



CARLA REIS OLIVEIRA

**PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-
TRYPANOSOMA CRUZI DO ISOTIPO IgG_{2a} EM OPS-AGAROSE**

Campinas – São Paulo

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

CARLA REIS OLIVEIRA

**PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-
TRYPANOSOMA CRUZI DO ISOTIPO IgG_{2a} EM OPS-AGAROSE**

*Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para obtenção
do título de Mestra em Engenharia Química*

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DEFENDIDA PELA ALUNA
CARLA REIS OLIVEIRA, E ORIENTADA
PELA PROF^a. DR^a. SÔNIA MARIA ALVES
BUENO.

A handwritten signature in blue ink, reading "Sônia Bueno", is written over a horizontal line.

Campinas

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

OL4p Oliveira, Carla Reis, 1985-
Purificação de anticorpo monoclonal anti-*Trypanosoma cruzi* do isotipo IgG^{2a} em OPS-agarose / Carla Reis Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Cromatografia de afinidade. 2. Purificação. 3. Anticorpos monoclonais. 4. Proteínas - Separação. I. Bueno, Sônia Maria Alves, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: IgG^{2a} isotype anti-*Trypanosoma cruzi* monoclonal antibody purification onto OPS-agarose

Palavras-chave em inglês:

Affinity chromatography

Purification

Monoclonal antibodies

Proteins separation

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Sônia Maria Alves Bueno [Orientador]


Patrícia Ucelli Simioni

Everson Alves Miranda

Data de defesa: 20-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Carla Reis Oliveira e aprovada em 20 de fevereiro de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora



Profa. Dra. Patricia Ucelli Simioni – IB/UNICAMP



Prof. Dr. Everson Alves Miranda – FEQ/UNICAMP

RESUMO

Anticorpos monoclonais (AcM) são imunoglobulinas secretadas por clones de linfócitos B imortalizados obtidos pela tecnologia de hibridomas. Esses clones são cultivados em meios de cultura complexos e, geralmente, liberam baixas concentrações de AcM, dificultando as etapas de purificação. Como a utilização destas proteínas nas áreas terapêutica e analítica requer um alto grau de pureza, diferentes estratégias de purificação vêm sendo desenvolvidas, mas usualmente os anticorpos são purificados por cromatografia de afinidade com proteína A ou G imobilizada, o que representa um elevado custo de produção para processos industriais. No intuito de contribuir para o desenvolvimento de processos de purificação dessas moléculas, estudou-se a purificação do AcM anti-*Trypanosoma cruzi* isotipo IgG_{2a} em orto-fosfo-serina (OPS) imobilizado em gel de agarose. Contrário ao relatado em literatura, observou-se que o agente quelante apresentou baixa capacidade em imobilizar o íon metálico Ni²⁺. Além disso, o quelato formado adsorveu a molécula alvo juntamente com impurezas do sobrenadante do meio de cultura. Foi observado também que o OPS se comporta como ligante de troca iônica seletivo para IgG_{2a} em solução tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, quando imobilizado em gel de agarose ativado com CNBr, porém os ensaios realizados com o ligante imobilizado em gel ativado com bisoxirano demonstraram que a inserção de uma molécula espaçadora reduz a seletividade do adsorvente. O AcM foi recuperado com elevado grau de pureza quando empregado em solução tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção pelo acréscimo de NaCl 1,0 mol/L para promover aumento da força iônica. Os resultados de ensaios dinâmicos revelaram que a eficiência de recuperação do produto foi de 97,3% e a capacidade dinâmica de adsorção foi 0,39 mg de AcM/mL de gel devido. Este trabalho sugere a potencialidade de utilização do ligante OPS para a purificação dos anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* (IgG_{2a}).

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (mAb) are immunoglobulins produced by lymphocyte B clones immortalized by the hybridoma technology. Those clones are cultivated in complex medium and generally produce low levels of mAb, interfering on purification steps. Since these antibodies are required for analytical and therapeutic purposes, the need of highly pure antibodies is imperative. Although they are usually purified by chromatographic techniques utilizing immobilized protein A ligands, different strategies for downstream processes have been studied to overcome the high costs of these conventional media for industrial scale purposes. Aiming to contribute with the development of such processes, the anti-*Trypanosoma cruzi* mAb (IgG_{2a} isotype) was investigated under chromatographic conditions towards the affinity ligand ortho-phospho-L-serine (OPS) immobilized onto agarose beads. It was observed that despite the fact this ligand has been reported as a chelating agent for the purification of immunoglobulins by IMAC technique, OPS presented low chelating capacity for Ni²⁺ and the metal complex formed adsorbed the desired protein within culture medium contaminants. It was also observed that under buffering conditions of Tris-HCl 50 mmol/L pH 7.0 OPS behaves as a selective ionic exchanger ligand for IgG_{2a} when immobilized in CNBr activated agarose. On the other hand, when immobilized in bisoxirane activated agarose, OPS has shown that the presence of a spacer arm reduces the selectivity of the adsorbent. The mAb was recuperated in one single step with highly purity degree when operated with adsorption buffer Tris-HCl 50 mmol/L pH 7.0 and elution by increasing the ionic strength with the addition of NaCl 1.0 mol/L. The dynamic tests results showed that the efficiency for product recovery was 97.3% and the dynamic binding capacity was 0.39 mg of mAb/mL swollen agarose. This work suggests the potential use of OPS ligand affinity for the purification of IgG_{2a} antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* in a single step.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Anticorpos monoclonais e sua relevância.....	1
1.2	Purificação de anticorpos por cromatografia líquida.....	2
1.3	Objetivo	4
1.4	Estratégia de trabalho	5
2	REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1	Imunoglobulinas	6
2.1.1	Anticorpos monoclonais	8
2.1.2	Anticorpo anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> isotipo IgG _{2a}	12
2.2	Purificação de Anticorpos Monoclonais.....	13
2.3	Purificação de anticorpos por cromatografia de afinidade	15
2.3.1	Ligantes pseudo-bioespecíficos	19
2.3.2	Orto-fosfoserina (OPS) como ligante pseudo-bioespecífico	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Materiais	24
3.1.1	Reagentes.....	24
3.1.2	Anticorpos monoclonais	24
3.2	Métodos	25
3.2.1	Cultivo de hibridoma secretor de anticorpo monoclonal IgG _{2a} anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
3.2.2	Precipitação de proteínas para concentração e estocagem do material de trabalho 25	
3.2.3	Ativação do gel de agarose com bisoxirano	26

3.2.4	Experimentos cromatográficos	27
3.2.5	Determinação da curva de ruptura.....	30
3.2.6	Métodos analíticos.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1	Anticorpo monoclonal isotipo IgG _{2a} anti- <i>T. cruzi</i>	34
4.1.1	Determinação do ponto isoelétrico	34
4.1.2	Preparo do sobrenadante de cultura celular para as etapas cromatográficas	35
4.2	Purificação do anticorpo anti- <i>T. cruzi</i>	36
4.2.1	Purificação do anticorpo anti- <i>T. cruzi</i> por IMAC.....	36
4.2.2	Purificação de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> em agarose-OPS livre de metal	39
4.2.3	Seleção do tampão para purificação da IgG _{2a}	43
4.2.4	Efeito do acréscimo de NaCl ao tampão de adsorção na purificação do anticorpo anti- <i>T. cruzi</i>	47
4.3	Análise qualitativa da purificação de IgG _{2a}	49
4.4	Determinação da capacidade de adsorção de IgG _{2a} de agarose-CNBr-OPS	51
4.4.1	Avaliação da curva de ruptura para a condição cromatográfica proposta.....	Erro!
	Indicador não definido.	
5	CONCLUSÕES	53
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	APÊNDICE A	67
	APÊNDICE B.....	74

Agradecimentos

A Deus, pelo amor, paz e confiança que tem me concedido em todos os momentos.

À minha família, pela compreensão, apoio e incentivo.

À professora Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pela orientação e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu namorado Christiano, pelo carinho incondicional que me deu força nos momentos em que só acreditar parecia impossível.

Aos professores Dra. Ângela Maria Moraes e Dr. Everson Alves Miranda, por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios.

À professora Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro, não só por disponibilizar as instalações de seu laboratório tornando possível o desenvolvimento deste trabalho, mas também por compartilhar comigo seus conhecimentos.

A Dirce Lima Gabriel e Dra. Elisabeth de Fátima Pires Augusto, que se fizeram presente e me ajudaram em diferentes momentos.

Aos amigos e colegas que me ajudaram de alguma maneira nesta caminhada dando suporte técnico e psicológico, enriquecendo as mais diversas discussões e alegrando os momentos exaustivos.

Às doutoras Sandra Santos, Patricia Ucelli Simioni, Maria Teresa Almeida de Azevedo e demais pesquisadores que me despertaram o desejo pela pesquisa e que confiaram em meu trabalho.

Ao CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-1** Fluxograma das etapas realizadas para estudo da purificação do anticorpo monoclonal IgG_{2a} anti-*T.cruzi* em gel de agarose-OPS. 5
- Figura 2-1** Representação esquemática de estruturas (A) e fragmentos (B) de moléculas de imunoglobulinas. V_L e V_H – domínios variáveis das cadeias leve e pesada, respectivamente; C_L – domínio constante da cadeia leve; C_{H1}, C_{H2} e C_{H3} – domínios constantes da cadeia pesada; F_V – porção hipervariável, que interage com o antígeno; F_{AB} – fragmento reconhecedor do antígeno; F_C – fragmento constante (modificado de <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/IgStruct2000.htm> acessado em 08/10/2013)..... 7
- Figura 2-2** Esquema da produção e seleção de células de hibridomas e posterior cultivo dessas células para obtenção de anticorpos monoclonais em animais (*in vivo*) ou em cultura celular (*in vitro*), a partir da técnica desenvolvida por Köhler e Milstein em 1975 (BRESOLIN, 2006). 10
- Figura 2-3** Estrutura molecular do ligante OPS (www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0878?lang=pt®ion=BR acessado em 08/10/2013)..... 22
- Figura 3-1** Esquema do sistema cromatográfico de baixa pressão utilizado nos experimentos. 1) reservatórios de solução; 2) bombas peristálticas; 3) computador; 4) coluna cromatográfica; 5) monitor de medida de absorvância a 280 nm; 6) coletor de frações (adaptado de BRESOLIN, 2006). 27
- Figura 4-1** Gel de eletroforese de Focalização Isoelétrica (IEF) para determinação do ponto isoelétrico (pI) do AcM IgG_{2a} anti-*T. cruzi* purificado por cromatografia em gel de proteína G-Sepharose. M-Marcador de ponto isoelétrico, I- Amostra de imunoglobulina monoclonal IgG_{2a} purificada. 35
- Figura 4-2** Perfil eletroforético de amostras do sobrenadante de cultivo de hibridomas secretores de IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em diferentes etapas do processo de precipitação com sulfato de amônio a 50% de saturação, seguida de diálise. MM- Massa molecular (kDa), 1- Padrão de alta massa molecular (cód.17-0615-01, GE), 2- Marcador de IgG (Aventis), 3- Sobrenadante de cultura celular antes da precipitação, 4- Sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, 5-

Proteínas não precipitadas, 6- Anticorpo monoclonal IgG _{2a} purificado por cromatografia em gel de proteína G-Sepharose.....	36
Figura 4-3 Cromatografia do sobrenadante de cultura de hibridoma secretor de AcM isotipo IgG _{2a} em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS com o íon metálico Ni ²⁺ quelatado...	37
Figura 4-4 Cromatografia de sobrenadante de cultura de hibridoma secretor de AcM isotipo IgG _{2a} em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 2,4 mL de sobrenadante concentrado por precipitação [5,73 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 0,7 mL. Perfil cromatográfico: L- lavagem (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0), E- início da eluição(aumento em degrau da concentração de Tris), E ₁ - eluição 1 (Tris 100 mmol/L), E ₂ - eluição 2 (Tris 300 mmol/L), R- regeneração (EDTA 50 mmol/L pH 6,5). Perfil eletroforético: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E ₁ - eluição 100 mmol/L, E ₂ - eluição 300 mmol/L, R- regeneração.....	40
Figura 4-5 Cromatografia de sobrenadante de cultura de hibridoma secretor de AcM isotipo IgG _{2a} em coluna contendo 1,0 mL de agarose-bisoxirano-OPS. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 2,4 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,32 mg/mL] em Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 0,7 mL. Perfil cromatográfico: L- lavagem (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0), E- início da eluição(aumento em degrau da concentração de Tris), E ₁ - eluição 1 (Tris 100 mmol/L), E ₂ - eluição 2 (Tris 300 mmol/L), R- regeneração (EDTA 50 mmol/L pH 6,5). Perfil eletroforético: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E ₁ - eluição 100 mmol/L, E ₂ - eluição 300 mmol/L, R- regeneração.....	42
Figura 4-6 Perfis eletroforéticos das frações obtidas em cromatografias de alíquotas precipitadas e dialisadas de sobrenadante de cultivo de hibridoma, secretor de IgG _{2a} monoclonal anti- <i>T. cruzi</i> , em agarose-CNBr-OPS com diferentes sistemas tamponantes. Legenda: M. marcador de IgG (Aventis), I. amostra de injeção, L: <i>pool</i> das frações de lavagem, E: <i>pool</i> das frações de eluição.	44
Figura 4-7 Efeito do pH e natureza dos sistemas tamponantes Tris-HCl (×), fosfato de sódio (●) e MOPS (▲) na adsorção de proteínas totais do sobrenadante de cultura de hibridomas secretores de AcM anti- <i>T.cruzi</i> (IgG _{2a}) em agarose-CNBr-OPS.....	45

Figura 4-8 Perfil eletroforético das cromatografias de sobrenadante de cultura de hibridomas secretores de AcM anti-*T.cruzi* em agarose-CNBr-OPS em diferentes concentrações de NaCl no tampão de adsorção Tris-HCl pH 7,0. M. marcador de IgG (Aventis), I. amostra de injeção, L₀-L₁₀₀. lavagem (0, 10, 30, 50 e 100 mmol/L de NaCl), E₀-E₁₀₀. eluição com Tris-HCl 50 mmol/L contendo 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0 das cromatografias com 0, 10, 30, 50 e 100 mmol/L de NaCl no tampão de adsorção. 48

Figura 4-9 Massa relativa de proteínas totais e IgG das frações não-adsorvidas (■) e adsorvidas (▨), determinadas por análise quantitativa do gel SDS-PAGE e massa de proteínas adsorvidas (◆) nas cromatografias de sobrenadante de cultura de hibridomas secretores de AcM anti-*T.cruzi* em agarose-CNBr-OPS com aumento da molaridade de NaCl no tampão de adsorção Tris-HCl pH 7,0. 48

Figura 4-10 Análise qualitativa das frações obtidas pela purificação de IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em agarose-CNBr-OPS. Eletroforese SDS-PAGE, sob condições não redutoras, do pool formado pela homogeneização das frações de cada etapa: M. Padrão de massa molecular (GE Healthcare), A. amostra de injeção, L. pool de lavagem, E. pool de eluição B) *Western Blotting*: M. Padrão de massa molecular pré-corado (GE Healthcare), A. amostra de injeção, L. pool de lavagem, E. pool de eluição. 50

Figura 4-11 Curva de ruptura da cromatografia de IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em agarose-CNBr-OPS utilizando Tris-HCl pH 7,0 como sistema tamponante. Alimentação: 50,0 mL de anticorpo purificado [200 µg/mL]. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 0,5 mL de 0 a 125 min e de 176 a 200 min; 5,0 mL de 126 a 175 min. 52

Figura 4-12 Perfil cromatográfico das frações de lavagem e eluição da curva de ruptura de IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em gel de agarose-CNBr-OPS utilizando Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,0 como sistema tamponante. Injeção: 50,0 mL do anticorpo purificado [200 µg/mL]. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas na lavagem: 0,5 mL de 0 a 62,5 mL e 5,0 mL de 63 a 112 mL. Frações coletadas na eluição: 0,5 mL. **Erro! Indicador não definido.**

Figura A - 1 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna

contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,19 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Eluição: Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição..... 67

Figura A - 2 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,19 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0. Eluição: Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 8,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição..... 68

Figura A - 3 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: Tris-HCl 50 mmol/L pH 9,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [4,87 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 9,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L pH 9,0. Eluição: Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 9,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição..... 68

Figura A - 4 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,34 mg/mL] em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,5. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,5. Eluição: fosfato de sódio 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 6,5. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição. 69

Figura A - 5 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: fosfato de sódio 50 mmol/L pH

7,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,2 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [4,82 mg/mL] em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0. Eluição: fosfato de sódio 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.
..... 70

Figura A - 6 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,5. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,58 mg/mL] em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,5. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,5. Eluição: fosfato de sódio 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,5. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.
..... 70

Figura A - 7 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: MOPS 50 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [4,72 mg/mL] em tampão MOPS 50 mmol/L pH 6,5. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: MOPS 50 mmol/L pH 6,5. Eluição: MOPS 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 6,5. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição..... 71

Figura A - 8 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: MOPS 50 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,02 mg/mL] em tampão MOPS 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: MOPS 50 mmol/L pH 7,0. Eluição: MOPS 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição..... 72

Figura A - 9 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: MOPS mmol/L pH 7,9. Vazão:

0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,55 mg/mL] em tampão MOPS 50 mmol/L pH 7,9. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: MOPS 50 mmol/L pH 7,9. Eluição: MOPS 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,9. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição..... 72

Figura B - 1 Replicata do experimento apresentado na **Figura 4-3**..... 74

Figura B - 2 Replicata do experimento apresentado na **Figura 4-4**..... 75

Figura B - 3 Replicata do experimento apresentado na **Figura 4-5**..... 76

Figura B - 4 Replicata do experimento apresentado na **Figura 4-11**..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1 Comparação da intensidade de afinidade relativa entre os ligantes bioespecíficos (proteínas A, G e L) e os diferentes isotipos de IgG de camundongo.....	17
Tabela 4-1 Balanço de massa da etapa de concentração por precipitação de IgG _{2a} proveniente do sobrenadante de cultivo de hibridoma secretor do AcM anti- <i>T. cruzi</i>	36
Tabela 4-2 Balanço de massa da cromatografia em agarose-OPS-Ni ²⁺ utilizando tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris.....	38
Tabela 4-3 Balanço de massa da cromatografia em agarose-CNBr-OPS em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris.....	40
Tabela 4-4 Balanço de massa da cromatografia em agarose-bisoxirano-OPS utilizando tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris.....	42
Tabela 4-5 Balanço de massa da cromatografia em agarose-CNBr-OPS em tampão de equilíbrio Tris-HCl pH 7,0 e dessorção com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L.....	50
Tabela A - 1 Balanço de massa das cromatografias utilizando o sistema tamponante Tris-HCl 50 mmol/L. A dessorção foi realizada com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L ao tampão de equilíbrio.	69
Tabela A - 2 Balanço de massa das cromatografias utilizando tampão de equilíbrio Fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 6,5; 7,0 e 7,5. A dessorção foi realizada com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L.....	71
Tabela A - 3 Balanço de massa das cromatografias utilizando tampão de equilíbrio MOPS 50 mmol/L, pH 6,5; 7,0 e 7,9. A dessorção foi realizada com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L.....	73
Tabela B - 1 Replicata do balanço de massa apresentado na Tabela 4-2	75
Tabela B - 2 Replicata do balanço de massa apresentado na Tabela 4-3	76

Tabela B - 3 Balanço de massa da cromatografia em agarose-bisoxirano-OPS utilizando tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris..... 77

Tabela B - 4 Balanço de massa da cromatografia em agarose-CNBr-OPS utilizando tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L..... 77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anticorpos monoclonais e sua relevância

As imunoglobulinas (Ig), também denominadas anticorpos, são componentes de fundamental importância do sistema imune adaptativo, pois são moléculas proteicas que reagem especificamente com antígenos (por exemplo: proteínas, peptídeos, polímeros e carboidratos). Podem ser encontradas tanto na superfície de células B, onde atuam como receptores de antígenos específicos, quanto na sua forma livre no sangue ou linfa, atuando como moléculas efetoras da imunidade humoral (ABBAS e LICHTMANN, 2003; COX e PHILLIPS, 2007; SOOD *et al.*, 2012).

O reconhecimento de um agente antigênico pelo sistema imune desencadeia uma cascata de reações estimulando a produção de um *pool* heterogêneo de anticorpos específicos para sítios distintos do agente invasor. Estes anticorpos são originados de diferentes clones de linfócitos B e, por isso, são denominados policlonais. Os anticorpos monoclonais (AcM) são imunoglobulinas homogêneas secretadas por um único clone de linfócito B normal, tumoral ou obtido pela técnica de cultivo de hibridomas desenvolvida por Köhler e Milstein (1975). Esta técnica consiste na fusão *in vitro* de clones de linfócito B secretores de anticorpos com células tumorais para que adquiram destas a capacidade de se multiplicar indefinidamente em cultivo celular.

A produção ilimitada de AcM secretados por hibridomas encorajou o desenvolvimento de sistemas de biorreatores para cultivo destas células visando a obtenção de biomoléculas em escala industrial (GODING, 1995; TREBAK *et al.*, 1995; ROQUE *et al.*, 2007). Muitas proteínas terapêuticas já vinham sendo produzidas para utilização na prática clínica, como insulina, hormônio de crescimento e antígenos para formulação de vacinas. No entanto, a diversidade de interações antígeno-anticorpo e o desenvolvimento das técnicas de biotecnologia fazem dos anticorpos uma promissora ferramenta para aplicação não só para fins terapêuticos e diagnósticos, como também em cromatografia de imunoafinidade, técnicas analíticas e bioquímicas, desenvolvimento de imunoenaios e muitas outras aplicações no ramo da pesquisa básica (ROQUE *et al.*, 2004; AYYAR *et al.*, 2012; DEPRETER *et al.*, 2013).

O cultivo de hibridomas requer suplementos de crescimento compostos por proteínas, aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento, que interferem nas etapas de purificação do

produto atuando como contaminantes. Estes contaminantes tornam as etapas de recuperação mais complexas e dispendiosas (BUTLER, 2005; SHUKLA e THOMMES, 2010; RAJAK *et al.*, 2012), uma vez que as aplicações de AcM requerem a ausência de agentes que possam induzir processos alérgicos em formulações terapêuticas, exigindo assim elevado grau de pureza das preparações (LOW *et al.*, 2007; ROQUE *et al.*, 2007; AYYAR *et al.*, 2012).

A demanda crescente por AcM e a otimização da produção promovem o desenvolvimento de técnicas de purificação que aliem elevada pureza e minimizem os custos, uma vez que a purificação de anticorpos com elevado grau de pureza representa 50 a 80% do custo global do processo de produção (ZAMOLO *et al.*, 2008).

1.2 Purificação de anticorpos por cromatografia líquida

Plataformas industriais para purificação de anticorpos monoclonais são fundamentadas em etapas já estabelecidas de purificação de biomoléculas. Inicialmente o material obtido pelo cultivo em biorreatores é centrifugado, seguido de filtração, para recuperar o sobrenadante livre de células e partículas. Na sequência, esse sobrenadante passa por uma etapa cromatográfica de afinidade para captura dos AcM, que serão encaminhados para um sistema de inativação viral. Por fim, uma ou duas etapas cromatográficas de polimento são processadas para que seja alcançado o grau de pureza requerido (KELLEY, 2009; SHUKLA e THOMMES, 2010). Em média processos como estes atingem rendimentos de 70 a 80%.

A técnica cromatográfica de afinidade por ligante bioespecífico com proteína A e G imobilizada é a mais utilizada para a etapa de captura dos anticorpos, devido a sua alta capacidade e seletividade na adsorção de IgG, uma vez que o reconhecimento seletivo é promovido por interações específicas entre o ligante e a imunoglobulina (LOW *et al.*, 2007; ISHIHARA *et al.*, 2010; AYYAR *et al.*, 2012). No entanto, o emprego de ligantes bioespecíficos possui as seguintes limitações: são macromoléculas e de difícil imobilização nas matrizes; apresentam alto custo de obtenção; as condições drásticas de eluição, em valores baixos de pH, reduzem a capacidade e a vida útil do adsorvente por perda de atividade ou desprendimento dos ligantes; o desprendimento dos ligantes acarreta ainda na contaminação do produto purificado. Tais desvantagens tornam a cromatografia de afinidade a operação unitária mais cara ao longo do

processo, contribuindo para que as etapas de “downstream process” atinjam até 80% do custo total de produção (ZAMOLO *et al.*, 2008; KELLEY, 2009; DIMARTINO *et al.*, 2011).

Para contornar os problemas mencionados, novos ligantes de afinidade foram desenvolvidos. Os ligantes pseudo-bioespecíficos surgiram como uma promissora alternativa aos ligantes bioespecíficos, pois além de apresentarem baixo custo, são moléculas pequenas, de melhor estabilidade físicoquímica, fácil imobilização a diferentes tipos de matriz e não necessitam de condições drásticas para eluir as proteínas adsorvidas (VIJAYALAKSHMI, 1989). Estes ligantes podem ser sintéticos como quelatos metálicos, ligantes tiofílicos e corantes, ou compostos que mimetizam os ligantes de origem biológica como peptídeos e aminoácidos. Embora não possuam interação biológica, os ligantes pseudo-bioespecíficos também apresentam a capacidade de se ligar às proteínas por meio de interações do tipo hidrofóbicas, eletrostáticas ou de ligações de coordenação (ROQUE e LOWE, 2006; HAGE *et al.*, 2012).

Sendo assim, o amino ácido orto-fosfoserina (OPS) foi avaliado como agente quelante de geometria de coordenação tridentada alternativa ao ácido iminodiacético (IDA) para a purificação de proteínas pela técnica de IMAC (ZACHARIOU *et al.*, 1993; ZACHARIOU e HEARN, 2000), uma vez que a ligação de íons metálicos duros (segundo a classificação de Lewis) com os agentes quelantes tradicionais resultava em desprendimento destes durante a cromatografia.

Devido à presença dos grupamentos fosfato e carboxila, a molécula de OPS possui quatro valores de pKa (pK_{a1} não determinado; $pK_{a2} = 2,19$; $pK_{a3} = 5,78$; $pK_{a4} = 9,85$), apresentando carga líquida negativa em valores de pH acima de 5,78 (ZACHARIOU *et al.*, 1996, SMIECHOWSKI, 2010). Por esta razão seu desempenho foi avaliado na purificação de IgG a partir de soro humano (BRESOLIN e BUENO, 2012). Embora o rendimento tenha sido em torno de 45%, a elevada seletividade do ligante sugere uma potencial ferramenta para captura de IgG. Como existem poucos trabalhos publicados na literatura com o emprego da cromatografia de afinidade com o ligante OPS imobilizado, a potencialidade do seu uso para a purificação de IgG monoclonal precisa ser estudada para melhor compreender os mecanismos de interação entre o ligante e o anticorpo.

1.3 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de utilização, em termos de seletividade e rendimento, do aminoácido orto-fosfoserina (OPS) como ligante pseudo-bioespecífico imobilizado em gel de agarose (agarose-OPS) almejando a purificação cromatográfica em etapa única de anticorpo monoclonal isotipo IgG_{2a} por cromatografia de afinidade. A IgG_{2a} anti-*Trypanosoma cruzi*, obtida a partir do sobrenadante de cultivo de hibridomas, foi utilizada como modelo de AcM para estudar as interações intermoleculares que promovem a adsorção dessa classe de imunoglobulinas à agarose-OPS.

Para atingir o objetivo proposto, este projeto de pesquisa constou das seguintes etapas:

- 1) Cultivo de hibridoma secretor de anticorpo monoclonal anti-*T. cruzi* do isotipo IgG_{2a} (WT 5B6H3G10) *in vitro*, preparo do sobrenadante e concentração do AcM por precipitação com sulfato de amônio.
- 2) Realização de ensaios cromatográficos com o AcM em agarose-OPS, com o intuito de verificar o perfil de eluição da proteína em diferentes sistemas tamponantes e determinar a melhor condição para adsorção seletiva.
- 3) Determinação da pureza e fator de purificação do AcM.
- 4) Determinação da curva de ruptura do processo estudado.

1.4 Estratégia de trabalho

Para atingir o objetivo proposto, o estudo foi conduzido em etapas conforme apresentado no diagrama da **Figura 1-1**.

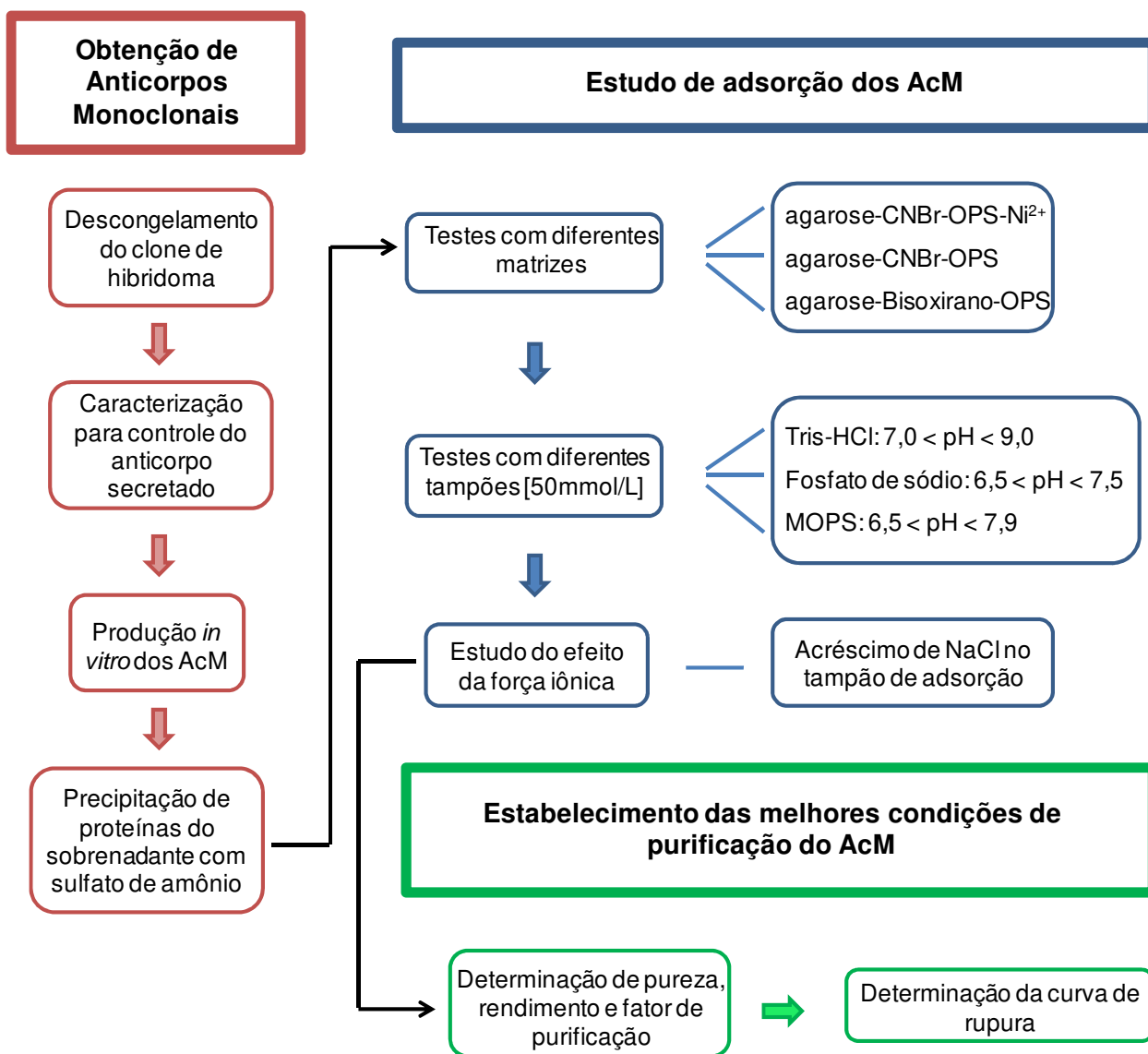


Figura 1-1 Fluxograma das etapas realizadas para estudo da purificação do anticorpo monoclonal IgG_{2a} anti-*T.cruzi* em gel de agarose-OPS.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Imunoglobulinas

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas produzidas por células de defesa do sistema imune (linfócitos B) responsáveis pela imunidade humoral. Estas moléculas efetoras são as principais responsáveis pela maior parte da defesa contra infecções provocadas por microrganismos extracelulares, vírus e parasitas, coletivamente chamados de patógenos (ABBAS e LICHTMANN, 2003; COX e PHILLIPS, 2007). Os anticorpos reagem especificamente com o antígeno que estimulou sua produção direcionando a neutralização ou sinalização de patógenos com decorrente eliminação dos agentes infecciosos do organismo (ABBAS e LICHTMANN, 2003; SMITH *et al.*, 2006; SOOD *et al.*, 2012).

A maior parte do conhecimento a cerca da estrutura e função dos anticorpos foi obtida graças a estudos realizados em camundongos, à medida que linhagens murinas foram estabelecidas e técnicas para o cultivo de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais foram desenvolvidas (KOHLENER e MILSTEIN, 1975; NEZLIN, 1998). As imunoglobulinas murinas, assim como as humanas, são divididas conforme suas propriedades estruturais e biológicas em cinco classes: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, sendo a IgG encontrada em maior abundância no soro. As moléculas de IgG murinas diferem entre si estruturalmente pelo número e localização de pontes dissulfeto nos domínios constantes da cadeia pesada e tamanho da região flexível. Essas diferenças influenciam diretamente algumas de suas propriedades funcionais, levando à distinção em quatro subclasses: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃, sendo a IgG₁ e IgG_{2a} as subclasses predominantes (NEZLIN, 1998; ABBAS e LICHTMANN, 2003; COX e PHILLIPS, 2007).

Enquanto ambas as subclasses murinas de IgG₂ fixam o complemento pela via clássica, essa propriedade é bastante fraca ou praticamente inexistente para os isotipos IgG₁ e IgG₃. Apesar de todas elas estarem associadas com transferência placentária, os isotipos IgG_{2a} e IgG_{2b} são os moduladores da citotoxicidade anticorpo-dependente, IgG₃ está associado com reconhecimento de carboidratos e a IgG₁ apresenta atividade de mediação passiva a reações anafiláticas cutâneas. As subclasses IgG₁ e IgG_{2a} são os isotipos reativos contra parasitas e vírus, estimulando efetivamente as células fagocitárias do sistema imune (SCOTT *et al.*, 1990; NEZLIN, 1998; SMITH *et al.*, 2006).

A síntese de imunoglobulinas inclui modificações pós traducionais como a glicosilação, processo intracelular no qual moléculas glicanas são adicionadas às estruturas proteicas. Como resultado, essas moléculas glicoprotéicas são constituídas de 82 a 96% de aminoácidos e 4 a 18% de carboidratos (UNKELESS *et al.*, 1988; VLUG e REMORTEL, 1989; HOLT *et al.*, 2003). As diferentes composições de aminoácidos e carboidratos conferem a estas moléculas variações quanto ao tamanho e ponto isoelétrico (ROITT *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2007).

Estruturalmente as IgGs são glicoproteínas simétricas com massa molecular de aproximadamente 150 kDa, compostas por dois pares de cadeias polipeptídicas estabilizadas e unidas entre si por ligações covalentes formando pontes dissulfeto e interações não covalentes, assumido o formato estrutural característico em Y (ROQUE *et al.*, 2007; SHUKLA *et al.*, 2007; VERMASVUORI, 2009) conforme ilustrado na **Figura 2-1**. A molécula apresenta duas cadeias polipeptídicas leves idênticas e não glicosiladas (L = *Light* - representadas em azul na **Figura 2-1**) formadas por apenas um domínio constante (C_L) e um variável (V_L), com massa molecular de 25 kDa, e duas cadeias glicosiladas pesadas também idênticas (H = *Heavy* – representadas em verde) formadas por três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) e um variável (V_H), com massa molecular entre 50 e 70 kDa (GODING, 1995; WANG *et al.*, 2007; COX e PHILLIPS, 2007).

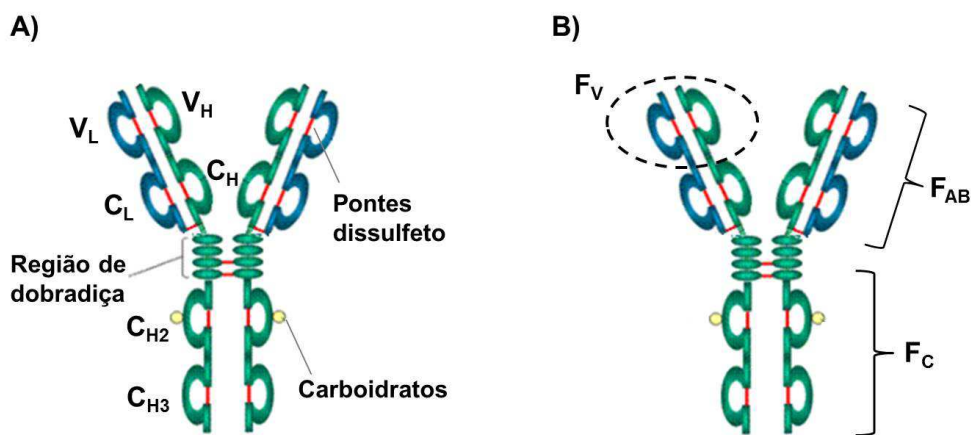


Figura 2-1 Representação esquemática de estruturas (A) e fragmentos (B) de moléculas de imunoglobulinas. V_L e V_H – domínios variáveis das cadeias leve e pesada, respectivamente; C_L – domínio constante da cadeia leve; C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} – domínios constantes da cadeia pesada; F_V – porção hipervariável, que interage com o antígeno; F_{AB} – fragmento reconhecedor do antígeno; F_C – fragmento constante (modificado de <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/IgStruct2000.htm> acessado em 08/10/2013).

Existem dois tipos de cadeia leve, comuns a todas as classes de imunoglobulinas, mas presentes de maneira alternada: kappa (κ) ou lambda (λ). Esta classificação considera a diferença de aminoácidos constitutivos da estrutura, mas não relaciona diferenças funcionais. Em murinos apenas 5,0% das imunoglobulinas presentes no plasma possuem cadeia leve do tipo λ (GODING, 1995; NEZLIN, 1998). As cadeias pesadas apresentam massa molecular variável para cada classe de Ig, sendo classificadas com base em diferenças estruturais apresentadas por seus domínios constantes, sendo elas: α para as moléculas de IgA, δ para IgD, ϵ para IgE, μ para IgM e γ para IgG (VLUG e REMORTEL, 1989; HOLT *et al.*, 2003; SOOD *et al.*, 2012).

Os anticorpos possuem uma região flexível denominada dobradiça, suscetível à clivagem por enzimas proteolíticas como a papaína e pepsina. A papaína digere o anticorpo em três subunidades: dois fragmentos idênticos na região amino terminal capazes de se ligar ao antígeno (Fab = *antigen-binding fragment*) e um fragmento na região carboxila terminal (Fc = *crystallizable fragment*) que está envolvida nos processos de transferência placentária, fixação do complemento, ligação aos receptores de várias células, dentre outras atividades biológicas (GODING, 1995; WANG *et al.*, 2007). Embora a digestão ocorra na mesma região, o sítio de clivagem não é o mesmo para a enzima pepsina, que fragmenta a Ig em: F(ab')₂ (constituído de dois fragmentos Fab ligados covalentemente) e o restante da molécula é clivado em fragmentos menores, do tipo pFc'. As variações na especificidade e afinidade dos anticorpos pelos antígenos são resultantes de alterações na sequência e no tamanho das regiões hipervariáveis (F_V) formadas pelos domínios variáveis V_L e V_H da porção amino terminal da molécula. Essas variações são produzidas por recombinações da sequência gênica e mutações somáticas (COX e PHILLIPS, 2007).

2.1.1 Anticorpos monoclonais

Ao ser exposto a determinado antígeno, o sistema imune inicia uma cascata de reações para neutralizar e eliminar o agente invasor. Neste processo, diferentes linfócitos B secretam seus respectivos anticorpos e, como cada uma dessas células (clones) produz uma única e específica molécula de Ig, o conjunto de anticorpos formados é bastante heterogêneo e é denominado policlonal (MILSTEIN, 1980; ABBAS e LICHTMANN, 2003). Mesmo sendo formados contra

um único determinante antigênico, suas diferenças estruturais conferem maior ou menor especificidade, proporcionando ligações com diferentes graus de afinidade (COX e PHILLIPS, 2007).

Os anticorpos monoclonais (AcM) diferem dos policlonais por sua monoespecificidade e homogeneidade, pois são moléculas idênticas e específicas para um determinado antígeno provenientes de um único clone celular. Suas características os tornam uma ferramenta muito efetiva no desenvolvimento e aplicação de terapias, diagnósticos e em pesquisa básica. O emprego desta classe de moléculas se tornou possível devido ao trabalho de Kohler e Milstein (1975), que possibilitou a obtenção de culturas contínuas de hibridomas secretores de anticorpos de especificidade pré-definida, já que linfócitos B normais não sobrevivem por muito tempo em cultura.

Para a obtenção de AcM, camundongos são sensibilizados com antígenos contra os quais se pretende produzir anticorpos. As células esplênicas do animal são isoladas e fundidas a células de linhagem tumoral (mielomas) e, com isso, os hibridomas formados têm a capacidade de se multiplicar indefinidamente, tornando-se virtualmente imortais. Os hibridomas são manipulados *in vitro* passando por sucessivas diluições através da técnica de diluição limite, até que seja isolado um único clone secretor de anticorpos (MILSTEIN, 1980).

A partir dos hibridomas, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos *in vivo* ou *in vitro*. No primeiro caso, o hibridoma secretor de AcM é injetado na cavidade peritoneal de um animal histocompatível e os anticorpos são recuperados posteriormente no fluido ascítico. A produção *in vitro* é feita pela expansão e cultivo do hibridoma selecionado em meio de cultura apropriado, enriquecido com nutrientes necessários ao crescimento celular. A **Figura 2-2** ilustra a técnica de obtenção desses anticorpos.

Apesar de serem naturalmente produzidos pelo sistema imune animal, a necessidade de grandes quantidades de anticorpos com especificidade única que atendam às exigências de elevada pureza e controle de produção levaram ao desenvolvimento de bioprocessos para produção dessas moléculas em escala industrial (ROQUE *et al.*, 2004; ELVIN *et al.*, 2013). O cultivo pode ser realizado tanto na forma de cultura estacionária quanto em tanques agitados, mas a maior parte das produções opta pelo cultivo de células de mamíferos em sistemas de batelada

ou batelada alimentada com biorreatores do tipo *wave* e sistemas de perfusão (FARID, 2007; SHUKLA e THOMMES, 2010).

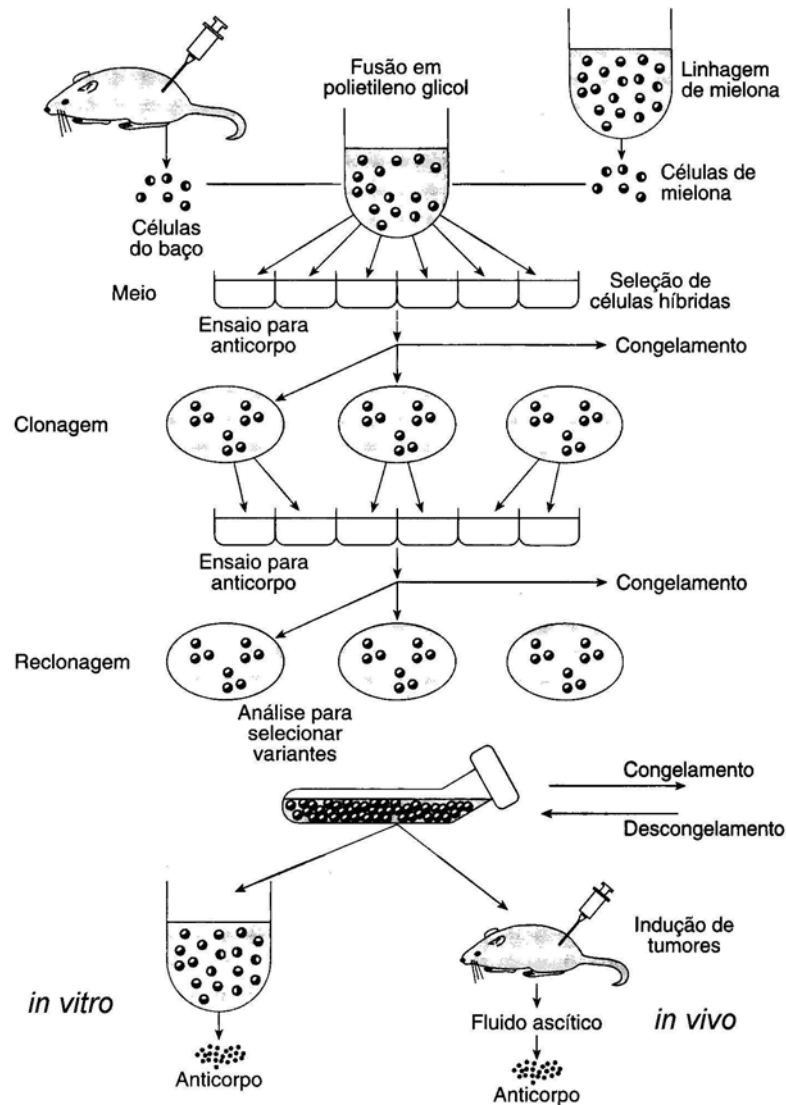


Figura 2-2 Esquema da produção e seleção de células de hibridomas e posterior cultivo dessas células para obtenção de anticorpos monoclonais em animais (*in vivo*) ou em cultura celular (*in vitro*), a partir da técnica desenvolvida por Köhler e Milstein em 1975 (BRESOLIN, 2006).

Aditivos dos meios de cultura como vitaminas, aminoácidos e fatores de crescimento acabam atuando como impurezas para a recuperação do produto que, aliado às baixas concentrações de AcM obtidas em muitos biorreatores, torna as etapas de purificação mais dispendiosas (RAJAK *et al.*, 2012). Outro componente que interfere nas etapas de purificação

quando adicionado aos meios de cultivo é o soro fetal bovino (SFB). Este aditivo é uma mistura complexa de proteínas, hormônios e fatores que promovem adesão e crescimento das células; transporte de glicose, fosfato e aminoácidos; aumento da permeabilidade celular; resistência mecânica para cultivo em reatores agitados (BUTLER e JENKINS, 1989; BUTLER, 2005).

Desde sua introdução no mercado em 1986 (WANG *et al.*, 2007; KELLEY, 2009), os avanços em tecnologias para o cultivo de células de mamíferos possibilitou o aumento de produtividade de AcM nas etapas de *upstream process*, passando de 1,0 g/L para 5,0 g/L as concentrações de anticorpo. Apesar dessa melhora no rendimento possibilitar o manuseio de biorreatores igualmente cinco vezes menores (alguns chegavam a conter 25000 L) (KELLEY, 2009; SHUKLA e GOTTSCHALK, 2013), essas economias em escala não se transferem diretamente para as etapas *downstream process* (recuperação e purificação do produto). Particularmente, o uso de resinas cromatográficas é determinado pela massa do produto a ser purificada, e não pelo volume (LOW *et al.*, 2007).

No ramo da pesquisa, o uso de anticorpos e seus derivados como marcadores permite a identificar e localizar proteínas intra e extracelulares, mediar ou modular condições fisiológicas e patológicas, e ainda diferenciar o tipo de célula pelo reconhecimento de suas proteínas de superfície. Como agentes diagnósticos, além de serem empregados como microcarregadores e imunossensores, são uma poderosa ferramenta na esfera analítica, sendo empregados em análises de citometria de fluxo, imunoenaios (caracterizando biomoléculas por *Western e Dot Blotting*), imunohistoquímica, imunocitoquímica, imunoprecipitação, testes de ELISA, radioimunoenaios, ensaios de imunofluorescência, dentre outros. São ainda largamente utilizados em cromatografias de imunoafinidade (para a captura de antígenos de interesse de uma mistura complexa de proteínas), imunopofilaxias, direcionamento de fármacos, detecção de patógenos, resíduos e toxinas em alimentos, monitoramento do meio ambiente. Por fim, são os agentes de imunoterapia (VERMASVUORI, 2009; AYYAR *et al.*, 2012; RAJAK *et al.*, 2012). Para todos esses fins existe a necessidade de obtenção de preparações homogêneas com elevado grau de pureza, portanto um método eficiente de purificação é considerado imperativo.

Atualmente, dentre os monoclonais aprovados e comercializados para fins terapêuticos nos Estados Unidos e União Europeia, cinco são de origem murina, dos quais três são do isotipo IgG_{2a}, sendo eles: Orthoclone OKT3 utilizado para combater rejeição em transplantes, Bexxar

receitado para tratamentos contra linfoma de Hodkings, e o AcM empregado no combate a ascites malignos Removab. Em 2010 os anticorpos monoclonais terapêuticos representavam 7% do mercado mundial farmacêutico. Com previsões de crescimento em 9,2%, estima-se que em 2015 essa classe será a responsável pelo crescimento de todo o setor farmacêutico, embora represente uma pequena parcela dele (SHUKLA e THOMMES, 2010; ELVIN *et al.*, 2013).

2.1.2 Anticorpo anti-*Trypanosoma cruzi* isotipo IgG_{2a}

Em camundongos, 95% das cadeias leves de Ig são do tipo κ e pequenas alterações na cadeia pesada de IgG como sequencia de aminoácidos, número e localização de pontes dissulfídicas e a extensão da região de dobradiça, fazem com que sejam subclassificadas (WANG *et al.*, 2007). Existem quatro subtipos de IgG (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃), que não são exatamente homólogos aos subtipos humanos, porém pode-se considerar uma correspondência considerando similaridades entre as atividades biológicas funcionais de ambas as espécies (SMITH *et al.*, 2006).

O isotipo IgG_{2a} murino é um dos principais responsáveis pelo combate a infecções e pode ser considerado o correspondente ao isotipo humano IgG₁ pelo fato de fixar o complemento e se ligar a antígenos (SCOTT *et al.*, 1990). Este isotipo é também envolvido na transferência placentária de anticorpos maternos para o feto e, após o nascimento, esta imunoglobulina transferida pelo aleitamento materno é capaz de conferir imunidade ao neonato graças a sua habilidade de atravessar o epitélio intestinal (SMITH *et al.*, 2006).

Em estudo para decifrar os mecanismos de ação protetora dos anticorpos produzidos durante a fase crônica da infecção pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, imunoglobulinas das classes IgG_{2a} e IgG_{2b} foram detectadas em soros imunes de camundongos cronicamente infectados (TAMASHIRO, 1988). A infecção por este parasita é a causa da Doença de Chagas, uma enfermidade de caráter crônico exclusiva do continente americano que foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas (COURA e DIAS, 2009; PEDRA *et al.*, 2011). É estimado que na América Latina 12 a 14 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* sendo que, no Brasil, ocorre cerca de cinco mil óbitos por ano devido à manifestação da doença (PEDRA *et al.*, 2011).

Estudos anteriores ao trabalho de Tamashiro (1988), como o conduzido por Krettli e colaboradores (1979) mostraram que anticorpos produzidos durante a fase crônica de infecção por este parasita em humanos e em camundongos são capazes de se ligar a estruturas antigênicas da superfície de tripomastigotas (estágio infectivo do parasita) e promover a lise do invasor mediada por complemento. Os clones estáveis de hibridomas secretores de IgG_{2a} ou IgG_{2b} anti- *T. cruzi* obtidos por TAMASHIRO (1988) apresentaram atividade lítica com índices de 30 a 50% sobre a forma tripomastigota do parasita.

2.2 Purificação de Anticorpos Monoclonais

A utilização de AcM para aplicações terapêuticas, diagnósticos e para purificação de biomoléculas, implica em cuidados no processo de obtenção destas proteínas. É de suma importância desenvolver ou aprimorar processos de purificação que resultem em alto rendimento, elevada pureza e manutenção da atividade biológica dos constituintes (PRASANNA e VIJAYALAKSHMI, 2010; GAGNON, 2012).

A aplicação terapêutica dos anticorpos monoclonais fomentou o desenvolvimento de processos industriais para a obtenção de bioprodutos (SHUKLA e THOMMES, 2010). A maioria dos produtos biotecnológicos aprovados na década de 90 (incluindo vacinas, hormônios e fatores de crescimento) exigiam pequenas quantidades de produto purificado. Em contrapartida, as altas doses e a enorme quantidade de pacientes indicados a tratamentos com AcM exigem do mercado produções anuais de centenas de quilogramas dessas substâncias (SHUKLA *et al.*, 2007).

Uma variedade de técnicas tem sido utilizada na purificação de bioprodutos e a escolha correta do método depende do grau de pureza necessário no produto final. Anticorpos destinados a aplicações terapêuticas e diagnósticas requerem alto grau de pureza e necessitam de técnicas de purificação mais seletivas. Além disso, apesar de partilharem de semelhanças estruturais, cada molécula possui características físicoquímicas diferentes e se comporta de maneira única e imprevisível em solução, tornando impraticável o delineamento de uma plataforma única (WANG *et al.*, 2007, SHUKLA *et al.*, 2007; AYYAR *et al.*, 2012). Outro fator a ser levado em conta é o custo de cada etapa do processo, pois as etapas de purificação de anticorpos podem

representar 80% do custo total de produção (ROQUE *et al.*, 2004; FARID, 2007; ZAMOLO *et al.*, 2008).

Os processos de recuperação são usualmente divididos em três etapas: separação, purificação e polimento. A separação comumente envolve processos mecânicos, no qual técnicas não muito seletivas são adotadas para eliminar células e partículas que provocam a comatação ou entupimento das colunas cromatográficas. As etapas de polimento visam remover contaminantes em pequenas quantidades ao final do processo e, para isso, geralmente são utilizadas técnicas de exclusão por tamanho (ROQUE *et al.*, 2007; AYYAR *et al.*, 2012).

O processo de purificação engloba metodologias baseadas nas propriedades específicas físicas e químicas dos anticorpos, como tamanho, solubilidade, carga, hidrofobicidade e ligação por afinidade. Consequentemente diferentes metodologias podem ser empregadas para esse fim, incluindo precipitação, filtração, cromatografia líquida e de afinidade (ROQUE *et al.*, 2007). A cromatografia líquida é considerada indispensável por permitir a separação de biomoléculas explorando diferentes tipos de interações com as técnicas de fase reversa, troca iônica, exclusão por tamanho, interações hidrofóbicas e cromatografia de afinidade (ROQUE e LOWE, 2006; GAGNON, 2012).

As etapas de purificação geralmente se iniciam com processos de precipitação quando os anticorpos se encontram muito diluídos em solução. No campo da pesquisa, a precipitação de proteínas utilizando soluções geladas de etanol ou acetona em excesso é uma prática corriqueira, enquanto indústrias farmacêuticas evitam a adição de solventes orgânicos, optando por concentrar o produto pela adição de sais como sulfato de amônio e polietileno glicol (PEG) para a precipitação de anticorpos pelo efeito *salting-out* (ROQUE *et al.*, 2007; SHUKLA e THOMMES, 2010). É importante ressaltar que a purificação de proteínas utilizando a precipitação envolve passos adicionais difíceis de escalonar como a centrifugação, que pode ser contornada pelo emprego de filtração tangencial (WANG *et al.*, 2009; KUCZEWSKI *et al.*, 2011; ELVIN *et al.*, 2013). Além disso, apesar do elevado rendimento em recuperação de IgG, variando de 85 a 93%, a pureza alcançada em torno do 85% é considerada baixa, necessitando de etapas adicionais de purificação.

Outra técnica que vem sendo desenvolvida como alternativa à cromatografia de afinidade é a extração em duas fases aquosas (ATP) que, apesar de alcançar purezas e recuperações em torno

de 95%, a concentração final de IgG em solução é muito baixa (ROSA *et al.*, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2009a, 2009b). Outro método não cromatográfico que vem sendo utilizado é a filtração tangencial em membranas ionicamente carregadas que aliam interações eletrostáticas a exclusão por tamanho para reter contaminantes solúveis (VAN REIS e ZYDNEY, 2007; MEHTA *et al.*, 2008), mas a variabilidade entre os anticorpos e a presença de ácidos nucleicos nas amostras pode reduzir o potencial de purificação desses dispositivos.

De forma geral, a necessidade de etapas adicionais para purificação de anticorpos quando empregados métodos não cromatográficos contribui para que a escolha do método de purificação recaia sobre a cromatografia líquida (HAGE *et al.*, 2012). Industrialmente a cromatografia em leito fixo é largamente utilizada em diferentes tipos de matrizes (membranas, monólitos ou partículas porosas empacotadas em colunas), enquanto a cromatografia em leito fluidizado apresenta desvantagens econômicas devido a limitações técnicas que dificultam o escalonamento (GAGNON, 2012). Dentre as técnicas cromatográficas existentes, a cromatografia de afinidade se destaca das demais, pois a adsorção é baseada na capacidade das biomoléculas em interagir seletivamente com os ligantes imobilizados em uma matriz garantindo redução de interações não específicas, incrementando o rendimento e eliminando contaminantes indesejáveis. A adsorção ocorre de maneira eficiente mesmo quando empregada para soluções muito diluídas, tornando possível a purificação em etapa única (VERDOLIVA *et al.*, 2002; ROQUE e LOWE, 2006; AYYAR *et al.*, 2012).

2.3 Purificação de anticorpos por cromatografia de afinidade

As técnicas de afinidade exploram a interação reversível entre a proteína alvo e um ligante imobilizado à matriz cromatográfica. Graças à alta seletividade dos ligantes, essa técnica pode ser empregada no isolamento, quantificação ou estudo de interação das respectivas moléculas-alvo mesmo quando diluídas em soluções biológicas complexas (ROQUE e LOWE, 2006; HAGE *et al.*, 2012). A adsorção de anticorpos em ligantes de afinidade segue basicamente duas estratégias: a primeira explora a interação da região Fab das imunoglobulinas com antígenos específicos imobilizados, enquanto a segunda explora a interação das partes constantes e da região Fc do

anticorpo com proteínas, aminoácidos e outras moléculas específicas imobilizados à matriz (HUSE e SCHOLZ, 2002; VERDOLIVA *et al.*, 2002).

Os ligantes classificados como bioespecíficos são moléculas envolvidas naturalmente em interações biológicas como anticorpos, enzimas, proteínas transportadoras, proteínas reconhecedoras de carboidratos, hormônios, antígenos, cofatores, sequências de DNA e RNA (VIJAYALAKSHMI, 1989; ROQUE e LOWE, 2006; HAGE *et al.*, 2012). A utilização de ligantes bioespecíficos na purificação de IgG tem como principal vantagem a alta seletividade, porém a forte adsorção dos anticorpos, com constantes de dissociação (K_d) atingindo valores de 10^{-7} a 10^{-15} mol/L (VIJAYALAKSHMI, 1989), implica em forte interação entre o complexo proteína-ligante e exige condições drásticas para a eluição.

Diversos trabalhos exploram a interação desses ligantes a diferentes anticorpos. DUBOIS *et al.* (2008) empregaram microesferas magnetizadas funcionalizadas com receptores do fator de crescimento epidérmico (sEGFR) para a captura do anticorpo quimérico Erbitux, utilizado em terapias de combate ao câncer colo-retal. BOSSI *et al.* (2010) utilizaram a técnica de imunoafinidade para purificar complexos antígeno-anticorpo recombinantes de proteínas destinadas a cristalização. A técnica de imunoafinidade também foi empregada por ZHUANG e colaboradores (2008) para aprimorar o método de purificação da proteína marcadora GFP (Green Fluorescent Protein) utilizando um anticorpo monoclonal imobilizado à matriz cromatográfica, que possibilitou rendimentos de 90% e elevou o grau de pureza, com mais de 97% de homogeneidade.

Em estudo para o desenvolvimento de um novo material para confecção de suportes cromatográficos, a proteína L foi utilizada como ligante bioespecífico em microesferas poliméricas para purificação de IgG proveniente de soro humano. Os autores alcançaram elevado grau de pureza (97%) com recuperação de 76% do anticorpo (BAYRAMOGLU *et al.*, 2013). Além das aplicações preparativas, a cromatografia de afinidade com ligantes bioespecíficos pode ser empregada analiticamente em métodos rápidos para detecção simultânea de IgG, insulina e transferrina (RALLA *et al.*, 2009) e quantificação de IgG (TSCHELIESSNIGA e JUNGBAUERB, 2009) presentes em meios de cultivo celular, utilizando monólitos imobilizados com proteína G e A, respectivamente.

Os principais adsorventes de afinidade usados para a purificação de AcM utilizam as proteínas A, G ou L como ligantes (LOW *et al.*, 2007; ZAMOLO *et al.*, 2008). A proteína A

recebe destaque dentre os outros ligantes e é o método mais difundido industrialmente que utiliza adsorventes comerciais para o desenvolvimento e validação das plataformas de purificação. Alguns exemplos são apresentados nos trabalhos de GIESE *et al.* (2013) e HOLSCHUH e SCHWAMMLE (2005), que empregaram, respectivamente, a resina ProSepvA (Millipore, EUA) e as microesferas magnéticas MagPrep®Protein A (Merck, EUA).

A proteína A é secretada por linhagens de bactérias *Staphylococcus aureus* e possui diferentes graus de afinidade pela região Fc das subclasses de IgG. A proteína G é isolada de linhagens de *G Streptococcal* e também possui afinidade pela porção Fc de imunoglobulinas, diferindo da proteína A na intensidade de tais ligações. A proteína L, isolada da bactéria *Peptostreptococcus magnus*, liga-se especificamente à região variável da cadeia leve de imunoglobulinas do tipo κ , sem interferir no sítio de ligação antígeno-anticorpo e, por esta razão, é muito utilizada na purificação de fragmentos Fab e regiões Fv. Os diferentes graus de intensidade relativa das ligações entre esses ligantes de afinidade e subclasses de IgG murina estão listados na **Tabela 2-1**, na qual a quantidade de sinais positivos (+) é diretamente proporcional à intensidade das ligações de afinidade.

Tabela 2-1 Comparação da intensidade de afinidade relativa entre os ligantes bioespecíficos (proteínas A, G e L) e os diferentes isotipos de IgG de camundongo.

Isotipo	Intensidade da ligação com		
	Proteína A	Proteína G	Proteína L
IgG ₁	+	++++	++++
IgG _{2a}	++++	++++	++++
IgG _{2b}	+++	+++	++++
IgG ₃	++	+++	++++

Adaptado de: © www.sigma-aldrich.com (acessado em 08/10/2013)

Embora os ligantes bioespecíficos apresentem ótimos valores de recuperação e purificação, a sua grande limitação é a necessidade de se obter ligantes purificados em quantidades relativamente altas para imobilização à matriz. Além disso, por se tratarem de moléculas sensíveis e grandes (comumente com estrutura tridimensional e elevada massa molecular), apresentam particularidades durante sua imobilização em suportes sólidos. Esses ligantes

apresentam ainda problemas de diminuição da vida útil do adsorvente e perda de capacidade relacionados à redução da atividade biológica, devido ao desprendimento ou hidrólise dos ligantes após ciclos repetidos de utilização. A perda de atividade por hidrólise ocorre devido às condições drásticas de eluição com a redução de pH, enquanto o desprendimento dos ligantes acarreta ainda a contaminação do produto purificado, representando um problema quando as imunoglobulinas são destinadas à aplicação terapêutica, pois estes ligantes atuam como potenciais causadores de alergias. Além disso, o alto custo das resinas é um entrave para aplicação em larga escala (VIJAYALAKSHMI, 1989; ÇANAK *et al.*, 2004; ROQUE e LOWE, 2006).

Ainda assim, a proteína A é o ligante de cromatografia mais utilizado em processos de purificação de anticorpos monoclonais e, por isso, muitos estudos têm sido realizados no intuito de aprimorar a eficiência e reduzir os custos de operação. MAHAJAN e colaboradores (2012) compararam a implementação de sistemas de cromatografia semi-contínua com múltiplas colunas e pela recirculação da amostra de alimentação em uma única coluna como alternativas para a melhora de eficiência em termos de rendimento e qualidade a um sistema convencional em batelada utilizando a resina MabSelectSuReTM (GE Lifesciences, EUA). Mesmo reduzindo os custos de operação, esse sistema se mostrou impraticável por ser mais complexo, difícil de escalar e, além disso, representa mais um entrave para atender às exigências de mercado quanto à validação dessa tecnologia.

Para contornar os problemas relativos à utilização dos ligantes bioespecíficos, ligantes que não possuem interação biológica, porém que apresentam a capacidade de se ligar às proteínas por meio dos mesmos tipos de interações moleculares (hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de coordenação, ligações de hidrogênio) são utilizados e recebem a denominação de ligantes pseudo-bioespecíficos (VIJAYALAKSHMI, 1989; ROQUE e LOWE, 2006; HAGE *et al.*, 2012). Estes ligantes são moléculas menores, de fácil imobilização e baixo custo. Podem ser sintéticos como quelatos metálicos, tiofílicos e corantes, ou compostos que mimetizam os ligantes de origem biológica como peptídeos e aminoácidos, que interagem com a proteína por afinidade, sendo capazes de promover a adsorção. Estas interações são mais fracas, com constante de dissociação (K_d) na ordem de 10^{-2} a 10^{-7} mol/L (VIJAYALAKSHMI, 1989) e, por isso, exigem

condições menos drásticas para eluição, conservando a integridade dos ligantes e da molécula alvo.

2.3.1 Ligantes pseudo-bioespecíficos

Enquanto os ligantes de afinidade de origem biológica são macromoléculas frágeis, complexas, caras e difíceis de imobilizar a suportes cromatográficos, os ligantes pseudo-bioespecíficos, são moléculas menores, robustas e economicamente viáveis, que possuem a capacidade de interagir com as mesmas moléculas alvo e, portanto, são considerados potenciais substitutos aos ligantes bioespecíficos. A exemplo desta classe de ligantes destacam-se os compostos sulfonados, quelatos metálicos, peptídeos e aminoácidos para purificação de imunoglobulinas.

O uso de ligantes tiofílicos para separação de proteínas foi introduzido por Porath e colaboradores em 1985 no estudo de fracionamento de proteínas do plasma. Estruturalmente esses ligantes estáveis são lineares, com a presença de dois átomos de enxofre e, em altas concentrações salinas, promovem elevada capacidade adsortiva e especificidade para purificação de imunoglobulinas (HUTCHENS *et al.*, 1986; BELEW *et al.*, 1987). SERRES *et al.* (1995) demonstraram que partículas de sílica derivatizadas com dextrana e imobilizadas com β -mercaptoetanol formavam um suporte cromatográfico com pseudo-afinidade por IgG de camundongos que permitia não só a purificação dos anticorpos em etapa única, como também podia ser empregada na separação em alta definição de isotipos IgG₁ e IgG₃. Recentemente LIN *et al.* (2013) relataram a alta capacidade de adsorção de IgG humana ($q_{\max}=20,7$ mg IgG/g gel seco) atingida por ligantes tiofílicos de estrutura heterocíclica imobilizados em matriz magnetizada, demonstrando também que o adsorvente interagiu preferencialmente com fragmentos Fab obtidos por digestão enzimática.

A cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC), introduzida por Porath e colaboradores (1975), explora a interação entre íons metálicos e grupos doadores de elétrons presentes na superfície de proteínas. Estes metais apresentam a capacidade de ligar-se reversivelmente a proteínas por ligações de coordenação e, quando quelatados a uma matriz sólida, podem ser usados como ligantes de afinidade para purificação de biomoléculas (PORATH, 1988; WONG *et al.*, 1991; GABERC-POREKAR e MENART, 2001; ROQUE *et al.*,

2007). Os metais de transição níquel, cobre, cobalto e zinco apresentam afinidade por resíduos de aminoácidos como histidina, triptofano e cisteína, devido a interações com seus grupamentos imidazol e indol, e tiol, respectivamente (SULKOWSKI, 1989; BRESOLIN *et al.*, 2009). A presença desses resíduos de aminoácido na estrutura de imunoglobulinas faz com que estes metais sejam explorados em IMAC para purificação de anticorpos de diferentes fontes.

Diferentes materiais vêm sendo estudados a fim de se encontrar as melhores condições de cromatografia para purificação de IgG utilizando a técnica de IMAC. O trabalho de BODEN *et al.* (1995) descreve a purificação em etapa única de IgG policlonal de cabra utilizando o íon metálico Cu^{2+} quelatado à poliamina Tris-2-aminoetil-amina (TREN) covalentemente imobilizada em agarose, alcançando pureza de 95% com o método. Anos mais tarde TISHCHENKO *et al.* (2002) avaliaram o desempenho de níquel quelatado a matrizes cromatográficas morfologicamente distintas feitas de ésteres de metacrilato para purificação de IgG₁ produzida em fluido ascítico de camundongo, no qual o melhor resultado em etapa única foi alcançado com suportes porosos, recuperando 92% da imunoglobulina com 73% de pureza. SERPA *et al.* (2005), imobilizou diferentes íons metálicos em membranas de álcool poli-etileno vinílico (PEVA) para o estudo de recuperação de AcM anti-TNP obtido pela técnica de cultivo *in vitro* de hibridomas, tendo o Zn^{2+} apresentado o melhor resultado de pureza. Outro exemplo é o estudo de PRASANNA e VIJAYALAKSHMI (2010), em que anticorpos monoclonais e policlonais foram eficientemente purificados em etapa única utilizando discos de monólitos de metacrilato com Ni^{2+} imobilizado.

A investigação de novos ligantes baseados na interação de proteínas com o grupamento amino vem crescendo nos últimos anos. Nesse contexto, peptídeos e aminoácidos também demonstraram potencial de utilização para purificação de IgG. A exemplo disto, o trabalho de VERDOLIVA *et al.* (2002) apresentou como ligante de afinidade um peptídeo tetramérico que mimetiza a proteína A para purificar imunoglobulinas presentes em soro humano enquanto, em outra aplicação demonstrada por NAIK *et al.* (2011a), três ligantes hexapeptídicos diferentes que apresentavam afinidade pela porção Fc de anticorpos foram imobilizados a uma resina comercial para otimização das condições de eluição de imunoglobulinas monoclonais. A adição de sal ao tampão de adsorção proporcionou pureza e rendimento de 94% e 85%, respectivamente, e capacidade dinâmica de adsorção de 20 mg/mL (comparáveis à performance de géis de proteína G imobilizada).

Tendo aminoácidos como a histidina demonstrado afinidade por proteínas, diferentes estudos foram conduzidos no intuito de aplicar este conceito à purificação de anticorpos. Foi demonstrado por EL-KAK e VIJAYALAKSHMI (1991) que a especificidade de adsorção de uma proteína em histidina imobilizada depende não somente das condições cromatográficas como pH, temperatura e força iônica, mas também da orientação da molécula acoplada à matriz e a exposição de seus grupamentos funcionais, fatores intimamente relacionados à interação com as moléculas alvo e, conseqüentemente, à capacidade dinâmica da matriz. A histidina, quando imobilizada em gel de aminohexil-Sepharose via seu grupamento carboxila (deixando livre seu grupamento amino e anel de imidazol), apresentou potencial de aplicação em cromatografias negativas para a recuperação de IgG nas frações não adsorvidas (PITIOT *et al.*, 2001b). Quando imobilizada via grupamento amina (deixando livre além do anel imidazol o grupamento carboxila) em membrana de PEVA ativada com grupos epóxi, o aminoácido promoveu a adsorção de IgG pela porção Fab de sua estrutura (HAUPT *et al.*, 1995).

A interação de IgG com outros aminoácidos imobilizados como ligantes de afinidade foi extensivamente estudada. Aminoácidos hidrofóbicos como o triptofano e fenilalanina foram imobilizados em diferentes materiais e empregados como ligantes hidrofóbicos para interagir com os sítios apolares de IgG, promovendo, assim, sua purificação a partir de plasma (KIM *et al.*, 1991; SUN *et al.*, 2006) ou sobrenadante de cultivo celular (NAIK *et al.*, 2011b). Aminoácidos básicos como a arginina ainda não tiveram seu mecanismo de interação com IgG completamente elucidado, mas pode-se afirmar que existem interações eletrostáticas, uma vez que o aumento da concentração salina no tampão de adsorção promoveu um decréscimo na capacidade adsorptiva do ligante imobilizado (BAYRAMOGLU *et al.*, 2007).

A natureza do sistema tamponante, o valor de pH empregado e a concentração salina do meio são parâmetros de extrema importância para se determinar a capacidade adsorptiva de uma molécula alvo em um ligante. Diferentes valores de pH podem afetar não só o estado de protonação do ligante, como também o balanço e distribuição de cargas em proteínas, influenciando a força de ligação entre os grupos funcionais do adsorvente e a molécula alvo. Ligantes de aminoácido com características de trocadores iônicos como a L-lisina e L-histidina também foram aplicados com sucesso na recuperação de anticorpos a partir de misturas complexas de proteínas. Gel de agarose derivatizado com poli-L-lisina recuperou 79% de IgG a

partir do soro humano, com 88,7% de pureza quando operada em solução tampão Bis-Tris a pH 6,0 (BRESOLIN *et al.*, 2011). O ligante de L-histidina foi comparado à proteína G por BAYRAMOGLU e colaboradores (2013) quanto á pureza e seletividade, demonstrando que a capacidade máxima de adsorção foi alcançada em pH 5,5 e, além disso, quando operado de forma continua seu desempenho aumentou 16% em em relação ao processo em batelada.

2.3.2 Orto-fosfoserina (OPS) como ligante pseudo-bioespecífico

Diferentes aminoácidos foram avaliados quanto ao potencial de aplicação em cromatografias para purificação de anticorpos. Neste contexto, OPS foi pouco investigado como ligante pseudo-bioespecífico (BRESOLIN e BUENO, 2012). Estruturalmente, este ligante é um éster composto por serina e ácido fosfórico, conforme ilustrado na **Figura 2-3**.

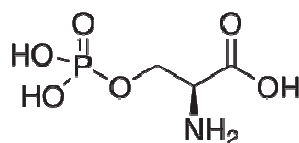


Figura 2-3 Estrutura molecular do ligante OPS (www.sigmaldrich.com/catalog/product/sigma/p0878?lang=pt®ion=BR acessado em 08/10/2013).

O OPS é um importante componente constitutivo de membranas biológicas, onde atua como mediador no transporte iônico. Este aminoácido é encontrado também em proteínas como a caseína, onde desempenha o importante papel de quelatador de íons metálicos, em específico, o Ca^{2+} . Dependendo de seu estado de ionização, o orto-fosfoserina forma complexos de coordenação com o íon metálico não só pelos átomos de oxigênio presentes em seus grupamentos fosfato e carboxila, mas também com o nitrogênio da porção amina, atuando como agente quelante tridentado, tal qual o ácido iminodiacético (IDA), agente quelante mais utilizado em IMAC (ZACHARIOU *et al.*, 1993; KARAS, 2010).

A técnica de IMAC com íons Fe^{3+} imobilizados em OPS permitiu a separação de fosfoproteínas não apenas devido a interações ocorridas entre o íon metálico quelatado e o oxigênio de grupamentos fosfato dos resíduos de fosfoserina, mas também devido a interações ocorridas com os grupamentos carboxílicos e fenol presentes nessas proteínas (MUSZYNSKA *et*

al., 1992). Baseado em sua habilidade natural em quelatar íons metálicos, o aminoácido OPS foi investigado quanto ao potencial em se tornar um novo agente quelante em IMAC, introduzindo assim uma geometria de coordenação alternativa ao IDA (ZACHARIOU *et al.*, 1993).

Ácidos duros de Lewis como Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{2+} e Yb^{3+} ou intermediários como o Cu^{2+} foram quelatados ao OPS imobilizado em matrizes ativadas com composto epóxi para estudo de interação com proteínas (ZACHARIOU e HEARN, 2000; KARAS, 2010). Foi observado que quando tampões de baixa força iônica foram empregados, o adsorvente se comportou como pseudo-cátion assumindo características de trocadores aniônicos ao adsorver proteínas negativamente carregadas, porém, contrariamente ao esperado, o aumento do valor de pH nessas condições não promoveu a dessorção proteica.

A presença de grupamentos negativamente carregados em sua estrutura (fosfato e carboxila) permite que o OPS seja explorado como um ligante de adsorção para moléculas positivamente carregadas através de interações eletrostáticas. Bresolin e Bueno (2012) avaliaram o ligante imobilizado em matriz de agarose ativada com brometo de cianogênio (CNBr) quanto à sua seletividade e capacidade adsortiva de IgG humana de origem sérica, mas não foram encontrados estudos na literatura investigando o potencial de utilização deste ligante para purificação de anticorpos monoclonais obtidos pelo cultivo de hibridomas.

O estudo de orto-fosfoserina (OPS) quanto ao seu potencial de utilização como agente quelante para os íons metálicos intermediários (segundo a classificação de Lewis) Cu^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} visando a purificação de proteínas do soro humano, foi conduzido com este agente quelante imobilizado em géis de agarose ativados com grupo epóxi e CNBr, respectivamente (ZACHARIOU e HEARN, 2000; BRESOLIN, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

Gel de agarose ativado com CNBr com orto-fosfo-L-serina imobilizado (agarose-CNBr-OPS, densidade de ligantes de 5 a 15 $\mu\text{mol/mL}$), gel de agarose com proteína G imobilizado (protein G-Sepharose 4B Fast Flow), papaína, glicina, Comassie brilliant blue R-250, ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico (MOPS), albumina de soro bovino (BSA 98% pureza) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Para eletroforese utilizou-se marcador de imunoglobulina G (IgG) 150 kDa, preparado a partir de IgG humana obtida da Aventis Behring (Alemanha). Acrilamida, bisacrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS) e TEMED (N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina) foram obtidos da Bio-Rad (EUA). Carbonato de sódio, sulfato de amônio, formaldeído e hidroximetil-aminometano (Tris) foram obtidos da Merck (Alemanha). Coluna de dessalinização PD-10, gel de agarose (Sepharose-4B), azul de bromofenol, persulfato de amônio, glicerol, kit de marcadores de alta massa molecular para eletroforese, ditiotrietol foram adquiridos da GE Healthcare (EUA). A caracterização do anticorpo foi confirmada com o kit de isotipagem ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit II, da Pierce (EUA). Ácido clorídrico, ácido acético, ácido cítrico, hidróxido de sódio, fosfato de sódio monobásico e dibásico, metanol, etanol e glutaraldeído foram obtidos da Synth (Brasil). Ácido orto-fosfórico foi adquirido da Vetec (Brasil). Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico e utilizou-se água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) para o preparo de todas as soluções.

3.1.2 Anticorpos monoclonais

A linhagem de hibridoma WT 5B6H3G10 (TAMASHIRO, 1988) secretora de imunoglobulinas monoclonais isotipo IgG_{2a} anti-*Trypanosoma cruzi* estava criopreservada em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunologia Celular e Inflamação, do Instituto de Biologia da UNICAMP.

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo de hibridoma secretor de anticorpo monoclonal IgG_{2a} anti-*Trypanosoma cruzi*

As etapas de produção e caracterização ds AcM IgG_{2a} anti-*T. cruzi* foram realizadas no Laboratório de Imunologia Celular e Inflamação, do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob a coordenação da Profa. Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro.

Um *vial* contendo 1,0 mL de células do banco WT 5B6H3G10 com densidade de $1,5 \cdot 10^6$ células/mL foi retirado de nitrogênio líquido e imediatamente transferido para banho termo estatizado a 37 °C para descongelado rápido e, em seguida, foi mergulhado em banho de gelo por aproximadamente 3,0 min. As células foram transferidas em condições estéreis para um tubo de centrifuga contendo 5,0 mL de meio de cultura completo fresco, sofrendo suave homogeneização. O material foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 min a 4,0 °C e o sobrenadante obtido foi descartado para remover o agente criopreservador.

Ao precipitado de células foram adicionados 4,0 mL de meio de cultivo completo para a ressuspensão dos hibridomas homogeneizando cuidadosamente. A suspensão foi transferida para placas de cultura e incubada a 37 °C em estufa incubadora com suprimento de CO₂ a 5,0%. Ao atingirem cerca de 70% de confluência, os hibridomas foram repicados para expansão do cultivo e transferidos para garrafas de cultura com áreas superficiais maiores, adaptando assim as células para o cultivo em garrafas de Roux. Os sobrenadantes coletados foram centrifugados para a remoção de células, agrupados e armazenados na forma de *pool* a 4,0 °C.

Como controle, a presença de IgG murina secretada no sobreadante de cultura celular foi confirmada por ensaio de imunoprecipitação (segundo Ouchterlony, 1958), enquanto o isotipo e a cadeia leve do anticorpo foram identificados por um kit de detecção de IgG (Pierce, EUA).

3.2.2 Precipitação de proteínas para concentração e estocagem do material de trabalho

Os diferentes *pools* de sobrenadante livres de células foram homogeneizados (totalizando 1,55 L) e filtrados em membranas de celulose com 0,22 µm de poro (Millipore, EUA) para a remoção de células e partículas. Na sequência, as proteínas presentes no sobrenadante foram

precipitadas a 50% de saturação de sulfato de amônio seguido de diálise, conforme o procedimento apresentado por EL-KAK e VIJAYALAKSHMI (1991).

A solução saturada de sulfato de amônio foi obtida pela solubilização com aquecimento de 1,4 kg do sal em 2,0 L de água Milli-Q. Após resfriamento, observou-se a formação de cristais depositados no fundo do recipiente da solução. Frações de 500 mL dessa solução foram gotejadas (a 4,0 °C e sob agitação branda constante) em alíquotas de igual volume do *pool* de sobrenadante para que se atingisse 50% de saturação de sulfato de amônio. A agitação foi mantida por 16 h e, após este período, o material foi centrifugado a 10000 g por 15 min. A porção líquida foi descartada e o precipitado resultante foi ressuscitado em 25 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. A solução proteica obtida foi dialisada em membranas de celulose regenerada com tamanho nominal de corte de 12 a 16 kDa (Interlab, Brasil), contra aproximadamente 3,0 L do tampão Tris-HCl trocado três vezes. A etapa de diálise foi conduzida a 4,0 °C, sob agitação constante, durante 30 h (até que o monitoramento da condutividade do tampão de diálise apresentasse o mesmo valor de condutividade do tampão recém preparado).

As soluções de sobrenadante dialisado (Sbt-d) foram agrupadas em *pool* e homogeneizadas antes de serem acondicionadas em tubos plásticos em alíquotas de 5,0 mL para congelamento e estocagem a -20 °C. Antes de serem utilizadas em alguns experimentos cromatográficos, as alíquotas de Sbt-d foram descongeladas e dessalinizadas em coluna PD-10 Sephadex G 25, de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante (GE Healthcare, EUA), utilizando o mesmo tampão da etapa de equilíbrio da cromatografia.

3.2.3 Ativação do gel de agarose com bisoxirano

A inserção de grupos epóxi (oxirana) para a ativação do gel de agarose Sepharose-4B foi realizada conforme HERMANSON e colaboradores (1992). Sendo assim, 50 mL de gel sedimentado agarose 4B foram lavados em um funil de vidro sinterizado, com 1,0 L de água destilada, e transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL onde foram adicionados 40 mL de uma solução de NaOH 0,6 mol/L contendo 75 mg de borohidreto de sódio. Em seguida, foram adicionados lentamente 40 mL de 1,4 butanodiol diglicidil éter (bisoxirano) à mistura, que foi incubada em capela de exaustão à temperatura ambiente, sob agitação constante durante 10 horas.

Terminado o tempo de reação, o gel foi lavado com água destilada até que o filme oleoso fosse removido, garantindo assim a eliminação do bisoxirano das partículas de gel. Após esta lavagem o gel foi armazenado em solução de NaCl 1,0 mol/L a 4,0 °C.

O ligante orto-fosfo-L-serina foi imobilizado à matriz ativada de acordo com o protocolo descrito por ZACHARIOU e colaboradores (1993). O gel foi lavado com pelo menos 20 volumes de água Milli-Q e, para 10 mL de gel foram adicionados 10 mL de uma solução a 200 mmol/L do ligante. Esta suspensão ficou sob agitação a temperatura constante a 60 °C durante 24 horas. Ao final da reação, o gel foi lavado com 10 volumes de água Milli-Q, seguidos de 5 volumes de uma solução de ácido acético 50 mmol/L pH 4,0 e, para finalizar, foi lavado novamente com mais 10 volumes de água Milli-Q. O gel obtido, denominado agarose-Bis-OPS, foi suspenso em solução de etanol 20% e armazenado a 4,0 °C até o uso.

3.2.4 Experimentos cromatográficos

Todos os experimentos cromatográficos foram realizados a temperatura ambiente, utilizando um sistema de cromatografia de baixa pressão automatizado (BioRad, EUA) com monitoramento de UV a 280 nm por um medidor de absorvância. A corrente de saída foi coletada em frações pelo coletor de frações acoplado ao sistema, conforme ilustrado na **Figura 3-1**.

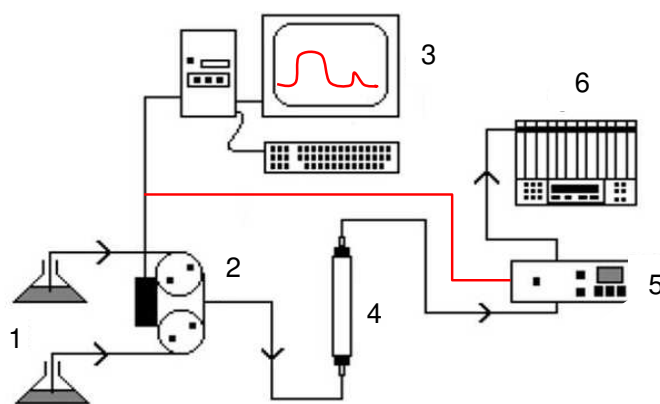


Figura 3-1 Esquema do sistema cromatográfico de baixa pressão utilizado nos experimentos. 1) reservatórios de solução; 2) bombas peristálticas; 3) computador; 4) coluna cromatográfica; 5) monitor de medida de absorvância a 280 nm; 6) coletor de frações (adaptado de BRESOLIN, 2006).

a) Experimentos cromatográficos em colunas contendo o gel agarose – OPS

As cromatografias foram realizadas para que fossem determinados os perfis de eluição da proteína de interesse nos sistemas tamponantes de baixa força iônica: Tris-HCl, fosfato do sódio e MOPS a 50 mmol/L, em diferentes valores de pH. Foi avaliado também o perfil de eluição do anticorpo pela técnica de IMAC, onde o ligante OPS foi empregado como agente quelante para o íon metálico Ni²⁺. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente e em duplicata.

Uma coluna cromatográfica com 10 mm de diâmetro interno, modelo C 10/10 (GE Healthcare, EUA) foi empacotada com 1,0 mL do gel agarose-OPS e acoplada ao cromatógrafo de baixa pressão. A corrente de saída foi monitorada a 280 nm por um medidor de absorvância e coletada em frações de 1,0 mL.

Para experimentos realizados sem o íon metálico níquel imobilizado, a coluna foi equilibrada com pelo menos 10 mL dos tampões de adsorção avaliados e alimentada com 4,0 mL do sobrenadante precipitado e dialisado devidamente dessalinizado para o experimento e com concentração ajustada para 5,0 mg/mL, totalizando 20 mg de proteínas totais nas amostras de injeção. Na sequência, a coluna foi lavada com pelo menos 10 volumes de coluna com o tampão de equilíbrio, até que não fosse mais detectada a presença de proteína nas frações coletadas. A eluição foi realizada com adição de 1,0 mol/L de NaCl aos tampões de adsorção. Durante todo o experimento a vazão foi mantida a 0,5 mL/min e a corrente de saída foi coletada em frações de 1,0 mL, que foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976). Após a quantificação para determinar o balanço de massa dos ensaios, as frações de cada etapa foram agrupadas para análise por eletroforese SDS-PAGE. Ao término de cada experimento a coluna foi regenerada com solução de NaOH 50 mmol/L.

O experimento de IMAC foi conduzido a temperatura ambiente, utilizando o mesmo sistema de cromatografia BioRad (EUA), na vazão 0,5 mL/min com a coluna modelo C 10/10 (GE Healthcare, EUA) devidamente empacotada com 1,0 mL do gel de agarose-CNBr-OPS (Sigma, EUA). A coluna foi saturada com solução de sulfato de níquel 50 mmol/L e, em seguida, lavada sequencialmente com no mínimo 15 mL de água Milli-Q e 15 mL do tampão de eluição na condição mais drástica (Tris-HCl 700 mmol/L pH 7,0) visando a remoção dos íons metálicos fracamente adsorvidos na matriz. O sistema foi então equilibrado com o tampão de adsorção Tris-

HCl 50 mmol/L pH 7,0 e alimentado com 10 mg de proteínas totais do sobrenadante de cultura precipitado e dialisado, na concentração 5,0 mg/mL. A lavagem da coluna foi feita com o mesmo tampão de adsorção e as etapas de eluição foram realizadas em gradiente em degrau com aumento na concentração de Tris-HCl: 100, 300, 500 e 700 mmol/L em pH 7,0. Na sequência, a coluna foi regenerada com solução de EDTA 50 mmol/L pH 6,5. A corrente de saída foi coletada durante todo o experimento em frações de 1,0 mL com monitoramento a 280 nm e quantificadas pelo método de BRADFORD (1976). O *pool* das frações referentes aos picos obtidos foi analisado por eletroforese SDS-PAGE.

Após o término de cada experimento, a coluna foi lavada com pelo menos 10 volumes de água Milli-Q, seguida de etanol 20% para armazenamento.

b) Experimentos cromatográficos em colunas contendo gel de proteína G – Sepharose

Os experimentos cromatográficos em proteína G-Sepharose foram realizados para purificar a imunoglobulina monoclonal diretamente do sobrenadante de cultivo celular, a fim de se obter o anticorpo livre de impurezas para a realização dos ensaios de determinação do ponto isoelétrico, curva de ruptura e cinética de adsorção.

Uma coluna cromatográfica modelo cm 10 mm de diâmetro interno modelo C 10/20 (GE Healthcare, EUA) foi empacotada com 5,0 mL de gel protein G Sepharose 4 Fast Flow (Sigma, EUA) e acoplada ao sistema de cromatografia de baixa pressão (BioRad, EUA). A vazão do sistema durante todo o processo foi de 0,1 mL/min e a corrente de saída foi monitorada a 280 nm.

O tampão de adsorção utilizado para o equilíbrio e a etapa de lavagem da coluna foi o tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 8,5. A coluna foi equilibrada com cerca de 50 mL deste tampão e alimentada com alíquotas de 250 mL de sobrenadante não precipitado com sulfato de amônio contendo anticorpos monoclonais IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em meio de cultura DMEM. A etapa de lavagem foi conduzida com pelo menos 75 mL do tampão até que não se fosse mais detectada saída de proteínas. Para a etapa de eluição foi utilizado o tampão glicina-HCl 100 mmol/L pH 2,8 na mesma vazão utilizada na etapa de lavagem e a corrente de saída foi coletada em frações de 2,0 mL em tubos de ensaio contendo 100 µL de Tris-HCl 1,0 mol/L a pH 8,0 (quantidade suficiente para neutralizar o pH, evitando a desnaturação da IgG purificada).

As frações purificadas eluidas de cromatografias sucessivas foram agrupadas, dessalinizadas em colunas PD-10 Sephadex G 25 conforme recomendado pela GE Healthcare (EUA) utilizando-se tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e foram concentradas por ultrafiltração em membrana de celulose regenerada de 10 kDa de diâmetro de corte (Millipore, EUA).

Ao término de cada processo de purificação a coluna foi lavada novamente com pelo menos 10 volumes de coluna do tampão de equilíbrio para neutralizar o pH do gel. Para o armazenamento, ela foi lavada exaustivamente com água Milli-Q, seguida de solução de etanol 20% e acondicionada a 4,0 °C, conforme recomendação do fabricante.

3.2.5 Determinação da curva de ruptura

O experimento de curva de ruptura de AcM anti-*T. cruzi* em agarose-CNBr-OPS foi realizado em temperatura ambiente com o sistema tamponante Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Uma coluna cromatográfica modelo com 10 mm de diâmetro interno modelo C 10/20 (GE Healthcare, EUA) empacotada com 1,0 mL de gel agarose-OPS (Sigma, EUA) foi acoplada ao sistema de cromatografia de baixa pressão (BioRad, EUA) e alimentada frontalmente com vazão constante de 0,5 mL/min e concentração C_0 igual a 200 µg/mL de AcM anti-*T. cruzi* previamente purificados em proteína G-Sepharose. As medidas de absorbância da solução inicial de alimentação e das frações de 1,0 mL coletadas ao longo do ensaio foram determinadas a 280 nm em espectrofotômetro de UV-visível (Beckman DU 650, EUA) e transformadas em dados de concentração pela divisão de cada medida pelo fator 1,4.

A alimentação da coluna foi interrompida assim que a absorbância a 280 nm da corrente efluente se manteve invariável após atingir o ponto de saturação do sistema, com concentração muito próxima à da amostra de alimentação. A coluna foi lavada exaustivamente com o tampão de adsorção Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 até que a absorbância das frações coletadas fossem estabilizadas próximas a zero, a fim de se eliminar as proteínas fracamente adsorvidas. Por fim, as imunoglobulinas adsorvidas foram eluidas com o tampão de dessorção Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 7,0 para recuperar as proteínas adsorvidas e determinar a capacidade dinâmica de adsorção da coluna. Após o fim da eluição, a coluna foi regenerada com solução de NaOH 25 mmol/L, lavada com água Milli-Q e armazenada em solução de etanol 20%.

3.2.6 Métodos analíticos

3.2.6.1 Quantificação de Ni²⁺ quelatado ao gel cromatográfico

A coluna cromatográfica modelo C 10/10 (GE Healthcare, EUA), devidamente empacotada com 1,0 mL do gel de agarose-CNBr-OPS (Sigma, EUA) e quelatada com o íon metálico Ni²⁺ para a realização dos ensaios de IMAC, conforme descrito na sessão 3.2.4a deste trabalho, foi regenerada com 10 mL da solução de EDTA 50 mmol/L pH 6,5. A amostra de regeneração coletada foi avaliada em espectrofotômetro de absorção atômica modelo Analyst 100 (Perkin Elmer, EUA) pelo Laboratório de Engenharia Ambiental (Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP-Campinas), sob a coordenação da Profa. Dra. Meuris Gurgel Carlos da Silva.

3.2.6.2 Dosagem de proteína total

A concentração de proteínas totais nas frações cromatográficas foi determinada de acordo com a metodologia para microensaio descrita por Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína de referência. As soluções com IgG_{2a} purificada, utilizadas para os ensaios de curva de ruptura e cinética de adsorção, foram quantificadas a 280 nm em espectrofotômetro (DU-650 - Beckman, EUA) com coeficiente de extinção 1,4.

3.2.6.3 Eletroforese SDS-PAGE

As frações proteicas foram qualitativamente analisadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutora (SDS-PAGE) no intuito de avaliar sua pureza. As análises foram realizadas no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida na concentração de 7,5%, conforme protocolo apresentado por LAEMMLI (1970). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos e aplicadas aos géis em alíquotas de 10 µL. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 150 V, em cubas verticais e a coloração foi realizada com nitrato de prata, de acordo com MORRISSEY (1981).

Os géis revelados foram escaneados em densitômetro modelo GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, EUA) e a quantificação das bandas foi feita pelo software Quantity One[®] 1-D Analysis Software (BioRad, EUA).

3.2.6.4 Determinação do ponto isoelétrico (pI)

A determinação do ponto isoelétrico do anticorpo IgG_{2a} anti-*Trypanosoma cruzi* foi realizada por eletroforese de focalização isoelétrica (*isoelectric focusing* - IEF). A IEF é uma

técnica de eletroforese baseada na separação de moléculas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI). Uma solução da proteína purificada é aplicada sobre um gel de acrilamida que apresenta um gradiente contínuo de pH. A este gel é aplicado um campo elétrico que promove o deslocamento da proteína até a região de pH que corresponde ao seu pI.

Para este procedimento foram utilizados o sistema PhastSystem (Pharmacia, Suécia), géis de acrilamida PhastGel IEF 3-9 e marcadores de pI (GE-Healthcare, EUA) de acordo com o método descrito pelo fabricante. A coloração do gel foi feita utilizando nitrato de prata, seguindo as instruções especificadas em protocolo fornecido pelo fabricante.

3.2.6.5 Caracterização do AcM por Western blotting

As frações obtidas na melhor condição cromatográfica foram separadas por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7,5% e transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad, EUA) em tampão Tris-HCl 25 mmol/L, glicina 192 mmol/L e etanol 20% (v/v). O ensaio foi realizado no sistema de transferência Mini Transblotting (BioRad, EUA) aplicando-se voltagem de 100 V durante 1,0 h, conforme protocolo descrito por TOWBIN e colaboradores (1979). O sucesso da etapa de transferência foi confirmado pela presença do marcador de massa molecular pré-corado Full Range Rainbow (GE-Healthcare, EUA) na membrana de nitrocelulose. Esta foi então incubada em solução salina de fosfato de sódio (PBS) 20 mmol/L, contendo 5,0% de leite em pó desnatado Molico (Nestlé, Brasil) e 0,1% de Tween-20. A membrana foi lavada três vezes com tampão PBS 20 mmol/L, Tween-20 0,01% e, na sequência, foi incubada em tampão PBS 20 mmol/L, Molico 0,2% contendo o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma, EUA) diluído na proporção 1/5000 por 1,0 h. Em seguida a solução foi descartada e a membrana foi lavada novamente três vezes com tampão PBS 20 mmol/L, Tween-20 0,01%. Para revelação, adicionou-se solução de substrato (1,0 mL de diaminobenzina 6,0 mmol/L, 5 µL de H₂O₂ 30% e 9,0 mL de Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,4). A reação foi interrompida pela lavagem da membrana com água Milli-Q.

3.2.6.6 Quantificação de IgG_{2a} por ELISA

O balanço de massa dos dados experimentais da melhor condição cromatográfica encontrada foi realizado também por um teste imunológico para determinação do grau de pureza do anticorpo monoclonal e do fator de purificação. O ensaio foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Inflamação, do Instituto de Biologia da UNICAMP sob a coordenação

da Profa. Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro, seguindo o protocolo e reagentes gentilmente fornecidos pela Profa. Dra. Elizabeth de Fátima Pires Augusto, do Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT/SP.

Placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços foram sensibilizadas pela adição de 50 μL /poço de anti-IgG de camundongo produzido em coelho (Sigma M-7023, EUA) na concentração de 2,0 $\mu\text{g/mL}$, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 50 mmol/L, pH 9,2. A placa foi incubada durante 1,0 h a 37 °C e posteriormente a 4,0 °C por mais 18 h. Em seguida, o material foi lavado manualmente quatro vezes com solução salina de fosfato de sódio (PBS) 20 mmol/L, pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20.

Na sequência foram adicionados 200 μL /poço de tampão de bloqueio (PBS 20 mmol/L, pH 7,2 contendo 5,0% de soro bovino) para bloquear os sítios remanescentes de ligação na placa e incubou-se a mesma novamente a 37 °C por 1,0 h. Procedeu-se então com a etapa de lavagem conforme já descrito e, logo depois, 50 μL /poço das amostras a serem quantificadas e das de padrão de IgG de camundongo (Sigma M-5284, EUA) da curva de calibração foram aplicadas em duplicata diluídas na faixa concentração de 1,56 a 200 ng/mL em tampão PBS 20 mmol/L, pH 7,2. A placa foi incubada novamente a 37 °C por mais 1,0 h e lavada na sequência.

Para a etapa de reação com o conjugado, o anticorpo anti-IgG de camundongo produzido em carneiro conjugado com peroxidase (Sigma A-5906, EUA) foi diluído 2000 vezes em tampão de diluição (PBS 20 mmol/L, pH 7,2) e aplicado 50 μL /poço. Após incubação de 1,0 h em estufa a 37 °C, realizou-se mais uma etapa de lavagem antes da aplicação do cromógeno. Foram adicionados 50 μL /poço do substrato orto-fenilenodiamina dihidroclorido (OPD - Sigma, EUA P-6787) 0,4 mg/mL preparado em tampão citrato-fosfato 50 mmol/L, pH 5,0 com adição de peróxido de hidrogênio 0,03%. A reação de revelação ocorreu pela incubação por 30 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e foi interrompida pela adição de 25 μL /poço de uma solução de ácido sulfúrico 4,0 N. A medida das absorbâncias foi realizada imediatamente após a interrupção da reação, em leitor de placas (Labsystem, Finlândia) com o comprimento de onda de 492 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão apresentados neste capítulo referem-se à caracterização e produção de anticorpos monoclonais IgG_{2a} anti-*T. cruzi*, em meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino, e ao estudo do ligante OPS imobilizado em gel de agarose como estratégia para purificação desse anticorpo livre de impurezas a partir de sobrenadante de cultivo de hibridomas concentrado por precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise.

Como o resultado com o quelatos OPS-Ni²⁺ se mostrou seletivo para purificação de IgG atingindo mais de 90% de pureza (BRESOLIN, 2010), optou-se por avaliar a seletividade do íon níquel para purificação de IgG_{2a} de uma mistura complexa de proteínas como o sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado.

4.1 Anticorpo monoclonal isotipo IgG_{2a} anti-*T. cruzi*

4.1.1 Determinação do ponto isoelétrico

Após o descongelamento da linhagem de hibridomas WT 5B6H3G10 e expansão por cultivo *in vitro*, foi necessário confirmar a manutenção do caráter secretor de anticorpos isotipo IgG_{2a} (anti-*T. cruzi*) por estas células. A secreção de imunoglobulinas foi confirmada por teste de imunoprecipitação com a técnica de dupla difusão (Ouchterlony, 1958).

O isotipo e a cadeia leve presente no anticorpo secretado foram determinados por um kit de caracterização de AcM (Pierce, EUA), que confirmou a molécula murina como sendo IgG_{2a}, bem como sua cadeia leve tipo κ . Além disso, uma alíquota de Sbt-d foi purificada por afinidade em gel de proteína G-Sepharose para se obter o AcM livre de qualquer impureza para complementar sua caracterização determinando o ponto isoelétrico (pI) da proteína por eletroforese de focalização isoelétrica (IEF).

O resultado da IEF apresentado pela **Figura 4-1** revela que o pI da IgG_{2a} obtida possui valor maior que 7,35 e menor que 8,15 e, sendo assim, para valores de pH abaixo de seu pI ela se apresenta positivamente carregada, enquanto em valores de pH acima ou equivalentes do pI este anticorpo apresenta o balanço de cargas negativo ou próximo a neutralidade, respectivamente. A IEF revelou também a presença de uma banda fraca na altura de pI 9,3 que deve ser atribuída a

provável presença de fragmentos da IgG_{2a} resultantes da manipulação da amostra, uma vez que anticorpos monoclonais são bastantes sensíveis e frágeis.

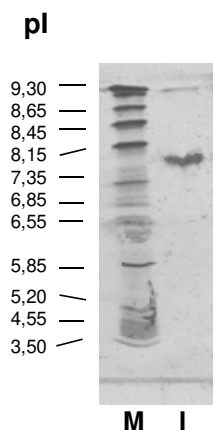


Figura 4-1 Gel de eletroforese de Focalização Isoelétrica (IEF) para determinação do ponto isoelétrico (pI) do AcM IgG_{2a} anti-*T. cruzi* purificado por cromatografia em gel de proteína G-Sepharose. M- Marcador de ponto isoelétrico, I- Amostra de imunoglobulina monoclonal IgG_{2a} purificada.

4.1.2 Preparo do sobrenadante de cultura celular para as etapas cromatográficas

Além do anticorpo monoclonal IgG_{2a} estar em baixa concentração, o sobrenadante de cultura celular apresentava impurezas provenientes do soro fetal bovino e suplementos utilizados no meio de cultura. A precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise promoveu o aumento da concentração do AcM em solução contudo, apesar do procedimento ter removido parte das proteínas de baixa massa molecular, as demais impurezas não foram totalmente removidas, sendo a albumina de soro bovino (BSA), o constituinte em maior abundância, com massa molecular em torno de 66 kDa, conforme revela a eletroforese apresentada pela **Figura 4-2**.

As amostras analisadas pela eletroforese foram também quantificadas por ELISA, revelando que as concentrações de anticorpo murino no *pool* de sobrenadantes coletados eram de aproximadamente 50 µg/mL, valor compatível com o método de cultivo convencional adotado para produção do AcM em escala laboratorial (TREBAK *et al.*, 1995). Após a precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise, a concentração de anticorpos de camundongo aumentou para cerca de 700 µg/mL, ou seja, a produção de 1,5 L de sobrenadante de cultura de hibridomas

foi de aproximadamente 70 mg de IgG_{2a} anti-*T. cruzi*. Os resultados obtidos pela quantificação do AcM pelo método de ELISA estão apresentados no balanço de massa da **Tabela 4-1**.

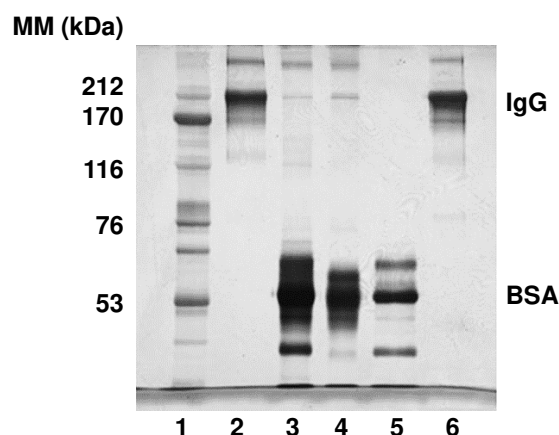


Figura 4-2 Perfil eletroforético de amostras do sobrenadante de cultivo de hibridomas secretores de IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em diferentes etapas do processo de precipitação com sulfato de amônio a 50% de saturação, seguida de diálise. MM- Massa molecular (kDa), 1- Padrão de alta massa molecular (cód.17-0615-01, GE), 2- Marcador de IgG (Aventis), 3- Sobrenadante de cultura celular antes da precipitação, 4- Sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado, 5- Proteínas não precipitadas, 6- Anticorpo monoclonal IgG_{2a} purificado por cromatografia em gel de proteína G-Sepharose.

Tabela 4-1 Balanço de massa da etapa de concentração por precipitação de IgG_{2a} proveniente do sobrenadante de cultivo de hibridoma secretor do AcM anti-*T. cruzi*.

Frações	Sobrenadante	<i>pool</i> precipitado e dialisado
Volume (mL)	1550	98,5
IgG _{2a} (µg/mL) ^a	48,6	708,3
AcM total (mg) ^b	75,3	69,8

^a Concentração relativa à massa de IgG_{2a} quantificada pelo método de ELISA

^b Quantidade de IgG_{2a} total determinada pelo método de ELISA

4.2 Purificação do anticorpo anti-*T. cruzi*

4.2.1 Purificação do anticorpo anti-*T. cruzi* por IMAC

O desempenho de adsorventes em cromatografia depende tanto de aspectos referentes ao adsorvente (características químicas, dimensões e porosidade da matriz; natureza do ligante;

presença, comprimento e estrutura química de uma molécula espaçadora) quanto de aspectos operacionais (composição da amostra de alimentação, natureza do sistema tamponante, concentração salina, pH, presença de interferentes e contaminantes, fluxo, força iônica).

De acordo com Bresolin (2010), o quelato OPS-Ni²⁺, em tampão de adsorção com baixa força iônica, apresentou seletividade para purificação de IgG humana, obtendo pureza acima de 90%. Tendo como base este resultado, avaliou-se o desempenho do quelato OPS-Ni²⁺ na condição tamponante de baixa força iônica para purificar IgG_{2a} monoclonal de uma mistura complexa de proteínas como o sobrenadante de cultura celular. O sistema tamponante escolhido foi Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, adotando-se como estratégia de eluição gradiente degrau de aumento da concentração de Tris como agente competidor. A **Figura 4-3** e a **Tabela 4-2** demonstram, respectivamente, o perfil de eluição do anticorpo e o balanço de massa do resultado obtido.

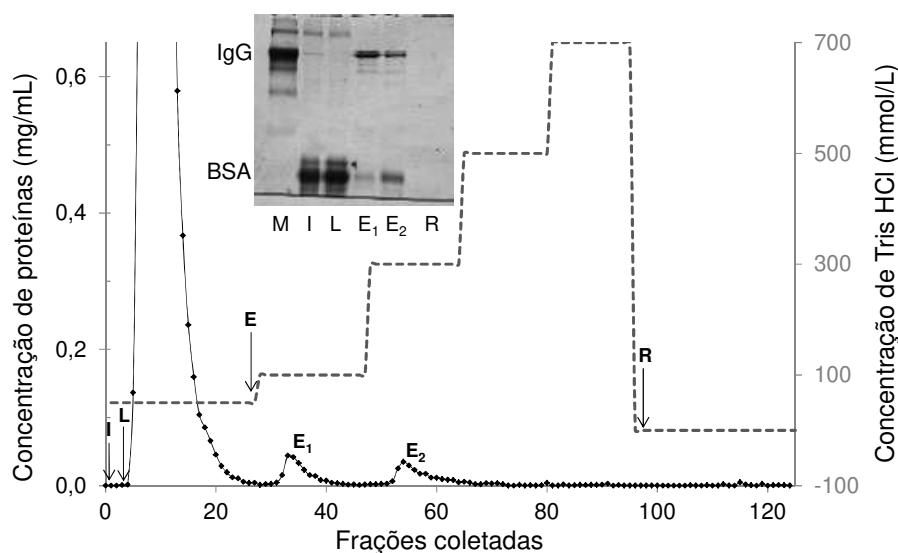


Figura 4-3 Cromatografia do sobrenadante de cultura de hibridoma secretor de AcM isotipo IgG_{2a} em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS com o íon metálico Ni²⁺ quelatado.

Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 2,4 mL de sobrenadante concentrado por precipitação [5,16 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 0,7 mL. Perfil cromatográfico: L- lavagem (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0), E- início da eluição (aumento em degrau da concentração de Tris), E₁- eluição 1 (Tris 100 mmol/L), E₂- eluição 2 (Tris 300 mmol/L), R- regeneração (EDTA 50 mmol/L pH 6,5). Perfil eletroforético: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E₁- eluição 100 mmol/L, E₂- eluição 300 mmol/L, R- regeneração.

Tabela 4-2 Balanço de massa da cromatografia em agarose-OPS-Ni²⁺ utilizando tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris.

Frações	Tris-HCl (mmol/L)	PT (mg) ^a	PT (%) ^b
Injeção	50	12,45	100
Lavagem	50	12,04	96,7
Eluição	100	0,19	1,5
	300	0,12	0,9
Recuperação		12,39	99,5
Proteínas totais adsorvidas		0,35	2,8

PT – Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Quando tampões de baixa força iônica são empregados em IMAC em géis quelantes com metais duros de Lewis, interações eletrostáticas propiciam a adsorção protéica, aproximando o comportamento do quelato metálico ao de um trocador iônico. Quando ambas as interações eletrostáticas e de coordenação ocorrem sob as mesmas condições tamponantes, os quelatos metálicos são classificados como pseudo-cátions (ZACHARIOU e HEARN, 1996; BRESOLIN, 2010).

O perfil eletroforético apresentado na **Figura 4-3** mostrou que para a condição de baixa força iônica e pH neutro utilizando o sistema tamponante Tris-HCl, o quelato metálico OPS-Ni²⁺ apresentou capacidade de adsorção de 0,31 mg/mL de gel (**Tabela 4-2**). A imunoglobulina de interesse foi adsorvida, embora parte das impurezas presentes na amostra de injeção também tenha sido adsorvida, assim como observado por Bresolin (2010). Segundo a **Figura 4-3**, foi observada a captura de IgG_{2a} e dessorção desta proteína a 100 e 300 mmol/L de Tris-HCl, resultado relevante visto que essa proteína encontra-se muito diluída na solução de alimentação, com concentração em torno de 200 µg/mL. A cromatografia possibilitou a concentração da molécula alvo, porém com a co-eluição de albumina. Este resultado sugere que etapas adicionais de purificação sejam necessárias para a recuperação do anticorpo livre de impurezas. As demais proteínas presentes no sobrenadante não interagiram com o quelato, tendo sido lavadas da coluna e não detectadas nem mesmo na etapa de regeneração com EDTA.

A presença do grupamento fosfato na estrutura do OPS (classificado como uma base dura de Lewis) resulta em uma interação energeticamente menos favorável do ligante com íons metálicos de transição quando comparado ao ligante convencional IDA (ZACHARIOU *et al.*, 1996; BRESOLIN, 2010). Segundo o ensaio de espectrofotometria de absorção atômica, a densidade de íons níquel quelatados ao OPS era de apenas 10,6 μmol de níquel/g de gel seco, menos da metade da densidade determinada por Bresolin (2010) em espectrofotômetro de UV-visível a 384 nm ($24,1 \pm 0,2$ μmol de níquel/g de gel seco) e cerca de 10 vezes inferior ao valor reportado pelo mesmo autor ($121,7 \pm 1,1$ μmol de níquel/g de gel seco) para o agente quelante IDA.

O Ni^{2+} imobilizado à matriz, mesmo em pouca quantidade, pode ter contribuído para a adsorção proteica, porém o resultado cromatográfico não pode ser atribuído unicamente à existência de ligações de coordenação entre o íon metálico quelatado e os resíduos de aminoácido acessíveis na superfície da imunoglobulina. Íons metálicos classificados como ácidos duros de Lewis formam quelatos que podem apresentar o comportamento de trocadores pseudocatiônicos quando operados em condições de baixa força iônica (ZACHARIOU e HEARN, 1996). O níquel, por ser considerado um metal intermediário, pode apresentar o mesmo comportamento quando imobilizado ao OPS.

Tendo em vista esses resultados, optou-se por avaliar o perfil de eluição do anticorpo anti-*T. cruzi* em gel agarose-OPS, empregando o OPS como ligante de troca iônica, sem a imobilização de íons metálicos. Por apresentar quatro grupos ionizáveis, sendo o valor de pK_{a1} não determinado, e os valores de $\text{pK}_{a2} = 2,19 \pm 0,01$, $\text{pK}_{a3} = 5,78 \pm 0,01$ e $\text{pK}_{a4} = 9,85 \pm 0,01$ (ZACHARIOU *et al.*, 1996, SMIECHOWSKI, 2010), o ligante se apresenta negativamente carregado em valores de pH neutro, enquanto a proteína estudada se apresenta positivamente carregada nesta condição.

4.2.2 Purificação de anticorpos anti-*T. cruzi* em agarose-OPS livre de metal

As mesmas condições cromatográficas estabelecidas para o experimento em IMAC foram mantidas para que o critério de comparação e as conclusões acerca dos resultados obtidos fossem relacionados apenas à ausência de Ni^{2+} imobilizado ao ligante (**Figura 4-4 e Tabela 4-3**).

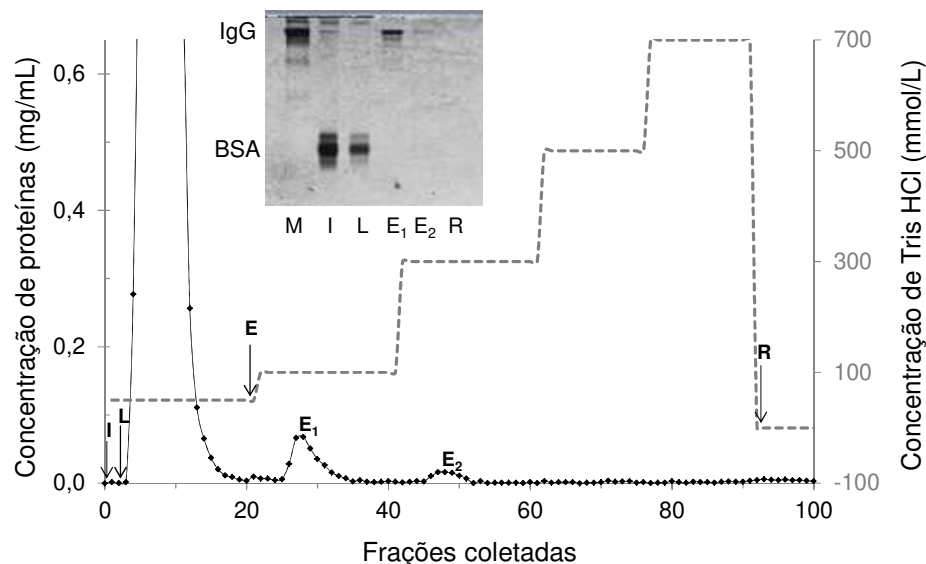


Figura 4-4 Cromatografia de sobrenadante de cultura de hibridoma secretor de AcM isotipo IgG_{2a} em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 2,4 mL de sobrenadante concentrado por precipitação [5,73 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 0,7 mL. Perfil cromatográfico: L- lavagem (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0), E- início da eluição(aumento em degrau da concentração de Tris), E₁- eluição 1 (Tris 100 mmol/L), E₂- eluição 2 (Tris 300 mmol/L), R- regeneração (EDTA 50 mmol/L pH 6,5). Perfil eletroforético: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E₁- eluição 100 mmol/L, E₂- eluição 300 mmol/L, R- regeneração.

Tabela 4-3 Balanço de massa da cromatografia em agarose-CNBr-OPS em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris.

Frações	Tris-HCl (mmol/L)	PT (mg) ^a	PT (%) ^b
Injeção		12,61	100
Lavagem	50	12,34	97,9
Eluição	100	0,27	2,2
	300	0,05	0,4
Recuperação		12,71	100,7
Proteínas totais adsorvidas		0,32	2,6

PT – Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Os resultados de cromatografia e eletroforese confirmam a captura da imunoglobulina e sua eluição nas concentrações 100 e 300 mmol/L de Tris-HCl. Foi observado que o emprego do ligante como trocador catiônico promoveu maior seletividade na adsorção da IgG_{2a} e que, eletroforéticamente, a proteína é desorvida com elevado grau de pureza. A alta seletividade também reflete na diminuição da quantidade de proteínas adsorvidas, conforme evidencia a **Tabela 4-3**, fato decorrente da não adsorção de albumina.

A fim de avaliar o efeito do reagente de ativação e do braço espaçador na capacidade de adsorção de IgG_{2a} foram comparados os géis de agarose ativados com CNBr e com 1,4 butanediol diglicidil éter (bisoxirano). Os experimentos foram realizados em condições cromatográficas idênticas e a interação do ligante OPS com o anticorpo anti-*T. cruzi* foi avaliada.

A ativação do gel de agarose com CNBr produz ésteres de cianeto que ao reagirem com o grupamento amina do ligante, durante sua imobilização, formam uma isouréia residual. Esta isouréia se encontra positivamente carregada em pH neutro, podendo gerar interações inespecíficas principalmente quando o ligante imobilizado for uma molécula pequena como o OPS (HERMANSON *et al.*, 1992). Por isso, com o intuito de verificar o efeito dessa carga residual na adsorção de proteínas do sobrenadante de cultura celular, avaliou-se o uso do gel de agarose-OPS ativado com 1,4 butanediol diglicidil éter (bisoxirano). Este agente de ativação insere grupos epóxi na matriz, gerando um espaçador molecular de longa cadeia carbônica e um oxirano reativo na extremidade capaz de reagir com ligantes contendo hidroxilas, aminas ou grupamentos tiol (HERMANSON *et al.*, 1992). O braço espaçador proporcionado por esta via de ativação é empregado com o objetivo de favorecer as interações de afinidade suprimidas por impedimentos estéricos ocasionados quando o ligante é imobilizado muito próximo à matriz cromatográfica (HERMANSON *et al.*, 1992). Os resultados do perfil cromatográfico e balanço de massa estão apresentados pela **Figura 4-5** e a **Tabela 4-4**, respectivamente.

O resultado obtido indica que a quantidade de proteínas adsorvidas ao gel foi superior à massa adsorvida no experimento realizado com agarose-CNBr-OPS, porém este fato se deve à diminuição de seletividade com a adsorção de albumina. A ativação da agarose com bisoxirano inseriu ao gel um longo braço espaçador com 12 átomos, conferindo características hidrofóbicas ao adsorvente. A presença desse braço espaçador proporcionou interações inespecíficas desfavoráveis à purificação do AcM IgG_{2a} em etapa única.

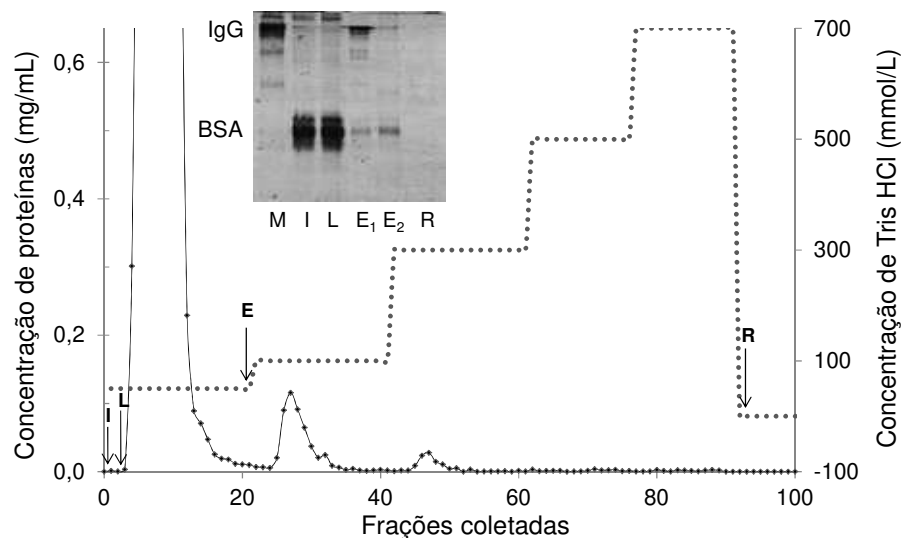


Figura 4-5 Cromatografia de sobrenadante de cultura de hibridoma secretor de AcM isotipo IgG_{2a} em coluna contendo 1,0 mL de agarose-bisoxirano-OPS. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 2,4 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,32 mg/mL] em Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 0,7 mL. Perfil cromatográfico: L- lavagem (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0), E- início da eluição(aumento em degrau da concentração de Tris), E₁- eluição 1 (Tris 100 mmol/L), E₂- eluição 2 (Tris 300 mmol/L), R- regeneração (EDTA 50 mmol/L pH 6,5). Perfil eletroforético: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E₁- eluição 100 mmol/L, E₂- eluição 300 mmol/L, R- regeneração.

Tabela 4-4 Balanço de massa da cromatografia em agarose-bisoxirano-OPS utilizando tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris.

Frações	Tris-HCl (mmol/L)	PT (mg) ^a	PT (%) ^b
Injeção		12,76	100
Lavagem	50	11,63	91,1
Eluição	100	0,34	2,7
	300	0,07	0,5
Recuperação		12,10	94,8
Proteínas totais adsorvidas		0,41	3,2

PT – Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Pode-se concluir que na condição estudada, a presença do níquel ou de um braço espaçador favorecem interações não específicas que reduzem a seletividade do adsorvente, sendo a agarose-CNBr-OPS o adsorvente mais adequado para prosseguir com o estudo.

4.2.3 Seleção do tampão para purificação da IgG_{2a}

No intuito de determinar as condições mais favoráveis à adsorção seletiva da IgG_{2a} em agarose-CNBr-OPS, foram realizadas cromatografias com sistemas tamponantes de diferentes características iônicas, frequentemente empregados em etapas cromatográficas de moléculas biológicas: o tampão catiônico Tris-HCl (pKa = 8,3), o aniônico fosfato de sódio (pKa₁=2,12; pKa₂=7,20 e pKa₃=12,67) e o *good buffer* MOPS (pKa=7,2), todos na mesma concentração de 50 mmol/L. Os valores de pH estudados foram escolhidos respeitando a faixa tamponante de cada um dos tampões: 7,0 a 9,0 para o Tris-HCl; 6,5 a 7,5 para o fosfato de sódio; e 6,5 a 7,9 para o MOPS (GOOD *et al.*, 1966). Os resultados foram comparados com base nos balanços de massa e análise por eletroforese sendo que, para o melhor resultado obtido, foram analisados ainda o grau de pureza da imunoglobulina adsorvida, rendimento e o fator de purificação.

Os balanços de massa de cada ensaio, quantificados pelo método de Bradford (1976), estão apresentados em anexo no Apêndice A juntamente com os perfis cromatográficos, enquanto nesta sessão são apresentados apenas os perfis eletroforéticos (**Figura 4-6**) e a análise comparativa quanto à massa proteica adsorvida em cada ensaio (**Figura 4-7**).

O sistema tamponante fosfato de sódio, além de ter apresentado a menor capacidade de adsorção nas condições estudadas, captura, além de IgG, outras proteínas presentes no sobrenadante de cultura celular. Este tampão não foi apropriado para purificar o AcM IgG_{2a}. Bresolin e Bueno (2012), utilizando o mesmo adsorvente e tampão fosfato de sódio, observaram que a IgG humana foi purificada nessa condição a partir do soro humano, no entanto, as imunoglobulinas que apresentavam pI na faixa de 5,85 a 8,15 não interagiram com agarose-CNBr-OPS e foram recuperadas nas frações não retidas. Possivelmente os ânions fosfato do tampão interagiram eletrostaticamente com as proteínas, mascarando seus domínios protonados e, conseqüentemente, gerando repulsão pelos sítios disponíveis do ligante. Isto deve ter impedido a interação entre as proteínas e o adsorvente em todos os valores de pH estudados e, como

resultado, as moléculas foram lavadas da coluna. Nos trabalhos de HAUPT *et al.* (1995) e BRESOLIN *et al.* (2011) também foi verificado que o emprego do tampão fosfato de sódio proporcionou baixa capacidade adsortiva em aminoácidos utilizados como ligantes pseudo-bioespecíficos em cromatografia de afinidade para a purificação de IgG proveniente de soro humano.

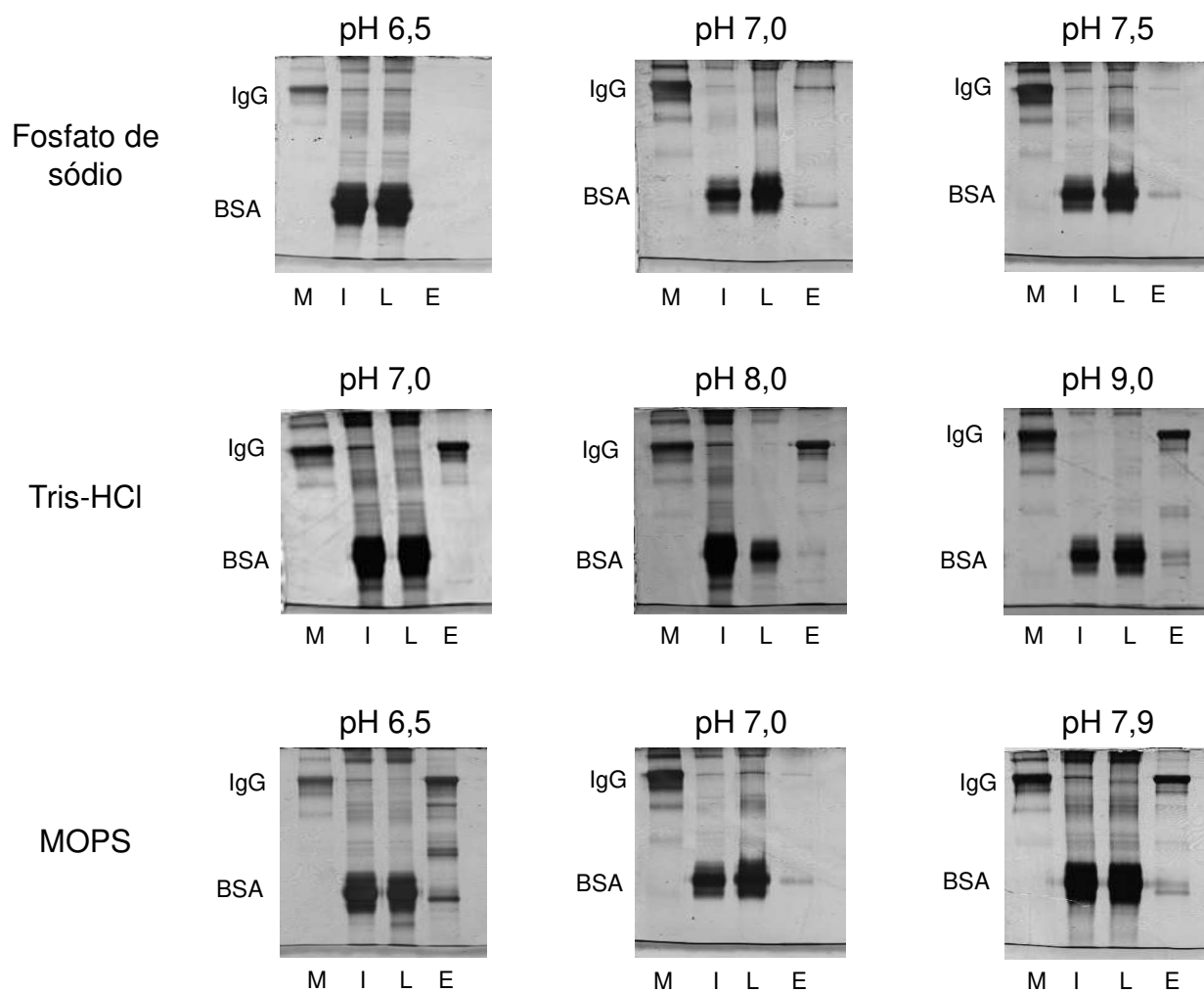


Figura 4-6 Perfis eletroforéticos das frações obtidas em cromatografias de alíquotas precipitadas e dialisadas de sobrenadante de cultivo de hibridoma, secretor de IgG_{2a} monoclonal anti-*T. cruzi*, em agarose-CNBr-OPS com diferentes sistemas tamponantes. Legenda: M. marcador de IgG (Aventis), I. amostra de injeção, L: *pool* das frações de lavagem, E: *pool* das frações de eluição.

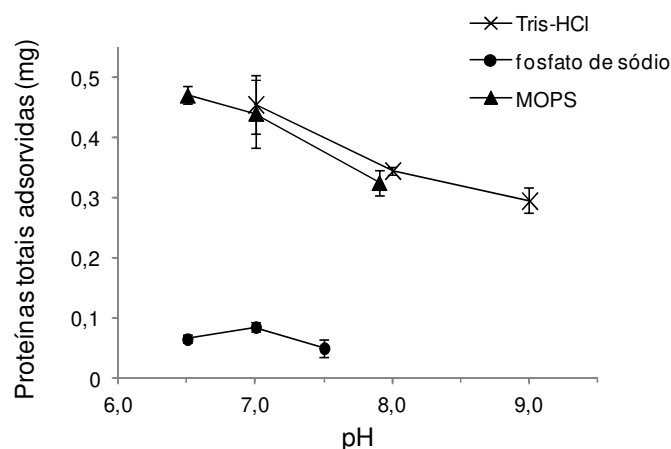


Figura 4-7 Efeito do pH e natureza dos sistemas tamponantes Tris-HCl (x), fosfato de sódio (●) e MOPS (▲) na adsorção de proteínas totais do sobrenadante de cultura de hibridomas secretores de AcM anti-*T.cruzi* (IgG_{2a}) em agarose-CNBr-OPS.

Os resultados obtidos com o sistema tamponante Tris-HCl revelam o potencial de utilização do adsorvente para captura da IgG_{2a} monoclonal anti-*T. cruzi*. Para os três valores de pH estudados, a imunoglobulina foi recuperada mais concentrada nas frações de eluição e praticamente livre de impurezas quando comparada em eletroforese à amostra de partida. No valor de pH igual a 7,0, o tampão proporcionou maior capacidade de adsorção (0,455 mg de proteína total/mL de gel) e ainda apresentou maior seletividade, recuperando a molécula alvo eletroforeticamente livre de impurezas. Os cátions do Tris competem pelos sítios disponíveis do ligante aniônico com proteínas positivamente carregadas presentes na amostra de injeção. No menor valor de pH avaliado, a maior quantidade de cargas positivas distribuídas na superfície da IgG_{2a} competem com maior força de atração por esses sítios e, por isso, o AcM é adsorvido seletivamente, enquanto as demais proteínas são lavadas da coluna. O aumento no valor de pH deste tampão provocou a desprotonação de alguns aminoácidos da superfície do anticorpo reduzindo a capacidade adsortiva da resina, comportamento característico de trocadores de cátions. Quando o pH se aproxima do valor de pI da imunoglobulina, o balanço de cargas distribuídos em sua superfície é praticamente nula, porém a provável exposição de determinados sítios positivamente carregados da molécula contribuem, embora em menor intensidade, para que ocorra a adsorção de uma menor quantidade da molécula alvo, refletindo na redução da capacidade adsortiva da coluna (SHI *et al.*, 2005). Quando utilizado este sistema tamponante em

pH 9,0, a predominância de resíduos de aminoácidos desprotonados na superfície proteica resultam em repulsão eletrostática, diminuindo ainda mais a quantidade de proteínas adsorvidas, embora a distribuição heterogênea dessas cargas resulte em sítios com carga oposta ao adsorvente possibilitando a interação da molécula com a matriz (LESINS e RUCKENSTEIN, 1988).

Enquanto a molécula de Tris carrega uma carga de sinal positivo em sua estrutura, o tampão MOPS apresenta um par de cargas com sinais opostos em valores de pH abaixo de seu pKa e apenas a carga negativa acima desse valor. A utilização do tampão MOPS em sua condição zwitteriônica proporcionou a adsorção não seletiva de 2,0 a 2,5% do total de proteínas alimentadas a coluna (**Figura 4-7**), enquanto quando avaliado em sua condição desprotonada, o composto MOPS reduziu a capacidade adsortiva da coluna, pois provavelmente interagiu com os domínios protonados das moléculas em solução. Próximo ao valor de pKa do tampão, o adsorvente capturou menor quantidade do anticorpo, que foi detectado na fração de lavagem da coluna. Estes resultados também foram observados por Souza e colaboradores (2010), que relataram a adsorção não seletiva de IgG humana em matriz com poliaminas imobilizadas em sistema cromatográfico utilizando o tampão zwitteriônico MOPS e também que para valores de pH próximos ao pKa do tampão, o sistema adsorveu menor quantidade de IgG.

O tampão zwitteriônico apresenta menor condutividade quando comparado ao sistema tamponante Tris-HCl em mesma concentração molar. Pitiot e colaboradores (2001a) também verificaram que o emprego do tampão MOPS para cromatografia de albumina em gel de agarose com histidina imobilizada favoreceu maior capacidade de adsorção da proteína em comparação ao Tris-HCl. Os autores verificaram que o diferente desempenho dos tampões estava relacionado à condutividade, uma vez que ao ser contornada pela a adição de NaCl à solução zwitteriônica, a adsorção de albumina em ambos tampões foi equivalente. O trabalho de HAUPT *et al.* (1995) mostrou que a adsorção de IgG humana purificada ao aminoácido histidina imobilizado em membranas de álcool poli-etileno vinílico (PEVA) foi inversamente proporcional à condutividade do sistema tamponante MOPS. Em sua forma zwitteriônica, a solução promoveu a adsorção de maior quantidade do anticorpo mas, com o aumento de pH e conseqüente aumento de condutividade pela desprotonação de suas espécies químicas, a capacidade adsortiva da membrana de afinidade foi reduzida.

Embora os mecanismos de adsorção do anticorpo ao ligante não estejam completamente elucidados, a predominância de interações eletrostáticas é evidenciada pela dessorção das proteínas com o acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl. Sendo assim, foram realizados ensaios para averiguar a capacidade adsortiva da IgG_{2a} em agarose-CNBr-OPS com diferentes molaridades de NaCl no tampão de adsorção.

4.2.4 Efeito do acréscimo de NaCl ao tampão de adsorção na purificação do anticorpo anti-*T. cruzi*

Os estudos realizados para definir a melhor condição para purificação do anticorpo monoclonal demonstraram que o pH e a natureza do sistema tamponante influenciam diretamente a adsorção seletiva de IgG_{2a} em agarose-CNBr-OPS que, provavelmente, é governada por interações eletrostáticas. Para comprovar esta hipótese e avaliar o efeito da força iônica no tampão de adsorção, ensaios com diferentes molaridades de NaCl no tampão de adsorção foram realizados utilizando a melhor condição obtida para a purificação do AcM (sistema tamponante Tris-HCl 50 mmol/L em pH 7,0) como parâmetro de comparação.

Os tampões de adsorção foram acrescidos de 10, 30, 50 e 100 mmol/L de NaCl. O *pool* das frações obtidas em cada etapa teve a concentração padronizada para análise quantitativa das bandas observadas em gel de eletroforese. A concentração de proteína total das amostras de injeção e lavagem foi ajustada para 0,5 mg/mL, enquanto as amostras de eluição foram ajustadas para 0,1 mg/mL (nas condições de adsorção com 0 e 10 mmol/L de NaCl) ou foram analisadas pela fração com maior valor de concentração (para as demais eluições). O resultado de eletroforese está apresentado na **Figura 4-8** e a comparação quantitativa das bandas proteicas com a correlação em massa do total de proteínas adsorvidas está apresentado no gráfico da **Figura 4-9**.

O adsorvente se comportou como uma resina trocadora de íons, pois o aumento da concentração de NaCl no tampão de adsorção reduziu sua capacidade adsortiva. O enfraquecimento das interações eletrostáticas promovido pelo pequeno acréscimo de 10 mmol/L de NaCl no tampão de adsorção promoveu não só uma queda de 46,4% das proteínas adsorvidas

como também reduziu 31,3% da pureza de IgG_{2a} purificada. A maior concentração de NaCl estudada (100 mmol/L) foi suficiente para suprimir as interações proteicas com o adsorvente.

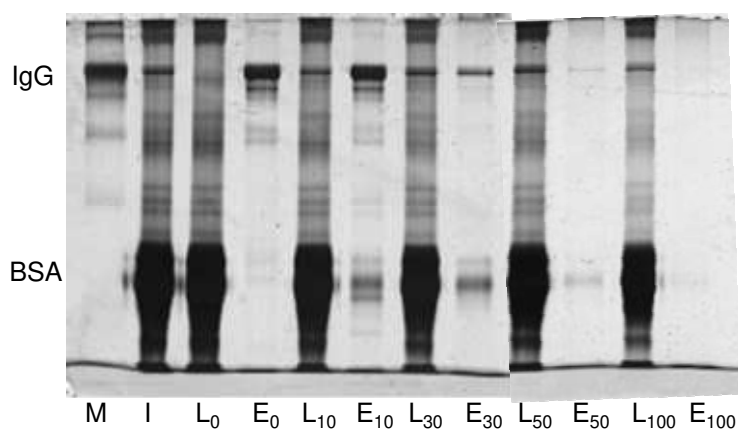


Figura 4-8 Perfil eletroforético das cromatografias de sobrenadante de cultura de hibridomas secretores de AcM anti-*T.cruzi* em agarose-CNBr-OPS em diferentes concentrações de NaCl no tampão de adsorção Tris-HCl pH 7,0. M. marcador de IgG (Aventis), I. amostra de injeção, L₀-L₁₀₀. lavagem (0, 10, 30, 50 e 100 mmol/L de NaCl), E₀-E₁₀₀. eluição com Tris-HCl 50 mmol/L contendo 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0 das cromatografias com 0, 10, 30, 50 e 100 mmol/L de NaCl no tampão de adsorção.

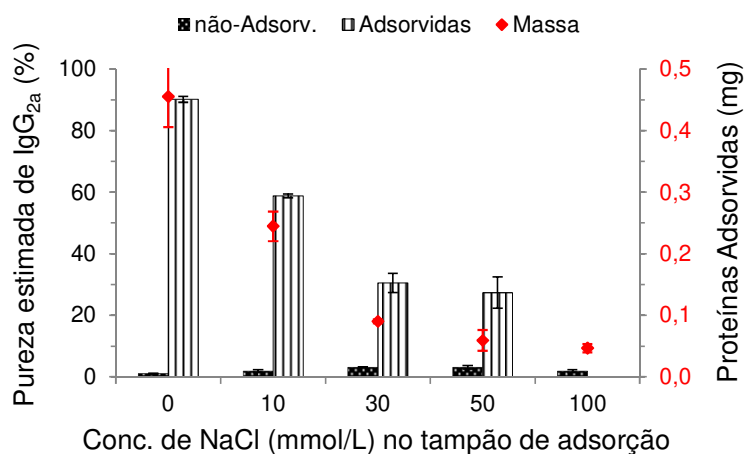


Figura 4-9 Massa relativa de proteínas totais e IgG das frações não-adsorvidas (■) e adsorvidas (□), determinadas por análise quantitativa do gel SDS-PAGE e massa de proteínas adsorvidas (♦) nas cromatografias de sobrenadante de cultura de hibridomas secretores de AcM anti-*T.cruzi* em agarose-CNBr-OPS com aumento da molaridade de NaCl no tampão de adsorção Tris-HCl pH 7,0.

Na **Figura 4-9** pode-se observar que em baixas concentrações de NaCl (10 a 50 mmol/L) no tampão de adsorção, foi observada a presença de impurezas de baixa massa molecular como a albumina, embora esta molécula bovina possua pI na faixa de 4,8 a 5,2 (AVRAMESCU *et al.*, 2003) e se encontre negativamente carregada para os valores de pH fisiológicos, devendo apresentar repulsão eletrostática pelos sítios disponíveis do ligante. É possível que a menor seletividade observada seja atribuída a outros mecanismos de adsorção (ligações de dipolo, ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals, etc) devido ao enfraquecimento das interações eletrostáticas (HAUPT *et al.*, 1995; PITIOT *et al.*, 2001a) ou ainda pela ocorrência de outros tipos de interações entre as moléculas em solução e os grupamentos residuais resultante da ativação do gel de agarose com CNBr, como o carbamato, imidocarbonato e isouréia (HERMANSON *et al.*, 1992). Na presença de 100 mmol/L de NaCl as interações entre proteínas e adsorvente foram completamente suprimidas.

A fração de eluição da cromatografia realizada na ausência de NaCl no tampão de adsorção foi estimada em 90% de pureza de IgG_{2a} pelo escaneamento do gel de eletroforese SDS-PAGE em densitômetro (**Figura 4-9**). Nesta condição, 0,41 mg de proteínas foram adsorvidas e além de ter sido mais seletiva, maior capacidade adsortiva foi observada (0,45 ± 0,05 mg de proteína/mL de gel). A análise da amostra de injeção apresentou 2,69% (± 0,79) de AcM, o que representa 0,55 mg (± 0,17) de proteínas do total de 20 mg aplicados à coluna. Com base nas quantificações por densitometria, a melhor condição encontrada para purificação do anticorpo em questão apresenta 74% de recuperação do produto, indicando que houve perdas do mesmo durante a etapa de lavagem. Sendo assim, técnicas analíticas mais sensíveis foram adotadas para caracterização e quantificação das frações obtidas pelos ensaios cromatográficos de purificação do anticorpo monoclonal isotipo IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em agarose-CNBr-OPS utilizando Tris-HCl pH 7,0 como tampão de adsorção e Tris-HCl, NaCl 1,0 mol/L pH 7,0 para eluição.

4.3 Análise qualitativa da purificação de IgG_{2a}

A purificação do AcM em agarose-CNBr-OPS em sistema tamponante Tris-HCl pH 7,0 demonstrou-se potencialmente viável em termos de seletividade e capacidade de adsorção. A fim de se obter um aspecto qualitativo desta purificação, realizou-se uma análise de *Western blotting*

com as amostras obtidas por esta cromatografia (**Figura 4-10**), que indicou que houve uma pequena perda de AcM na etapa de lavagem.

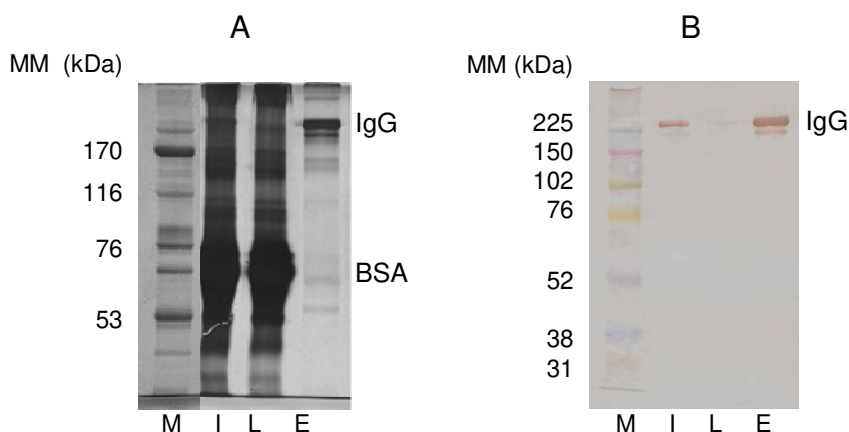


Figura 4-10 Análise qualitativa das frações obtidas pela purificação de IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em agarose-CNBr-OPS. Eletroforese SDS-PAGE, sob condições não redutoras, do *pool* formado pela homogeneização das frações de cada etapa: M. Padrão de massa molecular (GE Healthcare), A. amostra de injeção, L. *pool* de lavagem, E. *pool* de eluição B) *Western Blotting*: M. Padrão de massa molecular pré-corado (GE Healthcare), A. amostra de injeção, L. *pool* de lavagem, E. *pool* de eluição.

Após a confirmação da seletividade, o balanço de massa foi avaliado pelo teste tipo ELISA (**Tabela 4-5**).

Tabela 4-5 Balanço de massa da cromatografia em agarose-CNBr-OPS em tampão de equilíbrio Tris-HCl pH 7,0 e dessorção com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L.

Frações	PT ^a (mg)	PT (%)	IgG ^b (μg)	Recuperação IgG (%)	Massa Específica ^c	Fator Purificação ^d
Injeção	20,05	100	730,75 ± 51,11	100	36,44	1,0
Lavagem	19,30	96,2	69,72 ± 2,41	9,5	3,61	0,1
Eluição	0,49	2,4	560,96 ± 1,47	76,8	1144,7	31,4
Recuperação	19,79	98,7	630,68 ± 3,88	86,3	-----	-----

PT – Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Massa calculada por meio de dosagem pelo método de ELISA

^c Razão entre a massa de IgG_{2a} (μg) e a massa total de proteínas (mg)

^d Razão entre a massa específica de cada fração e a massa específica de injeção

A quantificação de imunoglobulinas de camundongo demonstrou que o AcM foi recuperado em 76,8% da etapa de eluição, ocorrendo perda de 9,5% da molécula alvo durante a lavagem (**Tabela 4-5**). De acordo com o cálculo da massa específica de anticorpo, a molécula alvo foi recuperada livre de impurezas e com fator de purificação 31,4.

Os resultados apresentados estão em acordo com as avaliações prévias feitas pelo escaneamento do gel de eletroforese, confirmando a porcentagem de recuperação do anticorpo em torno de 75% e seu elevado grau de pureza (valor calculado de 114,5%). A IgG_{2a} presente na amostra de inicial de sobrenadante precipitado e dialisado se encontra extremamente diluída, representando apenas 3,6% das proteínas totais. Tendo em vista as condições de operação determinadas para sua purificação, foi então elaborado um ensaio de curva de ruptura para determinar a capacidade dinâmica de adsorção, as eficiências de recuperação de produto e de utilização do sistema para soluções diluídas do AcM na concentração de trabalho 200 µg/mL.

4.4 Determinação da capacidade de adsorção de IgG_{2a} de agarose-CNBr-OPS

Todos os experimentos realizados nesta sessão foram conduzidos na melhor condição de purificação encontrada, em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e fase estacionária agarose-CNBr-OPS. O anticorpo monoclonal isotipo IgG_{2a} foi previamente purificado em proteína G-Sepharose e teve sua concentração ajustada para 200 µg/mL.

A capacidade dinâmica de adsorção em uma coluna de leito fixo pode ser avaliada pela curva de ruptura. Para determinar a curva de ruptura do processo cromatográfico em leito fixo definido para o AcM em agarose-CNBr-OPS, a coluna contendo 1,0 mL do gel empacotado foi alimentada até a saturação com solução a 200 µg/mL de IgG_{2a} previamente purificada em Proteína G-Sepharose. Os dados obtidos das etapas de alimentação, lavagem e eluição do adsorvente são mostrados em gráfico correlacionando a concentração normalizada de AcM na corrente de saída definida pela razão de concentração C/C_0 em função do tempo (**Figura 4-11**).

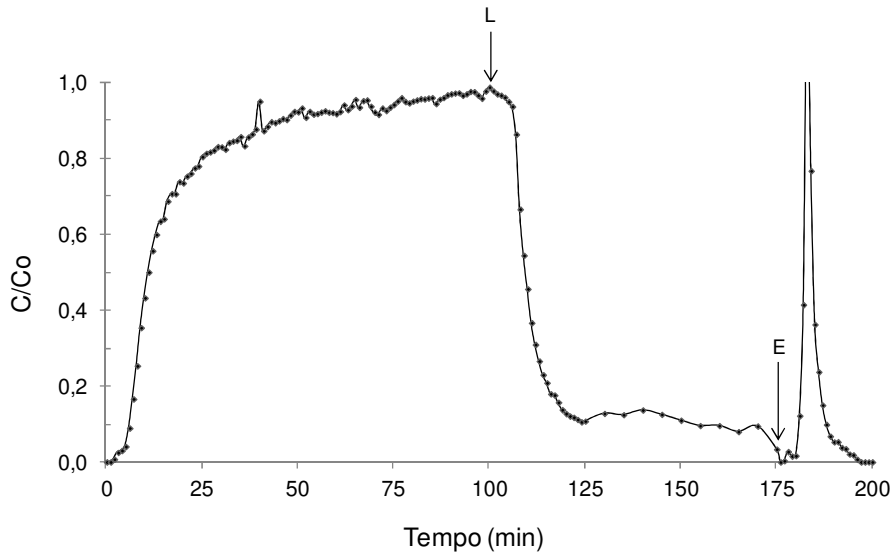


Figura 4-11 Curva de ruptura, etapas de lavagem e eluição de IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em agarose-CNBr-OPS utilizando Tris-HCl pH 7,0 como sistema tamponante. Alimentação: 50,0 mL de anticorpo purificado [200 µg/mL]. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 0,5 mL de 0 a 125 min e de 176 a 200 min; 5,0 mL de 126 a 175 min.

A etapa de eluição desorveu o anticorpo em frações que chegaram a apresentar concentração de 265 µg/mL, valor superior ao da alimentação a 200 µg/mL, indicando que a molécula foi recuperada de maneira mais concentrada.

O valor obtido para a capacidade dinâmica de adsorção (determinada pela razão entre a massa em mg de IgG_{2a} adsorvida recuperada na etapa de eluição e o volume em mililitro de gel empacotado) foi de 0,39 mg/mL para as condições de vazão e concentração utilizados. Este valor é cerca de cinco vezes menor que a capacidade dinâmica determinada para o mesmo adsorvente por Bresolin e Bueno (2012) para adsorção de IgG humana. Este resultado foi obtido devido à baixa concentração de IgG_{2a} na solução de alimentação da coluna (200 µg/mL), enquanto a concentração avaliada por Bresolin e Bueno(2012) foi 472 µg/mL e IgG humana.

5 CONCLUSÕES

A análise conjunta dos resultados obtidos sugere a potencialidade da utilização de agarose-CNBr-OPS como alternativa aos géis com proteína A imobilizada para a obtenção de AcM IgG_{2a} livre de impurezas como processo de purificação.

- a. O gel agarose-CNBr-OPS quelata pouca quantidade do íon metálico Ni²⁺ e, nas condições de baixa força iônica estudadas, o quelato formado apresenta o comportamento de um trocador catiônico.
- b. Apesar do adsorvente IMAC ter apresentado potencial para captura da IgG_{2a} anti-*T. cruzi* a partir de soluções muito diluídas, o quelato OPS-Ni²⁺ se apresentou pouco seletivo, sendo necessárias etapas posteriores de purificação para a recuperação do anticorpo livre de impurezas.
- c. A presença do braço espaçador 1,4 butanodiol diglicidil éter favoreceu interações não específicas que reduziram a seletividade do adsorvente, sendo a agarose-CNBr-OPS o adsorvente mais adequado para purificação da molécula alvo.
- d. Os tampões fosfato de sódio e o MOPS não são apropriados para a purificação do anticorpo anti-*T. cruzi*, pois os íons em solução (provenientes do tampão) interagem eletrostaticamente com as proteínas, reduzindo as interações eletrostáticas.
- e. A solução tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 favoreceu a adsorção seletiva de IgG_{2a} governada por interações eletrostáticas, uma vez que o aumento da força iônica do tampão de equilíbrio reduziu a capacidade adsortiva do gel e a eluição do anticorpo foi promovida pelo acréscimo de sal na solução tamponante.
- f. Foram obtidos recuperação de 76,8% da molécula alvo com elevado grau de pureza e fator de purificação igual a 31,4 na condição mais favorável à adsorção seletiva de IgG_{2a}.
- g. A capacidade dinâmica de adsorção da coluna foi de 0,39 miligramas do anticorpo monoclonal para cada mililitro de gel empacotado.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em vista dos resultados promissores para purificação da IgG_{2a}, secretada por hibridomas cultivados com adição de 10% de SFB, por cromatografia de afinidade utilizando o ligante pseudo-bioespecífico OPS imobilizado em agarose, seria relevante a continuidade da pesquisa envolvendo este tema. Desta forma, sugere-se:

- Realizar estudos termodinâmicos com agarose-CNBr-OPS para analisar a natureza de adsorção do AcM anti-*T. cruzi*.
- Avaliar o potencial de purificação de agarose-CNBr-OPS com moléculas biológicas que apresentem ponto isoelétrico maior que 7,35 e menor que 8,15, com a finalidade de confirmar que o processo de adsorção é governado por interações eletrostáticas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMANN, A. H. **Cellular and molecular immunology**, 5ª edição Philadelphia: W. B. Saunders, 2003, 562 p.
- AVRAMESCU, M. E.; SAGER, W. F. C.; WESSLING, M. Functionalised athylene vinyl alcohol copolymer (EVAL) membranes for affinity protein separation. **Journal of Membrane Science**, v. 216, p. 177-193, 2003
- AZEVEDO, A. M.; GOMES, A. G.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; PISCO, A. M. M. O.; AIRES-BARROS, M. R. Partitioning of human antibodies in polyethylyne glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 65, p. 14-21, 2009a
- AZEVEDO, A. M.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; PISCO, A. M. M. O.; VRIES, J.; KORPORAAL, R.; VISSER, T. J.; AIRES-BARROS, M. R. Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 65, p. 31-39, 2009b
- AYYAR, B. V.; ARORA, S.; MURPHY, C.; O’KENNEDY, R. Affinity chromatography as a tool for anibody. **Methods**, v. 56, p. 116-129, 2012
- BAYRAMOGLU, G.; SENEL, A. U.; ARICA M. Y. Adsorption of IgG on spacer-arm and L-arginine ligand attached poly(GMA/MMA/EGDMA) beads. **Journal of Applied Polymer Science** v. 104, p. 672-679, 2007
- BAYRAMOGLU, G.; OZALP, V. C.; ARICA, M. Y. Adsorption and separation of immunoglobulins by novel affinity core-shell beads decorated with Protein L and l-histidine. **Journal of Chromatography B**, v. 936, p. 1-9, 2013
- BELEW, M.; JUNTTI, N.; LARSSON, A.; PORATH, J. A one-step purification method for monoclonal antibodies based on salt-promoted adsorption chromatography on a ‘thiophilic’ adsorbent. **Journal of Immunological Methods**, v. 102, p. 173-182, 1987

- BODEN, V.; WINZERLING, J.J.; VIJAYALAKSHIMI, M.; PORATH, J. Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography. **Journal of Immunological Methods**, v. 181, 225–32, 1995
- BOSSI, S.; FERRANTI, B.; MARTINELLI, C.; CAPASSO, P.; MARCO, A. Antibody-mediated purification of co-expressed antigen–antibody complexes. **Protein Expression and Purification**, v. 72, p. 55-58, 2010
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976
- BRESOLIN, IGOR TADEU LAZZAROTTO. **Purificação de anticorpos monoclonais utilizando IMAC em membranas de fibra oca de PEVA: comparação dos agentes quelantes IDA, CM-ASP e TREN**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado)
- BRESOLIN, I. T.L; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomolécula: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v.32, p.1288-1296, 2009
- BRESOLIN, IGOR TADEU LAZZAROTTO. **Agentes quelntes e poliaminas como grupos ionogênicos para aa purificação de IgG humana por cromatografia**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. 138 p. Tese (Doutorado)
- BRESOLIN, I. T. L.; FIORITTI, R. R.; BUENO, S. M. A. IgG purification by negative chromatography in amine-based ligands: A comparison of l-lysine and poly-l-lysine. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2277-2285, 2011
- BRESOLIN, I. T. L.; BUENO, S. M. A. Evaluation of amino acid O-Phosphoserine as ligand for capture of Immunoglobulin G from human serum. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 167, p. 632-644, 2012

- BUENO, S. M. S.; LEGALLAIS, C.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M. Experimental kinetic aspect of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration: process for IgG separation from human plasma. **Journal of Membrane Science**, v. 117, p. 45-56, 1996
- BUTLER, M.; JENKINS, H. Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. **Journal of Biotechnology**, v.12, p. 97-110, 1989.
- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 3, p. 283-291, 2005
- COURA, J. R. , DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009
- COX, M. M.; PHILLIPS, G. N. **Handbook of proteins: structure, function and methods**. EUA, Wiley, v. 1, 2007, 649 p.
- ÇANAK, Y.; OZKARA, S.; AKGOL, S. DENIZLI, A. Pseudo-specific bioaffinity chromatography of immunoglobulin. **Reactive and Functional Polymers**, v. 61, p.369-377, 2004
- DEPRETER, F.; PILCER, G.; AMIGHI, K. Inhaled Proteins: Challenges and Perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, p. 251-280, 2013
- DIMARTINO, S.; BOI, C.; SARTI, G. C. Influence of protein adsorption kinetics on breakthrough broadening in membrane affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3966–3972, 2011
- DUBOIS, M.; FENAILLE, F.; CLEMENT, G.; LECHMANN, M.; TABEL, J. C.; EZAN, E.; BECHER, F. Immunopurification and mass spectrometric quantification of the active form of a chimeric therapeutic antibody in human serum. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 1737–1745, 2008

- EL-KAK, A. , VIJAYALAKSHMI, M. A. study of the separation of mouse monoclonal antibodies by pseudobioaffinity chromatography using matrix-linked histidine and histamine. **Journal of Chromatography**, v. 570, p. 29-41, 1991.
- ELVIN, J. G.; COUSTON, R. G.;VAN DER WALLE, C. F. Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, p. 83-98, 2013
- FARID, S. S. Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 8-18, 2007
- GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v. 49, p. 335- 360, 2001
- GAGNON, P. Technology trends in antibody purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 57-70, 2012
- GIESE, G.; MYROLD, A.; GORRELL, J.; PERSSON, J. Purification of antibodies by precipitating impurities using polyethylene glycol to enable a two chromatography step process. **Journal of Chromatography B**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.029>, 2013, acessado em 01/09/2013
- GODING, J. W. **Monoclonal antibodies: Principles and practice**. Academic Press, New York, 1995
- GOOD, N. E.; WINGET, G. D.; WINTER, W.; CONNOLLY, T. N.; IZAWA, S.; SINGH, R. M. M. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. **Biochemistry**, v. 5, p. 467-477, 1966
- HAGE, D. S.; ANGUIZOLA, J. A.; BI, C.; LI, R.; MATSUDA, R.; PAPASTAVROS, E.; PFAUNMILLER, E.; VARGAS, J.; ZHENG, X. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 69, p. 93-105, 2012

- HAUPT, K.; BUENO, S. M. A.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Interaction of human immunoglobulin G with L-histidine immobilized onto poly(ethylene-vinyl alcohol) hollow-fiber membranes. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 674, p. 13-21, 1995
- HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; SMITH, P. K. **Immobilized affinity ligand techniques**. Academic Press, San Diego, 454 p., 1992
- HOLSCHUH, K.; SCHWAMMLE, A. Preparative purification of antibodies with protein A—an alternative to conventional chromatography. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 345–348, 2005
- HOLT, L. J.; HERRING, C.; JESPER, L. S.; WOOLVEN, B. P.; TOMLINSON I. A. Domain antibodies: proteins for therapy. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 484-490, 2003
- HUSE, H. J.; SCHOLZ, G. H. Purification of antibodies by affinity chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 51, p. 217-231, 2002
- HUTCHENS, T. W.; PORATH, J. Thiophilic adsorption of immunoglobulins—analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification. **Analytical Biochemistry**, v. 159, p. 217-226, 1986
- ISHIHARA, T.; NAKAJIMA, N.; KADOYA, T. Evaluation of new affinity chromatography resins for polyclonal, oligoclonal and monoclonal antibody pharmaceuticals. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2141-2144, 2010
- KARAS, M. Use of O-Phosphoserine (OPS) for the separation of peptides on immobilized copper ions. *Journal of Elementology*, v.15, p. 101-110, 2010
- KELLEY, B. Industrialization of mAb production technology – The bioprocessing industry at a crossroads. **Landes Bioscience**, v.1, p. 443-452, 2009
- KIM, M.; SAITO, K.; FURUSAKI, S.; SATO, T.; SUGO, T.; ISHIGAKI, I. Adsorption and elution of bovine γ -globulin using an affinity membrane containing hydrophobic amino acids as ligands. **Journal of Chromatography A**, v. 585, p. 45-51, 1991

- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975
- KUCZEWSKI, M.; SCHIRMER, E.; LAIN, B.; ZARBIS-PAPASTOITSIS, G. A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line. **Biotechnology Journal**, v. 6, p. 56-65, 2011
- KRETTLI, A. U.; WEISZ-CARRINGTON, P.; NUSSENZWEIG, R. S. Membrane-bound antibodies to bloodstream Trypanosoma cruzi in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 37, p. 416-423, 1979
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970
- LIN, Z.; ZHANG Y.; LI C.; QIAN, H. Purification antibody by thiophilic magnetic sorbent modified with 2-mercapto-1-methylimidazol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.108, p. 72-79, 2013
- LOW, D.; O'LEARY, R.; PUJAR, N. S. Future of antibody purification. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 48-63, 2007
- LESINS, V.; RUCKENSTEIN, E. Patch controlled attractive electrostatic interactions between similarly charged proteins and adsorbents. **Colloid and Polymer Science**, v. 266, p.1187-1190, 1988
- MAHAJAN, E.; GEORGE, A.; WOLK, B. Improving affinity chromatography resin efficiency using semi-continuous chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1227, p. 154-162, 2012
- MEHTA, A.; TSE, M. L.; FOGLE, J.; LEN, A.; SHRESTHA, R.; FONTES, N.; LEBRETON, B.; WOLK, B.; VAN REIS, R. Purifying therapeutic monoclonal antibodies. **Chemical Engineering Progress**, v. 104, n. 4, p. 14-20, 2008
- MILSTEIN, C. Monoclonal antibodies. **Scientific American**, v. 243, n. 4, p. 66-74, 1980

- MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307-310, 1981
- MUSZYNSKA, G.; DOBROWOLSKA, G.; MEDIN, A.; EKMAN P. O.; PORATH, J. Model studies on iron(III) ion affinity chromatography II. Interaction of immobilized iron(III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins. **Journal of Chromatography**, v. 604, p. 19-28, 1992
- NAIK, A. D.; MENEGATTI, S.; GURGEL, P. V.; CARBONELL, R. G. Performance of hexamer peptide ligands for affinity purification of immunoglobulin G from commercial cell culture media. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1691-1700, 2011a
- NAIK, A. D.; RAINA, M.; LALI, A. M. AbSep—An amino acid based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G Original Research Article. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1756-1766, 2011b
- NEZLIN, P. **The immunoglobulins: Structure and Function**, Academic Press, 1998, 269 p
- PEDRA, R. A.; OLIVEIRA, R. A.; BEYRODT, C. G.; FRANÇA, H. H. Desafio em saúde pública: tratamento etiológico da doença de chagas na fase crônica. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 13, p. 5-9, 2011
- PITOT, O.; FOLLEY, L.; VIJAYALAKSHMI M. A. Protein adsorption on histidyl-aminohexyl-Sepharose 4B I. Study of the mechanistic aspects of adsorption for the separation of human serum albumin from its non-enzymatic glycosylated isoforms (advanced glycosylated end products). **Journal of Chromatography B**, v. 758, p. 163–172, 2001a
- PITOT, O.; NEDONCHELLE, E.; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI M. A. Protein adsorption on histidyl-aminohexyl-Sepharose 4B II. Application to the negative one-step affinity purification of human b2-microglobulin and Immunoglobulin G. **Journal of Chromatography B**, v. 758, p. 173–182, 2001b

- PORATH, J. , CARLSSON, J. , OLSSON, I. , BELFRAGE G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p. 598-599, 1975
- PORATH, J. , MAISANO, F. , BELEW, M. Thiophilic adsorption – a new method for protein fractionation. **FEBS Letters**, v. 185,p. 306-310, 1985
- PORATH, J. IMAC—immobilized metal ion affinity based chromatography. **Trends Analytical Chemical**, v. 7, p. 254–259, 1988
- PRASANNA, R. R.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Characterization of chelate methacrylate monolithic disk for purification of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3660-3667, 2010
- RAJAK, P.; VIJAYALAKSHMI, M. A.; JAYAPRAKASH, N. S. Purification of monoclonal antibodies, IgG1, from cell culture supernatant by use of metal chelate convective interaction media monolithic columns. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 12, p. 1488-1493, 2012
- RALLA, K.; ANTON, F.; SCHEPER, T.; KASPER, C. Application of conjoint liquid chromatography with monolithic disks for the simultaneous determination of immunoglobulin G and other proteins present in a cell culture medium. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2671–2675, 2009
- ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, P.. **Imunologia**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2003.
- ROSA, P. A. J.; AZEVEDO, A. M.; FERREIRA, I. F.; VRIES, J.; KORPORAAL, R.; VERHOEF, H. J.; VISSER, T. J.; AIRES-BARROS, M. R. Affinity partitioning of human antibodies in aqueous two-phase systems. **Journal os Chromatography A**, v. 1162, p. 103-113, 2007
- ROQUE, A. C. A.; LOWE, C. R.; TAIPA, M. A. Antibodies and genetically eneneered related molecules: productionand purification. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 639-654, 2004

- ROQUE, A. C. A.; LOWE, C. R. Advances and application of de novo designed affinity ligands in proteomics. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 17-26, 2006
- ROQUE, A. C. A.; SILVA, C. S. O.; TAIPA, M. A. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 1160, p. 44-55, 2007
- SCOTT, M. G.; BRILE, D. E.; NAHM, M. H. **The human IgG subclasses: molecular analysis of structure and function**. Capítulo: Selective IgG subclass expression: biological, clinic and functional aspects. p. 161-183, Ed. F. Shakib, Pergamon Press, Oxford, 1990
- SERPA, G.; AUGUSTO, E. F. P.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; RIBEIRO, M. B.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G₁ monoclonal antibody. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p. 259-268, 2005
- SERRES, A.; MUELLER, D.; JOZEFONVICZ, J. Purification of monoclonal antibodies on dextran-coated silica support grafted by thiophilic ligand. **Journal of Chromatography A**, v. 711, p. 151-157, 1995
- SHI, Q.; ZHOU, Y.; SUN, Y. Influence of pH and ionic strength on the steric mass-action model parameters around the isoelectric point of protein. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 516-523, 2005
- SHUKLA, A. A.; HUBBARD, B.; TRESSEL, T.; GUNHAN, S.; LOW, D. Downstream processing of monoclonal antibodies-application of platform approaches. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 29-39, 2007
- SHUKLA, A. A.; THOMMES, J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 253-261, 2010
- SHUKLA, A. A. , GOTTSCHALK, U. Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. **Trends in Biotechnology**, v. 31, p. 147-154, 2013

- SMIECHOWSKI, M. Theoretical pKa prediction of O-phosphoserine in aqueous solution. **Chemical Physics Letters**, v. 501, p. 123–129, 2010.
- SMITH, A.; NEWCOMER, C. E.; QUIMBY, F. W.; FOS, J. G.; DAVISSON, M.; BARTHOLD, S. **The mouse in biomedical research**, vol 3, Academic Press, 2006, 809 p
- SOOD, N.; CHAUDHARY, D. K.; SINGH, A.; RATHORE, G. Monoclonal antibody to serum immunoglobulins of *Clarias batrachus* and its application in immunoassays. **Gene**, v. 511, p. 411-419, 2012
- SOUZA, M. C. M.; BRESOLIN, I. T. L.; BUENO, S. M. A. Purification of human IgG by negative chromatography on ω -aminoethyl-agarose. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 557-566, 2010
- SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. **Bio Essays**, v.10, p. 170-175, 1989
- SUN, H.; ZHANG, L.; CHAI, H.; YU, J.; QIAN, H.; CHEN H. A study of human γ -globulin adsorption capacity of PVDF hollow fiber affinity membranes containing different amino acid ligands. **Separation and Purification Technology**, v. 48, p. 215-222, 2006
- TAMASHIRO, W. M. S. C. **Obtenção e estudo de anticorpos monoclonais anti-*Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909**. Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 82 p., 1988. Tese (Doutorado).
- TISHCHENKO, G.; DYBAL, J.; MÉSZÁROSOVA, K.; SEDLÁKOVÁ, Z.; BLEHA, M. Purification of the specific immunoglobulin G1 by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel complexes of chelating porous and nonporous polymeric sorbents based on poly(methacrylic esters) Effect of polymer structure. **Journal of Chromatography A**, v. 954, p. 115-126, 2002
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrlamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,v.76(9), p. 4350-4354, 1979.

- TREBAK, M.; CHONG, J. M.; HLYN, D.; SPEICHER, D. W. Efficient laboratory-scale production of monoclonal antibodies using membrane-based high-density cell culture technology. **Journal of Immunological Methods**, v. 230, p.59-70, 1995
- TSCHELIESSNIGA, A.; JUNGBAUER, A. High-performance monolith affinity chromatography for fast quantitation of immunoglobulin G. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2676-2682, 2009
- UNKELESS, J. C. , SCIGLIANO, E. , FREEDMA, V. H. Structure and function of human and murine receptors for IgG. **Annual Review of immunology**, v.6, p. 251-281, 1988
- VAN REIS, R.; ZYDNEY,A. Bioprocess membrane technology **Journal of Membrane Science**, v. 297, p. 16-50, 2007
- VERMASVUORI, RAISA. **Production of recombinant proteins and monoclonal antibodies – techno-conomical evaluation of the production methods**. Espoo, Finlândia : Helsinki University of Technology – Faculty of chemistry and materials sciences, 2009. 117 p.
- VERDOLIVA, A.; PANNONE, F.; ROSSI, M.; CASTELLO, S.; MANFREDI, V. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. **Journal of Immunological Methods**, v. 271, p. 77-88, 2002
- VIJAYALAKSHMI M. A. Pseudosecific ligand affinity chromatography. **Trends in Biotechnology**, v. 7, p. 71-76, 1989
- VLUG, A.; REMORTEL, V. P. The structure and function of human IgG subclasses. **American Clinical Laboratory**, v. 8, p.28-36, 1989
- WANG, W.; SINGH, S.; ZENG, D. L.; KING, K.; NEMA, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 1, p. 1-26, 2007
- WANG, L.; MAH, K. Z.; GHOSH, R. Purification of human IgG using membrane based hybrid bioseparation technique and its variants: A comparative study. **Separation and Purification Technology**, v. 66, n. 1, p. 242-247, 2009

- WONG, J.; ALBRIGTH, R. L.; WANGN, N. H. W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) – chemistry and bioseparation applications. **Separation and Purification Methods**, v. 20 n. 1, p. 49-106, 1991
- ZACHARIOU, M.; TRAVERSE, I.; HEARN, M. T. W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXXXI. O-phosphoserine as a new chelating ligand for use with hard Lewis metal ions in the immobilized-metal affinity chromatography of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 646, p. 107-120, 1993
- ZACHARIOU, M.; HEARN, M. T. W. Application of Immobilized Metal Ion Chelate Complexes as Pseudocation Exchange Adsorbents for Protein Separation. **Biochemistry**, v. 35, p. 202-211, 1996
- ZACHARIOU, M.; TRAVERSE, I.; SPICCIA, L.; HEARN, M. T. W. Potentiometric investigations into de acid-base and metal ion binding properties of immobilized metal ion affinity chromatographic (IMAC) adsorbents. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, p. 12680-12690, 1996
- ZACHARIOU, M. e HEARN, M. T. W. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilized hard Lewis metal ion-chelate adsorbents. **Journal of Chromatography A**, v.890, p. 95-116, 2000
- ZAMOLO L.; BUSINI V.; MOIANI D.; MOSCATELLI D.; CAVALLOTTI C. Molecular Dynamic Investigation of the Interaction of Supported Affinity Ligands with Monoclonal Antibodies. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 527-539, 2008
- ZHUANG, R.; ZHANG, Y.; ZHANG, R.; SONG, C.; YANG, K.; YANG, A.; JIN, B. Purification of GFP fusion proteins with high purity and yield by monoclonal antibody-coupled affinity column chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 59, p. 138-143, 2008

APÊNDICE A

Neste anexo são apresentados os perfis cromatográficos com sobreposição de suas respectivas replicatas, bem como a replicata dos perfis eletroforéticos dos ensaios de investigação da melhor condição tamponante para adsorção seletiva do anticorpo monoclonal IgG_{2a} anti-*T. cruzi* ao adsorvente agarose-CNBr-OPS. Os respectivos balanços de massa também estão apresentados neste apêndice.

Sistema tamponante Tris-HCl

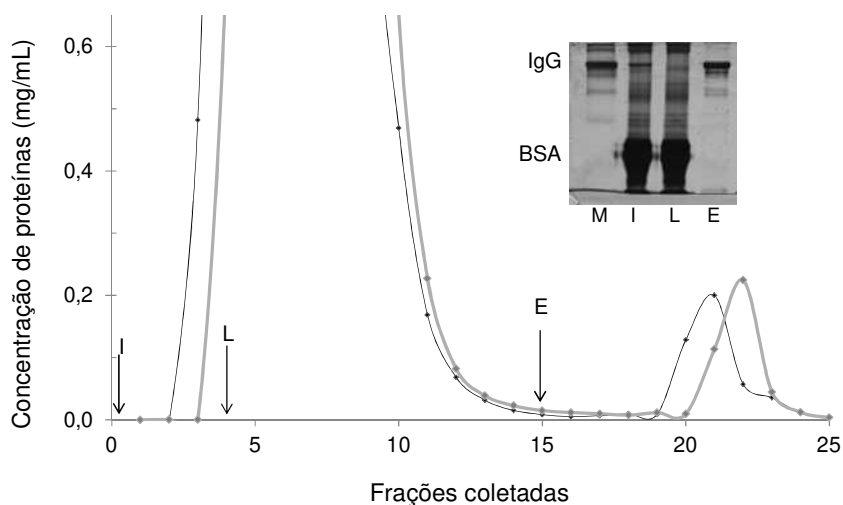


Figura A - 1 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,19 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Eluição: Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.

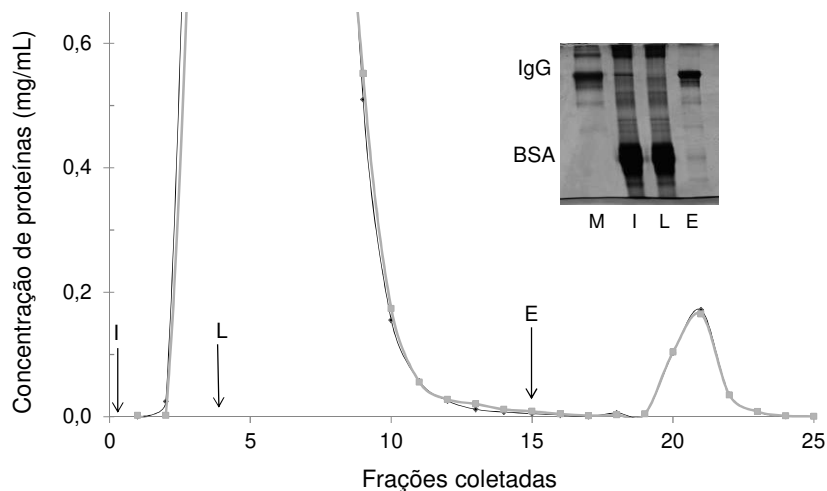


Figura A - 2 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,19 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0. Eluição: Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 8,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.

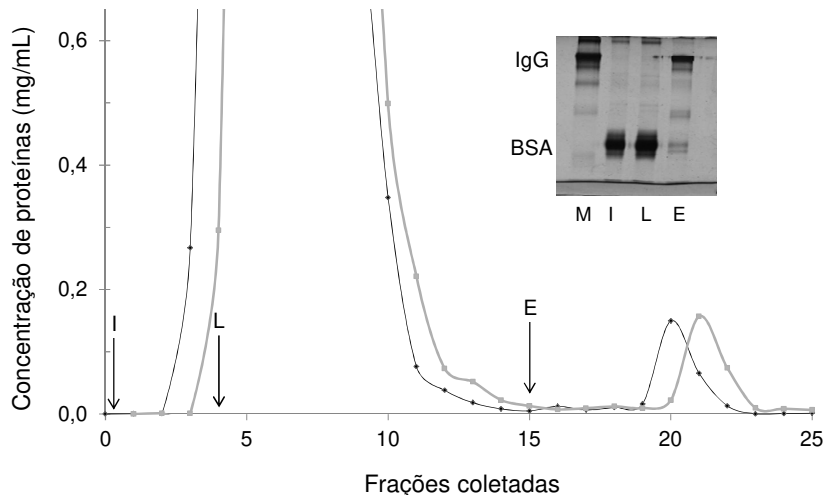


Figura A - 3 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: Tris-HCl 50 mmol/L pH 9,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [4,87 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 9,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L pH 9,0. Eluição: Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 9,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.

Tabela A - 1 Balanço de massa das cromatografias utilizando o sistema tamponante Tris-HCl 50 mmol/L. A dessorção foi realizada com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L ao tampão de equilíbrio.

Frações	pH 7,0		pH 8,0		pH 9,0	
	PT (mg) ^a	PT (%) ^b	PT (mg) ^a	PT (%) ^b	PT (mg) ^a	PT (%) ^b
Injeção	20,05	100	19,99	100	19,49	100
Lavagem	19,30	96,2	19,82	99,2	20,79	106,7
Eluição	0,49	2,4	0,35	1,7	0,28	1,4
Recuperação	19,79	98,7	20,17	100,9	21,07	108,1
Replicatas						
Injeção	20,76	100	20,98	100	21,23	100
Lavagem	20,43	98,4	20,42	97,3	22,11	104,2
Eluição	0,42	2,0	0,34	1,6	0,31	1,5
Recuperação	20,85	100,5	20,76	98,9	22,42	105,6

PT – Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Sistema tamponante fosfato de sódio

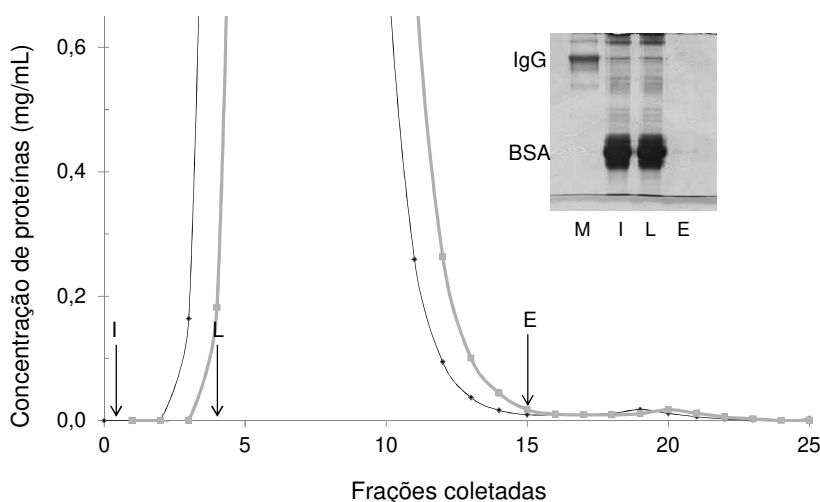


Figura A - 4 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,34 mg/mL] em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,5. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,5. Eluição: fosfato de sódio 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 6,5. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.

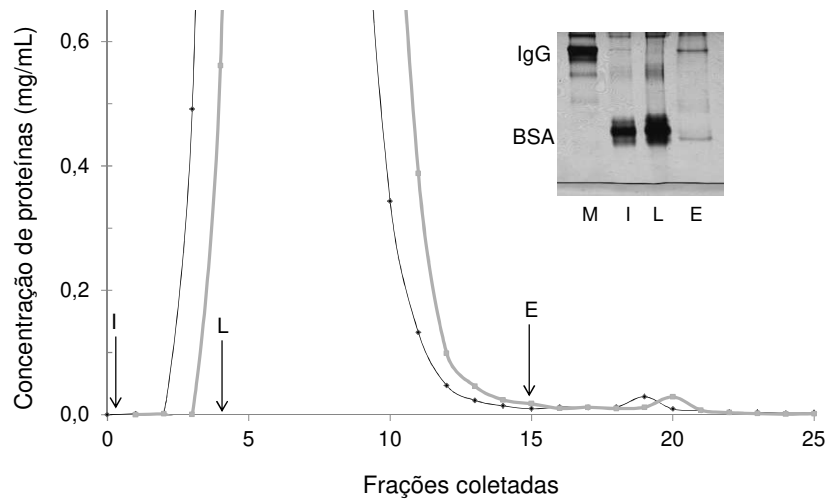


Figura A - 5 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,2 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [4,82 mg/mL] em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0. Eluição: fosfato de sódio 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.

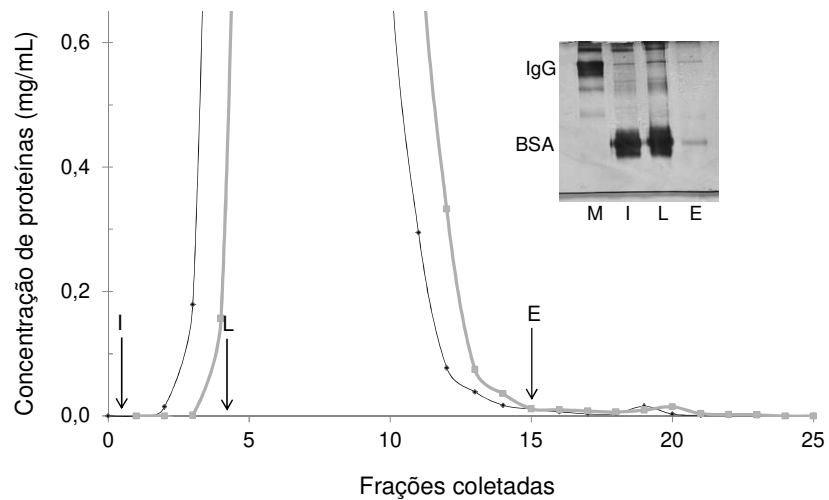


Figura A - 6 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,5. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,58 mg/mL] em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,5. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,5. Eluição: fosfato de sódio 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,5. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.

Tabela A - 2 Balanço de massa das cromatografias utilizando tampão de equilíbrio Fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 6,5; 7,0 e 7,5. A dessorção foi realizada com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L.

Frações	pH 6,5		pH 7,0		pH 7,5	
	PT (mg) ^a	PT (%) ^b	PT (mg) ^a	PT (%) ^b	PT (mg) ^a	PT (%) ^b
Injeção	21,59	100	20,28	100	19,55	100
Lavagem	19,98	92,5	20,34	100,3	19,74	100,9
Eluição	0,06	0,30	0,08	0,4	0,06	0,3
Recuperação	20,04	92,8	20,42	100,7	19,79	101,2
Replicatas						
Injeção	22,02	100	20,28	100	20,62	100
Lavagem	20,17	91,6	19,53	96,3	19,92	96,6
Eluição	0,07	0,3	0,09	0,5	0,04	0,2
Recuperação	20,24	91,9	19,62	96,7	19,96	96,8

PT – Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Sistema tamponante MOPS

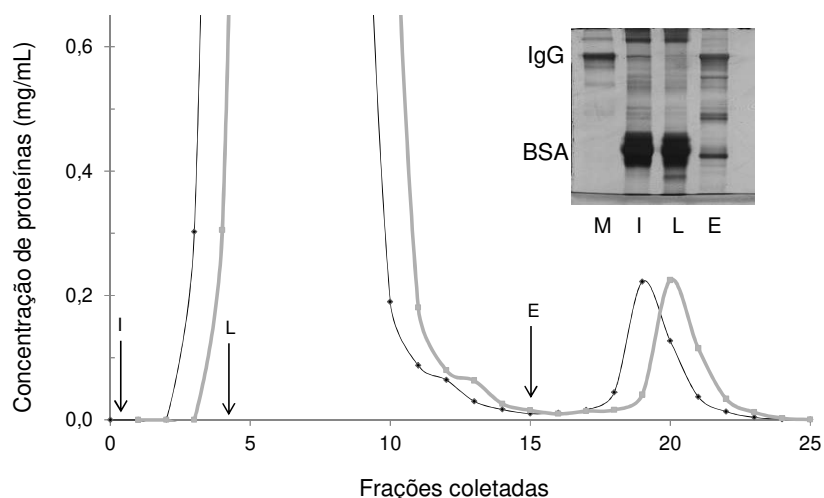


Figura A - 7 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: MOPS 50 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [4,72 mg/mL] em tampão MOPS 50 mmol/L pH 6,5. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: MOPS 50 mmol/L pH 6,5. Eluição: MOPS 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 6,5. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.

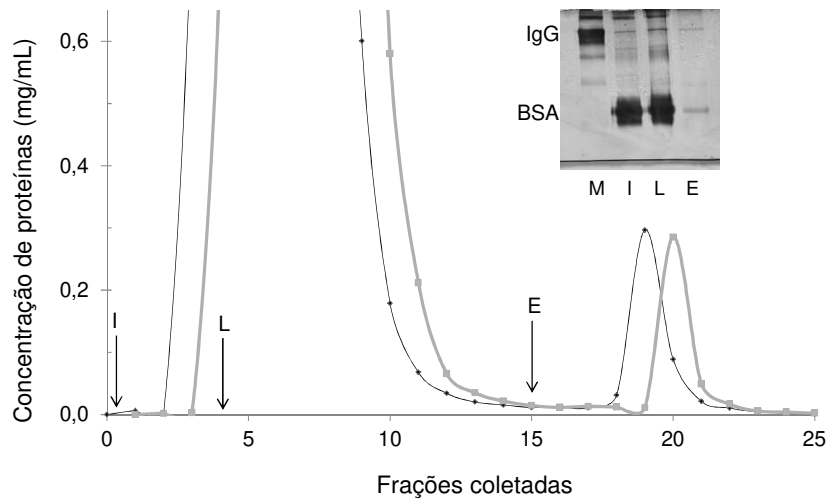


Figura A - 8 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: MOPS 50 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,02 mg/mL] em tampão MOPS 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: MOPS 50 mmol/L pH 7,0. Eluição: MOPS 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,0. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.

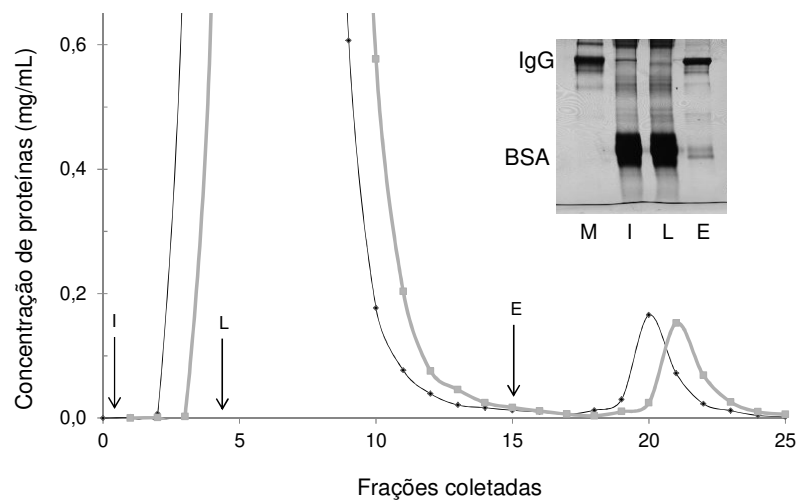


Figura A - 9 Perfis cromatográficos e replicata do perfil eletroforético da purificação de AcM anti-*T.cruzi* do isotipo IgG_{2a} (obtido a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas) em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Sistema tamponante: MOPS mmol/L pH 7,9. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 4,0 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,55 mg/mL] em tampão MOPS 50 mmol/L pH 7,9. Volume das frações coletadas: 1,0 mL. Lavagem: MOPS 50 mmol/L pH 7,9. Eluição: MOPS 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,9. Eletroforese: M- marcador de IgG (Aventis), I- amostra de injeção, L- lavagem, E- eluição.

Tabela A - 3 Balanço de massa das cromatografias utilizando tampão de equilíbrio MOPS 50 mmol/L, pH 6,5; 7,0 e 7,9. A dessorção foi realizada com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L.

Frações	pH 6,5		pH 7,0		pH 7,9	
	PT (mg) ^a	PT (%) ^b	PT (mg) ^a	PT (%) ^b	PT (mg) ^a	PT (%) ^b
Injeção	18,88	100	20,10	100	22,21	100
Lavagem	17,66	93,5	17,90	89,1	20,59	92,7
Eluição	0,48	2,5	0,40	2,0	0,34	1,5
Recuperação	18,14	96,1	18,30	91,1	20,93	94,2
Replicatas						
Injeção	18,88	100	20,10	100	21,80	100
Lavagem	17,52	92,8	18,31	91,1	20,31	93,1
Eluição	0,46	2,4	0,48	2,4	0,31	1,4
Recuperação	17,98	95,2	18,79	93,5	20,62	94,6

PT – Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

APÊNDICE B

Neste apêndice encontram-se as replicatas dos perfis cromatográficos e eletroforéticos apresentados na sessão 4.2.1 deste trabalho. São apresentas também as replicatas do ensaio de curva de ruptura e do balanço de massa da melhor condição de purificação do anticorpo monoclonal IgG_{2a} anti-*T. cruzi* ao adsorvente agarose-CNBr-OPS.

Replicata dos perfis cromatográficos e eletroforéticos em OPS-agarose

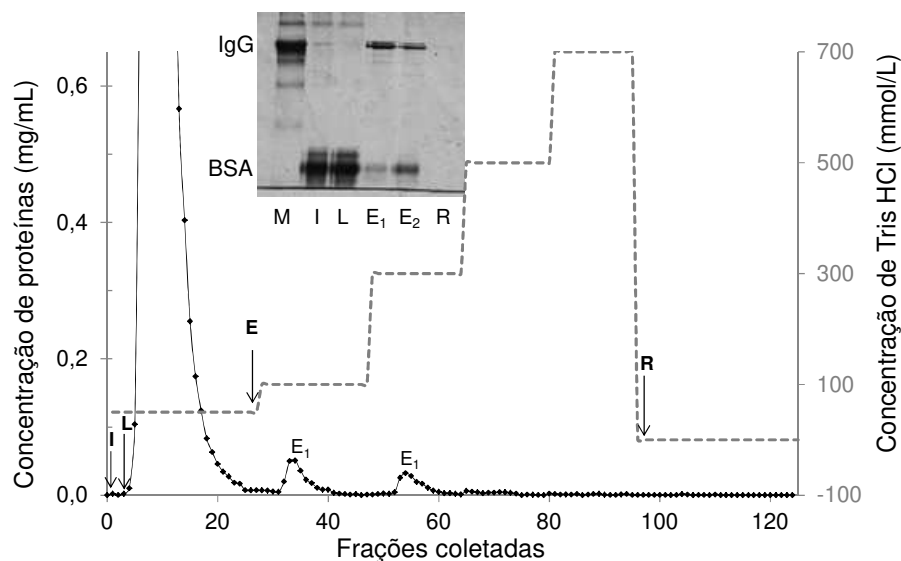


Figura B - 1 Replicata do experimento apresentado na **Figura 4-3**.

Perfil cromatográfico e eletroforético da cromatografia de sobrenadante de cultura de hibridomas secretores de AcM anti-*T.cruzi* em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS com o íon metálico Ni²⁺ quelatado. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 2,4 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,16 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 0,7 mL. Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Eluição: degrau de Tris-HCl 100, 300, 500 e 700 mmol/L pH 7,0. Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 6,5. Eletroforese: M-marcador de IgG (Aventis), I-amostra de injeção, L-lavagem, E₁-eluição 100 mmol/L, E₂-eluição 300 mmol/L, R-regeneração

Tabela B - 1 Replicata do balanço de massa apresentado na **Tabela 4-2**.

Balanço de massa da cromatografia em agarose-OPS-Ni²⁺ utilizando tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris-HCl, pH 7,0.

Frações	Tris-HCl (mmol/L)	PT (mg) ^a	PT (%) ^b
Injeção		12,45	100
Lavagem	50	12,27	98,6
Eluição	100	0,16	1,3
	300	0,15	1,22
Recuperação		12,64	101,5
Proteínas totais adsorvidas		0,37	2,9

PT – Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

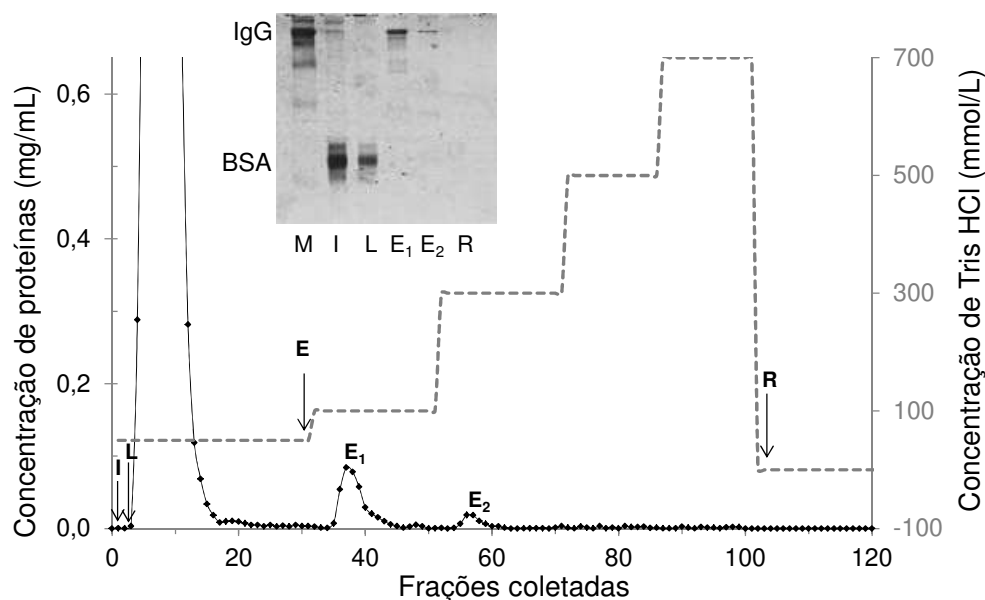


Figura B - 2 Replicata do experimento apresentado na **Figura 4-4**.

Perfil cromatográfico e eletroforético da cromatografia de sobrenadante de cultura de hibridomas secretores de AcM anti-*T.cruzi* em coluna contendo 1,0 mL de agarose-CNBr-OPS. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 2,4 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,73 mg/mL] em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 0,7 mL. Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Eluição: degrau de Tris-HCl 100, 300, 500 e 700 mmol/L pH 7,0. Regeneração: NaOH 25 mmol/L. Eletroforese: M-marcador de IgG (Aventis), I-amostra de injeção, L-lavagem, E₁-eluição 100 mmol/L, E₂-eluição 300 mmol/L, R-regeneração.

Tabela B - 2 Replicata do balanço de massa apresentado na **Tabela 4-3**.

Balanço de massa da cromatografia em agarose-CNBr-OPS utilizando tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris.

Frações	Tris-HCl (mmol/L)	PT (mg) ^a	PT (%) ^b
Injeção		12,76	100
Lavagem	50	11,63	91,1
Eluição	100	0,25	1,9
	300	0,07	0,5
Recuperação		12,01	94,1
Proteínas totais adsorvidas		0,38	3,0

PT – Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

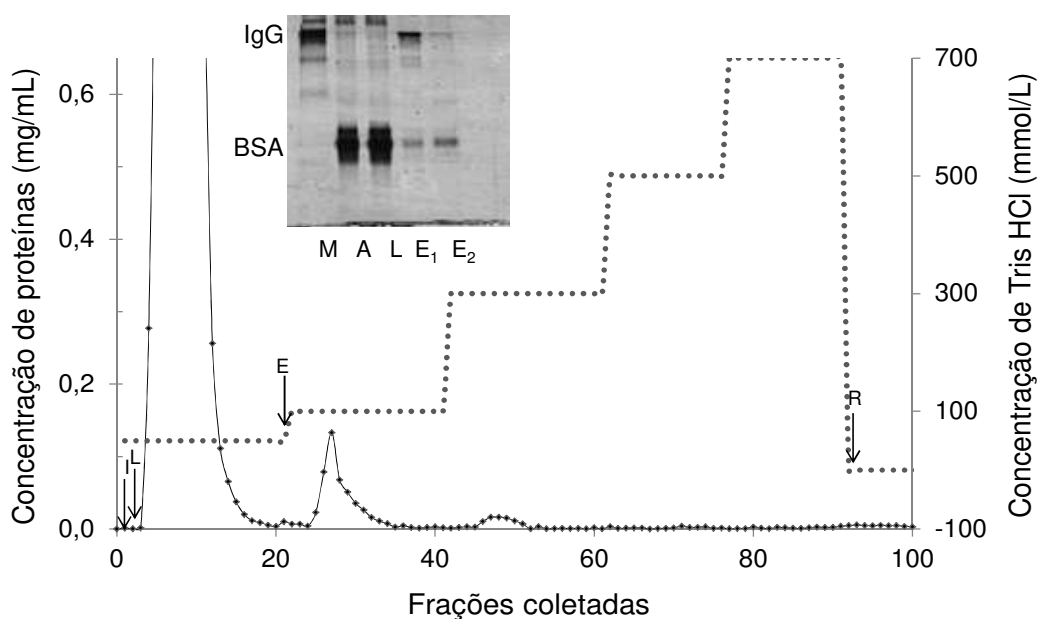


Figura B - 3 Replicata do experimento apresentado na **Figura 4-5**.

Perfil cromatográfico e eletroforético da cromatografia de sobrenadante de cultura de hibridomas secretores de AcM anti-*T.cruzi* em coluna contendo 1,0 mL de agarose-bisoxirano-OPS. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção: 2,4 mL de sobrenadante precipitado e dialisado [5,32 mg/mL] em Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0. Volume das frações coletadas: 0,7 mL. Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0; Eluição: degrau de Tris-HCl 100, 300, 500 e 700 mmol/L pH 7,0. Regeneração: NaOH 25 mmol/L. Eletroforese: M-marcador de IgG (Aventis), I-amostra de injeção, L-lavagem, E₁-eluição 100 mmol/L, E₂-eluição 300 mmol/L, R-regeneração.

Tabela B - 3 Balanço de massa da cromatografia em agarose-bisoxirano-OPS utilizando tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção por gradiente de grau de aumento da concentração de Tris.

Frações	Tris-HCl (mmol/L)	PT (mg) ^a	PT (%) ^b
Injeção		12,76	100
Lavagem	50	11,63	91,1
Eluição	100	0,34	2,7
	300	0,07	0,5
Recuperação		12,10	94,8
Proteínas totais adsorvidas		0,41	3,2

PT-Proteína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Balanço de massa da melhor condição para purificação encontrada

Tabela B - 4 Balanço de massa da cromatografia em agarose-CNBr-OPS utilizando tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0 e dessorção com acréscimo de NaCl 1,0 mol/L.

Frações	PT ^a (mg)	PT (%)	IgG ^b (µg)	Recuperação IgG (%)	Massa Específica ^c	Fator Purificação ^d
Injeção	20,76	100	799,78	100	38,53	1,0
Lavagem	20,43	98,4	77,57	9,7	3,80	0,1
Eluição	0,42	2,0	596,85	74,6	1421,1	36,9
Recuperação	20,85	100,4	674,42	84,3		

PT – Protína total

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

^b Massa calculada por meio de dosagem pelo método de ELISA

^c Razão entre a massa de IgG_{2a} (µg) e a massa total de proteínas (mg)

^d Razão entre a Massa Específica de cada fração e a massa específica de injeção

Curva de Ruptura

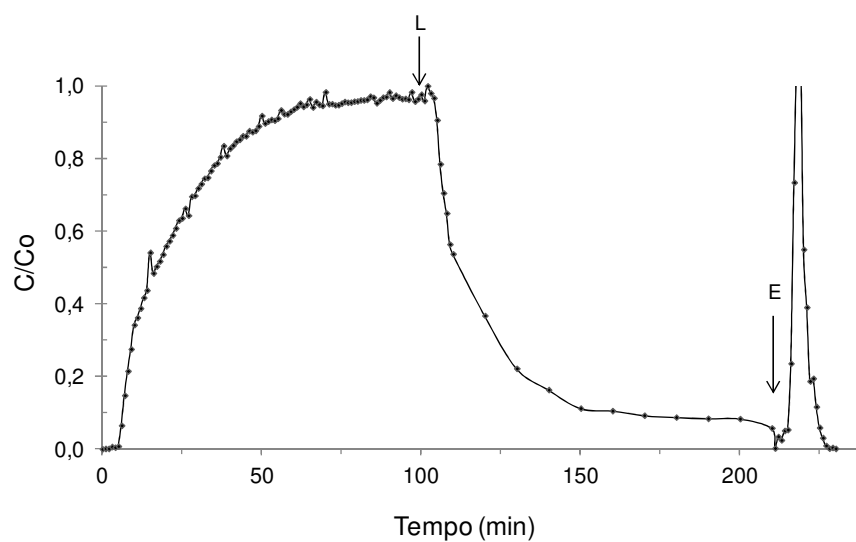


Figura B - 4 Replicata do experimento apresentado na **Figura 4-11**.

Curva de ruptura da cromatografia de IgG_{2a} anti-*T. cruzi* em agarose-CNBr-OPS utilizando Tris-HCl pH 7,0 como sistema tamponante. Alimentação: 45,0 mL de anticorpo purificado [200 µg/mL]. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 0,5 mL de 0 a 110 min e de 210 a 230 min; 5,0 mL de 111 a 210 min.