

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Purificação de Anticorpos Monoclonais Anti-TNP do Isotipo
IgG₁ Utilizando Cromatografia em Membranas de Afinidade
com Íons Metálicos Imobilizados**

Eng^a Gisele Serpa

Mestranda

Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas, São Paulo

Dezembro de 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	Re
Nº CHAMADA	TIUNICAMP
	Se 67p
V	EX
TOMBO DCI	52373
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00179785-7

SIB ID 279890

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

Se 66p Se 67p	<p>Serpa, Gisele</p> <p>Purificação de anticorpos monoclonais anti-TNP do isotipo IgG₁ utilizando cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados / Gisele Serpa.--Campinas, SP: [s.n.], 2002.</p> <p>Orientadora: Sônia Maria Alves Bueno.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Anticorpos monoclonais - Purificação. 2. Cromatografia de afinidade. 3. Íons metálicos. 4. Membranas (Tecnologia). I. Bueno, Sônia Maria Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.</p>
-----------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

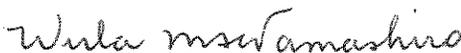
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processo Biotecnológicos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Purificação de Anticorpos Monoclonais Anti-TNP do Isotipo IgG₁ Utilizando Cromatografia em Membranas de Afinidade com Íons Metálicos Imobilizados, defendida por Gisele Serpa e aprovada em 10 de dezembro de 2002 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



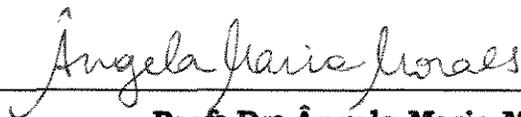
Prof^a Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno - Orientadora
Universidade Estadual de Campinas - FEQ



Prof^a Dr^a. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro
Universidade Estadual de Campinas - IB



Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Universidade Estadual de Campinas - FEQ



Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes
Universidade Estadual de Campinas - FEQ

200306087

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Eng^a Química Gisele Serpa e aprovada pela comissão julgadora em 10 de dezembro de 2002.



Orientadora: Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno

Mesmo que cada letra contida nas palavras desta dissertação fosse um diamante, ela não seria valiosa o suficiente para retribuir todo o amor, companheirismo e amizade que recebo das minhas maiores jóias....

Minha mãe, Ingelora Serpa e minha irmã, Patrícia

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registrado aqui o meu mais profundo agradecimento àqueles que de alguma forma contribuíram para esta conquista, em especial:

À Deus, o companheiro fiel das horas fáceis e difíceis.

À minha mãe Ingelora e à minha irmã Patrícia, que embora distantes, se faziam presentes em todos os minutos destes últimos 2 anos.

À minha "oma" Irmgard, que sempre me ensinou a confiar em Deus.

À Profa Dra Sônia Maria Alves Bueno, pela paciência e competência na orientação deste trabalho.

À Profa Dra Wirla M. S. C. Tamashiro e ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

À Dra Elizabeth F. P. Augusto e aos integrantes de sua equipe de pesquisa, em especial à Maria Gabriela, do Agrupamento de Biotecnologia do IPT de São Paulo, pelo fornecimento do sobrenadante de cultura celular e execução dos testes ELISA, necessários para a realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório da DPB: Adriano, Antenor, Cristiane, Elaine, Érika, Gilson, Isa, Kátia, Luciana, Mariana, Neemias, Oselys, Paula, Rachel, Romi e Rosana.

Às amigas do laboratório de Imunologia Celular e Inflamação. Dirce e Lôren, pela ajuda em algumas etapas deste trabalho.

Às minhas duas novas irmãs, Joyce e Carol, que me receberam em sua casa e compartilharam comigo cada momento destes 2 anos.

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“O Senhor é meu Pastor e nada me faltará”

RESUMO

Anticorpos monoclonais são imunoglobulinas secretadas por uma célula híbrida, chamada hibridoma, que é formada pela fusão de um linfócito (produtor de anticorpos) e uma célula de mieloma, o que faz do hibridoma uma célula produtora de anticorpos virtualmente imortal. Os anticorpos monoclonais têm sido utilizados nas áreas analítica e terapêutica, o que implica na necessidade de obtenção de anticorpos de alta pureza. Muitos estudos têm sido realizados visando a purificação de anticorpos monoclonais, e destacam-se as técnicas de adsorção seletiva, como as cromatografias de troca iônica, hidrofóbicas e de afinidade. Neste trabalho aplicou-se a cromatografia em membranas de álcool polietileno-vinílico, derivatizadas com ácido iminodiacético (IDA), com íons metálicos imobilizados na purificação de anticorpos monoclonais IgG₁ a partir de sobrenadante de cultura celular. Para determinar as melhores condições de adsorção e eluição, foram testados os íons Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺, na presença de diferentes sistemas tamponantes. A seletividade dos metais, em cada um dos sistemas, foi determinada através de eletroforese SDS-PAGE e testes ELISA das frações dos picos de proteína obtidos. A melhor condição de purificação foi a alimentação de sobrenadante de cultura celular previamente precipitado e dialisado com solução de sulfato de amônio, em coluna contendo PEVA-IDA-Zn²⁺, em presença de tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,0 e eluição por aumento de concentração de Tris. A partir das isotermas de adsorção, determinou-se a capacidade máxima de adsorção e a constante de dissociação do complexo IDA-Zn²⁺-IgG₁ que de acordo com o ajuste dos parâmetros pelo modelo de Langmuir, mostraram uma alta capacidade de adsorção (63,4 mg/g de membrana seca) e uma constante de dissociação (8,1x10⁻⁶ M) característica de sistemas de média afinidade. Foram também determinadas as curvas de ruptura para o processo proposto, através de experimentos de filtração a diferentes vazões de alimentação, utilizando um módulo contendo as fibras ocas com Zn²⁺ imobilizado, construído em nosso laboratório.

Palavras chave: anticorpos monoclonais, IgG₁, IMAC, membranas de afinidade.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies are immunoglobulins produced by a hybrid cell called hybridoma. These cells result from the fusion of lymphocytes with malignant myeloma cells. Hybridomas cells express both the lymphocyte's property of specific-antibody production and the immortal character of the myeloma cells. Monoclonal antibodies have been used in analytical and therapeutical areas. This application needs highly pure antibodies. Many techniques have been studied focusing monoclonal antibodies purification. These techniques include ion exchange, hydrophobic and affinity chromatography. In this study, we applied polyethylenevinyl alcohol (PEVA) membranes in the purification of monoclonal antibody from cell culture supernatant. These membranes were derivatized with the quelant agent, iminodiacetic acid (IDA). We evaluated the adsorption and purification of monoclonal antibodies on the matrix with different immobilized metal ions, Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} and Co^{2+} and with different buffers. According to SDS-PAGE electrophoresis and ELISA analysis, the higher selectivity was obtained in the presence of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7,0 and with elution by increasing Tris concentration, with immobilized Zn^{2+} , which provided the purification of IgG with traces of albumin. The adsorbent capacity and the dissociation constant of the complex IDA- Zn^{2+} -IgG₁ were determined from adsorption isotherms. According to the Langmuir model, the results indicated that the matrix presents high adsorption capacity (63,4 mg/g de dry membrane) and a dissociation constant ($8,1 \times 10^{-6}$ M) characteristic for intermediate affinity systems. We also evaluated the breakthrough curves for PEVA-IDA- Zn^{2+} membrane chromatography for the antibodies purification using different flow rates. These breakthrough curves are important to scale up procedure.

Keywords: monoclonal antibodies, IgG₁, IMAC, affinity membranes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ANTICORPOS MONOCLONAIS E SUA RELEVÂNCIA	1
1.2	OBJETIVO	4
2	REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1	ANTICORPOS MONOCLONAIS	7
2.2	PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS	10
2.2.1	Pré-Purificação.....	11
2.2.2	Purificação através de técnicas de adsorção seletiva	12
2.3	CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS	
	IMOBILIZADOS (IMAC)	18
2.3.1	Matriz cromatográfica.....	19
2.3.2	Ativação da matriz e imobilização do agente quelante	20
2.3.3	Íon metálico	22
2.3.4	Mecanismos de adsorção e dessorção.....	23
2.4	CROMATOGRAFIA EM MEMBRANAS DE AFINIDADE	25
2.4.1	Utilização das membranas em cromatografia de afinidade.....	28
2.5	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	29
2.6	CURVAS DE RUPTURA	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	MATERIAIS	35
3.1.1	Reagentes	35
3.1.2	Anticorpos Monoclonais.....	35
3.1.3	Membranas de álcool polietilenovinílico (PEVA).....	36
3.2	MÉTODOS	37
3.2.1	Preparação do sobrenadante de cultura celular	37
3.2.2	Troca de Tampão.....	38
3.2.3	Ultrafiltração.....	38
3.2.4	Ativação das fibras ocas de PEVA.....	38
3.2.5	Imobilização do agente quelante IDA.....	39
3.2.6	Determinação da quantidade de metal imobilizado	39

3.2.7	Quantificação de proteína total	39
3.2.8	Quantificação de IgG1	40
3.2.9	Titulação de IgG ₁	40
3.2.10	Eletroforese SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate Poly(Acrylamide) Gel Electrophoresis).....	42
3.2.11	Focalização Isoelétrica (IEF)	42
3.2.12	Experimentos cromatográficos com membranas PEVA-IDA-Me ²⁺ finamente cortadas.....	42
3.2.13	Verificação do desprendimento do metal da coluna.....	44
3.2.14	Purificação de IgG ₁ em duas etapas cromatográficas.....	45
3.2.15	Purificação de IgG ₁ em gel de Sepharose - Proteína G	45
3.2.16	Isotermas de Adsorção.....	46
3.2.17	Determinação das Curvas de Ruptura.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	PREPARAÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA CELULAR ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO	53
4.2	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO DE AGENTE QUELANTE NAS MEMBRANAS	54
4.3	INFLUÊNCIA DO SISTEMA TAMPONANTE NA PURIFICAÇÃO DE IGG₁ A PARTIR DE SOBRENADANTE DE CULTURA CELULAR PRECIPITADO E DIALISADO	56
4.3.1	Tampão Fosfato de Sódio.....	57
4.3.2	Tampão Mops contendo imidazol	60
4.3.3	Tampão Tris-HCl.....	64
4.3.4	Comparação entre os diferentes sistemas tamponantes	67
4.4	ESTUDO COMPARATIVO DA PURIFICAÇÃO DE IGG₁ A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTAÇÃO	69
4.4.1	Sobrenadante de cultura celular não precipitado sem pré- tratamento.....	69
4.4.2	Sobrenadante de cultura celular não precipitado tratado	72
4.4.3	Sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado	74

4.5	PURIFICAÇÃO DE IGG₁ EM DUAS ETAPAS CROMATOGRÁFICAS CONSECUTIVAS	77
4.6	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	79
4.7	DETERMINAÇÃO DA CURVA DE RUPTURA	83
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS	91
5.1	CONCLUSÕES	91
5.2	SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS.....	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
	ANEXO A.....	103
	ANEXO B.....	104
	ANEXO C.....	105

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 ANTICORPOS MONOCLONAIS E SUA RELEVÂNCIA

Os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas, em sua maioria imunoglobulinas G (IgG), que são secretados por células híbridas produtoras de anticorpos. Estas células, chamadas de hibridomas, são o resultado da fusão de uma célula produtora de anticorpos (linfócito) com uma célula de mieloma. Para se obter os anticorpos monoclonais, antígenos específicos (contra o qual se pretende produzir o anticorpo) são injetados em camundongos e decorrido o tempo necessário de imunização, as células esplênicas do animal são isoladas e fundidas com células tumorais de rato ou camundongo (mieloma). Esta operação é necessária porque a duração de vida dos linfócitos que produzem os anticorpos não é maior do que uma semana em cultura. Com a fusão são formados os hibridomas, que são células virtualmente imortais, produtoras do anticorpo monoclonal desejado (KÖHLER e MILSTEIN, 1975).

A tecnologia de hibridomas para produção de anticorpos monoclonais foi desenvolvida por KÖHLER e MILSTEIN em 1975 e significou um salto no desenvolvimento das mais diversas áreas das ciências biológicas. Devido a suas características de monoespecificidade e homogeneidade, estes anticorpos são potencialmente importantes no desenvolvimento e aplicações terapêuticas e em diagnósticos e de fato têm se tornado uma importante ferramenta nos laboratórios e clínicas como agentes terapêuticos, componentes de kits de imunodiagnóstico, carreadores de drogas terapêuticas, como ligantes em cromatografias de afinidade e na pesquisa básica de várias áreas (GEUS e HENDRIKSE, 1998).

Segundo GEUS e HENDRIKSEN (1998), já existem mais de 100.000 diferentes anticorpos monoclonais disponíveis. A maioria deles é produzida

apenas em escala laboratorial, embora vários estudos estejam sendo feitos para a produção de anticorpos em larga escala.

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos *in vivo*, método no qual os hibridomas são injetados na cavidade intraperitoneal de um animal histocompatível, de modo que, para obter os anticorpos, os animais precisam ser sacrificados. Podem também ser produzidos *in vitro*, onde os hibridomas são cultivados em meios sintéticos ou acrescidos de soro fetal bovino, que fornecem os nutrientes necessários ao crescimento celular. A expansão *in vitro* muitas vezes não é tão produtiva quanto a expansão *in vivo* (produção de 4 a 10 mg/mL de fluido ascítico), mas é a melhor alternativa para produção de anticorpos monoclonais em grande escala. Os estudos de produção de anticorpos são voltados ao aumento da produtividade, com o advento de novos biorreatores, e que permitam manter a cultura de forma contínua (JACKSON *et al.*, 1996; VOIGT e ZINTL, 1999). A baixa concentração de anticorpos obtida em muitos biorreatores na produção *in vitro*, em adição à complexidade do meio de onde o anticorpo é recuperado, dificultam as etapas de purificação. Além disso, o alto grau de pureza requerido, uma vez que a sua aplicação se dá na área terapêutica e de diagnóstico, exige o uso de técnicas de alta seletividade.

Uma variedade de técnicas tem sido utilizada na purificação de anticorpos monoclonais, muitas delas aliando a precipitação à cromatografia. Apesar de muito utilizada, a cromatografia de troca iônica não apresenta alta seletividade (LÜTKEMEYER *et al.*, 1993), sendo necessárias etapas adicionais na purificação. Outros tipos de cromatografias de adsorção seletiva, como a de afinidade, foram desenvolvidas e também são utilizadas na purificação de anticorpos monoclonais.

As proteínas A e G, têm sido utilizadas como ligantes em cromatografias de afinidade na purificação de anticorpos monoclonais, contudo, a contaminação do produto com traços do ligante devido à hidrólise ou desprendimento destes em presença de IgG sob condições de pH extremos de eluição, representa um sério problema quando as soluções protéicas são destinadas a aplicações terapêuticas. Além disso, o alto custo dos ligantes e sua inativação com as condições de eluição e sanitização da coluna, tornam este método impraticável em larga escala.

Como alternativa, outro método utilizado na purificação de anticorpos monoclonais é a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), que explora a interação entre os resíduos de histidina acessíveis na superfície da proteína e o íon metálico imobilizado (PORATH *et al.*, 1975).

HALE e BEIDLER, 1994, purificaram anticorpos monoclonais murinos do isotipo IgG₁ a partir do sobrenadante de cultura celular em géis contendo íons Ni²⁺ imobilizados, obtendo um grau de pureza de aproximadamente 90%. ALEANZI e colaboradores (1998) e TISHCHENKO e colaboradores (2002), também utilizaram IMAC para purificação de anticorpos monoclonais a partir de fluido ascítico pré-tratado, e obtiveram recuperações superiores a 70% com elevado grau de pureza. Estes dados indicam que a cromatografia utilizando íons metálicos imobilizados como ligantes é uma técnica promissora para a purificação de anticorpos monoclonais.

Contudo, a utilização de géis tradicionais como suporte para estas cromatografias torna inviável a utilização de altas vazões, o que dificulta o seu escalonamento. Com isso, torna-se necessário a utilização de matrizes com maior capacidade hidrodinâmica, como, por exemplo, as membranas, nas quais podem ser imobilizados os íons metálicos. Estudos de adsorção de IgG bovina e IgG humana em membranas com Cu²⁺ imobilizado, foram realizados por KUBOTA *et al.* (1996) e HARI *et al.* (2000), respectivamente, nos quais constataram que mais de 85% do total de proteínas contidas nas soluções alimentadas, ficaram adsorvidas nos íons metálicos imobilizados. Estudos de purificação de anticorpos monoclonais utilizando cromatografia de afinidade em membranas de afinidade com metais imobilizados não foram encontrados na literatura.

Estas informações nos motivaram a estudar o emprego da técnica de cromatografia em membranas de afinidade utilizando metais imobilizados para a purificação de anticorpos monoclonais a partir de sobrenadante de cultura celular.

1.2 OBJETIVO

Com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de processos de purificação de anticorpos para fins terapêuticos e diagnósticos, visando uma aplicação em larga escala, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial de utilização da cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados para purificação de anticorpos monoclonais anti-TNP do isotipo IgG₁ a partir de sobrenadante de cultura celular. Estes anticorpos, que são representantes de uma das subclasses de IgG, foram desenvolvidos a partir da reação imunológica de camundongos, em resposta à exposição ao composto trinitrofenil (TNP), a fim de serem empregados como um dos componentes em um kit de teste imunoenzimático do tipo ELISA.

Para atingir o objetivo proposto, este projeto de pesquisa constou de quatro etapas consecutivas:

- 1) Ativação das membranas com epícloridrina, seguida da imobilização do agente quelante e determinação da densidade de ligantes em termos de metal imobilizado;
- 2) Ensaios cromatográficos com anticorpos monoclonais a partir do sobrenadante de cultura celular, em colunas cromatográficas contendo as membranas de afinidade finamente cortadas, com o intuito de verificar o perfil de eluição da proteína em diversos sistemas tamponantes e determinar as melhores condições de eluição, utilizando os íons metálicos Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺;
- 3) Determinação da isoterma de adsorção através de ensaios em tanques agitados, utilizando membranas derivatizadas com IDA-Me²⁺ e anticorpos monoclonais pré-purificados em gel de proteína G, para determinação da constante de dissociação (K_D) do complexo IDA-Me²⁺-IgG₁ e da capacidade máxima de adsorção (q_m) de IgG₁ nas membranas;
- 4) Ensaios de filtração, conduzidos em modo tangencial, utilizando um módulo contendo as fibras ocas, em escala laboratorial, a fim de determinar as curvas de ruptura a diversas vazões de alimentação do sobrenadante de cultura

celular e o ponto a partir do qual iniciou a saída de IgG₁ do módulo (ponto de ruptura).

CAPÍTULO 2

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos, que representam cerca de 20% das proteínas plasmáticas, são imunoglobulinas (Ig) que reagem especificamente com o antígeno que estimulou a sua produção. A IgG é o anticorpo predominante nas respostas secundárias e constitui uma importante defesa contra bactérias e vírus. Os anticorpos são secretados por células imunitárias, chamadas linfócitos, e quando surgem *in vivo* como resposta a um único antígeno são heterogêneos, pois são formados por diversos clones diferentes de células, chamados anticorpos policlonais. Já os provenientes de um único clone de célula, são homogêneos, chamados anticorpos monoclonais (AcM).

As imunoglobulinas são formadas por duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas cadeias polipeptídicas leves, ligadas entre si por pontes dissulfeto, como está ilustrado na Figura 2.1. Os termos leve e pesada referem-se ao tamanho molecular, ou seja, as cadeias leves têm massa molecular de 25 kDa, enquanto as cadeias pesadas têm massa molecular de 50 a 70 kDa. Através da clivagem enzimática da molécula de IgG obtêm-se dois fragmentos, denominados Fc e Fab, sendo que a região que as une (região hinge) é flexível e sujeita à ação de enzimas proteolíticas. O fragmento Fab (região amino terminal) contém os sítios de ligação com o antígeno. O fragmento Fc (região carboxila terminal) não possui atividade de anticorpo, mas está envolvido na transferência placentária, na fixação de complemento, na ligação à várias células e outras atividades biológicas (JAWETS *et al.*, 1998).

Os anticorpos monoclonais diferem dos policlonais por sua monoespecificidade e homogeneidade. Estas características os tornam uma ferramenta muito efetiva no desenvolvimento e na aplicação de terapias, diagnósticos e em pesquisa básica. Sua importância vem aumentando a medida

que têm sido utilizados como carreadores de agentes terapêuticos (RITZ e SCHLOSSMAN, 1982), na reversão da rejeição aguda de transplantes; como sondas radioativas para delimitação de tumores, quando marcados com elemento radioativo (MORO e RODRIGUES, 2001), como componentes de kits para testes imunodiagnósticos do tipo ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), onde os anticorpos monoclonais podem ser conjugados e utilizados para a detecção de reações antígeno-anticorpo (JOHNSTON *et al.*, 1996; KOBAYASHI *et al.*, 1998; LÉO *et al.*, 2000) e como ligantes em processos de separação por afinidade, devido a sua alta especificidade, principalmente para purificação de outros anticorpos utilizados nas áreas terapêuticas (CATTY, 1989; LORENZEN, 1992).

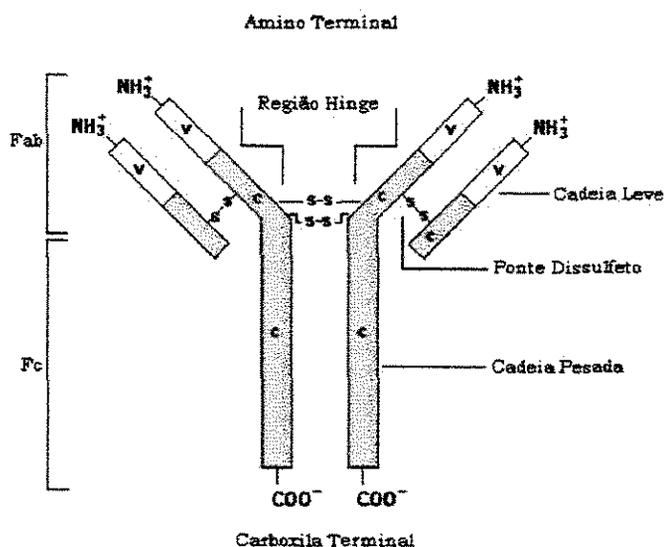


Figura 2.1: Representação esquemática de uma molécula de IgG indicando a localização das regiões constante (c) ou variável (v) nas cadeias leve e pesada (Adaptado de www.ntri.tamuk.edu/immunology, nov/2001).

Segundo GEUS e HENDRIKSEN (1998), há mais de 100.000 diferentes anticorpos monoclonais disponíveis. A maioria é produzida em pequena escala, mas grandes quantidades são freqüentemente necessárias em kits diagnóstico e reagentes, para procedimentos de diagnósticos de rotina, estudos de avaliação clínica e uso em propósitos profiláticos e terapêuticos.

Na produção de anticorpos monoclonais, os linfócitos do baço de um camundongo imunizado são isolados e fundidos com células tumorais de ratos (mieloma). Esta fusão, que resulta em linfócito-mielomas ou “hibridomas”, é

necessária para conferir à nova célula características de “imortalidade” e capacidade de produção de anticorpos, herdadas de cada um dos parentais (KÖHLER e MILSTEIN, 1975). A Figura 2.2 apresenta um esquema da obtenção de anticorpos monoclonais.

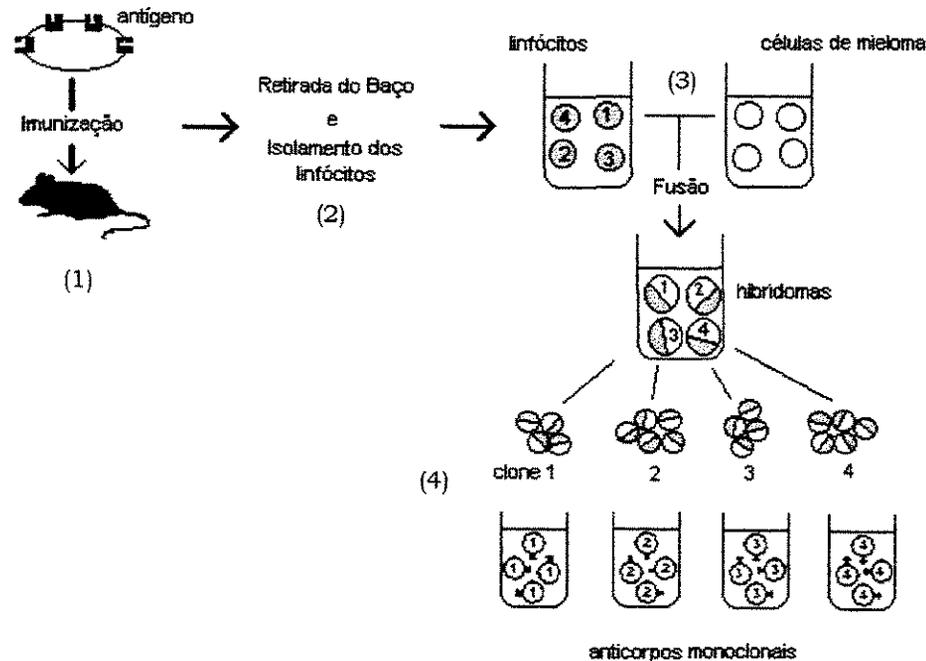


Figura 2.2 – Obtenção de anticorpos monoclonais: 1) imunização do camundongo com o antígeno; 2) retirada do baço e isolamento dos linfócitos produtores dos anticorpos; 3) fusão do linfócito com uma célula de mieloma, para a formação dos hibridomas que secretam os anticorpos monoclonais e 4) clonagem dos hibridomas produtores do anticorpo monoclonal (Adaptado de MILSTEIN, 1980).

Os hibridomas podem ser expandidos *in vivo*, sendo injetados diretamente na região peritoneal de mamíferos histocompatíveis, de modo que para se obter os anticorpos torna-se necessário o abate do animal, para a retirada do fluido ascítico, líquido peritoneal, que contém os anticorpos produzidos, ou *in vitro*, onde as células são cultivadas tradicionalmente em um meio de cultura contendo soro fetal bovino ou em meios sintéticos livres de soro, mas que fornecem todos os fatores de crescimento necessários.

A expansão *in vivo* não é prática para produção em larga escala, além de ser restringido ou proibido em alguns países por causa do uso de animais para produção dos anticorpos. A expansão dos hibridomas *in vitro* é a mais

recomendada para a produção em larga escala, podendo ser realizada na forma de cultura estacionária ou tanques agitados. Dependendo do sistema de cultura utilizado pode-se obter concentrações de anticorpos desde valores menores que 100 µg/mL até maiores que 10 mg/mL (JACKSON *et al.*, 1996; FALKENBERG, 1998; VOIGT e ZINTL, 1999).

Mais recentemente, microrganismos e plantas transgênicas têm sido utilizadas como biorreatores na produção de anticorpos monoclonais. Nesta técnica, sequências de DNA, responsáveis pela produção de determinado anticorpo ou fragmento de anticorpo, são adicionadas a um plasmídeo que, por sua vez, é inserido através de técnicas de engenharia genética, para as células dos microrganismos que, desta forma, produzirão o anticorpo desejado, ou para células de agrobactérias que posteriormente transferem o gene produtor do anticorpo para as plantas produtoras (HIATT *et al.*, 1989; STRACHAN *et al.*, 1998; SENA e GOLDMAN, 2001). Estes microrganismos ou plantas transgênicas são facilmente cultivados e representam uma alternativa promissora para a produção dos anticorpos monoclonais, principalmente em grande escala.

2.2 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Uma variedade de técnicas tem sido utilizada na purificação de bioprodutos e a escolha correta do método depende da necessidade de pureza do produto final. Compostos destinados a aplicações terapêuticas e diagnósticas, requerem alto grau de pureza e necessitam de técnicas de purificação mais seletivas. Outro fator importante a ser levado em conta é o custo de cada processo. Segundo LABROU e CLONIS (1994), o fator chave para o desenvolvimento da biotecnologia são os processos de recuperação e purificação que, freqüentemente, chegam a não menos que 50% do custo total de produção.

No caso dos anticorpos monoclonais, cuja aplicação requer pureza elevada, os processos de recuperação e purificação são fator fundamental na sua utilização. Os anticorpos monoclonais são necessariamente recuperados a partir

de meios complexos (fluido ascítico ou sobrenadante de cultura celular), constituídos de várias proteínas e células. Assim, após a remoção das células através de centrifugação e filtração, normalmente pode-se dividir o processo de purificação em duas etapas: etapas preliminares ou de pré-purificação e a etapa de purificação propriamente dita.

Na etapa de pré-purificação utilizam-se técnicas não muito seletivas, visto que esta etapa tem como objetivo eliminar partículas e sais ou concentrar a solução protéica. Precipitação, ultrafiltração e microfiltração, têm sido utilizados na etapa de pré-purificação de anticorpos monoclonais. Na etapa de purificação, tradicionalmente utilizam-se cromatografias de adsorção seletiva para remover as impurezas existentes.

2.2.1 Pré-Purificação

A pré-purificação de anticorpos monoclonais é uma etapa que visa eliminar partículas e sais ou concentrar o material para as etapas de cromatografia seletiva. Nesta etapa podem ser eliminados compostos lipídicos, carboidratos, corantes, e algumas proteínas, que possam estar presentes na solução protéica.

Centrifugação e microfiltração podem ser utilizadas quando o interesse for eliminar particulados das soluções protéicas, ou utiliza-se a ultrafiltração, quando se pretende eliminar sais e outras pequenas moléculas de uma solução com proteínas de alta massa molecular. A ultrafiltração é também eficiente na concentração das proteínas.

Para o tratamento de grandes quantidades de solução protéica ou ainda quando se pretende concentrá-la, normalmente utiliza-se a técnica de precipitação, na qual os precipitados protéicos são formados por agregados de moléculas de proteínas, através da indução por ajuste de pH (precipitação isoelétrica), de força iônica (precipitação por indução salina) ou por adição de solventes orgânicos, polímeros ou metais, dentre outros métodos.

Anticorpos monoclonais são normalmente precipitados pela adição de uma solução saturada de sulfato de amônio ou então por adição direta do sal no

sobrenadante de cultura celular ou no fluido ascítico centrifugados e filtrados. EL-KAK e VIJAYALAKSHMI (1991) utilizaram precipitação com sulfato de amônio a 50% de saturação na pré-purificação de anticorpos monoclonais IgG_{2b} obtidos a partir de sobrenadante de cultura celular. Da mesma forma, para pré-purificar anticorpos monoclonais do tipo IgG₃ a partir de fluido ascítico, ALEANZI *et al.*, (1998), utilizaram sulfato de amônio a 33% de saturação. Em ambos os casos, o objetivo era preparar o material para cromatografias seguintes, para que o excesso de impurezas não prejudicasse o processo, além da redução do volume a ser tratado nas cromatografias.

Os anticorpos monoclonais, uma vez pré-purificados, podem ser submetidos às cromatografias de adsorção seletiva como: cromatografia de troca iônica, de afinidade ou de pseudobioafinidade.

2.2.2 Purificação através de técnicas de adsorção seletiva

As técnicas de adsorção seletiva exploram características de carga (troca iônica), hidrofobicidade (interação hidrofóbica) ou de especificidade de interação (bioafinidade e pseudobioafinidade) (ANSPACH *et al.*, 1996). Nesta categoria, os grupos tióis da cisteína são explorados na cromatografia covalente, as regiões hidrofóbicas da proteína são exploradas na cromatografia de interação hidrofóbica, os grupos carregados na cromatografia de troca iônica, os sítios de ligação na cromatografia de bioafinidade e os grupos quelantes de metais, como histidina, cisteína e triptofano, são explorados na cromatografia de afinidade por íons metálicos, entre outros.

A cromatografia de troca de iônica foi uma das primeiras técnicas a ser utilizada na purificação anticorpos monoclonais, normalmente precedida de precipitação. No entanto muitas vezes esta técnica pode não apresentar a seletividade necessária para produtos destinados a fins terapêuticos ou diagnóstico, embora possa alcançar altos índices de recuperação. LÜTKEMEYER e colaboradores (1993), utilizaram membranas de troca iônica na purificação de anticorpos monoclonais a partir de sobrenadante de cultura celular, obtendo 96% de recuperação, embora, de acordo com a eletroforese apresentada, não conseguiram eliminar traços de albumina e transferina que foram eluídos

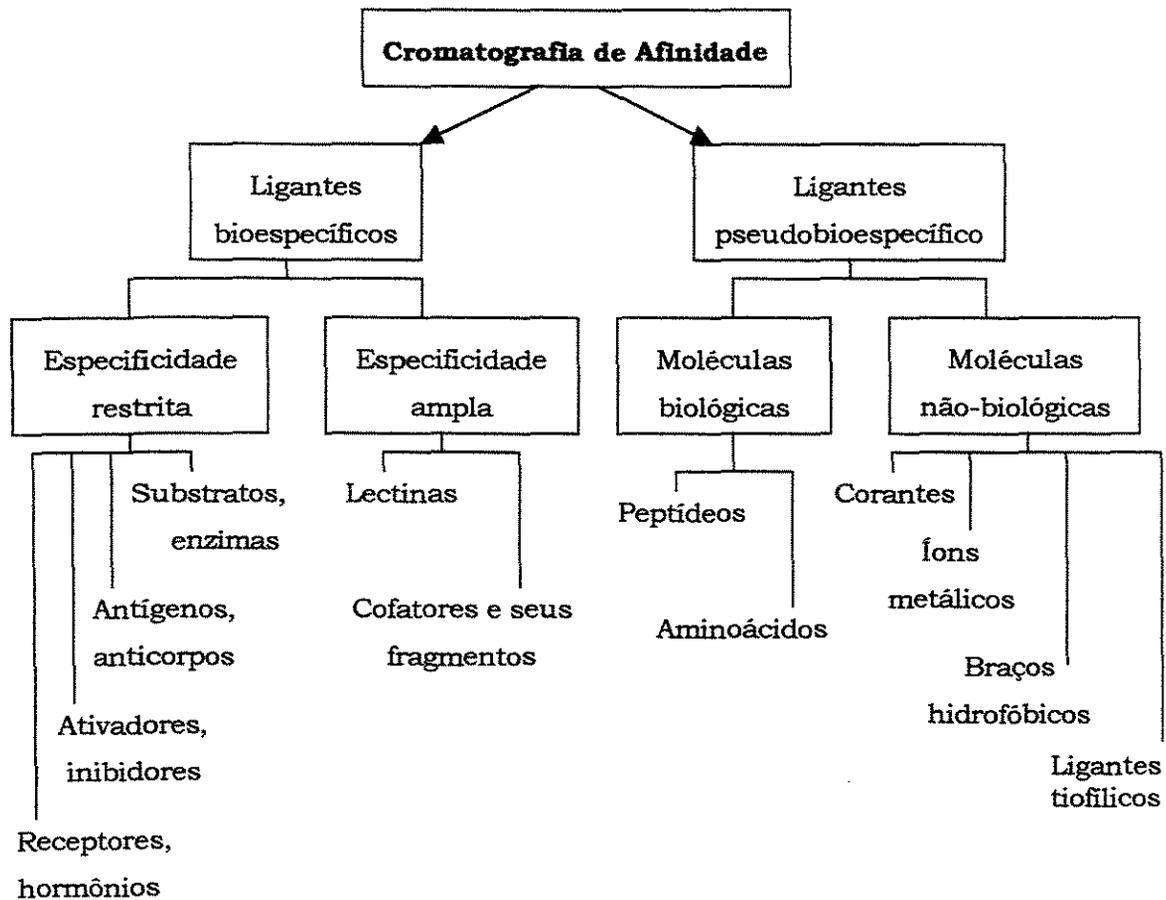
juntamente com a IgG. CLAUSEN e colaboradores (1999) desenvolveram um novo suporte para cromatografias de troca iônica a partir de zircônia modificada e conseguiram recuperar de 92 a 98% e purificar anticorpos monoclonais de sobrenadante de cultura celular com pureza maior que 95% em um único passo cromatográfico.

Por serem compostos por inúmeros aminoácidos, dentre os quais alguns com características hidrofóbicas, os anticorpos monoclonais podem ser purificados por cromatografias que utilizam este princípio. MANZKE e colaboradores (1997) utilizaram colunas contendo Phenil-Superose para separar anticorpos monoclonais bi-específicos dos seus respectivos monoespecíficos a partir de sobrenadante de cultura celular. Anticorpos monoclonais bi-específicos são anticorpos monoclonais produzidos por híbridos-hibridomas e incorporam dois diferentes paratopos, ou seja, são específicos para dois tipos de antígeno. No processo de purificação destes anticorpos, as maiores impurezas são os anticorpos monoclonais monoespecíficos, que são produzidos concomitantemente pelos hibridomas, os quais devem ser eliminados na etapa de purificação.

A cromatografia em hidroxiapatita também pode ser utilizada na purificação de imunoglobulinas (TARDITI *et al.*, 1992; MULLICK e FLICKINGER, 1998). A hidroxiapatita possui dois sítios de adsorção: o sítio C, carregado positivamente com íons Ca^{2+} e o sítio P, carregado negativamente com íons PO_4^{2-} . Assim, a proteína pode ser adsorvida na superfície da hidroxiapatita através da interação entre seus grupos carboxil ou grupo fostato, com o sítio C do mineral ou numa segunda opção, pode ser adsorvida no sítio P utilizando-se o grupo amino da proteína.

A cromatografia de afinidade também é utilizada na purificação de anticorpos monoclonais e se apresenta como um método altamente seletivo. A purificação de anticorpos por cromatografias de afinidade segue basicamente duas estratégias, a primeira explora a capacidade de reconhecimento e ligação com antígenos, que são características relativas à região Fab do anticorpo, a segunda explora as partes constantes e a região Fc do anticorpo, que apresentam capacidade de interação com várias proteínas, aminoácidos e outras moléculas específicas, que são imobilizados na matriz cromatográfica para a interação com a

proteína (HUSE *et al.*, 2002). A Figura 2.3 apresenta estes ligantes de afinidade segundo classificação feita por VIJAYALAKSHMI (1989), em dois grupos: ligantes



bioespecíficos e ligantes pseudobioespecíficos.

Figura 2.3: Esquema da classificação dos ligantes utilizados em cromatografias de afinidade (Adaptado de VIJAYALAKSHMI, 1989).

Os ligantes bioespecíficos são aqueles que interagem com a proteína através dos seus sítios de ligação, da mesma forma como ocorre na natureza, como por exemplo: interação antígeno-anticorpo, receptor-hormônio, etc. Este tipo de interação é muito forte e específica, o que garante alta seletividade e, conseqüentemente, elevado grau de pureza.

Cromatografias de imunoafinidade, que utilizam antígenos ou anticorpos imobilizados na matriz, são muito específicas e apresentam ótimos valores de recuperação e purificação, mas a sua grande limitação é a necessidade de se obter ligantes purificados em quantidades relativamente altas, para serem

acoplados à matriz. Este tipo de cromatografia também necessita de condições drásticas de eluição, uma vez que as interações entre a proteína e o ligante, são muito fortes, com constante de dissociação (K_d) entre 10^{-9} e 10^{-15} M. Estas condições de eluição, muitas vezes comprometem a atividade dos ligantes imobilizados, diminuindo o tempo de vida útil da coluna, também podendo afetar a atividade dos anticorpos purificados.

Como alternativa à cromatografia de imunoafinidade, tem-se utilizado a cromatografia de afinidade com proteínas A, G, ou L imobilizadas para a purificação de anticorpos de várias fontes (LEIBL *et al.*, 1993; LÜTKEMEYER *et al.*, 1999; FAHRNER e BLANK, 1999). A proteína A tem sido utilizada como ligante bioespecífico devido a sua alta afinidade e seletividade pela parte Fc das imunoglobulinas, possibilitando uma purificação com elevado grau de pureza. Devido a sua alta especificidade, a proteína A tem sido utilizada na purificação de proteínas com fins terapêuticos e testes clínicos. FAHRNER *et al.* (1999) e THÖMMES *et al.* (1996) purificaram anticorpos monoclonais a partir de sobrenadante de cultura celular, utilizando cromatografias de afinidade com proteína A imobilizada em coluna de leito expandido, obtendo valores de recuperação superiores a 90 % e graus de pureza elevados, de acordo com as eletroforeses SDS-PAGE apresentadas. Gel de Sepharose com proteína A imobilizada também foi utilizada em um sistema de leito móvel simulado (LMS) para purificar anticorpos monoclonais a partir de cultura de hibridomas, com o qual conseguiram-se eliminar mais de 99% das impurezas (GOTTSCHLICH e KASCHER, 1997). A proteína G também é utilizada como ligante por apresentar afinidade por várias subclasses de IgG, ligando-se também à parte Fc da imunoglobulina. AYBAY e IMIR (2000) utilizaram proteína G imobilizada para purificar anticorpos monoclonais murinos do tipo IgG₁ a partir de sobrenadante de cultura celular, uma vez que a IgG₁ murina se liga mais fortemente à proteína G do que à proteína A, obtendo pureza maior que 95%. A proteína L tem afinidade pelas cadeias leves do tipo kappa das imunoglobulinas e também tem sido empregada como ligante na purificação de IgG (NILSON *et al.*, 1993). Embora seja muito utilizada, a cromatografia de afinidade com proteínas A, G ou L imobilizadas apresenta problemas de perda da capacidade da coluna por desprendimento do ligante após ciclos repetidos de utilização do processo

cromatográfico (BLANK *et al.*, 2001). Este desprendimento da proteína imobilizada leva à contaminação das proteínas purificadas e representa um problema quando as imunoglobulinas têm aplicação terapêutica, pois estes ligantes servem como potenciais causadores de alergias. Outro problema inerente à utilização de proteínas como ligantes de afinidade é o alto custo de processo, devido à alta pureza requerida dos ligantes e a perda da capacidade das matrizes ocasionadas pela desnaturação e desprendimento das proteínas.

Para contornar estes problemas relativos à utilização dos ligantes bioespecíficos, outras alternativas têm sido utilizadas. Ligantes que não possuem interação biológica, porém sejam capazes de se ligar por meio de interações do tipo hidrofóbicas, eletrostáticas ou de ligações de coordenação às proteínas, são utilizados em cromatografias de pseudobioafinidade, sendo chamados de ligantes pseudobioespecíficos. Estes ligantes são compostos de origem biológica ou não e interagem com a proteína através de uma afinidade estrutural, sendo capazes de adsorvê-la na matriz cromatográfica. Estas interações são mais fracas do que as ocorridas nas cromatografias de afinidade (K_d de 10^{-3} a 10^{-6} M), porém se bem escolhidos, os ligantes de pseudobioafinidade podem proporcionar uma seletividade tão alta quanto aquela obtida com os bioespecíficos.

A cromatografia tiofílica, introduzida por PORATH e colaboradores em 1985, é uma técnica similar à cromatografia hidrofóbica, que utiliza ligantes que contêm o grupo -SH imobilizados em suportes ativados com divinilsulfona ou epicloridrina. A afinidade entre os ligantes tiofílicos e imunoglobulinas é baseada na interação entre regiões tiofílicas das proteínas com o grupo sulfona ou tioéter dos adsorventes, sendo que o anticorpo é adsorvido e dessorvido sob condições de alta e baixa concentração de sal, respectivamente. O mecanismo de interação proposto por HUTCHENS *et al.* (1988) sugere que a adsorção das proteínas na matriz tiofílica ocorra por uma ação combinada de doação e recepção de elétrons do ligante. Esta interação é promovida pela presença da alta concentração de sal no ambiente cromatográfico. A adsorção de anticorpos monoclonais em matrizes tiofílicas foi estudada por SERRES *et al.* (1995) e FINGER *et al.* (1996) que concluíram que anticorpos monoclonais das subclasses IgG₁, IgG_{2b} e IgG₃ são preferencialmente adsorvidos quando comparados com o anticorpo monoclonal da subclasse IgG_{2a} a partir de fluido ascítico e sobrenadante de cultura celular,

respetivamente. KREUTZ e colaboradores (1998) utilizaram esta técnica, precedida de precipitação com sulfato de amônio, na separação de anticorpos monoclonais bi-específicos (IgG₁-IgG_{2a}). Utilizando a cromatografia tiofilica os autores conseguiram separar os dois tipos de anticorpos, eluindo primeiramente os anticorpos monoespecíficos e depois os bi-específicos.

A cromatografia de pseudobioafinidade com peptídeos e aminoácidos imobilizados também é uma alternativa utilizada na purificação de anticorpos monoclonais. Histidina e histamina foram utilizadas como ligantes por EL-KAK e VIJAYALAKSHMI (1991), que obtiveram recuperação na ordem de 90% e fator de purificação igual a 56, do total de anticorpos injetados na coluna.

Íons metálicos também são utilizados como ligantes na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC - "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography") que é baseada na interação entre proteínas e íons metálicos, os quais têm a capacidade de ligar-se a elas através de ligações de coordenação, em uma interação reversível. Esta característica levou à utilização de IMAC na purificação de várias proteínas, inclusive anticorpos de diversas fontes (PORATH e OLIN, 1983; BODEN *et al.*, 1995; HARI *et al.*, 2000; VANÇAN *et al.*, 2002).

HALE e BEIDLER (1994) purificaram anticorpos monoclonais murinos IgG₁, a partir de sobrenadante de cultura celular e fluido ascítico, injetando-os sem pré-tratamento em uma coluna contendo gel com o íon Ni²⁺ imobilizado, conseguindo uma recuperação de 92%. Neste mesmo trabalho, um estudo com as frações Fc e Fab da IgG determinou que a região C-terminal é a responsável pela interação da IgG com o metal imobilizado.

Níquel e zinco imobilizados em gel de Sepharose foram utilizados por ALEANZI e colaboradores (1998) na purificação de anticorpos monoclonais murinos do isotipo IgG₃ obtidos a partir de fluido ascítico. Os resultados obtidos foram de 70 e 90% de recuperação e 90 e 80% de pureza quando utilizaram Zn²⁺ e Ni²⁺ imobilizados, respectivamente.

TISHCHENKO e colaboradores (2002) estudaram a purificação de anticorpos monoclonais da subclasse IgG₁ a partir de fluido ascítico de camundongo, através de cromatografia de afinidade por íons Ni²⁺ imobilizados em matriz porosa e não porosa e concluíram que a porosa foi mais eficiente na

purificação obtendo recuperação de 92% dos anticorpos alimentados com 73% de pureza.

Os resultados obtidos nos experimentos de purificação de anticorpos monoclonais utilizando IMAC revelam um grande potencial de utilização desta técnica, o que leva a crer que estudos devem ser realizados a fim de explorar outros tipos de matrizes, metais e sistemas tamponantes, que também possam ser empregados para outros tipos de anticorpos.

2.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC)

A técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, introduzida por PORATH em 1975, é baseada na capacidade que as proteínas têm de serem reversivelmente ligadas à íons metálicos, através de ligações de coordenação, onde a proteína atua como uma base de Lewis, doando elétrons para o íon metálico (WONG *et al.*, 1991). O metal que interage com a proteína encontra-se imobilizado por meio de um agente quelante, que por sua vez está ligado, via um espaçador (epicloridrina ou bisoxirano, por exemplo), covalentemente à matriz. As interações entre o íon metálico imobilizado e a proteína são extremamente complexas e combinam efeitos eletrostáticos, hidrofóbicos e de coordenação. Geralmente todos os três tipos de interação devem ser considerados, no entanto, nem sempre é possível determinar suas relativas contribuições (SHARMA e AGARWAL, 2001). Estudos realizados com proteínas modelo (SULKOWSKI, 1985; BELEW *et al.*, 1987) e aminoácidos (HEMDAN e PORATH, 1985), comprovaram a importância dos resíduos de histidina, cisteína e triptofano entre os aminoácidos presentes nas proteínas para ligações de coordenação com os íons metálicos imobilizados.

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados demonstrou ser eficiente na purificação de várias proteínas (WONG *et al.*, 1991) e mais recentemente, com o advento da engenharia genética, proteínas que na sua forma

original não possuíam histidinas disponíveis para ligação, recebem através de técnicas de recombinação genética, uma cauda de histidina que possibilita sua purificação por IMAC.

Há muitas vantagens na utilização de IMAC como técnica de purificação, graças à sua versatilidade em relação aos adsorventes de afinidade. Diferentes metais podem ser imobilizados na mesma matriz e podem ser facilmente removidos através da adição de fortes agentes competidores (ex: EDTA) sem que haja perda da capacidade da matriz. Métodos de separação específicos podem ser empregados para cada tipo de proteína, apenas com a escolha adequada do metal e das condições de eluição (WONG *et al.*, 1991).

Além do seu uso em purificação, IMAC também pode ser utilizado no estudo da estrutura das proteínas. O conhecimento das interações metal-proteína pode ser uma boa ferramenta no estudo da interação entre a proteína e outras moléculas, como por exemplo, a relação entre enzima-inibidor (WONG *et al.*, 1991).

Em IMAC, o processo de purificação depende de vários fatores, como a escolha da matriz, do agente quelante, do íon metálico e das condições de adsorção e dessorção para que a interação entre a proteína e o metal seja favorecida e resulte em alta recuperação e seletividade.

2.3.1 Matriz cromatográfica

As matrizes utilizadas em IMAC devem possuir basicamente as mesmas características requeridas aos outros suportes utilizados em cromatografias de afinidade, ou seja, serem facilmente derivatizadas; apresentarem características hidrofílicas para diminuir as interações não específicas, possuir boa estabilidade física, mecânica e química, possuir grande área superficial com alta porosidade, para permitir o fácil acesso e alta densidade de ligantes e permitir taxas de vazão adequadas.

Diferentes materiais são utilizados como suporte em IMAC, tais como: materiais inorgânicos (ex: sílica, vidro poroso e cerâmica) e polímeros orgânicos naturais (ex: agarose, dextrana e celulose) ou sintéticos (ex: poliacrilamida,

derivados de ácido acrílico e metacrílico). Os polímeros orgânicos são amplamente utilizados, destacando-se a agarose, que é hidrofílica, física e quimicamente estável e relativamente inerte, porém não possui alta resistência mecânica. Os suportes a base de polímeros sintéticos e sílicas apresentam vantagens sobre as matrizes de agarose devido a sua maior estabilidade mecânica, maior rigidez e menores variações de volume durante o processo. Nas matrizes a base de sílica no entanto, pode haver a formação de silanóis tanto em altos quanto em baixos valores de pH (WONG *et al*, 1991).

Na cromatografia de afinidade estes suportes apresentam-se na forma de géis ou partículas, com os quais são preenchidas as colunas, ou na forma de membranas porosas, sendo que, neste último caso, a cromatografia adquire características de filtração. Os géis convencionais, embora sejam amplamente utilizados, podem apresentar problemas de compressão, quando submetidos a altas vazões levando a formação de caminhos preferenciais. Estes problemas de compressibilidade podem ser eliminados utilizando-se suportes na forma de membranas porosas, que permitem um aumento da vazão do processo, sem comprometer a conformação espacial da matriz e sua capacidade de adsorção seletiva.

2.3.2 Ativação da matriz e imobilização do agente quelante

Os íons metálicos são imobilizados através de um agente quelante covalentemente ligado à matriz. A imobilização é normalmente dividida em duas fases: ativação do suporte e imobilização do agente quelante. A ativação da matriz é feita pela ação de reagentes em solução aquosa ou orgânica que interagem com grupos da matriz (normalmente hidroxila) tornando-a ativa para uma reação com o agente quelante, passo seguinte da preparação do adsorvente. Epicloridrina e bisoxirano, têm sido muito utilizados na ativação de membranas com grupos OH-disponíveis. A Figura 2.4 mostra um esquema da ativação da matriz e imobilização do metal, através do agente quelante.

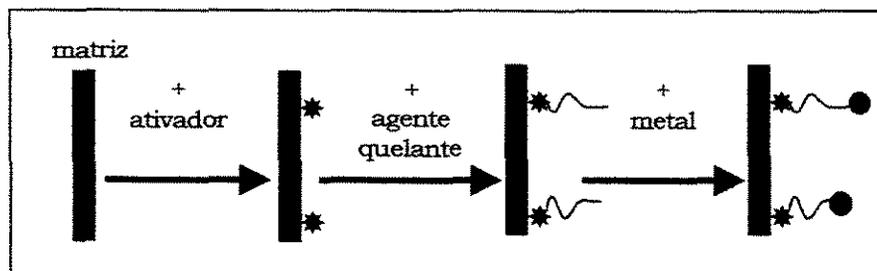


Figura 2.4: Esquema de ativação da ativação da matriz e imobilização do agente quelante: (*) ativador; (~) agente quelante; (●) íon metálico (Adaptado de SCOPES, 1994).

Muitos compostos são empregados como agentes quelantes em IMAC, mas os mais utilizados são o ácido iminodiacético (IDA) que é tridentado, isto é, forma complexo com o metal ocupando três sítios de coordenação, como esquematizado na Figura 2.5 e tris-carboximetil-etilenodiamina (TED), que é pentadentado, ocupando cinco sítios de coordenação do íon metálico.

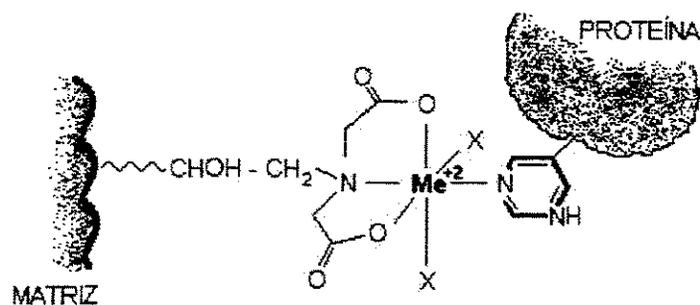


Figura 2.5: Representação esquemática da interação proteína-IDA- Cu^{2+} em IMAC, através de coordenação do anel imidazol do grupo histidina com o íon metálico. X: sítio de coordenação do metal, susceptível de ligação com a proteína. (Adaptado de VIJAYALAKSHMI, 1989)

Por conta de sua estrutura, o IDA permite uma maior interação do metal com a proteína (três sítios disponíveis) enquanto o TED quelata fortemente o metal, mas deixa livre apenas um sítio de interação. A escolha do melhor agente quelante depende das características impostas pela proteína a ser purificada e pelo metal a ser utilizado.

2.3.3 Íon metálico

Um fator fundamental na técnica de IMAC é a escolha do íon metálico a ser imobilizado. De um modo geral, qualquer metal capaz de interagir com as proteínas pode ser utilizado em IMAC, porém, Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Ca^{2+} , são os íons metálicos mais comumente empregados. Os íons metálicos Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} são utilizados na purificação de proteínas que possuam resíduos de histidina, triptofano e cisteína, onde os metais interagem com os grupamentos imidazol, indol e tiol, respectivamente, de cada aminoácido. Fe^{2+} e Al^{3+} são normalmente utilizados para separar fosfoproteínas e o íon Ca^{2+} , para proteínas ricas em grupamentos carboxílicos.

Em 1989, SULKOWSKI, utilizando tampão fosfato 20 mM a pH 7,0 e 1,0M NaCl, mencionou a importância dos resíduos de histidina acessíveis presentes em proteínas e peptídeos na separação por IMAC e determinou regras de interação entre estes resíduos com adsorventes contendo IDA- Cu^{2+} , IDA- Ni^{2+} , IDA- Co^{2+} , IDA- Zn^{2+} , que são as seguintes:

- I. a presença de pelo menos um resíduo histidina disponível para a coordenação é suficiente para a retenção da mesma em um gel de IDA- Cu^{2+} ;
- II. a presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação resulta em uma mais forte retenção da proteína em um gel de IDA- Cu^{2+} ;
- III. a presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação é requerida para a retenção em um gel de IDA- Ni^{2+} ;
- IV. a presença de dois resíduos histidina espacialmente localizadas em uma α -hélice e separadas por dois ou três aminoácidos é requerida para a retenção em géis de IDA- Zn^{2+} e de IDA- Co^{2+} .
- V. a retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina vicinais (efeito quelato) será mais forte, em todos os géis IDA- Me^{2+} , que a retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina bem espaçados na estrutura tridimensional.

Com o resultado da regra, pode-se determinar uma ordem crescente de força de retenção de proteínas contendo histidinas acessíveis, em géis IDA- Me^{2+} , da seguinte forma: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \geq \text{Co}^{2+}$

2.3.4 Mecanismos de adsorção e dessorção

Em IMAC a adsorção de proteínas ocorre através de uma ligação de coordenação, onde a proteína doa pares de elétrons ao metal que está imobilizado. Sendo assim, esta adsorção é favorecida quando os grupos doadores de elétrons da proteína de interesse, que sejam ionizáveis, estejam parcialmente desprotonados, ou seja, valores de pH acima do pK_a dos grupamentos imidazol, da histidina e tiol, da cisteína. O grupamento indol do triptofano não é ionizável e parece não se envolver diretamente com o metal imobilizado, provavelmente resultando em uma ligação fraca (VIJAYALAKSHMI, 1989). Além dos resíduos de aminoácidos, as extremidades N-terminal das proteínas também participam diretamente na interação com o metal imobilizado. De um modo geral, a adsorção das proteínas é favorecida em pH alcalino, porém para proteínas possuidoras de histidinas e cisteínas, por exemplo, a seletividade para adsorção é favorecida a uma faixa de pH de 6,0 a 8,0.

Além de pH, a força iônica também é uma variável que pode influenciar na adsorção. O quelato metálico imobilizado se encontra altamente solvatado por moléculas de água, possuindo assim elevado número de grupos hidroxila na vizinhança formando uma rede de cargas negativas. Estas cargas sugerem a participação de interações eletrostáticas ou indução de cargas envolvendo resíduos de aminoácidos positivamente carregados, na associação da proteína com o quelato. Para diminuir as interações não específicas do tipo eletrostáticas utiliza-se sal, adicionado aos tampões, em concentrações que podem variar de 0,1 a 1,0 M (VIJAYALAKSHMI, 1989).

A dessorção das proteínas que ficaram adsorvidas na matriz cromatográfica pode ser conduzida utilizando-se quatro métodos: 1) protonação das proteínas, por abaixamento de pH; 2) adição de agente competidor, que também possua capacidade de interagir com o metal; 3) deslocamento do complexo metal-proteína utilizando outro agente quelante mais forte (EDTA) e 4) eluição isocrática, que consiste na eluição das proteínas a condições constantes.

Os métodos mais comumente empregados são a protonação das proteínas por abaixamento de pH e a adição de um agente competidor na fase móvel da cromatografia. No primeiro caso, alguns cuidados devem ser tomados durante a

eluição: 1) controle das condições ácidas de eluição, a fim de evitar a desestabilidade da biomolécula, acarretando perda irreversível da atividade; 2) cuidados com a possível precipitação isoeletrica das proteínas dentro da coluna, também ocasionada pelas condições de baixo pH e; 3) controle do desprendimento do metal da coluna, causado pelo enfraquecimento da interação entre o agente quelante e o metal imobilizado, que pode ser afetado pelo abaixamento do pH do meio. No segundo método, a eluição das proteínas é feita a pH neutro, através de agentes competidores, tais como, histidina e imidazol, que competem com a proteína pela ligação com o metal. Este método de eluição é conveniente, pois evita a utilização de condições de baixo pH na recuperação das proteínas adsorvidas na matriz, porém torna-se necessária a introdução de mais uma etapa de processo a fim de eliminar o imidazol do meio contendo a proteína purificada.

O deslocamento do complexo metal-proteína utilizando um agente quelante mais forte, como por exemplo o EDTA, é normalmente utilizado para a regeneração da coluna após o término da etapa de eluição feita através de outro método. Porém, às vezes, a interação entre o metal e a proteína de interesse é tão forte, que o único meio de retirá-la da coluna é proporcionar o deslocamento do metal.

A eluição isocrática é mais utilizada quando a interação metal proteína é fraca e para pequenas proteínas e peptídeos. Neste método a eluição é realizada em condições constantes, como na etapa de lavagem.

Nas cromatografias de afinidade independentemente do ligante utilizado, o fator decisivo para que ocorra a adsorção das biomoléculas, é que elas tenham acesso aos sítios de interação com a matriz, que se encontram no interior dos seus poros. Este acesso pode ser facilitado ou dificultado de acordo com o tipo de matriz utilizada. Dentre as matrizes disponíveis comercialmente, as membranas são as que mais favorecem o transporte de massa até o interior dos poros, portanto, favorecem o processo de adsorção das proteínas nos ligantes imobilizados.

2.4 CROMATOGRAFIA EM MEMBRANAS DE AFINIDADE

A cromatografia de adsorção em membranas adsorptivas foi introduzida como um método de purificação de bioprodutos em meados dos anos 80 e desde então as membranas vêm sendo derivatizadas com ligantes biológicos e não biológicos, incrementando-se assim, a utilização destes suportes como matrizes em cromatografias de afinidade.

Segundo THÖMMES e KULA (1995) a cromatografia em membranas de afinidade pode ser diferenciada da cromatografia em gel convencional, pois quando o fluido passa através dos poros da membrana, o transporte das moléculas da solução até o interior dos poros é regido pela convecção e não pela difusão, ao contrário do que ocorre nos géis. Este transporte convectivo facilita o acesso da biomolécula ao sítio de fixação do ligante, conforme está ilustrado na Figura 2.6.

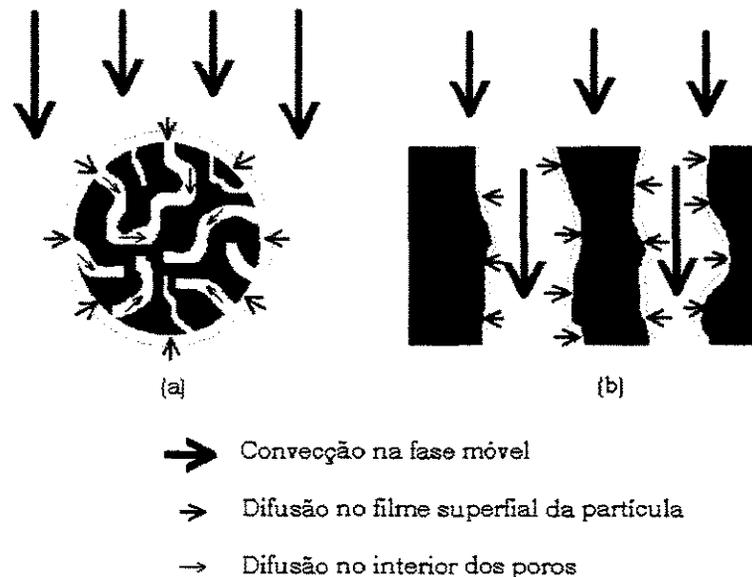


Figura 2.6: Representação esquemática do transporte de moléculas através dos poros de géis e membranas de afinidade. (a) Transferência de massa até o interior dos poros do gel regido principalmente pela difusão; (b) Transferência de massa, dentro dos poros da membrana, regida pela convecção, sendo que a difusão no filme superficial da partícula é desprezível (Adaptada de GHOSH, 2002).

O princípio da separação consiste na adsorção da biomolécula de interesse no ligante, sendo que este último é immobilizado no interior dos poros da

membrana. Assim, a solução contendo a biomolécula a separar é forçada a passar através da membrana. As moléculas grandes e partículas, que não atravessam os poros, são eliminadas na linha do retido, enquanto que as moléculas pequenas, inclusive a de interesse, atravessam os poros onde o ligante está imobilizado. A adsorção da biomolécula representa a primeira etapa da separação, na qual todas as moléculas não adsorvidas são eliminadas nas linhas do filtrado e do retido. A eluição representa a segunda etapa, onde a biomolécula é desorvida do suporte sólido, podendo ser recuperada, se ela for o produto de interesse, ou descartada, se ela for uma impureza.

A cromatografia em membranas de afinidade tem sido vista como uma técnica com grande potencial de utilização nos processos de purificação de bioprodutos, pois em uma única etapa, pode-se eliminar impurezas particuladas, através da filtração e recuperar as proteínas de interesse que ficam adsorvidas nos ligantes de afinidade, podendo-se ainda, utilizar grandes volumes de alimentação, trabalhando-se a baixas pressões e sem a possibilidade de formação de caminhos preferenciais (LABROU e CLONIS, 1994; HAUPT e BUENO, 2000; ZOU *et al.*, 2001; GHOSH, 2002).

As membranas disponíveis comercialmente, utilizáveis em sistemas de afinidade, são produzidas a partir de polímeros de hidrocarbonetos (polietileno e polipropileno), copolímeros aromáticos (policarbonatos, polisulfonas e poliétersulfona), poliamidas alifáticas (nylon) e polímeros como álcool poli vinílico e éster de celulose. Cada uma destas matérias primas necessita de uma preparação diferente para a imobilização do ligante. De um modo geral a preparação das membranas envolve quatro etapas (1) fabricação da membrana, (2) recobrimento da membrana com material hidrofílico, no caso de membranas hidrofóbicas; (3) ativação da membrana, através dos grupos reativos disponíveis e (4) acoplamento do ligante de afinidade na membrana ativada (KLEIN, 2000).

Uma das maiores dificuldades quanto à escolha de uma membrana para ser utilizada em cromatografias de afinidade é encontrar um material que sozinho apresente características de resistência química e física e ao mesmo tempo de compatibilidade e hidrofiliicidade, requeridas para o processo. Assim, algumas vezes recorre-se ao uso de membranas compostas de dois ou mais materiais.

Neste caso, recobre-se uma membrana mecânica e quimicamente estável, porém com características hidrofóbicas, com um material hidrofílico, obtendo-se assim, a membrana final desejada, contendo a resistência e a compatibilidade necessárias ao processo (CHARCOSSET, 1998; HAUPT e BUENO, 2000; ZOU *et al.*, 2001).

A ativação das membranas e a imobilização dos ligantes de afinidade são realizadas utilizando-se métodos similares àqueles empregados para os géis. O procedimento químico adequado para a ativação varia de acordo com o material com o qual a membrana foi fabricada, levando-se em consideração sua natureza e estabilidade. A imobilização do ligante pode ser realizada diretamente na membrana ou através de braços espaçadores, para permitir menor interferência da matriz no momento da adsorção da biomolécula.

As membranas de afinidade podem ser fabricadas em duas formas geométricas diferentes: formas plana ou cilíndrica, sendo que, cada uma destas formas pode ser utilizada individualmente ou em módulos de diferentes configurações disponíveis comercialmente ou produzidos em laboratório (ROPER e LIGHTFOOT, 1995; HAUPT e BUENO, 2000; GHOSH, 2002). As membranas planas podem ser utilizadas individualmente, na forma de discos ou placas ou então, agrupadas em pilhas horizontais ou na forma de espirais, sendo instaladas em unidades de ultrafiltração convencionais, ou em cartuchos especialmente preparados. As cilíndricas podem ser utilizadas individualmente ou agrupadas em módulos de filtração e conforme seu diâmetro interno, podem ser chamadas de membranas tubulares, capilares ou fibras ocas. Dentre as membranas cilíndricas, as mais citadas na literatura são as membranas de fibras ocas, com diâmetro interno que varia de 0,25 a 2,5 mm (GHOSH, 2002), que são utilizadas agrupadas em módulos de filtração comercialmente disponíveis ou fabricados em laboratório. A sua forma tubular de diâmetro bastante reduzido, disponibiliza uma grande área superficial por volume, que possibilita um maior acoplamento de ligantes por volume de membrana (ROPER e LIGHTFOOT, 1995; THÖMMES e KULA, 1995; KLEIN *et al.*, 1997).

A utilização de membranas em cromatografias de afinidade deriva da tecnologia de filtração e ultrafiltração utilizando membranas microporosas,

assim, muitos dos módulos em diversas configurações disponíveis comercialmente e utilizadas hoje são derivados dos módulos empregados também nas técnicas de filtração (ROPER e LIGHTFOOT, 1995).

2.4.1 Utilização das membranas em cromatografia de afinidade

Na última década os estudos de purificação de biomoléculas através de cromatografia em membranas de afinidade se intensificaram e alguns ligantes de afinidade, antes utilizados apenas nos géis, foram sendo incorporados nesta tecnologia. Visando diversos fins, muitos estudos têm sido realizados referente a utilização das membranas de afinidade na recuperação e purificação de IgG de diversas fontes (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Exemplos de membranas de afinidade utilizadas na purificação e recuperação de imunoglobulinas de diversas fontes.

Tipo de Membrana	Ligante	Imunoglobulina Purificada	Referência
Membranas de fibra oca de álcool polivinílico (PEVA)	histidina	IgG humana	BUENO <i>et al.</i> (1995a, b); BUENO <i>et al.</i> (1996)
Membranas de fibra oca de poliétersulfona e óxido de polietileno, recobertas com hidroxietilcelulose	proteína A	IgG humana	CHARCOSSET <i>et al.</i> (1995)
Membranas planas (Sartobind, Sartorius)	β -mercapto-etanol	IgG _{2a} e IgG ₁ monoclonal	FINGER <i>et al.</i> (1995)
Membranas planas de acetato de celulose	IDA-Cu ²⁺	IgG bovina	KUBOTA <i>et al.</i> (1996)
Membranas planas de celulose	IDA-Cu ²⁺	IgG humana	HARI <i>et al.</i> (2000)
Membranas planas compostas de quitosana e celulose	proteína A	IgG humana	YANG e CHEN (2002)
Membranas de fibra oca de álcool polivinílico (PEVA)	β -mercapto-etanol	IgG humana	COFFINIER <i>et al.</i> (2002)

A purificação de anticorpos monoclonais utilizando cromatografias em membranas de afinidade têm obtido bons resultados de purificação, sendo

possível recuperar e purificar os anticorpos que se encontram em concentrações muito baixas (0,20 µg a 0,2 mg por mililitro), a partir de meios muito complexos, como os sobrenadantes de cultura celular e fluidos ascíticos. (FINGER *et al.*, 1995; GHOSH, 2001a, b).

Porém, de todas as contribuições que a cromatografia em membranas de afinidade tem proporcionado aos processos de recuperação e purificação de proteínas, provavelmente, a de maior importância seja a possibilidade de utilização de altas vazões, sem a diminuição da capacidade de purificação.

2.5 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

A cromatografia de afinidade apresenta características específicas no seu mecanismo de adsorção, porém, embora este mecanismo envolva interações de alta complexidade, a relação de equilíbrio entre o soluto livre em solução e aquele adsorvido na matriz pode ser freqüentemente descrita pelo modelo de Langmuir (BUENO *et al.*, 1995; CHARCOSSET *et al.*, 1995; GHOSH, 2001a, b; 2002; SHARMA e AGARWAL, 2001)

A transferência de massa do soluto em solução até o ligante imobilizado, pode ser descrita pela equação 2.1 (CHASE, 1984):

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C(q_m - q) - k_2 q \quad (2.1)$$

onde C é a concentração de soluto na solução, q é a concentração de soluto adsorvido à matriz, q_m é a capacidade máxima de soluto adsorvido à matriz e t é o tempo. As constantes k_1 e k_2 representam as taxas de adsorção e dessorção do soluto na matriz contendo o ligante imobilizado. A partir da equação 2.1, admitindo-se que a adsorção é reversível e limitada a uma camada, que a superfície interna do sólido é homogênea e apresenta um número finito de sítios ativos, e que as moléculas adsorvidas não interagem entre si e não há adsorção competitiva, pode-se reduzi-la à isoterma de adsorção de Langmuir (eq. 2.2).

$$q^* = \frac{q_m \cdot C^*}{(K_d + C^*)} \quad (2.2)$$

onde K_d é a constante de dissociação no estado de equilíbrio (*).

A equação 2.2 pode ser linearizada de diversas maneiras, conforme as equações 2.3, 2.4 e 2.5 apresentadas, sendo que a curva do gráfico de Scatchard (q^*/c^* versus q^*) tem uma significativa importância, uma vez que sua forma é sensível à existência de desvios do modelo de Langmuir.

$$\text{Duplos recíprocos:} \quad \frac{1}{q^*} = \frac{1}{q_m} + \frac{K_d}{q_m} \cdot \frac{1}{C^*} \quad (2.3)$$

$$\text{Semi-recíproco:} \quad \frac{C^*}{q^*} = \frac{K_d}{q_m} + \frac{C^*}{q_m} \quad (2.4)$$

$$\text{Scatchard:} \quad \frac{q^*}{C^*} = \frac{q_m}{K_d} - \frac{q^*}{K_d} \quad (2.5)$$

Em alguns sistemas de adsorção de proteínas, nem todas as considerações do modelo de Langmuir são satisfeitas, devido a complexidade dos mecanismos de adsorção das macromoléculas, sendo que, quando traçado o gráfico de Scatchard, observa-se que a forma de sua curva difere de uma reta. Isso ocorre devido aos desvios de idealidade do modelo de Langmuir, que podem ser causadas devido a: (a) adsorção irreversível, provocada pela adsorção da proteína em múltiplos sítios de ligação, levando a uma forte interação com a matriz, (b) heterogeneidade da superfície da matriz, e (c) cooperatividade entre as proteínas (HUTCHENS *et al.*, 1988).

O perfil da curva q^*/C^* em função de q^* pode indicar se há cooperatividade positiva, onde cada molécula adsorvida aumenta a probabilidade de uma outra molécula ser adsorvida no sítio vizinho (curva assintótica ou curva côncava), ou cooperatividade negativa, onde cada molécula adsorvida diminui a probabilidade de adsorção de uma outra (curva convexa), no processo de adsorção da proteína ao ligante imobilizado. Quando a curva apresenta a forma linear indica que as proteínas não interagem entre si (SHARMA e AGARWAL, 2001).

Para os dados que não se ajustam ao modelo de Langmuir, pode-se aplicar, entre outros modelos, o de Langmuir-Freundlich (eq. 2.6), para representar os dados experimentais, que leva em conta a heterogeneidade das interações entre a proteína e o adsorvente.

$$q^* = \frac{q_m \cdot (C^*)^n}{K_{d(LF)} + (C^*)^n} \quad (2.6)$$

onde $K_{d(LF)}$ é a constante de dissociação aparente que inclui as contribuições de cooperatividade, q_m é a capacidade máxima de adsorção e n é o coeficiente de Langmuir-Freundlich. A inclusão do terceiro parâmetro "n", a ser ajustado, permite que esta equação possa representar melhor a natureza heterogênea da adsorção e as interações cooperativas (YANG e CHEN, 2002), uma vez que o coeficiente "n" é classicamente um indicativo do tipo de cooperatividade presente no mecanismo de adsorção. No caso de $n=1$, não há cooperatividade entre as proteínas, ou os sítios são independentes. Para $n>1$, uma cooperatividade positiva é sugerida e quando $0<n<1$, uma cooperatividade negativa é atribuída ao processo (SHARMA e AGARWAL, 2001).

2.6 CURVAS DE RUPTURA

Durante a operação de colunas cromatográficas em modo frontal, a amostra é alimentada continuamente e por um curto espaço de tempo não há saída de proteínas da coluna. Isso ocorre até que a amostra percorra todo o seu espaço interno. A partir deste ponto, as proteínas que não ficaram adsorvidas na matriz, começam a sair da coluna e a curva de concentração de proteínas *versus* tempo tende a subir rapidamente, até que a concentração de saída da coluna C , se aproxime do valor da concentração da amostra injetada C_0 (C/C_0 igual a 1,0). A curva torna-se assintótica, o que indica que se estabeleceu o estado estacionário dentro da coluna, e não há mais adsorção das proteínas na matriz. A Figura 2.7, mostra um desenho esquemático, característico deste comportamento, para alimentações em modo frontal nos procedimentos cromatográficos.

Em processos de purificação industrial de proteínas de alto custo é importante minimizar a perda de produtos na linha de saída, durante a etapa de alimentação, porém é desejável utilizar toda a capacidade de retenção da matriz cromatográfica. Assim, a alimentação segue até que inicie a saída da molécula de interesse da coluna. Segundo CHARCOSSET e colaboradores (1995), pode-se considerar o valor de C/C_0 igual a 0,10 como um valor representativo no qual interrompe-se a alimentação em aplicações industriais. O valor da massa de proteína injetada até o ponto onde C/C_0 igual a 0,10 é chamada de capacidade dinâmica da matriz sob as condições de adsorção estudadas.

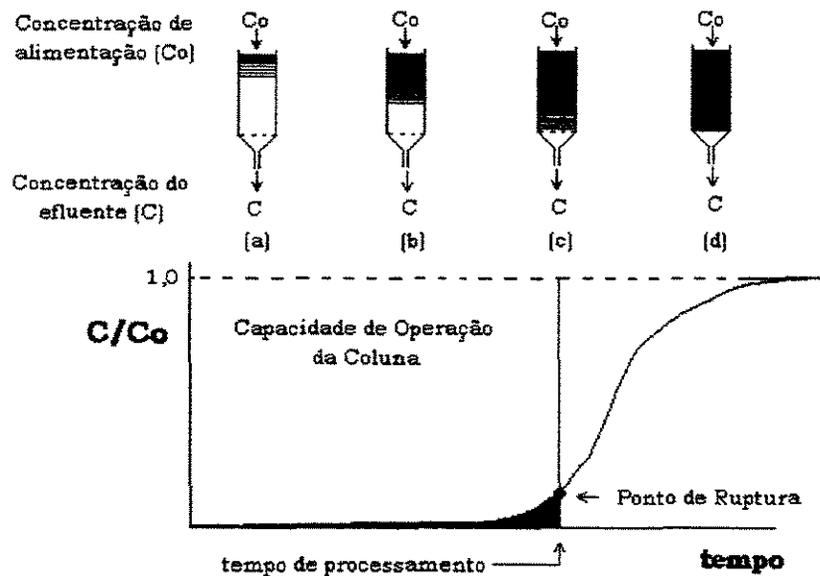


Figura 2.7: Esquema representativo de uma Curva de Ruptura em sistemas cromatográficos. (a-d) fases da alimentação da coluna (Adaptada de MANSIR *et al.*, 2001).

A fim de otimizar o processo de separação, e evitar perda de soluto no efluente, é necessário estudar a dinâmica da coluna, que é o resultado de uma complexa mistura de equilíbrios, fluxos não ideais, dispersão axial, volumes mortos, transferência de massa e taxas de adsorção. Muitas das informações necessárias para avaliar a performance da coluna estão contidas nas Curvas de Ruptura, que podem ser utilizadas para determinar (1) quanto da capacidade da coluna está sendo utilizada, (2) quanto soluto é perdido no efluente e, (3) o tempo de processo (MANSIR *et al.*, 2001).

Estas informações obtidas através das Curvas de Ruptura, são fundamentais para a transição dos processos de uma escala laboratorial para média e grande escala, visando a sua aplicação industrial.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

Albumina de soro bovino (BSA), ácido morfolinoetanossulfônico (Mes), ácido morfolinopropanossulfônico (Mops), Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue R-250, acrilamida, imidazol e boroidreto de sódio foram obtidos da Sigma, EUA. Ácido etileno-dinitrilo-tetraacético sal dissódico (EDTA), epícloridrina e sulfato de níquel foram obtidos da Merck, Alemanha. Azul de bromofenol, TEMED (N, N, N', N'- tetra-metilenodiamina), persulfato de amônia, bisacrilamida, SDS (dodecil sulfato de sódio), glicerol, β-mercaptoetanol, dithiotrietol e marcadores de alta e baixa massa molecular para eletroforese foram adquiridos da Pharmacia, Suécia. Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico. Utilizou-se água ultra pura Milli-Q (Millipore EUA) para a preparação de todas as soluções.

3.1.2 Anticorpos Monoclonais

O sobrenadante de cultura celular contendo anticorpos monoclonais anti-TNP, isotipo IgG₁, produzidos *in vitro* empregando o hibridoma 1B2.1B6 (LÉO *et al.*, 2000) e utilizando o meio de cultivo da Sigma (EUA) com formulação D7777 acrescido de 10% de soro fetal bovino, foi gentilmente fornecido pela Dra. Elisabeth de Fátima Pires Augusto, do Laboratório de Fermentação Industrial do Agrupamento de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT-SP). O sobrenadante de cultura celular foi cedido já livre de células, tendo sido centrifugado, filtrado em membranas de celulose de 0,22μm de poro (Millipore, EUA), aliqotado em recipiente estéril e congelado. O material foi estocado à -20°C.

3.1.3 Membranas de álcool polietilenovínílico (PEVA)

Nos experimentos cromatográficos foram utilizadas como suporte, membranas microporosas comerciais na configuração de fibras ocas de PEVA da marca Kuraray Co (Japão), devido à possibilidade de ativação destas membranas através dos seus grupamentos hidroxila, conforme estrutura apresentada na Figura 3.1, para a imobilização do agente quelante. As suas características são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Características da membrana de fibra oca de PEVA

Características	Fibras ocas de PEVA
diâmetro de poro	0,05 μm ⁽¹⁾
diâmetro interno	200 μm ⁽¹⁾
diâmetro externo	240 μm ⁽¹⁾
tamanho nominal de corte	600 kDa ⁽¹⁾
área superficial	49,5 m ² /g membrana seca ⁽²⁾
razão massa úmida / massa seca	3.4 ⁽³⁾

Fonte: (1) Kuraray Co (Japão); (2) PETSCH (1998); (3) AQUINO (2000)

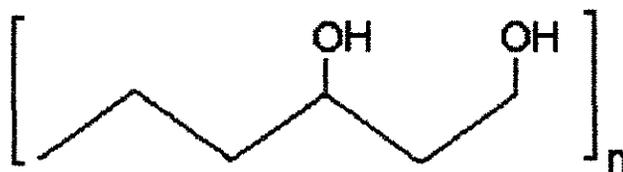


Figura 3.1: Esquema da estrutura química da membrana de PEVA

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação do sobrenadante de cultura celular contendo anticorpos monoclonais anti-TNP

O sobrenadante de cultura celular foi preparado de diferentes maneiras, dependendo do experimento. Foram testados três procedimentos de preparação.

a) Sobrenadante de cultura celular não precipitado sem pré-tratamento

Neste caso o sobrenadante de cultura celular após centrifugado e filtrado, conforme item 3.1.2, para remoção das células, não recebeu nenhum outro tipo de pré-tratamento.

b) Sobrenadante de cultura celular não precipitado tratado

O sobrenadante após centrifugado e filtrado, conforme item 3.1.2, para remoção das células, teve o tampão trocado para Tris-HCl 25 mM a pH 7,0.

c) Sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado

Seguindo o procedimento utilizado por EL-KAK e VIJAYALAKSHMI (1991), alíquotas de 100 a 200 mL de sobrenadante de cultura celular foram descongeladas e precipitadas com solução de sulfato de amônio a 50% de saturação, tudo mantido a 4° C. A solução saturada de sulfato de amônio foi gotejada sobre o sobrenadante na proporção de 1/1 entre as soluções. Em seguida, a solução permaneceu sob agitação branda por 1h a 4° C. O material foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos ou 3.000 g por 30 minutos. O precipitado foi dissolvido em aproximadamente 10 mL de tampão Tris-HCl 25mM a pH 7,0 e dialisado, em sacos de diálise com tamanho nominal de corte de 12–16 kDa de celulose regenerada (Interlab, Brasil), por 30 horas, sob agitação, contra 2 litros do mesmo tampão, trocados 3 vezes. A solução resultante foi então alíquotada, congelada e estocada a -20°C.

3.2.2 Troca de Tampão

Em alguns experimentos foi necessária a troca de tampão das soluções a serem utilizadas, esta troca foi realizada através de filtração em colunas PD-10 Sephadex G 25 M (Amersham Biosciences, Suécia), conforme metodologia sugerida pelo fabricante.

3.2.3 Ultrafiltração

Foram utilizados dois tipos de sistema de ultrafiltração. Para pequenas quantidades de solução utilizou-se ultrafiltração em centrífuga com Centricon 10 (Millipore, EUA) a uma rotação máxima de 5500 rpm. Para grandes quantidades de solução, utilizou-se uma célula de ultrafiltração Amicon Modelo 8050 (Millipore, EUA), com membranas de ultrafiltração YM 10 (Millipore, EUA), conectada a um cilindro de nitrogênio, sendo a máxima pressão de operação recomendada de 70 psi.

3.2.4 Ativação das fibras ocas de PEVA

As membranas de PEVA foram removidas do cartucho comercial e finamente cortadas em tamanhos de aproximadamente 2 a 3 mm. Em seguida, as membranas foram colocadas em um erlenmeyer, lavadas com água ultra pura e desgaseificadas para remover o ar dos poros. A ativação foi realizada, a temperatura ambiente, sob agitação moderada em capela, onde 50 mL de NaOH 2,0 M contendo 0,266 g de boroidreto de sódio (NaBH_4) foram adicionados, seguidos de 5 mL de epicloridrina. Em seguida, foi adicionada vagarosamente, uma solução de 50 mL de NaOH 2,0 M e 23,3 mL de epicloridrina, durante 2 horas. Após as duas horas, a solução ficou sob agitação por mais 16 horas à temperatura ambiente. Terminado o período de ativação, as membranas foram lavadas com água ultra pura para remover a epicloridrina em excesso, até que o pH da solução estivesse igual ao da água.

3.2.5 Imobilização do agente quelante IDA

A imobilização do ácido iminodiacético (IDA) foi realizada como descrito em PORATH e OLIN (1983). Foi preparada uma solução de 26 g de IDA adicionados a 65 mL de NaOH 2,0 M, tendo o pH ajustado para 10, com pastilhas de NaOH. Simultaneamente preparou-se outra solução, contendo 27,56 g de carbonato de sódio em 65 mL de água ultra pura. As duas soluções foram misturadas e adicionadas às fibras ocas já lavadas; a suspensão permaneceu em um agitador orbital a 65°C sob agitação por 24 horas. Após a imobilização, as membranas foram lavadas com água ultra pura, até que o pH da solução fosse igual ao pH da água. As membranas assim obtidas foram denominadas PEVA-IDA.

3.2.6 Determinação da quantidade de metal imobilizado

A determinação da quantidade de metal quelatado na matriz PEVA-IDA foi determinada, alimentando-se a coluna cromatográfica contendo as membranas, com solução de sulfato de metal (Cu^{2+} ou Ni^{2+}) 50 mM até a saturação e lavando-a seqüencialmente com água ultra pura e tampão acetato 100 mM a pH 4,0, com o objetivo de retirar o metal fracamente quelatado. A eluição do metal foi feita com solução EDTA 50 mM a pH 6,5. As frações de eluição foram recolhidas em volumes de 3 mL e analisada por medida de absorvância a 730 e 384 nm, respectivamente, para Cu^{2+} e Ni^{2+} (comprimentos de onda determinados por varredura de espectro). A concentração de metal foi determinada utilizando-se um coeficiente de extinção obtido a partir de curva de calibração do metal em solução de EDTA 50 mM pH 6,5, nos respectivos comprimentos de onda.

3.2.7 Quantificação de proteína total

As concentrações de proteína total nas amostras foram determinadas usando o método de Bradford, conforme o procedimento descrito por BRADFORD (1976), com albumina do soro bovino (BSA) como proteína de referência.

3.2.8 Quantificação da IgG₁

Para a quantificação de IgG₁ foram utilizados testes ELISA, realizados pelo Laboratório de Fermentação Industrial do Agrupamento de Biotecnologia do IPT/SP, segundo protocolo de LÉO *et al.* (2000) modificado. Os ensaios foram conduzidos em placas para microtitulação de poliestireno com 96 poços, previamente sensibilizadas com Ig de coelho anti-IgG de camundongo (Sigma M-7023) na concentração de 2 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05 M a pH 9,2 (50µL/poço). Após incubação por 1 h a 37°C seguida de mais 18 horas a 4°C, a placa foi lavada com solução salina de fosfato de sódio (PBS) 0,02 M a pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20. Para o bloqueio dos possíveis sítios de interação ainda disponíveis na placa, a mesma foi incubada por 1 h a 37°C com tampão PBS 0,02 M contendo 2% de caseína (Calbiochem 218682) e 2% soro bovino a pH 7,2 (200 µL/poço). A placa foi lavada novamente e incubada por 1h a 37°C, com 50 µL/poço da amostra da IgG₁ (purificada ou não) diluída seriadamente em tampão PBS 0,02 M contendo 1% caseína e 2% soro bovino a pH 7,2. Após uma nova lavagem a placa foi incubada (50 µL/poço) com Ig de carneiro anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (HRPO) (Sigma, A-5906), diluída em tampão PBS 0,02 M contendo 0,05% de Tween 20 a pH 7,2, por 1 h a 37°C. Em seguida a placa foi lavada e a revelação da reação foi possibilitada pela adição de 50 µL de substrato cromogênico (0,03 % H₂O₂ (Sigma H1009) e 0,4 mg/mL de ortofenilenodiamina – OPD (Sigma P-6787) em tampão citrato/fosfato 0,05 M a pH 5,0). Ao final da incubação por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara escura, a catálise do substrato foi interrompida pela adição de 25 µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico 4,0 N. A medida colorimétrica foi realizada a 492 nm, em leitor ELISA, usando como branco os poços contendo substrato cromogênico nos quais foi adicionado meio de cultura sem anticorpos. Para a confecção da curva de calibração foi utilizada IgG de camundongo adquirida comercialmente.

3.2.9 Titulação da IgG₁

A atividade do anticorpo monoclonal purificado nos experimentos cromatográficos realizados foi determinada pelo Laboratório de Imunologia

Celular e Inflamação, do Instituto de Biologia da Unicamp, através de titulação por ELISA, segundo protocolo de LÉO *et al.* (2000). Nesta técnica a placa de microtitulação é sensibilizada com o antígeno contra o qual foi desenvolvido o anticorpo. Após a sensibilização e lavagens, a placa contendo o antígeno é incubada com o anticorpo de interesse e a existência da interação antígeno-anticorpo, é "revelada" com a utilização de um segundo anticorpo específico contra o anticorpo de interesse, ligado a uma enzima que desencadeia uma reação colorida quando na presença do substrato.

Foi utilizada uma placa de 96 poços, previamente sensibilizada com solução de ovalbumina conjugada com TNP (OVA-TNP) na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, em tampão carbonato de sódio 0,05 M a pH 9,2 (50 μL /poço). Após incubação por 1 h a 37°C seguida de mais 18 horas a 4°C, a placa foi lavada com tampão PBS 0,02 M a pH 7,2, contendo 0,1% de Tween 20. Para o bloqueio dos possíveis sítios de interação ainda disponíveis na placa, a mesma foi incubada por 1 h a 37°C com tampão PBS 0,02 M contendo 5 % de leite desnatado (Molico-Nestlé, Brasil) a pH 7,2 (200 μL /poço). A placa foi lavada novamente e incubada por 1 h a 37°C, com 50 μL /poço da amostra da IgG₁ (purificada ou não) diluída seriadamente em tampão PBS 0,02 M contendo 2 % de leite desnatado a pH 7,2. Após uma nova lavagem, a placa foi incubada com Ig de coelho anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (HRPO), diluída em tampão PBS 0,02 M contendo 2 % de leite desnatado a pH 7,2 (50 μL /poço), por 1 h a 37°C. Em seguida a placa foi lavada e a revelação da reação foi realizada pela adição de 50 μL de substrato cromogênico (0,03% H₂O₂ e 0,4 mg/mL de ortofenilenodiamina – OPD em tampão citrato/fosfato 0,05 M a pH 5,0). Ao final da incubação por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara escura, a catálise do substrato foi interrompida pela adição de 25 μL /poço de uma solução de ácido sulfúrico 4,0 N. A leitura colorimétrica foi realizada a 492 nm, em leitor ELISA, usando como branco os poços nos quais a IgG₁ foi substituída por soro de animais não imunizados e contendo os demais reagentes. Foi considerado como o final da titulação quando as densidades ópticas (D. O.) das amostras foram iguais a 5 vezes a média das densidades ópticas do controle negativo (branco).

3.2.10 Eletroforese SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate Poly(Acrylamide) Gel Electrophoresis)

As frações obtidas nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE realizada no equipamento Mini Protein II (BioRad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida 10%, sendo as amostras tratadas com tampões contendo SDS (dodecil sulfato de sódio). A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada por aquecimento a 100°C por 5-7 minutos. Aliquotas de 7 a 12 µL de cada amostra foram aplicadas nos géis e estes submetidos à uma voltagem de 180 V, em cuba vertical. A coloração dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme MORRISSEY (1981).

3.2.11 Focalização Isoelétrica (IEF)

A IEF ("Isoelectric Focusing") é uma técnica eletroforética na qual as moléculas são separadas segundo o seu ponto isoelétrico (pI), ao longo de um gradiente contínuo de pH. A focalização isoelétrica consiste em depositar as proteínas sobre um gel de acrilamida que apresenta um gradiente contínuo de pH e submeter todo este conjunto a um campo elétrico, de modo a promover a migração da proteína através do gel até a região de pH correspondente ao seu pI, onde a proteína não mais migrará.

Uma amostra contendo IgG₁, purificada com gel de proteína G, a partir do sobrenadante de cultura celular, foi analisada por IEF em equipamento LKB-Phast System, utilizando gel de poliacrilamida Phast gel IEF 3-10, e marcadores de ponto isoelétrico 3 a 10, adquiridos da Amersham Biosciences (Suécia). Aliquotas de 4 µL de amostra foram aplicados no gel e este submetido às condições de operação pré-definidas pelo equipamento. A coloração do gel foi feita com nitrato de prata, conforme sugestão do fabricante do equipamento.

3.2.12 Experimentos cromatográficos com membranas PEVA-IDA-Me²⁺ finamente cortadas

Cromatografias foram realizadas para determinar o perfil de eluição da proteína nos diferentes sistemas tamponantes. Uma coluna cromatográfica da

Biosepra (EUA) (130 x 12,4 mm) foi preenchida com 5 mL (aprox. 1,6 g de massa seca) de membranas finamente cortadas (2-3 mm) derivatizadas com IDA e conectada a um sistema de cromatografia de baixa pressão (Gilson, EUA). A corrente de saída foi conectada a um monitor de medida de absorvância a 280 nm e este ligado ao coletor de frações (Figura 3.2). A coluna contendo o adsorvente foi alimentada, até a saturação, com uma solução a 50 mM de sulfato de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+} e em seguida, lavada, seqüencialmente, com água e com tampão (de mais baixo pH ou maior concentração de Tris ou imidazol) que foi utilizado na etapa de eluição, com o intuito de remover o metal fracamente adsorvido na matriz.

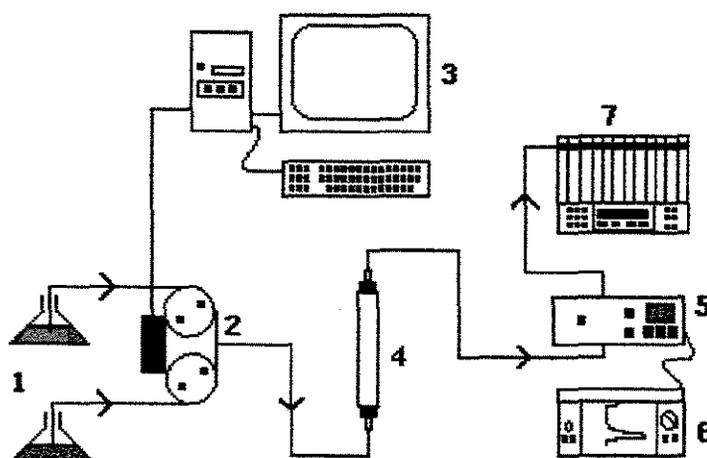


Figura 3.2: Esquema do sistema cromatográfico de baixa pressão, utilizado nos experimentos. 1) reservatórios de solução; 2) bombas peristálticas; 3) computador; 4) coluna cromatográfica; 5) leitor a 280 nm; 6) registrador e; 7) coletor de frações.

A coluna, contendo as membranas quelatadas com o metal, foi equilibrada a temperatura ambiente a uma vazão de 0,5 mL/min com o tampão de adsorção (tampão de equilíbrio). Foram utilizados na etapa de adsorção os tampões: fosfato de sódio 100 mM com 0,1 M de NaCl a pH 7,5; Mops 25 mM com 1,0 M de NaCl e 2 mM de imidazol a pH 7,0 e Tris-HCl 25 mM a pH 7,0.

Foram testadas três formas diferentes de alimentação, conforme descritas no item 3.2.1: 1) Sobrenadante de cultura celular não tratado; 2) sobrenadante

de cultura celular tratado e 3) sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado. Após o término da alimentação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de adsorção, até que todas as proteínas não adsorvidas fossem retiradas da coluna.

A eluição foi realizada por decréscimo de pH ou adição de agente competidor (Tris ou imidazol) no tampão de adsorção. Nesta etapa foram testados os tampões fosfato 100 mM com 0,1 M de NaCl a pH 6,0; 5,0; 4,25 e 4,0 e gradiente linear de pH 7,5 até 4,0; Mops 25 mM com 1,0 M de NaCl e 5, 10, 20, 30, 50, 100 mM de imidazol a pH 7,0 e Tris-HCl 50, 100, 150 e 200 mM a pH 7,0.

A coluna foi regenerada com solução de EDTA 50 mM a pH 6,5. A corrente de saída foi coletada durante todo o experimento em frações de volume de 3 a 5 mL. As frações obtidas foram monitoradas a 280 nm, quantificadas pelo método de Bradford e aquelas situadas nos picos de proteína foram agrupadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Algumas frações precisaram ter eliminados o EDTA e os íons metálicos através de permeação em gel, em colunas PD-10 (Pharmacia, Suécia), antes das eletroforeses.

3.2.13 Verificação do desprendimento do metal da coluna

Nos experimentos envolvendo metais imobilizados, pode haver desprendimento de metais da coluna durante as cromatografias. Estes metais ao se desprenderem, contaminam as frações contendo as proteínas de interesse. Sendo assim, é importante o monitoramento das frações com o objetivo de detectá-los. O desprendimento do Cu^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} foram determinados por análises espectrofotométricas a 809, 394 e 511 nm (comprimentos de onda determinados por varredura de espectro) respectivamente, das frações recolhidas nas cromatografias. O desprendimento de Zn^{2+} não foi monitorado, pois a técnica empregada não é adequada para a detecção deste metal.

3.2.14 Purificação de IgG₁ em duas etapas cromatográficas

Foram realizados ensaios de purificação de IgG₁ utilizando-se duas etapas cromatográficas sequenciais. Na primeira, uma coluna contendo PEVA-IDA com o metal Ni²⁺ imobilizado e equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM a pH 7,0, foi alimentada com 50 mL de sobrenadante de cultura celular não tratado. Após a alimentação, a coluna foi lavada com tampão de adsorção para eliminação das proteínas não adsorvidas. A eluição foi realizada com tampão Tris-HCl 700 mM a pH 7,0 e a coluna foi regenerada com solução de EDTA 50 mM a pH 6,5. As frações correspondentes à eluição com 700 mM de Tris foram agrupadas, tiveram seu tampão trocado para o tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,0.

Na segunda cromatografia, a coluna contendo as membranas de PEVA-IDA com o íon Zn²⁺ foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e alimentada com a solução resultante da primeira cromatografia (eluição com 700 mM) seguida de troca de tampão. Após a alimentação, a coluna foi lavada com o tampão de adsorção e a eluição foi feita por aumento da concentração de Tris em degraus de 100, 200, 300, 500 e 700 mM de Tris. Em seguida, a coluna foi regenerada com solução de EDTA 50 mM a pH 6,5. A corrente de saída foi coletada durante todo o experimento em frações de volume de 3 a 5 mL. As frações obtidas foram quantificadas pelo método de Bradford e aquelas situadas nos picos de proteína foram agrupadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE e por ELISA, para a quantificação de IgG₁. Algumas frações precisaram ter eliminados o EDTA e os íons metálicos através de permeação em gel, em colunas PD-10 (Pharmacia, Suécia), antes das eletroforeses.

3.2.15 Purificação de IgG₁ em gel de Sepharose - Proteína G

Uma coluna cromatográfica preenchida com 5 mL de gel Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Suécia), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 7,4, foi alimentada com 50 mL de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado e, em seguida, lavada com o mesmo tampão de adsorção. A eluição foi realizada com tampão ácido cítrico 100 mM a pH 2,6. As frações foram coletadas em tubos de ensaio contendo solução de Tris-HCl 1,0 M a pH 8,0, em quantidade suficiente para neutralizar o

pH, evitando a desnaturação da IgG₁ purificada. As frações de eluição obtidas após várias cromatografias foram agrupadas, tiveram seu tampão trocado para Tris HCl 50 mM a pH 7,0 e foram concentradas por ultrafiltração até a obtenção de uma solução de IgG₁ purificada de concentração de 5 mg/mL.

3.2.16 Isotermas de Adsorção

Para a determinação da isoterma de adsorção foram utilizadas soluções de IgG₁ de alta pureza, obtidas a partir da purificação do sobrenadante de cultura celular por cromatografia de afinidade em proteína G. Os experimentos para a obtenção da isoterma de adsorção foram realizados em frascos agitados, à temperatura ambiente (24°C), utilizando-se 50 mg (0,017 cm³) de membranas úmidas de PEVA, com metal Zn²⁺ imobilizado, em tubos Eppendorf de capacidade de 500 µL. Em cada tubo, contendo as membranas previamente equilibradas com o tampão de adsorção, Tris-HCl 50 mM a pH 7,0, foram adicionadas soluções de IgG₁ purificada em concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL. Os frascos foram agitados durante 3 horas, tempo suficiente para que o equilíbrio fosse atingido, determinado previamente. Depois deste tempo, o sobrenadante foi recuperado e a quantificação de IgG₁ foi realizada pelo método de Bradford, utilizando-se IgG humana comercial como referência.

3.2.17 Determinação das Curvas de Ruptura

Para a determinação das curvas de ruptura foram realizados experimentos de filtração, em módulos contendo as membranas de fibra oca PEVA-IDA-Zn²⁺ construídos em nosso laboratório. O fluido utilizado foi o sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado.

Construção do módulo de filtração

Foram retiradas duzentas fibras ocas de PEVA do cartucho comercial (EVAL 4A, Kuraray) e introduzidas em um tubo de vidro previamente construído contendo duas saídas laterais. As extremidades das fibras foram fixadas ao tubo

utilizando-se uma resina epóxi. A Figura 3.3 apresenta o esquema do módulo construído.

Para a determinação da área superficial (A) das membranas contidas no módulo foi utilizada a seguinte equação:

$$A = 2\pi r_i LN \quad \text{Equação 3.1}$$

onde:

r_i = raio interno das membranas (100 μm);

L : comprimento das membranas (5,7 cm);

N : número de fibras (200);

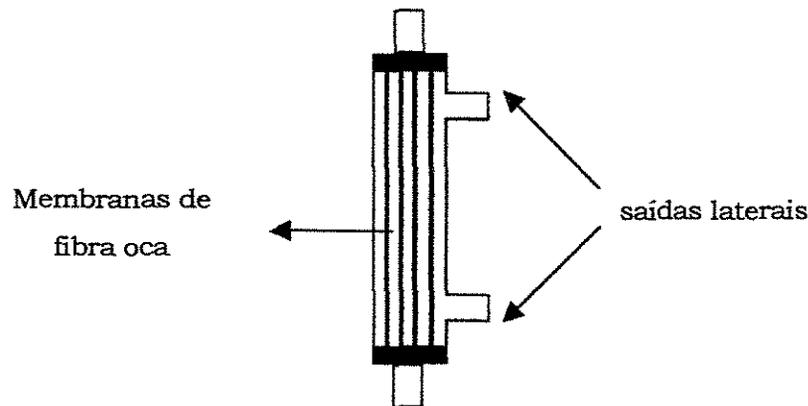


Figura 3.3: Esquema do módulo de fibras ocas de PEVA.

O volume das membranas (V) foi calculado segundo a equação 3.2:

$$V = \pi(r_0^2 - r_i^2)LN \quad \text{Equação 3.2}$$

onde:

r_0 = raio externo das membranas (120 μm);

r_i = raio interno das membranas (100 μm);

L : comprimento das membranas (5,7 cm);

N : número de fibras (200);

Ativação das membranas de PEVA contidas no módulo

As membranas contidas no módulo foram primeiramente lavadas com água ultrapura em quatro sentidos: frontal, lavagem interna, espaço concha e “backflushing” (fluxo reverso do permeado), conforme a Figura 3.4.

Em seguida, iniciou-se a ativação em capela, com a solução descrita no item 3.2.4, que permaneceu sob agitação branda e foi bombeada através das membranas, conforme esquema ilustrado na Figura 3.5, durante 8 horas.

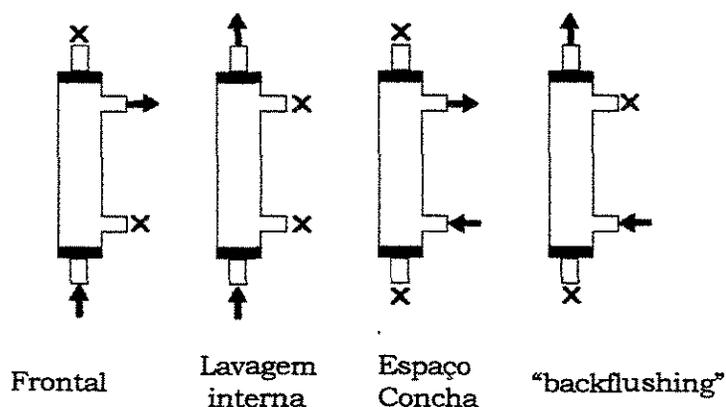


Figura 3.4: Esquema dos modos de lavagem das fibras ocas de PEVA contidas no módulo de filtração.

Ao final da reação, as membranas foram lavadas com água ultra pura, seguindo-se o procedimento de lavagem da Figura 3.4, até que o pH da solução de lavagem fosse igual ao pH da água ultra pura.

Imobilização do agente quelante IDA

A imobilização do ácido iminodiacético (IDA) foi realizada como descrito por PORATH e OLIN (1983), com a solução preparada segundo procedimento descrito no item 3.2.5, que permaneceu sob agitação branda, mantida a 65° C, e foi circulada pelo módulo de filtração conforme esquema da Figura 3.5, por 24 horas. Após a imobilização, o módulo foi lavado conforme a Figura 3.4, com água ultrapura, até que o pH da solução de lavagem fosse igual ao pH da água.

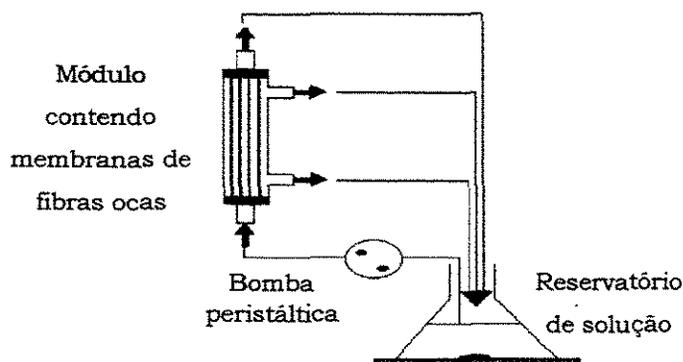


Figura 3.5: Esquema da montagem utilizada na ativação das membranas de PEVA contidas no módulo de filtração.

Avaliação da eficiência de imobilização do agente quelante

A eficiência da imobilização do agente quelante foi avaliada através da determinação da quantidade de Cu^{2+} quelatado nas membranas contidas no módulo de filtração. Este valor foi determinado experimentalmente, conforme procedimento descrito no item 3.2.6.

Experimentos de filtração do sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado

Estes experimentos tiveram por objetivo determinar a capacidade dinâmica, de adsorção da IgG_1 das membranas contidas no módulo de filtração.

O módulo contendo as fibras ocas foi alimentado, até a saturação, com uma solução a 50 mM de ZnSO_4 e em seguida, lavado seqüencialmente, com água ultra pura nos modos: frontal, lavagem interna, espaço concha e “backflushing”, e com tampão de maior concentração de Tris-HCl que foi utilizado na etapa de eluição, no modo “backflushing”, com o intuito de remover o metal fracamente adsorvido na matriz. As fibras do módulo foram, então, equilibradas, a temperatura ambiente, a uma vazão de 1,0 mL/min com o tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,0, em modo frontal. O sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado foi alimentado na coluna a vazões Q_i de 0,6, 1,4 ou 2,4 mL/min, de

acordo com cada experimento, em modo tangencial, conforme apresentado na Figura 3.6.a, até que fosse atingida a saturação da coluna. As vazões de alimentação Q_i e filtrado Q_F foram mantidas constantes usando-se duas bombas peristálticas para fixar a razão Q_F/Q_i em 0,5.

Fixando-se a vazão de filtrado, pode-se calcular o tempo de residência (t_R) pela seguinte expressão:

$$t_R = \frac{V}{Q_F} \quad \text{Equação 3.3}$$

onde:

V = volume ocupado pelas membranas ($0,157 \text{ cm}^3$);

Q_F = vazão do filtrado.

A corrente de filtrado foi monitorada a 280 nm durante toda a alimentação e as correntes de saída do filtrado e do retentado foram coletadas separadamente em frações de 2 mL cada. Após o término da alimentação, o módulo de fibras ocas foi lavado com o mesmo tampão de equilíbrio, conforme a Figura 3.4.

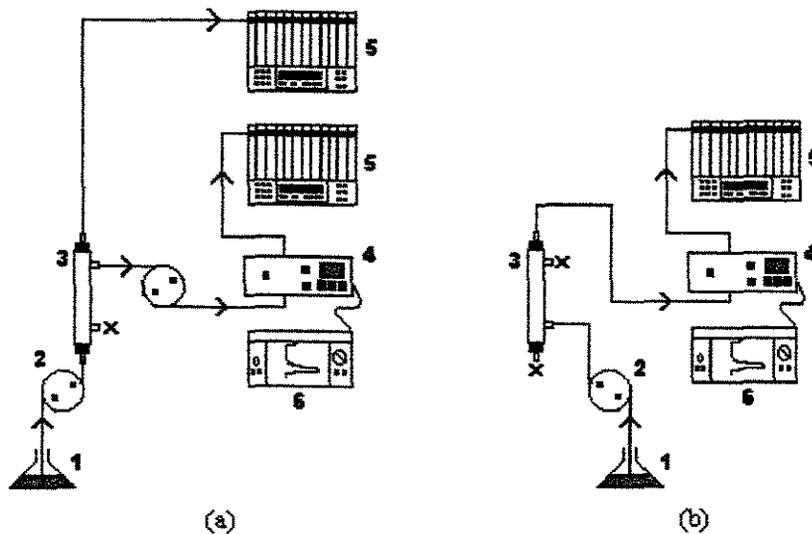


Figura 3.6: Esquema da montagem do experimento de filtração: (a) etapa de alimentação; (b) etapa de eluição e regeneração. (1) reservatório de solução; (2) bomba peristáltica; (3) módulo de filtração; (4) medidor de absorvância 280 nm; (5) coletor de frações e (6) registrador.

A eluição das proteínas adsorvidas nas membranas foi realizada, por aumento da concentração de Tris no tampão de equilíbrio, em degraus de 100, 200, 500 e 700 mM de Tris-HCl. Em seguida o módulo foi regenerado com solução de EDTA 50 mM a pH 6,5 e, em seguida, lavado seqüencialmente com solução de NaOH 50 mM e água ultra pura. As etapas de eluição e regeneração foram realizadas em modo “backflushing” (conforme Figura 3.6.b) e a corrente de saída foi monitorada a 280 nm e coletada em frações de 3 a 5 mL. As frações foram quantificadas pelo método de Bradford e aquelas correspondentes à etapa de alimentação e aos picos obtidos durante a etapa de eluição foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARAÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA CELULAR ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO

Em processos de recuperação e purificação de bioprodutos, a precipitação é utilizada para a purificação ou apenas para concentração do material de interesse. Neste trabalho a precipitação foi utilizada para a eliminação de um corante indesejado, “Phenol Red”, que é um dos componentes do meio utilizado no cultivo dos hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais anti-TNP.

Corantes de uso comum na indústria têxtil têm sido amplamente empregados como ligantes ou agentes quelantes de metais em cromatografia para a purificação de proteínas, por apresentarem, na sua estrutura, grupamentos que podem interagir com proteínas e átomos que podem doar elétrons a metais (SENEL, 2001). Deste modo, a presença do corante na fase móvel da cromatografia poderia interferir nas interações entre o metal e a proteína, caso ele se ligasse ao metal e interagisse com a proteína ou caso o corante se ligasse à proteína, mascarando o sítio de adsorção. Desta forma, não seria possível saber se a proteína está sendo adsorvida devido à sua interação com o metal, ou devido à sua interação com o corante.

A precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise, foi eficiente na eliminação do corante e também possibilitou um aumento da concentração de proteínas na solução (de 46 $\mu\text{g/mL}$ de IgG_1 antes da precipitação para 81 $\mu\text{g/mL}$ de IgG_1 após precipitação, determinado em uma das precipitações realizadas). A maioria das proteínas existentes no sobrenadante antes da precipitação foi precipitada e constituiu a solução protéica obtida após a diálise, o que pode ser observado na Figura 4.1, que ilustra uma eletroforese típica de todas as precipitações realizadas. Os balanços de massa de cada precipitação estão apresentados no Anexo A.

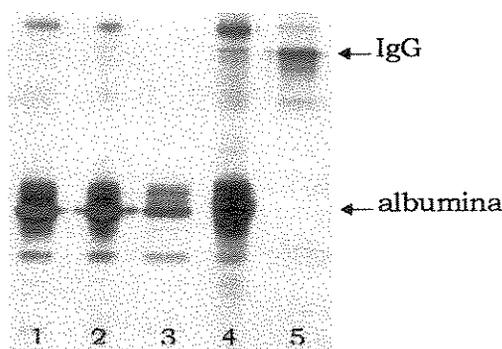


Figura 4.1: Eletroforese SDS-PAGE característica das precipitações de sobrenadante de cultura celular com sulfato de amônio a 50% de saturação, seguida de diálise. Faixas: (1) meio de cultura; (2) sobrenadante de cultura celular antes da precipitação; (3) material não precipitado; (4) sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado; (5) IgG humana comercial de alta pureza (Aventis Behring, Brasil)

A utilização da precipitação, com o objetivo de eliminar o corante, mostrou-se eficiente, pois após a diálise foi possível notar a perda da coloração, que inicialmente apresentava-se vermelha, embora não tenha sido feita nenhuma análise para detecção de traços de corante na solução. Segundo a eletroforese SDS-PAGE, nota-se também que o procedimento utilizado foi eficiente na precipitação das proteínas de alta massa molecular, incluindo a IgG₁.

A fim de caracterizar o anticorpo monoclonal utilizado nos experimentos realizados durante este trabalho, determinou-se o ponto isoelétrico da proteína 1B2.1B6, através de uma eletroforese IEF de uma amostra da IgG₁ altamente purificada por cromatografia de afinidade em gel de proteína G Sepharose 4 FF, apresentada no Anexo B. A proteína 1B2.1B6 apresentou uma faixa estreita de pI, característica de anticorpos monoclonais, entre 7,35 e 8,15.

4.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO DE AGENTE QUELANTE NAS MEMBRANAS

O agente quelante (IDA) foi imobilizado na membrana de PEVA através de ligação éter, após a ativação com epiclorigrina. A estrutura final proposta do adsorvente está apresentada na Figura 4.2.

A eficiência da imobilização do agente quelante IDA na membrana de PEVA, foi medida através da determinação da densidade de metal quelatado.

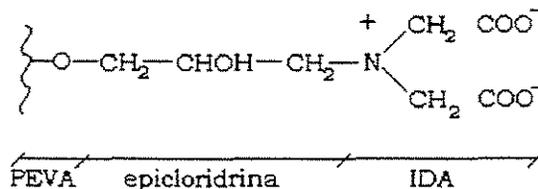


Figura 4.2: Estrutura proposta da matriz cromatográfica após ativação e imobilização do ácido iminodiacético.

Utilizando o procedimento descrito no item 3.2.6, foi determinada a quantidade de metal quelatada à matriz PEVA-IDA, em função da massa seca de membranas. Os valores obtidos para cada metal, bem como alguns valores de densidades de ligantes obtidos na literatura, utilizando géis de agarose, estão dispostos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Valores de densidade de ligantes utilizando membranas de PEVA e géis de agarose com IDA imobilizado.

Tipo de Matriz	Densidade de ligantes ($\mu\text{mol/g}$ suporte seco) ⁽¹⁾		Método de quantificação do metal	Referência
	Cu^{2+}	Ni^{2+}		
Membranas PEVA	38	35	espectrofotometria	Este trabalho
Chelating Superose (i)	45	-	espectrometria de absorção atômica	BELEW E PORATH (1990)
Chelating Superose (ii)	90	-	espectrometria de absorção atômica	BELEW E PORATH (1990)
Chelating Superose (iii)	126	-	espectrometria de absorção atômica	BELEW E PORATH (1990)
Chelating Sepharose Fast Flow	93	-	espectrofotometria	BELEW <i>et al.</i> (1987)
Agarose	60	-	não consta	PORATH <i>et al.</i> (1975)
Sepharose 6B	49	47	espectrometria de absorção atômica	SMITH <i>et al.</i> (1987)
Sepharose 6B		35 ⁽²⁾	não consta	PORATH E OLIN (1983)

⁽¹⁾ utilizando a correlação: 3 mL de agarose = 1 g de gel seco; ⁽²⁾ valores dados em μmol de Ni^{2+} / g úmido de gel; (i),(ii) e (iii) indicam diferentes géis de Chelating Superose.

Comparando-se os valores obtidos neste trabalho com os encontrados na literatura, observa-se que os valores de densidade de íons metálicos imobilizados nas membranas de PEVA, em relação a sua massa seca, são próximos a alguns valores encontrados para géis de agarose.

A variação encontrada nos valores de densidade de ligantes, mesmo entre os da literatura, ocorre devido a dois fatores: 1) método utilizado na quantificação do metal (espectroscopia ou espectroscopia de absorção atômica), e 2) tipo de matriz empregada, que embora sejam basicamente formados de agarose, têm diferenças na sua estrutura física e química, aumentando ou diminuindo sua capacidade de imobilização do metal. As características de cada suporte, quanto ao tamanho dos poros, material de fabricação, método de imobilização do agente quelante e condições em que foram realizadas as imobilizações do metal, influenciam nos resultados finais, o que torna pouco recomendável a comparação dos resultados, entre técnicas e matrizes diferentes. Dentre os métodos utilizados para a determinação da quantidade de metal imobilizado observa-se que a espectroscopia de absorção atômica tem sido a técnica mais freqüentemente utilizada.

4.3 INFLUÊNCIA DO SISTEMA TAMPONANTE NA PURIFICAÇÃO DE IgG₁ A PARTIR DE SOBRENADANTE DE CULTURA CELULAR PRECIPITADO E DIALISADO

Foram realizados experimentos para a determinação da influência do sistema tamponante na purificação dos anticorpos, nos quais foram utilizados os íons metálicos Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺ imobilizados na membrana de PEVA finamente cortadas, através do agente quelante IDA. Nesta etapa testou-se, para cada metal, os tampões de adsorção: 1) fosfato de sódio 100 mM com 0,1 M de NaCl a pH 7,5; 2) Mops 25 mM com 1,0 M de NaCl e 2 mM de imidazol a pH 7,0 e 3) Tris-HCl 25 mM a pH 7,0. As eluições foram realizadas por abaixamento de pH ou adição de agente competidor (imidazol e Tris) (ver item 3 de materiais e

métodos). A comparação entre os sistemas tamponantes foi feita com base nos balanços de massa e nas eletroforeses de cada cromatografia.

Os experimentos cromatográficos com íon metálico Co^{2+} quelatado foram realizados utilizando os tampões de adsorção Mops e Tris-HCl (eluição por adição de agente competidor), uma vez que se constatou desprendimento do metal da coluna com o abaixamento do pH, ainda na etapa de preparação da mesma, fenômeno também observado por VANÇAN e colaboradores (2002), utilizando gel Sepharose-IDA- Co^{2+} .

4.3.1 Tampão Fosfato de Sódio

Nos experimentos realizados em pH de adsorção igual a 7,5 contendo 0,1 M de cloreto de sódio, o tampão fosfato de sódio (pK_{a1} e pK_{a2} iguais a 2,1 e 7,2, respectivamente) age como um competidor fraco, possivelmente, interagindo através de ligações de coordenação com os íons metálicos imobilizados, promovendo uma maior seletividade na adsorção em IMAC. O fosfato age, nestas condições, como competidor fraco pois, por ser uma base dura (segundo definição ácido-base de Lewis), forma complexos de coordenação pouco estáveis com íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} , por estes não apresentarem o mesmo caráter: estes íons metálicos são ácidos intermediários de Lewis¹.

Os cromatogramas obtidos em cada ensaio utilizando os diferentes íons metálicos na presença de tampão fosfato e os balanços de massa são apresentados nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 e na Tabela 4.2 respectivamente.

Os resultados obtidos nos experimentos de purificação da IgG_1 mostraram que embora apresentando uma estrutura química capaz de interferir fracamente na adsorção das proteínas na matriz IMAC, o tampão fosfato não proporcionou uma

¹ Segundo PEARSON (1968), compostos de coordenação (íons metálico-molécula doadora de elétrons) estáveis são resultantes da associação de um ácido e de uma base de mesmo caráter (segundo definição ácido-base de Lewis).

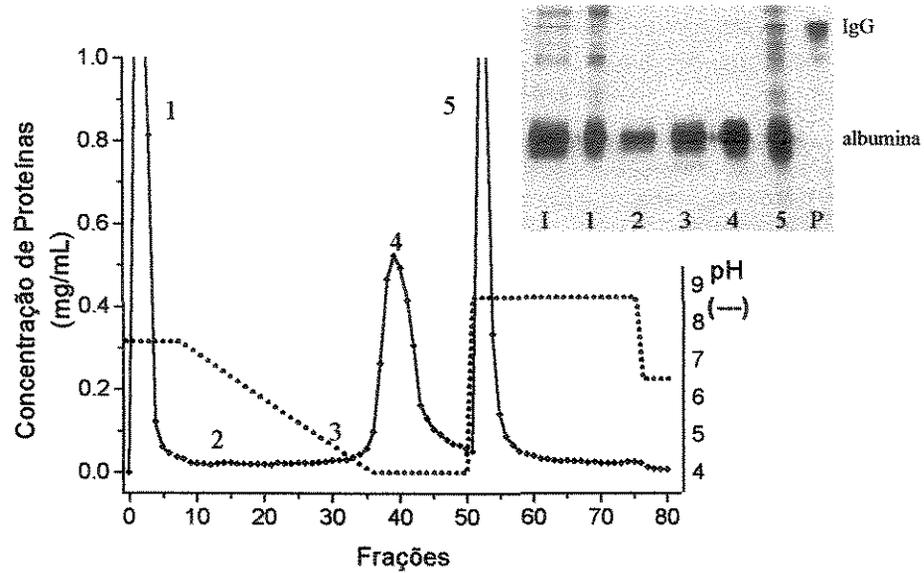


Figura 4.3: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo PEVA-IDA- Cu^{2+} . Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, fosfato de sódio 100 mM com 0,1 M NaCl a pH 7,5; dessorção em gradiente linear contínuo de pH até tampão fosfato de sódio 100 mM com 0,1 M NaCl a pH 4,0; tampão glicina 1M com 100 mM NaCl a pH 8,7; regeneração EDTA 50 mM com 0,5 M NaCl a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

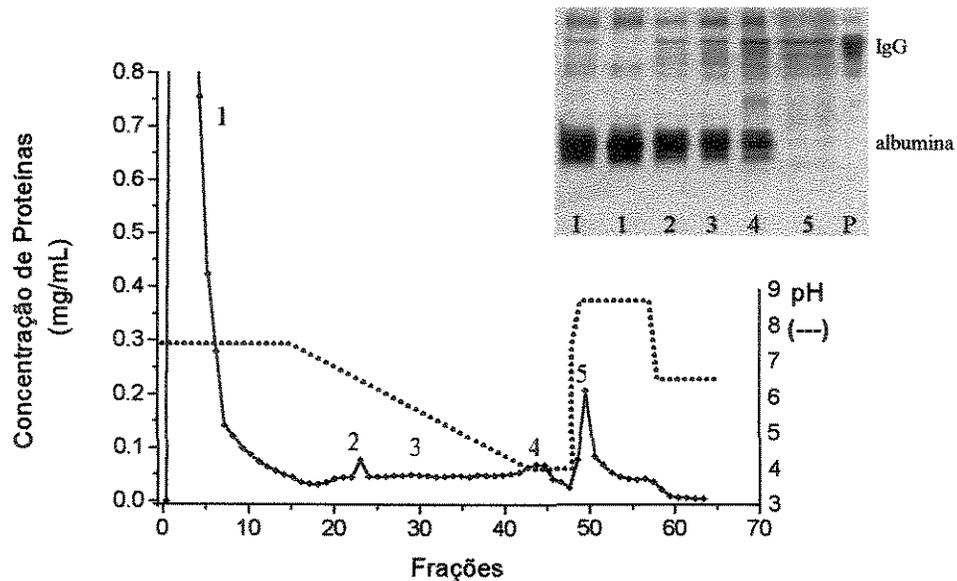


Figura 4.4: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo PEVA-IDA- Ni^{2+} . Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, fosfato de sódio 100 mM com 0,1 M NaCl a pH 7,5; dessorção em gradiente linear contínuo de pH até tampão fosfato de sódio 100 mM com 0,1 M NaCl a pH 4,0; tampão glicina 1M com 100 mM NaCl a pH 8,7; regeneração EDTA 50 mM com 0,5 M NaCl a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

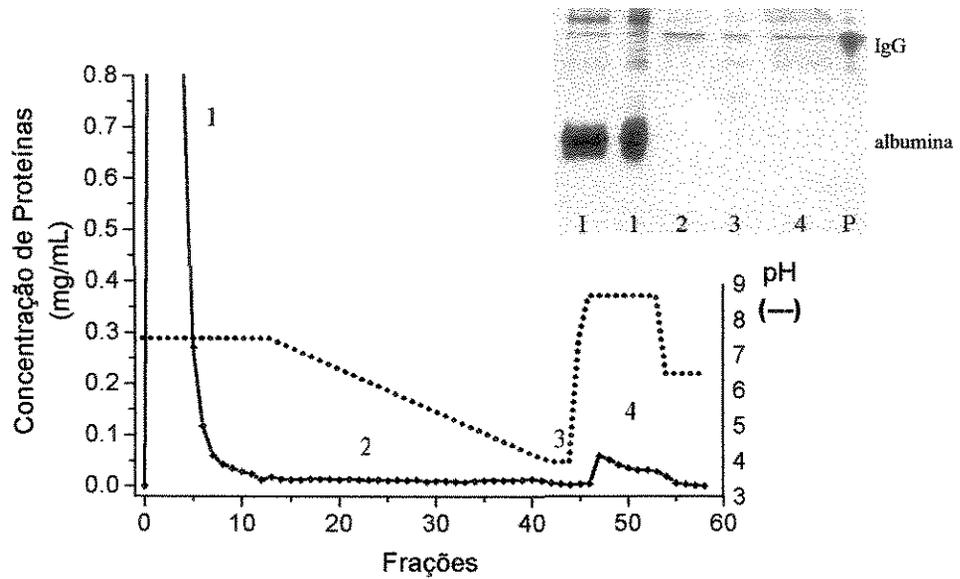


Figura 4.5 Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo PEVA-IDA- Zn^{2+} . Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, fosfato de sódio 100 mM com 0,1 M NaCl a pH 7,5; dessorção em gradiente linear contínuo de pH até tampão fosfato de sódio 100 mM com 0,1 M NaCl a pH 4,0; tampão glicina 1M com 100 mM NaCl a pH 8,7; regeneração EDTA 50 mM com 0,5 M NaCl a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-4) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

Tabela 4.2: Balanço de massa das cromatografias utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio a pH 7,5 e dessorção por gradiente linear contínuo de pH.

	Proteína total	Cu²⁺	Ni²⁺	Zn²⁺
Injeção	(mg)	47,34	55,72	56,24
	(%)	100,0	100,0	100,0
Lavagem	(mg)	16,00	49,72	49,4
	(%)	33,8	89,2	87,8
Eluição gradiente linear	(mg)	8,14	7,73	1,64
	(%)	38,9	13,9	2,9
Eluição glicina pH 8,7	(mg)	14,85	3,29	1,36
	(%)	31,0	6,0	2,0
Regeneração (EDTA)	(mg)	0,21	0,43	0,04
	(%)	1,0	1,0	0,0
Recuperação	(mg)	49,52	61,17	52,44
	(%)	105,0	110,0	93,0

adsorção seletiva. Os íons Cu^{2+} e Ni^{2+} , adsorveram IgG juntamente com muitas impurezas, não sendo possível eliminá-las durante a dessorção com o gradiente linear de pH. O íon Zn^{2+} não adsorveu a maior parte das impurezas e foi possível recuperar a IgG com traços de impurezas na última etapa de eluição com glicina, na qual ocorreu a eluição das proteínas acompanhadas de todo o metal que estava quelatado na coluna, servindo como uma etapa de regeneração da matriz.

Assim, a utilização do tampão fosfato de sódio a pH 7,5 na etapa de adsorção com eluição por decréscimo linear de pH até 4,0, mostrou-se ineficiente na purificação dos anticorpos monoclonais do isotipo IgG₁. Apesar de ter sido possível eluir a IgG na presença de impurezas na etapa de eluição com o tampão glicina, optou-se por não utilizar este procedimento, pois esta eluição acompanhada de metal é desfavorável para os processos visando aplicação industrial, uma vez que a presença de íons metálicos torna necessária a inclusão de mais uma etapa na purificação, visando a sua retirada.

4.3.2 Tampão Mops contendo imidazol

O tampão Mops, por ser zwitteriônico (pKa igual a 7,2), no pH de adsorção igual a pH 7,0 apresenta carga líquida zero e evita, assim, interações não específicas do tipo tampão-íon metálico e do tampão-proteína, não intervindo na adsorção das moléculas presentes na solução. Como nestes experimentos a eluição foi realizada através do agente competidor imidazol, foi necessária a inclusão deste agente no tampão de equilíbrio, como recomendado por SULKOWSKI (1996). Segundo este autor, como há muitos quelatos livres na coluna cromatográfica, durante a eluição as moléculas de imidazol adsorvem nos quelatos e perdem um próton, produzindo uma zona de pH muito baixo (de 1 a 2), que precede o pico de eluição (dessorção da proteína). Dessa forma, não há como afirmar se a proteína foi eluída pela ação da competição ou pela queda de pH. Para evitar este fenômeno, saturam-se, durante a etapa de equilíbrio da coluna, os ligantes livres com tampão contendo imidazol.

Os resultados obtidos nestes experimentos estão apresentados nas Figuras 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9 e os balanços de massa de cada cromatografia são mostrados na Tabela 4.3.

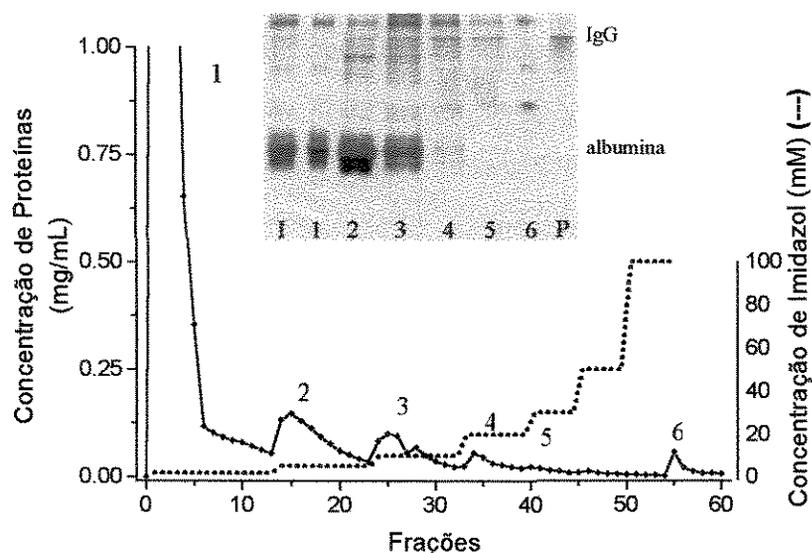


Figura 4.6: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Cu²⁺. Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops 25 mM contendo 1 M NaCl e 2 mM imidazol a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Mops 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 7,0 com 5, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-6) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercia

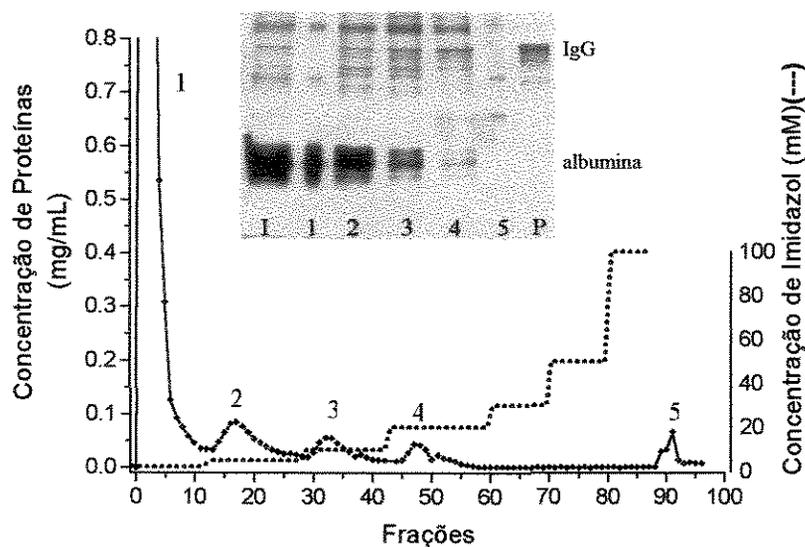


Figura 4.7: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Ni²⁺. Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops 25 mM contendo 1 M NaCl e 2 mM imidazol a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Mops 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 7,0 com 5, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

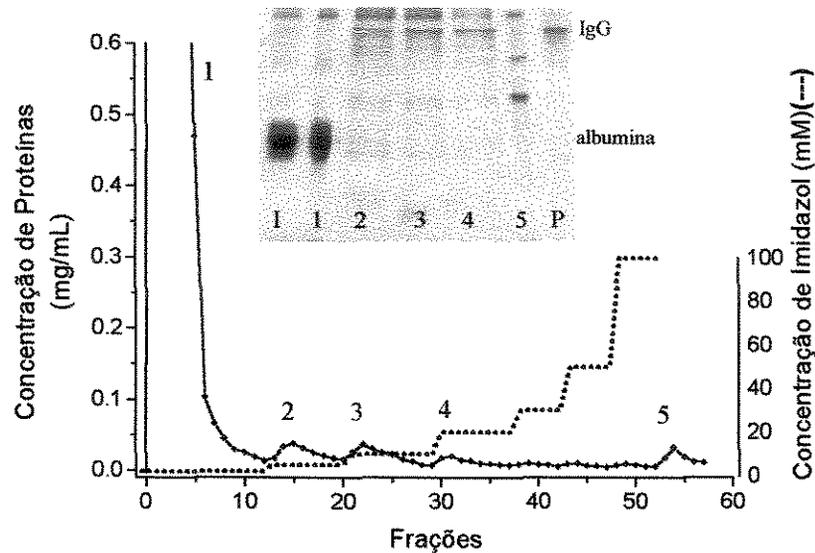


Figura 4.8: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Zn²⁺. Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops 25 mM contendo 1 M NaCl e 2 mM imidazol a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Mops 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 7,0 com 5, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

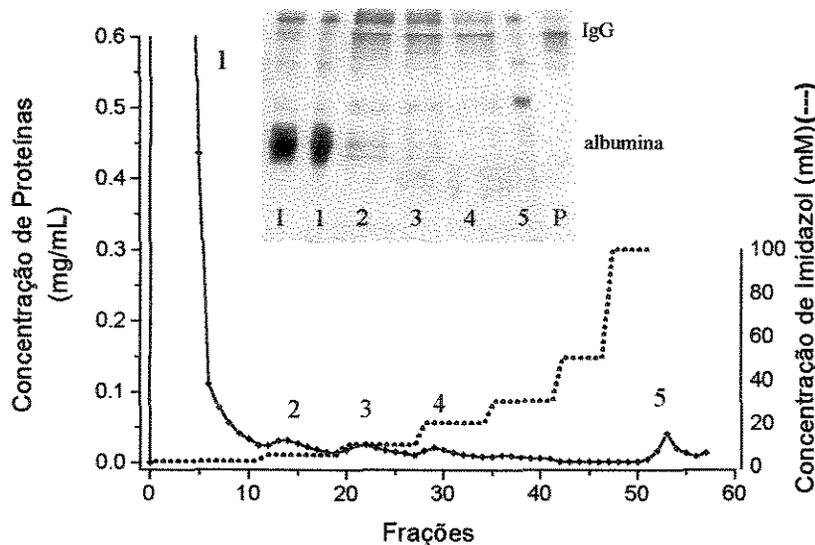


Figura 4.9: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Co²⁺. Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops 25 mM contendo 1 M NaCl e 2 mM imidazol a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Mops 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 7,0 com 5, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

Os resultados das cromatografias mostraram que todos os íons metálicos na presença do tampão Mops a pH 7,0, adsorveram a IgG acompanhada de muitas impurezas, destacando-se a albumina, não tendo sido possível obter IgG purificada nas etapas de eluição, em nenhum dos quatro casos.

Tabela 4.3: Balanço de massa após cromatografia utilizando tampão de equilíbrio Mops a pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de imidazol.

	Proteína total	Cu²⁺	Ni²⁺	Zn²⁺	Co²⁺
Injeção	(mg)	52,33	33,26	56,77	57,37
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Lavagem	(mg)	41,40	34,07	56,51	57,84
	(%)	79,0	102,0	99,5	100,8
Eluição 5 mM	(mg)	4,34	2,28	0,86	0,82
	(%)	8,0	7,0	1,5	1,4
Eluição 10 mM	(mg)	2,67	1,30	0,80	0,65
	(%)	5,0	4,0	1,4	1,1
Eluição 20 mM	(mg)	1,13	0,79	0,44	0,46
	(%)	2,0	2,0	0,8	1,0
Eluição 30 mM	(mg)	0,39	0,10	0,18	0,25
	(%)	0,0	0,0	0,0	0,0
Eluição 50 mM	(mg)	0,22	0,10	0,10	0,03
	(%)	0,0	0,0	0,0	0,0
Eluição 100 mM	(mg)	0,10	0,10	0,10	0,05
	(%)	0,0	0,0	0,0	0,0
Regeneração (EDTA)	(mg)	0,57	0,54	0,40	0,52
	(%)	1,0	2,0	1,0	0,9
Recuperação	(mg)	50,82	38,98	59,53	60,62
	(%)	97,1	117,2	104,8	105,6

Dentre os metais estudados, observa-se que os resultados de purificação da IgG₁ utilizando este sistema tamponante, obtidos nas eluições com 20 mM de imidazol, com os íons Zn²⁺ (0,44 g) e Co²⁺ (0,46 g) destacam-se dos demais, porém, percebe-se ainda a presença de várias impurezas. Com base nestes

resultados, optou-se pela não utilização do sistema tamponante Mops-imidazol para a purificação de IgG₁.

4.3.3 Tampão Tris-HCl

O tampão Tris-HCl é um tampão com pK_a igual a 8,3, de forma que em pH abaixo deste valor, sua carga é positiva. Embora possua carga positiva em pH 7,0, o grupamento $-NH_3^+$ presente na sua estrutura possui um par de elétrons disponível para uma interação de coordenação com os íons metálicos imobilizados. Esta característica faz com que o tampão Tris-HCl compita com a proteína pelo sítio de interação no metal, tornando a adsorção de proteínas mais seletiva. Esta propriedade pode também ser utilizada na etapa de eluição, onde o aumento de concentração de Tris proporciona a dessorção das proteínas que foram adsorvidas.

As Figuras 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13, apresentam os resultados dos experimentos realizados e o balanço de massa das cromatografias é apresentado na Tabela 4.4.

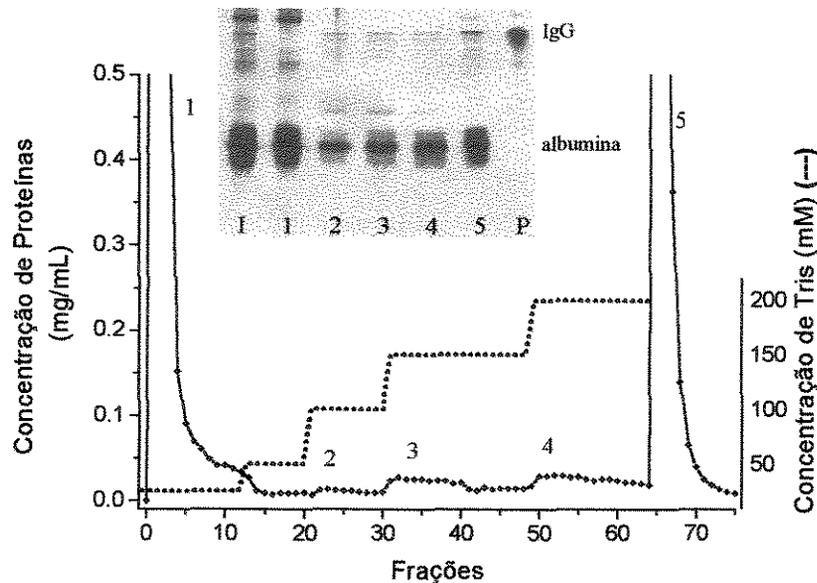


Figura 4.10: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Cu²⁺. Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 50, 100, 150 e 200 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

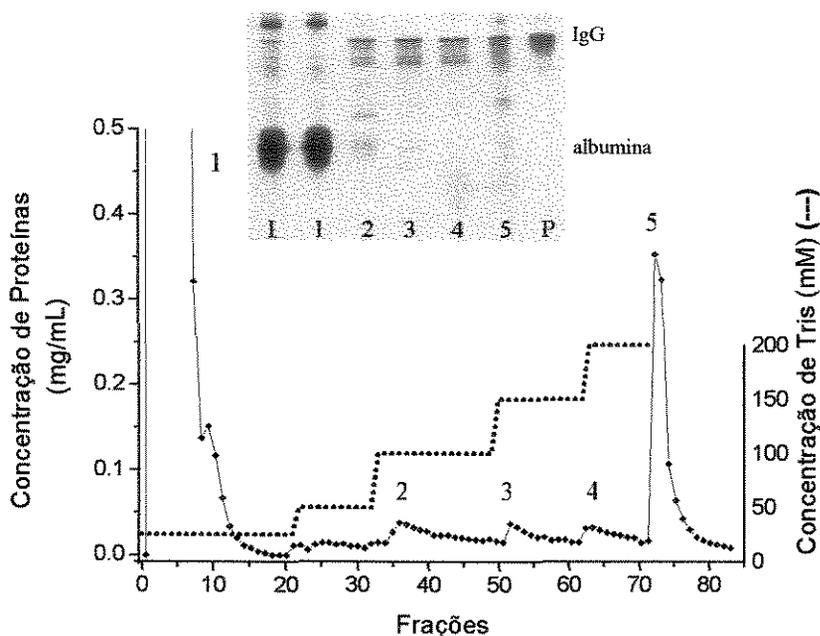


Figura 4.11: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Ni²⁺. Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 50, 100, 150 e 200 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

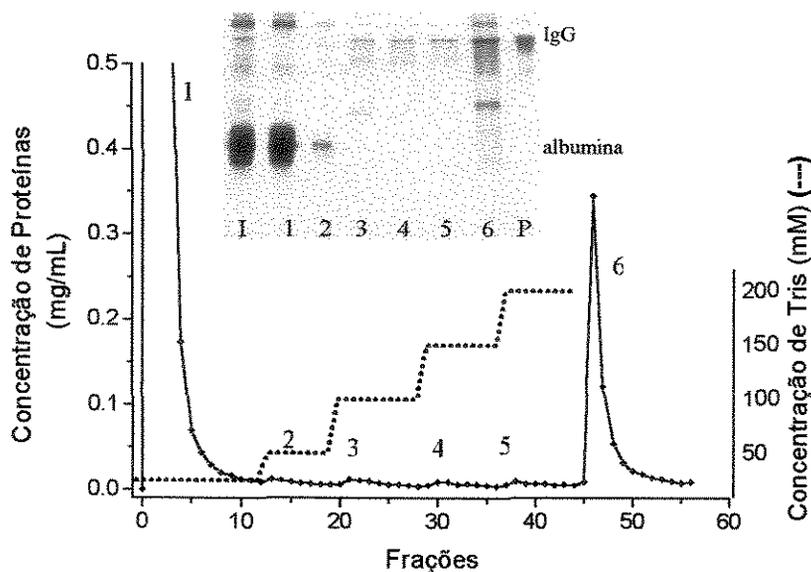


Figura 4.12: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Zn²⁺. Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 50, 100, 150 e 200 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

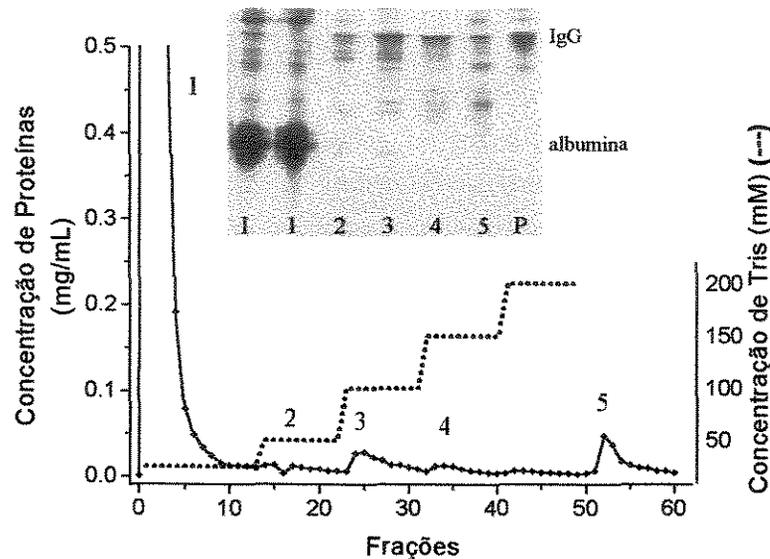


Figura 4.13: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA- Co^{2+} . Volume alimentado, 5 mL. Volume das frações, 5 mL. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 50, 100, 150 e 200 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG humana comercial.

Observa-se, a partir dos resultados das cromatografias, que o íon metálico Cu^{2+} adsorveu IgG_1 juntamente com muitas impurezas, destacando-se a presença de albumina, não tendo sido possível obter, nas etapas de eluição, IgG na ausência desta proteína. As eletroforeses referentes às cromatografias utilizando os íons Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} , mostram que uma grande quantidade de proteína (impurezas) não foi retida pela coluna, restando adsorvidas apenas a IgG_1 e traços de outras proteínas. De acordo com as Figuras 4.11 e 4.12, os melhores resultados de purificação foram obtidos nas etapas de eluição a 150 e 200 mM de Tris-HCl para os íons Ni^{2+} (1,13 e 1,02 g) e Zn^{2+} (0,25 e 0,26 g).

Concluindo, o tampão Tris-HCl mostrou grande potencial de utilização na purificação do anticorpo monoclonal, uma vez que favoreceu uma adsorção seletiva da IgG_1 , e nas etapas de eluição, houve a recuperação do anticorpo com traços de impurezas.

Tabela 4.4: Balanço de massa das cromatografias utilizando tampão de equilíbrio Tris-HCl a pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris-HCl .

	Proteína total	Cu²⁺	Ni²⁺	Zn²⁺	Co²⁺
Injeção	(mg)	48,42	85,64	43,05	38,64
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Lavagem	(mg)	26,42	78,76	43,17	39,90
	(%)	54,6	92,0	100,3	103,3
Eluição 50 mM	(mg)	0,46	0,28	0,29	0,35
	(%)	1,0	0,3	0,7	0,9
Eluição 100 mM	(mg)	0,58	1,11	0,34	0,64
	(%)	1,2	1,3	0,8	1,7
Eluição 150mM	(mg)	1,80	1,13	0,25	0,30
	(%)	3,7	1,0	0,1	0,1
Eluição 200 mM	(mg)	2,02	1,02	0,26	0,16
	(%)	4,1	1,2	0,1	0,0
Regeneração (EDTA)	(mg)	17,23	4,30	3,27	0,70
	(%)	35,6	5,0	7,6	1,8
Recuperação	(mg)	48,51	86,60	47,58	42,05
	(%)	100,1	101,1	110,5	108,8

4.3.4 Comparação entre os diferentes sistemas tamponantes

Os resultados de adsorção de IgG em PEVA-IDA-Me²⁺ obtidos com os três sistemas tamponantes estudados mostraram que a porcentagem de proteína retida na coluna decresce na seguinte ordem Cu²⁺ > Ni²⁺ > Zn²⁺ ≥ Co²⁺, seguindo a regra estabelecida por SULKOWSKI (1989) para a adsorção em IMAC, de proteínas contendo resíduos de histidina acessíveis (Tabela 4.5).

O tampão fosfato foi o menos seletivo dentre os tampões estudados, sendo que o Zn²⁺ foi o único íon que adsorveu IgG₁ com uma menor quantidade de impurezas (ver Figuras 4.3 até 4.5). Dentre os resultados de purificação obtidos com este tampão, destacam-se as frações de eluição com glicina, utilizando os íons Ni²⁺ e Zn²⁺, onde a IgG₁ eluiu na presença de traços de impurezas, mas juntamente com todo o metal quelatado na coluna.

Tabela: 4.5: Percentual de proteínas adsorvidas na matriz PEVA-IDA-Me⁺² nos diferentes sistemas tamponantes.

	Fosfato	Tris-HCl	Mops
Cu ²⁺	71%	46%	18%
Ni ²⁺	21%	9%	15%
Zn ²⁺	5%	10%	5%
Co ²⁺	-	6%	5%

O tampão Mops com imidazol favoreceu a adsorção da IgG, sempre acompanhada de impurezas, mesmo no caso dos metais Zn²⁺ e Co²⁺, que, embora em pequena quantidade, adsorveram também a albumina.

Dentre os três tampões estudados, o Tris-HCl foi o que menos favoreceu a adsorção de impurezas, e, com exceção do Cu²⁺, todos os outros íons metálicos adsorveram IgG₁ de forma seletiva. Os resultados com Tris mostram-se satisfatórios (principalmente para o íon Zn²⁺) para uma aplicação em larga escala, uma vez que este tampão não provocou o desprendimento de metal da coluna e favoreceu a obtenção da IgG₁ purificada, com traços de impurezas, mas livre de albumina, que é o principal constituinte do sobrenadante de cultura celular utilizado. Assim, dentre os tampões estudados, o tampão Tris-HCl destaca-se como o mais indicado para a purificação da IgG monoclonal.

4.4 ESTUDO COMPARATIVO DA PURIFICAÇÃO DE IgG₁ A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTAÇÃO

A recuperação e purificação de anticorpos monoclonais a partir de sobrenadante de cultura celular é uma etapa de alto custo, uma vez que a sua utilização na área terapêutica ou de diagnósticos exige a obtenção do anticorpo na forma ativa e com alto grau de pureza. Nos processos de purificação em escala industrial é essencial a minimização do número de etapas, do tempo e, conseqüentemente, do custo total do processo. Desta forma, seria uma economia em termos de processo, se a IgG₁ fosse obtida com alto grau de pureza, alimentando-se a coluna cromatográfica com o sobrenadante sem tratamento prévio, ou seja, sem a necessidade da etapa de precipitação.

Assim, para determinar a melhor condição de alimentação, foram testadas três diferentes situações: 1) sobrenadante não precipitado sem pré-tratamento (em tampão Hepes), 2) sobrenadante não precipitado tratado (com troca do tampão Hepes para Tris-HCl) e 3) sobrenadante precipitado e dialisado. A comparação dos resultados de cada cromatografia foi feita com base na quantificação de proteína total (método de Bradford), na quantificação de IgG₁ (teste ELISA) e na homogeneidade e pureza das frações das cromatografias (eletroforese SDS-PAGE).

4.4.1 Sobrenadante de cultura celular não precipitado sem pré-tratamento

Nestes experimentos, alíquotas de 50 mL de sobrenadante de cultura celular sem pré-tratamento foram injetadas na coluna de leito fixo contendo PEVA-IDA finamente cortadas com os íons Ni²⁺ ou Zn²⁺ imobilizados, previamente equilibradas com o tampão Tris-HCl 25 mM a pH 7,0. A eluição foi realizada em degraus de 100, 300, 500 e 700 mM de tampão Tris-HCl a pH 7,0.

As Figuras 4.14 e 4.15 apresentam os resultados obtidos para os dois íons metálicos testados e a Tabela 4.6 mostra o balanço de proteína total e de anticorpos de cada etapa das cromatografias.

Segundo as eletroforeses apresentadas, em ambas as cromatografias, não foram obtidas frações puras de IgG₁, sendo que as frações obtidas nas etapas de eluição para os dois íons metálicos utilizados, são similares na sua composição, apresentando baixos valores de recuperação e massa específica de anticorpos. Destacam-se como melhores resultados aqueles obtidos com eluição por 300 mM de Tris para os dois metais. Comparando-se estes resultados com aqueles obtidos com o tampão Tris-HCl no item 4.3, nota-se que anteriormente as frações de eluição, nos experimentos utilizando os metais Ni²⁺ e Zn²⁺, apresentaram IgG₁ de maior pureza (mediante análise de eletroforese SDS-PAGE). É importante destacar também a perda significativa de IgG₁ na etapa de lavagem (14,2% e 21,7%), para ambos os metais estudados.

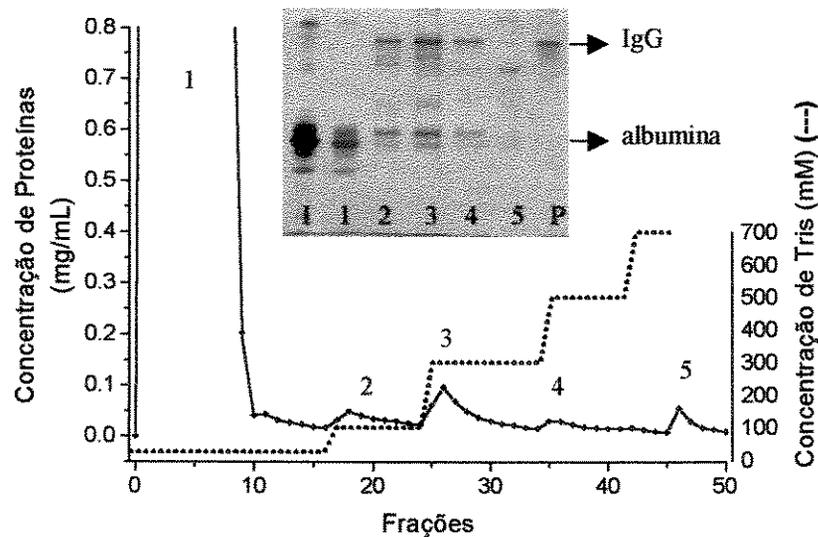


Figura 4.14: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular não precipitado sem pré-tratamento em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Ni²⁺. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 100, 300, 500 e 700 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG₁ de alta pureza.

Essa diferença na eficiência da purificação da IgG₁ pode ter ocorrido devido a uma maior interferência das impurezas na interação da matriz PEVA-IDA-Me²⁺ com os anticorpos, uma vez que sem a etapa de precipitação, o sobrenadante de cultura celular apresenta, segundo eletroforese SDS-PAGE, uma razão concentração de proteína total/concentração da IgG₁ muito maior do que

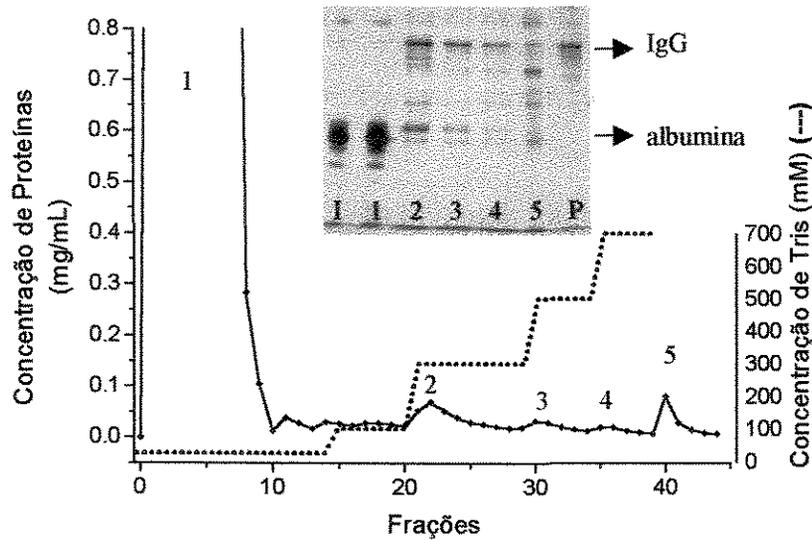


Figura 4.15: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular não precipitado sem pré-tratamento em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Zn²⁺. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 100, 300, 500 e 700 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG₁ de alta pureza.

Tabela 4.6: Purificação de anticorpos monoclonais (IgG₁) a partir de sobrenadante de cultura celular não precipitado sem pré-tratamento em coluna contendo PEVA-IDA-Me²⁺.

Frações	Proteínas ⁽¹⁾		Anticorpo ⁽²⁾		Massa Específica		Recuperação anticorpos		Fator Purificação	
	(mg)		(μg)		(μg AcM /mg)		(%)		Purificação	
	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺
Sobrenadante de cultura celular não tratado	191	168	2670	2350	14	14	100	100	1	1
Lavagem	190	170	380	510	2	3	14,2	21,7	0,1	0,2
Eluição 100 mM Tris	1,3	0,7	387	0	298	0	14,5	0	21,3	0
Eluição 300 mM Tris	2,0	1,5	786	633	393	422	29,4	26,9	28,1	30,1
Eluição 500 mM Tris	0,7	0,5	189	208	270	416	7,1	8,8	19,3	29,7
Eluição 700 mM Tris	0,2	0,4	0	107	0	267	0	4,5	0	19,1
Regeneração EDTA	0,6	0,7	8	17	13	24	0,3	0,7	0,9	1,7

(1) Dosagem de proteína total pelo Método de Bradford (2) Dosagem de IgG₁ por teste ELISA

no sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado. Além de que, o tampão originalmente presente no sobrenadante de cultura celular é o tampão Hepes, que por ser zwitteriônico, favorece a adsorção das proteínas na matriz cromatográfica, agindo de forma semelhante ao tampão Mops estudado anteriormente.

Baseado nas baixas seletividade e recuperação encontradas, os resultados obtidos nas cromatografias utilizando o sobrenadante de cultura celular não tratado, mostraram que este procedimento não é eficiente na obtenção dos anticorpos monoclonais purificados.

4.4.2 Sobrenadante de cultura celular não precipitado tratado

Aliquotas de 50 mL de sobrenadante de cultura celular foram filtradas em em gel de Sephadex G 25 M, onde o tampão, originalmente Hepes, foi trocado para Tris-HCl 25 mM a pH 7,0. Em seguida, a solução foi injetada na coluna contendo PEVA-IDA com os íons Ni^{2+} ou Zn^{2+} imobilizados, previamente equilibradas com o mesmo tampão. A eluição foi realizada em degraus de 100, 300 e 700 mM de tampão Tris-HCl a pH 7,0. O perfil cromatográfico e as eletroforeses referentes aos picos de cada experimento são apresentados nas Figuras 4.16 e 4.17 e o balanço de proteína total e IgG_1 , na Tabela 4.7.

O balanço das quantidades de IgG_1 eluídas em cada experimento, mostra que a troca do tampão do sobrenadante de cultura celular favoreceu a purificação do anticorpo, quando comparados com a alimentação do sobrenadante sem pré-tratamento obtendo-se frações na eluição com valores mais altos de massa específica de IgG_1 do que aqueles com o sobrenadante não tratado. Para ambos os metais, os melhores resultados de pureza foram obtidos com eluição em 700 mM de Tris, onde foram recuperados 44,9% (764 μg) e 42,4% (589 μg) dos anticorpos injetados, para os metais Ni^{2+} e Zn^{2+} , respectivamente. No entanto, as eletroforeses das Figuras 4.16 e 4.17 mostram a presença de muitas impurezas nas frações de eluição

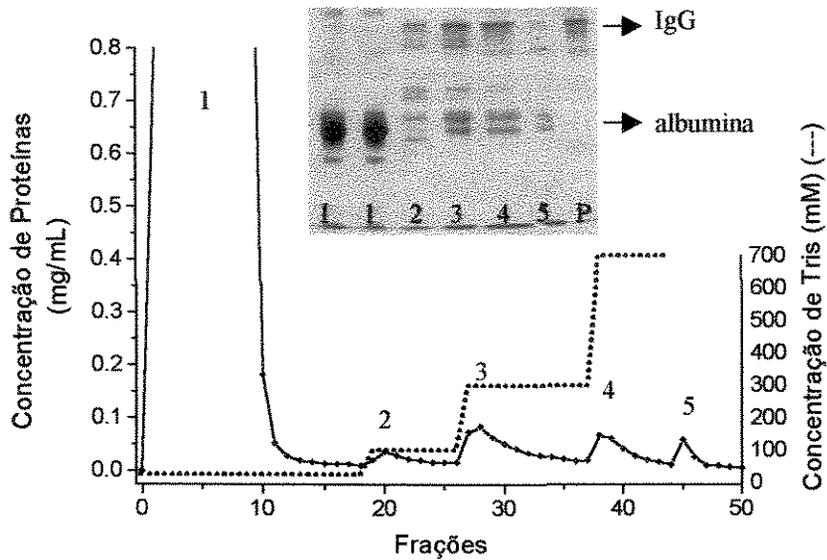


Figura 4.16: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular não precipitado tratado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Ni²⁺. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 100, 300 e 700 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG₁ de alta pureza.

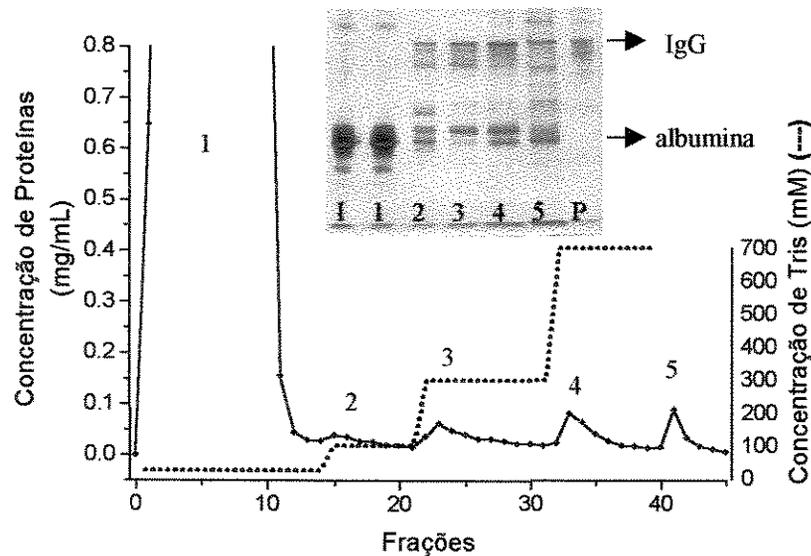


Figura 4.17: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular não precipitado tratado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Zn²⁺. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 100, 300 e 700 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG₁ de alta pureza.

Tabela 4.7: Purificação de anticorpos monoclonais (IgG₁) a partir de sobrenadante de cultura celular não precipitado tratado, em coluna contendo PEVA-IDA-Me²⁺.

Frações	Proteínas ⁽¹⁾		Anticorpo ⁽²⁾		Massa Específica		Recuperação anticorpos		Fator Purificação	
	(mg)		(µg)		(µg AcM /mg)		(%)			
	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺
Sobrenadante de cultura celular tratado	141	154	1700	1390	12	9,0	100	100	1	1
Lavagem	140	148	42	59	0,3	0,4	2,5	4,2	0,02	0,04
Eluição 100 mM Tris	0,9	0,9	184	218	204,4	242,2	10,8	15,7	17,0	26,9
Eluição 300 mM Tris	2,3	1,6	810	440	352,1	275,0	47,6	31,6	29,3	30,6
Eluição 700 mM Tris	1,2	1,4	764	589	636,7	420,7	44,9	42,4	53,1	46,7
Regeneração EDTA	0,6	0,9	28	139	46,7	154,4	1,6	10,0	3,9	17,2

(1) Dosagem de proteína total pelo Método de Bradford (2) Dosagem de IgG₁ por teste ELISA

Outro fato importante observado é que, a troca de tampão do sobrenadante de Hepes para Tris-HCl favoreceu uma maior adsorção de IgG₁, havendo menores perdas na etapa de lavagem (menos que 4,5%), para ambos os metais estudados, o que indica que a contribuição do tampão Tris-HCl é relevante na purificação dos anticorpos monoclonais, uma vez que favorece a sua adsorção na matriz, e contribui para a obtenção de frações mais puras em IgG₁ na etapa de eluição.

4.4.3 Sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado

A fim de completar os estudos iniciados no item 4.3, optou-se pela realização de um novo ensaio utilizando o íon Zn²⁺, com o qual obteve-se o melhor resultado de purificação dos anticorpos, imobilizado em coluna previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7. A coluna foi alimentada com 5 mL do sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado e a eluição foi realizada por aumento da concentração de Tris até 700 mM, para promover a eluição da IgG₁ fortemente adsorvida nas membranas de PEVA-IDA-Zn²⁺. A escolha pela adsorção em tampão com mais alta concentração de Tris ocorreu a fim de favorecer o aumento da seletividade da matriz cromatográfica, diminuindo a adsorção de proteínas indesejadas. A Figura 4.18 apresenta o perfil

cromatográfico e a eletroforese correspondente ao experimento e a Tabela 4.8 mostra o balanço de proteína total e IgG₁ de cada uma das etapas.

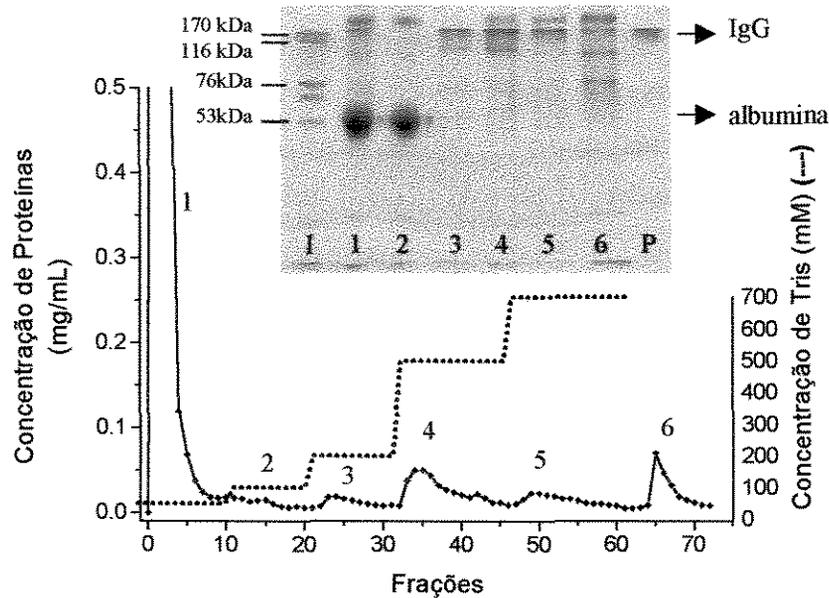


Figura 4.18: Cromatografia de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Zn²⁺. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 50 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 100, 300, 500 e 700 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (M) marcador de alta massa molecular; (I) material injetado; (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG₁ de alta pureza.

Tabela 4.8: Purificação de anticorpos monoclonais (IgG₁) a partir de sobrenadante de cultura celular, precipitado e dialisado, em coluna contendo PEVA-IDA-Zn²⁺.

Frações	Proteínas ⁽¹⁾ (mg)	Anticorpo ⁽²⁾ (µg)	Massa Específica (µg AcM /mg)	Recuperação anticorpos (%)	Fator Purificação
Sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado	27,5	980	35,7	100	1
Lavagem	26,1	26	1,0	2,7	0,03
Eluição 100 mM Tris	0,16	0	0	0	0
Eluição 300 mM Tris	0,32	100	312,5	10,2	8,8
Eluição 500 mM Tris	0,91	606	665,9	61,8	18,7
Eluição 700 mM Tris	0,52	279	536,5	28,5	15,0
Regeneração EDTA	0,54	86	159,3	8,8	4,5

(1) Dosagem de proteína total pelo Método de Bradford (2) Dosagem de IgG₁ por teste ELISA

A eletroforese mostra que não há presença do anticorpo nas frações de lavagem (faixa 1), indicando que os anticorpos ficaram adsorvidos na matriz. As faixas 2, 3, e 4 mostram as proteínas que ficaram adsorvidas e eluíram com 200, 500 e 700 mM Tris respectivamente, nas quais observa-se a presença da IgG₁ juntamente com traços de impurezas. As proteínas fortemente adsorvidas, incluindo uma pequena quantidade do anticorpo, eluíram apenas com a passagem da solução de EDTA 50 mM pH 6,5 (faixa 5).

O balanço de massa de cada uma das etapas mostra que, a grande maioria das proteínas foram eliminadas na etapa de lavagem, restando apenas uma pequena quantidade adsorvida, porém rica em IgG₁.

Os resultados de purificação obtidos com a alimentação da coluna PEVA-IDA-Zn²⁺ com sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, em presença do tampão Tris-HCl 50 mM mostraram que este procedimento foi o mais eficiente para a obtenção dos anticorpos monoclonais purificados a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas. Dos valores obtidos, destaca-se aquele referente às frações de eluição com 500 mM de Tris, que alcança a massa específica de 665,9 µg de anticorpos por miligrama de proteína total eluída, correspondendo a 61,8% dos anticorpos alimentados na coluna.

Os anticorpos obtidos nas frações de 700 mM de Tris-HCl e o sobrenadante de cultura celular precipitado e não precipitado, foram analisados quanto a sua atividade através de titulação por ELISA, visando avaliar uma possível perda da atividade do anticorpo devido ao processo de purificação. Os resultados obtidos, apresentados no Anexo C, mostraram que para as três amostras avaliadas, a solução contendo os anticorpos do tipo IgG₁ apresentou um resultado positivo de atividade, até a concentração aproximada de 0,02 µg de anticorpo por mililitro de solução. Assim, é possível concluir que, o processo de purificação proposto neste trabalho não afeta a atividade do anticorpo monoclonal estudado.

4.5 PURIFICAÇÃO DE IgG₁ EM DUAS ETAPAS CROMATOGRÁFICAS CONSECUTIVAS

Na busca por melhores resultados de recuperação e pureza para a purificação da IgG₁ a partir do sobrenadante de cultura celular sem pré-tratamento, ou seja, sem a necessidade da etapa de precipitação, utilizou-se um ensaio com duas etapas cromatográficas consecutivas em membranas de PEVA-IDA-Me²⁺, a fim de verificar a eficiência deste procedimento envolvendo apenas o princípio de afinidade por íons metálicos imobilizados, na purificação dos anticorpos monoclonais estudados. Os experimentos foram realizados segundo item 3.2.14. O sobrenadante de cultura celular não precipitado sem pré-tratamento foi alimentado na coluna de PEVA-IDA-Ni²⁺ e a eluição foi realizada com tampão Tris-HCl 700 mM a pH 7,0. Esta solução teve seu tampão trocado para 50 mM de Tris-HCl a pH 7,0 e foi alimentada em uma segunda coluna contendo PEVA-IDA-Zn²⁺. A eluição na segunda cromatografia foi realizada por degrau de concentração de Tris no tampão de adsorção. O cromatograma da segunda cromatografia e a eletroforese do ensaio completo, estão apresentados na Figura 4.19 e 4.20 e o balanço de proteína total e de IgG₁, na Tabela 4.9.

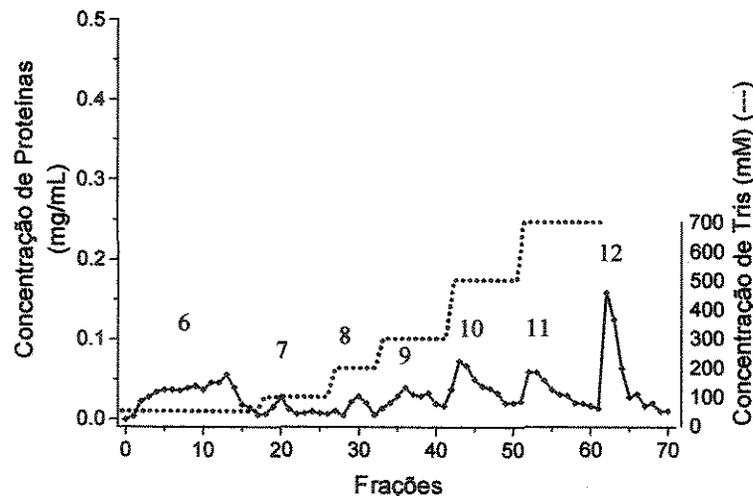


Figura 4.19. Cromatografia para purificação de IgG₁ em coluna contendo membrana PEVA-IDA-Zn²⁺. Alimentação: proteínas eluídas com 700 mM na primeira cromatografia. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Tris-HCl 50 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 100, 200, 300, 500 e 700 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5.

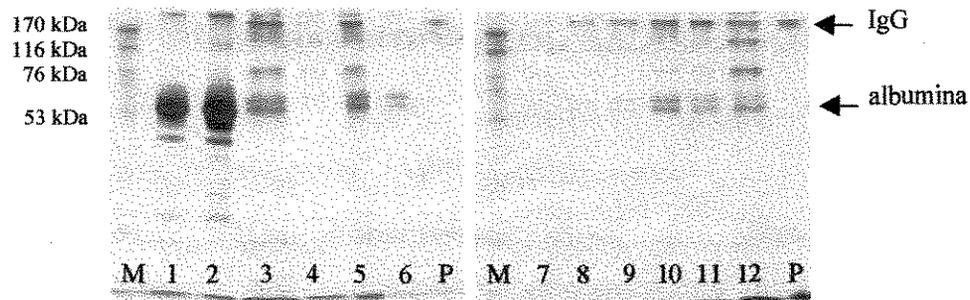


Figura 4.20: Eletroforese da purificação de IgG₁ utilizando duas cromatografias em colunas contendo PEVA-IDA-M²⁺. As faixas 1-4 correspondem a 1^a cromatografia: (1) sobrenadante de cultura celular não precipitado sem pré-tratamento (alimentação); (2) etapa de lavagem; (3) eluição com 700 mM a pH 7,0; (4) regeneração com EDTA 50 mM a pH 6,5. As faixas 5-12 correspondem a 2^a cromatografia: (5) alimentação; (6-12) correspondem as etapas numeradas no cromatograma da Fig. 4.19. (M) marcadores de massa molecular; (P) IgG₁ de alta pureza.

Tabela 4.9: Purificação de anticorpos monoclonais (IgG₁) utilizando duas cromatografias em coluna contendo PEVA-IDA-Me²⁺.

	Frações	Proteína (mg)	Anticorpos (µg)	Massa específica (µg AcM/mg)	Recuperação anticorpos (%)	Fator purificação
Ni ²⁺	Sobrenadante de cultura celular não precipitado sem pré-tratamento	142	2840	20,0	100	1
	Lavagem	118	708	6,0	24,9	0,3
	Eluição 700 mM Tris	2,8	862	307,8	30,3	15,4
	Regeneração EDTA	0,3	8	26,7	0,3	1,3
Zn ²⁺	Proteínas que eluíram com 700 mM Tris (alimentação)	2,2	980	445,5	100	1
	Lavagem	0,5	3	6,0	0,3	0,01
	Eluição 100 mM Tris	0,1	4	40,0	0,4	0,1
	Eluição 200 mM Tris	0,1	24	240,0	2,4	0,5
	Eluição 300 mM Tris	0,2	100	500,0	10,2	1,1
	Eluição 500 mM Tris	0,4	210	525,0	21,4	1,2
	Eluição 700 mM Tris	0,4	210	525,0	21,4	1,2
	Regeneração EDTA	0,5	100	200,0	10,2	0,4

(1) Dosagem de proteína total pelo Método de Bradford (2) Dosagem de IgG₁ por teste ELISA

Os resultados obtidos neste ensaio não indicam uma purificação eficiente do anticorpo monoclonal, uma vez que há presença de impurezas acompanhando a IgG₁ em todas as etapas de eluição.

Assim, conclui-se que a utilização de duas etapas cromatográficas para a purificação de IgG₁, nas condições estudadas, não contribui para a sua obtenção com alto grau de pureza. Além de que, como já observado no item 4.4.1, a injeção de sobrenadante não precipitado sem pré-tratamento na coluna contendo o metal imobilizado, acarretou perdas significativas de IgG₁ na etapa de lavagem.

4.6 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Uma vez determinada a melhor condição de purificação dos anticorpos monoclonais, que consistiu na utilização do íon Zn²⁺ imobilizado e alimentação do sobrenadante precipitado e dialisado e uso do tampão Tris-HCl, foram realizados experimentos em frascos agitados visando a determinação da isoterma de adsorção da IgG₁. Os experimentos foram conduzidos em batelada, a temperatura ambiente, seguindo o procedimento descrito no item 3.2.16, visando determinar a capacidade máxima de adsorção (q_m) e a constante de dissociação (K_d) do complexo IDA-Zn²⁺-IgG₁. Os resultados obtidos para a adsorção de IgG₁ nas membranas de PEVA derivatizadas com IDA-Zn²⁺ são apresentados na Figura 4.21, com os quais ajustaram-se os parâmetros do modelo de Langmuir através do método de regressão não linear de Levenberg-Marquardt. Os valores de q_m e K_d obtidos para este modelo estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de IgG₁ em membranas de PEVA-IDA-Zn²⁺

Parâmetros		IgG ₁ PEVA-IDA-Zn ²⁺
q_m	(mg/cm ³)	54,6 ± 7,2
	(mg/g)	63,4 ± 8,4
K_d	(M)	(8,1 ± 2,4) x 10 ⁻⁶
coeficiente de correlação		0,982

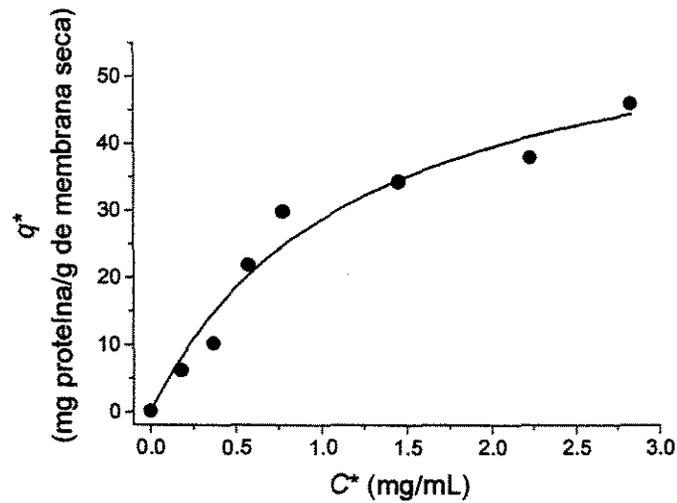


Figura 4.21: Isoterma de adsorção de IgG₁ pré-purificada em membranas PEVA-IDA-Zn²⁺. Ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmuir.

O coeficiente de correlação apresenta um valor próximo a 1,0, o que indica um ajuste satisfatório dos dados, porém, segundo SHARMA e AGARWAL (2001), outra maneira de avaliar a validade do modelo de Langmuir, é linearizar o modelo segundo equação de Scatchard (eq. 2.5), onde a forma do gráfico q^*/C^* versus q^* é particularmente sensível para indicar a existência de interações cooperativas na adsorção das proteínas no ligante imobilizado (Figura 4.22).

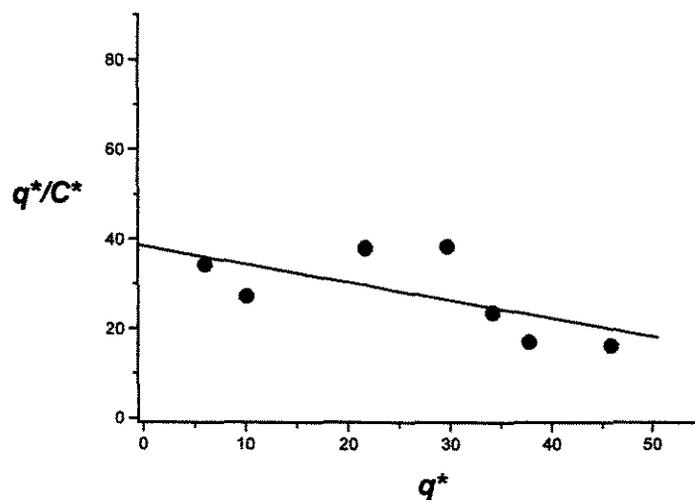


Figura 4.22: Gráfico de Scatchard para os dados de adsorção de IgG₁ pré-purificada em membranas de PEVA-IDA-Zn²⁺, $R^2 = 0,63$.

Analisando-se o gráfico de Scatchard, pode-se notar que os dados referentes a adsorção de IgG₁ nas membranas de PEVA-IDA-Zn²⁺, não apresentam um comportamento linear, o que indica a existência de desvios do modelo de Langmuir. Estes desvios podem ser consequência de interações de cooperatividade originadas pela natureza macromolecular da proteína e da existência de múltiplas interações entre a matriz e os múltiplos grupos funcionais da biomolécula.

Quando o modelo de Langmuir não representa bem os dados experimentais, outros modelos empíricos, que levem em consideração a existência de cooperatividade, heterogeneidade da superfície e formação de várias camadas podem ser utilizados (SHARMA e AGARWAL, 2001).

Aplicou-se então o modelo empírico de Langmuir-Freundlich (eq. 2.6), que leva em conta a heterogeneidade das interações entre a proteína e o adsorvente. A Figura 4.23 apresenta os dados experimentais e a curva ajustada segundo o modelo de Langmuir-Freundlich. Os parâmetros do modelo, ajustados segundo método não linear de Levenberg-Marquardt estão apresentados na Tabela 4.11.

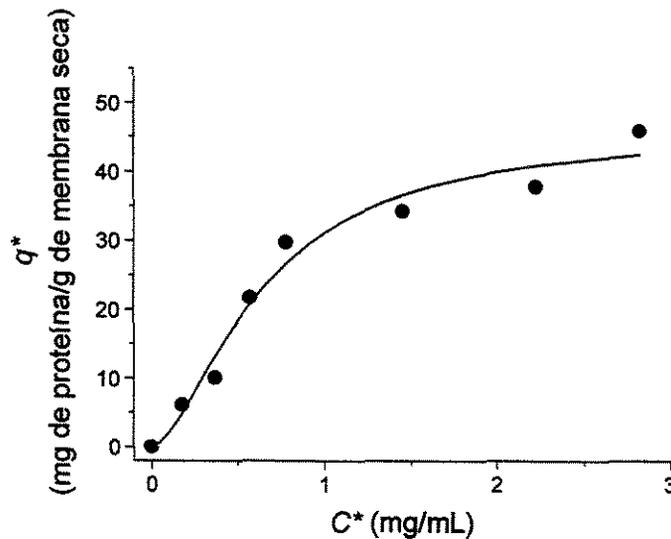


Figura 4.23: Isoterma de adsorção de IgG₁ pré-purificada em PEVA-IDA-Zn²⁺ com ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmuir-Freundlich

O ajuste de parâmetros do modelo apresentou um valor de coeficiente de correlação também próximo a 1,0, similar ao obtido pelo ajuste de acordo com o modelo de Langmuir, porém apresenta o parâmetro $K_{d(LF)}$ que não corresponde ao valor real da constante de dissociação do complexo IDA-Zn²⁺-IgG₁.

Tabela 4.11: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG₁ em membranas de PEVA-IDA-Zn²⁺.

Parâmetros		IgG ₁ PEVA-IDA-Zn ²⁺
q _m	(mg/cm ³)	39,7 ± 4,6
	(mg/g)	46,1 ± 5,4
K _{d(LF)}	(M)	(3,2 ± 1,7) × 10 ⁻⁶
n		1,66 ± 0,47
coeficiente de correlação		0,987

Segundo o modelo de Langmuir-Freundlich, obteve-se valor de n maior que 1, o que indica uma cooperatividade positiva, ou seja, a adsorção de uma molécula de IgG₁ favorece a adsorção de outra molécula do anticorpo.

Os valores das constantes de dissociação (K_d) e constantes de dissociação aparente ($K_{d(FL)}$), obtidos com ajuste não linear dos modelos de Langmuir (8,1 × 10⁻⁶ M) e Langmuir-Freundlich (3,2 × 10⁻⁶ M) para a adsorção de IgG₁, são valores típicos de constantes de dissociação que caracterizam os sistemas de afinidade média, cujos valores ideais estão na faixa de 10⁻⁵ a 10⁻⁷. Em um estudo de purificação de anticorpos monoclonais do tipo IgG₁ através de cromatografias utilizando várias matrizes de afinidade, ANSPACH e colaboradores (1996) obtiveram um K_d igual a 4,4 × 10⁻⁵ M para a adsorção do anticorpo em gel Sepharose-IDA-Zn²⁺ e K_d igual a 3,7 × 10⁻⁵ M para a adsorção em gel Agarose-NTA-Zn²⁺.

A capacidade máxima de adsorção de IgG₁ nas membranas de PEVA-IDA-Zn²⁺, foi determinada pelo ajuste não linear dos parâmetros, embora, como apresentado nas Figuras 4.21 e 4.23, não tenha sido possível atingir o nível de saturação das membranas. Esta impossibilidade de alcançar a capacidade

máxima da membrana, ocorreu devido a dificuldade de obtenção de solução concentrada de anticorpos monoclonais pré-purificados (maior que 5 mg/mL) em coluna de proteína G-Sepharose. Os valores de q_m obtidos com o ajuste dos parâmetros com os modelos de Langmuir (63,4 mg/g de membrana seca ou 54,6 mg/cm³) e Langmuir-Freundlich (46,1 mg/g de membrana seca ou 39,7 mg/cm³), demonstram uma alta capacidade de adsorção da membrana de PEVA derivatizada e são superiores aos obtidos por ANSPACH e colaboradores (1996), que obtiveram q_m igual 5,8 e 15,8 mg/cm³ para adsorção de IgG₁ em gel de Sepharose-IDA-Zn²⁺ e Agarose-NTA-Zn²⁺, respectivamente.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE RUPTURA

A fim de determinar as curvas de ruptura para a cromatografia em membranas de PEVA-IDA-Zn²⁺, visando a purificação de IgG₁ a partir de sobrenadante precipitado e dialisado, foram realizados experimentos de filtração em modo tangencial, utilizando um módulo de vidro que foi construído em nosso laboratório (conforme procedimento descrito no item 3.2.17). No módulo construído foram colocadas 200 fibras ocas, obtendo-se 71,63 cm² de área superficial, 0,157 cm³ de volume e 0,136 g de membrana seca. Após a construção do módulo, as membranas foram ativadas com epicloridrina e derivatizadas com o agente quelante IDA, conforme procedimento descrito no item 3.2.17.

Avaliação da eficiência de imobilização do agente quelante

A eficiência da imobilização do agente quelante IDA nas membranas de PEVA, foi medida através da determinação da densidade de Cu²⁺ quelatado. Utilizando o procedimento descrito no item 3.2.17, foi determinada a capacidade de quelação de 150 µmol de Cu²⁺ por grama de membrana seca. Esta capacidade é aproximadamente 4 vezes maior do que aquela obtida com as membranas finamente cortadas (37 µmol de Cu²⁺/g membrana), que foram utilizadas nas cromatografias. Este aumento da capacidade possivelmente se deve a ativação

mais eficiente das membranas contidas no módulo, devido ao procedimento utilizado. No caso da ativação do cartucho, as soluções de epiclorigrina e IDA, utilizadas na derivatização das membranas, foram alimentadas através de uma bomba peristáltica no módulo de filtração, em modo tangencial, forçando a passagem da fase móvel pelo interior dos poros da membrana. Este procedimento favoreceu a transferência de massa até o interior dos poros e promoveu a ativação da membrana pela epiclorigrina e conseqüentemente a imobilização do agente quelante de modo mais eficiente.

Experimentos de filtração

Nos experimentos de filtração para determinação das curvas de ruptura, a solução foi alimentada no módulo de fibras ocas em modo tangencial, com sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado (aproximadamente 6,5 mg/mL), a vazões de alimentação (Q_i) de 0,6, 1,4 e 2,4 mL/min. A razão entre a vazão do filtrado e a vazão de alimentação (Q_f/Q_i) foi mantida constante em 0,5 através de uma bomba peristáltica instalada na linha do filtrado, enquanto a linha do retentado permaneceu aberta. O tempo de residência calculado foi de 31,4, 13,4 e 7,8 segundos, respectivamente. A fim de determinar o ponto onde iniciou a saída de IgG₁ da coluna, ou seja o ponto a partir do qual houve a perda do anticorpo, realizou-se uma eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas de cada ensaio.

As Figuras 4.24, 4.25 e 4.26 apresentam as curvas de ruptura e as eletroforeses obtidas em cada ensaio. A curva de ruptura para a linha de retentado atinge o patamar de saturação quase que imediatamente após o início da alimentação. Por outro lado, a curva obtida para a linha de filtrado, sobe mais lentamente alcançando o patamar de saturação após algum tempo, que variou, de acordo com cada vazão utilizada.

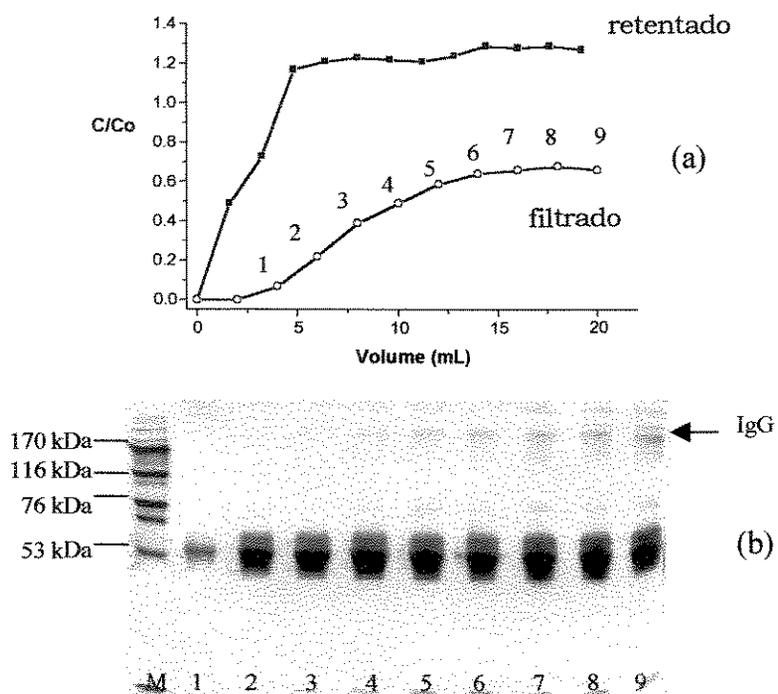


Figura 4.24: (a) Curva de ruptura obtida para as linhas de filtrado e retentado $Q_F = 0,3$ mL/min. (b) eletroforese das frações de filtrado recolhidas: Faixas: (M) marcadores de alta massa molecular; (1-9) correspondentes aos pontos da curva de ruptura.

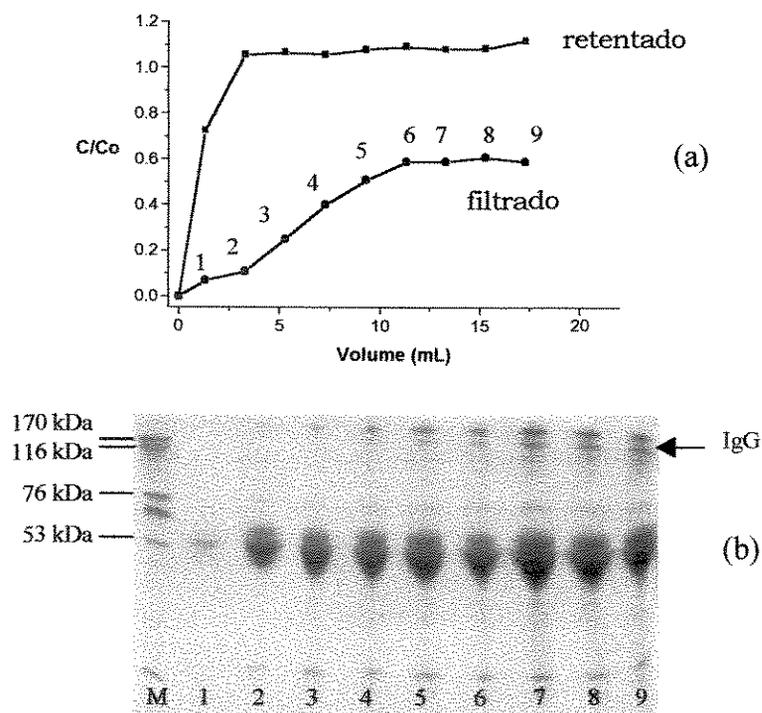


Figura 4.25: (a) Curva de ruptura obtida para as linhas de filtrado e retentado $Q_F = 0,7$ mL/min. (b) eletroforese das frações de filtrado recolhidas: Faixas: (M) marcadores de alta massa molecular; (1-9) correspondentes aos pontos da curva de ruptura.

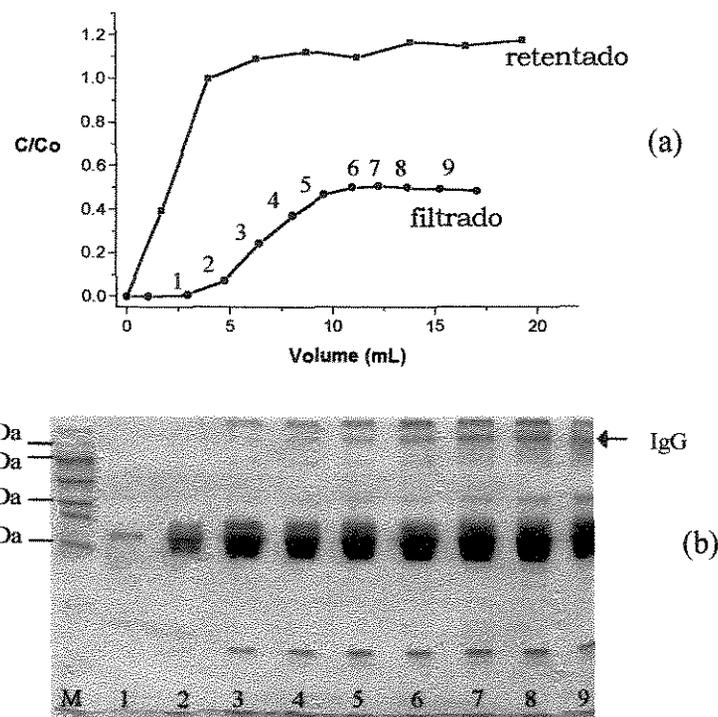


Figura 4.26: (a) Curva de ruptura obtida para as linhas de filtrado e retentado $Q_F = 1,2$ mL/min. (b) eletroforese das frações de filtrado recolhidas: Faixas: (M) marcadores de alta massa molecular; (1-9) correspondentes aos pontos da curva de ruptura.

Segundo a Figura 4.24 a IgG_1 começa a sair da coluna a partir do ponto 3 da curva, ou seja, após a passagem de 8,0 mL de sobrenadante (faixa 3 da eletroforese), correspondendo a 26,6 minutos de alimentação e sua presença nas frações de saída aumenta a cada ponto (faixas 4 a 9 da eletroforese) analisado. Assim, determinou-se que o ponto de ruptura para a IgG_1 , a uma vazão de filtrado de 0,3 mL/min, como sendo após a passagem de 8,0 mL do sobrenadante precipitado e dialisado pelo módulo de filtração.

No ensaio utilizando uma vazão de filtrado (Q_F) igual a 0,7 mL/min, nota-se que IgG_1 sai da coluna após a passagem de 5,3 mL de sobrenadante (faixa 3), caracterizando o ponto de ruptura para a IgG_1 , correspondente a esta vazão, após 7,6 minutos de alimentação do módulo com o sobrenadante precipitado e dialisado.

Nos resultados obtidos com o experimento no qual utilizou-se Q_F igual a 1,2 mL/min, nota-se, segundo a eletroforese SDS-PAGE (faixa 3), que o ponto de

ruptura da IgG₁ da coluna (ponto de ruptura) ocorre no ponto 3, após 4,6 minutos de alimentação, com volume correspondente a 6,5 mL de sobrenadante precipitado e dialisado.

Durante a execução dos ensaios acima, foram monitoradas as vazões de filtrado, que permaneceram constantes para as vazões de 0,3 e 0,7 mL. No experimento utilizando Q_F igual a 1,2 mL/min, observou-se uma queda na vazão, conforme apresentado na Figura 4.27, onde são comparadas as três curvas de ruptura obtidas.

Como podem ser observadas na Figura 4.27, as curvas de ruptura para proteína total não se diferenciam muito com a variação da vazão de filtrado. Porém ao analisarmos as eletroforeses, observa-se que o ponto de ruptura para a IgG₁, variou em cada experimento. Nota-se que nas vazões de 0,3, 0,7 e 1,2 mL/min os pontos de ruptura foram após a passagem de 8,0, 5,3 e 6,5 mL de sobrenadante de cultura celular, ou seja, ocorrendo após 26,6, 7,6 e 4,6 minutos após o início da alimentação, respectivamente. Esta observação nos permite concluir que se utilizando menor vazão aumenta-se a capacidade dinâmica do módulo de filtração. Conforme a Figura 4.27, a vazão de filtrado não se manteve constante, o que indica a ocorrência de colmatação da membrana, causado possivelmente, pelo acúmulo de material protéico nos poros. Este fato pode vir a alterar o comportamento da curva de ruptura, bem como o início da saída de IgG₁ do módulo de filtração (ponto de ruptura).

A fim de avaliar a seletividade das membranas na purificação de IgG₁ e compará-la com os resultados obtidos com as membranas finamente cortadas, empacotadas na coluna cromatográfica, efetuou-se a lavagem do módulo, para a retirada das proteínas que não foram adsorvidas pelo íon metálico, seguida da eluição em degraus de concentração de Tris-HCl de 100 a 700 mM. O perfil cromatográfico típico, dentre três realizados, acompanhado da eletroforese correspondente aos picos obtidos, estão apresentados na Figura 4.29.

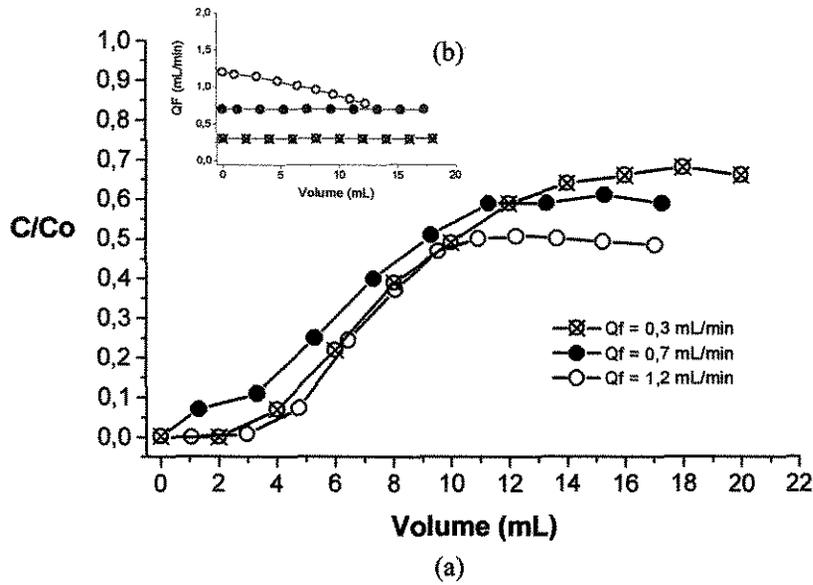


Figura 4.27: (a) Curvas de ruptura obtida para as linhas de filtrado para as diferentes vazões estudadas (b) Vazão de filtrado ao longo de cada ensaio.

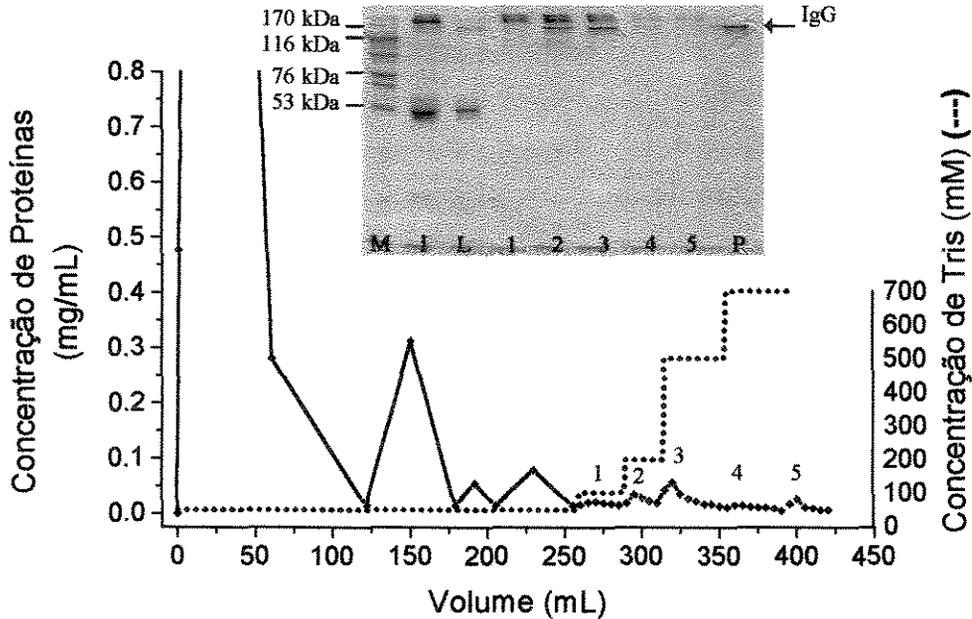


Figura 4.29: Perfil cromatográfico típico obtido nas etapas de lavagem e eluição dos experimentos de filtração realizados com o módulo contendo as membranas PEVA-IDA-Zn²⁺. Alimentação: sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado até saturação. Tampão de equilíbrio e lavagem, Tris-HCl 50 mM a pH 7,0; dessorção: gradiente degrau de Tris-HCl 100, 300, 500 e 700 mM a pH 7,0; regeneração EDTA a 50 mM a pH 6,5. Eletroforese: (M) marcador de alta massa molecular; (I) material injetado; (L) frações da última etapa de lavagem (1-5) correspondentes aos pontos numerados do cromatograma; (P) IgG₁ de alta pureza.

Segundo a eletroforese SDS-PAGE apresentada na Figura 4.29, os resultados de purificação obtidos com o módulo de filtração são similares àqueles referentes aos experimentos cromatográficos utilizando as membranas finamente cortadas, indicando que não há perda da eficiência de purificação dos anticorpos monoclonais a partir de sobrenadante de cultura celular, quando se utiliza a filtração nas membranas de PEVA-IDA-Zn²⁺. Este resultado confirma a viabilidade de utilização da filtração em membranas de afinidade em processos de purificação de anticorpos do isotipo IgG₁, aliando a alta capacidade hidrodinâmica da membrana com a alta seletividade das matrizes de afinidade.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1 CONCLUSÕES

A cromatografia de afinidade por ions metálicos imobilizados foi utilizada neste trabalho como uma alternativa para a purificação de IgG₁ anti-TNP, a partir de sobrenadante de cultura celular.

Com base na literatura consultada, pôde-se visualizar o potencial de uso desta técnica, uma vez que a cromatografia de afinidade por ions imobilizados, bem como a filtração em membranas de afinidade, já foram utilizadas na recuperação e purificação de anticorpos monoclonais e aliando-se as duas técnicas, obtém-se as vantagens oferecidas por ambas. Para tanto, foram realizados experimentos variando-se as condições de adsorção e eluição e também três diferentes tipos de alimentação.

Os resultados obtidos permitem concluir que a cromatografia de afinidade por ions metálicos imobilizados é uma técnica potencialmente viável para a purificação de anticorpos monoclonais do tipo IgG₁ a partir de sobrenadante de cultura celular, proporcionando a obtenção de anticorpos purificados, na presença de aproximadamente 30% de impurezas.

Outras conclusões relevantes obtidas foram:

- a) A preparação das membranas de PEVA através da ativação com epicloridrina e imobilização do agente quelante IDA foi eficiente, resultando numa capacidade de imobilização de metal nas membranas comparável com valores encontrados, para géis, na literatura;
- b) O sistema tamponante influencia na adsorção seletiva da matriz PEVA-IDA-Me²⁺, sendo que o tampão que favoreceu a melhor condição de adsorção foi o tampão Tris-HCl;

- c) O total de proteínas adsorvidas pelos íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} , nos diferentes tampões, segue a regra estabelecida por SULKOWSKI (1989), para a força de retenção de proteínas contendo histidinas acessíveis, em géis IDA- Me^2 ;
- d) A alimentação da coluna com sobrenadante de cultura celular não precipitado e sem pré-tratamento favoreceu a perda de anticorpos da coluna na etapa de lavagem;
- e) A utilização de duas etapas cromatográficas consecutivas não melhorou os resultados de purificação da IgG_1 a partir de sobrenadante de cultura celular não precipitado e sem pré-tratamento;
- f) A melhor condição utilizada para a purificação foi a alimentação de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado em coluna contendo PEVA-IDA- Zn^{2+} , em presença de tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,0 e eluição por aumento de concentração de Tris, sendo que o melhor resultado de purificação foi o obtido nas frações eluídas com 500 mM de Tris, que alcançou a massa específica de 665,9 μg de anticorpos por miligrama de proteína total eluída, correspondendo a 61,8% dos anticorpos alimentados na coluna;
- g) Os testes de titulação por ELISA do anticorpo purificado mostraram que o processo de purificação proposto não altera a atividade do anticorpo;
- h) Os experimentos de equilíbrio para a obtenção da isoterma de adsorção de IgG_1 pré-purificada nas membranas de PEVA-IDA- Zn^{2+} , com o ajuste dos parâmetros segundo o modelo de Langmuir, forneceu valores de K_d igual a $8,1 \times 10^{-6}$ M, valor este característico de processos de pseudobioafinidade e capacidade máxima de adsorção (q_m) igual a 63,4 mg/g de membrana seca (54,6 mg/cm³), que se compara aos valores encontrados na literatura;
- i) As curvas de ruptura obtidas a partir dos experimentos utilizando o módulo de filtração, permitiram concluir que o ponto de ruptura da IgG varia com a vazão de filtrado, sendo que a medida que a vazão aumenta a capacidade de retenção da coluna diminui.

5.2 SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

Diante dos resultados de purificação dos anticorpos monoclonais do tipo IgG₁ obtidos através da cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, torna-se relevante a continuação da pesquisa envolvendo este tema. Assim, as sugestões àqueles que darão continuidade a este trabalho são:

- Testar a utilização de outros agentes quelantes para a imobilização do metal na matriz;
- Testar a utilização de outros tipos de membranas como matriz na purificação dos anticorpos.
- Verificar a eficiência deste processo na purificação de IgG de outras fontes.
- Realizar testes de aumento de escala, utilizando para isso o módulo comercial de fibras ocas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEANZI, M.; OGGERO, M.; BOLLATI, M.; MARCIPAR, A.; VIJAYALAKSHMI, M. Ni-IMAC purification of IgG₃ murine monoclonal antibody against Trypanosoma Cruzi glycoprotein extract. *JBC*. v. 4 (2), p. 85-94, 1998.
- ANSPACH, F. B.; PETCH, D.; DECKWER, W. D. Purification of murine IgG₁ on group specific affinity sorbents. *Bioseparation*. v. 6, p. 165-184, 1996.
- AQUINO, LUCIANA C. L. Adsorção de IgG humana em duas matrizes porosas derivatizadas com o ligante histidina. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000.99 p. Tese (Mestrado)
- AYBAY, C. e IMIR, T. Development of a rapid, single-step procedure using protein G affinity chromatography to deplete fetal calf serum of its IgG and to isolate murine IgG₁ monoclonal antibodies from supernatants of hibridoma cells. *Journal of Immunological Methods*. v. 233, p. 77-81, 2000.
- BELEW, M. e PORATH, J. Effect of solute structure, ligand density and salt concentration on the retention of peptides. *Journal of Chromatography*. v. 516, p. 333-354, 1990.
- BELEW, M.; YIP, T. T.; ANDERSSON, L.; PORATH, J. Interaction of proteins with immobilized Cu²⁺. Quantification of adsorption capacity, adsorption isotherms and equilibrium constants by frontal analysis. *Journal of Chromatography*. v. 403, p. 197-206, 1987.
- BLANK, G. S.; ZAPATA, G.; FAHRNER, R.; MILTON, M.; YEDINAK, C.; KNUDSEN, H.; SCHMELZER, C. Expanded bed adsorption in the purification of monoclonal antibodies: a comparison of process alternatives. *Bioseparation*. v. 10, p. 65-71, 2001.
- BODEN, V.; WINZERLING, J. J.; VIJAYALAKSHMI, M.; PORATH, J. Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Immunological Methods*. v. 181, p. 225-232, 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, p. 248-254, 1976
- BUENO, S. M. A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M. A. In vitro removal of human IgG by pseudobiospecific affinity membrane filtration on a large scale. A preliminary report. *The International Journal of Artificial Organs*. v. 18, p. 392-398, 1995.

- BUENO, S. M. A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes. *Journal of Chromatography B*. v. 667, p. 57-67, 1995.
- BUENO, S. M. A.; LEGALLAIS, C.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Experimental kinetic aspects of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration: process for IgG separation from human plasma. *Journal of Membrane Science*. v. 117, p. 45-56, 1996.
- CATTY, D. Antibodies – a practical approach. V. 1 Washington: IRL, 1989.
- CHARCOSSET, C. Purification of proteins by membrane chromatography. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* v. 71, p. 95-110, 1998.
- CHARCOSSET, C.; SU, Z.; KAROOR, S.; DAUN, G.; COLTON, C. K. Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin G purification: experimental characterization. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 48, p. 415-427, 1995.
- CHASE, H. A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. *Journal of Chromatography*. v. 297, p. 179-202, 1984.
- CLAUSEN, A. M.; SUBRAMANIAN, A.; CARR, P. P. W. Purification of monoclonal antibodies from culture supernatants using a modified zirconia based cation-exchange support. *Journal of Chromatography A*. v. 831, p. 63-72, 1999.
- COFFINIER, Y.; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Separation of IgG from human plasma using thiophilic hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*. v. 5312, p. 1-10, 2002.
- EL-KAK, A. E VIJAYALAKSHMI, M.A. Study of the separation of mouse monoclonal antibodies by pseudobioaffinity chromatography using matrix-linked histidine and histamine. *Journal of Chromatography*. v. 570, p. 29-41, 1991.
- FAHRNER, R. L.; BLANK, G. S. Real time control of antibodies loading during protein A affinity chromatography using an on-line assay. *Journal of Chromatography A*. v. 849, p. 191-196, 1999.
- FAHRNER, R. L.; BLANK, G. S.; ZAPATA, G. A. Expanded bed protein A affinity chromatography of a recombinant humanized monoclonal antibody: process development, operation, and comparison with a packed bed method. *Journal of Biotechnology*. v. 75, p. 273-280, 1999.
- FALKENBERG, F. W. Monoclonal antibodies production: problems and solutions. *74th Forum in immunology*. p. 542-547, 1998.

- FINGER, U. B.; BRÜMMER, W.; KNEIPS, E.; THÖMMES, J.; KULA, M. R. Investigations on the specificity of thiophilic interaction for monoclonal antibodies of different subclasses. *Journal of Chromatography B*. v. 675, p. 197-204, 1996.
- FINGER, U. B.; THÖMMES, J.; KINZELT, D.; KULA, M. R. Application of thiophilic membranes for the purification of monoclonal antibodies from cell culture media. *Journal of Chromatography B*. v. 664, p. 69-78, 1995.
- GEUS, B. e HENDRIKSEN C. F. M. *In vivo* and *in vitro* production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives. *Res. Immunol.* v.149, p. 533-620, 1998.
- GHOSH, R. Separation of proteins using hydrophobic interaction membrane chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 923, p. 59-64, 2001.
- GHOSH, R. Bioseparation using supported liquid membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*. v. 192, p. 243-247, 2001.
- GHOSH, R. Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *Journal of Chromatography A*. v. 952, p. 13-27, 2002.
- GOTTSCHLICH, N.; KASCHE, V. Purification of monoclonal antibodies by simulated moving-bed chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 765, p. 201-206, 1997.
- HALE, J. E. e BEIDLER, D. E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*. v. 222, p. 29-33, 1994.
- HARI, P. R.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Adsorption of human IgG on Cu²⁺ immobilized cellulose affinity membrane: Preliminary study. *Journal of Biomed. Mater. Res.* v. 50, p. 110-113, 2000.
- HAUPT, K ; BUENO, S.M.A. Affinity membranes – In *Encyclopaedia of separation science*. Academic Press. p. 229-225, 2000.
- HEMDAN, E. S.; PORATH, J. Development of immobilized metal affinity chromatography. Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate. *Journal of Chromatography*, v. 323, p. 255-264, 1985.
- HIATT, A.; CAFFERKEY, R.; BOWDISH, K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. V. 342, p.76-78, 1989.
- HUSE, K.; BÖHME, H. J.; SCHOLZ, G. H. Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical and. Biophysical Methods*. v. 51, p. 217-231, 2002.

- HUTCHENS, T. W.; YIP, T. T.; PORATH, J. Protein interaction of immobilized ligands: Quantitative analyses of equilibrium partition data and comparison with analytical chromatography approaches using immobilized metal affinity adsorbents. *Analytical Biochemistry*. v. 170, p. 168-182, 1988.
- JACKSON, L.R., TRUDEL, L.J., FOX, J.G., LIPMAN, N.S. Evaluation of hollow fiber bioreactors as an alternative to murine ascites production for small scale monoclonal antibody production. *Journal of Immunological Methods*. v. 189, p. 217-231, 1996.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. BROOKS, G. F. BUREL, J. S. Immunologia – In *Microbiologia Médica*. Guanabara Koogan, p. 89-108, 1998.
- JOHNSTON, J. M.; RATHMELL, S. K.; WILSON, M. R.; SMITH, S. B. E. Use of monoclonal antibodies in ELISA assays. *Biochemical Education*. 24(1), p. 50-52, 1996.
- KLEIN E; YEAGER, D.; SESHADRI, R.; BAURMEISTER, U. Affinity adsorption devices prepared from microporous poly(amide) hollow fibers and sheet membranes. *Journal of Membrane Science*. v. 129, p. 31-46, 1997.
- KLEIN, K. Review: Affinity membranes: a 10-year review. *Journal of Membrane Science*. v. 179, p. 1-27, 2000.
- KOBAYASHI, N.; OIWA, H.; GOTO, J. Production and characterization of group-specific monoclonal antibodies recognizing nonamidated, glycine- and taurine-amidated ursodeoxycholic acid 7-N-acetylglucosaminides. *Journal of Steroid Biochemical. Molecular Biology*. v. 64, p. 171-177, 1998.
- KÖHLER, G. e MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, p. 495-497, 1975.
- KREUTZ, F. T.; WISHART, D. S.; SURESH, M. R. Efficient bispecific monoclonal antibody purification using gradient thiophilic affinity chromatography. *Journal of Chromatography*. v. 714, p. 161-170, 1998.
- KUBOTA, N. YASUHIRO, N. YUKARI, R. Recovery of serum proteins using cellulosic affinity membrane modified by immobilization of Cu^{2+} ion. *Journal of Applied Polymer Science*. v. 62, p. 1153-1160, 1996.
- LABROU, N. e CLONIS, Y. D. The affinity technology in downstream processing. *Journal of Biotechnology*. v. 36, p. 95-119, 1994.
- LEIBL, H.; ERBER, W.; EIBL, M. M.; MANNHALTER, J. W. Separation of polysaccharide-specific human immunoglobulin G subclasse using a Protein A Superose column with a pH gradient elution system. *Journal of Chromatography*. v. 639, p. 51-56, 1993.

- LÉO, P.; UCELLI, P.; AUGUSTO, E. F. P.; OLIVEIRA, M. S.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Anti-TNP monoclonal antibodies as reagents for enzyme-immunoassay (ELISA). *Hybridoma*. v. 19, p. 473-478, 2000.
- LORENZEN, N. Affinity purification of the structural proteins of a fish Rhabdovirus by the use of monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods*, v. 38, p. 297-303, 1992.
- LÜTKEMEYER, D.; AMESKAMP, N.; TEBBE, H.; WITTLER, J.; LEHMANN, J. Estimation of cell damage in bench- and pilot-scale affinity expanded-bed chromatography for the purification of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 65, p. 114-119, 1999.
- LÜTKEMEYER, D.; BRETSCHNEIDER, M.; BËNTEMEYER H.; LEHMANN, J. Membrane chromatography for rapid purification of recombinant antithrombin III and monoclonal antibodies from cell culture supernatant. *Journal of Chromatography*. v. 639, p. 57-66, 1993.
- MANSIR, A. T.; MONTESINOS, R. M.; GUZMÁN, R. Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particle and membrane configurations. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. v. 49, p. 1-28, 2001.
- MANSKE, O.; TESCH, H.; DIEHL, V.; BOHLEN, H. Single step purification of bispecific monoclonal antibodies for immunotherapeutic use by hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Immunological Methods*. v. 208, p. 65-73, 1997.
- MILSTEIN, C. Monoclonal antibodies. In *Scientific American* . v. 243, p. 66-74, 1980.
- MORO, A. M.; RODRIGUES, M. T. A. Anticorpos monoclonais para a clinica. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*. 22, p. 32-35, 2001.
- MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, p. 307-310, 1981.
- MULLICK, A. e FLICKINGER, M. C. Comparison of fluoride modified zirconia with ceramic hydroxyapatite for preparative scale purification of immunoglobulin from serum albumin. *Preparative Biochemistry & biotechnology*, v. 28, p. 1-21, 1998.
- NILSON, B.H.K.; LOGDEMB, L.; KASTERN, W.; BJÖRK, L.; AKERSTRÖM, B. Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *Journal of Immunological Methods*, v. 164, p.33-40, 1993.
- PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases hsab .2. underlying theories. *Journal of Chemical Education*. v. 45, p. 643-659, 1968.
- PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases hsab .2. underlying theories. *Journal of Chemical Education*. v. 45, p. 581-587, 1968.

- PETSCH, D.; DECKWER, W.D; ANSPACH, F.B; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI, M.A Endotoxin removal with poly(ethyleneimine)-immobilized adsorbers: Sepharose 4B versus flat sheet and hollow fibre membranes. *Journal of Chromatography B*. v. 707, p. 121-130, 1998.
- PORATH J.; MAISANO, F. E BELEW, M. Thiophilic adsorption - A new method for protein fractionation. *FEBS Lett.* v.185, p. 306-310, 1985.
- PORATH, J.; CARLSSON, J; OLSSON, I.; BELFRAGE G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. v. 258, p. 598-599, 1975.
- PORATH, J.; OLIN B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, v. 22, p. 1621-1630, 1983.
- RITZ, J. E SCHLOSSMAN, S.F. Utilization of monoclonal antibodies in the treatment of leukemia and lymphoma. *Blood*, v. 59, p. 1, 1982.
- ROPER, D.K.; LIGHTFOOT, E.N. Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *Journal of Chromatography A*. v. 702, p. 3-26, 1995.
- SCOPE, R. K. Protein Purification, principles and practices. New York: Springer Verlag, 1994.
- SENA, J. A. D. e GOLDMAN, M. H. Plantas produtoras de anticorpos. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*. 23, p. 20-26, 2001.
- SENEL, S.; SAY, R.; ARICA, Y.; DENIZLI, A. Zinc ion-promoted of lysozyme to Cibacron Blue F3GA-attached microporous hollow-fiber membranes. *Colloids and Surfaces: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 182, p. 161-173, 2001.
- SERRES, A.; MUELLER, D.; JOZEFONVICZ, J. Purification of monoclonal antibodies on dextran-coated silica support grafted by thiophilic ligand. *Journal of Chromatography A*. v. 711, p. 151-157, 1995.
- SHARMA, S. e AGARWAL, G. P. Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherms models. *Analytical Biochemistry*. v. 288, p. 126-140, 2001.
- SMITH, M. C.; FURMAN, T. C.; PIGGEON, C. Immobilized iminodiacetic acid metal peptide complexes. Identification of chelating peptide purification handles for recombinant proteins. *Inorg. Chem*. v. 26, p. 1965-1969, 1987.
- STRACHAM, G.; GRANT, S. D.; LEARMONTH, D.; LONGSTAFF, M.; PORTER, A. J.; HARRIS, W. J. Binding characteristics of anti-atrazine monoclonal antibodies and their fragments synthesised in bacteria and plants. v. 13, p. 665-673, 1998.
- SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*. v. 3, p. 1-11, 1985.

- SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. *BioEssays*. v. 10, p. 170-75, 1989.
- SULKOWSKI, E. Immobilized metal-ion affinity chromatography: Imidazole proton pump and chromatographic sequale. 1. Proton pump. *Journal of Molecular Recognition*. v. 9, p. 389-393, 1996.
- TARDITI, L.; CAMAGNA, M.; PARISI, A.; VASSOROTO, C.; DEMONTE, L. B.; LETARTE, M.; MALAVASI, F.; MARIANI, M. Selective high-performance liquid-chromatographic purification of bispecific monoclonal-antibodies. *Journal of Chromatography*, v. 599, p. 13-20, 1992.
- THÖMMES J.; KULA M.R. Membrane Chromatography - an integrative concept in the downstream processing of proteins. *Biotechnology Progress*. v. 11, p. 357-36, 1995.
- THÖMMES, J.; BADER, A.; HALFAR, M.; KARAU, ^a; KULA, M. R. Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds. *Journal of Chromatography*. v. 752, p. 111-122, 1996.
- TISHCHENKO, G.; DYBAL, J.; MESZAROSOVA, K.; SEDLAKOVA, Z.; BLEHA, M. Purification of the epecific immunoglobulin G₁ by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel complexes of chelating porous and nonporous polymeric sorbents based on poly(methacrylic esters). Effect of polymer structure. *Journal of Chromatography A*. v. 954, p. 115-126, 2002.
- VANÇAN, S.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized Koper, nickel, zinc and cobalt ions and different buffer systems. *Process Biochemistry*. v. 37, p. 573-579, 2002.
- VIJAYALAKSHMI, M.A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography *Trends in Biotechnology*, v. 7, p. 71-76, 1989.
- VOIGT, A. e ZINTL, F. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *Journal of Biotechnology*. v. 68, p. 213-226, 1999.
- WONG J.; ALBRIGTH R.L.; WANG N.H.W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)-chemistry and bioseparation applications. *Separation and Purification Methods*. v. 20, p. 49-106, 1991.
- www.ntri.tamuk.edu/immunology
- YANG, L.; CHEN, P. Chitosan/ coarse filter paper composite membrane for fast purification of IgG from human serum. *Journal of Membrane Science*. v. 205, p. 141-153, 2002.
- ZOU, H.; LUO, Q.; ZHOU, D. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. v. 49, p. 199-240, 2001.

ANEXO A

A seguir está apresentada a tabela contendo o balanço de massa das precipitações realizadas para a execução dos experimentos.

Tabela A1: Resultados obtidos nas precipitações de sobrenadante de cultura celular

Precipitações	Sobrenadante de cultura celular (material inicial)			Após precipitação com sulfato de amônio 50% e diálise		
	Volume (mL)	Conc. Proteína total (mg/mL)	Massa de Proteína total (mg)	Volume (mL)	Conc. Proteína total (mg/mL)	Massa de Proteína total (mg)
1	125	4,1	512,5	21,2	5,9	125,1
2	340	4,2	1428,0	22,6	10,5	237,3
3	450	3,8	1710,0	33,9	10,1	342,4
4	400	5,0	2000,0	26,5	9,5	251,7
5	490	3,8	1862,0	37,6	9,6	361,0

ANEXO B

A fim de determinar o ponto isoelétrico do anticorpo em estudo, utilizou-se a eletroforese IEF de uma amostra de IgG₁ de alta pureza, purificada através de cromatografia de afinidade em gel G Sepharose 4 F F.

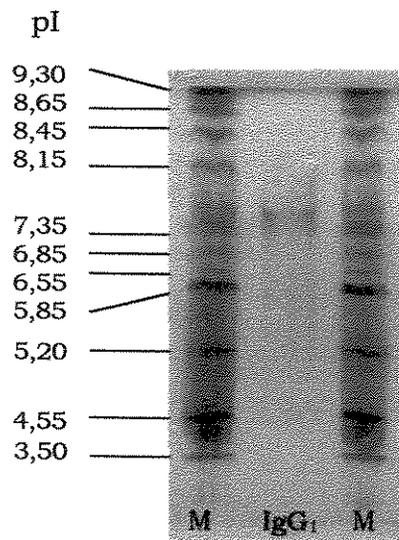


Figura B1: Eletroforese IEF, gradiente 3 a 9 (Phast gel). Revelação com nitrato de prata. Amostra de IgG₁ obtida através cromatografia de afinidade em gel G Sepharose 4 F.F. Faixas: (M) marcador de ponto isoelétrico; (1) IgG₁ de alta pureza.

ANEXO C

Visando avaliar uma possível perda da atividade do anticorpo devido ao processo de purificação, foram realizadas titulações por ELISA dos anticorpos monoclonais purificados obtidos nas frações de 700 mM de Tris-HCl e do sobrenadante de cultura celular precipitado e não precipitado. Os resultados estão apresentados na Tabela C1.

Tabela C1: Titulação por Elisa para determinação da atividade do anticorpo monoclonal do tipo IgG₁

Sobrenadante não precipitado sem pré-tratamento		Sobrenadante precipitado e dialisado		IgG ₁ purificado	
492 nm	µg/mL	492 nm	µg/mL	492 nm	µg/mL
0,361	0,260	0,569	3,300	0,319	0,330
0,226	0,130	0,507	1,650	0,179	0,165
0,138	0,065	0,439	0,825	0,118	0,082
0,094⁽¹⁾	0,032	0,333	0,412	0,069	0,041
0,051	0,016	0,235	0,206	0,045⁽²⁾	0,021
0,032	0,008	0,139	0,103	0,012	0,010
0,048	0,004	0,085	0,052	0,018	0,005
0,055	0,002	0,041⁽²⁾	0,026	0,012	0,003

Considera-se os valores de densidade óptica (492 nm) imediatamente superior a 3x o valor médio da densidade óptica (DO) do controle negativo, como sendo o valor de atividade positiva mínima aceita na análise. (1) DO do controle negativo igual a 0,078; (2) DO do controle negativo igual a 0,033.