

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

УДК 577.1.615.4:616-71/-78

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-3-333-338>

Поступила в редакцию 30.04.2020

Received 30.04.2020

Е. С. Пустюльга, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, В. П. Голубович

*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Беларусь*

СЕЛЕКТИВНОСТЬ АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ АРОМАТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G

Аннотация. Созданы биоспецифические сорбенты для удаления IgG и подклассов из биологических жидкостей на основе олигопептидов, содержащих остатки ароматических аминокислот. Проведена функциональная оценка сорбционных качеств экспериментальных образцов сорбентов и их селективности к подклассам IgG. Обнаружено, что все сорбенты имеют хорошие характеристики по удалению IgG из биологических жидкостей, но сорбент на основе Phe-Trp-DTyr эффективней остальных связывает общий IgG. По отношению к подклассам IgG лучшие результаты связывания следующие: Phe-Gln-Tyr-OMe – IgG1(86,53 %), Phe-Ala-Tyr – IgG2(60,2 %), Phe-Trp-DTyr – IgG3 (59,52 %) и IgG4 (55,05 %).

Ключевые слова: сорбция, сорбенты, иммуноглобулины, подклассы, белки, лиганды, пептиды, селективность, сорбционная емкость

Для цитирования. Селективность аффинных сорбентов на основе ароматических пептидов для связывания иммуноглобулинов класса G / Е. С. Пустюльга [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 3. – С. 333–338. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-3-333-338>

Y. S. Pustsyulga, O. V. Gribovskaya, E. M. Ermola, V. P. Golubovich

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

SELECTIVITY OF AFFINITY SORBENTS BASED ON AROMATIC PEPTIDES FOR THE BINDING OF CLASS G IMMUNOGLOBULINS

Annotation. Biospecific sorbents for the removal of IgG and subclasses from biological fluids based on oligopeptides that contain aromatic protein residues have been created. A functional assessment of high-quality experimental samples of sorbents and their preferences for IgG subclasses was carried out. It was found that each sorbent has good characteristics for removing IgG from biological fluids, but the sorbent based on Phe-Trp-DTyr is more effective in binding of total IgG. With respect to IgG subclasses, the best binding results are as follows: Phe-Gln-Tyr-OMe - IgG1 (86,53%), Phe-Ala-Tyr - IgG2 (60,2%), Phe-Trp-DTyr - IgG3 (59,52%) and IgG4 (55,05%).

Keywords: sorption, sorbents, immunoglobulins, subclasses, proteins, ligands, peptides, selectivity, sorption capacity

For citation. Pustsyulga Y. S., Gribovskaya O. V., Ermola E. M., Golubovich V. P. Selectivity of affinity sorbents based on aromatic peptides for the binding of class G immunoglobulins. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2020, vol. 56, no. 3, pp. 333–338 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-3-333-338>

Введение. Существует ряд заболеваний (системная красная волчанка, синдром Шегрена, системный склероз и др.), патогенез которых связан с гиперпродукцией иммуноглобулинов класса G (IgG) [1]. Концентрация общего IgG и его подклассов при обострениях увеличиваются на 20–30 % и составляют до 19 мг/мл, что приводит к критическим состояниям организма. В терапии данных заболеваний успешно применяются экстракорпоральные методы очистки крови с использованием специфических иммуносорбентов [2].

Биоспецифическая сорбция применима для удаления из биологических жидкостей (плазмы, лимфы, крови) целевых токсических биомолекул различной молекулярной массы и природы при аутоиммунных, аллергических и других заболеваниях. Подобный подход эффективен в лечении острых стадий заболеваний, связанных с избыточной концентрацией или накоплением IgG в биологических жидкостях организма [3, 4].

При создании биоспецифических сорбентов один из ключевых моментов в их разработке – выбор лигандов. Главными критериями, которым должны соответствовать лиганды, являются

стабильность, устойчивость к химической и энзиматической деградации, специфичность к выбранным молекулам-мишеням, а их решающими свойствами – это его способность обеспечивать прочную иммобилизацию молекул лигандов на матрице, низкая стоимость и простота в изготовлении.

За долгое время разработки специфичных к IgG сорбентов были предприняты попытки изготовления сорбентов на основе как органических соединений (олигопептиды, белки), так и неорганических (бентонит, нанопибра) [5–8], которые имеют ряд недостатков, связанных либо со сложностью и дороговизной производства, либо нацеленные на удаление общего IgG.

Для создания сорбентов с высокой активностью к иммуноглобулинам класса G (IgG) и селективностью к их подклассам нами разработаны варианты биоспецифических сорбентов на основе трипептидов, содержащих ароматические аминокислоты. Ранее был проведен теоретический поиск лигандов на основе аминокислот и пептидов, проявляющих высокую энергию связывания с Fc-фрагментами IgG различных подклассов. Было выявлено, что короткие пептиды, в структуре которых присутствуют остатки ароматических аминокислот фенилаланина и триптофана, показывают высокую энергию связывания с молекулами Fc-фрагментов подклассов IgG [9–11].

Цель данной работы – оценка функциональных свойств опытных образцов биоспецифических сорбентов для связывания IgG, а также их селективности к подклассам IgG. В качестве лигандов были взяты за основу наиболее перспективные олигопептиды из предыдущих исследований (Phe-Trp-DTyr и Trp-Phe-DTyr), а также созданы новые трипептиды, модифицированные по второму положению с целью влияния на свойства селективности к подклассам IgG.

Материалы и методы. В работе использовали аминокислоты (Sigma, США), реагенты (Fluka, Швейцария, Acros Organics, Бельгия). Процессы синтеза соединений, удаления защитных групп контролировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Sorbfil, Россия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–20 %-ный аммиак, 60:40:10; бутанол–уксусная кислота–вода, 40:10:10, этилацетат–пиридин–уксусная кислота–вода, 50:30:30:10. Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлорбензидинового реагента.

Масс-спектры с химической ионизацией при атмосферном давлении (APCI-MS) регистрировали на масс-хроматографе Accela-LCQ Fleet (Thermo Scientific, США).

Прививку акриловой кислоты на полиэтиленовые гранулы проводили прямым радиационным методом в Объединенном институте энергетических и ядерных исследований – Сосны НАН Беларуси. Для иммобилизации пептидов на гранулы последние предварительно модифицировали N-гидроксисукцинимидом с помощью N, N'-диизопропилкарбодиимида.

Функциональную оценку связывания IgG полученными образцами сорбентов проводили посредством иммуноферментного анализа [12]. Для этого в качестве иммуноферментной тест-системы использовали наборы фирмы Clone Cloud Corp. (США), предназначенные для иммуноферментного определения концентраций подклассов IgG. Для установления сорбционных качеств к общему IgG экспериментальных образцов сорбентов проводили иммуноферментный анализ с использованием набора IgG общий – ИФА–БЕСТ фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия), предназначенный для иммуноферментного определения концентраций общего IgG.

Эксперименты проводили с цитратной плазмой с предварительным центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин. Образцы сорбентов объемом 0,05 мл инкубировали в 1,0 мл плазмы в течение 30 мин. Концентрацию сорбированного общего IgG и подклассов рассчитывали по разнице количества IgG в контрольной плазме в сравнении с концентрацией IgG в плазме, подвергавшейся воздействию сорбентов. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора iMark фирмы BioRad (США) при длине волны 450 нм (референс 620–655 нм).

Результаты и их обсуждение. Синтез пептидов осуществляли с использованием классических методов пептидного синтеза в растворе, путем последовательного присоединения *трет*-бутилоксикарбонил (Boc)-аминокислот к C-концевым фрагментам (рис. 1, 2). C-концевой тирозин вводили в реакции в виде метилового эфира, который конденсировали с Boc-Хаа-ОН, где Хаа – Asp(OBzl), Asn, Gln, Ala, Gly соответственно. В качестве основного конденсирующего агента использовали дициклогексилкарбодиимид (DCC) с добавлением N-гидроксисбензотриазола (HOBT) в качестве противорацемической добавки. Отщепление Boc-защитной группы проводили обработкой пептидов 4,5 н. раствором HCl в этилацетате в течение 40–50 мин. Практически все ста-

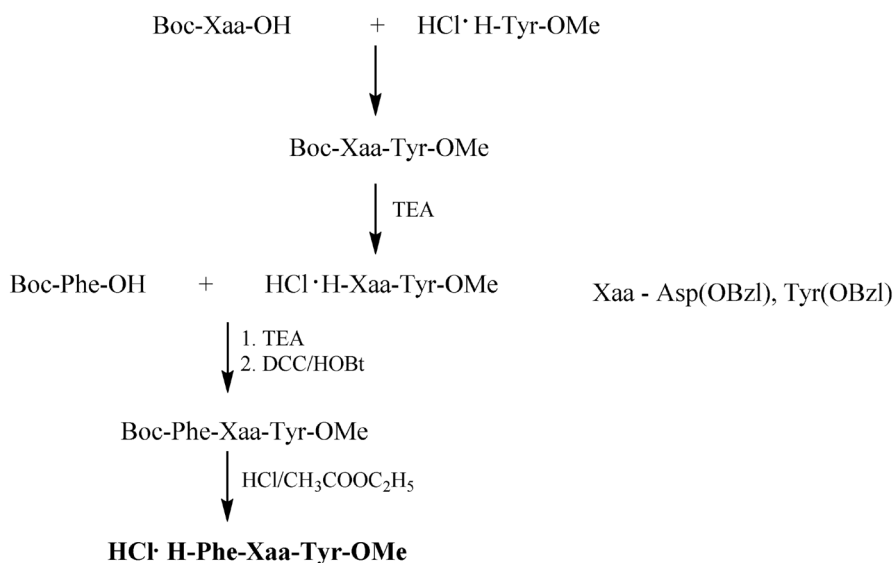


Рис. 1. Схема синтеза трипептида Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe (I)
 Fig. 1. Synthesis scheme of the tripeptide Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe (I)

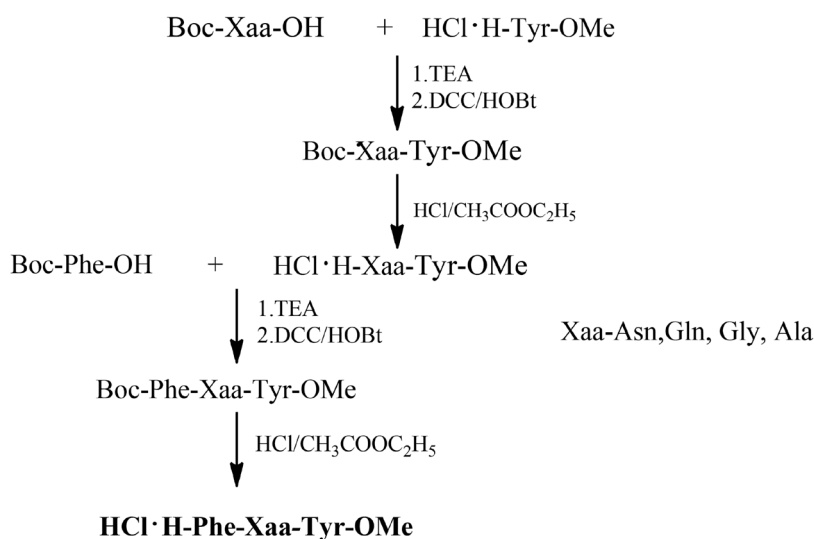


Рис. 2. Схема синтеза трипептидов Phe-Asn-Tyr-OMe (II), Phe-Gln-Tyr-OMe (III), Phe-Gly-Tyr-OMe(IV), Phe-Ala-Tyr-OMe (V)
 Fig. 2. Synthesis scheme of the tripeptides Phe-Asn-Tyr-OMe (II), Phe-Gln-Tyr-OMe (III), Phe-Gly-Tyr-OMe(IV), Phe-Ala-Tyr-OMe (V)

дии синтеза проходили с высокими выходами, что позволило получить целевые трипептиды с суммарными выходами 40–56 %. Основным методом контроля структуры пептидной цепи была масс-спектрометрия, по которой определяли массы молекулярных ионов промежуточных соединений и целевых трипептидов.

В качестве матрицы использовали полиэтиленовые гранулы объемом 0,05±0,005 мл и массой 0,045±0,008 г с привитой акриловой кислотой. Химическая структура данной матрицы отличается большим количеством карбоксильных групп. Выбор полиэтиленовой матрицы обусловлен жесткостью ее структуры, что предотвращает попадание частиц сорбента в кровь, ее стабильностью, биологической инертностью. Привитая полиакриловая кислота повышает гемосовместимость полимера и создает возможность ковалентно иммобилизовать разнообразные лиганды.

Методом ИФА определили, что концентрация общего IgG в контрольной плазме составила 17±0,6 мг/мл, что превышает количество общего IgG в среднем в плазме. Концентрации подклассов IgG в контрольной плазме были следующими: IgG1 – 7,46±0,65 мг/мл, IgG2 – 0,7±0,65 мг/мл,

IgG3 – $2,27 \pm 0,65$ мг/мл, IgG4 – $1,47 \pm 0,65$ мг/мл. Для экспериментальных образцов сорбентов установили количество сорбированного общего IgG, которое составило от $8,65 \pm 0,65$ мг для Phe-Ala-Tyr-OMe до $10,16 \pm 0,65$ мг для Phe-Trp-DTyr (рис. 3).

На рис. 4 представлены результаты оценки селективности созданных образцов сорбентов к подклассам IgG, по которым видно, что большинство образцов проявляют к IgG3 высокую активность. Сорбенты, содержащие в качестве лиганда трипептиды Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe, Phe-Ala-Tyr-OMe, Phe-Asn-Tyr-OMe, Trp-Phe-DTyr, демонстрируют высокую специфичность к IgG2, IgG3 и практически не проявляют активности к IgG1 и IgG4. Наиболее высокоактивными сорбентами к IgG3 оказались образцы на основе Phe-Trp-DTyr и Phe-Gln-Tyr-OMe, связавшие 59,5 и 58,4 % IgG3 соответственно. Поскольку сорбент, содержащий Phe-Trp-DTyr в качестве лиганда, сорбирует меньше IgG1, это делает его перспективным для дальнейших исследований.

Из рис. 4 видно, что образцы сорбентов, содержащие Phe-Ala-Tyr-OMe, Phe-Asn-Tyr-OMe и Trp-Phe-DTyr, показали высокую избирательность к IgG2 и IgG3 при очень низкой активности

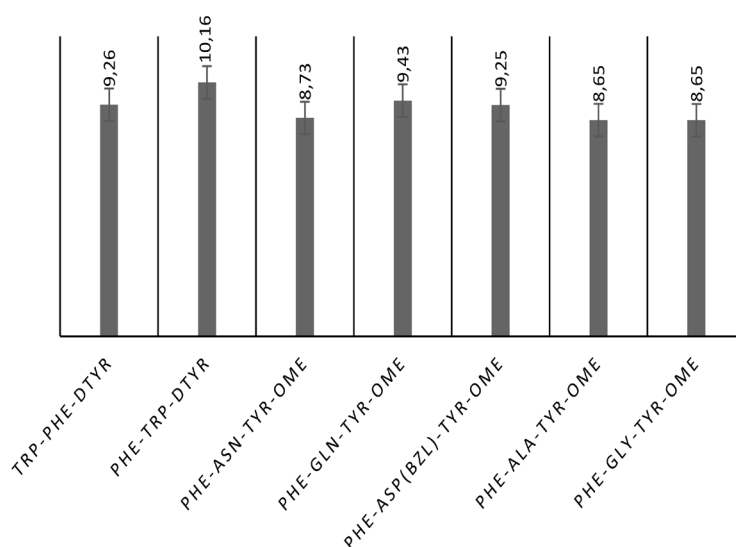


Рис. 3. Диаграмма количества связанного образцами сорбентов общего IgG, мг

Fig. 3. Diagram of the amount of total IgG bound by sorbents, mg

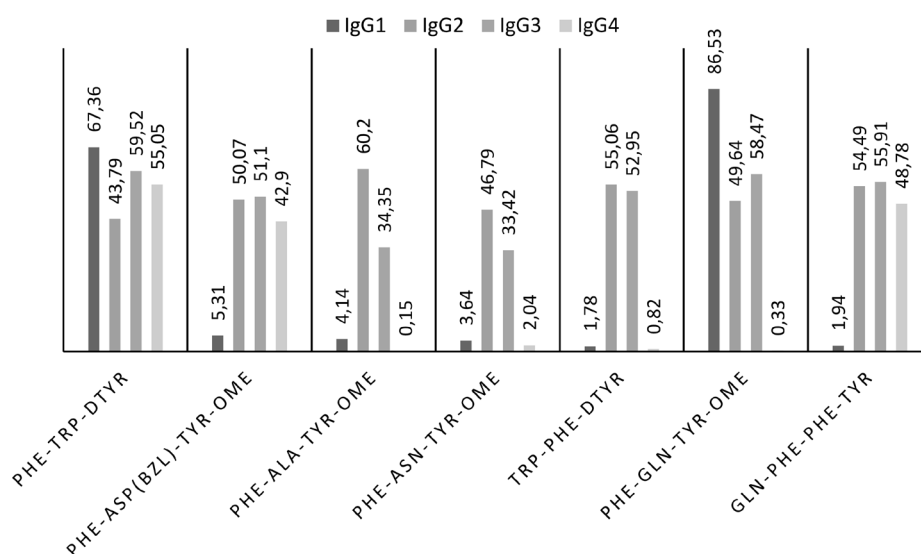


Рис. 4. Диаграмма процентного соотношения сорбированных подклассов IgG

Fig. 4. Diagram of the percentage of sorbed IgG subclasses

к IgG1 и IgG4. Выявленные свойства специфичности образцов дают возможность предложить их как в качестве дополнительного компонента в композитном варианте сорбента, так и для самостоятельного использования при коррекции состояний связанных с гиперпродукцией подклассов IgG, к которым сорбенты проявляют избирательную активность.

Заклучение. Таким образом, нами получены сорбенты, обладающие высокой степенью связывания IgG и его подклассов на основе матриц, обладающих стабильностью и гемосовместимостью. Установлено, что природа аминокислоты в центральном положении последовательности Phe-Хаа-Тур-Оме влияет на селективность к тому или иному подклассу IgG, что способствует изменению селективности экспериментальных образцов к подклассам IgG без заметного падения активности ко всему классу, что особенно важно для терапии аутоиммунных заболеваний.

Список использованных источников

1. Serum IgG subclasses in autoimmune diseases / H. Zhang [et al.] // *Medicine*. – 2015. – Vol. 94, N 2. – P. e387–393. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000387>
2. Bosch, T. Therapeutic Apheresis—State of the Art in the Year 2005 / T. Bosch // *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 2005. – Vol. 9, N 6. – P. 459–468. <https://doi.org/10.1111/j.1744-9987.2005.00306.x>
3. Auto-immune disorders treated with therapeutic apheresis / R. Bambauer [et al.] // *Immunology Research and Therapy Journal*. – 2017. – Vol. 1, N 1. – P. 111–131.
4. Plasmapheresis in active systemic lupus erythematosus: effects on clinical, serum and cellular abnormalities / N. J. Aboue [et al.] // *Case report. Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1981. – Vol. 19. – P. 44–54. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(81\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0090-1229(81)90046-5)
5. Newly synthesized bentonite–histidine (Bent–His) micro-composite affinity sorbents for IgG adsorption / N. Ozturk [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2007. – Vol. 301, iss. 1. – P. 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.01.026>
6. Аффинные гемосорбенты на основе ароматических пептидов для связывания иммуноглобулинов класса G / П. А. Левашов [и др.] // *Биоорганич. химия*. – 2015. – Т. 41, № 5. – С. 553–558. <https://doi.org/10.7868/S0132342315040089>
7. Performance of hexamer peptide ligands for affinity purification of immunoglobulin G from commercial cell culture media / A. Naik [et al.] // *J. Chromatogr. A*. – 2011. – Vol. 1218, iss. 13. – P. 1691–1700. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.071>
8. Selective adsorption of globulin on nanofiber meshes for immuno-adsorption therapy / R. Kurimotoa [et al.] // *New J. Chem.* – 2018. – Vol. 42, N 4. – P. 1–3. <https://doi.org/10.1039/c7nj04672c>
9. Пустюльга, Е. С. Поиск и оценка функциональных качеств лигандов сорбентов на основе ароматических аминокислот при связывании IgG из биологических жидкостей / Е. С. Пустюльга, Е. М. Ермола, В. П. Голубович // *Биохимия и молекулярная биология / Ин-т биох. биол. активн. соед. НАН Беларуси; ред.: И. Н. Семененя (гл. ред.) [и др.]* – Гродно, 2018. – Вып. 2. Границы биологических наук. Сигналинг и метоболизм. – С. 132–135.
10. Пустюльга, Е. С. Поиск лигандов сорбентов для извлечения IgG из биологических жидкостей / Е. С. Пустюльга, Е. М. Ермола // 2-й междунар. биохим. конгресс. Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии / *Ин-т биох. биол. активн. соед. НАН Беларуси; ред.: И. Н. Семененя (гл. ред.) [и др.]*. – Гродно, 2018. – С. 482–487.
11. Молекулярный докинг лигандов перспективных для сорбции IgG из биологических жидкостей / Е. С. Пустюльга [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук*. – 2020. Т. 56, № 1. – С. 88–95. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-1-88-95>
12. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров [и др.] – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.

References

1. Zhang H., Li P., Wu D., Xu D., Hou Y., Wang Q., Li M., Li Y., Zhang F., Shi Q., Serum IgG subclasses in autoimmune diseases. *Medicine*, 2015, vol. 94, no. 2, pp. e387–393. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000387>
2. Bosch T., Therapeutic Apheresis—State of the Art in the Year 2005. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 2005, vol. 9, no. 6, pp. 459–468. <https://doi.org/10.1111/j.1744-9987.2005.00306.x>
3. Bambauer R., Latza R., Burgard D., Schiel R. Auto-immune disorders treated with therapeutic apheresis. *Immunology Research and Therapy Journal*, 2017, vol. 1, no. 1, pp. 111–131.
4. Abdou N. I., Lindsey H. B., Pollock A., Stechschulte D. J., Wood G. Plasmapheresis in active systemic lupus erythematosus: effects on clinical, serum and cellular abnormalities. Case report. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1981, vol. 19, pp. 44–54. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(81\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0090-1229(81)90046-5)
5. Ozturk N., Tabak A., Akgol S., Denizli A., Newly synthesized bentonite–histidine (Bent–His) micro-composite affinity sorbents for IgG adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007, vol. 301, iss. 1, pp. 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.01.026>
6. Levashov P. A., Ovchinnikova E. D., Frid D. A., Azmuko A. A., Afanaseva M. I., Kotkina T. I., Afanaseva O. I., Adamova I. Yu., Pokrovskiy S. N., Affinity hemosorbents based on aromatic peptides for the binding of immunoglobulins G. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2015, vol. 41, no. 5, pp. 494–499. <https://doi.org/10.7868/S0132342315040089>

7. Naik A. D., Menegatti S., Gurgel P. V., Carbonell R. G. Performance of hexamer peptide ligands for affinity purification of immunoglobulin G from commercial cell culture media. *Journal of Chromatography A*, 2011, vol. 1218, iss. 13, pp. 1691–1700. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.071>

8. Kurimoto R., Namekawa K., Ellisd A. V., Naitoa M., Ebaraa M. Selective adsorption of globulin on nanofiber meshes for immuno-adsorption therapy. *New Journal of Chemistry*, 2018, vol. 42, no. 4, pp. 2916–2922. <https://doi.org/10.1039/c7nj04672c>

9. Pustyl'ga Y. S., Yermola E. M., Golubovich V. P. Search and assessment of the functional qualities of sorbent ligands based on aromatic amino acids upon IgG binding from biological fluids. *Biokhimiya i molekulyarnaya biologiya. Vypusk 2. "Granitsy biologicheskikh nauk. Signaling i metabolism"* [Biochemistry and molecular biology. Issue 2. "The limits of biological sciences. Signaling and metabolism"]. Grodno, Institute of Biochemistry of biologically active compounds of the NAS of Belarus, 2018, pp. 132–135 (in Russian).

10. Pustyl'ga Y. S., Yermola E. M. Search for ligands of sorbents for the extraction of IgG from biological fluids. *2-i mezhdunar. biokhim. kongress. Sovremennyye problemy biokhimii i molekulyarnoi biologii* [2nd International Biochemical Congress. Modern problems of biochemistry and molecular biology]. Grodno, Institute of Biochemistry of biologically active compounds of the NAS of Belarus, 2018, pp. 482–487 (in Russian).

11. Pustyl'ga Y. S., Gribovskaya O. V., Yermola E. M., Golubovich V. P. Molecular docking of ligands promising for IgG sorption from biological fluids. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2020, vol. 56, no. 1, pp. 88–95 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-1-88-95>

12. Egorov A. M., Osipov A. P., Dzantnev B. B., Gavrilova E. M. *Theory and practice of enzyme immunoassay analysis*. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1991. 288 p. (in Russian).

Информация об авторах

Пустыльга Егор Сергеевич – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zeroed.inside@gmail.com

Грибовская Ольга Викторовна – ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olymelnik@yandex.ru

Ермола Евгений Михайлович – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ermola.e@tut.by

Голубович Владимир Петрович – д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: golubovich@iboch.by

Information about the authors

Yegor S. Pustyl'ga – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zeroed.inside@gmail.com

Olga V. Gribovskaya – Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olymelnik@yandex.ru

Eugeny M. Ermola – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ermola.e@tut.by

Vladimir P. Golubovich – D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: golubovich@iboch.by