ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.1 615.4:616-71/-78
https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-303-308

Поступило в редакцию 11.03.2021
Received 11.03.2021

Е. С. Пустюльга[1], О. В. Грибовская[1], Е. М. Ермола[1], В. П. Голубович[1], член-корреспондент А. Г. Мойсеёнок[2]

[1]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Республика Беларусь

ОЦЕНКА СЕЛЕКТИВНОСТИ СОРБЕНТОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ IgG НА ОСНОВЕ ТРИПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ

Аннотация. Созданы биоспецифические сорбенты для удаления IgG и подклассов из биологических жидкостей на основе олигопептидов, содержащих остатки ароматических аминокислот. Проведена оценка селективности специфических сорбентов по отношению к IgM, IgE и белкам плазмы крови. Обнаружено, что созданные сорбенты проявляют низкую активность к общему белку плазмы крови, альбумину, IgM, IgE и высоко специфичны к IgG.

Ключевые слова: сорбция, сорбенты, иммуноглобулины, пептидные лиганды, белки плазмы, альбумин

Для цитирования. Оценка селективности сорбентов для связывания IgG на основе трипептидных лигандов / Е. С. Пустюльга [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 303–308. https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-303-308

Yegor S. Pustsyulga[1], Olga V. Gribovskaya[1], Eugeny M. Ermola[1], Vladimir P. Golubovich[1], Corresponding Member Andrey G. Moiseenok[2]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Science of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

EVALUATION OF THE SELECTIVITY OF SORBENTS FOR IgG BINDING BASED ON TRIPEPTIDE LIGANDS

Abstract. Biospecific sorbents for the removal of IgG and subclasses from biological fluids based on oligopeptides, containing aromatic amino acid residues, were created. The selectivity properties of specific sorbents for IgM, IgE, and plasma proteins were evaluated. It was found that the created sorbents exhibit the low activity to the total plasma protein, albumin, IgM, IgE and are highly specific for IgG.

Keywords: adsorption, sorbents, immunoglobulins, peptide ligands, plasma proteins, albumin

For citation. Pustsyulga Y. S., Gribovskaya O. V., Ermola E. M., Golubovich V. P., Moiseenok A. G. Estimation of the selectivity of sorbents for IgG binding based on tripeptide ligands. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 3, pp. 303–308 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-303-308

Введение. Как известно, именно иммуноглобулины класса G (IgG) и их подклассы могут быть патогенными при ряде аутоиммунных заболеваний, таких как дилатационная кардиомиопатия, системная красная волчанка, пиело- и гломерулонефрит [1; 2]. Для лечения многих аутоиммунных заболеваний применяются сорбенты, связывающие IgG человека.

Подобный подход эффективен в лечении острых стадий заболеваний, связанных с избыточной концентрацией или накоплением IgG в биологических жидкостях организма [3].

В последние годы были разработаны различные виды высокоэффективных сорбентов медицинского назначения, способные связывать IgG [4; 5]. Однако они имеют ряд недостатков, таких как высокая стоимость и сложность в изготовлении.

На данный момент большой интерес представляют короткие лиганды на основе ди- или трипептидов, которые просты в синтезе и более дешевы в производстве [6].

Ранее в этом направлении нами был проведен теоретический поиск лигандов на основе аминокислот и пептидов, проявляющих высокую энергию связывания с Fc-фрагментами IgG раз-

личных подклассов [7]. Было выявлено, что сорбенты на основе коротких пептидов, в структуре которых присутствуют остатки ароматических аминокислот фенилаланина и триптофана, показывают высокие результаты связывания общего IgG из плазмы. Также были проведены исследования полученных сорбентов на селективность к подклассам IgG [8] и сорбционную емкость [9]. Представленные сорбенты показали высокую избирательность к подклассам IgG1 и IgG3 и высокую насыщаемость.

Целью данной работы является оценка селективности ряда образцов сорбентов к общему белку плазмы и другим классам иммуноглобулинов, так как эти свойства одни из наиболее важных показателей воздействия сорбентов на плазму крови.

Материалы и методы иследования. Функциональную оценку связывания иммуноглобулинов полученными ранее образцами сорбентов проводили посредством иммуноферментного анализа [10]. Для установления сорбционных качеств к общему IgG, IgE и IgM экспериментальных образцов сорбентов был проведен анализ с использованием наборов «IgG общий – ИФА–БЕСТ», «IgE общий – ИФА–БЕСТ», «IgM общий – ИФА–БЕСТ» фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия).

Для определения степени связывания исследуемых образцов сорбентов с Fc-фрагментами иммуноглобулинов использовали твердофазный метод иммуноанализа, основанный на принципе «сэндвич» [10].

Статические эксперименты проводили с плазмой с присутствием в качестве антикоагулянта цитрата натрия. Перед экспериментом плазму предварительно центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. Образцы сорбентов объемом 0,05 мл инкубировали в 1,0 мл плазмы в течение 30 мин при температуре 37 °C.

Концентрация антител определялась фотометрически с помощью иммуноферментного анализатора iMark фирмы BioRad (США) при длине волны 450 нм (референс 620–655 нм).

Количество сорбированного общего IgG, IgE, IgM и белка рассчитывали по разнице количества свободных антител в контрольной плазме в сравнении с концентрацией свободных антител в плазме, подвергавшейся воздействию сорбентов.

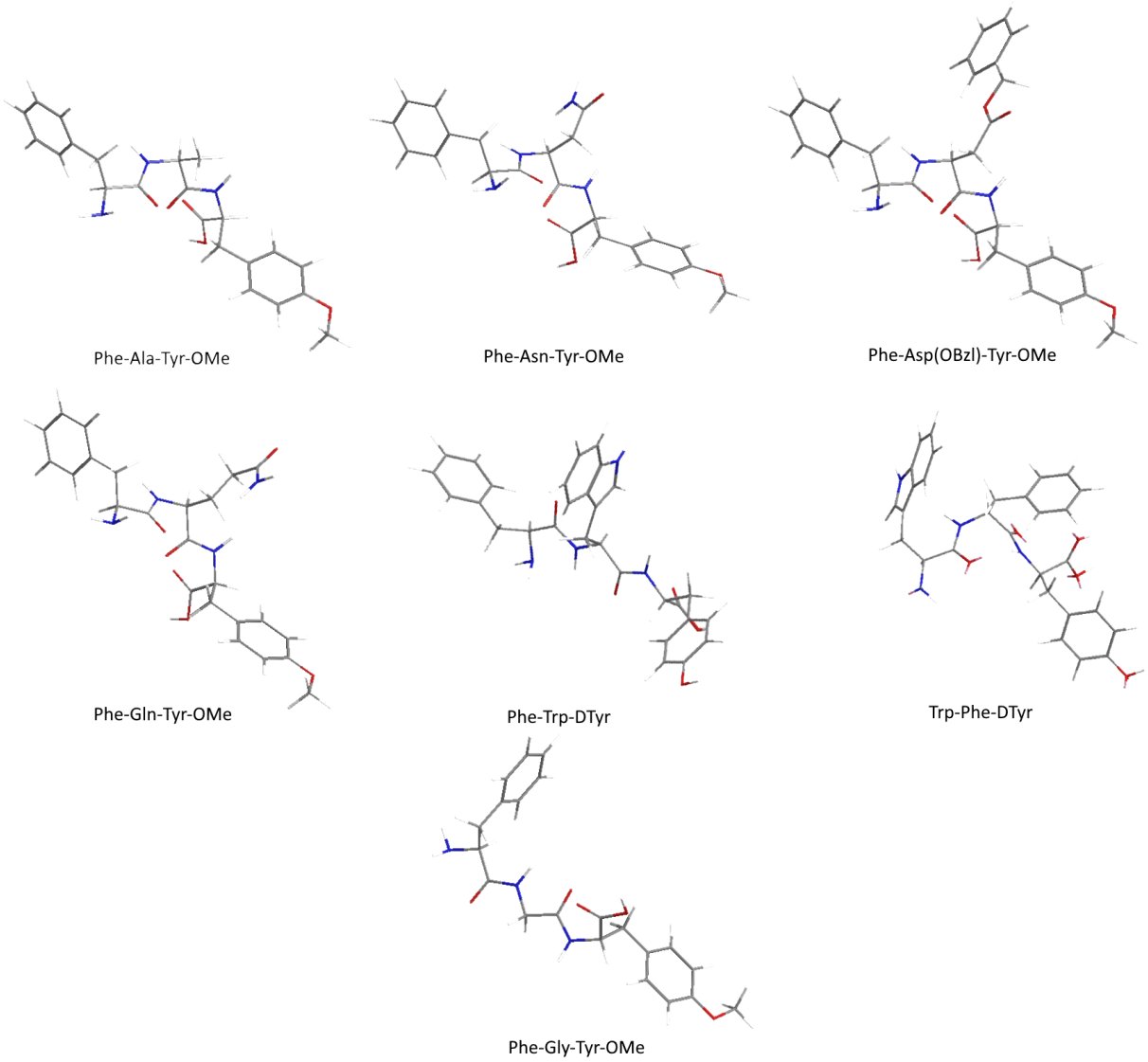
Селективность рассчитана в процентах как отношение количества удаленных из плазмы иммуноглобулинов к количеству удаленного общего белка. Количество белка в образцах определяли по методу Лоури [11]. Метод основывается на реакции белков с солями меди(II) в щелочном растворе и восстановлении реактива Фолина с образованием окрашенных продуктов, что количественно определялось фотометрически. Интенсивность окраски образцов определяли по оптической плотности при длине волны 750 нм. По оптической плотности стандартных растворов строили калибровочный график и определяли концентрацию общего белка в исследуемых образцах по калибровочной кривой.

Результаты и их обсуждение. На данный момент исследования селективности к подклассам IgG были проведены на семи олигопептидных лигандах: Trp-Phe-*D*Tyr, Phe-Trp-*D*Tyr, Phe-Asn-Tyr-OMe, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe, Phe-Ala-Tyr-OMe и Phe-Gly-Tyr-OMe (рисунок).

Характерной особенностью большинства приведенных лигандов является защищенная карбоксильная группа тирозина, что представляет собой своеобразную защиту от биодеградации протеазами. Входящие в состав лигандов аминокислотные остатки триптофана, фенилаланина и тирозина выступают во взаимодействиях «смешанного типа», т. е. связывание целевого белка происходит за счет комбинации гидрофобных, π-стэкинг, водородных связей и электростатических взаимодействий.

Таким образом находящиеся в составе ароматические аминокислоты могут обеспечивать высокую степень связывания с Fc-фрагментом иммуноглобулинов G. Как уже было показано ранее аминокислотные остатки Ala, Asn, Asp, Glnи Gly обеспечивают свойства селективности. Сущность работы данного механизма может быть связана со стерическими свойствами самих лигандов.

В результате проведенных экспериментов выявлено, что селективность образцов к IgG находится в пределах от 69,27 до 75,94 %, что является показателем высокой селективности (табл. 1).



Структуры олигопептидных лигандов для связывания IgG

Structures of oligopeptide ligands for IgG binding

Т а б л и ц а 1. **Селективность образцов сорбентов к IgG**

T a b l e 1. **Selectivity of sorbent samples to IgG**

Олигопептидный лиганд Oligopeptide ligand	Сорбированный IgG (мг) Sorbed IgG (mg)	Сорбированный общий белок (мг) Sorbed total protein (mg)	Селективность (%) Selectivity (%)
Trp-Phe-*D*Tyr	9,04	13,05	69,27
Phe-Trp-*D*Tyr	10,13	13,34	75,94
Phe-Asn-Tyr-OMe	8,30	11,51	72,11
Phe-Gln-Tyr-OMe	8,91	13,23	67,35
Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe	8,51	11,45	74,32
Phe-Ala-Tyr-OMe	8,42	11,12	75,72
Phe-Gly-Tyr-OMe	8,37	11,05	75,75

Данные табл. 1 показывают, что наибольшую селективность проявляет образец на основе Phe-Trp-*D*Tyr – 75,94 %.

В результате проведенных статических экспериментов было выявлено, что сорбционные свойства экспериментальных образцов сорбентов к IgM низкие, в пределах от 0,73 до 2,46 мг при общем количестве IgM в контрольной плазме, составляющем 10,91 мг (от 6,56 до 19,88 %).

Минимум сорбированного IgM показали образцы на основе Phe-Asn-Tyr-OMe и Phe-Ala-Tyr-OMe, что составило для обоих образцов 0,73 мг IgM. Наиболее высокие показатели характерны для трипептидов Phe-Trp-*D*Tyr, Trp-Phe-*D*Tyr и составляют 2,15 и 2,08 мг сорбированного IgM (табл. 2). Подобный результат может объясняться тем, что при высокой активности к IgG созданные трипептиды имеют достаточно высокий уровень активности к IgM, что может зависеть от аминокислотного состава самих трипептидных лигандов.

Т а б л и ц а 2. **Селективность образцов сорбентов к IgM**

T a b l e 2. **Selectivity of sorbent samples to IgM**

Олигопептидный лиганд Oligopeptide ligand	Сорбированный IgM (мг) Sorbed IgM (mg)	Сорбированный общий белок (мг) Sorbed total protein (mg)	Селективность (%) Selectivity (%)
Trp-Phe-*D*Tyr	2,08	13,05	15,94
Phe-Trp-*D*Tyr	2,15	13,34	16,12
Phe-Asn-Tyr-OMe	0,73	11,51	6,34
Phe-Gln-Tyr-OMe	2,63	13,23	19,88
Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe	1,86	11,45	16,24
Phe-Ala-Tyr-OMe	0,73	11,12	6,56
Phe-Gly-Tyr-OMe	0,85	11,05	7,69

Селективность экспериментальных образцов сорбентов к IgE определялась в процентном отношении. Расчет велся относительно количества IgE в контрольной плазме (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. **Селективность образцов сорбентов к IgE**

T a b l e 3. **Selectivity of sorbent samples to IgE**

Олигопептидный лиганд Oligopeptide ligand	IgE (ME)	% сорбированного IgE % sorbed IgE
Phe-Asn-Tyr-OMe	2,15	3,33
Phe-Trp-*D*Tyr	10,59	16,42
Phe-Gly-Tyr-OMe	10,79	16,73
Phe-Ala-Tyr-OMe	11,69	18,13
Trp-Phe-*D*Tyr	13,29	20,61
Phe-Gln-Tyr-OMe	11,59	17,97
Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe	14,89	23,09

По результатам ИФА установлено, что количество IgE в 1 мл контрольной плазмы составляло 64,49 МЕ. Образцами Phe-Asn-Tyr-OMe и Phe-*D*Tyr сорбировано наименьшее количество IgE (3,33 и 9,04 % соответственно), что показывает почти полное отсутствие активности в отношении IgE. Образцы на основе Phe-Arg-Tyr-OMe, Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe и Trp-Phe-*D*Tyr сорбировали наибольшее количество IgE (23,09, 23,71 и 20,61 % соответственно), что дает повод считать результаты связывания опытными образцами IgE очень хорошими.

Механизм избирательного связывания сорбентами IgG относительно IgM и IgE пока не найден, однако может объясняться различиями константных доменов этих иммуноглобулинов. Так, тяжелые цепи IgM и IgE содержат дополнительный домен С, который заменяет шарнирную область, существующую у IgG. Таким образом можно предположить, что способность лигандов избирательно связывать IgG может быть объяснена структурными различиями внутри классов самих иммуноглобулинов.

Достигнутая селективность сорбции IgG открывает возможность новых технологий устранения токсических иммуноглобулинов из кровотока, а также получения противобактериальных и антивирусных антител в качестве лечебных препаратов.

Заключение. Выявлено, что все экспериментальные образцы сорбентов проявляют селективность к IgG относительно общего белка не менее 67 %, что является высоким показателем. Установлено, что селективность экспериментальных образцов к IgM низкая, в пределах от 6 до 20 %, а также, что сорбционные качества образцов сорбентов к IgE низкие, в пределах от 3 до 24 % сорбированного IgE.

Список использованных источников

1. Иммуносорбция в лечении дилатационной кардиомиопатии / К. И. Бардахивская [и др.] // Эфферентная и физ.-хим. медицина. – 2012. – № 3. – С. 7–10.

2. Батаева, Е. П. Состояние гуморального иммунитета у детей при пиело- и гломерулонефрите / Е. П. Батаева, Ю. А. Витковский // Забайкальск. мед. вестн. – 2010. – № 1. – С. 30–33.

3. Auto-immune disorders treated with therapeutic apheresis / R. Bambauer [et al.] // Immunol. Res. Ther. – 2017. – Vol. 1, N 1. – P. 111–131.

4. Novel Peptide ligand with high binding capacity for antibody purification / L. N. Lund [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2012. – Vol. 1225. – P. 158–167. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.074

5. Performance of hexamer peptide ligands for affinity purification of immunoglobulin G from commercial cell culture media / A. D. Naik [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2011. – Vol. 1218, N 13. – P. 1691–1700. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.071

6. Афинные гемосорбенты на основе ароматических пептидов для связывания иммуноглобулинов класса G / П. А. Левашов [и др.] // Биоорг. хим. – 2015. – Т. 41, № 5. – С. 553–558. https://doi.org/10.7868/s0132342315040089

7. Молекулярный докинг лигандов перспективных для сорбции IgG из биологических жидкостей / Е. С. Пустюльга [и др.] // Вес. 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

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

9. Тестирование экспериментальных образцов сорбентов на основе ароматических пептидов / Е. С. Пустюльга [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 465–472. https://doi. org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-465-472

10. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров [и др.] – М., 1991. – 288 с.

11. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6

References

1. Bardakhivskaya K. I., Nikolayev V. G., Uvarov V. Y., Tsimbalyuk R. S., Ivanyuk A. A. Immunoadsorption in the treatment of dilated cardiomyopathy. *Efferentnaya i fiziko-khimicheskaya meditsina* [Efferent and physicochemical medicine], 2012, no. 3, pp. 7–10 (in Russian).

2. Bataeva E. P., Vitkovskiy Yu. A. The state of humoral immunity in children with pyelo- and glomerulonephritis. *Zabaikal'skii meditsinskii vestnik* [Zabaikalsky medical bulletin], 2010, no. 1, pp. 30–33 (in Russian).

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. Lund L. N., Gustavsson P. E., Michael R., Lindgren J., Norskov-Lauritsen L. Lund M., Houen G., Staby A., Hilaire Ph. M. St. Novel Peptide ligand with high binding capacity for antibody purification. *Journal of Chromatography A*, 2012, vol. 1225, pp. 158–167. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.074

5. 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, no. 13, pp. 1691–1700. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.071

6. Levashov P. A., Ovchinnikova E. D., Fried D. A., Azmuko A. A., Afanasjeva M. I., Kotkina T. I., Afanasjeva O. I., Adamova I. Y., Pokrovsky 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/10.1134/s1068162015040081

7. Pustsyulga Y. S., Gribovskaya O. V., Ermola E. M., Golubovich V. P. Molecular docking of ligands promising for IgG sorption from biological fluids. *Vestsi Natsyyanal'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

8. 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. *Vestsi Natsyyanal'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

9. Pustsyulga Y. S., Gribovskaya O. V., Ermola E. M., Golubovich V. P. Testing of experimental samples of sorbents based on aromatic peptides. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2020, vol. 56, no. 4, pp. 465–472 (in Russian). https://doi.org/ 10.29235/1561-8331-2020-56-4-465-472

10. Egorov A. M., Osipov A. P., Dzantiev B. B., Gavrilova E. M. *Theory and practice of enzyme immunoassay.* Moscow, 1991. 288 p. (in Russian).

11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6

Информация об авторах

Пустюльга Егор Сергееевич – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zeroed.inside@gmail.com.

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

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

Голубович Владимир Петрович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: golubovich@iboch.by.

Мойсеёнок Андрей Георгиевич – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (б-р Ленинского комсомола, 50, 230030, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: andrey.moiseenok@tut.by.

Information about the authors

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

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

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

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

Moiseenok Andrey G. – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Professor. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Science of Belarus (50, Leninsky Komsomol boulevard, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: andrey.moiseenok@tut.by.