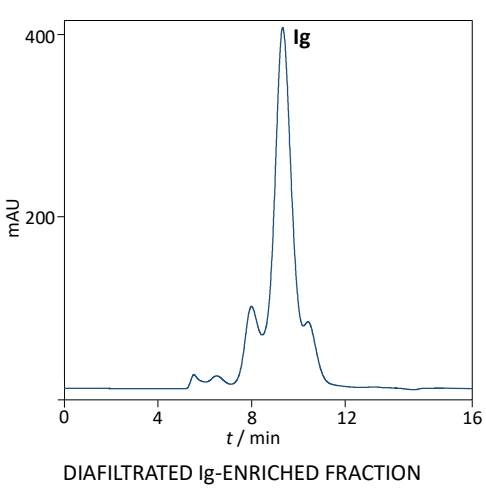
	IgG	IgA	IgM	
Diafiltration				
Share in total proteins [%]	79.2 ± 7.6	10.7 ± 3.0	4.9 ± 3.5	⇒ 95% IgG + IgA + IgM
Share in immunoglobulins [%]	83.6 ± 2.6	12.9 ± 4.0	4.8 ± 3.3	
Recovery in relation to CCP [%]	81.8 ± 8.0	73.8 ± 9.6	40.1 ± 7.5	
Recovery in relation to previous step [%]	96.5 ± 3.2	95.9 ± 4.5	83.0 ± 12.1	



REZULTATI

KROMATOGRAFSKI KORAK

	IgG	IgA	IgM
Flow-through chromatography			
Share in total proteins (immunoglobulins) [%]	99.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	$0.6 \times 10^{-3} \pm 0.4 \times 10^{-3}$
Recovery in relation to CCP [%]	75.1 ± 1.8	4.1 ± 1.5	0.2 ± 0.1
Recovery in relation to previous step [%]	93.0 ± 7.1	5.6 ± 2.0	1.0 ± 0.8



REZULTATI

SVOJSTVA IgG PRODUKTA – NEUTRALIZACIJSKI POTENCIJAL

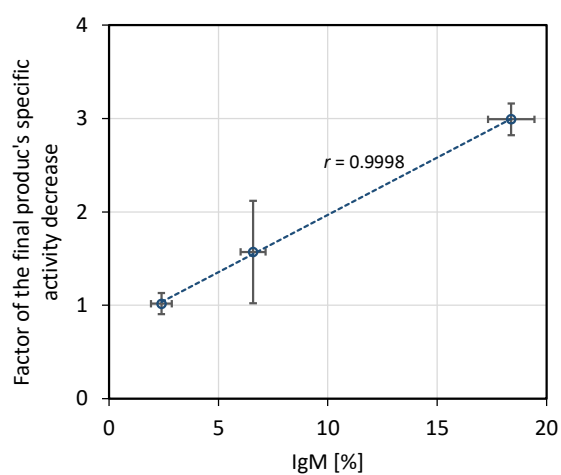
	Neutralization potency [IU mL ⁻¹]	γ (IgG) [mg mL ⁻¹]	IU mg ⁻¹ of IgG content
CCP A	151.8 ± 47.6 (n = 5)	9.4	16.2 ± 5.1
Pure IgG 1	176.0 ± 44.8 (n = 5)	9.5	18.4 ± 4.7
Pure IgG 2	145.8 ± 38.7 (n = 5)	9.7	15.0 ± 4.0
Pure IgG 3	153.0 ± 32.6 (n = 3)	10.0	15.2 ± 3.3
CCP B	86.5 ± 13.1 (n = 12)	8.6	10.0 ± 1.5
Pure IgG 1	36.9 ± 7.6 (n = 6)	10.7	3.4 ± 0.7
Pure IgG 2	32.8 ± 7.8 (n = 5)	9.3	3.5 ± 0.8
Pure IgG 3	30.4 ± 6.0 (n = 3)	9.5	3.2 ± 0.6
CCP C	575.9 ± 83.2 (n = 9)	12.9	44.7 ± 6.5
Pure IgG 1	244.6 ± 21.1 (n = 6)	10.6	23.1 ± 2.0
Pure IgG 2	396.8 ± 39.0 (n = 5)	10.4	38.2 ± 3.8

ISKORIŠTENJE PROCESA ODREĐENOG IZ NEUTRALIZACIJSKOG POTENCIJALA U PROSJEKU IZNOSI 51.0 ± 16.2% (n = 8).

REZULTATI

DOPRINOS IgM-a NEUTRALIZACIJSKOM POTENCIJALU KONVALESCENTNE PLAZME

	IgM share [%]	Factor of the final product's specific activity decrease
CCP A	3.3 ± 0.8	1.0 ± 0.1
CCP B	18.4 ± 0.8	3.0 ± 0.2
CCP C	6.6 ± 0.6	1.6 ± 0.5



REZULTATI

SVOJSTVA KONAČNOG PRODUKTA

OSTVAREN JE PRINOS OD OKO 75% UKUPNIH IgG-a.

SEC-determined purity [%]	SEC-determined aggregate content [%]	ELISA-determined purity [%]	ELISA-determined yield [%]	ED ₅₀ assay-determined yield [%]	Average purification factor
100	0	99.2 ± 0.1	75.1 ± 1.8	51.0 ± 16.2	3.3

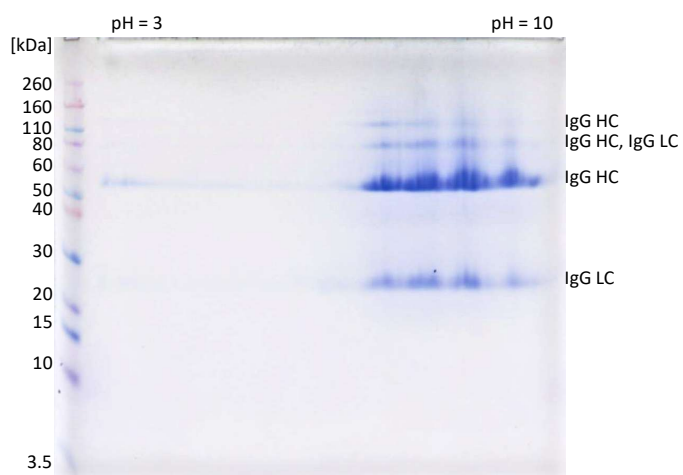
POSTIGNUTA JE NENARUŠENA DISTRIBUCIJA IgG POTKLASA.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Factor of IgG subclass quantity change in relation to the amount in CCP	1.10 ± 0.05	1.07 ± 0.11	1.05 ± 0.13	1.04 ± 0.11

REZULTATI

PROVJERA KVALITETE IgG PRODUKTA MS/MS-om

DOBIVEN JE POTPUNO ČISTI IgG PRIPRAVAK, BEZ TRAGOVA KONTAMINIRAJUĆIH PROTEINA, OSOBITO IZOTIPOVA IgA i IgM, TE AGREGATA.



ZAKLJUČAK

POSTOJI LI POTREBA ZA RAZVIJANJEM I UVOĐENJEM NOVIH PROIZVODNIH PRISTUPA?

POSTUPCI NA INDUSTRIJSKOJ SKALI ZA FRAKCIONACIJU TRAŽE VELIKE VOLUMENE ULAZNOG MATERIJALA. KONVALESCENTA PLAZMA JE RASPOLOŽIVA U OGRANIČENIM, MANJIM KOLIČINIMA, OSOBITO U POČETNOJ FAZI IZNENADNIH VIRUSNIH EPIDEMIJA KADA JE I NAJPOTREBNIJA.

ZA TAKVE SITUACIJE SU BOLJI SMALL-SCALE PROCESI:

- USKLAĐENI SU S TRENDOM PORASTA BROJA PREBOLJELIH I SVE VEĆE DOSTUPNOSTI KONVALESCENTNE PLAZME
- PRIKLADNI SU ZA PRERADU MANJIH SERIJA PRIKUPLJENIH KROZ KRAĆI VREMENSKI PERIOD I OD LOKALNIH DAVAČA, S IGG-IMA SPECIFIČNIMA ZA ONE VIRUSNE VARIJANTE KOJE U DANOM TRENUTKU CIRKULIRAJU NA ODREĐENOM PODRUČJU

Efficient and Sustainable Platform for Preparation of a High-Quality Immunoglobulin G as an Urgent Treatment Option During Emerging Virus Outbreaks

Tihana Kurtović^{1,2}, Sanda Ravlić^{1,2}, Adela Štimac^{1,2}, Sanja Mateljak Lukačević^{1,2}, Ana Hećimović³, Saša Kazazić⁴ and Beata Halassy^{1,2*}*

¹ Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, ² Center of Excellence for Virus Immunology and Vaccines, Zagreb, Croatia, ³ Croatian Institute of Transfusion Medicine, Zagreb, Croatia, ⁴ Division of Physical Chemistry, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia



Projekt je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj i Hrvatska zaklada za znanost (IP CORONA-04-2053, voditeljica dr. sc. B. Halassy).

HVALA NA PAŽNJI.

Sadržaj ovog materijala isključiva je odgovornost Korisnika projekta „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji“ (KK.01.1.1.01.0006) Sveučilišta u Rijeci Medicinskog fakulteta, Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva.