

## **CROMATOGRAFIA NEGATIVA EM AMINOHEXIL- AGAROSE: SEPARAÇÃO DE FRAGMENTOS Fab HUMANO**

G. P. CARMIGNOTTO<sup>1</sup> e S. M. A. BUENO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química  
E- mail para contato: bi.gabrielapc@gmail.com

**RESUMO** – Os fragmentos de imunoglobulina G são moléculas empregadas em testes diagnósticos e terapias. Usualmente são purificados por cromatografia de afinidade em proteínas A ou G imobilizadas em matrizes sólidas. No entanto, esses ligantes apresentam algumas desvantagens, sendo a principal delas o alto custo. Como ligantes alternativos de baixo custo, têm sido propostos o emprego de diaminas imobilizadas. Neste trabalho foi avaliada a separação de fragmento Fab humano por cromatografia negativa (proteína alvo obtida na fração não-retida) em aminohexil-agarose, em diferentes sistemas tamponantes, na faixa de pH 6,0 a 8,5. A seletividade do adsorvente foi avaliada por eletroforese SDS-PAGE e *Western blot*. Os resultados mostraram que a adsorção de proteínas na coluna ocorre entre os valores de pH de 7,0 a 8,5, tendo obtido fragmentos Fab separados dos fragmentos Fc na fração não-retida em tampão Tris-HCl pH 8,5.

### **1. INTRODUÇÃO**

Os fragmentos Fab de imunoglobulinas G (IgG) vêm sendo empregados em diagnósticos e aplicações terapêuticas. Por apresentarem tamanho reduzido, o uso dos fragmentos em algumas aplicações é preferível em relação à IgG intacta, pois possibilitam maior poder de penetração e maior velocidade de circulação. Além disso, o uso desses fragmentos previne possíveis reações adversas relativas à função efetora da porção Fc da imunoglobulina (Yu e Ghosh, 2009; Roque *et al.*, 2005; Rothlinberger *et al.*, 2005; Ljunglof *et al.*, 2007; Elbakri *et al.*, 2010; Hollister e Hudson, 2005). Os fragmentos Fab são obtidos a partir da clivagem enzimática da IgG pela papaína ou por tecnologia do DNA recombinante (Hollister e Hudson, 2005; Cheung *et al.*, 2003).

A purificação dos fragmentos Fab é realizada principalmente por técnicas de cromatografia de afinidade em proteína A ou proteína G imobilizadas. Entretanto, esses ligantes possuem alto custo e podem sofrer degradação ou ocorrer seu desprendimento da matriz cromatográfica, resultando em contaminação do produto. Como alternativa a esses ligantes têm sido propostos ligantes de menor custo e que apresentem alta estabilidade,

capacidade, simplicidade e seletividade (Bresolin *et al.*, 2009; Ljunglof *et al.*, 2007; Roque *et al.*, 2005; Willems *et al.*, 2003).

Como uma alternativa, neste trabalho é proposto como ligante a diamina aminohexil imobilizada em agarose para a purificação de fragmentos Fab por cromatografia negativa. A cromatografia negativa consiste na recuperação do produto nas frações não retidas da cromatografia, sendo retidas no adsorvente as impurezas (Bresolin *et al.*, 2009).

Devido a sua estrutura, as diaminas apresentam carga positiva em ampla faixa de valores de pH, possibilitando a interação eletrostática com moléculas negativas. No entanto, dependendo do tamanho de sua cadeia carbônica e do braço espaçador utilizado, as interações hidrofóbicas entre a molécula alvo e o ligante não podem ser excluídas (Houen *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2010).

Neste trabalho foi avaliada a separação de fragmento Fab humano por cromatografia negativa em aminohexil (1,6 diaminoxexano)-agarose (epóxi-ativada), em diferentes sistemas tamponantes, na faixa de valores de pH 6,0 a 8,5. A seletividade do adsorvente foi avaliada por eletroforese SDS-PAGE e *Western blot*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

O gel  $\omega$ -aminohexil-Sepharose 4B (“epoxy activated”) foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). A IgG humana foi adquirido da CSL Behring (Alemanha). Anticorpo de cabra anti-Fab específico conjugado com peroxidase, anticorpo de cabra anti-Fc específico conjugado com peroxidase, a papaína, a L-cisteína, a iodoacetamida, o Comassie brilliant blue R-250, o Hepes (ácido 2-[4-(2-hidroxietil) 1-piperazinil]-etanosulfônico), o Bis-Tris e o Tris (hidroximetil) amino metano foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O fosfato de sódio monobásico e dibásico foram obtidos da Merck (Alemanha). Marcador de baixa massa molar para eletroforese, membrana de nitrocelulose e marcador de massa molar pré-corado para *Western blot* foram adquiridos da GE Healthcare (EUA). Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico. Utilizou-se água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) para preparação de todas as soluções.

### **2.2. Métodos**

Obtenção dos fragmentos Fab: Os fragmentos Fab e Fc foram obtidos pela clivagem enzimática da IgG humana pela ação da papaína, de acordo com Ternynck e Avrameas, (1987). Após a fragmentação, a solução tampão da amostra contendo os fragmentos foi

trocada em coluna PD-10 Sephadex G 25, de acordo com protocolo fornecido pela GE Healthcare (EUA).

Experimentos cromatográficos: Os experimentos foram realizados em sistema de cromatografia de fase líquida de baixa pressão (Bio-Rad, EUA), em temperatura ambiente, na vazão de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , em duplicatas. O volume do leito ( $\omega$ -aminohexil-agarose) foi de 1,5 mL (colunas de 1 cm de diâmetro por 10 cm de altura, GE Healthcare, EUA). A coluna foi equilibrada com tampão de adsorção (tampões Tris-HCl, Hepes, fosfato de sódio e Bis-Tris, todos a  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , na faixa de pH de 6,0 a 8,5). A coluna foi alimentada com 1,0 mL de solução de fragmentos de IgG clivada, na concentração de  $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . A eluição foi conduzida com o tampão de adsorção contendo  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl e a regeneração com solução de NaOH  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ . Durante toda a cromatografia, frações de 1,0 mL foram coletadas da corrente de saída.

Métodos analíticos: A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com método proposto por Bradford (1976). A seletividade do adsorvente foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições não redutoras (SDS-PAGE), utilizando-se as frações cromatográficas com maior concentração de fragmentos. O teste imunoenzimático *Western blot* foi utilizado para identificar os fragmentos presentes nas frações de maior concentração (Towbin *et al.*, 1979).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A separação dos fragmentos Fab em  $\omega$ -aminohexil-Sepharose foi avaliada quanto a recuperação seletiva dos fragmentos Fab a partir da solução de clivagem enzimática de IgG humana. Os ensaios cromatográficos foram realizados em tampões Hepes, Tris-HCl, fosfato de sódio e Bis-Tris, em valores de pH na faixa de 6,0 a 8,5, de acordo com a faixa tamponante de cada tampão. Como os fragmentos Fc possuem pI de 5,5 a 6,7, e os fragmentos Fab, pI de 6,0 a 9,3, espera-se que na faixa de pH utilizado, a maior proporção dos fragmentos Fc apresente carga líquida negativa, sendo adsorvidos por meio de interações eletrostáticas com o grupamento amino primário do aminohexil, enquanto os fragmentos Fab sejam recuperados nas frações não retidas. (Mourão, 2014).

Observa-se maior adsorção de proteínas no adsorvente na faixa de valores de pH 7,0 a 8,5 (Figura 1). O efeito do pH das soluções tamponantes na capacidade de adsorção das impurezas está relacionada à interação de cargas entre proteínas, o gel e o tampão e os efeitos hidrofóbicos.

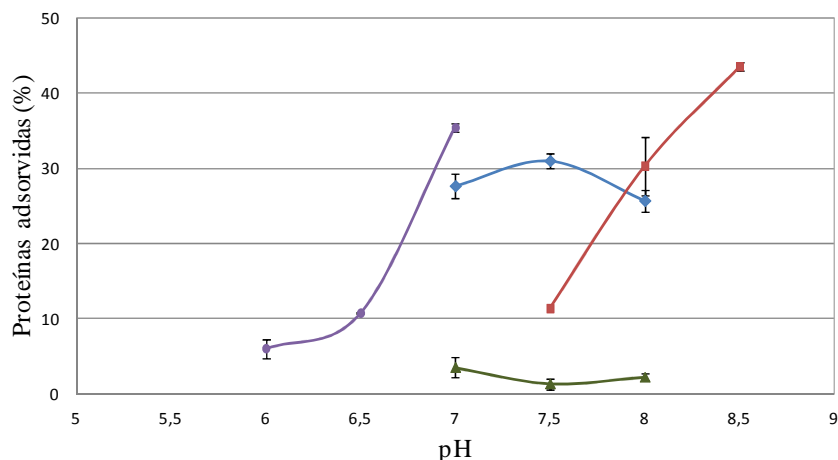


Figura 1- Efeito do pH e dos sistemas tamponantes Hepes (—●—), Tris-HCl (—■—), fosfato de sódio (—▲—) e Bis-Tris (—◆—) na adsorção de proteínas totais em  $\omega$ -aminohexil-Sepharose.

As Figuras 2, 3 e 4 indicam o perfil eletroforético e *Western blot* dos experimentos que apresentaram maior porcentagem de proteínas totais adsorvidas (Hepes a pH 7,0, 7,5 e 8,0, Tris-HCl a pH 8,0 e 8,5, e Bis-Tris a pH 7,0).

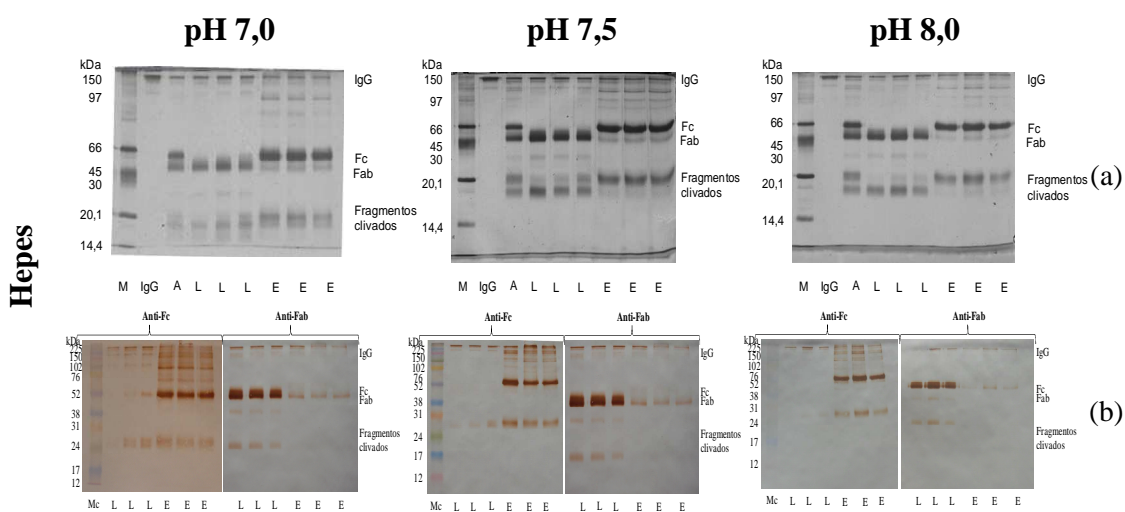


Figura 2- Perfil eletroforético e *Western blot* da separação de fragmentos Fab de IgG humana em  $\omega$ -aminohexil-Sepharose em Hepes. (a) Perfil eletroforético. M: Marcador de baixa massa molecular. IgG: Marcador de IgG. A: Amostra de injeção. L: Frações de lavagem. E: Frações de eluição. (b) *Western blot*: Mc: Marcador pré-corado. L: Frações de lavagem. E: Frações de eluição.

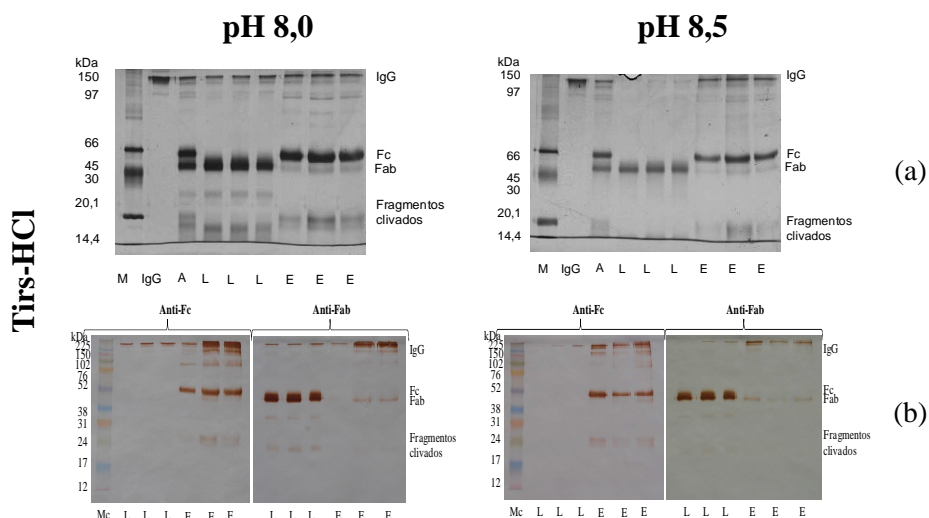


Figura 3- Perfil eletroforético e *Western blot* da separação de fragmentos Fab de IgG humana em  $\omega$ -aminohexil-Sepharose em Tris-HCl. (a) Perfil eletroforético. M: Marcador de baixa massa molecular. IgG: Marcador de IgG. A: Amostra de injeção. L: Frações de lavagem. E: Frações de eluição. (b) *Western blot*: Mc: Marcador pré-corado. L: Frações de lavagem. E: Frações de eluição.

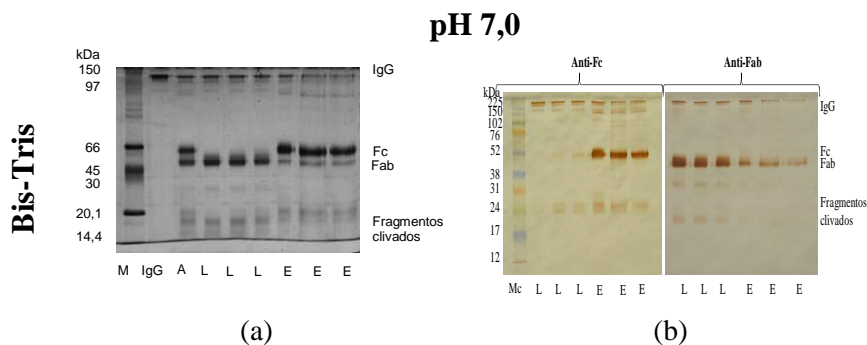


Figura 4- Perfil eletroforético e *Western blot* da separação de fragmentos Fab de IgG humana em  $\omega$ -aminohexil-Sepharose em Bis-Tris. (a) Perfil eletroforético. M: Marcador de baixa massa molecular. IgG: Marcador de IgG. A: Amostra de injeção. L: Frações de lavagem. E: Frações de eluição. (b) *Western blot*: Mc: Marcador pré-corado. L: Frações de lavagem. E: Frações de eluição.

A recuperação seletiva dos fragmentos Fab nas frações não retidas foram observadas nos tampões Hepes a pH 7,5 e 8,0, e Tris-HCl a pH 8,0 e 8,5.

O tampão Tris-HCl apresenta carga positiva em pH abaixo de seu pKa, e não apresenta carga em pH acima de seu pKa. Em pH 8,5, o tampão apresenta-se sem carga, não

interferindo na adsorção dos fragmentos Fc. Em pH 7,5, o tampão carregado positivamente pode interagir com os fragmentos Fc negativamente carregados, mascarando os sítios dos fragmentos que seriam adsorvidos na coluna.

Os resultados para o tampão Bis-Tris mostraram que a separação não foi possível na faixa tamponante deste tampão. Embora o tampão Bis-Tris tenha comportamento semelhante ao tampão Tris-HCl quanto à carga, sendo positivo abaixo de seu pKa e neutro acima, o valor de pH 7,0 (acima do pKa do Bis-Tris) é próximo ao valor do pI dos fragmentos Fc, podendo haver fragmentos que não estejam negativos, sendo recolhidos nas frações de lavagem.

O tampão fosfato de sódio não favoreceu a adsorção das proteínas na coluna. O fosfato de sódio possui pKa muito baixo, apresentando carga negativa em sua estrutura nos valores de pH utilizados nas cromatografias. É possível que o ânion fosfato interaja com o aminohexil, dificultando a adsorção dos fragmentos Fc.

O tampão Hepes é um tampão zwitteriônico, apresentando duas cargas de sinais opostos em valores de pH abaixo de seu pKa. Assim, em pH 7,0 e 7,5, o Hepes não promove nem impede a adsorção dos fragmentos Fc. Em valores de pH maiores que seu pKa, o tampão apresenta-se carregado negativamente. Essa carga faz com que o tampão interaja com o adsorvente, diminuindo a capacidade de adsorção e aumentando a seletividade (Figuras 1 e 2, respectivamente). Foi possível separar os fragmentos Fab em tampão Hepes, quando carregado negativamente, pois provavelmente o grupamento  $\text{SO}_3^-$  presente em sua estrutura não apresente grande afinidade com o adsorvente, contrário ao que ocorre com o ânion fosfato.

A separação dos fragmentos Fab foi possível, em algumas condições, devido principalmente às interações eletrostáticas entre os fragmentos Fc carregados negativamente em pHs maiores que seus pontos isoelétricos e a matriz carregada positivamente, além das interações presentes entre os tampões estudados e o adsorvente e as proteínas. Em Tris-HCl a pH 8,5 obteve-se ausência de bandas de fragmentos Fc e com fracas bandas de IgG intacta nas frações não retidas, além de alta capacidade de adsorção da coluna.

## 4. CONCLUSÃO

O uso da diamina aminohexil imobilizada em agarose (epóxi-ativada), possibilitou a separação dos fragmentos Fab dos fragmentos Fc e IgG humana não clivada. A condição com maior grau de pureza nas frações não retidas foi tampão Tris-HCl 25 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,5.

## 5. REFERÊNCIAS

- 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.; 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.
- CHEUNG, G.L.M.; THOMAS, T.M.; RYLATT, D.B. Purification of antibody Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments using Gradiflow technology. *Protein Expres. Purif.*, v. 32, p. 135-140, 2003.
- ELBAKRI, A.; NELSON, P.N.; ODEH, R.O.A. The state of antibody therapy. *Hum. Immunol.*, v. 71, p. 1243-1250, 2010.
- HOLLIGER, P.; HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise for single domains. *Nat. Biotechnol.*, v. 23, p. 1126-1136, 2005.
- HOUEN, G. Aminoalkyl affinity matrices. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 49, p. 189-197, 2001.
- LJUNGLÖF, A.; LACKI, K.M.; MUELLER, J.; HARINARAYAN, C.; van REIS, R.; FAHENER, R.; ALSTINE, J.M.V. Ion exchange chromatography of antibody fragments. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 96, no. 3, 2007.
- MOURÃO, Cecília Alves. Purificação de fragmentos Fab humano em níquel, cobre, cobalto e zinco quelatados ao CM-Asp. 100 f. (Dissertação de mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, a ser defendida em 29/05/2014.
- 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.
- RÖTHLISBERGER, D.; HONNEGGER, A.; PLUNCKTHUN, A. Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J. Mol. Biol.*, v. 347, p. 773-789, 2005.
- SOUZA, M.C.M.; BRESOLIN, I.T.L.; BUENO, S.M.A. Purification of human IgG by negative chromatography on  $\omega$ -aminohexyl-agarose. *J. Chromatogr. B*, v. 878, p. 557-566, 2010.



- TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. *Techniques immune-enzymatiques. Techniques en immunologie*. Editora Les Editions Inserm, Société Française d'Immunologie, 1987.
- TOWBIN, H.; STAEBELI, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- WILLEMS, A.; LEOEN, J.; SCHOONOOGHE, S.; GROOTEN, J.; MERTENS, N. Optimizing expression and purification from cell culture medium of trispecific recombinant antibody derivatives. *J. Chromatogr. B*, v. 786, p. 161-176, 2003.
- YU, D.; GHOSH, R. Integrated fragmentation of human IgG and purification of Fab using a reactant adsorptive membrane bioreactor separator system. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 104, no. 1, 2009.