

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

GISELE LUIZA PAVAN

Orto-fosfo-L-tirosina como ligante para purificação de IgG humana por cromatografia de pseudobioafinidade

CAMPINAS

2018

GISELE LUIZA PAVAN

Orto-fosfo-L-tirosina como ligante para purificação de IgG humana por cromatografia de pseudobioafinidade

> Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: SÔNIA MARIA ALVES BUENO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA GISELE LUIZA PAVAN E ORIENTADA PELA PROFª. DRª. SÔNIA MARIA ALVES BUENO.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/12705-9

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

P288o	Pavan, Gisele Luiza, 1985- Orto-fosfo-L-tirosina como ligante para purificação de IgG humana por cromatografia de pseudobioafinidade / Gisele Luiza Pavan. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.
	Orientador: Sônia Maria Alves Bueno. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	 Cromatografia de afinidade. 2. Imunoglobulina G. 3. Aminoácidos. 4. Ligantes. I. Bueno, Sôhia Maria Alves, 1961 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Ortho-phospho-L-tyrosine as ligand in pseudobioaffinity chromatography for human IgG purification Palavras-chave em inglês: Affinity chromatography Immunoglobulin G Amino acid Ligands Área de concentração: Engenharia Química Titulação: Doutora em Engenharia Química Banca examinadora: Sônia Maria Alves Bueno Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro Patrícia Ucelli Simioni Luis Antônio Peroni Everson Alves Miranda Data de defesa: 27-10-2017 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Gisele Luiza Pavan e aprovada em 27 de outubro de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno Faculdade de Engenharia Química/Universidade Estadual de Campinas

> Prof^a. Dr^a. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas

> > Prof^a. Dr^a. Patrícia Ucelli Simioni Faculdade de Americana

Prof. Dr. Luis Antônio Peroni CNPEM/LNBio

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Faculdade de Engenharia Química/Universidade Estadual de Campinas

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica da aluna.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus, pois "Nele encontro descanso" (Mateus 11:29)

Ao meu esposo Lucas por todo amor, companheirismo e apoio durante todo esse longo período de doutorado. Por todas as vezes que me incentivou e me impulsionou a dar o melhor de mim. Ao nosso filho Felipe que embora tão pequenininho me transforma a cada dia participou de forma especial na conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Luiz e Vanderli, que mesmo longe não mediram esforços para me amar, apoiar e vibrar com cada fase desse meu aprendizado.

Aos meus irmãos, tanto de sangue quanto da fé, que estiveram sempre ao meu lado.

À professora Dra. Sonia Maria Alves Bueno pela orientação, paciência, dedicação e pelos ensinamentos.

Aos professores Dra. Ângela Maria Moraes e Dr. Everson Alves Miranda por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios. Às professoras Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro e Dra. Patricia Ucelli Simioni pelas instalações de seus laboratórios e o tempo dividindo seus conhecimentos.

Aos amigos Cecília, Dani, Gabriela, Luana, Virginia, Cris e Juliano pela amizade, ajuda e convivência.

Ao CNPq e CAPES pela concessão da bolsa de estudo. Ao CNPq, à FAPESP e à CAPES/Proex, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A orto-fosfo-L-tirosina (P-Tyr) é um derivado do aminoácido tirosina, obtido pela substituição do grupamento hidroxil por um grupamento fostato, processo conhecido como fosforilação. P-Tyr foi imobilizado em gel de agarose ativado com 1,4 butanodiol diglicidil éter (bisoxirano) e, em seguida, o efeito do tipo de sistema tamponante, do pH e da condutividade, foram estudados para avaliar a natureza da interação entre IgG-P-Tyr. A análise da contribuição dos diferentes grupamentos funcionais presentes na estrutura do P-Tyr na adsorção de IgG humana indicou a predominância de interação eletrostática através do grupamento fosfato, embora a contribuição dos grupamentos aromáticos e carboxílico não possa ser descartada. Foi possível obter IgG com pureza maior que 90% guando o plasma foi diluído em três deles: HEPES, a 25 mmol L⁻¹ pH 7,0, Tris-HCI e fosfato de sódio (NaP), a 10 mmol L⁻¹ em pH 7,0 e 6,0, respectivamente. Para o sistema tamponante EPES, a capacidade máxima de adsorção de IgG foi de 273,51 \pm 12,63 mg g⁻¹, obtida a 20°C e para o NaP foi de 179,00 ± 10,31 mg g^{-1,} a 25°C. A constante de dissociação foi da ordem de 10⁻⁵ mol L⁻¹, indicando afinidade média de IgG por P-Tyr. Foi possível obter o fragmento Fab sem contaminação de fragmentos Fc na etapa de eluição (baseado na análise de Western blot), com 98% de pureza e 86% de recuperação somente para o sistema tamponante HEPES 25 mmol L⁻¹ pH 7,0.

ABSTRACT

The ortho-fosfo-L-tyrosine (P-Tyr) is an amino acid derivative, that is obtained, replacing the hydroxyl group by a phosphate group, process known as phosphorylation. P-Tyr was firstly immobilized in agarose gel activated with 1,4 (bisoxiran), then the effect of buffer systems, pH and conductivity were studied in order to evaluate the nature of the interaction between IgG and P-Tyr. The analysis of how the various functional groups present in the P-Tyr chemical structure contribute to the adsorption of human IgG indicated the predominance of electrostatic interaction through the phosphate group, although the contribution of the carboxylic and aromatic groupings cannot be discarded. Purity greater than 90% was obtained for three of them: 25 mmol L⁻¹HEPES at pH 7.0; 10 mmol L⁻ ¹Tris-HCl at pH 7.0 and 10 mmol L⁻¹sodium phosphate (NaP) at pH 6.0. For the buffer system 25 mmol L⁻¹ HEPES at pH 7.0, the maximum adsorption capacity was achieved at 20 °C and was of 273.51 \pm 12.63 mg g⁻¹, while for 10 mmol L⁻ ¹NaP at pH 6.0 it was of 179.00 + 10.31 mg g⁻¹, reached at 25 °C. Furthermore, the dissociation constant for these both buffers system were of the order of 10⁻⁵ mol L⁻¹, which indicates a medium affinity. Fab fragment was successfully adsorbed without Fc contamination when the buffering system 25 mmol L ¹HEPES at pH 7.0 was applied (Western blot based), resulting in a 86% of recuperation and 98% of purity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Etapas realizadas para o estudo de adsorção de IgG 17 humana no adsorvente P-Tyr-agarose.

Figura 1.2: Etapas realizadas para o estudo da purificação de IgG **18** humana a partir do plasma humano no adsorvente P-Tyr-agarose.

Figura 1.3: Etapas realizadas para o estudo da purificação do **18** fragmento Fab a partir de solução de IgG humana clivada pela enzima papaína no adsorvente P-Tyr-agarose.

Figura 2.1: Estrutura da IgG e seus fragmentos obtidos por meio da **20** ação proteolítica das enzimas papaína e pepsina (adaptado de ALBERTS et al., 1997).

Figura 5.1: Estrutura proposta do P-Tyr-agarose e as cargas **107** disponíveis em valores de pH neutro.

LISTA DE TABELA

Tabela 3.1: Fórmula estrutural e pKa dos ligantes estudados

27

SUMÁRIO

PREFÁCIO		
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO		
1.1. OBJETIVO	16	
1.2. ESTRATÉGIA DE TRABALHO	17	
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA		
2.1. IMUNOGLOBULINA G: ESTRUTURA E FUNÇÃO	19	
2.2. PURIFICAÇÃO DE IgG	21	
2.2.1. Aminoácidos como ligantes em cromatografia de afinidade	23	
2.2.2. Orto-fosfo-L-tirosina (P-Tyr)	25	
CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS	27	
3.1. MATERIAL	27	
3.1.1. Ligantes estudados	27	
3.1.2. Plasma humano	28	
3.1.3. Reagentes	28	
3.2. MÉTODOS		
3.2.1. Ativação do gel de agarose com bisoxirano e imobilização dos ligantes	29	
3.2.2. Obtenção dos fragmentos de IgG humana	30	
3.2.3. Ensaios cromatográficos	30	
3.2.4. Cinética de adsorção de IgG humana em P-Tyr-agarose	31	
3.2.5. Isotermas de adsorção IgG humana em P-Tyr-agarose	32	
3.2.6. Parâmetros termodinâmicos	33	
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	34	

3.3.1. Dosagem de proteína total	34			
3.3.2. Eletroforese SDS-PAGE	34			
3.3.3. Determinação do ponto isoelétrico	35			
3.3.4. Enzyme Linked Immunonosorbent Assay (ELISA): Dosagem de IgG, IgA, IgM, transferrina (TRF) e albumina humana (HSA)	35			
2.2.6. Densitemetria des géis de SDS PAGE	36			
5.5.0. Densitometha dos gels de SDS-FAGE	37			
3.3.7. Quantificação de Fab por imunodifusão radial (RID)	37			
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO				
4.1. ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS FUNCIONAIS DO P- Tyr NA ADSORÇÃO DE IgG HUMANA				
4.2.PURIFICAÇÃO DE IgG A PARTIR DO PLASMA HUMANO E FRAGMENTO Fab EM P-Tyr-AGAROSE				
CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO GERAL				
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES				
CAPÍTULO 7. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS				
CAPÍTULO 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS				
ANEXO 1				
ANEXO 2				
ANEXO 3				

PREFÁCIO

Esta tese foi desenvolvida na Faculdade de Engenharia Química no Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos (DEMBio) e inclui em seus capítulos dois artigos de minha co-autoria. Esse modelo de apresentação é uma opção validada pelo artigo 2º da Informação CCPG/001/2015, de 17/06/2015 (ANEXO 1).

Como exigido esta tese consta de uma introdução que abrange o contexto atual na purificação de IgG, objetivo e estratégia de trabalho. Na Fundamentação Teórica são detalhados os aspectos específicos da imunoglobulina G, assim como as técnicas utilizadas para sua purificação. Para este trabalho, a técnica utilizada foi a cromatografia de afinidade e, juntamente com a descrição desta técnica, foram também apresentadas as características e aplicações dos ligantes propostos neste trabalho. A seção Resultados e Discussão foi dividida em dois tópicos que correspondem à apresentação de dois artigos, um publicado e outro submetido, seguido de uma discussão geral.

O artigo já publicado *Phosphorylated-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G* (publicado em Journal of Chromatography B, volume 1052, páginas 10-18, 2017) apresenta um estudo sobre a adsorção de IgG humana no ligante derivado de aminoácido orto-fosfo-L-tirosina (P-Tyr) avaliando o efeito do sistema tamponante, do pH e da condutividade na interação da IgG com o ligante. Também apresenta um estudo sobre a contribuição dos diferentes grupamentos funcionais presentes na estrutura do P-Tyr quando comparado com ligantes controles. A aplicação do P-Tyr foi estudada para a purificação de IgG a partir do plasma humano.

O artigo submetido *The effect of the buffer system on the adsorption of human IgG and Fab fragments onto phospho-L-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent* apresenta um estudo sobre o efeito do sistema tamponante na adsorção seletiva de IgG a partir do plasma humano e do fragmento Fab a partir de uma solução resultante da clivagem da IgG pela enzima papaína que consiste em (Fab+Fc+IgG intacta) em cromatografia de afinidade utilizando como matriz o P-Tyr-agarose.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

A pesquisa na área de purificação de bioprodutos tem possibilitado grande desenvolvimento de técnicas de separação de proteínas e peptídeos para uso terapêutico, diagnóstico e para obtenção de vacinas. Proteínas e peptídeos para estas aplicações têm sido obtidos a partir de fluidos ou tecidos humanos, animais e vegetais, ou produzidos em cultura de células modificadas geneticamente ou não (LIMA et al., 2001, DUROCHER e BUTLER, 2009, ZHAO et al., 2014; ELVIN et al., 2013; BAKHSHPOUR et al., 2016).

Anticorpos representam uma importante categoria de biomoléculas devido ao seu crescente emprego no tratamento e diagnóstico de várias doenças, bem como em pesquisa em imunoproteômica (ANDERSEN E REILLY, 2004; ROQUE et al., 2004; NILSSON et al., 2005; TJALSMA et al., 2008, ARORA et al, 2017). No entanto, a maior parte dessas aplicações exigem uma solução homogênea de alta pureza o que é limitado pela natureza proteica complexa do meio ou fluido em que são obtidas essas biomoléculas. A purificação de muitos bioprodutos ainda permanece um desafio, visto que os processos de purificação são, de maneira geral, multietapas, longos e de alto custo (LOWE, 2001, ROQUE et al., 2007, AYYAR et al., 2012).

As técnicas cromatográficas empregadas para purificação de anticorpos policionais e monocionais são basicamente as mesmas, envolvendo uma combinação de métodos que exploram diferentes tipos de interações (ROQUE et al., 2005). A cromatografia de afinidade com os ligantes bioespecíficos imobilizados, proteínas A, G ou L, tem sido comumente empregada para purificação de anticorpos (NILSON et al., 1993; AYBAY, 2003, ROQUE et al., 2005, ROQUE e LOWE, 2005, ADIKANE e IYER, 2013). No entanto, esses adsorventes apresentam custo elevado e algumas limitações a serem contornadas como, por exemplo, a inativação da matriz devido as condições extremas de sanitização, que acarreta na perda da capacidade de adsorção (ARNOLD et al., 2006; SHENG e KONG, 2012).

Uma alternativa aos ligantes bioespecificos são os ligantes pseudobioespecíficos, que apresentam algumas vantagens tais como: baixo custo, simplicidade e robustez. Dentre os vários ligantes pseudobioespecíficos

que têm sido propostos em alternativa às proteínas A, L e G pode-se citar os aminoácidos. Estes vêm sendo muito estudados atualmente por apresentarem estrutura química simples, baixo custo, além da alta capacidade de adsorção, alta estabilidade em diferentes condições químicas/físicas e resistência à degradação microbiológica (VIJAYALAKSHMI, 1989; ANSPACH et al.,1996; CHAMPAGNE et al., 2007). A literatura relata vários aminoácidos e derivados de aminoácidos como ligantes em cromatografia visando a purificação de IgG, tais como histidina, fenilalanina, arginina, poli-L-lisina (PLL), o-fosfo-L-serina (OPS) e triptofano (BUENO et al., 1995; GAN et al., 2000; PITIOT et al., 2001; SUN et al., 2006; BAYRAMOGLU et al., 2007; BRESOLIN et al., 2009; SOUZA et al., 2010; BRESOLIN et al., 2011; NAIK et al., 2011; VICTOR e SHARMA, 2011; BRESOLIN e BUENO, 2012).

Por meio de técnicas de modelagem molecular ("molecular docking"), Naik e colaboradores (2011) demonstraram que os resíduos dos aminoácidos triptofano (indol), fenilalanina (fenil) e tirosina (fenol) participam diretamente na formação do complexo de interação entre a molécula de IgG humana e o sítio de ligação da proteína A (domínio B). Com base nessas informações, os autores imobilizaram esses aminoácidos em suportes sólidos via grupamento amino e os utilizaram como ligantes para purificação de IgG a partir do plasma humano, obtendo captura desta proteína em todos os adsorventes. No entanto, alto grau de pureza (90%) foi alcançado somente para triptofano como ligante, não sendo apresentado, no entanto, dados sobre recuperação. Os autores não elucidaram se a adsorção se deve predominantemente a interações hidrofóbicas entre as moléculas de IgG e os grupos aromáticos (indol, fenol e fenil) dos aminoácidos ou se a contribuição da carga negativa do grupo carboxílico também é significativa. O alto grau de pureza de IgG foi alcançado somente com a adição de PEG 600 (polietileno glicol) no sistema tamponante (nas etapas de adsorção e eluição), sendo necessária sua posterior remoção por diafiltração. Como os autores não demonstraram se a presença de PEG no sistema tamponante alterava ou não as características estruturais e funcionais das biomoléculas do plasma humano, não é recomendado o emprego imediato desse ligante para a purificação de IgG.

Aminoácidos contendo grupos iônicos livres para interação com proteínas do soro humano têm sido estudados por vários autores que verificaram que as forças que governam a adsorção são predominantemente de natureza eletrostática, embora outros tipos de interações não possam ser descartadas. Quanto à contribuição de grupos iônicos livres de resíduos de aminoácidos na purificação de IgG humana, vários autores têm verificado que as forças que governam a adsorção são predominantemente de natureza eletrostática das cadeias laterais de aminoácidos arginina, lisina e orto-fosfo-L-serina (OPS), embora outros tipos de contribuição não possam ser negligenciadas (BAYRAMOGLU et al., 2007; BRESOLIN et al., 2011; BRESOLIN e BUENO, 2012). Para os dois primeiros aminoácidos citados, os grupamentos livres para interação com IgG encontram-se positivamente carregados em ampla faixa de pH, sendo esta proteína obtida na fração não retida ("flowthrough"), enquanto que o OPS encontra-se negativamente carregado, proporcionando a adsorção de IgG.

Embora aminoácidos e seus derivados sejam muito empregados como ligantes para purificação de IgG de diversas fontes, a contribuição de diferentes grupos funcionais (iônicos e aromáticos) destes ligantes na adsorção de IgG ainda não foi completamente elucidada.

O aminoácido orto-fosfo-L-tirosina (P-Tyr), proposto neste trabalho, é resultado da fosforilação do aminoácido não essencial L-tirosina, ou seja, por meio de proteínas quinases o grupamento hidroxil da L-tirosina é substituído por um grupamento fosfato (HANKS e QUINN, 1991). A utilização deste aminoácido como ligante em cromatografia de afinidade se resume ao trabalho publicado por Afonso e colaboradores (2014) onde P-Tyr foi utilizado para a purificação do microRNA pre-MIR-29, que são moléculas de RNA não codificantes envolvidas na regulação pós-transcricional dos genes alvo. A interação hidrofóbica entre o grupamento aromático presente no P-Tyr e o RNA possibilitou a adsorção deste no ligante, com recuperação de 71% e pureza de 52%. Antes da realização deste trabalho não foram encontrados na literatura artigos que relatassem a utilização do P-Tyr para a purificação de IgG.

1.1 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo estudar o derivado de aminoácido ortofosfo-L-tirsosina (P-Tyr) imobilizado em agarose (previamente ativada com bisoxirano) na captura e purificação de IgG humana. A fim de avaliar a contribuição desses grupamentos na captura de IgG propôs-se avaliar a porcentagem de IgG adsorvida em P-Tyr comparando com os aminoácidos utilizados como controle, sendo eles: L-tirosina (L-Tyr), L-fenilalanina (L-Phe), tiramina (Tyra), fenetilamina (PEA), e com ácido amino-metil fosfórico (AMPA). O efeito do sistema tamponante, do pH, da condutividade e da força iônica na captura e/ou purificação de IgG foi também avaliado.

1.2. ESTRATÉGIA DE TRABALHO

Para atingir o objetivo proposto, o estudo foi conduzido em etapas conforme apresentado nos diagramas das Figuras 1.1, 1.2 e 1.3.



Figura 1.1: Etapas realizadas para o estudo da adsorção de IgG humana no adsorvente P-Tyr-agarose.



Figura 1.2: Etapas realizadas para o estudo da purificação de IgG humana a partir do plasma humano no adsorvente P-Tyr-agarose.



Figura 1.3: Etapas realizadas para o estudo da purificação do fragmento Fab a partir de solução de IgG humana clivada pela enzima papaína no adsorvente P-Tyr-agarose.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. IMUNOGLOBULINA G: ESTRUTURA E FUNÇÃO

A imunoglobulina G (IgG) é uma proteína que faz parte do sistema de defesa imunológica, sintetizada e secretada pelos linfócitos B das células plasmáticas e que atua diretamente na inativação e eliminação de um antígeno (MILSTEIN, 1980; ABBAS, 2003). Presente no plasma humano em concentração que varia de 8,0 mg mL⁻¹ a 18,0 mg mL⁻¹ (PUTNAM, 1984), a IgG pertence ao grupo das glicoproteínas com massa molar de 150 kDa, e é constituída de 82 a 96% de aminoácidos e 4 a 18% de carboidratos (HOLT et al., 2003). Quanto à estrutura e tamanho, apresenta duas cadeias polipeptídicas leves idênticas (C_L) com massa molar de 25 kDa e duas cadeias pesadas idênticas (C_P) com massa molar de 50 kDa (VLUG e VAN REMORTEL, 1989; ALBERTS et al., 1997). As quatro cadeias polipeptídicas se mantêm unidas por ligações dissulfeto e por ligações não covalentes, estruturadas em forma de "Y" (Figura 1) (ROQUE et al., 2007; REN et al., 2008; COSTA et al., 2010).

A ação específica da IgG na proteção contra agentes patogênicos tem relação com duas regiões presentes em sua estrutura, a porção Fab e Fc. A porção Fab contêm o sítio de ligação ao antígeno e a porção Fc é responsável pela atividade efetora da IgG, ou seja, atua diretamente em funções biológicas, tais quais: a indução de fagocitose por leucócitos fagocíticos e citotoxicidade celular dependente de anticorpos por células NK, fagocitose de antígenos ligados a anticorpos, da ativação de mastócitos e do direcionamento e ativação de linfócitos B derivados da medula óssea (ABBAS e LICHTMAN, 2003, BOURNAZOS e RAVETCH, 2017). Essas duas porções podem ser obtidas através da ação de enzimas proteolíticas papaína e pepsina que clivam as imunoglobulinas em diferentes fragmentos característicos, na Figura 2.1. A clivagem com papaína origina dois fragmentos idênticos Fab (domínio amino terminal), no qual cada um apresenta um sítio de ligação com o antígeno e um fragmento Fc (domínio carboxila terminal), que não apresenta atividade de anticorpo (JAWETS et al., 1998). A utilização de pepsina como agente

proteolítico origina um fragmento F(ab')₂ e dois fragmentos menores, do tipo pFc'.



Figura 2.1: Estrutura da IgG e seus fragmentos obtidos por meio da ação proteolítica das enzimas papaína e pepsina (adaptado de ALBERTS et al., 1997).

As cadeias leves podem ser classificadas em: kappa (κ) e lambda (λ) e são formadas por duas regiões, uma variável (V_L) e outra constante (C_L). As cadeias pesadas são formadas por quatro ou cinco domínios, sendo um domínio variável (V_P) e os demais constantes (CH₁, CH₂, CH₃ e CH₄), dando origem as classes de Igs: IgG (γ), IgM (μ), IgA (α) e IgE (ϵ) (VLUG e VAN REMORTEL, 1989). As classes IgM e IgE possuem o quarto domínio constante (CH₄). Os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas constituem os sítios ligantes de antígeno.

Dentro da classe IgG humana tem-se quatro subclasses: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Estas subclasses se diferenciam pelo número e localização de pontes disulfídicas e por terem quatro tipos de cadeias pesadas que se distinguem pela região dobradiça. As subclasses de IgG possuem ponto isoelétrico (pI) distintos: IgG₁ e IgG₃ possuem pI mais altos (7,8 a 9,0) que os da IgG₂ e IgG₄ (6,3 a 8,0). A concentração relativa das subclasses no plasma humano varia de 68-71% para IgG₁, 19-31% para IgG₂, 4-8% para IgG₃ e 1-7% para IgG₄ (VLUG e VAN REMORTEL, 1989).

2.2. PURIFICAÇÃO DE IgG

A imunoglobulina G tem sido amplamente utilizada em aplicações terapêuticas (doenças auto-imunes inflamatórias e crônicas e no tratamento de câncer, entre outros) e também para kits diagnósticos (ELISA, radioimunoensaio e imunossensores), sendo que para ambos casos é essencial homogeneidade e alta pureza (BAKHSHPOUR et al., 2016; ARORA et al., 2017). O crescimento na demanda destes produtos e a competitividade no seu desenvolvimento faz com que muitas empresas sejam desafiadas a desenvolver processos para a obtenção de IgG que aliem rapidez e economia. Cerca de 50-80% do custo total de fabricação é decorrente das etapas processamento, purificação e polimento. Desta forma, uma alternativa seria diminuir os passos de purificação, maximizando a recuperação em cada etapa (LOWE, 2001).

Geralmente a IgG está presente em misturas complexas que dificultam ainda mais o processo, tais como plasma e soro humano, fluídos ascíticos e meios de cultura celular, entre outros (AYYAR et al., 2012). Indústrias que fracionam o plasma humano, tradicionalmente purificam IgG pelo método de Cohn e colaboradores (1946). Esta técnica tem como base a precipitação desta proteína com etanol a frio, explorando a solubilidade das proteínas em função do pH, força iônica, concentração de proteínas, quantidade de etanol e temperatura. Uma grande desvantagem deste método é a necessidade de passos adicionais como a filtração, centrifugação e aplicação de técnicas cromatográficas para alcançar a pureza requerida, além da perda de IgG nos sobrenadantes que varia entre 40-50% em relação a quantidade inicial (LOWE, 2001). Neste contexto, a cromatografia de afinidade tem sido uma alternativa à purificação de IgG humana por ser eficiente e devido a especificidade, fácil operação e alto rendimento associado a alta pureza em uma só etapa (MARTIN, 2006; ROQUE et al., 2007; AYYAR et al., 2012).

A cromatografia de afinidade foi primeiramente introduzida por Cuatrecasas e colaboradores (1968) e tem como princípio a interação entre as biomoléculas e o ligante imobilizado em uma matriz cromatográfica de maneira específica e reversível. A escolha do ligante é muito importante na cromatografia de afinidade, uma vez que ele é responsável pela especificidade e estabilidade do sistema (ARORA et al.,2017). Os ligantes podem ser classificados como: bioespecíficos e pseudobioespecíficos (VIJAYALAKSHMI, 1989).

Os ligantes bioespecificos são moléculas naturais e apresentam alta afinidade à molécula alvo acarretando alta especificidade e seletividade (LIU et al., 2013). Dentro deste grupo as proteínas A, G e L são as mais utilizadas na purificação de anticorpos (AYYAR et al., 2012; AURORA et al., 2017). A proteína A é isolada da parede celular do Staphylococcus aureus e apresenta alta afinidade pela porção Fc de subclasses da IgG humana (BURTON, 1985), exceto da IgG₃ (LOGHEM, 1982). Todas as subclasses de IgG humana que são adsorvidas na proteína A apresentam um resíduo de histidina na posição 435, enquanto a IgG3 apresenta um resíduo de arginina na mesma posição (BOYLE et al., 1987). A proteína G é obtida por linhagens de Estreptococos G e apresenta alta afinidade pela porção Fc e baixa afinidade pela porção Fab das imunoglobulinas G (SUN et al., 2008; CHAMBERS, 2002). No entanto, esse ligante também adsorve albumina, α₂-macroglobulina e cininogênio (peptídeos endógenos presentes em fluidos corporais, por exemplo, sangue) o que reduz a eficiência na purificação de IgG (HANEY et al., 2003). A proteína L é isolada a partir de *Peptostreptococcus magnus* e apresenta afinidade apenas pela cadeia leve do tipo kappa presente na estrutura das imunoglobulinas (MYHRE e ERNTELL, 1985) interagindo especificamente com as subclasses que apresentam as cadeias k1, k3 e k4 e não reconhecendo as subgrupos k2 e λ. A proteína L tem como principal vantagem sobre as proteínas A e G a habilidade de se ligar as imunoglobulinas de diferentes classes (ROQUE et al., 2007) e ainda ser empregada na separação dos fragmentos de IgG (Fab e Fc) (BJORK, 1988; HAIGH et al., 2009).

Embora os ligantes bioespecíficos sejam amplamente utilizados na purificação de IgG humana, eles apresentam muitas desvantagens, como por exemplo: são moléculas grandes, de baixa estabilidade, podem apresentar variação entre diferentes lotes, alto risco de contaminação e toxicidade, dificuldade de esterilização, desprendimento de ligante após ciclos repetidos de utilização e diminuição da capacidade de adsorção, alto custo e, consequentemente, baixo potencial para ser utilizado em larga escala (ARNOLD et al., 2006; SHENG e KONG, 2012).

O segundo tipo de ligante, os pseudobioespecificos, são uma alternativa para contornar esses problemas listados para os bioespecificos, uma vez que são moléculas pequenas e de fácil imobilização, apresentam menor custo e melhor estabilidade física e química durante os processos de sanitização e esterilização (ANSPACH et al.,1996; CHAMPAGNE et al., 2007). Dentre os ligantes pseudobioespecificos, os aminoácidos têm sido amplamente empregados como ligantes para a purificação de IgG a partir de diversas fontes. A especificidade, as interações proteína-ligante e a capacidade de adsorção de IgG variam em função da forma de imobilização do aminoácido na matriz, bem como das condições cromatográficas aplicadas (BUENO et al., 1995; PITIOT et al., 2001).

2.2.1. Aminoácidos como ligantes em cromatografia de afinidade

Os aminoácidos apresentam estrutura química simples, baixa toxicidade, alta capacidade de adsorção, são estáveis em diferentes condições químicas e físicas, resistentes à degradação biológica e são de baixo custo (HAUPT et al., 1995). A imobilização de aminoácidos na matriz cromatográfica pode ser realizada por duas vias, ou pelo grupamento amino ou pelo grupo carboxílico (BUENO et al., 1995; PITIOT et al., 2001). Bueno e colaboradores (1995) imobilizaram o aminoácido histidina em membranas ativadas com grupo epóxi via grupamento amino. Desta forma, os grupos remanescentes para interação com IgG foram o grupo carboxílico e o anel imidazol. Neste caso, IgG foi adsorvida na fase estacionária, sendo recuperada durante a etapa de eluição com pureza em torno de 80%. Pitiot e colaboradores (2001) imobilizaram o mesmo aminoácido. No entanto, via grupo carboxílico em aminohexil-agarose, estando livres para interação com IgG os grupamentos amino e o anel imidazol. Nesse caso, a IgG foi recuperada nas frações não retidas (Cromatografia Negativa) durante a etapa de lavagem da coluna (os autores não mencionaram o grau de pureza obtido).

Turkmen e colaboradores (2008) desenvolveram o adsorvente poli(HEMA-MAPA), no qual o derivado de aminoácido, a L-fenilalanina metil éster (MAPA) foi imobilizada na matriz 2-hidroxi-etil metacrilato (HEMA) visando

à purificação de IgG humana. A capacidade de adsorção de IgG a partir de uma solução aquosa foi máxima em pH 7,0 (780 mg de IgG por grama de adsorvente), sendo observado decréscimo na capacidade de adsorção em valores de pH menores ou maiores que 7,0. O valor do ponto isoelétrico (pI) da IgG utilizada foi de 6,2, demonstrando que em pH igual a 7,0 a adsorção de IgG ocorre por meio de interação hidrofóbica combinada com outras formas de interação (ligação π - π , ocorre devido ao grupamento fenil presente na estrutura deste aminoácido). A capacidade de adsorção de IgG a partir do plasma humano foi de 897 g de IgG por grama de adsorvente com cerca de 90% de pureza.

Resultados de trabalhos recentes têm indicado aminoácidos contendo cadeia lateral aromática ou contendo grupos iônicos livres na sua estrutura como potenciais ligantes para purificação de IgG humana (BAYRAMOGLU et al., 2006; TURKMEN et al., 2008; VICTOR e SHARMA, 2011; NAIK et al., 2011; BRESOLIN et al., 2011; BRESOLIN e BUENO, 2012). Aminoácidos contendo grupos iônicos livres para interação com proteínas do soro humano têm sido estudados por vários autores. Quando grupos carregados positivamente da cadeia lateral de aminoácidos como lisina, poli-L-lisina ou arginina estão livres para interação com as proteínas do soro humano, a IgG não é adsorvida, sendo recuperada nas frações não retidas com pureza da ordem de 85 a 90% (TANAKA et al., 1998; BRESOLIN et al., 2011). Por outro lado, guando aminoácidos contendo grupamentos carregados negativamente são utilizados como ligante, como o orto-fosfo-L-serina (OPS), a IgG é adsorvida na fase estacionária (predominantemente por interações eletrostáticas) e eluida com pureza de 89%. (BRESOLIN e BUENO, 2012). OPS é um éster composto por serina e ácido fosfórico; como resíduo de aminoácidos, ele é encontrado em muitas proteínas, por exemplo, fosforilase, caseína e fosvitina e também em membranas biológicas, atuando no transporte de íons (RENUGOPALAKRISHMAN et al., O OPS também é utilizado como agente quelante tridentado em 1985). cromatografia com íons metálicos imobilizados (IMAC) (ZACHARIOU e HEARN, 2000). O rendimento alcançado para purificação de IgG com o emprego de OPS como ligante foi baixo, da ordem de 45 %, apesar de ter-se obtido pureza alta (BRESOLIN e BUENO, 2012).

2.2.2. Orto-fosfo-L-tirosina (P-Tyr)

A L-tirosina (L-Tyr) é um aminoácido não essencial e aromático que atua na produção de epinefrina, dopamina, melanina, e nas funções da adrenal, tireoide e pituitária (BATISTUZZO et al., 2006). A L-Tyr é obtida através do amino ácido fenilalanina e é mais polar que seu precursor devido à presença do grupamento hidroxila em sua estrutura. A tirosina atua como precursor dos hormônios da tireoide (RIVLIN, 1966, JONHKEES et al., 2015).

Os aminoácidos podem sofrer um processo conhecido como fosforilação, que consiste na substituição do grupamento hidroxila por um grupamento fosfato por meio de proteínas quinases (HANKS et al., 1991). Esse mecanismo controla a estrutura protéica, a dinâmica e as funções biológicas, assumindo um papel de suma importância nas vias metabólicas, ativação em cascata da quinase, transporte de membrana e transcrição de genes (CORBRIGDE, 1990). Os aminoácidos fosforilados são frequentemente utilizados como amostras de referência para o teste de metodologias analíticas avançadas que podem ser mais utilizadas em estudos estruturais de sistemas biológicos mais complexos. Além disso, a fosforilação de aminoácidos por quinases é um importante mecanismo regulatório para a normatização hormonal da função celular (COEHN, 1982, JOHNSON E LEWIS, 2001). A L-tirosina em sua forma fosforilada é conhecida como orto-fosfo-L-tirosina (P-Tyr).

Em cromatografia de afinidade, a L-tirosina tem sido utilizada como ligante ou braço espaçador. Como ligante ela foi imobilizada em gel de agarose para a purificação da quinase *src* do vírus sarcoma Rous e alcançou um fator de purificação de 250 quando em altas concetrações de sal, onde as interações hidrofóbicas foram favorecidas (FUKAMI e LIPMAN, 1985). Baseado no estudo publicado por Fukami e Lipman (1985) a tirosina foi ainda utilizada como ligante imobilizada em agarose para a purificação de receptor EGF de células A431 de carcinoma epidermóide humano, também em altas concentrações salinas, promovendo assim a interação hidrofóbica (AKIYAMA et al., 1985). Recentemente, a tirosina foi utilizada como ligante imobilizado a agarose (ativada com grupamento epóxi) para a purificação de diferentes tipos de plasmídios por meio de interações hidrofóbicas (FERREIRA et al, 2015). Como braço espaçador, o aminoácido L-tirosina foi utilizado para prevenir as interações não específicas (ATASEVER et al, 2013).

L-tirosina em sua forma fosforilada, orto-fosfo-L-tirosina (P-Tyr), foi utilizada como ligante em cromatografia de afinidade para a purificação de pre-MIR-29 (AFONSO et al., 2014). Não foi encontrado na literatura relato da utilização de P-Tyr para a adsorção de lgG humana. No entanto, este derivado de aminoácido apresenta características que fazem dele um potencial ligante na captura e purificação de lgG humana em cromatografia de afinidade. Segundo Robert e colaboradores (1985) P-Tyr apresenta modera estabilidade em uma ampla faixa de pH. As interações entre o amino ácido e a molécula alvo está basicamente ligada a interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, sendo que a eluição é facilmente conduzida usando um ligante competitivo ou simplesmente mudando o pH, força iônica ou polaridade da fase móvel (JUNGHANS and ANDERSON, 1996).

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Ligantes estudados

Os ligantes o-fosfo-L-tirosina (P-Tyr), L-tirosina (L-Tyr), L-fenilalanina (L-Phe), fenetilamina (PEA) e tiramina (Tyra) e o ácido amino-metil fosfórico (AMPA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). A fórmula estrutural e os respectivos pKas dos ligantes propostos estão apresentados na Tabela 3.1.

Ligante	Fórmula estrutural	pKa
		<2 e 5,8 (fosfato)
P-Tyr		2,4 (-COOH)
	ОН	9,4 (-NH ₂)
	HO NH2 OH	2,20 (-COOH)
L-Tyr ^a		9,11 (-NH ₂)
		10,07 (-OH)
	O NH ₂ OH	
L-Phe ^a		1,83 (-COOH)
		9,13 (-NH ₂)
PEA ^a	NH ₂	9,83 (-NH ₂)
Turoa	HO NH ₂	9,74 (-OH)
i yra-		10,52 (-NH ₂)
	H ₂ N H ₂ N OH	<0,9 e 5,6
AMPA ^a		(fosfato)
		10,2 (–NH ₂)

Tabela 3.1: Fórmula estrutural e pKa dos ligantes estudados

^aLigantes utilizados como controle e valores de pKa foram obtidos do catálogo da Sigma-Aldrich

3.1.2. Plasma humano

Plasma humano de doadores sadios foi doado pelo Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.1.3. Reagentes

O gel de agarose 4B (Sepharose 4B, 4% de reticulação, com diâmetro médio de partículas de 45 a 165 µm e faixa de fracionamento de proteínas globulares de 60 a 20.000 kDa), albumina de soro bovino (BSA), 1,4-butanodiol diglicil éter, comassie brilliant blue R-250, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazina-1il]-etanossulfônico (HEPES), acetato de sódio (NaAc), Tris(hidrometil)aminometano (Tris-HCI), tricina, ácido 2-(n-morfolino) etanossulfônico (MES), Ácido 3-N-morfolino (propanossulfônico) (MOPS), 2-Bis(2-hydroxyethyl) amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Bis-Tris), agarose para eletroforese foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, glicerol, azul de bromofenol, ditiotrietol, N,N,N',N'-tetra-metilenodiamina (TEMED) para SDS-PAGE e membrana de nitrocelulose foram obtidos da Bio-Rad (EUA). Gel de eletroforese IEF Phast System e kits de marcadores de massa molecular (14,4 at 97 kDa) e de ponto isoelétrico (3 a 9,3) para eletroforese e colunas PD10 foram adquiridos da GE Healthcare (EUA). O marcador de massa molecular "rainbown" (RPN800E) para western blot, agarose-proteina L, anticorpo anti-IgG humana (Fab específica) ligada a peroxidase produzida em cabra (A0293), anticorpo anti-IgG humana (Fc específica) ligada a peroxidase produzida em cabra (A0170), peróxido de hidrogenio, gamma globulina do sangue humano (IgG) e 3,3-diaminobenzidina (DAB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Fragmento Fab (≥95% pureza determinada por SDS-PAGE), fosfato de sódio (NaP) monobásico e bibásico foram adquiridos da Merck (Alemanha). Os kits ELISA para dosagem de IgG, IgA, IgM, HSA, e transferrina foram fornecidos pela Bethyl Laboratoires (EUA). Em todos os experimentos foi utizada água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) e todos os outros reagente utilizados foram de grau analítico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ativação do gel de agarose com bisoxirano e imobilização dos ligantes

<u>Ativação do gel:</u> A ativação do gel de agarose 4B com 1,4 butanodiol diglicidil éter foi realizada conforme descrito em Hermanson et al. (1992). A um volume de 50 mL de gel úmido foi adicionado 40 mL de uma solução de NaOH a 0,6 mol L-1 contendo 75 mg de borohidreto de sódio. Posteriormente, 40 mL de 1,4 butanodiol diglicil éter foi adicionado lentamente àquela suspensão, que foi mantida em agitação constante a temperatura ambiente por um período de 10 horas. Terminado o tempo de reação, o gel foi lavado com água destilada. O gel foi armazenado em solução de NaCI a 1,0 mol L⁻¹ e sob refrigeração.

Imobilização dos ligantes: A imobilização dos ligantes P-Tyr, L-Tyr, L-Phe, PEA, Tyra e AMPA foi realizada de acordo com os protocolos apresentados por Zachariou et al. (1993) e Zachariou e Hearn (2000). Para cada ligante foi preparada uma solução de 0,2 mol L⁻¹ em água e o pH foi ajustado para 10,5 com pastilhas de KOH na temperatura de 4ºC. Para 15 g de gel ativado (base seca) foram adicionados 30 mL da solução contendo o ligante, e essa suspensão ficou sob agitação por 4 h, a 25ºC (para ligante que contém fósforo) ou a 60ºC, durante 24 h (para ligantes que não contém fósforo), como recomendado por Zachariou et al. (1993). Depois da imobilização, o gel foi sequencialmente lavado com 100 mL de água ultrapura, 50 mL com uma solução de 50 mmol L⁻¹ ácido acético em pH 4,0 e 100 mL água ultrapura. Em seguida, o gel com o ligante imobilizado foi suspenso em uma solução a 20% de etanol e mantido sob refrigeração até o uso.

<u>Determinação da densidade de ligantes</u>: A densidade de ligantes imobilizados foi determinada por análise elementar de nitrogênio no Laboratório de Análise Elementar da Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) utilizando o equipamento CHN 2400 Elemental Analyzer (Perkin-Elmer, USA).

3.2.2. Obtenção dos fragmentos de IgG humana

A IgG humana foi clivada com papaína para a obtenção dos fragmentos Fab e Fc como descrito por Ternynck e Avrameas (1987), da Silva et al., 2014 Mourão et al., (2016) e Carmignotto et al., (2017). À uma solução de IgG com concentração de 30 mg mL⁻¹ foram adicionados 2,23 mL nas seguintes proporções: 850 μL de solução de L-cisteína a 0,2 mol L⁻¹, 850 μL de solução de EDTA a 0,04 mol L⁻¹, 300 μL de solução de papaína a 1,0 mg mL⁻¹ e 230 μL de tampão fosfato de sódio a 100 mmol L⁻¹ em pH 7,4. Essa mistura foi deixada em banho térmico a 37°C, por 2 h. Ao final desse tempo, o volume foi completado para 2500 μL com uma solução iodoacetamida a 0,4 mol L⁻¹ para que a reação fosse interrompida. Essa solução ficou em repouso por 30 min. Para que essas amostras fossem armazenadas foi necessário a troca do tampão em uma coluna PD-10. As alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C.

3.2.3. Ensaios cromatográficos

Os experimentos cromatográficos foram realizados a temperatura ambiente e em duplicata utilizando três diferentes amostras de injeção: (1) IgG alta pureza: foi injetado 2,0 mL de uma solução de IgG humana de alta pureza na concentração de 3,5 mg mL⁻¹, preparadas nos tampões de adsorção Tris-HCl, HEPES, MES, MOPS, acetato de sódio (AcNa) e fosfato de sódio (NaP) em concentração de 25 mmol L⁻¹, em valores de pH entre 5,0 a 8,0, na faixa tamponante de cada tampão. (2) Plasma: plasma humano foi diluido 10 vezes para os tampões MES, MOPS, HEPES, Bis-Tris na concentração de 25 mmol L-¹ na faixa de pH entre 5,5 e 7,0 e para os tampões Tris-HCl pH 7,0 e NaP pH 6,0 na concentração de 10 mmol L⁻¹ o plasma foi diluído 13 e 15 vezes, respectivamente. Para todos os experimentos com plasma humano foi injetado a massa de proteína total de 4,6 mg. (3) Fragmentos de IgG humana: as amostras de injeção dos fragmentos de IgG foram preparadas utilizando os tampões HEPES, Bis-Tris, MOPS a 25 mmol L⁻¹ pH 7,0 e Tris-HCl e NaPem 10 mmol L⁻¹ para os valores de pH de 7,0 e 6,0, respectivamente. Foi utilizado uma coluna (modelo HR 5/10, GE Healthcare, EUA) preenchida com 1,0 mL de gel derivatizado com os ligantes propostos neste trabalho e conectada a um sistema

de cromatografia de baixa pressão (ÄKTA Purifier, GE Healthcare, EUA). A coluna contendo o adsorvente foi equilibrada à temperatura ambiente com tampão de adsorção, citados anteriormente, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. Soluções de injeção de cada etapa foram alimentados na coluna cromatográfica. A lavagem do adsorvente foi realizada na mesma vazão com o tampão de adsorção, visando a remoção das proteínas não adsorvidas ou adsorvidas fracamente. A eluição também foi realizada na mesma vazão, com a adição de 1,0 mol L⁻¹ de NaCl no tampão de adsorção. As frações foram monitoradas a 280 nm e coletadas durante todo o experimento em frações correspondentes ao pico de cada etapa cromatográfica. As frações coletadas nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias realizadas com solução de plasma humano e solução de IgG humana digerida foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e os "pools" das frações de lavagem e eluição foram analisados por eletroforese SDS-PAGE. Os para os ensaios com plasma humano a quantificação de IgG, IgA, IgM, HSA e Trf foram realizados por Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA), enquanto que para os fragmentos de IgG humana os resultados de eletroforese foram confirmados por Western Blot quantificados por Imunodifusão Radial (RID). Ao término dos experimentos, o adsorvente foi lavado com água MilliQ® e, em seguida, re-equilibrado com tampão de adsorção para ser re-utilizado em novo ciclo.

3.2.4. Cinética de adsorção de IgG humana em P-Tyr-agarose

A cinética de adsorção foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Daoud-Attieh et al. (2013). Sendo os experimentos foram realizados em duplicata. Um volume de 1,0 mL de P-Tyr-agarose foi empacotado em uma coluna C10/10 (GE Healthcare, USA) e equilibrado com 10 mmol L⁻¹ NaP a pH 6,0 (tampão e adsorção), a vazão de 1,0 mL min⁻¹ (velocidade superficial de 76,4 cm h⁻¹). Foram preparados 50 mL de IgG de alta pureza no tampão de adsorção, em concentrações de 0,5 mg mL⁻¹ e 2,0 mg mL⁻¹, sendo estas soluções continuamente recirculada na coluna (sistema fechado) até que atingisse concentração de saída constante. A solução de IgG foi mantida em agitação durante todo o experimento. Durante todo o processo, em tempo determinados, foram retirados 10 μL da amostra para a determinação da concentração pelo

método de Bradford (1976). Depois de atingir o equilíbrio, a coluna foi lavada com o tampão de adsorção para a remoção das proteínas não adsorvidas e as fracamente adsorvidas. Em seguida as proteínas retidas foram eluidas utilizando o sistema tamponante 10 mmol L⁻¹NaP e 1 mol L⁻¹NaCL em pH 6,0. A concentração proteica foi mensurada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Após cada experimento a coluna foi regenerada com 50 mmol L⁻¹ NaOH e água ultrapura, desta forma a coluna estava pronta para novos experiementos.

Os modelos matemáticos de pseudo-primeira-ordem e pseudo-segundaordem (equações 1 e 2) foram utilizados ajustando-se os parâmetros segundo os dados obtidos experimentalmente na cinética de adsorção de IgG humana.

$$q_t = q_e(1 + e^{-k_1 t})$$
 (1)

$$q_{t} = \frac{k_{2}q_{e}^{2}t}{(1 + tk_{2}q_{e})}$$
(2)

Onde qe e qt representam a quantidade de IgG adsorvida (mg) em P-Tyragarose (g) no equilíbrio e no tempo t, respectivamente, t é o tempo (min); k_1 (min⁻¹) é a constant da taxa de adsorção pseudo-primeira-ordem e k_2 (g mg⁻¹ min⁻¹) é a constante da taxa de adsorção pseudo-segunda-ordem.

3.2.5. Isotermas de adsorção IgG humana em P-Tyr-agarose

Os experimentos para obtenção de dados experimentais de adsorção de IgG humana em P-Tyr-agarose no equilíbrio foram realizados para dois sistemas tamponantes: 10 mmol L⁻¹ NaP pH 6,0 e 25 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,0 para temperatura de 25 °C e 10 °C, 20 °C, 25 °C e 35 °C, respectivamente. Em duplicata, em um microtubo de 2,0 mL, foram adicionados 50 μL de gel previamente equilibrado no tampão de adsorção. Em cada microtubo foi adicionado 1,0 mL de solução de IgG humana de alta pureza em diferentes concentrações iniciais (0,5 até 20,0 mg mL⁻¹). Os microtubos foram mantidos sob agitação durante 8 h (tempo para atingir o equilíbrio).

Atingido o equilíbrio, os microtubos foram centrifugados separadamente e os sobrenadantes foram analisado molar por espectrofotometria a 280 nm, sendo 1,4 o coeficiente de extinção utilizado para o cálculo da concentração de IgG no equilíbrio (C*). A massa de proteína adsorvida por grama de adsorvente no equilíbrio (Q*) foi calculada utilizando a Eq. (3).

$$Q^{*} = \frac{(C - C^{*}) * V}{m_{g}}$$
(3)

sendo C a concentração inicial de IgG adicionada no tubo (mg mL⁻¹), C* a concentração de IgG no equilíbrio (mg mL⁻¹), V o volume adicionado no tubo (mL) e m a massa de adsorvente (g).

Conhecendo os valores de Q* e C* utilizou-se o modelo de Langmuir e Langmuir-Freundlich (regressão não linear – Gauss-Marquardt) segundo as Eq. (4) e (5).

$$Q^* = \frac{Q_m C^*}{K_d + C^*} \tag{4}$$

$$Q^* = \frac{Q_m(C^*)^n}{K_{dLF} + (C^*)^n}$$
(5)

onde Q_m é a capacidade máxima de adsorção (mg de IgG mg⁻¹ de gel); K_d é a constante de dissociação (mol L⁻¹), que representa a afinidade entre a proteína e o adsorvente; K_{dLF} é a contante de dissociação aparente (mol L⁻¹) e n é o coeficiente de Langmuir-Freundlich (Sharma e Agarwal, 2001).

3.2.6. Parâmetros termodinâmicos

A partir dos dados experimentais de adsorção de IgG em P-Tyr-agarose no equilíbrio, nas temperaturas de 10 °C, 20 °C, 25 °C e 35 °C, em tampão 25 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,0, foram calculados os valores das constantes de dissociação (K_d) do modelo de Langmuir. Os parametros termodinâmicos (ΔG° , ΔH° e ΔS°) foram determinados como descrito por Góes et al. (2010), Haupt et al. (1995), Thrash Jr et al. (2004), e Chang et al. (2006), de acordo com a equação de van't Hoff (equação 6):

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln K_d \tag{6}$$

onde ΔG é a variação energia livre de Gibbs aparente, ΔG° é a variação da energia de Gibbs padrão, R é a constante dos gases perfeitos e T é a

temperatura em Kelvin. No equilíbrio, a variação da energia de Gibbs aparente é igual a zero ($\Delta G=0$) e a Eq. (7) é escrita como:

$$\Delta G^0 = RT \ln K_d \tag{7}$$

Por meio da Eq. (7), ΔG^{ϱ} , pode ser obtido a partir da constante de dissociação determinada para cada temperatura. A relação entre temperatura e constante de dissociação é representada pela equação de van't Hoff na sua forma integrada (apresentada na Eq. (8)):

$$\ln K_d = \frac{\Delta H^0}{RT} + J \tag{8}$$

onde J é a constante de integração e equivale a $\Delta S^{\varrho}/R$ e ΔH^{ϱ} é a variação da entalpia padrão e independe da temperatura na faixa estudada. De acordo com a relação de Gibbs-Helmholtz (Eq. (9)) é possível calcular a variação da entropia, ΔS^{ϱ} ,

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \tag{9}$$

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1. Dosagem de proteína total

A concentração de proteína total nas amostras foi determinada usando o método de Bradford (1976), com BSA como proteína de referência.

3.3.2. Eletroforese SDS-PAGE

As frações protéicas obtidas nas etapas de adsorção, lavagem e eluição das cromatografias foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE em gel a 7,5% e 10% (para ensaios com plasma e fragmentos de IgG humana, respectivamente) em poliacrilamida, em condições não redutoras (LAEMMLI, 1970). As amostras tratadas com SDS foram aquecidas a 100 °C por 10 min e, posteriormente, aplicadas nos géis. Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com Morrissey (1981).

3.3.3. Determinação do ponto isoelétrico

Determinou-se o ponto isoelétrico (*pl*) das amostras de IgG humana de alta pureza e a IgG eluída das cromatografias de purificação do plasma humano por eletroforese de focalização isoelétrica (Isoelectric Focusing, IEF). Para estas análises utilizou-se o equipamento LKB – Phast System, método 4.1 (IEF – 3 – 9AAA), gel de poliacrilamida para IEF 3 – 10 e o marcador 44 de p*l* de 3,5 a 9,3 obtidos da GE Healthcare (EUA). A coloração foi realizada de acordo com o protocolo que segue o manual do equipamento Phast System da GE Healthcare (Suécia) utilizando nitrato de prata.

3.3.4. E*nzyme Linked Immunonosorbent Assay* (ELISA): Dosagem de IgG, IgA, IgM, transferrina (TRF) e albumina humana (HSA)

A quantificação das proteínas IgG, IgA, IgM, Trf e HSA foram realizadas utilizando kits de ELISA comercial (Bethyl, EUA). Os ensaios foram rigorosamente executados de acordo com o protocolo que acompanha os kits (códigos para obtenção de cada kit - IgG: E80-104; IgA: E80-102; IgM: E80-100; Trf: E80-128 e HSA: E80-129). Placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços foram sensibilizadas pela adição de 100 µL/poço de anticorpos anti-(IgG, IgA, IgM, Trf e HSA) humano produzido em cabra na concentração de 1,0 mg mL⁻¹, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,5 mol L⁻¹, pH 9,6 (1 µL para cada 100 µL de tampão). A placa foi incubada durante 1,0 h a temperatura ambiente (20-25 °C). Em seguida, as placas foram lavadas manualmente cinco vezes com tampão Tris 50 mmol L-1, NaCL 0,14 mol L-1, Tween 20 0,05% em pH 8,0. Na seguência foram adicionados 200 µL/poço de tampão de bloqueio (Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 0,14 mol L⁻¹ e 1% BSA em pH 8,0) para bloquear os sítios remanescentes de ligação na placa e incubou-se a mesma 0,5 h a temperatura ambiente (20-25 °C). Procedeu-se, então, com a etapa de lavagem conforme anteriormente descrito e, logo depois, 100 µL/poço das amostras a serem quantificadas e dos padrões de IgG, IgA, IgM, Trf e HSA humana para a curva de calibração foram aplicadas, em duplicata, diluídas na faixa concentração determinada em cada kit. A placa foi incubada novamente a temperatura ambiente (20-25 °C) por 1,0 h e lavada na sequência. Para a etapa de reação com o conjugado, foi aplicado em cada poço 100 μL do anticorpo anti-(IgG, IgA, IgM, Trf e HSA) humana produzido em cabra, conjugado com peroxidase (a diluição foi determinada como descrito no protocolo, o valor de absorbância obtido para a concentração máxima da curva padrão deveria estar entre 1,8-2,2). Após incubação de 1,0 h em estufa a temperatura ambiente (20-25 °C) realizou-se mais uma etapa de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μL/poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB - Bethyl, EUA, código E-102). A reação de revelação ocorreu pela incubação por 15 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e foi interrompida pela adição de 100 μL/poço de uma solução de ácido sulfúrico 0,18 mol L⁻¹. A medida das absorbâncias foi realizada imediatamente após a interrupção da reação, em leitor de placas (Labsystem, Finlândia) com o comprimento de onda de 450 nm.

3.3.5. Western blot

O ensaio de *Western blot* foi realizado de acordo com o procedimento apresentado Towbin et al. (1979), para a detecção específica dos fragamentos Fab e Fc.

Primeiramente, foi realizada uma eletroforese em dois géis de poliacrilamida 12% utilizando as mesmas amostras apresentadas na eletroforese SDS-PAGE e o marcador de massa molar pré-corado (RPN800E) obtidos da GE (EUA). Para que ocorresse a separação, esses géis foram submetidos à voltagem de 100 V em cuba vertical. Após esta etapa, iniciou-se a etapa de transferência das proteínas presentes nos géis para duas membranas de nitrocelulose em equipamento MiniTransblotting (Bio-Rad, EUA), sendo aplicada a voltagem de 100 V por 1,0 h. Para verificar o sucesso da transferência foi observado se o marcado pré-corado foi transferido para a membrana.

Em seguida, as membranas foram submersas em tampão PBS 0,02 mol L⁻¹, contendo 5% leite em pó desnatado (Molico - Nestlé, Brasil) e 0,1% de Tween-20 por 1,0 h. Esta etapa tem como finalidade bloquear os sítios remanescentes para evitar que os anticorpos se liguem de forma não-específica. Após a incubação, as membranas foram lavadas com a solução de lavagem (tampão PBS 0,02 mol L⁻¹ contendo 0,1% de Tween-20). Nesta etapa, uma
membrana foi incubada com o anticorpo de cabra anti-hIgG (Fab específico) e outra, com o anticorpo de cabra anti-hIgG (Fc específico) conjugados a peroxidase. A reação foi revelada pela adição da mistura de substrato (0,003% de peróxido de hidrogênio) e cromógeno (diaminobenzidina 1,0 mg mL⁻¹) em tampão Tris-HCI (50 mmol L⁻¹), pH 7,4. Para interromper a reação as membranas foram lavadas com água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA).

3.3.6. Densitometria dos géis de SDS-PAGE

A relação entre a quantidade de IgG humana não clivada e o fragmento Fab na etapa de eluição foi quantificada por densitometria dos géis de SDS-PAGE no sistema de eletroforese modelo GS 800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, EUA).

3.3.7. Quantificação de Fab por imunodifusão radial (RID)

A quantificação de Fab foi realizada por imunodifusão radial de acordo com o protocolo adaptado por Lu e Miller (1996), da Silva et al. (2014), Mourão et al. (2016), Carmignotto et al. (2017). Uma solução foi preparada com 1,2 % agarose e 2,0% de polietilenoglicol (PEG 6000 Da) em tampão TBE (Tris-HCl 90 mmol L⁻¹; ácido bórico 90 mmol L⁻¹; EDTA 3,0 mmol L⁻¹) a pH 8,3. Em seguida essa mistura foi aquecida, em banho-maria, a 90 ºC até que a agarose e o PEG fossem completamente dissolvidos. Posteriormente essa solução foi mantida em repouso para que a temperatura de 55 ºC fosse atingida. Em seguida, foi adicionado para 1,0 µL anticorpo anti-lgG humano (Fab específico produzido em cabras) conjugado com peroxidase para cada 1,0 mL de gel. Esta mistura foi dispersa em uma superfície plana e após a geleificação do gel foram feitos orifícios com diâmetro de 2,0 mm. Em seguida, foi adicionado em cada orifício 10 µL das amostras referente ao pool das etapas cromatográficas. Depois de adicionadas as amostras o gel foi incubado em câmara úmida por 48 h a 25 ºC. Para finalizar, o gel foi lavado com tampão PBS por 24 h e depois foi seco à temperatura ambiente, em seguida, foi corado com uma solução contendo 0,25 % de Comassie Brilliant Blue R-250 em etanol, ácido acético glacial e água MilliQ (180:40:180 v/v) e subsequente o gel foi descorado utilizando uma solução contendo 30% de etanol e 7% de ácido acético (v/v). A quantificação foi feita através da relação entre os diâmetros dos alos, medidos com um paquímetro, e uma curva padrão que relaciona de forma linear o diâmetro dos alos com o logaritmo da concentração dos fragmentos Fab e IgG intacta. A curva de calibração foi determinada através da adição de 10 µL de amostras contendo concentrações pré-determinadas de fragmentos Fab purificado da Merck Millipore (EUA) a cada orifício.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS FUNCIONAIS DO P-Tyr NA ADSORÇÃO DE IgG HUMANA

Este trabalho teve como objetivo explorar o aminoácido P-Tyr como ligante em cromatografia de afinidade para interação com a IgG humana. Para tal, este estudo foi dividido em 4 etapas:

1) O gel de agarose foi ativado com bisoxirano e posterioriormente os ligantes P-Tyr e dos controles L-tirosina (L-Tyr), L-fenilalanina (L-Phe), tiramina (Tyra), feniletilamina (PEA) e ácido amino-metil fosfórico (AMPA) foram imobilizados via grupamento amino. Para todos os adsorventes preparados foram realizadas a análise elementar de nitrogênio para a quantificação da densidade de ligantes e posterior comparação com a literatura.

2) Ensaios cromatográficos com IgG humana de alta pureza para três tipos de sistemas tamponantes: (a) carregados positivamente: Tris-HCl, (b) carregados negativamente: AcNa e NaP e (c) zwiteriônicos: HEPES, MES e MOPS, a 25 mmol L⁻¹, na faixa de pH entre 5,0-8,0. Onde foi possível avaliar o efeito de variáveis como o sistema tamponante, pH e força iônica na captura de IgG, assim como a contribuição dos diferentes grupamentos funcionais na retenção da molécula alvo. Para que isso fosse possível os aminoácidos Ltirosina (L-Tyr), L-fenilalanina (L-Phe), tiramina (Tyra), feniletilamina (PEA) e ácido amino-metil fosfórico (AMPA) foram utilizados como controle. A capacidade de adsorção de IgG humana em P-Tyr-agarose, foram realizados experimentos cromatográficos alimentando-se 7,0 mg de IgG humana na concentração de 3,5 mg mL⁻¹ nos três diferentes tipos de sistema tamponantes estudados neste trabalho. Obteve-se porcentagem de IgG humana adsorvida entre 80-90% para valores de pH igual ou menor que 7,0, com exceção do Tris-HCl, para o qual a porcentagem adsorvida foi similar em todos os valores de pH estudados. No entanto foi observado que em pH 6,0 a porcentagem de IgG adsorvida para o sistema tamponante MES foi 1,6 e 2,5 vezes maior que o obtido para os tampões AcNa e NaP, respectivamente.

Como observado anteriormente, no mesmo valor de pH foi possível obter diferentes quantidades de IgG retida no ligante P-Tyr. No intuito de elucidar esse fenômeno, foram realizadas medidas da condutividade desses sistemas tamponantes e seus valores relacionados com a porcentagem de IgG adsorvida. Esses resultados demonstraram que a quantidade de IgG retida na coluna variava de acordo com os valores de condutividade obtidos. Para todos os sistemas tamponantes, exceto Tris-HCl, o aumento do pH resultou em um aumento na condutividade o que acarretou na diminuição da quantidade de IgG humana adsorvida. A baixa porcentagem de IgG retida para os sistemas tamponantes não zwteriônicos Tris-HCI e NaP pode estar relacionado aos altos valores de condutividade associados a eles na concentração de 25 mmol L⁻¹. Sendo assim podemos afirmar que as interações do tipo eletrostáticas foram favorecidas pelos baixos valores de condutividade associados aos sistemas tamponantes zwteriônicos. A fim de confirmar essa hipótese foram realizados experimentos com a adição de NaCI (0 e 2,0 mol L⁻¹) no tampão de adsorção e verificou-se que o aumento da concentração de sal diminuiu drasticamente a quantidade de IgG adsorvida confirmando a predominância da interação eletrostática.

Outra análise realizada foi o efeito da contribuição dos diferentes grupamentos funcionais presentes na estrutura do ligante P-Tyr, comparando com os resultados obtidos para os ligantes L-Tyr, L-Phe, Tyra, PEA e AMPA. Foi possível observar que, como foi dito nos parágrafos anteriores, a interação eletrostática entre do grupamento fosfato (carga negativa) e a IgG em solução foi o grande responsável pela adsorção desta proteína.

3) Na condição selecionada na etapa 2, HEPES 25 mmol L⁻¹ pH 7,0 foram realizados experimentos para a purificação de IgG a partir do plasma humano. Os experimentos cromatográficos foram realizados alimentando 4,6 mg de proteína total (plasma diluído 10 vezes, 6,0 mg mL⁻¹) em tampão HEPES. As frações obtidas no ensaio cromatográfico foram analisadas por meio de eletroforese SDS-PAGE e ELISA, onde foi possível verificar a obtenção de IgG na etapa de eluição juntamente com traços de IgM, Trf e HSA. A pureza e o rendimento foram de 91% e 48%, respectivamente e fator de purificação de 9,1.

4) As isotermas de adsorção foram realizadas em diferentes temperaturas (10, 20, 25 e 35 °C) e os parâmetros foram obtidos por meio do modelo de Langmuir. A maior capacidade máxima de adsorção (Qm) foi de 273,51 mg g⁻¹ de gel em 20 °C e a constante de dissociação foi da ordem de 10-5 mol L-1 caracterizando-o como um ligante de afinidade média. Entre as temperaturas de 10 e 35 °C foi verificada a linearidade de van't Hoff sendo então possível o cálculo dos parâmetros termodinâmicos ΔG° , $\Delta H^{\circ} \in \Delta S^{\circ}$. Os valores de ΔG° obtidos foram negativos na faixa de 5,94-7,34 kcal mol⁻¹ e ΔS° positivos na faixa de 21,02-23,87 cal mol⁻¹ K⁻¹. Já o valor de ΔH° foi de +9,55 kcal mol⁻¹ sendo considerado levemente positivo. Foi realizado nessa etapa um ensaio cromatográfico com IgG humana de alta pureza em sulfato de sódio 0,5 mol L⁻¹ a fim de verificar se seria possível a adsorção da proteína por interação hidrofóbica. Não foi possível a adsorção de IgG nessa condição, confirmando a interação eletrostática como predominante. Como sugerido por Ross e Subramaniam (1981), os valores de ΔH° levemente positivos, combinado com ΔS° positivo, indicam a predominância de interações eletrostáticas.

Este trabalho foi publicado no *Journal of Chromatography B*, volume 1052, pg 10–18, 2017 e o manuscrito está apresentado a seguir.

A autorização para a utilização deste artigo encontra-se no ANEXO 2 e o corrigendum no ANEXO 3. Este artigo, quando citado em qualquer outro trabalho, deve obrigatoriamente ter como referência a revista e não este documento de tese.



Journal of Chromatography B Volume 1052, 1 May 2017, Pages 10-18



Phosphorylated-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G

Gisele Luiza Pavan ^a, Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin ^b, Angélica Grespan ^a, Sonia Maria Alves Bueno ^a Ӓ 🖾

Show more

https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.018

Get rights and content

Referred to by Gisele Luiza Pavan, Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin, Angélica Grespan, Sonia Maria Alves Bueno

Corrigendum to "Phosphorylated-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent for the pur... Journal of Chromatography B, Available online 30 January 2018, Pages

Download PDF

Abstract

The present study evaluated the phosphorylated-tyrosine (P-Tyr) based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of human immunoglobulin G (IgG). P-Tyr was selected as a ligand to mimic the natural interactions that occur between the immunoreceptor tyrosine-based activation motif and the IgG. The ligand was coupled to bisoxirane-activated agarose gel and the effect of buffer system, pH, and conductivity was performed to elucidate the nature of IgG-P-Tyr interactions. P-Tyr-agarose was able to purify IgG from human plasma solution in HEPES buffer at pH 7.0 exhibiting a purification factor of 9.1 with IgG purity of 91% (based on ELISA analysis of albumin, transferrin, and immunoglobulins A, G, and M). The evaluation of different functional groups of P-Tyr on the adsorption of human IgG indicated the predominance of electrostatic interactions with phosphate groups, although the contributions of aromatic and carboxylic groups also play a role. The thermodynamic parameters (ΔH° , ΔS° , ΔG°) for IgG adsorption onto P-Tyr-agarose were determined from the temperature dependence. The maximum IgG binding capacity at 20°C was 273.51 \pm 12.63 mg g⁻¹ and the dissociation constant value of the complex IgG-P-Tyr was in the order of 10⁻⁵ mol L⁻¹ indicating low-affinity.

Keywords O-phospho-tyrosine, Human immunoglobulin G, Adsorption, Purification, Human plasma.

1. Introduction

Tyrosine is a non-essentialamino acid with relatively nonpolar aromatic side chain (hydrophobic). This amino acid is significantly more polar than phenylalanine due to the presence of the tyrosine hydroxyl group. Tyrosine hydroxyl group can form hydrogen bonds and it is an important functional group for protein stability and also plays an important role in photosynthesis [1, 2]. Tyrosine is necessary for the manufacture of thyroid hormones, being neurotransmitters precursor and, consequently, increasing the plasma neurotransmitter levels (particularly dopamine and norepinephrine) [3, 4]. Some of the tyrosine residues can be tagged at the hydroxyl group with a phosphate group by protein kinases [5]. In its phosphorylated form, tyrosine is called phospho-tyrosine and this molecule can be detected through specific antibodies [6].

In affinity chromatography, the amino acid L-tyrosine (L-Tyr) has been used as ligand or as space arm. Amino acids as pseudobiospecific ligands have been studied as good alternatives to the traditional biospecific ligands. The purification of target proteins occurs due to reversible interactions (electrostatic and hydrophobic interactions, hydrogen bonding) between some amino acids and proteins [7]. As affinity ligand for purification of the Rous sarcoma virus *src* kinase, L-Tyr immobilized onto agarose reached a purification factor around 250 when chromatography was performed at high ionic strength, in which hydrophobic interactions were facilitated [8].

The affinity of lactoperoxidase from bovine milk was exploited in one-step purification using L-Tyr as the spacer arm to a cyanogen bromide (CNBr)activated-Sepharose 4B matrix. The L-Tyr was chosen as a spacer arm to prevent nonspecific binding [9]. L-Tyr was also used as spacer arm for purification of several enzymes such as xanthine oxidase from bovine milk [10], prophenoloxidase (PPO)from *Gallería mellonella* L. [11], human carbonic anhydrase I and II (hCA) and carbonic anhydrase from erythrocytes [12, 13], peroxidases [14], tyrosinase [15], and acetylcholinesterase [16]. Due to hydrophobic properties of tyrosine itself, matrices containing this amino acid as spacer arms have been used for purification of holstein bull semen paraoxonase 1 (PON1) [17], serum paraoxonase, and bovine testicular hyaluronidase [18] by hydrophobic interaction chromatography.

Regarding to the tyrosine phosphorylated form (ortho-phospho-L-tyrosine, P-Tyr), it has already used as ligand in affinity chromatography aiming at premiRNA (MicroRNA)-29 purification, reaching 52% purity and 71% yield [19]. P-Tyr immobilized on agarose gel was used to mimic the natural interactions that occur with RISC (RNA-induced silencing complex), involving a conserved tyrosine residue and miRNA molecules. Separation occurred through hydrophobic interactions between RNAs and the aromatic group of P-Tyr ligand. Adsorbed pre-miRNA was eluted after decreasing ionic strength of the elution buffer [19].

P-Tyr belongs to the immunoreceptor tyrosine based activation motif (ITAMs) receptors that are responsible to several biochemical events in cytoplasm, activating specific cell biological response. ITAMs transmit to cell interior the IgG binding signal to its receptor [20,21]. Due to the ITMAs affinity for IgG isotypes, P-Tyr could become an excellent candidate to be used as ligand for the purification of polyclonal and monoclonal antibodies from different sources.

Thus, the purpose of this study was to explore this natural interaction between P-Tyr and IgG aiming at its purification from human plasma. Although L-Tyr and P-Tyr are employed as ligands for purification of several biomolecules, the contribution of different functional groups of P-Tyr in the adsorption of the target biomolecule has not been elucidated yet. Thus, in this study, the effect of the joint presence or the individual contribution of aromatic, carboxylate and phosphate groups of P-Tyr on the adsorption of IgG was also evaluated. When immobilized via amino group, P-Tyr is available for interaction with the target biomolecule by carboxylate groups (ionic) while phosphate bounds to aromatic ring (ionic-partially hydrophobic). In order to study the individual contribution of these groups in IgG purification, L-Tyr, L-phenylalanine (L-Phe), tyramine (Tyra), phenethylamine (PEA), and aminomethyl phosphoric acid (AMPA) were used as control ligands. On this basis, the ligands were immobilized in agarose gel and the adsorption of human IgG was studied. The effects of operational conditions (buffer system, pH, and ionic strength) on the capacity and selectivity of the adsorbent were investigated. Adsorption isotherms at different temperatures were analyzed using Langmuir model and the thermodynamic parameters (ΔG° , ΔH° , and ΔS°) were estimated since they are the basis for process design and scale-up.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Agarose gel (Sepharose 4B), glycine, 1,4-butanediol diglycidyl ether. N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris), tricine, sodium chloride (NaCl), Coomassie brilliant blue R-250, crystalline bovine serum albumin (BSA), and gamma globulins from human blood (high-purity human IgG) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). Sodium acetate (AcNa) and sodium phosphate (NaP) were purchased from Merck (Germany). Acrylamide, bis-acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), dithiotrietol, and tetramethyl ethylene diamine (TEMED) for SDS-PAGE analysis were obtained from Bio-Rad (USA). The isoelectric focusing gel (PhastGel pH 3-10), the electrophoresis calibration kit for determination of isoelectric point (3-9.3), the electrophoresis calibration kits for determination of molecular weight (53 to 212 kDa), and PD10 Sephadex G-25 columns were provided by GE Healthcare (USA). Ultrapure water (Milli-Q, Millipore, USA) was used throughout the experiments. All other chemicals were of analytical reagent grade.

2.2. Human plasma

Human plasma from healthy donors was gently provided by Blood Center (Hemocentro) of University of Campinas (UNICAMP, Brazil). To ensure that suitable conductivity and pH were maintained for optimal binding, it was necessary to dilute plasma samples with the proper adsorption buffer.

2.3. Ligands

The P-Tyr and the control ligands L-Tyr, L-Phe, PEA, Tyra, and AMPA were purchased from Sigma-Aldrich (USA). All ligands used in this study

contained a primary amine group. An overview of the various structures explored in this study is shown in Figure 1.



Figure 1: Molecular structures of the ligands studied.

2.4. Agarose activation and ligands immobilization

The activation of agarose 4B with 1,4-butanediol diglycidyl ether was performed as recommended by Hermanson et al. [22]. The immobilization of each ligand was performed according to the protocols developed by Zachariou et al. and Zachariou and Hearn [23,24]. In brief, aqueous solutions of 0.2 mol L⁻¹ of each ligand were prepared and the pH was adjusted to 10.5 with KOH pellets at 4°C. For 15 g (wet weight) of activated gel, 30 mL of the ligand solution was added and the suspension was stirred for 4 h at 25 °C (for phosphorus-containing ligands) or 24h at 60°C (for non phosphorus-containing ligands), as recommended by Zachariou et al. [23]. After immobilization, the gels were sequentially washed with 100 mL of ultrapure water, 50 mL of acetic acid 50 mmol L⁻¹ at pH 4.0 and 100 mL of ultrapure water. Then the gels were suspended in 20% ethanol and kept under refrigeration until use.

The density of immobilized ligands was determined by elemental analysis of nitrogen in the Elemental Analysis Laboratory of Analytical Center of the University of São Paulo (Brazil) using the CHN 2400 Elemental Analyzer (Perkin-Elmer, USA).

2.5. Chromatographic procedures

Chromatographic experiments presented in this paper were divided into studies with high-purity human IgG and experiments using human plasma. Chromatographic runs were performed at room temperature (25 ± 2ºC) in duplicates. For the studies with high-purity human IgG, Tris-HCI, HEPES, MES, MOPS, AcNa, and NaP were used as adsorption buffers at 25 mmol L⁻¹, covering a pH range of 5.0 to 8.0. For the experiments with human plasma, HEPES 25 mmol L⁻¹ at pH 7.0 was used as adsorption buffer. A glass column (HR 10/10, GE Healthcare, USA) packed with 1.0 mL of each derivatized gel with the studied ligands was connected to a low-pressure chromatography system (ÄKTA Purifier, GE Healthcare, USA). The column was equilibrated with adsorption buffer at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ (superficial velocity of 76.4 cm h⁻¹) and then high-purity IgG or human plasma diluted in adsorption buffer (~ 7.0 and 4.6 mg of total protein at a concentration 3.5 mg mL⁻¹ and 6.0 mg mL⁻¹, respectively) was fed. After the sample loading, the column was washed with the same adsorption buffer. Elution was performed by adding NaCl 1.0 mol L⁻¹ in the adsorption buffer. During all chromatographic steps absorbance at 280 nm was monitored and fractions of 1.0 mL were collected.

In order to evaluate the effect of the salt in the adsorption buffer, same experiments were performed using the adsorption buffer added with NaCl (from 0.1 to 2.0 mol L⁻¹ NaCl) whereas elution was performed with the respective buffer without NaCl. The Bradford method [25], SDS-PAGE, and ELISA were used to analyze the proteins in both retained and nonretained fractions. After each experiment, the column was washed with ultrapure water and the loading buffer to restore it to its initial condition for a new experiment cycle.

2.6. Batch adsorption of human IgG on P-Tyr-agarose gel

The batch IgG adsorption experiments on P-Tyr-agarose gel were carried out, in duplicates, using Eppendorf tubes with 50 μ L of gel at four temperatures (10, 20, 25 and 35°C) as described in the literature [26-28]. First, the gel was equilibrated with adsorption buffer HEPES 25 mmol L⁻¹ at pH 7.0 and then 1.0

mL of human IgG solutions at different initial concentrations (0.5 to 20.0 mg mL⁻¹) was added in each tube. The tubes were stirred during 8 h to allow the equilibrium to be established.

The equilibrium concentration of protein in the liquid phase (C*) was obtained by measuring the absorbance at 280 nm (UV–vis spectrophotometer, Beckman DU 650, USA) using the extinction coefficient of 1.4 mL cm mg⁻¹. After that, the difference between the amount of protein added and that remaining in the liquid phase after equilibrium divided by the volume or mass of the adsorbent was used to determine the mass of protein adsorbed per volume or mass of gel (mg mL⁻¹ of gel or mg g⁻¹ of gel), Q*.

The parameters of the Langmuir isotherm model (Eq. (1)) were fitted to the experimental data employing the iterative fitting method of Levenberg–Marquardt using OriginLab® (Microcal, USA).

$$Q^* = \frac{Q_m C^*}{K_d + C^*} \tag{1}$$

where Q_m is the maximum protein binding capacity and K_d is the dissociation constant, which represents the affinity between protein and adsorbent.

Thermodynamics adsorption parameters (ΔG° , ΔH° , and ΔS°) at different temperatures were determined as described by de Góes et al., Haupt et al., Thrash Jr et al., and Chang et al. [28-31]. According to the van't Hoff equation

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln K_d \tag{2}$$

where ΔG is the change in apparent free Gibbs energy, ΔG° is standard Gibbs energy change, R is the ideal gas constant, and T is the temperature. At equilibrium, the change in apparent free Gibbs energy is equal zero (ΔG =0), the Eq. (2) can be written as:

$$\Delta G^0 = RT \ln K_d \tag{3}$$

From Eq. (3) ΔG° can be calculated at a given temperature from the dissociation constant. The temperature dependence of K_d is given by the van't Hoff isobar in its integrated form presented in Eq. (4):

$$\ln K_d = \frac{\Delta H^0}{RT} + J \tag{4}$$

in which J is an integration constant and ΔH° is the standard enthalpy change. So, ΔH° can be obtained from the slope if a straight line is obtained (in that case, H° is temperature-independent in this temperature range) plotting K_d as a function of 1/T. According to the Gibbs-Helmholtz relationship (Eq. (5)) the standard entropy change ΔS° can be calculated:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \tag{5}$$

2.7. Analytical methods

2.7.1. Total protein quantification

The total protein concentration of the fractions collected in the chromatographic runs was quantified by the colorimetric Bradford method [25] using BSA as reference protein.

2.7.2. SDS-PAGE

Fractions of chromatographic peaks (adsorption, washing, and elution) were analyzed by SDS-PAGE under denaturing and nonreducing conditions in a Mini-Protean TetraCell system (BioRad, USA) [32]. The separation was carried out at 180 V in 7.5% separation gels with a 4% stacking gel. Protein bands were developed by silver staining in accordance to the procedure described by Morrissey [33].

2.7.3. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA): IgG, IgA, IgM, Trf, and HSA quantification

Quantification of IgG, IgA, IgM, Trf, and HSA was performed using ELISA kits of Bethyl Laboratories (USA). The tests were carried out strictly according to the protocols accompanying each kit (IgG: E80-104; IgA: E80-102; IgM: E80-100; Trf: E80-128, and HSA: E80-129).

2.7.4. Isoelectric focusing

To determine the pl of high-purity IgG and eluted IgG samples, isoelectric focusing (IEF) analysis were carried out in a LKB PhastSystem (Pharmacia, Sweden), using the polyacrylamide PhastGel IEF 3-10 and the broad range pl marker (3.0 to 9.3). The IEF run and the gel staining followed the Separation Technique File No. 100 and the Development Technique File No. 210, respectively, provided by the manufacturer.

3. Results and discussion

3.1. Adsorbents synthesis: Agarose activation and ligands immobilization

The agarose gel was previously activated with 1,4-butanediol diglycidyl ether (bisoxirane), which promotes a partially hydrophobic character due to the ten carbon chain presented in the adsorbent. Later, P-Tyr and other ligands used as control were immobilized by the amino group. Ligands with different substitution patterns were investigated by varying the substituents attached to the aromatic ring (Figure 1). The removal of the phosphate and carboxyl groups was expected to lead to increased hydrophobicity of the immobilized ligand. In addition to amino acids and amino acid derivatives, it was also added as a control the ligand AMPA since this molecule presents only one phosphate group, and can be separately studied its effect on the adsorption of IgG. The conditions of ligands immobilization were standardized in order to prepare adsorbents with similar ligand density (the ligand density and the respective pKa values are presented in Table 1).

Ligand	рКа	Ligand Density (µmol mL ⁻¹ of gel)		
P-Tyr	< 2 and 5.8 (phosphate) 2.4 (-COOH) 9.4 (-NH ₂)	13.80		
L-Tyr	2.20 (-COOH) 9.11 (-NH ₂) 10.07 (-OH)	16.00		
L-Phe	1.83 (-COOH) 9.13 (-NH ₂)	14.69		
PEA	9.83 (-NH ₂)	22.90		
Tyra	10.52 (-NH ₂) 9.74 (-OH)	15.10		
AMPA	< 0.9 and 5.6 (phosphate) 10.2 (-NH ₂)	6.43		

Table 1. The pK_a values¹ and ligand density² of the studied ligands

 1 The pK_{a} values of the studied ligands were obtained from Sigma-Aldrich catalog.

² Determined by elemental analysis of nitrogen

However, the coupling efficiencies were not identical, presumably due to the effect of the ligand structure. Nevertheless, all ligand densities were obtained with the same order of magnitude, compatible with similar value for P-Tyr-agarose adsorbent used by Afonso et al. (5 to 15 μ mol of P-Tyr mL⁻¹ of gel) [19].

3.2. Human IgG adsorption onto P-Tyr-agarose: Effect of buffer system, pH, and conductivity

Chromatographic runs of high-purity human IgG were performed using three different kinds of buffer systems at 25 mmol L⁻¹ and pH range between 5.0 and 8.0 (respecting the buffering range of each buffer system): a) the zwitterionic buffers MOPS, MES, and HEPES (which present opposite signs charge at pH < pKa); b) the negatively charged AcNa and NaP; c) the positively charged Tris-HCI. The results of the retained IgG in each chromatographic run are presented in Figure 2.



Figure 2: Percentage of high-purity human IgG retained on P-Tyr-agarose as a function of the pH value and conductivity for the buffer systems. (\diamond) Conductivity (mS cm⁻¹).

The percentage of adsorbed IgG ranging from 80 to 90% was observed at pH values equal or lower than 7.0 using AcNa, MES, MOPS, and HEPES buffers. If an individual analysis is performed, the IgG adsorption decreases drastically when pH is increased, except for Tris-HCI, in which similar amounts of IgG were adsorbed in Tris-HCI buffering range (7.0 to 8.0).

The isoelectric point (pl) of the human IgG used in chromatographic experiments was determined by isoelectric focusing (IEF) analysis, being in the range of 4.3 to 9.3. Therefore, in the pH range studied (5.0 to 8.0), IgG has negative, positive and/or neutral charge depending on pH value. Since P-Tyr is negatively charged throughout all pH range studied, it was expected an adsorption dependence only regarding the pH. However, the adsorption also depended on the nature of the used buffer system. For example, in same pH value, such as 6.0, the IgG adsorption was disfavored in AcNa and NaP buffer when compared to MES buffer.

In order to understand the observed phenomenon, the percentage of retained IgG was analyzed as a function of the conductivity of each buffer system (Figure 2). For zwitterionic buffer systems, the highest percentage of adsorbed IgG was obtained when they had low conductivities (in its zwitterionic form), in accordance to Haupt et al. [29], which studied the adsorption of human IgG onto histidine-immobilized hollow fiber membranes. At pH values above the pKa of these buffers, an increase in conductivity promoted a decreasing in retained IgG. For conductivity values above 1.0 mS cm⁻¹, the retained IgG values observed were below 70%, except for AcNa buffer. Using both AcNa and MES buffer at pH 5.5, the retained IgG value achieved was similar, irrespective of the buffer conductivity (1.83 mS cm⁻¹ for AcNa and 0.41 mS cm⁻¹ for MES). In contrast, at pH 6.0, P-Tyr-agarose showed higher adsorption capacity when MES buffer was used compared to NaP, which indicates that increasing the conductivity, the retained IgG decreases (91% vs 36% for MES and NaP, respectively, Figure 2). Smaller amounts of dispersed ions in solution promote more interactions between proteins and the ligand P-Tyr, suggesting that the adsorption is mainly governed by electrostatic interactions in nature.

In order to understand the effect of conductivity in IgG adsorption capacity of zwitterionic buffers, an experiment was conducted using Tricine buffer at pH 7.5 (pKa of 8.15, conductivity 0.34 mS cm⁻¹ below the other zwitterionic buffers). The retained IgG was 63% when Tricine was used whereas only 37% of the injected IgG was adsorbed when HEPES was used at the same pH value (Figure 2). When non-zwitterionic NaP and Tris-HCI buffers were used, the low IgG adsorption onto P-Tyr-agarose can be possibly related to the higher conductivity values of the buffers at 25 mmol L⁻¹. These results led one to conclude that the zwitterionic nature of these buffer systems provides lower conductivity and hence a higher adsorption human IgG in P-Tyr-agarose, indicating that the electrostatic type interactions may be predominant in the IgG adsorption of P-Tyr-agarose.

Aiming to confirm this hypothesis, the effect of NaCl addition in 25 mmol L⁻¹ AcNa and MES adsorption buffers (at pH 5.0 and 5.5, respectively) was studied by varying its concentration between 0 and 2.0 mol L⁻¹ (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, and 2.0 mol L⁻¹). Increasing NaCl concentration from 0 to 0.1 mol L⁻¹, resulted in a drastic decrease in the adsorption capacity (90% to 5% of IgG retained), showing that human IgG can be eluted from the P-Tyr-agarose under a low NaCl concentration. A similar phenomenon was described by Akgol et al. for the adsorption of human IgG onto immobilized histidine methyl ester on magnetic

particles [34]. The decreasing in the adsorption capacity observed when increasing the NaCl concentration in the adsorption buffer confirms the predominance of electrostatic interactions in the IgG adsorption of P-Tyr-agarose.

3.3. Evaluation of different functional groups of P-Tyr on the adsorption of human IgG

In order to verify if all functional groups present in the ligand P-Tyr (phosphate, aromatic ring, and carboxyl groups) contribute for the adsorption of IgG, experiments of adsorption were conducted with control ligands (L-Tyr, L-Phe, PEA, Tyra, and AMPA) on different buffer systems. The results of retained IgG as a function of buffer system and pH are depicted in Figure 3a-f.



Figure 3: Retained IgG on the ligands (I) P-Tyr (I) AMPA (I) L-Phe (I) L-Tyr (IIII) Tyra (IIII) PEA. Buffer systems used: (a) AcNa; (b) NaP; (c)Tris-HCl; (d) MOPS; (e) MES; (f) HEPES.

The adsorption of IgG on control ligands was low (below 40%) and weakly affected by the nature of the buffer system and pH, except for AMPA and L-Phe. When MES buffer was used at pH 5.5, both AMPA and L-Phe adsorbed above 50% of human IgG (Figure 3e). For AMPA a decrease of IgG adsorption capacity is achieved when pH is increased. In contrast, for most cases, L-Tyr, PEA, and Tyra promoted an increase in IgG adsorption capacity when pH is increased. These ligands have hydrophobic groups without the presence of carboxylate group (negatively charged). This phenomenon can be also explained in view of the pl of the polyclonal human IgG used, which is in the range of 4.3 to 9.3. Increasing the pH from 6.0 to 7.5 makes the charge of many IgG molecules be zero or close to zero, thus allowing the IgG adsorption through hydrophobic interactions.

Regarding to the buffer system nature, it has a pronounced effect on IgG adsorption on P-Tyr and AMPA when compared to other ligands studied. For P-Tyr, for example, IgG adsorption reached more than 90% of the feed protein when buffer systems are in its zwitterionic form (Figures 3d, 3e, and 3f). On the other hand, when AMPA was used, it was possible to adsorb only about 60% of the human IgG using the zwitterionic buffers MOPS and MES (Figures 3d and 3e).

If a comparison is performed between the ligands PEA and L-Phe, under the conditions studied, it can be observed that both the aromatic ring (PEA) and the aromatic ring associated with a carboxylate group (L-Phe) had not favored the adsorption of human IgG. In the case of L-Phe, the condition that promoted more than 50% of human IgG retention was for MES at pH 5.5 (Figure 3e), which led one to conclude that the presence of aromatic ring alone or next to a carboxylate group is not essential to IgG adsorption. Regarding to the phenyl group, it can be noticed that its presence in Tyra and L-Tyr (phenyl group near the carboxylate group) does not have great influence on the IgG adsorption, since low adsorbed IgG percentage values are achieved in all buffers and pH values studied. From the analysis conducted in accordance with the functional groups present in the structure of each ligand, it can be noted that the phosphate group linked to the aromatic ring attached to the P-Tyr structure is largely responsible for adsorption of human IgG. It can be assumed that the high adsorption capacity obtained in P-Tyr was due to the combination of the interaction of the aromatic ring-phosphate and carboxylate groups to IgG.

Among the buffer systems studied, the buffering conditions under which the adsorption of more than 80% of the injected human IgG was possible onto P-Tyr-agarose were AcNa pH 5.0 and 5.5, MOPS pH 6.5, MES pH 5.5 and 6.0, and HEPES pH 7.0. Then, studies of IgG purification from human plasma was carried out using HEPES buffer at pH 7.0, to be buffering condition nearer to the physiological pH.

3.4. Purification of IgG from human plasma

The experiments of purification of IgG were performed using human plasma diluted 10 times with HEPES 25 mmol L⁻¹ buffer at pH 7.0. Figure 4 shows the chromatographic and the electrophoretic profiles. ELISA quantification of protein in each chromatographic step is presented in Table 2.



Figure 4. Chromatographic and electrophoretic profiles from adsorption of proteins onto P-Tyr-agarose, Bed volume: 1.0 mL. Flow rate: 1.0 mL min⁻¹. Injection: ~ 4.6 mg total protein (human plasma diluted 10 times in HEPES 25 mmol L⁻¹ at pH 7.0). (a) Chromatographic profile: (W) Washing, HEPES 25 mmol L⁻¹ pH 7.0; (E) Elution, HEPES 25 mmol L⁻¹ with NaCl 1.0 mol L⁻¹ pH 7.0; (R) Regeneration, NaOH 50 mmol L⁻¹. (b) Electrophoretic profile: (M) molecular weight marker; (I) Injection; (W) Washing fractions pool; (E) Elution fractions pool; (IgG) human IgG marker made from high-purity IgG (Sigma, USA).

Table	2:	Quantif	ication	of	lgG,	lgA,	lgΜ,	HSA,	and	Trf	by	ELISA	in	each
chroma	atog	graphic	step of	the	purifi	catior	n of Ig	G from	ı hum	nan p	olas	ma usi	ng l	P-Tyr-
agaros	se.													

Fraction	lgG	lgA	lgM	HAS	Trf
Injection (mg)	0.336	0.084	0.070	2.720	0.124
Washing (mg)	0.150	0.073	0.057	2.703	0.104
Elution (mg)	0.160	0.000	0.015	0.000	0.000
Adsorbed IgG (%) ^a	48				
IgG adsorption capacity (mg	0.160				
mL ⁻¹ gel)					
Purity (%) ^b	91				
Purification factor ^c	9.1				

^a Adsorbed IgG: mass ratio of eluted IgG by fed IgG x 100.

^bPurity: mass ratio of the eluted IgG by the total mass of the proteins quantified by ELISA in the elution step x 100.

^c Purification factor: purity ratio of the eluted IgG by the IgG fed.

Analyzing the electrophoretic profile (Figure 4b), it can be observed the presence of traces of IgM, Trf, and HSA in the pool of the eluted fractions. However, Trf and HSA were not detected by ELISA (values below the ELISA detection level of 0.69 ng mL⁻¹). According to the ELISA results (Table 2), it was achieved an IgG purity and recovery of 91% and 48%, respectively, in the elution step (based on the IgG, IgA, IgM, HSA, and Trf measurements), reaching a purification factor of 9.1.

Similar purity results were reported in the literature by Bresolin et al. and Arica et al. [27, 35]. These authors achieved purity of 91% and 93% employing the amino acids o-phospho-L-serine and histidine, respectively, as ligands for purifying IgG from human serum. As to the yield of IgG in the eluted fractions, the value obtained in this study was of the same order of magnitude of those reported by Bresolin et al. (58%) and Arica et al. (58%) [27, 35]. On the other hand, the purification factor of 9.1 achieved in the chromatographic experiments performed by P-Tyr-agarose was 68% higher than those reported by Bresolin et al. (purification factor of 5.4) [27].

The electrophoretic profile of the eluted fraction of P-Tyr-agarose showed that the adsorbed IgG has pl ranging from 7.0 to 9.3 (data not shown). At pH 7.0, the most of adsorbed proteins onto P-Tyr-agarose was positively charged, in accordance to the IEF. In this condition, most proteins was possibly adsorbed by electrostatic interactions. Thus, the properties of the P-Tyr-agarose seem to provide an adequate approach to purification of IgG from human plasma based on the electrostatic and attractive forces.

3.5. Determination of thermodynamic parameters of IgG adsorption at P-Tyr

In order to investigate the nature of the interaction between human IgG and the ligand P-Tyr, adsorption isotherms were carried out at different temperatures (10, 20, 25 and 35°C). The parameters of Langmuir model (maximum adsorption capacity, Q_m, and dissociation constant, K_d) were adjusted to experimental data using a nonlinear fitting procedure and its values are presented in Table 3 and Figure 5 shows the isotherms.



Figure 5. Experimental adsorption isotherms for human IgG on P-Tyr-agarose using HEPES buffer pH 7.0 at 10, 20, 25, and 35°C. Curves were calculated using the fitting parameters of Langmuir model. Temperatures: (+) 10°C, (\Box) 20°C, (\diamond) 25°C, and (\times) 35°C.

Table 3: Adjusted parameters of Langmuir model fitted to experimental IgG adsorption data onto P-Tyr-agarose

Temperature (ºC)	Q _m (mg g ⁻¹ gel)	K _d (mol L ⁻¹)	R ²
10	57.38 <u>+</u> 3.58	(2.63 <u>+</u> 0.51) × 10 ⁻⁵	0.97
20	273.51 <u>+</u> 12.63	(1.47 <u>+</u> 0.18) × 10 ⁻⁵	0.99
25	255.60 <u>+</u> 5.33	$(1.42 \pm 0.24) \times 10^{-5}$	0.99
35	67.79 <u>+</u> 2.98	$(0.63 \pm 0.10) \times 10^{-5}$	0.98

The experimental adsorption data were well represented by the Langmuir model (correlation coefficient between 0.97 and 0.99). It is observed an increase in IgG adsorption capacity at temperatures between 10 and 20 °C while a decrease in temperatures between 20 and 35 °C, which indicates that temperatures around room temperature (20 and 25 °C) favor the adsorption of IgG. The maximum capacity of IgG adsorption obtained in this study 273.51 mg g⁻¹ adsorbent at 20 °C (1.0 g of P-Tyr-agarose equals 2.5 mL of gel) was higher than the values reported by Uzun et al., Feng et al., and Bayramoglu et al., which obtained values ranging from 96 to 142 mg g⁻¹ when IgG was adsorbed onto histidine methyl ester polymerized with methacrylate, tyrosine derivative embedded in agarose, and arginine immobilized in methacrylate, respectively

[36-38]. K_d values obtained were in the order of 10^{-5} mol L⁻¹ indicating that P-Tyragarose can be considered as a low-affinity medium in accordance to Vijayalakshmi [7].

The adsorbent P-Tyr-agarose presented at constant enthalpy in the temperature range from 10 to 35°C and a linearity of van't Hoff plot (4.801x - 27.468; R² = 0.950). The IgG affinity for P-Tyr increased with increasing temperature (K_d values decrease with increasing temperature), which was also observed by Ribeiro et al. for the adsorption of human IgG onto an IMAC ligand (Ni(II) immobilized on iminodiacetic acid coupled to poly(ethylene vinyl alcohol) membranes) [39].

The adsorption of human IgG onto P-Tyr-agarose is an endothermic process, since the K_d values decreased with increasing temperature, providing positive ΔH° values (Table 4).

 Table 4: Thermodynamic parameters of human IgG adsorption onto P-Tyragarose

Temperature (ºC)	ΔG° (kcal mol⁻¹)	ΔHº (kcal mol⁻¹)	ΔS° (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
10	-5.94		21.02
20	-6.49	± 9 55	22.18
25	-6.62	+ 0.00	22.25
35	35 -7.34		23.87

The ΔG° values were negative and ranged from -5.94 to -7.34 kcal moL⁻¹, which indicate that adsorption is spontaneous and more favorable when temperature is increased. These ΔG° values are of similar magnitude to those obtained by Bayramoglu et al. for adsorption of human IgG onto L-arginine attached to methacrylate beads [38]. The ΔS° values were positive in the range of 21.02 to 23.87 cal mol⁻¹ K⁻¹ (Table 4) and a little change was observed when temperature was increased, indicating an increase in the system total disorder, promoting the adsorption and the stability of IgG-P-Tyr-agarose [40].

As described by Ross and Subramaniam, slightly positive values of ΔH° associated with ΔS° with the same sign indicate the predominance of electrostatic interactions [41]. Thus, the value found for ΔH° (+9.55 kcal mol⁻¹) is in the order

of magnitude as slightly positive, indicating the predominance of electrostatic interactions. In order to confirm this hypothesis, a chromatography was performed in P-Tyr-agarose using high purity human IgG diluted in 0.5 mol L⁻¹ sodium sulfate solution (sodium sulfate favors hydrophobic interactions). No adsorption of human IgG was observed in this condition, demonstrating that electrostatic interactions are the main responsible that make possible the IgG adsorption onto P-Tyr.

4. Conclusion

This study demonstrated that the adsorption of human IgG onto P-Tyragarose is highly influenced by the conductivity of the buffer system used. The zwitterionic buffer systems provide low conductivity and hence a high adsorption of human IgG in P-Tyr-agarose. The evaluation of different functional groups of P-Tyr on the adsorption of human IgG indicated the predominance of electrostatic interactions with the phosphate groups, although the contributions of aromatic and carboxylic groups also play a role. High selectivity was observed when HEPES buffer was used for purification of IgG from human plasma, reaching purity levels near 90%. P-Tyr has a maximum IgG binding capacity of 273.51 \pm 12.63 mg g⁻¹ which is higher than reported for many pseudobioaffinity adsorbents. The dissociation constant (K_d) values of the complex IgG-P-Tyr were in the order of 10⁻⁵ mol L⁻¹ indicating low-affinity. The value of ΔH° obtained was positive, suggesting the endothermic nature of IgG adsorption. The thermodynamic analysis revealed that the adsorption of IgG on P-Tyr occurs mainly due to electrostatic interactions. We can conclude that the P-Tyr-agarose is a potential and effective tool for the purification of IgG from human plasma solutions with high purity in single-step process.

Acknowledgments:

The authors gratefully acknowledge the financial support of FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Brazil), CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazil), and CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil).

References

[1] C.N. Pace, E.J. Herbert, J. Berchert, K. Shaw, L. Urbanikova, J.M. Scholtz, J. Sercik, Tyrosine hydrogen bonds make a large contribution to protein stability, J. Mol. Biol. 14 (2001) 393-404.

[2] J.H.A. Nugent, R.J. Ball, M.C.W. Evans, Photosynthetic water oxidation: the role of tyrosine radicals, Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics 1655 (2004) 217-221.

[3] R. Rivlin, S.P. Asper, Tyrosine and the thyroid hormones, Am. J. Med. 40 (1966) 823-827.

[4] B.J. Jongkees, B. Hommel, S. Kühn, L.S. Colzato, Effect of tyrosine supplementation on clinical and healthy populations under stress or cognitive demands - a review, J. Psychiatr. Res. 70 (2015) 50-57.

[5] S.K. Hanks, A.M. Quinn, Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members, Methods Enzymol. 200 (1991) 38-62.

[6] M. Ohtsuka, S. Ihara, R. Ogawa, T. Watanabe, Y. Watanabe, Preparation and characterization of antibodies to o-phosphotyrosine and their use for identification of phosphotyrosine-containing proteins, Int. J. Cancer 34 (1984) 855-861.

[7] M.A. Vijayalakshmi, Pseudobiospecific ligand affinity chromatography, Trends Biotechnol. 7 (1989) 71-76.

[8] Y. Fukami, F. Lipmann, Purification of the Rous sarcoma virus src kinase by casein-agarose and tyrosine-agarose affinity chromatography, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 321-324.

[9] A. Atasever, H. Ozdemir, I. Gulcin, O.I. Kufrevioglu, One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography, Food Chem. 136 (2013) 864-870.

[10] S. Beyaztaş, O. Arslan, Purification of xanthine oxidase from bovine milk by affinity chromatography with a novel gel, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 30 (2015) 442-447.

[11] D. Demir, N. Gencer, A. Er, Purification and characterization of prophenoloxidase from *Gallería mellonella* L., Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 40 (2012) 391-395.

[12] T. Demirci, M. Arslan, Ç. Bilen, D. Demir, N. Gençer, O. Arslan, Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of 1,3-dicarbonyl derivatives of methylaminobenzene-sulfonamide, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 29 (2014) 132-136.

[13] O. Ozensoy, O. Arslan, S.O. Sinan, A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography, Biochemistry 69 (2004) 216-219.

[14] R. Kalin, A. Atasever, H. Özdemir, Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish and Turnip roots, Food Chem. 150 (2014) 335-340.

[15] M.O. Karatas, B. Alici, E. Çetinkaya, Ç. Bilen, N. Gençer, O. Arslan, Synthesis, characterization, and tyrosinase inhibitory properties of benzimidazole derivatives, Russ. J. Bioorganic Chem. 40 (2014) 461-466.

[16] H.B. Kaya, B. Özcan, M. Şişecioğlu, H. Ozdemir, Purification of acetylcholinesterase by 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine from human erythrocytes, Appl. Biochem. Biotechnol. 170 (2013) 198-209.

[17] N. Dedeoğlu, M. Arslan, M. Erzengin, Purification of holstein bull semen paraoxonase 1 (PON1) by hydrophobic interaction chromatography and investigation of its inhibition kinetics by heavy metals, Biol. Trace Elem. Res. 158 (2014) 29-35.

[18] M.O. Kaya, O. Arslan, O.O. Guler, A new affinity method for purification of bovine testicular hyaluronidase enzyme and an investigation of the effects of some compounds on this enzyme, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 30 (2015) 524-527.

[19] A. Afonso, P. Pereira, J.A. Queiroz, A. Sousa, F. Sousa, Purification of pre-miR-29 by a new o-phospho-L-tyrosine affinity chromatographic strategy optimized using design of experiments, J. Chromatogr. A 1343 (2014) 119-127.

[20] J.E. Gessner, H. Heiken, A. Tamm, R.E. Schmidt, The IgG Fc receptor family, Ann. Hematol. 76 (1998) 231-48.

[21] C.M. Marzocchi-Machado, Y.M. Lucisano-Valim, Receptores para imunoglobulina G (FcγR), Medicina (Ribeirão Preto) 38 (2005) 82-95.

[22] G.T. Hermanson, A.K. Mallia, P.K. Smith, Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, San Diego, USA, 1992.

[23] M. Zachariou, I. Traverso, M.T.W. Hearn, High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXXXI. O-phosphoserine as new chelating ligand for use with hard Lewis metal ions in the immobilized-metal affinity chromatography of proteins, J. Chromatogr. 646 (1993) 107-120.

[24] M. Zachariou, M.T.W. Hearn, Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilised hard Lewis metal ion-chelate adsorbents, J. Chromatogr. A 890 (2000) 95-116.

[25] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.

[26] M.C.M. de Souza, I.T.L. Bresolin, S.M.A. Bueno, Purification of human IgG by negative chromatography on ω-aminohexyl-agarose, J. Chromatogr. B 878 (2010) 557-566.

[27] I.T.L. Bresolin, S.M.A. Bueno, Evaluation of amino acid ophosphoserine as ligand for the capture of immunoglobulin G from human serum, Appl. Biochem. Biotechnol. 167 (2012) 632-644.

[28] L.C. de Góes, E.A. Miranda, S.M.A. Bueno, Interaction of histidinetagged human proinsulin with immobilized nickel ion: effect of chelating ligand and thermodynamics analysis, Colloid Surf. A 369 (2010) 176-185.

[29] K. Haupt, S.M.A. Bueno, M.A. Vijayalakshmi, Interaction immobilized of human immunoglobulin G with L-histidine onto poly(ethylene vinyl alcohol) hollow-fiber membranes, J. Chromatogr. B 674 (1995) 13-21.

[30] M.E. Thrash Jr, J.M. Phillips, N.G. Pinto, An analysis of the interactions of BSA with an anion-exchange surface under linear and non-linear conditions, Adsorption 10 (2004) 299-307.

[31] Y.K. Chang, R.Z. Huang, S.Y. Lin, S.J. Chiu, J.C. Tsai, Equilibrium study of immobilized lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite, Biochem. Eng. J. 28 (2006) 1-9.

[32] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4, Nature 227 (1970) 680-685.

[33] J.H. Morrissey, Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity, Anal. Biochem. 117 (1931) 307-310.

[34] S. Akgol, S. Ozkara, L. Uzun, F. Yilmaz, A. Denizli, Pseudospecific magnetic affinity beads for immunoglobulin-G depletion from human serum, J. Appl. Polym. Sci. 6 (2007) 2405-2412.

[35] M.Y. Arica, E. Yalçin, G. Bayramoglu, Preparation and characterisation of surfaces properties of poly(hydroxyethylmethacrylate-co-methacrylolyamido-histidine) membranes: application for purification of human immunoglobulin G, J. Chromatogr. B 807 (2004) 315-325.

[36] L. Uzun, R. Say, A. Denizli, Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography, React. Funct. Polym. 64 (2005) 93-102.

[37] H. Feng, L. Jia, H. Li, X. Wang, Screening and chromatographic assessing of a novel IgG biomimetic ligand, Biomed. Chromatogr. 20 (2006) 1109-1115.

[38] G. Bayramoglu, A.U. Sene, M.Y. Arica, Adsorption of IgG on spacerarm and L-arginine ligand attached poly(GMA/MMA/EGDMA) beads, J. Appl. Polym. Sci. 104 (2007) 672-679.

[39] M.B. Ribeiro, M. Vijayalakshmi, D. Todorova-Balvay, S.M.A. Bueno, Effect of IDA and TREN chelating agents and buffer systems on the purification of human IgG with immobilized nickel affinity membranes, J. Chromatogr. B 861 (2008) 64-73. [40] R. Donat, A. Akdogan, E. Erdem, A. Cetisli, Thermodynamics of Pb²⁺ and Ni²⁺ adsorption onto natural betonite from aqueous solutions, J. Colloid Interface Sci. 286 (2005) 43-52.

[41] P.D. Ross, S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability, Biochemistry 20 (1981) 3096-3102.

4.2. PURIFICAÇÃO DE IgG A PARTIR DO PLASMA HUMANO E FRAGMENTO Fab EM P-Tyr-AGAROSE

Neste tópico estão apresentados os resultados experimentais do emprego do ligante P-Tyr imobilizado em agarose visando a captura e/ou purificação de lgG humana a partir do plasma humano. Para tal, foram estudados os seguintes sistemas tamponantes, tais como: MES, MOPS e Bis-Tris 25 mmol L⁻¹, pH entre 5,5 e 7,0 e NaP e Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, pH 6,0 e 7,0, respectivamente. A escolha destes tampões teve como base os resultados obtidos do estudo da interação de lgG humana com o P-Tyr apresentados no item 4.1. Complementar a este estudo, foram realizados experimentos de adsorção de fragmentos (Fab e Fc) proveniente da clivagem de IgG humana pela enzima papaína. Este estudo foi motivado pelo fato de que, em pH neutro, tanto o ligante quanto a porção Fc da IgG encontram-se negativamente carregados, o que favoreceria a adsorção seletiva de fragmentos Fab.

Primeiramente, foi alimentado na coluna cromatográfica 750 µL de plasma diluído 10 vezes (~4,6 mg de proteína total) nos sistemas tamponantes MES pH 5,5, 6,0 e 6,5, e Bis-Tris pH 6,0, 6,5 e 7,0 para a obtenção da condição que permitisse a maior seletividade na adsorção de IgG. A análise de eletroforese SDS-PAGE e ELISA demonstraram que não foi possível obter IgG humana livre de impurezas como Trf e HSA. Ao utilizar o sistema tamponante MES pH 5,5 foi possível recuperar na etapa de eluição 91% da IgG injetada, no entanto, a pureza foi abaixo do padrão estabecido (60%), sendo essa condição uma alternativa para outras aplicações, como por exemplo, a depleção de IgG para estudos proteômicos. Para ambos sistemas tamponantes, os maiores valores de pureza foram obtidos em pH 6,5, 84% e 80% para MES e Bis-Tris, respectivamente. Para avaliar o efeito do pH aplicado na pureza da IgG, foram realizados ensaios cromatográficos com plasma diluído 10 vezes em MOPS 25 mmol L⁻¹ pH 6,5, sendo obtida pureza de 70%, ou seja, menor que a obtida para o MES e Bis-Tris no mesmo valor de pH.

Em seguida, foram realizadas medidas de condutividade do plasma diluido nesses sistemas tamponantes. Verificou-se que os tampões que propocionaram maiores valores de pureza apresentaram valores de
condutividade em torno 1,80 mS cm⁻¹. Desta forma, os sistemas tamponantes Tris-HCl e NaP, que a principio apresentaram valores de condutividade maiores que 2,0 mS cm⁻¹ e haviam sido descartados devido à baixa capacidade na adsorção de IgG, foram reconsiderados e a condutividade ajustada para valores próximos a 1,80 mS cm⁻¹. Assim, as condições utilizadas foram Tris-HCl pH 7,0 e NaP pH 6,5, ambos a 10 mmol L^{-1} , com o plasma diluído 13 e 15 vezes, respectivamente. Ao utilizar o Tris-HCI e NaP foi possível obter IgG livre de impurezas, segundo as análises de eletroforese SDS-PAGE e ELISA, sendo que a a maior pureza aliada a recuperação foi obtida em sistema tamponante NaP (105% e 74%, respectivamente). O valor de pureza maior que 100% é explicado pela diferença entre os métodos de guantificação de proteína total (método de Bradford) e a quantificação de cada proteína individualmente (ELISA). O método de Bradford subestima a concentração de IgG nas amostras, enquanto o método de ELISA é altamente específico para esta proteína (LUCARINI AND KILIKIAN, 1999; KRUGER, 2002). Com base nesses resultados, o NaP 10 mmol L⁻¹pH 6,0 foi selecionado para os experimentos seguintes.

A adsorção de IgG humana em P-Tyr-agarose foi avaliada em função do tempo (cinética de adsorção) na vazão de 1,0 mL min⁻¹. Para tal foram utilizadas duas concentrações de IgG: 0,5 e 2,0 mg mL⁻¹ em NaP 10 mmol L⁻¹ pH 6,0, sendo que o tempo de equilíbrio foi de 20 e 170 min, respectivamente. Para as duas concentrações de IgG estudadas o modelo cinético de pseudo-segunda-ordem foi o que descreveu melhor os dados experimentais, tendo sido obtidos coeficientes de correlação de 0,97 e 0,95 para 0,5 e 2,0 mg mL⁻¹, respectivamente. As quantidades de IgG humana adsorvidas em P-Tyr-agarose (q_e mg g⁻¹ gel) obtidas experimentalmente foram coerentes com os valores teóricos, apresentando desvio de 1,7% para a concentração de 0,5 mg mL⁻¹ para e de 5,5% para a concentração de 2,0 mg mL⁻¹. A capacidade de adsorção obtida foi de 14,81 mg g⁻¹ para 0,5 mg mL⁻¹ e 46,97 mg g⁻¹ para 2,0 mg mL⁻¹. Esses resultados confirmam que o adsorvente P-Tyr-agarose pode ser utilizado como uma alternativa na purificação de IgG humana, usando o sistema tamponante NaP 10 mmol L⁻¹ pH 6,0.

No que concerne às isotermas de adsorção, o modelo de Langmuir, bem como o de Lagmuir-Freundlich, representaram adequadamente os dados

experimentais, com coeficiente de correlação similares 0,989 e 0,999, respectivamente. A capacidade máxima de adsorção de IgG (Q_m) obtida pelo modelo de Langmuir foi igual a 156,80 mg g⁻¹ gel. A constante de dissociação (K_d) deste modelo foi da ordem de grandeza de 10⁻⁵ mol L⁻¹, mostrando que P-Tyr pode ser considerado um ligante de afinidade média para adsorção de IgG na presença do sistema tamponante NaP 10 mmol L⁻¹ pH 6,0.

A fim de identificar a porção da molécula de IgG que interage com o ligante foram realizados ensaios com fragmentos de IgG humana clivados com papaína (Fab e Fc) nos sistemas tamponantes HEPES, Tris-HCl, Bis-Tris, e MOPS para a concentração de 25 mmol L⁻¹ em pH 7,0 e NaP e Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ em pH 6,0 e 7,0, respectivamente. Dentre todos os tampões utilizados só foi possível obter Fab livre de Fc na eluição para o HEPES 25 mmol L⁻¹ em pH 7,0, com recuperação de 86% do Fab injetado, com 98% de pureza (medido por RID). Foi possível identificar a presença de IgG intacta tanto na eletroforese quanto na membrana de *Western blot*. IgG não digerida também é observado nas frações de eluição de cromatografia em géis com proteína L imobilizada, que devido a afinidade pela cadeia leve do tipo *kappa*, adsorve não somente o fragmento Fab como também a IgG intacta.

O artigo está apresentado na forma do manuscrito e esta em processo de submissão.

The effect of the buffer system on the adsorption of human IgG and Fab fragments onto phospho-L-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent

Gisele Luiza Pavan, Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin, Aline Ferreira Velho Muzio, Daniele Celestino Cunha, and Sonia Maria Alves Bueno

¹School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas-SP, Brazil

²Chemical Engineering Department, Federal University of São Paulo (UNIFESP), 09913-030, Diadema-SP, Brazil

*Corresponding author. E-mail address: sonia@feq.unicamp.br

Abstract

The nature of the buffer system is one of various factors affecting the performance of the pseudoaffinity chromatography. The effect of five buffer systems MES, MOPS, Bis- Tris, Tris-HCI, and sodium phosphate (NaP) was evaluated on the adsorption of human IgG and Fab fragments onto phospho-Ltyrosine immobilized on agarose (P-Tyr-agarose). High values of purity (96%, based on ELISA analysis of albumin, transferrin, and immunoglobulins A, G, and M) were obtained when IgG was purified from human plasma diluted in 10 mmol L⁻¹ NaP buffer at pH 6.0. The P-Tyr-agarose was also promising in IgG capture, since 91% of IgG was adsorbed when plasma was diluted in 25 mmol L⁻¹ MES buffer at pH 5.5 and could be recommended for IgG depletion from human plasma in this condition. The experimental data of IgG adsorption kinetic were in agreement with the pseudo-second-order model. The adsorption isotherm data were well described by the Langmuir-Freundlich model, with value of parameter n below the unit (0.72), indicating negative cooperativity. Selectivity was achieved on P-Tyr-agarose from digested human IgG in 25 mmol L⁻¹ HEPES buffer at pH 7.0, obtaining Fab fragments in eluted fractions without Fc fragments (although having uncleaved IgG), with 86.2% of recovery.

Keywords ortho-phospho-tyrosine, purification, human IgG, Fab fragments.

1. Introduction

Immobilized amino acids have been used as pseudobiospecific ligands in affinity chromatography for the purification of a variety of proteins. Due to ease immobilization, low cost, high protein-binding capacity, and selectivity, immobilized amino acids represent alternatives to conventional affinity ligands. For example, antibodies from different biological sources have been purified on histidine, phenylalanine, lysine, and tryptophan immobilized onto several insoluble matrices.

The amino acid histidine has been reported as ligand for the separation of IgG, whether immobilized by amino or carboxylic groups [Bueno et al., 1995, Pitiot et al., 2001, Elkak et al., 2009, Fan et al., 2016]. However, the specificity of adsorption of IgG molecules on immobilized histidine depends on matrix nature, ligand orientation, and chromatographic conditions. The interactions between histidine and IgG take place with predominance of electrostatic interactions, but other ones, such as mild hydrophobic, van der Waals, and hydrogen bonding play an important role [Prasana et al., 2015; Savane et al., 2016]. Immunoglobulins are adsorbed in immobilized histidine at low ionic strength eluted in mild conditions and the purity of the isolated IgG reaches around 90%.

Phenylalanine and tryptophan have been exploited as ligands not only for the purification of IgG but also for immunoadsorption therapy [Gan et al., 2000; Naik et al., 2011]. When immobilized onto polyvinylalcohol gels, phenylalanine and tryptophan have been used for extracorporeal treatment of the several autoimmune diseases such as myasthenia gravis, Guillain-Barre syndrome, lupus nephritis, severe bullous pemphigoid, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus [Hirata et al., 2003; Sugimoto et al., 2006; Herrero-González et al., 2005; Lüftl et al., 2003]. The autoantibodies anti-DNA, antiphospholipid, rheumatoid factor, and immune complexes are retained by hydrophobic interactions onto polyvinylalcohol gels with phenylalanine and tryptophan as ligands [Gaubitz and Schneider, 2003]. For IgG purification from different sources, tryptophan complexed hydroxyapatite nanoparticles coupled to a polymethacrylate porous SEPA BEADS matrix and phenylalanine immobilized onto microporous polyamide and PVDF membranes have been employed with success as adsorbents resulting in general, a purity higher than 85% [Naik et al., 2011; Victor and Sharma, 2011; Gan et al., 2000; Sun et al., 2006].

L-Lysine and L-histidine have been used as ligands in negative chromatography for IgG purification and endotoxin removal. These immobilized amino acids capture mostly human serum proteins or endotoxins at neutral pH conditions while IgG with high purity is obtained in the non-retained fractions [Anspach and Petsch, 2000; Acconci et al., 2000; Pitiot et al., 2001; Machado et al., 2006; Bresolin et al., 2011]. The negative chromatography is an efficient method which provides IgG purification or endotoxin removal under gentle chromatographic conditions, reaching above 80% yields.

Recently, phosphorylated-tyrosine (P-Tyr) and -serine (OPS) amino acids coupled to agarose gel were reported as polyclonal and monoclonal IgG adsorbents with high selectivity as a function of adsorption conditions [Bresolin and Bueno, 2012; Oliveira et al., 2015; Pavan et al., 2017]. OPS immobilized on cyanogen bromide (CNBr)-activated agarose and P-Tyr coupled to bisoxiraneactivated agarose gel have shown high selectivity for IgG from human serum and plasma. OPS immobilized on agarose was also employed for purification of mouse monoclonal antibody (IgG2a) from precipitate solution of hybridoma culture supernatant [Oliveira et al., 2015]. OPS and P-Tyr interact with IgG mainly by electrostatic interactions with negatively charged phosphate and carboxylate groups of OPS and carboxylate and phosphate bounds to aromatic ring groups of P-Tyr [Bresolin and Bueno, 2012; Oliveira et al., 2015, Pavan et al., 2017]. However, although OPS and P-Tyr have been successfully used as ligands for purification of IgG, they have not been extensively investigated and the interactions between ligand and IgG have not yet been elucidated.

The present work extends the application of Pavan and coworkers' studies of human IgG purification on P-Tyr immobilized on agarose gel [Pavan et al., 2017] in order to acquire fundamental data for the development of IgG and Fab fragments purification or depletion processes from human plasma. The effects of operational conditions pH and buffer system on the capacity and selectivity of the adsorbent were investigated. Parameters of pseudo-first-order and pseudosecond-order models were fitted to kinetic adsorption data while Langmuir and Langmuir-Freundlich adsorption isotherm models were used to describe the equilibrium data. These parameters were determined aiming at obtaining useful data for the development of large scale processes aiming at the purification of human IgG from human plasma.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Agarose gel (Sepharose 4B), glycine, ortho-phospho-L-tyrosine (P-Tyr), 1,4-butanediol diglycidyl ether, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES), 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris), bis(2hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl) methane (Bis-Tris), sodium chloride, Coomassie brilliant blue R-250, crystalline bovine serum albumin (BSA), and γ globulins from human blood (high-purity human IgG) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Sodium acetate (AcNa) and sodium phosphate (NaP) were acquired from Merck (Germany). Acrylamide, N,N-methylene-bis-acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), dithiotrietol, and tetramethyl ethylene diamine (TEMED) for SDS-PAGE analysis were obtained from Bio-Rad (USA). ELISA kits for IgG, IgA, IgM, HSA (human serum albumin), and Trf (transferrin) determination were purchased from Bethyl Laboratoires (USA). The electrophoresis calibration kits for determination of molecular weight (53 to 212 kDa) and PD10 Sephadex G-25 columns were provided by GE Healthcare (USA). The water used in all experiments was ultrapure water obtained using a Milli-Q System (Millipore, USA). All other chemicals were of analytical reagent grade.

2.2. Human Plasma

Human plasma bags were gently provided by Blood Center (Hemocentro) of University of Campinas (UNICAMP, Brazil).

2.3. Methods

2.3.1. Adsorbent synthesis

The adsorbent preparation followed two steps as described in Pavan et al., 2017. First, agarose 4B was activated with 1,4-butanediol diglycidyl ether in accordance to the procedure presented by Hermanson et al. (1992). Briefly, 40 mL of a 0.6 mol L⁻¹ NaOH solution containing 75 mg of sodium borohydride was added to 50 mL of suction dried gel. Subsequently, 40 mL of 1,4-butanediol diglycidyl ether was slowly dropped to that suspension, which was kept under constant stirring at room temperature for 10 h. After the reaction time, the gel was washed with distilled water and stored in a 1.0 mol L⁻¹ NaCl solution under refrigeration.

The second step comprised P-Tyr immobilization, performed according to the protocols developed by Zachariou et al. (1993), Zachariou and Hearn (2000), and Pavan et al. (2017). A 0.2 mol L⁻¹ aqueous solution of P-Tyr was prepared and the pH was adjusted to 10.5 with KOH pellets, maintaining the temperature at 4°C. For a 15 g of suction dried activated gel, 30 mL of the ligand solution was added and the suspension was stirred for 4 h at 25 °C. After the immobilization, the gel was washed, resuspended in 20% ethanol and kept under refrigeration until use. The derivatized gel is referred as P-Tyr-agarose.

2.3.2. Human IgG papain-digestion

Aiming at the obtainment of Fab and Fc fragments, whole human IgG was cleaved with papain following the procedures described by Ternynck and Avrameas (1987), da Silva et al. (2014), and Mourão et al. (2016) using a 30 mg mL⁻¹ solution of high purity human IgG in 100 mmol L⁻¹ NaP buffer at pH 7.4 containing 40 mmol L⁻¹ EDTA. Briefly, the digestion was started by adding cysteine-activated papain to the IgG solution to achieve a papain/antibody ratio of 1% (w/w). Then, this solution was incubated at 37° C for 2 h. After this, iodoacetamide 400 mmol L⁻¹ solution was used to stop the reaction. Buffer

exchange of digested products was performed using PD10 Sephadex G-25 column (GE Healthcare, USA) following the procedure described by the manufacturer. Aliquots of digested IgG were stored at -20°C.

2.3.3. Chromatographic experiments

Chromatographic experiments were performed at room temperature ($25 \pm 2^{\circ}$ C) in duplicates. A HR 5/10 column (GE Healthcare, USA) was packed with 1.0 mL of P-Tyr-agarose and connected to a low-pressure chromatography system (ÄKTA Purifier, GE Healthcare, USA). The column was equilibrated at room temperature with the proper adsorption buffer, at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ (superficial velocity of 76.4 cm h⁻¹).

As feed, it was used approximately 750 µl of a diluted plasma solution (total protein mass of ~ 4.6 mg) prepared in a proper buffer depending of the experiment (MES, MOPS, and Bis-Tris at 25 mmol L⁻¹, pH from 5.5 to 7.0; NaP and Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, pH 6.0 and 7.0, respectively). Digested IgG solution was prepared in different buffers HEPES, Bis-Tris, MOPS, Tris-HCI, and NaP at 25 mmol L⁻¹, pH 7.0, and Tris-HCl and NaP 10 mmol L⁻¹ at pH 7.0 and 6.0, respectively. These solutions containing 1.4 mg of total protein were fed in the column. After the sample loading, the column was washed with the same adsorption buffer and elution was performed by adding 1.0 mol L⁻¹ NaCl in the adsorption buffer. During all chromatographic steps absorbance at 280 nm was monitored, fractions of 1.0 mL were collected and guantified by Bradford method [Bradford, 1976] and pools of washing and elution fractions were analyzed by SDS-PAGE. When human plasma was used, IgG, IgA, IgM, HSA, and Trf were quantified by ELISA while for digested IgG, Western blot and radial immunodiffusion assays were performed. After each experiment, the column was washed with ultrapure water and the loading buffer to restore it to its initial condition for a new experiment cycle.

2.3.4. Dynamic human IgG adsorption kinetic onto P-Tyr-agarose

The dynamic adsorption kinetic experiments were carried out in duplicate at room temperature as described in Daoud-Attieh et al, 2013 and Demirci et al, 2017. The C10/10 column (GE Healthcare, USA) packed with 1.0 mL of P-Tyr-agarose was equilibrated with 10 mmol L⁻¹ NaP at pH 6.0 (adsorption buffer) at 1.0 mL min⁻¹ (superficial velocity of 76.4 cm h⁻¹). A volume of 50 mL of high purity human IgG solution was prepared in 10 mmol L⁻¹ NaP buffer pH 6.0 in two different concentrations (0.5 and 2.0 mg mL⁻¹). These solutions were continuously recirculated through the column in a closed-loop circuit, until outlet concentration became constant. IgG solution was maintained under continuous stirring and, in determined time intervals, samples of 10 μ L were collected for protein quantification with the Bradford method [Bradford, 1976]. After each experiment, the column was regenerated with 50 mmol L⁻¹ NaOH, followed by Milli-Q water and the adsorption buffer to restore it to its initial condition for a new experiment.

The pseudo-first-order and pseudo-second-order kinetic models were applied to the experimental data on the human IgG adsorption kinetic using the following equations [Daoud-Attieh et al., 2013; Oliveira et al., 2015]:

$$q_t = q_e (1 + e^{-k_1 t}) \tag{1}$$

$$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{(1 + t k_2 q_e)}$$
(2)

in which qe and qt are the amount of IgG adsorbed (mg) onto P-Tyragarose (g) at equilibrium and time t (min), respectively; k_1 (min⁻¹) is the rate constant for the pseudo-first-order adsorption kinetic and k_2 (g mg⁻¹ min⁻¹) is the rate constant for the pseudo-second order kinetic.

2.3.5. Equilibrium adsorption of human IgG onto P-Tyr-agarose

The equilibrium IgG adsorption experiments onto P-Tyr-agarose were carried out at 25°C, in duplicates, using Eppendorf tubes with 50 μ L of gel. First, the gel was equilibrated with adsorption buffer 10 mmol L⁻¹ NaP at pH 6.0 and then 1.0 mL of human IgG solutions at different initial concentrations (0.5 to 20.0

mg mL⁻¹) was added to each tube. To allow the equilibrium to be established, the tubes were rotated end-over-end at 6 rpm during 8 h according to the kinetic studies performed.

The equilibrium concentration of protein in the liquid phase (C*) was obtained by measuring the absorbance at 280 nm (UV–vis spectrophotometer, Beckman DU 650, USA) using the extinction coefficient of 1.4 mL cm mg⁻¹. After that, the difference between the amount of protein added and that remaining in the liquid phase after equilibrium divided by the volume or mass of the adsorbent was used to determine the mass of protein adsorbed per volume or mass of gel (mg mL⁻¹ of gel or mg g⁻¹ of gel), Q*. Plotting Q* against C* yielded the equilibrium isotherm.

The parameters of Langmuir (Eq. (3)) and Langmuir-Freundlich (Eq. (4)) models were fitted to the experimental data employing the iterative fitting method of Levenberg–Marquardt using OriginLab® (Microcal, USA):

$$Q^* = \frac{Q_m C^*}{K_d + C^*} \tag{3}$$

$$Q^* = \frac{Q_m (C^*)^n}{K_{dLF} + (C^*)^n}$$
(4)

where Q_m is the maximum protein binding capacity; K_d is the dissociation constant, which represents the affinity between protein and adsorbent; K_{dLF} is the apparent dissociation constant of protein-ligand; and n is the Langmuir-Freundlich coefficient [Sharma e Agarwal, 2001].

2.4. Analytical Methods

2.4.1. Total protein quantification

The total protein content of chromatographic fractions was determined by the colorimetric Bradford method [Bradford, 1976] using BSA as reference protein.

2.4.2. SDS-PAGE

Fractions of adsorption, washing, and elution chromatographic peaks were analyzed by SDS-PAGE in a Mini-Protean TetraCell system (BioRad, USA), under denaturing and nonreducing conditions [Laemmli 1970]. SDS-treated samples were heated at 100 °C for 10 min and then applied to the gels. The separation was carried out at 180 V in a 7.5% separation gel with a 4% stacking gel. Protein bands were silver stained in accordance to the procedure presented by Morrissey (1981).

2.4.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): IgG, IgA, IgM, Trf, and HSA quantification

Quantification of IgG, IgA, IgM, Trf, and HSA was performed using ELISA kits purchased from Bethyl Laboratories (USA). The tests were carried out strictly in accordance to the protocols provided by the manufacturer for each kit (IgG: E80-104; IgA: E80-102; IgM: E80-100; Trf: E80-128, and HSA: E80-129). Absorbance measurements were performed on a ELx 808 microplate reader (Biotek, USA) on a wavelength of 450 nm.

2.4.4. Western blot

After SDS-PAGE runs, protein samples were transferred to nitrocellulose membranes in a Mini Transblotting III System (Bio-Rad, USA) as described by

Towbin et al. (1979), da Silva et al. (2014), Mourão et al. (2016), and Carmignotto et al. (2017) for the specific detection of whole human IgG and its Fc and Fab fragments. The secondary antibodies used were peroxidase conjugated antihuman IgG (Fab specific or Fc specific), both produced in goat and purchased from Sigma-Aldrich (USA). The protein bands were developed using a chromogen solution (0.003% H_2O_2 , 1.0 mg mL⁻¹ 3,3'-diaminobenzidine diluted in Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ at pH 7.4).

2.4.5. Fab fragment quantification by radial immunodiffusion (RID)

The concentration of Fab fragments presented in chromatographic fractions was determined by RID assay, in accordance to literature [Lu and Miller, 1996; da Silva et al., 2014, and Mourão et al., 2016]. It was used a Fab specific anti-human IgG antibody conjugated to peroxidase produced in goat (Sigma-Aldrich, USA).

2.4.6. Quantitative determination of uncleaved IgG and Fab fragments by densitometry of SDS-PAGE gels

The ratio between the amount of uncleaved human IgG and the Fab fragments presented in elution steps was determined by SDS-PAGE densitometry using the GS 800 Calibrated Densitometer (BioRad, USA).

3. Results and Discussion

3.1 Purification of IgG from human plasma

The ligand P-Tyr has negative charge over a wide pH range due to the presence of the both phosphate and carboxyl groups in its structure. Based on these characteristics, its ability to adsorb proteins through electrostatic interactions was exploited. As polyclonal human IgG has isoelectric point in the range of 6.9 to 9.3 [Bresolin et al., 2010], it was initially chosen to use buffers systems whose buffer ranges were between 5.5 and 7.0, to assure that the IgG molecules contained in the plasma were mainly positively charged. The following buffers were studied at 25 mmol L⁻¹, in which plasma was 10 times diluted: MES (zwiterionic buffer) at pH 5.5, 6.0, and 6.5, and Bis-Tris in pH 6.0, 6.5, and 7.0. For each experimental condition studied, the electrophoretic profiles and the quantification of IgA, IgG, IgM, Trf, and HSA of chromatographic fractions are shown in Figure 1.



Figure 1. Electrophoretic profile and quantification of IgG, IgA, IgM, Trf, and HSA (by ELISA) of pooled fractions of chromatographic runs performed with human plasma 10 times diluted in the following buffers at 25 mmol L⁻¹. Electrophoretic profile. MES (a) pH 5.5; (b) pH 6.0; (c) 6.5 and Bis-Tris (e) pH 6.0; (f) pH 6.5; (g) pH 7.0. M: Molecular weight marker; I: Injection; W: Washing fraction pool; E: Elution fraction pool; IgG: human IgG marker (Sigma-Aldrich). Quantification of proteins (d) MES and (h) Bis-Tris. (\Box) HSA; (\blacksquare) Trf; (\blacksquare) IgM; (\blacksquare) IgA; (\blacksquare) IgG; (\blacksquare) PT (total protein, Bradford, 1976).

Experimental data led one to conclude that pH and buffer system influence IgG recovery (ratio of eluted IgG mass and fed IgG mass. IgG recovery decreased when pH was increased for MES (recovery of 91, 79, and 60% for pH 5.5, 6.0, and 6.5, respectively) and increased slightly with increasing pH for Bis-Tris (recovery of 44, 51, and 53% for pH 6.0, 6.5, and 7.0, respectively). When MES pH 5.5 was used, a recovery of 91% was reached, but the presence of impurities in the electrophoresis was observed (Figure 1a), confirming the results obtained by the ELISA (Figure 1d, purity 60%). Due to this high recovery, this buffer can be recommended for other applications using P-Tyr-agarose, such as plasma depletion for proteomic studies, since 91% of the plasma IgG was adsorbed to the column, allowing obtaining flowthrough and washing fractions with only 7% of the initially fed IgG. Bereli et al. (2010) and Faulkner et al. (2011) reached depletion of 93.6% of human IgG in criogels with immobilized iminodiacetic acid (IDA)-Cu(II) and 92% of bovine IgG in immobilized protein G, respectively.

The highest purity values for both buffers were obtained at pH 6.5 (84 and 80% for MES and Bis-Tris, respectively). Although the purity values achieved are close, a higher IgG recovery was obtained with MES (60%). To confirm if this pH value provided the same purity of IgG, a new chromatographic experiment was performed, by feeding human plasma 10 times diluted in 25 mmol L⁻¹ MOPS at pH 6.5, whose results are presented in Figure 2.



Figure 2. Electrophoretic profile and quantification of IgG, IgA, IgM, Trf, and HSA (by ELISA) of pooled fractions of chromatographic runs performed with human plasma 10 times diluted in 25 mmol L⁻¹ MOPS at pH 6.5. (a) Electrophoretic profile. M: Molecular weight marker; I: Injection; W: Washing fraction pool; E: Elution fraction pool; IgG: human IgG marker (Sigma-Aldrich). (b) Quantification of proteins () HSA; () Trf; () IgM; () IgA; () IgG; () PT (total protein, Bradford, 1976).

At this pH, MOPS buffer has zero net charge due to two charges of opposite signals. The zwitterionic MOPS buffer provided a little lower IgG purity lower (70%) than those obtained with the Bis-Tris (80%) and MES (84%) buffer systems at pH 6.5. However, a higher IgG recovery was achieved (70%).

Considering the high price of MES, MOPS, and Bis-Tris when compared to Tris-HCI and NaP, these last ones were also evaluated using P-Tyr-agarose. IgG adsorption capacities from high purity human IgG solution were low when these buffers were used at 25 mmol L⁻¹ in the pH ranges of 6.0 to 8.0 for NaP and 7.0 to 8.0 for Tris-HCI. The highest percentages of adsorbed IgG were 37% and 22% for the NaP and Tris-HCI buffers at the pH values of 6.0 and 7.0, respectively [Pavan et al., 2017]. Probably, the low adsorption capacity achieved could be due to the high conductivity of these buffers when compared to MES, MOPS, and Bis-Tris (Table 1).

Molarity	Buffer System	рН ^а	Plasma dilution (times)	рН ^ь	Conductivity ^c (mS cm ⁻¹)
		5.5	10	5.89	1.77
	MES	6.0	10	6.22	1.88
		6.5	10	6.60	1.98
Ţ		6.0	10	6.21	2.77
lom	Bis-Tris	6.5	10	6.69	1.80
25 m		7.0	10	7.29	1.79
	MOPS	6.5	10	6.67	1.82
	NaP	6.0	10	6.25	3.33
	Tris-HCl	7.0	10	7.26	3.36
<u> </u>	NaP	6.0	10	6.51	2.66
		6.0	15	6.43	1.86
μ	Tris-HCI	7.0	10	7.46	2.32
10		7.0	13	7.32	1.80

Table 1.pH and conductivity of plasma solution in different buffer systems

a) buffer pH, before the plasma dilution; b) pH of the final solution, after plasma dilution; c) conductivity of the final solution, after the plasma dilution.

In order to verify if NaP and Tris-HCl buffers would also favor IgG adsorption at similar conductivity values to those of other buffers (between 1.8 and 2.0 mS cm⁻¹), their concentration was lowered from 25 to 10 mmol L⁻¹, which still maintained their conductivities above 2.0 mS cm⁻¹ (Table 1).

To achieve adequate conductivity values for IgG purification, that is, below 2.0 mS cm⁻¹, these buffers had to be used at 10 mmol L⁻¹ but with dilution of plasma higher than 10-fold (15 times in NaP buffer and 13 times in Tris-HCl buffer), according to the results presented in Table 1. At these conductivity values, no precipitation of plasma proteins was observed. The results of the purification are shown in Figure 3 and Table 2.



Figure 3. Electrophoretic profiles of pooled fractions of chromatographic runs performed in the following conditions: (a) injection of human plasma 15 times diluted in 10 mmol L⁻¹ NaP pH 6.0; (b) injection of human plasma 13 times diluted in 10 mmol L⁻¹Tris-HCl pH 7.0. M: Molecular weight marker; I: Injection; W: Washing fraction pool; E: Elution fraction pool; IgG: human IgG marker (Sigma-Aldrich).

Table 2. IgG, IgA, IgM, Trf, and HSA quantification (by ELISA) in each chromatographic step of IgG purification from human plasma in P-Tyr-agarose

	Steps	Protein (mg)					IgG Purification			
Buffer		lgG	lgA	lgM	Trf	HSA	TPª	Purity ^b	PF℃	R ^d
								(%)		(%)
	Injection	0.315	0.093	0.057	0.194	3.187	4.58	6.9		
ፈ	Washing	0.137	0.089	0.054	0.187	3.187	4.20	3.2		
Na	Elution	0.232	0.002	0.005	0.002	0.000	0.22	105	15.2	74
	Recovery	0.369	0.091	0.059	0.189	3.187	4.42			
	Injection	0.308	0.091	0.059	0.174	3.209	4.61	7.0		
HCI	Washing	0.129	0.089	0.056	0.185	3.209	4.48	2.9		
Tris-	Elution	0.180	0.002	0.003	0.003	0.000	0.15	120	17.1	58
	Recovery	0.309	0.091	0.059	0.188	3.209	4.63			

a) TP – Total Protein: quantified by Bradford method (1976); b) Elution IgG purity: ratio of eluted IgG mass and total protein fed; c) PF – Purification Factor: ratio of elution IgG purity and fed IgG purity. d) R - Recovery: ratio of eluted IgG mass and fed IgG mass.

The highest purity values were obtained using NaP and Tris-HCl buffers, both at 10 mmol L^{-1} , reaching 105% and 120%, respectively. These purity values that exceeded 100% can be explained due to the use of different protein

quantification methods. The Bradford method [Bradford, 1976], used for total protein quantification, underestimates the concentration of IgG in the samples, as high purity IgG is present. Depending on the protein measured, the Bradford method shows a great variation in response with a greater sensitivity to albumin [Kruger, 2002; Lucarini and Kilikian, 1999]. On the other hand, the ELISA method used for IgG, HSA, Trf, IgA, and IgM quantification is highly specific because of the antigen-antibody nature of the interactions of the samples. Although the high purity values achieved are close, the IgG recovery was higher for NaP (74%) than Tris-HCI (58%). This difference can be explained by the buffer system net charge that was negative for NaP and positive for Tris-HCI. At the pH studied, Tris could possibly compete with IgG (also positively charged) for the negatively charged sites of P-Tyr.

As both higher purity and higher recovery were obtained using 10 mmol L⁻¹ NaP at pH 6.0, this buffer system was chosen for the determination of kinetic and equilibrium parameters which are very important for scale up procedures.

3.2. Kinetic parameters determination of IgG adsorption onto P-Tyr-agarose

Adsorption kinetic of human IgG onto P-Tyr-agarose was evaluated as a function of time using a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ (superficial velocity of 76.4 cm h⁻¹, Figure 4). For this purpose, two concentrations of IgG 0.5 and 2.0 mg mL⁻¹ in 10 mmol L⁻¹ NaP at pH 6.0 were used. For IgG concentration of 0.5 mg mL⁻¹, the adsorption was a rapid process occurring within the first minute (0% adsorption at time 0 min to 88% adsorption at 1.2 min), followed by a much slower second step. For IgG concentration of 2.0 mg mL⁻¹ the adsorption was a slow process (0% adsorption at time 0 min to 5% adsorption at 1.2 min). At 5 min and 60 min, the adsorption tends to be equilibrium and no further increase in the adsorption capacity for IgG concentration of 0.5 and 2.0 mg mL⁻¹, respectively. Maximum adsorption was observed for IgG concentration of 0.5 and 2.0 mg mL⁻¹, respectively, with 100 and 56% disappearance of IgG from solution. The adsorption kinetic experimental data were analyzed according to the pseudo-first order and pseudo-second order models (Equations 1 and 2, Figure 4, Table 3).



Figure 4. Pseudo-first- and pseudo-second-order kinetic plot for human IgG adsorption onto P-Tyr-agarose. Buffer: 10 mmol L⁻¹ NaP at pH 6.0. (•) Experimental data; (•••••) pseudo-first-order model fitting; (––––) pseudo-second-order model fitting. a) 0.5 mg mL⁻¹. (b) 2.0 mg mL⁻¹.

	IgG concentration (mg mL ⁻¹)	Experimental q _e (mg g ⁻¹)	Kinetic model parameters				
-			Pseudo-first-order ^a				
			k1 (min ⁻¹)	q _e (mg g ⁻¹)	R ²		
	0 5	70.05	10.48 <u>+</u> 0.60	70.29 <u>+</u> 1.66	0.93		
	0.5	5 72.65	Pseudo-second-order ^b				
			k ₂ (g mg ⁻¹ min ⁻¹)	q _e (mg g⁻¹)	R ²		
			0.26 <u>+</u> 0.04	71.38 <u>+</u> 0.46	0.97		
-			Pseudo-first-order ^a				
			k1 (min ⁻¹)	k ₁ (min ⁻¹) q _e (mg g ⁻¹)			
			0.07 <u>+</u> 0.01 104.39 <u>+</u> 2.29		0.94		
	2.0	111.68	Pseudo-second-order ^b				
			k ₂ (g mg ⁻¹ min ⁻¹)	q _e (mg g⁻¹)	R ²		
			(7.99 <u>+</u> 0.87) x 10 ⁻⁴	117.63 <u>+</u> 2.92	0.95		
	a Developed of the transferred base	(a - k, t)					

 Table 3. Pseudo-first and pseudo-second-order kinetic parameters for adsorption of human IgG onto P-Tyr-agarose

^a Pseudo-first-order kinetic: $q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t})$ ^b Pseudo-second-order kinetic: $q_t = k_2 q_e^2 t / (1 + t k_2 q_e)$

For the concentration of 0.5 mg mL⁻¹ the pseudo-first order equation did not satisfactorily represent the experimental data ($R^2 = 0.93$, Table 3), although the calculated qe value reasonably agreed with experimental qe value. For both concentrations, the best adjusts were obtained with the pseudo-second order equation, reaching coefficient of correlation (R^2) of 0.97 and 0.95 for the concentrations of 0.5 and 2.0 mg mL⁻¹, respectively (Table 3).

For pseudo-second order model, the calculated qeq values for the concentrations of 0.5 and 2.0 mg mL⁻¹ (71.38 mg g⁻¹ and 117.63 mg g⁻¹, respectively) were close to the experimental values (72.65 mg g⁻¹ and 111.68 mg g⁻¹, respectively), with a deviation of 1.74 and 5.33%, respectively. Thus, the results indicated that the rate of adsorption is limited by the interaction between the IgG and the P-Tyr, not being governed by diffusion in the gel.

3.3. IgG adsorption isotherm determination

The experimental equilibrium adsorption data of IgG performed at 25°C with 10 mmol L⁻¹ NaP at pH 6.0 and the fitted curves of the Langmuir and Langmuir-Freundlichare presented in Figure 5.



Figure 5. IgG adsorption isotherm onto P-Tyr-agarose. Buffer: 10 mmol L⁻¹ NaP at pH 6.0. (♦) Experimental data; (——) Langmuir model fitting; (----) Langmuir-Freundlich model fitting.

Both Langmuir and Langmuir-Freundlich models represented well the experimental IgG adsorption data at the equilibrium, reaching similar correlation coefficients, of 0.989 and 0.999, respectively (Table 4).

Table 4. Adjusted parameters of Langmuir and Langmuir-Freundlich models fitted to experimental IgG adsorption data onto P-Tyr-agarose using 10 mmol L⁻¹ NaP buffer at pH 6.0.

Parameters	Langmuir	Langmuir-Freundlich
Q _m (mg g⁻¹ gel)	156.80 <u>+</u> 3.03	179.00 <u>+</u> 10.31
K _d (mol L ⁻¹)	(1.01 <u>+</u> 0.01) × 10 ⁻⁵	
K_{dLF} (mol L^{-1})		(1.23 <u>+</u> 0.12) × 10 ⁻⁵
n	-	0.73 <u>+</u> 0.07
R ²	0.989	0.999

The maximum adsorption capacity (Q_m) obtained from the Langmuir model adjustment showed compliance with the experimental data, where it was observed around 150 mg IgG g⁻¹ adsorbent in accordance to Figure 5 and Table 4. The maximum IgG adsorption capacity values obtained in this work were of the same order of magnitude as those values reported by Gondim et al. (2014) and Bayramoglu et al. (2007), which obtained values of 110.9 mg g⁻¹ and 142 mg g⁻¹ for adsorption of human IgG in Cibacron Blue F-3GA dye immobilized on chitosan/alginate and arginine immobilized on methacrylate matrix, respectively.

The dissociation constants K_d and K_{dLF} presented values in the order of magnitude of 10⁻⁵ mol L⁻¹, indicating a typical value of pseudobiospecific ligands, in which the elution can be performed under mild conditions. The Langmuir-Freudlich model considers the heterogeneous nature of the system and the adsorption cooperativity [Sharma and Agarwal, 2001]. The parameter n presented a value of 0.73, which characterizes a system with negative cooperativity, typical of adsorbents containing positive or negative charges, since the adsorption of a target molecule not favors the adsorption of other molecules at neighboring sites (probably by electrostatic repulsion).

3.4. Adsorption of Fab fragments of IgG onto P-Tyr-agarose

Because of the potential that P-Tyr-agarose reached for the purification of IgG from human plasma, the adsorption experiments of fragments from a papaindigested human IgG solution was carried out. Based on the negative charges of immobilized P-Tyr, it should be possible that Fc fragments are not adsorbed at a neutral pH (7.0), since these fragments are negatively charged at pH values above their pI range of 5.5 to 6.7 [Mourão et al. 2016].

The human IgG was cleaved with papain to produce both Fab and Fc fragments. Chromatographic experiments with digested human IgG solution were carried out in different buffer systems at 25 mmol L⁻¹ and pH 7.0: HEPES, Tris-HCl, Bis-Tris, and MOPS. Both IgG fragments were negligible adsorbed onto P-Tyr-agarose, when the IgG digested solution fed to the column was diluted in the Tris-HCl and MOPS buffers at 25 mmol L⁻¹ (adsorption below 5% of the total injected protein). However, when 25 mmol L⁻¹ HEPES and Bis-Tris were used as buffer, the fragments adsorption was around 40%. Experiments were also carried out using NaP and Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ at pH 6.0 and 7.0, respectively (selected buffers for IgG purification from human plasma, which reached better results). Fragments adsorption was in the order of 30 to 40%. So, its washing and elution fractions were submitted to qualitative electrophoretic and Western blot analysis.

The electrophoretic profiles and Western blot indicated adsorption of Fab fragments irrespective of the buffer system used, presenting traces of Fc fragments and also whole IgG molecule. Thus, only selectivity in P-Tyr-agarose (absence of Fc fragments) was verified, when the digested IgG solution was in 25 mmol L⁻¹ HEPES at pH 7.0 (Fab fragments separated from Fc fragments, Figure 6). The Western blot also revealed the presence of uncleaved IgG in elution fractions when HEPES buffer was used. Quantitative analysis of total protein and RID of the chromatographic fractions indicated that 86% of Fab fragments separated from the Fc fragments were recovered in the elution fractions with purity of 98% and purification factor of 2.1 (Table 5).



Figure 6. (a) Chromatographic profile of the human IgG solution digested by papain onto P-Tyr-agarose. Adsorption buffer: 25 mmol L⁻¹ HEPES at pH 7.0. Elution buffer: adsorption buffer containing 1.0 mol L⁻¹NaCl. Regeneration: 50 mmol L⁻¹NaOH. Bed volume: 1.0 mL; Flow-rate: 0.5 mL min⁻¹. Injection: ~ 1.5 mg digested IgG solution. **(b)** SDS-PAGE under non-reducing conditions. M: molecular weight marker; IgG: IgG marker (Sigma-Aldrich); I Injection; 4-6: washing fractions; 25-27: elution fractions. **(c)** Western blot of chromatographic fractions; 25-27: elution fractions.

	TP ^a		Fab ^b		Fab purification	
Pooled	(mg)	(%)	(mg)	(%)	Purity ^c (%)	PF^d
Fractions						
Injection	1.41 <u>+</u> 0.017	100.0	0.66 <u>+</u> 0.01	100.0	47 <u>+</u> 1	1.0
Washing	0.70 <u>+</u> 0.02	49.6	0.07 <u>+</u> 0.01	10.9	10 <u>+</u> 1	0.2
Elution	0.57 <u>+</u> 0.01	40.8	0.56 <u>+</u> 0.02	86.2	98 <u>+</u> 3	2.1
Recovery	1.27 <u>+</u> 0.02	90.3	0.63 <u>+</u> 0.02	97.1	-	-

Table 5: Mass balance of digested IgG solution chromatography on P-Tyragarose

^a TP: Total protein determined by Bradford method (Bradford, 1976).

^b Fab and uncleaved IgG: mass determined by RID.

° Purity: mass ratio of the Fab mass to total protein mass x 100

° PF: purification factor, purity ratio of the Fab in the step by the Fab in the feed.

The ligand P-Tyr is negatively charged at pH 7.0 and the isoelectric points of the fragments are in the range of 6.0 to 9.3 and 5.5 to 6.7 for Fab and Fc, respectively [Mourão et al, 2016]. At pH 7.0, Fc fragment is negatively charged, while Fab fragments have positive, negative, and neutral charges. Thus, Fab fragments were adsorbed while Fc fragments were not retained, being recovered in the washing step. The purity achieved with the use of P-Tyr-agarose (98%) is similar to that obtained by Co(II) chelated to CM-Asp (carboxymethyl aspartate) immobilized on the agarose gel (91% purity) [Mourão et al., 2016].

The intact IgG was also adsorbed with Fab fragments onto P-Tyr-agarose, like protein L-agarose. The protein L is a bioespecific ligand traditionally used for this purpose. Protein L has affinity for the kappa light chains of immunoglobulins present in the Fab region of the antibody, but not interacting with the lambda chains [Nilson et al., 1993, Duarte et al., 2005]. Since protein L has affinity for the light chain of the kappa type then it adsorbs not only proteolytic Fab fragments, but also uncleaved IgG molecules. Eluted fractions of the chromatographic experiments performed using papain digested human IgG as feeding on protein L-agarose and P-Tyr-agarose, respectively, presented 53% and 68% of Fab and 47% and 32% of uncleaved IgG (determined by densitometry of SDS-PAGE gel). This result demonstrates the potential use of P-Tyr-agarose for human Fab separation from Fc fragments.

4. Conclusions

The P-Tyr, a pseudobiospecific ligand for IgG purification, showed to be very promising since high values of IgG purity and electrophoretically homogeneous bands in the elution fractions were observed when this protein was purified from human plasma diluted in 10 mmol L⁻¹ NaP buffer at pH 6.0. The P-Tyr-agarose adsorbent was also promising in IgG capture, since 91% of IgG was adsorbed when plasma was diluted in 25 mmol L⁻¹ MES buffer at pH 5.5 and could be recommended for IgG depletion from human plasma in this condition. The adsorption of IgG onto P-Tyr-agarose was evaluated as a function of time for two initial IgG concentrations (0.5 and 2.0 mg mL⁻¹). The kinetic experimental data were used to calculate parameters of the kinetic models of pseudo-first-order and pseudo-second order. For both concentrations, the best fit was obtained with the pseudo-second-order model. For the adsorption isotherm tests the data obtained were described by the Langmuir and Langmuir-Freundlich models, with dissociation constant in the order of magnitude of 10⁻⁵ mol L⁻¹, characteristic of a pseudobiospecific ligand. The value of parameter n obtained was below the unit, indicating negative cooperativity. For the human IgG fragments, it was possible to obtain Fab fragments free of Fc fragments when using the 25 mmol L⁻¹ HEPES at pH 7.0 buffer system, in which 86.2% of the injected Fab fragments were recovered in the elution step with 98% off purity.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Brazil), CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazil), and CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil).

References

- Acconci C.; Legallais C.; Vijayalakshmi M.; Bueno S.M.A. Depyrogenation of snake antivenom serum solutions by hollow fiber-based pseudobioaffinity filtration. Journal of Membrane Science (2000) 173, 235–245.
- Anspach F.B.; Petsch D. Membrane adsorbers for selective endotoxin removal from protein solutions. Process Biochemistry (2000) 35, 1005-1012.

- 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. (2007) 104, 672-679.
- Bereli N.; Sener G.; Altintas E.B.; Yavuz H.; Denizli, A. Poly(HEMA-co-NBMI) Monolithic Cryogel Columns for IgG Adsorption. Materials Science and Engineering C, (2010) 30, 323-329.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry (1976) 72, 248-254.
- Bresolin I.T.L.; Souza M.C.M.; Bueno S.M.A. A new process of IgG purification by negative chromatography: Adsorption aspects of human serum proteins onto ω-aminodecyl-agarose. Journal of Chromatography B, (2010) 878, 2087-2093
- 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 (2011) 46, 277-2285.
- Bresolin I.T.L.; Bueno S.M.A. Evaluation of Amino Acid O-Phosphoserine as Ligand for the Capture of Immunoglubulin G from Human Serum. Applied Biochemistry and Biotechnology (2012) 167, 632-644.
- Bueno S.M.A.; Haupt K.; Vijayalakshmi M.A. Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized Lhistidine in hollow fibre membranes. Journal of Chromatography B (1995) 667, 57-67.
- Carmignotto G.P.; Mourão C.A.; Bueno S.M.A. Separation of human Fab fragments by negative chromatography on ω-aminohexyl- and poly(ethyleneimine)-agarose. Process Biochemistry 52 (2017) 267-275.
- Daoud-Attieh M; Chaib H; Armutcu C; Uzun L; Elkak A; Denizli A. Immunoglobulin G purification from bovine serum with pseudo-specific supermacroporous cryogels. Separation and Purification Technology (2013) 118, 815-822.
- da Silva L.C.A.; Serracchiani M.M.; Miranda E.A.; Bueno S.M.A. Separation of human Fab fragments on negative mode Ni(II)-TREN-agarose chromatography. Process Biochemistry (2014) 49, 715–723.

- Demirci B.; Bereli N.; Aslıyüce S.; Baydemir G.; Denizli A. Protein C recognition by ion-coordinated imprinted monolithic cryogels. Journal of Separation Science (2017) 40, 1610-1620.
- Duarte, I.S.; Zollner, R.L.; Bueno S.M.A.Protein L-agarose for adsorption of autoantibodies: A potential tool for extracorporeal treatment. Artificial Organs (2005) 29(4), 313-323
- Elkak A.; Ismail S.; Uzun L.; Denizli A.Adsorption study of immunoglobulin G subclasses from different species by pseudobioaffinity separation on histidyl-bisoxirane-sepharose. Chromatographia (2009) 69, 1161-1167.
- Fan J.; Luo J.; Chen X.; Wan Y. Polydopamine meets porous membrane: A versatile platform for facile preparation of membrane adsorbers. Journal of Chromatography A, (2016) 1448, 121-126.
- Faulkner S.; Elia G.; Hillard M.; O'Boyle P.; Dunn M.; Morris D. Immunodepletion of albumin and immunoglobulin G from bovine plasma. Proteomics (2011) 11, 2329-2335.
- Gan H.-Y.; Shang Z.-H.; Wang J.-D. New affinity nylon membrane used for adsorption of γ-globulin. Journal of Chromatography A (2000) 867, 161-168.
- Gaubitz M.; Schneider K.M. Immunoadsorption in systemic Lupus Erythematosus: Different techniques and their current role in medical therapy. Therapeutic Apheresis and Dialysis (2003) 7, 183-188.
- Gondim D.R.; Dias N.A.; Bresolin I.T.L.; Baptistiolli A.M.; Azevedo, D.C.S.; Silva Jr. I.J. Human IgG adsorption using dye-ligand epoxy chitosan/alginate as adsorbent: influence of buffer system. Adsorption (2014) 20, 925-934.
- Hermanson G.T.; Mallia A.K.; Smith P.K. Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, San Diego. (1992) 118-119.
- Herrero-González J. E.; Sitaru C.; Klinker E.; Bröcker E.B.; Zillikens D. Successful adjuvant treatment of severe bullous pemphigoid by tryptophan immunoadsorption. Clinical and Experimental Dermatology (2005) 30, 519-522.
- Hirata N.; Kuriyama T.; Yamawaki N. Immusorba TR and PH. Therapeutic Apheresis and Dialysis (2003) 7, 85-90.
- Kruger, N.J. The Bradford method for protein quantitation. In Protein Protocols Handbook (Walker, J.M., ed.). Totowa, NJ: Humana Press, 2nd edition, (2002) 15-20.

- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4, Nature (1970) 227, 680-685.
- Lu X.S.; Miller C.J. Concentration of IgG in the sera of normal rhesus macaques as determined by a species-specific radial immunodiffusion assay. Journal of Immunological Methods (1996) 197(1-2), 193-196.
- Lucarini A.C.; Kilikian B.V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. Biotechnology Techniques (1999) 13, 149-154.
- Lüftl M.; Stauber A.; Mainka A.; Klingel R.; Schuler G.; Hertl M. Successful removal of pathogenic autoantibodies in pemphigus by immunoadsorption with a tryptophan-linked polyvinylalcohol adsorber. British Journal of Dermatology (2003) 149, 598-605.
- Machado R.L.; de Arruda E.J.; Santana C.C.; Bueno S.M.A. Evaluation of a chitosan membrane for removal of endotoxin from human IgG solutions. Process Biochemistry (2006) 41, 2252–2257.
- Morrissey J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Analytical Biochemistry (1931) 117, 307-310.
- Mourão C.A.; Carmignotto G.P.; Bueno S.M.A. Separation of human IgG fragments using copper, nickel, zinc, and cobalt chelated to CM-Asp-agarose by positive and negative chromatography Journal of Chromatography B (2016) 1017, 163-173.
- Naik A.D., Raina M., Lali A.M. AbSep: An amino acid based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G. Journal of Chromatography A (2011) 1218, 1756-1766.
- Nilson, B.H.K.; Logdemb, L.; Kastern, W.; Björk, L.; Akerström, B. Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. Journal of Immunological Methods (1993) 164, 33-40.
- Oliveira C.R.; Tamashiro W.M.S.C.; Bueno S.M.A. Evaluation of OPS-agarose pseudo-affinity adsorption IgG2a mouse monoclonal antibody. Process Biochemistry 50 (2015) 2267-2274.
- Pavan G.L.; Bresolin I.T.L.; Grespan A.; Bueno S.M.A. Phosphorylated-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G. Journal of Chromatography B (2017) 1052, 10-18.

- Pitiot 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 β2-microglobulin and Immunoglobulin G. Journal of Chromatography B (2001) 758, 173-182.
- Prasanna R.R.; Kamalanathan A.S.; Vijayalakshmi M.A. Development of Lhistidine immobilized CIM® monolithic disks for purification of immunoglobulin G. Journal of Molecular Recognition (2015) 28, 129-141.
- Savane T.S.; Kumar S.; Janakiraman V.N.; Kamalanathan A.S.; Vijayalakshmi M.A. Molecular insight in the purification of immunoglobulin by pseudobiospecific ligand L- histidine and histidyl moieties in histidine ligand affinity chromatography (HLAC) by molecular docking. Journal of Chromatography B, (2016) 1021, 129-136.
- Sharma S.; Agarwal G.P. Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherm models. Analytical Biochemistry (2001) 288, 126-140.
- Sugimoto K.; Yamaji K.; Yang K-S.; Kanai Y.; Tsuda H.; Hashimoto H. Immunoadsorption plasmapheresis using a phenylalanine column as an effective treatment for Lupus nephritis. Therapeutic Apheresis and Dialysis (2006) 10, 187-192.
- 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 (2006) 48, 215-222.
- Ternynck T.; Avrameas S. Techniques Immunoenzymatiques: Techniques en Immunologie. Les Editions INSERM France (1987).
- Towbin H.; Staehelin T.; Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1979) 76, 4350-4354.
- Victor S.P.; Sharma C.P. Tryptophan complexed hydroxyapatite nanoparticles for immunoglobulin adsorption. Journal of Materials Science: Materials in Medicine (2011) 22, 2219-2229.
- Zachariou M.; Traverso I.; Hearn, M.T.W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXXXI. O-

phosphoserine as new chelating ligand for use with hard lewis metal ions in the immobilized-metal affinity chromatography of proteins. Journal of Chromatography (1993) 646, 107-120.

Zachariou M.; Hearn M.T.W. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilised hard Lewis metal ion-chelate adsorbents. Journal of Chromatography A (2000) 890, 95-116.

CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO GERAL

A identificação e o estudo de novos ligantes para purificação de anticorpos são de extrema importância, uma vez que os métodos de purificação usualmente empregados pela indústria são responsáveis pelos altos preços dos produtos obtidos. Desta forma, o estudo de ligantes alternativos aos convencionais e que possam minimizar os custos e maximizar a produtividade se faz necessário.

Neste trabalho, o derivado de aminoácido P-Tyr foi proposto de forma inédita como ligante em cromatografia de afinidade visando a purificação de IgG humana. Inicialmente o ligante P-Tyr foi imobilizado em gel de agarose ativado com bisoxirano (1,4 butanodiol diglicidil éter). Quanto à reação química de ativação e imobilização, o reagente bisoxirano foi escolhido devido à estabilidade da ligação éter formada entre o bisoxirano e a matriz de agarose e entre o bisoxirano e o P-Tyr. Além disso, pelo fato desse reagente apresentar doze átomos na sua estrutura, não foi necessário a inserção de braços espaçadores (Figura 5.1).



Figura 5.1: Estrutura proposta do P-Tyr-agarose e as cargas disponíveis em valores de pH neutro.

Posteriormente, o gel de agarose ativado com bisoxirano foi utilizado para a imobilização dos ligantes controles, os quais foram: PEA, Tyra, L-Phe, L-Tyr e AMPA. Para avaliar a eficiência da imobilização destes ligantes, foi realizada análise elementar de nitrogênio, sendo obtidos valores de densidade de ligantes coerentes com aqueles encontrados na literatura.

Os estudos de adsorção de IgG humana em função do sistema tamponante e do pH foram conduzidos com os seguintes tampões a 25 mmol L⁻¹ e na faixa de valores de pH entre 5,0 e 8,0, de acordo com a faixa tamponante

de cada tampão: a) MOPS, MES e HEPES (apresentam sinais de cargas opostas em pH < pKa); b) AcNa e NaP (carregados negativamente); c) Tris-HCI (carregado positivamente).

O ligante P-Tyr, na faixa de pH estudada, apresenta em sua estrutura dois grupamentos negativamente carregados (fosfato – pKa₁<2,0 e pKa₂= 5,8e o carboxílico – pKa= 2,5) e um grupamento aromático que confere um caráter hidrofóbico ao ligante (Figura 5.1). O ponto isoelétrico (pI) da IgG humana de alta pureza utilizada, estava na faixa de 3,5-8,4, ou seja, nos valores de pH testados tem-se IgG neutra e carregada positiva e negativamente.

Uma vez que o ligante P-Tyr encontra-se negativamente carregado em toda faixa de pH estudada, e que a IgG se encontra neutra, negativa ou positivamente carregada dependendo do pH aplicado, era esperado que a adsorção dependesse unicamente do pH. No entanto, verificou-se que a natureza do sistema tamponante e a condutividade atuam efetivamente na adsorção da IgG. A capacidade de adsorção de IgG, quando solubilizada nos NaP e AcNa em pH 6,0, foi de aproximadamente 35% e 60%, respectivamente, contra 90% obtido para o MES no mesmo valor de pH. Em todos os sistemas tamponantes testados, o aumento do pH acarretou na diminuição da quantidade de IgG adsorvida, com exceção do Tris-HCI, no qual as quantidades foram similares. Observa-se que para todos os tampões zwiteriônicos, as maiores quantidades de IgG adsorvida foram obtidas em baixos valores de condutividade. Desta forma, a interação entre a IgG e P-Tyr tem como limitação a condutividade do tampão empregado, uma vez que para valores de condutividade superiores a 1,0 mScm⁻¹, a quantidade de IgG retida foi menor que 70%, exceto para AcNa. Comportamento similar também foi observado por Haupt e colaboradores (1995) para adsorção de IgG humana em histina imobilizada em membranas de álcool poli(etileno) vinílico.

Observou-se que os tampões Tris-HCI e NaP, devido aos seus altos valores de condutividade, propiciaram os menores valores de capacidade de adsorção de IgG em P-Tyr-agarose. A baixa capacidade de adsorção de IgG pode ser contornada diminuindo os valores de condutividade desses tampões, ou seja, diminuindo a molaridade. O Tris-HCI em pH 7,0 e NaP em pH 6,0 foram
preparados em concentração de 10 mmol L⁻¹, sendo que a condutividade e a capacidade de adsorção de IgG, respectivamente, passaram de 2,14 mS cm⁻¹ e 37% para 1,13 mS cm⁻¹ e 83%, para o NaP, e de 2,71 mS cm⁻¹ e 22% para 0,80 mS cm⁻¹ e 70%, para o Tris-HCI.

Visando a purificação de IgG a partir do plasma humano, foram selecionadas as condições tamponantes que propiciaram capacidade de adsorção de IgG humana de alta pureza maior que 70%, a saber: (a) para concentração de 25 mmol L⁻¹, os tampões HEPES em pH 7,0, MES em pH 5,5, 6,0 e 6,5, Bis-Tris em pH 6,0, 6,5 e 7,0 e MOPS em pH 6,5; (b) para a concentração de 10 mmol L⁻¹, os tampões Tris-HCI em pH 7,0 e NaP em pH 6,0. Para os tampões com concentração de 25 mmol L⁻¹, o plasma humano foi diluido 10 vezes e para o de 10 mmol L⁻¹ a diluição foi de 13 e 15 vezes para Tris-HCI e NaP, respectivamente. A diminuição da concentração dos tampões Tris-HCI e NaP e o aumento da diluição do plasma foram realizados para que a condutividade do plasma diluído estivesse na faixa de 1,8 a 2,0 mS cm⁻¹, visto que nesta faixa de condutividade foi possível obter IgG com alto grau de pureza em outros sistemas tamponantes.

Para a concentração de 25 mmol L⁻¹ e plasma 10 vezes diluído, a melhor condição para a purificação de IgG foi obtida para o HEPES em pH 7,0, onde foi possível recuperar na eluição 48% de IgG com mais de 90% de pureza. Resultados similares foram encontrados por Bresolin et al. (2012) e Arica et al. (2004), os quais reportaram pureza de 91% e 93% para os ligantes orto-fosfo-L-serina (OPS) e a histidina na purificação de IgG a partir do plasma humano, com recuperação de 58% para ambos. No que concerne ao fator de purificação, este trabalho apresentou um valor 70% maior que o obtido por Bresolin e colaboradores (2012).

A adequação da condutividade para os sistemas tamponantes Tris-HCl em pH 7,0 e NaP em pH 6,0 na concentração de 10 mmol L⁻¹resultou em boa adsorção de IgG em ambos sistemas, sendo obtido alta pureza, quando comparado a pureza obtida na presença dos tampões na concentração de 25 mmol L⁻¹. No entanto, o NaP em pH 6,0 proporcionou recuperação de IgG 1,3 vezes maior do que a obtida para o Tris-HCl em pH 7,0, o que pode ser explicado pela carga do sistema tamponante. O NaP pH 6,0 encontra-se negativamente carregado, enquanto o Tris-HCl encontra-se positivamente carregado. A carga positiva do Tris-HCl compete com a IgG pelos sítios de ligação no P-Tyr-agarose, diminuindo a capacidade de adsorção, enquanto que a carga negativa do NaP promove a interação da IgG com a ligante por meio da repulsão por cargas semelhantes.

A maior pureza obtida para IgG ao utilizar os sistemas tamponantes NaP pH 6,0 e Tris-HCl pH 7,0 em concentração de 10 mmol L⁻¹ quando comparado ao sistema tamponante HEPES 25 mmol L⁻¹ está, provavelmente, relacionada com a condutividade desses sistemas tamponantes quando na presença do plasma. A condutividade do HEPES com o plasma diluido foi de 2,17 mS cm⁻¹ contra aproximadamente 1,80 mS cm⁻¹ para o NaP e Tris-HCl.

Quanto à purificação a partir do plasma humano, os dois sistemas tamponantes que proporcionaram bons valores de pureza e recuperação, sendo eles o HEPES 25 mmol L⁻¹ em pH 7,0 e o NaP 10 mmol L⁻¹ em pH 6,0. A partir desses dois resultados foram realizados experimentos diferentes para cada um, sendo: (1) para HEPES 25 mmol L⁻¹ pH 7,0 foram obtidas isotermas de adsorção em diferentes temperaturas (10, 20, 25 e 35 °C) e calculados os parâmetros termodinâmicos; (2) para NaP 10 mmol L⁻¹ pH 6,0 foi obtida a isoterma de adsorção e cinética de adsorção à temperatura de 25°C.

Quanto à isoterma de adsorção, para ambos os sistemas tamponantes o modelo de Langmuir descreveu bem os dados experimentais. A capacidade máxima de adsorção de IgG foi de 273,51 mg g⁻¹ de gel em tampão HEPES e 156,80 mg g⁻¹ de gel em tampão NaP, nas temperaturas de 20°C e 25°C, respectivamente. A capacidade máxima de adsorção de IgG foi maior quando esta proteína foi solubilizada em tampão HEPES que a obtida em tampão NaP. Na ausência do plasma, o sistema tamponante HEPES (que encontra-se em sua forma zwiteriônica) apresenta condutividade de cerca de 3,2 vezes menor que a observada para NaP, o que favoreceu a adsorção de IgG humana de alta pureza durante a experimento em batelada. Esses valores de capacidade de adsorção de IgG são maiores que os reportados por Uzun et al. (2005), Feng et al.(2006) e Bayaramoglu et al. (2007), os quais estão na faixade 96 a 142 mg g⁻¹ de gel

em metil ester histidina imobilizada em metacrilato, tirosina imobilizada em agarose e arginina imobilizada em metacrilato, respectivamente. A constante de dissociaçãocalculada nos sistemas tamponantes Tris-HCl e NaP foram da ordem de 10⁻⁵ mol L⁻¹, valor característico de ligantes de pseudoafinidade (VIJAYALAKSMI, 1989).

Os parâmetros termodinâmicos foram calculados para o sistema tamponante HEPES 25 mmol L⁻¹ pH 7,0. O parâmetro ΔG° apresentou valores negativos na faixa de -5,94 a -7,34 kcal mol⁻¹, indicando que a reação é espontânea e mais favorável com o aumento da temperatura. O parâmetro ΔS° foi positivo e aumentou com o aumento da temperatura, indicando desordem total no sistema. No que diz respeito ao tipo de interação, como descrito por Ross e Subramaniam (1981), um valor de ΔH° levemente positivo combinado com um valor de ΔS° de mesmo sinal indica predominância de interação eletrostática na adsorção de IgG em P-Tyr-agarose.

Foram realizados experimentos com IgG de alta pureza na presença de 0,5 mol L⁻¹ de sulfato de sódio, sal que favorece interações hidrofóbicas, afim de avaliar a contribuição dessa interação na adsorção de IgG. Nessa condição a IgG não foi adsorvida em P-Tyr-agarose, sendo esta proteína completamente removida da coluna cromatográfica durante a etapa de lavagem. O predomínio de interações eletrostáticas entre IgG e P-Tyr já havia sido evidenciada, uma vez que a adsorção é favorecida em baixos valores de condutividade, indicando a predominância das interações eletrostáticas entre P-Tyr e IgG.

A adsorção de IgG em P-Tyr-agarose foi avaliada por meio da cinética de adsorção, em duas concentrações de IgG: 0,5 e 2,0 mg mL⁻¹ em NaP 10 mmol L⁻¹ pH 6,0, sendo que o tempo de equilíbrio foi de 20 e 170 min, respectivamente. Para as duas concentrações de IgG estudadas, o modelo cinético de pseudo-segunda-ordem foi o que descreveu melhor os dados experimentais, tendo sido obtidos coeficientes de correlação de 0,97 e 0,95 para 0,5 e 2,0 mg mL⁻¹, respectivamente.

O estudo da adsorção de fragmentos proteolíticos de IgG humana (Fc e Fab) em P-Tyr-agarose foi realizada nos sistemas tamponantes HEPES, Tris-HCI, Bis-Tris e MOPS em pH 7,0 e a 25 mmol L⁻¹ e Tris-HCI a pH 7,0 e NaP a pH 6,0 a 10 mmol L⁻¹. Com base nos pontos isoelétricos dos fragmentos Fc e Fab (na faixa de 5,5-6,7 para Fc e na faixa de 6,0 a 9,3 para Fab, MOURAO et al., 2016), esperava-se que em pH neutro os fragmentos Fc não fossem adsorvidos na fase estacionária, uma vez que P-Tyr encontra-se negativamente carregado. No entanto, a única condição que posibilitou a adsorção do fragmento Fab livre do fragmento Fc foi em tampão HEPES 25 mmol L⁻¹ em pH 7,0. A pureza obtida nesta condição foi de 98%, similar a obtida por Mourão et al. (2016), que foi de 91% utilizando o íon metálico cobalto quelatato em CM-Asp-agarose.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES

Este trabalho proporcionou as seguintes conclusões:

A adsorção entre a IgG humana e o ligante P-Tyr-agarose é fortemente influenciada pela condutividade do sistema tamponante empregado, sendo que os melhores resultados para a retenção desta proteína ocorreram em condutividades com valores menores que 2,0 mS cm⁻¹.

A contribuição dos diferentes grupamentos funcionais presentes na estrutura do ligante P-Tyr demonstrou que a interação eletrostática entre a IgG humana e o grupamento fosfato (negativamente carregado) é a maior responsável pela retenção da IgG, embora a contribuição do grupo carboxílico e aromático não possam ser descartados. Foi possível confirmar que a interação eletrostática governa a adsorção de IgG, confirmada por ensaios cromatográficos na presença de NaCI e sulfato de sódio e também por meio dos parâmetros termodinâmicos obtidos pelas isotermas de adsorção a diferentes temperaturas.

Foi possível obter IgG humana a partir do plasma humano com pureza maior de 90% para três dos sistemas tamponantes, sendo eles: HEPES 25 mmol L⁻¹ pH 7,0, Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,0 e NaP 10 mmol L⁻¹ pH 6,0, sendo que a maior pureza associada a maior recuperação foi obtida em NaP 10 mmol L⁻¹ pH 6,0 (105% e 74% de pureza e de recuperação, respectivamente).

O modelo de Langmuir descreveu os dados isotérmicos de adsorção no equilíbrio de forma satisfatória e as constantes de dissociação calculada foram da ordem de 10⁻⁵ mol L⁻¹, sendo valor característico de ligantes pseudobioespecificos.

Os dados cinéticos experimentais de adsorção IgG humana em NaP 10 mmol L⁻¹ pH 6,0 foram bem descritos pelo modelo de pseudo-segunda-ordem.

Foi possível adsorver fragmentos Fab em P-Tyr-agarose em todos os sistemas tamponantes estudados, no entanto, o único tampão que propiciou a adsorção de fragmento Fab com alto grau de pureza (eletroforese indicou bandas de fragmento Fab e IgG intacta nas frações de eluição, confirmado pelo *Western blot)* foi o HEPES 25 mmol L⁻¹ pH 7,0. Nesta condição pode-se obter Fab com 98% de pureza e recuperação de 86,2%.

CAPÍTULO 7: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo sido obtido resultados promissores de purificação de IgG a partir de plasma humano em P-Tyr-agarose, torna-se relevante a continuação da pesquisa envolvendo este tema e explorando outras abordagens, como as propostas abaixo:

 Estudar a eficiência na purificação de anticorpos monoclonais produzidos pelo cultivo de hibridomas, uma vez que a purificação desses anticorpos são um desafio devido a complexidade do meio de cultivo, tendo como maior contaminante a albumina do soro fetal bovino.

 Ativar a matriz cromatográfica com outros reagentes como epicloridrina, cloreto de tosila ou brometo de cianogênio e comparar com os resultados obtidos neste trabalho em relação a contribuição do braço espaçador presente no agente de ativação bisoxirano.

4. Avaliar a separação dos fragmentos de IgG humana (Fab e Fc) para as novas matrizes sugeridas acima.

CAPÍTULO 8: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMANN, A.H. Cellular and molecular immunology, 5^ª edição. Philadelphia: W. B. Saunders, (2003), p. 562.

ACCONCI, C., LEGALLAIS, C., VIJAYALAKSHMI, M., BUENO, S.M.A. Depyrogenation of snake antivenom serum solutions by hollow fiber-based pseudobioaffinity filtration. Journal of Membrane Science, 173 (2000), 235–245.

ADIKANE, H. V., IYER, G. J. Chemical Modification of Ethyl Cellulose-Based Highly Porous Membrane for the Purification of Immunoglobulin GApplied Biochemistry and Biotechnology, 169 (2013), 1026–1038.

AKGOL, S., OZKARA, S., UZUN, L., YILMAZ, F., DENIZLI, A. Pseudospecific magnetic affinity beads for immunoglobulin-G depletion from human serum, J. Appl. Polym. Sci. 6 (2007), 2405-2412.

AYBAY, C. Differential binding characteristics of protein G and protein A for Fc fragments of papain-digested mouse IgG. Immunology Letters, 85 (2003), 231-235.

AFONSO A., PEREIRA P., QUEIROZ J.A., SOUSA A., SOUSA F., Purification of pre-miR-29 by a new o-phospho-L-tyrosine affinity chromatographic strategy optimized using design of experiments, J. Chromatogr. A 1343 (2014) 119-127.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M.; ROBERTS, K. e WATSON, J.D. Biologia Molecular da Célula, 3ª edição, p. 1196-1251, 1997.

ANDERSEN, D.C.; REILLY, D.E. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments, Current Opinion in Biotechnology, Current Opinion in Biotechnology, 15 (2004), 456-462.

ANSPACH, F. B., PETSCH, D. e DECKWER, W. D. Purification of murine IgG1 on group specific affinity sorbents. Bioseparation, 6 (1996), 165-184.

ANSPACH, F.B., PETSCH, D. Membrane adsorbers for selective endotoxin removal from protein solutions. Process Biochemistry,35 (2000), 1005-1012.

ARICA, M.Y., YALÇIN, E., BAYRAMOGLU, G. Preparation and characterisation of surfaces properties of poly(hydroxyethylmethacrylate-co-methacrylolyamido-histidine) membranes: application for purification of human immunoglobulin G, J. Chromatogr. B 807 (2004), 315-325.

ARNOLD J.N., DWEKB R. A., RUDD P. M., SIM R. B., Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. Immunology Letters 106 (2006), 103-110.

ARORA S., SAXENA V., VIJAYALAKSHMI AYYAR B. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification, Methods. 116 (2017) 84-94.

ATASEVER A., OZDEMIR H., GULCIN I., KUFREVIOGLU O.I., One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography, Food Chem. 136 (2013) 864-870.

AKIYAMA, T., KADOOKA, T., OGAWARA, H. PURIFICATION OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR

BY TYROSINE-SEPHAROSE AFFINITY CHROMATOGRAPHY. Biochemical and Biophysical Research communications. 131(1985), 442-448.

AYYAR, B.V.; ARORA, S.; MURPHY, C., O'KENNEDY, R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. Methods, 56 (2012),116-129.

BATISTUZZO, J.A.O., ITAYA, M., ETO, Y. Formulário Médico Farmacêutico. 3ª ed, São Paulo: Pharmabooks, 2006.

BAKHSHPOUR M., DERAZSHAMSHIR A., BERELI N., ELKAK A., DENIZLI A., [PHEMA/PEI]–Cu(II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: Application on the separation of IgG from human plasma, Materials Science and Engineering, 61 (2016) 824–831.

BAYRAMOGLU G., CELIK G. e ARICA, M.Y. Immunoglobulin G adsorption behavior of L-histidine ligand attached and Lewis metal ions chelated affinity membranes. Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects, 287 (2006), 75-85. 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, 104 (2007), 672–679.

BERELI, N., SENER, G., ALTINTAS, E.B., YAVUZ, H., DENIZLI, A. Poly(HEMAco-NBMI) Monolithic Cryogel Columns for IgG Adsorption. Materials Science and Engineering C, 30 (2010), 323-329.

BEYAZTAŞ S., ARSLAN O., Purification of xanthine oxidase from bovine milk by affinity chromatography with a novel gel, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 30 (2015) 442-447.

BOURNAZOS, S., RAVETCH, J.V. Diversification of IgG effector functions. International Immunology. 29(2017), 303-310.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254.

BRESOLIN, I.T.L., RIBEIRO, M.B., CARO, J.R., SANTOS, F.P., CASTRO, M.P., BUENO, S.M.A. Adsorption of human serum proteins onto TREN-agarose: Purification of human IgG by negative chromatography. Journal of Chromatography B, 877 (2009), 17-23.

BRESOLIN, I.T.L., DE SOUZA, M.C.M., BUENO, S.M.A. A new process of IgG purification by negative chromatography: Adsorption aspects of human serum proteins onto -aminodecyl-agarose. Journal of Chromatography B, 878 (2010), 2087-2093.

BRESOLIN, I.T.L., FIORITTI, R.R., BUENO, S.M.A. IgG purification by negative chromatography in amine-based ligands: A comparison of I-lysine and poly-I-lysine. Process Biochemistry,46 (2011), 2277–2285.

BRESOLIN I.T.L., BUENO S.M.A., Evaluation of amino acid o-phosphoserine as ligand for the capture of immunoglobulin G from human serum, Appl. Biochem. Biotechnol. 167 (2012) 632-644.

BJORK, L. Protein L: A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. Journal of Immunology, 140(1988), 1194-1197.

BOYLE M.D.P., REIS K. J. Bacterial Fc receptors. Nature Biotechnology, 5 (1987), 697-703.

BUENO, S.M.A., HAUPT, K., VIJAYALAKSHMI, M.A. Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes. Journal of Chromatography B, 667(1995), 57-67.

BURTON D. R. Immnunoglobulin G: functional sites. Molecular Immunology, 22(1985), 161-206.

CARMIGNOTTO, G.P., MOURÃO, C.A., BUENO, S.M.A. Separation of human Fab fragments by negative chromatography on ω-aminohexyl- and poly(ethyleneimine)-agarose. Process Biochemistry, 52 (2017), 267-275.

CHAMBERS S. P., High-throughput protein expression for the post-genomic era. Drug Discovery Today, 7 (2002),759-765.

CHAMPAGNE J., DELATTRE C., SHANTHI C., SATHEESH B., DUVERNEUIL L., VIJAYALAKSHMI M. A., Pseudoaffinity Chromatography Using a Convective Interaction Media-Disk Monolithic Column, Chromatographia 65 (2007), 639-648.

CHANG, Y.K., HUANG, R.Z., LIN, S.Y., CHIU, S.J., TSAI, J.C. Equilibrium study of immobilized lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite, Biochem. Eng. J. 28 (2006), 1-9.

COHEN, P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. Nature, 296(1982), 613.

COHN, E.J., STRONG, L.E., HUGHES Jr., W.L., MULFORD, D.J., ASHWORTH, J.N., MELIN, M., TAYLOR, H.L. Preparation and properties of serum and plasma protein. IV. A system for the separation into fractions of protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. Journal of American Chemical Society, 8 (1946), 459-475.

COSTA, D., BROODMAN, I., VANDUIJN, M.M., STINGL, C., DEKKER, L.J.M., BURGERS, P.C., HOOGSTEDEN, H.C., SILLEVIS, E.J.K., LUIDER, T.M. Sequencing and Quantifying IgG Fragments and Antigen-Biding Regions by Mass Spectrometry. Journal of Proteome Research, 9(2010), 2937-2945.

CUATRECASAS P., WILCHEK M., ANFINSEN C. B. Selective Enzyme Purification By Affinity Chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61(1968), 638-643.

DAOUD-ATTIEH, M., CHAIB, H., ARMUTCU, C., UZUN, L., ELKAK, A., DENIZLI, A. Immunoglobulin G purification from bovine serum with pseudo-specific supermacroporous cryogels. Separation and Purification Technology, 118 (2013), 815-822.

da SILVA, L.C.A., SERRACCHIANI, M.M., MIRANDA, E.A., BUENO, S.M.A. Separation of human Fab fragments on negative mode Ni(II)-TREN-agarose chromatography. Process Biochemistry, 49 (2014), 715–723.

DEDEOĞLU N., ARSLAN M., ERZENGIN M., Purification of holstein bull semen paraoxonase 1 (PON1) by hydrophobic interaction chromatography and investigation of its inhibition kinetics by heavy metals, Biol. Trace Elem. Res. 158 (2014), 29-35.

DEMIRCI T., ARSLAN M., BILEN Ç., DEMIR D., GENÇER N., ARSLAN O., Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of 1,3-dicarbonyl derivatives of methylaminobenzene-sulfonamide, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 29 (2014) 132-136.

DEMIRCI, B., BERELI, N., ASLIYÜCE, S., BAYDEMIR, G., DENIZLI, A. Protein C recognition by ion-coordinated imprinted monolithic cryogels. Journal of Separation Science 40 (2017), 1610-1620.

DEMIR D., GENCER N., ER A., Purification and characterization of prophenoloxidase from *Gallería mellonella* L., Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 40 (2012) 391-395.

DONAT, R., AKDOGAN, A., ERDEM, E., CETISLI, A. Thermodynamics of Pb²⁺ and Ni²⁺ adsorption onto natural betonite from aqueous solutions, J. Colloid Interface Sci. 286 (2005), 43-52.

DUARTE, I.S., ZOLLNER, R.L., BUENO, S.M.A. Protein L-agarose for adsorption of autoantibodies: A potential tool for extracorporeal treatment. Artificial Organs 29(4) (2005), 313-323

DUROCHER, Y., BUTLER, M., Current Opinion in Biotechnology, 20 (2009), 700-707.

ELKAK, A., ISMAIL, S., UZUN, L., DENIZLI, A. Adsorption study of immunoglobulin G subclasses from different species by pseudobioaffinity separation on histidyl-bisoxirane-sepharose. Chromatographia, 69 (2009), 1161-1167.

ELVIN, J. G., COUSTON, R.G., van der WALLE, C.F. Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing. International Journal of Pharmaceutics, 440 (2013), 83-98.

FAN, J., LUO, J., CHEN, X., WAN, Y. Polydopamine meets porous membrane: A versatile platform for facile preparation of membrane adsorbers. Journal of Chromatography A, 1448 (2016), 121-126.

FAULKNER, S., ELIA, G., HILLARD, M., O'BOYLE, P., DUNN M., MORRIS, D. Immunodepletion of albumin and immunoglobulin G from bovine plasma. Proteomics, 11 (2011), 2329-2335.

FENG, H., JIA, L., LI, H., WANG, X. Screening and chromatographic assessing of a novel IgG biomimetic ligand, Biomed. Chromatogr. 20 (2006), 1109-1115.

FERREIRA, S., CARVALHO, J., VALENTE, J.F.A., CORVO, C.C., CABRITE, E.J., SOUSA, F., QUIROZ, J.A., CRUZ, C. Affinity analysis and application of dipeptides derived from I-tyrosine in plasmid purification. Journal of Chromatography B, 1006 (2015), 47-58.

FUKAMI, Y., LIPMANN, F. Purification of the Rous sarcoma virus src kinase by casein-agarose and tyrosine-agarose affinity chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 (1985), 321-324.

GAN, H-Y., SHANG, Z-H.; WANG, J-D. New affinity nylon membrane used for adsorption of g-globulin. Journal of Chromatography A, 867 (2000), 161–168.

GAUBITZ, M., SCHNEIDER, K.M. Immunoadsorption in systemic Lupus Erythematosus: Different techniques and their current role in medical therapy. Therapeutic Apheresis and Dialysis, 7 (2003), 183-188.

GESSNER J.E., HEIKEN H., TAMM A., SCHMIDT R.E., The IgG Fc receptor family, Ann. Hematol. 76 (1998), 231-48.

GONDIM, D.R., DIAS, N.A., BRESOLIN, I.T.L., BAPTISTIOLLI, A.M., AZEVEDO, D.C.S., SILVA JR, I.J. Human IgG adsorption using dye-ligand epoxy chitosan/alginate as adsorbent: influence of buffer system. Adsorption, 20 (2014), 925-934.

de GÓES, L.C., MIRANDA, E.A., BUENO,S.M.A. Interaction of histidine-tagged human proinsulin with immobilized nickel ion: effect of chelating ligand and thermodynamics analysis. Colloid Surf. A 369 (2010), 176-185.

HAIGH, J.M., HUSSAIN, A., MIMMACK, M.L., LOWE, C.R. Affinity ligands for immunoglobulins based on the multicomponent Ugi reaction. Journal of Chromatography B, 877 (2009), 1440-1452.

HANEY P.J., DRAVELING C., DURSKI W., ROMANOWICH K., QORONFLEH M. W., SwellGel: a sample preparation affinity chromatography technology for high throughput proteomic applications, Protein Expression and Purification, 28 (2003) 270–279.

HANKS S.K., QUINN A.M., Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members, Methods Enzymol. 200 (1991) 38-62.

HAUPT K., BUENO S.M.A., VIJAYALAKSHMI M.A., Interaction immobilized of human immunoglobulin G with L-histidine onto poly(ethylene vinyl alcohol) hollow-fiber membranes, J. Chromatogr. B 674 (1995) 13-21.

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

HERRERO-GONZÁLEZ, J. E., SITARU, C., KLINKER, E., BRÖCKER, E.B., ZILLIKENS, D. Successful adjuvant treatment of severe bullous pemphigoid by tryptophan immunoadsorption. Clinical and Experimental Dermatology, 30 (2005), 519-522.

HIRATA, N., KURIYAMA, T., YAMAWAKI, N. Immusorba TR and PH. Therapeutic Apheresis and Dialysis, 7 (2003), 85-90.

HOLT, L.J., HERRING, C., JESPERS, L.S., WOOLVEN, B.P., TOMLINSON, I.A. Domain antibodies: proteins for therapy. Trends Biotechnol, 21 (2003), 484.

JAWETZ, E., MELNICK, J. L., ADELBERG, E. A., BROOKS, G. F., BUREL, J. S. Imunologia – In Microbiologia Médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, (1998), 89-108.

JONGKEES B.J., HOMMEL B., KÜHN S., COLZATO L.S., Effect of tyrosine supplementation on clinical and healthy populations under stress or cognitive demands - a review, J. Psychiatr. Res. 70 (2015) 50-57.

JOHNSON, L.N., LEWIS, R.J. Structural Basis for Control by Phosphorylation. Chemical, 101(2001), 2209-2242.

KALIN R., ATASEVER A., ÖZDEMIR H., Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish and Turnip roots, Food Chem. 150 (2014) 335-340.

KARATAS M.O., ALICI B., ÇETINKAYA E., BILEN Ç., GENÇER N., ARSLAN O., Synthesis, characterization, and tyrosinase inhibitory properties of benzimidazole derivatives, Russ. J. Bioorganic Chem. 40 (2014) 461-466. KAYA H.B., ÖZCAN B., ŞIŞECIOĞLU M., OZDEMIR H., Purification of acetylcholinesterase by 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine from human erythrocytes, Appl. Biochem. Biotechnol. 170 (2013) 198-209.

KAYA, M.O. ARSLAN O., GULER O.O., A new affinity method for purification of bovine testicular hyaluronidase enzyme and an investigation of the effects of some compounds on this enzyme, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 30 (2015) 524-527.

KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantitation. In Protein Protocols Handbook (Walker, J.M., ed.). Totowa, NJ: Humana Press, 2nd edition, (2002),15-20.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4, Nature 227 (1970), 680-685.

LARRICK, J.W. Progress with promising human antibodies. Immunotherapy, 4 (2012), 257-261.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Coordenadores. Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos e Enzimáticos, Ed. Edgard Blücher Ltda, Vol 3, 2001.

LIU, Z., GURGEL, P.V., CARBONELL, R.G., Affinity Chromatographic Purification of Human Immunoglobulin A from Chinese Hamster Ovary Cell Culture Supernatant, Biotechnol. Prog., 29 (2013), 91-98.

LU, X.S., MILLER, C.J. Concentration of IgG in the sera of normal rhesus macaques as determined by a species-specific radial immunodiffusion assay. Journal of Immunological Methods, 197(1-2) (1996), 193-196.

LUCARINI, A.C., KILIKIAN, B.V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. Biotechnology Techniques, 13 (1999), 149-154.

LÜFTL, M., STAUBER, A., MAINKA, A., KLINGEL, R., SCHULER, G., HERTL, M. Successful removal of pathogenic autoantibodies in pemphigus by immunoadsorption with a tryptophan-linked polyvinylalcohol adsorber. British Journal of Dermatology, 149 (2003), 598-605.

LOGHEM, V. Staphylococcal protein A and human IgG subclasses and allotypes. Scandinavian Journal of Immunology, 15 (1982), 275-278.

LOWE C. R., Combinatorial approaches to affinity chromatography, Current Opinion in Chemical Biology, 5 (2001), 248–256.

MACHADO, R.L., de ARRUDA, E.J., SANTANA, C.C., BUENO, S.M.A. Evaluation of a chitosan membrane for removal of endotoxin from human IgG solutions. Process Biochemistry, 41 (2006), 2252–2257.

MARTIN, T.D. IGIV: Contents, properties, and methods of industrial productionevolving closer to a more physiologic product. International Immunopharmacology, 6 (2006), 517-522.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M., LUCISANO-VALIM, Y.M. Receptores para imunoglobulina G (FcγR), Medicina (Ribeirão Preto), 38 (2005), 82-95.

MILSTEIN, C. Monoclonal Antibodies. Scientific American. 243 (1980), 66-74.

MOURÃO, C.A., CARMIGNOTTO, G.P., BUENO, S.M.A. Separation of human IgG fragments using copper, nickel, zinc, and cobalt chelated to CM-Asp-agarose by positive and negative chromatography Journal of Chromatography B, 1017 (2016), 163-173.

MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity, Anal. Biochem. 117 (1931), 307-310.

MYHRE, E.B.; ERNTELL, M. A non-immune interaction between the light chain of human immunoglobulin and a surface component of a Peptococcus magnus strain, Molecular Immunology, 22 (1085), 879-885.

NAIK, A. D., RAINA, M., LALI, A.M. AbSep—An amino acid based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G. Journal of Chromatography A. 1218 (2011), 1756–1766.

NILSON, B.H.K., LOGDEMB, L., KASTERN, W., BJÖRK, L., AKERSTRÖM, B. Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain.Journal of Immunological Methods, 164 (1993), 33-40.

NILSSON, P., PAAVILAINEN, L., LARSSON, K., ÖDLING, J., SUNDBERG, M., ANDERSSON, A., KAMPF, C., PERSSON, A., SZIGYARTO, C.A., OTTOSSON, J., BJÖRLING, J., HOBER, S.; WERNÉRUS, H., WESTER, K., PONTÉN F., UHLEN, M. Towards a human proteome atlas: High-throughput generation of mono-specific antibodies for tissue profiling. Proteomics, 5 (2005), 4327-4337.

NUGENT J.H.A., BALL R.J., EVANS M.C.W. , Photosynthetic water oxidation: the role of tyrosine radicals, Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics 1655 (2004) 217-221.

OHTSUKA M., IHARA S., OGAWA R., WATANABE T., WATANABE Y., Preparation and characterization of antibodies to o-phosphotyrosine and their use for identification of phosphotyrosine-containing proteins, Int. J. Cancer 34 (1984) 855-861.

OLIVEIRA, C.R., TAMASHIRO, W.M.S.C., BUENO, S.M.A. Evaluation of OPSagarose pseudo-affinity adsorption IgG2a mouse monoclonal antibody. Process Biochemistry, 50 (2015), 2267-2274.

OZENSOY, O., ARSLAN, O., SINAN, S.O. A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. Biochemistry, 69 (2004), 216-219.

PACE C.N., HERBERT E.J., BERCHERT J., SHAW K., URBANIKOVA L., SCHOLTZ J.M., SERCIK J., Tyrosine hydrogen bonds make a large contribution to protein stability, J. Mol. Biol. 14 (2001) 393-404.

PAVAN, G.L., BRESOLIN, I.T.L., GRESPAN, A., BUENO, S.M.A. Phosphorylated-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G. Journal of Chromatography B, 1052 (2017), 10-18.

PITIOT, O., NEDONCHELLE, E., LEGALLAIS, C., VIJAYALAKSHMI, M. A. Protein adsorption on histidyl-aminoheyl-Sepharose 4B II. Application to the negative onestep affinity purification of human 2-microglobulin and immunoglobulin G. Journal of Chromatography B.758 (2001), 173-182.

PRASANNA, R.R., KAMALANATHAN, A.S., VIJAYALAKSHMI, M.A. Development of L-histidine immobilized CIM® monolithic disks for purification of immunoglobulin G. Journal of Molecular Recognition, 28 (2015), 129-141.

PUTNAM, F.W. The plasma protein: structure, function, and genetic control. Academic Press. New York, (1984).

RIBEIRO, M.B., VIJAYALAKSHMI, M., TODOROVA-BALVAY, D. S.M.A. BUENO, Effect of IDA and TREN chelating agents and buffer systems on the purification of human IgG with immobilized nickel affinity membranes, J. Chromatogr. B 861 (2008), 64-73.

REN, D., PIPES, G., XIAO, G., KLEEMANN, G.R., BONDARENKO, P.V., TREUHEIT, M.J., GADGIL, H.S. Reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of site-specific chemical modifications in intact immunoglobulin molecules and their fragments. Journal of Chromatography A.1179 (2008), 198-204.

RENUGOPALAKRISHNAN, V., HOROWITZS, P.M., GLIMCHERG, M.J. Structural Studies of Phosvitin in Solution and in the Solid State. The Journal Of Biological Chemistry., 260 (1985), 11406-11413.

RIVLIN R., ASPER S.P. Tyrosine and the thyroid hormones, Am. J. Med. 40 (1966) 823-827.

ROSS, P.D, SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. Biochemistry, 20 (1981), 3096-3102.

ROQUE A.C., LOWE C.E., TAIPA M.A. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. Biotechnology Progress, 20 (2004), 639–654. ROQUE A.C.A., LOWE C.R. Advances and applications of de novo designed affinity ligands in proteomics. Biotechnology Advances, 24 (2005), 17-26.

ROQUE, A.C.A., TAIPA, M. A., LOWE, C.R. An artificial protein L for the purification of immunoglobulins and Fab fragments by affinity chromatography. Journal of Chromatography A, 1064 (2005), 157-167.

ROQUE, A.C.A., SILVA, C.S.O., TAIPA, M.A., Affinity based methodologies and ligands or antibody purification Advances and perspectives. Journal of Biotechnology. 1160 (2007), 44-55.

SAVANE, T.S., KUMAR, S., JANAKIRAMAN, V.N., KAMALANATHAN, A.S., VIJAYALAKSHMI, M.A. Molecular insight in the purification of immunoglobulin by pseudobiospecific ligand L- histidine and histidyl moieties in histidine ligand affinity chromatography (HLAC) by molecular docking. Journal of Chromatography B, 1021 (2016), 129-136.

SHARMA, S., AGARWAL, G.P. Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherm models. Analytical Biochemistry, 288 (2001), 126-140.

SHENG S., KONG F., Separation of antigens and antibodies by immunoaffinity chromatography. Pharmaceutical Biology, 50 (2012), 1038-1044.

SOUZA, M.C.M., BRESOLIN, I.T.L, BUENO, S.M.A., Purification of human IgG by negative chromatography on ω-aminohexyl-agarose. Journal of Chromatography B, 878 (2010), 557-566.

SUGIMOTO, K., YAMAJI, K., YANG, K-S., KANAI, Y., TSUDA, H., HASHIMOTO, H. Immunoadsorption plasmapheresis using a phenylalanine column as an effective treatment for Lupus nephritis. Therapeutic Apheresis and Dialysis, 10 (2006), 187-192.

SUN, H., ZHANG, L., CHAI, H., YU, J., QIAN, H., CHEN, H. A study of human y-globulin adsorption capacity of PVDF hollow fiber affinity membranes containing different amino acid ligands. Separation and Purification Technology, 48 (2006), 215–222. SUN H., GE B., LUI S., CHEN H., Preparation of nitrocellulose (NC) immunoaffinity membrane for purification of rAPC antibody. J. Sep. Sci., 31 (2008), 1201-1206.

TANAKA, K., SAWATANI, E., SHIGUEOKA, E.M., CAMPOS, T.C.X.B., NAKAO H.C., DIAS, G.A., FUGITA, R.K., ARASHIRO, F. A chromatographic method for the production of a human immunoglobulin G solution for intravenous use. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 31 (1998), 1375-1381.

TERNYNCK, T., AVRAMEAS, S. Techniques Immunoenzymatiques: Techniques en Immunologie. Les Editions INSERM France (1987).

THRASH JR, M.E., PHILLIPS, J.M., PINTO, N.G. An analysis of the interactions of BSA with an anion-exchange surface under linear and non-linear conditions, Adsorption 10 (2004), 299-307.

TJALSMA, H., SCHAEPS, R.M.J., SWINKELS, D.W. Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications. Proteomics Clin. Appl., 2 (2008), 167-180.

TURKMEN D., DENIZLI A., OZTURK N., AKGOL S., ELKAK A. Phenylalanine Containing Hydrophobic Nanospheres for Antibody Purification. Biotechnol. Prog. 24 (2008), 1297-1303.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from poly-acrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76 (1979), 4350-4354.

UZUN, L., SAY, R., DENIZLI, A. Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography, React. Funct. Polym. 64 (2005), 93-102.

VICTOR, S. P., SHARMA, C.P. Tryptophan complexed hydroxyapatite nanoparticles for immunoglobulin adsorption. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 22 (2011), 2219-2229.

VIJAYALAKSHMI, M.A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. Trends in Biotechnology. 7(1989), 71-76.

VLUG, A., VAN REMORTEL, P. The structure and function of human IgG subclasses. American Clinical Laboratory. 8 (1989), 28-36.

ZACHARIOU, M., TRAVERSO, I., HEARN, M.T.W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXXXI. O-phosphoserine as new chelating ligand for use with hard Lewis metal ions in the immobilized-metal affinity chromatography of proteins. J. Chromatogr, 646 (1993), 107-120.

ZACHARIOU M., HEARN M.T.W., Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilised hard Lewis metal ion-chelate adsorbents, Journal of Chromatography A, 890 (2000), 95-116.

ZHAO W., SHI Q., Sun Y. FYWHCLDE-based affinity chromatography of IgG: Effect of ligand density and purifications of human IgG and monoclonal antibody, Journal of Chromatography A, 1355(2014), 107-114.

ANEXO 1

INFORMAÇÃO CCPG/001/2015 Substitui Informação CCPG/002/2013 e Altera a redação da versão aprovada pela CCPG em 17/06/2015). (Nova redação dos itens; 2, 3 e 4, Inciso I, do Art. 1º)

Tendo em vista a necessidade de revisão da regulamentação das normas sobre o formato das dissertações de mestrado e teses de doutorado e com base no entendimento exarado no Parecer PG nº 1985/96, que trata da possibilidade da apresentação do conteúdo das dissertações e teses em formato alternativo ao já estabelecido tradicional, a CCPG resolve:

Art. 1º O formato padrão das dissertações e teses de mestrado e doutorado da UNICAMP deverá obrigatoriamente conter as informações como seguem: I. Páginas pré-textuais: 1. Primeira folha dando visibilidade à Universidade, à Unidade de defesa, ao autor (a), título da dissertação/tese na língua em que o trabalho foi redigido – português, inglês ou espanhol -, local e data.

No caso de tese/dissertação redigida em inglês ou espanhol, além do título original do trabalho, obrigatoriamente, também deverá constar o título em português;

2. Página de rosto dando visibilidade: ao nome do autor; ao título do trabalho; ao número de volumes (quando houver mais de um); ao nível (mestrado ou doutorado); à área de concentração; ao nome do orientador e coorientador; ao local (cidade) e ao ano de depósito. Incluir informação, na parte inferior da página de que o arquivo digital corresponde à versão final da tese/dissertação defendida pelo aluno (nome) e orientada pelo (nome do Orientador). Nos casos de teses defendidas em Cotutela, logo abaixo do nível e da área de concentração, se houver, deverá ser inserida a informação em português e em inglês ou espanhol de que a tese foi produzida no âmbito de um Acordo de Cotutela firmado entre a Unicamp e a Universidade convenente.

3. Ficha catalográfica (no verso da página de rosto).

Obs. 1) Caso a tese de doutorado seja feita em Cotutela, será necessário informar na ficha catalográfica o fato, o nome da Universidade convenente e os nomes dos orientadores.

Obs. 2) Quando se tratar de Teses e Dissertações financiadas por agências de fomento, os beneficiados deverão fazer referência ao apoio recebido e inserir, no sistema de confecção da Ficha Catalográfica, além do nome da agência, o número do processo pelo qual recebeu o Auxílio;

4. Folha de aprovação, dando visibilidade à Comissão Examinadora com a informação de que a Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno;

- 5. Dedicatória (opcional);
- 6. Agradecimento (opcional);
- 7. Resumo (redigido obrigatoriamente em português, máximo de 500 palavras);
- 8. Abstract (resumo traduzido para o inglês);
- 9. Resumo em uma terceira língua (opcional);
- 10. Lista de ilustrações (opcional);
- 11. Lista de Tabelas (opcional);
- 12. Lista de Abreviaturas e Siglas (opcional);
- 13. Lista de Símbolos (opcional);
- 14. Sumário.

II. Elementos Textuais: Corpo da dissertação ou tese dividido em tópicos estruturados, segundo as necessidades da área de conhecimento.

- III. Elementos Pós-Textuais:
- 1. Referências;
- 2. Apêndices;

3. Anexos.

§ 1° Todas as páginas deverão ser contadas; porém, as folhas pré-textuais (da primeira folha até o sumário) não são numeradas. A numeração (contada continuamente) deverá figurar a partir da Introdução até a última folha do trabalho, em algarismos arábicos, no canto superior direito da página.

§ 2° A critério do autor e do orientador poderão ser incluídos: dedicatória; agradecimento; epígrafe; lista de: ilustrações, tabelas, abreviaturas e siglas, símbolos; apêndices; anexos.

§ 3° A dissertação ou tese deverá ser redigida em português facultada a redação em inglês ou espanhol, com a concordância simultânea do orientador e orientado, conforme previsão no Regimento Geral da Pós-Graduação da Universidade.

§ 4º A defesa da dissertação ou tese, total ou parcialmente em inglês ou espanhol poderá ser realizada desde que haja concordância explícita (em documento escrito) do orientado, orientador e de todos os membros da comissão examinadora.

§ 5° A dissertação ou tese cujos conteúdos versarem sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais, biossegurança e patrimônio genético, deverá apresentar em anexo os respectivos documentos de aprovação obtidos nas instâncias competentes.

Art. 2° Dependendo da área do conhecimento, a critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, a dissertação ou tese poderá ter seu conteúdo apresentado em formato alternativo ao modelo tradicional, observado também o padrão indicado no Art. 1°.

§ 1° É considerado formato alternativo aquele em que as dissertações e teses, obrigatoriamente, apresentem os seguintes capítulos no corpo do trabalho: 1) Introdução; 2) Documentos publicados e/ou a publicar, como: sumário do(s) artigo(s), o(s) artigo(s) propriamente dito(s), sumário de livro(s), capítulo(s) de livro(s), com os dados referentes à publicação e/ou submissão; 3) Discussão

(aplicável em casos de dois ou mais documentos e não obrigatória em casos de apenas um documento); 4) Conclusão; 5) Referências.

§ 2° O(s) documento(s) publicado(s) ou a publicar deve(m) ser em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§ 3º No caso de documento já publicado, o aluno deverá anexar a autorização da Editora para a sua inclusão na tese/dissertação.

Art. 3° É obrigatória a entrega de mídia contendo o trabalho completo em arquivo único inclusive contendo a Folha de Aprovação, Ficha catalográfica, Apêndices e Anexos. Quando houver cópia impressa, seu conteúdo deve ser fiel ao conteúdo entregue em mídia digital, inclusive quanto à folha de aprovação, ficha de catalogação, apêndice e anexos. O arquivo digital não deve conter chaves que restrinja o acesso. A mídia deve ser identificada com as seguintes informações: a) nome do autor por extenso; b) título e subtítulo do trabalho; c) grau de Defesa; d) Unidade de Defesa; e) data de Defesa; f) endereço de e-mail e telefone para contato; g) identificação do tipo de arquivo.

Parágrafo único. Será necessário entregar, junto com a mídia, uma via do Termo de Autorização para disponibilização da tese ou dissertação em formato digital.

Art. 4° Caso o autor desejar a versão impressa da tese/dissertação, ele será o responsável pela reprodução. As dissertações e teses deverão ser reproduzidas no padrão frente, exceção feita à página que contém a ficha catalográfica. O arquivo do modelo padrão da capa, com formato único, válido tanto para o formato tradicional quanto para o alternativo de tese ou dissertação, com projeto gráfico definido pela PRPG, fornecida pela Universidade, contendo informações relativas à Universidade Estadual de Campinas, ao nível (mestrado ou doutorado), à Unidade e ano de defesa, estará disponível na CPG de cada Unidade.

Art. 5º Quanto à Apresentação, a tese/dissertação deverá ter o seguinte formato, válido tanto para a versão digital quanto impressa:

I – folha tamanho A4 de dimensões 21 x 29,7 cm. É aconselhável o uso do papel branco e tinta de cor preta. A fonte utilizada pode ser escolhida entre Times New Roman, Arial, ou similar, em tamanho 12.

II - espacejamento:

a) entre linhas do texto e referências: espaço 1,5;

 b) notas de rodapé e citações textuais longas: espaço simples – uso opcional para Resumo e Abstract;

c) margens:

1) superior: 3,0 cm

- 2) esquerda: 3,0 cm
- 3) direita: 2,0 cm
- 4) inferior: 2,0 cm

5) de parágrafos: 2,0 cm a partir da margem esquerda

6) de citação longa: 4,0 cm a partir da margem esquerda.

Art. 6° Esta Informação entrará em vigor a partir de sua aprovação na CCPG, revogadas as disposições em contrário, principalmente a Informação CCPG 002/2013.

Profa. Dra. Rachel Meneguello

Presidente Comissão Central de Pós-Graduação

CCPG-PRPG

ANEXO 2

Dear Gisele,

As an Elsevier journal author, you retain the right to Include the article in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially) whether in full or in part, subject to proper acknowledgment; see https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright/personal-use for more information. As this is a retained right, no written permission from Elsevier is necessary.

If I may be of further assistance, please let me know.

Best of luck with your thesis and best regards, Laura

Laura Stingelin Permissions Helpdesk Associate ELSEVIER | Global E-Operations Books +1 215-239-3867 office I.stingelin@elsevier.com Contact the Permissions Helpdesk +1 800-523-4069 x3808 | permissionshelpdesk@elsevier.com

ANEXO 3

Corrigendum

Corrigendum to "**Phosphorylated-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G"** [J. Chromatogr. B, 1052 (2017) 10-18] Gisele Luiza Pavan^a, Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin^b, Angélica Grespan^a, Sonia Maria Alves Bueno^{a,*}

^a School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brazil

^b Chemical Engineering Department, Federal University of São Paulo (UNIFESP), 09913-030, Diadema, SP, Brazil

The authors regret that there were misconceptions in the Abstract and the Introduction sections of the above-mentioned article. The authors would like to apologize for any inconvenience caused.

In page 10 (Abstract, Line 2), instead of the stated "P-Tyr was selected as a ligand to mimic the natural interactions that occur between the immunoreceptor tyrosine-based activation motif and the IgG." should be read: "P-Tyr was selected as a ligand due to previous applications of tyrosine and P-Tyr as ligands in chromatography of biomolecules, besides the use of tyrosine also as spacer arm."

In page 11 (Introduction section, Line 11) the paragraph "P-Tyr belongs to the immunoreceptor tyrosine based activation motif (ITAMs) receptors that are responsible to several biochemical events in cytoplasm, activating specific cell biological response. ITAMs transmit to cell interior the IgG binding signal to its receptor [20,21]. Due to the ITMAs affinity for IgG isotypes, P-Tyr could become an excellent candidate to be used as ligand for the purification of polyclonal and monoclonal antibodies from different sources." should be read: "Tyrosine belongs to the immunoreceptor tyrosine based activation motif (ITAM) and its phosphorylation initiates several biochemical events in cytoplasm, activating specific cell biological response. ITAMs transmit to cell interior the IgG binding signal to its receptor [20,21]. Due to the fact that tyrosine and P-Tyr have been

used as ligands in the purification of biomolecules (besides tyrosine also used as spacer arm), P-Tyr was considered a candidate for the purification of human IgG."

In page 11 (Introduction section, Line 19) instead of the stated "Thus, the purpose of this study was to explore this natural interaction between P-Tyr and IgG aiming at its purification from human plasma." should be read: "Thus, the purpose of this study was to explore the PTyr as ligand aiming at the IgG purification from human plasma." These corrections do not affect neither Methodology, Results, Discussion, nor Conclusion of this work.

The authors would like to apologize for any inconvenience caused.



Corrigendum

Corrigendum to "Phosphorylated-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G" [J. Chromatogr. B, 1052 (2017) 10–18]

Gisele Luiza Pavan^a, Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin^b, Angélica Grespan^a, Sonia Maria Alves Bueno^{a,*}

^{as} School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil
^b Chemical Engineering Department, Federal University of São Paulo (UNIFESP), 09913-030 Diadema, SP, Brazil

The authors regret that there were misconceptions in the Abstract and the Introduction sections of the above-mentioned article. The authors would like to apologize for any inconvenience caused.

In page 10 (Abstract, Line 2), instead of the stated "P-Tyr was selected as a ligand to mimic the natural interactions that occur between the immunoreceptor tyrosine-based activation motif and the IgG." should be read: "P-Tyr was selected as a ligand due to previous applications of tyrosine and P-Tyr as ligands in chromatography of biomolecules, besides the use of tyrosine also as spacer arm."

In page 11 (Introduction section, Line 11) the paragraph "P-Tyr belongs to the immunoreceptor tyrosine based activation motif (ITAMs) receptors that are responsible to several biochemical events in cytoplasm, activating specific cell biological response. ITAMs transmit to cell interior the IgG binding signal to its receptor [20,21]. Due to the ITMAs affinity for IgG isotypes, P-Tyr could become an excellent candidate to be used as ligand for the purification of polyclonal and monoclonal antibodies from different sources." should be read: "Tyrosine belongs to the immunoreceptor tyrosine based activation motif (ITAM) and its phosphorylation initiates several biochemical events in cytoplasm, activating specific cell biological response. ITAMs transmit to cell interior the IgG binding signal to its receptor [20,21]. Due to the fact that tyrosine and P-Tyr have been used as ligands in the purification of biomolecules (besides tyrosine also used as spacer arm), P-Tyr was considered a candidate for the purification of human IgG."

In page 11 (Introduction section, Line 19) instead of the stated "Thus, the purpose of this study was to explore this natural interaction between P-Tyr and IgG aiming at its purification from human plasma." should be read: "Thus, the purpose of this study was to explore the P-Tyr as ligand aiming at the IgG purification from human plasma."

These corrections do not affect neither Methodology, Results, Discussion, nor Conclusion of this work.

The authors would like to apologize for any inconvenience caused.