



PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS Fab EM AGAROSE-CM-Asp-Cu(II): EFEITO DO SISTEMA TAMPONANTE E DA FORÇA IÔNICA

C. A. Mourão¹; S. M. A. Bueno¹

1- Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas
Avenida Albert Einstein, 500 – CEP: 13.083-852– Campinas- SP – Brasil
Telefone: (19) 3521-3897 – Email: cecilia_mourao@yahoo.com.br

RESUMO: As imunoglobulinas G (IgG) e seus fragmentos Fab, F(ab)₂ e Fv apresentam aplicações proeminentes nas áreas médicas e farmacêuticas, as quais requerem uma elevada pureza dessas biomoléculas. O elevado custo de obtenção de fragmentos pelas técnicas convencionais justifica a investigação de outras que possam proporcionar a purificação, combinando baixo custo com elevado grau de pureza. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência do ligante CM-Asp-Cu(II) na purificação dos fragmentos Fab de IgG humana policlonal, a partir de uma solução de IgG clivada pela enzima papaína. O efeito do sistema tamponante e do cloreto de sódio foram avaliados. Os resultados indicaram que o quelato CM-Asp-Cu(II) proporcionou a recuperação seletiva dos fragmentos Fab nas frações de lavagem ao se empregar os tampões Tris-HCl e fosfato de sódio contendo sal, evidenciando a potencialidade desse ligante, para purificação de fragmentos Fab por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).

PALAVRAS-CHAVE: fragmentos Fab; IMAC; purificação; imunoglobulina G.

ABSTRACT: Immunoglobulins G (IgG) and their fragments Fab, Fc, F(ab)₂ e Fc` have a wide application in medical and pharmaceutical areas, that need high purity antibody preparation. The high cost of purification process antibody using traditional techniques justify the research for others techniques to obtain this biomolecules with lower cost and high purity. Thereby, the goal of this work is to evaluate the efficiency of CM-Asp-Cu(II) in Fab fragments purification of human IgG from a solution de clevead IgG. Effects of buffers and salt were studied. The results showed that CM-Asp-Cu(II) provided Fab selective recovery in wash fractions when Tris-HCl and sodium phosphate buffers with salt were use. This results showed potential use of CM-Asp-Cu(II) to Fab fragments purification.

KEYWORDS: fragment Fab; IMAC; purification; immunoglobulin G.

1. INTRODUÇÃO

Os fragmentos de imunoglobulinas G (IgG), Fab, scFv e F(ab)₂ são relevantes proteínas obtidas por meio da clivagem enzimática da IgG ou pela tecnologia do DNA recombinante. Tais biomoléculas têm sido estudadas e aplicadas em terapias, diagnósticos

e como biossensores para a caracterização e quantificação biomolecular (Ertuk *et al.*, 2011), nas áreas médicas e farmacêuticas (Elbakri *et al.*, 2010). Essas proteínas apresentam massa molar e tempo de meia-vida inferiores ao da IgG intacta. Tais características acarretam maior facilidade de difusão nos tecidos alvo e menor tempo de



depuração plasmática (Chames, *et al.*, 2009). Em determinadas finalidades, nas quais a presença do fragmento Fc é dispensável ou prejudicial, a utilização de fragmentos Fab é preferível em relação à IgG intacta (Holliger e Hudson, 2005).

Para serem utilizados em aplicações terapêuticas e diagnósticas, IgG e seus fragmentos devem apresentar um elevado grau de pureza. A purificação desses biocompostos é, tradicionalmente, conduzida por meio da cromatografia de afinidade, empregando como ligantes a proteína A ou proteína G (Huse *et al.*, 2002). No entanto, a utilização desses ligantes bioespecíficos apresenta algumas desvantagens, tais como o elevado custo, sua inativação após sucessivos ciclos de purificação, assim como a necessidade de condições drásticas de eluição, podendo, como consequência, desnaturar o anticorpo e desprender o ligante da matriz (Roque *et al.*, 2005; Roque *et al.*, 2007; Ayyar *et al.*, 2012).

Diante dessas desvantagens e da necessidade de se reduzir as etapas e os custos dos processos de recuperação e purificação de bioprodutos, têm sido propostos outras técnicas e substitutos desses ligantes. Uma das alternativas a esses ligantes bioespecíficos são os pseudobioespecíficos, tais como os tiofílicos (Guerrier *et al.*, 2001), peptídeos (Yang *et al.*, 2009) e os íons metálicos imobilizados (Vançan *et al.*, 2002; Todorova-Balvay *et al.*, 2004). Os íons metálicos imobilizados são empregados na técnica denominada de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), a qual tem como princípio a afinidade entre os íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida por determinados resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície de uma biomolécula em solução (Porath, 1975).

Nos estudos explorando a utilização da técnica de IMAC, os metais de transição Cu(II), Ni(II), Zn(II) e Co(II) são normalmente os mais empregados. Uma série de estudos tem demonstrado a potencialidade da utilização desses metais no isolamento, a partir de meios complexos, de biocompostos os quais

apresentam em sua composição resíduos de histidina acessíveis (Chaga *et al.*, 1999; Vançan *et al.*, 2002; Yavuz *et al.*, 2011).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência do adsorvente agarose-CM-Asp-Cu(II) e o efeito dos tampões Hepes, Tris-HCl e fosfato de sódio na ausência e presença de cloreto de sódio na purificação de fragmentos Fab obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG humana policlonal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O gel de agarose (Sephacrose-4B), o ácido 2-[4-(2-hidroxietil) 1-piperazinil] - etanosulfônico (Hepes), o Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), a papaína e o imidazol foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi obtido da Merck (Alemanha). Para a obtenção dos fragmentos foi utilizada a IgG obtida da CSL Behring (Alemanha). Para as análises de eletroforese SDS-PAGE foram utilizados padrão de IgG obtido da CSL Behring (Alemanha) e o marcador de baixa massa molar da GE Healthcare (EUA). Para a análise de *Western Blotting* foram empregados anticorpo de cabra anti-hIgG (Fab específico) e anticorpo de cabra anti-hIgG (Fc específico) conjugados a peroxidase, adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA), o marcador de massa molar pré-corado da GE Healthcare (EUA) e a membrana de nitrocelulose da BioRad (EUA).

2.2. Métodos

2.2.1. Ativação do gel de agarose: O gel de agarose foi ativado com epicloridrina conforme a metodologia descrita por Porath e Olin (1983). O ácido aspártico carboximetilado foi imobilizado de acordo com a metodologia de Mantovaara *et al.* (1991), obtendo-se assim o gel, agarose-CM-Asp.

2.2.2. Obtenção dos fragmentos Fab: Os fragmentos Fab foram obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG humana pela



enzima papaína, de acordo com a metodologia descrita por Ternynck e Avrameas (1987).

2.2.3. Experimentos cromatográficos:

Os experimentos foram conduzidos a 25°C, em uma coluna cromatográfica (20,0 cm × 1,0 cm, Amersham Biosciences, Suécia) empacotada com 3,0 mL de agarose-CM-Asp acoplada a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão (Akta, GE Healthcare, EUA). Todos os experimentos foram realizados a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹, em duplicata. A coluna foi alimentada com solução de sulfato de cobre em água (50 mmol L⁻¹) até a saturação, posteriormente lavada com água e com o tampão de eluição. Em seguida, o gel foi equilibrado com o tampão de adsorção Hepes, Tris-HCl ou fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ou não NaCl 1,0 mol L⁻¹. A eluição foi conduzida com o tampão de adsorção contendo imidazol a 100 mmol L⁻¹. A regeneração da coluna foi realizada com solução de EDTA a 100 mmol L⁻¹, pH 7,0. Durante todo o experimento, foram coletadas frações de 1,0 mL da corrente de saída.

2.2.4. Métodos analíticos:

A concentração de proteína total das frações cromatográficas foi obtida pelo método de

Bradford (1976), com a albumina do soro bovino (BSA) como proteína de referência. As frações com as maiores concentrações de proteína total, de cada etapa, foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras (Laemmli, 1970) e pelo ensaio de *Western blotting* (Towbin *et al.*, 1979).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência do quelato metálico CM-Asp-Cu(II) foi avaliada quanto a recuperação seletiva dos fragmentos Fab a partir de uma solução de IgG digerida (contendo fragmentos Fab, Fc e IgG não clivada), empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCl e fosfato de sódio contendo ou não cloreto de sódio. Com tal finalidade, estimou-se a porcentagem de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas na coluna por meio do método de Bradford, e qualitativamente, a pureza dos fragmentos Fab por meio do perfil eletroforético e do ensaio de *Western blotting*.

O efeito do sistema tamponante e da força iônica na adsorção de proteínas totais está representado na Figura 1.

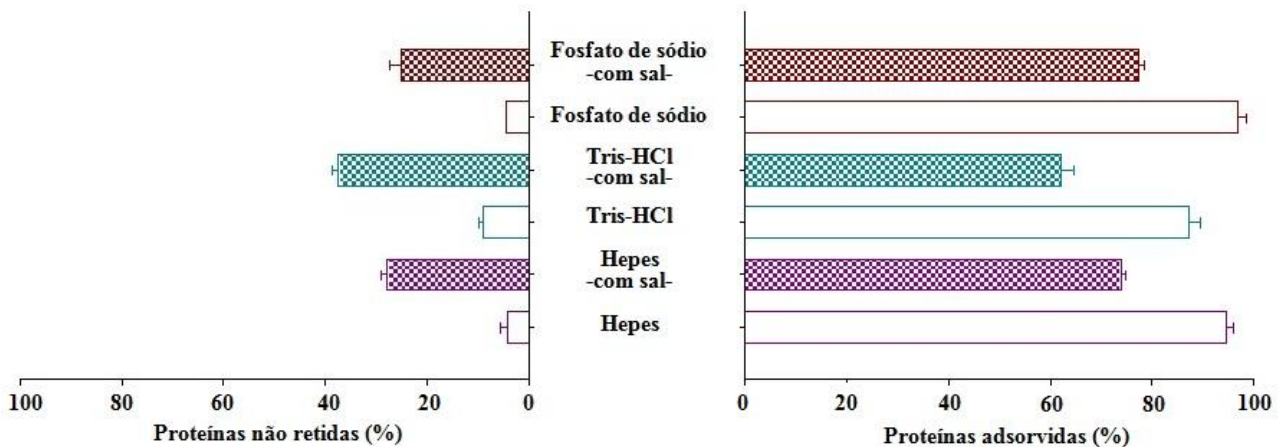


Figura 1. Efeito do sistema tamponante e da força iônica na adsorção de proteínas totais em agarose-CM-Asp-Cu(II).

Observa-se que nas cromatografias realizadas empregando o tampão de adsorção sem cloreto de sódio, a maior parte das proteínas é adsorvida no quelato metálico. No

entanto, a adição de NaCl ao tampão de equilíbrio aumenta a recuperação de proteínas totais nas frações de lavagem. Os resultados obtidos nas cromatografias conduzidas com os

tampões Tris-HCl e fosfato de sódio na presença de cloreto de sódio proporcionaram a recuperação dos fragmentos Fab nas frações de lavagem separados do Fc como indicado nos

perfis eletroforéticos (Figura 2) e na membrana de *Western blot* (Figura 3).

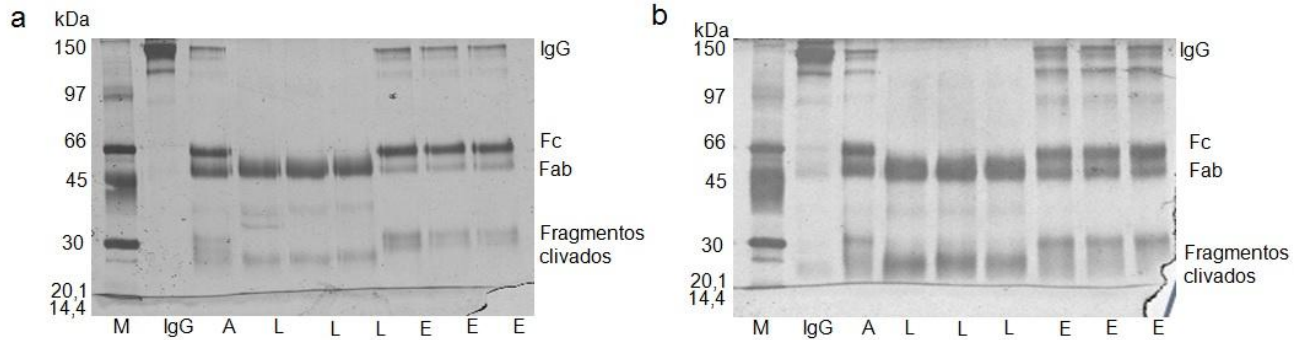


Figura 2. Perfil eletroforético das frações cromatográficas dos experimentos em agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando sistema tamponante (a) Tris-HCl e (b) fosfato de sódio na presença de NaCl. M – Marcador de baixa massa molar; IgG – Marcador de IgG; A – Amostra de injeção. L: Lavagem E: Eluição.

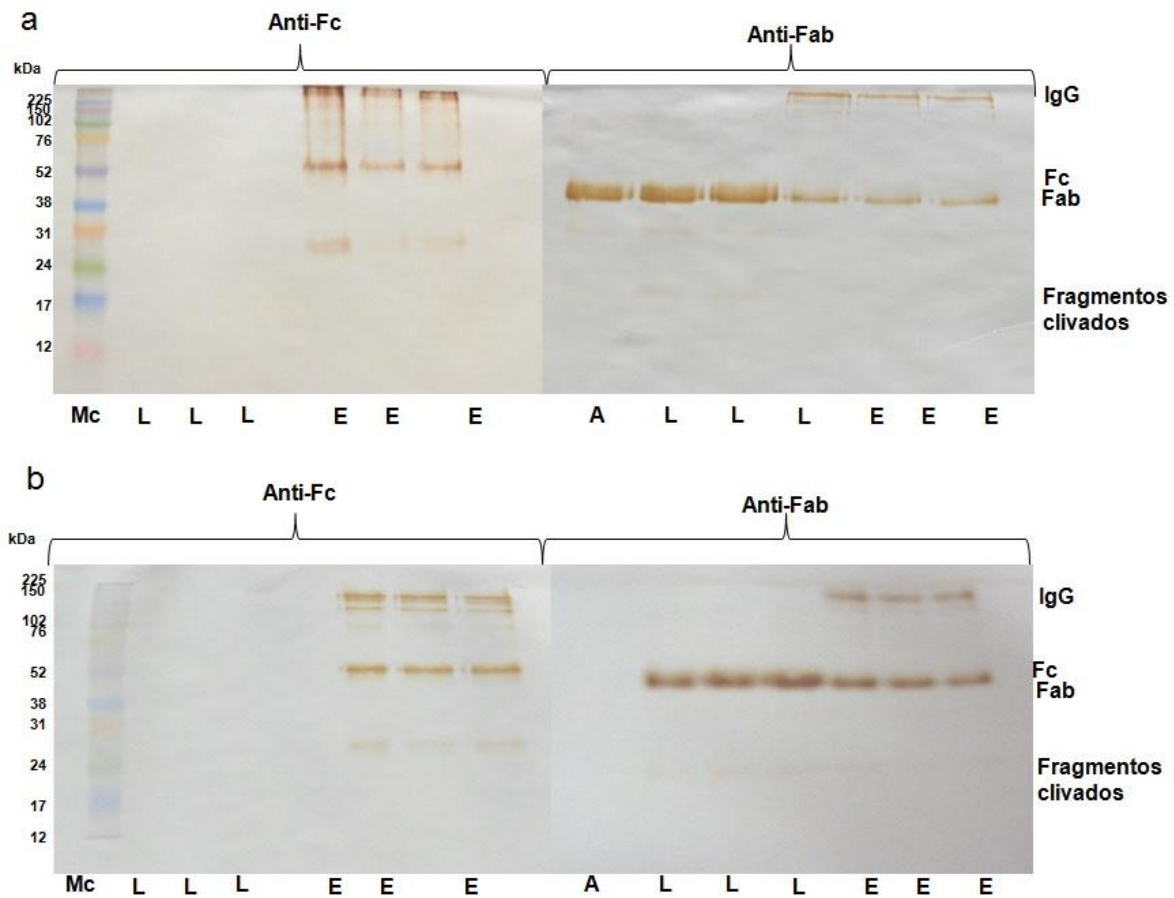
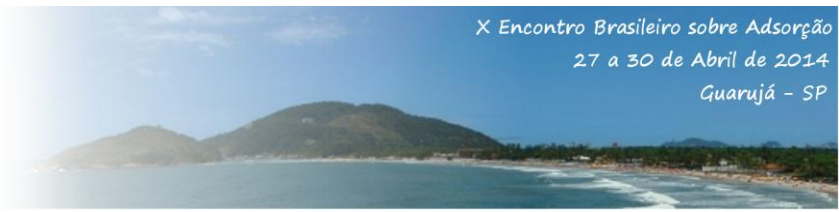


Figura 3. *Western blot* das frações cromatográficas dos experimentos em agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante (a) Tris-HCl e (b) fosfato de sódio na presença de sal M – Marcador de massa molar; IgG – Marcador de IgG; A – Amostra de injeção. L: Lavagem E: Eluição.



Os resultados apresentados nas Figuras 2 e 3 revelaram a adsorção dos fragmentos Fc e da IgG não clivada ao quelato metálico. Esse fato pode estar relacionado às ligações de coordenação entre o cobre quelatado e resíduos de aminoácidos doadores de elétrons presentes na estrutura dos fragmentos Fc e da IgG. De fato, Hale e Beidler (1994) reportaram a presença de uma região rica em histidinas no domínio CH3 de IgG₁ monoclonal. Além disso, Todorova-Balvay *et al.* (2004) demonstraram a presença do cluster de histidina, His 433-X-his 435 no fragmento Fc de IgG humana policlonal. Portanto, é possível que as ligações de coordenação entre o cobre quelatado e o nitrogênio do anel imidazol da histidina dos fragmentos Fc e da IgG contribuíram para a adsorção dessas proteínas aos quelatos metálicos. No entanto, nos experimentos realizados na ausência de sal, a adsorção dos fragmentos Fab, Fc e as IgG pode estar relacionada às interações de caráter eletrostático.

Os resultados dos experimentos cromatográficos também revelam que a adição de cloreto de sódio ao tampão de adsorção acarretou uma menor adsorção dos fragmentos Fab. Esse comportamento pode estar associado a repressão das interações eletrostáticas entre tais proteínas e o ligante, CM-Asp-Cu(II). Segundo Porath *et al.* (1975), em elevadas concentrações de sal associadas a valores de pH em que os resíduos de histidinas estão desprotonados, interações não específicas, tais como as eletrostáticas, são minimizadas.

Comparando os resultados dos experimentos cromatográficos, observa-se que a recuperação seletiva dos fragmentos Fab, assim como, a adsorção de proteína total ao ligante CM-Asp-Cu(II) é dependente do sistema tamponante empregado. O tampão Hepes não possibilitou a recuperação dos fragmentos Fab separados do Fc. No entanto, o emprego do tampão de carga líquida positiva Tris-HCl e o tampão de carga líquida negativa, fosfato de sódio na presença de cloreto de sódio, possibilitaram a recuperação dos fragmentos Fab seletivamente nas frações de

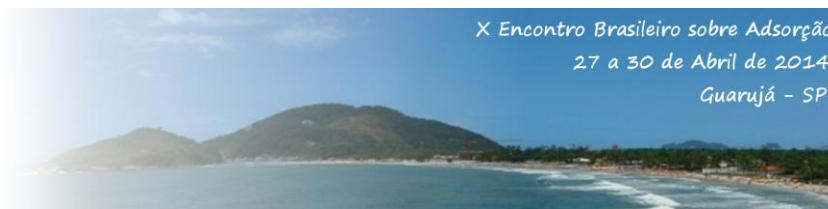
lavagem. Uma possível explicação para tais resultados pode estar relacionada às interações eletrostáticas entre os contra-íons dos tampões Tris-HCl e fosfato de sódio com as proteínas e com o adsorvente, impedindo a interação dos fragmentos Fab com o ligante (Haupt *et al.*, 1995; Bresolin *et al.*, 2009).

4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o quelato metálico CM-Asp-Cu(II) foi eficiente na purificação de fragmentos Fab obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG humana policlonal. Observou-se que a recuperação seletiva dos fragmentos foi influenciada pelo tampão de adsorção e pela presença de cloreto de sódio. As cromatografias realizadas com os tampões Tris-HCl e fosfato de sódio contendo cloreto de sódio possibilitaram a recuperação dos fragmentos Fab nas frações de lavagem separados do Fc e da IgG intacta. Os resultados obtidos revelaram a potencialidade do ligante CM-Asp-Cu(II) na purificação de fragmentos Fab.

5. REFERÊNCIAS

- AYYAR, B.V.; ARORA, S.; MURPHY, C., O'KENNEDY, R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, v. 56, p. 116-129, 2012.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRESOLIN, I.T.L.; BORSOI-RIBEIRO, M.; CARO, J.R.; DOS SANTOS, F.P.; DE CASTRO, M.P.; BUENO, S.M.A. Adsorption of human serum proteins onto TREN-agarose: Purification of human IgG by negative chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 877, p. 17-23, 2009.
- CHAGA, G.; HOPP, J.; NELSON, P. Immobilized metal ion affinity chromatography on Co²⁺



carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 29, p. 19-24, 1999.

CHAMES, P.; VAN REGENMORTEL, M.; WEISS, E.; BATY, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 157, p. 220-233, 2009.

ELBAKRI, A.; NELSON, P.N.; ABU, R.O. The state of antibody therapy. *Hum. Immunol.*, v. 71, p. 1243-1250, 2010.

ERTURK, G.; UZUN, L.; TUMER, M.A.; SAY, R.; DENIZLI, A. Fab fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G detection. *Biosens. Bioelectron.*, v. 28, p. 97-104, 2011.

GUERRIER, L.; FLAYEUX, I.; BOSCHETTI, E. A dual-mode approach to the selective separation of antibodies and their fragments. *J. Chromatogr. B*, v. 755, p. 37-46, 2001.

HALE, J.E.; BEIDLER, D.E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. *Anal. Biochem.*, v. 222, p. 29-33.

HAUPT, K.; BUENO, S.M.A.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Interaction of Human-Immunoglobulin-G with L-Histidine Immobilized onto Poly(Ethylene Vinyl Alcohol) Hollow-Fiber Membranes. *J. Chromatogr. B*, v. 674, p. 13-21, 1995.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.*, v. 23, p. 1126-1136, 2005.

HUSE, K.; BOHME, H.J.; SCHOLZ, G.H. Purification of antibodies by affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, v. 51, p. 217-231, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of

Bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

MANTOVAARA, T.; PERTOFT, H.; PORATH, J. Carboxymethylated aspartic acid agarose, a selective adsorbent for calcium-binding proteins, preliminary studies. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 13, p. 315-322, 1991.

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, v. 258, p. 598-599, 1975.

PORATH, J.; OLIN, B. Immobilized Metal-Ion Affinity Adsorption and Immobilized Metal-Ion Affinity-Chromatography of Biomaterials - Serum-Protein Affinities for Gel-Immobilized Iron and Nickel Ions. *Biochemistry*, v. 22, p. 1621-1630, 1983.

ROQUE, A.C.A.; SILVA, C.S.O.; TAIPA, M.A. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. *J. Chromatogr. A*, v. 1160, p. 44-55, 2007.

ROQUE, A.C.A.; TAIPA, M.A.; LOWE, C.R. An artificial protein L for the purification of immunoglobulins and Fab fragments by affinity chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1064, p. 157-167, 2005.

TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. *Techniques Immunoenzymatiques*. França: INSERM, 1987.

TODOROVA-BALVAY, D.; PITIOT, O.; BOURHIM, M.; SRIKRISHNAN, T.; VIJAYALAKSHMI, M. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *J. Chromatogr. B*, v. 808, p. 57-62, 2004.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *P. Natl. Acad. Sci. Usa*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.



VANÇAN, S.; MIRANDA, E. A. BUENO, S. M. A. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems. *Process Biochem.*, v. 37, p. 573-579, 2002.

YANG, H.; GURGEL, P.V.; CARBONELL, R.G. Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1216, p. 910-918, 2009.

YAVUZ, H.; BERELI, N.; ARMUTCU, C.; YILMAZ, F.; DENIZLI, A. Antibody Purification from Human Plasma by Metal-Chelated Affinity Membranes. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 123, p. 3476-3484, 2012.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, à CAPES/Proex e à FAPESP pelo auxílio financeiro.