

Imunogeničnost agregata terapeutskih proteina

Immunogenicity of therapeutic protein aggregates

Ivana Mijić¹, Sabina Marinc², Mario Cindrić^{1*}

SAŽETAK. S obzirom na to da ima brojne nepoželjne učinke koji uključuju smanjenje aktivnosti, promijenjeno vrijeme poluživota u organizmu te povećanu imunogeničnost, agregacija proteina predstavlja značajan problem kod administracije biofarmaceutika. Čimbenici koji uzrokuju agregaciju proteina mogu biti strukturne karakteristike proteina (interni čimbenici) ili okolišni uvjeti (eksterni čimbenici). Proteinska agregacija jedan je od najviše proučavanih faktora imunogeničnosti terapeutskih proteina, ali usprkos tome do danas nije u potpunosti razjašnjen mehanizam kojim agregati terapeutskih proteina izazivaju imuni odgovor. Pokazano je, međutim, kako ključnu ulogu u stvaranju imunološkog odgovora ima multimerno predočavanje antigena, kao i njegove konformacijske promjene. Kako bi se osigurao razvoj sigurnog i efikasnog proteinskog terapeutika u smislu nepoželjnih čimbenika koje izaziva proteinska agregacija, potrebno je osigurati analitičke metode za karakterizaciju i kvantifikaciju agregata. Kvantifikacija agregata je nerijetko iznimno zahtjevna, što je povezano s činjenicom da se agregati mogu pojavljivati u mnogim i različitim oblicima. Za detekciju i kvantifikaciju agregata uspješno se primjenjuju brojne separacijske tehnike koje uključuju gel-filtracijsku kromatografiju, gel-elektroforezu, razlučivanje protočnim poljem i analitičko ultracentrifugiranje, kao i spektroskopske detekcijske tehnike, od kojih se najčešće koriste UV/VIS, fluorimetrija, dinamičko raspršenje svjetlosti i višekutno raspršenje svjetlosti.

Ključne riječi: analitičke metode, imunogeničnost, proteinska agregacija, struktura antigena

ABSTRACT. Aggregation is a significant problem in pharmaceutical administration of proteins, since it can end up with several detrimental effects including the loss of activity, altered half-life in bloodstream, and increased immunogenicity. Aggregation provoking factors may be structural characteristics of protein (internal factors) or environmental conditions (external factors). Despite the fact that protein aggregation represents one of the most possible factor that lead to immunogenicity toward therapeutic proteins, the mechanism of aggregates induced immunogenicity is not yet understood. However, it is known that multimeric antigen presentation and antigen conformations changes have the key role in immunogenicity of therapeutic proteins aggregates.

Because of severe pharmaceutical consequences of protein aggregation, the methods aimed to assess the degree of aggregation are required for the development of a safe and efficacious protein drug product. Quantification of aggregation is often difficult and compounded by multiple forms in which the aggregates may be found. A number of methods have been successfully employed to monitor and quantify protein aggregation. These methods include the separation techniques like size-exclusion chromatography, gel electrophoresis, field flow fractionation and analytical ultracentrifugation, and detection spectroscopic techniques like UV/VIS, fluorescence detection, dynamic light scattering and multi-angle laser light scattering,

Key words: analytical methods, antigen structure, immunogenicity, protein aggregation

¹ Institut "Ruđer Bošković",
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za sistemsku biomedicinu
² Pliva Hrvatska d.d.,
Kvaliteta – biofarmaceutski proizvodi,
Zagreb

Primljeno: 1. 11. 2008.
Prihvaćeno: 13. 3. 2009.

Adresa za dopisivanje:
* **Dr. sc. Mario Cindrić**,
Institut "Ruđer Bošković",
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,
Planinska 1, 10 000 Zagreb
e-mail: mcindric@irb.hr

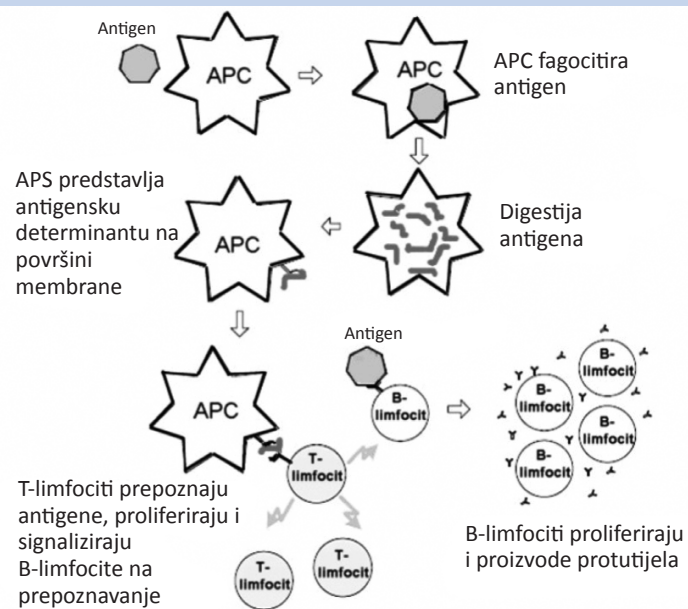
<http://hrcak.srce.hr/medicina>

MEHANIZAM IMUNOGENIČNOSTI

Jedna od uloga imunološkog sustava je i obrana organizma od stranih tijela. Imunološki se sustav može podijeliti na konstitucijski imunološki sustav i adaptivni imunološki sustav. Dok konstitucijski imunološki sustav nije specifičan i reagira na sva strana tijela u organizmu, adaptivni, odnosno prilagodljivi imunološki sustav specifično reagira na antigen i djeluje stvaranjem protutijela. Adaptivni imunološki sustav uglavnom uključuje B-limfoci-

te i T-limfocite. B-limfociti nastaju u leđnoj moždini i prepoznaju prostornu konformaciju antigena, dok T-limfociti potječu iz timusa i prepoznaju linearne epitope proteina izložene unutar glavnog sustava antigena tkivne podudarnosti¹ (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) koji se nalazi izložen na površini antigen predočnih stanica¹ (engl. *antigen presenting cell*, APC)². Dva su osnovna imunološka mehanizma uz pomoć kojih tzv. terapeutski proteini potiču stvaranje protutijela u ljudskom organizmu. Terapeutske proteini koji na svojoj površini imaju epitope ksenogenog podrijetla, kao što su to, primjerice, proteini iz mikroba (npr. streptokinaze), potiču klasični imunološki odgovor koji uključuje predočavanje stranog epitopa pomoću antigen predočnih stanica i tako aktiviraju B-limfocite i T-limfocite, nakon čega se stvaraju protutijela, te se induciraju memorijske stanice. Naime, kada strano tijelo, odnosno antigen, uđe u organizam, antigeni predočne stanice ga prvo fagocitiraju i prerade proteinazama, a tek potom njegove peptidne dijelove, koji se nazivaju antigenske determinante, izlože na svojoj membrani unutar udubljenja na kojima se nalazi MHC. Tako predočene peptide potom prepoznaju T-limfociti, što ujedno predstavlja signal za B-limfocite koji proliferiraju i započinju proizvodnju protutijela³⁻⁵ (slika 1).

Ovakav se imunološki odgovor odvija u dvije faze; prva faza je ona u kojoj se proizvode vezna protutijela, a druga faza, koja ne mora nužno uslijediti, ona je u kojoj nastaju neutralizirajuća protutijela. Stvaranje veznih protutijela obično nema biološke posljedice, iako je nekoliko istraživanja pokazalo kako ova protutijela utječu na farmakokinetiku lijeka, što kao posljedicu ima potrebu za većim dozama ili češćim administracijama lijeka, a mogu i sudjelovati u anafilaktičkim reakcijama^{6,7}. S druge strane, neutralizirajuća protutijela vežu se u aktivno mjesto, čime ga inaktiviraju. Osim što se neutralizirajuća protutijela tako vežu u aktivno mjesto terapeutskog proteina, također se mogu vezati i u vezno mjesto endogenog proteina, što može uzrokovati niz ozbiljnijih komplikacija⁷. Na posljetku se vezanjem protutijela na antigen koji je izložen na površini APC aktivira cijeli imunološki sustav, uključujući i makrofage te segmente urođenog imunološkog sustava koji onda sudjeluju



Slika 1. Shematski prikaz klasičnog imunološkog odgovora. APC fagocitira antigen, vrši njegovu digestiju i izlaže ga na površini unutar MHC kompleksa. T-limfociti prepoznaju peptide u kombinaciji s MHC kompleksom. T-limfociti proliferiraju i interagiraju s B-limfocitima koji prepoznaju antigen. Aktivirani B-limfociti proliferiraju i proizvode protutijela. APC – antigen predočna stanica.

Figure 1. Schematic overview of a classical immune response. The APC phagocytoses the antigen, digests it and presents it on its MHC-molecules on the surface. A T-cells recognize the peptide in combination with the MHC. The T-cell starts to proliferate and interacts with B-cells that recognize the antigen. The activated B-cell starts to proliferate and produces antibodies. APC: antigen presenting cell.

ju u inaktiviranju i izlučivanju antigena iz organizma⁹.

Drugi mehanizam koji je odgovoran za indukciju stvaranja protutijela temelji se na prevladavanju imunotolerancije na vlastiti antigen. Tolerancija na vlastiti antigen potječe iz embrionalne faze razvoja organizma kada se iz timusa uklanjaju stanice imunološkog sustava koje prepoznaju konstitutivne antigene organizma¹⁰. Ovaj glavni mehanizam razvoja imunotolerancije podrazumijeva samo toleranciju na one antigene koji su u dovoljnoj količini predočeni u timusu, stoga neki autoreaktivni B-limfociti mogu izbjeći uklanjanje u timusu tijekom ranog razvoja organizma. Iz tog razloga periferni imunološki mehanizmi drže takve B-limfocite pod kontrolom ili takvi B-limfociti koji prepoznaju konstitutivne antigene bivaju apoptotički uklonjeni iz organizma u kasnijim fazama razvoja. Anergični, odnosno tolerantni autoreaktivni B-limfociti počinju producirati protutijela samo ako je konstitutivni antigen predočen kao signal za opasnost. Jedan od signala za opasnost je i unakrsno povezivanje nekoliko antigena u svojevrsne antigenske komplekse⁴. Tako je pokazano kako ponavljajući slijed antigena povećava izlučivanje specifičnih protutijela 30 puta u odnosu na monomerni antigen¹¹. Ponavljajući slijedovi antigenskih epitopa u organizmu konstitutivno postoje kod infekcijskih medijatora, pa je razumljiv snažan odgovor organizma na takve vrste antigenskih struktura^{4,11,12}.

MEHANIZAM AGREGACIJE PROTEINA

Agregacija se može opisati kao proces pri kojem proteini stvaraju reverzibilne nesmatajuće međublike koji zatim prelaze u reverzibilno odmotane proteine ili u reverzibilne, a ponekad i ireverzibilne agregate. Agregacija proteina inicijalno vodi k povećanju slobodne energije sustava zbog gubitka određenog broja konformacijskih i translacijskih stanja monomera (smanjenje entropije). Proteini s vrlo niskom energijom nativne strukture, tj. energetski stabilizirani proteini, imaju u pravilu višu agregacijsku energetsku barijeru i manje je vjerojatno da će stvarati agregate. Nakon stvaranja nukleusa, daljnja agregacija rezultira smanjenjem slobodne energije sustava, te čitav proces agregacije postaje termodinamički povoljan, budući da je međusobnim privlačenjem hidrofob-

nih ogranaka proteinskih monomera smanjeno područje nepovoljne interakcije proteina i vodenog otapala. Postoje mnoge kemijske reakcije koje mogu direktno povezati proteine ili promijeniti hidrofobnost proteina te tako indirektno promijeniti njegovo agregacijsko ponašanje. Najčešća reakcija takve vrste je stvaranje disulfidne veze koja nastaje oksidacijom slobodnih cisteinskih ogranaka u proteinu¹⁰. Niz postupaka poput zagrijavanja, filtracije, trešnje, smrzavanja, sušenja i rekonstitucije mogu također dovesti do pojave agregacije. Važno je pri tome spomenuti kako primarna struktura proteina može biti glavna odrednica sklonosti proteina k agregaciji. Općenito, što je protein hidrofobniji, to je veća sklonost stvaranja agregata^{13,14}. Sekundarna struktura pojedinog proteina također utječe na sklonost agregiranja. β -nabrane ploče najzastupljenija su sekundarna struktura kod proteinskih agregata, dok su α -zavojnice manje zastupljene, vjerojatno zbog snažnije izraženog dipolnog momenta (između C i N terminalnog kraja molekule) što poboljšava termostabilnost¹⁵.

Iako mehanizam agregacije proteina nije u potpunosti razriješen, do danas je predloženo i na konkretnim primjerima potvrđeno nekoliko načina asocijacije molekula proteina.

Jedan od prvih predloženih mehanizama agregacije proteina jest agregacija potaknuta malom količinom "zagađivača". Zagađivač može biti narušena forma samog proteina (degradirana ili konformacijski narušena struktura), mala količina proteina iz stanice domaćina (ukoliko se radi o rekombinantnim proteinima) ili to mogu biti tvari neproteinskog podrijetla, primjerice čestice silicijevog dioksida ili volframa.

Topivi oligomeri, proteini iz stanice domaćina ili neproteinski zagađivači služe kao jezgre na kojima se proteini međusobno povezuju i na taj način združuju u veće agregate. Ukoliko je zagađivač oštećena forma samog proteina, tada agregacijom mogu nastati topivi oligomeri ili veći agregati, vidljive čestice ili netopivi precipitati¹⁶.

Narušena forma proteina može nastati degradacijskim modifikacijama proteina (oksidacija, deamidacija), zatim promjenom konformacije proteina uslijed termalnog stresa ili pak uslijed površinski potaknute denaturacije.

Drugi predloženi mehanizam proteinske agregacije je agregacija uvjetovana razmatanjem nativnog proteina tijekom pohrane. Naime, proteinska konformacija nije kruta već ona fluktuiru oko vremenski ustabiljene nativne strukture s različitim elagancijama, a sve u ovisnosti o vanjskim uvjetima. Tako su djelomično smotane ili potpuno nesmotane proteinske molekule uvijek prisutne u ravnoteži unutar proteinske otopine, iako se većina takvih molekula jednostavno vraća u svoje nativno stanje. Postoje brojni dokazi kako su međuoblici u smatanju i odmatanju proteina prekursori u njihovoj agregaciji^{17,18}. Naime, potpuno smotani ili odmotani proteini slabije agregiraju jer su im hidrofobni bočni lanci sakriveni u unutrašnjosti gdje ne mogu doći u kontakt s vodom ili su pak nasumično razbacani¹⁹. Segmenti kontinuiranih hidrofobnih grupa u međuoblicima smatanja i odmatanja proteina potiču proces agregiranja. Faktori kao što su povišena temperatura, agitacija (smicanje i stres u kontaktu otopine sa zrakom), površinska adsorpcija i ostali fizikalni ili kemijski čimbenici mogu pospješiti djelomično razmatanje proteina, a time i agregaciju. Bržoj agregaciji narušenih proteinskih formi u odnosu na agregaciju nativnih formi proteina pridonosi i veća brzina difuzije, uslijed čega se znatno povećava mogućnost asocijacije (vjerojatnost sudara) između narušenih proteinskih formi¹⁰.

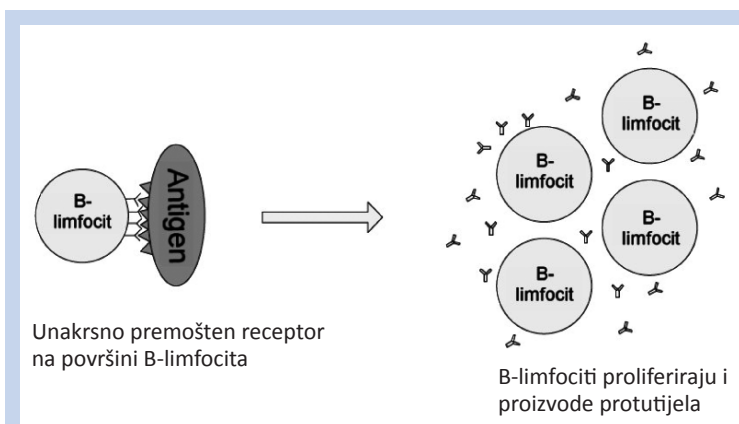
Treći predloženi mehanizam proteinske agregacije je reverzibilno samoudruživanje nativnih formi proteina u oligomere. Sposobnost reverzibilnog

samoudruživanja različitih proteina ovisi kako o strukturnim karakteristikama proteina (interni čimbenici), tako i o vanjskim uvjetima (eksterni čimbenici) kao što su pH i ionska jakost otopine, a udio takvih reverzibilnih agregata u proteinskim formulacijama proporcionalan je ukupnoj koncentraciji proteina²⁰. Reverzibilni agregati nisu neposredno toksični niti imunogeni, s obzirom na to da je pokazano kako uslijed velikog razrjeđenja terapeutskog proteina prilikom administracije reverzibilni agregati potpuno disociraju. No, usprkos toj činjenici postojanje reverzibilnih agregata, odnosno sposobnost molekula proteina da se reverzibilno samoudružuju, pokazuje kako protein ima tendenciju stvaranja prijelaznih formi (u pravilu narušenih formi proteina) za koje se zna da mogu poslužiti i kao agregacijski nukleus u procesu nastanka ireverzibilnih agregata, pa je stoga indikativno praćenje i detekcija procesa reverzibilne agregacije terapeutskih proteina²¹.

IMUNOGENIČNOST PROTEINSKIH AGREGATA

Brojne su teorije mehanizama kojima se imunološki sustav aktivira uslijed prisutnosti agregata terapeutskog proteina, bilo onog endogenog ili pak egzogenog. Poznato je kako su multimerno predočeni antigeni kritičan signal opasnosti B-limfocitima, a kako se u slučaju proteinskih agregata zasigurno radi o multimernom predočavanju antigena, moguće je da do imunološkog odgovora dolazi uslijed unakrsnog multimernog premošćivanja receptora na površini B-limfocita, kako je prikazano na slici 2.

Do danas nije poznat točan mehanizam i razlog zbog kojeg se imunološki odgovori agregacijskih antigena značajno razlikuju u odnosu na imunološke odgovore njihovih monomernih inačica, a još je manje razjašnjena činjenica da proteinski agregati ne moraju uvijek izazvati snažniji imunološki odgovor u odnosu na odgovarajući monomerni protein. Dosadašnje studije daju naslutiti kako je mogući razlog promijenjenoj imunogeničnosti proteinskih agregata u odnosu na njihove monomernu inačicu promjena svojstava antigena, kako strukturnih svojstava pojedinačnih monomera unutar agregata, tako i promijenjena izloženost pojedinog monomernog epitopa do koje dolazi uslijed procesa agregacije. Strukturne pro-



Slika 2. Shematski prikaz mogućeg mehanizma izazivanja imunološkog odgovora uslijed stvaranja agregata.

Figure 2. Schematic representation of a possible mechanism of aggregates induced immune response.

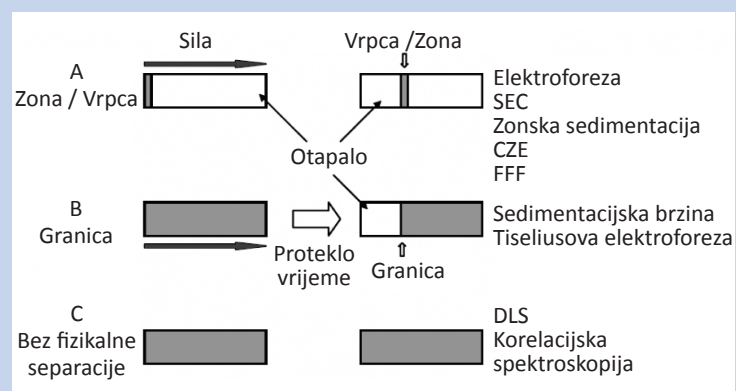
mjene antigena tako mogu uzrokovati različiti afinitet B-limfocita za epitope, aktivaciju različitih unutarstaničnih signalnih putova koji usmjeravaju antigen u procese degradacije, a mogu biti i uzrokom promijenjenoj osjetljivosti endosomalnih proteaza. Endosomalne proteaze, naime, imaju važnu ulogu digestije antigena u manje peptide kako bi se osiguralo predočavanje inače prevelikih antigena unutar kompleksa MHC na površini APC. Tijekom svih do sada navedenih koraka imunološke reakcije struktura antigena može imati dvojak utjecaj, tj. može doći do smanjenja ili povećanja imunološkog odgovora na proteinske agregate terapeutika u odnosu na monomerni protein²².

Osim vrste agregata i strukturnih promjena antigena tijekom procesa agregacije, i sama vrsta terapeutskog proteina može utjecati na razinu imunološkog odgovora. Naime, imunološki sustav sisavaca nije jednako tolerantan na sve endogene proteine^{23,24}, već ključni ulogu u određivanju tolerantnosti imunološkog sustava na određeni terapeutski protein imaju relativna zastupljenost i način na koji su predočeni antigeni endogenog proteina. Tako agregati terapeutskih proteina čiji su endogeni proteini slabo zastupljeni unutar organizma kojem je administriran protein, mogu izazvati snažne imunološke odgovore, dok je sposobnost induciranja imunološkog odgovora snižena kod agregata visoko zastupljenih proteina²⁴.

METODE ANALIZE PROTEINSKIH AGREGATA

Proces agregacije, a time i vrsta agregata, znatno se razlikuju za svaki pojedini protein, te stoga nije moguće primijeniti univerzalnu analitičku metodu za karakterizaciju i kvantifikaciju proteinskih agregata. Veličine agregata variraju od malih oligomera do vidljivih čestica, i općenito se smatra kako su samo male čestice reverzibilni agregati. Manje je poznato kako agregati posjeduju i širok raspon vremena poluživota, a vrijeme poluživota ima značajan utjecaj na izbor i mogućnost provedbe određene analitičke tehnike. Pri izboru analitičke tehnike treba posebno imati na umu i činjenicu da mjerenje, odnosno analiza sama po sebi može uništiti ili producirati proteinske agregate i upravo ova činjenica treba biti okosnica izbora analitičke metode, kako kod kvalitativnog, tako i kod kvantitativnog određivanja agregata²⁵.

Metode analize proteinskih agregata mogu se formalno podijeliti u tri skupine, kako je to prikazano na slici 3.



Slika 3. Klasifikacija tehnika koje se koriste za analizu proteinskih agregata; 3A: vrpca / zona, 3B: granica, 3C: bez fizikalne separacije²².

Figure 3. Classification of techniques used to analyze protein aggregates; 3A Zone/Band, 3B Boundary, 3C No physical separation²².

Prvoj skupini metoda pripadaju metode kod kojih se uzorak razdvaja u vrpce ili zone s obzirom na veličinu, elektroforetsku pokretljivost i masu (slika 3A). Ovoj skupini metoda pripadaju kromatografija razlučivanjem po veličini (engl. *size exclusion chromatography*, SEC), gel-elektroforeza, razdvajanje protočnim poljem (engl. *field flow fractionation*, FFF) i kapilarna zonska elektroforeza (engl. *capillary zone electrophoresis*, CZE)²¹.

Kod analiza iz druge skupine uzorak se unosi u mjernu ćeliju i na njega se djeluje električnom ili centrifugalnom silom, uslijed kojih se zone uzorka pomiču i stvara granica između dijela otopine koji sadrži i dijela otopine koji ne sadrži uzorak (slika 3B). Analiza se kod ovih metoda temelji na pomicanju spomenute granice u vremenskoj domeni. Ovakav se način razdvajanja koristi kod analitičkog ultracentrifugiranja (engl. *analytical ultracentrifugation*, AUC) i kod elektroforeze s pokretnim granicama (Tiseliusova elektroforeza)²⁴.

Treću skupinu metoda za analizu proteinskih agregata čine fizikalne metode određivanja veličine čestica kod kojih nema separacijskog koraka (slika 3C). Takva je metoda, primjerice, korelacijska spektroskopija kod koje se mjeri fluktuacija čestica u otopini uslijed Brownovog gibanja (difuzijski koeficijent), a najčešće korištena metoda u ovoj kategoriji je ogib svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS ili od eng. *multi-angle light scattering*, MALS)²¹.

Gotovo se u svim laboratorijima rutinski primjenjuje SEC zbog svoje jednostavnosti i robusnosti²⁷⁻²⁹, no brojni su čimbenici koji kod provođenja ove tehnike mogu dovesti do pogrešnih rezultata. Tako, primjerice, otopina koja se koristi kao pokretna faza može zbog analiziranom proteinu neprilagođene ionske jakosti ili pH izazivati disocijaciju ili pak formiranje agregata. No, puno veći nedostatak ove tehnike jest mogućnost adsorpcije agregata na nepokretnu fazu kromatografske kolone, uslijed čega može potpuno izostati detek-

Kromatografija razlučivanja po veličini (SEC) analitička je tehnika koja se najčešće rutinski primjenjuje za identifikaciju i za kvantifikaciju agregata. Budući da se radi o tehnici koja koristi nepokretnu fazu kao medij za razdjeljivanje makromolekula, postoji mogućnost gubitka dijela agregata nespecifičnim vezanjem na nepokretnu fazu, stoga je rezultat SEC analize poželjno ispitati nekom ortogonalnom kvantifikacijskom tehnikom (npr. razlučivanjem protočnim poljem, FFF ili tehnikom analitičkog ultracentrifugiranja, AUC).

cija agregata ili se pak agregati samo djelomično kvantificiraju^{25,30}. Upravo je stoga potrebno provesti naknadnu potvrdu rezultata dobivenih SEC tehnikom nekom drugom separacijskom tehnikom koja se ne temelji na upotrebi kolone, tj. čvrste faze pri razdvajanju. Uz to, još se uvijek postavlja pitanje izbora prikladne SEC ortogonalne tehnike, pri čemu izbor leži u tehnikama razdvajanja protočnim poljem i tehnikama analitičkog ultracentrifugiranja. Konačni izbor, dakako, ovisi o prirodi proteina i prije svega o vrsti analiziranih makromolekula (kovalentni ili nekovalentni, reverzibilni ili ireverzibilni agregati), no u posljednje vrijeme tehnika FFF, kao mnogo robusnija i reproducibilnija tehnika od AUC, postaje sve češća ortogonalna metoda izbora^{31,32}.

ZAHVALA

Ovaj rad nastao je uz financijsku potporu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa O98-0982464-2393 i projekta Fonda za zapošljavanje i razvoj RH 14V09809.

LITERATURA

1. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M et al. *Imunologija*. 6th Edition. Zagreb: Medicinska naklada, 2004.
2. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:457-62.
3. Porter S. Human immune response to recombinant human proteins. *J Pharm Sci* 2001;90:1-11.
4. Hermeling S, Crommelin DJA, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res* 2004;21:897-903.
5. Perini P, Facchinetti A, Bulian P, Massaro AR, Pascalis DD, Bertolotto A et al. Interferon-beta (IFN-beta) antibody-in interferon-beta1a- and interferon-beta1b-treated multiple sclerosispatients. Prevalence, kinetics, cross-reactivity, and factors enhancinginterferon-beta immunogenicity in vivo. *Eur Cytokine Netw* 2001;12:56-61.
6. Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D' Haens G, Carbonez A et al. Influence of immunogenicity on the long term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-8.
7. Ring J, Stephan W, Brendel W. Anaphylactoid reactions to infusions of plasma protein and human serum albumin. *Clin Allergy* 1979;9:89-97.
8. Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies inpatients treated with recombinant erythropoietin. *N. Engl. J Med* 2002;346:469-75.
9. Li J, Yang C, Xia Y, Bertino A, Gaspy J, Roberts M et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood* 2001;98:3241-8.
10. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceuticals. *Int J Pharm* 2005;289:1-30.
11. Baschong W, Hasler L, Haner M, Kistler J, Aebi U. Repetitiveversus monomeric antigen presentation: direct visualization of antibody affinity and specificity. *J Struct Biol* 2003;143:258-62.
12. Zinkernagel RM. Uncertainties-discrepancies in immunology. *Immunol Rev* 2002;185:103-25.
13. Calamai M, Taddei N. Relative influence of hydrophobicity and net charge in the aggregation of two homologous proteins. *Biochemistry* 2003;42:15078-83.
14. Saroja G, Samanta A. Hydrophobicity-induced aggregation of N-alkyl-4 aminophthalimides in aqueous media probed by solvatochromic fluorescence. *J Chem Soc* 1998;94:3141-5.
15. Querol E, Perez-Pons JA, Mozo-Villarias A. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Eng* 1996;9:265-71.
16. Chi EY, Weickman J, Carpenter JF, Manning MC, Randolph TW. Heterogeneous Nucleation-Controlled Particulate Formation of Recombinant Human Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase in Pharmaceutical Formulation. *J Pharm Sci* 2005;94:256-74.
17. Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* 1998;3:9-23.
18. Hoppe CC, Nguyen LT, Kirsch LE, Wiencek JM. Characterization of seed nuclei in glucagon aggregation using light scattering methods and field-flow fractionation. *J Biol Eng* 2008;2:2-10.

19. Uversky VN, Karnoup AS, Khurana R, Segel DJ, Doniach S, Fink AL. Association of partially-folded intermediates of staphylococcal nuclease induces structure and stability. *Protein Sci* 1999;8:161–73.
20. Manning MC, Patel K, Borchardt RT. Stability of Protein Pharmaceuticals. *Pharm Res* 1989;6:903–17.
21. Purohit VS, Middaugh CS, Balasubramanian SV. Influence of Aggregation on Immunogenicity of Recombinant Human Factor VIII in Hemophilia A Mice. *J Pharm Sci* 2006;95:358–71.
22. Arakawa T, Philo JS, Ejima D, Tsumoto K, Arisaka F. Aggregation Analysis of Therapeutic Proteins, Part 1. *BioProcess International* 2006;4:42-3.
23. Ryff JC, Schellekens H. Immunogenicity of rDNA-derived pharmaceuticals. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:254–6.
23. Braun A, Kwee L, Labow MA, Alsenz J. Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice. *Pharm Res* 1997;14:1472–8.
25. Philo JS. Is Any Measurement Method Optimal for All Aggregate Sizes and Types?. *The AAPS Journal* 2006;8:564-71.
26. Tiselius A. Electrophoresis of Serum Globulin. *J Biochem J* 1937;31:313–7.
27. Wang W. Instability, Stabilization, and Formulation of Liquid Protein Pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1999;185:129–88.
28. Jones AJS. Analysis of Polypeptides and Proteins. *Adv Drug Deliv. Rev.* 1993;10:29-90.
29. Ahrer K, Buchacher A, Iberer G, Josic D, Jungbauer A. Analysis of Aggregates of Human Immunoglobulin G Using Size-Exclusion Chromatography, Static and Dynamic Light Scattering. *J Chromatogr A* 2003;1009:89–96.
30. Stulik K, Pacakova V, Ticha M. Some Potentialities and Drawbacks of Contemporary Size-Exclusion Chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2003;56:1–13.
31. Arakawa T, Philo JS, Ejima D, Tsumoto K, Arisaka F. Aggregation Analysis of Therapeutic Proteins, Part 2 Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering. *Bio-Process International* 2007;5:36-50.
32. Arakawa T, Philo JS, Ejima D, Tsumoto K, Arisaka F. Aggregation Analysis of Therapeutic Proteins, Part 3 Principles and Optimization of Field-Flow Fractionation (FFF). *Bio-Process International* 2007;6:52-70.

POPIS KRATICA

APC	antigen predočna stanica, engl. <i>antigen presenting cell</i>
AUC	analitičko ultracentrifugiranje, engl. <i>analytical ultracentrifugation</i>
CZE	kapilarna zonska elektroforeza, engl. <i>capillary zone electrophoresis</i>
DLS	dinamični ogib svjetlosti, engl. <i>dynamic light scattering</i>
FFF	razdvajanje protočnim poljem, engl. <i>field flow fractionation</i>
MALS	višekutno raspršenje svjetlosti, engl. <i>multi-angle light scattering</i>
MHC	sustav antigena tkivne podudarnosti, engl. <i>major histocompatibility complex</i>
SEC	kromatografija razlučivanjem po veličini, engl. <i>size exclusion chromatography</i>