

PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS Fab POR IMAC EM AGAROSE-CM-Asp-Co(II)

C. A. MOURÃO¹ e S. M. A. BUENO¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: cecilia_mourao@yahoo.com.br

RESUMO – As imunoglobulinas G (IgG) e seus fragmentos Fab, F(ab)₂ e Fv apresentam aplicações relevantes na área médica e de diagnóstico. O elevado custo de purificação dessas biomoléculas por técnicas de afinidade justifica a investigação de alternativas de baixo custo para a sua purificação. O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia do quelato CM-Asp-Co(II) imobilizado em agarose na purificação dos fragmentos Fab de IgG humana, a partir de uma solução de IgG clivada pela enzima papaína. O efeito do sistema tamponante e do cloreto de sódio foram avaliados. O tampão Hepes na ausência de sal, permitiu obter os fragmentos Fab com pureza superior a 90%. Esse tampão possibilitou a maior recuperação seletiva dos fragmentos, em comparação com o tampão Hepes contendo NaCl e com os tampões, Tris-HCl e fosfato de sódio. Os resultados evidenciaram a potencialidade desse ligante para purificação de fragmentos Fab.

1. INTRODUÇÃO

Os fragmentos Fab, F(ab)₂ e Fv obtidos da clivagem da IgG ou por meio da tecnologia do DNA recombinante, são proteínas que apresentam aplicações relevantes em terapias e diagnósticos. Tais biomoléculas são caracterizadas por possuírem massa molar e tempo de meia-vida inferiores ao da IgG intacta, consequentemente apresentam maior facilidade de penetração nos tecidos alvo e menor tempo de depuração plasmática (Chames *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, vários fragmentos de IgG foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e têm sido empregados em diagnósticos por imagem *in vivo*, nas terapias de doenças degenerativas e cânceres (Hansel *et al.*, 2010). A aplicação dos fragmentos de anticorpos nesses segmentos representa, aproximadamente, 6 bilhões de dólares por ano (Holliger e Hudson, 2005).

Para serem empregados nessas aplicações é requerido um elevado grau de pureza da IgG e de seus fragmentos. Tradicionalmente, a purificação dessas biomoléculas é realizada por meio da técnica de cromatografia de afinidade, empregando como ligantes a proteína A ou a proteína G imobilizadas (Huse *et al.*, 2002). No entanto, esses ligantes apresentam algumas desvantagens, tais como o elevado custo, o risco de desnaturação do anticorpo e de desprendimento do ligante da matriz em decorrência das condições de eluição a baixos valores de pH e o risco da inativação do ligante após sucessivos ciclos de purificação (Ayyar *et al.*, 2012). Diante desses inconvenientes, estudos têm sido desenvolvidos visando o emprego de técnicas alternativas à cromatografia de afinidade (Coleman e Mahler, 2003; Yu e Ghosh, 2010) ou de ligantes substitutos das proteínas A e G (Khoury e Lowe,

2013).

Uma alternativa às proteínas A e G são os íons metálicos imobilizados, empregados na técnica denominada de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). A técnica IMAC, introduzida por Porath e colaboradores (1975), tem como princípio a afinidade entre íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida por determinados resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície de uma biomolécula em solução (Porath, 1975). Em comparação à cromatografia de afinidade empregando as proteínas A e G como ligantes, essa técnica apresenta as vantagens de apresentar um menor custo, de possibilitar várias regenerações da coluna sem que suas propriedades sejam alteradas e de permitir a eluição da biomolécula adsorvida em condições mais brandas (Porath, 1992). Alguns estudos tem demonstrado a eficácia da técnica IMAC na purificação de fragmentos de IgG naturais e recombinantes (Xiang *et al.*, 2002; Todorova-Balvay *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência do adsorvente agarose-CM-Asp-Co(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 humana adquirida da CSL Behring (Alemanha). Para as análises de eletroforese SDS-PAGE foram utilizados padrão de IgG humana 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). Para o ensaio de imunodifusão radial foi empregado fragmento Fab de IgG humana com 99% de pureza da Merck (Alemanha). Os demais reagentes foram de grau analítico. Utilizou-se água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) para preparação de todas as soluções.

2.2. Métodos

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

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).

Experimentos cromatográficos: Os experimentos foram conduzidos a 25°C, em uma coluna cromatográfica (20 cm × 1,0 cm, GE Healthcare, EUA) empacotada com 3,0 mL de agarose-CM-Asp acoplada a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão (Äkta, 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 cobalto 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, todos a 25 mmol L⁻¹ na ausência e presença de 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.

Métodos analíticos: A concentração de proteína total das frações cromatográficas foi quantificada 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). O equipamento PhastSystem (Pharmacia, Suécia) e os géis gradientes de pH 3-9 (GE Healthcare, EUA) foram usados para a determinação do ponto isoelétrico dos fragmentos Fab e Fc. A quantificação dos fragmentos Fab obtidos nas condições experimentais que possibilitaram a recuperação desses separados dos fragmentos Fc foi conduzida por imunodifusão radial simples (RID), segundo a metodologia de Lu e Miller (1996).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência do quelato metálico CM-Asp-Co(II) foi avaliada quanto a recuperação seletiva dos fragmentos Fab a partir de uma solução de IgG clivada (contendo fragmentos Fab, Fc e IgG não clivada), empregando os tampões Hepes, Tris-HCl e fosfato de sódio na ausência ou na presença de cloreto de sódio. Com tal finalidade, estimou-se a porcentagem de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas no quelato metálico por meio do método de Bradford (Figura 1), e qualitativamente, a pureza dos fragmentos Fab por meio do perfil eletroforético (Figura 2) e do ensaio de *Western blot* (Figura 3).

Observa-se que a presença de NaCl no tampão de adsorção acarretou a recuperação de praticamente todas as proteínas nas frações não retidas na coluna (Figura 1). Em condições cromatográficas com elevadas concentrações de sal (geralmente 1,0 mol/L de NaCl), associadas a valores de pH em que os resíduos de histidina estejam desprotonados (pKa ~6,5), ligações de coordenação predominam na adsorção das proteínas no quelato metálico (Porath *et al.*, 1975). Para que ocorra ligações de coordenação entre uma proteína e o íon metálico cobalto quelatado ao IDA, em tampões contendo NaCl, é necessário a presença de dois resíduos de histidinas (situadas em uma α -hélice e entre dois ou três aminoácidos) na superfície da proteína (Sulkowski, 1989). Portanto, a não adsorção das proteínas no quelato metálico CM-Asp-Co(II), na presença de NaCl, pode indicar que a

IgG e os fragmentos Fab e Fc não apresentem em sua estrutura dois resíduos de histidinas situados em uma α -hélice ou entre dois ou três aminoácidos.

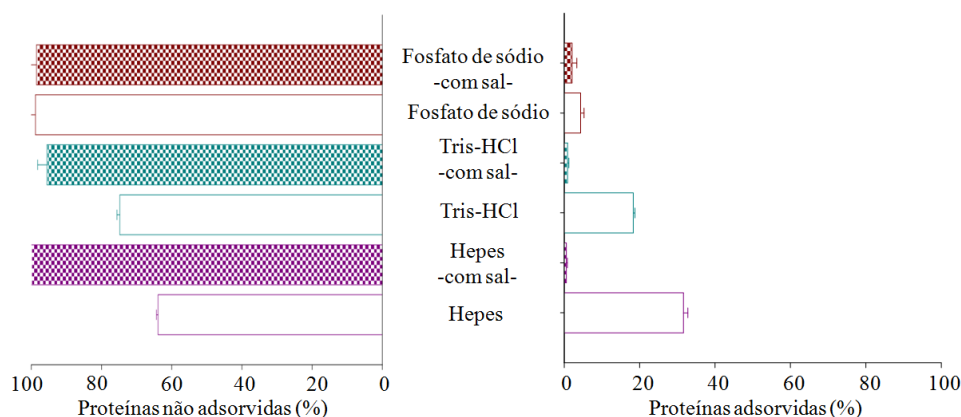


Figura 1 - Porcentagem de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas das cromatografias em agarose-CM-Asp-Co(II) empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCl e fosfato de sódio na ausência e presença de cloreto de sódio.

Os resultados obtidos nas cromatografias conduzidas com os tampões Hepes e Tris-HCl, na ausência de NaCl, revelam a recuperação dos fragmentos Fab nas frações de eluição separados do Fc como indicado nos perfis eletroforéticos (Figura 2) e confirmado, por meio da detecção imunológica, no ensaio de *Western blot* (Figura 3). Resultados da determinação do ponto isoelétrico (pI) dos fragmentos revelaram que os fragmentos Fab adsorvidos no ligante CM-Asp-Co(II) são caracterizados por um pI na faixa de 8,0 a 9,3, enquanto os Fc possuem pI na faixa de 6,0 a 6,9. Portanto, no valor de pH em que os experimentos foram conduzidos, pH 7,5, os fragmentos Fab adsorvidos no quelato CM-Asp-Co(II) apresentam carga líquida positiva, enquanto os fragmento Fc apresentam carga líquida negativa. Desse modo, a adsorção dos fragmentos Fab no quelato metálico e a recuperação dos fragmentos Fc nas frações de lavagem poderiam ser atribuídas às possíveis interações eletrostáticas entre os fragmentos Fab e o CM-Asp-Co(II) e à repulsão eletrostática entre os fragmentos Fc e esse quelato metálico. A hipótese de que interações eletrostáticas estejam envolvidas na adsorção dos fragmentos Fab e da IgG não clivada no ligante CM-Asp-Co(II) pode ser ratificada pelo fato de em condições cromatográficas caracterizadas por uma baixa força iônica, o quelato metálico exibir um comportamento característico de trocadores de íons (Zachariou e Hearn, 2000). Além disso, os experimentos conduzidos na presença de cloreto de sódio não favoreceram a adsorção dos fragmentos Fab.

Nas cromatografias conduzidas com os tampões Tris-HCl e fosfato de sódio, na ausência de NaCl, houve menor adsorção de proteína total em comparação com as cromatografias conduzidas com Hepes. Esse comportamento pode estar relacionado com as possíveis interações eletrostáticas entre o grupamento NH_3^+ do tampão Tris com o quelato metálico, dificultando a adsorção das proteínas. Para o tampão fosfato, é possível que interações eletrostáticas entre o oxigênio desprotonado do fosfato com a proteína dificultaram a adsorção das proteínas no quelato metálico.

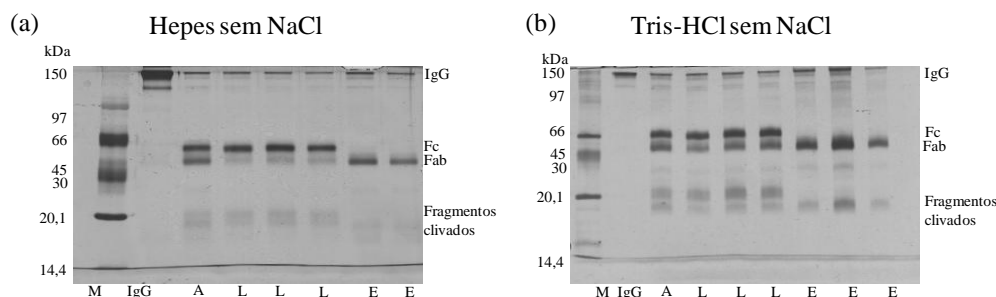


Figura 2 - Perfil eletroforético das frações das cromatografias em agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes (a) e Tris-HCl (b) pH 7,5, na ausência de cloreto de sódio. M – marcador de baixa massa molecular; IgG – marcador de IgG; A – solução de injeção. L: frações de lavagem; E: frações de eluição.

Nas cromatografias conduzidas com o tampão de adsorção Hepes, na ausência de NaCl, 27% das proteínas totais foram recuperadas na eluição e os fragmentos Fab foram obtidos separados do Fc. Desse modo, para essa condição cromatográfica, as frações das etapas de lavagem, eluição e regeneração (agrupadas em “pools”) e a solução de injeção foram submetidas à análise de RID para a determinação da pureza e do fator de purificação (Tabela 1). Os resultados obtidos por RID indicam que os fragmentos Fab foram recuperados nas frações de eluição com valor de pureza de 91%.

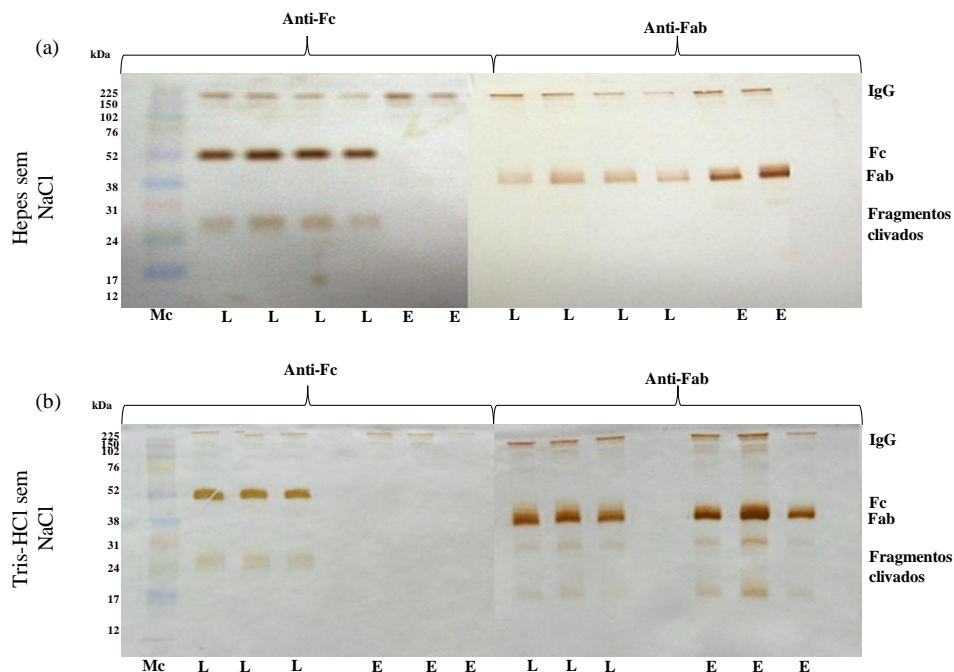


Figura 3 - Perfil do *Western blot* das frações das cromatografias em agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes (a) e Tris-HCl (b) pH 7,5, na ausência de cloreto de sódio. Mc – marcador de massa molar pré-corado; L: frações de lavagem; E: frações de eluição.

Tabela 1 – Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes 25 mmol L⁻¹, pH 7,5; eluição: Hepes 25 mmol L⁻¹, contendo 100,0 mmol L⁻¹ de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol L⁻¹, pH 7,0

Fração	Bradford		RID			
	Massa (mg) ^a	% ^b	Massa (mg) ^c	% ^d	Pureza (%) ^e	FP ^f
Injeção	3,70 ± 0,07	100,0	2,0 ± 0,0	100,0	54	1,0
“pool” Lavagem	2,94 ± 0,09	79,5	1,3 ± 0,0	67,0	46	0,8
“pool” Eluição	0,68 ± 0,05	18,4	0,6 ± 0,0	31,0	91	1,7
“pool” Regeneração	0,09 ± 0,01	2,4	0,0			
Recuperação (%)	100,3 ± 4,1		97,9 ± 1,4			

^a Massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG humana como proteína de referência

^b Massa de proteína total em cada etapa dividida pela massa de proteína na injeção x 100

^c Massa de fragmentos Fab e de IgG estimada por RID

^d Massa de fragmentos Fab e de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos Fab e de IgG na injeção x 100

^e Pureza: massa de fragmentos Fab e de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

^f Fator de purificação: pureza dividida pela pureza da solução de injeção

Com a finalidade de verificar se a adsorção seletiva dos fragmentos Fab ocorre em outros agentes quelantes tetradentados quelatados ao íon metálico cobalto, realizou-se experimentos cromatográficos com os adsorventes agarose-TREN-Co(II) e agarose-NTA-Co(II), empregando a condição que possibilitou a maior recuperação de fragmentos Fab nas frações de eluição: tampão de adsorção Hepes na ausência de NaCl. Os perfis eletroforéticos (Figura 4) indicam que com quelato TREN-Co(II) houve a recuperação dos fragmentos Fab, separados do Fc, na etapa de lavagem, enquanto o NTA-Co(II), apenas, na etapa de regeneração. O CM-Asp-Co(II), assim como o NTA-Co(II), adsorvem o fragmento Fab. Esse fato pode estar relacionado à semelhança entre as estruturas químicas desses agentes quelantes, uma vez que o CM-Asp e o NTA apresentam um átomo de nitrogênio e três átomos de oxigênio que participam da coordenação com o íon metálico (Gaberc-Porekar e Menart, 2001).

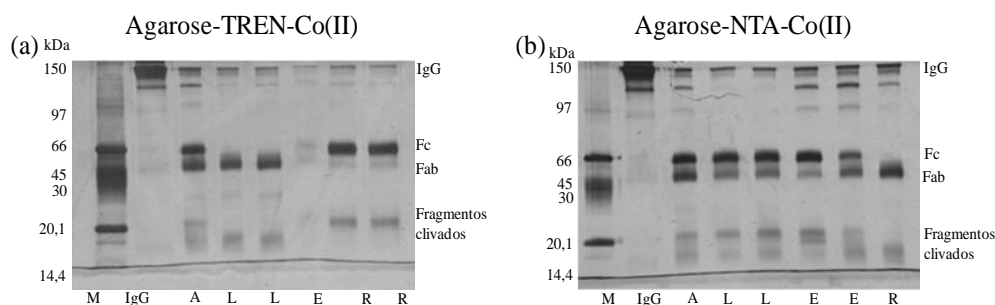


Figura 4 - Perfil eletroforético das frações cromatográficas dos experimentos em (a) agarose-TREN-Co(II) e (b) agarose-NTA-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes na ausência de sal M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Amostra de injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração.

4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o quelato metálico CM-Asp-Co(II) foi eficaz na purificação de fragmentos Fab obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG humana policlonal. Observou-se que a recuperação dos fragmentos nas frações de eluição, assim como a seletividade, foram influenciadas pelo tampão de adsorção e pela presença ou ausência de cloreto de sódio no tampão de adsorção. Na cromatografia realizada com o tampão Hepes na ausência de NaCl houve a maior recuperação dos fragmentos Fab nas frações de eluição com um grau de pureza superior a 90%, porém contendo a IgG não clivada. Os resultados obtidos revelaram a potencialidade do ligante CM-Asp-Co(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 quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHAMES, P.; VAN REGENMORTEL, M.; WEISS, E.; BATY, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.*, v. 157, p. 220-233, 2009.
- COLEMAN, L.; MAHLER, S. M. Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis. *Protein Expres. Purif.*, v. 32, p. 246-251, 2003.
- GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J. Biochem. Bioph. Methods*, v. 49, p. 335-360, 2001.
- HANSEL, T. T.; KROPSHOFER, H.; SINGER, T.; MITCHELL, J. A.; GEORGE, A. J. T. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discovery*, v. 9, p. 325-338, 2010.
- 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. Bioph. Methods*, v. 51, p. 217-231, 2002.
- KHOURY G. E.; LOWE C. R. A biomimetic Protein G affinity adsorbent: an Ugi ligand for immunoglobulins and Fab fragments based on the third IgG-binding domain of Protein G. *J. Mol. Recognit.*, v. 26, p. 190-200, 2013.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LU, X. S.; MILLER, C. J. Concentration of IgG in the sera of normal *Rhesus macaques* as determined by a species-specific radial immunodiffusion assay. *J. Immunol. Methods*, v. 197, p. 193-196, 1996.

- 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. Immobilized Metal-Ion Affinity-Chromatography. *Protein. Expres. Purif.*, v. 3, p. 263-281, 1992.
- 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.
- 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.
- TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. *Techniques Immunoenzymatiques*. Paris: Editora 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.; STAEBELI, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- XIANG, H.; WYNN, R.; NGUYEN, L. T.; ROSS, O. H.; AHRENS, D. P.; O'NEIL, K. T.; HOLLIS, G. F.; PATRICK, D. R. Immobilized metal-ion affinity chromatography of recombinant Fab protein OPG C11 in the presence of EDTA-Mg(II). *J. Chromatogr. A*, v. 978, p. 153-164, 2002.
- YU, D. Q.; GHOSH, R. Membrane bioreactor separator system for integrated IgG fragmentation and Fab purification. *J. Immunol. Methods*, v. 359, p. 37-41, 2010.
- ZACHARIOU, M.; HEARN, M. T. W. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilised hard Lewis metal ion-chelate adsorbents. *J. Chromatogr. A*, v. 890, p. 95-116, 2000.
- ZHAO, Y. H.; GUTSHALL, L.; JIANG, H. Y.; BAKER, A.; BEIL, E.; OBMOLOVA, G.; CARTON, J.; TAUDTE, S.; AMEGADZIE, B. Two routes for production and purification of Fab fragments in biopharmaceutical discovery research: Papain digestion of mAb and transient expression in mammalian cells. *Protein Expres. Purif.*, v. 67, p. 182-189, 2009.