

УДК 577.112.825:577.2

Использование в качестве лигандов новых рекомбинантных IgG-связывающих полипептидов при очистке иммуноглобулина G с помощью аффинной хроматографии

© 2018 Е.А. БОРМОТОВА¹, Т.В. ГУПАЛОВА^{1,*}

¹ФГБУН Институт экспериментальной медицины, 197376 Санкт-Петербург

*e-mail: tvgupalova@rambler.ru

Поступила 16.04.2018 г

Принята 28.06.2018 г

Высокоочищенные препараты IgG человека и IgG кролика были получены методом аффинной хроматографии с использованием в качестве лигандов двух синтезированных аффинных сорбентов. Один из них был получен путем присоединения к матрице (активированная бромцианом сефароза 4В) IgG-связывающего полипептида G4223, а во второй – IgG-связывающего полипептида G₁4223. IgG из сывороток кроликов, содержал специфические антитела к групповым полисахаридам стрептококков группы А и В. Такие препараты IgG, дают возможность идентифицировать группоспецифические антигены стрептококков этих групп.

Ключевые слова: сорбенты сефароза 4В-IgG-связывающие полипептиды G4223 и G₁4223, специфические антитела к групповым полисахаридам стрептококков групп А и В.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-62-66

Имуноглобулины или антитела – белковые соединения плазмы крови, образующиеся в ответ на введение в организм человека или теплокровных животных бактерий, вирусов, белковых токсинов и других антигенов. Связываясь активными участками (центрами) с бактериями или вирусами, антитела препятствуют их размножению или нейтрализуют выделяемые ими токсические вещества. У млекопитающих выделяют пять классов антител (иммуноглобулинов) — IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, различающихся между собой по строению и аминокислотному составу тяжелых цепей и по выполняемым эффекторным функциям. Иммуноглобулин G (IgG) – основной класс иммуноглобулинов, содержащихся в сыворотке крови (80% от всех антител), который представлен четырьмя подклассами (IgG1–IgG4), каждый из которых выполняет свои уникальные функции. IgG, в основном, обеспечивает вторичный иммун-

ный ответ, начиная вырабатываться спустя несколько дней после иммуноглобулинов класса М. Благодаря высокому содержанию в сыворотке крови IgG имеет наибольшее значение в инфекционном иммунитете. Поэтому об эффективности вакцинации судят по его наличию в сыворотке крови.

Мировой рынок антител значительно вырос в результате расширения их применения в научных исследованиях, в диагностике и терапии [1–3]. Обычно их выделяют из плазмы, сыворотки, асцитической жидкости, клеточной питательной среды, растительных экстрактов, бактериальных и дрожжевых культур. В связи с тем, что все эти источники помимо антител содержат различные белки, а в ходе исследований антитела подвергаются химической модификации (например, мечение флуоресцентным, радиоактивным или ферментным зондом), появляется необходимость в эффективной очистке антител.

Список сокращений: НЦ-мембраны – нитроцеллюлозные мембраны; ОП – оптическая плотность; ПААГ – полиакриламидный гель; ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; IgG – сывороточный иммуноглобулин G; SDS – додецилсульфат.

Очистка антител может быть достигнута с помощью различных методов на основе конкретных физических или химических свойств антител, таких как размер, растворимость, заряд, гидрофобность и аффинность связывания. Традиционно процесс очистки антител включает стадию осаждения и фильтрации, затем несколько стадий ионообменной хроматографии, используя либо анионит, либо катионит. В настоящее время для очистки антител наиболее широко используется метод аффинной хроматографии, который представляет собой разделение биологических молекул и основан на особом взаимодействии между белком и специфическим лигандом, связанным с матрицей [4]. Один шаг аффинной очистки дает огромную экономию времени по сравнению с менее селективными многоступенчатыми процедурами. Использование аффинной очистки уменьшает неспецифические взаимодействия, повышает выход и устраняет нежелательные примеси. За последнее десятилетие было разработано множество лигандов для улучшения качества очистки белков.

Мощным инструментом для обнаружения и очистки антител явилось использование бактериальных рецепторов в качестве биоспецифических лигандов в аффинной хроматографии [5–7]. Технология рекомбинантных ДНК позволила управлять их свойствами для решения многих задач.

Выделение IgG и его фрагментов основано на высоком сродстве к белку А и белку G. Белки А и G – это бактериальные протеины, выделенные из клеточных структур стафилококка (*Staphylococcus aureus*) и стрептококка группы G, соответственно, которые на сефарозной матрице образуют чрезвычайно полезный и простой сорбент. В отличие от стафилококкового белка А, белок G связывает все подклассы IgG человека (белок А не связывает третий подкласс человеческого IgG), а также имеет более широкий спектр связывания Fc-фрагмента IgG различных млекопитающих.

Белок G также связывает альбумин и α_2 -макроглобулин, однако, сайты их связывания с соответствующими белками крови расположены на разных участках молекулы белка [8, 9]. Это позволило провести клонирование нужного фрагмента последовательности гена G-белка, кодирующей область с тремя IgG-связывающими доменами, и получить новые рекомбинантные штаммы-продукты IgG-связывающей части G-белка штамма стрептококка группы G, *Streptococcus gordonii*, G4223, выделенного со слизистой оболочки верхних дыхательных путей человека [10]. Выделены

и очищены рекомбинантные полипептиды G4223 и G₁4223 с высокой способностью связывать IgG человека и млекопитающих [10].

Цель настоящего исследования – получение высокоочищенных препаратов IgG человека и млекопитающих благодаря использованию рекомбинантных полипептидов G4223 и G₁4223 в качестве лигандов в аффинной хроматографии.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы

В работе использовали рекомбинантные IgG-связывающие G4223 и G₁4223 полипептиды, которые получены, как описано ранее [10], сефарозу 4В, активированную бромцианом (Sigma, США), колонки 1,5×5,0 см, (Bio-Rad, США), нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad), готовый жидкий субстрат для мембран 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ, Sigma, США), белки-маркеры молекулярных масс (Thermo Scientific, Литва), сыворотку крови человека и сыворотки кроликов, содержащие специфические антитела к групповым полисахаридам стрептококков групп А и В, которые были предоставлены ведущим научным сотрудником Отдела молекулярной микробиологии Буровой Л.А.

Предварительно сефарозу 4В, активированную бромцианом, несколько раз центрифугировали, промывая каждый раз свежей порцией холодной 1мМ HCl и отбрасывая надосадочную жидкость. Затем суспензию сефарозы промывали 0,1 М бикарбонатным буфером, pH 8,3.

Подготовка сорбентов

Рекомбинантные IgG-связывающие G4223 и G₁4223 полипептиды, по 35 мг, иммобилизовали на 5 мл сефарозы 4В, активированной бромцианом, в 0,1 М бикарбонатном буфере, pH 8,3, содержащем 0,5 М NaCl, согласно инструкции производителя. Сорбенты промывали в колонках (1,5×5 см) последовательно 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,0 и 0,1 М бикарбонатным буфером, pH 8,3, содержащим 0,5 М NaCl, затем уравнивали 0,01 М фосфатным буфером (ФСБ), содержащим 0,85% NaCl, pH 7,4, и хранили при 4 °С.

Получение и очистка IgG

Сыворотку крови человека и сыворотки кроликов наносили на сорбенты. Несвязавшиеся белки элюировали ФСБ, связавшиеся с сорбентами – 0,1 М глициновым буфером, pH 2,2. Во фракциях,

объемом 400 мкл, определяли оптическую плотность (ОП) при 280 нм. Фракции с высокими значениями ОП объединяли и значение pH доводили до 4,5 с помощью 2,0 М NaOH.

Для проверки емкости сорбентов на два сорбента, уравновешенных ФСБ, pH 7,4, последовательно наносили различные объемы сыворотки человека (10, 15, 20, 30, 35 и 40 мл) Полноту освобождения сыворотки от IgG проверяли методом блоттинга. Наличие и качество полученного IgG определяли с помощью электрофореза по методу Лэммли в 12%-ном ПААГ в присутствии 0,1% SDS на приборе Bio-Rad (США), а его концентрацию – методом Лоури.

Определение компонентов, содержащих пероксидазу

Для блоттинга на две НЦ-мембраны наносили пробы исходной сыворотки, пробы сыворотки, не связавшейся с сорбентом, и пробы, элюированные с сорбентов, используя автоматический принтер для микропечати BioOdyssey Calligrapher miniarrayer (Bio-Rad). Мембраны помещали в 2%-ный раствор обезжиренного сухого молока в ФСБ (блокирующий раствор) и инкубировали 40 мин. Мембраны переносили в блокирующие растворы, содержащие пероксидазу хрена, конъюгированную периодатным методом с IgG-связывающим полипептидом и инкубировали в течение 15 мин при перемешивании. Затем мембраны последовательно промывали блокирующим раствором и раствором ФСБ 3 раза по 5 мин. Отмытые мембраны высушивали на воздухе и помещали в раствор субстрата ТМБ для мембран. После инкубации в течение нескольких секунд определяли компоненты, содержащие пероксидазу, по появлению синей окраски.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве матрицы аффинного носителя использовали сефарозу 4В, активированную бромцианом (Sigma). Лигандами, иммобилизованными на матрице, служили рекомбинантные IgG-связывающие полипептиды G4223 и G₁4223.

Каждый рекомбинантный IgG-связывающий полипептид (G4223 и G₁4223), по 35 мг, иммобилизовали на 5 мл сефарозы 4В, активированной бромцианом в 0,1 М бикарбонатном буфере, pH 8,3, содержащем 0,5 М NaCl и заполняли полученными сорбентами две колонки. Сорбенты промывали в колонках последовательно буферными растворами: не связавшиеся белки элюи-

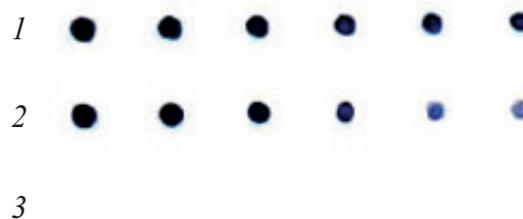


Рис. 1. Блоттинг проб на нитроцеллюлозной мембране после инкубации с меченым IgG-связывающим полипептидом. 1 – исходной сыворотки крови; 2 – IgG, элюированного с аффинного сорбента, содержащего полипептид G4223 или рекомбинантный IgG-связывающий полипептид G₁4223; 3 – проба сыворотки, не связавшейся с сорбентом и освобожденной от IgG аффинной хроматографией

Fig. 1. Blotting of samples of nitrocellulose membrane after incubation with labeled IgG-binding polypeptide: (1), original sera; (2), IgG eluted from affinity sorbent containing G4223 or G₁4223 as a ligand; (3), fraction of serum unbound to sorbent and freed from IgG by affinity chromatography

ровали ФСБ, связавшиеся с сорбентами – 0,1 М глициновым буфером, pH 2,2. При более высоких значениях pH, чем 2,2, элюция происходит не полностью. Количество IgG-связывающего G4223 полипептида, присоединившегося к матрице, составило 30 мг, а IgG-связывающего G₁4223 полипептида – 25 мг.

Для определения емкости сорбентов на каждый сорбент наносили различные количества сыворотки крови человека с концентрацией IgG 15 мг/мл. Полноту освобождения сыворотки от IgG проверяли методом блоттинга, который показал, что в не связавшемся с сорбентами материале, даже при нанесении 30 мл сыворотки на сорбенте с полипептидом G4223 и 35 мл на сорбенте с полипептидом G₁4223 практически полностью отсутствовал IgG (рис. 1). На мембранах при нанесении 35 мл сыворотки на сорбент с G4223 и 40 мл сыворотки на сорбент с G₁4223 в составе белков, не связавшихся с сорбентами, присутствовали следы IgG. Полнота удаления IgG из сыворотки, как и пробы IgG, элюированные с сорбентов, были проверены методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. Как показано на рис. 2, сыворотка, после аффинной хроматографии на обоих сорбентах полностью освобождалась от IgG (рис. 2, дорожка 3). Пробы IgG, очищенные аффинной хроматографией, элюированные с каждого сорбента, представлены на рис. 2 (дорожки 4 и 5). Рисунок демонстрирует, что оба препарата IgG получены

в высокоочищенном состоянии. Количество IgG, связавшееся с обоими сорбентами, оказалось одинаковым, хотя, как было показано раньше, IgG-связывающий G₁4223 полипептид связывает IgG с большей аффинностью [10], однако, на сорбенте 4В-IgG-связывающий G4223 полипептид с матрицей связалось больше полипептида (30 мг) и за счет этого количество молекул его оказалось больше ($602 \cdot 10^{15}$), чем на 25 мг сорбента сефароза 4В-IgG-связывающий G₁4223 полипептид – $301 \cdot 10^{15}$ молекул. Количество молекул рассчитывалось в зависимости от молекулярного веса полипептида (http://www.molbiol.ru/scripts/01_04.htm). Объем объединенных фракций IgG, элюированного с каждого сорбента, составил 20 мл, концентрация очищенного IgG на сорбенте с полипептидом G4223 – 22 мг/мл, а с полипептидом G₁4223 – 26 мг/мл, т.е 1 мг полипептида G4223 связал около 15 мг IgG, а G₁4223 – 20 мг IgG.

Таким образом, созданы сорбенты сефароза 4В-IgG-связывающие G4223 и G₁4223 полипептиды, позволяющие получать очищенные препараты IgG человека. Однако для получения сорбента сефароза 4В-IgG-связывающий G₁4223 полипептид нужно меньшее количество IgG-связывающего полипептида (мг), чем для сорбента сефароза 4В-IgG-связывающий G4223 полипептид, чтобы получить в очищенном состоянии одинаковое количество IgG.

На полученных сорбентах можно получать также очищенные препараты IgG различных антител, полученных от млекопитающих, так как белок G, а в данном случае IgG-связывающие G4223 и G₁4223 полипептиды, обладают способностью связывать Fc-фрагмент иммуноглобулина G большинства видов млекопитающих [11].

Подтверждением сказанного стало получение очищенных IgG из сывороток кроликов, содержащих специфические антитела к групповым полисахаридам стрептококков группы А и В. На сорбенты сефароза 4В-IgG-связывающие G4223 и G₁4223 полипептиды наносили 15 мл сыворотки кролика, содержащей специфические антитела к групповому полисахариду стрептококка группы А и В, соответственно. Полноту освобождения сывороток от IgG также проверяли методом блоттинга, который показал, что в не связавшемся с сорбентами материале практически полностью отсутствовал IgG. На рис. 2 представлены пробы очищенных IgG из сывороток кроликов, содержащих специфические антитела к групповым полисахаридам стрептококков групп А (дорожка 6) и В (дорожка 7). Имея такие препараты

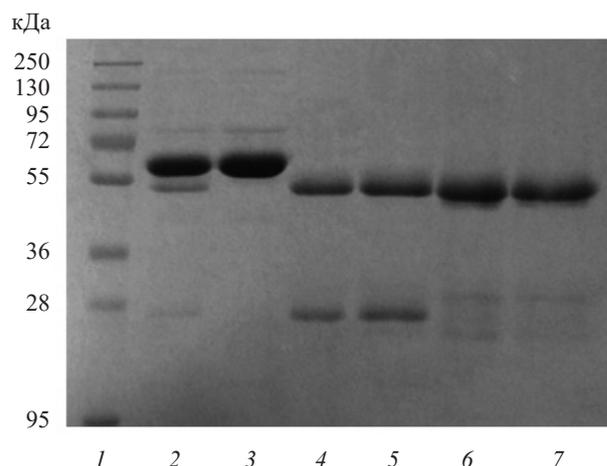


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS рекомбинантных полипептидов. 1 – маркер молекулярных масс; 2 – исходная сыворотка крови; 3 – фракция сыворотки, не связавшейся с колонками сорбентов и освобожденной от IgG аффинной хроматографией; 4 – IgG человека, элюированного и очищенного аффинной хроматографией на сефарозе 4В-G4223; 5 – IgG человека, элюированного и очищенного аффинной хроматографией на сорбенте сефароза 4В-G14223; 6 – IgG кролика, элюированного и очищенного аффинной хроматографией на сорбенте сефароза 4В-G4223; 7 – IgG кролика, элюированного и очищенного аффинной хроматографией на сорбенте сефароза 4В-G14223

Fig. 2. SDS-PAGE of recombinant polypeptides: (1), MM markers; (2), original blood serum; (3), blood fraction unbound to sorbent columns and freed from IgG by affinity chromatography; (4), human IgG eluted and purified by affinity chromatography on Sepharose 4B-G4223; (5), human IgG eluted and purified by affinity chromatography on Sepharose 4B-G₁4223; (6), rabbit IgG eluted and purified by affinity chromatography on Sepharose 4B-G4223; (7), rabbit IgG eluted and purified by affinity chromatography on Sepharose 4B-G₁4223

IgG, можно идентифицировать группоспецифические антигены стрептококков этих групп.

Ранее было показано, что полученные новые штаммы-продуценты рекомбинантных IgG-связывающих полипептидов G4223 и G₁4223 позволяют получать с 1 л культуры 60–70 мг очищенных белков [10]. Оба эти белка обладали большей способностью связывать и IgG человека и IgG млекопитающих по сравнению с хорошо известным G белком, полученным из штамма стрептококка группы G – G148 [10]. Такие свойства новых рекомбинантных полипептидов очень перспективны для использования их в качестве лигандов в аффинной хроматографии для получения очищенных препаратов как IgG человека, так и IgG млекопитающих при очистке различных антител.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boder E.T., Jiang W. Engineering antibodies for cancer therapy. *Ann. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, 2011, 2, 53–75. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114142
2. Cabezas J., Albaina O., Montacez D., Sevilla M.J., et al. Potential of anti-*Candida* antibodies in immunoprophylaxis. *Immunotherapy*, 2010, 2 (2), 171–183. doi: 10.2217/imt.09.76
3. Jain M., Kamal N., Batra S.K. Engineering antibodies for clinical applications. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25(7), 307–316. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.05.001
4. Ayyar B.V., Arora S., Murhy C., et al. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, 2012, 56 (2), 116–129. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.10.007
5. Choe W., Durgannavar T.A., Chung S.J. Fc-binding ligands of immunoglobulin G: An overview of high affinity proteins and peptides. *Materials*, 2016, 9(12), 1–17. doi: 10.3390/ma9120994
6. Grodzki A.C., Berenstein E. Antibody purification: affinity chromatography – protein A and protein G Sepharose. *Methods Mol Biol.*, 2010, 588, 33–41. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0_5
7. Kang H.J., Choe W., Min J.K., et al. Cyclic peptide ligand with high binding capacity for affinity purification of immunoglobulin G. *J. Chromatogr. A.*, 2016, 1466. P. 105–112. doi: 10.1016/j.chroma.2016.09.007
8. Godehardt A.W., Hammerschmidt S., Frank R., et al. Binding of $\alpha 2$ -macroglobulin to GRAB (Protein G-related $\alpha 2$ -macroglobulin-binding protein), an important virulence factor of group A streptococci, is mediated by two charged motifs in the A region. *Biochem. J.*, 2004, 381 (3), 877–885. doi: 10.1042/BJ20030919
9. Gupalova T.V., Lojkina O.V., Palagnuk V.G., et al. Quantitative investigation of affinity properties of different recombinant forms of protein G by means of high-performance monolithic chromatography. *J. Chromatography A*, 2002, 949, 185–193.
10. Бормотова Е.А., Гупалова Т.В., Получение новых рекомбинантных IgG-связывающих полипептидов и анализ их способности связывать IgG человека. *Бюлл. эксперим. биол. медицины*, 2018, 165(3) 349–355.
11. Arora S, Ayyar BV, O’Kennedy R. Affinity chromatography for antibody purification. *Meth. Mol. Biol.*, 2014, 1129, 497–516. doi: 10.1007/978-1-62703-977-2_35

Purification of Immunoglobulin G by Affinity Chromatography using New Recombinant IgG-Binding Polypeptides as Ligands

E.A. BORMOTOVA¹ and T.V. GUPALOVA^{1,*}

¹*Institute of Experimental Medicine, 197376, Saint Petersburg Russia*

**e-mail: tvgupalova@rambler.ru*

Received April 16, 2018

Accepted June 28, 2018

Abstract – Highly purified human and rabbit IgG preparations have been obtained by the method of affinity chromatography using two synthesized affinity sorbents as ligands that were obtained by the immobilization of an IgG-binding G4223 or G₁4223 recombinant polypeptide on a matrix (bromocyanogen-activated Sepharose 4B). IgG from rabbit serum contained specific antibodies to the *Streptococcus* group polysaccharides of A and B groups. Such IgG preparations make it possible to identify group-specific antigens of streptococci of these groups.

Key words: IgG purification, Sepharose 4B-G4223, Sepharose 4B-G₁4223, IgG-binding polypeptides G4223 and G₁4223, group streptococcal polysaccharides.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-62-66