

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Purificação em etapa cromatográfica única de DNA plasmidial a partir de lisado neutralizado visando a sua aplicação em estudos de terapia e vacinação gênica

Nemailla Bonturi

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Co-Orientador: Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Julho 2011

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

B644p Bonturi, Nemailla
Purificação em etapa cromatográfica única de DNA
plasmidial a partir do lisado neutralizado visando a sua
aplicação em estudos de terapia e vacinação gênica /
Nemailla Bonturi. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Everson Alves Miranda, Adriano
Rodrigues Azzoni.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cromatografia. 2. Plasmídeos. 3. Biomoléculas -
Purificação. 4. Análise cromatográfica. I. Miranda,
Everson Alves. II. Azzoni, Adriano Rodrigues. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Single step chromatographic purification of plasmid
DNA from neutralised lysate aiming its application in
gene therapy and vaccination

Palavras-chave em Inglês: Chromatography, Plasmids, Biomolecules -
Purification, Chromatographic analysis

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Mirian Perez Maluf, Sônia Maria Alves Bueno

Data da defesa: 04-07-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Nemailla Bonturi e aprovada em 04 de Julho de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

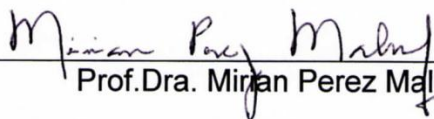


Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador



Prof. Dra. Sônia Maria Alves Bueno



Prof. Dra. Mirian Perez Maluf

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Nemailla Bonturi em 04 de julho de 2011.



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo.

Aos meus pais, que são em grande parte, os responsáveis por tudo que sou e conquistei.

Ao prof. Everson Alves Miranda pela oportunidade que me foi dada, pela orientação, confiança e paciência.

Ao prof. Adriano Rodrigues Azzoni pela orientação, pelo aprendizado e o coleguismo.

À Dra. Sindélia Freitas por ter concebido o projeto e pela ajuda inicial.

Às profs. Ângela Maria Moraes e Sonia Maria Alves Bueno, não só pelos equipamentos de laboratório disponibilizados para a realização do meu trabalho, mas também por terem ajudado intelectualmente com este trabalho.

À prof. Lucimara Gaziola de la Torre pelas sugestões dadas no exame de qualificação.

À prof. Dra. Anete Pereira de Souza por ter gentilmente cedido seu laboratório para a realização de grande parte deste trabalho.

À Dra. Mirian Perez Maluf (Centro de Café-IAC) e ao prof. Dr. Michel G. A. Vincentz (CBMEG-UNICAMP) por terem cedido seus equipamentos de rt-PCR.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química e do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, ambos da UNICAMP.

Ao Guilherme pelo amor, companheirismo e por sempre cuidar tão bem de mim.

À Michelle pela amizade.

À todos os amigos e colegas do LEBp, LEBC, LIMBio e LAGM por toda ajuda, paciência e companheirismo.

À Fapesp, CNPq e a Capes pelo financiamento..

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.*

*Põe quanto és
No mínimo que fazes.*

*Assim em cada lago a lua toda,
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis (heterônimo de Fernando Pessoa)

RESUMO

O número de estudos em terapia gênica com vetores plasmídiais (pDNA) têm aumentado nestes últimos anos. Como resultado, a demanda para preparações de pDNA em conformidade com as recomendações das agências reguladoras (EMEA, FDA) também aumentou. O DNA plasmidial é frequentemente obtido através da fermentação de *Escherichia coli* transformada e purificada por uma série de operações unitárias, incluindo a cromatografia. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um processo cromatográfico para a recuperação e purificação do pDNA superenovelado (sc pDNA) a partir do lisado neutralizado. Os ligantes fenil (hidrofóbico) e mercaptopirimidina (tiofílico) foram imobilizados em matrizes de agarose e celulose. A seletividade destes ligantes para com o sc pDNA foi determinada através de estudos de adsorção utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampões de adsorção. A cromatografia com o adsorvente fenil-agarose e o citrato de sódio 1,5 mol/L permitiu recuperar 58% do pDNA sem contaminação por gDNA, proteínas e endotoxinas, sendo uma alternativa potencial para a recuperação primária do sc pDNA. O resultado mais promissor foi obtido com a cromatografia com o adsorvente mercaptopirimidina-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção. Este sistema tampão de adsorção/adsorvente permitiu a obtenção de pDNA com 100% de pureza e dentro das recomendações das agências reguladoras no tocante à contaminação por RNA e endotoxinas. Assim, este trabalho lançou as bases para o desenvolvimento de dois métodos cromatográficos para a recuperação primária ou purificação de pDNA diretamente do lisado neutralizado, ambos potencialmente aplicáveis em larga escala.

Palavras-chave: cromatografia tiofílica aromática, cromatografia de interação hidrofóbica, pDNA, lisado neutralizado.

ABSTRACT

The number of studies in gene therapy with plasmid vectors (pDNA) has witnessed an increase in the recent years. As result the demand for preparations of pDNA in compliance with recommendations of the regulatory agencies (EMA, FDA) has also increased. Plasmid DNA is oftenly obtained through fermentation of transformed *Escherichia coli* and purified by a series of unit operations, including chromatography. This work aimed the development of a chromatographic process for the recovery and purification of supercolied pDNA (sc pDNA) directly from neutralized cell lysate. Phenyl (hydrophobic) and mercaptopuridine (thiophilic) molecules immobilized in agarose and cellulose matrices were the ligands used to capture the pDNA. Their selectivity towards sc pDNA was evaluated through adsorption studies using sodium citrate 1.5 mol/L and potassium phosphate 2.0 mol/L as the adsorption buffers. The chromatography with the adsorbent phenyl-agarose and sodium citrate 1.5 mol/L was able to recover 58% of sc pDNA without gDNA, proteins and endotoxins contamination, being an potential alternative for the primary recovery of sc pDNA. The most promising result was obtained with the chromatography with mercaptopuridine-agarose and potassium phosphate 2.0 mol/L adsorption buffer. With the latter buffer/adsorbent system it was possible to obtain in a single step pDNA with 100% purity and within the recommendations of regulatory agencies with regard to contamination by RNA and endotoxins. Thus, this work laid the basis for the development of two chromatographic process for the recovery or purification of pDNA directly from the neutralized lysate, both potentially applicable in larger scale.

Keywords: aromatic thiophilic chromatography, hydrophobic interaction chromatography, pDNA, neutralized lysate

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xxi
NOMENCLATURA.....	xxv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O pDNA como vetor na vacinação e terapia gênica e sua purificação	1
1.2 Colocação do problema.....	4
1.3 Objetivo	6
1.4 Etapas desenvolvidas	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Terapia gênica e vacinação com DNA.....	11
2.2 Propriedades físico-químicas e biológicas de plasmídeos (pDNA)...	15
2.3 Processo de produção e RPB empregados na obtenção de pDNA com padrão farmacêutico	17
2.3.1 Fermentação e lise celular	17
2.3.2 Constituição do lisado neutralizado e características das principais impurezas	20
2.3.3 Processos de clarificação e concentração de lisados comumente empregados na RPB de pDNA.....	23
2.3.4 Processos cromatográficos empregados na RPB de pDNA.....	24
2.3.4.1 Cromatografia de interação hidrofóbica (CIH)	27
2.3.4.2 A interação hidrofóbica	27
2.3.4.3 A operação unitária CIH.....	28
2.3.4.4 A CIH na purificação de pDNA	30
2.3.4.5 Cromatografia Tiofílica Aromática (CTA).....	33
2.3.4.6 A interação tiofílica aromática	33

2.3.4.7 A CTA na purificação de pDNA	37
2.3.4.8 Processos cromatográficos com membranas	
na purificação de pDNA	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Materiais e equipamentos.....	43
3.1.1 Descrição do plasmídeo modelo pVAX1GFP.....	44
3.1.2 Adsorventes utilizados	46
3.1.2.1 Adsorvente da cromatografia de interação hidrofóbica (CIH)	46
3.1.2.2 Cromatografia tiofílica aromática (CTA)	46
3.1.2.2.a Adsorvente para a CTA utilizando agarose como matriz	46
3.1.2.2.b Adsorvente para a CTA utilizando membrana de celulose como matriz.....	48
3.2 Preparo dos tampões de adsorção utilizados	49
3.3 Produção e armazenamento de lisado neutralizado	49
3.4 Purificação de pDNA controle utilizado como padrão.....	50
3.5 Estudos preliminares para seleção de tampões de adsorção	51
3.6 Estudos completos de adsorção e dessorção do pDNA em adsorventes baseados em agarose	52
3.7 Estudos completos de adsorção e dessorção do pDNA em adsorvente mercaptopirimidina-celulose	52
3.8 Estudos completos de otimização da adsorção e dessorção do pDNA em adsorvente mercaptopirimidina-celulose	53
3.9 Dessalinização das amostras.....	54
3.10 Quantificação de proteínas	54
3.11 Eletroforese em gel de agarose	54
3.12 Quantificação de pDNA	55
3.13 Quantificação de endotoxinas	56
3.14 Quantificação de gDNA	57

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Estudos preliminares para seleção de tampões de adsorção	60
4.1.1 Estudo preliminar de CIH utilizando citrato de sódio 1,2 mol/L como tampão de adsorção	61
4.1.2 Estudo preliminar de CIH utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção	63
4.1.3 Estudo preliminar de CIH utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção	66
4.1.4 Estudo preliminar de CIH utilizando citrato de potássio 1,5 mol/L como tampão de adsorção	68
4.2 Estudos completos	70
4.2.1 Estudos completos de CIH utilizando matrizes de agarose	71
4.2.1.1 Estudo completo de CIH utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção	71
4.2.1.2 Estudo completo de CIH utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção	76
4.2.1.3 Estudo completo de CIH utilizando sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção	82
4.2.2 Estudos completos de CTA utilizando matriz de agarose	86
4.2.2.1 Estudo completo de CTA utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção	86
4.2.2.2 Estudo completo de CTA utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção	94
4.2.2.3 Estudo completo de CTA utilizando sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção	103
4.2.3 Estudos completos de CTA com mercaptopirimidina imobilizada em matriz de celulose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção	110
4.2.4 Comparação dos processos delineados pelos estudos completos com processos descritos na literatura	120

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	127
5.1 Conclusões	127
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	128
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Fluxograma do processo genérico de RPB proposto neste trabalho. Adaptado de Ferreira et al. (2000). CIH: Cromatografia de interação hidrofóbica; CTA: Cromatografia de interação tiofílica aromática; sc pDNA: plasmídeo na isoforma super enovelada purificado.....	7
Figura 1.2. Diagrama esquemático representando as etapas do trabalho desenvolvido.	9
Figura 2.1. Imagem de microscopia eletrônica das três isoforma de pDNA, sendo oc: “open circular”; sc: “supercoiled”; l: “linear”. Adaptado de Molloy et al. (2004). 16	
Figura 2.2. Fluxograma do processo típico de purificação em larga escala de sc pDNA. As operações unitárias consideradas no processo estão indicadas juntamente com as impurezas eliminadas em cada etapa. Adaptado de Ferreira et al. (2000). MF: microfiltração; UF: ultrafiltração; DF: diafiltração e TFF: filtração tangencial.	18
Figura 2.3. Estrutura química de endotoxinas de <i>E. coli</i> . (Hep) L-glicerol-D-mano-heptose; (Gal) galactose; (Glc) glicose; (KDO) ácido 2-keto-3-deoxioctonic; (NGa) N-acetil-galactosamina; (NGc) N-acetil-glucosamina. Adaptado de Magalhães et al. (2007).	22
Figura 2.4. Diagrama esquemático das interações hidrofóbicas entre proteínas e ligante hidrofóbico imobilizado no adsorvente. Adaptado de McCue (2009).	30
Figura 2.5. Série de Hofmeister de precipitação de proteínas (Porath, 1987).	30
Figura 2.6. Estrutura dos ligantes heterocíclicos utilizados por Schwartz e colaboradores (1995): (a) 2-mercaptopirimidina, (b) 2-mercaptopiridina e (c) mercaptotiazol.	35
Figura 2.7. (a) Diagrama esquemático das interações tiofílicas entre proteínas e ligantes tiofílicos imobilizado em matriz hidrofílica; (b) Diagrama esquemático das interações tiofílicas entre proteínas com grupamento hidrofóbicos e ligantes tiofílicos imobilizado em matriz hidrofílica Adaptado de Oscarsson e Vieira (2002).	36
Figura 3.1. Esquema ilustrativo das seqüências que compõem o vetor plasmidial pVAX1GFP (Azzoni et al., 2007).	45
Figura 3.2. Representação esquemática do adsorvente Phenyl Sepharose. Adaptado de Queiroz et al. (2001).	46

Figura 3.3. Representação esquemática do adsorvente DVS-agarose (Hermanson et al., 1992).	47
Figura 3.4. Representação esquemática do adsorvente mercaptopirimidina-agarose (Comunicação pessoal de Prof. Dra. Sônia Maria Alves Bueno em 28 de Abril de 2011).	48
Figura 3.5. Representação esquemática do adsorvente epóxi-celulose (Comunicação pessoal de Prof. Dra. Sônia Maria Alves Bueno em 28 de Abril de 2011). Como não é especificado pelo fabricante o método epóxi utilizado na ativação, apenas o grupamento reativo é mostrado nesta figura.	49
Figura 3.6. Representação esquemática do adsorvente mercaptopirimidina-celulose (Comunicação pessoal de Prof. Dra. Sônia Maria Alves Bueno em 28 de Abril de 2011)	49
Figura 3.7. Marcadores moleculares utilizados na eletroforese em gel de agarose: a) Lambda Hind III / phiX Hae III; b) 1 Kb Plus DNA Ladder. Imagens retiradas dos manuais dos respectivos fabricantes, Biolabs (EUA) e Invitrogen (EUA), respectivamente.	55
Figura 4.1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do pDNA padrão, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção citrato de sódio 1,2 mol/L. M: marcador molecular; pDNA: padrão alimentado; F: fração coletada após a injeção da amostra ("flow through"); L1-L3: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.....	62
Figura 4.2. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do lisado neutralizado, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção citrato de sódio 1,2 mol/L. M: marcador molecular; Lis: amostra de lisado alimentada; F: fração coletada após a injeção da amostra ("flow through"); L1-L2: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com tampão CST; E10-E20: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.....	62
Figura 4.3. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do pDNA padrão, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção citrato de sódio 1,5 mol/L. M: marcador molecular; pDNA: padrão alimentado; F: fração coletada após a injeção da amostra ("flow through"); L1-L3: lavagens; E1-E8: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.....	64
Figura 4.4. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do lisado neutralizado, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção citrato de sódio 1,5 mol/L. M: Marcador molecular; Lis: alimentação; F: fração coletada após a injeção da amostra ("flow through"); L1-L3: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.	65

Figura 4.5. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do pDNA controle, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção fosfato de potássio 2,0 mol/L. M: marcador molecular; pDNA: padrão alimentado; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L3: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0..... 67

Figura 4.6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do lisado neutralizado, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção fosfato de potássio 2,0 mol/L. M: marcador molecular; Lis: alimentação; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L2: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0..... 67

Figura 4.7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do pDNA controle, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção citrato de potássio 1,5 mol/L. M: marcador molecular; pDNA: padrão alimentado; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L5: lavagens; E1-E7: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0..... 69

Figura 4.8. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do lisado neutralizado, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção citrato de potássio 1,5 mol/L. M: marcador molecular; pDNA: padrão; Lis: alimentação; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L2: lavagens; E1-E6: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0..... 70

Figura 4.9. Cromatograma da CIH do lisado neutralizado utilizando o adsorvente fenil-agarose e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas para análises; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção..... 72

Figura 4.10. Eletroforese em gel de agarose das frações da CIH do lisado neutralizado com o adsorvente fenil-agarose e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção. M: marcador de massa molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna. 73

Figura 4.11. Cromatograma obtido pela CIH do lisado neutralizado utilizando o adsorvente fenil-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas para análises ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção. 77

Figura 4.12. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CIH do lisado neutralizado com o adsorvente fenil-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção. M: Marcador de massa molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna. 78

Figura 4.13. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CIH do lisado neutralizado com maior razão sc pDNA/oc pDNA com adsorvente fenil-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção. M: Marcador de massa molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna. 79

Figura 4.14. Cromatograma obtido pela CIH do lisado neutralizado utilizando o adsorvente fenil-agarose e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção..... 83

Figura 4.15. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CIH do lisado neutralizado com adsorvente fenil-agarose e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna..... 83

Figura 4.16. Cromatograma obtido pela CTA do lisado utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a)** DVS-agarose (controle) e **(b)** mercaptopirimidina-agarose. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção..... 87

Figura 4.17. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CTA do lisado neutralizado com citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a)** DVS-agarose (controle) e **(b)** mercaptopirimidina-agarose. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna. 88

Figura 4.18. Comparação entre os perfis cromatográficos obtidos utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes fenil-agarose (linha preta) e mercaptopirimidina-agarose (linha azul). L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção..... 93

Figura 4.19. Cromatograma obtido pela CTA do lisado neutralizado utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a)** DVS-agarose controle e **(b)** mercaptopirimidina-agarose. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção..... 95

Figura 4.20. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CTA do lisado neutralizado com fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a)** DVS-agarose controle e **(b)** mercaptopirimidina-agarose. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna. 96

Figura 4.21. Comparação entre os perfis cromatográficos obtidos utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes fenil-agarose controle (linha preta) e mercaptopirimidina-agarose (linha azul). L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção..... 102

Figura 4.22. Cromatograma obtido pela CTA do lisado neutralizado utilizando sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: (a) DVS-agarose controle e (b) mercaptopirimidina-agarose. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção..... 104

Figura 4.23. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CTA do lisado neutralizado com sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: (a) DVS-agarose controle e (b) mercaptopirimidina-agarose. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna. 105

Figura 4.24. Comparação entre os perfis cromatográficos obtidos utilizando sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes fenil-agarose (linha preta) e mercaptopirimidina-agarose (linha azul). L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção..... 110

Figura 4.25. Cromatograma obtido pela CTA do lisado neutralizado utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: (a) epóxi-celulose controle e (b) mercaptopirimidina-celulose. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção. 112

Figura 4.26. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CTA do lisado neutralizado com fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: (a) epóxi-celulose controle e (b) mercaptopirimidina-celulose. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna. 113

Figura 4.27. Cromatograma obtido pela CTA do lisado neutralizado com o adsorvente mercaptopirimidina-celulose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção e utilizando a estratégia de eluição em degrau. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.... 117

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Especificações e análises recomendadas para preparações de pDNA para aplicação em terapia gênica. Adaptado de Diogo et al. (2005).	14
Tabela 2.2. Composição típica do lisado celular e características físico químicas dos principais componentes. Adaptado de Diogo et al. (2005).	20
Tabela 2.3. Comparação entre as técnicas cromatográficas mais comumente descritas na literatura visando a purificação de pDNA com padrão farmacêutico. Adaptado de Freitas (2007).	39
Tabela 3.1. Estratégia utilizada durante a etapa de eluição.	53
Tabela 3.2. Ciclos utilizados na reação de PCR.	58
Tabela 4.1. Resumo dos estudos desenvolvidos neste trabalho, especificando os adsorventes e condições utilizadas e a sessão referente à descrição dos resultados obtidos.	60
Tabela 4.2. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CIH utilizando o adsorvente fenil-agarose e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.	74
Tabela 4.3. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CIH utilizando o adsorvente fenil-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como fase móvel.	80
Tabela 4.4. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CIH utilizando o adsorvente fenil-agarose e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.	85
Tabela 4.5. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente controle DVS-agarose e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.	91
Tabela 4.6. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-agarose e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.	91
Tabela 4.7. Contaminação por proteínas e gDNA em relação a massa de pDNA nas amostras de CTA com mercaptopirimidina-agarose tendo citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.	92
Tabela 4.8. Comparação entre os principais dados de purificação obtidos com a CIH e CTA do lisado neutralizado utilizando o citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.	93

Tabela 4.9. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente DVS-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.	98
Tabela 4.10. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.....	99
Tabela 4.11. Contaminação por proteínas e gDNA em relação a massa de pDNA nas amostras de CTA com mercaptopirimidina-agarose tendo fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.	100
Tabela 4.12. Comparação entre os principais dados de purificação obtidos com a CIH e CTA do lisado neutralizado utilizando o fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.....	101
Tabela 4.13. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente DVS-agarose e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.	106
Tabela 4.14. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-agarose e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.....	107
Tabela 4.15. Contaminação por proteínas e gDNA em relação a massa de pDNA nas amostras de CTA com mercaptopirimidina-agarose tendo sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.	108
Tabela 4.16. Comparação entre os principais dados de purificação obtidos com a CIH e CTA do lisado neutralizado utilizando o sulfato de amônio mol/L como tampão de adsorção.....	109
Tabela 4.17. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente controle epóxi-celulose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.	114
Tabela 4.18. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-celulose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.	115
Tabela 4.19. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-celulose e fosfato de potássio 2 mol/L como tampão de adsorção.....	118
Tabela 4.20. Contaminação por proteínas, endotoxinas e gDNA em relação a massa de pDNA nas amostras de CTA com mercaptopirimidina-celulose tendo fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.	119

Tabela 4.21. Comparação entre valores de recuperação, pureza relativa, presença de contaminantes e inconvenientes relacionados às operações de recuperação primária na purificação de pDNA aqui descritos e os citados na literatura..... 121

Tabela 4.22. Comparação entre valores de recuperação, pureza relativa, presença de contaminantes e inconvenientes relacionados dos processos de purificação de pDNA aqui descritos e os citados na literatura. 123

Tabela 4.23. Comparação entre valores de recuperação, pureza relativa, presença de contaminantes e inconvenientes relacionados aos processos de purificação de pDNA com adsorventes alternativos à agarose aqui descrito e os citados na literatura. 125

NOMENCLATURA

ΔG	variação da energia livre de Gibbs
ΔH	variação da entalpia
ΔS	variação da entropia
A_{260}	absorbância no comprimento de onda de 260 nm
ACS	alta concentração de sais
AGE	eletroforese em gel de agarose
ATPS	extração em duas fases aquosas
BCA	ácido bicinconínico
BCS	baixa concentração de sais
CET	cromatografia de exclusão por tamanho
CGE	eletroforese capilar em gel
cGMP	“current Good Manufacturing Practices”
CIH	cromatografia de interação hidrofóbica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTA	cromatografia tiofílica aromática
CTI	cromatografia de troca-iônica
DF	diafiltração
DNA	ácido desoxirribonucleico
EMA	“European Medicines Agency”
ET	endotoxinas
FDA	“Food and Drug Administration”
gDNA	DNA genômico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HS	alta densidade de ligantes
IFNg	interferon gama
IL-2	interleucina 2
IL-12	interleucina 12
IMAC	cromatografia de interação com íons metálicos imobilizados

LAL	lisado de amebócito de <i>Limulus</i>
LPS	lipopolissacarídeos
LS	baixa concentração de sais
MF	microfiltração
MPRM	mercaptopirimidina
oc pDNA	isoforma circular aberta do plasmídeo
PCR	cadeia de reação da polimerase
pDNA	plasmídeo
Phe	fenilalanina
RNA	ácido ribonucleico
RPB	recuperação e purificação de bioprodutos
sc pDNA	isoforma superenovelada do plasmídeo
SDS	dodecil sulfato sódio
TFF	filtração tangencial
Trp	triptofano
UF	ultrafiltração
VC	volume de coluna
WHO	“World Health Organization”

1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo será abordado a utilização de DNA plasmidial (pDNA) como vetor em terapia gênica e vacinação com DNA, sua produção e as etapas de recuperação e purificação mais empregadas e, dentre estas, a cromatografia de interação hidrofóbica e tiofílica aromática. Além disto, serão expostos os principais problemas envolvidos nos processos de purificação de pDNA e o objetivo deste trabalho.

1.1 O pDNA como vetor na vacinação e terapia gênica e sua purificação

A descoberta da habilidade celular de absorver informação genética exógena e expressar proteínas provenientes desse código desencadeou progressos na produção de terapias baseadas no DNA, como a terapia gênica e as vacinas de DNA (Manthorpe et al., 2005).

A terapia gênica e a vacinação com DNA são estratégias inovadoras e promissoras para o tratamento e prevenção de doenças, que consistem na introdução no paciente de um ou mais genes funcionais, carregado por vetores, tais como vírus ou plasmídeos, modificando o repertório genético das células alvo com finalidade terapêutica ou profilática (Ferreira et al., 2000; Oliveira et al., 2009).

O uso de vetores plasmidiais (pDNA) vem crescendo substancialmente devido ao histórico de comprovado perfil de segurança e qualidade nos tratamentos, reconhecidos pelas agências reguladoras como o “Food and Drug Administration” (FDA, EUA), a “European Medicines Agency” (EMA, União Européia) e a “World Health Organization” (WHO) (Tiainen et al., 2007), criando a necessidade de processos de produção que resultem em pDNA de alta pureza e

que sigam as boas práticas de fabricação (cGMP- “current Good Manufacturing Practices”).

O pDNA é produzido por fermentação em bactérias como a *Escherichia coli* e, por ser um produto intracelular, necessita de uma etapa de ruptura celular, que é comumente realizada através de lise alcalina seguida por neutralização com tampão ácido (Prazeres e Ferreira, 2004). Após centrifugação, o produto obtido, denominado de lisado neutralizado, apresenta uma concentração muito baixa de pDNA e uma alta concentração de impurezas, principalmente proteínas, endotoxinas, RNA e DNA genômico (gDNA). Tais impurezas apresentam uma ou mais características físico-químicas semelhantes ao pDNA, tornando o isolamento desta molécula um desafio, principalmente para estratégias de purificação em uma única etapa a partir do lisado. Além disso, os parâmetros de pureza do produto final devem estar de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pelas agências reguladoras FDA e EMEA, considerando a finalidade do produto.

Os processos de purificação de pDNA em geral apresentam pelo menos uma etapa cromatográfica. Diversos tipos de resina têm sido explorados tais como resinas de troca iônica (Prazeres et al., 1998; Tiainen et al., 2007), de interação hidrofóbica (Diogo et al., 2001; Li et al., 2005, Freitas et al. 2008), tiofílica (Lemmens et al., 2003; Sandberg et al, 2004), de exclusão molecular (Li et al., 2007) e de afinidade (Ghose et al., 2004; Darby e Hine, 2005; Sousa et al., 2006). Na maioria absoluta dos trabalhos publicados que exploram algum tipo de cromatografia, o pDNA passa por uma ou mais operações unitárias de recuperação intermediária (em geral precipitação com sal, álcool ou polímeros, filtração ou separação em sistema de duas fases aquosas) antes de ser experimentado no sistema cromatográfico de estudo.

A cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) explora a interação entre ligantes hidrofóbicos imobilizados na matriz com regiões não polares de uma molécula, sendo as interações majoritariamente promovidas por forças de van der Waals. A purificação de pDNA pela CIH é possível pela diferença de hidrofobicidade existente entre a molécula alvo e suas principais impurezas, como o RNA e o gDNA desnaturado, que por terem uma maior exposição das bases nitrogenadas devido à fita simples são mais hidrofóbicos. As endotoxinas (ETs)

também são mais hidrofóbicas que o pDNA, devido a presença de lipídio A na molécula (Diogo et al., 2000b).

As interações hidrofóbicas são favorecidas pela alta concentração de sais cosmotrópicos (sais que promovem as interações hidrofóbicas, devido ao estruturamento de moléculas de água presentes no solvente) e, no caso da purificação de plasmídeos por CIH, o sulfato de amônio é largamente utilizado. Porém, o uso deste sal em larga escala é ambientalmente preocupante, devido ao seu grande potencial de eutroficação (Biwer e Heinzle, 2004), o que gera a necessidade de tratamento de resíduos encarecendo o processo global.

A cromatografia tiofílica aromática (CTA) também necessita de altas concentrações de sais cosmotrópicos na fase móvel para promover a adsorção da molécula-alvo com os ligantes imobilizados na matriz. Nesta técnica cromatográfica utiliza-se como ligantes moléculas aromáticas com grupamentos tioéter. O mecanismo de interação envolvido neste tipo de separação não está completamente elucidado, mas no caso da purificação de pDNA foi sugerido que ocorra através de forças hidrofóbicas (π - π) entre os grupamento aromáticos do ligante e do sc pDNA e, também por interações doador-aceptor de elétrons do átomo de enxofre com nucleotídeos específicos (Sandberg et al., 2004). Assim como a CIH, o sulfato de amônio é largamente utilizado como tampão de adsorção na purificação de pDNA.

Avaliações do impacto ambiental de processos é uma parte essencial do projeto de qualquer planta industrial. Os custos associados com o tratamento e eliminação de resíduos gerados por um processo particular devem ser estimados e ponderados na decisão final sobre a seleção de processos a serem utilizados. Além disso, a otimização de processos deveria sempre caminhar em direção da minimização da geração de resíduos (Petrides, 2003; Petrides et al., 2002; Steffens et al. 2000).

De acordo com o trabalho de Freitas e colaboradores (2008), a utilização dos tampões com os sais citrato de sódio e fosfato de potássio, se mostraram alternativas potenciais para a purificação de pDNA, utilizando-se uma resina comercial com alta densidade de ligantes fenil. O citrato de sódio é uma alternativa ambientalmente mais correta que o sulfato de amônio, pois é biodegradável,

atóxico e possui um menor potencial de eutrofização (Gomes et al., 2009). Além disso, tanto o fosfato de potássio quanto o citrato de sódio, de acordo com a Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), não possuem um padrão de lançamento de efluentes, ou seja, não há regulamentação prevista sobre quantidades máximas a serem descartadas em efluentes líquidos. No caso do sulfato de amônio, a concentração limítrofe permitida de descarte é de 20 mg/L de nitrogênio amoniacal total. Portanto, para um processo em larga escala de purificação de pDNA é ambientalmente e economicamente mais interessante a substituição do sulfato de amônio por citrato de sódio ou fosfato de potássio, pois eliminaria a necessidade de uma etapa de remoção destes sais do efluente, contribuindo para a diminuição de gastos envolvidos com tratamentos de efluentes.

Além da questão ambiental, outro ponto importante na purificação cromatográfica do pDNA é o desenvolvimento de novas fases estacionárias. Esta necessidade advém da constatação que as matrizes baseadas em agarose, largamente utilizadas e primordialmente desenvolvidas para a purificação de proteínas, possuem poros inadequados para moléculas da ordem de micromêtros, como o pDNA, resultando em limitações de transferência interna de massa, que são responsáveis pela baixa recuperação e capacidade de adsorção (Diogo et al., 2005). Cromatografias utilizando membranas derivatizadas com grupos funcionais como adsorventes na purificação de biomoléculas têm sido descritas desde 1988 e o número de publicações sobre o assunto (uma centena até 2002) confirmam seu potencial (Bueno e Miranda, 2005). Este tipo de fase estacionária já foi descrita na purificação de pDNA (Haber et al., 2004; Pereira et al., 2010; Guerrero-Germán et al., 2011) e juntamente com outros tipos de matrizes macroporosas (e.g., monólitos) (Souza et al., 2010; Smerekar et al., 2010) são uma tendência no desenvolvimento de processos para purificação desta molécula.

1.2 Colocação do problema

Normalmente as etapas de recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) terapêuticos correspondem de 50-80% de seu custo de produção (Lowe et al.,

2001). No caso de produtos biotecnológicos, como o de proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais as etapas de RPB chegam a representar até 80-90% dos custos do processo. A cada etapa de RPB ocorre certa perda de produto e essas perdas podem ser substanciais em um processo em multi-etapas (Doran, 1995). Ademais, operações e processos com muitas etapas devem ser evitados para diminuir custos de despesas gerais, amortização de equipamento e encargos trabalhistas (Wheelwright, 1987). Portanto, quanto mais operações unitárias envolvidas, maior o custo do processo, maiores as perdas do produto de interesse e menor o rendimento global do processo.

Devido as similaridades físico-químicas existentes entre o pDNA e as principais impurezas em um lisado celular (RNA, gDNA, proteínas e endotoxinas) e, ao fato do primeiro constituir menos do que 3% do lisado neutralizado em contrapartida aos 82% das principais impurezas, sua purificação se demonstra um desafio (Diogo et al., 2005), ainda mais em etapa única.

Processos de purificação de pDNA relatados na literatura normalmente contém etapas de recuperação intermediárias de precipitação com sulfato de amônio e/ou isopropanol no lisado neutralizado, sendo então denominado lisado clarificado, e em sua maioria também usam esse mesmo sal na fase móvel das cromatografias utilizadas nas purificações finais. A utilização de sulfato de amônio e do 2-propanol, devido ao impacto ambiental causado por estes dois reagentes, encarece o processo global devido à necessidade de tratamento do efluente líquido. Somente a exclusão da etapa de precipitação com isopropanol na purificação de pDNA significaria uma redução de 14% no custo global de matéria-prima, redução de 70% do impacto ambiental do processo associado com o uso e descarte deste solvente e, redução de 32% de custos associados com o tratamento de efluentes líquidos (Freitas et al., 2006a).

A substituição do sulfato de amônio por sais cosmotrópicos menos poluentes na formulação de tampões de adsorção já foi estudada anteriormente na purificação de pDNA por cromatografia de interação hidrofóbica utilizando adsorvente fenil-agarose com alta densidade de ligantes (Freitas, 2007). Neste estudo concluiu-se que fases móveis constituídas por citrato de sódio, citrato de potássio e fosfato de potássio permitiam a purificação de pDNA a partir de lisado

pré-purificado (clarificado). Desta maneira, ampliar este estudo através da utilização das mesmas fases móveis na purificação do pDNA partindo-se do lisado neutralizado é economicamente e ambientalmente interessante.

Além da questão ambiental, são relatados problemas relacionados à baixa recuperação e capacidade de adsorção inerentes aos adsorventes baseados em agarose utilizados na purificação cromatográfica de pDNA. Tais inconvenientes precisam ser contornados, para tal é necessário o desenvolvimento de adsorventes macroporosos e que propiciem purificações com maior rendimento, recuperação e sejam economicamente viáveis.

Assim, se faz necessário o estudo em duas frentes importantes no desenvolvimento de novos processos de purificação de pDNA ambientalmente e economicamente mais favoráveis: (1) diminuição do número de etapas, sendo estas livres de 2-propanol e com a substituição do sulfato de amônio por sais caotrópicos menos agressivos ao meio-ambiente; (2) adsorventes não baseados em agarose, que tenham poros adequados ao tamanho do pDNA e sejam passíveis de derivatizações para a funcionalização de ligantes que promovam a separação eficiente do pDNA.

1.3 Objetivo

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um processo cromatográfico de purificação de pDNA a partir do lisado neutralizado utilizando cromatografia de interação hidrofóbica com ligante fenil e de interação tiofílica aromática com o ligante 2-mercaptopirimidina. Estas duas técnicas cromatográficas foram escolhidas como operação unitária na purificação de pDNA por apresentarem a capacidade tanto de isolar o pDNA de suas impurezas quanto de resolver entre as isoformas (Lemmens et al., 2003; Freitas, 2007), capacidades estas, imprescindíveis para um processo de purificação que visa a obtenção da molécula de interesse em etapa única.

Os tampões de adsorção utilizados foram o citrato de sódio e o fosfato de potássio por serem descritos como menos danosos ao meio ambiente que o

sulfato de amônio e pelos resultados positivos de seus usos relatados na literatura (Gomes et al., 2009; Freitas et al., 2008; Ribeiro et al., 2002; Schwarz, 1996).

O plasmídeo utilizado neste estudo foi o pVAX1GFP, pois possui todas as estruturas gênicas necessárias a um vetor para estudos de terapia gênica e vacinação com DNA, já tendo servido como modelo em trabalhos publicados.

Inicialmente, os ligantes foram imobilizados em agarose, pela maior facilidade de se trabalhar com este tipo de matriz. Após a determinação da combinação ligante/tampão de adsorção que promoveu a melhor purificação de sc pDNA em agarose, imobilizou-se tal ligante em membrana de celulose, que por possuir poros maiores do que a agarose (da ordem de micrometros e nanômetros, respectivamente) permite utilização integral da superfície interna e transporte convectivo da molécula-alvo aos sítios de ligação no interior dos poros.

Buscou-se, assim, o desenvolvimento de um processo sem precedentes na literatura, ambientalmente e economicamente mais favorável e com padrão farmacológico (Figura 1.1).

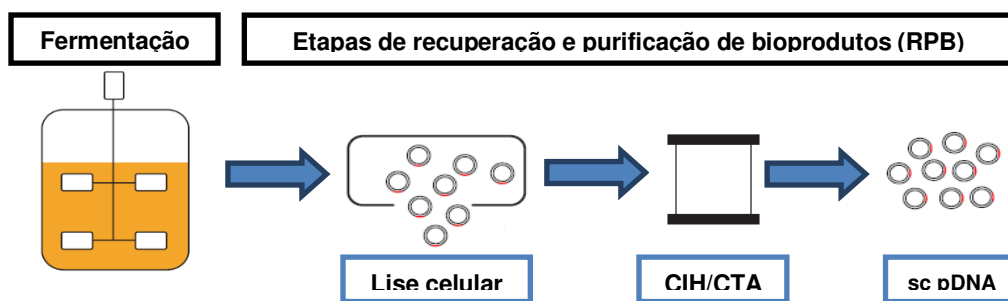


Figura 1.1. Fluxograma do processo genérico de RPB proposto neste trabalho. Adaptado de Ferreira et al. (2000). CIH: Cromatografia de interação hidrofóbica; CTA: Cromatografia de interação tiofílica aromática; sc pDNA: plasmídeo na isoforma super enovelada purificado.

1.4 Etapas desenvolvidas

O plano de trabalho foi dividido em sete etapas (Figura 1.2):

- a) Estudo preliminar para seleção das fases móveis de melhor resultado na purificação de pDNA por CIH utilizando agarose com baixa densidade de ligantes fenil. Essa resina foi escolhida devido a sua comprovada capacidade de purificar pDNA com padrão farmacêutico a partir de lisado clarificado (Moreira et al., 2005) (**Etapa 1**).
- b) Implementação dos métodos analíticos para a verificação da qualidade de pDNA (eletroforese em gel de agarose, quantificação de pDNA, proteínas, gDNA e endotoxinas) para a realização dos estudos completos de adsorção e dessorção de pDNA por CIH e CTA (**Etapa 2**).
- c) Utilização das fases móveis selecionadas (**Etapa 1**) em experimentos cromatográficos, ditos completos, para a purificação de pDNA alimentando-se a coluna cromatográfica com o lisado neutralizado (**Etapa 3**). Estes experimentos foram nomeados “completos”, pois foi feita a avaliação da qualidade do pDNA purificado (**Etapa 2**). Foram experimentados dois tipos de cromatografia baseadas em matriz de agarose: cromatografia de interação hidrofóbica com o adsorvente fenil-agarose com baixa densidade de ligantes (**Etapa 3.1**); cromatografia tiofílica aromática com o adsorvente mercaptopirimidina-agarose (**Etapa 3.2**).
- d) Estudo da cromatografia com o ligante 2-mercaptopirimidina por esta ter apresentado os melhores resultados de purificação de pDNA (**Etapa 3.2**) em adsorvente baseado em matriz de membrana de celulose (**Etapa 4**).
- e) Estudo completo de otimização da cromatografia tiofílica com o adsorvente mercaptopirimidina-celulose (**Etapa 4**) utilizando maior vazão volumétrica e uma estratégia de eluição (em degrau) diferente das utilizadas nas etapas anteriores de trabalho (em gradiente) (**Etapa 4.1**).

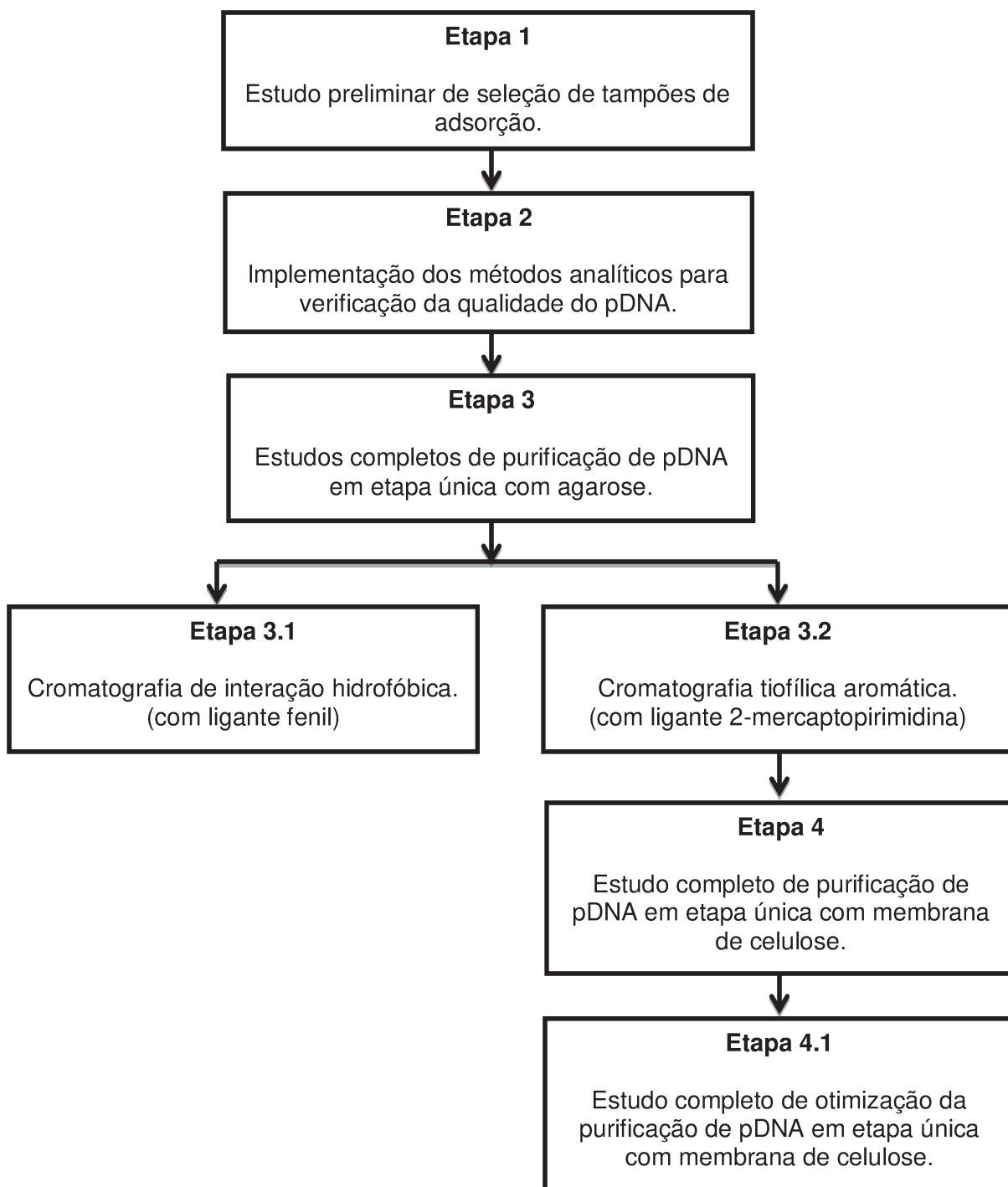


Figura 1.2. Diagrama esquemático representando as etapas do trabalho desenvolvido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão revisados assuntos pertinentes ao melhor entendimento dos tópicos acerca deste trabalho, como a vacinação e terapia gênica, as propriedades físico-químicas e biológicas do pDNA, sua produção e os processos envolvidos na sua purificação visando grau-farmacêutico. Dentre os processos discutidos, a cromatografia de interação hidrofóbica e tiofílica aromática serão detalhadas, já que são as técnicas cromatográficas utilizadas neste trabalho para a purificação de pDNA.

2.1 Terapia gênica e vacinação com DNA

Terapia gênica é uma estratégia na qual ácidos nucleicos são introduzidos nas células humanas com a finalidade de modificar o repertório genético destas (Ferreira et al., 2000) seja restaurando, inibindo, aumentando ou introduzindo uma função bioquímica (Guerrero-Gérman et al., 2009). O princípio desta técnica foi primeiramente relatado na década de 70 (Voß et al., 2005) e abriu perspectivas para a cura ou tratamento de desordens monogênicas, como fibrose cística, doenças cardiovasculares, auto-imunes e câncer (Flotte, 2007; Kelly, 2003).

Mais de 1600 testes clínicos com terapia gênica foram concluídos, aprovados ou estão em andamento, sendo que a grande maioria destas era destinada a terapia de câncer (64,5%), além de doenças cardiovasculares (8,7%) e monogênicas (8,2%) (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical>, acessado em 20/05/2011). O primeiro produto de terapia gênica para uso clínico, Gendicine, um vetor adenovírus carregando o gene p53 para o tratamento de câncer, foi aprovado pela “Chinese State Food and Drug Administration” em

outubro de 2003, seguido pela sua licença de produção comercial em 2004 (Edelstein et al., 2007).

O maior objetivo da terapia gênica é que os genes introduzidos atinjam uma expressão estável e regulada no tecido alvo pelo tempo que for necessário para a profilaxia da doença, sem causar efeitos adversos, toxicidade ou transformação celular carcinogênica (Gardlík et al., 2005). A transferência gênica (“gene delivery”) normalmente é feita através de vetores virais ou não virais (Gomes et al., 2009). Ambos tipos de vetores têm a capacidade de transportar os genes terapêuticos para o núcleo da célula ou tecido alvo.

Vetores virais são a base da primeira geração de terapias gênicas (Rubanyi, 2001). Geralmente esses vírus são modificados pela deleção de genes essenciais de replicação e construção de novos vírus. Adenovírus e retrovírus são os mais usados para esta finalidade (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical>, acessado em 20/05/2011). Porém, existem dúvidas com relação ao perfil de segurança de tais vetores, devido ao risco de integração no genoma do hospedeiro, possibilidade de ativação de oncogenes, imunogenicidade e respostas inflamatórias (Anderson, 1998; Luo e Saltzman, 2000). Além disso, algumas mortes de pacientes em ensaios clínicos de terapias gênicas diferentes foram reportadas na literatura (Fox, 1999).

Pelas razões expostas anteriormente, sistemas de transferência gênica não virais têm se tornado cada vez mais desejáveis (Luo e Saltzman, 2000), sendo o sistema de “delivery” mais atrativo para produtos comerciais (Mountain, 2000). Desde 1995 verificou-se um substancial aumento no uso destes vetores em testes clínicos, especificamente os plasmidiais (pDNA) que, em 2004 representavam 14% dos vetores utilizados em terapia gênica, atingindo atualmente uma participação de 18,3% (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical>, acessado em 20/05/2011).

Vetores não virais, como o pDNA “nú” ou encapsulado em lipossomas constituem uma alternativa com menores riscos à saúde do hospedeiro quando comparados com os vetores virais, devido a sua baixa toxicidade e imunogenicidade (permitindo a ocorrência de tratamentos múltiplos) e por serem de fácil produção (Guerrero-Gérman, 2009). As terapias com este tipo de vetor

têm sido reconhecidas como seguras e de qualidade pelas agências reguladoras, como o FDA e o WHO (Tianen, 2007). A desvantagem desta estratégia de transporte gênico está na sua baixa eficiência de transfecção e, como resultado disso, grandes quantidades de plasmídeos devem ser entregues às células alvo para que a transferência gênica seja eficiente. Estima-se que apenas uma em cada 1000 moléculas de plasmídeo chega ao núcleo celular e é expressa (Crystal, 1995). Terapias gênicas em andamento para fibrose cística usam doses tão altas quanto 1,25 mg de pDNA; outro exemplo é a dose para a terapia de isquemia dos membros inferiores que utiliza doses de cerca de 4 mg. Além disso, administrações repetidas destas doses serão necessárias, pois plasmídeos raramente se integram no genoma do hospedeiro, permanecendo como um elemento extracromossomal transiente no núcleo (Duarte et al., 2007; Listner et al., 2006; Prather et al., 2003).

Há mais de 18 anos, Tang et al. (1992) reportaram pela primeira vez a utilização de pDNA contendo genes para a codificação de antígenos para desencadear respostas imunes em camundongos, criando o conceito de vacinação com DNA, que hoje evoluiu até o ponto de ser considerada uma abordagem válida para a profilaxia de diversas patologias, incluindo doenças infecciosas e tumores (Oliveira et al., 2009).

As vacinas gênicas, além da imunidade humoral e celular específica, oferecem vantagens adicionais em relação às vacinas clássicas, como: (1) a síntese dos antígenos endógenos ocorre com características estruturais muito semelhantes à molécula nativa sintetizada pelo patógeno; (2) a imunidade adquirida persiste por longo período de tempo devido à constante produção do antígeno dentro da célula hospedeira e à capacidade destes estimularem linfócitos de memória imunológica; (3) outros genes podem ser clonados no plasmídeo contendo o gene do agente infeccioso, como, por exemplo, os de componentes estimuladores da resposta imune (IL-2, IL-12 e IFN- γ) que auxiliam no processo de reconhecimento antigênico entre as células apresentadoras de antígenos e os linfócitos e (4) em termos econômicos, o custo de produção das vacinas gênicas é significativamente menor do que o custo de produção das vacinas recombinantes, peptídeos sintéticos e outras (Silva et al.; 2004).

Três importantes produtos de vacinas de DNA foram aprovados, todos de aplicação veterinária, sendo elas: (1) proteção de salmões contra o vírus da necrose hematopoética; (2) prevenção em cavalos contra a infecção pelo vírus do oeste do Nilo; (3) melanoma em cães (Moss, 2009). Além disso, outros 13 produtos estão em estudos clínicos ou entraram em testes clínicos (Weiner, 2006). Doenças humanas como malária (Wang et al., 1998), ebola (Martin et al., 2006), H1N1 (Kodihalli et al., 1999; Hoare et al., 2005), AIDS (Mwau et al., 2004), isquemia crítica dos membros (Morishita et al., 2004) e câncer (Tagawa et al., 2004) são exemplos de doenças humanas alvos destes testes.

Para que o pDNA possa ser utilizado nos estudos ou como produtos para terapia gênica e vacinação com DNA é necessário que este se enquadre nos parâmetros estipulados pelas agências reguladoras (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Especificações e análises recomendadas para preparações de pDNA para aplicação em terapia gênica. Adaptado de Diogo et al. (2005).

Parâmetro	Critério de aceitação	Método
Aparência	Claro, solução incolor	Inspeção visual
Identidade do plasmídeo	Mapa de restrição esperado	Sequenciamento, PCR
Concentração do pDNA	Depende da aplicação	A ₂₆₀ , HPLC, fluorescência
Homogeneidade do pDNA	> 90% de sc pDNA	AGE [*] , CGE ^{**} , HPLC
Presença de proteínas	< 3 µg/mg pDNA	Ácido Bicinconínico (BCA)
Presença de RNA	Não detectável	AGE [*] 0.8%
Presença de gDNA	< 2 µg/mg pDNA	Hibridização, PCR, fluorescência
Presença de endotoxinas	< 10 UE/mg pDNA	LAL ^{***}

* Eletroforese em gel de agarose, ** Eletroforese capilar em gel, *** *Limulus Amebocyte Lysate*, UE: Unidades de endotoxina, PCR: reação em cadeia da polimerase.

Devido à potencialidade apresentada pelos vetores plasmidiais e com a crescente demanda por grandes quantidades de pDNA devido ao aumento de produtos em testes clínicos e no mercado, se faz necessário o estabelecimento de

processos de produção e purificação de pDNA de grau farmacêutico em larga escala que atendam as exigências das boas práticas de manufatura e de agências reguladoras, resultando em produtos efetivos e economicamente viáveis.

2.2 Propriedades físico-químicas e biológicas de plasmídeos (pDNA)

Plasmídeos são moléculas de DNA extracromossômicas, normalmente circulares, de fita dupla, cujo tamanho varia de 200 até 100.000 pares de bases, que existem naturalmente tanto em células eucarióticas quanto em procarióticas (Schmidt et al., 2001). Estas moléculas se replicam independentemente do cromossomo do hospedeiro e são encontradas em quase todas as espécies de bactérias, nas quais exercem um papel adaptativo e evolutivo importante (Schumann, 2001), apesar de não codificarem para genes essenciais à sobrevivência da célula em condições não seletivas (Griffiths, 2002).

A grande maioria dos pDNAs isolados de bactérias são círculos covalentemente fechados (ccc: “covalently closed circles”) que são superenovelados negativamente (ou seja, no sentido oposto de giro da dupla fita de DNA, que é para direita), por isso denominados isoforma superenovelada (sc: “supercoiled”) (Schmidt et al., 2001). Esse tipo de enovelamento negativo é vantajoso porque promove o desenrolamento e separação das fitas complementares durante a transcrição (Souza et al., 2008c). Essa isoforma possui uma estrutura compacta, na qual a fita dupla de DNA se enrola ao redor de si mesma, mantendo intactas e fechadas covalentemente ambas as fitas (Figura 2.1). O rompimento de uma das fitas de DNA, seja por ação de nucleases ou por estresse mecânico, resulta na isoforma circular aberta (oc: “open circular”) devido a perda de enovelamento. A isoforma oc é completamente relaxada e conseqüentemente, menos compacta. Quando ocorre a quebra de ambas as fitas na mesma posição, o plasmídeo fica linearizado (Schmidt et al., 2001).

Como citado no parágrafo anterior, as isoformas linear e circular aberta são oriundas de danos na estrutura superenovelada, que é naturalmente intacta e energeticamente mais favorável à replicação e transcrição gênica (Souza et al.,

2008c). Por isso regulamenta-se que exista mais de 90% da isoforma sc nas formulações de terapia gênica e vacinação com DNA, já que esta isoforma induz à transfecções mais eficientes e melhores taxas de expressão em células eucarióticas (Souza et al., 2007).

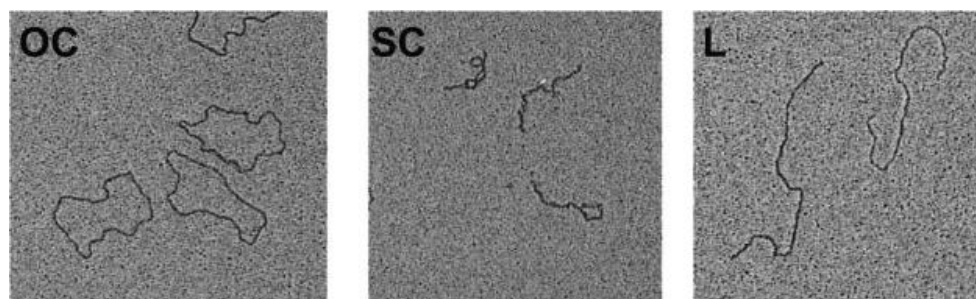


Figura 2.1. Imagem de microscopia eletrônica das três isoforma de pDNA, sendo oc: “open circular”; sc: “supercoiled”; l: “linear”. Adaptado de Molloy et al. (2004).

Como toda molécula de DNA, o pDNA possui uma estrutura exterior hidrofílica constituída por açúcares (desoxirriboses) e grupamentos fosfatos, sendo que este último, a pH maior que 4, é responsável pelo seu caráter polianiônico. O interior da cadeia é um ambiente hidrofóbico devido aos grupos aromáticos das bases nitrogenadas que interligam as duas fitas através de pontes de hidrogênio (Lehninger et al., 2006).

Os plasmídeos utilizados nas terapias gênicas e vacinação com DNA, apresentam normalmente um tamanho entre 3.300-6.600 kDa (5-10 kpb, respectivamente) e um raio hidrodinâmico de cerca de 150-250 nm (Levy et al., 2000). Além disso, também apresentam tipicamente uma origem de replicação bacteriana, um promotor eucariótico, sítios multiclonais, gene repórter e/ou gene de interesse, sequência de poliadenilação e gene de seleção (Prather et al., 2003).

2.3 Processo de produção e RPB empregados na obtenção de pDNA com padrão farmacêutico

2.3.1 Fermentação e lise celular

Na fermentação para a produção de pDNA, comumente utiliza-se a *Escherichia coli* transformada com o plasmídeo de interesse, que é multiplicada até uma concentração celular ideal, enquanto o pDNA é replicado autonomamente no meio intracelular. O isolamento primário consiste na coleta das células cultivadas, seja por centrifugação ou filtração, seguido por uma etapa de lise celular. O método de lise mais empregado é a lise alcalina (Birboim e Doly, 1979) ou adaptações desta (Holmes e Quigley, 1981). Basicamente esta etapa compreende a ruptura das células a elevado pH com NaOH na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), que leva a liberação do pDNA, gDNA desnaturado, parede celular e proteínas celulares. Em decorrência do pH alto, o pDNA sofre desnaturação reversível de sua estrutura. A etapa seguinte é a de neutralização com acetato de potássio, que ocasiona a renaturação do pDNA e a precipitação do SDS juntamente com os debrís celulares e o gDNA, que devido à desnaturação está na forma de fita simples (Diogo et al., 2005). Durante essas etapas de lise e neutralização deve-se evitar a clivagem do gDNA por cisalhamento, o que resultaria em fragmentos da ordem de tamanho do pDNA, dificultando a separação destas moléculas (Freitas, 2007).

Em escala laboratorial existem muitos protocolos e kits comerciais disponíveis para a purificação de pDNA, porém eles não são adequados para serem usados em larga escala para fins terapêuticos, devido a utilização de reagentes tóxicos ou por dificuldades na ampliação de escala do processo (Duarte et al., 2007). Muitas destas estratégias envolvem o uso de solventes orgânicos (eg. fenol, clorofórmio e isopropanol), reagentes tóxicos (eg., cloreto de cério e brometo de etídio) ou enzimas (eg., lisozima, proteinase K e RNase) (Freitas et al., 2006b).

Muitos processos têm sido descritos e propostos na literatura para a recuperação e purificação em larga escala do pDNA, geralmente, compreendendo

as seguintes etapas: recuperação da massa celular, lise celular, clarificação e concentração e purificação final (Figura 2.2) .

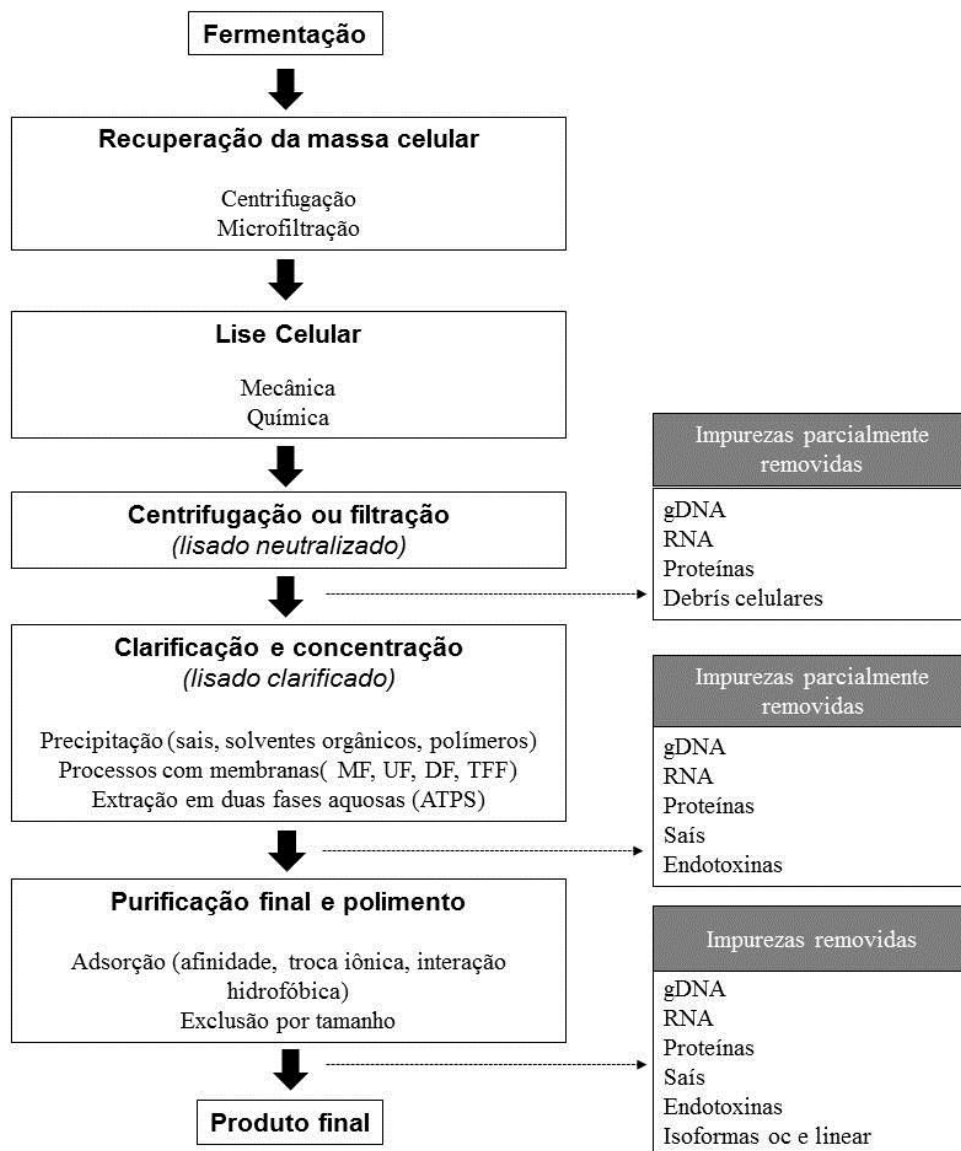


Figura 2.2. Fluxograma do processo típico de purificação em larga escala de sc pDNA. As operações unitárias consideradas no processo estão indicadas juntamente com as impurezas eliminadas em cada etapa. Adaptado de Ferreira et al. (2000). MF: microfiltração; UF: ultrafiltração; DF: diafiltração e TFF: filtração tangencial.

Apenas seis trabalhos disponíveis na literatura propuseram processos de purificação a partir do lisado neutralizado (lisado resultante da lise alcalina seguido de neutralização e centrifugação), sendo que em três deles (Tan et al., 2007a; Tan et al., 2007b; Deshmukh e Lali, 2005) o lisado neutralizado foi purificado com etapa cromatográfica, enquanto que nos outros utilizou-se extração em duas fases aquosas (“aqueous two phase system”- ATPS) (Gomes et al., 2009; Kepka et al., 2004, Ribeiro et al, 2002).

Os trabalhos que utilizaram etapa cromatográfica para a purificação do lisado neutralizado não fizeram análises completas da qualidade do pDNA obtido. Deshmukh e Lali (2005) utilizaram matriz de celulose reticulada como adsorvente (não descrevem o processo de derivatização) e sulfato de amônio 2 mol/L como tampão de adsorção. Os autores descreveram recuperação de 55% do pDNA e analisaram sua qualidade apenas por eletroforese em gel de agarose e quantificação de proteínas. Tan e colaboradores (2007a) purificaram o pDNA diretamente do lisado neutralizado utilizando IMAC com o metal Cu^{2+} quelatado em ácido iminodiacético (IDA) e posterior precipitação do pDNA com CuCl_2 . Após as operações de cromatografia e precipitação, os autores relataram um rendimento final de 92%, 96% de remoção do RNA e remoção de endotoxinas acima de 99%, porém não realizaram análises no tocante a contaminação de proteínas e gDNA.

Dentre os trabalhos com ATPS, destaca-se o de Gomes e colaboradores (2009) que obtiveram valores de recuperação de pDNA em torno de 90%, porém com pureza relativa de apenas 17%. Normalmente as etapas cromatográficas são usadas depois que as impurezas e o volume do processo são reduzidos nas etapas de clarificação e concentração, respectivamente (Ferreira et al., 1999). Praticamente todos os outros trabalhos com purificação de pDNA com padrão farmacêutico utilizam o lisado clarificado (pré-purificado).

2.3.2 Constituição do lisado neutralizado e características das principais impurezas

A constituição do lisado neutralizado é o que governará as escolhas pelas operações unitárias que compreenderão o processo RPB do pDNA de padrão farmacêutico. Por isso, conhecer as impurezas presentes e suas respectivas propriedades físico-químicas é essencial para o projeto do processo. As principais impurezas presentes nesta etapa são: isoformas oc e linear do pDNA, RNA, gDNA, proteínas e endotoxinas (Tabela 2.2).

O gDNA da *E. coli* é uma molécula composta por fita dupla no seu estado natural, porém com a lise celular, sofre desnaturação se tornando uma molécula de fita simples, com maior exposição das bases aromáticas nitrogenadas. Essa maior exposição proporciona um caráter mais hidrofóbico do que o pDNA, já que as bases aromáticas deste último estão enclausuradas no interior da cadeia (Li et al., 2005). No entanto, a remoção do gDNA é particularmente difícil, pois forças cisalhantes durante a lise alcalina e neutralização fragmentam a molécula, podem reduzir seu tamanho nativo (4500 kpb) para um tamanho na faixa da grandeza de um pDNA (Freitas, 2007). Além da massa molecular, o gDNA pode se assemelhar ao pDNA pela carga negativa.

Tabela 2.2. Composição típica do lisado celular e características físico químicas dos principais componentes. Adaptado de Diogo et al. (2005).

Molécula	Conteúdo no lisado (m/m)	Tamanho (kDa)	Características principais
Plasmídeo	< 3%	$\sim 3,9 \times 10^3^*$	Polianiônico, dupla cadeia
Proteínas	55%	< 200	Aniônico, catiônico, neutro, hidrofóbico, hidrofílico
gDNA	3%	$\sim 2,9 \times 10^6$	Polianiônico, cadeia simples/dupla, altamente fragmentado
Endotoxinas	3%	10 a 20	Aniônico, hidrofóbico (lipídio A)
RNA	21%	28 a 1000	Polianiônico, cadeia simples
Outros	15%	-	-

*Considerando-se um plasmídeo com 6000 pb.

Endotoxinas (ET) são lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular externa de bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*. Normalmente, possuem uma estrutura dividida em três subunidades (Figura 2.3): cadeia O-específica (região onde ocorre repetição de oligossárideos específicos de cada cepa bacteriana), núcleo oligossacarídeo e domínio lipídico (lipídio A). Por isso, estas moléculas possuem caráter anfifílico e podem se assemelhar ao pDNA pela carga e pela hidrofobicidade, ambas semelhanças devidas as regiões compostas por ácidos fosfóricos aniônicos e hidrofóbicas do lipídio A, respectivamente (Tan et al., 2007b). A grande preocupação na remoção destas moléculas é garantir que sua concentração na formulação final do pDNA não ultrapasse a quantidade prevista pelas agências reguladoras (< 5 unidades de endotoxina por quilograma de massa corporal). As endotoxinas são responsáveis por causarem respostas pirogênicas em humanos quando presentes em pequenas quantidades, e até choque séptico irreversível, quando presentes em doses altas (Petsch e Anspach, 2000). Outro inconveniente da contaminação por ET é que estas podem diminuir drasticamente as eficiências de transfecção em linhagens celulares (Davis et al., 1996).

As moléculas de RNA são polianiónicas de fita simples e representam a principal impureza em preparações de pDNA em larga escala (Freitas, 2007). Apesar de serem mais hidrofóbicas do que o pDNA, devido a maior exposição das bases nitrogenadas, estas duas moléculas se assemelham na carga negativa (Souza et al., 2008b).

As proteínas são as impurezas mais heterogêneas que o lisado neutralizado contém. No caso de se utilizar processos cromatográficos para a RPB do pDNA, dependendo do princípio que o método explora, as proteínas podem competir por sítios de adsorção, diminuindo a capacidade da resina de adsorver a molécula alvo. Exemplos destes métodos são as cromatografias por troca iônica e de interação hidrofóbica.

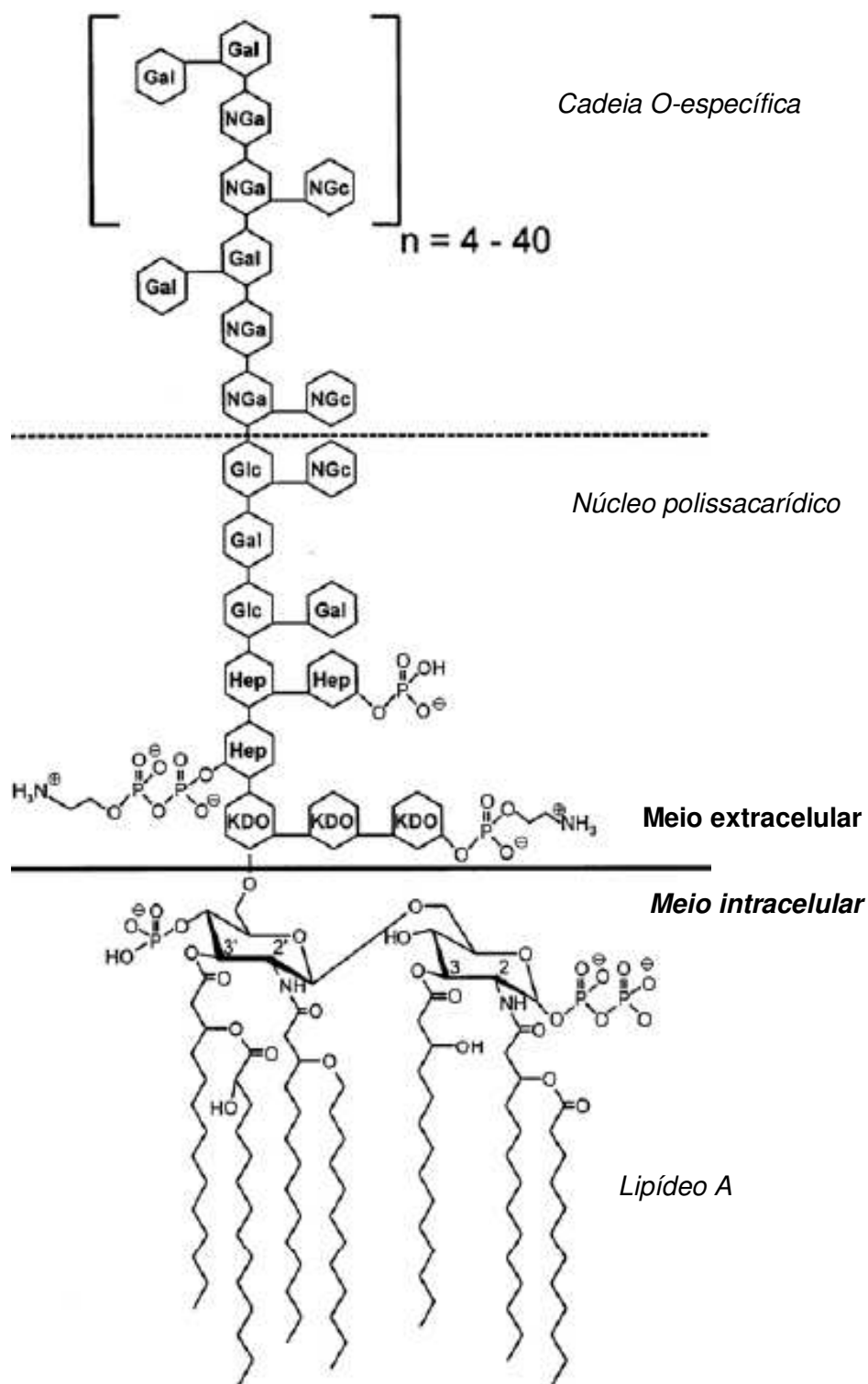


Figura 2.3. Estrutura química de endotoxinas de *E. coli*. (Hep) L-glicerol-D-mano-heptose; (Gal) galactose; (Glc) glicose; (KDO) ácido 2-keto-3-deoxioctonic; (NGa) N-acetil-galactosamina; (NGc) N-acetil-glucosamina. Adaptado de Magalhães et al. (2007).

2.3.3 Processos de clarificação e concentração de lisados comumente empregados na RPB de pDNA

As etapas seguintes à lise celular são a de clarificação e a concentração (recuperação). Elas são projetadas para a remoção de proteínas e ácidos nucléicos e para aumentar a fração mássica de pDNA. Nestas etapas inúmeras operações unitárias são descritas, como precipitações - com isopropanol (Diogo et al., 2000a; Diogo et al., 2000b; Diogo et al., 2001; Freitas et al., 2006a; Freitas et al., 2006b), poli(etileno glicol) (PEG) (Horn et al., 1995; Horn et al., 1998; Marquet et al., 1996) e cetil tri-metilamônio (CTBA) (Lander et al., 2002), ATPS (Kepka et al., 2004; Gomes et al., 2009; Trindade et al., 2005; Ribeiro et al., 2002)- e filtração tangencial (TFF - “tangential flow filtration”) (Kahn et al., 2000, Kendall et al., 2002, Eon-Duval et al., 2003; Eon-Duval e Burke, 2004).

Existem inúmeros trabalhos que descrevem a utilização da precipitação “seriada” com isopropanol e sais cosmotrópicos, como o sulfato de amônio (Souza et al., 2007; Freitas et al., 2008; Diogo et al., 2000a, Diogo et al., 2000b; Souza et al., 2006; Moreira et al., 2005; Pereira et al., 2010), acetato de amônio (Bhikhabhai, 2002), cloreto de cálcio (Eon-Duval et al., 2003) e cloreto de lítio (Li et al., 2007).

Precipitação e ATPS são as operações unitárias mais comumente utilizadas nesta etapa. Elas são capazes de promover redução substancial do volume de trabalho, apesar de ambas possuírem baixa seletividade. Além disso, esses métodos se baseiam no uso de grandes quantidades de álcoois, polímeros e sais, que são caros, agregam periculosidade ao processo e contribuem para a contaminação do ambiente (Guerrero-Gérmán et al., 2009).

Outra operação bem difundida na purificação de pDNA é a filtração tangencial, que tem como principais vantagens a escalabilidade, reprodutibilidade, baixo custo de operação e a não utilização de reagentes complexos (Freitas, 2007).

Freitas et al. (2009) estudaram o desempenho técnico, viabilidade econômica e impacto ambiental das técnicas de precipitação com isopropanol e sulfato de amônio, TFF e ATPS na purificação de pDNA. Os autores concluíram que a

técnica com melhores resultados de rendimento e fatores de purificação foi a ATPS, porém os altos custos de operação e impacto ambiental se mostraram como desvantagens.

2.3.4 Processos cromatográficos empregados na RPB de pDNA

A purificação final de pDNA é normalmente realizada com o emprego de técnicas cromatográficas, pois o produto final deve se enquadrar nas rígidas orientações propostas pelas agências reguladoras para aplicações farmacêuticas. A cromatografia é conhecida como um processo eficiente, robusto, reprodutivo e completamente escalonável no âmbito de bioprocessos (Aguilar, 2004). Não surpreendentemente, ela é o cerne dos processos utilizados em larga escala para a purificação de pDNA com padrão farmacêutico (Diogo et al., 2005).

Muitas técnicas cromatográficas são empregadas individualmente ou integradas para se atingir a pureza final necessária da biomolécula de interesse, como exclusão por tamanho (CET) (Horn et al., 1995; Ferreira et al., 1997; Li et al., 2007), troca iônica (CTI) (Prazeres et al., 1998; Ferreira et al., 1999; Varley et al., 1999; Ferreira et al., 2000; Eon-Duval e Burke, 2004; Tiainen et al., 2007; Guerrero-Gérman et al., 2009) interação hidrofóbica (CIH) (Diogo et al., 2000a; Diogo et al., 2000b; Diogo et al., 2003; Li et al., 2005; Deshmukh e Lali, 2005; Moreira et al., 2005; Freitas et al., 2008; Pereira et al., 2010), interação com íons metálicos imobilizados (IMAC) (Murphy et al., 2003a; Tan et al., 2007a; Tan et al., 2007b), interação tiofílica aromática (CTA) (Lemmens et al., 2003; Sandberg et al., 2004) e afinidade (Wils et al., 1997; Schluep e Cooney, 1998; Woodgate et al., 2002; Ghose et al., 2004; Souza et al., 2005; Souza et al., 2007; Souza et al., 2008a; Souza et al., 2008b, Souza et al., 2009a, Souza et al., 2009b).

Os processos cromatográficos citados, em sua maioria utilizam resinas destinadas a purificação de proteínas, já que são fases estacionárias disponíveis comercialmente. Geralmente as proteínas são globulares e medem em torno de 2-10 nm, enquanto os plasmídeos possuem tamanhos na ordem de 200 nm e sua estrutura é intermediária entre uma espiral flexível e um enovelado rígido. Devido

a isso, o pDNA tem coeficientes difusionais menores que os das proteínas, resultando em coeficientes menores de transferência de massa. Devido ao fato dos poros das fases estacionárias não terem sido fabricados para lidar com moléculas tão grandes, essas limitações de transferência interna de massa resultam em picos alargados, baixa recuperação e capacidade de adsorção (Diogo et al., 2005). Para tal, são necessárias a utilização de baixas vazões volumétricas e gradientes amplos de eluição, levando a longos tempos de separação (Huber, 1998).

As deficiências ligadas aos baixos coeficientes de difusão e capacidade de adsorção podem ser parcialmente superados com a compactação do pDNA ou pela utilização de fases estacionárias com poros maiores (Diogo et al., 2005). A primeira estratégia utiliza alta concentração de sais cosmotrópicos para a compactação do pDNA, condição imprescindível também para que as interações hidrofóbicas ocorram entre o adsorvente e a molécula alvo durante a cromatografia no caso da CIH, mas indesejável na CTI.

A CET é amplamente descrita na literatura nas etapas de polimento e troca de tampão, porém também já foi descrita em etapas após a lise celular, para separar o conteúdo do lisado em dois picos, sendo o primeiro pico constituído por pDNA e gDNA e o segundo por RNA e outras moléculas pequenas (procedimento denominado “separação de grupos”) (Stadler et al, 2004; Prazeres et al., 1999; Ferreira et al., 1997). Outra abordagem de CET denominada “high salt”, utilizou sulfato de amônio a 2 mol/L como fase móvel, promovendo a separação do pDNA do RNA e gDNA através da adsorção destas impurezas na matriz de agarose (Li et al., 2007). Mesmo se tratando de um processo cromatográfico, no qual tradicionalmente não se tem o fenômeno da adsorção, esses autores relataram que a alta concentração salina utilizada na fase móvel promoveu adsorção, através de interações hidrofóbicas, entre as bases nitrogenadas altamente expostas das cadeias simples de RNA e gDNA com a matriz, mesmo esta possuindo caráter hidrofílico. As vantagens da CET são a capacidade de separar o pDNA do RNA e outras impurezas pequenas e ser uma poderosa técnica de polimento. Porém, a resolução do método é baixa, produz altas taxas de diluição

da molécula de interesse e propicia a co-eluição das isoformas indesejáveis e gDNA com o sc pDNA (Souza et al., 2008b).

A CTI é aplicada tanto na escala preparativa quanto na analítica e tem a capacidade de resolver as isoformas de pDNA (Souza et al., 2008b). Esta técnica é normalmente empregada após etapas de pré-purificação como TFF, ATPS e CIH (Eon-Duval e Burke, 2004; Kepka et al., 2004; Urthaler et al., 2005). Apesar de ser um método de purificação rápido e simples que permite a concentração do pDNA, muitas fases estacionárias exibem baixa capacidade de resolução entre o pDNA e impurezas como RNA e endotoxinas (Souza et al., 2006).

Cromatografias de afinidade utilizando aminoácidos imobilizados também já foram aplicados na purificação de pDNA. Histidina imobilizada em agarose propiciaram a remoção das impurezas provenientes do lisado clarificado (pré-purificado por precipitação sequencial com 2-propanol e 2,5 mol/L de sulfato de amônio) e separação das isoformas oc e sc em um gradiente decrescente de sulfato de amônio (Souza et al., 2005; Souza et al., 2006). Arginina imobilizada em agarose também já foi descrita na literatura para a purificação de pDNA partindo-se do lisado clarificado (Souza et al., 2008a; Souza et al., 2009b), na qual obteve-se uma ótima resolução entre as isoformas. Os mecanismos envolvidos nesse tipo de cromatografia não são apenas interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre o suporte o pDNA, mas também ocorre um bioreconhecimento das bases nitrogenadas pela arginina (Souza et al., 2008a; Souza et al., 2008b). Souza et al. (2009a) descreveram que lisina imobilizada em agarose foi capaz de seletivamente adsorver e dessorver a isoforma sc de pDNA, ao se alimentar a coluna com pDNA purificado por kit comercial que continha tanto a isoforma de interesse quanto a oc.

A CIH é extensamente descrita em processos de purificação de pDNA (Freitas et al., 2008; Iuliano et al., 2002; Diogo et al., 2003; Diogo et al., 2000b; Diogo et al., 2000a; Diogo et al., 2001) devido a sua excelente capacidade de separar o pDNA das impurezas e será melhor discutida nos tópicos seguintes.

A CTA, ao contrário das outras técnicas cromatográficas, não é extensamente descrita como processo de purificação de pDNA, mas se mostrou capaz de isolar o pDNA de suas impurezas e inclusive de resolver entre as

isoformas (Lemmens et al., 2003; Sandberg et al., 2004). Esta técnica já foi também descrita como método analítico na quantificação de pDNA (Bennemo et. al, 2009). Além disto, existe um exemplo comercial do emprego da CTA na purificação de pDNA visando aplicações farmacêuticas, que é o kit Plasmid Select (GE Healthcare, Suécia). Por estes motivos, este tipo de cromatografia, juntamente com a CIH, será abordada com maior detalhamento à frente nesta revisão.

2.3.4.1 Cromatografia de interação hidrofóbica (CIH)

2.3.4.2 A interação hidrofóbica

As moléculas de água possuem forte predisposição a formarem ligações de hidrogênio entre si, sendo este comportamento determinante na sua interação com compostos apolares. Quando moléculas de água entram em contato com compostos apolares, tendem a se reorganizar de modo perder o mínimo de ligações de H possíveis com outras moléculas de água. No estado líquido, podem fazer de 3 a 3,5 ligações de H entre si, mas ao redor de um composto inerte (não-polar e incapaz de fazer ligação de H), as moléculas de água podem atingir um estado maior de organização, podendo fazer até 4 ligações de H, formando uma camada de moléculas com estado energético mais alto ao redor deste composto. Esse fenômeno é denominado de “hidratação hidrofóbica” (Israelachvili, 1992). A hidratação hidrofóbica é entropicamente desfavorável, pois o maior ordenamento de moléculas de água ocasiona uma diminuição na entropia ($\Delta S < 0$). A variação na entalpia é pequena quando comparada com o valor $T\Delta S$, ocasionando uma mudança positiva na energia livre ($\Delta G > 0$), conforme a equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Equação 1

Apesar do termo hidrofobicidade significar “fobia de água”, a interação entre moléculas apolares e a água são atrativas, devido as forças de dispersão. Entretanto, a força de atração existente entre as moléculas de água é muito maior (Israelachvili, 1992), sendo, portanto, a responsável pelas interações hidrofóbicas, ou seja, se mais compostos não-polares são colocados em água eles irão se associar espontaneamente, devido ao rearranjo das configurações das pontes de H das moléculas de água circundantes, ocasionando a sobreposição das camadas de hidratação conforme as espécies hidrofóbicas se aproximam (van Oss, 2006; Israelachvili, 1992). Não existem ligações químicas reais entre moléculas hidrofóbicas, a atração entre compostos não-polares no meio aquoso ocorre para minimizar seu contato com as moléculas de água (Akiyoshi, 2002).

A interação hidrofóbica entre compostos não-polares em solução aquosa é entropicamente favorável, pois gera um aumento da entropia ($\Delta S > 0$), resultado do deslocamento de moléculas de água, que antes estavam ordenadas ao redor de da espécie apolar, para uma configuração menos ordenada no seio da solução. Isso implica em uma mudança negativa na energia livre ($\Delta G < 0$). Resumindo, a interação entre duas ou mais moléculas hidrofóbicas em soluções aquosas ocorre espontaneamente e é governada principalmente pela mudança na entropia (Jennissen, 1976).

2.3.4.3 A operação unitária CIH

Cromatografia de interação hidrofóbica é uma valiosa técnica muito empregada na purificação de proteínas, tanto em escala analítica e preparatória, quanto industrial (Wu e Karger, 1996; Sofer e Hagel, 1997; Grund, 1998). O princípio é explorar a separação de acordo com as regiões não-polares presentes nas superfícies das macromoléculas que interagem com os ligantes imobilizados na fase estacionária. A interação ocorre em um ambiente que favorece as interações hidrofóbicas, como em soluções aquosas com alta concentração salina (McCue, 2009). A adsorção aumenta conforme o aumento da concentração salina na fase móvel e a eluição é feita pelo decréscimo da concentração salina no

eluente (Melander e Horváth, 1977; Fausnaugh e Regnier, 1986; Roe, 1989). Entretanto, o termo “adsorção induzida por sal” também já foi usado para este tipo de cromatografia (Porath, 1986).

Na CIH, as forças de van der Waals vão ser as responsáveis pela atração entre a camada de hidratação presente ao redor da molécula-alvo, alimentada na coluna, com a camada de hidratação circundante dos ligantes imobilizados na matriz (Figura 2.4) (van Oss et al., 1986).

As interações hidrofóbicas aumentam na presença de sais que favorecem a precipitação de proteínas, cujo fenômeno é denominado “salting-out”. A influência de diferentes íons nas interações hidrofóbicas segue a série de Hofmeister para a precipitação de proteínas em soluções aquosas (Figura 2.5). Os íons no início da série promovem a interação hidrofóbica, o que leva à associação de moléculas de proteínas através de regiões superficiais que são hidrofóbicas, ocasionando a precipitação de proteínas. Estes íons são chamados de cosmotrópicos e redirecionam as moléculas de água na camada de hidratação hidrofóbica ao redor da proteína para o seio da solução, que contém moléculas de água com menor grau de ordenação. Essa mudança é entropicamente favorável e com a diminuição da camada de hidratação ao redor da proteína, devido à presença do sal cosmotrópico, ocorre exposição dos motivos hidrofóbicos, que serão passíveis de interação com o grupamento hidrofóbico de outra proteína promovendo a precipitação ou da fase estacionária promovendo a adsorção (Eriksson, 1989; Roettger et al., 1989).

Os íons no final da série de Hofmeister, denominados caotrópicos, redirecionam moléculas de água do seio da solução para a camada de hidratação ao redor da proteína, aumentando-a. Desta maneira, desfavorecem a associação proteica por interações hidrofóbicas e adsorção em fases estacionárias com ligantes hidrofóbicos. Estes íons aumentam a solubilidade das proteínas, fenômeno denominado “salting-in” (Eriksson, 1989).

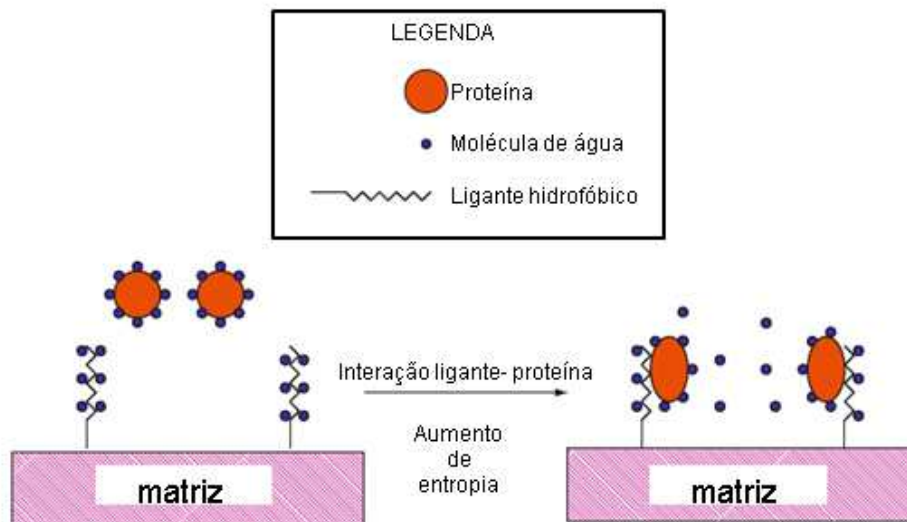


Figura 2.4. Diagrama esquemático das interações hidrofóbicas entre proteínas e ligante hidrofóbico imobilizado no adsorvente. Adaptado de McCue (2009).

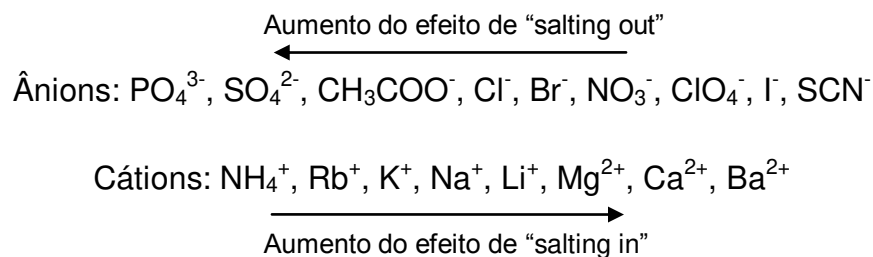


Figura 2.5. Série de Hofmeister de precipitação de proteínas (Porath, 1987).

2.3.4.4 A CIH na purificação de pDNA

A capacidade da CIH de purificar o pDNA é devido as diferenças de hidrofobicidade entre esta moléculas e as impurezas, como o RNA, isoformas circular aberta e linear, gDNA, endotoxinas e proteínas (Freitas et al., 2008), promovendo excelente separação entre elas. A interação entre o pDNA, RNA e gDNA com o ligante acoplado na matriz ocorre através de interações hidrofóbicas

entre este e as bases nitrogenadas presentes nos nucleotídeos, que são as subunidades dos ácidos nucléicos.

A CIH é aplicada em escalas preparativas, analíticas (Iuliano et al., 2002; Diogo et al., 2003) e industriais. Exemplos de sua aplicação incluem a purificação do vetor para terapia gênica da fibrose cística (Diogo et al., 2000b) e da vacina de DNA contra a raiva (Diogo et al., 2000a; Diogo et al., 2001). Essa técnica pode ser utilizada tanto como cromatografia convencional ou como cromatografia negativa. Na cromatografia convencional ocorre a adsorção do pDNA sc na fase estacionária (Freitas et al., 2008), que é eluído pela diminuição da força iônica da fase móvel. Na cromatografia negativa ocorre a adsorção das impurezas, sendo que o pDNA e suas isoformas saem nas frações de lavagem (Diogo et al., 2000a; Diogo et al., 2000b; Diogo et al., 2001; Iuliano et al., 2002; Diogo et al., 2003).

O modo de operação negativo permite a obtenção da molécula de interesse com maior rapidez e é sugerido quando a alimentação não contém muitas impurezas, para maximizar a capacidade do adsorvente em adsorvê-las. Porém, no lisado neutralizado se tem mais impurezas do que sc pDNA, o que torna o modo de operação convencional mais indicado, pois é possível a adsorção e dessorção seletiva do molécula alvo.

Diogo e colaboradores (1999) foram os pioneiros na utilização da CIH na purificação de pDNA. Neste trabalho isoformas sc e oc de pDNA purificadas previamente por um kit comercial foram completamente separadas através da cromatografia negativa utilizando agarose derivatizada com 1,4 butanediol diglicidil éter e sulfato de amônio 1,5 mol/L como fase móvel.

Trabalhos seguintes utilizaram as mesmas fases móveis e estacionárias para purificar, também por cromatografia negativa, o pDNA partindo-se do lisado clarificado por precipitação seriada com 2-propanol e sulfato de amônio 2,5 mol/L (Diogo et al., 2000a; Diogo et al., 2000b; Diogo et al., 2001). Tal processo possibilitou a obtenção de pDNA com pureza de 100% e de acordo com as regulamentações estabelecidas pelas agências reguladoras.

Moreira e colaboradores (2005) utilizaram pela primeira vez o adsorvente comercial fenil-agarose com baixa densidade de ligantes na purificação do pDNA, partindo-se do lisado clarificado por precipitação seriada com 2-propanol e sulfato

de amônio 2,5 mol/L. A fase móvel utilizada foi o sulfato de amônio 1,5 mol/L e a cromatografia ocorreu em modo negativo, apenas as impurezas interagiram com o adsorvente, enquanto que o pDNA foi recuperado na etapa de lavagem. Tal combinação adsorvente/tampão de adsorção permitiu a obtenção de pDNA com pureza de 100% e sem contaminação por proteínas, RNA, gDNA e isoforma oc.

Freitas e colaboradores (2008) descreveram a purificação do pDNA por CIH partindo-se do lisado clarificado por filtração tangencial. Neste trabalho foi feito um estudo para se experimentar na purificação de pDNA adsorventes hidrofóbicos disponíveis comercialmente (fenil-agarose com alta densidade de ligantes, fenil-agarose com baixa densidade de ligantes, octil-agarose e butil-agarose) e tampões de adsorção alternativos ao sulfato de amônio. Os melhores resultados foram obtidos com o adsorvente fenil-agarose com alta substituição de ligantes (40 μ mol/mL meio) e o citrato de sódio 1,2 mol/L como tampão de adsorção. Esta combinação adsorvente/tampão de adsorção foi capaz de promover a adsorção do pDNA na fase estacionária e possibilitou recuperar apenas a isoforma superenovelada livre de contaminantes.

Os empregos mais recentes desta técnica na RPB do pDNA foram descritos por Pereira e colaboradores (2010) e Guerrero-Gérmán e colaboradores (2011). No primeiro o lisado clarificado é purificado por CIH utilizando membrana de celulose modificada com ligante hidrofóbico de cadeia linear como fase estacionária, obtendo pureza final de apenas 60%. O trabalho mais recente utiliza a CIH como a última etapa de purificação, sendo realizada após clarificação por filtração tangencial e cromatografia de troca-iônica. Apesar do processo ser composto por várias etapas a pureza final obtida foi de apenas 79%.

Os trabalhos que utilizam a CIH utilizando a fenil-agarose (alta e baixa densidade de ligantes) mostram a eficiência deste adsorvente em purificar o pDNA com finalidade terapêutica, porém não há relatos na literatura na utilização do lisado neutralizado como forma de alimentação. Por isso, estudos utilizando a CIH como etapa única na purificação do pDNA são interessantes, de modo a determinar se este tipo de adsorvente é capaz de promover a pureza final necessária mesmo à partir de um material com maior quantidade de contaminantes (lisado neutralizado).

2.3.4.5 Cromatografia Tiofílica Aromática (CTA)

2.3.4.6 A interação tiofílica aromática

A cromatografia de adsorção tiofílica foi introduzida por Porath e colaboradores (1985) com o desenvolvimento do adsorvente tiofílico (T-gel). Este adsorvente continha uma cadeia alifática ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$) imobilizada a grupamentos sulfona e tioéter resultantes da ativação da matriz de agarose com divinil sulfona (agarose-O-SO₂-CH₂-CH₂-S-Ligante). Neste trabalho pioneiro, foi possível demonstrar a capacidade deste adsorvente de fracionar as proteínas do plasma sanguíneo ao se utilizar sais cosmotrópicos no tampão de adsorção (Boschetti, 2001). O tipo de sal utilizado neste tampão tem uma grande influência não só na seletividade de adsorção de proteínas (Oscarsson e Vieira, 2002), mas também na força da interação entre proteínas e ligante. Neste tipo de cromatografia, normalmente são utilizados tampões compostos por sulfatos e fosfatos (Boschetti, 2001).

A utilização de compostos aromáticos e heterocíclicos na síntese de adsorventes tiofílicos foi introduzida por Porath e Oscarsson (1988). Neste trabalho o ligante mercaptopirimidina foi imobilizado em agarose ativada com epóxi (agarose-O-CH₂-CH(OH)-CH₂-S-pirimidina) e foi utilizado na purificação de anticorpos e α -2-macroglobulina (Boschetti et al., 2001).

Oscarsson e Porath (1990) sugeriram que estes ligantes sejam intermediários entre adsorventes tiofílicos e hidrofóbicos. Knudsen e colaboradores (1992) definiram uma fórmula geral para adsorventes aromáticos ou heterocíclicos imobilizados em matrizes de agarose ativadas por divinil sulfona que é:



na qual M é a matriz, X é oxigênio ou nitrogênio e Y é o composto aromático ou heterocíclico.

A cromatografia tiofílica pode ser classificada em duas categorias, dependendo do método de ativação escolhido para a ativação da fase estacionária (Oscarsson e Vieira, 2002): (1) adsorventes baseados em divinil sulfona, nos quais ligantes alifáticos ou heterocíclicos são acoplados; (2) suportes ativados via epóxi, nos quais ligantes heterocíclicos são acoplados. O termo cromatografia aromática tiofílica adotado neste trabalho se refere à utilização de adsorventes contendo ligantes aromáticos e heterocíclicos com grupamentos tioéter, de maneira a manter a nomenclatura utilizada por Lemmens e colaboradores (2003), que foi o trabalho pioneiro na utilização de CTA para a purificação de pDNA.

A utilização de ligantes heterocíclicos no desenvolvimento de adsorventes tiofílicos é, em sua grande maioria, com a finalidade de purificar imunoglobulinas (Knudsen et al., 1992; 1995; Schwartz et al., 1995). Porath e Oscarsson (1988), e Schwartz et al. (1995) demonstraram o potencial de ligantes baseados em mercaptopirimidinas na purificação destas moléculas e, dentre estes trabalhos, pode-se ressaltar o de Schwartz e colaboradores (1995), que além de explorarem ligantes com o enxofre e nitrogênio deslocados do braço espaçador para o anel heterocíclico (2-mercaptopirimidina, 2-mercaptopiridina e mercaptotiazol – Figura 2.6), também demonstraram a capacidade destes de adsorver seletivamente as imunoglobulinas.

A interação tiofílica entre ligantes e proteínas é promovida por concentrações relativamente altas de sais cosmotrópicos (Porath et al., 1985) e são provavelmente resultado da combinação de interações do tipo doador/aceptor de elétrons (Hutchens e Porath, 1987; Porath e Belew, 1987) e possivelmente uma interação mista do tipo tiofílica/hidrofóbica (Oscarsson et al., 1988). É provável que essas interações ocorram 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).

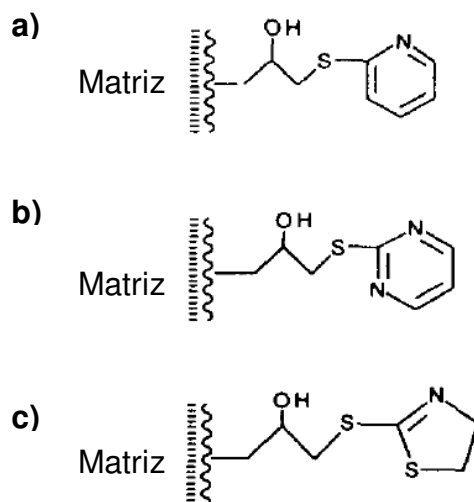


Figura 2.6. Estrutura dos ligantes heterocíclicos utilizados por Schwartz e colaboradores (1995): **(a)** 2-mercaptopiridina, **(b)** 2-mercaptopirimidina e **(c)** mercaptotiazol.

De acordo com Porath e Belew (1987) ocorre um ataque nucleofílico do ligante em uma porção deficiente de elétrons na molécula de proteína (contra-ligante), que pode levar à transferência de elétron do nucleófilo (representado por X, Figura 2.7a) para o aceitador de elétrons da proteína, que pode ser um átomo localizado do grupamento indol. Isto leva à formação de uma ligação fraca e, este complexo pode ser fortalecido por uma interação concomitante entre o grupamento sulfona com um sítio proteico próximo ao sítio de ligação previamente descrito. O grupamento sulfona interage em virtude de seu caráter dipolo ou aceitando elétrons do contra-ligante no orbital 3d do átomo de enxofre.

Se os sítios do contra-ligante forem compostos por regiões hidrofóbicas (Figura 2.7b), as moléculas de água na cavidade próximas às essas regiões serão menos polares que as moléculas no seio da solução. Isso se acentuará na presença de sais cosmotrópicos, resultando num contato próximo entre o ligante e o contra-ligante. Neste ambiente predominantemente não-polar, o grupamento metileno do ligante pode ser ativado para a transferência intramolecular de um próton (“proton jump”), que tende a formar uma ligação de hidrogênio com sistema de elétrons π de um núcleo aromático ou heterocíclico, que é parte do contra-sítio

da proteína formando um complexo doador/aceptor de elétrons (DAE). A deficiência de elétrons no núcleo aromático deve ser contrabalanceada pelo fluxo de elétrons do enxofre ou nitrogênio nucleofílico (Porath e Belew, 1987).

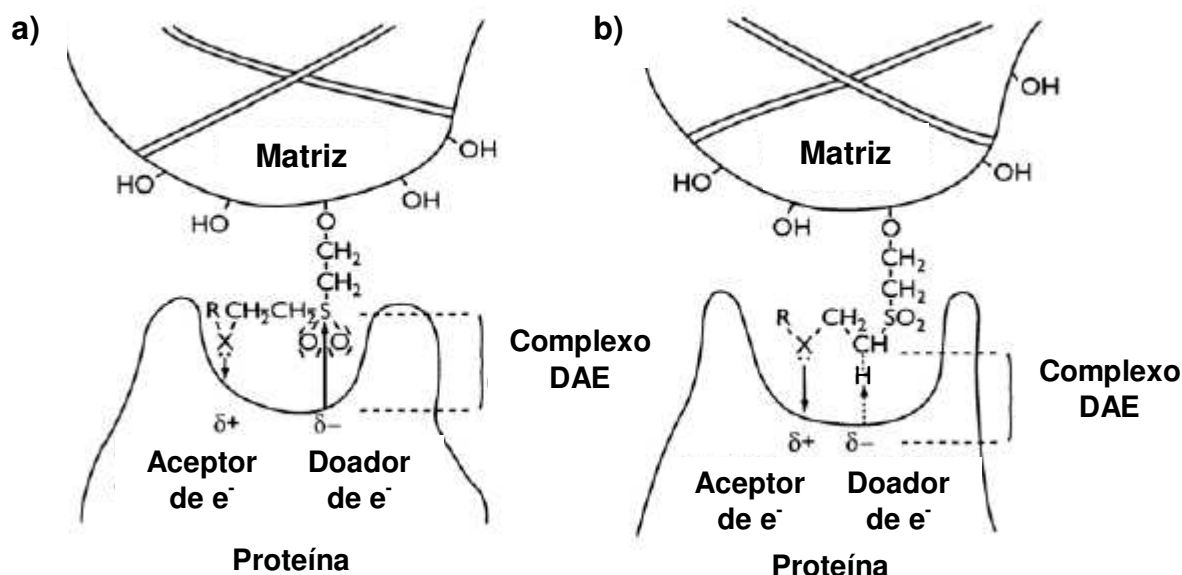


Figura 2.7. (a) Diagrama esquemático das interações tiofílicas entre proteínas e ligantes tiofílicos imobilizado em matriz hidrofílica; (b) Diagrama esquemático das interações tiofílicas entre proteínas com grupamento hidrofóbicos e ligantes tiofílicos imobilizado em matriz hidrofílica Adaptado de Oscarsson 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 experimentados neste trabalho. A interação entre o adsorvente e os polinucleotídeos só ocorreu quando o ligante foi composto no mínimo por um anel aromático e um motivo tioéter, sugerindo que o anel aromático pode participar com um tipo de interação intercalante hidrofóbica (π - π) com a fita dupla da isoforma superenovelada de pDNA, enquanto que o motivo sulfúrico pode assumir um papel de doador de elétrons. Sandberg e colaboradores (2004) relataram que ao se aumentar a eletronegatividade do anel aromático, substituindo os constituintes por átomos mais eletronegativos (e.g., o flúor no caso do ligante 2,4-

difluorotiofenol), pôde-se aumentar a resolução entre as isoformas circular aberta e superenovelada do pDNA, provavelmente devido ao aumento da hidrofiliidade do ligante, que aumentam as interações hidrofílicas entre este e o grupamento fosfato da molécula de pDNA. Também de acordo os autores, os grupamentos fosfatos são mais acessíveis na isoforma superenovelada.

2.3.4.7 A CTA na purificação de pDNA

A CTA para a purificação de pDNA foi descrita pela primeira vez por Lemmens et al. (2003), experimentando vários tipos diferentes de ligantes tiofílicos imobilizados em Sephase 6 Fast Flow ativada via epóxi. Nesse trabalho o lisado clarificado passou por um processo de gel filtração, para a retirada do RNA, posteriormente foi feito a CTA para enriquecimento da fração super enovelada do pDNA e o processo de purificação é finalizado com uma cromatografia de troca iônica para concentrar o produto e retirar o sulfato de amônio, que é usado como tampão tanto na filtração quanto na CTA. Sandberg et al. (2004) se utilizaram de duas das etapas de purificação propostas por Lemmens et al. (2003): CET e CTA. Porém, na etapa de CTA experimentou ligantes com substituintes mais eletronegativos no anel aromático (e.g., flúor e óxido nítrico), aumentando a resolução entre as isoformas circular aberto e superenovelada. Em ambos os trabalhos os autores relataram a utilização de mercaptopirimidinas como ligantes e a obtenção de plasmídeos aptos a serem empregados como vetores na terapia e vacinação gênica partindo-se do lisado clarificado.

Um exemplo comercial do emprego desta técnica cromatográfica na purificação de pDNA visando aplicações farmacêuticas desta molécula é o kit Plasmid Select (GE Healthcare, Suécia), cujo processo de uso compreende o emprego das mesmas três operações cromatográficas sequenciais (CET, CTA e CTI) a partir do lisado clarificado. O adsorvente tiofílico utilizado neste kit é composto por matriz de agarose 6% acoplada ao ligante 2-mercaptopiridina (densidade de ligantes: 4 mg/mL). As instruções do fabricante recomendam que a etapa de adsorção da CTA seja feita com sulfato amônio 2,25 mol/L e, que na

etapa de eluição seja utilizado cloreto de sódio 3 mol/L, preparado em sulfato de amônio 2,25 mol/L. O inconveniente deste processo é o uso de altas concentrações salinas nas etapas de adsorção e eluição aumentam os custos de operação do processo, além de afetar as questões ambientais com tratamentos de efluentes líquidos já explanadas anteriormente.

Bennemo et. al (2009) descreveram o uso de CTA não como processo de purificação, mas como um método analítico quantitativo confiável para determinar a razão oc/sc de pDNA dos passos do processo de purificação, já que esse tipo de cromatografia tem potencial de resolver estas isoformas.

Todas as técnicas cromatográficas discutidas neste capítulo foram organizadas na Tabela 2.3, para facilitar a comparação das características, vantagens e desvantagens inerentes de cada técnica.

2.3.4.8 Processos cromatográficos com membranas na purificação de pDNA

Os processos cromatográficos citados na literatura, em sua maioria utilizam resinas destinadas a purificação de proteínas, pois são fases estacionárias disponíveis comercialmente. Geralmente as proteínas são globulares e medem em torno de 2 a 10 nm, enquanto os plasmídeos possuem seu tamanho na ordem de centenas de nanômetros e sua estrutura é intermediária entre uma espiral flexível e um enovelado rígido. Devido a isso, o pDNA tem coeficientes difusionais menores que os das proteínas, resultando em coeficientes menores de transferência de massa, além do fato que os poros das fases estacionárias não foram feitos para lidar com moléculas tão grandes. Essas limitações de transferência interna de massa resultam em picos alargados e baixa capacidade de adsorção (Diogo et al., 2005). Assim, são necessárias a utilização de baixas vazões volumétricas e gradientes amplos de eluição, levando a longos tempos de separação (Huber, 1998).

Tabela 2.3. Comparação entre as técnicas cromatográficas mais comumente descritas na literatura visando a purificação de pDNA com padrão farmacêutico. Adaptado de Freitas (2007).

Características	CET	CTI	CPA		CTA	CIH	
Modo de operação	Convencional	Convencional	Convencional		Convencional	Negativa	Convencional
Força-motriz da separação	Diferença de tamanho	Interação eletrostática	Bioreconhecimento (histidina)	Ligação de coordenação (IMAC)	Interação do tipo π - π e doador-aceptor de elétrons	Interação hidrofóbica	
Condição para adsorção	-	BCS	BCS/ACS	ACS	ACS	ACS	
Condição para dessorção	-	ACS	BCS	N.E	ACS	BCS	
Estágio do processo	Polimento,troca de tampão	Recuperação intermediária	Polimento	Após lise celular	Após CET	Após pré-purificação	
Remoção de RNA	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Remoção de gDNA	Sim	Baixa	Sim	N.E	Sim	Sim	Sim
Remoção de ET	Sim	Baixa	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Remoção de proteínas	Sim	Sim	Sim	N.E	Sim	Sim	Sim
Seletividade para sc pDNA	Parcial	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Referências	Prather et al. (2003) Diogo et al. (2005)	Prather et al. (2003) Diogo et al. (2005)	Souza et al. (2006)	Tan et al. (2007a) Tan et al. (2007b)	Sandberg et al. (2004)	Diogo et al. (2005) Moreira et al. (2005)	Freitas (2007) Freitas et al. (2008)

Legenda: CET: Cromatografia de exclusão molecular; CTI: Cromatografia de troca-iônica; CPA: Cromatografia de pseudoafinidade; CTA: Cromatografia tiofílica aromática; CIH: Cromatografia de interação hidrofóbica; IMAC: Cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados; BCS: Baixa concentração de sais; ACS: Alta concentração de sais; ET: endotoxinas; N.E: não especificado.

Os problemas relatados com as matrizes baseadas em agarose demonstram a necessidade do desenvolvimento de fases estacionárias com poros apropriados para a purificação de pDNA. Uma alternativa é a utilização de adsorventes compostos por membranas derivatizadas com grupos funcionais, pois são materiais rígidos, a difusão nos poros é negligenciável (a transferência de massa é governada principalmente pela convecção possibilitando o emprego de vazões mais altas) e combina filtração e adsorção em uma só operação (Bueno e Miranda, 2005).

O trabalho que discutiu pela primeira vez membranas como adsorventes na purificação de pDNA foi realizado por Giovannini et al. (1998). Neste trabalho, apenas a questão da resolução entre as isoformas do pDNA foi abordada e não a capacidade dinâmica do adsorvente (membranas de poliglicidil metacrilato-co-etileno dimetilmetacrilato derivatizadas com ligantes para troca-aniônica). Mesmo com a alimentação de pDNA purificado previamente por gradiente em cloreto de cério, o adsorvente experimentado não possibilitou a separação das isoformas.

Teeters et al. (2002) utilizaram membranas de poliétersulfona de troca-aniônica, com tamanho nominal de poros de 0,8 μm , para purificar pDNA do lisado clarificado (etapas de filtração, precipitação com isopropanol e centrifugação foram feitas após a neutralização do lisado). Apesar dos autores avaliarem a qualidade do pDNA purificado apenas por eletroforese em gel de agarose e pela razão de absorbâncias a 260 e 280 nm, eles relataram capacidades estáticas máximas de adsorção de 10 mg plasmídeo/mL, resultado este uma ordem de magnitude maior do que os valores tipicamente reportados para leitos porosos.

Guerrero-Gérman e colaboradores (2009) experimentaram as mesmas membranas de troca aniônica para a purificação do pDNA presente no lisado, que foi clarificado por três operações (filtração tangencial, adsorção em membrana de troca-iônica e novamente filtração tangencial) antes da etapa de adsorção final, também com estas membranas. Após o processamento descrito foi possível remover mais de 97% do RNA e aumentar a pureza do pDNA em 28 vezes, porém, a pureza do produto final ainda foi insuficiente para aplicação terapêutica, em razão de contaminações por gDNA e endotoxinas.

Pereira e colaboradores (2010) modificaram membranas comerciais de celulose ativadas via epóxi (poro nominal de 0,45 μm) para sua utilização como adsorvente na cromatografia de interação hidrofóbica para a purificação do pDNA. Com a utilização deste adsorvente, sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção e alimentando-se lisado clarificado (precipitação com isopropanol), os autores descreveram que, na condição otimizada, foi possível recuperar 73% do pDNA com pureza relativa de 60%, sem resolução entre as isoformas e isento de contaminação por proteínas.

Recentemente, Guerrero-Gérman et al. (2011) descreveram um processo de purificação de pDNA com membranas adsorativas de troca-aniônica, mas não utilizaram este adsorvente na etapa de purificação final, mas sim na etapa de recuperação intermediária. O processo proposto consistiu das seguintes etapas: lise celular, clarificação do lisado por duas filtrações tangenciais e cromatografia de troca-aniônica com membrana e cromatografia de interação hidrofóbica. Mesmo como todas estas etapas, não foi possível a separação das isoformas e a pureza final foi de 79,3%.

Diante deste cenário é possível verificar que os processos com membranas são potenciais na purificação de pDNA, porém ainda são insuficientes para promover a pureza necessária para sua aplicação em estudos de terapia e vacinação com DNA. Portanto, o estudo de novas membranas adsorativas é necessário para preencher esta lacuna tecnológica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos

A produção do plasmídeo pVAX1GFP (3697 pb) foi feita através de fermentação de *E. coli* DH5 α em incubadora com agitação orbital e controle de temperatura modelo INNOVA 4430 (New Brunswick Scientific, EUA). Todas as operações de centrifugação foram realizadas na centrífuga 5804 R (Eppendorf, Alemanha). A água utilizada na preparação de todos os reagentes e reações foi purificada em equipamento Milli Q (Millipore, EUA).

Os reagentes: tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris), sulfato de amônio, tri-citrato de sódio, 2-propanol, ácido etilenodiamino tetra-ácetico (EDTA), hidróxido de sódio, cloreto de sódio, ácido acético, glicose e acetato de potássio foram adquiridos da Merck (Alemanha). Extrato de levedura, triptona e fosfato de potássio foram adquiridos da Fluka (Suíça). Todos os reagentes foram de grau analítico.

Os experimentos cromatográficos utilizados na purificação de pDNA controle e nos estudos preliminares de seleção de tampão de adsorção foram realizados por gravidade em colunas Econo-Pac (1,5 x 12 cm) e Poli-prep (0,8 x 4 cm) respectivamente, ambas adquiridas da Bio-Rad (EUA). Os experimentos cromatográficos completos foram realizados com a coluna HR 5/10 (0,5 x 10 cm) acoplada ao sistema FPLC (“Fast Liquid Chromatography System”) ÄKTA Purifier provido do “software” Unicorn 5.1 e coletor de frações Frac-920, todos obtidos da GE Healthcare (Suécia).

Para a realização dos ensaios analíticos de eletroforese em gel de agarose, quantificação de proteínas e quantificação gDNA das frações obtidas das cromatografias, foi necessário realizar a dessalinização destas amostras. Para tal,

foram utilizados dispositivos de ultrafiltração Amicon de 0,5 mL (Millipore, EUA) possuindo membranas de celulose regenerada com tamanho nominal de corte de 10 kDa.

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 acoplada com ligante 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 fotodocumentador “Electrophoresis Documentation Software and Analysis System 120” e o “software” Kodak digital Science 1D, ambos adquiridos da Kodak (EUA). Os padrões de massa molecular utilizados foram Lambda Hind III / phiX Hae III (Biolabs, EUA) e 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA).

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA), com kit obtido da Pierce (EUA). Para mensurações de absorbância foi utilizado o espectrofotômetro Beckman DU 650 (Beckman Instruments, EUA).

A determinação da quantidade de endotoxinas presentes foi realizada com o kit LAL (lisado de amebócito de *Limulus*) cromogênico fornecido pela Lonza (EUA). As mensurações de absorbância foram realizadas na leitora de absorbância em microplacas, modelo ELx 808 (Bio-Tek Instruments, EUA).

Para determinação da quantidade de gDNA contaminante nas amostras resultantes dos estudos completos de cromatografia foi utilizado 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, MgCl₂ e fluorocromo SYBR Green I.

3.1.1 Descrição do plasmídeo modelo pVAX1GFP

O plasmídeo pVAX1GFP (Figura 3.1), gentilmente doado pelo Professor Miguel Prazeres (Instituto Superior Tecnológico, Portugal), foi construído a partir do vetor comercial pVAX1LacZ, desenhado para o desenvolvimento de vacinas de DNA (Azzoni et al., 2007). Este vetor possui um promotor do citomegalovírus

humano (CMV), gene repórter que codifica para a “green fluorescent protein” (GFP) em substituição ao gene LacZ (β -galactosidase), gene de resistência à kanamicina para seleção em *E. coli* e origem de replicação procariota derivada do plasmídeo pUC. Os plasmídeos foram primeiramente inseridos em células de *E. coli* linhagem DH5 α competentes. O protocolo de preparação e transformação de células com pDNA foi aquele descrito por Sambrook e Russell (2001), baseado no reagente polietileno glicol. Colônias formadas em placa foram, posteriormente, individualmente crescidas em meio líquido Luria-Bertani (LB) e armazenadas em congelador a -70°C na presença de glicerol (15% em volume). A verificação da presença dos plasmídeos nas células foi feita através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, após procedimento de extração e purificação de pDNA utilizando-se o kit de minipreparação Spin Plasmid Mini Two (Invisorb, Alemanha) segundo o protocolo do fabricante.

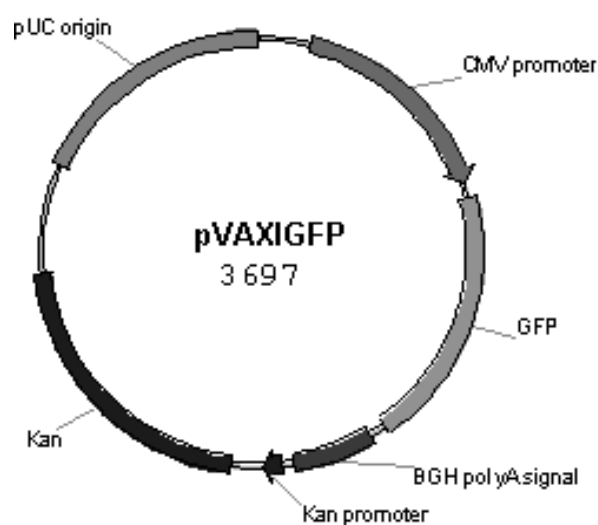


Figura 3.1. Esquema ilustrativo das seqüências que compõem o vetor plasmidial pVAX1GFP (Azzoni et al., 2007).

3.1.2 Adsorventes utilizados

3.1.2.1 Adsorvente da cromatografia de interação hidrofóbica (CIH)

As colunas utilizadas na purificação de pDNA controle, nos estudos preliminares para a seleção de tampão e nos estudos completos de cromatografia de interação hidrofóbica, foram empacotadas com a resina Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub) (GE Healthcare, Suécia), contendo 25 μmol ligantes fenil/mL meio ligadas em matriz de agarose 6% composta por partículas esféricas de 90 μm de tamanho médio (Figura 3.2).

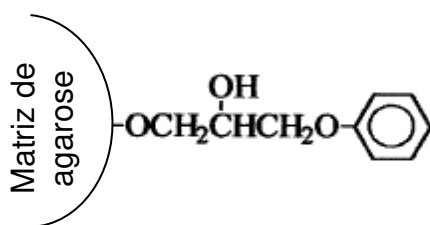


Figura 3.2. Representação esquemática do adsorvente Phenyl Sepharose. Adaptado de Queiroz et al. (2001).

3.1.2.2 Cromatografia tiofílica aromática (CTA)

3.1.2.2.a Adsorvente para a CTA utilizando agarose como matriz

O adsorvente utilizado nos estudos completos de cromatografia tiofílica aromática foi desenvolvido “in house”, no qual 20 mL de Sepharose 6B (GE Healthcare, Suécia) foi ativada com divinil sulfona (Sigma, EUA), denominada DVS-agarose (Figura 3.3). Para a reação de ativação da matriz foi feita a lavagem da agarose com 1 L de água em funil de vidro sinterizado utilizando bombeamento a vácuo. Após a lavagem o gel foi transferido para bquer contendo 20 mL de carbonato de sódio 0,5 mol/L e deixado sob agitação com pás inclinadas a 100 Hz. Após isso foram lentamente adicionados 2 mL de divinil sulfona durante 15 minutos sob constante agitação e mantidos assim por mais 60 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar o protocolo de ativação a agarose foi

extensivamente lavada com água em funil de vidro sinterizado até que o pH do filtrado atingisse a normalidade. A DVS-agarose foi armazenada a 4°C suspensa em acetona (Hermanson et al., 1992).

Posteriormente, fez-se o acoplamento do ligante 2-mercaptopirimidina (Sigma, EUA) na matriz ativada (Figura 3.4) adaptando-se o protocolo descrito por Hermanson et al. (1992). Para tal, 5 mL de DVS-agarose foram lavadas com 100 mL de água para a remoção da acetona, seguida de lavagem com 100 mL de carbonato de sódio 0,5 mol/L. Após isso o gel foi transferido para um bquer e ressuspendido em 10 mL de carbonato de sódio 0,5 mol/L contendo 5% (m/v) de 2-mercaptopirimidina pH 9,0. A suspensão foi deixada sob agitação orbital por 24 h. Após isso, fez-se a lavagem do gel com 1 L de carbonato de sódio 0,5 mol/L seguido de mais uma lavagem com 750 mL de água. Por fim, foi feito o bloqueio dos grupos ativos da agarose (onde não ocorreu a ligação com a mercaptopirimidina) através da agitação por 2 h da suspensão do gel com 10 mL de bicarbonato de sódio 0,5 mol/L contendo 500 µL de β-mercaptoetanol. O adsorvente resultante, aqui denominado mercaptopirimidina-agarose, foi extensivamente lavado com 1 L de cloreto de sódio 1 mol/L seguido de lavagem com 1 L de água e armazenado a 4°C em etanol 20%.

Para se determinar qualitativamente se houve ou não acoplamento efetivo do ligante, os mesmos procedimentos cromatográficos feitos com a agarose contendo 2-mercaptopirimidina foram realizados com DVS-agarose como controle.

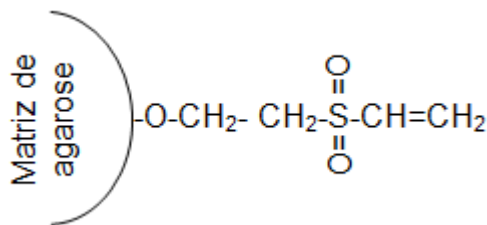


Figura 3.3. Representação esquemática do adsorvente DVS-agarose (Hermanson et al., 1992).

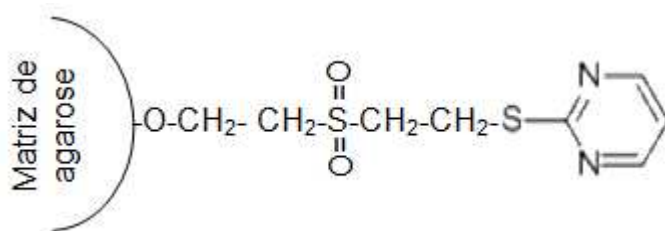


Figura 3.4. Representação esquemática do adsorvente mercaptopiridina-agarose (Boschetti, 2001).

3.1.2.2.b Adsorvente para a CTA utilizando membrana de celulose como matriz

Para a cromatografia tiofílica aromática foi utilizado o cartucho comercial Sartobind Epoxy 75 (Sartorius, EUA). Segundo fabricante, este cartucho contém um leito de 4 mm de altura e 2,6 cm diâmetro interno composto por 15 membranas de celulose ativadas via epóxi (Figura 3.5), com volume de 2,1 mL, área superficial total de 75 cm², tamanho nominal de poro de 0,45 µm e com 1 µeq grupamento epóxi/cm². O acoplamento do ligante 2-mercaptopiridina foi realizado segundo instruções do fabricante, no qual uma solução de carbonato de sódio 0,5 mol/L contendo 2% de ligante foi bombeada a 1 mL/min por 12 h no cartucho com as membranas. O protocolo de ligação se finalizou com a lavagem do cartucho com 20 mL de tampão fosfato salino (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄ . 2 H₂O e 0,24 g/L KH₂PO₄ pH 7,4) seguido de lavagem com 100 mL de água. O cartucho contendo o adsorvente mercaptopiridina-celulose (Figura 3.6), foi armazenado em etanol 20% a 4°C.

Para se determinar qualitativamente se houve ou não acoplamento efetivo do ligante, os mesmos procedimentos cromatográficos feitos com o cartucho contendo 2-mercaptopiridina foram realizados com um cartucho sem ligante acoplado (epoxi-celulose) como controle.

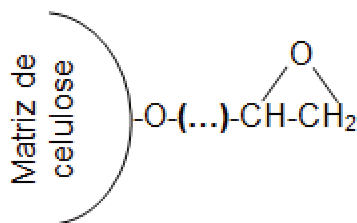


Figura 3.5. Representação esquemática do adsorvente epóxi-celulose (Comunicação pessoal de Prof. Dra. Sônia Maria Alves Bueno em 28 de Abril de 2011). Como não é especificado pelo fabricante o método epóxi utilizado na ativação, apenas o grupamento reativo é mostrado nesta figura.

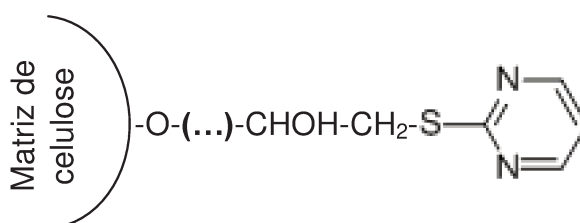


Figura 3.6. Representação esquemática do adsorvente mercaptopirimidina-celulose (Comunicação pessoal de Prof. Dra. Sônia Maria Alves Bueno em 28 de Abril de 2011)

3.2 Preparo dos tampões de adsorção utilizados

Soluções dos tampões citrato de sódio a 1,2 mol/L e 1,5 mol/L, sulfato de amônio a 1,5 mol/L, fosfato de potássio 2,0 mol/L e citrato de potássio 1,5 mol/L foram preparadas em Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0, filtradas em filtro de 0,22 μm (Millipore, EUA) e degaseificadas à vácuo.

3.3 Produção e armazenamento de lisado neutralizado

A produção de lisado celular contendo pDNA para os estudos de adsorção foi realizada através do crescimento de *E. coli* DH5 α competente transformada com o plasmídeos pVAX1GFP. O crescimento celular foi realizado por 16 h em

frasco agitado contendo 250 mL de meio LB (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura e 5 g/L NaCl) e canamicina (30 µg/mL) a 37°C e 250 rpm. No final da fase exponencial (determinado por absorbância a 600 nm), as células foram recolhidas através de centrifugação (3500 *g* por 10 min) e submetidas à ruptura celular de acordo com método da lise alcalina descrito por Birnboim e Doly (1979). Por este método, o “pellet” obtido foi ressuscitado em 8 mL de tampão 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L glicose, 10 mmol/L EDTA (P1); em seguida adicionou-se 8 mL de tampão 200 mmol/L de NaOH e SDS 1% (m/v) (P2) e a suspensão foi deixada a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente à lise alcalina, fez-se a neutralização do lisado com a adição de 8 mL de solução acetato de potássio 3 mol/L pH 5,5 corrigido pela adição de ácido acético glacial (P3) previamente gelada a 0°C. Este lisado neutralizado foi mantido em gelo por 10 min. Durante a neutralização ocorreu a precipitação de fragmentos celulares, proteínas e gDNA, que foram removidos por centrifugação (12000 *g* por 30 min a 4°C). O lisado neutralizado foi armazenado em alíquotas a -70°C por até três meses para garantir-se a estabilidade do pDNA durante o armazenamento (Freitas et al., 2008).

3.4 Purificação de pDNA controle utilizado como padrão

A purificação de plasmídeo para ser utilizado como padrão neste trabalho foi realizada com base no processo descrito por Moreira et al. (2005). Ao lisado neutralizado, produzido como descrito na seção 3.4, adicionou-se 0,7 volumes de isopropanol para promover a precipitação do plasmídeo nele presente. Após centrifugação a 15.000 *g* (30 min, 4°C) e lavagem com etanol 70%, o precipitado foi seco sob ar e ressuscitado em tampão Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0. Sulfato de amônio sólido foi então adicionado à esta solução até uma concentração de 2,5 mol/L. Após a solubilização do sal e incubação em gelo por 15 min, as impurezas precipitadas foram separadas por centrifugação a 10.000 *g* (15 min, 4°C). O sobrenadante foi diretamente carregado em coluna Econo-Pac empacotada com 10 mL de resina Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub), previamente equilibrada

com 20 mL de sulfato de amônio 1,5 mol/L em Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 (tampão de adsorção). Após a alimentação do lisado clarificado, fez-se a lavagem da coluna com 5,0 mL de tampão de adsorção, sendo o plasmídeo coletado nos 2,0 mL finais, após o descarte dos primeiros 3,0 mL desta lavagem. As impurezas adsorvidas foram eluídas com a adição de 20 mL de Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0. Após a eluição, a coluna foi regenerada com 20 mL de água e re-equilibrada com 20 mL de Tris HCl 10 mmol/L pH 8,0 para ser utilizada na etapa de dessalinização da fração contendo o pDNA. Nesta operação, 2 mL de solução de pDNA resultantes da CIH foram alimentados na coluna; em seguida adicionou-se 4,5 mL de tampão Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0, coletando-se o pDNA dessalinizado nos últimos 3,0 mL.

Após este processo de purificação o pDNA padrão foi quantificado através de medida de absorbância a 260 nm e a pureza avaliada através da razão de absorbância 260/280 nm e eletroforese em gel de agarose (0,8%). Posteriormente, esta solução de pDNA controle foi armazenado a -20°C.

3.5 Estudos preliminares para seleção de tampões de adsorção

Primeiramente, equilibrou-se a coluna Poli-prep, operada por gravidade, contendo 1 mL de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub) com 5 volumes de coluna (VC) do tampão de adsorção em questão (fase móvel). Em seguida, fez-se a injeção de 500 µL de amostra (plasmídeo padrão ou lisado neutralizado) acondicionada com o sal do tampão de adsorção até se atingir a mesma concentração de sal naquele tampão. Após isso, iniciou-se a lavagem das moléculas que não interagiram ou que interagiram fracamente com o adsorvente utilizando-se 5 VC de tampão de adsorção. Excetuando-se o experimento com citrato de sódio 1,2 mol/L, cuja eluição foi feita com 10 VC com tampão 25% de citrato de sódio 1,2 mol/L e 75% Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 (CST) seguido de 10 VC de Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0, as eluições dos experimentos com os outros tampões foram feitas com 10 VC de Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0. Todas as cromatografias foram feitas em triplicata.

3.6 Estudos completos de adsorção e dessorção do pDNA em adsorventes baseados em agarose

Colunas HR 5/10 foram empacotadas com 1 mL do adsorvente respectivo ao tipo de cromatografia a ser estudada (seção 3.1.2). Os experimentos completos de cromatografia foram realizados no sistema AKTA e utilizaram vazão volumétrica de 0,25 mL/min, coletando-se frações de 0,5 mL que foram armazenadas a -20°C para análises futuras. Todo o processo cromatográfico foi acompanhado por medida de absorbância a 260 nm.

O protocolo da cromatografia continha primeiramente uma etapa de equilíbrio na qual foram utilizados 5 VC de tampão de adsorção, seguida da injeção de 250 µL de lisado neutralizado pré-condicionado com o sal do tampão de adsorção na concentração final alvo. A seguir, fez-se a remoção das moléculas que não interagiram ou que interagiram fracamente por lavagem com 10 VC com o tampão de adsorção. Nesses experimentos, apenas as fases móveis citrato de sódio 1,5 mol/L, fosfato de potássio 2,0 mol/L e sulfato de amônio 1,5 mol/L foram utilizados. A eluição foi feita, em gradiente linear (0 a 100%), com 10 VC trocando-se o tampão de adsorção para Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

Os ensaios cromatográficos para cada fase móvel experimentada foram realizados em triplicata. Após a última repetição de cada ensaio fez-se a sanitização da coluna com 2 VC de NaOH 0,5 mol/L, seguida por lavagem com água até que o pH chegasse à neutralidade.

3.7 Estudos completos de adsorção e dessorção do pDNA em adsorvente mercaptopirimidina-celulose

Os experimentos completos de cromatografia em membrana foram realizados no sistema AKTA e utilizaram vazão volumétrica de 0,5 mL/min, coletando-se frações de 0,5 mL que foram armazenadas a -20°C para análises futuras. Todo o processo cromatográfico foi acompanhado por medida de absorbância a 260 nm.

Nesses experimentos, apenas a fase móvel fosfato de potássio 2,0 mol/L foi utilizada como tampão de adsorção. Na etapa de equilíbrio foram utilizados 3 VC do tampão de adsorção, seguido da injeção de 250 µL de lisado neutralizado pré-condicionado com fosfato de potássio 2 mol/L. A lavagem das moléculas que não interagiram ou que interagiram fracamente foi realizada com 5 VC com o tampão de adsorção. A eluição foi feita, em gradiente linear (0 a 100%), com 7 VC trocando-se o tampão de adsorção para Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

Os ensaios cromatográficos foram realizados em triplicata. Entre cada repetição fez-se a lavagem do cartucho com 20 mL de água.

3.8 Estudos completos de otimização da adsorção e dessorção do pDNA em adsorvente mercaptopirimidina-celulose

Nestes experimentos foram mantidos constantes todos os parâmetros expostos na seção 3.7, excetuando-se a vazão volumétrica que foi de 2 mL/min, a etapa de lavagem que ocorreu durante 3 VC e a estratégia de eluição que foi feita de acordo com a Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Estratégia utilizada durante a etapa de eluição.

Concentração de Tris-HCl 10 mmol/L (%)	Tamanho do gradiente (VC)
0-26	1
26	5
26-100	1
100	2

VC: volume de coluna

3.9 Dessalinização das amostras

A dessalinização das frações resultantes das cromatografias foi feita em dispositivos de ultrafiltração Amicon de 0,5 mL com massa molecular de corte de 10 kDa. O protocolo consistiu na adição de 300 µL de amostra e 200 µL de Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 em tais dispositivos. Fez-se uma centrifugação a 14.000 *g* até que o volume da solução retornasse a 300 µL, adicionando-se mais 200 µL de Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0. Esse passo foi repetido cinco vezes, para que ocorresse a troca do tampão inicial para Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

3.10 Quantificação de proteínas

Proteína total foi quantificada pelo método de ácido bicinconínico com o kit BCA de acordo com instruções do fabricante (Pierce, EUA). Uma curva de calibração utilizando albumina de soro bovino (fornecida pelo fabricante) como padrão protéico (concentrações de 0,5 µg/mL até 40 µg/mL) foi construída utilizando Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 como diluente.

3.11 Eletroforese em gel de agarose

As frações resultantes das CIH e CTA que formaram pico de absorção a 260 nm foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (60 V durante 4 h) com o tampão de corrida Tris básico 40 mmol/L, ácido acético 20 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,0 (TAE) e tratadas com brometo de etídio a 0,5 µg/mL, para permitir a visualização das bandas de ácidos nucleicos sob luz UV. O marcador molecular utilizado na eletroforese das frações resultantes dos estudos preliminares para seleção de tampão (seção 3.6) foi o Lambda Hind III / phiX Hae III (Biolabs, EUA) (Figura 3.7a), enquanto que para as frações cromatográficas obtidas nos estudos completos (seção 3.7) foi utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA) (Figura 3.7b), apenas por questão de disponibilidade.

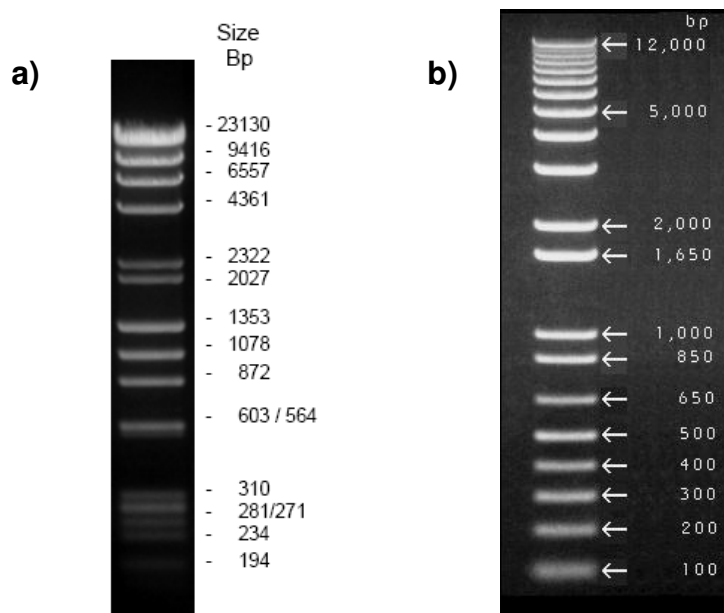


Figura 3.7. Marcadores moleculares utilizados na eletroforese em gel de agarose: **a)** Lambda Hind III / phiX Hae III; **b)** 1 Kb Plus DNA Ladder. Imagens retiradas dos manuais dos respectivos fabricantes, Biolabs (EUA) e Invitrogen (EUA), respectivamente.

3.12 Quantificação de pDNA

O pDNA foi quantificado pelo método descrito por Gomes et al. (2009), no qual foi utilizado a coluna de interação hidrofóbica 15 Source PHE conectado a um sistema ÄKTA Purifier. Após a 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 “flow through”, 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 absorbância foi registrada a 260 nm e a vazão utilizada foi de 1 mL/min. A concentração de plasmídeos foi determinada a partir de uma curva de calibração preparada pDNA padrão (seção 3.5) nas concentrações de 2,5 a 50 µg/mL.

O conceito de pureza relativa (PR) (Diogo et al., 2003) foi usado para descrever o grau de pureza da amostra, sendo definido pela porcentagem da área do pico do pDNA em relação à todas as áreas dos picos obtidos no cromatograma após a subtração da áreas dos picos obtidos ao se alimentar na coluna os respectivos brancos. Estes brancos foram compostos do mesmo tampão no qual a amostra alimentada estava acondicionada.

A equação utilizada para o cálculo de PR foi a seguinte:

$$PR = \left(\frac{A_{pico\ pDNA}}{A_{pico\ pDNA} + \sum A_{picos\ impurezas}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

na qual $A_{pico\ pDNA}$ é a área do pico do pDNA e $\sum A_{picos\ impurezas}$ é a somatória dos picos restantes, aqui tidos como impurezas.

3.13 Quantificação de endotoxinas

A determinação de endotoxinas foi realizada através do kit *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) (Lonza, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Curvas de calibração de foram construídas para as concentrações de 0,1 a 1 UE/mL (endotoxina de *E. coli* fornecida pelo fabricante). Para a realização deste teste foram utilizadas ponteiras (Axygen, EUA) e água apirogênica (fornecida pelo fabricante). Toda vidraria foi despirogenizada antes da sua utilização por tratamento químico (NaOH 1,5 mol/L) e térmico (200 °C por 2h), de acordo com protocolo descrito no trabalho de Machado (2003).

As amostras foram agitadas por 45 min para garantir a homogeneidade do meio, tanto antes da quantificação quanto durante o preparo das diluições das amostras e padrões utilizados.

3.14 Quantificação de gDNA

Para quantificação de gDNA foi feita uma adaptação do protocolo descrito por Martins et al. (2003) 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 Tabela 3.2 compreende os ciclos utilizados na reação de PCR. A amplificação gênica foi quantificada pela diferença de fluorescência apresentada a cada ciclo pelo fluorocromo “Syber Green” contido no “Master mix”.

Curvas de calibração foram construídas a partir de diluições seriais 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.

Tabela 3.2. Ciclos utilizados na reação de PCR.

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Número de repetições do ciclo
50	120	1
95	600	1
95	10	35
65	30	
72	10	

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão descritos os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, assim como discussões objetivando explicar os fenômenos ocorridos e, quando possível, comparar tais resultados com os descritos na literatura.

Os experimentos cromatográficos foram delineados para o estudo da cromatografia de interação hidrofóbica (adsorvente fenil-agarose) e tiofílica aromática (adsorvente mercaptopirimidina-agarose) na purificação de pDNA. Estas duas técnicas cromatográficas foram escolhidas por apresentarem a capacidade tanto de isolar o pDNA de suas impurezas quanto de resolver entre as isoformas (Lemmens et al., 2003; Freitas, 2007). Os tampões de adsorção experimentados (citrato de sódio, citrato de potássio e o fosfato de potássio) por serem descritos como menos danosos ao meio ambiente que o sulfato de amônio e pelos resultados positivos de seus usos relatados na literatura (Gomes et al., 2009; Freitas et al., 2008; Ribeiro et al., 2002; Schwarz, 1996).

O trabalho foi dividido em dois estudos (Tabela 4.1): preliminares e completos. Na primeira etapa, estudos preliminares, os trabalhos tiveram um caráter exploratório, visando selecionar as fases móveis que tinham potencial de promover purificação do pDNA em termos de contaminação por RNA e a isoforma oc. Desta maneira, nestes estudos apenas a eletroforese em gel de agarose foi utilizada como parâmetro analítico.

Nos estudos completos, objetivou-se experimentar as fases móveis que apresentaram melhores resultados nos estudos preliminares em condições mais controladas utilizando um cromatógrafo. Nestes ensaios, além de se registrar o cromatograma completo, fez-se quantificação de pDNA, endotoxinas, proteínas e gDNA, além de utilizar amostras dessalinizadas nas eletroforeses em géis de agarose de modo a melhorar a resolução deste resultado.

Tabela 4.1. Resumo dos estudos desenvolvidos neste trabalho, especificando os adsorventes e condições utilizadas e a sessão referente à descrição dos resultados obtidos.

Tipo do estudo	Adsorvente	Tampão de adsorção	Capítulo dos resultados
Preliminar	Fenil-agarose	Citrato de sódio 1,2 mol/L	4.1.1
		Citrato de sódio 1,5 mol/L	4.1.2
		Fosfato de potássio 2,0 mol/L	4.1.3
		Citrato de potássio 1,5 mol/L	4.1.4
Completo	Fenil-agarose	Citrato de sódio 1,5 mol/	4.2.1.1
		Fosfato de potássio 2,0 mol/L	4.2.1.2
		Sulfato de amônio 1,5 mol/L	4.2.1.3
	MPRM-agarose	Citrato de sódio 1,5 mol/	4.2.2.1
		Fosfato de potássio 2,0 mol/L	4.2.2.2
		Sulfato de amônio 1,5 mol/L	4.2.2.3
	MPRM-celulose	Fosfato de potássio 2,0 mol/L	4.2.4

MPRM: mercaptopirimidina

4.1 Estudos preliminares para seleção de tampões de adsorção

Os experimentos nesta etapa do trabalho tinham o objetivo de selecionar preliminarmente quais sais cosmotrópicos citados na literatura promoviam purificação do pDNA em adsorvente composto por um ligante aromático, pois os ligantes a serem explorados neste trabalho- fenil, no caso da CIH, e mercaptopirimidina, no caso da CTA- possuem esta estrutura e em ambas técnicas cromatográficas (CIH e CTA) aqui utilizadas é necessária altas concentrações destes sais para a adsorção. A escolha das fases móveis e suas respectivas concentrações foi baseada no estudo realizado por Freitas e colaboradores (2008), no qual demonstrou-se a possibilidade de purificar pDNA, partindo-se do lisado clarificado, utilizando citrato de sódio 1,2 mol/L e 1,5 mol/L,

fosfato de potássio 2,0 mol/L e citrato de potássio 1,5 mol/L como fases móveis em resina de agarose com alta densidade de ligantes fenil (40 μ mol/mL leite).

4.1.1 Estudo preliminar de CIH utilizando citrato de sódio 1,2 mol/L como tampão de adsorção

Através da realização de cromatografias utilizando o citrato de sódio 1,2 mol/L como fase móvel pôde-se observar, através da eletroforese em gel de agarose, que tanto o pDNA padrão (Figura 4.1) quanto o pDNA presente no lisado neutralizado (Figura 4.2) deixaram a coluna nas frações de “flow through” (F) e lavagem (L1), portanto não houve interação entre o pDNA e a resina nessas condições.

Apesar do pDNA não ter interagido com o adsorvente, verificou-se que uma pequena quantidade de RNA de baixa massa molecular, presente no lisado neutralizado alimentado na coluna, foi eluída na fração E12, demonstrando que o citrato de sódio a 1,2 mol/L como fase móvel promoveu a adsorção parcial do RNA na fenil-agarose, que depois foi dessorvido pelo tampão CST (25% citrato de sódio 1,2 mol/L e 75% Tris HCl 10 mmol/L pH 8,0).

As agaroses derivatizadas, são descritos como tendo baixa capacidade de adsorção para o pDNA (Eon-Duval e Burke, 2004), pois a maioria destas moléculas se ligam, independente do tipo de interação, unicamente na superfície externa da partícula de agarose, devido ao grande tamanho do pDNA que limita o seu acesso ao interior dos poros da partícula (Prazeres et al.,1998). Provavelmente, o citrato de sódio a 1,2 mol/L não foi suficiente para promover interações hidrofóbicas entre pDNA presente no lisado alimentado com os ligantes presentes na superfície das partículas de agarose. Como o RNA é uma molécula menor e mais hidrofóbica que o pDNA, a concentração do citrato de sódio foi suficiente para promover interação entre algumas moléculas de RNA baixa massa molecular e o ligante fenil.

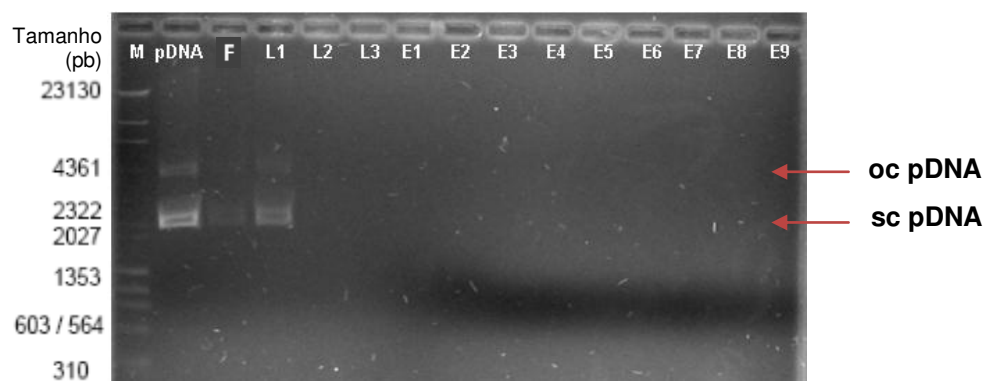


Figura 4.1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do pDNA padrão, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção **citrato de sódio 1,2 mol/L**. M: marcador molecular; pDNA: padrão alimentado; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L3: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

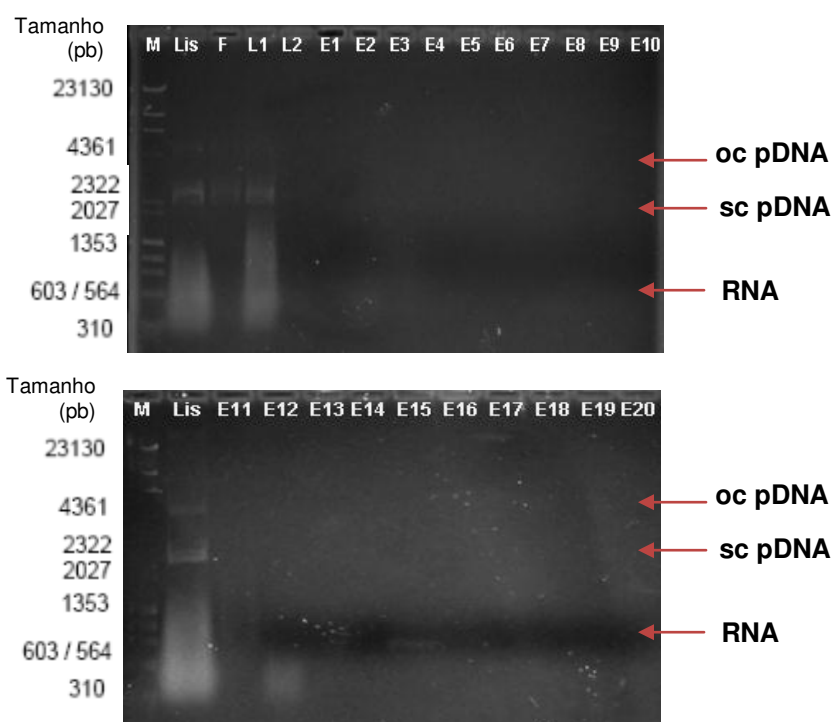


Figura 4.2. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do lisado neutralizado, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção **citrato de sódio 1,2 mol/L**. M: marcador molecular; Lis: amostra de lisado alimentada; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L2: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com tampão CST; E10-E20: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

Freitas et al. (2008) descrevem em seu trabalho com resina com alta densidade de ligantes fenil e alimentando-se lisado clarificado (pré-purificado por precipitação sequencial com 2-propanol e sulfato de amônio e filtração tangencial) que os melhores resultados na purificação de pDNA foram obtidos com citrato de sódio 1,2 mol/L como tampão de adsorção. O fato do pDNA não ter adsorvido ensaio com o citrato de sódio a 1,2 mol/L, aqui apresentado, pode ser explicado pela baixa densidade de ligantes fenil do adsorvente. Provavelmente, uma matriz com uma menor densidade de ligantes necessitaria de uma maior concentração de sal no tampão de adsorção para promover mais interações hidrofóbicas entre o pDNA e os ligantes superficiais, para assim ocorrer a adsorção. Outro ponto importante a se salientar é que, no caso de Freitas et al. (2008) a filtração que antecedeu a CIH do lisado clarificado pré-purificou o lisado, diminuindo a carga das impurezas. No presente estudo, como não houve uma etapa de pré-purificação, essa alta carga de impurezas (e.g., gDNA, proteínas e endotoxinas), pode ter sido preferencialmente adsorvidas ao invés da molécula-alvo.

Portanto, diante da incapacidade de promover uma separação significativa entre o sc pDNA e seus contaminantes (isoforma oc e RNA), concluiu-se que o citrato de sódio 1,2 mol/L não é um tampão de adsorção apropriado para a purificação de pDNA no adsorvente fenil-agarose com baixa densidade de ligantes.

4.1.2 Estudo preliminar de CIH utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção

Ao se utilizar uma maior concentração salina no tampão de adsorção citrato de sódio, pôde-se confirmar a premissa de que essa maior concentração seria necessária para promover a adsorção de pDNA na resina fenil-agarose de baixa densidade de ligantes. Essa confirmação ocorreu ao se alimentar o pDNA padrão, pois foram detectadas na eletroforese (Figura 4.3) duas bandas contendo sc pDNA nas pistas E1 e E2, que correspondem as frações de eluição 1 e 2. Não foi possível detectar a isoforma oc nas frações de lavagem e de eluição,

provavelmente devido ocorrência de uma diluição desta isoforma durante a cromatografia. Portanto, apesar de não poder se afirmar que ocorreu exclusivamente a adsorção e dessorção da isoforma sc, pode-se inferir que foi possível recuperar majoritariamente esta isoforma na etapa de eluição.

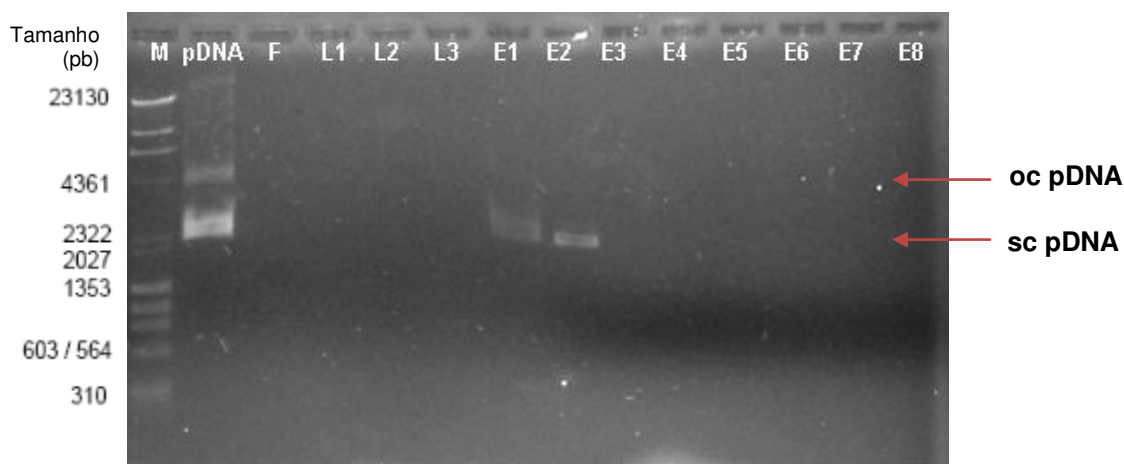


Figura 4.3. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do pDNA padrão, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção **citrato de sódio 1,5 mol/L**. M: marcador molecular; pDNA: padrão alimentado; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L3: lavagens; E1-E8: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

Freitas e colaboradores (2008) atribuíram a interação seletiva da isoforma sc com o adsorvente ao fato da isoforma oc ser menos hidrofóbica do que a sc, uma vez que a isoforma sc, devido às torções provocadas pelo superenovelamento, tem uma maior exposição das bases nitrogenadas.

Na alimentação do lisado neutralizado na CIH com citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção, foi constatado um resultado diferente do obtido com a alimentação do pDNA padrão, mas similar com o obtido na alimentação do lisado neutralizado utilizando citrato de sódio a 1,2 mol/L. De acordo com a eletroforese das frações cromatográficas obtidas (Figura 4.4), pôde-se observar que apesar da fração 1 da lavagem (pista L1) ser constituída por RNA, as frações 1 e 2 da eluição (E1 e E2) também são constituídas por esta molécula, demonstrando que

a utilização de citrato de sódio 1,5 mol/L foi capaz de promover a adsorção e dessorção parcial do RNA, que neste caso foi maior do que quando se utilizou este mesmo tampão a uma concentração salina menor (1,2 mol/L). Através da eletroforese em gel de agarose não foi possível detectar claramente em nenhuma fração, seja da lavagem ou da eluição, uma banda correspondente ao pDNA, provavelmente devido à diluições durante a cromatografia e a perda de resolução do gel devido à concentração de sal utilizada.

A grande quantidade de RNA adsorvida, ao se alimentar o lisado, ocorreu devido à sua hidrofobicidade, pois são moléculas compostas por fitas simples de ácidos nucleicos, configuração esta, que permite uma maior exposição das bases nitrogenadas (hidrofóbicas). Esse caráter mais hidrofóbico do RNA quando comparado ao pDNA, que é uma molécula de dupla fita, portanto com uma menor exposição das bases nitrogenadas, nos permite supor que o RNA interagiu preferencialmente com o adsorvente, ocupando os sítios de ligação, fazendo com que o pDNA saísse diluído na etapa de lavagem.

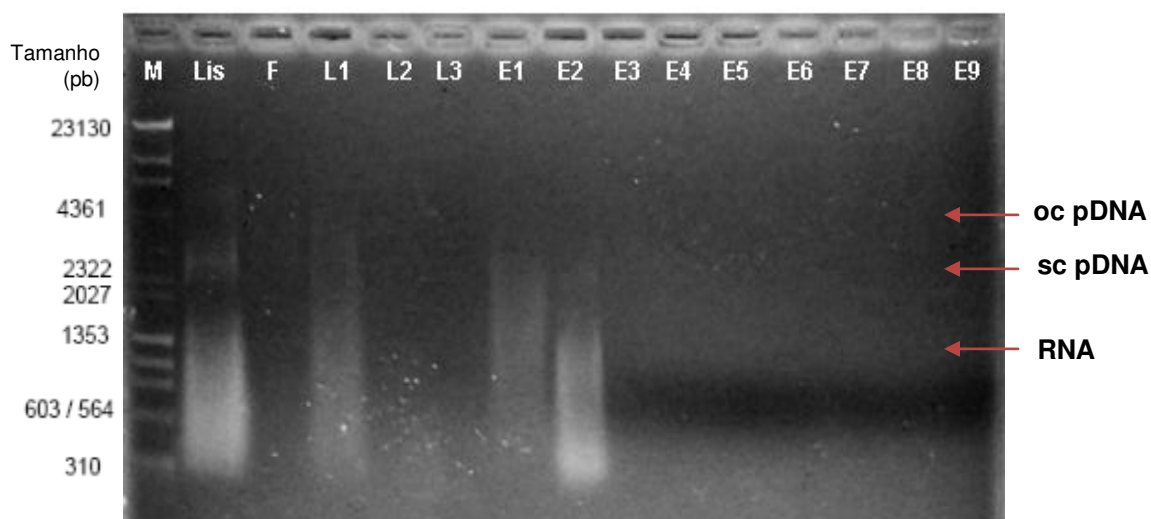


Figura 4.4. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do lisado neutralizado, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção **citrato de sódio 1,5 mol/L**. M: Marcador molecular; Lis: alimentação; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L3: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

Os resultados aqui apresentados também divergem dos observados por Freitas et al. (2008), que ao experimentarem citrato de sódio 1,5 mol/L na CIH do lisado clarificado, o pDNA foi capaz de interagir com a fenil-agarose de alta densidade de ligantes, sendo que parte da isoforma oc saiu na etapa de lavagem, ocasionando enriquecimento da isoforma sc. O RNA também interagiu com a coluna, sendo desorvido nas mesmas frações que o pDNA. Assim, como apontados na seção anterior, as possíveis causas da divergência seriam a alimentação de lisado pré-purificado e a utilização de uma resina com maior densidade de ligantes.

A partir dos resultados apresentados é possível inferir que a utilização de citrato de sódio 1,5 mol/L promoveu majoritariamente a adsorção e dessorção do sc pDNA, quando o padrão foi alimentado. Com a alimentação do lisado neutralizado, esse mesmo tampão possibilitou adsorção e dessorção de grande parte do RNA, podendo este sistema adsorvente/tampão ser utilizado como base para o desenvolvimento de um processo de purificação no modo de cromatografia negativa. Desta maneira, este tampão foi selecionado para os estudos completos discutidos à frente.

4.1.3 Estudo preliminar de CIH utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção

Ao utilizar o fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção na CIH com a resina fenil-sepharose com baixa densidade de ligantes, não se observou a interação entre o pDNA controle e a resina (Figura 4.5), uma vez que as bandas referentes ao pDNA apareceram na pista correspondente ao “flow through” (F) e na primeira fração de lavagem (L1).

Ao se alimentar o lisado neutralizado na coluna contendo o adsorvente fenil-agarose utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como fase móvel, observou-se pela eletroforese (Figura 4.6), que as isoformas de pDNA deixaram a coluna nas frações de “flow through” (pista correspondente a fração F) e na primeira fração da lavagem (pista correspondente a fração L1).

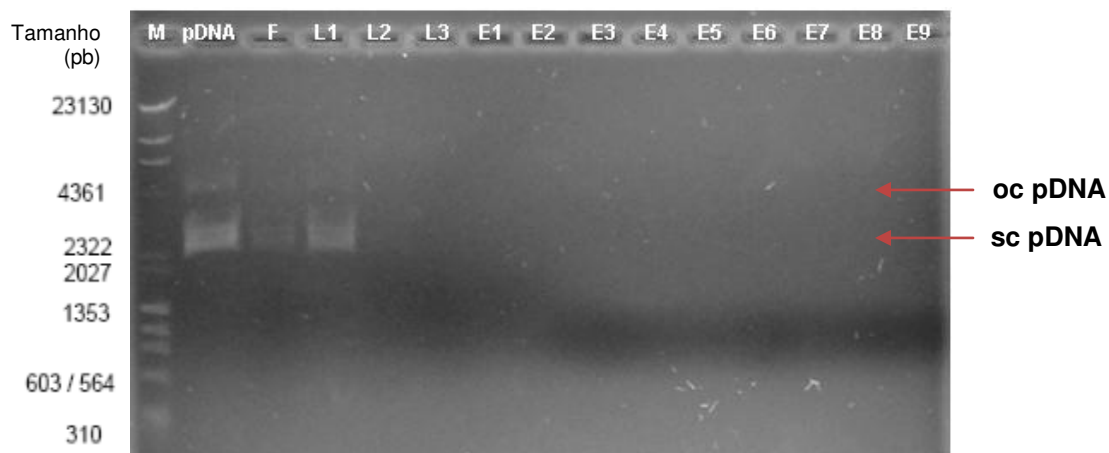


Figura 4.5. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do pDNA controle, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção **fosfato de potássio 2,0 mol/L**. M: marcador molecular; pDNA: padrão alimentado; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L3: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

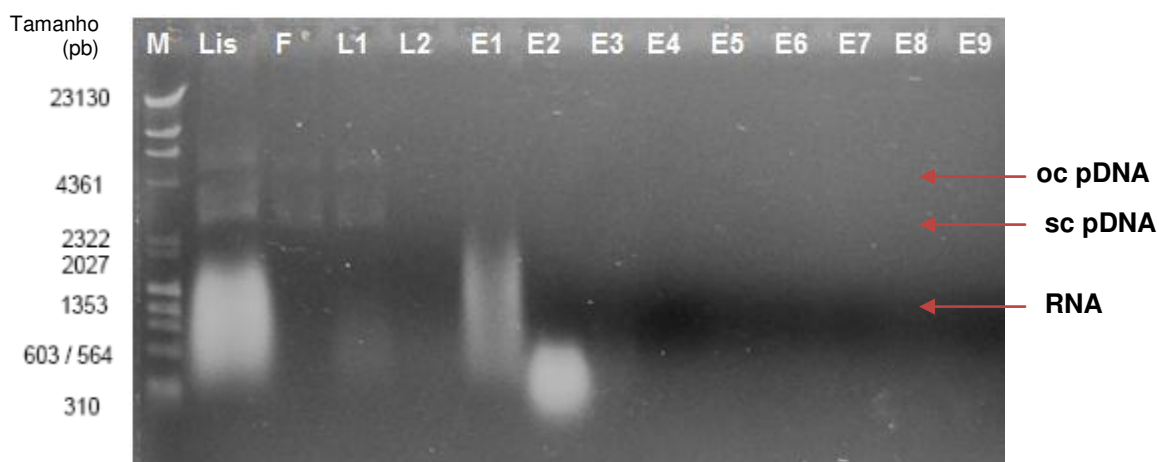


Figura 4.6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do lisado neutralizado, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção **fosfato de potássio 2,0 mol/L**. M: marcador molecular; Lis: alimentação; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L2: lavagens; E1-E9: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

A fração F contém pDNA sem contaminação visível por RNA, enquanto que na fração L1 existe contaminação, mas que pode ser considerada pequena levando-se em comparação quantidade de RNA presente na alimentação. Essa purificação foi alcançada devido à adsorção e eluição de grande quantidade de RNA, que de acordo com a eletroforese, foi dessorvido nas frações 1 e 2 da eluição (pistas E1 e E2).

Freitas et al. (2008) ao utilizarem fosfato de potássio 2,0 mol/L como fase móvel da CIH de lisado pré-purificado em resina com alta densidades de ligantes, diferentemente da fenil-agarose de baixa densidade de ligantes, aqui estudada, que promoveu apenas adsorção e dessorção do RNA, observaram que tanto as isoformas oc e sc de pDNA quanto o RNA interagiram com a resina, sendo que três frações da etapa de eluição continham apenas as isoformas de pDNA dessorvidas, enquanto que as seguintes compreendiam as isoformas de pDNA contaminadas com RNA.

Concluiu-se, portanto, que a utilização do fosfato de potássio 2,0 mol/L para a purificação de pDNA com CIH em resina fenil-agarose com baixa densidade de ligantes se mostrou interessante, pois promoveu uma boa separação entre o pDNA e o RNA, podendo ser utilizada como base para o desenvolvimento de um processo de purificação no modo de cromatografia negativa. Desta maneira, este tampão foi selecionado para os estudos completos discutidos à frente.

4.1.4 Estudo preliminar de CIH utilizando citrato de potássio 1,5 mol/L como tampão de adsorção

A CIH do pDNA padrão utilizando o citrato de potássio a 1,5 mol/L (Figura 4.7) resultou em um enriquecimento da isoforma sc nas duas primeiras frações de eluição (pistas E1 e E2), porém pode-se dizer que uma pequena quantidade da isoforma oc foi capaz de interagir com a resina, pois há uma banda correspondente a esta isoforma na segunda fração da eluição.

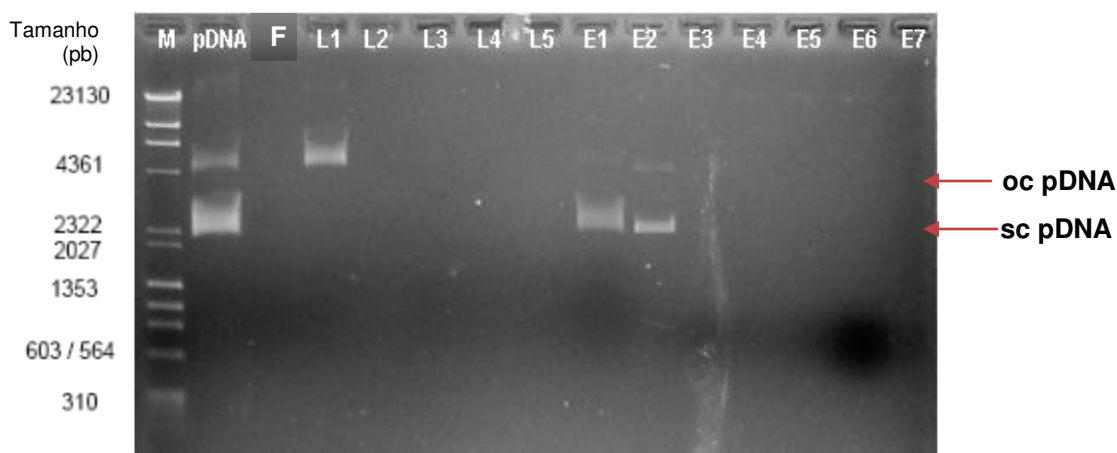


Figura 4.7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do pDNA controle, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção **citrato de potássio 1,5 mol/L**. M: marcador molecular; pDNA: padrão alimentado; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L5: lavagens; E1-E7: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

Verificou-se, através da eletroforese, que a CIH utilizando citrato de potássio 1,5 mol/L como fase móvel e alimentando-se o lisado neutralizado (Figura 4.8), resultou em uma forte banda dispersa referente ao RNA e uma banda referente à isoforma sc de plasmídeo na pista correspondente à fração 2 de eluição (E2), demonstrando que tanto a isoforma sc do pDNA quanto o RNA foram capazes de interagir com a fenil-agarose. Não foi possível visualizar a isoforma oc nas frações de lavagem e eluição, provavelmente esta molécula foi fracionada durante as etapas de lavagem e eluição, sendo diluída à concentrações menores do que o método de detecção de ácidos nucleicos utilizado foi capaz de revelar.

Freitas e colaboradores (2008) ao utilizarem o mesmo tampão na CIH de lisado clarificado em fenil-agarose de alta densidade de ligantes obtiveram uma fração de eluição composta somente pela isoforma oc, seguida de uma fração com as isoformas sc e oc e, nas frações seguintes, essas duas isoformas co-eluiam com o RNA, resultado este, diferente do obtido neste trabalho, no qual não houveram frações de pDNA sem a contaminação por RNA.

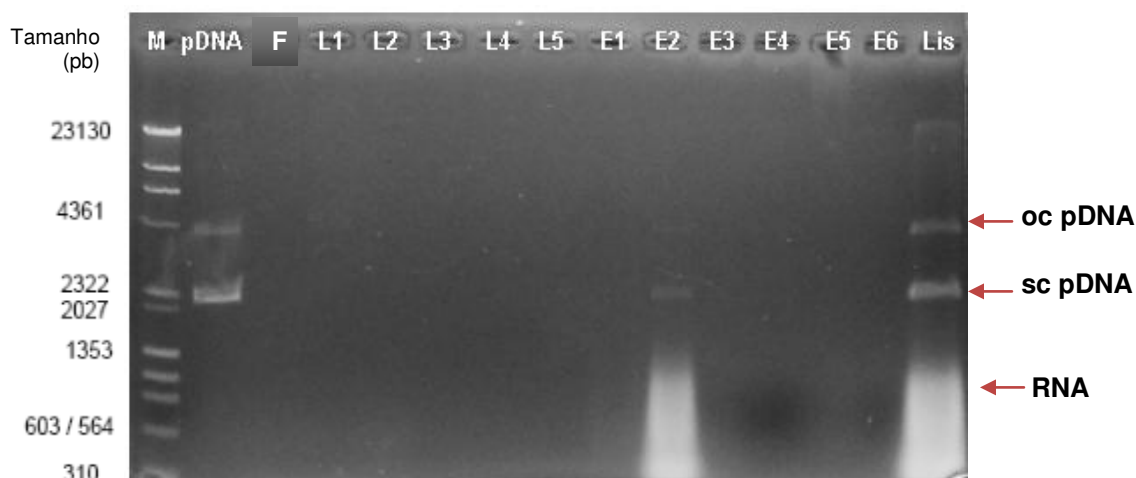


Figura 4.8. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da CIH do lisado neutralizado, utilizando resina fenil-agarose com baixa densidade de ligante e tampão de adsorção **citrato de potássio 1,5 mol/L**. M: marcador molecular; pDNA: padrão; Lis: alimentação; F: fração coletada após a injeção da amostra (“flow through”); L1-L2: lavagens; E1-E6: frações obtidas da eluição com Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0.

Em resumo, os experimentos aqui apresentados com o citrato de potássio 1,5 mol/L como fase móvel na CIH de pDNA padrão demonstrou capacidade de adsorver preferencialmente a isoforma sc, capacidade que não pode ser confirmada ao se alimentar o lisado neutralizado. No entanto, esse tampão de adsorção não promoveu purificação do pDNA com relação ao RNA, sendo que a duas moléculas foram co-eluídas.

4.2 Estudos completos

Nesta etapa do trabalho buscou-se aprofundar os estudos de purificação de pDNA em resina fenil-agarose apresentados nos estudos preliminares. Para tal, citrato de sódio 1,5 mol/L e fosfato de potássio 2,0 mol/L foram selecionados como tampões de adsorção para prosseguimento nestes estudos completos, pois apresentaram os resultados mais promissores em termos de purificação do pDNA em relação à contaminação por RNA e capacidade de resolução entre as isoformas de pDNA.

Além dos estudos completos com estes dois tampões, estudos foram também feitos utilizando sulfato de amônio 1,5 mol/L para comparação, uma vez que este sal é largamente empregado na purificação de pDNA.

Quantificações de proteínas totais, endotoxinas e gDNA foram feitas para verificar a capacidade dos tampões de adsorção aqui estudados em proporcionar pDNA de grau-farmacêutico, utilizando processo de purificação em etapa única a partir do lisado neutralizado.

Primeiramente foram realizados os estudos completos de CIH utilizando o adsorvente fenil-agarose de modo a dar continuidade aos estudos preliminares de seleção de tampões de adsorção. Posteriormente foram feitos os estudos completos de CTA com o adsorvente mercaptopirimidina-agarose.

Para se realizar os estudos completos de purificação de pDNA em etapa única com a membrana de celulose foi selecionado o ligante 2-mercaptopirimidina e o fosfato de potássio 2 mol/L como tampão de adsorção, pois este sistema ligante/tampão apresentou o melhor resultado nos experimentos com a agarose como fase estacionária.

4.2.1 Estudos completos de CIH utilizando matrizes de agarose

4.2.1.1 Estudo completo de CIH utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção

Nesta CIH do lisado neutralizado, utilizando citrato de sódio a 1,5 mol/L como fase móvel, obteve-se um resultado diferente daquele encontrado nos estudos preliminares, já que o pDNA interagiu com o adsorvente. Foi possível observar que houve adsorção e dessorção de pDNA e RNA (Figuras 4.9 e 4.10), uma vez que o pico correspondente às frações 28 a 30 continham unicamente a isoforma super enovelada do pDNA sem aparente contaminação por RNA. A dessorção do RNA ocorreu nas frações seguintes conforme a diminuição da força iônica do tampão ao longo do gradiente de eluição, que diminuía a intensidade das interações hidrofóbicas (primeiramente RNA de pequena massa molecular, seguido de RNA de alta massa molecular).

As diferenças encontradas entre estudos preliminares e os completos (realizados com coluna operadas por gravidade e equipamento cromatográfico, respectivamente), podem ser atribuídas a dois fatores: (1) a utilização do cromatógrafo permite o controle da vazão volumétrica, fazendo com que a amostra tenha uma velocidade superficial constante no leito e próxima da ideal estipulada pelo fabricante do adsorvente; (2) mudou-se a geometria da coluna, aumentando a relação altura/diâmetro (de 5 para 20), de modo que a utilizada nos estudos completos propiciasse uma melhor resolução de separação. Tanto a utilização de uma vazão volumétrica constante quanto uma coluna maior razão altura/diâmetro melhoraram a separação por, provavelmente, diminuir o efeito da dispersão axial.

A explicação para a interação preferencial da isoforma sc com a resina foi dada por Ferreira et al. (2000), o qual sugere que a forma mais compacta e enovelada desta isoforma, quando comparada a circular aberta (oc), pode permitir o acesso aos ligantes presentes dos poros da partícula da resina.

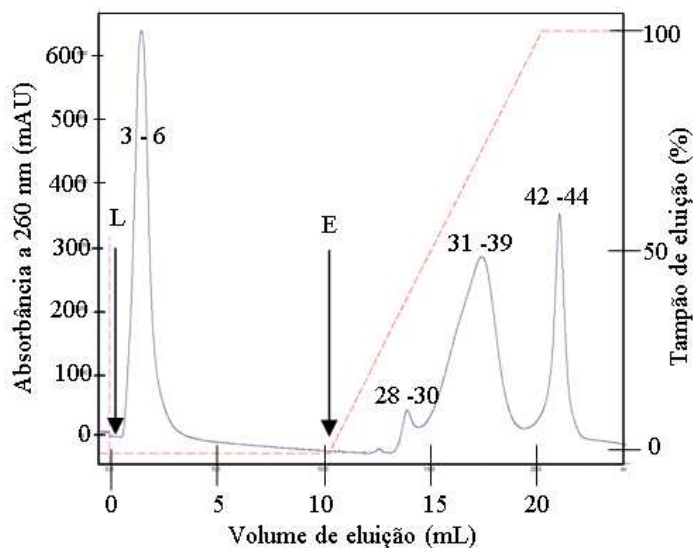


Figura 4.9. Cromatograma da CIH do lisado neutralizado utilizando o adsorvente fenil-agarose e **citrato de sódio 1,5 mol/L** como tampão de adsorção. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas para análises; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

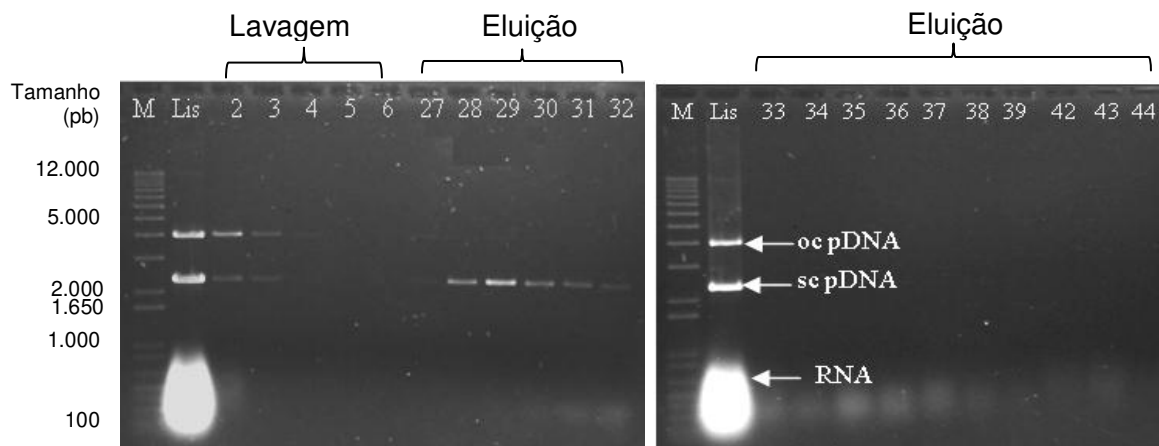


Figura 4.10. Eletroforese em gel de agarose das frações da CIH do lisado neutralizado com o adsorvente fenil-agarose e **citrato de sódio 1,5 mol/L** como tampão de adsorção. M: marcador de massa molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna.

O meio com alta concentração salina também favoreceu a seletividade entre as moléculas de RNA e sc pDNA. A explicação para isto é que as moléculas de RNA por serem de fita simples, podem ser muito mais compactadas do que o pDNA (Li et al., 2007), além de serem mais hidrofóbicas também, possibilitando a entrada nos poros e, por conseguinte, maior interação com os ligantes. Murphy et al. (2003b), ao trabalharem com cromatografia de troca aniônica, descrevem um aumento de 40% na capacidade de adsorção do sc pDNA na matriz após a adição de um agente de compactação positivamente carregado, reduzindo as repulsões eletrostáticas na cadeia de DNA, compactando sua estrutura e facilitando seu acesso aos poros. Bencina et al. (2004) ao trabalharem com monólitos, sugeriram que, da mesma maneira, a alta concentração salina, pode reduzir a repulsão entre os grupamentos carregados negativamente na cadeia de DNA, permitindo seu empacotamento e levando a uma maior capacidade de adsorção.

Os resultados referentes às análises da quantidade e qualidade do pDNA purificado, no tocante à contaminação por proteínas, endotoxinas e gDNA estão resumidos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CIH utilizando o adsorvente fenil-agarose e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

Fração	pDNA			Proteínas		gDNA		Endotoxinas	
	M (µg)	PR (%)	Y (%)	C (µg/mL)	R (%)	C (pg/uL)	R (%)	C (UE/mL)	R (%)
Lisado	16,2	6,1	100	68 ± 6,74	-	1,79x10 ⁵	-	132,0	-
28	2,6 ± 0,2	45,0 ± 5,6	14,4 ± 3,7	N.d	>97%	N.d	99,9	N.d	99,2
29	4,2 ± 0,3	45,8 ± 1,1	24,8 ± 2,7	N.d	>97%	N.d	99,9	N.d	99,2
30	2,7 ± 0,1	34,1 ± 0,9	19,6 ± 4,8	N.d	>97%	N.d	99,9	N.d	99,2

M: Massa; PR: Pureza relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; C: Concentração; R: Remoção, N.d: Não detectado

Não foi detectado a presença de proteína pelo método do BCA nas frações 28 a 30. A concentração de proteínas totais presentes no lisado foi de $68 \pm 6,74$ $\mu\text{g/mL}$, indicando que a remoção de proteínas foi maior que 97% nas frações de interesse (a sensibilidade do método é de 2 $\mu\text{g/mL}$).

A análise de concentração de gDNA indicou a presença de $1,79 \times 10^5$ $\text{pg}/\mu\text{L}$ no lisado (totalizando $44,8 \times 10^6$ pg de gDNA nos 250 μL alimentados) e ausência nas frações 28 a 30. Considerando a sensibilidade do método (1,7 $\text{pg}/\mu\text{L}$), a diluição das amostras neste ensaio (1:10) e o volume de cada fração (500 μL), podemos inferir que havia no máximo 8500 pg de gDNA por fração. Isto corresponde a no máximo, 3,2; 2,0 e 3,2 μg gDNA/mg pDNA nas frações 28, 29 e 30, respectivamente. Assim, os teores de gDNA nestas frações estariam no máximo 1,2 μg gDNA/mg pDNA acima do permitido. O lisado neutralizado continha 2.774,6 μg gDNA/mg pDNA, portanto, a CIH com o citrato de sódio do lisado neutralizado possibilitou um fator de remoção de gDNA maior que 99,9% (considerando o valor máximo de 8.500 pg de gDNA por fração).

No tocante à contaminação por endotoxinas, foram detectadas no lisado 132 UE/mL, o que representa 2042,4 UE/mg pDNA. O FDA e o EMEA regulamentam que este valor deve ser menor do que 10 UE/mg pDNA. Nas amostras da eluição 28 a 30 estas moléculas não foram detectadas. Considerando a sensibilidade do método (0,1 UE/mL), a diluição das amostras neste ensaio (1:5) e o volume de cada fração (500 μL), podemos inferir um máximo de 0,25 UE presente por fração, mostrando que em torno de 99% das endotoxinas presentes do lisado foram removidas.

Pode-se observar pela eletroforese que a isoforma oc está presente em grande quantidade no lisado alimentado, mas apenas a isoforma sc está presente nas frações de interesse, e como o método de quantificação de pDNA não discerne entre as isoformas, a recuperação real de pDNA sc, e a pureza relativa real de cada fração são maiores do que as calculadas. Ou seja, foi possível recuperar $58,8 \pm 11,3\%$ de pDNA e com purezas relativas maiores do que $45,0 \pm 5,6\%$, $45,8 \pm 1,1\%$ e $34,1 \pm 0,9\%$, nas frações 28, 29 e 30, respectivamente.

Apesar das frações 28 a 30 estarem ausentes de contaminação por proteínas e RNA, os valores de pureza relativa não se mostraram muito altos (45-34%). A provável explicação para que tais valores não estejam satisfatórios, é a existência de contaminação por RNA, que possivelmente está em uma quantidade menor do que o método analítico utilizado (eletroforese com detecção por brometo de etídeo) é capaz de detectar, porém perceptíveis à análise de pureza relativa realizada no equipamento de HPLC.

Em resumo, a CIH utilizando citrato de sódio como tampão de adsorção resultou em frações compostas apenas pela isoforma sc, isentas da contaminação de proteínas e endotoxinas, porém com provável contaminação por gDNA e RNA. Devido a sua capacidade de separar o sc pDNA do RNA, das proteínas, das endotoxinas e da isoforma oc, a CIH com o citrato de sódio 1,5 M pode ser utilizada como uma etapa de recuperação intermediária no processo de purificação pDNA, sendo necessárias etapas posteriores de polimento para que o produto purificado possa ser utilizado nos estudos de terapia gênica e vacinação com DNA. A necessidade de adicionar etapas, nesse caso, pode não representar uma desvantagem, sendo que a adição de uma etapa de polimento (normalmente CET) representaria uma garantia extra à qualidade final da molécula de pDNA, estando de acordo com as boas práticas de fabricação (Freitas et al., 2008).

4.2.1.2 Estudo completo de CIH utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção

O tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L foi capaz de promover uma resolução parcial entre os picos correspondentes as isoformas oc (pico correspondente a fração 29) e sc do pDNA (pico correspondente as frações 30 a 32) (Figura 4.11), mesmo alimentando-se diretamente o lisado neutralizado em uma matriz com baixa densidade de ligantes. Através da eletroforese em gel de agarose (Figura 4.12), podemos estimar que tal tampão permitiu um grande enriquecimento da fração sc, já que no lisado injetado na coluna há uma maior quantidade da isoforma oc que da sc, relação que diminuiu consideravelmente nas frações de eluição 30 a 32. Estas frações também estão isentas de contaminação

por RNA, que foi eluído conforme diminuição da força iônica durante o gradiente de eluição, mesmo perfil observado ao se utilizar citrato de sódio 1,5 mol/L como fase móvel.

A diferença de enriquecimento observada entre os tampões fosfato de potássio e citrato de sódio, pôde ter ocorrido não só devido apenas à concentração salina maior do primeiro, mas também devido ao tipo de íon (tamanho e forma) envolvido. De acordo com Li et al. (2007) há uma relação direta entre a compactação do pDNA com o aumento da concentração de sal, possibilitando que algumas moléculas de pDNA tenham acesso aos poros do gel, aumentando assim, o número de interações do pDNA com o ligante, ao mesmo tempo que favorece as interações hidrofóbicas. Esses mesmos autores também expõem que a estrutura relaxada e estendida do oc pDNA é menos afetada pela concentração salina.

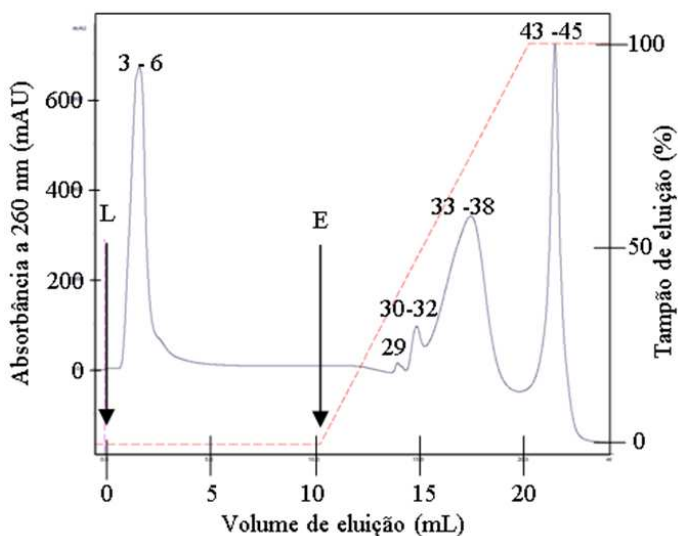


Figura 4.11. Cromatograma obtido pela CIH do lisado neutralizado utilizando o adsorvente fenil-agarose e **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas para análises ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

Nas condições de alta concentração salina o RNA, como já discutido no item anterior, também pode ter sofrido uma maior compactação do que o sc pDNA, que somado a sua maior hidrofobicidade, interagiu mais eficientemente com os ligantes, levando assim, à uma maior adsorção.

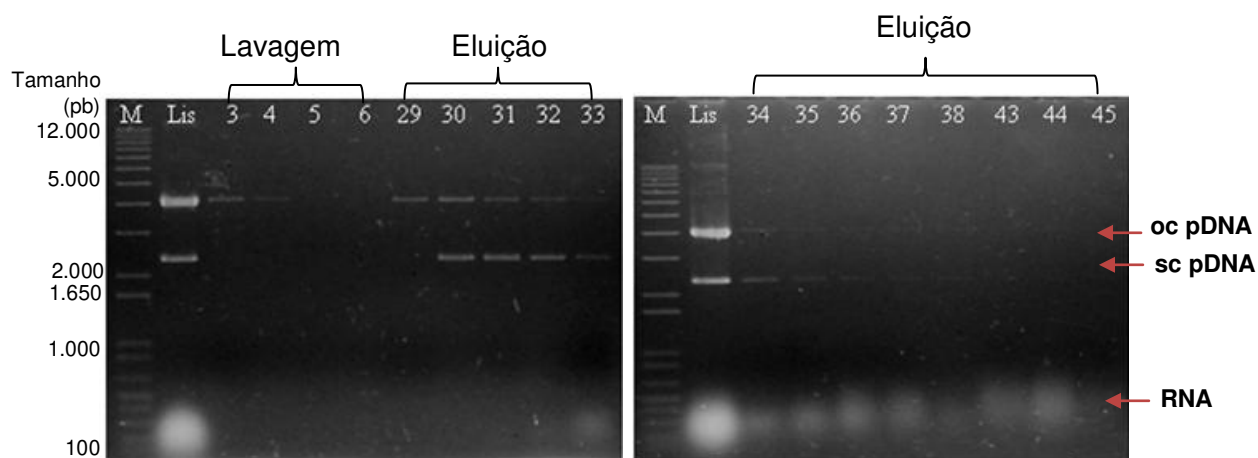


Figura 4.12. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CIH do lisado neutralizado com o adsorvente fenil-agarose e **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção. M: Marcador de massa molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna.

Assim, como no caso do citrato de sódio 1,5 mol/L, o uso do tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L resultou em frações de interesse (30 a 32) ausentes de proteínas. A quantidade de proteínas totais presentes no lisado neutralizado foi de $112,58 \pm 45,20 \mu\text{g/mL}$, portanto, houve uma redução na concentração de proteínas de mais de 98%, pois o método analítico de determinação da concentração de proteínas utilizado tem como limite de detecção $2 \mu\text{g/mL}$.

Ao se repetir os experimentos cromatográficos utilizando como alimentação um lisado com uma maior proporção da isoforma sc de pDNA (obtido da mesma maneira que foi descrito na seção 3.3), foi possível obter o mesmo perfil cromatográfico, porém, as frações de interesse (30-32) continham majoritariamente a isoforma sc (Figura 4.13). Portanto, para uma maior eficiência do uso do tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L nesta CIH é necessário alimentar a coluna com um lisado com a menor degradação da isoforma sc possível. A partir

destas amostras foram feitas as quantificações e análises da qualidade do pDNA, cujo os resultados estão apresentados na Tabela 4.3.

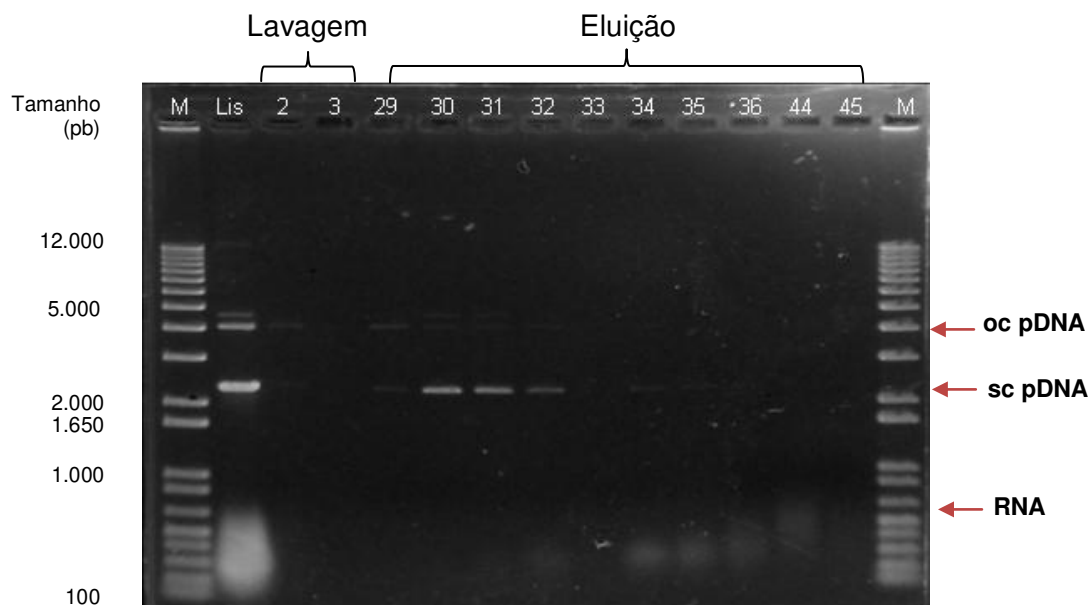


Figura 4.13. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CIH do lisado neutralizado com maior razão sc pDNA/oc pDNA com adsorvente fenil-agarose e **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção. M: Marcador de massa molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna.

O fosfato de potássio 2,0 mol/L como fase móvel possibilitou uma recuperação nas frações 30 e 31 de 38,1% (a fração 32 não foi utilizada neste cálculo por apresentar concentração de pDNA abaixo do limite de detecção do método). Apesar de esta recuperação (cerca de 59% para as frações de 28 a 30) ser menor do que as obtidas com o citrato de sódio 1,5 mol/L (58%), conseguiu-se valores de purezas relativas maiores, chegando a $85,5 \pm 2,7\%$ na fração 30, o que torna esta condição uma candidata para purificação de pDNA sc direto do lisado neutralizado, sendo necessário apenas uma etapa adicional de troca de tampão.

Tabela 4.3. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CIH utilizando o adsorvente fenil-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como fase móvel.

Fração	pDNA			Proteínas		gDNA		Endotoxinas	
	M (µg)	PR (%)	Y (%)	C (µg/mL)	R (%)	C (pg/uL)	R (%)	C (UE/mL)	R (%)
Lisado	32,4	17,2	100	112,6 ± 45,2	-	2,1 x10 ⁵	-	320,0	-
30	7,5 ± 0,7	85,5 ± 2,7	23,2 ± 0,0	N.d	>98%	N.d	99,9	N.d	99,7
31	4,8 ± 0,0	65,4 ± 1,0	14,9 ± 0,0	N.d	>98%	N.d	99,9	N.d	99,7
32	N.d.	-	-	N.d	>98%	440	99,6	N.d	99,7

M: Massa; PR: Pureza relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; C: Concentração; R: Remoção, N.d:Não detectado

Nas frações 30 e 31 não foi possível detectar a presença gDNA (sensibilidade de detecção de 1,7 pg/μL). Conforme analisado para o caso da CIH com citrato de sódio 1,5 mol/L, conclui-se que na pior hipótese, as frações 30 e 31 contêm no máximo 1,1 e 1,8 μg gDNA/mg pDNA, portanto, abaixo do valor estabelecido pelas agências reguladoras (< 2 μg gDNA/mg pDNA). Na fração 32 foi possível detectar 440 pg/μL de gDNA, que significa um total de 101,8 μg gDNA/mg pDNA, estando muito acima do valor aceitável, sendo talvez o motivo da pureza relativa desta fração ser apenas em torno de 17%. No lisado neutralizado foi detectado $2,1 \times 10^5$ pg/μL de gDNA, resultando em um valor de 1.621,0 μg gDNA/mg pDNA. A remoção de gDNA foi maior que 99,9% nas frações de interesse.

Não foi detectada a presença de endotoxinas nas frações 30-32, ao contrário do lisado, no qual foi detectado 320 UE/mL. Este valor implica em 2472,1 UE/mg pDNA (teor máximo permitido é de 10 UE/mg pDNA). Assim, esta CIH com fosfato de potássio 2,0 mol/L removeu das frações contendo pDNA no mínimo 99,7% das endotoxinas presentes inicialmente (cálculo considerando a sensibilidade do método de detecção, descrito na seção anterior).

De acordo com dados presentes na literatura, não há nenhum processo proposto, utilizando agarose como matriz cromatográfica, que atinja esses níveis de pureza relativa ao se alimentar diretamente o lisado neutralizado. Por outro lado, etapas de RPB utilizando fosfato de potássio na purificação de pDNA são raramente descritos na literatura, o que dificulta comparações de desempenho do processo aqui sugerido com outros processos disponíveis, que serão discutidos no item 4.2.4.

Em resumo, a CIH do lisado neutralizado, utilizando o fosfato de potássio 2,0 mol/L com o adsorvente fenil-agarose com baixa densidade de ligantes, possibilitou a obtenção de uma fração de interesse com cerca de 85% de pureza relativa, sem contaminação por gDNA, endotoxinas e proteínas e majoritariamente composta pela fração sc. Apesar de ter separado visualmente todo o RNA do pDNA, provavelmente a PR não chega a 100% devido à contaminações por esta molécula à níveis indetectáveis para brometo de etídio na eletroforese, porém detectáveis para o HPLC. Tal resultado foi obtido sem a necessidade de etapas

anteriores de precipitação salina e com solventes orgânicos e ainda evitou a utilização de sulfato de amônio em alta concentração molar como fase móvel.

4.2.1.3 Estudo completo de CIH utilizando sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção

Como o sulfato de amônio é o tampão mais utilizado na purificação de pDNA por cromatografia de afinidade (Souza et al., 2009^a; Souza et al., 2009b; Souza et al., 2008a; Souza et al., 2008b; Souza et al., 2007; Souza et al., 2006), hidrofóbica (Diogo et al., 2001; Li et al., 2005; Freitas et al., 2008; Pereira et al., 2010) e tiofílica (Lemmens et al., 2003; Sandberg et al., 2004), o mesmo experimento conduzido com citrato de sódio e fosfato de potássio foi conduzido com o sulfato de amônio, para efeito de comparação.

Os dados obtidos com a CIH (Figura 4.14 e 4.15) foram condizentes com a literatura (Diogo et al., 2005; Freitas et al., 2008): o sulfato de amônio a 1,5 mol/L não teve capacidade de promover a interação do pDNA com a coluna, muito menos de separar suas isoformas. No entanto, a presença de RNA nas frações de lavagem foi pequena, sendo, portanto, sugerida por Diogo et al. (2005) como um processo de cromatografia negativa.

Os resultados obtidos com relação a quantificação de pDNA e as principais impurezas presentes no lisado estão resumidas na Tabela 4.4.

No tocante a contaminação por proteínas, o sulfato de amônio se mostrou desvantajoso quando comparado aos tampões citrato de sódio 1,5 mol/L e fosfato de potássio 2,0 mol/L, já que foi possível a detecção de proteínas na fração 2 na concentração de $2,96 \pm 1,4$ µg/mL. No lisado foi possível detectar 118,1 µg/mL de proteínas, mostrando que apesar de remover 95% das proteínas na fração de interesse, tal remoção foi insuficiente, pois resultou em 134,5 µg proteína/mg pDNA, excedendo em muito a concentração limite de proteínas por miligrama de pDNA estipulados pelas agências reguladoras (< 3 µg proteína/ mg pDNA).

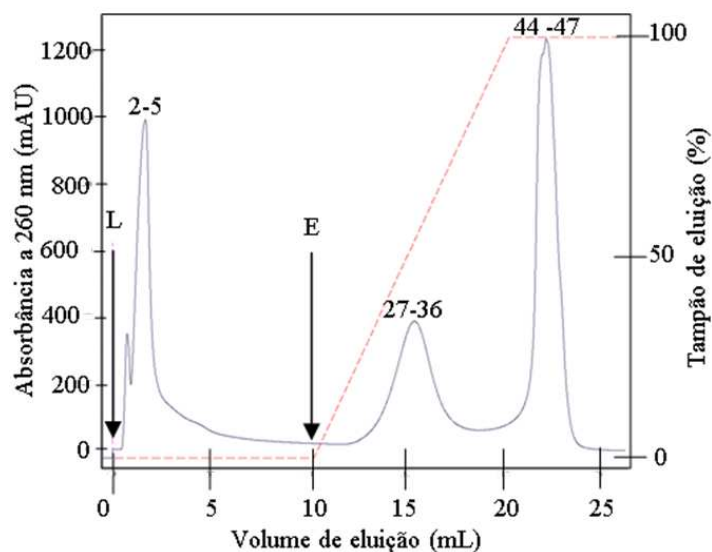


Figura 4.14. Cromatograma obtido pela CIH do lisado neutralizado utilizando o adsorvente fenil-agarose e **sulfato de amônio 1,5 mol/L** como tampão de adsorção. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

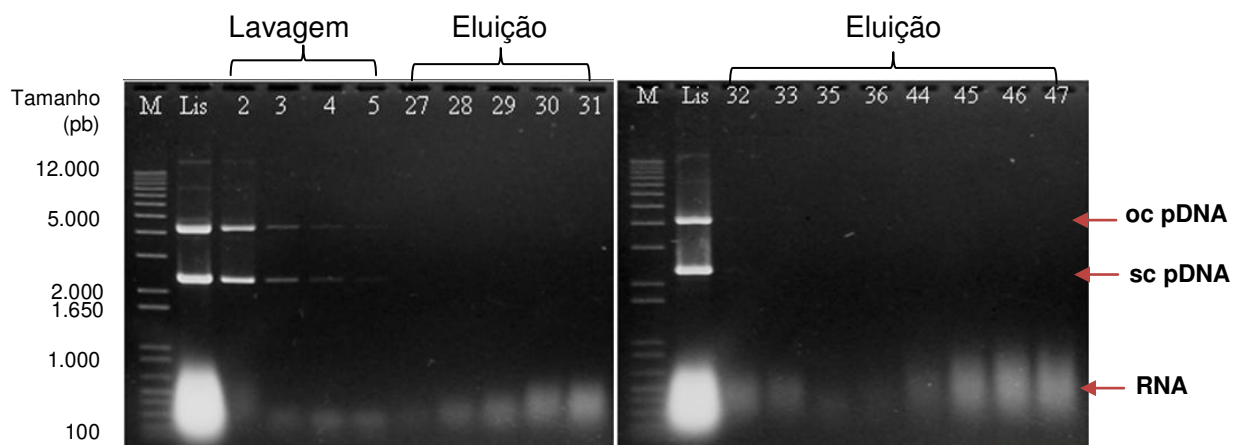


Figura 4.15. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CIH do lisado neutralizado com adsorvente fenil-agarose e **sulfato de amônio 1,5 mol/L** como tampão de adsorção. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna.

Na fração 2 não foi possível detectar a presença de gDNA (sensibilidade do método 1,7 pg/mL). Adotando-se os mesmos cálculos relatados nos subcapítulos 2.4.1 e 2.4.2, conclui-se que há no máximo 0,8 µg gDNA/mg pDNA, portanto, teor dentro limite estipulado pelas agências reguladoras para este parâmetro. No lisado neutralizado alimentado foram detectados $1,9 \times 10^5$ pg/µL, resultando em 2.570 µg gDNA/mg pDNA.

Quanto as endotoxinas, no lisado neutralizado e na fração 2 foram detectados $329,1 \pm 1,2$ e $5,0 \pm 1,2$ UE/mL, respectivamente. Apesar da remoção de endotoxinas na fração de interesse ter sido em torno de 97%, foi quantificado 457 UE/mg pDNA, ultrapassando a concentração limítrofe permitida (>10 UE/mg pDNA).

Essa condição cromatográfica, com o uso de sulfato de amônio foi a que proporcionou melhores resultados de recuperação, sendo de $56,3 \pm 1,3\%$ na fração 2. O resultado de pureza relativa desta mesma fração, igual a $82,6 \pm 1,28\%$ foi próximo do valor encontrado na fração 30 (85,5%) da CIH com fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.

Apesar dos resultados positivos apresentados em relação à purificação com este tampão de adsorção, considerando-se os valores obtidos de recuperação, pureza relativa e contaminação por gDNA, seria necessário a inclusão de pelo menos duas etapas de purificação, provavelmente cromatográficas, para se eliminar as contaminações por RNA, proteínas endotoxinas, isoforma oc (e.g., CET, CTI, CA e TAC) e realizar a troca de tampão (e.g., CET e diafiltração).

Estudos de viabilidade econômica também precisam ser feitos, pois a utilização deste sal requer etapas adicionais para a remoção dos contaminantes e tratamento de efluentes, pois existem regulamentações rígidas sobre o descarte do sulfato de amônio.

Tabela 4.4. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CIH utilizando o adsorvente fenil-agarose e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

Fração	pDNA			Proteínas		gDNA		Endotoxinas	
	M (µg)	PR (%)	Y (%)	C (µg/mL)	R (%)	C (pg/uL)	R (%)	C (UE/mL)	R (%)
Lisado	18,9	17,2	100	112,6 ± 45,2	-	1,9 x10 ⁵	-	329,1	-
2	10,9 ± 0,5	82,6 ± 1,3	56,3 ± 1,3	2,9 ± 1,4	95%	N.d	99,9	5 ± 1,2	96,9

M: Massa; PR: Pureza relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; C: Concentração; R: Remoção, N.d:Não detectado

4.2.2 Estudos completos de CTA utilizando matriz de agarose

Como o adsorvente utilizado nestes estudos foi desenvolvido “in house”, os mesmos procedimentos cromatográficos realizados com a mercaptopirimidina-agarose, foram realizados com a agarose ativada com divinil sulfona (DVS-agarose), funcionando, assim, como um controle para se averiguar se houve ou não o acoplamento da mercaptopirimidina na matriz ativada e também adsorções não específicas, ou seja, aquelas cujas interações acontecem com a matriz em si e não com a participação do ligante mercaptopirimidina.

4.2.2.1 Estudo completo de CTA utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção

Ao se utilizar citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção na CTA utilizando os adsorventes controle DVS-agarose e mercaptopirimidina-agarose, obteve-se cromatogramas diferentes (Figura 4.16a e 4.16b), indicando que houve sucesso no acoplamento do ligante na matriz ativada.

A cromatografia realizada com o controle DVS-agarose resultou um perfil composto por quatro picos, que através da análise por eletroforese (Figura 4,17a), são majoritariamente constituídos por oc pDNA (frações 2-4), sc pDNA (frações 27-29), sc pDNA co-eluído com RNA (frações 33-37) e RNA (frações 43-44), respectivamente. Mesmo sem o ligante, a DVS-agarose controle interagiu com o sc pDNA, provavelmente devido ao grupamento tioéter presente na estrutura pós ativação da matriz (Figura 3.3), corroborando com Noel e colaboradores (1996), que comprovaram a natureza tiofílica da agarose ativada com a dinivilsulfona.

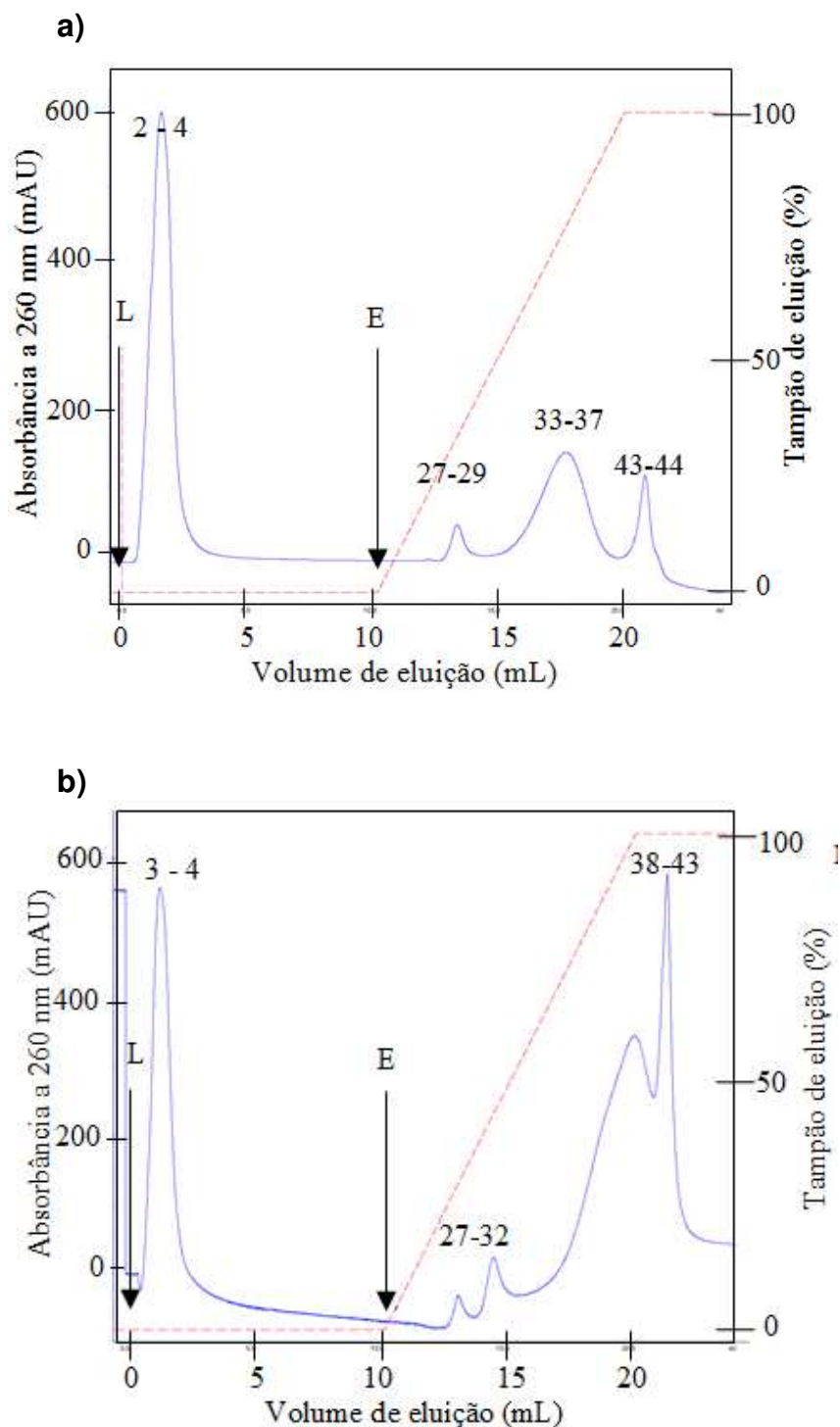


Figura 4.16. Cromatograma obtido pela CTA do lisado utilizando citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a)** DVS-agarose (controle) e **(b)** mercaptopirimidina-agarose. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

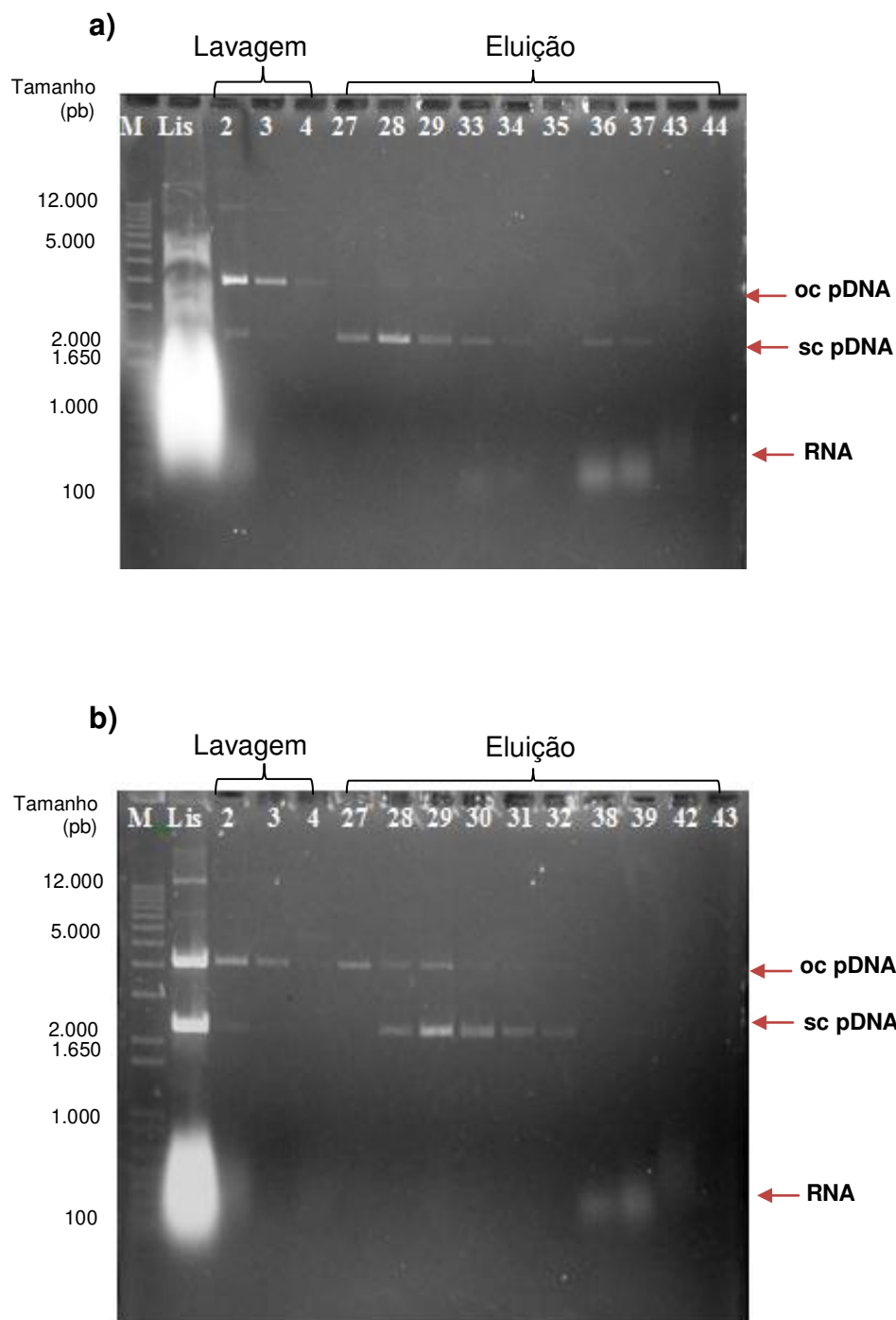


Figura 4.17. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CTA do lisado neutralizado com **citrato de sódio 1,5 mol/L** como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a)** DVS-agarose (controle) e **(b)** mercaptopirimidina-agarose. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna.

No caso da CTA com a mercaptopirimidina-agarose, obteve-se um perfil cromatográfico composto por cinco picos de absorbância (Figura 4.16b). A análise eletroforética (Figura 4.17b) mostrou que o pico correspondente às frações 2 e 3 coletadas durante a etapa de lavagem e a fração 27 coletada durante a eluição são constituídas principalmente pela isoforma oc do pDNA. O terceiro pico (frações 28-33) é composto em sua maioria por sc pDNA, apresentando pouca contaminação com a isoforma oc. Os dois últimos picos (frações 38-43) correspondem as moléculas de RNA dessorvidas ao longo do gradiente de eluição.

A perda de grande parte isoforma oc do pDNA na etapa de lavagem sugere que o citrato de sódio, na concentração molar utilizada, não foi capaz de promover compactação suficiente nesta isoforma de pDNA, de modo que ocorreu interação somente com os ligantes presentes na superfície das partículas de agarose, uma vez que a molécula de pDNA não suficientemente compactada não teve acesso a grande parte dos sítios de ligação presentes no interior das partículas de agarose.

A molécula de RNA interagiu fortemente com o adsorvente, por isso foi dessorvida conforme a força iônica do tampão diminui ao longo do gradiente de eluição. Uma possível explicação para a maior interação do RNA com o adsorvente pode ser é o fato de por ser uma molécula de fita simples, mais maleável que o pDNA devido à constituição nucleotídica em fita dupla deste, ela foi mais facilmente compactada pela ação da concentração do tampão composto por sal cosmotrópico (Lemmens et al., 2003), permitindo assim, que tenha acesso a um maior número de ligantes ou que interaja mais fortemente. Essa maior interação com o RNA foi positiva, pois permitiu uma boa resolução entre o pico composto por essa molécula e o pico composto pelo pDNA.

A isoforma superenovelada do pDNA, por ser menor e mais compressível do que a circular aberta (Lemmens et al., 2003), foi quase que totalmente adsorvida e dessorvida nas frações 28 a 32 sem contaminação por RNA. Apesar de o cromatograma apresentar dois picos quase resolvidos (o primeiro corresponde as frações 27 a 29 e o segundo corresponde as frações 30 a 32), as análises por eletroforese em gel de agarose demonstram que nas frações 28 e 29 ocorre co-eluição da isoforma de interesse com a isoforma circular aberta de pDNA. Mesmo

com a ocorrência da co-eluição das isoformas, é importante ressaltar que ocorreu enriquecimento da isoforma sc.

Para investigar se a incorporação da mercaptopirimidina na matriz ativada resultou, não só em um adsorvente com maior capacidade de interagir com o pDNA (promoveu a adsorção e dessorção das duas isoformas), mas também com maior seletividade de purificação, foram feitas análises de quantificação de pDNA, para as frações coletadas de ambos os adsorventes. Análises de contaminação por proteínas, gDNA e endotoxinas foram realizadas apenas para amostras oriundas da CTA com o adsorvente mercaptopirimidina-agarose. Os resultados estão dispostos nas Tabelas 4.5 e 4.6.

O citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção na cromatografia com o adsorvente mercaptopirimidina promoveu nas frações enriquecidas com a isoforma sc (29 a 31) uma recuperação de 91% do pDNA com pureza relativa variando de 5 a 22%, partindo-se de um material com pureza relativa de 3%. Na fração 28 não foi possível detectar quantidades mensuráveis de pDNA pelo método utilizado, enquanto que o controle DVS-agarose promoveu a recuperação de apenas 17,8% do pDNA com PR de 29%. A fração 28 foi a única que apresentou concentração de pDNA acima do limite de detecção do método (2,5 µg pDNA/mL). Estes dados mostram que a incorporação do ligante mercaptopirimidina, foi responsável por recuperar uma maior quantidade de pDNA, porém com PR menor, ou seja, este adsorvente apresentou baixa seletividade.

A mercaptopirimidina-agarose juntamente com o tampão citrato de sódio 1,5 mol/L promoveu, em média, a remoção de 100% das endotoxinas, 94% das proteínas e 99% do gDNA presentes no lisado neutralizado.

Apesar da capacidade de remoção de proteínas e gDNA apresentada pela mercaptopirimidina-agarose, as amostras contendo o pDNA estavam muito acima do limite estabelecido pelas agências reguladoras para a contaminação com estas moléculas (Tabela 4.7).

Tabela 4.5. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente controle DVS-agarose e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

pDNA			
Fração	M (µg)	PR (%)	Y (%)
Lisado	7,7	3,0	100
27	N.d	-	-
28	1,3 ± 0,1	29	17,5 ± 1,7
29	N.d	-	

M: Massa; PR: Pureza relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; N.d: Não detectado

Tabela 4.6. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-agarose e citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

Amostra	pDNA			Proteínas		gDNA		Endotoxinas	
	M (µg)	PR (%)	Y (%)	C (µg/mL)	R (%)	C (pg/uL)	R (%)	C (UE/mL)	R (%)
Lisado	11,0 ± 0,5	2,8 ± 0,0	100	120,3 ± 6,6	-	1,14x10 ⁵	-	1051,8	-
29	1,5 ± 0,2	11,1 ± 1,5	13,6 ± 2,0	6,23 ± 1,8	89,6	645,5 ± 47,1	98,9	N.d	>99,9
30	2,0 ± 0,4	5,1 ± 1,7	15,9 ± 0,4	2,7 ± 0,2	95,5	246,8 ± 37,3	99,6	N.d	>99,9
31	2,7 ± 0,3	15,1 ± 1,1	25,6 ± 2,7	3,1 ± 0,9	94,7	152,9 ± 52,8	99,7	N.d	>99,9
32	4,0 ± 0,1	22,3 ± 1,9	36,0 ± 0,2	2,3 ± 1,4	96,2	94,0 ± 3,4	99,8	N.d	>99,9

M: Massa; PR: Pureza relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; C: Concentração; R: Remoção; N.d: Não detectado

Tabela 4.7. Contaminação por proteínas e gDNA em relação a massa de pDNA nas amostras de CTA com mercaptopirimidina-agarose tendo citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

Amostra	Contaminação proteínas (μg proteína/mg pDNA)	Contaminação gDNA (μg gDNA/mg pDNA)
Lisado	2727,2	2607,3
29	1565,0	157,5
30	675,0	61,7
31	523,3	38,2
32	282,5	11,6
Limite (FDA, EMEA)	3	2

Se compararmos os dados obtidos com a CTA com os da CIH (Tabela 4.8), ao se utilizar o mesmo tampão de adsorção, percebe-se que esta última foi superior em vários os aspectos (seletividade ao sc pDNA, contaminação por proteínas, gDNA e valores de pureza absoluta), excetuando-se os valores de recuperação que foram inferiores a CTA (58,8% e 91%, respectivamente). De acordo com Sandberg et al. (2004) ao se aumentar a eletronegatividade dos constituintes dos anel aromático (contém dois átomos de nitrogênio), aumenta-se a interação com os polinucleotídeos. Tal informação é pertinente com os dados encontrados, na CTA com a mercaptopirimidina houve interação do oc pDNA e do gDNA, de maneira que foram co-eluídos com o sc pDNA. No tocante ao RNA, a interação desta molécula com o adsorvente mercaptopirimidina-agarose foi maior do que a interação com a fenil-agarose, necessitando um decréscimo maior na força iônica para o início da sua dessorção (Figura 4.18), aumentando a resolução entre os picos de pDNA e RNA.

Tabela 4.8. Comparação entre os principais dados de purificação obtidos com a CIH e CTA do lisado neutralizado utilizando o citrato de sódio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

Tipo de cromatografia	Adsorvente	Y_{total} (%)	$PR_{média}$ (%)	Contaminantes presentes nas frações com sc pDNA
CIH	Fenil-agarose	58,8	41,6	Não detectados
CTA	Mercaptopirimidina-agarose	91	13,4	gDNA, proteínas e oc pDNA

Y_{total} : Recuperação total de pDNA, $PR_{média}$: Média das pureza relativa das frações conteúdo sc pDNA.

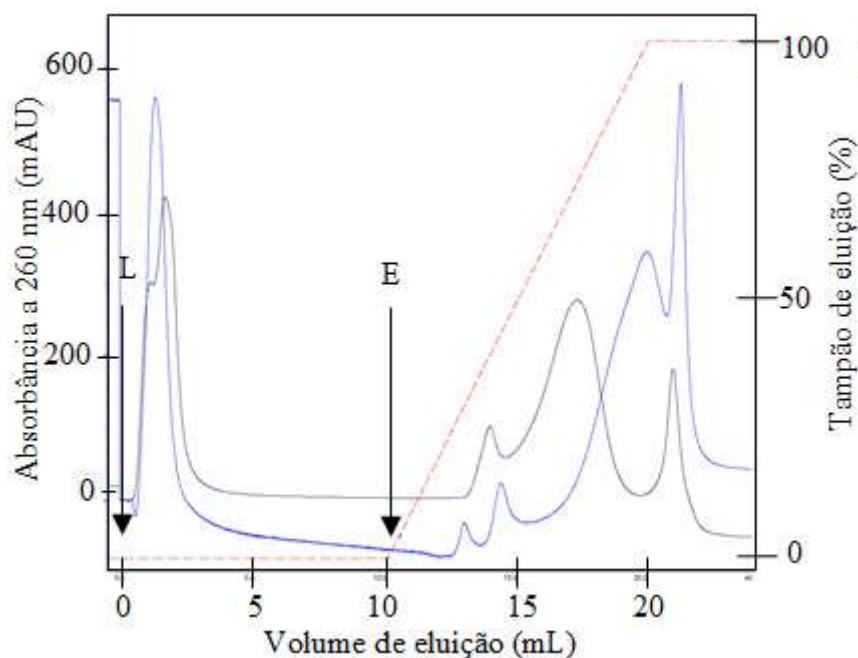


Figura 4.18. Comparação entre os perfis cromatográficos obtidos utilizando **citrato de sódio 1,5 mol/L** como tampão de adsorção e os adsorventes fenil-agarose (linha azul-escuro) e mercaptopirimidina-agarose (linha azul). L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

4.2.2.2 Estudo completo de CTA utilizando fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção

Ao se utilizar o fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção na CTA utilizando os adsorventes DVS-agarose e mercaptopirimidina-agarose, obteve-se cromatogramas com perfis diferentes (Figura 4.19a e 4.19b), indicando que as diferenças observadas foram em função do acoplamento do ligante.

A CTA com o adsorvente DVS-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção resultou em um cromatograma com cinco picos de absorbância a 260 nm: um na etapa de lavagem e quatro na etapa de eluição. Os dois primeiros picos da etapa de eluição (frações 31-33) estão com baixa resolução, ocorrendo superposição.

A análise eletroforética (Figura 4.20a) das frações coletadas da CTA com DVS-agarose revelou que as frações 2 a 4, apesar de terem apresentado pico de absorbância, não foram detectadas bandas pelo brometo de etídio. Existem duas possíveis explicações para tal fato: (1) as moléculas contidas nestas frações estavam em concentrações abaixo da capacidade de detecção do método; (2) essas frações eram constituídas por moléculas menores do que os poros da membrana de ultrafiltração utilizada na dessalinização e foram removidas nesta etapa. As frações 31 a 33 contêm as isoformas oc e sc de pDNA, sem aparente contaminação por RNA. Já as frações coletadas em seguida (36 a 40) são compostas das mesmas isoformas, mas contaminadas pela presença de RNA. O último pico apresenta um valor de absorbância muito baixo, indicando que as moléculas ali presentes estão em concentrações muito baixas, fato confirmado pela incapacidade de serem detectadas também por eletroforese.

A presença da mercaptopirimidina no adsorvente utilizado na CTA do lisado resultou em um perfil cromatográfico diferente, aumentando a resolução dos picos antes superpostos na CTA com o controle DVS-agarose. As análises por eletroforese (Figura 4.20b) revelaram que o primeiro pico da eluição (fração 31) é composto pela isoforma oc de pDNA. O segundo pico (frações 32-34) contêm a isoforma oc e sc de pDNA, porém enriquecida nesta última. O último pico da eluição (fração 39-44) é constituído majoritariamente por RNA.

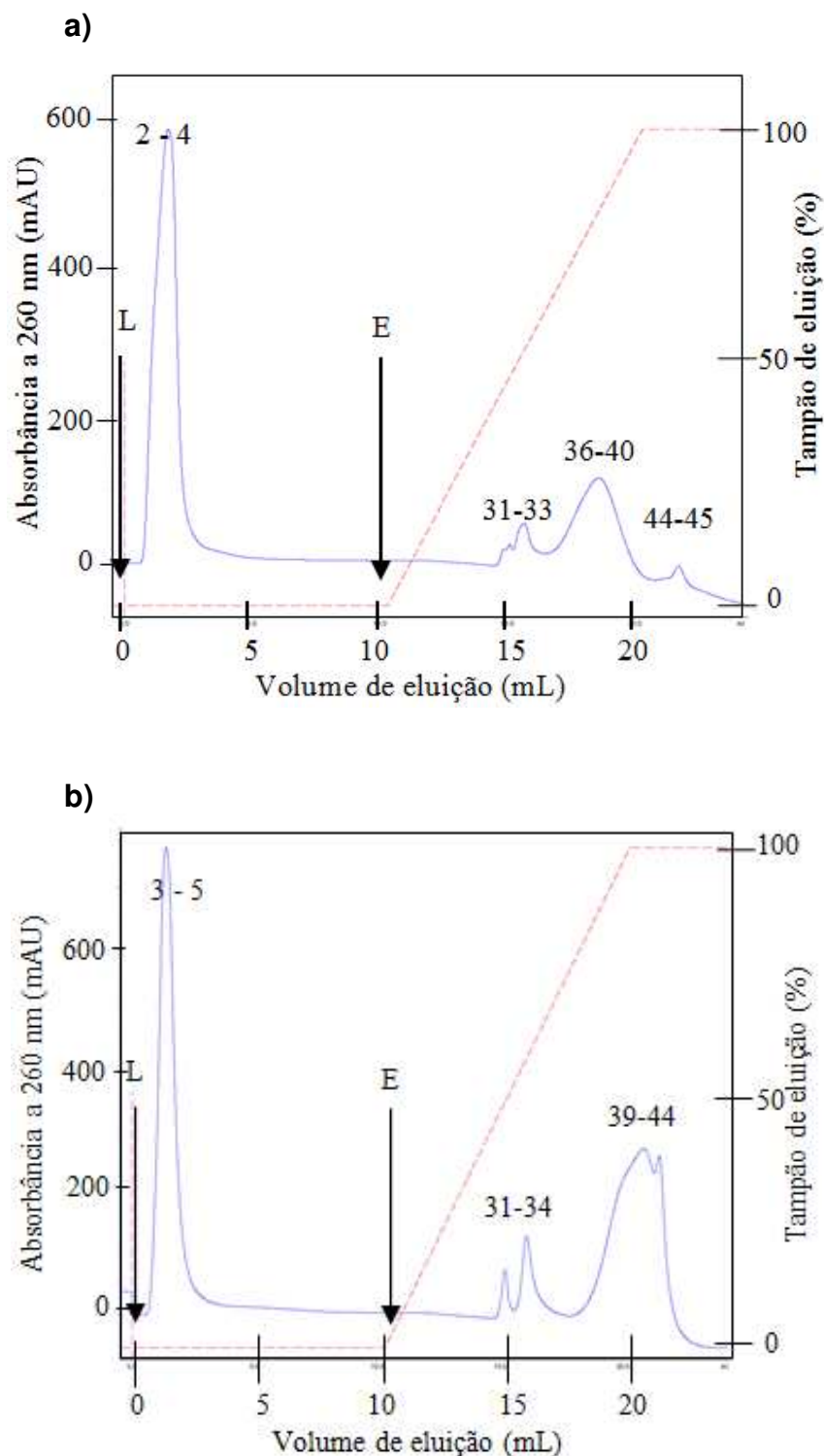


Figura 4.19 Cromatograma obtido pela CTA do lisado neutralizado utilizando **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a) DVS-agarose** controle e **(b) mercaptopirimidina-agarose**. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

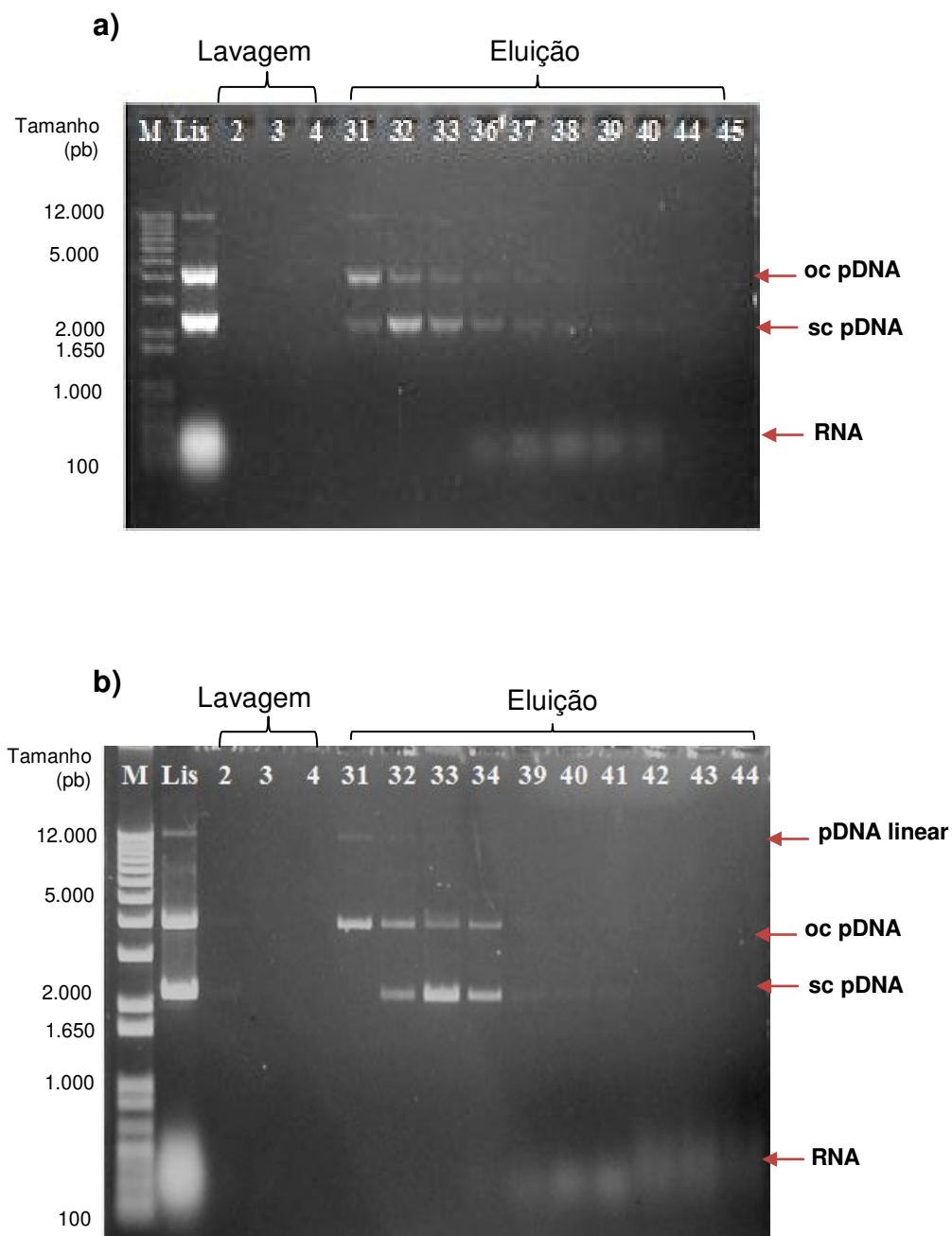


Figura 4.20. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CTA do lisado neutralizado com **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a)** DVS-agarose controle e **(b)** mercaptopirimidina-agarose. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna.

Comparando estes resultados obtidos com mercaptopirimidina-agarose e tampão fosfato de potássio com os já relatados com o mesmo adsorvente e citrato de sódio como tampão de adsorção, nota-se que: (1) na CTA com tampão fosfato não houve perda de oc pDNA na etapa de lavagem; (2) para a dessorção do pDNA foi necessário uma concentração maior de Tris HCl 10 mmol/L (52%) no tampão de eluição (no caso da CTA com citrato de sódio, 38% de Tris HCl 10 mmol/L foi necessário para dessorver o pDNA). Essas observações indicam que o fosfato de potássio 2,0 mol/L promoveu maior interação entre o pDNA e o adsorvente, mesmo tendo uma força iônica menor (força iônica igual a 5 mol/L) do que o tampão citrato de sódio 1,5 mol/L (força iônica igual a 7,5 mol/L). Provavelmente, o fosfato de potássio promove maior compactação do pDNA e intensifica as interações hidrofóbicas, pois de acordo com a série de Hofmeister, seus íons têm uma maior capacidade cosmotrópica.

O citrato de sódio foi mais seletivo ao sc pDNA, provavelmente por ter capacidade de exercer compactação apenas em moléculas mais flexíveis, como o sc pDNA e RNA, ao contrário do fosfato de potássio que aparentemente possibilitou a interação até de isoformas lineares de pDNA quando o adsorvente mercaptopirimidina-agarose foi utilizado.

As hipóteses explicitadas acima também se aplicam às diferenças encontradas no perfil de eluição do RNA: o fosfato de potássio promoveu uma maior resolução entre os picos compostos por pDNA e o picos compostos por RNA, quando comparados com o resultado ao se utilizar tampão citrato. Como já citado anteriormente, o RNA tem maior capacidade de se compactar do que o pDNA, por ser fita simples. Dessa maneira, estando na presença de um sal que compacta mais sua estrutura e promove mais interações com o adsorvente (fosfato de potássio) é de se esperar que se separe mais do pDNA, que é menos flexível e tem menor exposição das bases nitrogenadas.

Para investigar o efeito da incorporação da mercaptopirimidina na matriz ativada foram feitas análises de quantificação de pDNA das frações coletadas de da CTA com o DVS-agarose controle e mercaptopirimidina-agarose. Análises de contaminação por proteínas, gDNA e endotoxinas foram realizadas apenas para o

adsorvente mercaptopirimidina-agarose. Os resultados estão dispostos nas Tabelas 4.9 e 4.10.

A mercaptopirimidina como ligante na matriz de agarose permitiu que uma quantidade maior de pDNA (68,5%) fosse recuperada nas frações 32 a 34 com pureza relativa média próxima de 100%, em contrapartida aos 22% recuperado com 16% de pureza relativa obtidos com o adsorvente controle. A presença do enxofre, do anel heterocíclico e dos átomos de nitrogênio da mercaptopirimidina são provavelmente os responsáveis por essa maior interação com o pDNA. O átomo de enxofre e o nitrogênio colaboram com a formação de complexos doadores-aceptores de elétrons, enquanto que o anel heterocíclico participa em ligações hidrofóbicas intercalantes (π - π) com as bases nitrogenadas do pDNA (Lemmens et al., 2003).

Tabela 4.9. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente DVS-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.

Fração	pDNA		
	M (μ g)	PR (%)	Y (%)
Lisado	9,5	8,0	100
31	N.d	-	-
32	4,2 \pm 1,2	16,0 \pm 4,0	22,1 \pm 4,2
33	N.d	-	-

M: Massa; PR: Pureza Relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; N.d: Não detectado

Tabela 4.10. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.

Fração	pDNA			Proteínas		gDNA		Endotoxinas	
	M (µg)	PR (%)	Y (%)	C (µg/mL)	R (%)	C (pg/uL)	R (%)	C (UE/mL)	R (%)
Lisado	16,6 ± 1,3	8,1 ± 0,9	100	131,1 ± 10,3	-	2,4x10 ⁴	-	447,0	-
32	1,7 ± 0,1	100 ± 0,0	11,3 ± 1,15	2,9 ± 0,6	95,5	74,5 ± 22,2	99,4	N.d	99,8
33	5,4 ± 0,3	99,8 ± 0,3	39,6 ± 2,1	2,7 ± 0,2	95,8	273,7 ± 87,1	97,7	N.d	99,8
34	2,6 ± 0,1	96,7 ± 0,0	17,6 ± 1,1	10,5 ± 1,4	83,9	258,7 ± 3,4	97,8	N.d	99,8

M: Massa; PR: Pureza Relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; C: Concentração; R: Remoção, N.d: Não detectado

A combinação fosfato de potássio 2 mol/L e o adsorvente mercaptopirimidina-agarose na CTA do lisado permitiu a remoção média de 92% das proteínas, 98% do gDNA e mais que 99,9% das endotoxinas presentes inicialmente. Apesar de esta combinação tampão/adsorvente ter alcançado expressivos fatores de remoção de contaminantes, ainda mais se tratando de um material injetado sem pré-purificação e contendo apenas 3% de pDNA, a massa de proteínas e gDNA por massa de pDNA presente (Tabela 4.11) ultrapassaram os valores limites estabelecidos pelas agências reguladoras.

Tabela 4.11. Contaminação por proteínas e gDNA em relação a massa de pDNA nas amostras de CTA com mercaptopirimidina-agarose tendo fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.

Amostra	Contaminação proteínas (µg proteína/mg pDNA)	Contaminação gDNA (µg gDNA/mg pDNA)
Lisado	2184,6	400,6
32	740,0	18,6
33	274,0	27,4
34	1753,3	43,13
Limite (FDA, EMEA)	3	2

As frações 32 a 34 mesmo contaminadas com gDNA e proteínas tiveram pureza relativa de 100%. Essa incongruência pode ser explicado pelo fato de que diferentes métodos com diferentes sensibilidades são empregados para quantificar a pureza relativa, o gDNA e as proteínas. A contaminação por gDNA é da ordem de picogramas, concentração provavelmente fora do limite de detecção do método de quantificação de pDNA, que é o mesmo método que determina o valor da pureza relativa. Neste método, faz-se o registro de picos de absorbância a 260 nm, que no caso das proteínas, não é o comprimento de onda ideal para sua detecção (280 nm). Outra observação interessante é que nos valores limites estipulados pelo FDA para proteínas e gDNA por massa de pDNA, utilizam-se

unidades diferentes (μg para o contaminantes e mg para o pDNA), portanto a quantidade de pDNA presente é mais decisiva neste valor do que a concentração de contaminantes em si.

Ao se comparar os dados obtidos com a CTA com os da CIH ao se utilizar o fosfato de potássio 2,0 mol/L tampão de adsorção (Tabela 4.12), verifica-se a CTA foi superior em termos de recuperação (CTA: 67% e CIH: 38%), valores de pureza absoluta (CTA: 98,8% e CIH: 85-65%) e resolução entre os picos correspondentes as dessorções do pDNA e do RNA (Figura 4.21). A CIH foi melhor nos quesitos contaminação por proteína e gDNA eliminando estas impurezas a níveis abaixo das capacidades de detecção dos respectivos métodos de quantificação utilizados. Ao se utilizar um ligante mais eletronegativo (mercaptopirimidina), possibilitou-se que interações de doação/acepção de elétrons ocorressem, diferente do que ocorreu com o ligante fenil, que possivelmente promoveu separação baseado principalmente apenas nas diferenças de hidrofobicidade. As interações mistas proporcionadas pela mercaptopirimidina podem ter resultado em interações mais fortes entre os polinucleotídeos e o adsorvente (Lemmens et al., 2003).

Tabela 4.12. Comparação entre os principais dados de purificação obtidos com a CIH e CTA do lisado neutralizado utilizando o fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.

Tipo de cromatografia	Adsorvente	Y_{total} (%)	$PR_{\text{média}}$ (%)	Contaminantes presentes nas frações com sc pDNA
CIH	Fenil-agarose	38	75	oc pDNA
CTA	Mercaptopirimidina-agarose	67	98,8	gDNA, proteínas e oc pDNA

Y_{total} : Recuperação total de pDNA; $PR_{\text{média}}$: Média das pureza relativa das frações contendo sc pDNA.

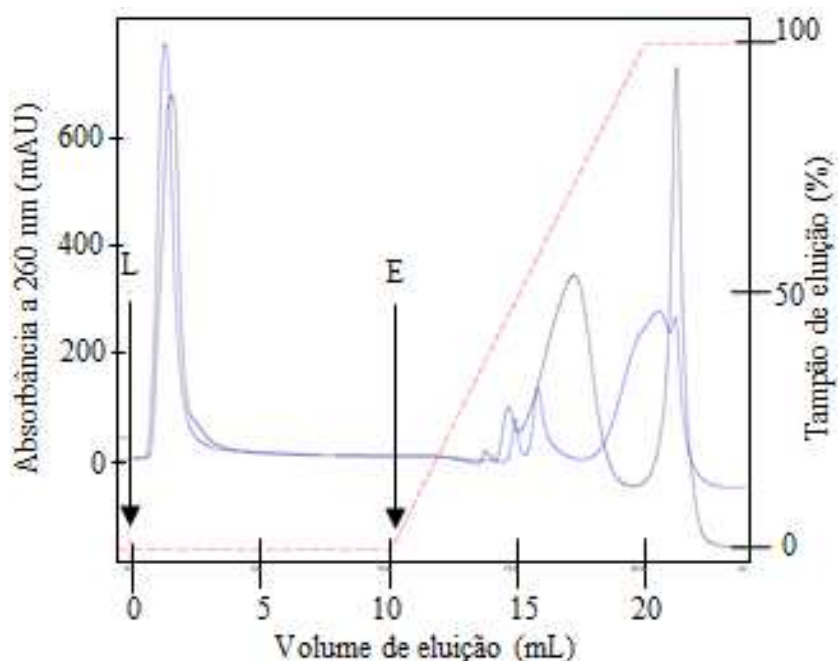


Figura 4.21. Comparação entre os perfis cromatográficos obtidos utilizando **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção e os adsorventes fenil-agarose (linha azul-escuro) e mercaptopiridina-agarose (linha azul). L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

É importante salientar que não há na literatura a descrição de processo, a partir de lisado neutralizado, que se tenha atingido os expressivos valores de purificação alcançados quando se combinou o adsorvente mercaptopiridina-agarose e o fosfato de potássio 2 mol/L. Uma vez que para que o pDNA recuperado nestas frações se torne um produto de utilização terapêutica é necessário fazer uma etapa posterior de troca de tampão, a contaminação remanescente por proteínas e gDNA não representam uma desvantagem desse processo de purificação quando comparado com os descritos na literatura (Lemmens et. al, 2003; Sandberg et al., 2004), pois a etapa obrigatória de troca de tampão, se feita por cromatografia por exclusão de tamanho, por exemplo, poderia eliminar tais contaminações, uma vez que os contaminantes tem um tamanho diferente da molécula de interesse.

4.2.2.3 Estudo completo de CTA utilizando sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção

O tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção na cromatografia de interação tiofílica aromática, manteve a tendência observada com os outros tampões de resultar cromatogramas com perfis diferentes ao se experimentar a DVS-agarose controle (Figura 4.22a) e mercaptopirimidina-agarose (Figura 4.22b).

No cromatograma obtido com a utilização da DVS-agarose como adsorvente foi possível obter quatro picos de absorbância a 260 nm. Dois deles, com baixa resolução entre si, na etapa de lavagem da coluna (frações 2-4) e outros dois, bem resolvidos, na etapa de eluição (frações 30 a 36 e 44 a 46). A análise do conteúdo das frações correspondentes a esses picos (Figura 4.23a) revelou que o pDNA não interage com o adsorvente, saindo nas frações 2 a 4, sem enriquecimento da isoforma sc e contaminado com RNA. As frações referentes aos dois picos de absorbância obtidos na etapa de eluição são constituídas por RNA.

A CTA com o adsorvente mercaptopirimidina-agarose e o tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L resultou em cromatograma composto por duas séries de picos superpostos, uma na etapa de lavagem (frações 2 a 4) e outra na etapa de eluição (frações 29 a 36 e 44 a 46). Através da eletroforese (Figura 4.23b) das frações que compõem esses picos de absorbância, nota-se que não houve diferença do padrão observado com DVS-agarose controle: o pDNA foi recuperado na etapa de lavagem sem enriquecimento da isoforma superenovelada e contaminado com RNA. Apenas o RNA foi adsorvido e posteriormente dessorvido nas frações 29 a 36 e 44 a 46. Analisando os cromatogramas obtidos com os dois adsorventes, é possível verificar que a inclusão do ligante mercaptopiridina na matriz ativada, promoveu interações mais fortes entre o RNA e o adsorvente (foi necessário uma maior concentração de Tris HCl 10 mmol/L no tampão de eluição para promover sua dessorção), mas diminuiu a resolução entre o RNA de baixa massa molecular (frações 29 a 36) com o de alta massa molecular (frações 44 a 46).

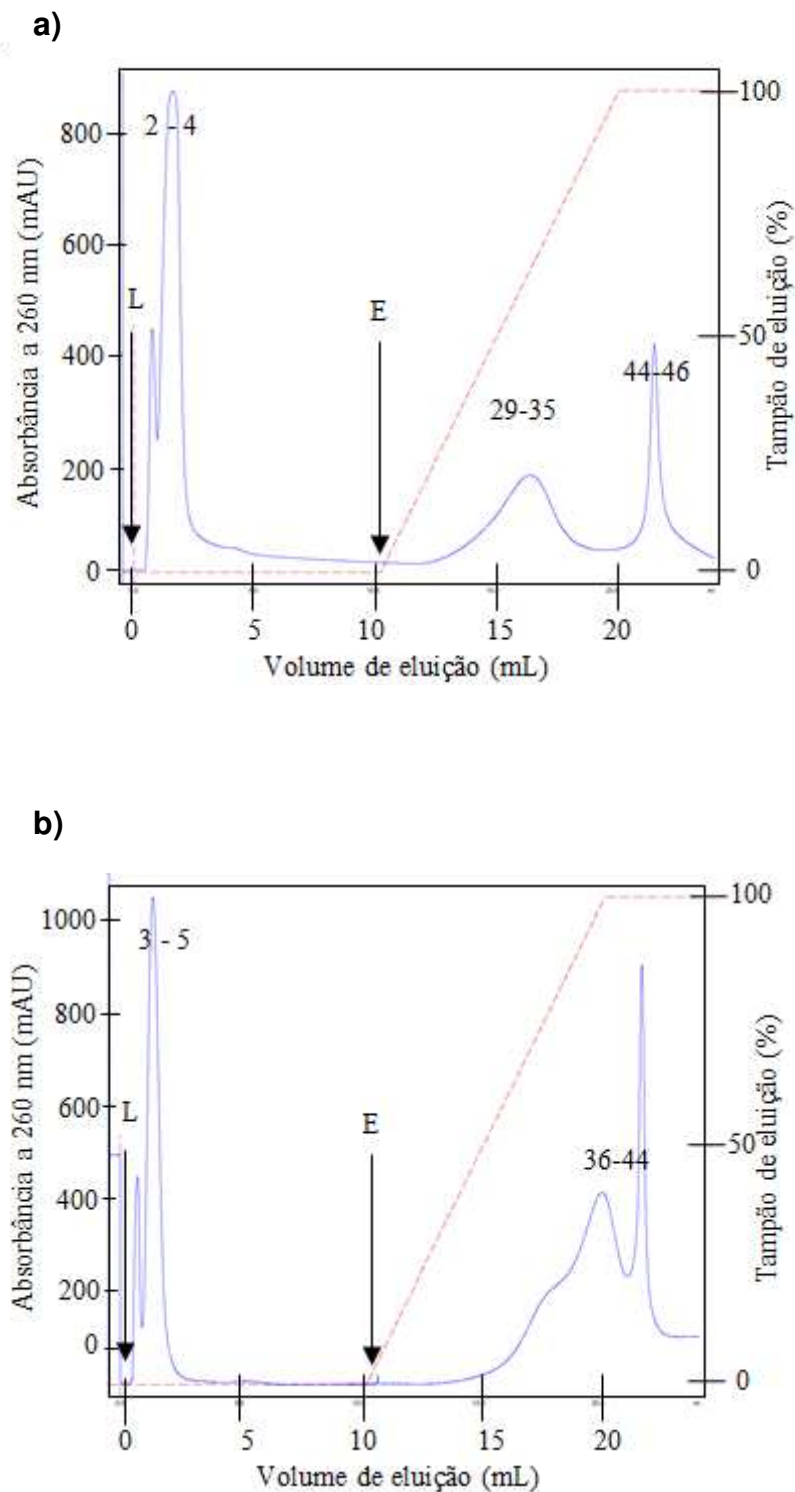


Figura 4.22. Cromatograma obtido pela CTA do lisado neutralizado utilizando sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a)** DVS-agarose controle e **(b)** mercaptopirimidina-agarose. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

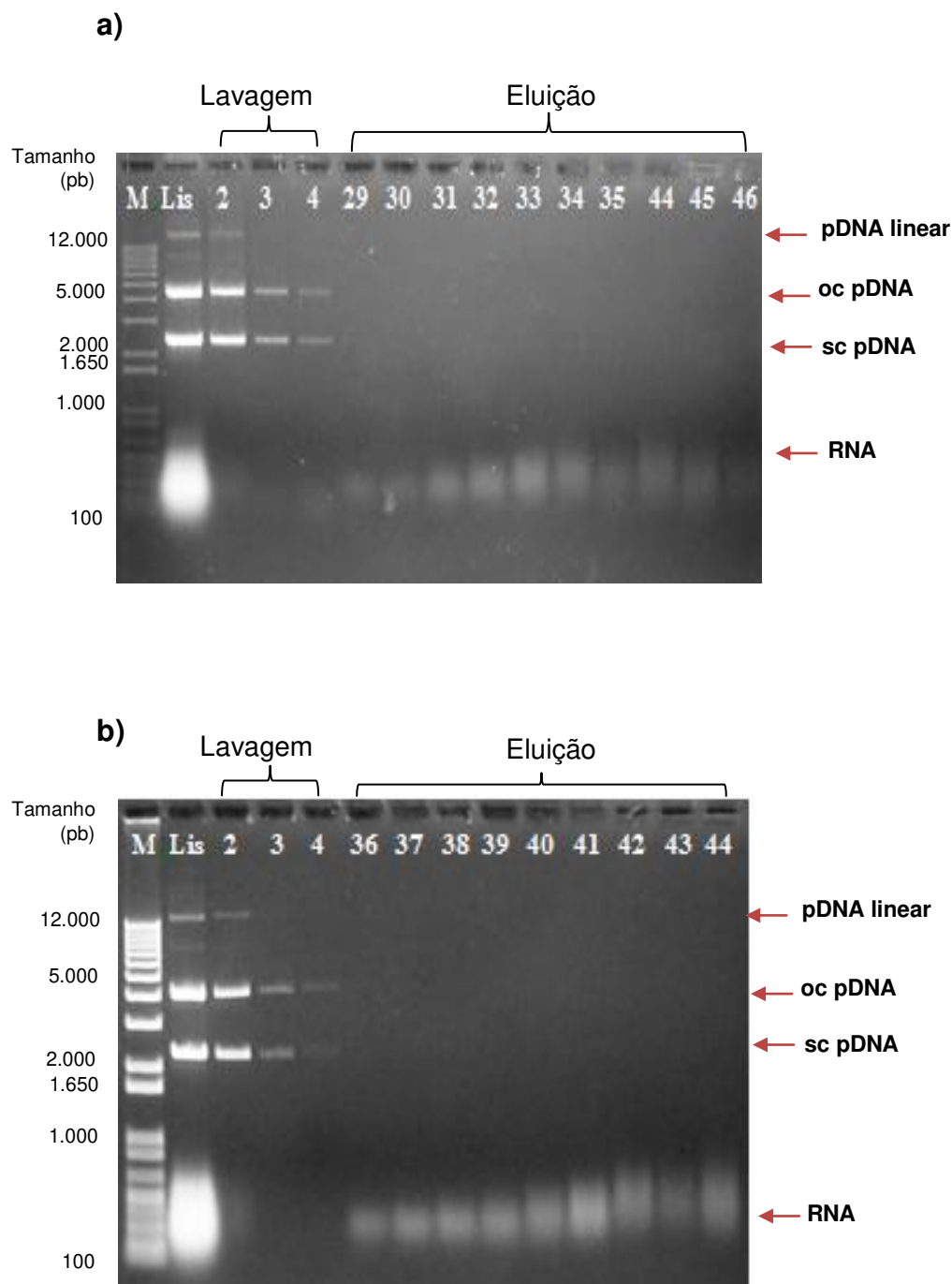


Figura 4.23. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CTA do lisado neutralizado com **sulfato de amônio 1,5 mol/L** como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a) DVS-agarose** controle e **(b) mercaptopirimidina-agarose**. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna.

O sulfato de amônio 1,5 mol/L é o tampão que possui a menor força iônica dentre os experimentados (força iônica igual a 3,75 mol/L), porém uma capacidade de “salting out” comparável à do fosfato de potássio, conforme a série de Hofmeister, portanto, a provável diferença nos resultados obtidos entre o fosfato, citrato e o sulfato devem ser devido a maior capacidade de compactação das moléculas de ácidos nucleicos promovida pelos primeiros.

Apesar do DVS-agarose controle e a mercaptopirimidina-agarose não terem adsorvido o pDNA utilizando sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção, se analisou se o ligante influenciou na recuperação e pureza relativa do pDNA purificado. Quantificação da contaminação por proteínas, gDNA e endotoxinas foram realizadas apenas para o adsorvente mercaptopirimidina-agarose. Os resultados estão dispostos nas Tabelas 4.13 e 4.14.

Tabela 4.13. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente DVS-agarose e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

Fração	pDNA		
	M (µg)	PR (%)	Y (%)
Lisado	13,4 ± 0,6	6,5 ± 2,1	100
2	9,6 ± 1,3	60,0 ± 29,7	72,1 ± 9,7
3	1,8 ± 0,4	4,0 ± 1,4	13,3 ± 3,3

M: Massa; PR: Pureza Relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; N.d: Não detectado

Tabela 4.14. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-agarose e sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

Fração	pDNA			Proteínas		gDNA		Endotoxinas	
	M (µg)	PR (%)	Y (%)	C (µg/mL)	R (%)	C (pg/uL)	R (%)	C (UE/mL)	R (%)
Lisado	14,1 ± 1,5	4,5 ± 0,5	100	130,0 ± 0,7	-	6,1 x10 ⁴	-	1285,8	-
2	8,2 ± 0,5	44,7 ± 2,6	58,0 ± 3,5	N.d	96,9	235,0 ± 52,4	99,2	N.d	99,9
3	1,8 ± 0,2	3,3 ± 0,8	12,4 ± 1,8	3,5 ± 1,8	94,6	157,8 ± 60,1	99,5	N.d	99,9

M: Massa; PR: Pureza Relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; C: Concentração; R: Remoção, N.d: Não detectado

Mesmo com a não ocorrência da adsorção das moléculas de pDNA, o sulfato de amônio 1,5 M permitiu a recuperação de 58% do pDNA com pureza relativa de 45% (fração 2), partindo-se de um material com 4% de pureza (Tabela 4.15). Foi possível também a remoção de 96% das proteínas, 99% do gDNA e mais de 99,6% das endotoxinas presentes no lisado neutralizado alimentado. Mesmo com esses valores de remoção, a massa de proteínas e gDNA por massa de pDNA presente (Tabela 4.13) ultrapassaram os valores limites estabelecidos pelas agências reguladoras.

Tabela 4.15. Contaminação por proteínas e gDNA em relação a massa de pDNA nas amostras de CTA com mercaptopirimidina-agarose tendo sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

Amostra	Contaminação proteínas (μg proteína/mg pDNA)	Contaminação gDNA (μg gDNA/mg pDNA)
Lisado	2304,0	1084,6
2	-	14,7
3	1002,3	39,5
Limite (FDA, EMEA)	3	2

Em resumo, a CTA utilizando o tampão sulfato de amônio 1,5 mol/L se mostrou inferior quando comparada a CIH (Tabela 4.16) nos quesitos pureza relativa da fração contendo pDNA (CTA: 44% e CIH: 82%) e remoção da contaminação por gDNA, o qual foi eliminado a níveis abaixo da sensibilidade do método de detecção, fato não ocorrido na CTA. Em termos de recuperação de pDNA os dois métodos cromatográficos apresentaram valores próximos (CTA: 58%; CIH: 56,3). A CTA foi superior em termos de remoção de proteínas e endotoxinas, as quais não puderam ser detectadas na fração 2, enquanto que na mesma fração da CIH estes dois contaminantes foram quantificados.

Tabela 4.16. Comparação entre os principais dados de purificação obtidos com a CIH e CTA do lisado neutralizado utilizando o sulfato de amônio 1,5 mol/L como tampão de adsorção.

Tipo de cromatografia	Adsorvente	Y_{total} (%)	PR (%)	Contaminantes presentes nas frações com sc pDNA
CIH	Fenil-agarose	56,3	82,6	oc pDNA, proteínas, endotoxinas
CTA	Mercaptopirimidina-agarose	58	44,7	gDNA e oc pDNA

Y_{total}: Recuperação total de pDNA; PR: pureza relativa das frações contendo sc pDNA.

Comparando-se os perfis cromatográficos (Figura 4.24), observa-se que a mercaptopirimidina foi a responsável pela maior interação do RNA (devido à maior concentração de Tris HCl 10 mmol/L no tampão de eluição necessária para promover a dessorção) com o adsorvente, pois a CIH com a fenil-agarose resultou em um cromatograma similar ao apresentado pela DVS-agarose controle. Essas diferenças, mais uma vez podem ser explicadas pela utilização de um ligante mais eletronegativo, que resultou em interações do tipo misto (doação/acepção de elétrons e hidrofobicidade) entre o RNA e a mercaptopirimidina-agarose e, portanto, mais fortes.

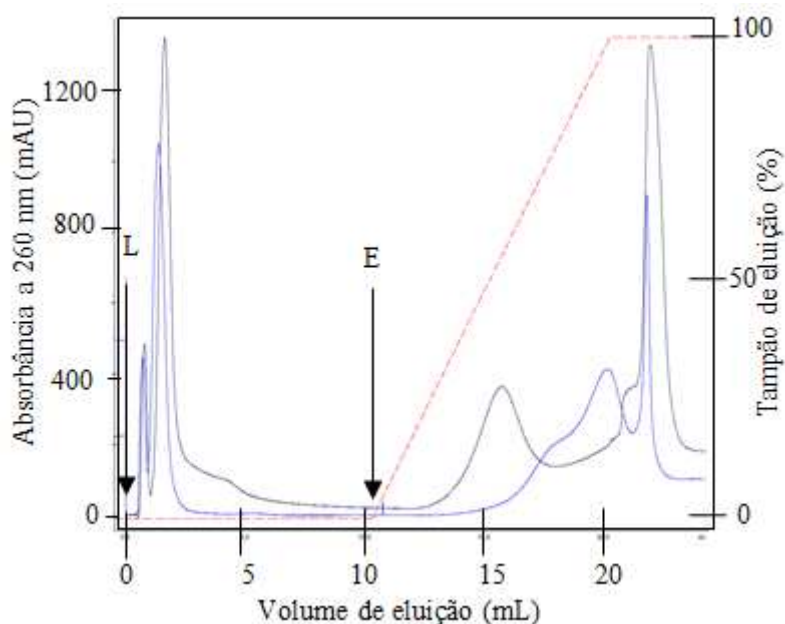


Figura 4.24. Comparação entre os perfis cromatográficos obtidos utilizando **sulfato de amônio 1,5 mol/L** como tampão de adsorção e os adsorventes fenil-agarose (linha azul-escuro) e mercaptopiridina-agarose (linha azul). L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

4.2.3 Estudos completos de CTA com mercaptopiridina imobilizada em matriz de celulose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção

Diante dos resultados das cromatografias de interação hidrofóbica e tiofílica aromática com os tampões citrato de sódio 1,5 mol/L, fosfato de potássio 2,0 mol/L e sulfato de amônio 1,5 mol/L, chegou-se a conclusão que a melhor combinação ligante/tampão de adsorção para a purificação em etapa única de pDNA foi a mercaptopiridina/fosfato de potássio. Desta maneira, este ligante foi imobilizado em cartucho comercial de membranas de celulose previamente ativado via epóxi e sua eficácia na purificação de pDNA foi experimentada utilizando tampão de adsorção fosfato de potássio 2,0 mol/L.

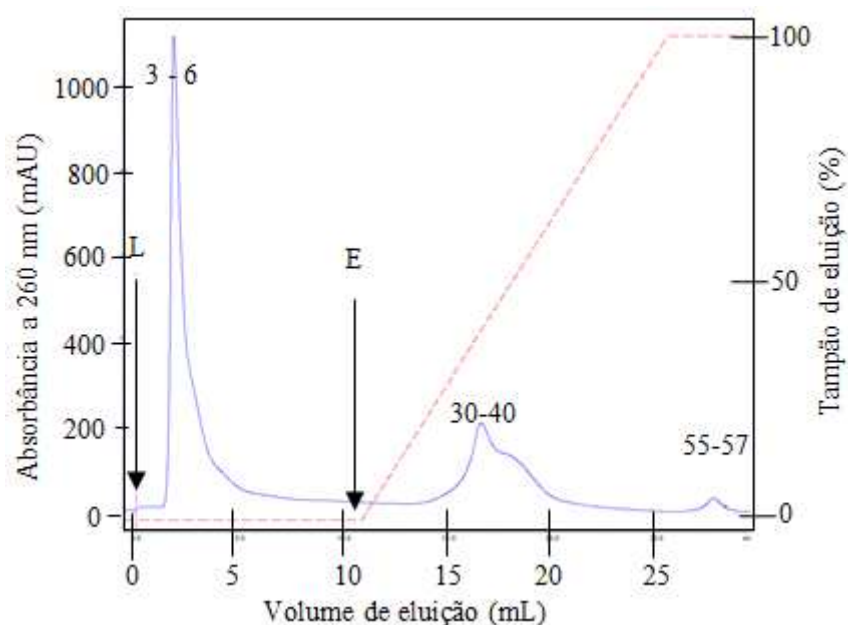
Para se averiguar se houve sucesso no acoplamento da mercaptopiridina na matriz celulósica e qual o efeito deste ligante na purificação de pDNA, foram

feitos os mesmo procedimentos cromatográficos com membranas ativadas sem o ligante com o controle (epóxi-celulose).

A cromatografia utilizando a epóxi-celulose controle e tampão fosfato de potássio 2 mol/L resultou em um perfil composto por 3 picos de absorbância, um na etapa de lavagem e dois na etapa de eluição (Figura 4.25a). As frações 30 a 40 correspondem provavelmente a dois picos superpostos que, por eletroforese em gel de agarose (Figura 4.26a), verificou-se que continham isoformas oc e sc de pDNA contaminadas com RNA. O pico de absorbância obtido na fração de lavagem (frações 3 a 6) continham também ambas isoformas de pDNA e contaminação por RNA. As frações 55 a 57 correspondiam a um pico com valores muito pequenos de absorbância e não puderam ser detectadas por eletroforese (dado não apresentado). A capacidade de adsorção e dessorção das moléculas de pDNA e RNA, provavelmente ocorreram em decorrência do grupamento epóxi na matriz.

A cromatografia com a mercaptopirimidina-celulose apresentou um perfil cromatográfico diferente do obtido com a epóxi-celulose (Figura 4.25b). A diferença ocorre na etapa de eluição, na qual as moléculas foram dessorvidas em uma série de picos superpostos. A eletroforese em gel de agarose (Figura 4.26b) revelou que as frações 36 a 41 eram compostas pelas isoformas oc e sc de pDNA e RNA. Para que ocorresse a dessorção dos pDNA foi necessário uma força iônica no tampão de eluição menor (concentração de 45% de Tris HCl 10 mmol/L pH 8,0) do que na cromatografia com a epóxi-celulose (35% de Tris HCl 10 mmol/L pH 8,0), indicando que as moléculas interagiram mais fortemente com o adsorvente. As moléculas que compõem as frações 44 a 51 e 56 a 57, provavelmente por um efeito de diluição relacionado à efeitos de dispersão axial (provavelmente devido à baixa velocidade superficial das moléculas no leito) não puderam ser detectadas por eletroforese.

a)



b)

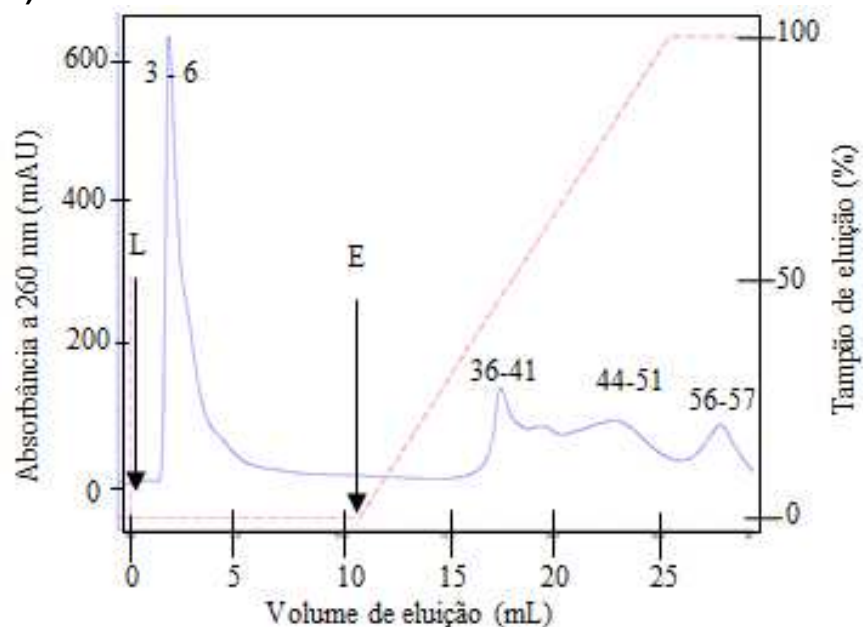


Figura 4.25. Cromatograma obtido pela CTA do lisado neutralizado utilizando **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a)** epóxi-celulose controle e **(b)** mercaptopirimidina-celulose. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas ; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

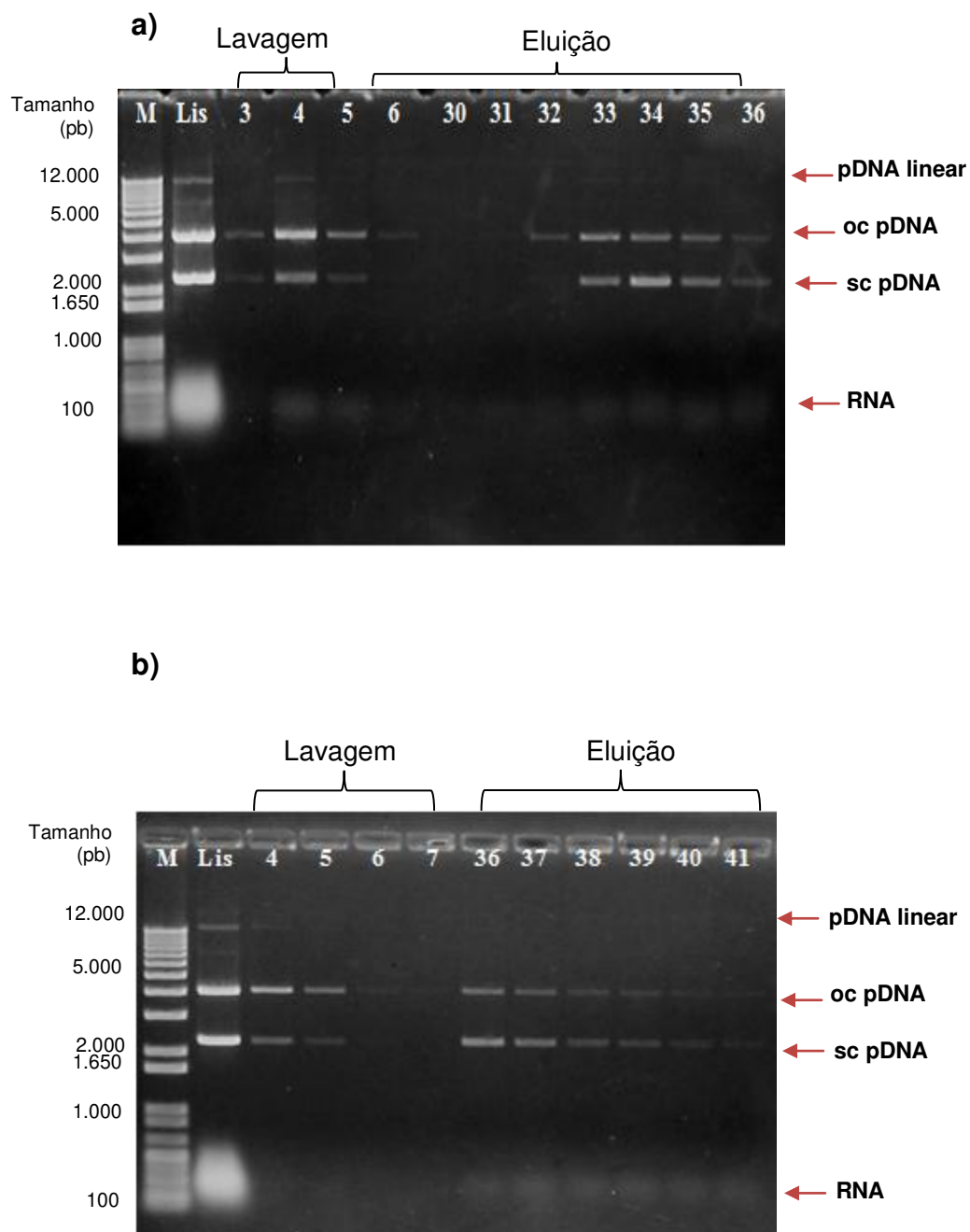


Figura 4.26. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CTA do lisado neutralizado com **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção e os adsorventes: **(a) epóxi-celulose** controle e **(b) mercaptopirimidina-celulose**. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna.

Apesar da cromatografia com a mercaptopirimidina-celulose e a epóxi-celulose terem apresentado cromatograma com perfis diferentes, não foi possível detectar essas diferenças através da eletroforese.

No tocante a dados da recuperação e pureza relativa do pDNA obtidos com a cromatografia utilizando mercaptopirimidina-celulose e epóxi-celulose (Tabelas 4.17 e 4.18), conclui-se que este último adsorvente apresentou uma menor capacidade de recuperar o pDNA adsorvido e dessorvido (37% contra 47,8%), mas apresentou valores melhores de pureza relativa (média de 42% em comparação a 26%). Apesar da epóxi-celulose ter apresentado dados melhores, a cromatografia com esse material não foi muito reprodutível, o que explica os altos valores de desvio padrão.

Tabela 4.17. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente controle epóxi-celulose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.

Fração	pDNA		
	M (µg)	PR (%)	Y (%)
Lisado	17,1 ± 0,6	14,1 ± 1,0	100
3	N.d	-	-
4	4,1 ± 2,0	11,1 ± 1,7	15,6 ± 11,7
5	N.d	-	-
33	2,7 ± 2,0	40,5 ± 7,8	10,2 ± 4,1
34	2,4 ± 1,6	49,7 ± 9,3	14,1 ± 9,5
35	2,2 ± 0,2	35,0 ± 10,7	13,0 ± 0,9

M: Massa; PR: Pureza Relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; N.d: Não detectado

Tabela 4.18. Quantidade, pureza relativa (PR) e recuperação (Y) do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-celulose e fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.

Amostra	pDNA		
	M (μ g)	PR (%)	Y (%)
Lisado	14,5 \pm 0,3	5,1 \pm 0,5	100
4	2,3 \pm 1,1	8,5 \pm 6,2	15,6 \pm 7,3
5	1,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,4	8,7 \pm 0,5
36	3,1 \pm 0,2	9,6 \pm 1,5	21,4 \pm 1,5
37	2,3 \pm 0,1	43,4 \pm 0,6	15,8 \pm 0,4
38	1,5 \pm 0,0	26,4 \pm 0,3	10,6 \pm 0,0

M: Massa; PR: Pureza Relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; N.d: Não detectado

A fração com melhores dados de pureza na CTA com a mercaptopirimidina foi a 37, com 15% do pDNA presente no lisado com pureza relativa de 43%. Os principais contaminantes presentes no lisado partilham de várias semelhanças estruturais com o pDNA, assim, quando utilizamos um adsorvente que concilia um ligante capaz de aumentar a interação com polinucleotídeos (verificado com a mercaptopirimidina-agarose) e poros maiores, possibilitamos não só que ocorra uma maior interação com o pDNA, mas também dos seus contaminantes. Essa talvez é a razão de se ter obtido valores de pureza relativos tão abaixo dos obtidos com a mercaptopirimidina-agarose, pois parte da sua capacidade de purificar o pDNA provavelmente ocorreu da inabilidade dos contaminantes com tamanhos maiores de interagirem os ligantes.

Inicialmente na cromatografia foi utilizada a vazão volumétrica de 0,5 mL/min, pois os trabalhos que utilizam membranas normalmente empregam essa vazão (Guerrero-Gérman et al., 2011; Pereira et al., 2010; Guerrero-Gérman et al., 2009). Devido a razão altura do leito/diâmetro interno do cartucho ser 66 vezes menor do que a mesma razão nas colunas recheadas com adsorventes fenil e mercaptopirimidina-agarose, ao se utilizar essa vazão volumétrica a velocidade

superficial no leito foi de apenas 5,65 cm/h, em contrapartida aos 76,4 cm/h nos adsorventes com matriz de agarose. Esse valor baixo de velocidade superficial no leito com membranas provavelmente possibilitou que efeitos difusivos diminuíssem a resolução e efetividade da separação.

Visando otimizar a purificação do pDNA duas mudanças foram feitas no processo cromatográfico: (1) utilizou-se a maior vazão volumétrica possível que não excedesse os limites de pressão especificados para os cartuchos de membrana (2 mL/min que resultou em uma velocidade superficial de 22,6 cm/h); (2) optou-se pela eluição ocorrer em degrau com 26% de Tris HCl mmol/L pH 8,0, pois verificou-se que a dessorção do pDNA se iniciava nesta concentração durante o gradiente de eluição.

A cromatografia com o protocolo modificado resultou em um cromatograma com quatro picos de absorbância sendo um na etapa de lavagem e três na etapa de eluição (Figura 4.27). O sc pDNA foi detectado nas frações da lavagem (4-5) e na fração correspondente ao primeiro pico de absorbância obtido na etapa de eluição (19-20) (Figura 4.28). A isoforma circular aberta do pDNA foi detectada em praticamente todas as frações analisadas por eletroforese. Nas frações 19 e 20 não é possível observar a contaminação por RNA, mas não houve enriquecimento da isoforma sc, sendo que a circular aberta é nitidamente predominante. O RNA é dessorvido nas frações 43-47.

Mesmo com as modificações, o pico de absorbância que contém o sc pDNA dessorvido (frações 19 a 20) não é simétrico, possuindo distorção posterior (caudal), que é um indício de separação com má eficiência e má seletividade. As causas disso são a baixa razão altura do leito/diâmetro interno do cartucho contendo as membranas e a baixa velocidade superficial.

Análises referentes a recuperação de pDNA e pureza relativa também foram realizados com as frações resultantes da CTA em mercaptopirimidina-celulose utilizando o protocolo otimizado, assim como quantificações de proteínas, DNA genômico e endotoxinas (Tabela 4.19).

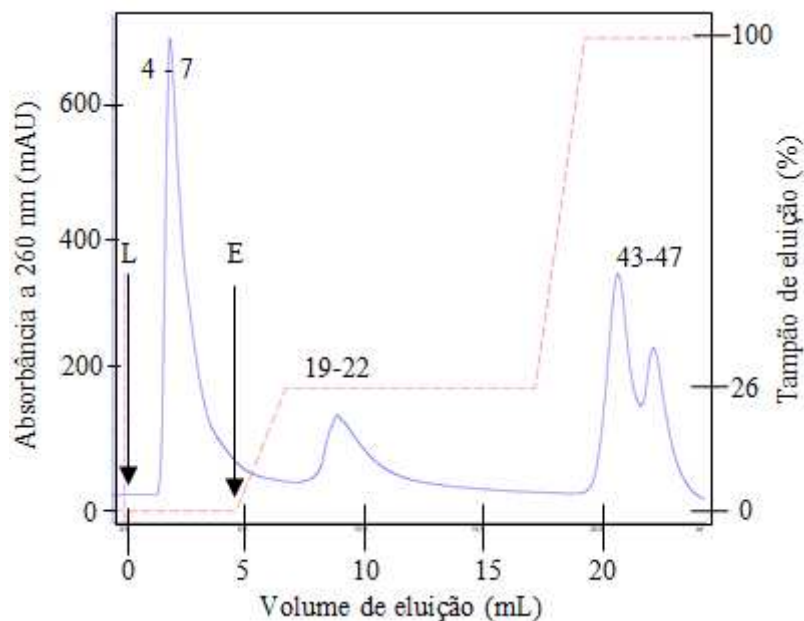


Figura 4.27. Cromatograma obtido pela CTA do lisado neutralizado com o adsorvente mercaptopirimidina-celulose e **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção e utilizando a estratégia de eluição em degrau. Os intervalos numéricos representam as frações coletadas; L: etapa de lavagem; E: etapa de eluição. Linha azul: absorbância a 260 nm; Linha vermelha: quantidade (%) de Tris-HCl 10 mmol/L (tampão de eluição) em relação ao tampão de adsorção.

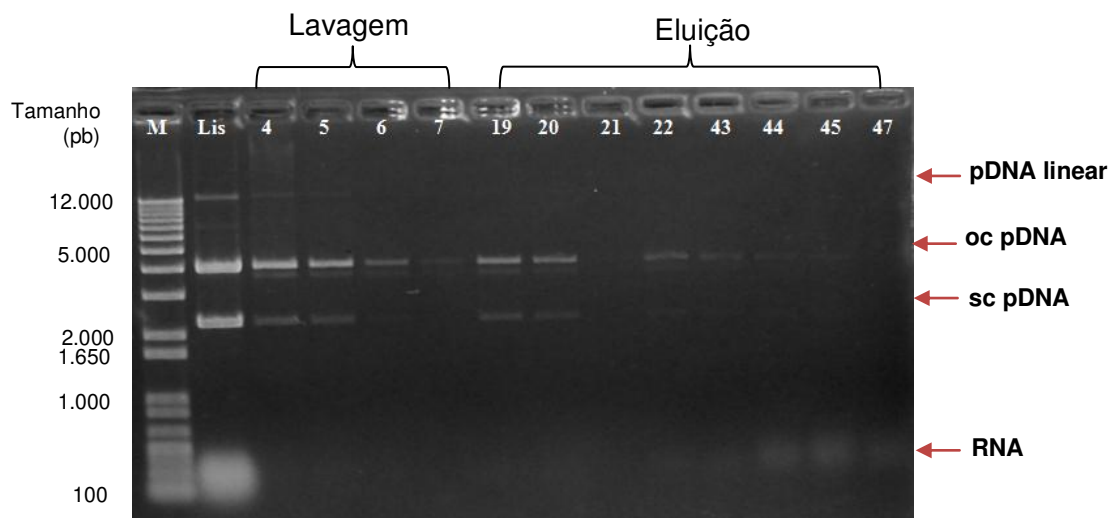


Figura 4.28. Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas da CTA do lisado neutralizado com o adsorvente mercaptopirimidina-celulose e **fosfato de potássio 2,0 mol/L** como tampão de adsorção e utilizando estratégia de eluição em degrau. M: Marcador molecular; Lis: lisado neutralizado alimentado na coluna.

Tabela 4.19. Quantidade e qualidade do pDNA nas frações da CTA utilizando o adsorvente mercaptopirimidina-celulose e fosfato de potássio 2 mol/L como tampão de adsorção.

Fração	pDNA			Proteínas		gDNA		Endotoxinas	
	M (µg)	PR (%)	Y (%)	C (µg/mL)	R (%)	C (pg/uL)	R (%)	C (UE/mL)	R (%)
Lisado	14,1 ± 1,5	16,3 ± 0,9	100	143,4 ± 0,0	-	6,5 x10 ³	-	112,5	-
4	5,7 ± 0,1	18,1 ± 0,3	35,3 ± 0,9	8,32 ± 0,7	88,4	9,1 ± 4,3	99,7	0,5 ± 0,0	99,3
5	3,3 ± 0,1	10,0 ± 0,4	20,3 ± 0,6	11,7 ± 0,5	83,7	4,3 ± 1,3	99,9	0,5 ± 0,0	99,3
19	2,0 ± 0,2	46,1 ± 11,8	12,1 ± 0,9	5,9 ± 0,7	91,8	4,7 ± 1,4	99,9	0,5 ± 0,1	99,3
20	2,0 ± 0,1	100 ± 0,0	12,4 ± 0,7	3,9 ± 0,1	94,5	2,3 ± 0,3	99,9	0,4 ± 0,0	99,3

M: Massa; PR: Pureza Relativa (item 3.11, equação 2); Y: Recuperação; C: Concentração; R: Remoção, N.d: Não detectado

A implementação da vazão de 2 mL/min e a eluição em degrau na cromatografia de interação tiofílica com a mercaptopirimidina-celulose, possibilitou recuperar 12% do pDNA com pureza relativa de 100% na fração 20. Devido à utilização de uma vazão volumétrica maior todo o processo foi realizado em 20 min, o que o torna vantajoso no caso de aplicações industriais (a cromatografia utilizando matriz de agarose foi realizada em 120 min). Cerca de 55% do pDNA foi perdido na etapa de lavagem, indicando saturação dos sítios de ligação no adsorvente. Otimizações com relação à alimentação (volumes menores de alimentação de lisado neutralizado) e geometria do adsorvente (utilizar cartuchos com maior relação altura/diâmetro) provavelmente levariam a uma melhor separação.

Além da melhoria na pureza relativa, a CTA com a mercaptopirimidina-celulose removeu em média 89% das proteínas, 100% do gDNA e 99% das endotoxinas presentes no lisado neutralizado alimentado. Pela primeira vez ao se utilizar o ligante mercaptopirimidina foi possível obter frações cujo limite de massa de gDNA por massa de pDNA não ultrapassou os valores limites para esse quesito (Tabela 4.20). O mesmo não ocorreu com relação à contaminação de proteínas e endotoxinas por massa de pDNA.

Tabela 4.20. Contaminação por proteínas, endotoxinas e gDNA em relação a massa de pDNA nas amostras de CTA com mercaptopirimidina-celulose tendo fosfato de potássio 2,0 mol/L como tampão de adsorção.

Fração	Contaminação proteínas (µg proteína/mg pDNA)	Contaminação gDNA (µg gDNA/mg pDNA)	Contaminação endotoxinas (UE/mg pDNA)
Lisado	2201,4	101,3	1985,8
4	723,9	0,7	43,8
5	1761,7	0,7	75,75
19	1498,6	1,16	125
20	983,18	0,57	100
Limite (FDA, EMEA)	3	2	10

Apesar de necessitar de melhorias a utilização da mercaptorimidina-celulose como adsorvente se mostrou potencial, possibilitando recuperar pDNA com 100% de pureza relativa, isentos de gDNA, RNA e endotoxinas em vinte minutos.

4.2.4 Comparação dos processos delineados pelos estudos completos com processos descritos na literatura

Para uma comparação dos processos delineados pelos estudos completos com processos descritos na literatura, dados de recuperação, pureza e presença de contaminantes encontrados neste trabalho (apenas os resultados mais promissores foram utilizados) e em artigos pertinentes foram apresentados em três tabelas diferentes, comparando as operações de recuperação primária (Tabela 4.21), os processos de purificação (Tabela 4.22) e processos com adsorventes alternativos à agarose (Tabela 4.23).

O método de purificação de pDNA por CIH utilizando fenil-agarose e citrato de sódio como tampão de adsorção se mostrou como uma alternativa dentre as técnicas de recuperação primária de sc pDNA (Tabela 4.21), já que os resultados obtidos se mostraram competitivos e vantajosos quando comparados à outras técnicas estudadas para este fim, como a utilização da TFF seguido de ATPS (Freitas et al., 2009) que apesar de ter obtido valores de PR (94%) superiores aos descritos neste trabalho (34-45% na CIH), as amostras oriundas da TFF-ATPS possuíam as isoformas oc e sc de pDNA, enquanto que as amostras provenientes da CIH continham apenas a isoforma de interesse (sc). Além disso, a CIH e a CTA utilizando citrato de sódio não tem os mesmos inconvenientes que a ATPS (maior impacto ambiental e os mais altos custos de operação). Outro trabalho que utiliza a ATPS (Gomes et al., 2009) obteve valores de recuperação (91,1%) acima dos descritos neste trabalho (58%). Porém, em termos de PR e enriquecimento da isoforma sc de pDNA, o processo com ATPS teve um desempenho inferior, pois não conseguiu resolução entre as isoformas oc e sc de pDNA e obteve valor de PR menor (17,2%) do que os aqui relatados (34-45%).

Tabela 4.21. Comparação entre valores de recuperação, pureza relativa, presença de contaminantes e inconvenientes relacionados às operações de recuperação primária na purificação de pDNA aqui descritos e os citados na literatura.

Processos	Alimentação	Y (%)	PR (%)	Contaminantes	Inconvenientes	Referências
CIH com fenil-agarose LS e citrato de sódio	Lisado neutralizado	58,8	34-45	gDNA e RNA(?)	Não estudados	Este trabalho
TFF-ATPS (sulfato de amônio)	Lisado clarificado	NR	94	oc pDNA	Impacto ambiental e alto custo de operação	Freitas et al., 2009
ATPS com citrato de sódio	Lisado clarificado	91,1	17,2	oc pDNA	Impacto ambiental e alto custo de operação	Gomes et al., 2009

Y: Recuperação; PR= Pureza relativa; LS: Baixa densidade de ligantes fenil; NR: não relatado; (?) = Provável contaminação; TFF= Filtração tangencial; ATPS= extração em duas fases aquosas.

O fosfato de potássio como tampão de adsorção na CTA do lisado neutralizado com a matriz mercaptopirimidina-agarose proporcionou melhores resultados de recuperação e pureza relativa quando comparados aos outros tampões ou adsorventes experimentados neste trabalho. É um possível candidato a processo de purificação em etapa única. A CIH utilizando fosfato de potássio como tampão de adsorção também apresentou dados de pureza relativa e remoção de contaminantes (neste último quesito foi superior a mercaptopirimidina), mas apresentou a menor recuperação entre os processos citados.

A CTA com o adsorvente mercaptopirimidina e o tampão fosfato de potássio, quando comparado com outros processos descritos na literatura se mostra competitiva, principalmente por ter alcançado 100% de pureza relativa e o segundo maior valor de recuperação (68%) partindo do lisado neutralizado. O único inconveniente é a necessidade de etapa posterior de polimento, para a remoção dos contaminantes residuais e troca de tampão para o da formulação final.

Ao se utilizar cromatografia de afinidade com histidina imobilizada (Souza et al., 2006) foram alcançados valores de recuperação (35%) inferiores ao da CTA com tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L. O processo de purificação utilizado na cromatografia com a histidina imobilizada compreendeu a utilização de lisado clarificado por precipitação com sulfato de amônio e 2-propanol, novamente levantando questões sobre a viabilidade econômica e impacto ambiental inerentes a utilização do sulfato e do propanol.

O maior valor de recuperação (73%) dentre os trabalhos citados foi obtido com a cromatografia de interação hidrofóbica utilizando fenil-agarose com alta substituição de ligantes e citrato de sódio 1,0 mol/L como tampão de adsorção (Freitas, 2007). Uma desvantagem deste processo é a utilização do lisado clarificado por precipitações seriais com isopropanol e sulfato de amônio, assim como na cromatografia de afinidade .

Tabela 4.22. Comparação entre valores de recuperação, pureza relativa, presença de contaminantes e inconvenientes relacionados dos processos de purificação de pDNA aqui descritos e os citados na literatura.

Processos	Alimentação	Nº. de etapas	Y (%)	PR (%)	Contaminantes	Inconvenientes	Referências
CIH com fenil-agarose LS e fosfato de potássio	Lisado neutralizado	1	23	85	RNA(?) e oc pDNA	Necessidade de etapa de polimento	Este trabalho
CTA com MPRM-agarose e fosfato de potássio	Lisado neutralizado	1	68	~100	Proteínas,gDNA, oc pDNA	Necessidade de etapa de polimento	Este trabalho
CIH com fenil-agarose HS e citrato de sódio	Lisado clarificado	3	73,5	~100	Dentro dos limites estabelecidos FDA	Impacto ambiental	Freitas, 2007
Cromatografia de afinidade com histidina imobilizada	Lisado clarificado	3	35	100	Dentro dos limites estabelecidos FDA	Impacto ambiental	Souza et al., 2006
Plasmid select	Lisado clarificado	5	N.R	NR	Dentro dos limites estabelecidos FDA	Impacto ambiental, utiliza 3 etapas cromatográficas e 7 tampões diferentes.	GE Healthcare

MPRM=mercaptopyrimidina; Y= Recuperação; PR= Pureza relativa; LS= Baixa densidade de ligantes fenil; HS= Alta densidade de ligantes fenil; NR= não relatado; (?) = Provável contaminação..

O processo proposto por este trabalho de se utilizar a mercaptopirimidina-celulose e fosfato de potássio na purificação do pDNA se mostrou competitiva mesmo quando comparada à um kit comercial para a purificação de pDNA com fins terapêuticos (Plasmid Select, GE Healthcare). Este kit compreende a purificação do lisado clarificado (pré-purificado por precipitações seriais com isopropanol e sulfato de amônio) por três etapas cromatográficas consecutivas: cromatografia de exclusão por tamanho, tiofílica (agarose derivatizado o ligante 2-mercaptopiridina) e de troca-iônica. No processo descrito pelo fabricante do kit são utilizadas altas concentrações de sulfato de amônio e outros sais (sete tampões diferentes são utilizados no total). Portanto, a alternativa aqui proposta se mostrou interessante, pois proporcionou pDNA de boa qualidade com uma única etapa (se não considerarmos o polimento final - simples troca de tampão - como etapa de purificação) e utilizando uma menor quantidade de sal, sendo um processo menos agressivo para o ambiente e mais barato, já que etapas cromatográficas são custosas.

No tocante ao desenvolvimento de adsorventes com matrizes alternativas à agarose, as membranas e os monólitos têm se mostrado uma opção interessante, mas ainda muito iniciais. A mercaptopirimidina-celulose apresentou 100% de pureza relativa sendo superior, nesse quesito, quando comparada a membrana de CIH derivativada por Pereira et al. (2010), que foi de 60%. Ao mesmo tempo, foi incapaz de promover purificação suficiente para o enquadramento do pDNA aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras. Além disso, apresentou o pior valor de recuperação (12%) dentre os processos aqui descritos. Os monólitos contidos em um kit comercial (Plasmid Process Pack, Bia Separation) para a purificação de pDNA para fins terapêuticos são os que apresentaram o melhor desempenho (80% de recuperação e pDNA final dentro dos parâmetros aceitáveis de pureza).

Tabela 4.23. Comparação entre valores de recuperação, pureza relativa, presença de contaminantes e inconvenientes relacionados aos processos de purificação de pDNA com adsorventes alternativos à agarose aqui descrito e os citados na literatura.

Processos	Alimentação	Nº. de etapas	Y (%)	PR (%)	Contaminantes	Inconvenientes	Referências
CTA com MPRM-celulose e fosfato de potássio	Lisado neutralizado	1	12	100	Proteínas, RNA, endotoxinas e oc pDNA	Necessita de polimento e baixa recuperação	Este trabalho
Membrana CIH	Lisado clarificado	2	73	60	oc pDNA	Impacto ambiental	Pereira et al., 2010
Plasmid Process Pack (monólitos)	Lisado neutralizado	4	80	NR	Dentro dos limites estabelecidos FDA	Impacto ambiental	Bia Separation

Y= Recuperação; PR= Pureza relativa;; MPRM= mercaptopirimidina; NR= não relatado;

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusões

Perante os estudos realizados neste trabalho foi possível obter conclusões tanto no âmbito das interações entre o pDNA e seus contaminantes com os sistemas adsorvente/tampão de adsorção experimentados quanto no âmbito do desenvolvimento de processos.

No tocante ao estudo das interações pode-se concluir que o tampão fosfato de potássio 2 mol/L foi mais eficiente do que o citrato de sódio 1,5 mol/L em termos de compactação dos ácidos nucléicos presentes no lisado neutralizado e promoção das interações hidrofóbicas e/ou tiofílicas. O adsorvente fenil-agarose, foi mais eficiente na remoção do gDNA e proteínas do que a mercaptopirimidina-agarose, porém esta última foi superior em resolver sc pDNA do oc pDNA e RNA.

No âmbito do desenvolvimento de processos para a RPB do pDNA com grau farmacêutico de pureza, pôde-se concluir que:

1. O objetivo de promover a purificação em etapa cromatográfica única do pDNA partindo-se do lisado neutralizado e utilizando tampões alternativos ao sulfato de amônio foi alcançado com o sistema mercaptopirimidina-agarose/fosfato de potássio 2,0 mol/L. Esta combinação adsorvente/tampão de adsorção proporcionou a recuperação de 68% pDNA com 100% de pureza relativa, mas residualmente contaminado com gDNA e proteínas. A obtenção de pDNA com este grau de pureza em etapa cromatográfica única partindo-se do lisado neutralizado é inédito na literatura.

2. A CIH com fenil-agarose e tampão citrato de sódio 1,5 mol/L se mostrou um processo competitivo aos existentes na literatura de recuperação primária de pDNA, pois permitiu a recuperação de 58% do pDNA com 41% de pureza relativa, sem contaminação por proteína, endotoxinas, gDNA e oc pDNA.
3. Apesar da CTA com o adsorvente mercaptopirimidina-celulose e tampão fosfato de potássio ter obtido pDNA com pureza relativa de 100% em apenas 20 minutos de cromatografia, recuperação de pDNA (12%) foi baixa e a remoção de proteínas, RNA e endotoxinas foi inferior ao resultado obtido com a mercaptopirimidina-agarose/fosfato de potássio.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Sugere-se para trabalhos futuros:

1. Experimentar a estratégia de eluição em degrau na CTA e CIH com os tampões citrato de sódio 1,5 mol/L e fosfato de potássio 2,0 mol/L, para se verificar se ocorre melhora nos padrões de qualidade do pDNA purificado.
2. Realizar a etapa de polimento com cromatografia de exclusão por tamanho nas amostras provenientes da CTA com mercaptopirimidina-agarose e fosfato de potássio 2,0 mol/L e determinar se foi possível a remoção dos contaminantes residuais e avaliar dados de recuperação global do processo.
3. Fazer ensaios de transfecção em células de mamíferos dos plasmídeos purificados pela mercaptopirimidina-agarose e tampão fosfato de potássio, para averiguar se o método de purificação proposto interfere de alguma maneira na capacidade de transfecção do plasmídeo ou provoca alguma reação negativa nas células.

4. Otimizar parâmetros na cromatografia com a mercaptopirimidina-celulose e tampão fosfato de potássio 2,0 mol/L como: volume de alimentação do lisado neutralizado, razão altura/diâmetro do cartucho e velocidade linear das moléculas no leito.
5. Experimentar a robustez dos sistemas adsorvente/tampão de adsorção que se mostraram adequados à processos comerciais, através da realização de ciclos repetidos de cromatografia, “cleaning in place” e regeneração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M.-I. HPLC of peptides and proteins: Basic theory and methodology, in: Aguilar, M.-I. (Ed.), *HPLC of peptides and proteins: Methods and protocols*, Humana Press, New Jersey, p. 3-8, 2004.

AKIYOSHI, K. Hydrophobic effects, in: Yui, N. (Ed.), *Supramolecular design for biological applications*, CRC Press, Boca Raton, p. 13-24, 2002.

ANDERSON, W. F. Human gene therapy. *Nature*, v. 392, p. 25-30, 1998.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, v.1, p. 2.4.1, 1996.

AZZONI, A.R.; RIBEIRO, S.C.; MONTEIRO, G.A.; PRAZERES, D.M. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J. Gene Med.*, v. 9 (5), p. 392-402, 2007.

BENCINA, M.; PODGORNIK, A.; STRANCAR, A. Characterization of methacrylate monoliths for purification of DNA molecules. *J. Sep. Sci.*, v. 27, p. 801-810, 2004.

BHIKHABHAI, K. Plasmid DNA purification using divalent alkaline metal ions and two ion exchangers. US Patent 6410274 B1, 2002.

BIRBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

BIWER, A.; HEINZLE, E. Environmental assessment in early process development, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.79, p. 597–609, 2004.

BOSCHETTI, E. The use of thiophilic chromatography for antibody purification: a review, *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 49, p. 361-389, 2001.

BOURHIM, M.; RAJENDRAN, A.; RAMOS, Y.; SRIKRISHNAN, T.; SULKOWSKI, E. Thiophilic interaction chromatography of serum albumins, *J. Chromatogr Sci.*, v. 46, p. 574-576, 1998.

BUENO, S.M.A.; MIRANDA, E.A. Membranas adsorptivas, in: Pessoa Jr., A.; Kilikian, B.V. (Eds.), *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, Ed. Manole, Barueri, p. 314-331, 2005.

CRYSTAL, R.G. The gene as the drug. *Nat. Med.*, v. 1, p. 15-17, 1995.

DARBY, R.A.J.; HINE, A.V. LacI-mediated sequence-specific affinity purification of plasmid DNA for therapeutic applications. *FASEB J.*, v. 19, p. 801-805, 2005.

DAVIS, H.L.; MICHEL, M.-L.; WHALEN, R.G. Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. *Ann. N Y Acad. Sci.*, v. 772, p. 21–29, 1995.

DESHMUKH, N. R.; LALI, A. M. Adsorptive purification of pDNA o superporous rigid cross-linked cellulose matrix. *J. Chromatogr. B*, v. 818, p. 5-10, 2005.

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. Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high performance hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 998, p. 109-117, 2003.

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(6), p. 577-584, 2001.

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.; 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.; QUEIROZ, J.A.; MONTEIRO, G.A.; PRAZERES, D.M.F. Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography, *Anal. Biochem.*, v. 275, p. 122-124, 1999.

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

DUARTE, S.P.; FORTES, A.G.; PRAZERES, D.M.F, MARCOS, J.C. Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step aqueous two-phase extraction process. *J. Chromatogr. A*, v. 1164, p. 105-112, 2007.

EDELSTEIN, M.L.; ABEDI, M.R.; WIXON, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007- an update. *J. Gene Med.*, v. 9, p. 833-842, 2007.

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.

EON-DUVAL, A.; MACDUFF, R.H.; FISHER, C.A.; HARRIS, M.J.; BROOK, C. Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. *Anal. Biochem.*, v. 316, p. 66-73, 2003.

ERIKSSON, K.-O. Hydrophobic Interaction Chromatography, in: Janson, J.-C.; Rydén, L. (Eds.), *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, 1^o 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.

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.; 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.; 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.

FLOTTE, T.R. Gene Therapy: The first two decades and current state-of-the-art. *J. Cell Physiol.*, v. 213, p. 301-305, 2007.

FOX, J.L. Gene therapy safety issues come to fore. *Nat. Biotechnol.* v. 17, p. 1153, 1999.

FREITAS, S.; CANÁRIO, S.; SANTOS, J.A.L.; PRAZERES, D.M.F. Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact. *Biotechnol. J.*, v. 4, p. 265-278, 2009.

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.

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 DNA production, in: Biwer, A.; Heinzle, E.; Cooney, C. (Eds.), *Development of Sustainable Bioprocess: Modeling and Assessment*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, p. 271-285, 2006a.

FREITAS, S.S.; SANTOS, J.A.L.; PRAZERES, D.M.F. Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA. *Biotechnol. Prog.*, v. 22, p. 1179-1186, 2006b.

GARDLÍK, R.; PÁLFFY, R.; HODOSY, J.; LUKÁCS, J.; TURNA, J.; CELEC, P. Vector and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Mon.*, v. 11, p. 110-121, 2005.

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

GIOVANNINI, R.; FREITAG, R. High-performance membrane chromatography of supercoiled plasmid DNA, *Anal. Chem.*, v. 70, n. 16, p. 3348-3354, 1998.

GOMES, G.A.; AZEVEDO, A.M.; AIRES-BARROS, R.; PRAZERES, D.M.F. Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. *Sep. Purif. Technol.*, v. 65, p. 22-30, 2009

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Tecnologia do DNA recombinante, in: Griffiths, A.J.F.; Miller, J.H.; Suzuki, D.T.; Lewontin, R.C.; Gelbart, W.M. (Eds.), *Introdução a Genética*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 341-376, 2002.

GRUND, E. Hydrophobic interaction chromatography of proteins, in: Subramanian, G. (Ed.), *Bioseparations and Bioprocess: Biochromatography, Membrane*

Separations, Modeling, Validation., John Wiley & Sons, Nova Iorque, p. 65-88, 1998.

GUERRERO-GÉRMAN, P.; MONTESINOS-CISNEROS, R.M.; PRAZERES, D.M.F; TEJEDA-MANSIR, A. Purification of plasmid DNA from *Escherichia coli* ferments using anion-exchange membrane and hydrophobic chromatography, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 58, n.1, p. 68-74, 2011.

GUERRERO-GÉRMAN, P.; PRAZERES, D.M.F; GUZMÁN, R.; MONTESINOS-CISNEROS, R.M.; TEJEDA-MANSIR, A. Purification of plasmid DNA using tangential flow filtration and tandem anion exchange membrane chromatography. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, v. 32, p. 615-623, 2009.

HABER, C.; SKUPSKY, J.; LEE, A.; LANDER, R. Membrane chromatography of DNA: conformation-induced capacity and selectivity, *Biotechnol. Bioeng.*, v. 88, p. 73-81, 2004.

HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; SMITH, P.D. Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, San Diego, 1992

HOARE, M.; LEVY, M.S.; BRACEWELL, D.G.; DOIG, S.D.; KONG, S.; TITCHENER-HOOKER, N.; WARD, J.M.; DUNNILL, P. Bioprocess engineering issues that would be faced in producing a DNA vaccine at up to 100 m³ fermentation scale for an influenza pandemic. *Biotechnol. Prog.* v. 21, p. 1577–1592, 2005.

HOLMES, D.S; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, v.114, p.193-197 ,1981.

HORN, N.A.; MEEK, J.A.; BUDAHAZI, G.; MARQUET, M. Purification of DNA during column chromatography. US Patent 5707812, 1998.

HORN, N.A.; MEEK, J. A.; BUDAHAZI, G.; MARQUET, M. Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Hum. Gene Ther.*, v. 6, p. 565-573, 1995.

HUBER, C.G. Micropelicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. *J. Chromatogr. A*, v. 806, p. 3-30, 1998.

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

ISRAELACHVILLI, J.N. *Intermolecular & Surface forces*, 2° Ed, Academic Press, San Diego, 1992.

IULIANO, S.; FISHER, J.R.; CHEN, M.; KELLY, W.J. Rapid analysis of a plasmid by hydrophobic-interaction chromatography with a non-porous resin. *J. Chromatogr. A*, v. 972, p. 77-86, 2002.

JENNISSEN, H.P. Evidence for negative cooperativity in the adsorption of phosphorylase b on hydrophobic agaroses. *Biochemistry*, v. 15, p. 5688-5692, 1976.

Journal of Gene Medicine Clinical Trial Site. Acessado em 16 de outubro, 2010. <<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical>>.

KAHN, D.W.; BUTLER, M.D.; COHEN, D.L.; GORDON, M.; KAHN, J.W.; WINKLER, M.E. Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 69(1), p. 101-106, 2000.

KELLY, H. Perspectives plasmid-based gene therapy: Challenges for the product and the process. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 37, p. 219-223, 2003.

KENDALL, D.; LYE, G.J.; LEVY, M.S. Purification of plasmid DNA by an integrated operation comprising tangential flow filtration and nitrocellulose adsorption. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 79(7), p. 816-822, 2002

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.

KNUDSEN, K.L.; HANSEN, M.B.; HENRIKSEN, L.R.; ANDERSEN, B.K.; LIHME, A. Sulfone aromatic ligands for thiophilic adsorption chromatography: purification of human and mouse immunoglobulins, *Anal. Biochem.*, v. 201, p. 170-177, 1992.

KODIHALLI, S.; GOTO, H.; KOBASA, D.L.; KRAUSS, S.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R.G. DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *J. Virol.*, v. 73, p. 2094–2098, 1999.

LANDER, R.J.; WINTERS, M.A.; MEACLE, F.J.; BUCKLAND, B.C., LEE A. L. Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 79, p. 776-784, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, DL; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*, 4º ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LEMMENS, R.; OLSSON, U.; NYHAMMAR, T.; STADLER, J. Supercoiled plasmid DNA: selective purification by thiophilic aromatic adsorption. *J. Chromatogr. B*, v. 784, p. 291-300, 2003.

LEVY, M.S.; O'KENNEDY, R.D.; AYAZI-SHAMLOU, P.; DUNNIL, P. biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends Biotechnol.*, v. 18 (7), p. 296-305, 2000.

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.

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.

LISTNER, K.; BENTLEY, L.; OKONKOWSKI, J.; KISTLER, C.; WNEK, R.; CAPARONI, A.; JUNKER, B.; ROBINSON, D.; SALMON, P.; CHARTRAIN, M.

Development of a highly productive and scalable plasmid DNA production platform. *Biotechnol. Prog.*, v. 22, p. 1335-1345, 2006.

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.

LUO, D.; SALTZMAN, W.M. Synthetic DNA delivery systems, *Nat. Biotechnol.*, v. 18, p. 33-37, 2000.

MACHADO, R.L. Despirogenação de soluções de imunoglobulina G humana: Adsorção de endotoxinas em membrana de quitosana. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003, 91 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MAGALHÃES, P.O.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T.C.V.; PESSOA JR., A. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, v. 10(3), p. 388-404, 2007.

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

MARQUET, M.; HORN, N.A.; MEEK, J. A.; Budahazi, G. Production of pharmaceutical grade plasmid DNA. US Patent 5561064, 1996.

MARTIN, J.E. SULLIVAN, N.J.; ENAMA, M.E.; GORDON, I.J.; ROEDERER, M.; KOUP, R.A.; BAILER, R.T.; CHAKRABARTI, B.K.; BAILEY, M.A.; GOMEZ, P.L.; ANDREWS, C.A.; MOODIE, Z.; GU, L.; STEIN, J.A.; NABEL, G.J.; GRAHAM, B.S. A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial. *Clin. Vaccine. Immunol.*, v. 13, p. 1267–1277, 2006.

MARTINS, S.A.M.; PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S.; MONTEIRO, G.A. Comparison of real-time polymerase chain reaction and hybridization assays for the

detection of *Escherichia coli* genomic DNA in process samples and pharmaceutical-grade plasmid DNA products. *Anal. Biochem.*, v. 322, p. 127-129, 2003.

McCUE, J.T. Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. *Methods Enzymol.*, v. 463, p. 405-414, 2009.

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.

MOLLOY, M.J.; HALL, V.S.; BAILEY, S.I.; GRIFFIN, K.J.; FAULKNER, J.; UDEN, M. Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed. *Nuc. Acids Res.*, v. 32 (16), e129, doi:10.1093/nar/gnh124, 2004.

MOREIRA, K.A.; DIOGO, M.; PRAZERES, D.M.; FILHO, J.L.L.; PORTO, A.L.F. Purification of Plasmid (pVaxLacZ) by hydrophobic interaction chromatography. *Braz. Arch. Biol. Tech.*, v. 48, p. 113-117, 2005.

MORISHITA, R.; AOKI, M.; HASHIYA, N.; MAKINO, H.; YAMASAKI, K.; AZUMA, J.; SAWA, Y.; MATSUDA, H.; KANEDA, Y.; OGIHARA, T. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension*, v. 44, p. 203–209, 2004.

MOSS, R.B. Prospects for control of emerging infectious diseases with plasmid DNA vaccines. *J. Immune Based Ther. Vac.*, v. 7 (3), p. 1-9, 2009.

MOUNTAIN, A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol.*, v. 18, p. 119-128, 2000.

MURPHY, J.C.; JEWELL, D.L.; WHITE, K.I.; FOX, G.E.; WILSON, R.C. Nucleic acid separations utilizing immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnol. Prog.*, v. 19, p. 982-986, 2003a.

MURPHY, J.C.; FOX, G.E.; WILSON, R.C. Enhancement of anion-exchange chromatography of DNA using compaction agents. *J. Chromatogr. A*, v. 984, p. 215-221, 2003b.

MWAU, M.; CEBERE, I.; SUTTON, J.; CHIKOTI, P.; WINSTONE, P.; WEE, E.G.T.; BEATTIE, T.; CHEN, Y.H.; DORRELL, L.; MCSHANE, H.; SCHMIDT, C.; BROOKS, M.; PATEL, S.; ROBERTS, J.; CONLON, C.; ROWLAND-JONES, S.L.; BWAYO, J.J.; MCMICHAEL, A.J.; HANKE, T. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J. Gen. Virol.*, v. 85, p. 911–919, 2004.

NOEL, R.J.; O'HARE, W.T.; STREET, G. Thiophilic nature of divinyl-sulfone cross-linked agarose. *J. Chromatogr. A*, v. 734, p. 241-246, 1996.

OLIVEIRA, P.H.; PRATHER, K.J.; PRAZERES, D.M.F.; MONTEIRO, G.A. Structural instability of plasmid biopharmaceuticals: challenges and implications. *Trends Biotechnol.*, v. 27 (9), p. 503-511. 2009.

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.

PEREIRA, L.R.; PRAZERES, D.M.F.; MATEUS, M. Hydrophobic interaction membrane chromatography for plasmid DNA purification: Design and optimization. *J. Sep. Sci.*, v. 33, p. 1-10, 2010.

PETRIDES, D.; KOULOURIS, A.; LAGONIKOS, P.T. The role of process simulation in pharmaceuticals process development and product commercialization. *Pharm. Eng.*, v. 22, p. 1-8, 2002.

PETRIDES, B. Bioprocess design, in: Harrison, R.G.; Todd P.W.; Rudge S.R.; Petrides, D. (Eds), *Bioseparations Science and Engineering*, Oxford University Press, p. 319-372, 2003.

PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin removal from protein solution. *J. Biotechnol.*, v. 76, p. 97-119, 2000.

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. Salt-promoted adsorption: recent developments. *J. Chromatogr.*, v. 376, p. 331-341, 1987.

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

PORATH, J. Metal ion - hydrophobic, thiophilic and π -electron governed interactions and their application to salt-promoted protein adsorption chromatography. *Biotechnol. Prog.*, v. 3 (1), p. 14-21, 1986.

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. *Enz. Microb. Tech.*, v. 33(7), p. 865-883, 2003.

PRAZERES, D.M.F.; FERREIRA, G.N.M. Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chem. Eng. Process.*, v. 43, p. 615-630, 2004.

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.

RIBEIRO, S. C.; MONTEIRO, G. A.; CABRAL, J. M. S.; PRAZERES, D. M. F. Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 78, p. 376–384, 2002.

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.

ROETTGER, B.F.; MYERS, J.A.; LADISCH, M.R.; REGNIER, F.E. Adsorption phenomena in hydrophobic interaction chromatography, *Biotechnol. Prog.*, v. 5, n. 3, p. 79-88, 1989.

RUBANYI, G. The future of human gene therapy. *Mol. Asp. Med.*, v. 22, p. 113-142, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3° ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, 2001.

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.

SCHMIDT, T.; FRIEHS, K.; FLASCHEL, E. Structures of plasmid, in: Schleef, M. (Ed.), *Plasmids for Therapy and Vaccination*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, p. 29-32, 2001.

SCHLUEP, T.; COONEY, C.L. Purification of plasmids by triplex affinity interaction. *Nucl. Acids Res.*, v. 26, p. 4524-4528, 1998.

SCHUMANN, W. The biology of plasmids, in: Schleef, M. (Ed.), *Plasmids for Therapy and Vaccination*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, p. 1-28, 2001.

SCHWARZ, A. Five-membered mercaptoheterocyclic ligands for thiophilic adsorption chromatography, *J. Mol. Rec.*, v. 9, p. 672-674, 1996.

SCHWARTZ, A.; KOHEN, F.; WILCHEK, M. Novel heterocyclic ligands for the thiophilic purification of antibodies, *J. Chromatogr. B*, v. 664, p. 83-88, 1995.

SILVA, C.L.; BONATO, V.L.P.; CASTELO, A.A.M.C.; LIMA, K.M.; JÚNIOR, J.M.R. Vacinas Gênicas, in: Luís Mir (Ed.), *Genômica*, Atheneu, São Paulo, p. 463-494, 2004.

SMREKAR, F.; PODGORNIK, A.; CIRINGER, M.; KONTREC, S.; RASPOR, P.; STRANCAR, A.; PETERKA, M. Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns, *Vaccine*, v. 28, p. 2039-2045, 2010.

SOFER, G.K.; HAGEL, L. *Handbook of process chromatography: A guide to optimization, scale-up and validation*, Academic Press, Londres, 1997.

SOUZA, A.; BICHO, D.; TOMAZ, C.T.; SOUZA, F.; QUEIROZ, J.A. Performance of a non-grafted monolithic support for purification of supercoiled plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*, v. 1218, p. 1701-1706, 2010.

SOUZA A.; SOUZA, F.; QUEIROZ, J.A. Biorecognition of supercoiled plasmid DNA isoform in lysine-affinity chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 877 (27), p. 3257-3260, 2009a.

SOUZA, F.; PRAZERES, D.M.F.; QUEIROZ, J.A. Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification. *Biomed. Chromatogr.*, v. 23(2), p. 160-165, 2009b.

SOUZA, F.; MATOS, T.; PRAZERES, D.M.F.; QUEIROZ, J.A. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Anal. Biochem.*, v. 374, p. 432-434, 2008a.

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

SOUZA, F.; PRAZERES, D.M.F.; QUEIROZ, J.A. Dynamic binding of plasmid DNA in histidine-agarose chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, v. 21, p. 993-998, 2007.

SOUZA, 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.

SOUZA, F.; TOMAZ, C.T.; PRAZERES, D.M.F.; QUEIROZ, J.A. Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA by chromatography with histidine-agarose support. *Anal. Biochem.*, v. 343, p. 183-185, 2005.

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

STEFFENS, M.A; FRAGA, E.S.; BOGLE, I.D. Synthesis of bioprocess using physical properties data. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 68, p. 218-230, 2000.

TAGAWA, S.T.; LEE, P.; SNIVELY, J.; BOSWELL, W.; OUNPRASEUTH, S.; LEE, S.; HICKINGBOTTOM, B.; SMITH, J.; JOHNSON, D.; WEBER, J.S. Phase I study of intranodal delivery of a plasmid DNA vaccine for patients with Stage IV melanoma. *Cancer*, v. 98, p. 144–154, 2003.

TAN, L.; KIM, D.S.; YOO, I.K.; CHOE, W.S. Harnessing metal ion affinity for the purification of plasmid DNA. *Chem. Eng. Sci.*, v. 62, p. 5809-5820, 2007a.

TAN, L; LAI, W.B.; LEE, C.T.; KIM, D.S.; CHOE, W.S. Differential interactions of plasmid DNA, RNA and endotoxin with immobilized and free metal ions. *J. Chromatogr. A*, v. 1141, p. 226-234, 2007b.

TANG, D.C.; DEVIT, M.; JHONSTON, S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, v. 356, p. 152-154.1992.

TEETERS, M.A.; ROOT, T.W.; LIGHTFOOT, E.N. Performance and scale-up of adsorptive membrane chromatography, *J. Chromatogr. A*, v.944, p. 129-139, 2002.

TIAINEN, P.; GUSTAVSSON, P.E.; LJUNGLÖF, A.; LARSSON, P.O. Superporous agarose anion exchangers for plasmid isolation. *J. Chromatogr. A*, v. 1138, p. 84-94, 2007.

TRINDADE, I.P.; DIOGO, M.M.; PRAZERES, D.M.F.; MARCOS, J.C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1082, p. 176-184, 2005.

URTHALER, J.; BUCHINGER, W.; NECINA, R. Industrial scale cGMP purification of pharmaceutical grade plasmid-DNA. *Chem. Eng. Technol.*, v. 28(11), p. 1408-1420, 2005.

VAN OSS, C.J. Role of water in hydrophobic attraction, in: van Oss, C.J. (Ed.), *Interfacial forces in aqueous media*, 2^oEd., Boca Raton, p. 101-107, 2006.

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.

VARLEY, D.L.; HITCHKOCK, A.G.; WEISS, A.M.E.; HORLER, W.A.; COWELL, R.; PEDDIE, L.; SHARPE, G.S.; THATCHER, D.R.; HANAK, J.A.J. Production of plasmid DNA for human gene therapy using modified alkaline cell lysis and expanded bed anion exchange chromatography. *Bioseparation.*, 8, 209-217, 1998.

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.

WANG, R.; DOOLAN, D.L.; LE, T.P.; HEDSTROM, R.C.; COONAN, K.M.; CHAROENVIT, Y.; JONES, T.R.; HOBART, P.; MARGALITH, M.; NG, J.; WEISS, W.R.; SEDEGAH, M.; DE TAISNE, C.; NORMAN, J.A.; HOFFMAN, S.L. Induction

of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science*, v. 282, p. 476–480, 1998.

WEINER, D.B. Introduction to DNA Vaccines Issue. *Vaccine*, v. 24, p. 4459-4460, 2006.

WHEELWRIGHT, S.M. Designing downstream processes for large-scale protein purification. *Nat. Biotechnol.*, v.5, p. 789-793, 1987.

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.

WOODGATE, J.; PALFREY, D.; NAGEL, D.A.; HINE, A.V.; SLATER, N.K.H. Protein-mediated isolation of plasmid DNA by zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 79, p. 450-456, 2002.

WU, S.L.; KARGER, B.L. Hydrophobic interaction chromatography of proteins, in: Karger, B.L.; Hancock, W.S. (Eds.), *High Resolution Separation and analysis of biological macromolecules, fundamentals*. Methods Enzymol., v. 270, Academic Press Inc., Londres, p. 27-47, 1996.