



ČIŠČENJE IMUNOGLOBULINA G IZ SIROTKE IN NJEGOVA STABILIZACIJA / PURIFICATION OF IMMUNOGLOBULIN G FROM WHEY AND ITS STABILIZATION

Jernej Oberčkal¹, Bojana Bogovič Matjašić¹
¹Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Institut za mlekarstvo in probiotike, Domžale, Slovenija, jernej.oberckal@bf.uni-lj.si



UVOD / INTRODUCTION

Imunoglobulin G (IgG) je glavni imunoglobulin v krvjem mleku. V zrelem mleku doseže koncentracije do 0,7 g/L, v kolostromu pa celo do 32 – 212 g/L (Gapper et al., 2017). Pri koagulaciji kazeinov se del IgG obori ali veže na kazeine. V sirotki so koncentracije zato nižje kot v mleku. Mlečni imunoglobulini ščitijo tako mlečno žlezo kot tudi tele pred okoljskimi patogeni in toksini, ko še nima razvitega imunskega sistema. Protimikrobeno delovanje IgG pa se uporablja tudi v prehranskih dopolnilih in krmih. Molekule IgG so zaradi občutljive in razvezane 3D-strukture podvržene agregaciji in so zaradi tega nestabilne pri daljšem hranjenju ali zamrzovanju. V komercialnih proizvodih proizvajalci v produkte z deklarirano aktivnostjo dodajajo stabilizatorje, npr. glicerol, NaCl, saharozu in BSA. Problem je predvsem pomemben v farmaciji pri proizvodnji bioloških zdravil, ki morajo zaradi intravenoznega vnašanja biti brez agregatov. Park in sod. (2013) so ugotovili, da dodatek 4 % manitola in 2 % saharoze pri pH 5 preprečuje agregiranje in podaljša stabilnost formulacij monoklonskih IgG.

Immunoglobulin G (IgG) is the major immunoglobulin in bovine milk. It reaches concentrations of up to 0.7 g/L in mature milk and up to 32–212 g/L in colostrum (Gapper et al., 2017). In the process of casein coagulation, part of the IgG seems to precipitate or bind to caseins. IgG concentrations in whey are thus lower than in milk. Immunoglobulins in milk protect both the mammary gland and the calf from environmental pathogens and toxins when the calf's immune system is not yet developed. The antimicrobial activity of IgGs is utilized also in food supplements and animal feed. IgG molecules are subject to aggregation due to their delicate and branched 3D structure and are therefore unstable during prolonged storage or freezing. In commercial products, manufacturers add stabilizers (e.g., glycerol, NaCl, sucrose, and BSA) to products with declared IgG activity. The problem of aggregation is particularly prominent in the production of biologic drugs, which must be free of aggregates due to intravenous administration. Park et al. (2013) found that the addition of 4% mannitol and 2% sucrose at pH 5 prevented IgG aggregation and prolonged the stability of monoclonal IgG formulations.

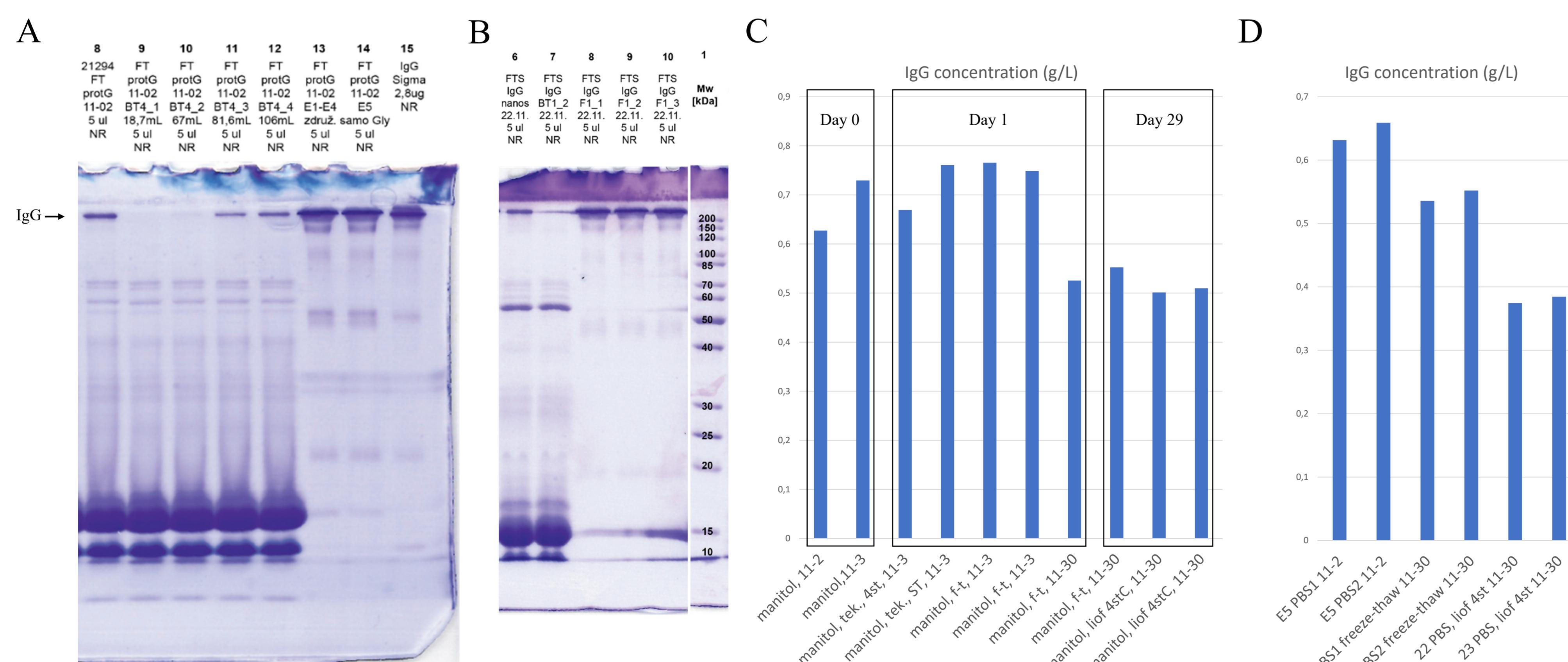
METODE DELA

Iz 100 do 200 mL osiromašene kisle (FT) in sladke sirotke (FTS) smo s protein G-afinitetno kromatografijo z uporabo monolitne kolone CIMmultus™-r protein G-1 v več poskusih izolirali IgG. Interakcija IgG s proteinom G je odvisna od pH, zato smo eluirali z glicinom pri pH 2. Elucijskim frakcijam smo umerili pH na višjo vrednost in nekaterim dodali fosfatni pufer in NaCl (PBS) ali raztopino NaCl, manitola in saharoze. Frakcije smo nato skladiščili pri različnih pogojih (liofilizacija, v tekočem stanju pri različnih temperaturah in z več cikli zamrzovanja in odmrzovanja), nato pa izmerili koncentracijo z analitsko protein G-afinitetno HPLC in z vizualnim opazovanjem spremljali pojav agregatov v raztopinah.

REZULTATI IN DISKUSIJA

Slika 3 (A in B) prikazuje analizo FT (A) in FTS (B), pripadajočih nevezanih frakcij, elucij in komercialnega IgG (Sigma-Aldrich) z SDS-PAGE. Slika 3 (C in D) prikazuje koncentracijo IgG ob različnih dnevih v frakcijah z dodanim manitolom in brez manitola ter z različnimi načini skladiščenja: tekoče pri 4 °C, tekoče pri sobni temperaturi (ST), pri zamrzovanju in odmrzovanju (f-t, freeze-thaw) in liofilizaciji.

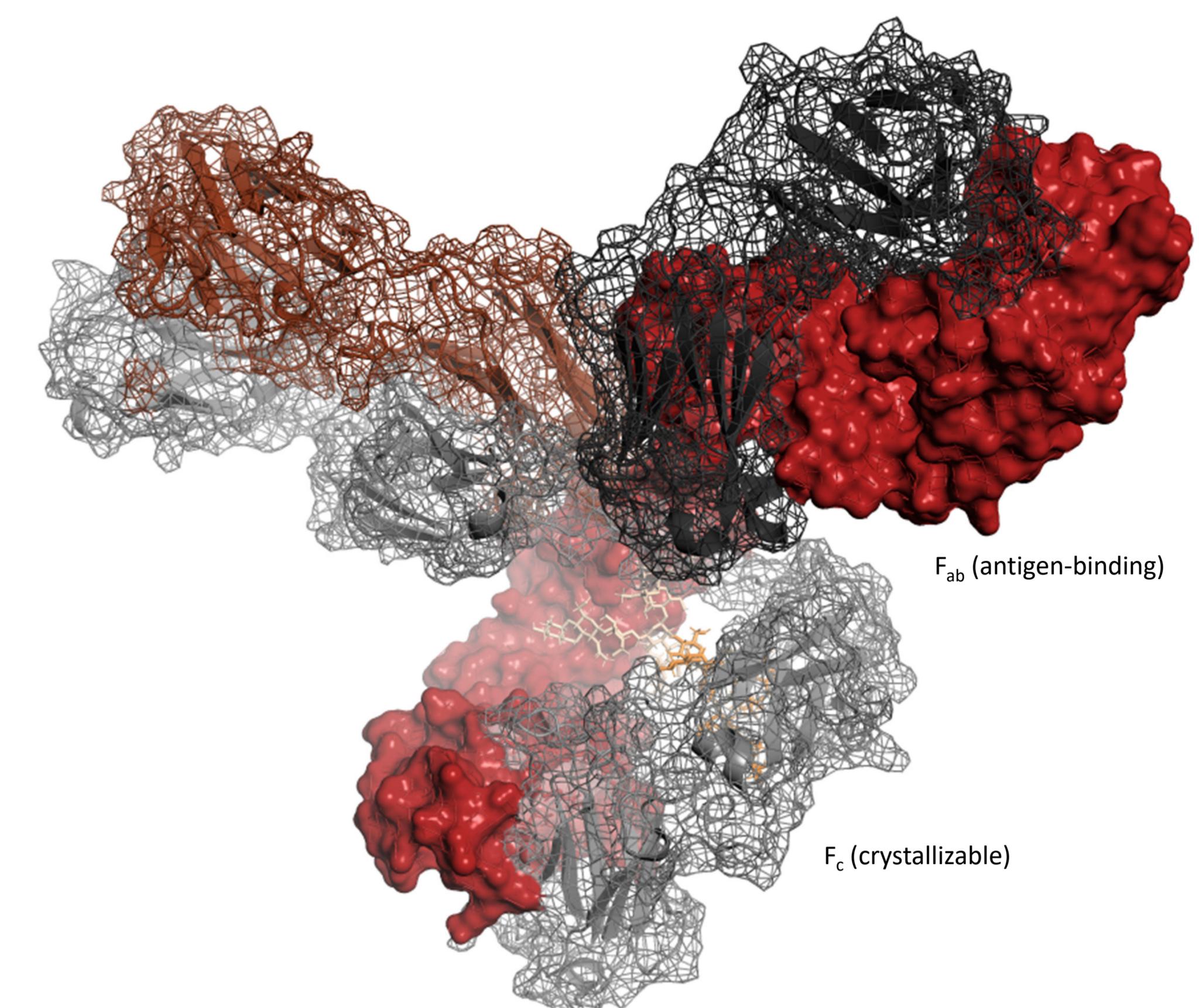
Izmerjena koncentracija IgG (Slika 3, C in D) je bila bolj odvisna od dneva meritve kot od razlike med vzorci, kar nakazuje, da uporabljena metoda ni zanesljiva. Vseeno smo lahko med sabo primerjali koncentracije različnih vzorcev na isti dan merjenja. V FT in FTS smo izmerili podobno koncentracijo IgG (v FT 0,089 g/L in v FTS 0,085 g/L). V nevezanih frakcijah pri nalaganju sirotke nismo opazili IgG, torej se je ves IgG zadržal na koloni (Slika 1, levo). Preboj IgG smo dosegli pred nanosom 105 mL FTS, predvidoma pri enakem volumnu kot v kisli sirotki (80 mL, naši predhodni rezultati) glede na podobno koncentracijo IgG. Kolona se je nasičila z IgG pri nanosu 157 do 186 mL FTS. Pri nanašanju večjega volumna se koncentracija v nevezanih frakcijah več ni povečevala in ni presegla koncentracije v nanešenem FTS, kot smo opazili z nekaterimi drugimi proteini in drugimi kolonami CIMmultus™. Dodatek manitola, saharoze in NaCl (in v primeru izolacije iz FTS tudi dodatek le acetatnega pufra) je stabiliziral mlečni IgG pri liofilizaciji in odmrzovanju/zamrzovanju do te mere, da ni bilo jasne razlike v koncentraciji med različnimi obdelavami vzorcev. Le glicin ali kombinacija glicina in PBS nista stabilizirala IgG pri liofilizaciji ali zamrzovanju/odmrzovanju: IgG se je pri tem delno oboril.



Slika 3/Figure 3:

A, B: Analiza vhodne kisle sirotke (A–FT in B–FTS), nevezanih frakcij, elucij in komercialnega IgG (Sigma-Aldrich) z SDS-PAGE. C: koncentracija IgG v frakcijah z manitolom. D: koncentracija IgG v frakcijah brez manitola.

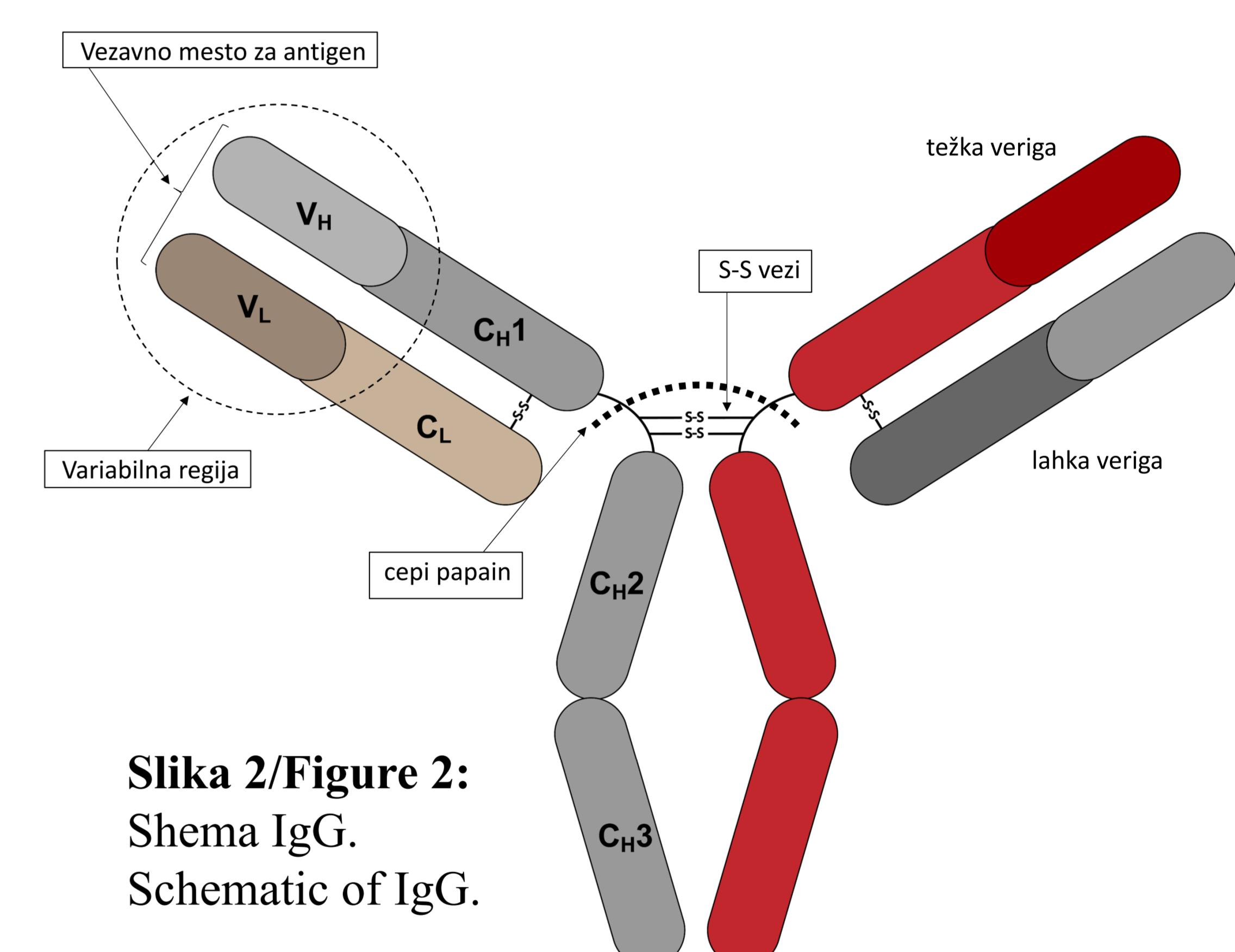
A, B: Analysis of input acid whey (A–FT, B–FTS), unbound fractions, elutions, and commercial IgG (Sigma-Aldrich) by SDS-PAGE. Middle: IgG concentration in mannitol fractions. Right: IgG concentration in mannitol-free fractions.



Slika 1/Figure 1:

Mišji IgG1 (datoteka PDB 1IGY) (Harris in sod., 1998), vizualizirano s Pymol.

Mouse IgG1 (PDB entry 1IGY) (Harris et al., 1998), visualised with Pymol.



Slika 2/Figure 2:
Shema IgG.
Schematic of IgG.

ZAKLJUČKI/CONCLUSIONS

Uspešno smo izolirali zelo čist IgG iz obeh vrst osiromašene sirotke. Kolona CIMmultus™-r protein G-1 je zaradi mašenja (predvidoma s hidrofobnimi nečistotami) manj primerna za izolacijo snovi iz sladke sirotke. Pri izolaciji iz kisle sirotke takšnega mašenja nismo opazili. Dodatek manitola in saharoze ali le acetatnega pufra zavaruje mlečni IgG pred agregacijo in je torej smiseln, če želimo proizvajati formulacijo z aktivnim IgG.

We successfully isolated very pure IgG from both types of depleted whey. The CIMmultus™-r protein G-1 column is less suitable for isolation of substances from sweet whey due to clogging (presumably by hydrophobic impurities). No such clogging was observed when isolating from acid whey. The addition of mannitol and sucrose or only acetate buffer protects milk IgG from aggregation and is therefore useful if we want to prepare a formulation with active IgG.

Zahvala/Acknowledgements:

Raziskava je bila sofinancirana s projektom LIFE for Acid Whey (št. pogodbe LIFE16 ENV/SI/000335) evropskega finančnega instrumenta LIFE in projektom LAKTIKA (št. pogodbe OP20.03521) Operativnega programom EKP 2014 – 2020.

This research was co-funded by the project LIFE for Acid Whey (contract No. LIFE16 ENV/SI/000335) of the European financial instrument LIFE and the project LAKTIKA (contract No. OP20.03521) in the frame of the Operational Programme ECP 2014 – 2020.

Viri/References

Gapper, L.W., et al., Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 93–109 (2007).
 Harris, L.J., et al., Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody, *J. Mol. Biol.* 275, 861–872 (1998).
 Park, J., et al., Effect of pH and excipients on structure, dynamics, and long-term stability of a model IgG1 monoclonal antibody upon freeze-drying, *Pharm. Res.* 30, 968–984 (2013).

