



Vanessa Soraia Cortez de Oliveira Radke

Bacharela em Química

**PRÉ-PURIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE DNA PLASMIDIAL  
POR CROMATOGRAFIA DE PSEUDOAFINIDADE E TIOFÍLICA  
AROMÁTICA**

Campinas

Novembro 2013







UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Vanessa Soraia Cortez de Oliveira Radke

Bacharela em Química

**PRÉ- PURIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE DNA PLASMIDIAL POR  
CROMATOGRAFIA DE PSEUDOAFINIDADE E TIOFÍLICA AROMÁTICA**

*Dissertação apresentada à Faculdade de  
Engenharia Química, como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título  
de Mestra em Engenharia Química.*

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Co-Orientadora: Dra. Sindélia Freitas Azzoni

Este exemplar corresponde à versão final da  
Dissertação defendida por Vanessa Soraia  
Cortez de Oliveira Radke e orientada pela  
professora Dra. Sônia Maria Alves Bueno.

---

Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora

Campinas

Novembro 2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

R119p Radke, Vanessa Soraia Cortez de Oliveira, 1980-  
Pré-purificação de DNA plasmidial por cromatografia de pseudoafinidade e  
tiofílica aromática / Vanessa Soraia Cortez de Oliveira Radke. – Campinas, SP :  
[s.n.], 2013.

Orientador: Sônia Maria Alves Bueno.  
Coorientador: Síndelia Freitas Azzoni.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Engenharia Química.

1. Plasmídeos. 2. DNA. 3. Cromatografia. 4. Purificação. I. Bueno, Sônia  
Maria Alves, 1961-. II. Azzoni, Síndelia Freitas. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Pre plasmid DNA purification by pseudo-affinity chromatography and  
tiophilic aromatic chromatography

**Palavras-chave em inglês:**

Plasmid

DNA

Chromatography

Purification

**Área de concentração:** Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Titulação:** Mestre em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Sônia Maria Alves Bueno [Orientador]

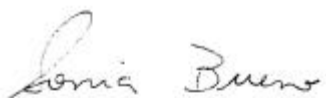
Luis Antônio Peroni

Marisa Masumi Beppo

**Data de defesa:** 22-11-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Dissertação de mestrado defendida por Vanessa Soraia Cortez de Oliveira Radke e aprovada em 22 de novembro de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

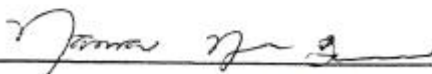
Dra.Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora



---

Dr.Luis Antonio Peroni



---

Dra.Marisa Masumi Beppo

## RESUMO

Emergindo como alvo de estudos para fins terapêuticos, acompanhado de novas tecnologias a fim de explorar todo seu potencial e especificidade, o DNA plasmidial (pDNA) tem demonstrando um importante papel na nova geração de vacinas e terapia gênica como um vetor não viral. No entanto, há grandes desafios para atender altas demandas de preparações de vetores plasmidiais (pDNA), seguindo rigorosos padrões das agências reguladoras internacionais. As dificuldades sobretudo, são encontradas no *downstream processing*, com alto custo e operações não apropriadas para uso em larga escala e nos longos e caros kits comerciais, este último utilizado para ensaios pré-clínicos. Almejando, explorar as características do DNA plasmidial e tornar cada vez mais factível sua produção e purificação, esta pesquisa teve como foco o desenvolvimento de um protocolo para obtenção de pDNA para aplicação em ensaios *in vitro* com possível escalonamento para larga escala. Para tanto, buscou-se adsorventes seletivos para a etapa de pré-purificação de pDNA diretamente do lisado celular. O trabalho foi baseado em géis de agarose (S) com ligantes de natureza hidrofóbica e tiofílica, visando testar o comportamento do pDNA em cromatografia negativa e cromatografia tiofílica aromática. Os ligantes eleitos para investigação foram os aminoácidos de natureza hidrofóbica, fenilalanina (Phe) e D-triptofano (T), ambos imobilizados covalentemente em Sepharose 6B®, e um tiofílico, a mercaptopiridina. O tampão de adsorção, e os sais adicionados, foram escolhidos com o objetivo de favorecer um ambiente hidrofóbico, de tal forma que a interação das biomoléculas presentes no lisado celular com os ligantes fosse favorecida. Os sais utilizados para tal foram citrato de sódio 1,5 mol/L, fosfato de potássio 2,0 mol/L e sulfato de amônio 1,5 mol/L. Os resultados obtidos com os sistemas fenilalanina-agarose e D-triptofano-agarose demonstraram seu potencial na retenção de moléculas de RNA e na remoção de grande parte de endotoxinas e proteínas. O sistema adsortivo mercaptopiridina-agarose, permitiu uma purificação bastante satisfatória, com remoção total de endotoxinas e relevante recuperação de pDNA.

Palavras – Chave: DNA plasmidial, purificação, cromatografia.

## Abstract

Coming up as a target for therapeutic studies, together with new technologies in order to explore its potential use and specificity, plasmid DNA (pDNA) has demonstrated an important role in new generation of vaccines and gene therapy as a non-viral vector. However, there are huge challenges to meet high demands of plasmid vectors (pDNA) preparation, following strict standards of international regulatory agencies. Its difficulties are found in downstream processing, with high cost operations which are not suitable for large-scale use and in the long expensive commercial kits, the last one used for preclinical trials. Aiming then, to explore DNA plasmid characteristics and making its production and purification even more feasible, this research focused on a development of a protocol to obtain pDNA for assays in vitro applications with a possible staggering to large scale. Therefore selective adsorbents were sought for pre-step purification of pDNA directly from cell lysate. The work was based on agarose gels (S) with ligands of hydrophobic and thiophilic nature aiming to test pDNA actions in negative chromatography and thiophilic aromatic chromatography. The ligands chosen for investigation were the amino acids of hydrophobic nature, phenylalanine (Phe) and D-tryptophan (T), both covalently immobilized on Sepharose 6B ®, and a thiophilic one, mercaptopyridine. The adsorption caps and as well as its concentration, experienced in this work were chosen in order to support a hydrophobic environment, so that the interaction of the biomolecules in the lysate cell would be easier with the ligands. The salts used for this interaction were sodium citrate 1.5 mol/L, potassium phosphate 2.0 mol/L and ammonium sulfate 1.5 mol/L. The results achieved with the systems phenylalanine-agarose and D-tryptophan-agarose have demonstrated its potential in the retention of the RNA molecules and the removal of most part of endotoxin, and proteins. The mercaptopyridine-agarose adsorptive system enabled a satisfactory purification, with a total removal of endotoxins and pDNA relevant recovery.

Keywords: plasmid DNA, purification, chromatography.

## Sumário

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS .....                                            | xiii |
| LISTA DE TABELAS .....                                            | xvi  |
| LISTA DE SIGLAS .....                                             | xvii |
| 1.....INTRODUÇÃO .....                                            | 19   |
| 1.1 COLOCAÇÃO DO PROBLEMA .....                                   | 20   |
| 1.2 OBJETIVO .....                                                | 22   |
| 2.....REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                 | 25   |
| 2.1 Terapia Gênica.....                                           | 25   |
| 2.2 Produção e características do pDNA.....                       | 27   |
| 2.3 Recuperação e purificação de DNA plasmidial.....              | 30   |
| 2.3.1 Cromatografia de exclusão por tamanho (CET) .....           | 32   |
| 2.3.2 Cromatografia de Troca Iônica (CTI) .....                   | 32   |
| 2.3.3 Cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) .....          | 33   |
| 2.3.4 Cromatografia de afinidade (CA) e pseudoafinidade CPA ..... | 36   |
| 2.3.5 Cromatografia tiofílica aromática (CTA).....                | 39   |
| 3.....MATERIAIS E MÉTODOS.....                                    | 41   |
| 3.1 MATERIAIS.....                                                | 41   |
| 3.1.1 Equipamentos .....                                          | 41   |
| 3.1.2 Ligantes e adsorventes.....                                 | 42   |
| 3.1.3 Soluções tamponantes .....                                  | 43   |
| 3.2 MÉTODOS.....                                                  | 43   |
| 3.2.1 Obtenção do lisado celular neutralizado .....               | 43   |
| 3.2.2 Obtenção do DNA padrão .....                                | 44   |
| 3.3 PREPARO DOS ADSORVENTES.....                                  | 44   |
| 3.4 Experimentos cromatográficos .....                            | 46   |
| 3.5 Métodos Analíticos.....                                       | 47   |
| 3.5.1 Dessalinização .....                                        | 47   |

|        |                                                                                                                               |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.2  | Eletroforese em gel de agarose.....                                                                                           | 47 |
| 3.5.3  | Quantificação de proteínas .....                                                                                              | 48 |
| 3.5.4  | Quantificação de pDNA .....                                                                                                   | 48 |
| 3.5.5  | Quantificação de Gdna .....                                                                                                   | 49 |
| 3.5.6  | Quantificação de endotoxinas.....                                                                                             | 49 |
| 4..... | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                   | 51 |
| 4.1    | PURIFICAÇÃO DE pDNA POR CPA EM GEL FENILALANINA-SEPHAROSE (PHE-S).....                                                        | 51 |
| 4.1.1  | CPA utilizando sistema adsorativo Phe-S e tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L (FP) .                                         | 51 |
| 4.1.2  | CPA utilizando sistema adsorativo Phe-S e tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L (SA)...                                          | 54 |
| 4.1.3  | CPA utilizando sistema adsorativo Phe-S e tampão citrato de sódio 1,5 mol/L (CS).....                                         | 56 |
| 4.2    | . PURIFICAÇÃO DE pDNA EM TRIPTOFANO-SEPHAROSE (TS) .....                                                                      | 59 |
| 4.2.1  | CPA utilizando sistema adsorativo TS e tampão citrato de sódio 1,5 mol/L (CS) .....                                           | 59 |
| 4.2.2  | CPA utilizando sistema adsorativo TS e tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L (FP).....                                         | 61 |
| 4.2.3  | CPA utilizando sistema adsorativo TS e tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L (SA) .....                                          | 63 |
| 4.3    | PURIFICAÇÃO DE pDNA POR CTA COM MERCAPTOPIRIDINA-SEPHAROSE (MPR-S) .....                                                      | 66 |
| 4.3.1  | Cromatografia Tiofílica Aromática (CTA) utilizando sistema adsorativo MPR-S e tampão citrato de sódio 1,5 mol/L (CS).....     | 66 |
| 4.3.2  | Cromatografia tiofílica aromática (CTA) utilizando sistema adsorativo MPR-S e tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L (SA).....    | 69 |
| 4.3.3  | Cromatografia tiofílica aromática (CTA) utilizando sistema adsorativo MPR-S e tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L (FP) ..... | 72 |
| 4.4.   | <i>Discussões gerais</i> .....                                                                                                | 75 |
| 5..... | CONCLUSÃO.....                                                                                                                | 77 |
| 6..... | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                               | 79 |

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Luiz,  
minha mãe Tetela e minha mãe Tata!!!  
Pelo amor que dedicaram a mim, sempre.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, porque Ele é bom, perfeito em tudo o que faz e reservou um tempo para que eu realizasse este sonho e moveu pessoas em meu favor.

Ao meu esposo, amigo e incentivador de todas as horas, Elver Radke e as nossas princesas Ana Luísa e Isabela Radke, por terem cedido um pouquinho de seu tempo comigo.

Minha família amada, meus pais, Luiz, Vera e Tata, que se esforçaram por mim. Meus sogros Leonil e Ervino, por me amarem e incentivarem! Irmãos Jéssica e Júlio e meus cunhados queridos, Marcelo, Ricardo e Ruby, verdadeiros amigos! Meus sobrinhos, Juju, Tefa, Ana Julia e Gabizinha, presentes pra mim! Minha irmã, Alexandra, minha Lê, pela torcida e por sempre ser meu exemplo!

Aos amigos, com vocês a caminhada ficou mais leve! Obrigada pelas orações e torcida.

Obrigada a amiga Giseli Pavan pelas dicas e apoio! Aos demais queridos do LEBp (Gi Atsuko, Itiara, Luana, Lara, Igor) pelas risadas, lanchinhos, companheirismo! Foram preciosos pra mim.

Em especial, a amiga e companheira de projeto Nemailla Bonturi, por me ajudar mesmo sem ter nenhuma obrigação por isto! Valeu!!

A minha orientadora, Sônia Maria Alves Bueno, foi uma honra trabalhar com você.

Aos professores Everson A. Miranda e Adriano Rodrigues Azzoni, pelas ricas dicas e discussões.

À Dra. Sindélia Freitas, pelo projeto deste trabalho e co-orientação.

À prof. Dra. Anete Pereira de Souza por ter cedido seu laboratório.

À Fapesp, CNPq e a Capes pelo financiamento desta pesquisa.

“O mais importante ingrediente na fórmula  
do sucesso é saber como lidar com as  
pessoas”

Theodore Roosevelt

“Olhando firmemente para o Autor e  
Consumador da fé, Jesus...”

Hebreus, 12:2

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1-1. Produção de pDNA (adaptado de FERREIRA et al., 2000).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 21 |
| Figura 2-1. Estrutura simplificada do DNA plasmidial usado em terapia gênica. (Adaptado de LIMA, 2008). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 28 |
| Figura 2-2. Isoformas de pDNA (adaptado de FERREIRA, 2005). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 29 |
| Figura 3-1. Estrutura dos ligantes: A - aminoácido D-triptofano; B – mercaptopiridina; D - aminoácido fenilalanina.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 42 |
| Figura 4-1 CPA em Phe-S. Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250 µL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem (W): fosfato de potássio 2,0 mol/L, pH 8,0. Tampão de eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. ....                                                                          | 53 |
| Figura 4-2 - Perfil Eletroforético-Phe-S. Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular λφX (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações da etapa de lavagem (W): W2, W3 , W4; frações etapa de eluição (E): E21, E34, E35. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA. ....                                                  | 53 |
| Figura 4-3 - CPA em Phe-S. Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem (W): Sulfato de amônio 1,5 mol/L pH 8,0; Tampão de Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. ....                                                                             | 55 |
| Figura 4-4 - Perfil eletroforético- CPA em Phe-S. Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular λφX (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem (W): W3, W4, W5, W6; frações etapa de eluição (E): E24, E25, E42. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado. ....                       | 55 |
| Figura 4-5 - CPA em Phe-S. Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: citrato de sódio 1,5 mol/L, pH 8,0; Tampão de eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E). ....                      | 57 |
| Figura 4-6- Perfil eletroforético- CPA em Phe-S. Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular λφX (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2, W3, W4, W5 e W6. Frações da etapa de eluição E19, E20, E21, E22, E30, E31, 32 e E33. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado. .... | 57 |
| Figura 4-7 - CPA em TS. Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão                                                                                                                                                                                                                 |    |

de lavagem: citrato de sódio 1,5 mol/L pH 8,0; Tampão de Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E). ..... 60

Figura 4-8 - Perfil eletroforético- CPA em TS. Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L.. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2, W3, W4, W5 e W6. Frações da etapa de eluição: E29-E41. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado. .... 60

Figura 4-9 - CPA em TS. Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: fosfato de potássio 2,0 mol/L, pH 8,0; Tampão de Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).62

Figura 4-10 - Perfil eletroforético - CPA em TS. Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2, W3, W4, W5. Frações da etapa de eluição: E28-E43. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado. .... 62

Figura 4-11- CPA em TS. Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Volume da coluna: 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: sulfato de amônio 1,5 mol/L, pH 8,0; Tampão de Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).64

Figura 4-12 - Perfil eletroforético - CPA em TS. Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A : lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2-W6. Frações da etapa de eluição: E32-E42.(L): pDNA linear, (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado..... 64

Figura 4-13 - CTA em MPR-S. Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Volume da coluna: 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: citrato de sódio 1,5 mol/L, pH 8,0; Tampão de Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E). ..... 67

Figura 4-14 - Perfil eletroforético- CTA em MPR-S. Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2-W6. Frações da etapa de eluição: E32-E42. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado. .... 67

Figura 4-15 - CTA em MPR-S. Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Volume da coluna: 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: sulfato de amônio 1,5 mol/L, pH 8,0; Tampão e Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E). ..... 70

Figura 4-16 - Perfil eletroforético- CTA em MPR-S. Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A : lisado neutralizado

alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2-W4. Frações da etapa de eluição: E27-E43. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado. .... 70

Figura 4-17 - CTA em MPR-S. Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Volume da coluna: 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: Fosfato de potássio 2,0 mol/L, pH 8,0; Tampão e Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).73

Figura 4-18 - Perfil eletroforético- CTA em MPR-S. Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W3-W5. Frações da etapa de eluição: E31-E44. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado. .... 73

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 2-1. Teor de impurezas no produto final, segundo critérios das agências reguladoras (adaptado de STADLER et al., 2004). .....                                              | 29 |
| Tabela 2-2. Principais técnicas cromatográficas para purificação de DNA plasmidial (adaptado de SOUSA et al., 2008). .....                                                        | 31 |
| Tabela 4-1. Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz Phe-S e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção. ....              | 58 |
| Tabela 4-2. Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz TS e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção. ....                | 65 |
| Tabela 4-3. Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz MPR e tampão citrato de sódio 1,5 mol/L (CS). ....                            | 68 |
| Tabela 4-4. Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz MPR e tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L (SA) como tampão de adsorção. ....   | 71 |
| Tabela 4-5. Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz MPR e tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L (FP) como tampão de adsorção. .... | 74 |

## LISTA DE SIGLAS

|                |                                                            |
|----------------|------------------------------------------------------------|
| <b>A</b>       | amostra                                                    |
| <b>A260</b>    | absorbância no comprimento de onda de 260 nm               |
| <b>ATPS</b>    | extração em duas fases aquosas                             |
| <b>BCA</b>     | ácido bicinconínico                                        |
| <b>CET</b>     | cromatografia de exclusão por tamanho                      |
| <b>CIH</b>     | cromatografia de interação hidrofóbica                     |
| <b>CS</b>      | citrato de sódio                                           |
| <b>CONAMA</b>  | Conselho Nacional do Meio Ambiente                         |
| <b>CTA</b>     | cromatografia tiofílica aromática                          |
| <b>CTI</b>     | cromatografia de troca-iônica                              |
| <b>DNA</b>     | ácido desoxirribonucleico                                  |
| <b>E</b>       | etapa eluição                                              |
| <b>ET</b>      | endotoxinas                                                |
| <b>FDA</b>     | <i>“Food and Drug Administration”</i>                      |
| <b>FP</b>      | fosfato de potássio                                        |
| <b>gDNA</b>    | DNA genômico                                               |
| <b>DNA</b>     | genômico                                                   |
| <b>HPLC</b>    | cromatografia líquida de alta eficiência                   |
| <b>IMAC</b>    | cromatografia de interação com íons metálicos imobilizados |
| <b>L</b>       | linear                                                     |
| <b>LAL</b>     | lisado de amebócito de <i>Limulus</i>                      |
| <b>MPR</b>     | mercaptopiridina                                           |
| <b>oc pDNA</b> | isoforma circular aberta do plasmídeo                      |
| <b>PCR</b>     | cadeia de reação da polimerase                             |
| <b>pDNA</b>    | plasmídeo                                                  |
| <b>Phe</b>     | fenilalanina                                               |
| <b>RNA</b>     | ácido ribonucleico                                         |
| <b>RPB</b>     | recuperação e purificação de bioprodutos                   |

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| <b>S</b>   | sepharose                            |
| <b>AS</b>  | sulfato de amônio                    |
| <b>SE</b>  | isoforma superenovelada do plasmídeo |
| <b>SC</b>  | isoforma superenovelada do plasmídeo |
| <b>SDS</b> | dodecil sulfato sódio                |
| <b>TFF</b> | filtração tangencial                 |
| <b>T</b>   | triptofano                           |
| <b>UF</b>  | ultrafiltração                       |
| <b>VC</b>  | volume de coluna                     |
| <b>W</b>   | etapa de lavagem                     |



## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento biotecnológico resultou em uma grande mudança na maneira como desenvolvemos e aplicamos vacinas. A descoberta de novos antígenos e vetores é atualmente reflexo deste significativo avanço (DINIZ e FERREIRA, 2010). No que se refere a vacinas, diferentes processos de produção e mecanismos de ação têm sido explorados. Entre as técnicas mais conhecidas, e pode-se dizer clássica, destacam-se as produzidas com base em vírus atenuados (REYES et al., 2001).

No entanto, os avanços atuais na biotecnologia possibilitaram o desenvolvimento de vetores não virais para imunização. Nestas vacinas, o mecanismo de ação está ligado à informação genética do patógeno, responsável pela codificação de proteínas que representem antígenos relevantes para induzir a proteção. Em geral, são conhecidas como vacinas de DNA ou gênicas (DINIZ e FERREIRA, 2010).

As vacinas de DNA são projetadas para gerar resposta imune celular e humoral, as vacinas precedentes foram idealizadas para induzir a produção de anticorpos contra doenças causadas por microorganismos. Essa nova abordagem fez com que as doenças alvo para tratamento expandissem, passando a incluir câncer, alergias e doenças autoimunes (SRIVASTAVA e LIU, 2003; LIU, 2003).

De forma geral um vetor não viral é uma molécula de DNA plasmidial (pDNA), contendo um ou mais genes que codificam proteínas terapêuticas, que uma vez expressas nas células do paciente, tendem a induzir ou melhorar a imunidade ou substituir uma proteína defeituosa (PRAZERES et al., 2001).

O DNA plasmidial é normalmente obtido por meio de uma cultura bacteriana de *Escherichia coli* e, como resultado do rompimento celular, no lisado há presença de grande quantidade de impurezas. As impurezas a serem removidas durante a purificação do plasmídeo são: DNA genômico (gDNA), proteínas, RNA e endotoxinas (ET). Além do *debris* celular, há possível presença de três isoformas de pDNA, sendo elas, circular aberta (OC), linear (L) e superenovelado (SC); este último é o produto alvo para uso farmacêutico, pois, é o mais estável e eficaz na

transfecção celular. As isoformas (L) e (OC) são os resultados de quebras na estrutura do plasmídeo superenovelado. A causa destes rompimentos na estrutura do pDNA SE podem ser: a oxidação por radical livre, a ação enzimática de endonucleases, além de forças de cisalhamento durante o processo de purificação (LENGSFELD e ANCHORDOQUY, 2002). As agências reguladoras exigem que uma preparação celular para ação terapêutica contenha no mínimo 90% da isoforma superenovelada (FDA, “*Food and Drug Administration*”- EUA) (FDA, 1996; PRAZERES e FERREIRA 2004).

## 1.1 COLOCAÇÃO DO PROBLEMA

A remoção de impurezas presentes no lisado celular é, portanto, o grande desafio para a aprovação do DNA plasmidial para fins terapêuticos, e um dos principais alvos a serem considerados quando se busca o escalonamento da produção de plasmídeos (BARBOSA, 2009). A otimização e validação de processos, principalmente na etapa do *downstream processing*, são fundamentais para vencer as restrições que têm tornado a produção de quilogramas de pDNA atualmente impraticáveis (PRAZERES e MONTEIRO, 2011).

As agências reguladoras limitam o teor de impurezas em cada formulação de pDNA. Diversos fabricantes têm disponibilizado no mercado kits comerciais e protocolos para a purificação de plasmídeos em escala laboratorial. No entanto, nenhum deles são apropriados para grandes produções de pDNA, seja devido à utilização de materiais durante o processo, que tornam o pDNA impróprio para aplicação humana, ou por utilizar técnicas de difícil escalonagem e economicamente não viáveis (FERREIRA et al., 2000).

Os processos atuais de purificação de pDNA normalmente são feitos em multietapas e com emprego de grandes quantidades de sais nocivos ao meio ambiente. O uso de sais, como por exemplo, o sulfato de amônio em concentrações elevadas, tende a encarecer a etapa de purificação, uma vez que há necessidade de longos tratamentos de efluentes após o processo. Tem-se almejado, então,

métodos que aliem alto grau de pureza para o pDNA, baixo custo de produção e, como uma necessidade e preocupação atual, a substituição do uso de substâncias tóxicas e de grande impacto ambiental.

Segundo BARBOSA 2009, existem três etapas principais na fabricação de DNA plasmidial. A primeira etapa (*upstream processing*), é a fase na qual ocorre a construção do vetor e a transformação da linhagem hospedeira adequada. Como segunda etapa tem-se o cultivo e fermentação das células do hospedeiro do pDNA e, na terceira etapa, busca-se a recuperação e purificação de plasmídeos (*downstream processing*) (Figura1.1). Há uma interligação neste processo, e um sucesso na etapa anterior tem um impacto sobre a eficiência e sucesso das etapas seguintes.

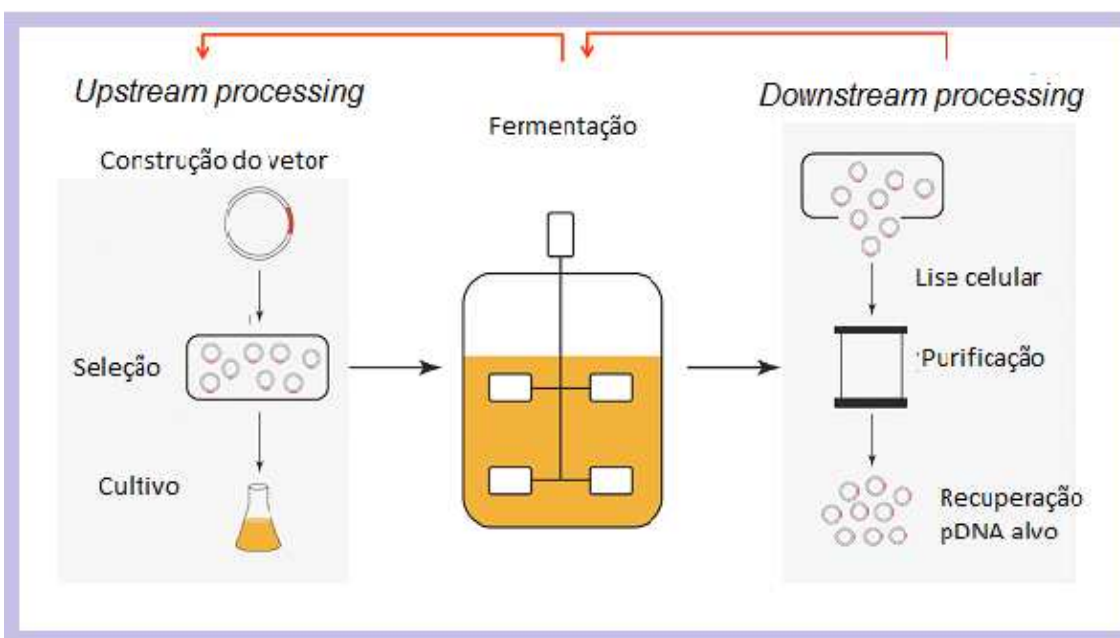


Figura 1-1. Produção de pDNA (adaptado de FERREIRA et al., 2000).

De forma geral, a etapa de purificação do lisado celular é a parte mais dispendiosa do processo, sendo por volta de 80-90% do custo final da produção (Doran, 1995). Devido a isso, há grande interesse em técnicas de purificação nas quais sejam minimizados o custo e perda de produto.

## 1.2 OBJETIVO

A literatura é escassa quanto a trabalhos que propõem a purificação de pDNA para uso terapêutico à partir do lisado neutralizado. Neste contexto, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de processos de purificação de DNA plasmidial para fins terapêuticos, a presente pesquisa teve como objetivo a pré-purificação de pDNA por cromatografia de pseudo-afinidade (CPA) e cromatografia tiofílica aromática (CTA) (Figura 1.2), com potencial de utilização em larga escala diretamente do lisado celular neutralizado. Os ligantes eleitos para o estudo, os aminoácidos, fenilalanina e D-triptofano (cromatografia de pseudo-afinidade) e o agente tiofílico mercaptopiridina (cromatografia tiofílica aromática) foram pouco estudados até o momento visando a pré-purificação de pDNA e não há trabalhos na literatura sobre a interação destes ligantes com o DNA plasmidial, bem como sobre a elucidação do mecanismo de adsorção desta molécula nesses adsorventes. Quanto à escolha dos sais utilizados nas etapas cromatográficas, buscou-se selecionar aqueles menos danosos ao meio ambiente, almejando um sistema com concentração salina empregada em níveis mais baixos do que os comumente utilizados em kits comerciais ou propostos em protocolos já conhecidos.

O sulfato de amônio é um dos principais sais utilizados nos processos de purificação, mas apesar de sua eficiência quando adicionado ao tampão de adsorção, existe a dificuldade de tê-lo como um efluente potente em termos de eutrofização (FREITAS et al., 2008). Em termos ambientais, isto o torna bastante danoso e com controles rígidos por meio dos órgãos como CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), acerca de seu descarte; diante disto deve-se considerar, a substituição ou diminuição da concentração do sulfato de amônio quando almeja-se um processo de larga escala. Em contrapartida, os sais fosfato de potássio e citrato de sódio, também experimentados neste trabalho, tem baixo poder de eutrofização e controle ambiental simples (GOMES et al., 2009), o que pode ser uma excelente opção em termos industriais.

Os ligantes escolhidos apresentam baixo custo e possibilidade de serem utilizados por muitos ciclos sem modificações da capacidade seletiva do adsorvente, características estas muito importantes para emprego em larga escala. Um dos desafios na obtenção de pDNA para fins terapêuticos, reside na necessidade de aumentar a produção, tornando-a factível em quantidades de quilogramas do produto. Entende-se que isto será possível com técnicas robustas e que transitem facilmente da escala laboratorial para a industrial, sem a necessidade de altos custos e do emprego de várias etapas para obtenção do produto final.

### 1.3. Etapas desenvolvidas

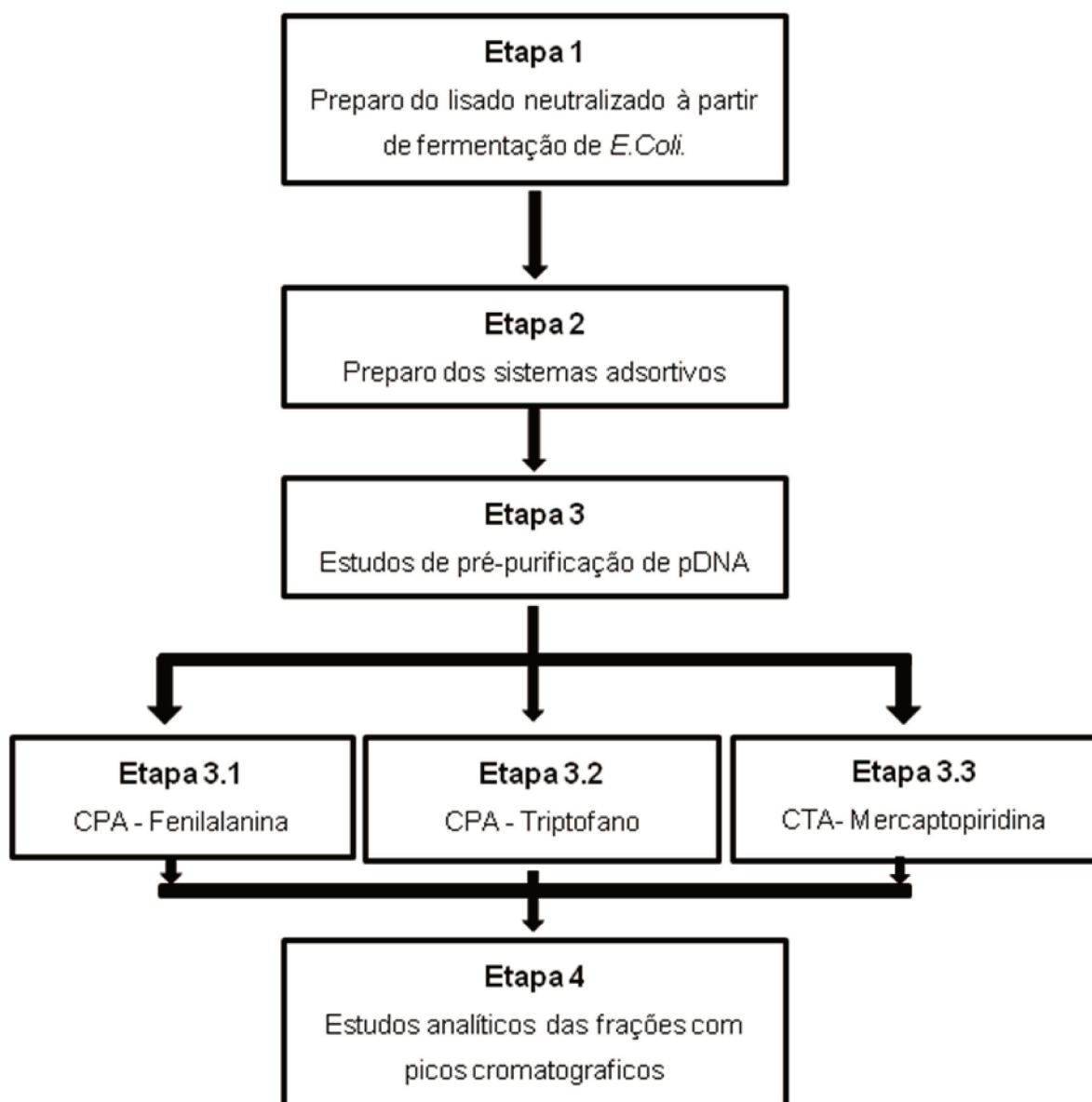


Figura 1.2. Diagrama de etapas do trabalho desenvolvido.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Terapia Gênica**

Uma variedade de doenças inatas ou adquiridas podem ser tratadas com a aplicação da terapia gênica e vacinas de pDNA, que tem como base preparações com agentes biológicos (SOUSA et al., 2011). O alvo destes tratamentos está na correção de erros genéticos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças, visando assim, melhorar a qualidade de vida dos indivíduos (LIMA et al., 2008). Os vetores até agora desenvolvidos para este tipo de tratamento são divididos basicamente em dois grupos, os vetores baseados em sistemas virais e os chamados vetores sintéticos, sendo este último, a categoria na qual se enquadra o DNA plasmidial (FERBER, 2001; NIIDOME et al., 2002), a base para a promissora vacina de DNA (LARA et al. 2012).

As vacinas com DNA se tornaram promissoras frente ao combate a uma variedade de patógenos e tumores, para os quais as vacinas e técnicas tradicionais não têm sido eficientes (KANO et al., 2007). Este novo conceito vacinal floresceu a partir de estudos de pesquisadores como James Watson e Francis Crick (WATSON e CRICK, 1953) com a descoberta da estrutura do DNA. O primeiro DNA recombinante foi desenvolvido por Paul Berg e um grupo de pesquisadores em 1972 (JACKSON et al., 1972). Em 1973 houve um grande avanço na engenharia genética, através da produção do primeiro organismo de DNA recombinante (COHEN e CHANG, 1973).

Fundamentada no uso das sequências do material genético do agente infeccioso, que codificam antígenos imunodominantes, é que a vacina de DNA plasmidial age quando administrada de forma terapêutica, possibilitando a produção da proteína antigênica pelas próprias células do indivíduo vacinado e induzindo uma resposta imune celular e humoral com memória (GURUNATHAN et al., 2000; SRIVASTAVA et al., 2003).

De forma comparativa, no tocante ao uso de vetores virais na terapia gênica, existem alguns pontos que merecem atenção decorrente das vantagens e desvantagens que um e outro podem trazer. Os vetores virais levam a uma transfecção mais estável e eficiente, no entanto, acompanhada pelo risco de efeitos indesejáveis, uma vez que as infecções virais além de sintomas desagradáveis podem culminar na destruição do tecido hospedeiro resultando em patogênese, como por exemplo, processos tumorais. Existem também dois outros fatores relevantes: a limitação relacionada ao tamanho dos genes que podem ser carreados e a produção dependente do cultivo em células de mamíferos, cujo custo é elevado e a padronização difícil (LIMA et al., 2008).

Nas vacinas de DNA, por outro lado, as vantagens estão na estabilidade, maior tempo de imunização (LARA et al. 2012), ausência de risco de infecção ou indução de mutagênese, na grande quantidade de material genético que pode ser carregado, além de sua produção ser feita a partir do cultivo de células bacterianas, esta última com certa facilidade para produção em larga escala (BROWN et al., 2001). Suas limitações, contudo, residem no fato do DNA plasmidial não reconhecer alvos específicos, como acontece na utilização de sistemas virais especializados, e serem facilmente degradados por nucleases, o que reflete na redução da quantidade de pDNA que atinge o núcleo das células-alvo, comprometendo assim, a transfecção desejada (TAIRA et al., 2005).

A crucial importância da terapia com DNA plasmidial reside em seu potencial de tratamento e possível erradicação de muitas doenças (LARA et al. 2012). As aplicações clínicas tem avançado de tratamento de simples viroses (REYES et al., 2001) para testes em doenças infecciosas como tuberculose (HUYGEN, 2003; RODRIGUES et al., 2004), câncer (FIORETTI et al., 2010; VAN DEN BERG et al., 2010), alergias e doenças autoimunes (LIU, 2003 ; SRIVASTAVA, 2003).

Segundo VAN DEN BERG e colaboradores (2010), as pesquisas em torno das vacinas de pDNA já somam perto de 20 anos, no entanto, pode-se dizer que esta ferramenta na área de vacinação é ainda jovem. São vacinas relativamente fáceis de produzir e têm se apresentado úteis, sobretudo, na área de oncologia,



onde provou ser bem tolerada e teve a capacidade de induzir a ativação imunitária dos pacientes.

As terapias baseadas no uso do DNA plasmidial apresentam uma eficiência superior aos outros métodos tradicionais (VOLOSNIKOVA et al., 2010). Por esta razão, o desenvolvimento de novos processos para tornar a vacina de pDNA competitiva, cada vez mais eficiente e dentro das diretrizes e leis respectivas de acordo com o GMP (Boas Práticas de Fabricação), FDA (*Food and Drug Administration*) e EMEA (*European Medicines Evaluation Agency*), têm sido impulsionado (VOß et al., 2005) e tornado grandes desafios na pesquisa e na indústria.

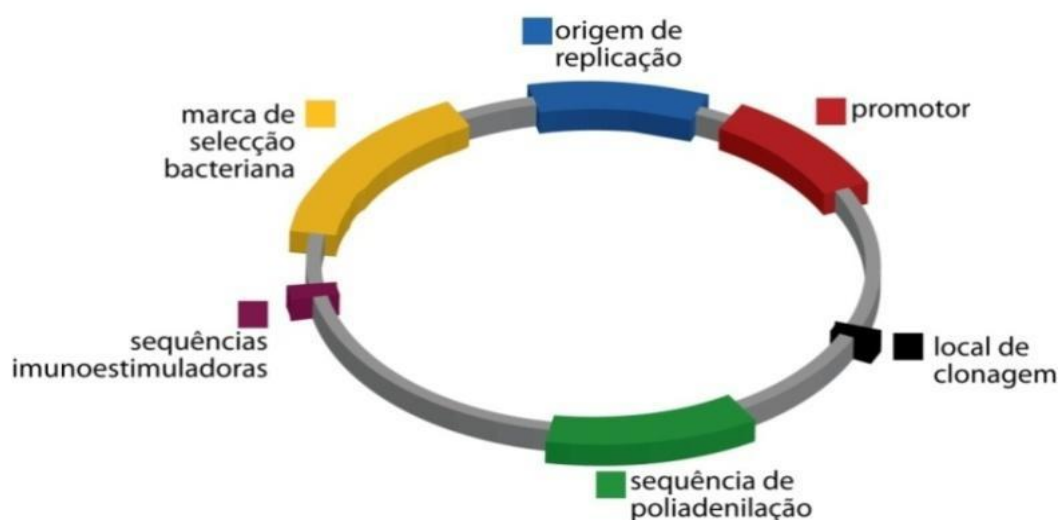
## **2.2 Produção e características do pDNA**

O DNA plasmidial é uma molécula de DNA circular de fita dupla que contém um gene que codifica a proteína de interesse e elementos para a sua expressão (SRIVASTAVA et al.; 2003) (Figura 2-1). O pDNA utilizado nas terapias gênicas apresenta um tamanho entre 3.300-6.600 kDa (5-10 kpb) e um raio hidrodinâmico de cerca de 150-250 nm (LEVY et al., 2000).

As cadeias lineares que constituem sua estrutura são compostas por desoxirribonucleotídeos ligados entre si por pontes de hidrogênio estabelecidas entre purinas e pirimidinas. Suas extremidades interagem covalentemente, resultando assim em uma estrutura semelhante a um *loop* fechado. No entanto, devido a rompimentos nessa estrutura superenovelada (SC), causados por ação mecânica ou enzimática, resultam duas outras isoformas (Figura 2-2), a circular aberta (OC) e a linear (L), que variam em estabilidade e, conseqüentemente, capacidade de transfecção (SINDEN et al., 1994).

A produção de pDNA é normalmente realizada por meio de fermentação de células bacterianas de *Escherichia coli* como, por exemplo, a DH5α (PRAZERES et al., 2001). De forma geral, após a fermentação, quando a concentração celular atingiu o ideal, ocorre a etapa nomeada de isolamento primário, feita através de centrifugação ou filtração, que consiste na obtenção das células resultantes da fermentação. Após a coleta das mesmas, segue-se uma etapa de lise celular, sendo a lise alcalina a mais comumente utilizada (BIRBOIM et al., 1979).

Como resultados da lise celular, juntamente com o DNA plasmidial de



**Figura 2-1.** Estrutura simplificada do DNA plasmidial usado em terapia gênica. (Adaptado de LIMA, 2008).

interesse, são obtidas biomoléculas naturais do meio intracelular consideradas impurezas. Estas impurezas presentes no lisado são: DNA genômico, RNA, endotoxinas e proteínas. As características análogas com o pDNA são os principais obstáculos para eliminação dessas impurezas nas etapas de recuperação e purificação. Pode-se afirmar que os pesquisadores buscam aliar as similiaridades físico-químicas entre as impurezas oriundas do meio celular, para definir etapas para obtenção do DNA plasmidial puro.

O método escolhido para recuperação e purificação deve privilegiar uma boa separação das isoformas, uma vez que o pDNA SE é o produto alvo para uso farmacêutico e as outras isoformas são vistas como impurezas. As agências reguladoras limitam o teor de impurezas em cada formulação de pDNA, conforme resumido na Tabela 2-1.

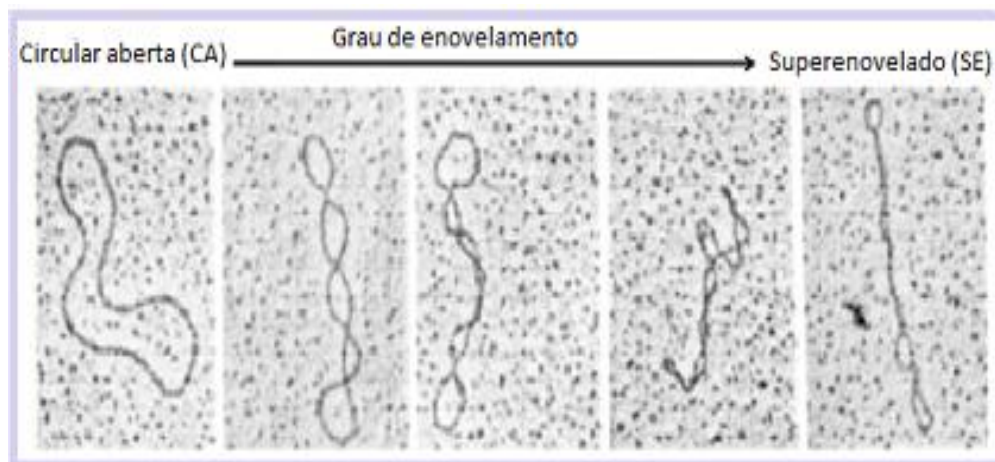


Figura 2-2. Isoformas de pDNA (adaptado de FERREIRA, 2005).

Tabela 2-1. Teor de impurezas no produto final, segundo critérios das agências reguladoras (adaptado de STADLER et al., 2004).

| Composição inicial do lisado bacteriano | Produto final:<br>Composição aceita | Método de Detecção |
|-----------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| 55% Proteínas                           | < 3 µg/mg pDNA                      | BCA                |
| 3% gDNA                                 | < 2 µg/mg pDNA                      | PCR real time*     |
| 3% Endotoxina                           | < 10 E.U./mg pDNA                   | Teste LAL **       |
| <3% Plasmídeo                           | > 90% pDNA (SC)                     | HPLC***, EGA****   |
| 21% RNA                                 | < 0,2 µg/mg pDNA                    | HPLC***, EGA****   |

\*Polymerase Chain Reaction\*\* Limulus Amebocyte Lysate. \*\*\*High Performance Liquid Chromatography\*\*\*\*Eletroforese em Gel de Agarose.

### **2.3 Recuperação e purificação de DNA plasmidial**

Devido ao potencial terapêutico do DNA plasmidial, tem aumentado o número de pesquisa objetivando a melhoria dos métodos de recuperação e purificação para obtenção desse produto em quilogramas. É desejável que os métodos propostos sejam de baixo custo e que não causem impacto ambiental. Diante disto, uma diversidade de técnicas cromatográficas têm sido exploradas como uma opção para purificação do DNA plasmidial, na tentativa de obter um material final de acordo com as exigências dos órgãos regulamentadores.

A escolha por um determinado método deve levar em conta as características do lisado celular e buscar integração total do processo, uma vez que o processo é normalmente dividido em várias etapas até a obtenção do produto final. Um resultado satisfatório em termos de rendimento e custo, depende de uma integração bem sucedida.

Dentro disto as técnicas cromatográficas desempenham um papel muito importante na purificação de compostos terapêuticos por serem altamente versáteis e seletivas (Kalyanpur 2000). Consideradas as técnicas disponíveis para recuperação e bioseparações, tais como filtração (micro , ultra, e osmose-reversa), a centrifugação, a floculação, flotação etc, a cromatografia é a que atinge alta resolução de biomoléculas. Nenhum dos outros passos, tem o mesmo desempenho frente a produtos biofarmacêuticos (Loannidis, 2009) . Diante deste potencial os métodos cromatográficos (Tabela 2.2.) tem sido largamente estudados para a obtenção de pDNA de grau terapêutico, pois além seletivas, suas vantagens residem também no fato de serem técnicas bastante conhecidas e escalonáveis. As diferentes fases móveis e estacionárias disponíveis, possibilitam explorar as diferentes características das biomoléculas presentes no lisado celular, como tamanho, carga, hidrofobicidade.

As características físico-químicas do pDNA alvo e suas impurezas podem ser, portanto, exploradas através de interações seletivas com o adsorvente cromatográfico (BARBOSA, 2009, DIOGO et al., 2005). Os tipos de cromatografia

mais explorados atualmente no *downstream processing* para obtenção de pDNA de grau farmacêutico são apresentadas de forma sucinta a seguir.

**Tabela 2-2.** Principais técnicas cromatográficas para purificação de DNA plasmidial (adaptado de SOUSA et al.,2008).

| <b>Tipos de cromatografia</b>       | <b>Vantagens</b>                                                                                 | <b>Desvantagens</b>                                                                             |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Exclusão de tamanho</i></b>   | Separa o pDNA e o gDNA de moléculas menores. Eficiente como etapa de polimento.                  | Baixa resolução, alta diluição e co-eluição de pDNA e gDNA.                                     |
| <b><i>Troca iônica</i></b>          | Separação eficiente do pDNA de endotoxinas e isoformas relaxadas. Aplicação em escala analítica. | Co-eluição de pDNA e RNA                                                                        |
| <b><i>Interação Hidrofóbica</i></b> | Separação do pDNA de endotoxinas, RNA e gDNA. Aplicação analítica e industrial.                  | Não interação com pDNA, uso de altas concentrações salinas, baixa resolução entre as isoformas. |
| <b><i>Tiofílica Aromática</i></b>   | Separação do pDNA das impurezas, resolução entre as isoformas.                                   | Eluição com altas concentrações salinas.                                                        |

### **2.3.1 Cromatografia de exclusão por tamanho (CET)**

Cromatografia de exclusão por tamanho (CET) tem sido extensivamente usada para purificar pDNA. Esta técnica explora os diferentes tamanhos das biomoléculas do lisado neutralizado, tanto do pDNA como de suas impurezas, a fim de promover a purificação (LI et al., 2007).

O tamanho do DNA genômico e as diferentes formas de pDNA, por exemplo, favorecem a separação destas das demais moléculas, uma vez que ambas (gDNA e pDNA) são grandes e incapazes de penetrar nos poros da resina, podendo ser separados das moléculas menores como RNA e outras impurezas (FERREIRA et al., 2000).

Um exemplo de matriz clássica na CET é a Sephacryl S1000 que, empregada na purificação e recuperação de pDNA, promoveu o retardo de moléculas de endotoxinas, RNAs e proteínas. Essa matriz tem sido aplicada no processo como uma etapa de polimento e troca de tampão (HORN et al., 1995; FERREIRA et al., 1997; 1999). No entanto, observa-se que uma separação com boa resolução entre as moléculas de pDNA e gDNA é bastante difícil em função das similaridades, pois as duas biomoléculas são eluídas em frações muito próximas (LI et al., 2007).

A CET com matriz Sephacryl S-1000 é uma técnica simples, de baixo custo e reprodutível, seus resultados se mostram promissores alcançando miligramas de pDNA SE de alta pureza a partir de um lisado de *E. coli* pré-purificado.

### **2.3.2 Cromatografia de Troca Iônica (CTI)**

A cromatografia de troca iônica (CTI) é uma das técnicas mais utilizadas para a recuperação primária de DNA plasmidial estando presente em mais de 81% das patentes de processos de purificação de DNA (FORDE, 2004). As vantagens oferecidas por esta cromatografia são a rápida separação, uso de tampões comuns em processos de purificação, e vários tipos de fases estacionárias disponíveis (EON-DUVAL et al., 2004). A CTI se baseia na interação eletrostática entre a carga

negativa dos grupos fosfato da cadeia do DNA plasmídico e a fase estacionária carregada positivamente (PRAZERES et al., 1998; 2004). De forma geral, um gradiente salino é empregado para deslocar os diferentes ácidos nucleicos que são eluídos de acordo com a densidade de carga, propriedades que estão ligadas ao comprimento da cadeia e conformação da biomolécula (PRAZERES et al., 2001).

A matriz DEAE-Celulose (dietilaminoetil-celulose), estudada por LI e colaboradores (2010), apresentou resultados bastantes satisfatórios no tocante à purificação de pDNA a partir de um lisado neutralizado, por CTI. No referido trabalho, a isoforma superenovelada de pDNA foi efetivamente separada da isoforma circular aberta através de um gradiente salino. O método proporcionou a recuperação de pDNA SE de alta pureza ( $95 \pm 1,1\%$ ) e níveis quase indetectáveis de endotoxinas, DNA genômico, RNA e proteínas, com um rendimento de ( $65 \pm 8\%$ ). O presente estudo confirmou a possibilidade de usar CTI como uma etapa única para purificação de pDNA SE de outras isoformas e contaminantes presentes no lisado neutralizado de *E. coli*.

A cromatografia de troca iônica tem alcançado êxito no fator recuperação, principalmente quando aplicada posteriormente à uma etapa de pré-purificação de pDNA, como por exemplo ATPS (Sistema de duas fases aquosas) ou cromatografia de interação hidrofóbica (EON-DUVAL et al., 2004; KEPKA et al., 2004b; URTHALER et al., 2005).

No entanto, a principal limitação é a co-purificação de polímeros aniônicos de estrutura e carga semelhante ao pDNA, como gDNA, endotoxinas e alguns RNAs (WICKS, 1995; PRAZERES et al. 2004), levando a necessidade de etapas posteriores para eliminá-los e resultando em um aumento de custo.

### **2.3.3 Cromatografia de interação hidrofóbica (CIH)**

A cromatografia de interação hidrofóbica é um método bem estabelecido e tem sido aplicado com êxito como etapa de recuperação e de purificação proteínas de uso terapêutico em escala laboratorial e industrial.

Seu uso na purificação de DNA plasmidial está baseada na diferença de hidrofobicidade de suas isoformas e dos demais ácidos nucleicos de fita simples presentes no lisado celular (gDNA e RNA), além das endotoxinas (DIOGO et al., 2000; IULIANO et al., 2002). A explicação para este fato está na conformação das moléculas de pDNA (SC), onde suas bases hidrofóbicas estão localizadas no interior da dupla hélice superenovelada, tornando assim a interação hidrofóbica com o adsorvente mínima.

Na cromatografia de interação hidrofóbica, uma fase móvel com alta concentração salina favorece a adsorção de proteínas e o decréscimo da concentração salina favorece a dessorção (MELANDER E HORVÁTH, 1977; FAUSNAUGH E REGNIER, 1986; ROE, 1989). As interações hidrofóbicas são potencializadas diante de sais que favorecem a precipitação de proteínas, cujo fenômeno é denominado “salting-out”. Estes íons estão ordenados de acordo com série de Hofmeister para a precipitação de proteínas em soluções aquosas (Figura 2.3).

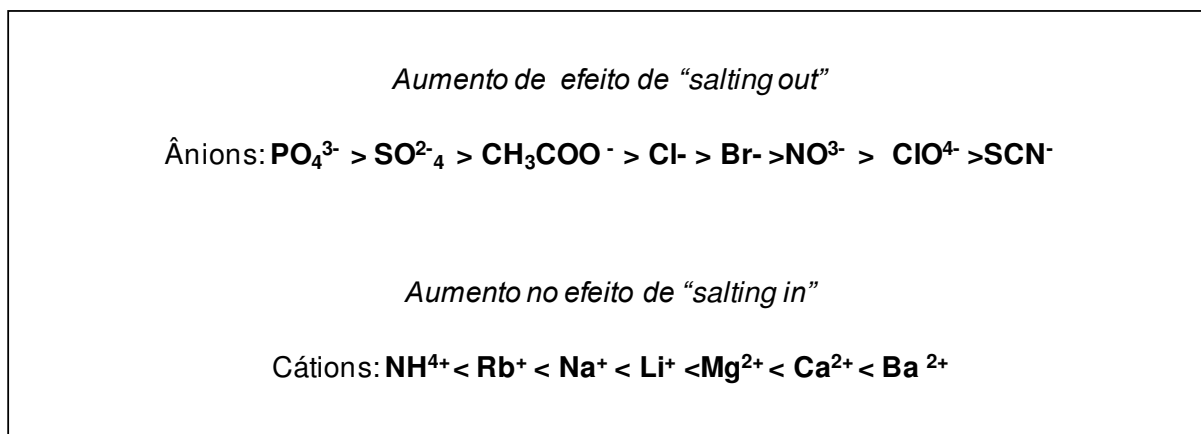


Figura 2.3. Série de Hofmeister de precipitação de proteínas (PORATH, 1987).

Esta série foi elaborada por Hofmeister em 1888 levando em consideração a influencia de diferentes íons no comportamento físico de colóides e proteínas em sistemas aquosos. Os íons foram classificados como cosmotrópicos ou caotrópicos,



de acordo com sua capacidade de alterar a ligação de hidrogênio da molécula de água (BALDWIN, 1996; ZHANG et al, 2006; VLACHY, et al, 2009;).

Os íons chamados de cosmotrópicos, agrupados no início da série, promovem a interação hidrofóbica, geram altas densidades de carga que levam a forte interferência na ligação de hidrogênio resultando no redirecionamento das moléculas de água na camada de hidratação hidrofóbica ao redor da proteína para o centro da solução. Eles promovem o efeito “*salting-out*” nas proteínas e macromoléculas. Já os íons denominados caotrópicos, do final da série de Hofmeister, quebram as estruturas da água, e geram baixas densidades de carga que levam a pequenos efeitos na ligação hidrogênio (ZHANG et al, 2006; NUCCI, 2008 ) e redirecionam as moléculas de água do seio da solução para a camada de hidratação ao redor da proteína.

Os íons caotrópicos promovem um desfavorecimento das interações hidrofóbicas e adsorção em fases estacionárias com ligantes hidrofóbicos. Estes íons aumentam a solubilidade das proteínas, fenômeno denominado “*salting-in*” (ERIKSSON, 1989).

Sendo assim, a presença de altas concentrações de sais cosmotrópicos tendem a aumentar o empacotamento das bases hidrofóbicas no interior do pDNA (DIOGO et al., 2000), dificultando as interações com a fase estacionária.

Por outro lado, as impurezas que contém fita simples permitem uma maior exposição de suas bases hidrofóbicas, induzindo a interação com o ligante hidrofóbico da coluna (DIOGO et al., 2002).

Estas interações são promovidas principalmente por forças de van der Waals (VAN OSS et al., 1986) e tem seu potencial aumentado na presença de sais caotrópicos . Com uso desta variável, pode-se promover a purificação do pDNA por cromatografia negativa. Nesta técnica a molécula de interesse é obtida na etapa de lavagem, enquanto as impurezas ficam retidas no adsorvente, sendo recuperadas nas frações de eluição (DIOGO et al., 2000;. 2001, LI et al., 2005).

A desvantagem do uso de altas concentrações salinas na CHI reside no fato de que os mesmos são efluentes bastante danosos ao meio ambiente, como, por exemplo, o clássico sulfato de amônio. FREITAS e colaboradores (2008) estudaram alternativas para sua substituição, propondo o uso do sal citrato de sódio.

GÉRMAN e colaboradores (2011) relataram uma expressiva purificação de pDNA, cerca de 30 vezes em relação a solução de pDNA inicial, e 99% de remoção de RNA com a utilização da CHI. Este grupo de pesquisa fez uso inicialmente de filtração com fluxo tangencial, posteriormente uma cromatografia de troca iônica em membrana de fibra oca Mustang Q (Pall BioPharmaceuticals), como uma pré purificação, seguida de cromatografia de interação hidrofóbica com coluna de Fenil-Sepharose. Esses dados mostram que a integração de técnicas trouxeram resultados satisfatórios. A desvantagem destes múltiplos passos está no aumento de custo do processo.

#### **2.3.4 Cromatografia de afinidade (CA) e pseudoafinidade CPA**

O anseio por métodos altamente seletivos para recuperação e purificação de pDNA para uso terapêutico, tem impulsionado o estudo com diferentes ligantes de afinidade, por exemplo, arginina (SOUSA et al., 2008), na etapa de *downstream process* (LOWE et al., 2001).

A CA e a CPA são baseadas no emprego de um ligante bio- ou pseudobio-específico, respectivamente, para separar biomoléculas, levando em consideração suas características biológicas, funcionais ou estrutura química individual (VIJAYALAKSHMI, 1989; LOWE et al., 2001; SCHIEL et al., 2006). Em geral, a purificação baseada em CA oferece uma elevada seletividade para a biomolécula alvo, no entanto, os baixos rendimentos na recuperação do plasmídeo é também relatada e é atribuída a baixa capacidade do adsorvente (GHOSE et al., 2004; FORDE et al., 2006). As interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligação de hidrogênio são as bases destas interações específicas que ocorrem entre ligante e molécula alvo (PLATONOVA et al., 2005).

Três tipos de interações tem sido estudados para a purificação de pDNA explorando interações por afinidade: tripla hélice, ligação do DNA com íons metálicos e interações com aminoácidos (LANDER et al., 2004; SOUSA et al., 2008).

A afinidade de tripla-hélice é baseada na interação de uma sequência específica do oligonucleotídeo pirimidina com o pDNA (WILS et al., 1997; SCHLUEP et al., 1998). A desvantagem desta técnica, porém, está na cinética de ligação geralmente lenta e requer pH ácido (BARBOSA, 2009).

No tocante ao uso de íons metálicos imobilizados em matrizes sólidas (agarose-IDA-Cu<sup>2+</sup> e agarose NTA-Cu<sup>2+</sup>), ou coluna comercial HiTrap (GE Healthcare®) com Cu<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup> imobilizados, pesquisadores mostraram que o DNA plasmidial (pDNA) e genômico (gDNA) puderam ser separados por desnaturação termoquímica seguida de renaturação, uma vez que o gDNA parcialmente desnaturado se liga seletivamente aos íons metálicos imobilizados; já o pDNA renaturado não apresenta afinidade pelos ligantes (LANDER et al., 2004).

Os aminoácidos, tais como histidina (SOUSA et al., 2006), lisina (SOUSA et al., 2011) e arginina (SOUSA et al., 2008, 2009, 2010), também têm sido explorados como potenciais ligantes na cromatografia de afinidade para purificação de pDNA. Ligantes simples e menos específicos, mas não menos robustos, foram introduzidos pela primeira vez para a purificação de imunoglobulinas por Vijayalakshmi e colaboradores (KANOUN, 1986) e foram convencionados como ligantes de pseudobioafinidade ou pseudobioespecíficos (VIJAYALAKSHMI, 1989). Estudos mostram que a interação pseudobioespecífica entre o aminoácido histidina e moléculas de proteínas, ocorrem através da contribuição de dois grupamentos presentes na estrutura da histidina, o anel imidazol de um lado da cadeia e o COOH do outro. A interação do imidazol com a proteína é hidrofóbica enquanto que com o grupamento COOH há uma interação eletrostática (VIJAYALAKSHMI, 1989). De acordo com o tipo de tampão e o pH escolhidos, há o favorecimento de uma das duas interações.

Tanto a histidina como a arginina imobilizadas em matrizes cromatográficas, tem apresentado bons resultados na separação entre as isoformas superenoveladas e a circular aberta de pDNA em apenas uma etapa a partir do lisado clarificado. A presença de gDNA e endotoxinas têm ficado dentro dos níveis aceitáveis, e proteínas e RNA não foram detectados nas amostras de eluição. No trabalho descrito por SOUSA e colaboradores 2006, houve a combinação das características hidrofóbicas de um braço espaçador epoxi com a pseudo-afinidade do aminoácido histidina. As diferentes espécies do lisado neutralizado foram eluídas por diminuição da concentração de sal (2,3; 2,0; 1,5 e 0 mol/L). O pDNA (OC) e gDNA foram eluídos com uma concentração salina de 2,3 mol/L, o pDNA superenovelado foi isolado como um único pico a 2,0 mol/L e o RNA foi eluído com sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 1,5 mol/L. Um trabalho mais recente de Sousa e colaboradores 2008, investigando arginina como ligante, observou um tipo de interação diferenciada da apresentada com histidina. Além das atrações eletrostáticas e hidrofóbicas, há uma complexa afinidade entre pDNA e arginina indicando que um grande número de interações podem ocorrer envolvendo tanto as bases do pDNA como sua estrutura.

Ao contrário do mecanismo encontrado anteriormente para a purificação por cromatografia do pDNA (SC) com ligante histidina, no qual a interação foi atribuída principalmente à exposição das bases (KUTZLE et al., 2008), a matriz de arginina-agarose é altamente eficiente em interagir com o pDNA a baixa força iônica, indicando a presença de fortes interações com os grupos fosfato carregados no esqueleto do pDNA. Essas interações eletrostáticas da cadeia do DNA com resíduos de aminoácidos como a arginina e lisina são numerosos em muitos complexos DNA-proteína, proporcionando estabilidade ao invés de especificidade (YI et al., 2005). No referido estudo, Sousa e colaboradores 2008, obtiveram uma satisfatória separação das isoformas CA e SE. Apesar de promissores, os estudos utilizando diferentes aminoácidos ainda são escassos e pouco elucidados, o que os torna uma importante linha a ser investigada devido o potencial uso como ligantes.

### **2.3.5 Cromatografia tiofílica aromática (CTA)**

Um grande desafio na purificação do DNA plasmidial é justamente encontrar um método que faça uma boa resolução entre as três isoformas existentes. A cromatografia tiofílica aromática tem demonstrado êxito neste aspecto no tocante às outras cromatografias.

Em 1885 Porath e colaboradores deram início a CTA, ao desenvolverem o adsorvente tiofílico T-Gel. A cadeia alifática do ligante tiofílico mercaptoetanol ( $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ ) foi imobilizada a grupos sulfona e tioéter presentes na matriz de agarose, esta previamente ativada com divinil sulfona. Este trabalho demonstrou a capacidade do adsorvente tiofílico na separação de diferentes proteínas presentes no plasma sanguíneo (BOSCHETTI, 2001). Porath e colaboradores fizeram o uso de sais cosmotrópicos como tampões adsorventes. A seletividade de adsorção das proteínas e a interação das mesmas com o ligante, são diretamente influenciados pelo tipo de sal empregado nos tampões (Oscarsson e Vieira, 2002).

Essa interação tiofílica entre ligantes e proteínas sob alta concentração salina, são provavelmente, resultado de uma combinação de interações do tipo doador/aceptor de elétrons (HUTCHENS e PORATH, 1987; PORATH e BELEW, 1987) e interação tiofílica/hidrofóbica (OSCARSSON et al., 1988). Essas interações ocorrem provavelmente entre o grupamento tiol do ligante com regiões aromáticas da proteína, principalmente nos resíduos contendo “clusters” de triptofano e fenilalanina na seguinte ordem:  $(\text{Trp})_2 \gg (\text{Phe})_2$  (BOURHIM et al., 2008; PORATH e BELEW, 1987; OSCARSSON e VIEIRA, 2002).

No caso da purificação do pDNA, um mecanismo diferente de interação foi proposto por Lemmens e colaboradores (2003), pois ao contrário do que ocorre com as proteínas, os polinucleotídeos não foram capazes de interagir com ligantes tiofílicos alifáticos por eles testados. A interação entre o adsorvente e os polinucleotídeos do pDNA só ocorreu quando o ligante foi composto no mínimo por um anel aromático e um átomo de enxofre, sugerindo que o anel aromático participe com um tipo de interação hidrofóbica ( $\pi$ - $\pi$ ) com a fita dupla da isoforma

superenovelada de pDNA, enquanto que o átomo de enxofre participa como doador de elétrons.

Para esta conclusão, o referido grupo de pesquisa testou a substituição do anel aromático por átomos de enxofre, oxigênio e também por hologênios, no entanto, em nenhuma destas substituições houve alteração da interação do pDNA com o ligante. A substituição do átomo de enxofre por oxigênio ou nitrogênio, mantendo-se o radical aromático também foi testada e resultou em nenhuma interação da isoforma superenovelada com os ligantes.

Nesta técnica uma interação bioquímica ocorre na presença de altas concentrações salinas, resultando na adsorção seletiva de DNA na isoforma superenovelada em ligante tiofílico aromático, promovendo a separação da isoforma circular aberta. Para alcançar este resultado mais polido, ainda segundo Lemmens, há uma integração de processos, no qual logo após a CTA há uma etapa de cromatografia de troca iônica.

O mecanismo de interação entre o pDNA e o ligante tiofílico não está completamente elucidado, mas pode-se dizer que a demanda por grande concentração salina neste tipo de cromatografia, em geral, 2 mol/L de sulfato de amônio, seja sua desvantagem.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAIS**

##### **3.1.1 Equipamentos**

O crescimento celular de *E.coli* transformada, contendo DNA plasmidial de interesse utilizado neste trabalho, foi realizado em uma Incubadora com agitação orbital e controle de temperatura modelo INNOVA 4430 (New Brunswick Scientific, EUA) e centrifugação em centrífuga 5804 R (Eppendorf, Alemanha).

Para a realização das cromatografias foram utilizadas colunas do tipo HR 5/10 (0,5 x 10 cm) acopladas ao sistema FPLC (“Fast Liquid Chromatography System”) ÄKTA Purifier com “software” Unicorn 5.1 e coletor de frações Frac-920, GE Healthcare (Suécia). A quantificação de pDNA foi realizada no sistema ÄKTA acoplado a coluna de interação hidrofóbica 15 Source PHE (0,46 x 10 cm) (GE Healthcare, Suécia), composta por uma matriz de poliestireno derivatizada com ligantes fenil.

A eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, EUA) foi realizada em unidade de eletroforese horizontal HE 99X Max Submarine (GE Healthcare, Suécia). Para aquisição de imagem foi utilizado o foto documentador “Electrophoresis Documentation Software and Analysis System 120” e o “software” Kodak digital Science 1D, ambos adquiridos da Kodak (EUA).

Para mensurações de absorbância foi utilizado o espectrofotômetro Beckman DU 650 (Beckman Coulter, EUA). A determinação da quantidade de gDNA nas amostras resultantes da CIH foi feita em equipamento de PCR em tempo real “7300 System” e “7300 System software”, ambos adquiridos da Applied Biosystems (EUA). Para meio reacional do PCR foi utilizado o Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, EUA), composto por Taq polimerase, dNTP’s, MgCl<sub>2</sub> e fluorocromo SYBR Green I.

A produção de lisado celular e as análises de eletroforese e quantificação de proteínas foram realizadas no Laboratório de Análise Genética e Molecular, coordenado pela Profa. Dra. Anete Pereira de Souza, no CBMEG (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética) da UNICAMP. A quantificação de gDNA foi executada no Laboratório de Genética de Plantas, coordenado pelo Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz, também no CBMEG, UNICAMP.

### 3.1.2 Ligantes e adsorventes

O gel de agarose (Sephacrose 6B<sup>®</sup>) foi obtida da GE Healthcare, Suécia. Os estudos com o ligante aminoácido triptofano (Figura 3.1- A) foram feitos com o emprego do adsorvente comercial D-Tryptophan Sepharose 4B<sup>®</sup> da Sigma (EUA). O ligante tiofílico mercaptopiridina (Figura 3.1 - B) (MPR) e o ligante aminoácido fenilalanina (Phe) (Figura 3.1-C), foram também obtidos da Sigma (EUA). Os reagentes para ativação dos géis, divinil sulfona e epícloridrina, foram obtidos da Sigma (EUA). Os demais reagentes: tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris), sulfato de amônio, tri-citrato de sódio, fosfato de potássio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e acetato de potássio foram adquiridos da Merck (Alemanha). Utilizou-se água purificada em aparelho Milli-Q (Millipore, EUA) para a preparação de todas as soluções.

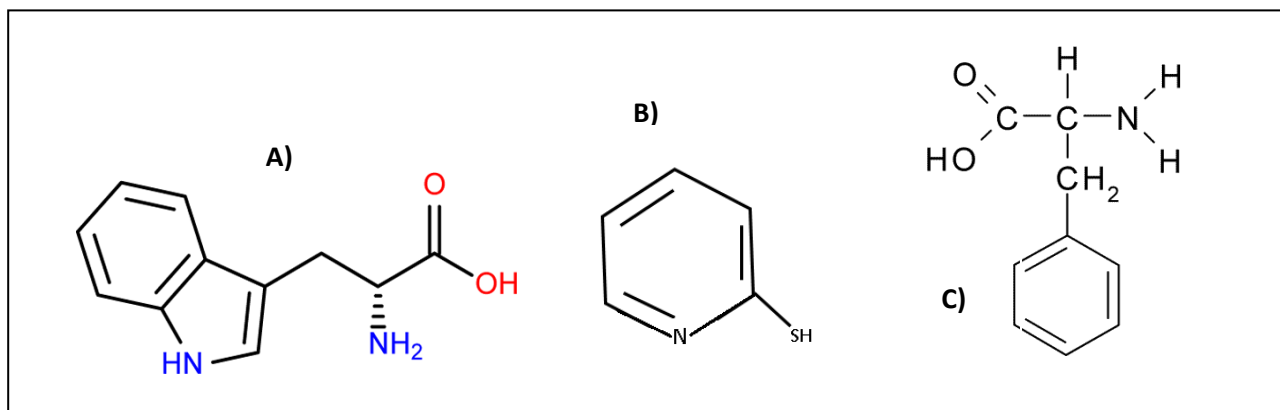


Figura 3-1. Estrutura dos ligantes: A - aminoácido D-triptofano; B – mercaptopiridina; D - aminoácido fenilalanina.



### **3.1.3 Soluções tamponantes**

Os sais citrato de sódio 1,5 mol/L, sulfato de amônio 1,5 mol/L e fosfato de potássio 2,0 mol/L, todos em Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0, foram utilizados nos tampões nas etapas de adsorção e dessorção das cromatografias em fenilalanina-Sepharose e triptofano-Sepharose (Cromatografia de Interação Hidrofóbica, CIH) e em mercaptopiridina-Sepharose (cromatografia tiofílica) para purificação de pDNA.

As soluções foram preparadas em água ultra-pura (Milli-Q, Millipore, EUA). Antes das cromatografias, as soluções tamponantes foram previamente filtradas em filtro de 0,22 µm (Millipore, EUA) e desgaseificadas a vácuo por 60 min.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Obtenção do lisado celular neutralizado**

A produção de lisado celular contendo pDNA para os estudos de adsorção foi feita com o crescimento de bactérias do tipo *E. coli* DH5α competente transformadas com os plasmídeos pVAX1GFP, estes gentilmente doados pelo Prof. Dr. Miguel Prazeres do Instituto Superior Técnico (Lisboa, Portugal).

O crescimento celular foi realizado em frasco Erlenmeyer agitado a 250 rpm contendo meio Luria Bertani (LB) 250 mL, composto por: 10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl e kanamicina 30 µg/mL, a temperatura fixada em 37°C.

As células obtidas por centrifugação sofreram lise celular de acordo com método descrito por BIRNBOIM e DOLY (1979). O pellet resultante foi ressuspensionado em 8 mL de tampão P1, constituído de 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mM glicose, e 10 mmol/L EDTA, seguido da adição de 8 mL de tampão P2 (200 mmol/L de NaOH e SDS 1% (m/v)). Após a etapa de ressuspensão, manteve-se o lisado por 10 min a temperatura ambiente.

A neutralização do lisado foi feita com a adição de 8 mL de solução P3 (acetato de potássio 3 mol/L pH 5,5) a 0°C, por 10 min. Os *debris* celulares resultantes da neutralização foram removidos por centrifugação (12000 *g* por 30 min a 4°C). O lisado neutralizado foi separado em alíquotas e mantido sob refrigeração, por 3 meses.

### **3.2.2 Obtenção do DNA padrão**

O pDNA padrão, utilizado como referência neste trabalho, foi obtido a partir do lisado neutralizado, segundo protocolo descrito por Moreira et al. (2005). Ao lisado neutralizado, adicionou-se 0,7 volumes de isopropanol para induzir a precipitação do plasmídeo presente. Seguida à esta etapa, efetuou-se uma centrifugação (15.000 *g*) por 30 min a 4°C e uma lavagem com etanol a 70%.

O precipitado obtido foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em tampão Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0. Adicionou-se então, sulfato de amônio até uma concentração de 2,5 mol/L; as impurezas nesta etapa foram retiradas através de uma nova centrifugação (10.000 *g*) por 15 min à 4°C.

Posteriormente, uma coluna Econo-Pac (empacotada com 10 mL de resina Phenyl Sepharose 6 Fast Flow), previamente equilibrada com 20 mL de solução de sulfato de amônio 1,5 mol/L em Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 (tampão de adsorção), foi alimentada com o sobrenadante. Efetuou-se, então, a lavagem da coluna com 5,0 mL de tampão de adsorção e o pDNA padrão foi coletado nos 2,0 mL finais desta lavagem.

## **3.3 PREPARO DOS ADSORVENTES**

### **3.3.1.1 Ativação da Matriz de Agarose com Epicloridrina**

A ativação do gel de agarose (40 g de gel filtrado a vácuo por 5 min) foi realizada com epicloridrina, de acordo com o protocolo descrito por PORATH e OLIN (1983). A matriz (gel de agarose) foi colocada em um frasco Erlenmeyer de

250 mL e, em capela, foram adicionados à matriz 100 mL de solução de NaOH 2 mol/L contendo 10 mL de epícloridrina e 0,532 g de boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). A suspensão (gel e solução) foi deixada sob agitação por 15 min a temperatura ambiente.

Em seguida, foram gotejados, simultaneamente, uma solução de 100 mL de NaOH 2 mol/L e 46,6 mL de epícloridrina durante um período de 2 h. A mistura foi deixada sob agitação por mais 16 h à temperatura ambiente. Após o término da reação, a matriz foi lavada com água ultrapura para a remoção de excesso de epícloridrina até a verificação de mesmo valor de pH da água ultrapura adicionada e da água de descarte, indicando que todo excesso de solução (solução com epícloridrina, NaOH e  $\text{NaBH}_4$  com pH em torno de 10,0) fora removido.

### **3.3.1.2 Imobilização dos ligantes fenilalanina (Phe) e mercaptopiridina (MPR)**

O gel ativado com epícloridrina foi inicialmente lavado com solução de carbonato de sódio 1,5 mol/L. Em seguida, o gel de agarose ativado foi colocado em um frasco *Erlenmeyer* e então adicionou-se uma solução de fenilalanina a 5%, deixando sob agitação em um agitador orbital a 60°C durante 24 horas.

Após a reação, o suporte foi lavado com água ultrapura até verificar a igualdade de pH da solução e da água, indicando que foi retirada toda a fenilalanina não imobilizada. O adsorvente obtido foi denominado Phe-S. A densidade de ligantes imobilizados no gel foi realizada por análise elementar de nitrogênio (CHN), equipamento (Perkin Elmer - Series II2400), análise executada por Central Analítica - IQ/UNICAMP, o adsorvente apresentou 16  $\mu\text{mol}$  de ligante por mL de gel.

O ligante tiofílico aromático mercaptopiridina (Sigma, EUA) foi imobilizado em Sepharose 6B (GE Healthcare, EUA) ativada com divinil sulfona (Sigma, EUA) de acordo com o protocolo descrito por HERMANSON e colaboradores (1992).

Para tanto, a Sepharose foi previamente lavada com 1 L de água em funil de vidro sinterizado à vácuo. Seguido à lavagem, o gel ficou sob agitação orbital em um béquer contendo 20 mL de carbonato de sódio 0,5 mol/L. Adicionou-se

vagarosamente à esta solução 2 mL de divinil sulfona durante 15 min em agitação constante. Após a adição dos 2 mL de divinil sulfona a agitação foi mantida por mais 60 min em temperatura ambiente.

Posteriormente, lavou-se abundantemente a agarose ativada com água deionizada até a normalidade do pH, e, em seguida, o gel foi armazenado à 4°C em acetona.

A imobilização do ligante mercaptopiridina foi realizada com 5,0 mL de matriz ativada, previamente lavada com 100 mL de água para remoção da acetona, seguida de lavagem com 100 mL de carbonato de sódio 0,5 mol/L. O gel foi novamente ressuspendido em 10 mL de carbonato de sódio 0,5 mol/L contendo 7% (m/v) de mercaptopiridina a pH 11.

A suspensão foi deixada em agitação orbital por 24 h e, posteriormente, fez-se a lavagem do gel, primeiramente com 1L de carbonato de sódio 0,5 mol/L, seguido de mais uma lavagem com 750 mL de água.

Os grupos ativos da Sepharose, onde não ocorreram acoplamento da mercaptopiridina, foram bloqueados através da suspensão do gel em 10 mL de bicarbonato de sódio 0,5 mol/L contendo 500 µL de β-mercaptoetanol. Após esta etapa, o gel foi lavado com 1L de cloreto de sódio e 1L de água e armazenado em etanol 20% à 4°C. A matriz obtida foi nomeada MPR-S.

### **3.4 Experimentos cromatográficos**

Os experimentos de cromatografia foram realizados no sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare, EUA), a uma vazão volumétrica de 0,25 mL/min com um volume de adsorvente de 1,0 mL. Obteve-se frações de 0,5 mL, que foram armazenadas sob refrigeração para análise posterior.

O equilíbrio do adsorvente foi feito utilizando 5 VC (volumes de coluna) de tampão de adsorção, seguido de injeção de 1500 µL de lisado neutralizado condicionado com o sal do tampão de adsorção escolhido. Os sais experimentados nos tampões de adsorção foram: citrato de sódio 1,5 mol/L, fosfato de potássio 2,0

mol/L e sulfato de amônio 1,5 mol/L. A concentração dos sais foram baseadas nos estudos de Freitas (2007). A etapa de lavagem foi realizada com 10 VC de tampão de adsorção. A etapa eluição foi feita com 10 VC de Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0, em gradiente linear.

As frações resultantes das cromatografias com picos a 260 nm nos cromatogramas foram eleitas para as análises quantitativas e qualitativas.

### **3.5 Métodos Analíticos**

#### **3.5.1 Dessalinização**

As frações obtidas das cromatografias foram dessalinizadas em dispositivos de ultrafiltração Amicon (EUA) de 0,5 mL, constituídos de membranas de celulose regeneradas com tamanho nominal de corte de 10 kDa. Adicionando-se aos dispositivos um volume de 300 µL de amostra e 200 µL de Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0, os mesmos foram centrifugados a 14.000 *g* até que o volume da solução atingisse o volume de 300 µL.

Houve a repetição deste passo por cinco vezes, para que ocorresse a troca do tampão inicial para Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

#### **3.5.2 Eletroforese em gel de agarose**

As frações resultantes das cromatografias cujos picos de absorção a 260 nm foram observados nos cromatogramas, foram eleitas para análise em eletroforese. As eletroforeses foram realizadas em géis de agarose a 0,8%, a 60 V, durante 4 h, com o tampão de corrida TAE (Tris básico 40 mmol/L, ácido acético 20 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,0) e coradas com brometo de etídio a 0,5 µg/mL e visualizadas sob luz UV.

O marcador molecular (MM) utilizado nas eletroforeses foi o Lambda Hind III / phiX Hae III (Biolabs, EUA).

### 3.5.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de ácido bicinconínico com o kit BCA, de acordo com instruções do fabricante (Pierce, EUA). Adotou-se a albumina de soro bovino como padrão protéico. Construiu-se uma curva padrão (concentrações de 0,5 µg/mL até 40 µg/mL) utilizando Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 como tampão de diluição.

### 3.5.4 Quantificação de pDNA

Seguindo o método descrito por GOMES et al. (2009), o pDNA foi quantificado utilizando-se a coluna de interação hidrofóbica 15 Source PHE conectado a um sistema ÄKTA Purifier. Posteriormente à etapa de equilíbrio da coluna com 5 VC de sulfato de amônio 1,5 mol/L em Tris HCl 10 mmol/L pH 8,0, 30 µL de amostra foram nela injetados. Durante 1,4 min fez-se eluição isocrática, seguido de mudança instantânea para o tampão Tris HCl 10 mmol/L pH 8,0. Após 2,3 min da injeção, fez-se mudança instantânea novamente para o tampão inicial, o qual foi mantido durante 5,5 min. As isoformas do pDNA não interagem com a coluna, sendo eluídas no *flowthrough*, enquanto que as impurezas retidas são eluídas com Tris HCl 10 mmol/L pH 8,0 com tempos de retenção entre 1,0 e 4,5 min. A vazão utilizada foi de 1,0 mL/min e a absorbância de 260 nm. A concentração de plasmídeos foi determinada a partir de uma curva analítica preparada com pDNA padrão nas concentrações de 2,5 a 50 µg/mL.

O conceito de pureza relativa (PR) (FREITAS et al., 2008) foi usado para descrever o grau de pureza da amostra, calculado pela Equação 3-1. Nesta equação, *A pico pDNA* corresponde a área referente ao pico de pDNA no cromatograma, e  $\sum A_{picos\ impurezas}$  é a somatória das áreas dos picos de impurezas. Para a área dos picos de impurezas, considera-se a subtração do pico referente a cromatografia realizada com o respectivo tampão ao qual a amostra estava acondicionada.

$$PR = \left( \frac{A_{pico\ pDNA}}{A_{pico\ pDNA} + \sum A_{picos\ impurezas}} \right) \times 100$$

Eq. 3-1

### 3.5.5 Quantificação de Gdna

Fez-se uma adaptação no protocolo descrito por MARTINS et al. (2003) para quantificação de gDNA utilizando equipamento de PCR em tempo real. Sequências iniciadoras (“primers”) senso (5’ ACACGGTCCAGAACTCCTACG 3’) e anti-senso (5’ GCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCA 3’) foram usados para amplificar o fragmento de 181 pb do gene de rRNA 16S (Acesso no GenBank nº J01859).

O meio reacional foi composto de 10 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 0,75 µmol/L de cada “primer”, 2 µL de amostra diluída em água (2000 vezes para lisado neutralizado e 10 vezes para frações provenientes da CIH) e água para se atingir um volume final de 20 µL. A amplificação gênica foi quantificada pela diferença de fluorescência apresentada a cada ciclo pelo fluorocromo “Syber Green” contido no “Master mix”. As curvas de calibração foram construídas a partir de diluições seriadas de padrões contendo concentrações conhecidas de gDNA variando de 1,7 a 140.000 pg/µL. O gDNA de *E. coli* utilizado nestes padrões foi obtido através do protocolo de extração de DNA genômico de bactérias descrito por Ausubel et al. (1996), que consistiu no rompimento enzimático membrana da parede celular utilizando proteinase K, precipitação com NaCl 5 mol/L, extrações sequenciais utilizando soluções de clorofórmio/álcool isoamílico e fenol/clorofórmio/álcool isoamílico seguida de precipitação com 2-propanol.

### 3.5.6 Quantificação de endotoxinas

A determinação de endotoxinas (ET) presentes nas frações de interesse foi realizada pelo método cromogênico LAL (*Limulus Amebocyte Lisate*). Este método

quantitativo faz a detecção de endotoxinas presentes em bactérias Gram negativas. A quantificação foi realizada seguindo protocolo presente no kit de acordo com o fabricante (Lonza, EUA).

As amostras eleitas para quantificação foram agitadas durante 45 min, após esta etapa iniciou-se a diluição seriada até 1000 vezes com volume final de 100  $\mu$ L. As diluições foram realizadas com água apirogênica proveniente do kit.

Após a etapa de diluição, as amostras vedadas com papel alumínio foram levadas ao banho à 37° C. Sob constante agitação, acresceu-se em cada tubo 50  $\mu$ L de LAL.

Após 10 min, adicionou-se 100  $\mu$ L de substrato previamente aquecido à 37° C e, 6 min depois, o reagente de parada, constituído de ácido acético. Ao final da reação as amostras foram pipetadas nas placas com fundo chato e levadas para determinação de absorbância.

A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm, sendo diretamente proporcional a quantidade de ET presente.

A quantificação foi feita com base em uma curva analítica, construída conforme as instruções do fabricante, nas concentrações de 0,1 a 1,0 Unidades de Endotoxinas (EU)/mL de solução padrão de endotoxina proveniente do kit.

Toda vidraria utilizada foi despirogenizada através de tratamento com solução de NaOH 1,5 mol/L, posteriormente lavadas com água e em seguida, submetidas à temperatura de 200° C, por 24h envoltas em papel alumínio.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados alcançados com os ligantes aminoácidos de natureza hidrofóbica, fenilalanina e D-triptofano, ambos imobilizados em agarose e experimentados com três sistemas tamponantes, sendo eles; citrato de sódio 1,5 mol/L, fosfato de potássio 2,0 mol/L e sulfato de amônio 1,5 mol/L. Também são apresentados os resultados obtidos com o ligante de natureza tiofílica aromática mercaptopiridina, imobilizada em matriz de agarose.

O trabalho desenvolvido buscou identificar o sistema tamponante mais adequado para a pré-purificação do DNA plasmidial diretamente do lisado neutralizado.

### 4.1 PURIFICAÇÃO DE pDNA POR CPA EM GEL FENILALANINA-SEPHAROSE (PHE-S)

Em testes realizados com o ligante fenilalanina, explorou-se as interações hidrofóbicas entre o ligante e as biomoléculas presentes no lisado celular (SCHLUEP et al.,1998). As soluções tamponantes foram preparadas com altas concentrações salinas, uma vez que a força iônica influi diretamente de forma a aumentar a hidrofobicidade das biomoléculas presentes no lisado celular utilizado.

#### 4.1.1 *CPA utilizando sistema adsortivo Phe-S e tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L (FP)*

A cromatografia de pseudo-afinidade em fenilalanina-Sepharose foi realizada com alimentação de 250 uL de amostra de lisado neutralizado (LN), acondicionado previamente no mesmo sal do tampão de adsorção experimentado.

Após o acondicionamento houve formação de precipitado, o mesmo foi descartado por se tratar de impurezas do lisado. Neste sistema adsortivo obteve-se

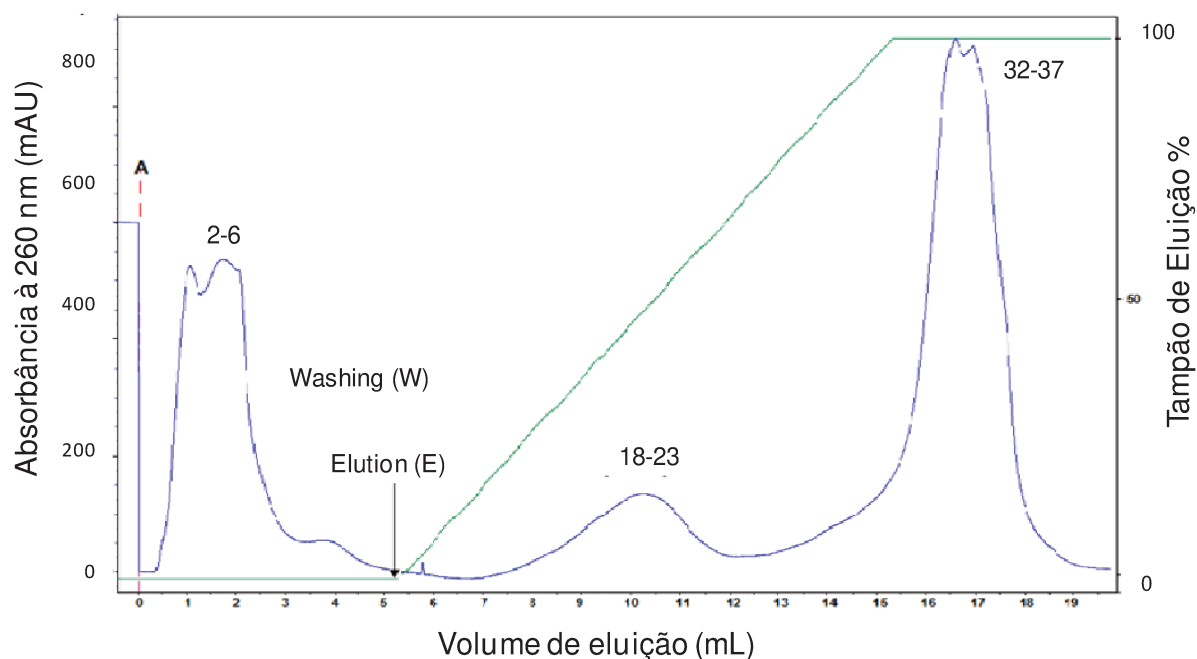
seis frações de interesse. O perfil cromatográfico e eletroforético resultantes estão apresentados nas Figuras 4-1 e 4-2.

Pode-se dizer que o tampão de adsorção fosfato de potássio 2,0 mol/L não promoveu interação do pDNA na fase estacionária, uma vez que observou-se a saída do DNA plasmidial superenovelado e isoformas nas frações lavagem. A co-eluição destas isoformas foram observadas nas frações de lavagem W2, W3 e W4, respectivamente, com bandas características presentes no gel de eletroforese.

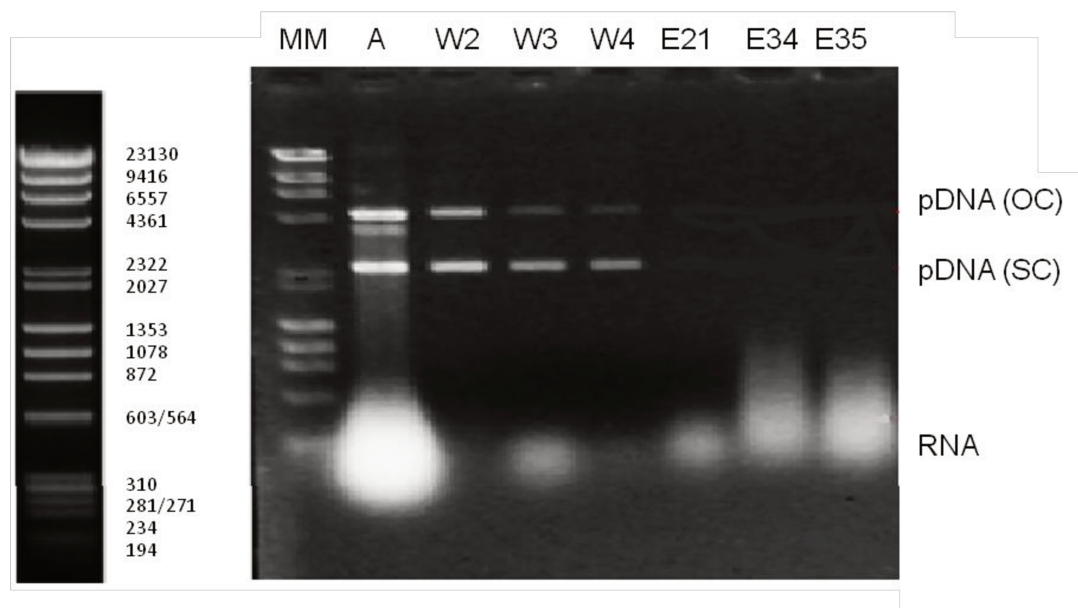
As referidas frações da lavagem (W) demonstraram aparente enriquecimento da isoforma superenovelada, mas, em contrapartida, apresentam contaminação por RNA, conforme apresentado nas pistas denominadas W2, W3 e W4 (Figura 4-2).

O RNA foi a biomolécula com maior afinidade pelo adsorvente, sendo recuperado, em sua maioria, nas frações de eluição. Isso pode ser explicado pelo fato das bases hidrofóbicas do RNA estarem mais expostas que as pDNA, ocorrendo, assim, mais facilmente a interação hidrofóbica com o ligante fenilalanina.

Apesar disto, este sistema se mostrou ineficiente na promoção da purificação do DNA plasmidial e em sua recuperação.



**Figura 4-1 CPA em Phe-S.** Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250  $\mu$ L de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem (W): fosfato de potássio 2,0 mol/L, pH 8,0. Tampão de eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear.



**Figura 4-2 - Perfil Eletroforético-Phe-S.** Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular  $\lambda$ phiX (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações da etapa de lavagem (W): W2, W3, W4; frações etapa de eluição (E): E21, E34, E35. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado.

#### **4.1.2 CPA utilizando sistema adsorativo Phe-S e tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L (SA)**

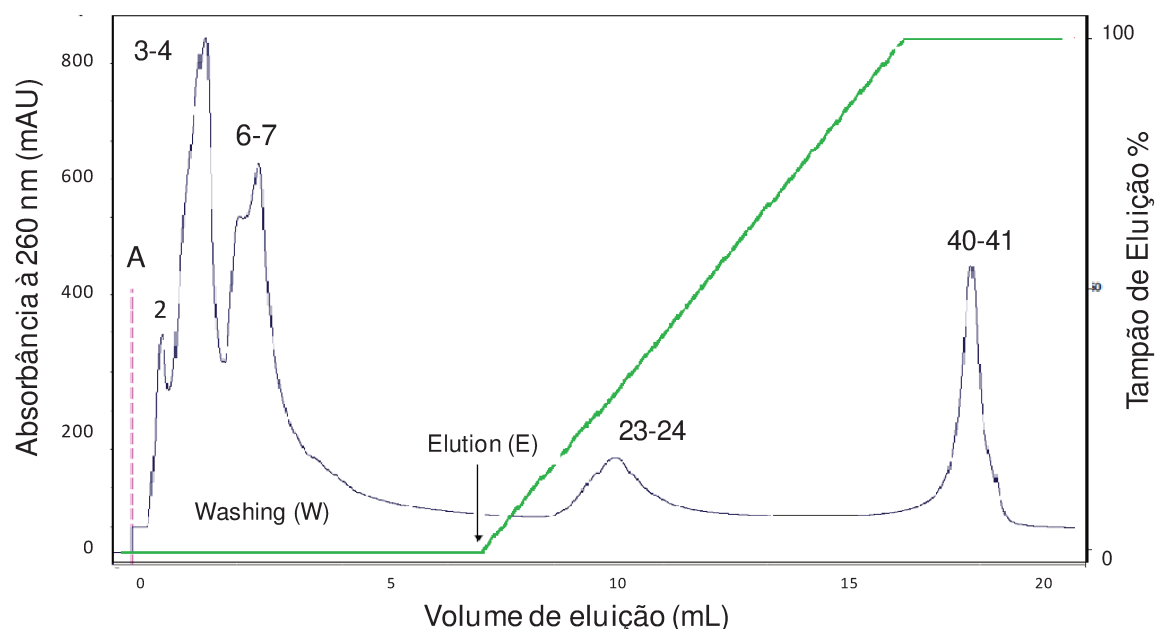
As cromatografias de interação hidrofóbica em Phe-S foram realizadas com tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L à uma alimentação de 250 µL de amostra de lisado neutralizado (LN), previamente acondicionadas no mesmo sal constituinte do tampão. Foram obtidas 7 frações de interesse para análises quantitativas e qualitativas; o perfil cromatográfico e eletroforético resultantes estão apresentados nas Figuras 4-3 e 4-4.

Verificou-se que o tampão de adsorção sulfato de amônio 1,5 mol/L não promoveu a interação do pDNA com o adsorvente, resultados estes observados através de eletroforese (Figura 4-4) e posteriormente confirmados pela quantificação de pDNA.

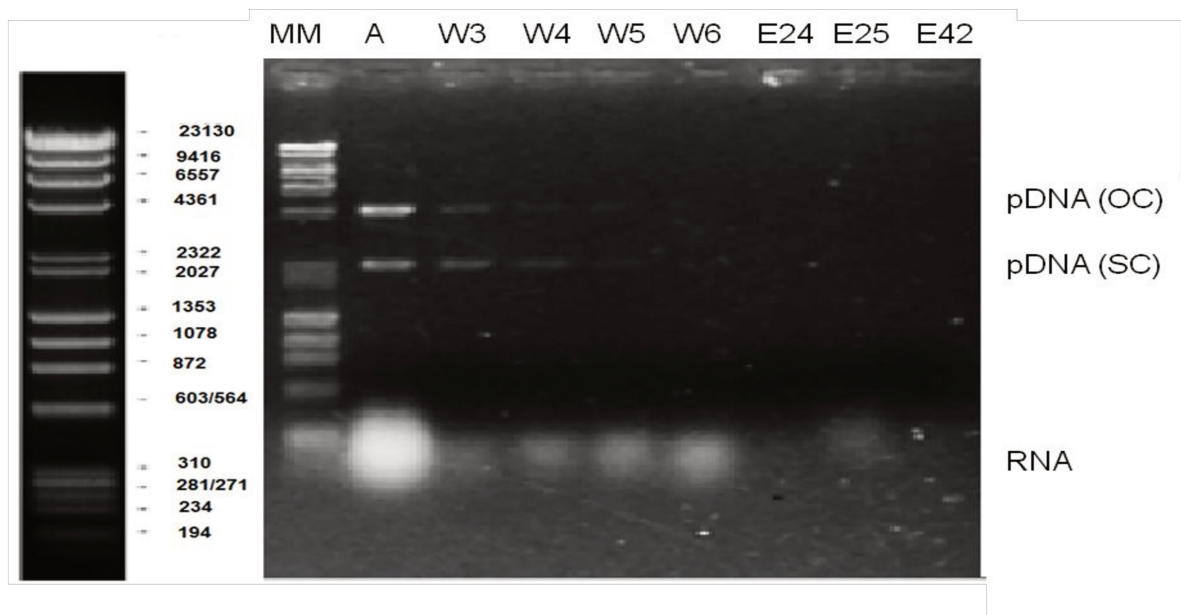
A recuperação do DNA plasmidial neste sistema se deu nas frações de lavagem W3, W4 e W5, respectivamente, nas isoformas SE e CA, com a presença de RNA e proteínas.

No tocante às moléculas de RNA, houve interação das mesmas com o adsorvente, uma vez que parte deixou a coluna na etapa de lavagem, mas sua maioria foi recuperada na etapa de eluição. Este resultado foi semelhante ao observado no sistema anterior experimentado com tampão fosfato de potássio.

Uma alternativa, para um possível melhor resultado, seria o aumento da concentração salina de sulfato de amônio para valores maiores de 1,5 mol/L, como já descrito na literatura (SOUZA e colaboradores, 2006). O aumento da concentração salina poderia melhorar a interação hidrofóbica e ser usada como alternativa para remoção de RNA, uma vez que aumenta a capacidade de adsorção da resina. No entanto, não seria interessante do ponto de vista ambiental.



**Figura 4-3 - CPA em Phe-S.** Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem (W): Sulfato de amônio 1,5 mol/L pH 8,0; Tampão de Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear.



**Figura 4-4 - Perfil eletroforético- CPA em Phe-S.** Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi$ X (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem (W): W3, W4, W5, W6; frações etapa de eluição (E): E24, E25, E42. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado.

#### **4.1.3 CPA utilizando sistema adsortivo Phe-S e tampão citrato de sódio 1,5 mol/L (CS)**

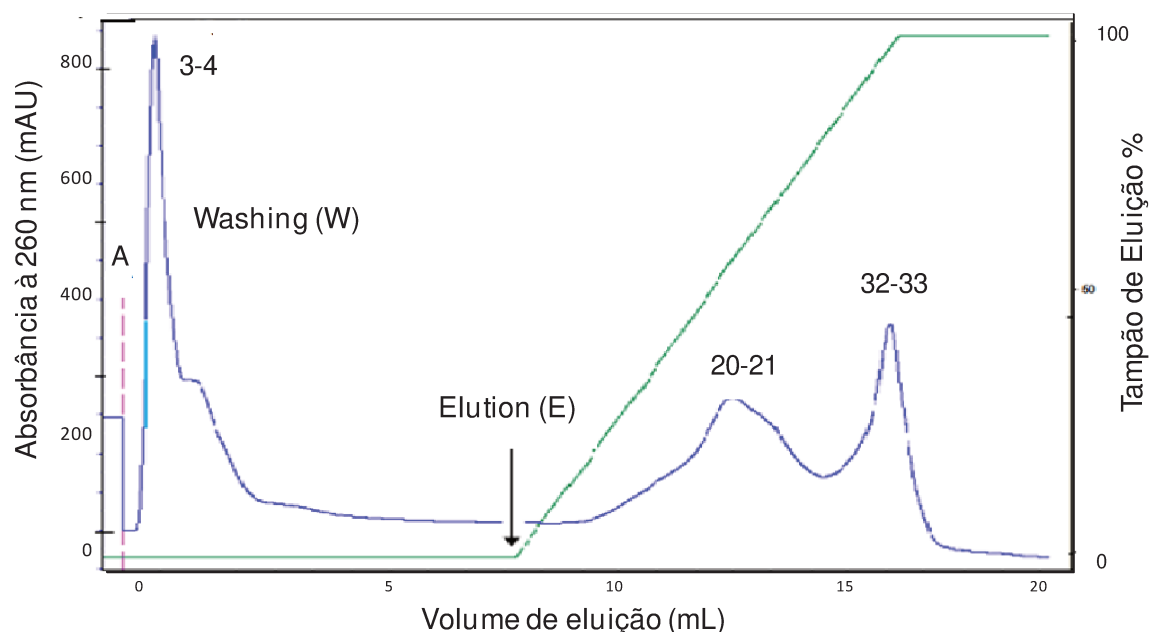
Os testes realizados com o tampão citrato de sódio 1,5 mol/L foram executados de maneira semelhante aos feitos com os tampões fosfato de potássio e sulfato de amônio. No entanto, apresentaram os melhores resultados frente aos outros tampões, se mostrando promissor em cromatografia negativa.

Este sistema adsortivo propiciou a não-retenção de pDNA no adsorvente Phe-S, tanto da isoforma CA quanto da SE, sendo ambas removidas na etapa de lavagem da coluna, com aparente pouca contaminação por RNA, frações W2 e W3 na eletroforese (Figuras 4-5 e 4-6).

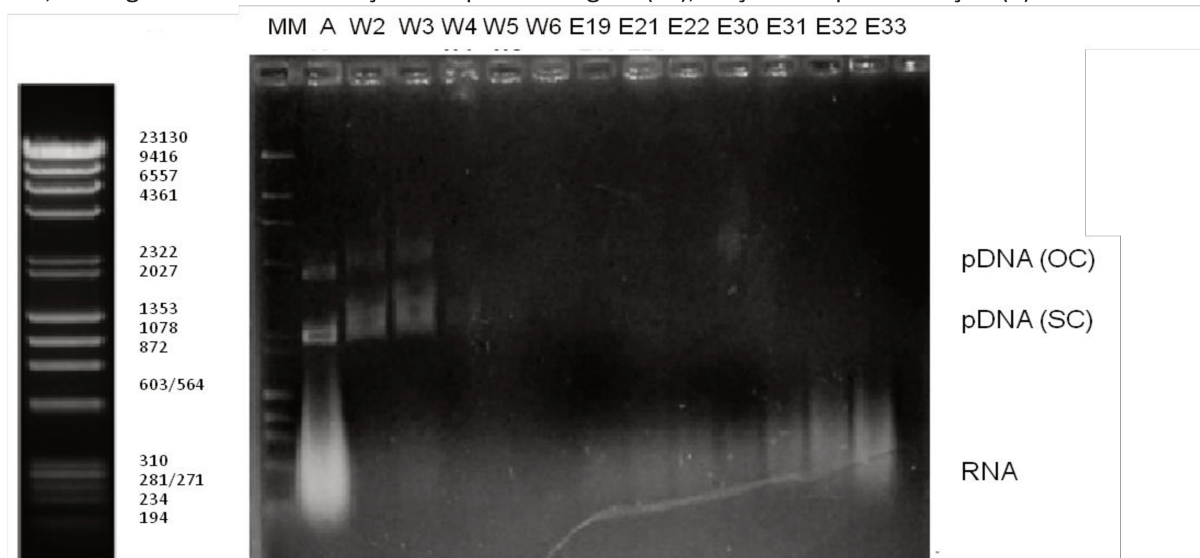
A presença das isoformas circular aberta e linear ocorre devido a “cortes” na estrutura da isoforma SE, levando às outras formas circular aberta e linear. Estes cortes na estrutura podem ser causados por produtos químicos (oxidação do radical livre) ou (enzimática de endo-nucleases), e também por forças de cisalhamento durante o processo de purificação (LENGSFELD E ANCHORDOQU, 2002).

No entanto, uma parte das moléculas de RNA foi recuperada juntamente com as isoformas de pDNA nas frações W2, W3 e W4 da etapa de lavagem, o que provavelmente explica a baixa pureza relativa encontrada.

Os resultados promissores apontaram para a relevante remoção de impurezas como gDNA, proteínas e endotoxinas (Tabela 4-1), o que indica que este sistema adsortivo baseado em cromatografia negativa é promissor para uso em uma etapa de pré-purificação. A remoção de gDNA é de grande interesse, pois a similaridade desta com o pDNA é um desafio para os métodos de purificação (LI et al., 2007). Quanto à endotoxina, foi alcançado 100% de remoção na fração de lavagem W4 e acima de 99% nas frações W2 e W3.



**Figura 4-5 - CPA em Phe-S.** Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: citrato de sódio 1,5 mol/L, pH 8,0; Tampão de eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).



**Figura 4-6- Perfil eletroforético- CPA em Phe-S.** Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2, W3, W4, W5 e W6. Frações da etapa de eluição E19, E20, E21, E22, E30, E31, 32 e E33. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC)pDNA: pDNAsuperenovelado.

**Tabela 4-1.** Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz Phe-S e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

| <b>Amostra</b> | <b>pDNA</b>   |              |                    | <b>Proteínas</b> |                | <b>gDNA</b>          |                  | <b>Endotoxina</b> |                 |
|----------------|---------------|--------------|--------------------|------------------|----------------|----------------------|------------------|-------------------|-----------------|
|                | <b>M (µg)</b> | <b>Y (%)</b> | <b>* P. R. (%)</b> | <b>C (µg/mL)</b> | <b>**R (%)</b> | <b>C (pg/µL)</b>     | <b>*** R (%)</b> | <b>C (EU/mL)</b>  | <b>***R (%)</b> |
| <b>Lisado</b>  | 12,89         | 100          | 2,27               | 408,09           | ----           | 1,77x10 <sup>5</sup> | ----             | 164,16            | ----            |
| <b>W2</b>      | 2,63          | 20,4         | 5,52               | 31,931           | 84,35          | 7,86x10 <sup>2</sup> | 99,1             | 1,38              | 99,1            |
| <b>W3</b>      | 1,34          | 10,43        | 1,37               | 16,5             | 91,93          | 4,30x10 <sup>2</sup> | 99,51            | 0,7               | 99,5            |
| <b>W4</b>      | 1,87          | 14,52        | 1,14               | 21,2             | 89,61          | 1,40x10 <sup>2</sup> | 99,84            | N.D.              | 100             |

Y: Recuperação. \*P.R.:Pureza Relativa (Equação 3.1). R:Remoção. N.D.:Não detectado. C:Concentração. \*\*Referente ao teor de proteína no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.\*\*\* Referente ao teor de gDNA e ET no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.



## **4.2. PURIFICAÇÃO DE pDNA EM TRIPTOFANO-SEPHAROSE (TS)**

Em testes realizados com o ligante triptofano (T), explorou-se as interações hidrofóbicas entre o ligante e as biomoléculas presentes no lisado celular (SCHLUEP et al.,1998). Para tanto, foram estudados três sistemas adsortivos: citrato de sódio 1,5 mol/L (CS), sulfato de amônio 1,5 mol/L (SA) e fosfato de potássio 2,0 mol/L (FP).

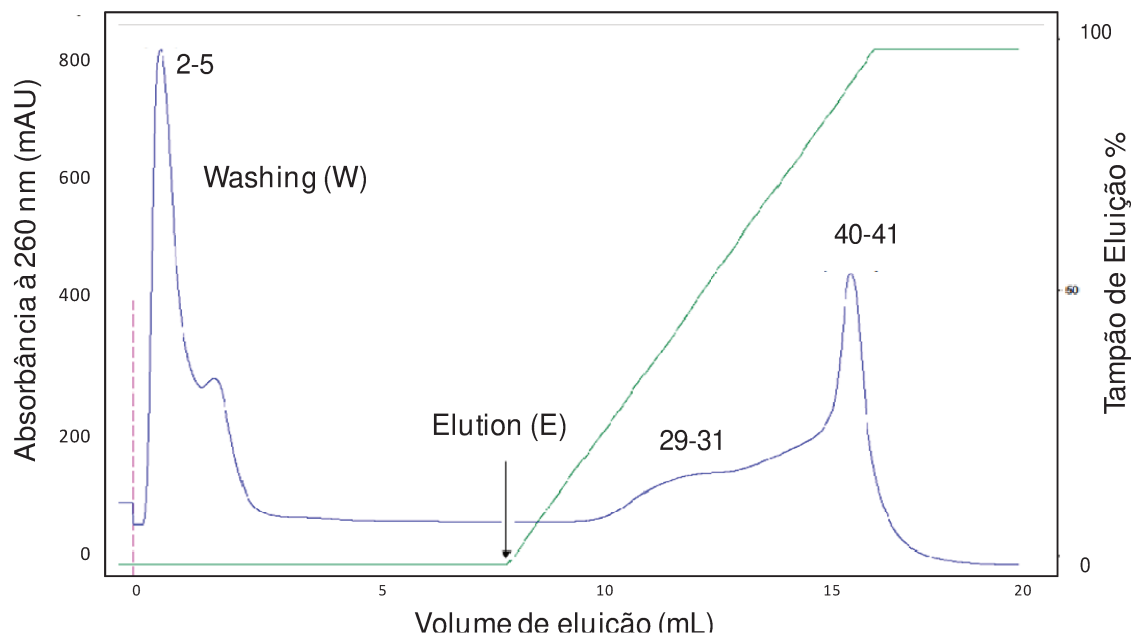
### ***4.2.1 CPA utilizando sistema adsortivo TS e tampão citrato de sódio 1,5 mol/L (CS)***

Nos experimentos realizados com o adsorvente triptofano-sepharose (TS) e tampão citrato de sódio, observou-se uma interação das isoformas SE e CA com TS um pouco maior em comparação com os resultados encontrados com ligante fenilalanina (Figura 4-7 e 4-8).

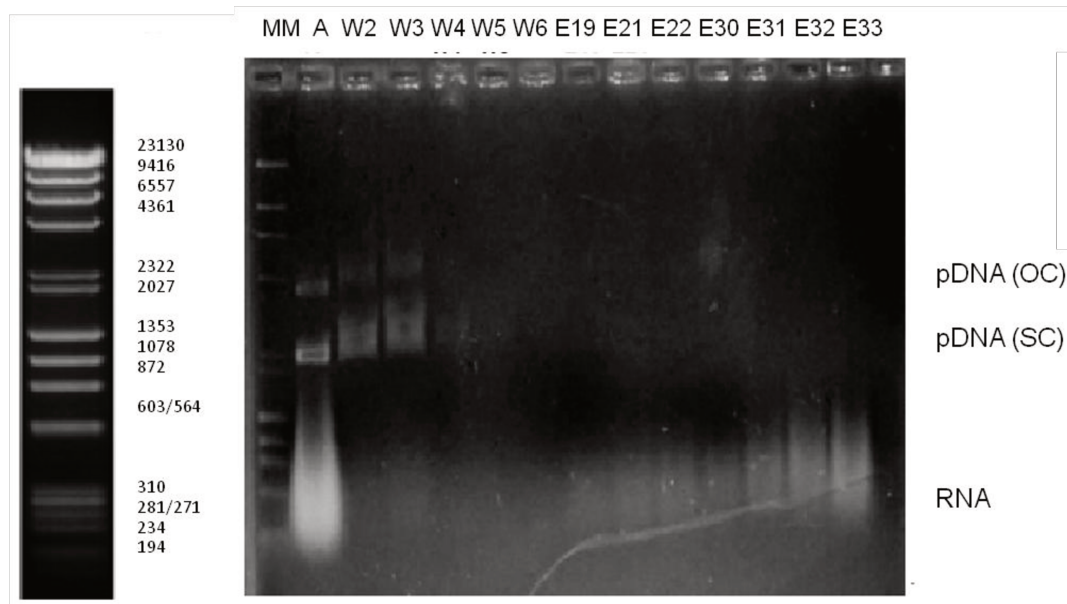
Observa-se pela eletroforese (Figura 4-8), que a maior parte das isoformas de pDNA foram recuperadas na etapa de lavagem e outra parte recuperada na etapa de eluição.

As frações E30 e E31 demonstraram aparentemente baixa ou nenhuma quantidade de pDNA CA, sendo as bandas de pDNA superenovelado evidenciadas no gel, indicando que este tampão propiciou uma resolução entre as isoformas.

Apesar destes dados, a quantidade de pDNA recuperada foi extremamente baixa, dados verificados através de quantificação de pDNA e com grande presença de RNA. A remoção de proteínas alcançou uma média de 91%, com relação, a quantidade de proteínas presentes no lisado neutralizado alimentado. Diante disto, pode-se concluir que este sistema adsortivo alcançou resultados promissores com relação à uma etapa de pré-purificação, pois apresentou uma resolução entre as isoformas de pDNA e satisfatória remoção de proteínas à partir do lisado neutralizado.



**Figura 4-7 - CPA em TS.** Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: citrato de sódio 1,5 mol/L pH 8,0; Tampão e Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).

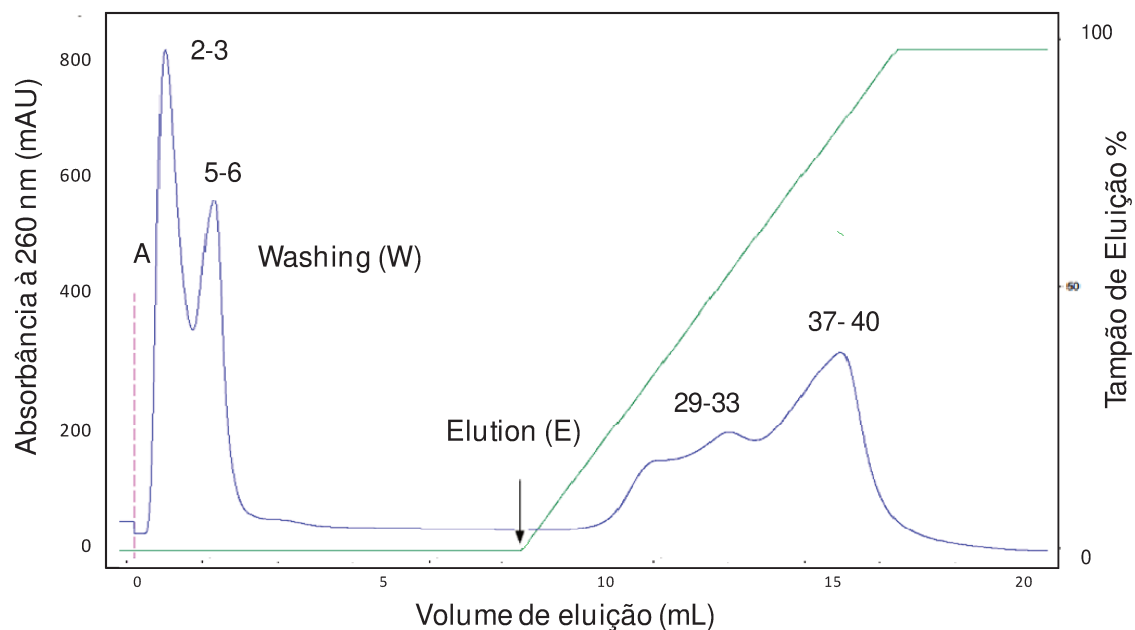


**Figura 4-8 - Perfil eletroforético- CPA em TS.** Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L.. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2, W3, W4, W5 e W6. Frações da etapa de eluição: E29-E41. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado.

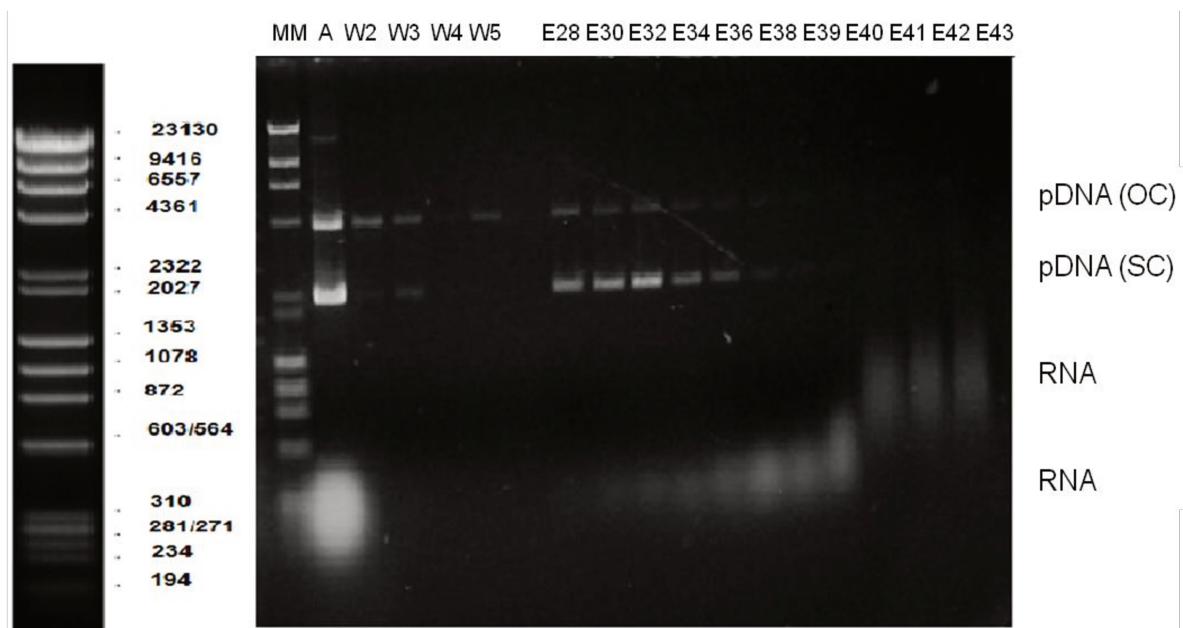
#### **4.2.2 CPA utilizando sistema adsorativo TS e tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L (FP)**

Ao se utilizar o tampão de adsorção fosfato de potássio 2,0 mol/L na CPA com adsorvente TS, observa-se a interação parcial das isoformas linear, circular aberta e superenovelada com o adsorvente, fato este que pode ser verificado pelas bandas referentes à estas isoformas no gel de eletroforese (Figura 4-10), na etapa de lavagem.

Uma banda de pDNA superenovelado pode ser observado na pista referente a fração E32, no entanto com co-eluição da isoforma (OC), de acordo com esta fração observou-se a não recuperação significativa de pDNA e com alta presença RNA. Este, por sua vez, demonstrou afinidade pelo adsorvente, sendo recuperado em sua maioria nas frações referentes à etapa de eluição, como se indica as bandas da eletroforese (Figura 4-10) e picos do cromatograma (Figura 4-9).



**Figura 4-9 - CPA em TS.** Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Volume da coluna 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: fosfato de potássio 2,0 mol/L, pH 8,0; Tampão de Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).



**Figura 4-10 - Perfil eletroforético - CPA em TS.** Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi$ X (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2, W3, W4, W5. Frações da etapa de eluição: E28-E43. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado.

#### **4.2.3 CPA utilizando sistema adsorativo TS e tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L (SA)**

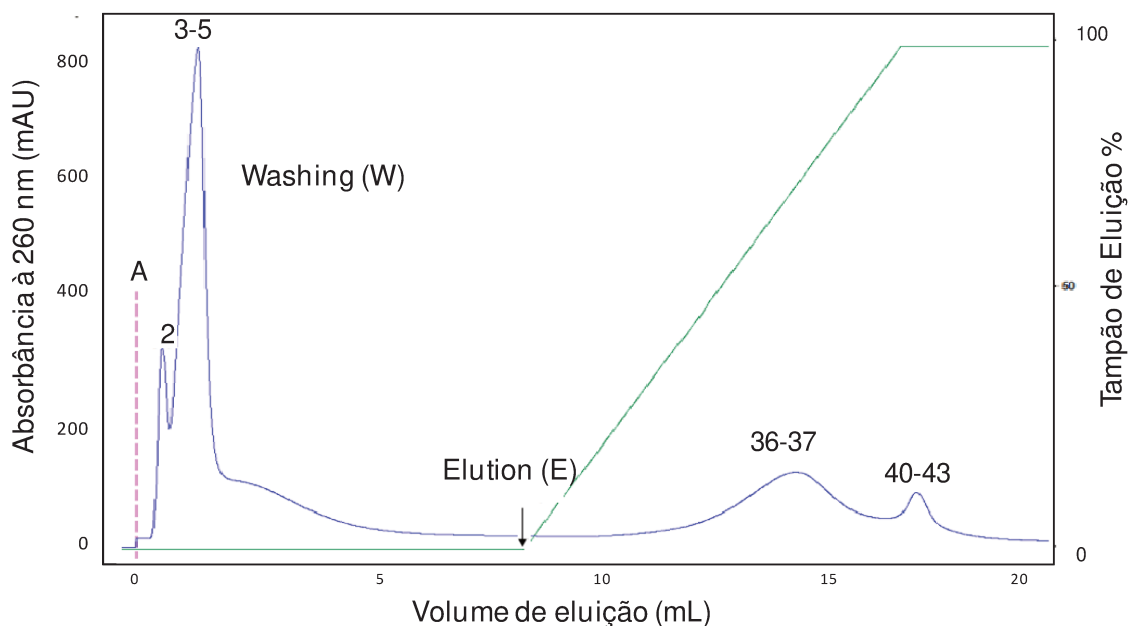
O sistema tamponante sulfato de amônio 1,5 mol/L apresentou o melhor desempenho (Figuras 4-11 e 4-12) frente aos demais tampões testados, com 47% de recuperação das isoformas de pDNA (OC) e (SC), além de relevante remoção de impurezas como proteínas, RNA e gDNA (Tabela 4-2).

Em trabalho realizado com aminoácido histidina imobilizado em gel de agarose, SOUSA e colaboradores observaram a necessidade de altas concentrações salinas, na faixa de 2,3 mol/L e 2,0 mol/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , para a eluição do pDNA superenovelado e circular aberto (SOUSA et al., 2006). No entanto, no sistema adsorativo TS estudado neste trabalho, as isoformas de pDNA foram recuperadas na etapa de lavagem, com uma concentração salina menor que 1,5 mol/L o que evidencia uma vantagem frente ao impacto ambiental e os custos de processo.

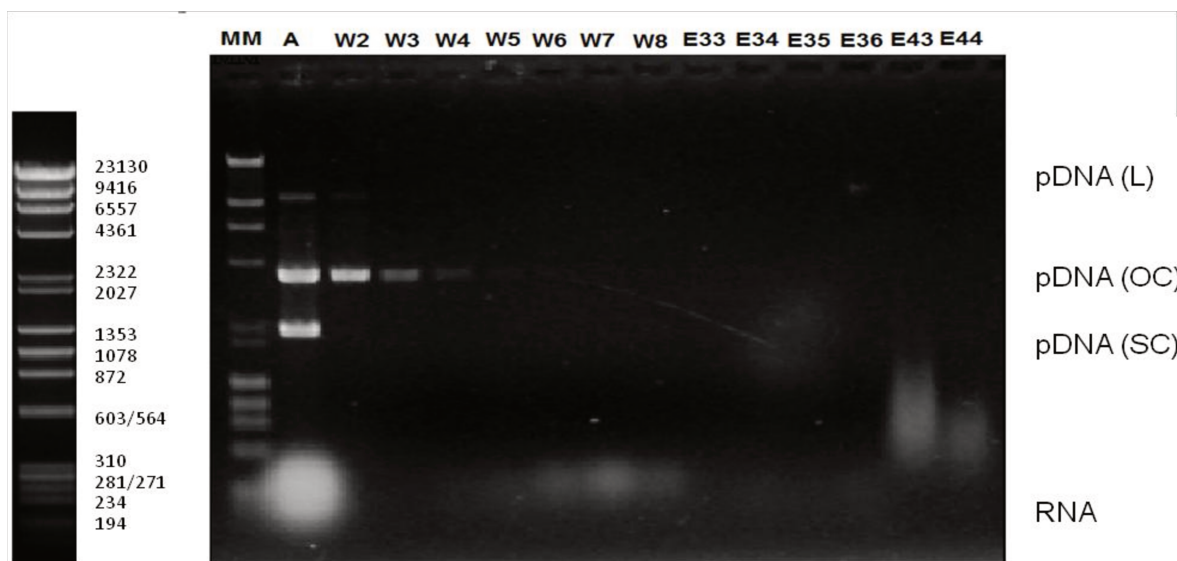
De acordo com os resultados observados, pode-se dizer que o uso deste sistema em cromatografia negativa se mostrou promissor. Pode-se propor sua utilização como etapa de pré-purificação, uma vez que a biomolécula alvo não interagiu com o adsorvente, sendo principalmente recuperada na fração W2 da etapa de lavagem (Figuras 4-11 e 4-12), com uma pureza relativa aproximadamente 12 vezes maior que a amostra de lisado neutralizado alimentada (Tabela 4-2).

Além disso, ambas as isoformas SE e CA saem nas mesmas frações de lavagem, como pode ser visto na eletroforese, reforçando o fato de que este sistema pode ser empregado como uma etapa de pré-purificação, seguido de outra para polimento final, e assim resolução entre as isoformas.

O comportamento das moléculas de RNA neste sistema experimentado foi de interação com o adsorvente, sendo coletadas, em sua maioria, na etapa de eluição. As outras impurezas, como proteínas e gDNA, foram removidas com êxito de aproximadamente 98% no que se refere a proteínas, e endotoxinas, com mais de 99% de remoção.



**Figura 4-11- CPA em TS.** Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Volume da coluna: 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: sulfato de amônio 1,5 mol/L, pH 8,0; Tampão de Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).



**Figura 4-12 - Perfil eletroforético - CPA em TS.** Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2-W6. Frações da etapa de eluição: E32-E42. (L): pDNA linear, (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado.

**Tabela 4-2.** Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz TS e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

| <b>Amostra</b> | <b>pDNA</b>   |              |                    | <b>Proteínas</b> |                | <b>gDNA</b>          |                  | <b>Endotoxina</b> |                 |
|----------------|---------------|--------------|--------------------|------------------|----------------|----------------------|------------------|-------------------|-----------------|
|                | <b>M (µg)</b> | <b>Y (%)</b> | <b>* P. R. (%)</b> | <b>C (µg/mL)</b> | <b>**R (%)</b> | <b>C (pg/µL)</b>     | <b>*** R (%)</b> | <b>C (EU/mL)</b>  | <b>***R (%)</b> |
| <b>Lisado</b>  | 11,36         | 100          | 4,12               | 402,8            | ----           | 1,36x10 <sup>5</sup> | ----             | 252,74            | ----            |
| <b>W2</b>      | 5,4           | 47,54        | 24,94              | 4,64             | 97,69          | 1,44x10 <sup>3</sup> | 97,87            | 0,86              | 99,15           |
| <b>W3</b>      | 1,65          | 14,52        | 2,1                | 18,7             | 90,7           | 3,32x10 <sup>2</sup> | 99,51            | 0,36              | 99,6            |
| <b>W4</b>      | 1,65          | 14,54        | 1,09               | 12,68            | 93,69          | 2,10x10 <sup>2</sup> | 99,69            | 0,35              | 99,7            |

Y: Recuperação. \*P.R.:Pureza Relativa = (Equação 3.1). R:Remoção. N.D.:Não detectado. C:Concentração.

**\*\*Referente ao teor de proteína no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.**

**\*\*\*Referente ao teor de gDNA e ET no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.**

### **4.3 PURIFICAÇÃO DE pDNA POR CTA COM MERCAPTOPIRIDINA-SEPHAROSE (MPR-S)**

Os experimentos nesta etapa tiveram como objetivo a utilização da cromatografia tiofílica aromática (CTA) para a recuperação e pré-purificação de pDNA SE para fins terapêuticos. Os tampões empregados foram os mesmos utilizados anteriormente com ligantes pseudoespecíficos em CPA, sendo eles: citrato de sódio 1,5 mol/L, sulfato de amônio 1,5 mol/L e fosfato de potássio 2,0 mol/L. O ligante de natureza tiofílica imobilizado em Sepharose foi a mercaptopiridina.

#### ***4.3.1 Cromatografia Tiofílica Aromática (CTA) utilizando sistema adsortivo MPR-S e tampão citrato de sódio 1,5 mol/L (CS)***

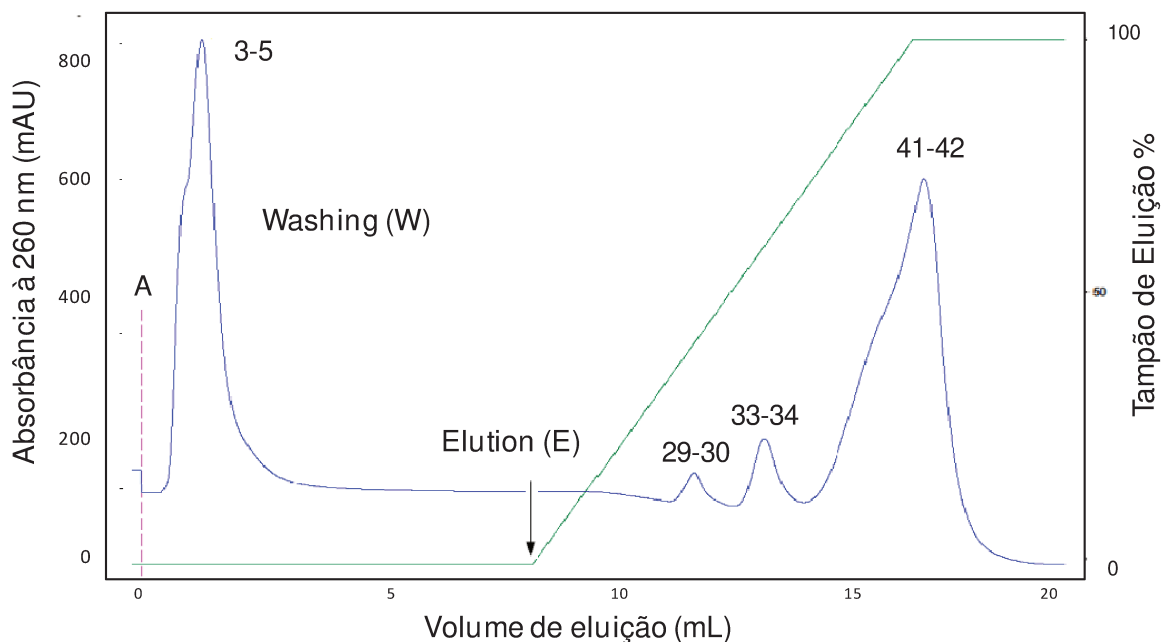
Os estudos realizados com a fase estacionária MPR-S e fase móvel CS mostraram a interação das isoformas de pDNA CA e SE com o adsorvente, conforme pode ser observado no gel de eletroforese nas pistas E30 e E32 (Figura 4-14), correspondentes às frações 30 e 32 do cromatograma (Figura 4-13).

A pureza relativa encontrada para a fração de eluição 32 foi de 80%, e a recuperação de 12% referente a massa de pDNA na fração de lisado alimentada na coluna (Tabela 4-3). O gel de eletroforese, no entanto, demonstrou que a fração E32 possui a isoforma circular aberta como impureza; vale enfatizar que a análise de quantificação de pDNA não distingue entre as isoformas.

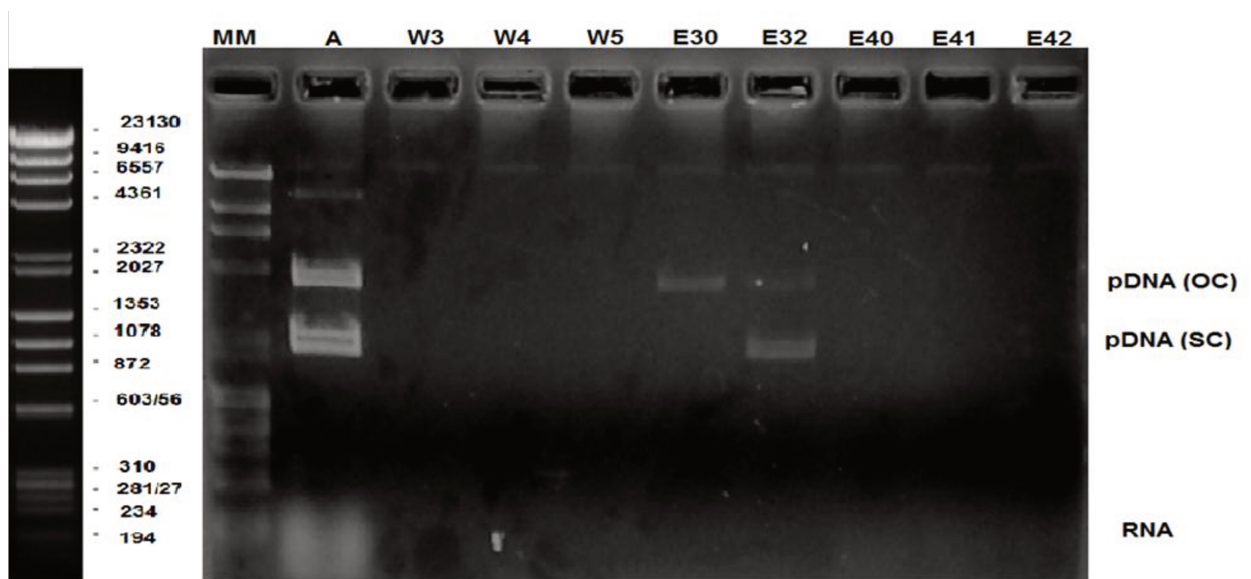
A recuperação de 12% pode ser explicada por uma possível diluição do pDNA ao longo da etapa de eluição da cromatografia, sendo recuperado em quantidades baixas para a detecção do método de quantificação, mesmo havendo uma concentração prévia da amostra.

Pode-se dizer que apesar da baixa recuperação, este tampão pode ser usado em uma etapa de pré purificação de DNA plasmidial SE, levando em consideração ainda a vantagem de ser menos danoso ao meio ambiente em comparação com os outros sais comumente utilizados em CTA, como, por exemplo, sulfato de amônio.





**Figura 4-13 - CTA em MPR-S.** Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Volume da coluna: 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: citrato de sódio 1,5 mol/L, pH 8,0; Tampão de Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).



**Figura 4-14 - Perfil eletroforético- CTA em MPR-S.** Sistema tamponante: citrato de sódio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2-W6. Frações da etapa de eluição: E32-E42. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado.

**Tabela 4-3.** Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz MPR e tampão citrato de sódio 1,5 mol/L (CS).

| <b>Amostra</b> | <b>pDNA</b>       |              |                        | <b>Proteínas</b>     |                    | <b>Endotoxina</b>    |                     |
|----------------|-------------------|--------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
|                | <b>M<br/>(µg)</b> | <b>Y (%)</b> | <b>* P. R.<br/>(%)</b> | <b>C<br/>(µg/mL)</b> | <b>**R<br/>(%)</b> | <b>C<br/>(EU/mL)</b> | <b>***R<br/>(%)</b> |
| <b>Lisado</b>  | 9,88              | 100          | 3,00                   | 269,05               | ----               | 326,74               | ----                |
| <b>E32</b>     | 1,16              | 12,00        | 80,00                  | 14,50                | 78,00              | 0,54                 | 99,80               |

Y:Recuperação. \*P.R.:Pureza Relativa = (Equação 3.1). R:Remoção. N.D.:Não detectado. C:Concentração.

\*\*Referente ao teor de proteína no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.

\*\*\* Referente ao teor de gDNA e ET no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.

#### **4.3.2 Cromatografia tiofílica aromática (CTA) utilizando sistema adsortivo MPR-S e tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L (SA)**

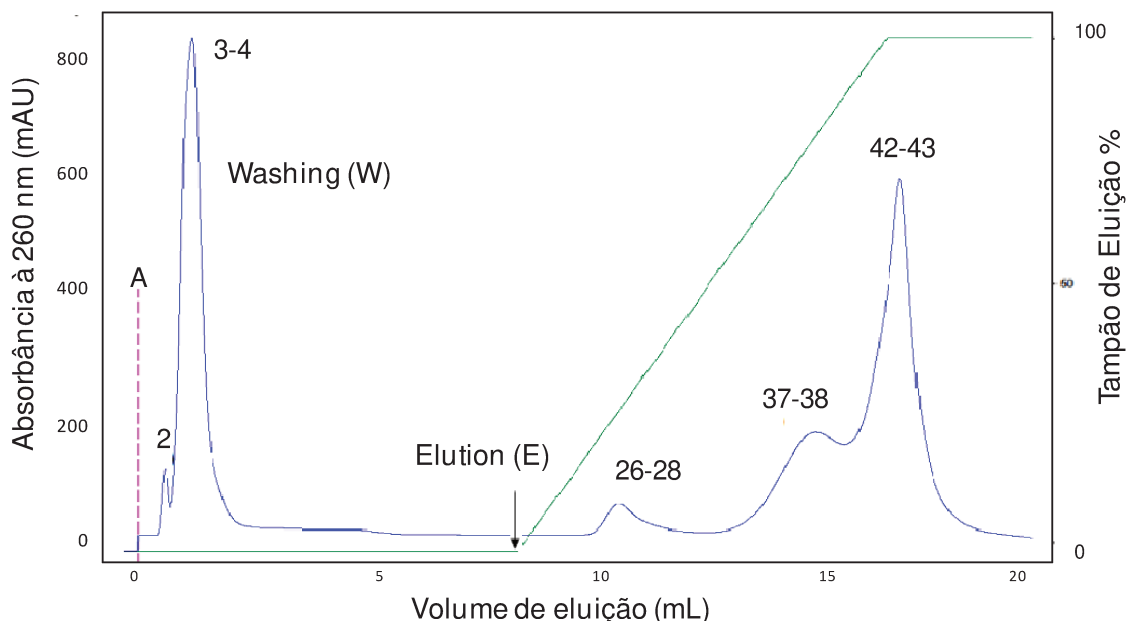
Os resultados das frações resultantes da cromatografia tiofílica com tampão SA (Figura 4-15) demonstraram uma relevante recuperação de isoformas pDNA (SC) e (OC) (na fração de eluição E27) (Figura 4-16), como observado anteriormente com o tampão citrato de sódio 1,5 mol/L.

No entanto, na condição tamponante utilizada (SA) verificou-se uma menor interação entre as isoformas de pDNA e o ligante, uma vez que parte das isoformas de pDNA CA foram recuperadas na etapa de lavagem (fração W2, conforme pode ser observado no gel de eletroforese da Figura 4-16).

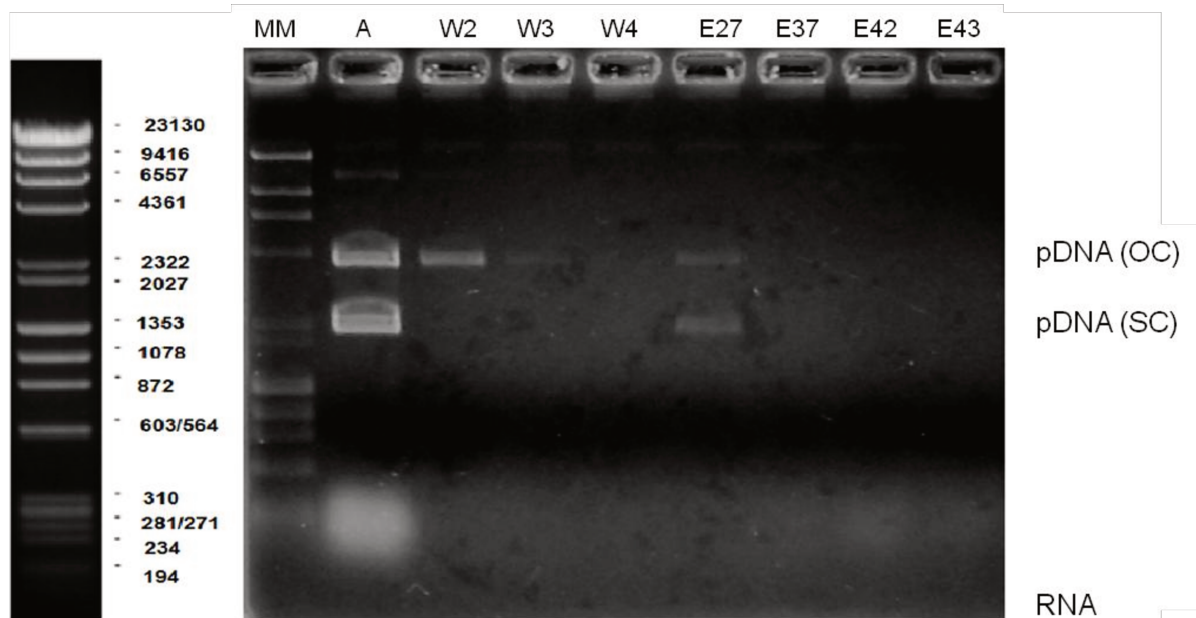
A pureza relativa foi aumentada em torno de 13 vezes se comparada ao lisado neutralizado alimentado na coluna, sem nenhuma etapa de pré-purificação anterior. Este sistema promoveu também a recuperação satisfatória de uma mistura de isoformas SE e CA de pDNA, fração E27, observada como pico no cromatograma (Figura 4-15) e no gel de eletroforese (Figura 4-16).

Através de análises quantitativas para determinação de proteínas e endotoxinas, visualizou uma remoção significativa de proteínas, em torno de 80% e da total eliminação de endotoxinas (Tabela 4-4).

Em geral, o sulfato de amônio em CTA é utilizado em concentrações muito altas na etapa de adsorção, como por exemplo, a indicada no kit comercial *Plasmid Select* (GE Healthcare), com sulfato amônio a 4,0 mol/L. No presente estudo, no entanto, o emprego deste tampão em concentrações muito menores (1,5 mol/L), demonstrou resultados satisfatórios, com remoção de grande parte das impurezas, principalmente endotoxinas e com recuperação de 36% de pDNA nas isoformas SE e CA.



**Figura 4-15 - CTA em MPR-S.** Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Volume da coluna: 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: sulfato de amônio 1,5 mol/L, pH 8,0; Tampão e Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).



**Figura 4-16 - Perfil eletroforético- CTA em MPR-S.** Sistema tamponante: sulfato de amônio 1,5 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi X$  (Biolabs); A : lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W2-W4. Frações da etapa de eluição: E27-E43. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado.

**Tabela 4-4.** Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz MPR e tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L (SA) como tampão de adsorção.

| <b>Amostra</b> | <b>pDNA</b>       |              |                        | <b>Proteínas</b>     |                    | <b>Endotoxina</b>    |                     |
|----------------|-------------------|--------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
|                | <b>M<br/>(µg)</b> | <b>Y (%)</b> | <b>* P. R.<br/>(%)</b> | <b>C<br/>(µg/mL)</b> | <b>**R<br/>(%)</b> | <b>C<br/>(EU/mL)</b> | <b>***R<br/>(%)</b> |
| <b>Lisado</b>  | 8,21              | 100,00       | 4,00                   | 267,40               | ----               | 305,01               | ----                |
| <b>W2</b>      | 0,80              | 9,00         | 13,00                  | 12,77                | 80                 | N.D.                 | 100                 |
| <b>E27</b>     | 3,00              | 36,01        | 53,00                  | 11,70                | 82                 | N.D.                 | 100                 |

Y: Recuperação. \*P.R.:Pureza Relativa = (Equação 3.1). R:Remoção. N.D.:Não detectado. C:Concentração.

\*\*Referente ao teor de proteína no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.

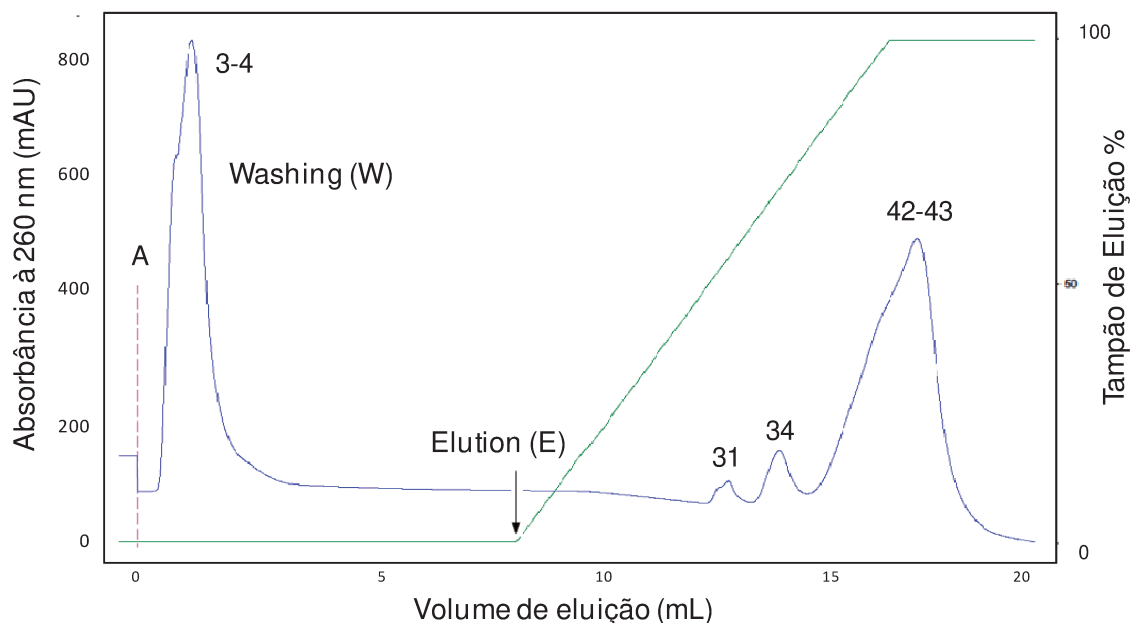
\*\*\* Referente ao teor de gDNA e ET no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.

#### ***4.3.3 Cromatografia tiofílica aromática (CTA) utilizando sistema adsortivo MPR-S e tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L (FP)***

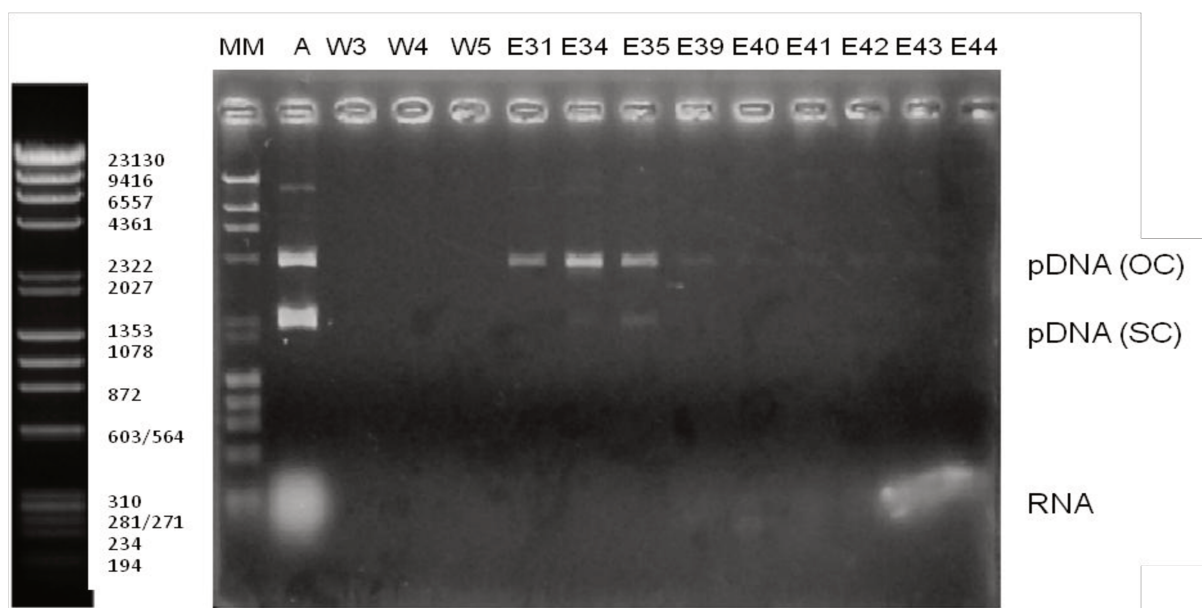
O tampão FP 2,0 mol/L propiciou interação das isoformas de pDNA SE e CA com o adsorvente MPR-S, como pode ser observado (Figura 4-17 e 4-18) nas pistas correspondentes às frações E31, E34, E35 da etapa de eluição. Estas frações tiveram picos relativamente bem definidos no cromatograma (Figura 4-17) correspondente à cromatografia tiofílica aromática.

A saída das moléculas de RNA foi percebida ao longo de todas as frações nas etapas de lavagem e eluição; as outras impurezas foram removidas de forma satisfatória (Tabela 4-5), principalmente no que se referem à endotoxinas cuja a remoção foi de 100%.

No tocante a remoção de proteínas, a remoção foi de 80-86%, um valor aquém do permitido pelas agências reguladoras, mas um resultado satisfatório levando em consideração o lisado neutralizado alimentado na coluna.



**Figura 4-17 - CTA em MPR-S.** Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Volume da coluna: 1,0 mL. Alimentação (A): 250 uL de lisado neutralizado. Vazão: 0,25 mL/min. Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem: Fosfato de potássio 2,0 mol/L, pH 8,0; Tampão e Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L, 8,0 em gradiente linear. Frações etapa de lavagem (W), frações etapa de eluição (E).



**Figura 4-18 - Perfil eletroforético- CTA em MPR-S.** Sistema tamponante: fosfato de potássio 2,0 mol/L. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM: Marcador molecular  $\lambda\phi$ X (Biolabs); A: lisado neutralizado alimentado na coluna. Frações etapa de lavagem; W3-W5. Frações da etapa de eluição: E31-E44. (OC) pDNA: pDNA circular aberto, (SC) pDNA: pDNA superenovelado.

**Tabela 4-5.** Dados referentes a qualidade acerca do pDNA obtido após cromatografia utilizando matriz MPR e tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L (FP) como tampão de adsorção.

| <b>Amostra</b> | <b>pDNA</b>       |              |                        | <b>Proteínas</b>    |                    | <b>Endotoxina</b> |                     |
|----------------|-------------------|--------------|------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
|                | <b>M<br/>(µg)</b> | <b>Y (%)</b> | <b>* P. R.<br/>(%)</b> | <b>(µg/mL<br/>)</b> | <b>**R<br/>(%)</b> | <b>(EU/mL)</b>    | <b>***R<br/>(%)</b> |
| <b>Lisado</b>  | 5,80              | 100,00       | 2,00                   | 443,4               | ----               | 258,00            | ----                |
| <b>E31</b>     | 0,58              | 10,00        | 22,00                  | 11,90               | 86,00              | N.D.              | 100,00              |
| <b>E34</b>     | 0,70              | 12,00        | 24,00                  | 17,00               | 80,00              | N.D.              | 100,00              |

Y: Recuperação. \*P.R.:Pureza Relativa = (Equação 3.1). R:Remoção. N.D.:Não detectado.

\*\*Referente ao teor de proteína no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.

\*\*\* Referente ao teor de gDNA e ET no lisado celular e o teor encontrado na amostra da cromatografia negativa.



#### 4.4. Discussões gerais

**Tabela 4-6.** Dados comparativos da qualidade acerca do pDNA obtido frente aos sistemas experimentados.

| Sistema cromatográfico | Sal                 | Recuperação | Pureza Relativa | Proteínas | gDNA | E.T.  |
|------------------------|---------------------|-------------|-----------------|-----------|------|-------|
| Phe-S                  | Citrato de sódio    | 5%          | 20%             | 91%       | 100% | 100%  |
| TS                     | Sulfato de Amônio   | 47%         | 24%             | 97%       | 98%  | N.D.  |
| MPR-S                  | Citrato de sódio    | 12%         | 80%             | 78%       | N.D. | 99,8% |
| MPR-S                  | Sulfato de Amônio   | 36%         | 53%             | 82%       | N.D. | 100%  |
| MPR-S                  | Fosfato de potássio | 12%         | 24%             | 86%       | N.D. | 100%  |

N.D.:Não determinado

Os resultados analisados do sistema de cromatografia tiofílica aromática MPR-S empregando o sal sulfato de amônio 2,0 mol/L, se mostrou interessante no tocante a recuperação (36%) de pDNA frente aos outros sais testados (Tabela 4.6). O fato do sulfato de amônio ter uma capacidade de “*salting out*” maior dos que os demais, citrato de sódio e fosfato de potássio, pode explicar a recuperação alcançada, já que induz uma maior compactação da biomolécula de pDNA, mantendo suas bases hidrofóbicas no interior da molécula, dificultando a interação com o ligante e fazendo com que a recuperação ocorra nas primeiras frações da etapa de lavagem.

Já o sistema CPA utilizando como sal citrato de sódio e o ligante fenilalanina se mostrou promissor quanto a pureza relativa, se comparado a outros estudos utilizando aminoácidos como histidina (SOUSA et al., 2006), lisina (SOUSA et al., 2011) e arginina (SOUSA et al., 2008, 2009, 2010), se levado em consideração, o fato destes terem utilizado o lisado clarificado e não o neutralizado. O sistema TS com sal sulfato de amônio demonstrou uma recuperação satisfatória de pDNA, contudo, apesar da remoção satisfatória de proteínas e endotoxinas, houve alta presença de RNA nas principais frações.

Entre as duas técnicas cromatográficas CPA e CTA, pode-se dizer que a que apresentou melhores resultados tanto dos aspectos de recuperação quanto de pureza relativa foi a tiofílica aromática.

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com o uso do ligante pseudobioespecífico fenilalanina é possível concluir, que dos três sistemas adsortivos utilizados, o que apresentou melhor desempenho foi o tampão citrato de sódio 1,5 mol/L. Este tampão possibilitou a não retenção das isoformas de pDNA, inclusive a isoforma superenovelada de interesse terapêutico, fato este evidenciado por sua eluição nas frações de lavagem iniciais. O citrato promoveu, no entanto, a retenção de boa parte das moléculas de RNA, que puderam ser recuperadas principalmente nas frações de eluição. A remoção de grande parte de gDNA e endotoxinas (entre 99-100%) e cerca de 84% do total de proteínas inicialmente encontrados no lisado neutralizado alimentado na coluna, permite afirmar que este sistema pode ser usado de forma promissora como cromatografia negativa, para uma etapa de pré-purificação de pDNA.

Os sistemas tamponantes utilizados nessa mesma fase estacionária, fosfato de potássio 2,0 mol/L e sulfato de amônio 1,5 mol/L, apesar de também não promoverem a adsorção do pDNA e isoformas, propiciaram a co-eluição de muitas impurezas com a molécula de interesse, sendo a proporção entre as moléculas de pDNA e contaminantes muito desfavorável e com consequente baixa recuperação e pureza relativa.

Ante ao sistema adsortivo testado com o outro aminoácido, D-triptofano, este também de natureza hidrofóbica, pode-se observar que o tampão que proporcionou melhores resultados foi o sulfato de amônio 1,5 mol/L. Nesta condição, as impurezas foram retidas, sendo estas eliminadas em sua maioria na etapa de eluição, comportamento este que demonstra seu uso como cromatografia negativa, semelhantemente ao encontrado com o aminoácido fenilalanina. Observou-se uma boa remoção de proteínas, gDNA e endotoxinas (97 a 99%) na principal fração de interesse, com recuperação de aproximadamente 48%. A vantagem dessa condição tamponante reside no fato do uso de uma concentração menor de sulfato

de amônio, de um avanço no tocante a um menor impacto na quantidade de efluentes nocivos lançados ao meio ambiente.

Comparando-se os resultados, tem-se que o D-triptofano-Sepharose é o adsorvente mais promissor para uso em uma etapa de pré-purificação de DNA plasmidial em cromatografia negativa, uma vez que este apresentou melhor desempenho no que se refere a recuperação e remoção de impurezas.

No tocante ao uso do ligante de natureza tiofílica aromática mercaptopiridina, os resultados obtidos permitem concluir que o melhor sistema tamponante experimentado foi o sulfato de amônio 1,5 mol/L, diante de uma recuperação de pDNA de 36%. O tampão citrato de sódio 1,5 mol/L promoveu um relevante aumento na pureza relativa (80%), mas com recuperação menor de 12%. O tampão fosfato de potássio se mostrou promissor quanto à remoção de endotoxinas, alcançando 100%.

Os resultados com o ligante mercaptopiridina e tampão sulfato de amônio, foram obtidos com baixa concentração salina, diferentemente das cromatografias com ligantes tiofílicos para recuperação e purificação de pDNA, que são geralmente usados e, inclusive recomendados por kits comerciais, o emprego de concentrações de 4 mol/L de sulfato de amônio.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, W. F. Human gene therapy. *Nature*, v.392, p.25-30, 1998.
- BALDWIN, R. L.; How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, v.71 p. 2056-2063, 1996.
- BARBOSA, H. S. C. *Affinity Partitioning and Purification of Plasmid DNA in Aqueous Two-Phase*. Departamento de Química, Universidade do Minho, Portugal, 2009. 206p. Tese (Doutorado)
- BOSCHETTI, E. The use of thiophilic chromatography for antibody purification: a review, *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 49, p. 361-389, 2001.
- BRESOLIN, I. T. L., MIRANDA, E. A., BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. *Quím. Nova*, v. 32, n.5, p.1288 – 1296, 2009.
- BROWN, M. D., SCHATZLEIN, A. G., UCHEGBU, I. F. Gene delivery with syntetic (non-viral) carriers. *Int. J. Pharmac.*, v. 229, p.1-21, 2001.
- Bywater, M., Bywater, R., Hellman, L. A novel chromatographic procedure for purification of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* v. 132, p. 219-24, 1983.
- COHEN, S.N., CHANG, A.C. Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in Escherichia coli transformants. *Proc. Natl.Acad. Sci*, v.70, p. 1293-7, 1973.
- CRISTIANO, R. J. Viral and non-viral vectors for cancer gene therapy. *Anticancer Res.*, v.18, p. 3241-3245, 1998.
- CURTA, J. C., SIMÃO, R. C. G., SEGER, J. Vacina de DNA contra doenças infecciosas. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.40, n.3, p.187-191, 2008.
- DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia – Um breve ensaio. *Rev. Química Nova*, n.7, p.21-25, 1998.
- DINIZ, M. O., FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estud. Av.*, v.24, n.70, p. 19-30, 2010.
- DIOGO, M. M., QUEIROZ, J. A., PRAZERES, D. M. F. Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*, v.1069, p. 3–22, 2005.
- DIOGO, M.M., QUEIROZ, J.A., PRAZERES, D.M.F. *Bioseparation*, v. 10, p. 211, 2002.
- DIOGO, M.M.; QUEIROZ, J.A.; MONTEIRO, G.A.; MARTINS, S.A.M.; FERREIRA, G.N.M.; PRAZERES, D.M.F. Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene

therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 576-583, 2000b.

DIOGO, M.M.; RIBEIRO, S.; QUEIROZ, J.A.; MONTEIRO, G.A.; PERRIN, P.; TORDO, N.; PRAZERES, D.M.F. Scale-up of hydrophobic interaction chromatography for the purification of a DNA vaccine against rabies. *Biotechnol. Lett.*, v. 22, p. 1397-1400, 2000a.

DIOGO, M.M.; RIBEIRO, S.C.; QUEIROZ, J.A.; MONTEIRO, G. A.; TORDO, N.; PERRIN, P., PRAZERES, D.M.F. Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *J. Gene Med.*, v. 3, n.6, p. 577-584, 2001.

DORAN, P.M. *Bioprocess Engineering Principles*. 1° Ed., Academic Press, San Diego: Academic Press; 1995.

EON-DUVAL, A.; BURKE, G. Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J. Chromatogr. B*, v. 204, p. 327-335, 2004.

ERIKSSON, K.-O. Hydrophobic Interaction Chromatography, in: Janson, J.-C.; Rydén, L. (Eds.), *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, 1° Ed., VCH Publishers, New York, p. 207-226, 1989.

FAUSNAUGH, J.L.; REGNIER, F.E. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Chromatogr.*, v. 359, p. 131-146, 1986.

FERBER, D. Gene Therapy. Safer and virus free. *Science*, v.294, p.1638-1642, 2001.

FERREIRA, G. N. M. Chromatographic Approaches in the Purification of Plasmid DNA for Therapy and Vaccination. *Chem. Eng. &Tech.*, v.28, p. 1285-1294, 2005.

FERREIRA, G.N.M.; CABRAL, J.M.S.; PRAZERES, D.M.F. A comparison of gel filtration chromatographic supports for plasmid purification. *Biotechnol. Lett.*, v. 11, p. 417-420, 1997.

FERREIRA, G.N.M.; CABRAL, J.M.S.; PRAZERES, D.M.F. Development of process flow sheets for the purification of supercoiled plasmids for gene therapy applications. *Biotechnol. Prog.*, v. 15, p. 725-731, 1999.

FERREIRA, G.N.M.; MONTEIRO, G.A.; PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol.*, v. 18, p. 380-388, 2000.

FERREIRA, G.N.M.; MONTEIRO, G.A.; PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol.*, v. 18, p. 380-388, 2000.

FIORETTI D., IURESCIA S., FAZIO V.M, RINALDI M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *Biomed. Biotechnol.*, p. 174378, 2010.

FORDE, G. M., GHOSE S., SLATER N. K. H., HINE A. V., DARBY R. A. J., HITCHCOCK A. G. LacO-LacI interaction in affinity adsorption of plasmid DNA. *Biotechnol. Bioeng.*, v.95, p.67-75, 2006.

Forde, G.M. *Plasmid DNA purification by affinity methods*. University of Cambridge (United Kingdom), 2004.Tese (Doutorado)

FREITAS, S. Development and optimization of a scalable plasmid DNA production process based on hydrophobic interaction chromatography and aiming at gene therapy and DNA vaccination. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2007, 176 p. Tese (Doutorado)- Programa de Doutorado em Biotecnologia, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2007

FREITAS, S.S.; SANTOS, J.A.L.; PRAZERES, D.M.F. Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. *Sep. Purif. Technol.*, v. 65 (1), p. 95-104, 2008.

GERMÁN, P. G., CISNEROS, R. M. M., PRAZERES, D. M. F., MANSIR, A. T. Purification of plasmid DNA from *Escherichia coli* ferments using anion-exchange membrane and hydrophobic chromatography. *International Union of Bioch. and Molec. Biology*, v. 58, n.1, p. 68–74, 2011.

GHOSE, S.; FORDE, G.M.; SLATER, N.K.H. Affinity adsorption of plasmid DNA. *Biotechnol. Prog.*, v. 20, p. 841-850, 2004.

GURUNATHAN S., KLINMAN, D. M., SEDER, R. A. DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Annual Review of Immunology*. v. 18, p. 927-974, 2000.

Horn N. A., Meek J. A., Budahazi G., Marquet M. *Purification of DNA during column chromatography*. US Patent 5707812. 1995.

HUTCHENS, T.W.; PORATH, J. Thiophilic adsorption: a comparison of model protein behavior, *Biochemistry*, v. 26, p. 7199-7204, 1987.

HUYGEN, K. On the Use of DNA vaccines for the Prophylaxis of MYcobacterial Diseases. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 4, p. 1613-1621, 2003.

IULIANO, S., FISHER, J. R., CHEN, M., KELLY, W. J., *J. Chromatogr. A.*, v. 972, p. 77–86, 2002.

JACKSON, D. A., SYMONS, R.H., BERG, P., Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.69, p. 2904-9, 1972.

- KALYANPUR M. Downstream Processing of Proteins Methods and Protocols. *Humana Press*. p. 1 – 10, 2000.
- KANO, F. S., VIDOTTO, O., VIDOTTO, M. C. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 4, p. 709-726, 2007.
- KANOUN, S. New support for the large-scale purification of proteins. *J. Chromatogr.*, v. 376, p. 259–267, 1986.
- KEPKA, C., LEMMENS, R., VASI, J., NYHAMMAR, T., GUSTAVSSON, P. Integrated process for purification of plasmid DNA using aqueous two-phase systems combined with membrane filtration and lid bead chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1057, p. 115-124, 2004.
- KUTZLER, M.A., WEINER, D.B. DNA vaccines: ready for prime time. *Nat. Rev. Genet.*, v.9, p. 776-88, 2008.
- LANDER, R.J., WINTERS, M.A., MEACLE, F.J. *Patent ID: US20046797476*, 2004.
- LARA, A. R., RAMIREZ, O.T. Plasmid DNA production for therapeutic applications. *Recombinant Gene Expression*, v 824-2; p. 271-303, 2012.
- LEDERER, E., LEDERER, M. *Cromatografía – Revisión de Sus Principios y Aplicaciones*. 2.ed. Buenos Aires:El Ateneo, 752p, 1973.
- LEMMENS, R. OLSSON, U., NYHAMMAR, T., STADLER, J. Supercoiled plasmid DNA: selective purification by thiophilic/aromatic adsorption. *J. Chromatog. B*, v. 784, p. 291-300, 2003.
- LENGSFELD, C. S., ANCHORDOQUY, T. J. Shear-induced degradation of plasmid DNA. *J.Pharm. Sci.*, v. 91, p. 1581-1589, 2002.
- LI, H., BO, H., WANG, J.H., HUANG, S. S. Separation of supercoiled from open circular forms of plasmid DNA, and biological activity detection. *Cytotechnology* v.63, p.12, 2010.
- LI, L.; LIU, Y.; SUN, M.; SHAO, Y. Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1139, p. 228-235, 2007.
- LI, Y.; DONG, X.; SUN, Y. High-speed chromatographic purification of plasmid DNA with a customized biporous hydrophobic adsorbent. *Biochem. Eng. J.*, v. 27, p. 33-39, 2005.
- LIMA, M.K., SANTOS, A. S., SILVA, L. C., JUNIOR, R. M. J. *Terapia Gênica. Tecnologia do Cultivo de Celulas Animais*. Cap.21,p 480-494, 2008.
- LIU, M. A. DNA vaccines: a review. *J.Internal Medicine*, v. 253, p. 402-410, 2003.



LOANNIDIS, N. Manufacturing of agarose-based chromatographic media with controlled pore and particle size. Escola de engenharia química. Universidade de Birmingham, Reino Unido, 2009. 214p. Tese (Doutorado).

LOWE, C.R.; LOWE, A.R.; GUPTA, G. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 49, p. 561-574. 2001.

LUNDSTROM K., BOULIKAS T. Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technol. Cancer Res. Treat.*, v. 2, p. 471-486, 2003.

MAGALHÃES, J. B. L. Efeito do grau de superenrolamento de plasmídeos na sua estabilidade estrutural e função biológica. Universidade de Lisboa. Dissertação (mestrado) em biologia molecular e genética, 43p, 2008.

MANTHORPE, M., HOBART, P., HERMANSON, G., FERRARI, M., GEALL A., GOFF, B., ROLLAND, A. Plasmid vaccines and therapeutics: from design to applications. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.*, v. 99, p. 41-92, 2005.

MELANDER, W.; HORVATH, C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. *Arch. Biochem. Biophys.*, p. 183, p. 200–215, 1977.

MICARD, D., SOBRIER, M., COUDERC, J., DASTUGUE, B. *Anal. Biochem.*, v.148, p. 121, 1985.

MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO L. R. *Tecnologia do cultivo de células animais*. São Paulo:Ed.Rocca,2007.

NIIDOME, T., HUANG, L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gen. Ther.*, v.9, p. 1647-1652, 2002.

NUCCI, N. V.; VANDERKOOI J. M.; Effects of salts of the Hofmeister series on the hydrogen bond network of water. *Journal of Molecular Liquids* v.143 p.160-170, 2008.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. *Rev. Biológico*, v.63, n.2, p.227-229, 2002.

OSCARSSON, S; VIERA, F.B. Thiophilic interaction chromatography, in: *Biochromatography: Theory and practice*, Vijayalakshmi, M.A. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, p. 309-327, 2002.

OSCARSSON, S; PORATH, J. Protein chromatography with pyrimidine and alkylthioether-based agarose adsorbents, *J. Chromatogr.*, v. 499, p. 235-247, 1990.

PLATONOVA, G.A., TENNIKOVA, T.B. Chromatographic investigation of macromolecular affinity interactions. *J. Chromatogr.*, v. 1065, p. 75–81, 2005.

PORATH, J.; OSCARSSON, S. A new kind of thiophilic electron-donor-acceptor adsorbent, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*, v. 17, p. 359-371, 1988.

PORATH, J.; BELEW, M. Thiophilic interaction and the selective adsorption of proteins, *TIBTECH*, v. 5, p. 225-229, 1987.

PORATH, J.; MAISANO, F.; BELEW, M. Thiophilic adsorption, a new method for protein fractionation, *FEBS Lett.*, v. 185, n. 2, p. 306-310, 1985.

PRATHER, K. J., SAGAR, S., MURPHY, J., CHARTRAIN, M. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 33, p. 865-883, 2003.

PRAZERES, D. M. F., FERREIRA, G.N. Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chemical Engineering and Processing*, v.43, p.609-624, 2004.

PRAZERES, D. M. F., MONTEIRO, G. A. *Dossier Biotecnologia*. IBB - Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Portugal, 2002.

PRAZERES, D. M. F., MONTEIRO, G. A., FERREIRA, G. N. M., DIOGO, M. M., RIBEIRO, S. C., CABRAL, J. M. S. *Biotech. An. Review, Elsevier*, p. 1, 2001.

PRAZERES, D. M. F., MONTEIRO, G. A., FERREIRA, G.N.M., DIOGO, M. M., RIBEIRO, S. C., CABRAL, J. M. S. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnol. Ann. Rev.*, v.7, p., 1-30, 2001.

PRAZERES, D. M. F.; SCHLUEP, T.; COONEY, C. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 806, p. 31-45, 1998.

PRAZERES, D.M., MONTEIRO, G.A., FERREIRA, G.N. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnol Annu Rev.*, v. 7, p. 1-30 2001.

Raf, L., Urbano, O., Joachim, T. S. N. Supercoiled DNA plasmidial: purificação por adsorção seletiva / thiophilic aromáticos. *J. of Chrom. B.*, v. 784, p. 291-300, 2003.

REYES, S. A., ERTL, H. C. J. DNA vaccines. *Cur. molec. Medic.*, v. 1, p. 217-243, 2001.

RODRIGUES, J. M. J. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculoses. *J.I Bras Pneum.*, v. 30, n. 4, p. 468-477,2004.

ROE, S. Purification based on hidrophobicity, in: Harris, E.L.V.; Angal, S. (Eds.), *Protein purification methods: A pratical approach*, IRL Press, Oxford, p. 221-232, 1989.

- SANDBERG, L.M.; BJURLING, A.; BUSSON, P.; VASI, J.; LEMMENS, R. Thiophilic interaction chromatography for supercoiled plasmid DNA purification. *J. Biotechnol.*, v. 109, p. 193-199, 2004.
- SCHIEL, J.E. Applications of silica supports in affinity chromatography. *J. Sep. Sci.*, v. 29, p.719–737, 2006.
- SCHLUEP, T., C.L. COONEY, Purification of plasmids by triplex affinity interaction. *Nucleic Ac. Res.*, v. 26, p. 4524-8, 1998.
- SHAMLOU, P. A. Scaleable processes for the manufacture of therapeutic quantities of plasmid DNA. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v.37, p. 207-218, 2003.
- SINDEN, R.R. DNA Structure and Function. *Academic Press*, 1994.
- SKOOG, K.A., HOLER, F.J. NIEMAN, T.A. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. Bookman, p. 642-677, 2002.
- SOUSA A, SOUSA F, QUEIROZ J.A. Impact of lysine-affinity chromatography on supercoiled plasmid DNA purification . *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011.
- SOUSA A, SOUSA F, QUEIROZ JA. Impact of lysine-affinity chromatography on supercoiled plasmid DNA purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, p. 3507-3515, 2011.
- SOUSA A, TOMAZ C.T, SOUSA F., QUEIROZ J. A. Successful application of monolithic innovative technology using a carbonyldiimidazole disk to purify supercoiled plasmid DNA suitable for pharmaceutical applications. *J. Chromatogr. A.*,p.8333-43, 2011 b.
- SOUSA F, PRAZERES DM, QUEIROZ J.A. Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *J. Gene Med.*, v.1; p79-88, 2009.
- SOUSA, F. , MATOS, T., PRAZERES, D.M.F., QUEIROZ, J. A. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Analytical Bioch.*, v.374, p. 432–434, 2008.
- SOUSA, F., PRAZERES, D. M. F., QUEIROZ, J. A. Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification. *Biomedical Chrom.*,v. 23, p. 160-165, 2009.
- SOUSA, F., PRAZERES, D. M., QUEIROZ, J. A. Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification. *Biomed Chromatogr.*, v. 23 , p. 160-5. 2008.
- SOUSA, F., PRAZERES, D.M.F., QUEIROZ, J. A. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends in*

*biotechnology*, v. 26,p. 518-525, 2008.

SOUSA, F., QUEIROZ, J. A. Supercoiled plasmid quality assessment by analytical arginine-affinity chromatography. *J Chromatogr A*,p. 124-129, 2011.

SOUSA, F.; FREITAS, S.; AZZONI, A.R.; PRAZERES, D.M.F.; QUEIROZ, J. Selective purification of plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 45, p. 131-140, 2006.

SOUSA, F.; PRAZERES, D.M.F.; QUEIROZ, J.A. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends Biotechnol.*, v. 26, n.9, p. 518-525, 2008b.

SRIVASTAVA, I. K., LIU, M. A. Gene Vaccines. *Annal of Inter. Medic.*, v. 38, n. 138, p. 550-559, 2003.

STADLER, J., LEMMENS, R., NYHAMMAR, T. Plasmid DNA purification. *J. Gene Med.*, v.6, p. S54-S66, 2004.

TAIRA, K., KATAOKA, K. & NIIDOME, T. In Non-viral gene therapy. *Gene Design and Delivery*, 2005.

URTHALER, J., BUCHINGER, W., NECINA, R. Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta Bioch. Polonica*, v. 52, p. 703-711, 2005.

VALENTE, A. L. P., COLLINS, C. H., MANFREDI, J. E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev.Química Nova*, p.103-109, 1983.

VAN DEN BERG J.H, OOSTERHUIS K, BEIJNEN J.H, NUIJEN B, HAANEN J.B. DNA vaccination in oncology: current status, opportunities and perspectives. *Curr. Clin. Pharmacol.*, p. 218-25, 2010.

VAN OSS, C.J.; GOOD, R.J.; CHAUDHURY, M.K. The role of Van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interaction” between biopolymers and low energy surfaces. *J. Coll. Interf. Sci.*, v. 111, p. 378-390, 1986.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, v. 7, n. 3, p. 71-76, 1989.

VLACHY, B. V. JAGODA-CWIKLIK, R. VÁCHA,, TOURAUD D., JUNGWIRTH, P., KUNZ; W. Hofmeister series and specific interactions of charged headgroups with aqueous ions. *Advances in Colloid and Interface Science* v.146 p. 42-47, 2009.

VOLOSNIKOVA, AKULOVA, E.A., YA, N.I., GOGINA, S., LEVAGINA, G.M., MIKHAILOVA, V.K., LEBEDEV, L.R.; PODGORNYYI, V.F.,YU,V. Development of Technology for Purification of Plasmid DNAs for Pharmaceutical Purposes *Bioch. and Microbiol.*, v. 46, p. 865–869; 2010.

VOß, C.; SCHMIDT, T.; SCHLEEF, M. From bulk to delivery: Plasmid manufacturing and storage, in: Schleef, M. (Ed), *DNA-Pharmaceuticals: Formulation and Delivery in Gene Therapy, DNA Vaccination and Immunotherapy*, Wiley-VCH, Weinheim, p. 23-42, 2005.

WATSON, J.D., CRICK, F.H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, v.171, p. 737-8, 1953.

WICKS, I.P. Bacterial lipopolysaccharides copurifies with plasmid DNA: Implications for animal models and human gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, v.6, p. 317-323, 1995.

WILLIAMS, J. A. CARNES, A. E. HODGSON, C. P. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv.*, v.27, p. 353-70, 2009.

WILS, P.; ESCRIOU, V.; WARNERY, A.; LACROIX, F.; LAGNEAUX, D.; OLLIVIER, M.; CROUZET, J.; MAYAUX, J.-F.; SCHERMAN, D. Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography. *Gene Ther.*, v. 4, p. 323-330, 1997.

YI, Y., HAHM, S.H., LEE, K.H. Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr. Gene Ther.*, v.5, p. 25-35, 2005.

ZHANG, P. S. Y. C.; Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology* v.10, p. 658-663 (2006).