

ВИКОРИСТАННЯ СТАФІЛОКОКОВОГО ПРОТЕЇНУ А В АФІННІЙ ХРОМАТОГРАФІЇ ТА ІМУНОСОРБЦІЇ

О.В. СВЯТЕНКО¹, О.А. ВАСИЛЬЧЕНКО¹, К.К. ВАСИЛЬЧЕНКО²

¹Національний авіаційний університет, м. Київ

²Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

Протеїн А – це нативний та рекомбінантний протеїн бактеріального походження, що зв'язується з імуноглобулінами ссавців. У роботі наведено характеристику протеїну А, афінних сорбентів на його основі, переваги використання цього протеїну як ліганду в афінній хроматографії для очищення антитіл, виділення різних фракцій антитіл з сироватки крові, антитіл та імунних комплексів з плазми крові хворих людей в процесі імуносорбції.

Ключові слова: афінна хроматографія, стафілококовий протеїн А (SPA), антитіла, імуноглобуліни.

Вступ. Афінна хроматографія – це тип адсорбційної хроматографії, який оснований на винятковій здатності біологічно активних сполук специфічно та зворотно зв'язуватися з комплементарними сполуками, які називаються лігандами. Прикладами афінних комплексів можуть бути пари: антитіла з антигенами або гаптенами, ферменти з їхніми інгібіторами або субстратами, кофакторами чи ефекторами. Афінна хроматографія має наступні переваги перед іншими типами хроматографії: швидкий процес очищення, можливість застосування різних елюючих агентів для одержання високоочищених фракцій макромолекул, значне концентрування зразка [1]. Так як афінна хроматографія дозволяє швидко отримувати високоочищені фракції протеїнів, вона

використовується для очищення антитіл. Адже рівень чистоти антитіл має надзвичайно важливе значення для їхнього застосування в медичній біотехнології для лікування різних хвороб та для фундаментальних досліджень. Більше того, афінна хроматографія широко використовується для одержання очищених фракцій антитіл з культуральних та асцитних рідин, сироватки крові, а також для імуносорбції аутоантитіл та імунних комплексів з плазми крові хворих людей [2; 3].

SPA є ефективним лігандом при використанні в афінній хроматографії завдяки тому, що кожний з його п'яти доменів здатний специфічно взаємодіяти з константними доменами антитіл; і це забезпечує специфічне зв'язування з IgG різних видів тварин та людини [4]. Розглянуто основні переваги використання SPA як ліганду в афінній хроматографії, що пов'язані з можливістю одностадійного виділення різних класів антитіл з високим рівнем чистоти або для екстракції різних фракцій антитіл з сироватки крові.

Властивості SPA та механізм взаємодії з імуноглобулінами

SPA – це протеїн *Staphylococcus aureus* з молекулярною масою 42 кДа, що зв'язаний з його клітинною стінкою. Він складається з п'яти високогомологічних імуноглобулінзв'язувальних доменів – E, D, A, B, C (Рис. 1) та ХМ домену, за допомогою якого SPA прикріплюється до бактеріальної клітинної стінки, а також сигнальної послідовності S, яка забезпечує секрецію SPA [5, 6].

Кожен з п'яти доменів SPA має вигляд трьох антипаралельних α -спіралей приблизно по 58 амінокислотних залишків, трьохвимірна структура протеїну стабільна завдяки наявності гідрофобного кору.

SPA може взаємодіяти з імуноглобулінами двома способами: кожен домен здатний зв'язуватися з константною ділянкою IgG Fc та варіабельним фрагментом Fab, що відповідає за розпізнавання антигену.



Рис. 1. Структура домену В SPA, гомологічного доменам А, С, D, Е.

11 амінокислотних залишків першої та другої спіралей домену SPA взаємодіють з константною ділянкою молекули IgG. D та E домени SPA взаємодіють головним чином з Fab доменами імуноглобуліну та мають дуже низьку афінність до їхніх Fc доменів, в той час як А, В, С домени міцно зв'язуються з Fc доменами імуноглобуліну [7]. SPA взаємодіє з IgG1, IgG2, IgG4 людини, IgG2a, IgG2b, IgG3 миші, IgG кролика, IgG2 вівці (Таблиця 1).

Сайт зв'язування імуноглобуліну з SPA розташований на ділянці важкого ланцюга, що включає домени CH2 та CH3 більшості підкласів IgG [6]. Ця властивість широко використовується для очищення антитіл.

SPA може бути використаний для фракціонування імуноглобулінів, тому що він має різний ступінь афінності до імуноглобулінів різних підкласів.

Стабільність SPA. SPA притаманна висока конформаційна стабільність, значна стійкість до фізико-хімічних чинників та дії протеаз. Протеїн стабільний в широкому діапазоні рН (2,0 – 11,0) та може бути ренатурований після його обробки денатуруючими розчинами, розчинами сечовини або солей гуанідину. Відсутність цистеїнових залишків дозволяє проводити очищення SPA відновлюваними агентами [7].

Зв'язування різних антитіл з SPA

Види	Підкласи імуноглобулінів	Взаємодія з SPA	Види	Підкласи імуноглобулінів	Взаємодія з SPA
Людина	IgG1	++	Щур	IgG	–
	IgG2	++		IgM	–
	IgG3	+	Кролик	IgG	++
	IgG4	++		IgM	–
	IgA	–	Вівця	IgG1	–
	IgM	–		IgG2	++
Миша	IgG1	+	Коза	IgM	–
	IgG2a	++		IgG1	+
	IgG2b	++		IgG2	+
	IgG3	++	Коза	IgM	–
	IgM	–			

++ - сильна взаємодія; + - слабка взаємодія; – - немає взаємодії

Використання SPA в афінній хроматографії

Афінна хроматографія з використанням сорбентів на основі іммобілізованого SPA вважається одним з найкращих методів для очищення моноклональних антитіл для досягнення їх гомогенності, завдяки простоті використання та високому рівню специфічності антитіл [7]. Також цей метод використовується для імуносорбції антитіл з крові в процесі лікування та терапії цукрового діабету, ревматоїдного артриту, протеїнурії з нефротичним синдромом з фокально-сегментарним гломерулосклерозом, дилатаційної кардіоміопатії, ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури та при трансплантації нирок [8–12].

Відомо багато публікацій щодо виділення поліклональних антитіл, різних класів та підкласів IgG з асцитних та культуральних рідин, сироватки крові з використанням методу афінної хроматографії із застосуванням афінного сорбенту з іммобілізованим SPA на сефарозі [13]. Цей метод забезпечує рівень чистоти IgG більше ніж 95 % після одностадійного процесу очищення [14].

Афінність SPA до IgG залежить від виду тварин, динамічна ємність (кількість зразка (мг), який зв'язується з певним об'ємом сорбенту (мл) в хроматографічній колонці) – від типу афінного сорбенту (Таблиця 2) [15].

Таблиця 2

Характеристика афінних сорбентів на основі іммобілізованого SPA

Назва сорбенту	Динамічна ємність (мг антитіл/мл сорбенту)	Застосування та опис сорбенту
NiTrap Protein A HP	IgG людини >20 мг	Очищення фрагментів та підкласів IgG
NiTrap rProtein A FF	IgG людини > 50 мг	Очищення фрагментів та підкласів IgG. Сорбент з підвищеною динамічною ємністю
rProtein A Sepharose 4 Fast Flow	IgG людини > 50 мг IgG миші – 8-20 мг	Сорбент з підвищеною динамічною ємністю
Protein A Sepharose 6MB	IgG людини > 5 мг	Очищення клітин, вкритих антитілами
MabSetect (ліганд – рекомбінантний SPA)	IgG людини ~ 30 мг	Очищення IgG, фрагментів та підкласів IgG. Сорбент забезпечує швидкий процес очищення великих об'ємів, має високу динамічну ємність при високих швидкостях потоку

Афінна хроматографія з використанням сорбентів на основі іммобілізованого SPA застосовується для очищення IgG людини, морської свинки, кролика, свині. Зазвичай використовують буферний розчин для нанесення антитіл з рН 8,0, елюцію проводять за низьких значень рН розчину (наприклад, 0,1 М гліцин-HCl, рН 3.0 або 0.1 М лимонна кислота, рН 2.4). Елюат нейтралізують одразу після одержання, що дає можливість зберегти функціональну та біологічну активність антитіл [13].

IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 можуть бути виділені з сироватки крові мишей з високим рівнем чистоти та застосовані в імунологічних тестах. Екстракція імуноглобулінів залежить від рН буферного розчину для елюції. Для виділення IgG1, IgG2a, IgG2b застосовують розчини з рН 6.0-7.0, рН 4.5-5.0 та рН 3.5-4.0, відповідно. Додавання 1М Tris-HCl, рН 8,5 одразу після елюції перешкоджає денатурації IgG2a, IgG2b [16].

Афінні сорбенти на основі іммобілізованого SPA. Афінні сорбенти на основі іммобілізованого SPA відрізняються за джерелом SPA (природний дикий тип або рекомбінантний білок), способом іммобілізації, характеристиками гранул сорбенту. Два головних виробника афінних сорбентів на основі іммобілізованого SPA – це General Electric (GE) Healthcare та Millipore.

У афінному сорбенті рекомбінантний SPA іммобілізований на сефарозі. SPA приєднаний через С-кінцевий цистеїн до сефарозної матриці, активованої ціан бромідом. Завдяки тіоефірному зв'язку ліганд розташований на хроматографічній матриці таким чином, що це підвищує його доступність до мобільної фази. Таке розташування ліганду покращує зв'язування антитіл [7]. До того ж ефективна іммобілізація молекули SPA на матриці сорбенту забезпечує відсутність підтікання сорбенту, одержання чистих фракцій антитіл.

Використовуючи генно-інженерні технології, модифікували домен В SPA, і на його основі був створений новий ліганд у формі тетрамеру з чотирьох ідентичних модифікованих доменів В. Відсутність D та E доменів SPA в даному ліганді дозволяє уникати взаємодій з варіабельною ділянкою імуноглобулінів, ліганд взаємодіє лише з Fc доменом антитіл. В результаті знижується

гетерогенність зв'язування антитіл, тобто ліганд зв'язується лише з антитілами, що мають високу афінність до нього. Новий розроблений сорбент MabSelect SuRe витримує сильнолужні умови, дозволяючи неодноразове використання розчинів 0.1 – 0.5 М NaOH для очищення та санітарної обробки.

Сьогодні також виробляються комерційно перспективні сорбенти з іммобілізованим SPA на пористому склі (ProSep A), на покритих пористих полістиролових матеріалах (POROS).

Процес афінної хроматографії з використанням сорбентів з іммобілізованим SPA забезпечує підвищення концентрації продукту у 5-10 разів [7]. Очищення антитіл з використанням афінних сорбентів на основі іммобілізованого SPA ефективно завдяки його фізико-хімічній стабільності та низьким операційним витратам, пов'язаним з очищенням сорбенту та його повторним використанням.

Процес очищення антитіл

Процес очищення антитіл шляхом використання афінної хроматографії із застосуванням сорбенту на основі іммобілізованого SPA показаний на рис. 2.

Нанесення та зв'язування. Більшість моноклональних антитіл, які зараз використовуються або досліджуються у терапевтичних цілях, є молекулами імуноглобуліну G людини класів 1, 2, 4, всі вони міцно зв'язуються з SPA. В розчин, призначений для розведення антитіл перед нанесенням на хроматографічну колонку, запаковану сорбентом з іммобілізованим на ньому SPA, може бути додана сіль для покращення зв'язування моноклональних антитіл з SPA або етилендіамінтетрацетат для зниження протеолітичної деградації, яка призводить до втрат ліганду. Процес очищення однієї партії моноклональних антитіл включає декілька циклів на вищезазначеній хроматографічній колонці. Це знижує затрати на проведення даної операції.

Промивання. Для максимального видалення неспецифічно зв'язаного матеріалу рН розчину для промивання повинен бути низьким, щоб не почалася передчасна елюція антитіл. В такому разі можна використовувати для буферних розчинів різні комбінації солей та детергентів, солей та розчинників,

солей та полімерів, високі концентрації Тріс-НСІ буфера (гідроксиметиламінометану).

Елюція. Елюція зазвичай проводиться при найвищому можливому значенні рН, при якому зберігається високий вихід продукту. Сечовина є ефективним донором/акцептором водню, тому вона руйнує водневі зв'язки і може використовуватися в низьких концентраціях, що полегшує процес елюції та зберігає стабільність продукту. Елюція на хроматографічних колонках, заповнених сорбентом з іммобілізованим SPA, може проводитися за низьких температур, тому що це дає можливість уникнути агрегації протеїнів в елюаті.

Регенерація. Здатність сорбенту з іммобілізованим SPA витримувати значну кількість циклів його повторного використання є важливим фактором для високоефективного процесу очищення антитіл для терапевтичного та лабораторного застосування у фармацевтичній біотехнології. Регенерація сорбенту з іммобілізованим SPA зазвичай проводиться з використанням низьких концентрацій NaOH (зазвичай < 100 мМ), тому що нативний або рекомбінантний SPA стабільний у слабко лужних умовах [7].

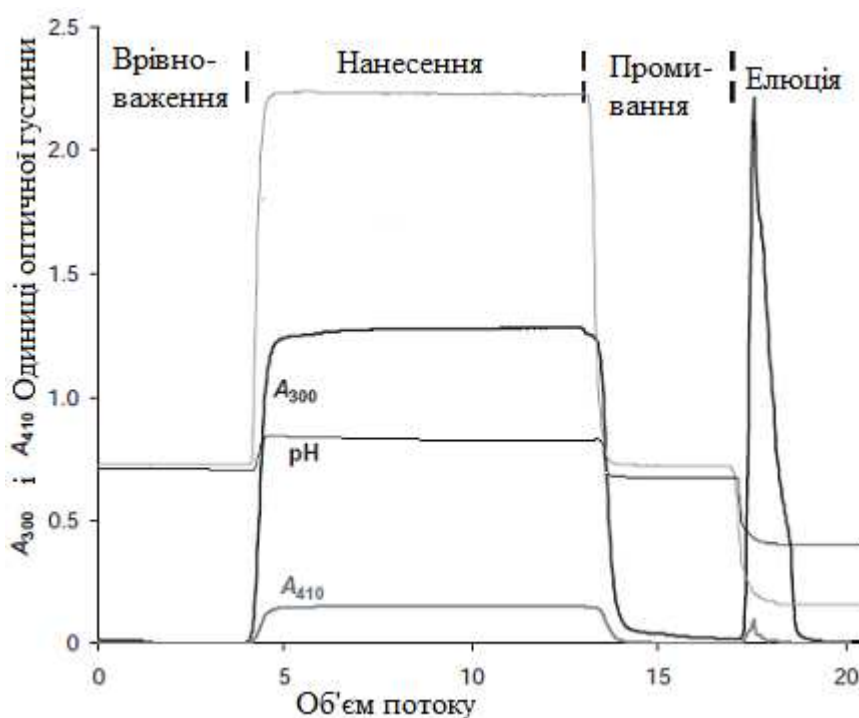


Рис. 2. Процес очищення антитіл шляхом використання афінної хроматографії із застосуванням сорбенту на основі іммобілізованого SPA

Очищення антитіл з використанням сорбенту на основі іммобілізованого SPA забезпечує простоту проведення процесу, високий ступінь чистоти протеїнів, тому що включає декілька циклів. Отже, висока ефективність очищення антитіл завдяки афінній хроматографії з використанням сорбенту з іммобілізованим SPA спрощує технологію виробництва та виділення цільового продукту. Такий процес очищення протеїнів є економічно вигідним, тому що не потребує обладнання для додаткового очищення антитіл іншими видами хроматографії.

ВИСНОВКИ

SPA є ефективним лігандом для афінної хроматографії завдяки його високій конформаційній стабільності, стійкості до фізико-хімічних чинників та протеаз, стабільності у широкому діапазоні рН (2,0–11,0). Відсутність цистеїнових залишків спрощує процедуру очищення SPA. SPA демонструє високу афінність до широкого ряду різних класів та підкласів антитіл: IgG1, IgG2, IgG4 людини, IgG2a, IgG2b, IgG3 миші, IgG кролика, IgG2 вівці.

У галузі фармацевтичної біотехнології дослідження стафілококового протеїну А є перспективним завдяки можливості створення нових біоафінних сорбентів. Це реалізується шляхом покращення імуноглобулінзв'язувальних властивостей SPA за використання генно-інженерних методів. Афінна сорбція на основі іммобілізованого протеїну А може використовуватись замість традиційних методів очищення антитіл, як-от осадження етанолом та різних хроматографічних методів, завдяки простоті використання, можливості одностадійного процесу очищення, одержання антитіл з високим рівнем чистоти, багаторазового використання при дотриманні правильних умов зберігання та експлуатації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Turkovi J. Bioaffinity chromatography / J. Turkovi – Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1993. – 800 p.
2. Boi C. Performance of a new protein a affinity membrane for the primary recovery of antibodies / C. Boi, S. Dimartino, G.C. Sarti // Biotechnological Programs. – 2008. – V. 24. – № 3. – P. 640–647.
3. Protein A immunoadsorption in renal transplantation patients with vascular rejection / [H. Hickstein, G. Korten, R. Bast et al.] // Transfusion Sciences. – 1998. – № 19. – P. 53–57.
4. Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein. A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity / [M. Graille, E. A. Stura, A. L. Corper et al.] // PNAS. – 2000. – P. 5399–5404.
5. Pat. 6,548,639 B1 USA PCT/SE98/02036. IgG binding protein from Staphylococcus and nucleotide sequence encoding this protein / Frykberg L.; Uppsala. – № 09/554,080, decl. 12.05.00, publ.15.04.03.
6. Nord K. Protein A chromatography for antibody purification / K. Nord, S. Hober, M. Linhult // Journal of Chromatography B. – 2007. – № 848. – P. 40–47.
7. Gottschalk U. Process scale purification of antibodies / U. Gottschalk – Hoboken: Wiley & Sons, 2009. – 430 p.
8. Experience With Protein A-Immunoadsorption in Treatment-Resistant Adult Immune Thrombocytopenic Purpura / [H.W. Snyder, S.K. Cochran, J.P. Balint et al.] // Blood. – 1992. – 79, № 9. – P. 2237–2245.
9. McMillan R. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura / R. McMillan // English Journal of Medicine. – 1981. – № 304. – p. 1135 – 1147.
10. Clair St. W.E. Rheumatoid Arthritis / St. W.E.Clair, D.S. Pisetsky, B.F. Haynes. – [1st ed.] – Lippincott: Williams & Wilkins, 2004. – 555 p.

11. Schwenger V. Immunoabsorption in nephrology and kidney transplantation / V. Schwenger, C. Morath // *Nephrol Dial Transplant.* – 2010. – № 25. – P. 2407–2413.
12. Effects of Protein A Immunoabsorption in Patients with Chronic Dilated Cardiomyopathy / [A.O. Doesch, S. Mueller, M. Konstandin et al.] // *Journal of Clinical Apheresis.* – 2010. – №. 25. – P. 315–322.
13. Andrew S.M. *Current protocols in cell biology* / S.M. Andrew, J.A. Titus. – UK: John Wiley & Sons, Inc. – 2000. – 432 p.
14. Josic D. Analytical and preparative methods for purification of antibodies / D. Josic, Y.-P. Lim // *Food technol. biotechnol.* – 2001. – V. 39. – № 3. – P. 215–226.
15. *Antibody purification handbook.* – UK: Amersham Biosciences, 2002.
16. Ey P. L., Prowse S. J., Jenkin C. R. Isolation of pure IgG1, IgG2, AND IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose / P. L. Ey, S. J. Prowse, C. R. Jenkin // *Immunochemistry.* – 1978. – V. 15. – P. 429 – 436.

***APPLICATION OF STAPHYLOCOCCUS PROTEIN A
IN THE AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND IMMUNOABSORPTION***

O.V. SVYATENKO¹, O.A. VASYLCHENKO¹, K.K. VASILCHENKO²

¹National Aviation University, Kyiv

²Bogomolets National Medical University, Kyiv

Protein A is native or recombinant proteins of microbial origin that bind to mammalian immunoglobulins. In the work characteristics of protein A, affinity sorbents on its basis, advantages of protein A for application as ligands in the affinity chromatography for antibodies purification, extraction of different antibody fractions from blood serum, antibodies and immune complexes from blood plasma of ill people in the process of immunoabsorption.

Key words: affinity chromatography, Staphylococcus protein A (SPA), antibodies, immunoglobulins.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТАФИЛОКОККОВОГО ПРОТЕИНА А
В АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ИММУНОСОРБЦИИ**

О.В. СВЯТЕНКО¹, О.А. ВАСИЛЬЧЕНКО¹, К.К. ВАСИЛЬЧЕНКО²

¹*Национальный авиационный университет, г. Киев*

²*Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев*

Протеин А – это нативный и рекомбинантный протеин бактериального происхождения, которые связывается с иммуноглобулинами млекопитающих. В работе приведены характеристика протеина А, аффинных сорбентов на его основе, преимущества использования этого протеина как лиганда в аффинной хроматографии для очищения антител, выделения разных фракций антител из сыворотки крови, антител и иммунных комплексов из плазмы крови больных людей в процессе иммуносорбции.

Ключевые слова: *аффинная хроматография, стафилококковый протеин А (SPA), антитела, иммуноглобулины.*