



PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE FATOR IX RECOMBINANTE PRODUZIDO  
EM CÉLULAS DA LINHAGEM CHO

Daniel André Ribeiro

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz  
Leda dos Reis Castilho

Rio de Janeiro  
Junho de 2013

PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE FATOR IX RECOMBINANTE PRODUZIDO  
EM CÉLULAS DA LINHAGEM CHO

Daniel André Ribeiro

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ  
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

---

Profa. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

---

Profa. Leda dos Reis Castilho, Dr. – Ing.

---

Prof. Adalberto Pessoa Junior, D.Sc.

---

Prof. Amaro Barreto Junior, D.Sc.

---

Profa. Margareth Castro Ozelo , Ph.D.

---

Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JUNHO DE 2013

Ribeiro, Daniel André

Processo de purificação de fator IX recombinante produzido em células da linhagem CHO/ Daniel André Ribeiro – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XVI, 142 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Helen Conceição Ferraz

Leda dos Reis Castilho

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 118-142.

1. Purificação de fator IX da coagulação sanguínea recombinante. 2. Processos cromatográficos. 3. Membranas adsorptivas. 4. Monolitos. I. Castilho, Leda dos Reis *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

À minha querida esposa Marina Damião Besteti Ribeiro pelo constante apoio e paciência durante o decorrer das atividades.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ.

Ao meu aluno de iniciação científica Douglas de França Passos pela valiosa assistência durante os experimentos.

Às minhas orientadoras Helen Conceição Ferraz e Leda dos Reis Castilho por proporcionar uma orientação completa fornecendo riquíssimos conhecimentos.

Ao professor Diego Enry B. Gomes do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, pela modelagem da densidade de carga do fator IX.

Ao laboratório LATEV/Bio-Manguinhos/Fiocruz, por fornecer o *kit* para a realização dos ensaios de DNA residual.

Ao departamento de controle de qualidade de Bio-Manguinhos/Fiocruz pelo ensaio para determinar o teor de endotoxinas.

Ao CNPq, HEMOBRAS e BNDES pelo apoio financeiro durante o trabalho.

## DEDICATÓRIA

À minha querida mãe Cláudia,  
à minha esposa Marina,  
à minha irmã Fernanda e  
ao meu sobrinho Davi.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE FATOR IX RECOMBINANTE PRODUZIDO  
EM CÉLULAS DA LINHAGEM CHO

Daniel André Ribeiro

Junho/2013

Orientadores: Helen Conceição Ferraz  
Leda dos Reis Castilho

Programa: Engenharia Química

O fator IX é uma proteína que atua no processo de coagulação sanguínea cuja deficiência causa uma coagulopatia denominada de hemofilia B. Para reduzir os gastos do Ministério da Saúde brasileiro com sua compra bem como ampliar o número de pacientes beneficiados, a produção do fator IX recombinante (FIXr) tem sido desenvolvida. Este trabalho teve como objetivo explorar a utilização de novos materiais cromatográficos com transporte majoritariamente convectivo, como membranas e monolitos, para desenvolver um novo processo de purificação do FIXr. Os resultados mostraram que o monolito CIM<sup>®</sup> Q (troca aniônica) possui uma alta capacidade adsorptiva dinâmica para o FIXr presente em sobrenadante de células CHO e que, após a eluição com tampão contendo íons Ca<sup>2+</sup> (Tris-HCl 50 mM, 45 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,5), o FIXr foi recuperado com rendimento superior a 86% e com redução de DNA residual e HCP de 7182 e 1256 vezes, respectivamente. A membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* (interação hidrofóbica), quando comparado à resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate* como segunda etapa cromatográfica do processo, apresentou melhores resultados com rendimento maior que 90% e redução de HCP de 4592 vezes em relação ao sobrenadante alimentado à primeira etapa. Assim a cromatografia de troca aniônica seguida de uma cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando monolitos e membranas, apresentou-se como estratégia eficiente para o processo de purificação de FIXr.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

PURIFICATION PROCESS OF RECOMBINANT FACTOR IX PRODUCED IN  
CHO CELLS LINE

Daniel André Ribeiro

June/2013

Advisors: Helen Conceição Ferraz  
Leda dos Reis Castilho

Department: Chemical Engineering

Factor IX is a protein that plays an important role in the coagulation system, whose deficiency causes a disease called hemophilia B. To reduce costs with FIX importation and to allow access of more patients to this treatment, recombinant FIX production has been developed. The aim of this work was to explore the efficiency of membranes and monoliths in the purification process of recombinant factor IX. These materials present a majority convective transport improving the productivity of the process. The results showed a high dynamic binding capacity for the monolith CIM<sup>®</sup> Q (anion exchange) to the FIXr present in the supernatant of CHO cells and after elution with Ca<sup>2+</sup> buffer (50 mM Tris-HCl, 45 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.5) the yield was greater than 86% and the residual DNA and host cell proteins reductions were 7182 and 1256 fold, respectively. The membrane Sartobind<sup>®</sup> Phenyl (hydrophobic interaction), compared to the Cellufine<sup>®</sup> Sulfate resin, showed a great efficiency when used as a second chromatography step of the process. The yield for this step was greater than 90% and the host cell proteins reduction was 4592 fold in relation to the supernatant loaded into the first chromatography step. The anion exchange followed of a hydrophobic interaction, using monolith and membranes, showed to be an excellent strategy to improve the purification process of recombinant factor IX.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. Bioquímica do fator IX .....	4
2.1.1. Função do fator IX no organismo humano .....	4
2.1.2. Estrutura e propriedades bioquímicas do fator IX .....	6
2.1.3. Interação do fator IX com o íon $\text{Ca}^{2+}$ .....	10
2.1.4. Interação do fator IX com o anticoagulante heparina .....	12
2.2. Purificação de proteínas .....	13
2.2.1. Purificação de proteínas derivadas do plasma .....	14
2.2.2. Purificação de proteínas por técnicas cromatográficas.....	16
2.2.2.1. Cromatografia de troca iônica .....	16
2.2.2.2. Cromatografia de afinidade.....	19
2.2.2.2.1. Imunoafinidade e bioespecificidade.....	19
2.2.2.2.2. Pseudo-afinidade.....	21
2.2.2.2.2.1. Afinidade por hidroxiapatita .....	21
2.2.2.2.2.2. Afinidade por íons metálicos .....	23
2.2.2.3. Exclusão molecular.....	27
2.2.2.4. Interação hidrofóbica .....	28



2.2.2.4.1. Princípio de separação .....	28
2.2.2.4.2. Aplicações da interação hidrofóbica .....	32
2.2.3. Membranas cromatográficas .....	33
2.2.3.1. Características dos materiais utilizados na fabricação de membranas adsortivas .....	34
2.2.3.2. Métodos de ativação e imobilização de ligantes .....	44
2.2.3.3. Funcionalização com heparina.....	47
2.2.3.4. Módulos utilizados para cromatografia com membranas poliméricas.....	50
2.2.4. Monolitos como matriz cromatográfica .....	52
2.2.4.1. Materiais e modo de preparo .....	53
2.2.4.2. Aplicações .....	54
2.2.5. Processo de purificação do fator IX de coagulação recombinante (Benefix <sup>®</sup> ).....	55
2.2.6. Contaminantes considerados críticos em biofármacos e particularmente em concentrados de fator IX .....	56
3. OBJETIVOS .....	62
3.1. Objetivo geral.....	62
3.2. Objetivos específicos .....	62
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	63

4.1. Reagentes, linhagem celular, colunas cromatográficas e equipamentos.....	63
4.2. Produção do FIXr.....	63
4.3. Purificação do fator IX .....	65
4.3.1. Etapa de captura.....	65
4.3.1.1. Capacidade adsortiva dinâmica.....	65
4.3.1.2. Estudo da eluição do FIXr por afinidade ao cálcio utilizando o monolito CIM <sup>®</sup> Q.....	66
4.3.1.3. Purificação do FIXr com a membrana Sartobind <sup>®</sup> <i>Phenyl</i> ..	68
4.3.1.4. Ampliação de escala do processo utilizando o monolito CIM <sup>®</sup> Q.....	68
4.3.2. Segunda etapa cromatográfica do processo de purificação do FIXr.....	69
4.3.2.1. Capacidade adsortiva dinâmica.....	69
4.3.2.2. Purificação do FIXr com a resina Cellufine <sup>®</sup> <i>Sulfate</i> .....	70
4.3.2.3. Purificação do FIXr com a membrana Sartobind <sup>®</sup> <i>Phenyl</i> ..	71
4.4. Técnicas analíticas.....	71
4.4.1. Determinação da concentração de FIXr .....	71
4.4.2. Determinação da atividade biológica do FIXr e do FIXr ativado	72
4.4.3. Determinação da concentração de proteínas totais .....	73
4.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida ( <i>SDS-PAGE</i> ) .....	73

4.4.5. Determinação da concentração de proteínas da célula hospedeira (HCP) .....	74
4.4.6. Determinação da concentração de DNA residual .....	74
4.4.7. Determinação do teor de endotoxinas .....	74
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
5.1. Etapa de captura.....	76
5.1.1. Avaliação da capacidade adsortiva dinâmica de diferentes materiais para cromatografia de troca aniônica.....	76
5.1.2. Avaliação da eluição por afinidade ao íon $\text{Ca}^{2+}$ utilizando o monolito CIM <sup>®</sup> Q.....	82
5.1.2.1. Planejamento experimental da etapa de eluição.....	82
5.1.2.2. Ampliação de escala para a coluna monolítica com volume de 8 mL .....	90
5.1.2.2.1. Desempenho em termos de rendimento e fator de purificação .....	90
5.1.2.2.2. Monitoramento do fator IX recombinante ativado (FIXra).....	91
5.1.2.2.3. Remoção de HCP e DNA residual .....	93
5.1.3. Avaliação da etapa de captura utilizando a membrana Sartobind <sup>®</sup> Phenyl .....	95
5.2. Segunda etapa cromatográfica.....	97
5.2.1. Avaliação da resina Cellufine <sup>®</sup> Sulfate .....	97

5.2.1.1. Capacidade adsortiva dinâmica.....	97
5.2.1.2. Etapa de eluição do fator IX.....	100
5.2.2. Avaliação da membrana Sartobind <sup>®</sup> <i>Phenyl</i> .....	104
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....	114
6.1. Conclusões .....	114
6.2. Sugestões .....	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA .....	118

## LISTA DE SIGLAS

<b>ANOVA</b>	:	<i>Analysis of variance</i>
<b>ANVISA</b>	:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BHK</b>	:	<i>Baby Hamster Kidney Cells</i>
<b>BSA</b>	:	Sigla em inglês para Albumina do soro bovino
<b>cDNA</b>	:	DNA complementar
<b>CHO</b>	:	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
<b>CM-Asp</b>	:	Sigla em inglês para ácido aspártico carboximetilado
<b>DADPA</b>	:	diamino-dipropilamina
<b>DEAE</b>	:	Dietilaminoetil
<b>DNA</b>	:	Sigla em inglês para ácido desoxirribonucleico
<b>dsDNA</b>	:	<i>double – stranded DNA</i> – DNA dupla fita
<b>DVK</b>	:	Dependentes de vitamina K
<b>EDC</b>	:	hidrocloro de (1-etil-3-(3-etilamino-propil) carboiimida
<b>EDTA</b>	:	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>EGDGE</b>	:	Etileno glicol diglicidil éter
<b>EGF</b>	:	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>ELISA</b>	:	<i>Enzyme linked immunoassay</i>
<b>EMA</b>	:	European Medicines Agency
<b>EU</b>	:	Unidades de endotoxinas
<b>FDA</b>	:	Food and Drug Administration
<b>FF</b>	:	<i>Fast Flow</i>
<b>FIX</b>	:	Fator IX
<b>FIXa</b>	:	Fator IX ativado
<b>FIXr</b>	:	Fator IX recombinante
<b>FVIIa</b>	:	Fator VII ativado
<b>FVIII</b>	:	Fator VIII
<b>FVIIIa</b>	:	Fator VIII ativado
<b>FVW</b>	:	Fator de von Willebrand
<b>FX</b>	:	Fator X
<b>FXa</b>	:	Fator X ativado
<b>FXI</b>	:	Fator XI

<b>FXIa</b>	:	Fator XI ativado
<b>FXIIIa</b>	:	Fator XIII ativado
<b>Gla</b>	:	Resíduo de ácido glutâmico $\gamma$ -carboxilado
<b>GMA</b>	:	glicidil metacrilato
<b>HA</b>	:	Hidroxiapatita
<b>HCP</b>	:	<i>Host Cell Proteins</i> - proteínas da célula hospedeira
<b>HEMA</b>	:	hidroxietyl metacrilato
<b>HPLC</b>	:	Sigla em inglês para cromatografia líquida de alta eficiência
<b>HSA</b>	:	Sigla em inglês para Albumina do soro humano
<b>IDA</b>	:	Sigla em inglês para ácido iminodiacético
<b>IgA</b>	:	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	:	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	:	Imunoglobulina M
<b>IMAC</b>	:	Sigla em inglês para cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
<b>KH<sub>2</sub></b>	:	Vitamina K reduzida
<b>KO</b>	:	Vitamina K oxidada
<b>LAL</b>	:	<i>Limulus Amebocyte Lisate</i>
<b>LRV</b>	:	<i>Log Reduction Values</i>
<b>mAb</b>	:	Anticorpo monoclonal
<b>NHS</b>	:	N-hidroxisuccinamida
<b>NTA</b>	:	Sigla em inglês para ácido nitrilotriacético
<b>PACE</b>	:	<i>Paired Basic Amino acid Cleaving Enzyme</i>
<b>PCC</b>	:	Complexo protrombínico
<b>PCR</b>	:	<i>Polimerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase
<b>pDNA</b>	:	DNA plasmidial
<b>PEGDGE</b>	:	poli(etileno glicol) diglicidil éter
<b>PEI</b>	:	polieterimida
<b>PES</b>	:	polietersulfona
<b>PI</b>	:	Ponto isoelétrico
<b>PMAA</b>	:	poli(metacrílico)
<b>pNA</b>	:	p-nitroanilina
<b>pVCLM</b>	:	poli(N-vinilcaprolactama)

<b>PVP</b>	:	polivinilpirrolidona
<b>Q</b>	:	Amônio Quaternário
<b>RNA</b>	:	Ácido ribonucleico
<b>SDS</b>	:	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SDS-PAGE</b>	:	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>SP</b>	:	Sulfopropil
<b>TBS</b>	:	Tris-base
<b>TED</b>	:	Sigla em inglês para tris(carboximetil)etilenodiamina
<b>TEMED</b>	:	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
<b>TMAE</b>	:	Trimetilaminoetil
<b>t-PA</b>	:	Sigla em inglês para ativador de plasminogênio tecidual
<b>TREN</b>	:	Sigla em inglês para tris-2(aminoetil)amina
<b>UI</b>	:	Unidades internacionais
<b>VKORC1</b>	:	Vitamina K 2,3 epóxido redutase
<b>WHO</b>	:	<i>World Health Organization</i>

## SIMBOLOGIA DOS AMINOÁCIDOS

Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteina	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M



## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante permitiu grandes avanços na área da produção de proteínas terapêuticas. O primeiro biofármaco produzido oriundo desta tecnologia a ser comercializado foi a insulina recombinante, produzida por células bacterianas de *Escherichia coli*, aprovada para uso humano em 1982 (BUTLER, 2005). A insulina é uma proteína relativamente simples, por isso foi possível produzi-la na forma recombinante em células bacterianas. Contudo, proteínas mais complexas, principalmente aquelas que sofrem modificações pós-tradução, precisam ser produzidas por células mais complexas, como as células animais. O primeiro biofármaco produzido por células animais foi o t-PA (sigla em inglês para ativador de plasminogênio tecidual), utilizado para o tratamento de infarto do miocárdio, aprovado para comercialização em 1986 (BUTLER, 2005). Portanto, o desenvolvimento de biofármacos é uma tecnologia relativamente recente.

O mercado das principais proteínas terapêuticas movimentou aproximadamente 80 bilhões de dólares no mundo, em 2008, e estima-se que em 2010 o valor deve ter atingido aproximadamente 93 bilhões (STROHL & KNIGHT, 2009). Dentre as categorias de proteínas terapêuticas, os anticorpos monoclonais lideram as vendas com 40% do valor total movimentado em 2008. Contudo, existem somente 31 anticorpos monoclonais comercializados. Outras categorias de biofármacos são: fatores de estimulação eritropoiéticos, insulinas, enzimas, hormônios do crescimento, fatores de coagulação e fatores de estimulação de granulócitos, dentre outros. Além dos biofármacos aprovados, existem outros que ainda estão em fase de desenvolvimento. Para desenvolver uma proteína terapêutica, pode-se levar até 10 anos, dependendo da complexidade da mesma, já que além do desenvolvimento da tecnologia de produção, o biofármaco precisa passar pelas etapas de desenvolvimento clínico (ensaios pré-clínicos e clínicos fase I, II e III) antes de ser aprovado para uso humano (STROHL & KNIGHT, 2009).

As agências regulatórias, como o FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos), EMA (European Medicines Agency, União Européia) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil), são muito criteriosas para autorizar a comercialização de um biofármaco, principalmente em relação aos potenciais riscos de contaminação associados a produtos derivados de células e componentes de origem

animal. Os principais contaminantes estão associados à própria célula produtora (possivelmente contaminadas com vírus, células intactas, outros agentes transmissíveis, DNA e proteínas da célula hospedeira), às matérias-primas utilizadas (possivelmente contaminadas com bactérias, fungos, micoplasmas, vírus, proteínas indesejáveis e endotoxinas) ou aos reagentes utilizados no processo (antibióticos, ligantes de resinas, solventes, sanitizantes, indutores e nutrientes). Devido a esta variedade de possíveis contaminantes, o desenvolvimento de processos de purificação eficientes é fundamental para a aprovação de um biofármaco (RODRIGUES & MORO, 2008).

Dentre as proteínas terapêuticas produzidas, inclui-se o fator IX, que atua no processo de coagulação sanguínea e cuja falta ou defeito na produção pelo organismo causa uma doença denominada hemofilia B. Segundo dados do Ministério da Saúde, publicados em 2008, no Brasil existem cerca de 1300 pessoas com hemofilia do tipo B. Este número de pacientes com hemofilia B, somado aos pacientes de outras coagulopatias (principalmente a hemofilia A, que consiste em deficiência na produção de fator VIII), representa ao país um custo de mais de 100 milhões de dólares por ano com a compra de medicamentos hemoderivados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Segundo os últimos dados divulgados, o consumo anual de fator IX está em 70 milhões de UI/ano o que gerou um gasto de 17,5 milhões de dólares em 2010 com a compra de hemoderivados (HEMOBRÁS, 2012).

Existe somente um fator IX recombinante aprovado para comercialização no mundo, é denominado Benefix<sup>®</sup> e é produzido pelo Genetics Institute/Wyeth/Pfizer, na Europa. O processo de purificação do Benefix<sup>®</sup> foi desenvolvido na década de 1990, e inclui 4 etapas cromatográficas, sendo elas: troca aniônica, coluna de pseudo-afinidade por ligante sulfatado, coluna de hidroxapatita e coluna com íons metálicos imobilizados. Além disso, possui duas etapas de ultrafiltração/diafiltração e uma etapa de filtração viral (HARRISON *et al.*, 1998).

Neste contexto, o presente trabalho visa estudar detalhadamente o processo de purificação de fator IX recombinante, produzido por células de ovário de hamster chinês, CHO (*Chinese hamster ovary cells*).

O processo de purificação do Benefix<sup>®</sup> foi desenvolvido na década de 90. O presente trabalho propõe a utilização de novos adsorventes nas etapas cromatográficas

do processo de purificação do fator IX recombinante, como, por exemplo, o uso de membranas e monolitos como suportes cromatográficos, além de novas técnicas cromatográficas para este processo, como a interação hidrofóbica.

O desenvolvimento de tecnologia nacional para a produção de fator IX é de interesse para o País, pois pode gerar uma redução significativa nos gastos governamentais com este produto, reduzindo a necessidade de importações, a qual gera dependência do mercado externo. Além disso, pode representar um aumento no acesso ao tratamento (tratamento profilático em vez de imediatista), com impacto na qualidade de vida dos portadores da hemofilia B.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Bioquímica do fator IX**

#### **2.1.1. Função do fator IX no organismo humano**

O fator IX, também chamado de fator de Christmas, é uma proteína que atua no processo de coagulação sanguínea e foi descoberta em 1952 (BIGGS *et al.*, 1952). A deficiência desta proteína causa uma doença denominada de hemofilia B. A maior incidência da doença é entre os homens, já que a origem da doença está em um defeito genético atrelado ao cromossomo X, cromossomo no qual está localizado o gene do fator IX.

O sistema de coagulação é formado por reações sequenciais que envolvem várias proteínas em presença de cálcio e fosfolipídeos. Todos os componentes, exceto os fosfolipídeos, são conhecidos como fatores de coagulação. Os fatores de coagulação são denominados por números em algarismo romano, porém possuem sinônimos, sendo eles: fator I (fibrinogênio), fator II (protrombina), fator tecidual, fator V (acelerina), fator VII (proconvertina), fator VIII (fator anti-hemofílico), fator IX (fator de Christmas), fator X (fator de Stuart), fator XI (fator de Rosenthal), fator XII (fator de Hageman) e o fator XIII (fator estabilizador da rede de fibrina), além do fator de von Willebrand. O fator III, VI não existem e o cálcio é considerado como fator IV. (JEÓLAS, 1979; BUTENAS & MANN, 2002; HOFFMAN, 2004; DAHBACK, 2005; RIDDEL *et al.*, 2007).

O conceito mecanístico do processo de coagulação descrito por RIDDEL *et al.* (2007) pode ser considerado o mais atual. Segundo estes autores, o processo de coagulação pode ser dividido em quatro fases: iniciação, amplificação, propagação e terminação. A primeira fase se inicia através da exposição de células que expressam o fator tecidual ao fluxo sanguíneo, devido ao ferimento, permitindo a formação de um complexo fator VIIa-fator tecidual, o que é suficiente para iniciar o processo. A atuação do fator XII é secundária, ou seja, somente auxilia na ativação do fator IX, já que foi observado que a ausência do fator XII não causa problemas de sangramento e sim protege contra trombozes patológicas (KLEINSCHNITZ *et al.*, 2006). Ainda na fase de iniciação, o complexo fator VIIa-fator tecidual ativa uma pequena quantidade de fator



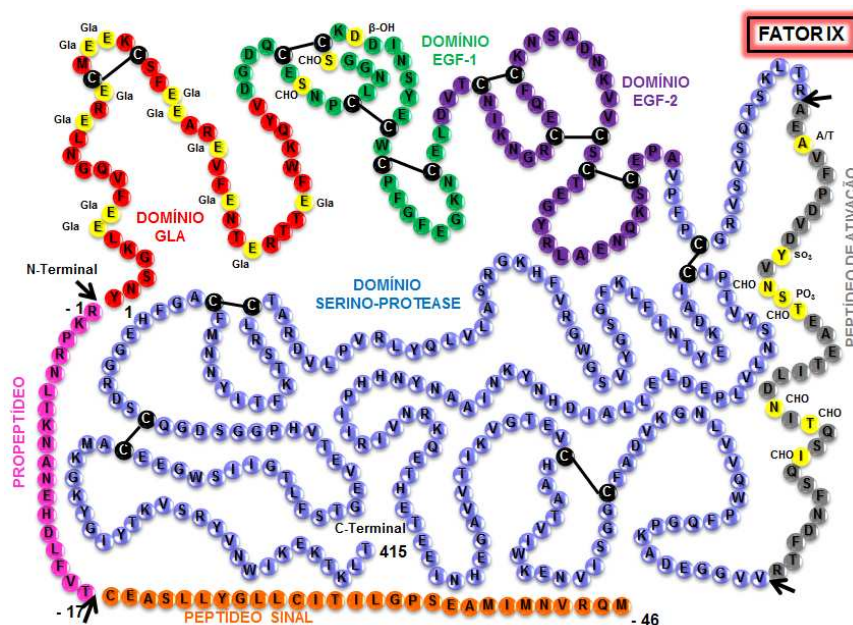
## 2.1.2. Estrutura e propriedades bioquímicas do fator IX

O gene que codifica o fator IX está localizado no *locus* q27 do cromossomo X (PURRELLO *et al.*, 1985) tendo sido completamente sequenciado por YOSHITAKE *et al.* (1985). O gene completo possui 34 kb, porém, quando os íntrons são removidos durante o processamento pela célula, sobram apenas 8 éxons que possuem ao todo 1,4 kb, tamanho do cDNA do fator IX, que geralmente é usado na transfecção em células de mamíferos (KURACHI *et al.*, 1993).

A sequência genética do fator IX codifica uma proteína com 461 aminoácidos, que corresponde ao fator IX imaturo. Quando o fator IX acaba de ser traduzido, ele é chamado de imaturo pelo fato de possuir dois peptídeos que são removidos ao longo do processamento completo da molécula. Estes peptídeos são: o peptídeo sinal, também chamado de pré-líder, e o pró-peptídeo, também chamado de pró-líder (KURACHI *et al.*, 1993). O peptídeo sinal é composto de 28 aminoácidos, que formam uma cadeia hidrofóbica que é requerida para o transporte da cadeia polipeptídica nativa através da membrana do retículo endoplasmático, sendo removido logo em seguida (JORGENSEN *et al.*, 1987). O pró-peptídeo é composto por 18 aminoácidos e atua auxiliando na  $\gamma$ -carboxilação (a mais extensa e mais importante modificação pós-tradução do fator IX), pois este peptídeo se liga a um sítio da enzima  $\gamma$ -carboxilase, sinalizando o início da reação de  $\gamma$ -carboxilação (JORGENSEN *et al.*, 1987). O pró-peptídeo é removido após o término da reação de  $\gamma$ -carboxilação, através da atuação de uma enzima denominada de PACE (*Paired Basic Amino acid Cleaving Enzyme*). A eficácia desta enzima é importante para o fator IX exercer sua atividade biológica, já que WASLEY *et al.* (1993) observaram que a atividade do fator IX secretado por células CHO aumentou em 3 vezes quando o gene do FIX foi co-expresso com o gene da enzima PACE. As células CHO que são utilizadas no processo de produção do único fator IX recombinante comercial foram co-transfectadas com o gene da PACE (HARRISON *et al.*, 1998).

Após a remoção do pré-peptídeo e do pró-peptídeo, a molécula do fator IX é composta por 4 domínios, sendo eles: o domínio Gla, o domínio EGF-1, o domínio EGF-2 e o domínio catalítico serino-protease. O domínio Gla é denominado desta maneira porque contém 12 resíduos de ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilados (Gla), dentro dos 46 aminoácidos que compõem o domínio. Os domínios EGF-1 e EGF-2 têm 38 e 43

aminoácidos, respectivamente. Estes domínios possuem esta denominação por terem conformações semelhantes à encontrada no fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor - EGF*), como, por exemplo, o fato de possuírem 6 cisteínas que formam 3 pontes dissulfeto (HARRIS *et al.*, 2003). Os domínios Gla, EGF-1 e EGF-2 formam a cadeia leve do fator IX. O último e mais extenso domínio é o domínio catalítico serino-protease. Este possui 235 aminoácidos e forma a cadeia pesada da proteína. O fator IX ainda possui um peptídeo de ativação que contém 35 aminoácidos. Quando o fator IX é ativado no processo de coagulação sanguínea, descrito no item anterior, o peptídeo de ativação é removido. Quando isto acontece, a cadeia pesada do fator IX permanece unida à cadeia leve através de uma ponte dissulfeto (KURACHI *et al.*, 1993; BOND *et al.*, 1998). A Figura 2.2 ilustra a estrutura primária da molécula do fator IX.



**Figura 2.2.** Sequência de aminoácidos e estrutura dos domínios do pré-pró-fator IX humano. O fator IX possui um domínio GLA (em vermelho), onde são encontrados 12 resíduos de ácidos glutâmicos  $\gamma$ -carboxilados (Gla), destacados em amarelo dentro das imediações do domínio. Em seguida, estão os domínios EGF-1 (em verde) e EGF-2 (em roxo). A sequência posterior aos domínios EGF possui uma ponte de dissulfeto entre resíduos de cisteína (C-C), que une toda a cadeia leve a duas partes do domínio serino-protease (em azul), após a clivagem do peptídeo de ativação (em cinza) durante o processo de coagulação. Os aminoácidos em amarelo correspondem aos locais onde ocorrem as modificações pós-tradução do fator IX (CHO – glicosilação,  $\beta$ -OH –  $\beta$ -hidroxilação,  $SO_3$  – sulfatação,  $PO_3$  – fosforilação, Gla -  $\gamma$ -carboxilação) ou a um sítio de Ala ou Thr (A/T), correspondente a um polimorfismo alélico. A figura ainda mostra o peptídeo sinal (em laranja) e o pró-peptídeo (em rosa), os quais são clivados por proteases antes de o fator IX ser secretado (RIBEIRO, 2009).

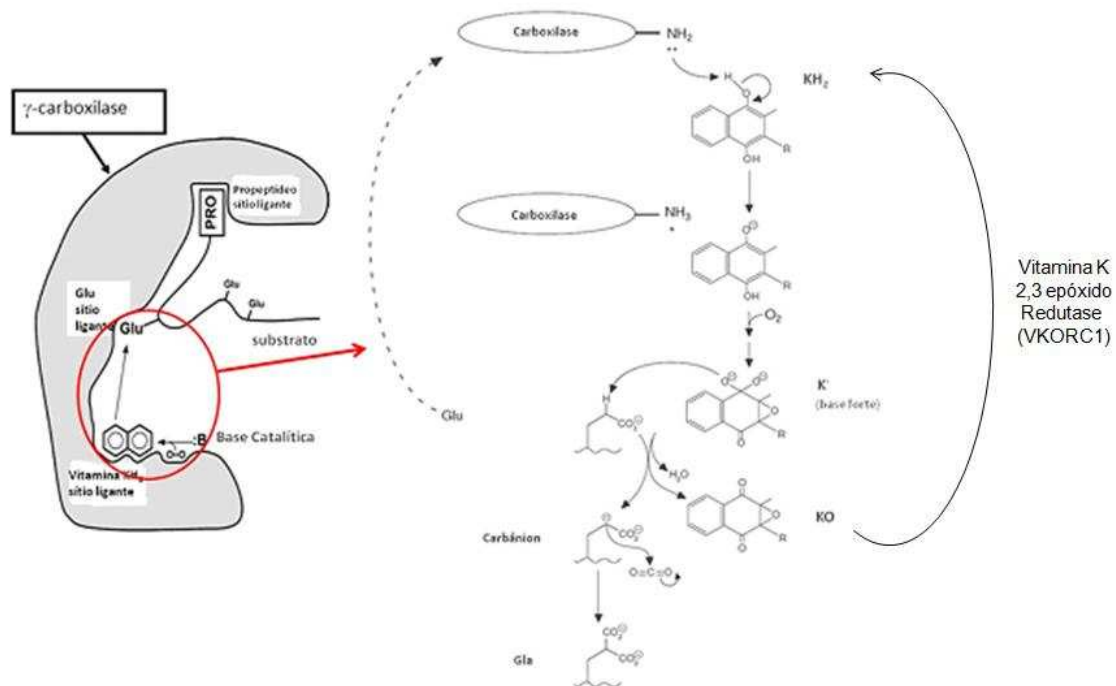
Apenas a síntese da cadeia polipeptídica não é suficiente para que o fator IX adquira o enovelamento correto e exerça sua atividade biológica, sendo necessária a ocorrência de modificações pós-tradução. O fator IX sofre 5 modificações pós-tradução: ( $\gamma$ -carboxilação, glicosilação,  $\beta$ -hidroxilação, sulfatação e fosforilação), além da eliminação do peptídeos (sinal, pró-peptídeo e de ativação).

A  $\gamma$ -carboxilação é a principal modificação pós-tradução que ocorre na molécula do fator IX, consistindo na adição de moléculas de  $\text{COO}^-$  nos carbonos  $\gamma$  dos resíduos de ácido glutâmico, presentes na estrutura da proteína. Esta reação é catalisada pela enzima  $\gamma$ -carboxilase, que tem como co-fator a vitamina K reduzida ( $\text{KH}_2$ ). Por isso, o fator IX pertence à classe das proteínas dependentes de vitamina K. A vitamina  $\text{KH}_2$ , após atuar na reação, é convertida para sua forma oxidada ( $\text{KO}$ ), porém a enzima denominada vitamina K 2,3 epóxido redutase ( $\text{VKORC1}$ ) exerce a função de reciclar a vitamina K reduzida, completando desta forma o ciclo da vitamina K (BERKNER, 2008; OLDENBURG *et al.*, 2008). A Figura 2.3 mostra um mecanismo proposto para a reação de  $\gamma$ -carboxilação. A reação de  $\gamma$ -carboxilação ocorre em 12 resíduos de ácido glutâmico e necessita da presença do pró-peptídeo na molécula do fator IX para que a reação seja iniciada (JORGENSEN *et al.*, 1987). No entanto, esta reação, em alguns casos, pode ser incompleta ou não ocorrer devido ao excesso de fator IX produzido. Isto ocorre com células de mamífero que superexpressam o gene do fator IX, ou seja, uma grande quantidade de fator IX pode sobrecarregar a maquinaria da célula, fazendo com que a mesma secrete parte do fator IX na forma não  $\gamma$ -carboxilada e, conseqüentemente, sem atividade biológica. Contudo, quando a enzima  $\text{VKORC1}$  foi co-expressa com o fator IX em células BHK, foi observado que a produção de fator IX funcional aumentou em 3 vezes, não ocorrendo o mesmo para a co-expressão da enzima  $\gamma$ -carboxilase, concluindo-se que a presença da  $\text{VKORC1}$  provavelmente é um dos fatores limitantes da  $\gamma$ -carboxilação (WAJIH *et al.*, 2005).

Assim, o aumento do rendimento da reação de  $\gamma$ -carboxilação do fator IX produzido por células de mamíferos geneticamente modificadas ainda é um desafio, pois, provavelmente, existem muitas outras substâncias que participam desta reação, como, por exemplo, a proteína calumenina, que segundo alguns trabalhos seria um inibidor natural da enzima  $\gamma$ -carboxilase (WALLIN *et al.*, 2001; 2004; WAJIH *et al.*,



2004). Com base nesta hipótese, o gene da calumenina foi silenciado em células BHK co-transfectadas com o gene do fator IX e da enzima VKORC1, e os resultados demonstraram que 80% do fator IX total produzido estava na forma ativa, enquanto que para as mesmas células não silenciadas o valor foi reduzido para 50% (WAJIH *et al.*, 2006).



**Figura 2.3** Reação de  $\gamma$ -carboxilação. A proteína dependente de vitamina K (DVK) liga-se à  $\gamma$ -carboxilase através do pró-peptídeo. Esta interação aumenta a afinidade da  $\gamma$ -carboxilase pelo resíduo de Glu. O efeito alostérico destas interações aumenta a atração da enzima pelo seu co-fator ( $\text{KH}_2$ ). O cofator reage com o sítio de Lys218, perdendo um próton. A reação do co-fator desprotonado com  $\text{O}_2$  forma um composto intermediário (base forte). A base forte retira o hidrogênio  $\gamma$  do resíduo Glu, formando um carbânion. O carbânion ataca o grupo  $\text{COO}^-$ , gerando o ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado, que possui 2 cargas negativas para interagir com o  $\text{Ca}^{2+}$  (adaptado de BERKNER, 2005 e 2008; RIBEIRO, 2009).

O fator IX também pode ser considerado como uma proteína glicosilada, porém a glicosilação que ocorre no fator IX é relativamente simples, não sendo um fator limitante para as células de mamífero. Existem 7 sítios de glicosilação no fator IX, 2 no primeiro domínio EGF e 5 no peptídeo de ativação. As duas glicosilações do domínio EGF-1 são do tipo O e correspondem a um tri-sacarídeo Xilose-Xilose-Glicose, no aminoácido Ser-53, e um glicano do tipo NeuAc-Galactose-GlicoseNAc-fucose, no aminoácido Ser-61. As outras 5 ocorrem no peptídeo de ativação: O-glicosilações nos

aminoácidos Thr-159, Thr-169 e Thr-172 e N-glicosilações nos resíduos de Asn-157 e Asn-167 (as N-glicosilações são completas e as O-glicosilações são parciais). As outras modificações são uma  $\beta$ -hidroxilação parcial no ácido aspártico 64, localizado no domínio EGF-1, uma fosforilação no resíduo Ser-158, localizado no peptídeo de ativação e uma sulfatação no aminoácido Tyr-155, também localizado no peptídeo de ativação (BOND *et al.*, 1998).

### **2.1.3. Interação do fator IX com o íon $\text{Ca}^{2+}$**

O fator IX, como já foi mencionado, faz parte da classe das proteínas dependentes de vitamina K (DVK). As proteínas DVK são muito semelhantes estruturalmente e, provavelmente, foram originadas a partir de um gene ancestral comum (LEYTUS *et al.*, 1986). Portanto, todas possuem um domínio Gla, porém, não necessariamente, com 12 resíduos Gla, como ocorre com o fator IX e o fator X, já que o fator VII possui apenas 10 resíduos Gla, enquanto que a proteína C apenas 9. Os resíduos de ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilados possuem cargas negativas capazes de interagir com cátions divalentes, principalmente com o  $\text{Ca}^{2+}$ , metal indispensável para o processo de coagulação sanguínea. Outros íons metálicos divalentes, como  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , também são capazes de interagir com os resíduos Gla, porém com menor eficiência (YAN, 1991).

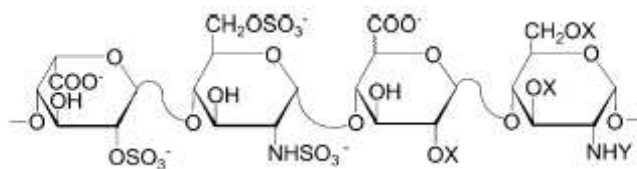
As proteínas dependentes de vitamina K, quando interagem com íons divalentes, sofrem uma mudança conformacional que altera suas características significativamente. Esta mudança foi comprovada utilizando a técnica de fluorescência. ASTERMARK *et al.* (1991) notaram uma mudança na intensidade na emissão de fluorescência, após a interação do  $\text{Ca}^{2+}$  com algumas proteínas dependentes de vitamina K. Além disso, SUNNERHAGEN *et al.* (1995) identificaram que, após a interação do domínio Gla com íons  $\text{Ca}^{2+}$ , três aminoácidos hidrofóbicos (Phe 4, Leu 5 e Val 8) foram expostos à superfície nas moléculas do fator X e da protrombina. Contudo, esta sequência de aminoácidos é similar em todas as proteínas DVK e, especificamente no fator IX, a ordem dos aminoácidos expostos é alterada para Leu 5, Phe 8 e Val 9. Estas descobertas explicam o fato de a molécula de proteína C possuir maior afinidade pela resina hidrofóbica fenil Sepharose<sup>®</sup> em presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do que na ausência deste íon no tampão de equilíbrio, podendo ser eluída, no primeiro caso, através da adição de tampão

contendo EDTA, um agente quelante que remove os íons  $\text{Ca}^{2+}$  (YAN, 1991; YAN, 1996).

Outra evidência da mudança estrutural, que ocorre quando há íons  $\text{Ca}^{2+}$  no ambiente em que se encontram as proteínas dependentes de vitamina K, foi observada em relação à carga superficial da proteína C, pois foi verificada uma alteração na mobilidade eletroforética desta proteína, após a mesma interagir com o íon  $\text{Ca}^{2+}$  (STENFLO, 1976). Esta característica é observada para todas as proteínas DVK. Portanto, com base nesta modificação na carga, pôde-se desenvolver um processo de purificação no qual as proteínas DVK podem ser eluídas de uma coluna de troca aniônica, por exemplo, contendo o ligante amônio quaternário (Q), através da adição de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , ou seja, por meio de uma eluição por pseudo-afinidade (YAN, 1991). Este método é aplicado no processo de purificação do fator IX recombinante comercial (Benefix<sup>®</sup>), produzido por células CHO, sendo obtido, segundo HARRISON *et al.* (1998), um alto grau de pureza e um alto rendimento nesta etapa individual de purificação. A grande vantagem deste método é a possibilidade de selecionar moléculas ativas das proteínas DVK, já que somente as proteínas contendo um grande número de resíduos de ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilados podem ser eluídas por afinidade pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$ . A seletividade do método foi descoberta ao se observar que a proteína C recombinante contendo 7 a 8 resíduos Gla (a proteína C normal, que possui 9 resíduos Gla) não foi capaz de ser eluída da coluna de troca aniônica com o tampão contendo 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 150 mM de NaCl (YAN, 1996). A força iônica do tampão também é importante na interação da proteína com os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , já que, na ausência de NaCl na concentração de 0,15 M, a eluição das proteínas DVK com 10mM de  $\text{CaCl}_2$  foi ineficiente (YAN, 1991). Um fator importante a ser destacado é o fato da interação do cálcio com proteínas anticoagulantes (que apresentam afinidade pelo fator IX) ser reduzida em pH ácido, provavelmente por protonação dos sítios de interação com o cálcio (SUZUKI *et al.*, 2005). Apesar de a pesquisa ter sido realizada com proteínas anticoagulantes, e não com o fator IX, é provável que ocorra fenômeno semelhante com os resíduos Gla do fator IX.

#### 2.1.4. Interação do fator IX com o anticoagulante heparina

A heparina foi descoberta em 1916, por Jay MacLaen, e consiste em um glicosaminoglicano sulfatado natural sintetizado no corpo humano e em alguns micro-organismos, como por exemplo, a bactéria *Flavobacterium heparinum*. Esta substância possui uma massa molar média de 15 kDa e uma elevada carga negativa, que é atribuída aos grupamentos sulfonato e carboxilato (LINHARDT, 2003). A estrutura mais comumente relatada para a heparina é na forma de um dissacarídeo tri-sulfatado, como pode ser visualizado na Figura 2.4 (LINHARDT, 2003). A conformação primária da heparina é na forma de um polissacarídeo linear, porém acredita-se que a flexibilidade das cadeias de ácido L-idurônico promova alterações conformacionais, responsáveis pela interação com proteínas. Já é sabido que a heparina participa de vários processos fisiológicos, como: coagulação sanguínea, adesão de células, metabolismo de lipídeos e regulação do fator de crescimento. O tipo predominante de interação entre as proteínas e a heparina é iônica, através do agrupamento de cargas positivas geradas por aminoácidos básicos, porém em casos isolados a interação pode ser por ligações de hidrogênio (CAPILA & LINHARDT, 2002).



**Figura 2.4.** Estrutura química da heparina. Unidade principal: dissacarídeo tri-sulfatado, X = sulfo ou H, Y = sulfo, Ac ou H (LINHARDT, 2003).

No processo de coagulação, a heparina atua em várias proteínas, mas principalmente na antitrombina III. A antitrombina III é um inibidor natural da coagulação, que atua em vários fatores de coagulação. Quando a heparina se liga à antitrombina III e esta por sua vez liga-se à trombina, forma-se um complexo ternário e o poder anticoagulante da antitrombina III aumenta em 2000 vezes (CAPILA & LINHARDT, 2002).

A heparina é capaz de interagir fortemente com proteínas da família dos fatores de crescimento epidérmicos. Algumas proteínas desta família somente foram removidas de uma coluna de Sepharose<sup>®</sup>/heparina com concentração de 1 M de NaCl, demonstrando uma forte interação iônica. Provavelmente, esta interação está relacionada com as sequências de aminoácidos X-B-B-X-B-X e X-B-B-B-X-X-B-X, onde o B representa a posição de um aminoácido básico (arginina, lisina ou histidina) e o X representa um aminoácido não básico (THOMPSON *et al.*, 1994).

Como o fator IX e outras proteínas DVK possuem dois domínios EGF, seria possível imaginar que a ligação da heparina com estas proteínas fosse através deste domínio. Contudo, em um trabalho publicado por YANG *et al.* (2002), foi avaliada a interação da heparina com o fator IX ativado (FIXa) submetido a algumas mutações em aminoácidos básicos presentes no domínio catalítico serino-protease. Após os testes com uma coluna de Sepharose<sup>®</sup> com heparina imobilizada, os autores observaram que a força de interação foi reduzida em alguns dos mutantes, já que a concentração de NaCl para eluir o fator IX diminuiu de 0,4 M para a faixa de 0,2-0,3 M. Os autores concluíram que alguns dos resíduos de aminoácidos básicos, supostamente envolvidos na interação do fator IX com a heparina, na ordem de importância, foram: Arg<sup>233</sup> > Arg<sup>165</sup> > Lis<sup>230</sup> > Lis<sup>126</sup> > Arg<sup>170</sup>, a maioria pertencente ao domínio catalítico serino-protease. Estes aminoácidos não estão próximos na estrutura primária, porém na estrutura terciária tridimensional ocorre uma aproximação destes resíduos na molécula do fator IX (YANG *et al.*, 2002).

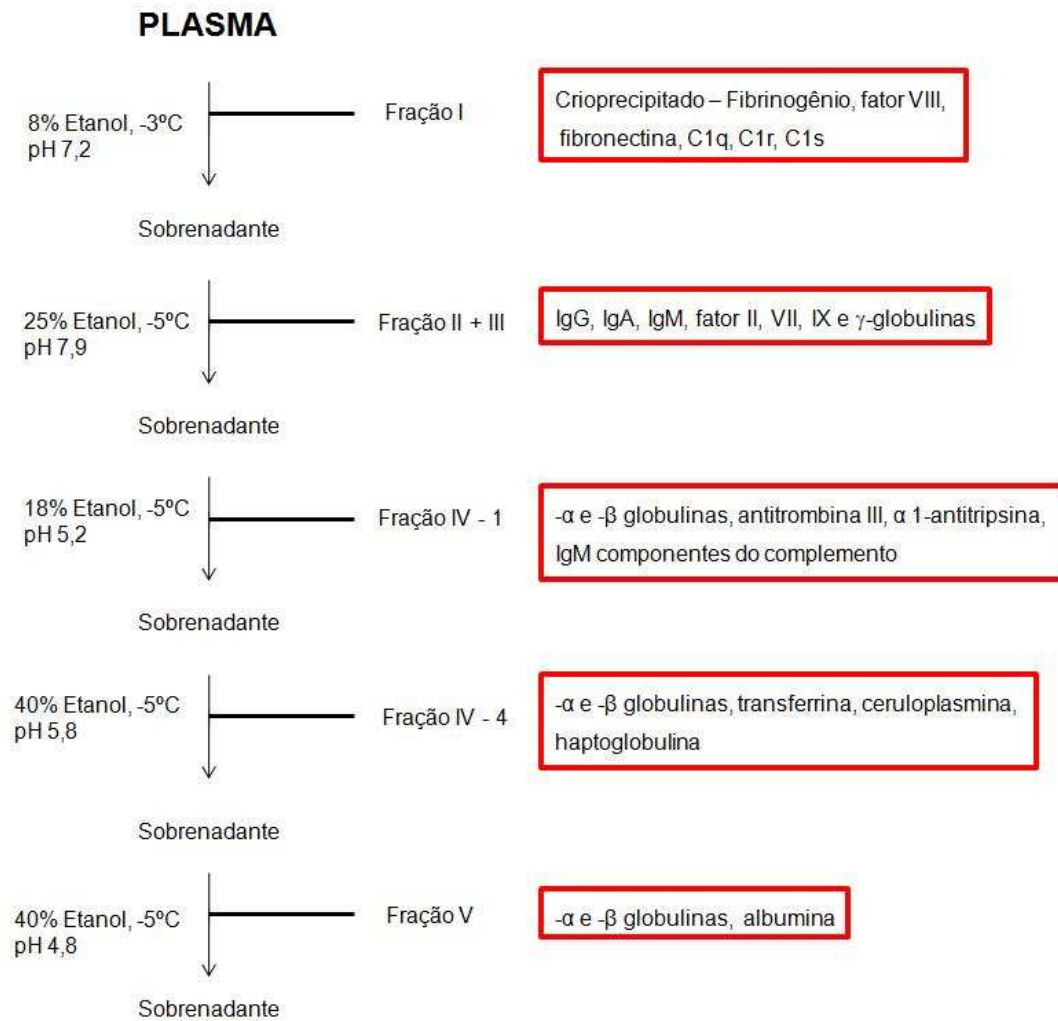
## 2.2. Purificação de proteínas

As etapas de purificação de proteínas são extremamente importantes no processo de produção de um biofármaco para uso em humanos, pois o grau de pureza requerido para o produto final é elevadíssimo. Por este motivo, geralmente utilizam-se várias etapas cromatográficas. Usualmente, utiliza-se uma etapa que promova um alto fator de concentração para a proteína de interesse logo no início do processo, visando à redução do volume de trabalho. Além disso, são necessárias etapas prévias de separação de células e agregados sólidos, e etapas de inativação/remoção viral. O processo de purificação como um todo pode representar até 90% dos custos de produção de biofármacos (MELLADO, 2005). Nesta revisão, somente serão comentadas as etapas cromatográficas do processo de purificação de proteínas a partir de uma mistura

protéica complexa, podendo ser um sobrenadante de cultivo de células ou plasma sanguíneo.

### **2.2.1. Purificação de proteínas derivadas do plasma**

O fracionamento do plasma humano é realizado industrialmente quase que exclusivamente por crioprecipitação fracionada, utilizando o método de Cohn (COHN *et al.*, 1946). Este método consiste, basicamente, em precipitar o plasma com diferentes proporções de etanol em temperaturas baixas, em torno de  $-5^{\circ}\text{C}$ . A Figura 2.5 mostra os produtos obtidos pelo método de Cohn em suas respectivas frações. O método de crioprecipitação é pouco eficiente e caro em relação aos processos cromatográficos, porém a maioria das indústrias que possuem plantas de produção de hemoderivados ainda utiliza o método de Cohn para fracionar o plasma, adotado à época em que as plantas foram montadas e que os produtos foram aprovados pelas agências regulatórias. Contudo, existem empresas, como a australiana CSL, que já implantaram etapas cromatográficas para separar algumas proteínas do plasma, como fatores de coagulação, albumina e imunoglobulinas (RAW *et al.*, 2007).

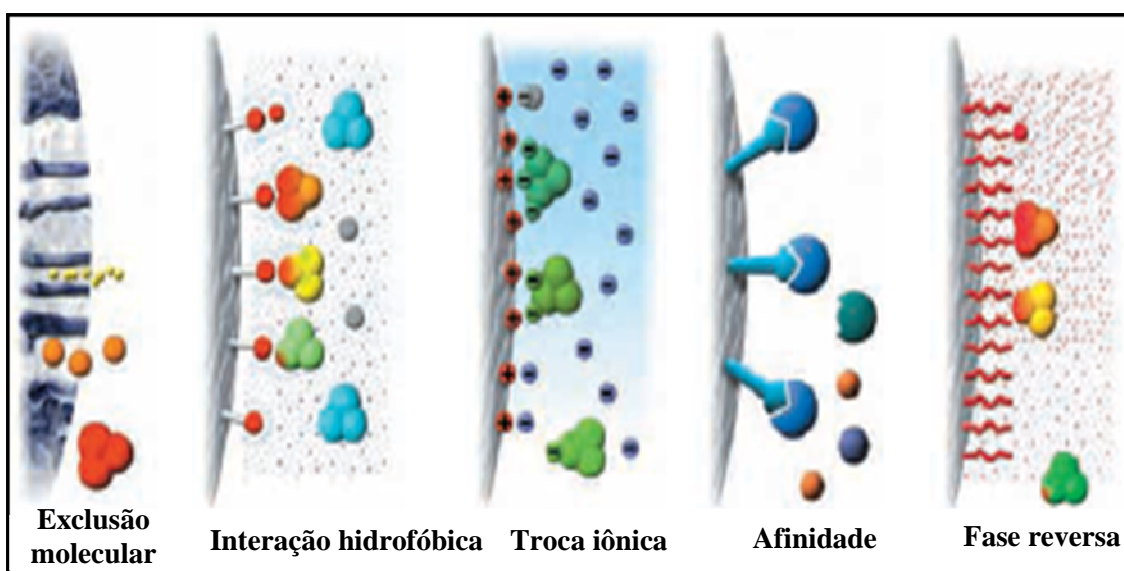


**Figura 2.5.** Método de Cohn para fracionamento do plasma humano (Adaptado de RAW *et al.*, 2007).

Há métodos que combinam a crioprecipitação com etapas cromatográficas para fracionamento do plasma, em escala industrial. Os mesmos foram descritos por BURNOUF & RADOSEVICH (2001) para as seguintes proteínas do plasma: fator VIII, fator IX, fator de von Willebrand, fibronectina, Antitrombina III,  $\alpha$ 1-antitripsina, proteína C, Albumina e Imunoglobulina G. Todos os métodos envolvem etapas cromatográficas de troca aniônica seguidas de etapas de imunoafinidade ou pseudoafinidade, principalmente utilizando heparina como ligante (BURNOUF & RADOSEVICH, 2001).

## 2.2.2. Purificação de proteínas por técnicas cromatográficas

Outro método para obtenção de proteínas plasmáticas é a produção por via recombinante, através do cultivo de células animais transfectadas com o gene da proteína de interesse. Pelo fato das proteínas plasmáticas serem complexas e sofrerem diferentes modificações pós-tradução, somente células eucarióticas superiores são capazes de sintetizar estas proteínas de forma correta, preservando, desta forma, sua atividade biológica. As vantagens dos produtos recombinantes em relação aos hemoderivados são o fato de a matéria-prima ser ilimitada e o risco de contaminação por novos patógenos ser reduzido. Nos processos de produção de fatores sanguíneos recombinantes, são usadas quase que exclusivamente técnicas cromatográficas. A Figura 2.6 resume os tipos de cromatografia utilizados na purificação de proteínas, que serão abordadas a seguir.



**Figura 2.5.** Tipos de cromatografia líquida utilizadas na purificação de proteínas. Exclusão molecular, separação por tamanho; interação hidrofóbica, seleção por nível de hidrofobicidade na superfície de proteínas; troca iônica, separação através da carga superficial das proteínas; afinidade, interação específica entre proteína e ligante e fase reversa, separação por hidrofobicidade em resina apolar com alto grau de compactação, utilizada em análises (GE HEALTHCARE HANDBOOK, 2004).

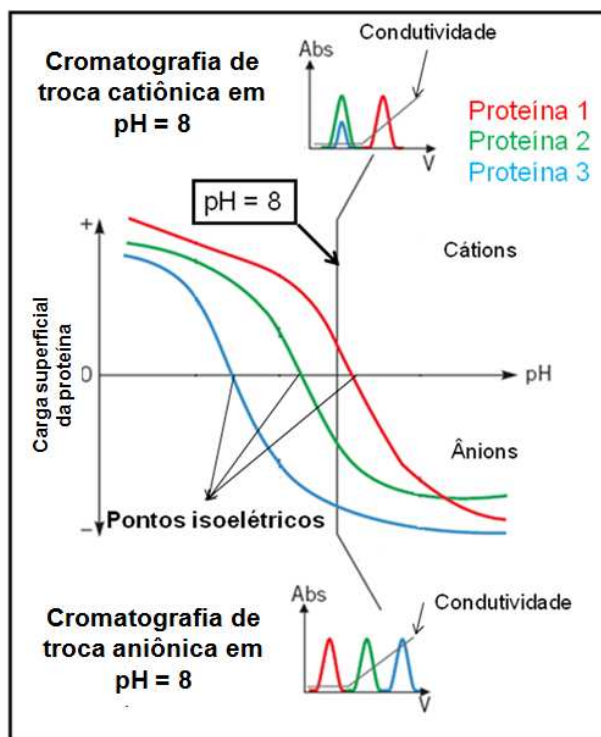
### 2.2.2.1. Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é amplamente utilizada nos processos de purificação de proteínas, sejam elas recombinantes, hemoderivadas, provenientes do leite ou de outras fontes. Este amplo uso é devido à grande capacidade adsortiva que os



adsorventes proporcionam, ao alto fator de purificação que pode ser obtido e ao custo relativamente baixo, em relação a outras técnicas cromatográficas (MORAES *et al.*, 2008).

Este tipo de cromatografia consiste na interação eletrostática do ligante carregado, imobilizado em uma matriz sólida, com a carga superficial distribuída na superfície da proteína. Esta carga superficial é função do ponto isoelétrico de cada proteína e do pH da solução em que a proteína se encontra. Os adsorventes podem ser de troca catiônica (ligantes com carga negativa, que trocam cátions) ou de troca aniônica (ligantes com carga positiva, que trocam ânions). Geralmente, para garantir uma carga mínima da proteína a ser separada, na adsorção se utiliza o pH pelo menos uma unidade acima ou abaixo do ponto isoelétrico da proteína de interesse, dependendo do tipo de ligante. A Figura 2.7 exemplifica a utilização dos dois tipos de cromatografia de troca iônica possíveis para separar três proteínas com pontos isoelétricos distintos. A eluição deste tipo de coluna é realizada por aumento gradativo da força iônica, ou seja, as proteínas que possuem interação iônica fraca com o ligante irão desorver primeiro e conforme a força iônica aumenta, outras proteínas são eluídas, gerando várias frações que devem ser analisadas para se determinar em qual fração está a proteína de interesse (GE HEALTHCARE HANDBOOKS, 2004).



**Figura 2.7.** Esquema ilustrativo da separação de três proteínas com distintos pontos isoeletricos por cromatografia de troca catiônica e aniônica em pH 8 (modificado de GE HEALTHCARE HANDBOOKS, 2004).

Os ligantes aniônicos e catiônicos podem ser divididos em dois tipos: ligantes fracos e fortes. A denominação fraca e forte está relacionada com a capacidade de ionização dos ligantes. Os ligantes aniônicos fortes são considerados bases fortes, pois seus hidróxidos em solução aquosa permanecem completamente dissociados. Os ligantes catiônicos fortes funcionam como ácidos fortes, pois liberam  $H^+$  em solução. A vantagem de se utilizar ligantes fortes é que a capacidade adsortiva do ligante não se altera em uma ampla faixa de pH, já que não há mudança significativa de carga do ligante. Ligantes aniônicos e catiônicos fracos podem perder ou ganhar prótons de acordo com a variação de pH, ou seja, a capacidade de ionização é variável de acordo com o pH do meio, o que pode acarretar em mudança da capacidade adsortiva do ligante. Contudo, a maioria das proteínas possui pontos isoeletricos entre 5,5 e 7,5 e podem ser separadas com trocadores fracos ou fortes. A utilização de ligantes fracos pode gerar diferentes seletividades (GE HEALTHCARE HANDBOOKS, 2004; MORAES *et al.*, 2008). A Tabela 2.1 mostra os ligantes de troca iônica mais utilizados e suas respectivas fórmulas químicas.

**Tabela 2.1.** Ligantes mais utilizados na cromatografia de troca iônica (GE HEALTHCARE HANDBOOKS, 2004; MORAES *et al.*, 2008).

<b>Fórmula</b>	<b>Nomenclatura do grupo funcional</b>
<b>Trocadores aniônicos fortes</b>	
-CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Trimetilaminometil (TAM)
-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub>	Trietilaminoetil (TEAE)
<b>Trocadores aniônicos fracos</b>	
-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> H <sub>3</sub>	Aminoetil (AE)
-CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> H(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Dietilaminopropil (ANX)
-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> H(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	Dietilaminoetil (DEAE)
<b>Trocadores catiônicos fortes</b>	
-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Sulfonato (S)
-CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Sulfometil (SM)
-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Sulfopropil (SP)
<b>Trocadores catiônicos fracos</b>	
-COO <sup>-</sup>	Carbóxi (C)
-CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	Carboximetil (CM)

A forma mais utilizada para eluir as proteínas adsorvidas em colunas de troca iônica é empregando um gradiente de concentração de NaCl, na forma de gradiente linear ou por degraus. Contudo, existe uma forma de eluir algumas proteínas por afinidade. A eluição por afinidade consiste em adicionar íons que sejam capazes de perturbar a estrutura eletrônica da proteína, diminuindo o seu coeficiente de partição e enfraquecendo, assim, sua interação com o adsorvente iônico. Outra forma de eluição é por variação do pH, ou seja, duas proteínas podem ter comportamentos distintos no coeficiente de partição ( $\alpha$ ) quando submetidas a variações de pH. Isto implica tempos de retenção diferentes, sendo possível separar as proteínas, às vezes com mais eficiência do que por aumento da força iônica (SCOPES, 1993). A dessorção de proteínas dependentes de vitamina K de uma resina de troca aniônica com adição de íons Ca<sup>2+</sup> é um exemplo prático deste princípio, porém, neste caso, a perturbação da carga superficial não é realizada por mudança de pH e sim pela afinidade ao íon Ca<sup>2+</sup> (YAN, 1991).

## 2.2.2.2. Cromatografia de afinidade

### 2.2.2.2.1. Imunoafinidade e bioespecificidade

A cromatografia de imunoafinidade em geral consiste na imobilização de um anticorpo em uma superfície sólida, cujo antígeno é a proteína alvo. Contudo, em alguns casos, pode ocorrer o inverso: antígeno imobilizado para purificar um anticorpo específico. Podem ser utilizados dois tipos de anticorpos: policlonais ou monoclonais. Os policlonais são produzidos por imunização, com a proteína de interesse geralmente de animais médios ou grandes, como, por exemplo, coelhos, ovelhas e cabras. Usa-se, então, o soro do animal para obtenção do anticorpo policlonal produzido, contudo o soro contém inúmeros anticorpos que podem acarretar em ligações inespecíficas. Os anticorpos monoclonais são produzidos a partir de um único clone selecionado (células de hibridomas, resultantes da fusão de linfócitos B de camundongos imunizados com células de mieloma, que possuem alta capacidade de reprodução). Portanto, esta célula produzirá somente um anticorpo que será imobilizado no suporte sólido, acarretando em maior especificidade.

Um grande problema encontrado na cromatografia de imunoafinidade é a etapa de eluição, pois, geralmente, a interação antígeno-anticorpo é forte e, às vezes, somente condições drásticas são capazes de dissociar o complexo antígeno-anticorpo, o que pode acarretar em desnaturação da proteína de interesse. Os eluentes mais comuns para este tipo de cromatografia são: tampão glicina-HCl com pH entre 2 e 3; uso de uréia ou guanidina-HCl, para romper ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas; sais caotrópicos, como, por exemplo, tiocianatos e brometo de lítio, embora estes possam acarretar em desnaturação, se permanecerem por muito tempo em contato com a proteína (SCOPES, 1993).

Bioespecificidade consiste na interação natural e estrita entre duas substâncias de origem biológica, como por exemplo, enzima e substrato. A purificação de imunoglobulinas com proteína A pode ser um exemplo de cromatografia por bioespecificidade. A proteína A é oriunda da bactéria *Staphylococcus aureus*, podendo ser produzida na forma recombinante, e pode ser imobilizada covalentemente em uma matriz sólida. Esta proteína possui a característica de se ligar à região Fc (região constante) das imunoglobulinas. Assim, a purificação de anticorpos monoclonais com proteína A resulta em alto grau de pureza em uma única etapa. Contudo, assim como os anticorpos, a proteína A está sujeita à degradação, o que pode acarretar em desprendimento da proteína A do matriz durante o processo, gerando queda de

rendimento e contaminando o produto de interesse com proteína A. Após 40 ciclos em geral já é possível observar perda da capacidade adsortiva (SCOPEL, 1993; JIANG *et al.*, 2009).

#### **2.2.2.2.2. Pseudo-afinidade**

A chamada pseudo-afinidade ocorre através da interação da proteína de interesse com moléculas, imobilizadas em um suporte sólido, que possuem algum tipo de afinidade biológica com a mesma. É menos específica do que a imunoafinidade e a bioespecificidade, já que, geralmente, o ligante imobilizado tem interação com uma família de proteínas e não apenas com a proteína de interesse. Apesar disso, obtém-se boa seletividade. Apresenta vantagens em relação à imunoafinidade: em geral a resistência à degradação dos ligantes é maior e o custo é menor. Os ligantes de pseudo-afinidade mais conhecidos são: corantes (ex. o azul de Cibacron), quelatos metálicos (íons metálicos imobilizados), hidroxiapatita e biomacromoléculas (ex. heparina). A eluição neste tipo de cromatografia ocorre por variações de pH, força iônica ou por adição de um agente competidor. Assim como nas demais técnicas cromatográficas, podem-se utilizar braços espaçadores, que consistem em moléculas de cadeia longa imobilizadas na matriz, para expor mais o ligante à proteína de interesse, aumentando, com isso, a capacidade adsortiva do adsorvente. Alguns exemplos de espaçadores são: poliaminas, polipeptídeos, poliéteres e diaminas com extensa cadeia carbônica (CABRAL & AIRES-BARROS, 2003; MORAES *et al.*, 2008).

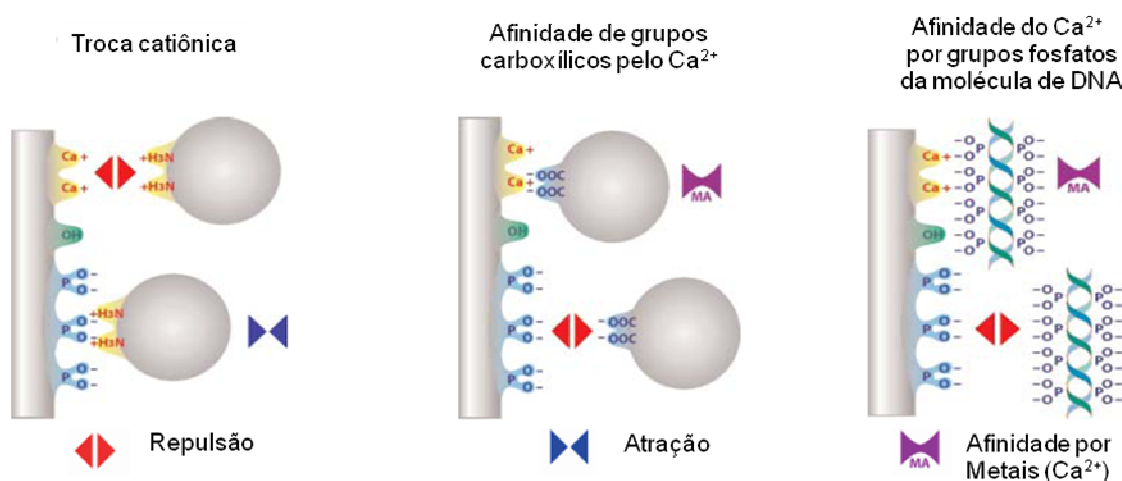
Os tipos de cromatografia de pseudo-afinidade mais utilizados na purificação do fator IX são: heparina, hidroxiapatita e íons metálicos imobilizados. A afinidade por heparina já foi comentada no item 2.1.4. A seguir, serão detalhadas as técnicas cromatográficas baseadas em hidroxiapatita e em íons metálicos imobilizados (IMAC).

##### **2.2.2.2.2.1. Afinidade por hidroxiapatita**

A hidroxiapatita (HA) é um mineral com fórmula molecular  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , porém é mais conhecida pela fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , pelo fato da unidade cristalina hexagonal conter duas entidades. A hidroxiapatita é amplamente utilizada na medicina como revestimento de ossos, por fazer parte da composição natural dos ossos, não havendo problemas de incompatibilidade (BROWN & CONSTANTZ, 1994). Pode,

também, ser utilizada na remoção de metais pesados de efluentes (SUGIYAMA *et al.*, 2009). Além disso, este mineral também é bastante utilizado em etapas cromatográficas para purificação de proteínas (GAGNON *et al.*, 2009a).

A adsorção de proteínas à hidroxiapatita se baseia em dois mecanismos que atuam na adsorção de proteínas: através da afinidade da proteína pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$ , contido na estrutura da HA (maior afinidade por proteínas ácidas), e através de troca catiônica, possibilitada pela carga negativa presente nos íons  $\text{PO}_3^{2-}$  (maior afinidade por proteínas básicas). As hidroxilas presentes na estrutura também contribuem na adsorção de proteínas. Contudo, a afinidade pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$  é de 15 a 60 vezes mais forte do que a interação iônica (GORBUNOFF & TIMASHEFF, 1984). A Figura 2.8 mostra as possíveis interações da hidroxiapatita com proteínas e com moléculas de DNA.



**Figura 2.8.** Tipos de interações das proteínas e de moléculas de DNA com a hidroxiapatita (BIO-RAD, 2010).

Os anticorpos monoclonais (mAb) são exemplos de proteínas que apresentam interação com a hidroxiapatita, sendo que, neste caso, a maioria dos anticorpos possui maior interação por troca catiônica. As vantagens de se utilizar hidroxiapatita na purificação de anticorpos monoclonais é o fato de ser possível eliminar contaminantes como moléculas de DNA, proteína A desprendida de uma etapa cromatográfica anterior, agregados e proteínas da célula hospedeira em geral (GAGNON *et al.*, 2009a). O processo de purificação de anticorpos com resinas de hidroxiapatita pode ser realizado em dois modos: modo *flow through* e modo adsorção e eluição, dependendo do tampão

de equilíbrio utilizado. WENSEL *et al.* (2008), realizaram testes de capacidade adsortiva dinâmica de vários anticorpos na resina de hidroxiapatita e obtiveram valores entre 30 e 40 mg/mL de hidroxiapatita, utilizando o tampão de equilíbrio com baixa concentração de cloreto e de fosfato.

A eluição da proteína na cromatografia com resinas de hidroxiapatita ocorre através da adição de NaCl ou fosfato. O NaCl irá desfavorecer as interações iônicas, enquanto que uma alta concentração de fosfatos irá competir com a proteína pelos íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Contudo, combinações de ambos os sais podem ser otimizadas para melhorar a adsorção ou a eluição de uma determinada proteína (GAGNON *et al.*, 2009a).

Na ausência de fosfatos em solução, íons  $\text{Ca}^{2+}$  formam complexos de coordenação com os grupamentos fosfato presentes na estrutura da hidroxiapatita, possibilitando uma interação secundária da proteína com íons  $\text{Ca}^{2+}$ , o que pode aumentar a capacidade adsortiva de uma proteína com afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (GAGNON *et al.*, 2009b). Entretanto, é necessário avaliar, cuidadosamente, qual a melhor concentração de solução de  $\text{Ca}^{2+}$ , em relação à concentração de fosfatos da fase móvel, pois pode haver precipitação de fosfato de cálcio, prejudicando o sistema cromatográfico.

O fator IX é uma proteína que interage com a hidroxiapatita por afinidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  devido à presença dos resíduos de ácidos glutâmicos  $\gamma$ -carboxilados. Como a presença destes resíduos é exclusiva para moléculas de fator IX funcionais, a cromatografia com resina de hidroxiapatita é uma forma eficiente de selecionar moléculas de fator IX com atividade biológica (HARRISON *et al.*, 1998).

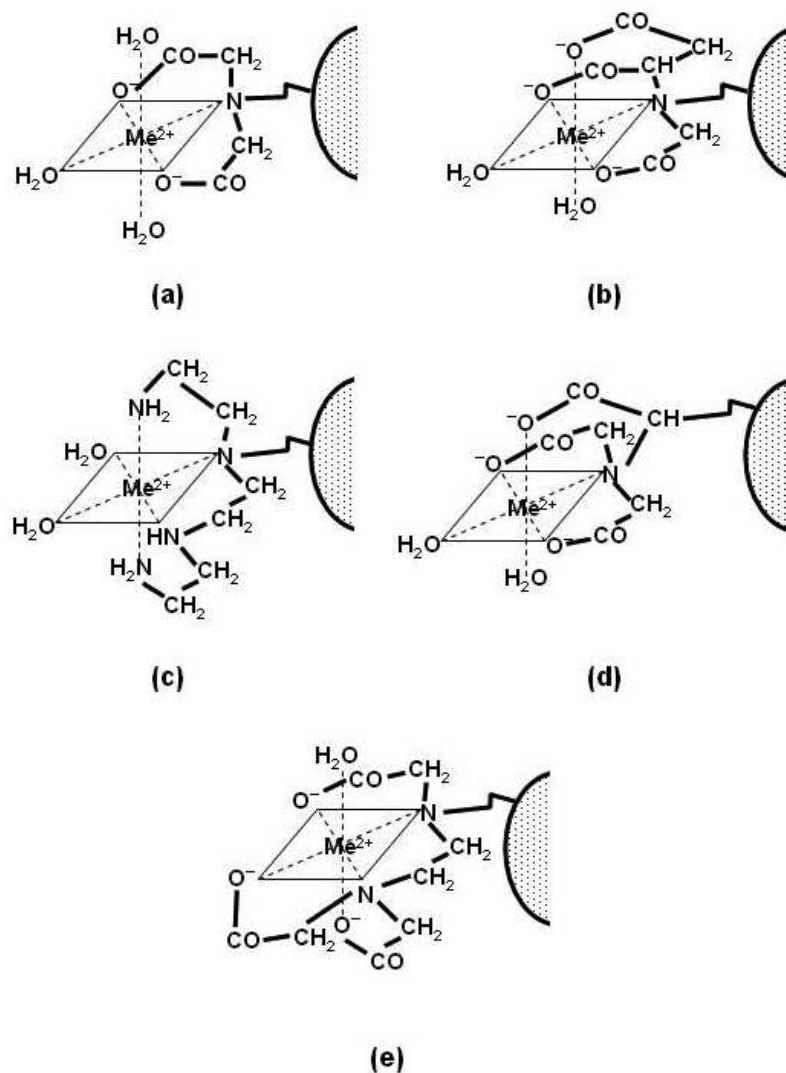
O pH também é um fator que interfere na interação das proteínas com a hidroxiapatita. OGAWA E HIRAIDE (1995) avaliaram o tempo de retenção de 15 proteínas em colunas de hidroxiapatita e verificaram que, em pH 6, a interação foi muito mais pronunciada do que em pH 9, independentemente do ponto isoeletrico de cada proteína.

#### **2.2.2.2.2. Afinidade por íons metálicos**

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, muito conhecida pela sigla IMAC, tem como princípio básico de interação a formação de ligações

coordenadas entre um metal, imobilizado na matriz por um agente quelante, e o nitrogênio aromático dos grupamentos imidazol, indol e com o enxofre do grupamento tiol presentes nos aminoácidos histidina, triptofano e cisteína, respectivamente. Os metais mais utilizados em IMAC são  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Estes metais, na classificação de ácidos duros e moles, são considerados ácidos intermediários, sendo assim capazes de interagir com bases intermediárias, como, por exemplo, átomos de nitrogênio aromático. Contudo, a força de interação, por exemplo, com o nitrogênio do anel imidazólico das histidinas, vai depender do ambiente químico a que os resíduos de histidinas estarão submetidos na estrutura tridimensional da proteína, podendo também ser influenciados pela força iônica e pH do tampão empregado na etapa de equilíbrio. Durante a etapa de adsorção é importante que não haja substâncias que possam reagir com metais, como, por exemplo, citratos. Outras medidas importantes na etapa de adsorção são: utilização de elevada concentração de sal (geralmente concentrações acima de 0,1 M de NaCl), para evitar interações iônicas não desejadas, e pH na faixa de 6 a 8, para evitar a protonação do nitrogênio imidazólico das histidinas, por exemplo. A dessorção pode ser realizada de diferentes formas: através de redução do pH, por adição de um agente competidor (geralmente usa-se imidazol) ou por remoção do metal com EDTA (geralmente utilizada na etapa de regeneração, mas caso a interação metal-proteína seja muito forte a sua utilização é recomendada, porém é preciso remover o metal em uma etapa subsequente). Os agentes quelantes são imobilizados covalentemente ao suporte, que pode ser uma resina, uma membrana ou um monolito, e os mais utilizados são: ácido iminodiacético (IDA), ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) tris-2(aminoetil)amina (TREN), ácido nitrilotriacético (NTA) e tris(carboximetil)etilenodiamina (TED). O mais utilizado é o agente tridentado IDA, já que ele disponibiliza três sítios de coordenação para íons metálicos interagirem com a proteína. Agentes quelantes tetra ou pentadentados são recomendados quando a interação com a proteína é muito forte a ponto de remover o metal do quelato. A Figura 2.9 mostra a estrutura química dos agentes quelantes citados e a Figura 2.10 a ligação coordenada formada entre o metal e o anel imidazólico dos resíduos de histidina (CHARLTON & ZACHARIOU, 2008; BRESOLIN *et al.*, 2009).

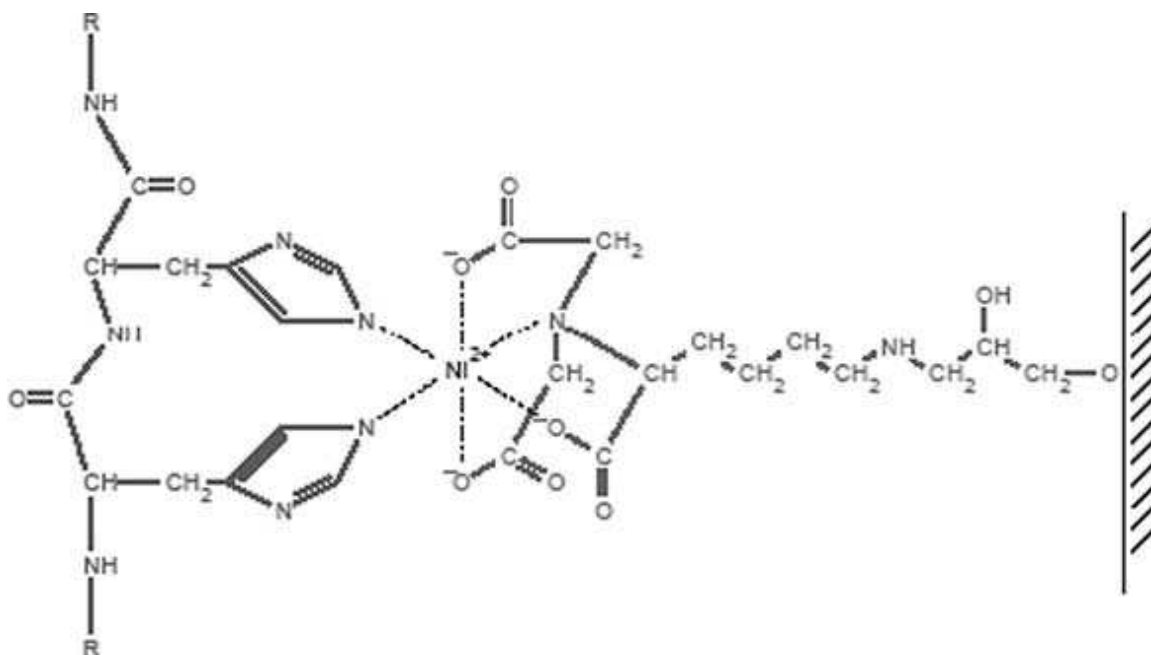




**Figura 2.9.** Estrutura de alguns agentes quelantes complexados com metais. (a) IDA; (b) CM-Asp; (c) TREN; (d) NTA; (e) TED (BRESOLIN *et al.*, 2009).

Em experimentos realizados com o fator IX derivado do plasma, CHANG *et al.* (2006) verificaram que o metal  $\text{Cu}^{2+}$  apresentou maior interação com o fator IX em pH 7, quando foi utilizada uma coluna STREAMLINE IMAC com leito expandido para purificar, em uma única etapa, o fator IX a partir do plasma humano. Contudo, não se obteve um rendimento alto, já que houve perda de fator IX no *flow through*. Provavelmente, houve interferência dos contaminantes da mistura plasmática, pois no processo de purificação do fator IX recombinante (Benefix<sup>®</sup>), a etapa de IMAC é utilizada no fim do processo de purificação, ou seja, em uma etapa de polimento, na

qual o objetivo é eliminar traços de contaminantes (HARRISON *et al.*, 1998; EDWARDS & KIRBY, 1999).



**Figura 2.10.** Complexo de coordenação formado pelo íon metálico Ni<sup>2+</sup> com o anel imidazólico dos resíduos de histidina (CHARLTON & ZACHARIOU, 2008).

A hidroxiapatita também pode ser utilizada como suporte para íons de metais de transição capazes de interagir com proteínas, atuando como uma cromatografia IMAC, ou seja, o cálcio da estrutura da hidroxiapatita pode ser substituído por íons metálicos, como Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, dentre outros. A grande vantagem da utilização da hidroxiapatita para IMAC é o fato da hidroxiapatita ser um material de fácil acesso, baixo custo e com maior estabilidade mecânica do que os materiais utilizados nas tradicionais resinas de IMAC, principalmente quando se pretende empregar a cromatografia IMAC em escala industrial (NORDSTRÖM *et al.*, 1999).

O mecanismo de interação das proteínas com a hidroxiapatita substituída ainda não é completamente conhecido e diferentes métodos de eluição podem ser empregados, dependendo do tipo de interação. Por exemplo, FARINAS *et al.* (2007) avaliaram a interação da mioglobina com a hidroxiapatita substituída com Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, e utilizaram diferentes agentes competidores na etapa de eluição: eluição por adição de fosfato de sódio, de NH<sub>4</sub>Cl, de imidazol e de EDTA. Os autores observaram comportamentos diferentes no rendimento obtido utilizando os métodos de eluição

citados, sendo que a eluição com imidazol foi a menos eficiente. Além disso, dentre os íons metálicos testados, o  $\text{Cu}^{2+}$  demonstrou ter a maior afinidade pela mioglobina, pois esta somente foi eficientemente eluída com adição de EDTA. Este comportamento pode ter sido acarretado pelo fato de adicionalmente existirem interações iônicas da hidroxiapatita com a mioglobina, já que a hidroxiapatita não substituída apresentou pequena interação com a mioglobina (FARINAS *et al.*, 2007).

Ensaio de adsorção utilizando tampões com alta concentração salina podem ser utilizados para inibir interações iônicas, como mencionado anteriormente. LIN *et al.* (2008) realizaram experimentos de adsorção com três proteínas diferentes (epimerase, N-carbamoylase e racemase) em hidroxiapatita modificada através da inserção de íons  $\text{Fe}^{3+}$  na estrutura cristalina, utilizando uma concentração de 0,3 M de NaCl no tampão de equilíbrio, para evitar interações iônicas inespecíficas, sendo, com isso, possível avaliar somente as interações por coordenação do íon  $\text{Fe}^{3+}$  imobilizado com as proteínas. Foi observada diferença na capacidade adsorptiva estática da HA- $\text{Fe}^{3+}$  para as diferentes proteínas, mesmo todas tendo uma cauda com 8 histidinas acopladas. Isto mostra que a conformação da proteína pode influenciar na coordenação do nitrogênio imidazólico das histidinas com os íons metálicos imobilizados (LIN *et al.*, 2008).

### **2.2.2.3. Exclusão molecular**

A cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel consiste na separação de proteínas com base em suas massas molares. A matriz apresenta uma distribuição de tamanho de poros, sendo que as proteínas com maior massa molar percorrem o gel mais rapidamente e aquelas com massa molar pequena percorrem mais lentamente, pois, como são menores, podem penetrar em poros menores, o que resulta em um percurso mais tortuoso e, conseqüentemente, mais lento (GE HEALTHCARE HANDBOOK, 2004).

É possível utilizar a cromatografia de exclusão molecular como técnica analítica, pois com esta técnica é possível obter dados referentes ao tamanho das proteínas ou seu diâmetro hidrodinâmico e referentes à interação entre moléculas idênticas e moléculas diferentes. A escolha do material utilizado neste tipo de cromatografia é um fator importante a ser analisado, dependendo da função da proteína de interesse, pois alguns materiais, como sílica, podem causar ativação de fatores de coagulação, assim como

degradação (principalmente o fator VIII). Materiais com alta hidrofobicidade não são recomendados para este tipo de cromatografia, pois podem causar interações inespecíficas da proteína com a superfície sólida. Os principais materiais disponíveis comercialmente que apresentam superfície hidrofílica são a resina Sepharose<sup>®</sup> 6 (agarose), da empresa GE Healthcare, e a resina Fractogel EMD BioSec (base de polimetacrilato com tentáculos hidrofílicos ligados covalentemente), da empresa Merck. Contudo, a resina Sepharose<sup>®</sup> 6 possui baixa resistência à pressão, o que seria uma desvantagem em relação ao Fractogel (JOSIC *et al.*, 1998).

#### **2.2.2.4. Interação hidrofóbica**

##### **2.2.2.4.1. Princípio de separação**

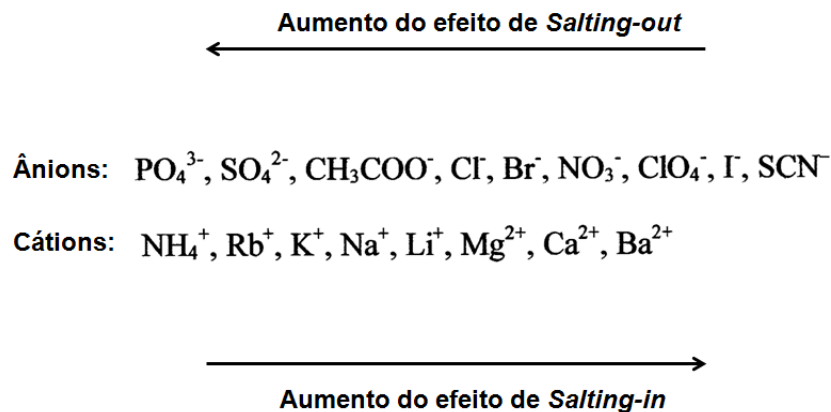
As interações hidrofóbicas intramoleculares são fundamentais para fornecer estabilidade às proteínas, pois contribuem para o dobramento das cadeias polipeptídicas para suas estruturas secundárias e terciárias. Os aminoácidos que mais contribuem para que as interações hidrofóbicas ocorram na estrutura de uma proteína são: os aminoácidos apolares alifáticos (alanina, valina, leucina, isoleucina e metionina) e os aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). O efeito cumulativo das interações de natureza fraca (interações hidrofóbica, interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações iônicas) contribui significativamente para que a proteína exerça sua atividade biológica. Por exemplo, a ligação de um hormônio ao seu receptor proteico, assim como a ligação antígeno-anticorpo, depende do efeito destas interações (NELSON & COX, 2011).

A formação de regiões hidrofóbicas em proteínas depende de alguns fatores intrínsecos à estrutura da proteína, como o número de aminoácidos hidrofóbicos na cadeia primária e a posição destes aminoácidos (interior da molécula ou expostos na superfície). Portanto, devido à variedade de possibilidades proporcionada pelos diferentes aminoácidos existentes, cada proteína terá uma composição hidrofóbica distinta. Isto faz com que seja possível separar proteínas com base nas características hidrofóbicas, explorando as diferentes afinidades das proteínas por ligantes hidrofóbicos imobilizados em matrizes cromatográficas. O conceito fundamental da interação de uma proteína com um ligante hidrofóbico está relacionado com a adsorção preferencial da proteína na resina, visando reduzir sua interação com o solvente. Sua permanência em

fase aquosa levaria a uma orientação das moléculas de água em torno dos resíduos apolares, o que resultaria em uma redução da entropia. Ao adsorver, esses resíduos são liberados do contato com água, o que é favorável do ponto de vista energético (FILHO E MENDIETA-TABOADA, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2001).

Para que a interação ligante hidrofóbico-proteína ocorra, é necessária uma alta concentração de sais, que favoreça o efeito de *salting-out*. Esta terminologia foi utilizada pela primeira vez por Tiselius, que observou que aminoácidos e proteínas são capazes de se ligar a suportes neutros em altas concentrações de fosfatos alcalinos (QUEIROZ *et al.*, 2001; TISELIUS, 1948). O termo *salting-out* refere-se aos sais que provocam precipitação de proteínas quando estão em elevadas concentrações, ou seja, os sais capazes de expulsar as proteínas da solução ou “absorver” moléculas de água, com maior interação íon-água do que água-água (ZANGI *et al.*, 2007). Os cátions e ânions foram organizados em uma série em relação à capacidade de precipitar proteínas, a qual é denominada de série de Hofmeister (QUEIROZ *et al.*, 2001). Portanto, com base nesta série é possível prever a influência de diferentes sais em interações hidrofóbicas entre proteínas e ligantes. A série pode ser visualizada na Figura 2.11.

Sais como  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NaCl}$  são normalmente utilizados em fases móveis para cromatografia de interação hidrofóbica pelo fato de proporcionarem alta força iônica à solução, sendo o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  utilizado com mais frequência (KARLSSON & HIRSH, 2011). Contudo, sais como  $\text{NaSCN}$  e  $\text{CaCl}_2$ , por exemplo, não aumentam a força das interações hidrofóbicas, por aumentarem a solubilidade de proteínas em água, o que é conhecido como efeito *salting-in* (Figura 2.11). Neste caso, a interação água-água é mais forte que a interação íon-água (ZANGI *et al.*, 2007). Estes sais são chamados de caotrópicos por serem substâncias que desorganizam as estruturas tridimensionais de macromoléculas (DANDLIKER *et al.*, 1967). Entretanto, agentes considerados caotrópicos podem favorecer interações hidrofóbicas. YAN (1991) mostrou que a proteína C humana recombinante possui maior afinidade por ligantes hidrofóbicos em presença de baixas concentrações de  $\text{CaCl}_2$ . A proteína não se ligou na resina hidrofóbica utilizando-se apenas uma solução tampão contendo 1 M de  $\text{NaCl}$ , porém somente quando 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  foi adicionado ao tampão. Portanto, a compreensão do mecanismo de interação de proteínas em ligantes hidrofóbicos não é trivial.



**Figura 2.11.** Série liotrópica de Hofmeister (QUEIROZ *et al.*, 2001).

MELANDER *et al.* (1984) foram os primeiros a formularem um mecanismo para a interação hidrofóbica, o qual consiste em supor que o aumento da molaridade do sal na fase móvel ou a mudança para um sal com maior incremento de tensão superficial promove um aumento da tensão superficial, o que aumenta a retenção de proteínas por interação hidrofóbica (MELANDER *et al.*, 1984).

O modelo de hidratação, apresentado por ARAKAWA (1986), refere-se à interação preferencial de proteínas com sais em solução e o efeito do sal na solubilidade de proteínas. Por exemplo, o sal  $\text{MgCl}_2$ , apesar de aumentar a tensão superficial da água, não promove aumento na interação entre a proteína e o ligante hidrofóbico, pois a proteína é preferencialmente hidratada (ARAKAWA, 1986; ARAKAWA & TIMASHEFF, 1984). Isto mostrou que o modelo de MELANDER *et al.* (1984) não previa determinados casos. ARAKAWA & TIMASHEFF (1984) explicaram que a ligação da superfície hidrofóbica de proteínas com ligantes hidrofóbicos é termodinamicamente estável em presença de alta concentração salina, já que a presença de sal aumenta a energia livre das proteínas (quanto maior a superfície hidrofóbica, maior o incremento da energia livre), tendendo a uma instabilidade da proteína. Quando um ligante hidrofóbico é introduzido no meio, as proteínas tendem a se ligar ao ligante hidrofóbico buscando a estabilidade, ou seja, o incremento da energia livre é minimizado em presença do ligante hidrofóbico (ARAKAWA & TIMASHEFF, 1984). Por outro lado, alguns sais como  $\text{MgCl}_2$  se ligam a proteínas tornando a forma livre da proteína termodinamicamente mais estável mesmo em presença de um ligante hidrofóbico. JENNISSEN (1986) sugeriu que a interação de uma proteína com um

ligante hidrofóbico é uma reação com múltiplos estágios e que a etapa limitante seria a lenta modificação conformacional ou reorientação da proteína na superfície hidrofóbica (JENNISSEN, 1986).

ROETTGER *et al.* (1989) propuseram que sais anti-caotrópicos (que promovem o *salting-out*) têm uma preferência negativa pela interação com as proteínas e com o ligante hidrofóbico, promovendo a adsorção da proteína. No entanto, sais caotrópicos (que promovem o *salting-in*) têm maior preferência pelas proteínas e pelo ligante hidrofóbico, o que acarreta em dessorção da proteína. A proposta confirmou que a interação hidrofóbica é dependente da concentração salina, sendo que o efeito é dependente do tipo de sal utilizado, ou seja, altas concentrações de sais caotrópicos favorecem a dessorção, enquanto que altas concentrações de sais anti-caotrópicos favorecem uma maior adsorção (ROETTGER *et al.*, 1989).

GENG *et al.* (1990) sugeriram que a alta concentração de sal atua como um diluente que afeta a concentração molar da água e muda a conformação das proteínas, a força das interações hidrofóbicas e o número de moléculas de água em torno de proteínas hidratadas (GENG *et al.*, 1990).

O mecanismo das interações hidrofóbicas não é simples de prever. OSCARSSON (1995) explicou que a conformação das proteínas está constantemente em modificação e que estas modificações são influenciadas por diferentes adsorventes, certos tipos de sais, além da concentração dos mesmos, implicando na exposição dos sítios hidrofóbicos das proteínas. Portanto, se estes sítios expostos forem complementares ao ligante, interações favoráveis tendem a ocorrer (OSCARSSON, 1995).

Muitos fatores podem favorecer ou desfavorecer a interação hidrofóbica de proteínas. O aumento do pH faz com que a maioria das proteínas adquira carga negativa, sendo que em condições levemente alcalinas as proteínas tornam-se mais hidrofílicas, desfavorecendo a interação com o ligante. O tipo de ligante e a densidade do mesmo no adsorvente também interferem no desempenho de uma cromatografia por interação hidrofóbica. O aumento da cadeia de n-alcanos imobilizados em matrizes provoca acréscimo no potencial da interação hidrofóbica e o ligante fenil apresenta o incremento de ligações aromáticas que, somadas às interações hidrofóbicas, aumentam

o desempenho do processo em alguns casos. O tipo de matriz também pode influenciar na eficiência do processo devido à diferença de porosidade e ao efeito do transporte de massa difusivo (KUCZEWSKI *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2008a; CHEN *et al.*, 2008b FILHO E MENDIETA-TABOADA, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2001).

#### **2.2.2.4.2. Aplicações da interação hidrofóbica**

A interação hidrofóbica pode ser utilizada em diferentes etapas de purificação de proteínas: na captura ou no polimento. Contudo, geralmente é utilizada como etapa de polimento. Em etapas de captura, normalmente vem precedida de uma etapa de precipitação devido à alta concentração de sais necessária para adsorver as proteínas e algumas proteínas tendem a precipitar mais facilmente (STRACKE *et al.*, 1992). Em algumas situações a interação hidrofóbica vem precedida de uma etapa de troca aniônica, sendo adicionada uma quantidade de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ao eluído (concentração final de 0,5 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  com o objetivo de alcançar as condições ideais para a adsorção na coluna hidrofóbica *Phenyl Sepharose*<sup>®</sup>, sem a necessidade de uma diafiltração. Este foi o caso da purificação de um anticorpo monoclonal anti-CD4 (GUSE *et al.*, 1994).

A cromatografia por interação hidrofóbica também é utilizada na purificação de plasmídeos (pDNA). Neste caso a intenção é separar o pDNA de moléculas de DNA genômico, RNA, oligonucleotídeos e endotoxinas, ou seja, contaminantes bacterianos. A utilização de ligantes hidrofóbicos está vinculada ao fato que moléculas de pDNA, por apresentarem dupla fita, possuem as bases hidrofóbicas protegidas no interior da molécula, não expondo as mesmas ao ambiente. Portanto, possuem uma interação mínima com matrizes hidrofóbicas enquanto que os contaminantes são fortemente adsorvidos por apresentarem regiões hidrofóbicas expostas, já que o DNA genômico, por exemplo, possui fita simples. Com isso, o pDNA é recuperado no efluente, em modo *flow-through* (DIOGO *et al.*, 2005).

HUSI & WALKINSHAW (1999) avaliaram a eficiência de resinas de interação hidrofóbica para purificação de algumas proteínas do plasma, como fator IX, fator X e protrombina. Dentre os ligantes hidrofóbicos avaliados, a melhor separação ocorreu com o grupo fenil imobilizado em matriz de agarose. Contudo, a combinação com outros métodos, como, por exemplo, cromatografia de troca iônica e afinidade, são necessárias para obtenção de altas purezas (HUSI & WALKINSHAW, 1999). Contudo,



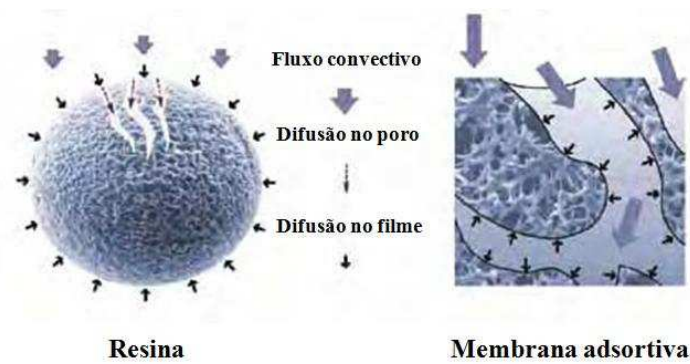
não há relatos da utilização da interação hidrofóbica na a purificação do FIXr, sendo este um dos objetivos deste trabalho.

### **2.2.3. Membranas cromatográficas**

As membranas adsortivas surgiram como uma alternativa às convencionais resinas cromatográficas, por apresentarem uma série de vantagens. A principal vantagem consiste no fato de que, em membranas, o transporte através dos poros é convectivo, o que possibilita maior fluxo do que em colunas empacotadas com resinas, sem um aumento considerável de pressão. A Figura 2.14 mostra uma comparação entre o fluxo nos poros de uma resina e de uma membrana adsortiva, indicando a ausência da difusão nos poros como etapa lenta e limitante. Com a utilização de membranas, o tempo de residência é reduzido, acarretando em uma eluição mais rápida, já que o acesso aos poros é facilitado. Geralmente, a utilização de membranas reduz o tempo de processo em cerca de 10 vezes em comparação ao uso de resinas empacotadas, aumentando a produtividade do processo (CHARCOSSET, 1998). A grande eficiência das membranas é devida à organização dos poros em uma fina camada polimérica rígida (ZOU *et al.*, 2001). A utilização de membranas adsortivas é proposta como uma alternativa eficiente em etapas de purificação de proteínas terapêuticas, pois pode acarretar em economia de custos, já que reduz o tempo de processo, diminui a utilização de consumíveis (tampões, por exemplo) e é de fácil escalonamento, pelo fato de os sistemas serem modulares (REIS & ZYDNEY, 2007). Contudo, apesar das vantagens das membranas adsortivas, estas não são amplamente utilizadas em processos comerciais, pois as membranas possuem uma baixa capacidade dinâmica adsortiva em comparação com resinas, sendo esta baixa capacidade adsortiva atribuída à baixa área superficial por unidade de volume das membranas. Portanto, atualmente, o desenvolvimento de membranas com alta capacidade adsortiva é um atrativo campo da ciência (BHUT *et al.*, 2010).

Em relação ao custo de um processo de purificação de proteínas com membranas adsortivas, não basta considerar o fato de a membrana propiciar maior produtividade do que a resina para afirmar que o custo de produção será menor com a utilização da membrana no processo. Devem-se avaliar alguns parâmetros antes de optar entre uma ou outra. Neste contexto, HUNT *et al* (2001) realizaram uma análise econômica, com

base em um modelo matemático, para comparar o custo final do processo de purificação de BSA, utilizando-se a cromatografia de imunoafinidade com uma membrana e uma resina. Para isto, os autores levaram em consideração, além dos custos de colunas cromatográficas e módulos de membranas, a densidade de ligante imobilizada em cada suporte e a capacidade dinâmica adsortiva em ambos os casos. Também foram considerados na análise variáveis como: capacidade anual de processamento em litros, número de ciclos (vida útil) de cada material e quantidade de anticorpo usada na imobilização. Depois de efetuadas as análises, os autores concluíram que o processo utilizando membranas proporcionou um custo 28% menor do que o mesmo processo utilizando uma resina cromatográfica (HUNT *et al.*, 2001).



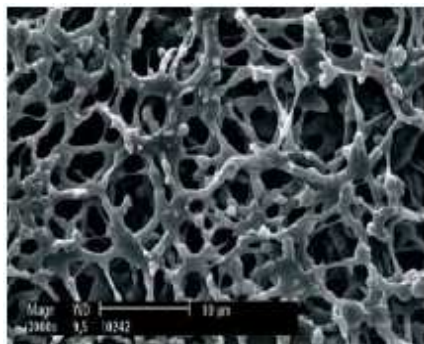
**Figura 2.14** Comparação do transporte do fluido no interior dos poros de uma membrana adsortiva e de uma resina (FRAUD *et al.*, 2009).

### 2.2.3.1. Características dos materiais utilizados na fabricação de membranas adsortivas

Muitos polímeros podem ser utilizados para fabricar membranas adsortivas, contudo estas devem possuir algumas propriedades específicas. É fundamental que as membranas produzidas sejam microporosas. As membranas adsortivas encontradas no mercado possuem tamanho de poro de 0,8  $\mu\text{m}$  (Mustang Q – Pall Membranes) a mais de 3  $\mu\text{m}$  (membranas adsortivas produzidas pela Sartorius). As membranas devem ser produzidas com materiais hidrofílicos e neutros para evitar interações não específicas, pois muitas proteínas são capazes de interagir com materiais hidrofóbicos, o que acarreta perda de rendimento caso a proteína alvo tenha superfícies hidrofóbicas em sua estrutura. É importante que os materiais poliméricos tenham grupos funcionais que

permitam a imobilização de ligantes em alta densidade, por vários tipos de reações. Os polímeros devem ser quimicamente estáveis, pois a membrana entra em contato com diferentes tampões durante as etapas de equilíbrio, lavagem, eluição, regeneração e sanitização, sendo que, ao longo de todas estas etapas, ocorre uma grande variação do pH. As membranas adsortivas precisam ter resistência mecânica e à alta temperatura, pois devem ser capazes de resistir à pressão transmembranar e à esterilização sob altas temperaturas.

A Figura 2.15 mostra uma micrografia eletrônica de varredura de uma membrana de celulose regenerada produzida pela empresa Sartorius, a membrana Sartobind<sup>®</sup> Phenyl. Não há muitos trabalhos na literatura descrevendo a utilização desta membrana, uma vez que se trata de um produto relativamente recente, disponibilizado comercialmente no final de 2009. Um deles compara a eficiência desta membrana, em uma etapa de polimento do processo de purificação de um anticorpo monoclonal, com a resina Toyopearl PPG-600M, obtendo-se resultados comparáveis em rendimento, remoção de agregados e proteínas da célula hospedeira, porém o processo com a membrana foi seis vezes mais rápido, compensando o fato da resina ter o dobro da capacidade (KUCZEWSKI *et al.*, 2010). Como o ligante fenil havia sido previamente avaliado com sucesso na purificação do FIX derivado do plasma (HUSI & WALKINSHAW, 1999) e o desempenho desta membrana ainda não foi muito explorado, este trabalho tem como um dos objetivos avaliar o desempenho da membrana Sartobind<sup>®</sup> Phenyl no processo de purificação do FIX recombinante produzido em células CHO, agregando importantes informações à literatura.



**Figura 2.15.** Micrografia eletrônica de varredura da membrana Sartobind<sup>®</sup> Phenyl (SARTORIUS STEDIM BIOTECH, 2009).

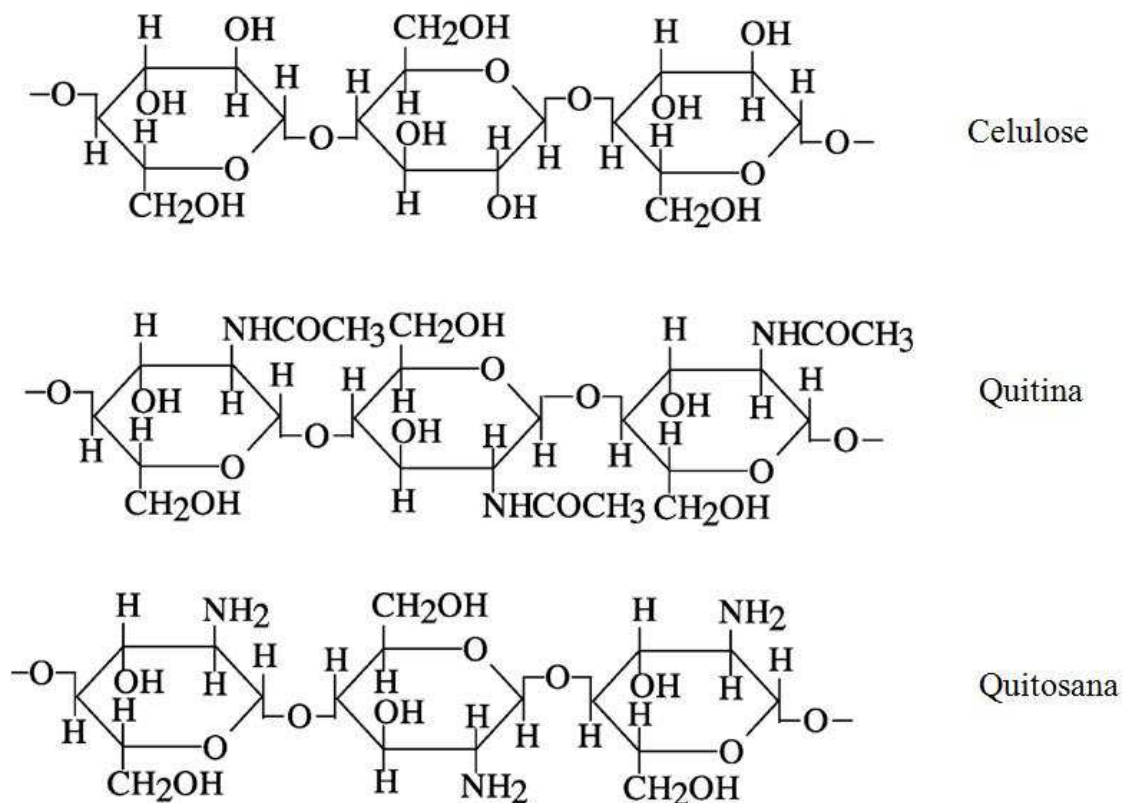
A preparação de uma membrana adsortiva envolve três etapas sequenciais: primeiro, a preparação da matriz polimérica ou inorgânica; segundo, a ativação da matriz polimérica; e, por último, a imobilização covalente do ligante cromatográfico na membrana ativada. A matriz de uma membrana adsortiva pode ser preparada com materiais poliméricos ou inorgânicos. Contudo, a maior parte das membranas adsortivas, encontradas no mercado e em pesquisas, são de materiais poliméricos puros ou compósitos. Dentre os polímeros mais utilizados na fabricação de membranas adsortivas estão: polissacarídeos (celulose, quitosana e quitina), poliamida, polisulfona, polietileno, polipropileno, policarbonatos, poli(álcool vinílico) e polímeros monolíticos, como o poli(glicidil metacrilato-co-etileno dimetacrilato). Todos estes materiais estão disponíveis comercialmente (ZOU *et al.*, 2001; KLEIN 2000; PABBY *et al.*, 2009).

As membranas de celulose e derivados são bastante empregadas. A celulose é um polissacarídeo formado pela união de moléculas de  $\beta$ -glicose através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Consiste em um material fibroso e uniforme. Entretanto, a celulose nativa não é muito utilizada para a purificação de proteínas, pois sofre degradação em soluções alcalinas e o número de grupos reativos ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) em sua estrutura é baixo em relação à agarose, material comumente utilizado como resina cromatográfica (ZOU *et al.*, 2001). A celulose regenerada é a celulose modificada quimicamente com o objetivo de aumentar o caráter hidrofílico e o número de hidroxilas reativas disponíveis para a imobilização de ligantes. Este tipo de membrana é comercializado pela empresa Sartorius e pode ser obtido por inversão de fase. Alguns tratamentos podem ser realizados para melhorar sua resistência mecânica e aumentar o tamanho dos poros das membranas, como a utilização de  $\text{NaBH}_4$  para obter membranas de celulose macroporosas (GUO *et al.*, 1994). A tendência a formar poros pequenos é devido ao inchamento limitado da celulose nativa que absorve pouca água em sua estrutura (PABBY *et al.*, 2009). Membranas de celulose regenerada com ligações cruzadas (tipo de ligação em que o polímero reage com moléculas lineares para formar uma estrutura tridimensional com alta massa molar), ou seja, reticuladas, podem ser preparadas após a reação com 1-cloro-2,3-epoxipropano a  $50^\circ\text{C}$  por 3 horas (ZOU *et al.*, 2001). O reagente bifuncional utilizado para cruzar as ligações da celulose aumenta a resistência química do material (PABBY *et al.*, 2009). GERSTNER *et al.* (1992) prepararam uma membrana de celulose utilizando grupamentos dietilaminoetil, obtendo com isso uma

membrana de troca aniônica com excelente capacidade adsortiva, que foi utilizada para adsorção de citocromos e lisozimas.

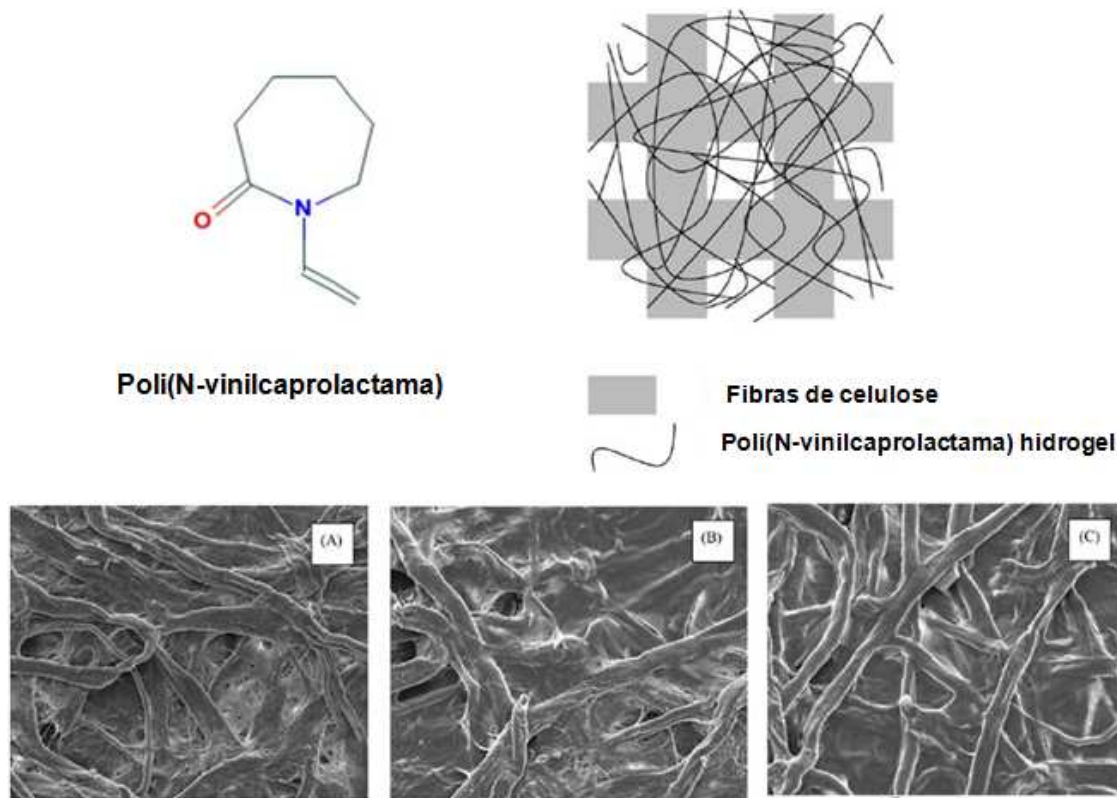
A celulose é uma macromolécula muito consistente e compacta, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos. Sendo assim, os métodos tradicionais de dissolução da celulose são complexos, algumas vezes caros e usam solventes tóxicos. Buscando contornar este problema, em uma publicação recente, BARROSO *et al.* (2010) obtiveram sucesso ao utilizar pela primeira vez um líquido iônico (sal orgânico com baixo ponto de fusão e praticamente zero de pressão de vapor, que possui excelente propriedade de dissolução para a maioria dos compostos orgânicos e inorgânicos), denominado de cloreto de 1-butil-3-metilimidazol ([BMIM][Cl]), para solubilizar a celulose durante o procedimento de preparação da membrana. A utilização de líquidos iônicos desponta, portanto, como uma opção ambientalmente vantajosa para a produção de membranas de celulose (BARROSO *et al.*, 2010).

A quitosana, um derivado da celulose sintetizado através da desacetilação da quitina (poli(2-amino-2-deoxi-D-glicose)), polissacarídeo natural encontrado em crustáceos, também é utilizada para fabricar membranas, pois consiste em um material com estrutura porosa controlada, boas propriedades mecânicas, hidrofiliidade, biocompatibilidade e com grupamentos reativos (ZENG *et al.*, 1998). A Figura 2.16 mostra a estrutura química da celulose, da quitina e da quitosana.



**Figura 2.16.** Estruturas químicas da celulose, quitina e quitosana (ZOU *et al.*, 2001).

Na tentativa de se produzir uma membrana de baixo custo para separação de proteínas, MAH e GHOSH (2010) desenvolveram recentemente uma membrana de celulose, ou seja, de papel de filtro, capaz de purificar imunoglobulina humana de um meio condicionado de células CHO por interação hidrofóbica, obtendo purezas entre 91 e 97% e rendimentos de 89 a 96%. Para conseguir uma membrana com esta propriedade, os autores reagiram discos de celulose com o hidrogel poli (N-vinilcaprolactama), formando uma membrana compósita com alta permeabilidade hidráulica. Contudo, o material possui tendência à formação de incrustações após alguns ciclos, porém, segundo os autores, este problema seria amenizado pelo fato de ser uma membrana de baixo custo. A Figura 2.17 mostra a estrutura do poli(N-vinilcaprolactama), abreviado por pVCLM, e sua interação com a celulose, apresentada em forma de desenho e por microscopia eletrônica de varredura (MAH & GHOSH, 2010).



**Figura 2.17.** Estrutura da membrana compósita formada por celulose e o hidrogel poli(N-vinilcaprolactama). Na parte superior, desenho esquemático do recobrimento das fibras de celulose pelo pVCLM. Na parte inferior, imagens de microscopia eletrônica de varredura de (A) celulose pura, (B) celulose com 5,51% de pVCLM e (C) celulose com 8,96% de pVCLM (adaptado de MAH & GHOSH, 2010).

As poliamidas, também conhecidas como nylon, possuem alta estabilidade mecânica e química, facilidade de processamento e absorção de umidade, por isso são materiais de grande interesse da indústria de membranas. As poliamidas podem ser produzidas de três formas, sendo elas: policondensação de diaminas e ácidos carboxílicos, policondensação de ácidos carboxílicos  $\omega$ -aminos e polimerização de amidas cíclicas. Quanto maior a quantidade de grupos metileno na cadeia linear das poliamidas, menor a absorção de água pela estrutura, pois, aumentando a cadeia linear, o efeito das forças do tipo ligação de hidrogênio é reduzido (BISPO, 2008). Portanto, para produção de membranas adsorptivas utilizadas na purificação de proteínas, as poliamidas devem ser produzidas buscando o aumento da hidrofiliicidade. Para contornar este problema, o número de grupos reativos ( $-NH_2$ ) pode ser aumentado por reações de hidrólise do nylon, porém grupos carboxila residuais devem ser eliminados

para prevenir interações eletrostáticas indesejáveis entre as proteínas e a membrana. Geralmente, a quantidade de grupos amino presentes na estrutura da poliamida é de pelo menos 20  $\mu\text{M/g}$  de membrana (ZOU *et al.*, 2001). No entanto, a melhor forma de aumentar os grupos reativos das membranas de poliamidas é preparar membranas compósitas, como, por exemplo, reagindo o nylon 6,6 com hidroxietilcelulose em presença de bisoxirano ou formaldeído (BEESKOW *et al.*, 1995).

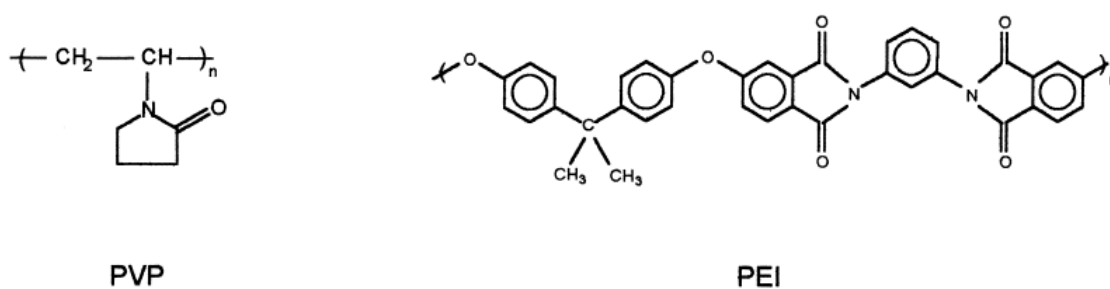
O polietileno e o polipropileno possuem a hidrofobicidade como característica marcante, além de não possuírem grupos funcionais para reagir com ligantes. Mesmo assim, algumas membranas adsortivas são produzidas tendo como base estes polímeros. Isto ocorre pelo fato de estes materiais possuírem uma maior estabilidade térmica e maior resistência a agentes químicos e biológicos em relação a polímeros hidrofílicos por natureza, como o poli(álcool vinílico) e o acetato de celulose (ZOU *et al.*, 2001). Contudo, existem técnicas que tornam estes materiais susceptíveis à ativação para geração de grupos reativos. HU *et al.* (2009) utilizaram enxertos hidrofílicos de poli(2-hidroxetil metacrilato) para ativar a estrutura polimérica da membrana de polipropileno. Para efetuar este procedimento, os autores utilizaram indução por ultravioleta em presença de benzofenona e  $\text{FeCl}_3$ . Por fim, sacarídeos acetilados foram ligados para posterior purificação de lectinas (classe de proteínas que se ligam a carboidratos, utilizadas na identificação de glicoproteínas e polissacarídeos), como, por exemplo, a concanavalina A (HU *et al.*, 2009).

A polisulfona e a polietersulfona são materiais com alta resistência, possibilitando a formação de membranas termicamente, quimicamente e biologicamente estáveis. Entretanto, são polímeros altamente hidrofóbicos. Além disso, não possuem grupamentos funcionais convenientes para ativação e imobilização de ligantes. Contudo, muitos métodos podem ser utilizados para contornar o problema da escassez de grupos funcionais e da hidrofobicidade, como por exemplo: misturar a polietersulfona ou a polisulfona com polímeros hidrofílicos, revestir a superfície para torná-la hidrofílica ou introduzir grupamentos hidrofílicos na cadeia polimérica (PABBY *et al.*, 2009). KLEIN *et al.* (1994) obtiveram êxito ao modificar uma membrana microporosa de polisulfona reagindo grupos fenóis terminais com EGDGE (Etileno glicol diglicidil éter) para produzir grupos epóxi, que posteriormente foram utilizados para ligar covalentemente hidroxietilcelulose na superfície da membrana.



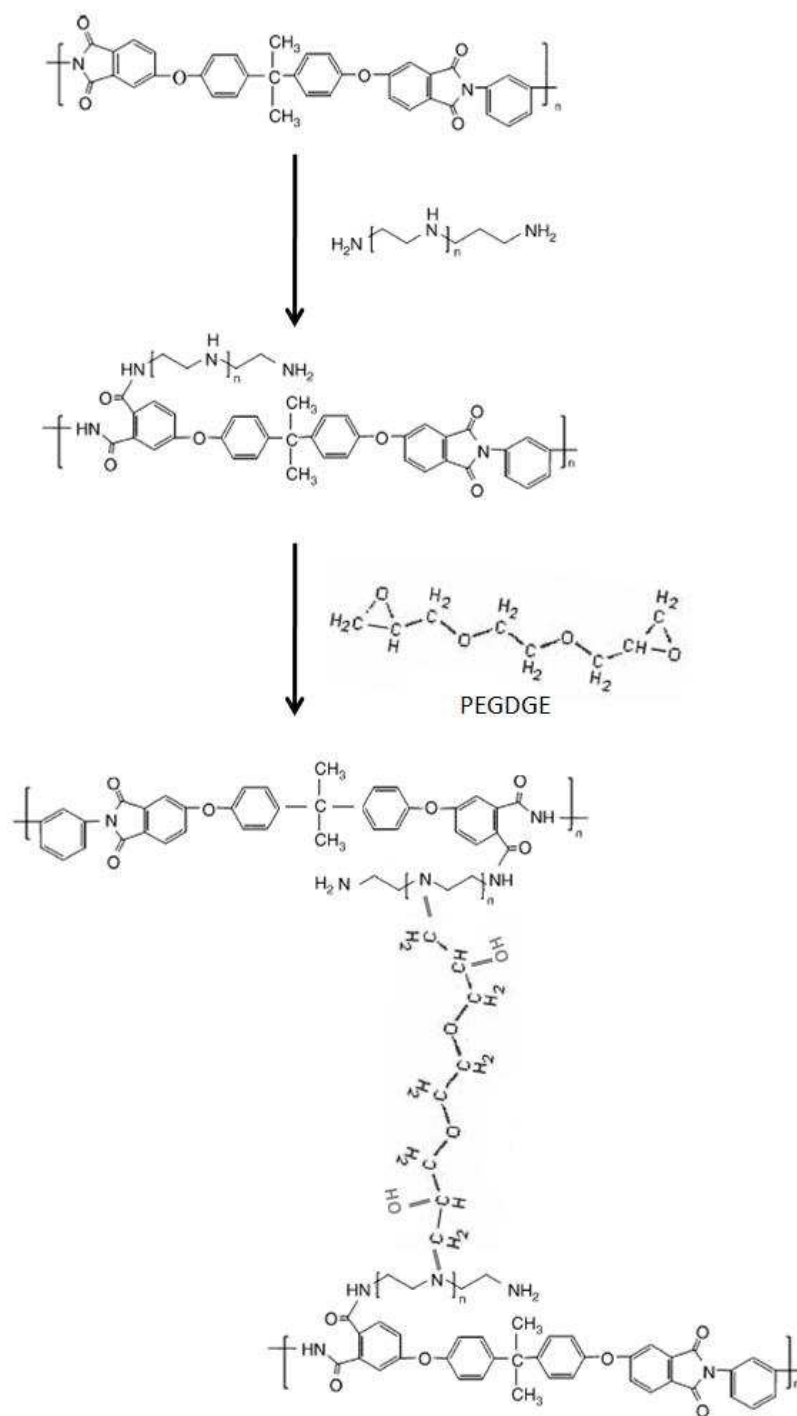
Após isto, foi possível criar grupos amino terminais reagindo hexanodiamina com a hidroxietilcelulose. Ao final, proteína A foi imobilizada na membrana através dos grupos amino terminais (KLEIN *et al.*, 1994). Apesar da necessidade de realizar tratamentos para viabilizar sua utilização, existem membranas de polietersulfona comercializadas pela empresa Pall Corporation, que são pré-ativadas com grupamentos aldeído na superfície, denominadas de Ultrabind<sup>®</sup> U450. Esta membrana foi utilizada para purificar imunoglobulina murina utilizando um reagente sintético que mimetiza a proteína A, denominado de D-PAM, *Protein A mimetic*, no qual todos os aminoácidos têm configuração enantiomérica D, deslocando a luz polarizada para a direita (CASTILHO *et al.*, 2002; BOI *et al.*, 2008).

A polieterimida (PEI) possui excelentes propriedades mecânicas e alta estabilidade térmica. Contudo, consiste em um material com alta hidrofobicidade. Portanto, a polieterimida pura não é recomendada para a fabricação de membranas adsorptivas, já que a quantidade de interações não específicas seria alta. Para usufruir das propriedades da polieterimida como membrana adsorptiva para a purificação de proteínas, pode-se realizar a copolimerização com monômeros hidrofílicos ou reagir a PEI com aditivos hidrofílicos. A polivinilpirrolidona (PVP) é um polímero muito utilizado para produzir membranas, já que possui características hidrofílicas, é miscível com vários polímeros e possui baixo custo (ALBRECHT *et al.*, 2007). A Figura 2.18 mostra a estrutura química das moléculas de PEI e PVP (CRANFORD *et al.*, 1999).



**Figura 2.18.** Estruturas químicas das moléculas de poli(vinil pirrolidona), PVP, e poli(eterimida), PEI (CRANFORD *et al.*, 1999).

Para ser utilizada como membrana adsortiva, é necessário realizar tratamentos químicos para sua ativação e produzir membranas com porosidade elevada. Em um trabalho realizado por SANTOSO *et al.* (2003), foi comprovado que o tratamento da membrana de PEI com dietilenotriamina (DETA) causa alterações nas propriedades da membrana, que a funcionalizam e aumentam os poros por degradação da cadeia polimérica. Contudo, os autores não introduziram nenhum ligante de afinidade para que a capacidade e a eficiência do material como adsorvente para proteína fosse avaliada (SANTOSO *et al.*, 2003). ALBRECHT *et al.* (2006) modificaram a membrana de PEI através de ligações covalentes com poli(etileno imina) para produzir membranas que podem ser utilizadas para aplicações biomédicas, já que as moléculas de poli(etileno imina) possuem grupamentos amina disponíveis para a realização de diversas reações, como por exemplo formação de bases de Schiff com aldeídos. A reação da poli(etileno imina) com a PEI é realizada através do ataque nucleofílico do grupo amina da molécula de poli(etileno imina) ao grupo imida da molécula de PEI. Um tratamento com poli(etileno glicol) diglicidil éter (PEGDGE) foi realizado para estabilizar as cadeias poliméricas de poli(etileno imina) e fortalecer a rede através de ligações cruzadas entre as cadeias de poli(etileno imina). A reação dos grupos epóxi do PEGDGE com grupos amina da molécula de poli(etileno imina) pode ser estendida com o aumento da temperatura, porém isto acarreta em redução da permeabilidade hidráulica do material, pois ocorre uma pequena redução da porosidade da membrana, o que não é interessante para membranas adsortivas. A Figura 2.19 mostra um esquema da reação de poli(etileno imina) com a membrana de PEI e posterior reticulação através da reação das moléculas de poli(etileno imina) com o PEGDGE (ALBRECHT *et al.*, 2006).



**Figura 2.19.** Reação da poli(eterimida) com poli(etileno imina) e PEGDGE, formando ligações cruzadas (Baseado em ALBRECHT *et al.*, 2006).





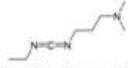
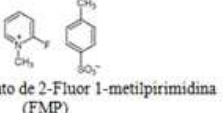

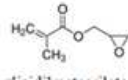
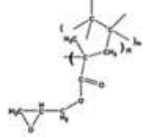
A utilização da membrana de PEI/PVP para purificação de proteínas ainda é pouco explorada em pesquisas. Em estudos preliminares realizados pelo grupo de pesquisa anteriormente, a membrana compósita formada por PEI/PVP foi ativada com poli(etileno imina) e, em seguida, a heparina foi imobilizada na matriz polimérica. Foi

verificado qualitativamente, através de um imunoensaio (*slot blot*), que esta membrana era capaz de adsorver o fator IX (MAZIN *et al.*, 2009). Contudo, estudos quantitativos e mais detalhados são necessários para consolidar o potencial desta membrana em relação à purificação do fator IX.

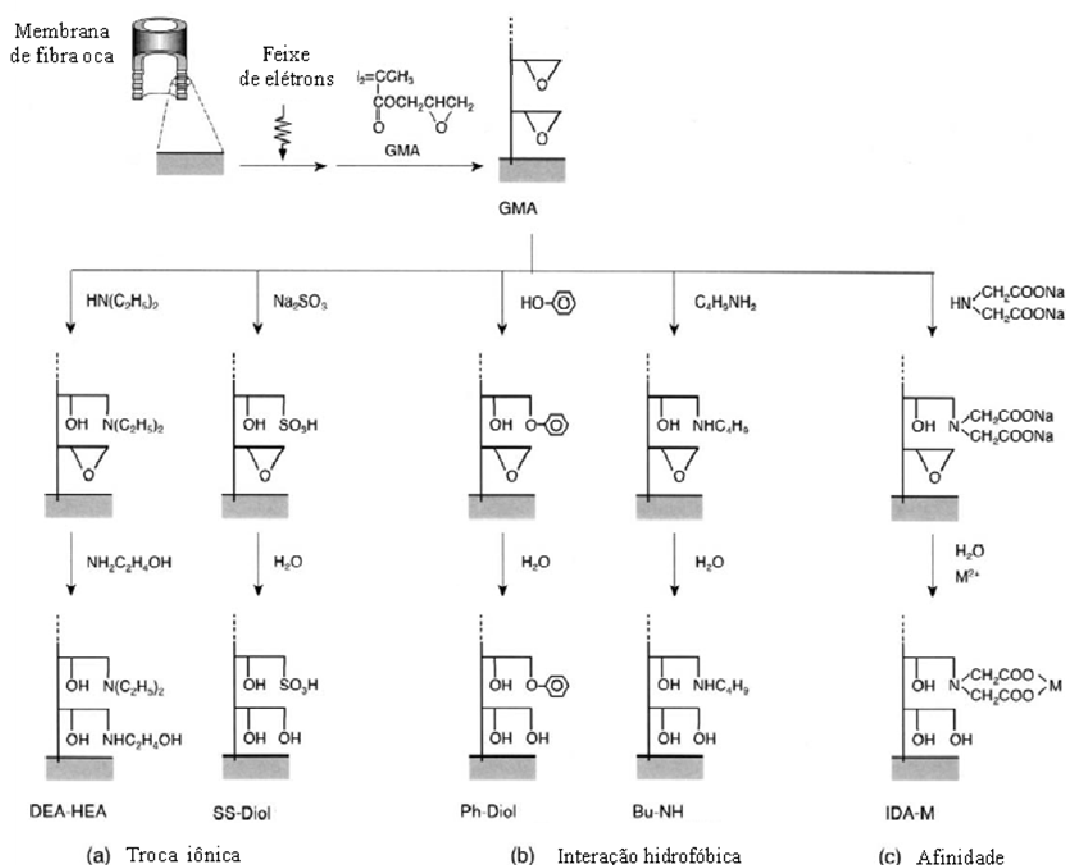
### 2.2.3.2. Métodos de ativação e imobilização de ligantes

A maior parte dos materiais poliméricos utilizados para fabricar membranas adsorptivas possui poucos ou não possui grupos funcionais disponíveis para reagir com o ligante de interesse. Por este motivo, vários métodos químicos foram desenvolvidos para criar ou aumentar a quantidade de grupamentos reativos na superfície polimérica. Os métodos mais conhecidos foram descritos por KLEIN (2000) e ZOU *et al.* (2001) em dois trabalhos de revisão. Alguns destes métodos estão descritos na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Exemplos de alguns métodos de ativação de membranas (baseado em KLEIN, 2000; ZOU *et al.*, 2001).

Método de ativação	Reagentes	Grupamentos da matriz polimérica que são modificados	Grupamentos que reagem com o ligante
Brometo de cianogênio	$\text{N}\equiv\text{C}-\text{Br}$ brometo de cianogênio	-OH	$[\text{R}-\text{O}-\text{C}\equiv\text{N}]$ (acoplamento do ligante via amina primária formando isouréia)
Epóxido	 1,4-butanodiol diglicidil eter	-OH	
Oxidação com periodatos	 periodato de sódio	cis-hidroxi vicinais	-COH
Compostos triazínicos	 2-amino-4,6 -dicloro-s-triazina	-OH de polissacarídeos	-NH <sub>2</sub> (substituição nucleofílica para ligação de corantes)
Ligação via carboiimidas	 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carboiimida (EDC)	-NH <sub>2</sub> (catalisa a formação de amidas)	-COO-EDC (ativa a carboxila do ligante)
Modificação de hidroxilas de carboidratos com FMP	 p-toluenosulfonato de 2-Fluor 1-metilpirimidina (FMP)	-OH de polissacarídeos	
Enxerto de polimeros via irradiação	 glicidilmetacrilato	formação de radicais livres	

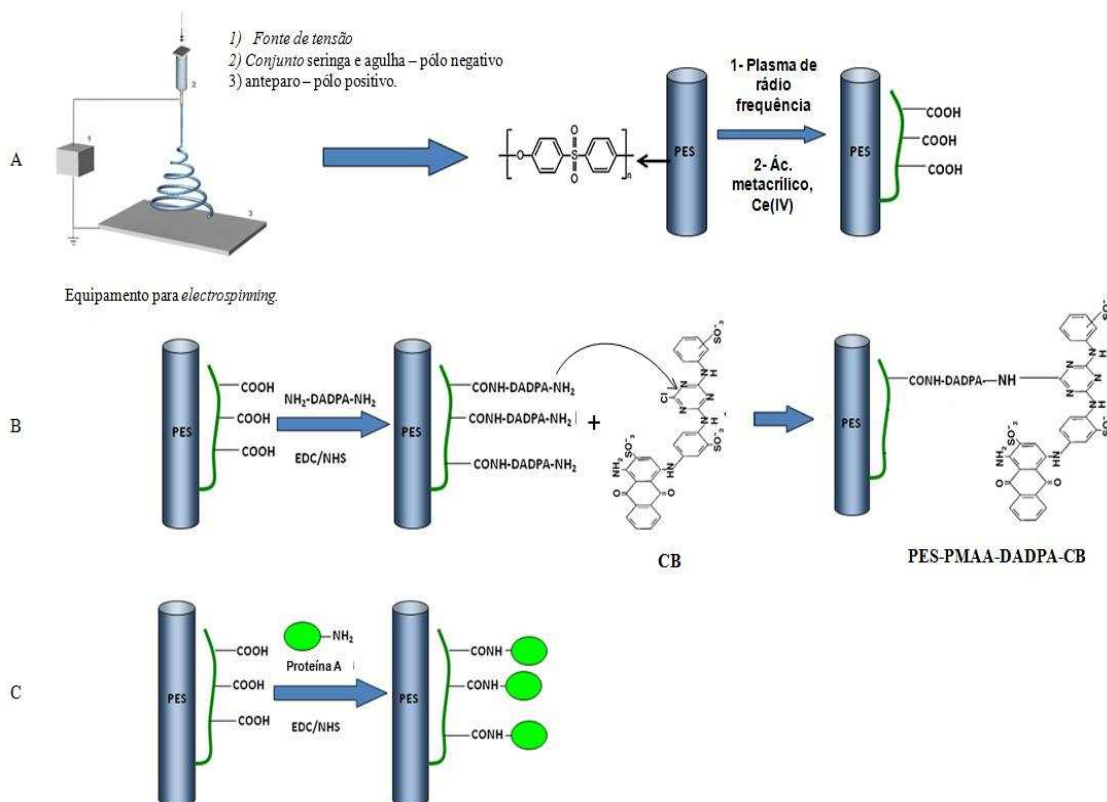
O método de formação de radicais por irradiação emitida por feixe de elétrons tem sido utilizado na ativação de materiais que não possuem nenhum grupo reativo, como o polipropileno e polietileno. Este método é chamado de enxerto de polímeros (*graft polymerization*) e demonstrou ser bastante eficiente. Após a irradiação, os radicais livres formados na superfície polimérica reagem com um monômero vinílico, geralmente o glicidimetacrilato (GMA) e o hidroxietil metacrilato (HEMA), que polymerizam a partir do radical, formando um emaranhado de poli-GMA. A molécula de GMA possui um grupamento epóxi na extremidade, capaz de sofrer uma série de reações, gerando membranas de vários tipos com uma alta concentração de ligantes, como por exemplo: troca aniônica e catiônica (grupos aniônicos (-NH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>) e catiônicos (-SO<sub>3</sub>H)); interação hidrofóbica (grupos fenil e butil); interação por íons metálicos complexados pelo ácido iminodiacético (IDA). A Figura 2.20 mostra o processo de acoplamento de ligantes em polímeros ativados por irradiação (KAWAI *et al.*, 2003).



**Figura 2.20.** Esquema de preparação de membranas de diferentes tipos por irradiação de polímeros (KAWAI *et al.*, 2003).

O método de irradiação é realizado em uma atmosfera contendo um gás inerte (nitrogênio, por exemplo). Como mencionado no item anterior, a irradiação pode ser realizada com luz ultravioleta (HU *et al.*, 2009). Outra forma de realizar o enxerto de polímeros é por descargas de plasma de rádio frequência, como realizado por MA *et al.*, para enxertar, em membranas de polietersulfona, ácido poli(metacrílico) na presença de Cério (IV) (VILANI, 2006; MA *et al.*, 2009).

O método de ativação de carboxilas por carbodiimidas, geralmente utilizando o reagente EDC (hidrocloro de (1-etil-3-(3-etilamino-propil) carboiimida), é amplamente explorado em reações de ativação de membranas para acoplamento de ligantes de afinidade. Em trabalhos recentes, visando avaliar a utilização membranas de afinidade fabricadas pela técnica de *eletrospinning*, a qual consiste em formar fibras com diâmetro reduzido aplicando-se campos elétricos de alta tensão e baixa corrente, foi adotado o processo de fabricação de membranas mostrado na Figura 2.20a (ALVES *et al.*, 2006). Nestes trabalhos, as membranas de polietersulfona (PES) produzidas por *eletrospinning* foram enxertadas com ácido poli(metacrílico) (PMAA) com indução por Cério (IV) e utilização de plasma de rádio-frequência, processo que gera grupos carboxílicos na superfície polimérica. Em uma segunda etapa, estes grupos carboxílicos foram ativados com EDC/NHS (N-hidroxisuccinamida), para que o composto diamino-dipropilamina (DADPA) pudesse ser acoplado à membrana através da formação de uma amida. Os grupamentos  $-NH_2$  do DADPA reagiram com as moléculas do ligante azul de cibacron, através de uma reação de substituição nucleofílica, gerando uma membrana com alta afinidade pela albumina bovina. O acoplamento da proteína A também foi possível, realizando a reação direta da proteína A com os grupos carboxílicos em presença de EDC/NHS, gerando uma membrana com capacidade adsortiva para imunoglobulinas, comparável com membranas comerciais contendo proteína A como ligante. A Figura 2.21 mostra o processo de formação das membranas de afinidade descritas acima (MA *et al.*, 2006 e 2009).



**Figura 2.21.** Esquema de reações para imobilização de ligantes na membrana de PES fabricada pela técnica de *electrospinning*. (A) Formação da membrana utilizando um equipamento para *electrospinning* e enxerto de ácido poli(metacrílico) após ativação por plasma de rádio frequência; (B) Reação de acoplamento de moléculas de azul de cibacron e (C) reação de acoplamento de moléculas de proteína A (baseado em ALVES *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006 e 2009).

### 2.2.3.3. Funcionalização com heparina

As carboimidás ( $RN=C=NR$ ) podem ser utilizadas para ativar carboxilas presentes no ligante e não no suporte polimérico. Um exemplo disto é o acoplamento de heparina em um suporte que contém grupos amina livres. Como descrito anteriormente, a heparina é um glicosaminoglicano muito utilizado em processos de purificação de proteínas do sangue, como, por exemplo, a antitrombina III e o fator IX (MILTRA *et al.*, 1986; HOFFER *et al.*, 1999). A molécula de heparina possui grupamentos carboxílicos que são utilizados para acoplar covalentemente a heparina ao suporte de interesse através da formação de uma amida. Contudo, a reação de aminas com ácidos carboxílicos, gerando uma amida como produto final, não ocorre em condições brandas, pelo fato do cátion amônio não ser um nucleófilo e o ânion carboxilato ser um eletrófilo

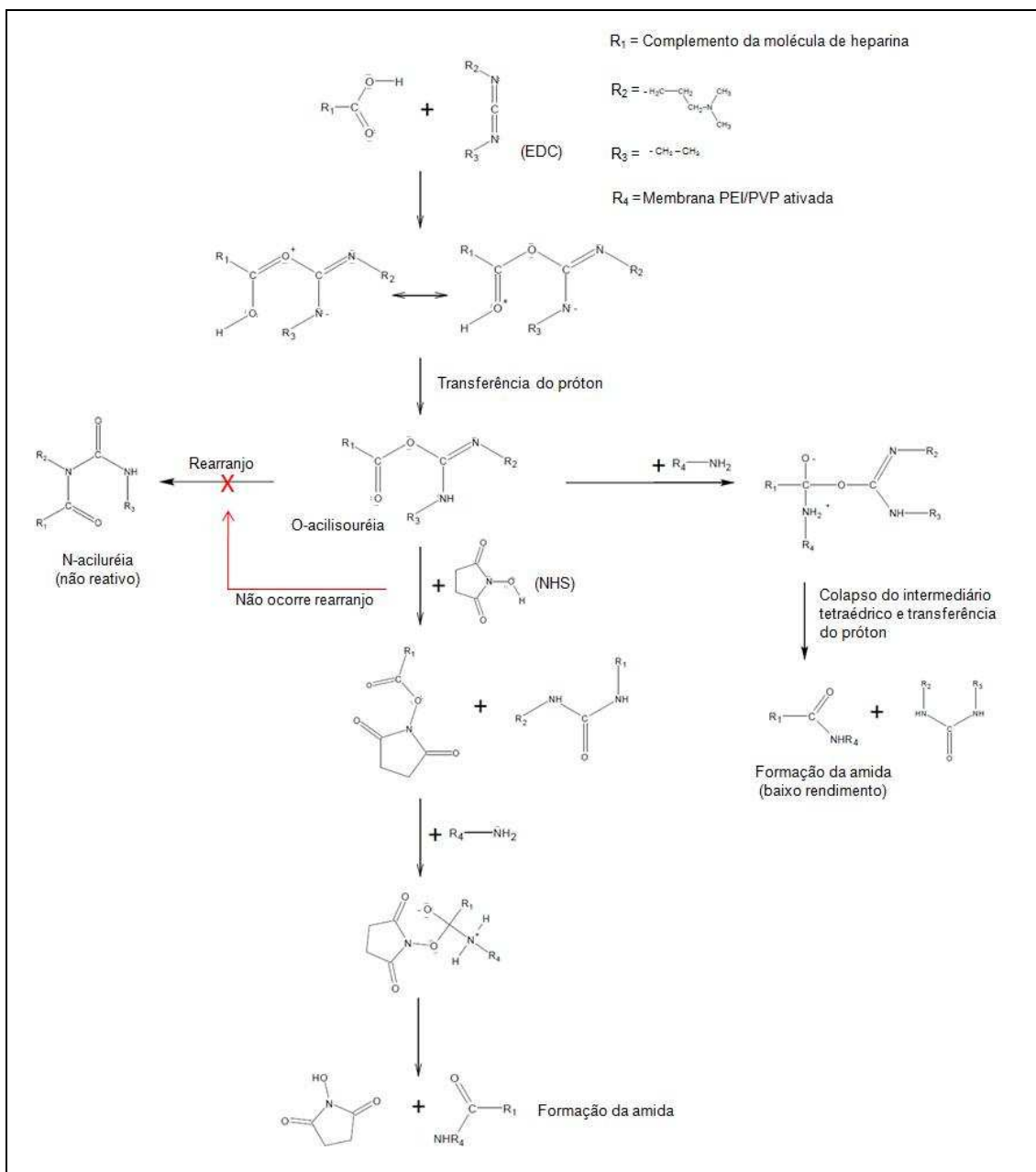
fraco, sendo ambas as espécies formadas a 25°C em grande quantidade no meio. Portanto, a reação ocorre através do ataque nucleofílico da amina não protonada ao ácido carboxílico, porém são necessárias condições drásticas de aquecimento, já que estas espécies são minoritárias no meio reacional. A eliminação de uma molécula de água, na condição de temperatura empregada, torna a reação favorável à formação da amida (COSTA *et al.*, 2003). Para resolver o problema da alta temperatura, o reagente EDC, uma carboimida, atua como ativador da carboxila, tornando-a susceptível ao ataque nucleofílico da amina mesmo em condições brandas (25°C). Isto ocorre, porque o composto EDC, ao se ligar à carboxila, funciona como um excelente grupo de saída. Contudo, esta não é uma reação simples, pelo fato de ocorrer formação de alguns subprodutos indesejáveis, que, dependendo das condições em que a reação se desenvolve, podem reduzir o rendimento da reação de imobilização do ligante ao suporte polimérico. Portanto, observações importantes desta reação em meio aquoso foram descritas por NAKAJIMA & IKADA (1995) em um estudo criterioso do mecanismo da reação em questão, a saber:

- Excesso de EDC formou N-aciluréia (estável em água) e não produziu amida, mesmo adicionando-se amina na solução;
- Quando a concentração de carboimida foi duas vezes menor que a de grupos carboxílicos, não ocorreu alteração na concentração de grupos carboxílicos, ou seja, não ocorreu reação de ativação;
- Quando ocorreu formação de anidrido durante a reação das carboxilas do meio com o EDC em uma primeira etapa da reação, a formação de amida na segunda etapa, quando foi inserida a amina na reação, foi mais favorável. Contudo, isto somente ocorre em moléculas que possuem carboxilas próximas, ou seja, moléculas ciclizáveis;
- O pH ótimo para a reação do EDC com carboxilas foi entre 3,5 e 4,5. Contudo, a formação de amidas foi mais favorável em pH igual a 7 para a reação em dois estágios, já que a protonação das aminas é mais reduzida. Para a reação em um estágio, ou seja, onde todos os reagentes são colocados concomitantemente, o pH ótimo foi de 5;
- A reação em um estágio produziu maior quantidade de amida do que a reação em dois estágios.



O mecanismo da reação de formação de amida a partir da ativação de grupos carboxilas por EDC, proposto por NAKAJIMA E IKADA (1995), remete à formação de um subproduto indesejável, a N-aciluréia, produto irreversível resultado do rearranjo do intermediário O-acilisouréia, gerado em maior quantidade quando há excesso de carboimida. No entanto, em 1996, OLDE DAMINK *et al.* avaliaram a influência do composto N-hidroxisuccinamida (NHS) na reação entre ácidos carboxílicos ativados com EDC e aminas, com a intenção de obter ligações cruzadas em fibras de colágeno. Os autores descobriram que a inserção de NHS resultou em um maior rendimento da reação de amidação, pois não ocorreu a formação dos subprodutos indesejáveis. Isto ocorreu, porque a NHS reagiu com a O-acilisouréia, formando ésteres de NHS, que são mais susceptíveis ao ataque nucleofílico das aminas. Contudo, os grupamentos carboxila não podem ser ativados diretamente com NHS, sendo necessária a presença da carboimida para iniciar a reação (OLDE DAMINK *et al.*, 1996). Após esta descoberta, é possível encontrar artigos que estudam a reação de ativação de grupos carboxila, utilizando a combinação EDC/NHS, para várias finalidades, como, por exemplo, cruzar ligações em fibras de colágeno e bioadesivos e ativar superfícies sólidas, como silicone e poli(éter sulfona) modificada com ácido metacrílico (LIANG *et al.*, 2004; NAM *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2009; SAM *et al.*, 2010). A Figura 2.22 mostra o mecanismo da reação entre o grupamento carboxílico da heparina e uma amina em presença de EDC/NHS formando uma amida.

Adicionalmente, braços espaçadores, como os utilizados para na imobilização de ligantes de afinidade em resinas cromatográficas, podem também ser utilizados em membranas de afinidade, aumentando, assim, a acessibilidade da proteína ao ligante imobilizado (ZOU *et al.*, 2001).



**Figura 2.22.** Mecanismo proposto para a reação de imobilização de heparina na membrana de PEI/PVP, utilizando EDC e EDC/NHS como ativadores de carboxilas (baseado em NAKAJIMA & IKADA, 1995; OLDE DAMINK *et al.*, 1996; SOLOMONS & FRYHLE, 2002).

### 2.2.3.4. Módulos utilizados para cromatografia com membranas poliméricas

Os módulos mais utilizados para cromatografia com membranas são de folhas planas, empilhadas em forma de disco, e de fibras ocas. Os módulos de folhas planas são mais eficientes em pequena escala, pois o aumento do diâmetro pode causar

problemas na distribuição do fluido. Por esta razão, o aumento de escala com membranas em formato plano é realizado enrolando-se a membrana em torno de um eixo (formato de espiral) ou empacotando-as em forma de pregas para aumentar a área superficial, como o módulo contendo a membrana de troca iônica Pall Mustang<sup>®</sup>, da empresa Pall, o qual pode ser visualizado na Figura 2.23. Módulos como estes são disponibilizados comercialmente com até 8 m<sup>2</sup> de área superficial. O volume destes módulos pode variar de 0,35 mL a 5 Litros. Os módulos podem também ser combinados em série ou em paralelo, dependendo do processo, para aumentar a capacidade dinâmica (REIS & ZYDNEY, 2007).

Já as fibras ocas conseguem reunir uma alta área superficial em um módulo com volume pequeno. Além disso, fornecem várias outras vantagens quando se adicionam módulos em paralelo para aumenta a escala do processo, como: queda de pressão transmembrana, comportamento da curva de ruptura e produtividade volumétrica não se alteram com o aumento de escala, o tempo de residência do fluido se mantém constante e o curto tempo de ciclo é preservado (BOI, 2007).

O modo de filtração frontal pode ser utilizado nas membranas adsortivas, pois incrustações são minimizadas, já que sempre há um tratamento de clarificação antes do início das etapas cromatográficas de um processo de purificação e, portanto, não ocorre passagem de partículas em suspensão.

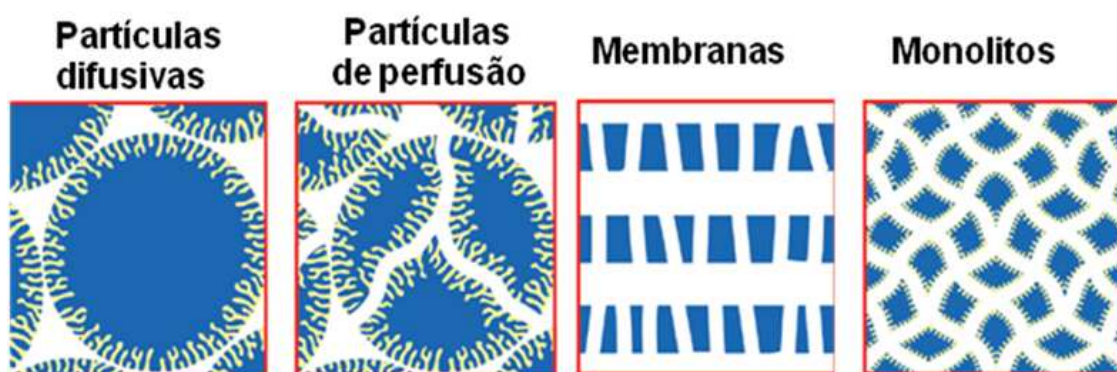


**Figura 2.23.** Módulo de 5 litros da membrana de troca iônica Pall Mustang<sup>®</sup> XT (REIS & ZYDNEY, 2007).

## 2.2.4. Monolitos como matriz cromatográfica

Uma coluna monolítica consiste em uma fase sólida contendo um material poroso com canais interligados, geralmente em formato cilíndrico e com poros grandes, que geram alta permeabilidade ao fluxo (FARIA *et al.*, 2006). Os monolitos podem ser considerados como a 4<sup>o</sup> geração de materiais cromatográficos, sendo as partículas difusivas convencionais a primeira, as partículas de perfusão a segunda e as membranas cromatográficas a terceira. O diagrama da Figura 2.24 compara a estrutura dos 4 tipos de materiais cromatográficos. Os monolitos possuem as mesmas vantagens das membranas cromatográficas: facilidade de escalonamento, transporte predominantemente convectivo (desempenho independente do fluxo) e fácil acesso, principalmente de moléculas grandes, aos sítios de adsorção. Foi observado que, quanto maior a molécula, maior a capacidade adsortiva dinâmica do monolito. Isto ocorre pelo fato de as moléculas maiores terem uma constante difusiva baixa, por exemplo moléculas de DNA de 44 kpb possuem  $1,9 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ , enquanto que moléculas de albumina bovina de 66 kDa possuem  $6,7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  de constante difusiva (GAGNON, 2006).

Para uma molécula grande pura (ex. tiroglobulina, 660 kDa), a capacidade dinâmica do monolito CIM<sup>®</sup> Q supera a de resinas cromatográficas e membranas contendo o mesmo ligante imobilizado (JUNGBAUER & HAHN, 2008). Isto indica que os monolitos possuem uma maior densidade de ligantes que as membranas, sendo esta a maior vantagem dos monolitos em relação às membranas.



**Figura 2.24.** Materiais cromatográficos. Partículas difusivas, 1<sup>o</sup> geração; partículas difusivas de perfusão, 2<sup>o</sup> geração; membranas cromatográficas, 3<sup>o</sup> geração e monolitos, 4<sup>o</sup> geração (GAGNON, 2006).

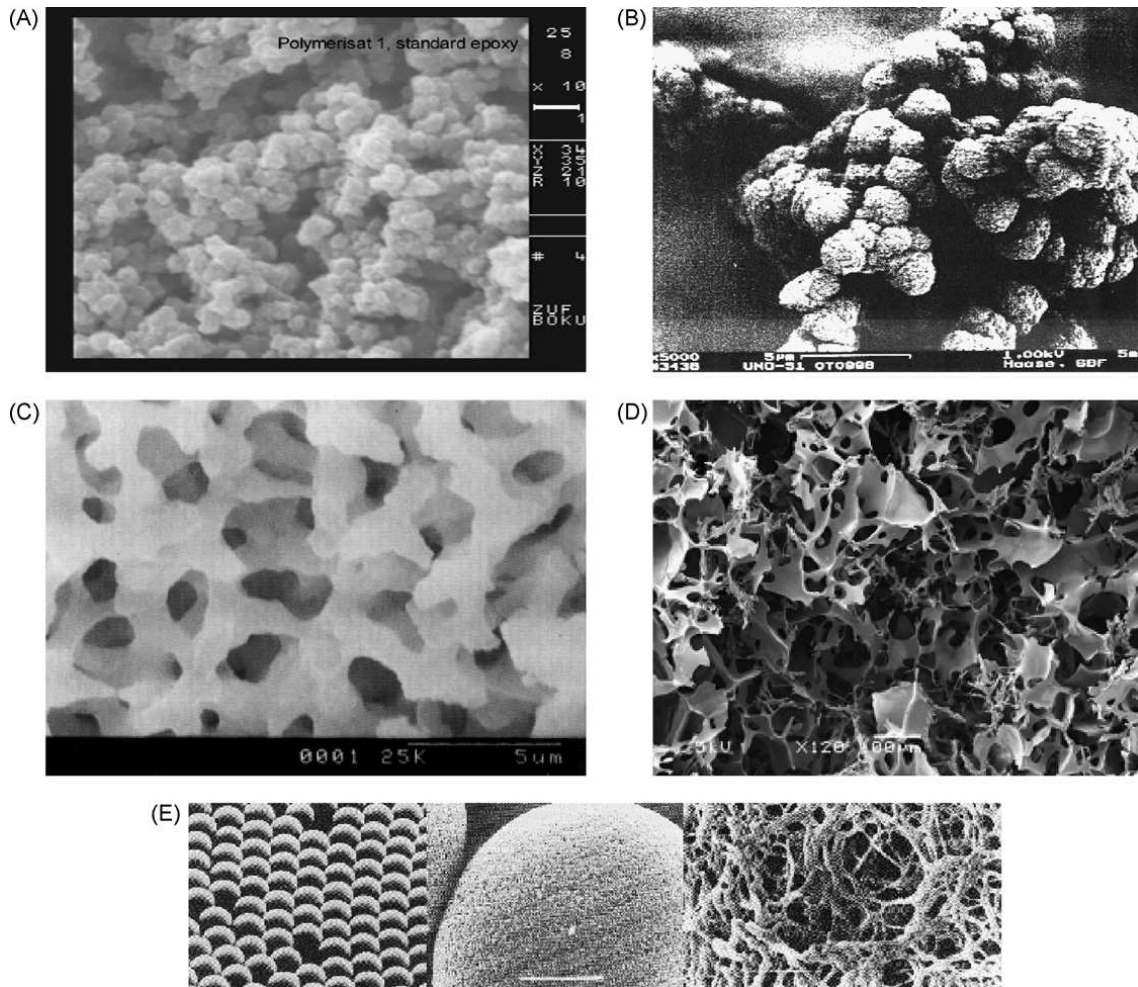
### 2.2.4.1. Materiais e modo de preparo

Os materiais poliméricos são os mais utilizados para o preparo de colunas monolíticas. A formação do monolito ocorre dentro da própria coluna através da polimerização *in situ*. Uma grande vantagem dos materiais poliméricos é a alta estabilidade química, ou seja, suporta variações de pH entre 2 e 12. Os polímeros mais utilizados são: a poli(acrilamida), o polietileno-divinilbenzeno e o polimetacrilato. Este último é o mais empregado pela facilidade de funcionalização (FARIA *et al.*, 2006).

A polimerização ocorre em presença de reagentes químicos com diferentes funções, como o monômero, um agente de reticulação e um solvente porogênico. A polimerização é iniciada por aquecimento, em uma faixa de temperatura de 50 a 80°C ou por luz UV. Após o término da polimerização, um solvente é bombeado através da coluna que foi utilizada como molde para remover resíduos e o agente porogênico. Por fim, o monolito é seco com nitrogênio gasoso e funcionalizado para o tipo de cromatografia desejado. A funcionalização pode ocorrer simultaneamente à polimerização, através da inserção de um monômero funcional, ou após essa etapa, deixando a coluna em repouso com os reagentes apropriados (FARIA *et al.*, 2006). A segunda opção é mais simples e o monômero mais utilizado para a funcionalização é o glicidil metacrilato (GMA), pois possui grupos epóxi reativos (ARRUA *et al.*, 2012).

Monolitos podem ser produzidos com materiais inorgânicos como sílica. Neste caso, o monolito é formado pelo processo sol-gel (uma solução coloidal, sol, funciona como precursor para uma rede integrada, gel), no qual ocorre um encolhimento do monolito após a formação. Portanto, não é possível utilizar colunas de aço inox como molde para monolitos de sílica, devendo-se utilizar materiais que sofrem deformação com variação de temperatura e pressão, como por exemplo, a poli(éter-éter-cetona) (FARIA *et al.*, 2006). A Figura 2.25 mostra a micrografia eletrônica da estrutura de diferentes monolitos que são comercializados para uso em cromatografia.

A construção de monolitos híbridos, com material orgânico e inorgânico, também está sendo foco de estudo. Um monolito com grupos vinil e silano na estrutura final tem a intenção de combinar vantagens da sílica com as dos materiais com base orgânica, obtendo uma alta área superficial, fácil preparação e alta estabilidade química e mecânica (ARRUDA *et al.*, 2012).



**Figura 2.25.** Micrografia eletrônica de alguns monolitos comerciais. (A) polimetacrilato, conhecido como CIM<sup>®</sup>, produzido em forma de discos ou tubos, da empresa BIASeparation, (B) poliacrilamida; coluna UNO, da empresa Bio-rad; (C) monolito de sílica, nome comercial Chromolith, da empresa Merck; (D) Criogel feito de poli(alcoolvinílico); e (E) poliestireno, comercialmente conhecido como Monobeads (JUNGBAUER & HAHN, 2008).

#### 2.2.4.2. Aplicações

Os monolitos são vastamente utilizados para purificação de moléculas grandes como DNA e vírus, pelo fato de a capacidade adsortiva dinâmica ser cerca de 50 vezes e 100 vezes maior no monolito do que em resinas convencionais, respectivamente (GAGNON, 2012). DNA plasmidial pode ser purificado com muita eficiência por colunas monolíticas de troca aniônica, sendo que o número de sítios de ligação teóricos é mais elevado para DNA plasmidial do que para proteínas. Em média, proteínas se ligam em 3-10 sítios enquanto o DNA plasmidial se liga a 50 sítios. Isto implica em uma adsorção de DNA plasmidial com uma concentração salina maior (YAMAMOTO

*et al.*, 2007). O processo de purificação de uma série de vírus foi melhorado com o uso dos monolitos CIM<sup>®</sup>, como por exemplo o vírus do mosaico tomateiro (ToMV – *Tomate Mosaic Virus*) e o vírus da influenza (JUNGBAUER & HAHN, 2008).

Os monolitos de troca aniônica e de fase reversa (CIM C3 e C4) foram empregados com sucesso em ensaios analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para separar moléculas de baixa massa molar (como ácidos orgânicos), peptídeos, oligonucleotídeos, proteínas, ácidos nucleicos e partículas virais. (VLAKH & TENNIKOVA, 2009).

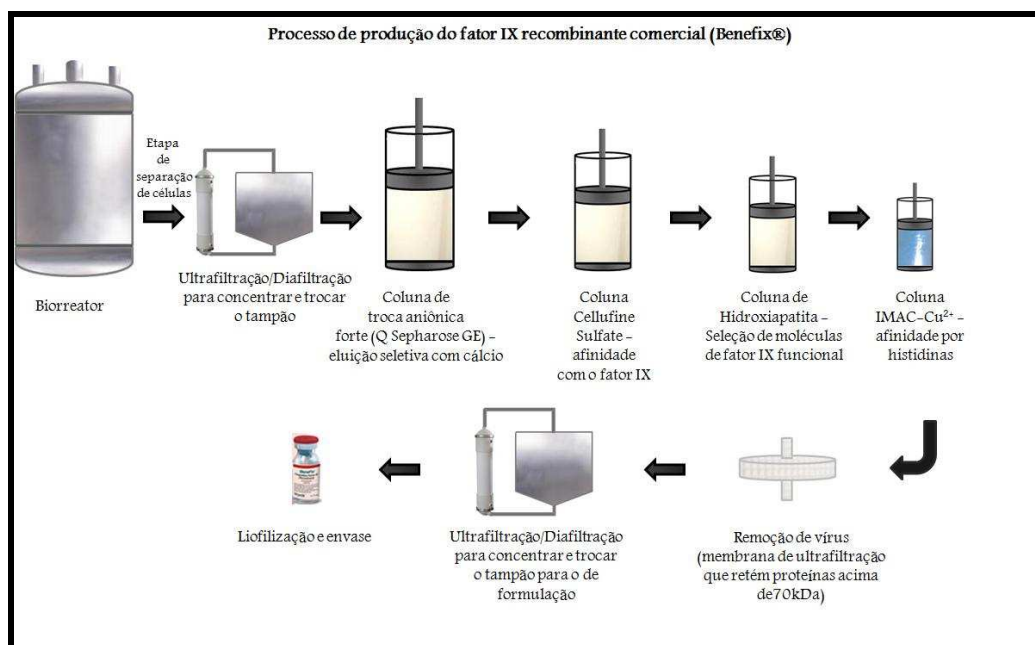
Também há trabalhos utilizando monolitos para a purificação de moléculas pequenas, como o fator IX, por exemplo. BRANOVIC *et al.* (2003) utilizaram o monolito CIM<sup>®</sup> DEAE para a purificação do fator IX derivado do plasma e obtiveram melhores resultados em relação à separação de contaminantes comparado com a utilização da resina DEAE Sepharose<sup>®</sup>. Contudo, BRANOVIC *et al.* (2003) utilizaram um produto intermediário da purificação de um FIX derivado do plasma comercial. Condições mais drásticas (utilização do plasma bruto ou sobrenadante de células) precisam ser avaliadas para confirmar a eficiência dos monolitos.

O presente trabalho visa explorar o potencial deste material cromatográfico na purificação do fator IX recombinante produzido por células animais, fato que nunca foi relatado na literatura. Além disto, a capacidade adsortiva do monolito CIM<sup>®</sup> Q será avaliada em condições reais de processo, ou seja, na presença dos contaminantes presentes no sobrenadante de células de mamíferos. A combinação do monolito CIM<sup>®</sup> Q com outros materiais, também de desenvolvimento recente, como a membrana hidrofóbica Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* será também investigada, na tentativa de desenvolver um novo processo de purificação do FIXr com maior produtividade e menor custo.

### **2.2.5. Processo de purificação do fator IX de coagulação recombinante (Benefix<sup>®</sup>)**

O processo de produção do Benefix<sup>®</sup> é constituído de sete etapas de purificação, sendo elas: ultrafiltração, seguida de diafiltração para adicionar o tampão de equilíbrio da primeira etapa cromatográfica, uma cromatografia de troca aniônica (eluição por afinidade com utilização de CaCl<sub>2</sub>), uma cromatografia com ligante sulfatado tipo

heparina (*Cellufine Sulfate*), uma coluna cromatográfica de hidróxiapatita (buscando reter somente as proteínas  $\gamma$ -carboxiladas), uma cromatografia com íon metálico imobilizado ( $\text{Cu}^{2+}$ ), uma membrana para retenção de vírus (*Virosolve 70*, que retém proteínas com massa igual ou maior que 70 kDa, sendo que o fator IX possui 55 kDa) e novamente um estágio de ultrafiltração/diafiltração para trocar o tampão de eluição da última coluna pelo tampão contendo os ingredientes da formulação (10 mM de L-histidina, 1% de sacarose, 260 mM de glicina e 0,005% de polissorbato 80). Ao fim do processo, o fator IX recombinante é liofilizado, para evitar degradação da proteína, e armazenado em pequenos frascos (FOSTER *et al.*, 1998; HARRISON *et al.*, 1998; EDWARDS & KIRBY, 1999). A Figura 2.12 resume o processo de produção do Benefix<sup>®</sup>.



**Figura 2.12.** Processo de produção do fator IX recombinante comercial Benefix<sup>®</sup> (baseado em HARRISON *et al.*, 1998; EDWARDS & KIRBY, 1999).

## 2.2.6. Contaminantes considerados críticos em biofármacos e particularmente em concentrados de fator IX

As agências regulatórias possuem um alto nível de exigência em relação à pureza de produtos de origem biológica, já que há uma variedade de contaminantes que podem estar presente em produtos biotecnológicos. Em relação a medicamentos



derivados de células animais, os principais contaminantes são: endotoxinas, agentes infecciosos (ex. vírus), proteínas da célula hospedeira (HCP – *Host Cell Proteins*), DNA residual, além de contaminantes específicos de cada produto, como isoformas indesejáveis da molécula, produtos oxidados e formação de agregados (ANICETTI *et al.*, 1989).

As endotoxinas são lipopolissacarídeos que fazem parte da face externa da parede celular de bactérias Gram-negativas e algumas cianobactérias. As endotoxinas podem causar severas reações inflamatórias em humanos. Os sintomas observados em humanos após a exposição a endotoxinas são febre, diarreia, vômitos, hipotensão, podendo levar à morte. O ensaio mais utilizado para detecção de endotoxinas é o teste com o lisado de amoebócitos extraídos do caranguejo *Limulus polyphemus* (teste conhecido como LAL – *Limulus Amebocyte Lisate*), que é caracterizado por possuir sangue azul (Figura 2.13). Apesar de células animais não possuírem endotoxinas, este tipo de contaminação pode estar presente em outras fontes que entram em contato com o produto, como por exemplo, a água (ABDULRAHEEM *et al.*, 2012). A cromatografia de troca aniônica é a técnica mais utilizada para a remoção de endotoxinas de produtos biológicos (MA *et al.*, 2010). O limite de endotoxina estabelecido para injeção intravenosa em humanos é de 5 unidades de endotoxina por kg de paciente por hora. Uma unidade de endotoxina equivale a 100 pg de endotoxinas (CHEN *et al.*, 2009).



**Figura 2.13.** Extração do sangue do caranguejo *Limulus polyphemus* (CIÊNCIA E O CRIADOR, 2011).

A remoção ou inativação viral é um requerimento importante relacionado à pureza de um produto biofarmacêutico. Casos de contaminação por vírus presentes em produtos biológicos foram observados desde a década de 1940. Métodos eficazes para eliminar vírus vêm sendo utilizados nas indústrias biofarmacêuticas, como: filtração viral com membranas de ultrafiltração que permitem a passagem da proteína de interesse, retendo os vírus; cromatografia de afinidade, de troca catiônica e aniônica, de

interação hidrofóbica e multimodal. Uma remoção de 3 a 4 logs em LRV (*Log Reduction Values*), ou seja, uma redução de  $10^3$ - $10^4$  vezes no título viral, é considerada satisfatória. Métodos de inativação viral também são aplicados em indústrias de biofármacos, como por exemplo: inativação por variação do pH, inativação por incubação com solventes e detergentes, inativação por aumento de temperatura e por irradiação de raios gama no caso de matérias-primas (CIPRIANO *et al.*, 2012).

As proteínas da célula hospedeira (HCP) também são consideradas um contaminante crítico e precisam ser reduzidas a níveis muito baixos, pois a presença deste tipo de contaminante pode acarretar em resposta imunológica, atividade adjuvante e redução da estabilidade do produto (SCHENAUER, 2012). A faixa recomendada pelas agências regulatórias em relação ao conteúdo de HCP no produto final é de 1-100 ppm (WANG *et al.*, 2009). Técnicas para determinar a pureza de proteínas, como eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em uma dimensão (revelado com corantes de alta sensibilidade, como a prata) e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) não são sensíveis o suficiente para detectar e quantificar as proteínas contaminantes. No caso do gel, apesar do limite de detecção da prata ser 100 vezes maior que o do corante *coomassie blue*, porém géis corados com prata tendem a não ter boa reprodutibilidade, a prata pode detectar ácidos nucleicos e polissacarídeos, além de não ser sensível para todas as proteínas (GAUCI *et al.*, 2011). As análises por HPLC podem não oferecer bom desempenho na separação das proteínas, caso a metodologia não esteja bem estabelecida e, além disto, pode haver limitação dos detectores, pois geralmente utilizam-se detectores de luz ultravioleta de baixa sensibilidade (MITULOVIC & MECHTLER, 2006).

Portanto, a pureza obtida apenas por estas técnicas pode não estar considerando a presença de contaminantes em concentrações muito reduzidas. Outras análises complementares são necessárias. O imunoenensaio do tipo ELISA (*enzyme linked immunoassay*) com a utilização de anticorpos policlonais que reconhecem uma gama de proteínas de uma determinada célula hospedeira é o método mais utilizado para quantificar níveis de HCP. Este método é capaz de quantificar as HCPs em níveis muito baixos (ng/mL). Contudo, existe a possibilidade de algumas HCPs que apresentem uma fraca interação com o anticorpo não serem detectadas pelo ensaio, ainda que ensaio seja considerado mais sensível que a eletroforese. Por estas razões, informações sobre a

pureza de um produto biofarmacêutico devem ser definidas pela combinação de diferentes métodos analíticos (CHAMPION *et al.*, 2005).

Análises mais apuradas podem ser utilizadas na identificação de proteínas de células hospedeiras. A cromatografia líquida em duas dimensões consiste em utilizar dois tipos de colunas diferentes para obter uma melhor separação dos picos. Por exemplo, em uma primeira dimensão utiliza-se uma coluna de fase reversa em condições de pH alto e, em uma segunda dimensão, usa-se a mesma coluna em condições de pH baixo. Esta metodologia acoplada à espectrometria de massa é capaz de detectar pequenas quantidades de proteínas (DONEANU *et al.*, 2012). Outra técnica utilizada para a identificação de HCPs é a eletroforese em duas dimensões, que explora a separação de proteínas através da massa e da carga das proteínas e consiste em uma excelente ferramenta na identificação do perfil de HCP em diferentes condições de cultivo (JIN *et al.*, 2010).

O DNA residual da célula hospedeira também é uma fonte de contaminação crítica. Estudos mostraram que o DNA genômico pode conter genes relacionados com o surgimento de tumores (oncogenes), pode induzir a ativação de um oncogene ou pode causar o desligamento de um gene inibidor de tumores. Além disso, o DNA de uma linhagem contínua de células animais é susceptível a ser mais tumorigênico (BRIGGS & PAINFILI, 1991).

Em 1997, o FDA (*Food and Drugs Administration*), através de um documento sobre produção de anticorpos monoclonais, reafirmou que a quantidade máxima de DNA residual presente no produto final deveria ser de 100 pg/dose, baseado em estudos reportados pela WHO (*World Health Organization*) em 1987. Contudo, a WHO realizou uma revisão dos riscos e considerou aceitável 10 ng de DNA/dose, sendo que uma dose é definida como a quantidade injetada no paciente em um período de 24 horas. Esta determinação está vigorando atualmente (SUN *et al.*, 2012; BUTLER *et al.*, 2009; SOFER & ZABRISKIE, 2000).

Devido à carga negativa dos grupamentos fosfato a cromatografia de troca aniônica é a mais empregada para a purificação de plasmídeos e DNA cromossomal. Contudo, a cromatografia por afinidade (ex.: proteína A, lisina, hidroxipatita) e de

interação hidrofóbica também são métodos utilizados para remoção de DNA (BUTLER *et al.*, 2009).

O método recomendado pelas agências regulatórias (FDA e EMA) para detecção de resíduos de DNA da célula hospedeira utiliza oligonucleotídeos marcados com átomos radioativos, porém é um método que requer reagentes agressivos, áreas controladas e equipamentos especializados. Contudo, existem outros métodos que também são eficientes, porém mais seguros, como por exemplo: métodos fluorimétricos, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) ou por reação de PCR em tempo real que utiliza sondas fluorescentes na amplificação do DNA, como a sonda Taqman (BUTLER *et al.*, 2009; GUSE *et al.*, 1994).

Comercialmente está disponível um método fluorimétrico (Qubit<sup>®</sup>), que utiliza o corante de ácidos nucleicos fluorescente PicoGreen para dosar DNA de dupla fita. Este corante possui excitação máxima em 480 nm e pico de emissão em 520 nm e somente emite fluorescência após se ligar a moléculas de DNA. Este método tem a vantagem de não sofrer interferência de proteínas e RNA, como ocorre com os métodos espectroscópios, que são baseados na relação da absorvância em 260 e 280 nm (O'NEILL *et al.*, 2011).

Em relação ao fator IX, outro parâmetro torna-se importante para que concentrados de FIX (derivados do plasma ou recombinantes) sejam aprovados pelas agências regulatórias trata-se da quantidade de fator IX ativado (FIXa) presente no produto final. O FIXa, se presente em grande quantidade, pode causar trombose nos pacientes que recebem concentrados de FIX (GALAN *et al.*, 1999). Os primeiros casos de trombose em testes clínicos foram observados com a utilização de concentrados do complexo protrombínico (PCC) para tratamento da hemofilia do tipo B, que consiste em uma mistura de vários fatores de coagulação dependentes de vitamina K (Fator IX, Fator X, Fator VII e fator II). A nova geração de concentrados de FIX derivados do plasma contém apenas traços de outras proteínas plasmáticas devido ao aprimoramento do processo de purificação, fato que reduziu a incidência de trombose em testes clínicos (MACGREGOR *et al.*, 1994). Contudo, estudos mostraram que uma atividade maior que 129 UI de FIX/dl de plasma estava associada com um aumento no risco de formação de trombose intravenosa em 2,8 vezes (BERTINA, 2004). A associação de casos de trombose com a presença de FIXa foi gerada após a observação da indução de

trombos em coelhos que receberam doses de FIXa purificado, porém o bloqueio de sítios ativos da molécula do FIXa preveniu a formação de coágulos *in vitro* e reduziu a formação de trombos coronarianos *in vivo* (LOWE, 2001). Somente foi encontrada uma referência na literatura que estabeleceu por ensaios clínicos próprios, não mostrados no artigo, que uma relação em atividade FIXa/FIX menor que 2,4% seria segura em relação à ocorrência de trombose em camundongos (SUN *et al.*, 2012). Além da atividade, é possível identificar a presença do FIXa por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições redutoras, ou seja, adicionando um agente redutor à amostra contendo concentrado de FIX. Se houver FIXa na amostra, será possível observar a formação de duas bandas, uma com 28 kDa (cadeia pesada) e outra com 17 kDa (cadeia leve). Isto ocorre pelo fato da cadeia pesada e leve da molécula do FIX ficarem unidas por uma ponte dissulfeto apenas após a remoção do peptídeo de ativação, conforme pode ser visto na Figura 2.2 (OSTERUD *et al.*, 1978; HARTMANN *et al.*, 2009). No entanto, somente testes clínicos poderão confirmar a segurança de concentrados de FIX.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral do trabalho consiste em propor uma estratégia de purificação do fator IX recombinante produzido por células CHO, explorando técnicas de cromatografia líquida de proteínas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- Comparar a capacidade adsortiva dinâmica, para o FIXr, de membranas adsortivas, monolitos e resinas para cromatografia de troca aniônica, utilizando sobrenadante de células CHO como alimentação;
- Avaliar a etapa de eluição por afinidade ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  no processo de purificação do FIXr utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q;
- Avaliar a cromatografia de pseudo-afinidade usando a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate como segunda etapa do processo de purificação do FIXr;
- Avaliar o desempenho da cromatografia de interação hidrofóbica no processo de purificação do FIXr utilizando a membrana Sartobind<sup>®</sup> Phenyl.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes, linhagem celular, colunas cromatográficas e equipamentos

As células utilizadas neste trabalho são da linhagem CHO FN76 produtoras de fator IX. O meio de cultivo utilizado foi TC-42 produzido pela empresa TeutoCell (Alemanha). A vitamina K utilizada foi o medicamento Kanakion, da empresa Roche. O fator IX derivado do plasma comercial foi adquirido da empresa Hyphen-Biomed (França). As colunas cromatográficas Hiprep<sup>TM</sup> Q FF 1 mL e a coluna vazia Tricorn 5/20, além da resina Q Sepharose<sup>®</sup> FF foram adquiridas da empresa GE Healthcare (EUA). A resina Fractogel<sup>TM</sup> TMAE foi adquirida da empresa Merck (EUA). A resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate foi adquirida da empresa Chisso Corporation (Japão). As membranas Sartobind<sup>®</sup> Q e Sartobind<sup>®</sup> Phenyl nano, as membranas para filtração de 0,2-0,4 µm e os sistemas de ultrafiltração Vivaspin<sup>®</sup> 20 mL foram adquiridos da empresa Sartorius. O monolito CIM<sup>®</sup> Q (discos, coluna de 1 mL e coluna de 8 mL) e o suporte para os discos foram adquiridos da empresa BIASeparation (Eslovênia). O anticorpo monoclonal anti-fator IX (F2645), o anticorpo anti-ovelha conjugado à fosfatase alcalina e a albumina do soro bovino foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (EUA). O anticorpo policlonal anti-FIX de ovelha (K95004S) foi adquirido da empresa Meridian (EUA). As placas de 96 poços *High Binding* e as placas de 96 poços próprias para leitura no UV 280 nm foram adquiridas da empresa Corning (EUA). As placas de 96 poços para ensaios de atividade foram adquiridas da empresa Greiner (Alemanha). O plasma padrão Unicalibrator foi adquirido da empresa Stago (França). Todos os demais reagentes químicos foram adquiridos da empresa Vetec Química (Brasil).

Os equipamentos utilizados para as corridas cromatográficas foram: Akta Purifier e Akta Explorer da empresa GE Healthcare. Para as leituras de absorbância dos ensaios colorimétricos foi utilizado o espectrofotômetro PowerWave XS da empresa BioTek.

### 4.2. Produção do FIXr

O fator IX recombinante foi produzido por colaboradores do laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) da COPPE/UFRJ. Todos os cultivos foram

realizados com células CHO FN76 em meio TC-42 suplementado com 5 µg/mL de vitamina K. A produção do FIXr foi dividida em dois lotes: no primeiro lote; a produção foi em biorreator operado em modo de batelada. Atingiu-se uma concentração celular de  $6 \times 10^6$  cel/mL e a viabilidade no momento da colheita do sobrenadante estava em 98%. No segundo lote; a produção foi em biorreator operado em modo de batelada alimentada, a concentração celular atingiu  $20 \times 10^6$  cel/mL e a viabilidade estava em 70% no momento da colheita do sobrenadante. Os sobrenadantes foram centrifugados para separar as células e depois congelados em alíquotas de 45 mL (tubos Falcon). Antes da utilização em sistemas cromatográficos os sobrenadantes foram descongelados e filtrados em membranas com 0,2-0,4 µm de tamanho de poro para eliminar qualquer resíduo sólido. Os dois lotes foram utilizados em experimentos de purificação, porém cada bloco de experimentos foi realizado com o mesmo lote, para evitar inconsistência nos resultados da purificação, como descrito na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Características dos lotes de sobrenadante e experimentos nos quais cada um foi utilizado.

Lotes	Características	Experimentos
1	Colheita com $6 \times 10^6$ cel/mL e 98% de viabilidade (biorreator operado em batelada)	- Estudo de capacidade dinâmica dos materiais cromatográficos; - Estudo da eluição do FIXr por afinidade ao cálcio utilizando o monolito CIM <sup>®</sup> Q.
2	Colheita com $20 \times 10^6$ cel/mL e 70% de viabilidade (biorreator operado em batelada alimentada)	- Ampliação de escala do processo utilizando o monolito CIM <sup>®</sup> Q; - Avaliação da segunda etapa do processo de purificação



## 4.3. Purificação do fator IX

### 4.3.1. Etapa de captura

Os experimentos da etapa de captura foram realizados no equipamento Akta Purifier com a utilização de uma bomba peristáltica P-960 para a injeção da amostra.

#### 4.3.1.1. Capacidade adsortiva dinâmica

A capacidade adsortiva dinâmica na etapa de captura foi primeiramente avaliada para os materiais de troca aniônica: Q Sepharose<sup>®</sup> FF (coluna Hitrap de 1 mL), Fractogel<sup>™</sup> TMAE (1 mL de resina empacotada em uma coluna Tricorn 5/20), membrana Sartobind<sup>®</sup> Q (75 cm<sup>2</sup> ou 2 mL) e monolito CIM<sup>®</sup> Q (3 discos de 0,34 mL empilhados em um suporte apropriado). Aproximadamente 120 mL de sobrenadante do lote 1 foram injetados *in natura* em cada um dos materiais avaliados. Foram utilizadas vazões de 1 mL/min para as resinas e 5 mL/min para as membranas e monolitos. Foram coletadas frações de 2 mL do efluente. Estas frações foram analisadas em relação à concentração de FIXr (ELISA). Os ensaios de cromatografia foram realizados em duplicata. Um novo ensaio foi realizado somente com o monolito CIM<sup>®</sup> Q (1 disco de 0,34 mL) e a resina Q Sepharose<sup>®</sup> FF (0,5 mL de resina empacotada em uma coluna Tricorn 5/20). Desta vez, uma quantidade maior de sobrenadante (160 mL) foi aplicada nas mesmas condições citadas acima. Com a redução de volume de material e o aumento do volume de sobrenadante o objetivo era garantir que ocorreria a saturação máxima dos materiais. Neste ensaio, o efluente foi analisado em relação à concentração mássica de FIX e à atividade.

A capacidade adsortiva dinâmica foi calculada, levando-se em consideração o volume no qual a concentração de fator IX no efluente era correspondente a 10% da concentração na amostra inicial, de acordo com a equação 1.

$$q = \frac{C_0 (V_0 - V_{morte})}{V_{resina, membrana, monolito}} \quad (1)$$

Sendo:

$q$  = capacidade adsortiva dinâmica (mg de proteína / mL de material);

$C_0$  = concentração da amostra alimentada (mg/mL);

$V_{10\%}$  = volume alimentado no momento em que o efluente apresentou concentração igual a 10% da alimentação (mL);

$V_{\text{morto}}$  = volume morto (mL);

$V_{\text{resina, membrana, monolito}}$  = volume do leito da resina, da membrana ou do monolito utilizado (mL).

#### **4.3.1.2. Estudo da eluição do FIXr por afinidade ao cálcio utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q**

Um planejamento experimental fatorial completo com 3 variáveis e três réplicas no ponto central foi realizado para investigar o comportamento da etapa de eluição do fator IXr por afinidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q. As variáveis avaliadas foram: concentração de NaCl, concentração de  $\text{CaCl}_2$  e pH. As combinações de experimentos e os níveis das variáveis utilizados estão descritos nas Tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente. Para este planejamento foi utilizada uma coluna de 1 mL do monolito CIM<sup>®</sup> Q. O sobrenadante do lote 1 foi diluído 3x em tampão Tris-HCl 50 mM, 0,15 M de NaCl, pH 8 antes de cada injeção. Foram injetados aproximadamente 100 UI de FIX (75 mL do sobrenadante diluído). A vazão utilizada foi de 5 mL/min. O monolito foi lavado com o tampão de equilíbrio (300 mL). A fração correspondente à eluição em presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mL) foi analisada em relação à concentração de proteínas totais, à concentração de fator IX, à atividade do FIX e por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Com os dados obtidos, foram determinadas as seguintes respostas: rendimento em atividade (equação 2), rendimento em massa (equação 2), fator de purificação (equação 3) e pureza qualitativa por SDS-PAGE. Ao final de cada experimento o monolito foi regenerado com o tampão Tris-HCl 50 mM, 2 M de NaCl, pH 7 (100 mL) e sanitizado com uma solução 1 M de NaOH (passou-se 20 mL da solução, então o fluxo foi interrompido por 1 hora e depois passou-se mais 20

mL da solução, ao final do processo de sanitização o monolito foi lavado com 300 mL de água ultrapura e estocado em etanol 20%).

$$\text{Rendimento} = \frac{(\text{Concentração de FIX ou atividade})_{\text{recuperada}} \times \text{Volume}}{(\text{Concentração de FIX ou atividade})_{\text{injetada}} \times \text{Volume}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Fator}_{\text{Purificação}} = \frac{\left( \frac{\text{Atividade de FIX}}{\text{Concentração de proteínas totais}} \right)_{\text{Eluido}}}{\left( \frac{\text{Atividade de FIX}}{\text{Concentração de proteínas totais}} \right)_{\text{Amostra}}} \quad (3)$$

**Tabela 4.2.** Planejamento experimental para avaliar a etapa de eluição do FIXr por afinidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q.

Ensaio	pH	[Ca <sup>2+</sup> ]	[NaCl]	R <sub>ativ.</sub> (%)	R <sub>massa</sub> (%)	FP
1	-1	-1	-1	-	-	-
2	+1	-1	-1	-	-	-
3	-1	+1	-1	-	-	-
4	+1	+1	-1	-	-	-
5	-1	-1	+1	-	-	-
6	+1	-1	+1	-	-	-
7	-1	+1	+1	-	-	-
8	+1	+1	+1	-	-	-
9	0	0	0	-	-	-
10	0	0	0	-	-	-
11	0	0	0	-	-	-

R<sub>ativ.</sub> = Rendimento em atividade

R<sub>massa</sub> = Rendimento em massa

FP = Fator de Purificação

**Tabela 4.3.** Níveis das variáveis do planejamento experimental.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH	6,5	7,5	8,5
[CaCl <sub>2</sub> ] (mM)	15	30	45
[NaCl] (mM)	0	50	100

#### **4.3.1.3. Purificação do FIXr com a membrana Sartobind® Phenyl**

A membrana hidrofóbica Sartobind® Phenyl foi avaliada como primeira etapa do processo de purificação do FIXr. Nesta etapa, o sobrenadante foi diluído para a concentração final 1,8 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  com um tampão Tris-HCl 50 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,2 M, pH 7,2. Logo após, o sobrenadante diluído foi centrifugado por 5 min a 150 g para efetuar a decantação do precipitado formado após a adição do sal contendo sulfato de amônio. O sobrenadante foi coletado, eliminando-se o precipitado formado. Uma nova filtração com membrana de 0,2-0,4  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro foi realizada para garantir a remoção de partículas sólidas. A membrana Sartobind® Phenyl nano (3 mL) foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 50 mM, 1,8 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7,2 (20 volumes de membrana). Logo após, foram injetados 30 mL do sobrenadante diluído na membrana Sartobind® Phenyl com uma vazão de 5 mL/min. Em seguida, a membrana foi lavada com o tampão de equilíbrio (20 volumes de coluna). A eluição ocorreu com um gradiente linear do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,2 (50 mL). O eluído foi coletado em frações de 2 mL, sendo as mesmas analisadas por ensaio de atividade de FIX, SDS-PAGE e HCP.

#### **4.3.1.4. Ampliação de escala do processo utilizando o monolito CIM® Q**

A ampliação de escala foi realizada com o lote de sobrenadante de número 2, pelo fato do primeiro lote não estar mais disponível. Foi avaliado o desempenho do aumento de escala do monolito CIM® Q de 1 mL para o de 8 mL. As condições de adsorção foram as mesmas utilizadas no planejamento experimental. Para o monolito de 1 mL, foram injetados 350 UI de FIXr (70 mL do sobrenadante diluído em tampão de equilíbrio) a 3,7 mL/min. A coluna foi lavada com 300 mL do tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada com o tampão Tris-HCl 50 mM, 45 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 6,5 (50 mL), sendo o pico coletado em uma fração de 2 mL. Já para o monolito CIM® Q de 8 mL, os valores foram aumentados proporcionalmente, exceto para o volume da lavagem com o tampão de equilíbrio e o volume da eluição (Injeção de 2500 UI de FIX, vazão de 29,6 mL/min, lavagem com 1000 mL do tampão de equilíbrio, 200 mL de volume de eluição e volume da fração do pico de 16 mL). As corridas para ambas as colunas foram realizadas em duplicata. Para a comparação do desempenho dos processos foram determinados o rendimento em atividade, o rendimento em massa, o fator de purificação

e o perfil do gel de SDS-PAGE. Análises de HCP, DNA residual e FIXa foram realizadas apenas para a corrida com o monolito CIM<sup>®</sup> Q de 8 mL. O mesmo processo de regeneração e sanitização utilizado durante os ensaios do planejamento também foi empregado nesta etapa.

### **4.3.2. Segunda etapa cromatográfica do processo de purificação do FIXr**

Todos os experimentos com os materiais avaliados na segunda etapa do processo de purificação do FIXr foram realizados com a utilização de um *pool* do eluído de 8 corridas com o monolito (8 mL) nas mesmas condições empregadas no experimento de aumento de escala. Além disto, todos os experimentos da segunda etapa foram realizados no equipamento Akta Explorer.

#### **4.3.2.1. Capacidade adsortiva dinâmica**

Primeiramente, a capacidade dinâmica adsortiva foi determinada para a resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate*. Foram empacotados 0,5 mL de resina em uma coluna Tricorn 5/20. Após equilibrar a coluna com 15 mL do tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 45 mM, pH 6,5, foram injetados 10 mL do eluído da etapa de troca aniônica, sem nenhuma alteração, na coluna. A análise foi realizada com uma vazão de 1 mL/min. Frações do efluente de 1 mL foram coletadas e analisadas em relação à concentração de FIXr e à atividade de FIXr. A curva de saturação foi monitorada pela absorbância a 280nm e 256 nm. Em outro experimento de capacidade com a resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate*, foram injetados 30 mL do eluído da etapa de troca aniônica diluído 3 x com um tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,2, sendo a curva de saturação analisada da mesma forma. Todos os experimentos de capacidade adsortiva dinâmica para a resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate* foram realizados em duplicata. Assim como para a troca aniônica, o cálculo da capacidade adsortiva dinâmica foi realizado baseado na equação 1. Ao final de cada experimento, a coluna foi regenerada com uma solução 0,1 M de NaOH (20 mL a 1 mL/min) e armazenada em etanol 20% a 4°C.

Também foi determinada a capacidade adsortiva dinâmica para a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl nano*. Antes de ser utilizada, a membrana foi lavada com NaOH 1 M (30 volumes de membrana) e, em seguida, com 35 volumes de membrana de água

ultrapura, segundo recomendação do fabricante. Desta vez, como o volume de membrana era de 3 mL, apenas uma corrida para a determinação da capacidade adsorptiva dinâmica foi realizada, pois um grande volume de eluído era necessário. Um novo *pool* de 8 eluídos da etapa de troca aniônica com o monolito CIM<sup>®</sup> Q foi utilizado somente para esta etapa. A amostra do eluído da etapa de troca aniônica foi diluída para uma concentração final de 1,8 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com um tampão Tris-HCl 50 mM, 3,2 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,2. O precipitado formado foi removido por filtração com uma membrana de 0,2-0,4 µm de tamanho de poro. Após o equilíbrio da membrana com 30 mL do tampão Tris-HCl 50 mM e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8 M, pH 7,2, 135 mL de amostra diluída a 1,8 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram injetados na membrana, sendo coletadas frações de 2 mL do efluente. A vazão utilizada nesta etapa foi de 5 mL/min. As frações também foram analisadas em relação à concentração de FIXr e à atividade de FIXr, e a absorbância monitorada a 280 nm e 256 nm. Ao final do experimento, a membrana foi regenerada com isopropanol 30% (30 volumes de membrana) e lavada com água ultrapura (50 volumes de coluna), antes de ser armazenada em etanol 20% a 4°C.

#### **4.3.2.2. Purificação do FIXr com a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate**

Para o processo de purificação do FIXr com a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate, 1 mL de resina foi empacotado em uma coluna Tricorn 5/20. A coluna foi equilibrada com 15 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, 45 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 6,5. Logo após, 5 mL do eluído da etapa de troca aniônica foram injetados na coluna, a 1 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 mL do tampão de equilíbrio. A eluição procedeu-se de duas formas: em uma corrida, foi realizada uma eluição por gradiente linear do tampão Tris-HCl 50 mM, 2 M de NaCl, pH 7 (60 mL), tampão da bomba B; mais duas corridas iguais foram realizadas com uma eluição por degraus dividida em três estágios (Lavagem com 6,5% de B, eluição com 25% de B e regeneração com 100% B). Ao final de cada experimento, a coluna foi regenerada com uma solução 0,1 M de NaOH (20 mL a 1 mL/min) e armazenada a 4°C em etanol 20%. Cálculos de rendimento em massa e atividade, fator de purificação, perfil de SDS-PAGE, teor de HCP e quantidade de DNA residual foram as respostas adotadas para avaliar o desempenho desta resina.

### **4.3.2.3. Purificação do FIXr com a membrana Sartobind® Phenyl**

A purificação do FIXr com a membrana Sartobind® Phenyl procedeu-se da seguinte forma. Antes de cada corrida, foi seguido o procedimento de lavagem recomendado pelo fabricante descrito no item 4.3.2.1. Em seguida, a membrana foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 50 mM, 1,8 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,2 (30 mL). Logo após, a amostra foi injetada de duas formas: em uma primeira corrida, o eluído da etapa de troca aniônica foi submetido a uma diafiltração com uma membrana Vivaspin® 20 mL que retém proteínas maiores que 10 kDa, para substituir o tampão para o de equilíbrio; em uma outra corrida, a amostra foi injetada diluída para 1,8 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com o tampão Tris-HCl 50 mM e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,2 M, pH 7,2 (antes da injeção, o precipitado formado foi removido por filtração com uma membrana de 0,2-0,4 µm de tamanho de poro). Aproximadamente 20 mL de amostra foram injetados em cada corrida. A seguir, a membrana foi lavada com 25 mL do tampão de equilíbrio. A eluição procedeu-se de duas formas diferentes: primeiramente foi avaliada (em apenas uma corrida) a eluição por gradiente linear (30 mL) até 100% do tampão localizado na bomba B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,2); a segunda forma empregou uma eluição por degraus em 3 estágios de concentração do tampão da bomba B (1º estágio – 40% de B, 2º estágio 60% de B e 3º estágio 100% de B), sendo este tipo de eluição avaliada em duas corridas idênticas. A membrana foi sanitizada e armazenada segundo o procedimento descrito no item 4.3.2.1. As respostas adotadas para avaliar o desempenho desta etapa foram: rendimento em massa e atividade, fator de purificação, perfil de SDS-PAGE, teor de HCP, quantidade de DNA residual e atividade do FIXa.

## **4.4. Técnicas analíticas**

### **4.4.1. Determinação da concentração de FIXr**

A concentração de FIXr foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA – *Enzyme Linked Immunoassay*), de acordo com o procedimento descrito a seguir. Uma placa de 96 poços de alta adsorção (high binding) foi sensibilizada com 100 µL do anticorpo de captura (F2645) diluído, em tampão carbonato de sódio 50 mM, pH 9,5, para a concentração de 6 µg/mL, sendo a placa incubada a 4°C durante a noite. No dia seguinte, a placa foi lavada 4 vezes com o tampão TBS-Tween e incubada com 100 µL em cada poço da solução de bloqueio (BSA 1% em TBS-Tween) por 2,5 horas a 37°C

ao abrigo da luz. Em seguida, a placa foi lavada 4 vezes com o tampão TBS-Tween e foram adicionados 100 µL do padrão (diluições seriadas, com 5 pontos, do plasma Unicalibrator, iniciando por 64 ng/mL de FIX – 12,6 µL de plasma para 1mL de volume final da solução diluente TBS-Tween) e 100 µL das amostras diluídas em TBS-Tween. A placa com as amostras e o padrão foi incubada a 25°C por 1 hora ao abrigo da luz. Logo após, a placa foi lavada 4 vezes com o tampão TBS-Tween e foram adicionados 100 µL em cada poço do anticorpo policlonal K95004S diluído 1:15000 em TBS-Tween, sendo a placa incubada a 25°C por 1 hora ao abrigo da luz. Em seguida, a placa foi lavada 4 vezes com o tampão TBS-Tween e 100 µL do anticorpo secundário conjugado à enzima fosfatase alcalina, diluído 1:20000 em TBS-Tween, foram adicionados em cada poço e a placa incubada a 25°C por 1 hora ao abrigo da luz. Ao final, a placa foi lavada 4 vezes com o tampão TBS-Tween e foram adicionados 100 µL da solução de revelação em 1 mg/mL de p-nitrofenilfosfato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8). A revelação ocorreu entre 15 e 20 min a 25°C ao abrigo da luz. A reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de NaOH 3 M em cada poço. A leitura da placa foi realizada em um leitor de microplacas a 405 nm.

#### **4.4.2. Determinação da atividade biológica do FIXr e do FIXr ativado**

A atividade biológica do FIXr total foi determinada com o uso do *kit* cromogênico da empresa Hyphen-Biomed, *BIOPHEN Factor IX kit* (Cat. 221802). A curva padrão foi realizada com plasma Unicalibrator de 25% a 1% em atividade de FIX. O procedimento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante, adotando-se uma pré-diluição no diluente do kit de 100 vezes para padrões e amostras.

A atividade biológica somente do FIXa também foi determinada com um *kit* comercial da empresa Hyphen-Biomed, *BIOPHEN Factor IXa kit* (Cat. 221812). O procedimento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante.

Os ensaios de atividade foram realizados em placas de 96 poços convencionais (baixa adsorção).

O ensaio de atividade biológica considerado na farmacopeia para o produto final de concentrados de fatores de coagulação é o ensaio por coagulometria *in vitro*, pois este tem maior semelhança com o processo de coagulação que ocorre no corpo humano.



Contudo, este ensaio sofre muita interferência dos componentes presentes nas soluções de fator IX que sempre são modificadas durante o processo de purificação devido à constante troca de tampão. Portanto, foi selecionado o ensaio cromogênico para evitar interferências nas análises, porém caso o processo estivesse concluído uma análise da atividade do FIXr por coagulometria teria que ser realizada.

#### **4.4.3. Determinação da concentração de proteínas totais**

A concentração de proteínas totais foi determinada por espectrometria a 280 nm. No ensaio, 100 µL de amostra ou padrão foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. Para a curva padrão, foi empregada a proteína BSA na faixa de 10 mg/mL até 0,078 mg/mL. Neste ensaio, foram utilizadas placas de 96 poços de baixa absorção próprias para leitura direta na região do UV 280nm.

#### **4.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*)**

O gel de poliacrilamida 12% foi preparado da seguinte forma: para o gel de resolução, utilizaram-se 4 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida 30% (m/v), 3 mL de água, 2,5 mL de tampão tris 1,5 M (pH 8,8), 0,1 mL de SDS 10% (m/v), 50 µL de persulfato de amônio e 10 µL de TEMED; para o gel de empilhamento, utilizaram-se 4 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida 30% (m/v), 3 mL de água, 2,5 mL de tampão tris 1,5 M (pH 6,8), 0,1 mL de SDS 10% (m/v), 50 µL de persulfato de amônio e 20 µL de TEMED. O gel foi preparado com 1,5 mm de espessura. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 50mM, SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0,1% (m/v) e glicerol 10% (m/v)) na proporção 30% de tampão para 70% de amostra. A mistura foi aquecida a 95°C por 5 minutos. Em uma cuba para eletroforese, o gel foi submergido em tampão de corrida (Tris-base 125 mM, glicina 1,25 M e SDS 0,1% (m/v), pH 8,3). Para os experimentos do planejamento experimental, foram aplicados 40 µL de amostra em cada poço do gel e a corrida foi realizada por 1 hora a 150 V. Para os outros géis, 30 µg de proteínas foram aplicadas em cada poço. O gel foi corado com nitrato de prata de acordo com o protocolo descrito na literatura (OAKLEY *et al.*, 1980).

#### **4.4.5. Determinação da concentração de proteínas da célula hospedeira (HCP)**

Para a determinação da concentração de proteínas da célula hospedeira, foi utilizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) comercial: KRIBIOLISA Chinese Hamster Ovary HCP ELISA da empresa KRISHGEN BioSystems (Índia). O procedimento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante.

#### **4.4.6. Determinação da concentração de DNA residual**

A concentração de DNA residual da célula hospedeira foi determinado pelo ensaio de fluorimétrico comercial Qubit<sup>®</sup> dsDNA BR Assay Kit da empresa Invitrogen (EUA). Foi utilizado o fluorímetro próprio para o ensaio (Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer) também da empresa Invitrogen (EUA). O procedimento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante (análises realizadas no laboratório LATEV/Bio-Manguinhos/Fiocruz).

#### **4.4.7. Determinação do teor de endotoxinas**

O teor de endotoxinas foi realizado pelo método cinético quantitativo LAL – *Limulus Amebocyte Lisate* (Kinetic-QCL<sup>™</sup> da empresa Lonza). O ensaio foi realizado pelo departamento de controle de qualidade de Bio-Manguinhos/Fiocruz de acordo com o protocolo abaixo.

Em uma microplaca de 96 poços foram aplicados 100 µL das amostras da purificação previamente diluídas, das amostras padrão de endotoxinas, controle positivo e branco. Logo após, a microplaca foi incubada a 37°C por 10 minutos. Durante a incubação o reagente Kinetic-QCL<sup>™</sup> foi reconstituído com 2,6 mL do reagente LAL dissolvido em água. A placa foi removida da incubação e com o uso de uma pipeta multicanal foram adicionados 100 µL da mistura contendo o reagente LAL e o reagente Kinetic-QCL<sup>™</sup> em cada poço da microplaca (a adição precisa ser realizada o mais rápido possível evitando a formação de bolhas). A leitura da microplaca foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm.

O método consiste na ativação de uma pró-enzima do lisado de *Limulus amebocyte* catalisada por endotoxinas de bactérias Gram-negativas. A taxa inicial de

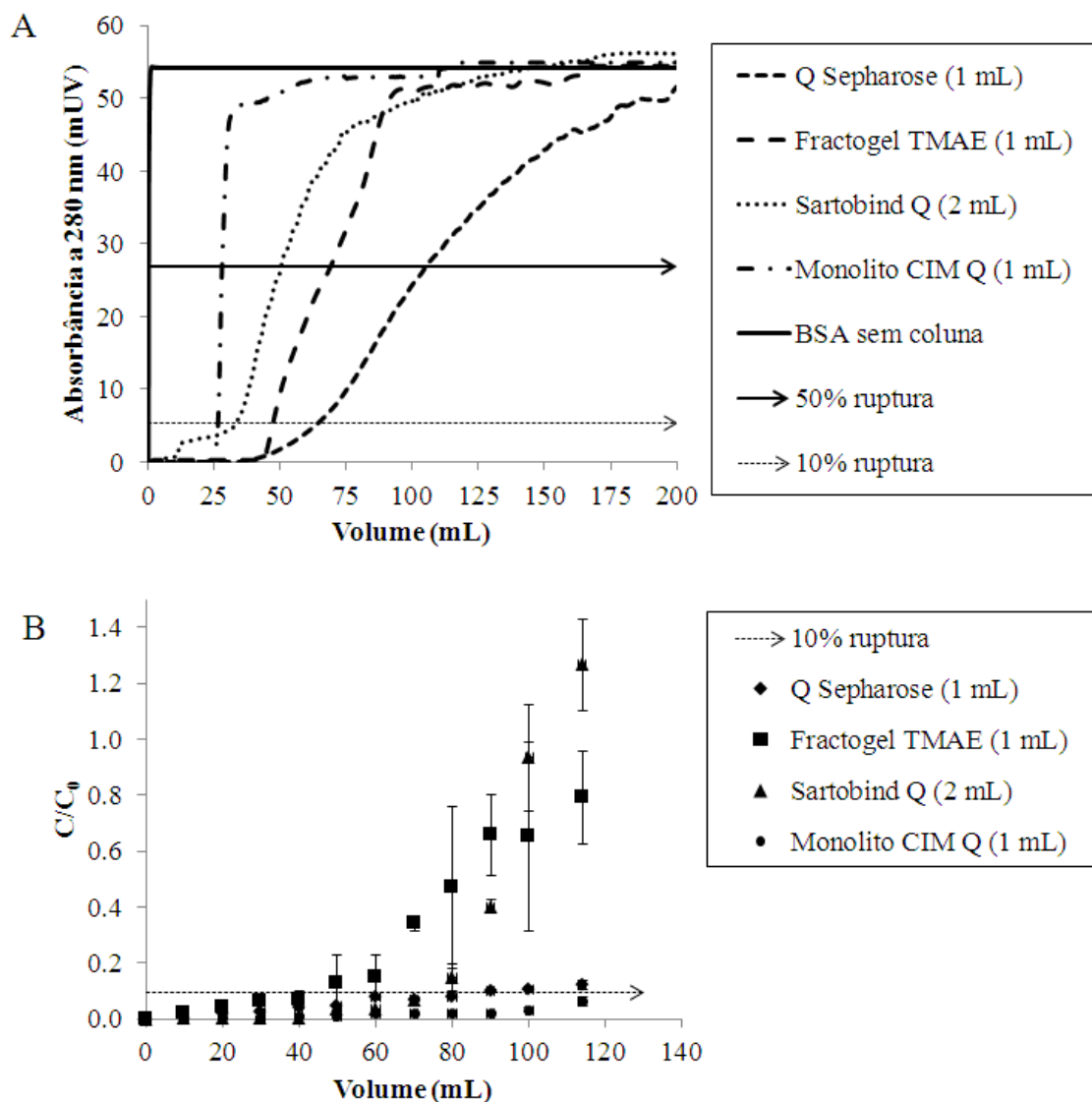
ativação é controlada pela concentração de endotoxinas. A enzima ativada catalisa a reação de clivagem do substrato (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA em Ac-Ile-Glu-Ala-Arg + pNA). A liberação do pNA (p-nitroanilina) emite coloração que pode ser lida em espectrofotômetro a 405 nm após um tempo de reação. A concentração de endotoxinas pode ser calculada através de uma curva padrão com quantidades conhecidas de endotoxinas.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Etapa de captura**

#### **5.1.1. Avaliação da capacidade adsortiva dinâmica de diferentes materiais para cromatografia de troca aniônica**

A capacidade adsortiva dinâmica de materiais cromatográficos geralmente é avaliada com proteínas modelo, como albumina do soro bovino (BSA), ou com a proteína de interesse purificada. Além disso, alguns trabalhos somente avaliam a capacidade estática dos materiais, porém neste caso o efeito difusivo é desprezível e somente é útil para entender o tipo de equilíbrio da isoterma de adsorção (MELTER *et al.*, 2008). Neste trabalho, a proposta foi avaliar a capacidade dinâmica de quatro diferentes materiais de troca aniônica (monolito CIM<sup>®</sup> Q, membrana Sartobind<sup>®</sup> Q, resina Sepharose<sup>®</sup> Q FF e resina Fractogel<sup>®</sup> TMAE), porém em relação ao FIXr presente no sobrenadante de células CHO. Em um processo real, na etapa de captura a presença de contaminantes tem extrema influência na capacidade dinâmica da proteína de interesse. Nesta etapa, foi utilizado o lote de sobrenadante de células CHO de número 1 (produção em batelada). Após uma filtração com uma membrana de 0,22 µm de tamanho de poro, o sobrenadante foi diretamente injetado nos materiais adsortivos em questão, sendo que para a membrana e o monolito, a vazão foi de 5 mL/min e, para as resinas, de 1 mL/min. As capacidades dinâmicas para o FIXr dos materiais avaliados foram determinadas considerando 10% de ruptura, ou seja, quando a concentração de FIXr no efluente correspondia a 10% da concentração de FIXr na amostra injetada. A concentração de FIXr foi dosada por ELISA e em alguns casos o FIXr também foi monitorado por atividade. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.1 e na Tabela 5.1.



**Figura 5.1.** Curvas de saturação dinâmica dos materiais para cromatografia de troca aniônica. (A) curvas com BSA; (B) curvas em relação ao FIXr presente no sobrenadante de células CHO (análise em concentração mássica de FIXr por ELISA). As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n=2).

**Tabela 5.1.** Capacidades adsorptivas dinâmicas dos materiais avaliados.

Materiais	Volume de material (mL)	Vazão (mL/min)	Capacidade adsorptiva dinâmica (mg de proteína/mL de material)			
			rFIX no sobrenadante	BSA <sup>a</sup>		BSA pelos fornecedores
				10% de ruptura	50% de ruptura	
Monolito CIM <sup>®</sup> Q	1,02	5	4,60 ± 0,14	25 ± 0 <sup>b</sup>	27 ± 0	> 20
Sartobind <sup>®</sup> Q	2,00 <sup>c</sup>	5	1,67 ± 0,28	18 ± 6	33 ± 12	29
Q Sepharose <sup>®</sup> FF	1,00	1 <sup>e</sup>	3,70 ± 0,07	69 ± 1	113 ± 1	120 <sup>d</sup>
Fractogel <sup>™</sup> TMAE	1,00	1 <sup>e</sup>	2,00 ± 0,49	44 ± 2	67 ± 2	100

<sup>a</sup> Em tampão Tris 20mM, pH 7.5 (membrana e monolito) e tampão Tris 50mM, pH 8.3 (resinas).

<sup>b</sup> Os desvios correspondem ao desvio padrão (n=2).

<sup>c</sup> 75 cm<sup>2</sup>.

<sup>d</sup> HSA (albumina humana).

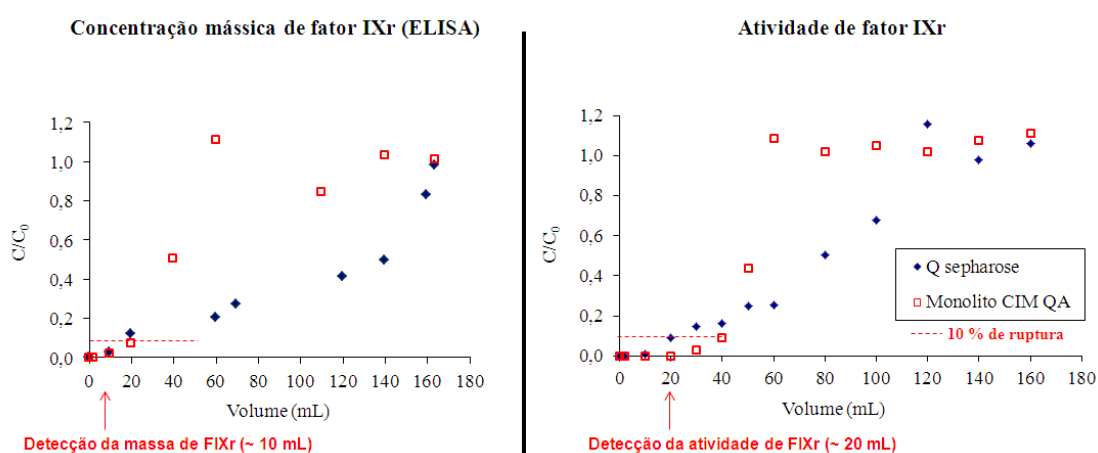
<sup>e</sup> Velocidade superficial de 300 cm/h.

A capacidade adsorptiva dinâmica para BSA também foi determinada (Figura 5.1A), com o intuito de comparar com as capacidades informadas pelos fornecedores. Os resultados obtidos mostraram valores similares aos obtidos pelos fornecedores somente para o monolito CIM<sup>®</sup> Q e para a membrana Sartobind<sup>®</sup> Q. Os valores encontrados para as resinas Q Sepharose<sup>®</sup> FF e Fractogel<sup>®</sup> TMAE foram inferiores aos obtidos pelos fornecedores. O mesmo foi observado por STABY *et al.* (2000) que obtiveram capacidades adsorptivas dinâmicas de 54 mg/mL para a Q Sepharose<sup>®</sup> e 28 mg/mL para o Fractogel<sup>®</sup> TMAE considerando 10% de ruptura, ou seja, trata-se de resultados bem inferiores aos informados pelos fornecedores (120 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente). Provavelmente, isto ocorreu pelo fato de as resinas cromatográficas sofrerem variabilidade devido ao empacotamento do gel. Também foi possível observar a menor diferença entre as capacidades dinâmicas em 10% e em 50% da curva de ruptura para os materiais que possuem transporte de massa convectivo (monolito e membrana). Nestes casos, a curva de saturação dinâmica destes materiais é mais inclinada, o que não ocorre com materiais cujo transporte difusivo é predominante (resinas), devido à dificuldade que a proteína tem em acessar os sítios adsorptivos no interior dos poros das partículas. Além disso, o desempenho das resinas cromatográficas é dependente do fluxo aplicado (KNUDSEN *et al.*, 2001; PODGORNIK *et al.*, 2004).

Em relação à capacidade adsortiva dinâmica para o FIXr, injetando-se o sobrenadante de células CHO produtoras de FIXr, o monolito CIM<sup>®</sup> Q apresentou o melhor resultado dentre os materiais avaliados ( $4.60 \pm 0.14$  mg de FIX/mL de material), apesar de não ter ocorrido o mesmo nos ensaios com BSA.

Em relação à diferença de capacidade entre o monolito e a membrana observada neste trabalho, o monolito possui uma densidade de ligantes maior do que a membrana, o que explica a superioridade do monolito no caso destes dois materiais convectivos testados.

O valor encontrado para a resina Q Sepharose<sup>®</sup> FF foi o mais próximo ao obtido para o monolito CIM<sup>®</sup> Q. Portanto, o ensaio foi repetido mais uma vez para estes dois materiais, porém determinando-se nas amostras a concentração mássica e também em termos de atividade. As curvas de saturação dinâmica e os valores obtidos podem ser visualizados na Figura 5.2 e Tabela 5.2, respectivamente.



**Figura 5.2.** Curvas de saturação dinâmica da Q Sepharose<sup>®</sup> FF e do monolito CIM<sup>®</sup> em relação ao FIXr presente na sobrenadante.

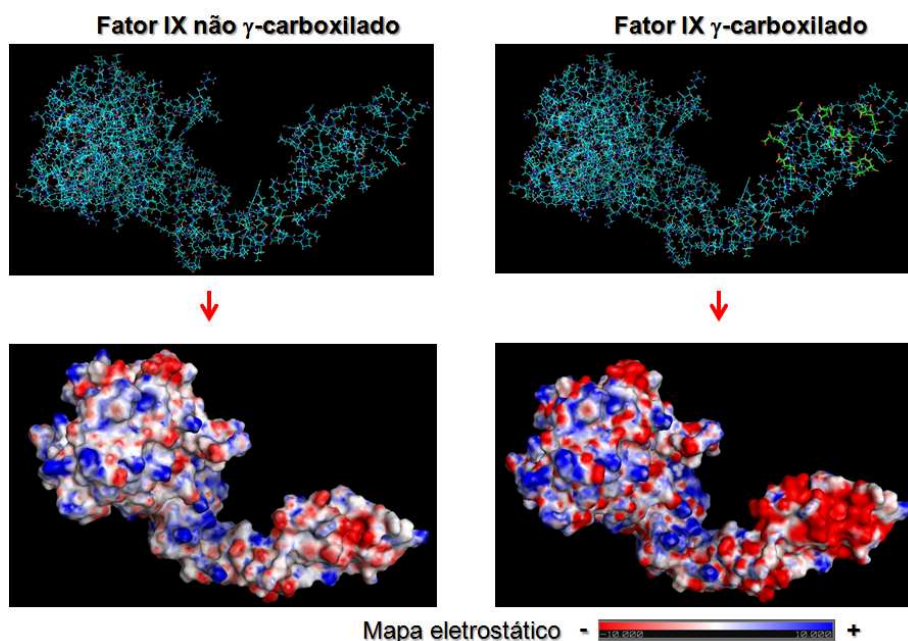
**Tabela 5.2.** Capacidades adsorptivas dinâmicas da resina Q Sepharose<sup>®</sup> e do monolito CIM<sup>®</sup> Q para o FIXr presente no sobrenadante em massa e atividade.

Materiais	Massa de fator IX (mg/mL de material)	Atividade de fator IX (UI/mL de material)
Q Sepharose <sup>®</sup> FF	3,6 ± 0,1	257 ± 23
Monolito CIM <sup>®</sup> Q	4,4 ± 0,2	516 ± 74

Nestes novos experimentos, valores equivalentes aos anteriores foram encontrados em relação à capacidade dinâmica em massa (3,6 e 4,4 mg de FIXr/mL de material, para a resina Q Sepharose<sup>®</sup> FF e o monolito CIM<sup>®</sup> Q, respectivamente). Contudo, em relação à atividade, a capacidade adsorptiva dinâmica do monolito foi o dobro (257 UI/mL para a Q Sepharose e 516 UI/mL para o monolito). Apesar de a resina Q Sepharose<sup>®</sup> possuir densidade de ligantes maior, o tamanho dos poros e o efeito difusivo são determinantes no desempenho. Outro detalhe observado neste experimento foi o fato de o FIXr ter sido detectado por ELISA antecipadamente à sua atividade. Provavelmente, existem duas formas de FIXr no sobrenadante, moléculas funcionais (com a presença da  $\gamma$ -carboxilação em todos os resíduos de ácido glutâmico) e não funcionais (sem a  $\gamma$ -carboxilação), já que as células animais podem não ser capazes de realizar esta modificação pós-traducional (essencial para a atividade do FIXr) em todas as moléculas de FIXr produzidas devido à limitação no processamento do grande número de moléculas recombinantes produzidas (KAUFMAN *et al.*, 1986; HALLGREN *et al.*, 2002; WAJIH *et al.*, 2005). De fato, a ausência da  $\gamma$ -carboxilação causa significativas modificações eletrostáticas na estrutura do FIXr, como pode ser visualizado na Figura 5.3 em uma simulação da estrutura eletrostática do FIX bovino (73% de similaridade com o FIX humano) com e sem a  $\gamma$ -carboxilação. A molécula  $\gamma$ -carboxilada torna-se muito mais negativa, portanto espera-se uma maior afinidade por ligantes positivos, como é o caso do amônio quaternário (Q) utilizado nestes experimentos. A maior densidade de cargas negativas no FIX  $\gamma$ -carboxilado levaria, portanto, a uma interação mais forte com os ligantes, explicando o retardamento da detecção de atividade e a maior capacidade dinâmica verificada em termos de atividade.



Não foi possível simular o ponto isoelétrico (PI) do FIX não  $\gamma$ -carboxilado, porém uma alteração no PI da molécula é uma hipótese provável devido à diferença na densidade de cargas entre as duas estruturas. A diferença na detecção do FIX por ELISA e por atividade pode, também, ter sido observada devido à sensibilidade dos ensaios, já que o ensaio de atividade normalmente possui menor sensibilidade do que o ELISA.



**Figura 5.3.** Mapa eletrostático do fator IX bovino com e sem a  $\gamma$ -carboxilação (mapa realizado pelo prof. Diego Enry B. Gomes, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ).

BRANOVIC *et al.* (2000) avaliaram a capacidade dinâmica do monolito CIM Q para o FIX derivado do plasma, porém utilizando um concentrado de FIX que já havia sido purificado parcialmente, e obtiveram o valor de  $1983 \pm 120$  UI de FIX/mL de monolito. Este resultado foi cerca de quatro vezes superior ao obtido neste trabalho, o que certamente está relacionado à co-adsorção de contaminantes do sobrenadante. KRAUSER *et al.* (1991) compararam a capacidade adsortiva dinâmica de membranas e resinas de afinidade de azul de cibacron, aplicando a enzima malato desidrogenase pura e em presença de contaminantes do extrato de *E. coli*, sendo que a capacidade obtida foi reduzida cerca de 70 vezes quando a enzima foi aplicada junto com o extrato bacteriano (KRAUSE *et al.*, 1991). Portanto, dependendo do tipo de matriz, do tipo de ligante e dos contaminantes (proteínas do plasma, extrato bacteriano, sobrenadante de células animais, etc.) presentes na amostra, a diferença entre a capacidade adsortiva dinâmica

da proteína pura e em presença de contaminantes pode ser muito elevada. Além disso, a injeção de uma mistura complexa nos leitos cromatográficos pode ter acarretado alguns eventos que justificam as diferenças de capacidade observadas. Primeiramente, a velocidade de penetração das proteínas nos poros mais internos das resinas, onde está localizada a maior parte dos sítios adsorptivos é muito lenta. Segundo, cada proteína tem características difusionais próprias, com isso proteínas menores conseguem penetrar mais rápido nos poros, deslocando outras mais lentas, mesmo que a mais lenta tenha maior interação com o ligante imobilizado, como observado em artigos publicados (EL-SAYED & CHASE, 2010; HUBBUCH *et al.*, 2002). Isto não ocorre em materiais monolíticos, sendo a cromatografia por deslocamento (na qual moléculas com maior afinidade deslocam moléculas com menor afinidade em condições de saturação), provavelmente, mais previsível em comparação ao mesmo processo empregando resinas (BRGLES *et al.*, 2011; SRAJER *et al.*, 2012). Outra possibilidade é o fato de proteínas maiores estarem adsorvendo na superfície das partículas e, com isso, bloqueando o acesso do FIXr aos poros mais internos das resinas.

### **5.1.2. Avaliação da eluição por afinidade ao íon $\text{Ca}^{2+}$ utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q**

#### **5.1.2.1. Planejamento experimental da etapa de eluição**

Foi realizado um planejamento experimental fatorial completo com 3 variáveis e 3 réplicas no ponto central para investigar as melhores condições para eluir o rFIX do monolito CIM Q em presença do íon  $\text{Ca}^{2+}$ . O pH, a concentração de  $\text{CaCl}_2$  e a concentração de NaCl foram selecionadas como variáveis do planejamento. As respostas obtidas foram rendimento em atividade, rendimento em massa, fator de purificação e análise qualitativa da pureza por SDS-PAGE. Os níveis de cada variável utilizados em cada ensaio e as respostas obtidas estão descritos nas Tabelas 5.3 e 5.4. O lote de sobrenadante utilizado neste experimento foi o de número 1 (produção em batelada). As condições de adsorção foram mantidas constantes em todos os experimentos. Nesta etapa, o sobrenadante foi diluído três vezes em tampão Tris-HCl 50 mM, 0,15 M NaCl, pH 8, antes de ser injetado no monolito de 1 mL em uma quantidade que não era suficiente para saturar o monolito, para que não houvesse perda no momento da injeção da amostra. O efeito de íons  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a dessorção de rFIX de

monolitos ainda não foi descrito na literatura. É provável que, devido à ausência do transporte difusivo, as condições necessárias para eluir o rFIX por afinidade ao cálcio sofra alguma alteração, já que foram observadas diferenças significativas no desempenho de resinas e monolitos tanto na etapa de adsorção, como descrito no tópico anterior e em publicações, como na etapa de eluição (BRANOVIC *et al.*, 2003). Por exemplo, quando as mesmas condições foram empregadas no processo de purificação do FIX derivado do plasma, o monolito CIM<sup>®</sup> DEAE apresentou melhor separação de contaminantes do que a resina DEAE Sepharose<sup>®</sup>, já que, com a utilização da resina, contaminantes, como o fator X e a vitronectina, permaneceram no eluído junto com o FIX (BRANOVIC *et al.*, 2003)

**Tabela 5.3.** Níveis das variáveis do planejamento experimental.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH	6,5	7,5	8,5
[CaCl <sub>2</sub> ] (mM)	15	30	45
[NaCl] (mM)	0	50	100

**Tabela 5.4.** Planejamento experimental para avaliar a etapa de eluição do FIXr por afinidade aos íons Ca<sup>2+</sup> utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q.

Ensaio	pH	[Ca <sup>2+</sup> ]	[NaCl]	R <sub>ativ.</sub> (%)	R <sub>massa</sub> (%)	FP
1	-1	-1	-1	11,9	12,0	254
2	+1	-1	-1	1,3	10,3	378
3	-1	+1	-1	83,7	41,9	305
4	+1	+1	-1	76,8	31,4	334
5	-1	-1	+1	83,2	69,4	138
6	+1	-1	+1	86,1	48,0	179
7	-1	+1	+1	97,3	93,6	86
8	+1	+1	+1	104,5	97,5	132
9	0	0	0	87,9	39,6	270
10	0	0	0	91,6	37,8	253
11	0	0	0	82,9	33,1	179

R<sub>ativ.</sub> = Rendimento em atividade

R<sub>massa</sub> = Rendimento em massa

FP = Fator de Purificação

Primeiramente, é possível observar que o rendimento em atividade foi maior do que o rendimento em massa na maioria dos experimentos, exceto nos experimentos 1 e 2, onde o rendimento em ambos os casos foi muito baixo. Este comportamento era esperado, já que, como foi mencionado anteriormente, parte do FIXr produzido por células CHO não é funcional devido à limitação da célula em realizar a  $\gamma$ -carboxilação (KAUFMAN *et al.*, 1986; HALLGREN *et al.*, 2002; WAJIH *et al.*, 2005). Contudo, é a presença desta modificação pós-traducional que faz com que a molécula do FIX interaja com os íons  $\text{Ca}^{2+}$  em solução (YAN, 1991). Portanto, como muitas moléculas de FIXr (normalmente a maioria), não interagem com os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , esta diferença de rendimento é factível já que o ensaio de ELISA reconhece todas as moléculas de FIXr, enquanto que o ensaio de atividade só considera as moléculas funcionais. Por este motivo, a adição dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  ao tampão de eluição tem como objetivo selecionar as moléculas de FIXr funcionais. O fato de os rendimentos em massa e em atividade, para os experimentos 7 e 8 não terem sido muito diferentes ocorreu provavelmente devido à influência da condutividade. Como é possível observar nos cromatogramas da Figura 5.4, a combinação dos níveis das variáveis gerou tampões com condutividade acima da condutividade do tampão de equilíbrio (17,0 mS/cm), 18,5 mS/cm para o ensaio 8 e 20,0 mS/cm para o ensaio 7. Isto acarretou em dessorção de proteínas com afinidade aos íons cálcio e também de proteínas que não tinham afinidade a este íon simplesmente por enfraquecimento da interação eletrostática causado pelo aumento da condutividade. Provavelmente, o FIXr não  $\gamma$ -carboxilado adsorveu fracamente ao monolito e um mínimo aumento de condutividade fez com que todo o FIXr não  $\gamma$ -carboxilado fosse co-eluído com o FIXr funcional igualando desta forma os rendimentos em atividade e massa. Com base no gel de SDS-PAGE (Figura 5.4), pode-se observar uma maior proporção de contaminantes nas raias correspondentes aos experimentos 7 e 8, o que está de acordo com os maiores picos observados nos cromatogramas destes experimentos.

Alguns autores utilizaram um tampão Tris-HCl 50 mM, 0,2 M NaCl, pH 7-8 (condutividade ~22 mS/cm) para lavar a resina Q Sepharose<sup>®</sup> antes de eluir o FIXr funcional ou por afinidade ao cálcio ou por simples elevação da condutividade, aplicando um tampão Tris-HCl 50 mM, 0,3 M NaCl, pH 7-8 (GILLIS *et al.*, 1997; HARRISON *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2012). Esta lavagem com NaCl 0,2 M foi

suficiente para remover o FIXr não  $\gamma$ -carboxilado da resina Q Sepharose<sup>®</sup>. Contudo, os resultados do presente trabalho mostraram que uma condutividade de 18,5 mS/cm já é suficiente para remover não só o FIXr  $\gamma$ -carboxilado e não  $\gamma$ -carboxilado, como também outros contaminantes adsorvidos na matriz monolítica. Além disso, ensaios prévios ao planejamento experimental mostraram que uma lavagem com o tampão Tris-HCl 50 mM, 0,2 M NaCl, pH 7-8 também remove parte do FIXr funcional quando o monolito CIM<sup>®</sup> Q é utilizado. Isto mostra que o material cromatográfico utilizado tem influência significativa nas condições químicas utilizadas em cromatografias preparativas.

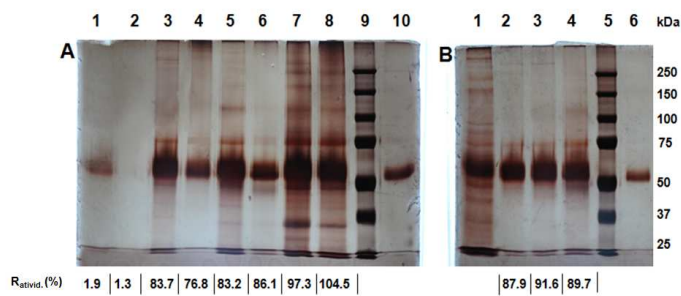
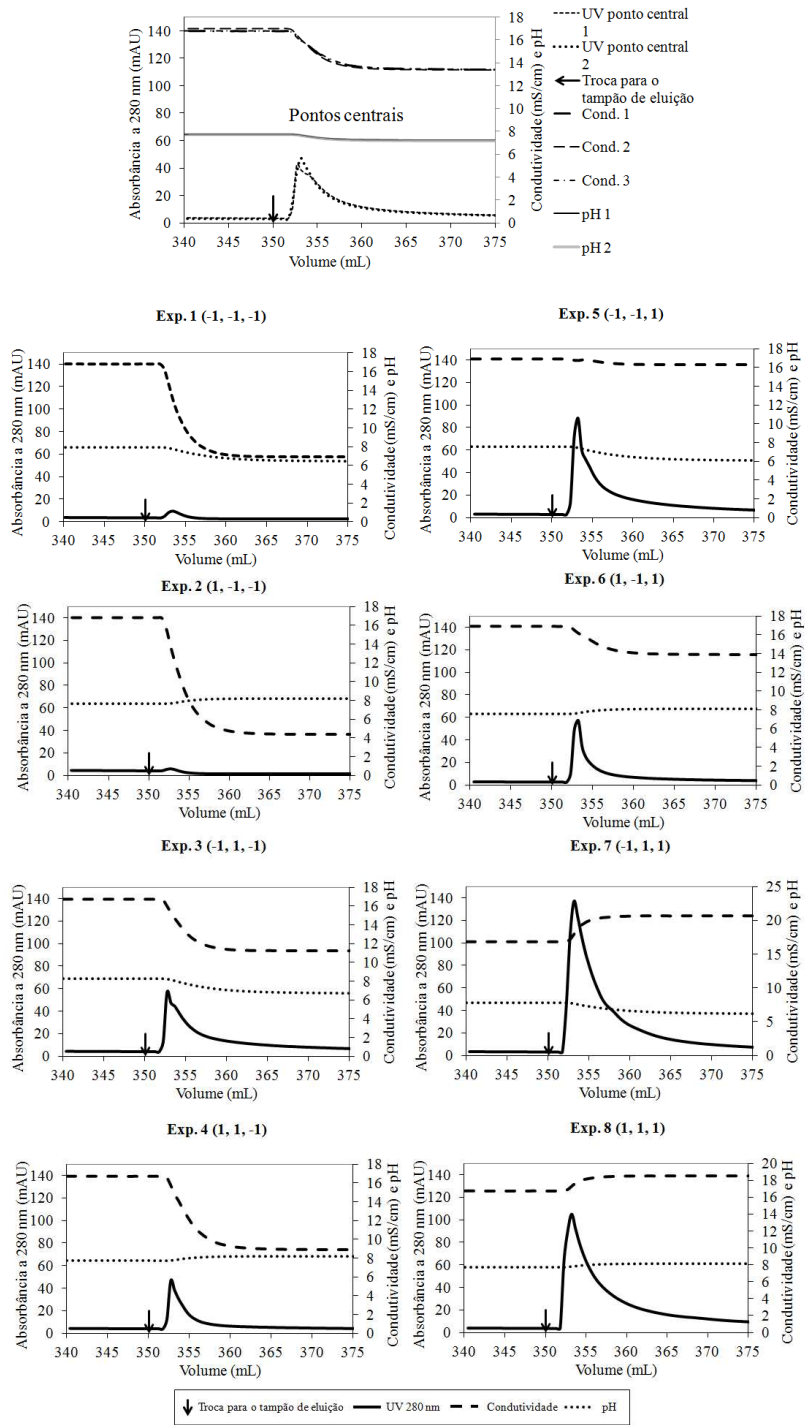


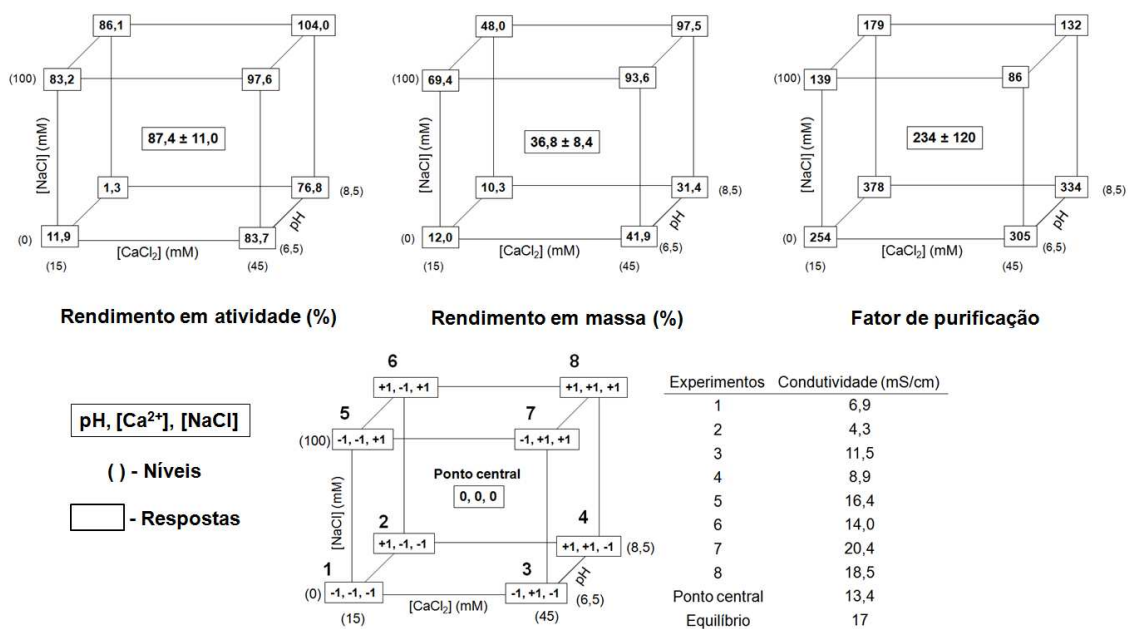
Figura 5.4. Legenda na página seguinte.

**Figura 5.4.** Cromatogramas da etapa de eluição dos experimentos do planejamento experimental. Eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) da fração do eluído: raias 1A-8A (experimentos 1 a 8, respectivamente); raias 9A e 5B (marcador de massa molar); raias 10A e 6B (padrão de FIX derivado do plasma); raia 1B (sobrenadante de células CHO produtoras de FIXr) e raias 2B-4B (replicatas do ponto central).

Com o objetivo de auxiliar na análise de dados do planejamento experimental, foram elaborados gráficos de cubos (ANTONY, 2003). Estes gráficos podem ser visualizados na Figura 5.5 para todas as respostas obtidas (rendimento em massa, rendimento em atividade e fator de purificação). Várias combinações obtiveram rendimentos acima de 80% em atividade, satisfatório para uma etapa de troca aniônica. Contudo, em dois experimentos (1 e 2), nos quais havia apenas 15 mM de  $\text{CaCl}_2$ , a condutividade resultante não foi suficiente para remover grande quantidade de FIXr do monolito. A pequena diferença de condutividade nestes dois experimentos foi provavelmente devido ao HCl usado no ajuste do pH. No experimento 1, ajustou-se para 6,5 e, no experimento 2, o pH foi ajustado para 8,5, sendo neste caso adicionado menos HCl ao tampão, o que levou a uma condutividade mais baixa e um menor valor de rendimento em atividade (1,3 %). ARTUR *et al.* (2013) utilizaram um tampão com apenas 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 0,18 M de NaCl para eluir o FIXr de uma resina de troca aniônica. Isto mostra que uma baixa concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  é suficiente para causar modificação conformacional na estrutura do FIXr, porém para dessorver o FIXr com alto rendimento é necessário aumentar a condutividade, podendo este papel ser realizado pelo cloreto de sódio ou como mostrado neste trabalho, pelo próprio  $\text{CaCl}_2$ . Assim, o excesso de  $\text{CaCl}_2$  somente teria a função de aumentar a condutividade do tampão. As combinações 7 e 8, como comentado anteriormente, provocaram a co-eluição de grande quantidade de contaminantes, incluindo o FIXr não funcional, e isto foi refletido no fator de purificação, sendo os mais baixos dentre todos (86 e 132 para os experimentos 7 e 8, respectivamente).

As combinações 3 e 4 foram as que obtiveram rendimentos em atividade considerados bons, próximos a 80%, e fatores de purificação elevados (>300). Além disto, o rendimento em massa foi baixo, indicando que, provavelmente, há predominância do FIXr funcional no eluído. Com base nos resultados obtidos com a combinação 4, pode-se dizer que 8,9 mS/cm é suficiente para dessorver o FIXr do monolito CIM<sup>®</sup> Q em presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  com rendimento satisfatório. Apesar da

condutividade da combinação 4 ter sido suficiente, a condição 3 foi escolhida para realização dos experimentos de aumento de escala e análises subsequentes, pois o perfil de SDS-PAGE foi parecido e os rendimentos em atividade e em massa foram mais altos.

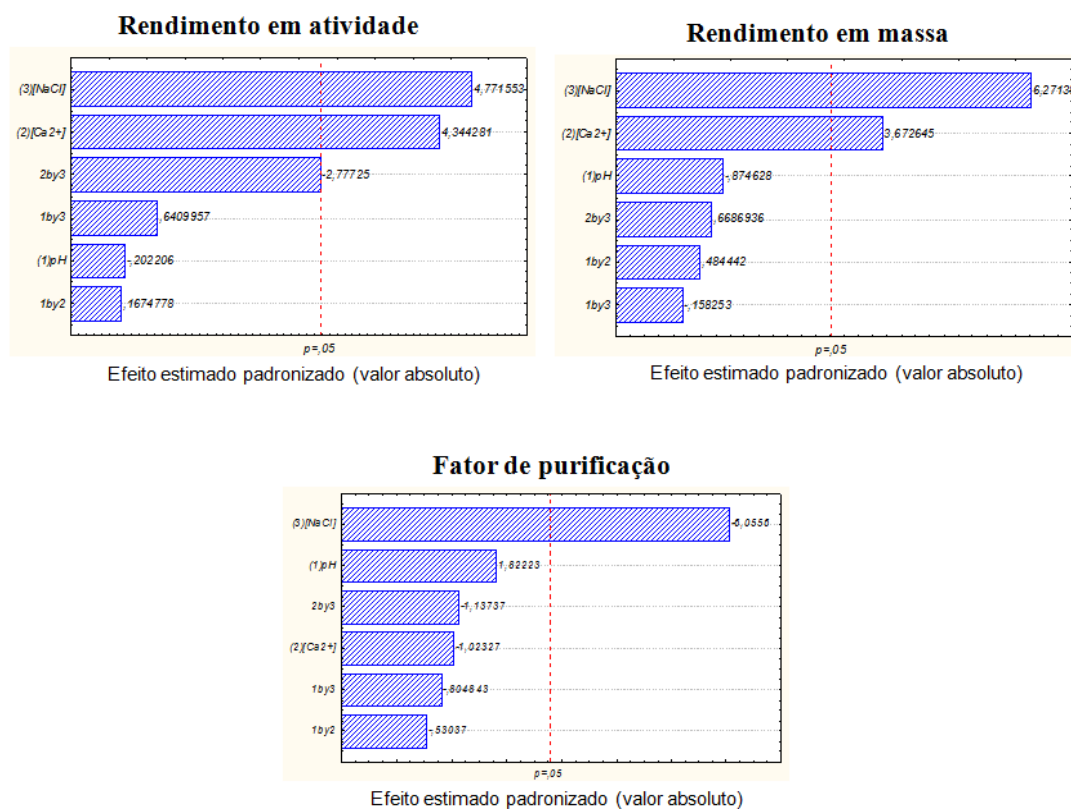


**Figura 5.5.** Diagramas de cubos para cada resposta do planejamento experimental.

Os dados do planejamento experimental também foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e diagramas de Pareto foram obtidos com o objetivo de verificar o nível de significância de cada variável e de efeitos combinados (ANTONY, 2003). Os erros obtidos com os pontos centrais foram calculados com 95% de confiança através do teste t-student. Com base nos diagramas de Pareto (Figura 5.6), é possível observar que, para todas as respostas, somente as variáveis concentração de  $\text{CaCl}_2$  e concentração de  $\text{NaCl}$  individualmente se mostraram estatisticamente significativas, provavelmente pelo fato destas variáveis contribuírem de forma significativa para o aumento da condutividade. O pH foi a única variável sem significância estatística, o que significa dizer que a faixa de pH avaliada (6,5 – 8,5) não causou nenhuma interferência relevante para o resultado final de nenhuma das respostas avaliadas. Provavelmente, esta variação de pH não gerou alterações significativas na carga superficial do FIXr. DISMER *et al.* (2008) avaliaram o efeito do pH na interação da lisozima com resinas de troca catiônica, como SP Sepharose<sup>®</sup> FF e SP Sepharose<sup>®</sup> XL. Eles observaram que, na faixa de pH entre 7 e 9, a carga superficial da lisozima



diminuiu lentamente e a condutividade para dessorver a proteína foi praticamente a mesma nesta faixa de pH. O mesmo pode ter acontecido com o FIXr. Outro fator que pode ter contribuído para que o efeito do pH fosse irrelevante é o fato de ser difícil a geração de uma variação de pH controlada na eluição de sistemas cromatográficos, para que seja possível medir o efeito do pH corretamente (AHAMED *et al.*, 2008). Portanto, fatores como estrutura do material, densidade de ligantes, interação proteína-proteína e orientação da proteína estão envolvidos direta ou indiretamente no comportamento da interação proteína-ligante em sistemas cromatográficos (DISMER *et al.*, 2008; DISMER & HUBBUCH, 2007; LI & PINTO, 1994; BROOKS & CRAMER, 1992). Com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que é extremamente difícil analisar a interação entre um ligante e uma proteína em uma matriz cromatográfica devido ao elevado número de eventos que podem ocorrer no sistema.



**Figura 5.6.** Diagramas de Pareto para cada resposta do planejamento.

### **5.1.2.2. Ampliação de escala para a coluna monolítica com volume de 8 mL**

A ampliação de escala da coluna monolítica de 1 mL para a de 8 mL foi avaliada com a utilização do segundo lote de sobrenadante de células CHO produtoras de FIXr. Este lote foi proveniente de um cultivo em batelada alimentada, que atingiu uma concentração celular de aproximadamente  $20 \times 10^6$  cel/mL, porém no qual, no momento da colheita, a viabilidade era de 70%. Estas informações serão importantes para a discussão dos resultados a seguir.

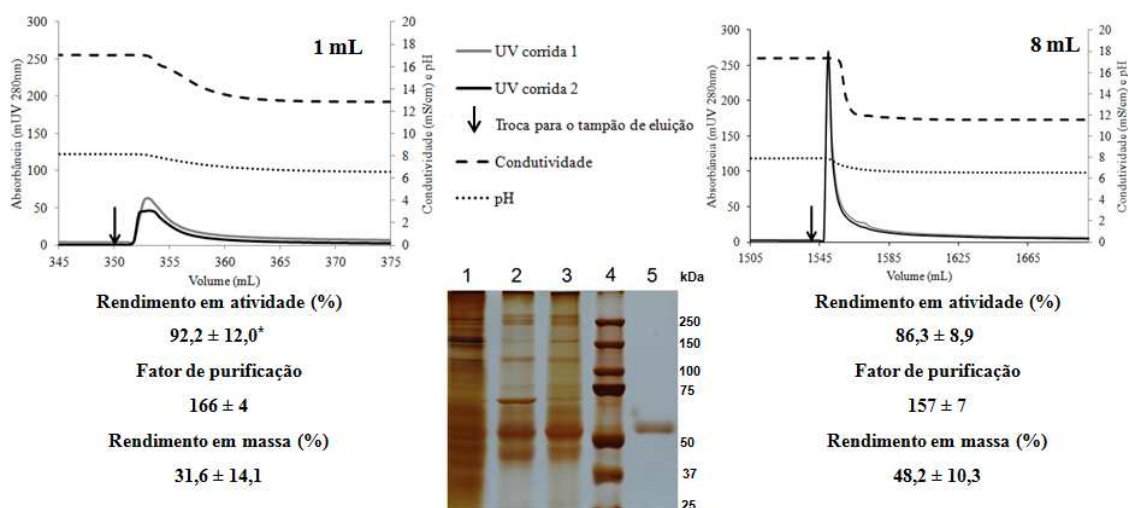
#### **5.1.2.2.1. Desempenho em termos de rendimento e fator de purificação**

As colunas monolíticas com base polimérica de polimetacrilato são construídas em moldes e podem ser fabricadas em várias escalas. PODGORNIK *et al.* (2004) demonstraram que a produtividade aumentou linearmente e a separação de três proteínas modelo foi similar quando a escala foi aumentada de 8 mL até 8 L. Outros autores obtiveram a mesma reprodutibilidade ao aumentar a escala de colunas monolíticas CIM<sup>®</sup> DEAE aplicadas ao processo de purificação do FIX derivado do plasma.

Para o aumento de escala da etapa de captura do processo de purificação do FIXr proposto neste trabalho, a condição de eluição do ensaio 3 do planejamento experimental foi selecionada para prosseguimento das análises pelos motivos justificados no item anterior. Contudo, para comparar o desempenho do processo nas duas escalas foram realizados novos ensaios cromatográficos com a coluna de 1 mL devido ao fato do lote de sobrenadante ter sido alterado. Os ensaios nas duas escalas foram realizados com o mesmo lote de sobrenadante (lote 2) e em duplicata. O resultado pode ser visualizado na Figura 5.7, que mostra os cromatogramas e resume os resultados obtidos.

Pode-se observar que o processo de purificação do FIXr utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q foi reprodutível nas duas escalas avaliadas (colunas de 1 e 8 mL) em termos de fator de purificação, rendimento em atividade e massa e perfil do gel de SDS-PAGE. Contudo, o fator de purificação para a coluna de 1 mL foi menor do que o obtido durante os ensaios do planejamento experimental considerando a condição 3, e o menor

nível de pureza ficou evidente no perfil do gel de SDS-PAGE. Isto pode ser explicado pelo fato do sobrenadante utilizado nos experimentos de aumento de escala vir de um cultivo no qual a concentração de células estava cerca de três vezes maior e a viabilidade celular reduzida de 98% para 70%. Isto proporcionou um aumento no número de contaminantes devido ao grande número de células lisadas, levando à co-eluição de uma grande quantidade de outras proteínas. Apesar deste fato causado pela mudança no lote de amostra injetada pode-se dizer que o monolito CIM<sup>®</sup> Q apresentou excelente desempenho no aumento de escala da coluna de 1 para a coluna de 8 mL, podendo-se trabalhar com vazões de, no mínimo, 30 mL/min, em um equipamento convencional de bancada. Em operações industriais, a facilidade de ampliação de escala é considerada uma grande vantagem.



\* Desvio padrão

**Figura 5.7.** Resultados obtidos após o experimento de ampliação de escala. Cromatogramas do pico proveniente da eluição, resultados obtidos (monolito de 1 mL, vazão de 3,7 mL/min e monolito de 8 mL, vazão de 30 mL/min) e gel de poliácridamida: raia 1 (sobrenadante de células CHO); raia 2 (fração correspondente ao pico de eluição do monolito de 1 mL); raia 3 (fração correspondente ao pico de eluição do monolito de 8 mL); raia 4 (padrão de massa molar) e raia 5 (padrão de FIX derivado do plasma). Os valores mostrados representam a média e desvio padrão (n=2).

#### 5.1.2.2.2. Monitoramento do fator IX recombinante ativado (FIXra)

Um aspecto importante do processo de purificação do fator IX, recombinante ou derivado do plasma, é a quantidade de fator IX ativado (FIXa) presente no produto final. Altas concentrações de FIXa podem causar trombose, gerando, por exemplo, infarto do

miocárdio em pacientes que recebem concentrados de FIX para tratamento da hemofilia do tipo B (LOWE, 2001; CHOUDHARI *et al.*, 2013). No organismo o fator VII ativado (FVIIa) e o fator XI ativado (FXIa), em presença de fosfolípidos e íons  $\text{Ca}^{2+}$ , são responsáveis pela ativação do FIX durante o processo de coagulação sanguínea (RIDDEL *et al.*, 2007). Contudo, a ativação do FIX também pode ocorrer durante o processo de produção do FIXr. Existe apenas um artigo que descreve a ocorrência de ativação do FIXr produzido por células CHO durante o cultivo. Neste estudo, foi investigada a influência da concentração dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  no nível de ativação do FIXr e os resultados mostraram que o aumento da concentração destes íons, principalmente do  $\text{Ca}^{2+}$ , promove a ativação do FIXr, principalmente na fase de declínio celular. A concentração destes íons, considerada ótima pelos autores, por minimizar o efeito da ativação do FIXr, foi 0,5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  e 1 mM de  $\text{Mg}^{2+}$  (KIM *et al.*, 2009). Entretanto, a presença destes íons nos meios de cultura é importante para o crescimento celular. O sobrenadante utilizado no presente trabalho possuía  $0,10 \pm 0,04$  UI/mL de atividade do FIXa, o que corresponde a uma razão FIXa/FIXr de  $0,83 \pm 0,33$  % (atividade do FIXa pela atividade total do FIXr). Contudo, após a purificação com o monolito CIM<sup>®</sup> Q, o valor desta razão aumentou para  $1,94 \pm 0,08$  % (Tabela 5.5). Este dado sugere que as condições utilizadas neste trabalho para a etapa de captura do processo de purificação do FIXr estaria induzindo a conversão do FIXr em FIXa ou enriquecendo o eluído com moléculas de FIXa. Contudo, não há relatos na literatura do aumento dos níveis de FIXa durante processos de purificação nem decorrentes de afinidade por íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Também não existem relatos precisos do valor limite seguro para a razão FIXa/FIXr. Somente foi encontrado um trabalho, onde FIXr expresso no leite de porcos transgênicos foi purificado, sendo que, durante a discussão, foi citado que uma razão de 2,4 % seria o limite para não causar trombose em camundongos (SUN *et al.*, 2012). Apesar do aumento do nível de FIXa após a etapa de captura do processo de purificação do FIXr utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q no modo de eluição por afinidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , o valor permaneceu abaixo do valor descrito nesse artigo. Contudo, ensaios em animais são necessários para confirmar a segurança do produto.

**Tabela 5.5.** Monitoramento de FIXa na etapa de troca aniônica do processo utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q com eluição por afinidade ao íon Ca<sup>2+</sup>, empregando o lote 2 de FIXr (batelada alimentada) e o monolito de 8 mL.

Amostra	FIXr (UI/mL)	FIXa (UI/mL)	FIXa/FIXr (%)
Alimentação	3,97 ± 0,21*	0,03 ± 0,01	0,83 ± 0,33
Eluído	106 ± 23	2,05 ± 0,38	1,94 ± 0,08

\* Os erros correspondem ao desvio padrão (n=2).

### 5.1.2.2.3. Remoção de HCP e DNA residual

A presença de proteínas da célula hospedeira (HCP, sigla em inglês) é indesejável em produtos biofarmacêuticos, porque algumas proteínas contaminantes podem causar resposta imune em pacientes (DONEANU *et al.*, 2012; GUTIERREZ *et al.*, 2012). Da mesma forma DNA residual da célula hospedeira. O controle de HCP e DNA residual são, portanto, aspectos cruciais relacionados à pureza de um biofármaco (ICH, 1999).

Os resultados de redução de DNA e HCP na etapa de captura do processo de purificação do FIXr utilizando-se o monolito CIM<sup>®</sup> Q estão descritos na Tabela 5.6. Esta etapa cromatográfica resultou em uma redução de HCP de 1256 ± 176 vezes. Considerando que se trata apenas da primeira etapa do processo de purificação, este resultado é satisfatório. Na purificação da pentraxina PTX3 humana recombinante produzida em células CHO, foi obtida uma redução de 314 vezes após a etapa de captura realizada com a resina Q Sepharose<sup>®</sup> no modo de eluição por gradiente de concentração de NaCl (RIVIECCIO *et al.*, 2007).

Contudo, a quantidade total de HCP obtida após a primeira etapa, aplicada no presente trabalho permaneceu elevada (7499 ppm) em relação aos níveis recomendados pelo FDA (1-100 ppm) para o produto purificado final (WANG *et al.*, 2009; CHAMPION *et al.*, 2005). No entanto, o sobrenadante utilizado neste experimento de purificação foi proveniente do segundo lote (70% de viabilidade celular e 20 x 10<sup>6</sup> cel/mL), de modo que a alta concentração de células e a baixa viabilidade, como já foi

mencionado, acarreta na ampliação da gama de contaminantes do sobrenadante. Em um processo industrial, mesmo sendo operado em batelada alimentada, a etapa do cultivo seria finalizada antes, sob condições de viabilidade mais elevadas do que ocorreu neste lote, oriundo de etapa ainda de pesquisa do processo de cultivo propriamente dito.

Sabe-se que condições de cultivo podem interferir severamente no perfil de HCPs de uma amostra a ser purificada. JIN *et al.* (2010) avaliaram a influência de fatores relacionados com o cultivo celular de células CHO, como viabilidade celular, composição do meio, tipo de alimentação, velocidade de agitação e mudança de temperatura, no perfil de proteínas da célula hospedeira (HCP) no sobrenadante. Eles descreveram o fator viabilidade celular como o mais significativo para alterar o perfil de HCPs do sobrenadante, sendo esta diferença notada por eletroforese em gel de poliacrilamida de duas dimensões.

Em relação aos níveis de DNA residual da célula hospedeira, o monolito CIM<sup>®</sup> Q apresentou uma grande capacidade de redução de DNA (99,986 % ou 7782 vezes conforme Tabela 5.4). Contudo, a concentração por dose continua relativamente alta (610 ng de DNA/dose, considerando uma dose de 500 UI de FIXr). O exigido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, sigla em inglês) é de 10 ng de DNA residual por dose do biofármaco aplicada no paciente em um período de 24 horas (SUN *et al.*, 2012; SOFER & ZABRISKIE, 2000). O potencial de remoção de DNA residual foi explorado em algumas membranas de troca aniônica (Sartobind<sup>®</sup> Q, Mustang<sup>®</sup> Q e Chormasorb) e os resultados mostraram diferença de desempenho entre as membranas testadas e que a baixa concentração de NaCl combinado com altos valores de pH (em torno de 9) aumentam a capacidade de remoção do DNA residual (WEAVER *et al.*, 2013). Esta diferença em relação ao desempenho das membranas provavelmente está relacionada com a variabilidade na densidade de ligantes das membranas. O monolito CIM<sup>®</sup> mostrou ser um material com alta capacidade adsortiva, pelos resultados descritos no item 5.1.1. Um aumento de pH para aumentar a remoção de DNA provavelmente iria aumentar a adsorção de outros contaminantes prejudicando a pureza do eluído. Como esta é apenas a etapa de captura e o sobrenadante continha muito DNA residual devido à baixa viabilidade celular no momento da colheita, é mais pertinente remover o pouco de DNA residual remanescente com etapas cromatográficas subsequentes e otimizar o cultivo celular.

**Tabela 5.6.** Redução de HCP e DNA na etapa de troca aniônica do processo com a utilização do monolito CIM<sup>®</sup> Q com eluição por afinidade ao íon Ca<sup>2+</sup>, empregando o lote 2 de FIXr (batelada alimentada) e o monolito de 8 mL.

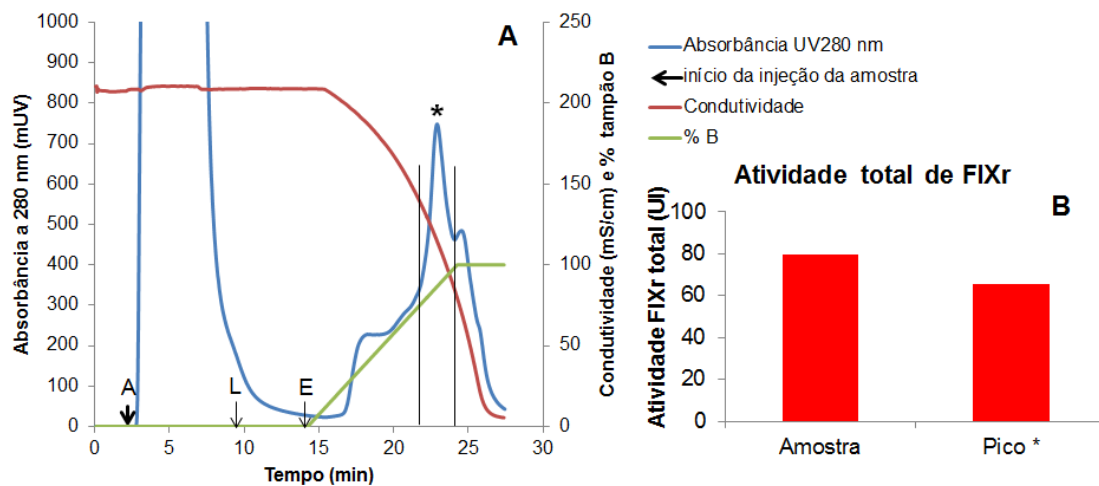
Amostra	FIXr (mg/mL)	HCP (ng/mL)	HCP (ng/mg FIX)	Fator de redução HCP	FIXr (UI/mL)	DNA* (ng/mL)	Volume (mL)	DNA (ng/dose)	Fator de redução DNA
Amostra alimentada	0,02	2,16 x10 <sup>5</sup>	9,42 x10 <sup>6</sup>	----	4,5	23763	440	2,64 x10 <sup>6</sup>	----
Amostra eluída	0,51	3793	7499	1256 ± 176**	106	122	10,5	575	7182 ± 1464**

\* A redução de DNA foi de 99,986 ± 0,002 %, concentração final de 122 ng/mL (considerando uma dose de 500 UI de FIX – 575 ng de DNA/dose).

\*\* Os erros correspondem ao desvio padrão (n=2).

### 5.1.3. Avaliação da etapa de captura utilizando a membrana Sartobind<sup>®</sup> Phenyl

O desempenho da etapa de captura também foi avaliado utilizando-se a membrana Sartobind<sup>®</sup> Phenyl, com o objetivo de comparar a mesma com a utilização do monolito CIM Q, com eluição por afinidade aos íons Ca<sup>2+</sup>, como primeira etapa do processo de purificação do FIXr. A amostra de sobrenadante foi previamente diluída para uma concentração de 1,8 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com o tampão Tris-HCl 50 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,2 M, pH 7,2. Após isto, observou-se a formação de grande quantidade de precipitado, provavelmente devido à precipitação de muitas proteínas em função da alta concentração de sulfato de amônio. Contudo, foi verificada, através de análise de atividade, que essa condição não é suficiente para precipitar o FIXr funcional, uma vez que a atividade do FIXr se manteve inalterada após a precipitação. Portanto, o sobrenadante de células CHO diluído com sulfato de amônio foi centrifugado para remoção do precipitado formado e filtrado em membrana de 0,2-0,4 µm de tamanho de poro antes da etapa cromatográfica. Após a injeção na membrana, a eluição foi realizada por gradiente linear do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,2. O cromatograma obtido pode ser visualizado na Figura 5.8A.



**Figura 5.8.** Cromatograma da etapa de captura do processo de purificação do FIXr utilizando-se a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* (A): A – alimentação da amostra, L – início da lavagem com tampão de equilíbrio e E – início do gradiente de eluição com o tampão B (Tris HCl 50 mM, pH 7). Gráfico da atividade total de FIXr recuperada no pico da eluição enriquecido de FIXr (B).

Para análise deste experimento, foram realizados ensaios de atividade do FIX e HCP. O rendimento do processo foi de 83 % em atividade, evidenciado pela atividade total obtida no pico assinalado do cromatograma (Figuras 5.8A e B). Contudo, a remoção de HCP foi inferior (55 vezes) na membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* em comparação ao monólito CIM<sup>®</sup> Q (1256 vezes) como primeira etapa do processo de purificação do FIXr. A Tabela 5.7 mostra os resultados. Devido à diferença de ordem de grandeza no desempenho de ambos os adsorventes no que diz respeito à remoção de HCP, decidiu-se prosseguir os trabalhos avaliando-se o uso da membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* como segunda etapa do processo de purificação, mantendo o monólito CIM Q como primeira etapa. Embora se saiba que o processo de purificação do FIXr utilizando a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* na etapa de captura ainda pode ser otimizado em relação às condições de eluição (por exemplo, eluição por degraus para melhorar a resolução dos picos no cromatograma), avaliou-se que seria mais válido investigá-lo tendo como alimentação a amostra eluída da troca aniônica. Não foram encontrados trabalhos na literatura que relatam o uso da cromatografia de interação hidrofóbica como etapa de captura do processo de purificação do FIX recombinante ou derivado do plasma.



**Tabela 5.7.** Comparação da redução de HCP entre o monolito CIM<sup>®</sup> Q com eluição por afinidade ao íon Ca<sup>2+</sup>, empregando o lote 2 de FIXr (batelada alimentada) e o monolito de 8 mL, e a membrana Sartobind<sup>®</sup> *phenyl* na etapa de captura do processo.

Materiais cromatográficos	FIXr (mg/mL)		HCP (ng/mL)		HCP (ng/mg de FIX)		Fator de redução
	Amostra de sobrenadante	Amostra eluída	Amostra de sobrenadante	Amostra eluída	Amostra de sobrenadante	Amostra eluída	
Monolito CIM <sup>®</sup> Q	0,02	0,51	2,16 x10 <sup>5</sup>	3793	9424358	7499	1256 ± 176*
Membrana Sartobind <sup>®</sup> <i>phenyl</i>	0,02	0,09	2,16 x10 <sup>5</sup>	15041	9424358	170512	55

\* Os erros correspondem ao desvio padrão (n=2).

## 5.2. Segunda etapa cromatográfica

Foi realizada uma comparação entre a membrana hidrofóbica Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* e a resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate* em relação à eficiência como segunda etapa cromatográfica. Esta última consiste de uma resina de celulose ligada a ésteres de sulfato, com o objetivo de mimetizar a heparina, que apresenta pseudo-afinidade por muitas proteínas inclusive fator IX. As avaliações desta sessão foram realizadas com o eluído proveniente da etapa de captura realizada com o monolito CIM<sup>®</sup> Q. Mais 8 corridas com o monolito CIM<sup>®</sup> Q foram realizadas e os eluídos das 8 corridas foram unidos para formar um único lote utilizado em todos os experimentos da segunda etapa.

### 5.2.1. Avaliação da resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate*

#### 5.2.1.1. Capacidade adsortiva dinâmica

Para avaliar a capacidade adsortiva dinâmica da resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate*, foi utilizado um *pool* do eluído de quatro corridas com o monolito CIM Q, para que todos os experimentos fossem realizados com o mesmo lote. Primeiramente, a capacidade

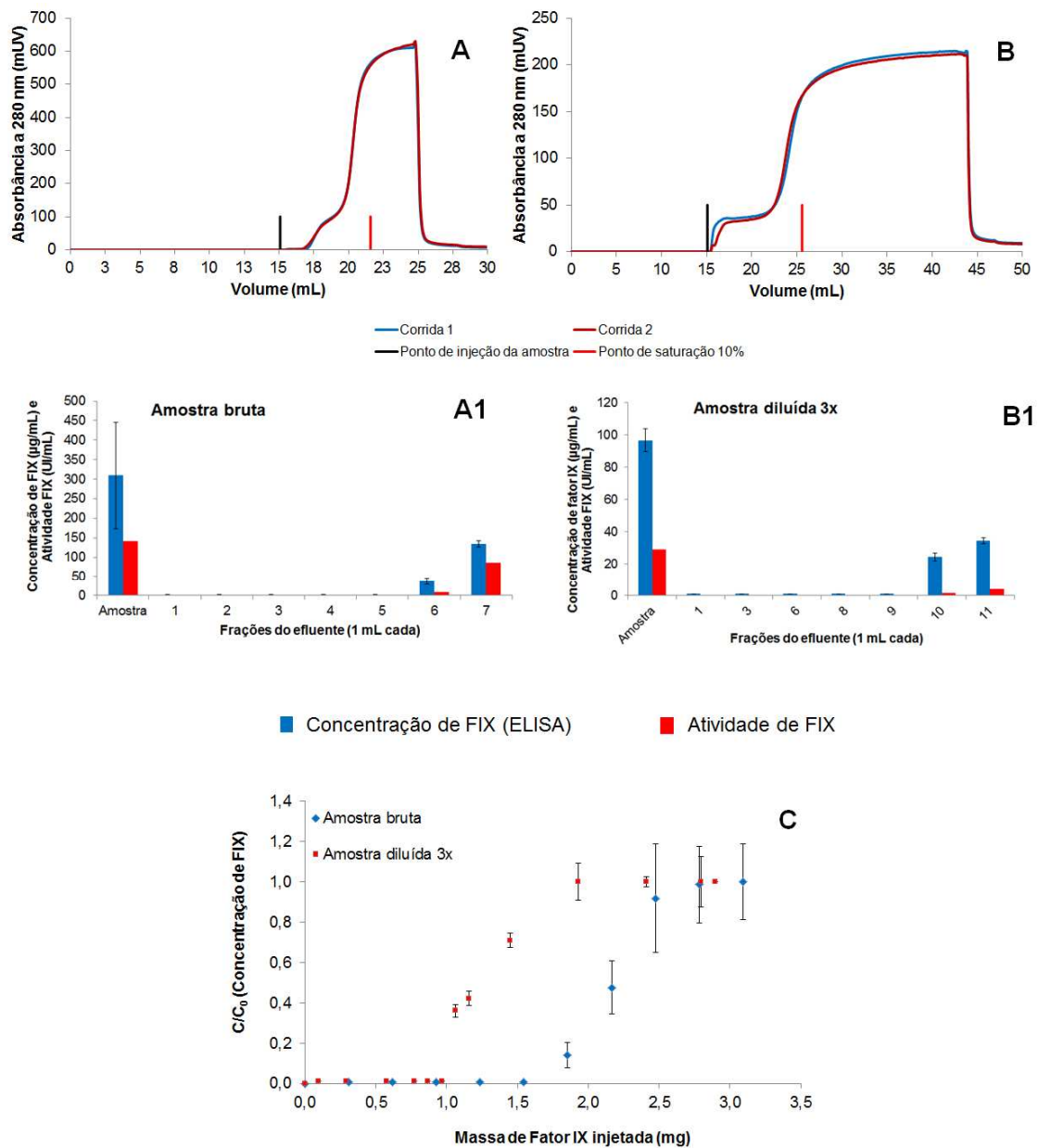
adsortiva dinâmica da resina em questão foi avaliada sem nenhuma alteração das condições do tampão da amostra (condutividade e pH), ou seja, o fator IX foi injetado na coluna Cellufine<sup>®</sup> Sulfate exatamente nas condições em que foi eluído do monolito CIM Q. Apesar do tampão de eluição da etapa de captura ter sido Tris-HCl 50 mM, 45 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,5 (condutividade de 11.9 mS/cm), as condições do eluído sofreram pequenas variações devido à mistura ocorrida no interior dos poros do monolito entre o tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 8 – condutividade 17 mS/cm) e o de eluição. Contudo, a maior alteração foi em relação ao pH, que obteve um valor de 7,2 na fração do eluído enriquecida de fator IX. Já a condutividade permaneceu em torno de 12 mS/cm. Isto pode ser explicado pelo fato de serem duas soluções tamponantes se misturando. O processo de alteração do pH envolve um equilíbrio químico, levando um certo tempo para isto ocorrer. Como o fator IX foi desorvido rapidamente do monolito devido à condutividade, presença dos íons Ca<sup>2+</sup> e ao transporte convectivo característico do material adsortivo, na fração coletada com alta concentração de fator IX o pH não havia diminuído até o valor de 6,5. No entanto, isto foi reproduzível para todas as corridas realizadas com o monolito CIM<sup>®</sup> Q nestas condições.

A capacidade adsortiva dinâmica obtida para a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate considerando a amostra de fator IX bruta (eluído da etapa de captura sem modificação) foi de  $3,2 \pm 0,2$  mg de fator IX/mL de resina, considerando a capacidade quando a concentração de fator IX no efluente atingiu 10% da concentração de fator IX da amostra. Isto ocorreu entre a fração de número 6 e 7 (foram coletadas frações de 1 mL após a injeção da amostra). O mesmo ponto de saturação foi observado em relação à atividade, já que não foi detectada atividade para o fator IX antes da fração 6. O ensaio de atividade foi realizado para uma corrida apenas, tendo-se obtido a capacidade em termos de atividade igual a 1559 UI de fator IX/mL de resina. Na Figura 5.9A, pode ser observado que o ponto de inflexão do gráfico relativo à absorbância a 280 nm do efluente da injeção da amostra na resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate ocorre próximo à fração 6, confirmando que a saturação ocorre neste ponto.

BELATTAR *et al.* (2007), desenvolveram uma resina polimérica de poli(estireno sulfonato de sódio) para purificação do fator IX explorando a afinidade por ligantes sulfatados, porém, utilizando a condição tamponante Tris 50 mM, 0,1 M NaCl,

pH 7,4, os autores obtiveram o valor de 8,6 UI de fator IX/mL de material em condições estáticas na presença de alguns contaminantes. Este valor é muito inferior ao obtido neste trabalho para a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate. Contudo, quando comparada com a resina Sepharose<sup>®</sup> com heparina imobilizada em relação à capacidade adsortiva da  $\gamma$ -globulina bovina, a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate apresentou uma capacidade adsortiva dinâmica 140 vezes menor (YOSHIDA *et al.*, 2007). Esta diferença de capacidade pode ser explicada pela mais baixa densidade de ligantes da resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate (8  $\mu$ mol/mL), porém a interação dos ligantes além, de ser por afinidade, também tem natureza eletrostática, o que pode gerar diferença de comportamento dependendo da proteína empregada (DEPHILLIPS & LENHOFF, 2001).

Na tentativa de aumentar a capacidade adsortiva dinâmica da resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate a amostra de eluído da etapa de captura foi diluída 3 vezes com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,2, reduzindo a condutividade para 7,5 mS/cm. Contudo, isto resultou em uma diminuição da capacidade adsortiva dinâmica em relação ao fator IX recombinante para  $1,8 \pm 0,1$  mg de FIX/mL de resina. O cromatograma da curva de saturação dinâmica evidencia esta perda de fator IX precocemente, já que, caso a capacidade dinâmica permanecesse inalterada, a concentração do efluente dos ensaios com amostra diluída deveria aumentar após a fração 18 (equivalente a 18 mL de amostra injetada ou 33 mL de volume total), porém ocorreu entre a fração 10 e 11 (Figura 5.9B). As curvas de saturação da Figura 5.9C evidenciam isto, pois é possível observar a perda precoce de fator IX quando a amostra diluída foi aplicada, indicando que a redução de condutividade é desfavorável.



**Figura 5.9.** Capacidade adsortiva dinâmica da resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate. Cromatograma da injeção da amostra bruta com o respectivo gráfico de concentração e atividade do FIXr em frações do efluente (A e A1); cromatograma da injeção da amostra diluída 3 vezes com o respectivo gráfico de concentração e atividade do FIXr em frações do efluente (B e B1); curva de saturação dinâmica em concentração mássica de fator IX (ELISA) para os dois casos (C).

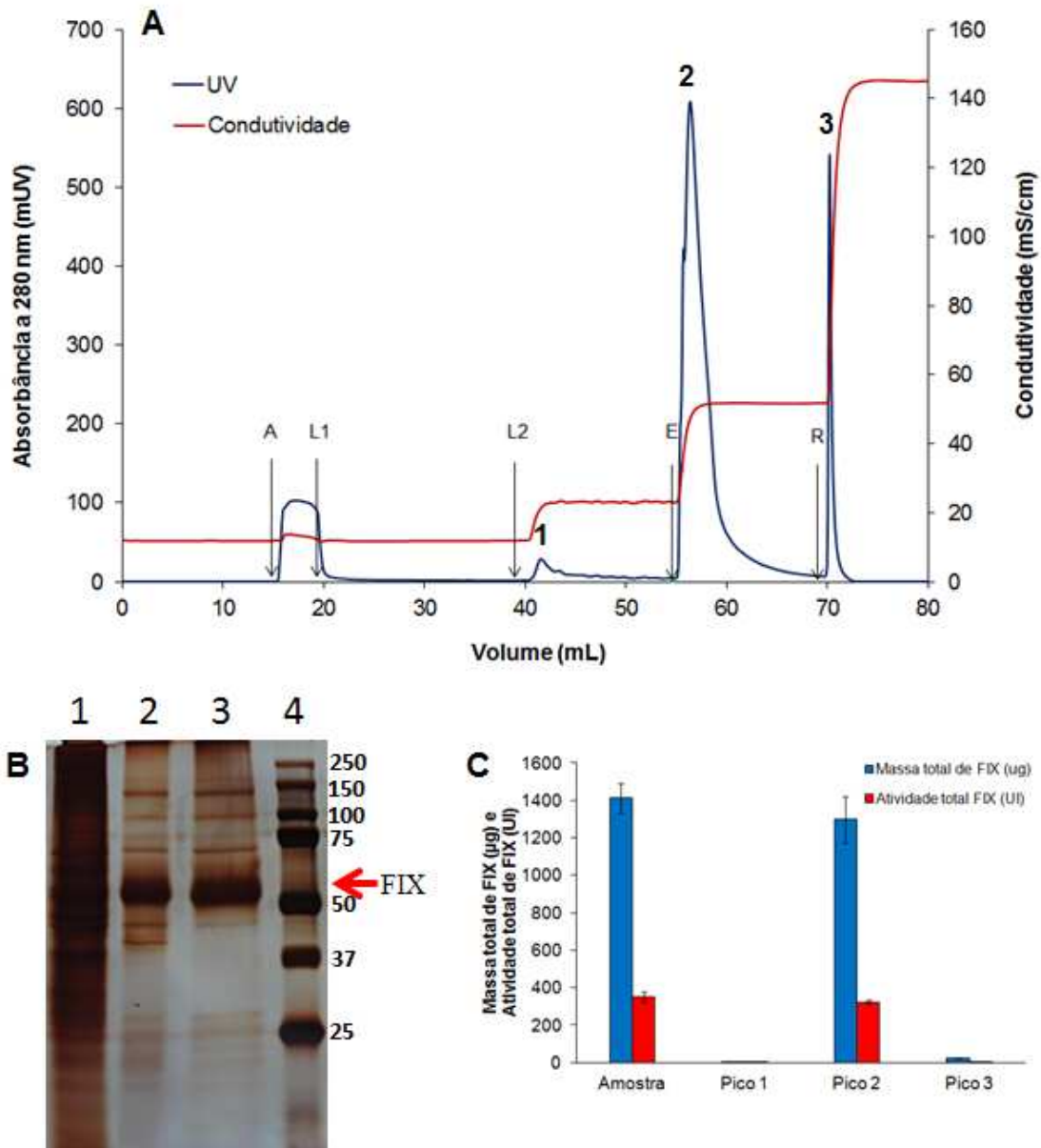
### 5.2.1.2. Etapa de eluição do fator IX

A eluição do fator IX da coluna Cellufine<sup>®</sup> Sulfate inicialmente foi avaliada com um gradiente linear (a condutividade foi de 12 mS/cm até 120 mS/cm em 50 mL, a uma

vazão de 1 mL/min), porém não ocorreu uma separação satisfatória, pois a resolução do pico foi baixa. SAKODA *et al.* (2012) observaram o mesmo problema na purificação do vírus da gripe aviária com a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate, optando assim pela eluição por degraú. Portanto, passou-se a investigar, na etapa de eluição do fator IX da resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate, o modo de eluição em degraus de concentração de NaCl. Após a injeção da amostra, a resina foi lavada com o tampão de equilíbrio e, em seguida, com tampão Tris-HCl 50 mM, 0,2 M NaCl, pH 7,2 para eliminar contaminantes fracamente adsorvidos. A eluição do fator IX ocorreu após a aplicação de tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,2. Por fim, a coluna foi regenerada com o tampão Tris-HCl 50 mM, 2 M NaCl, pH 7,2. O gráfico da Figura 5.10A mostra o cromatograma de uma das corridas. O experimento foi realizado em duplicata e foi verificado o mesmo comportamento em ambas as análises. Este método é geralmente utilizado para a eluição do fator IX, derivado do plasma ou recombinante, de colunas de afinidade por ligantes sulfatados como heparina ou Cellufine<sup>®</sup> Sulfate (HARRISON *et al.*, 1998; HOFFER *et al.*, 1999).

Neste trabalho, a utilização da resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate como segunda etapa de purificação do fator IX não proporcionou um incremento significativo de fator de purificação em relação ao sobrenadante, visto que aumentou de  $150 \pm 17$  vezes (valor obtido na primeira etapa) para  $168 \pm 9$  vezes. A redução de proteínas da célula hospedeira (HCP) também não foi elevada. Com a primeira etapa, a redução foi de  $1260 \pm 176$  vezes e, com a utilização da resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate, a redução em relação ao sobrenadante aumentou para  $1970 \pm 387$  vezes. A comparação dos perfis do gel de eletroforese (Figura 5.10B) deixa evidente que não houve um incremento significativo de pureza da primeira etapa (monolito CIM<sup>®</sup> Q) para a segunda (resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate). Por outro lado, os rendimentos obtidos tanto em massa quanto em atividade de FIX foram altos ( $92 \pm 7\%$  e  $93 \pm 4\%$ , respectivamente), conforme evidenciado pela Figura 5.10C. O monolito CIM<sup>®</sup> Q removeu uma grande quantidade de DNA residual da célula hospedeira, porém uma pequena quantidade foi co-eluída com o fator IX. Portanto, a amostra injetada na coluna Cellufine Sulfate ainda continha com uma pequena quantidade de DNA residual (78 ng/mL). Após a etapa de purificação com a resina Cellufine Sulfate, a concentração de DNA residual caiu para  $30 \pm 10$  ng/mL, o que equivale a uma redução de  $1,6 \pm 0,3$  vezes ou redução de  $37 \pm 11\%$ . Os dados

citados acima podem ser visualizados na Tabela 5.7, localizada no final do capítulo de Resultados e Discussão. A presença desta quantidade de DNA na fração do eluído da segunda etapa não era esperada, já que os ligantes sulfatados possuem carga negativa e não deveriam interagir com moléculas de DNA (carregadas negativamente devido aos grupamentos fosfato). Contudo, OPITZ *et al.* (2009) compararam a redução de DNA residual em diferentes materiais sulfatados, inclusive a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate, utilizados para a purificação de vírus e observou a presença de quantidade ainda significativa de DNA residual no eluído dos processos de purificação, embora a maior parte do DNA residual tenha sido eliminado no efluente. A interação de DNA com resinas de troca catiônica, como SP-Sepharose, monolito SO<sub>3</sub> e membrana Mustang S, também foi observada por LIU *et al.* (2011), porém o mecanismo de interação do DNA com ligantes com carga negativa ainda não está elucidado.



**Figura 5.10.** Cromatograma de purificação do fator IX com a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate (A): A – alimentação; L1 – lavagem com o tampão de equilíbrio; L2 – lavagem com tampão contendo 0,2 M de NaCl, pH 7,2; E – eluição com tampão contendo 0,5 M de NaCl pH 7,2 e R – regeneração com tampão contendo 2 M NaCl. Eletroforese em gel de poliacrilamida comparando o eluído da primeira etapa (monolito CIM<sup>®</sup> Q) com o eluído da coluna Cellufine Sulfate (B): sobrenadante de células CHO produtoras de FIX (raia 1); eluído da etapa de troca aniônica com o monolito CIM<sup>®</sup> Q (raia 2); eluído da resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate, pico 2 (raia 3) e marcador de massa molar (raia 4). Gráfico indicando a massa e a atividade total de FIX coletada em cada pico e comparada com a amostra (C).

Em relação aos níveis de FIXa, a resina Cellufine *Sulfate* tampouco apresentou bom desempenho, já que a razão FIXa/FIX aumentou para 4,63% após esta etapa. SUN *et al.* (2012) mostraram que a remoção do FIXa tornou-se factível com o emprego da resina Sepharose<sup>®</sup> *Heparin* devido à maior afinidade da heparina pelo FIXa em relação ao FIX normal. Contudo, apesar da resina Cellufine<sup>®</sup> *sulfate* apresentar uma estrutura análoga à da heparina, o mesmo não foi observado para esta resina no presente trabalho.

A Tabela 5.7, localizada no final do capítulo de Resultados e Discussão, resume os resultados obtidos para a purificação do FIXr com a resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate*.

### **5.2.2. Avaliação da membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl***

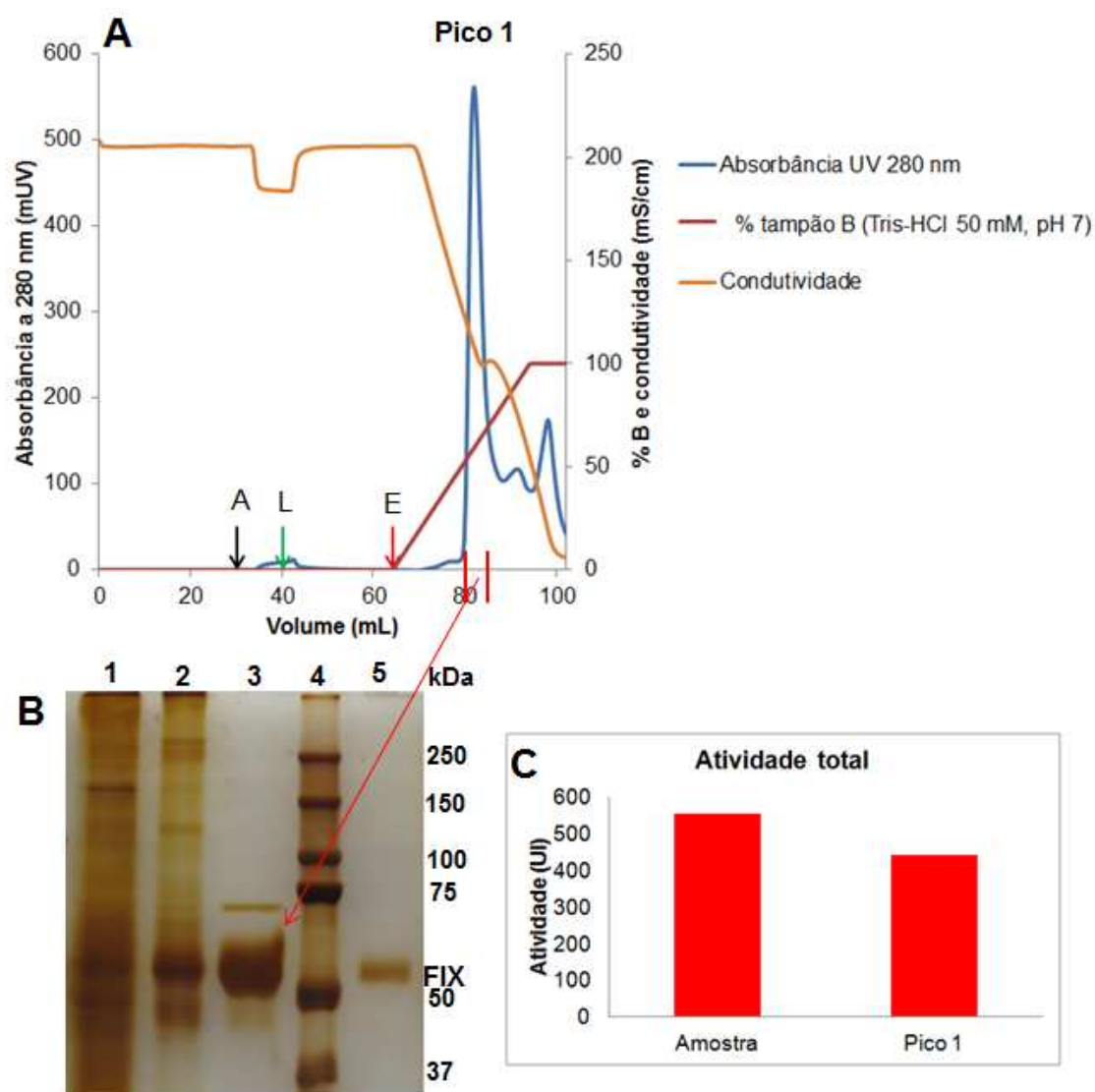
Segundo KUCZEWSKI *et al.* (2010), a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* apresentou capacidades adsorptivas dinâmicas para três proteínas modelo comparáveis as obtidas para resinas cromatográficas hidrofóbicas, como por exemplo a Sepharose<sup>®</sup> *Phenyl*. A alta capacidade dinâmica, o mecanismo de transporte convectivo e o fato de ser uma membrana nova no mercado, portanto com poucos trabalhos publicados, serviu de base para a decisão de selecionar a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* para a avaliação da etapa de interação hidrofóbica do processo de purificação do fator IX recombinante.

Para avaliar o desempenho da interação hidrofóbica como segunda etapa do processo de purificação do fator IX recombinante, foram empregadas as mesmas condições utilizadas para a obtenção da amostra que foi utilizada na avaliação da resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate*. Contudo, na etapa de interação hidrofóbica, a amostra precisa estar em condições de alta concentração salina para ter sua solubilidade reduzida e ter as regiões hidrofóbicas das proteínas expostas para interagir com o ligante hidrofóbico imobilizado. Portanto, primeiramente foi realizada uma diafiltração do eluído da etapa de troca aniônica com uma membrana de 10 kDa de corte (fator IX possui 55 kDa) para substituir o tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 45 mM, pH 7,2 para o tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 1,5 M, pH 7. No entanto, esta condição não foi suficiente para promover a adsorção do fator IX na membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*, pois toda a proteína injetada foi detectada no efluente durante a injeção. Esta condição tinha sido selecionada com base nos trabalhos da literatura que efetuaram a purificação do fator IX com resinas hidrofóbicas. HUSI & WALKINSHAW (1999) observaram que a concentração de 1,5 M de NaCl e pH 7 não era suficiente para dessorver o fator IX da resina *Phenyl*



Sepharose<sup>®</sup>, portanto esta concentração salina seria suficiente para promover a adsorção do FIX. HOFFER *et al.* (1999) utilizaram um tampão com 1 M de NaCl e pH 7 na etapa de adsorção do fator IX empregando a resina octyl-Sepharose<sup>®</sup> como material hidrofóbico e não observaram perda de fator IX no efluente. Considerando que o grupamento octil tem o maior grau de hidrofobicidade da série dos n-alcenos e que se a interação hidrofóbica entre o ligante e a proteína for muito forte, torna-se difícil o processo de eluição sem desnaturar a proteína (QUEIROZ *et al.*, 2001), a escolha da concentração de 1,5 M de NaCl e do pH 7 para a adsorção do FIXr na membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* a princípio seria suficiente para a interação ocorrer. Possivelmente, a ausência do efeito causado pelo transporte de massa difusivo pode ter influenciado o comportamento observado na etapa de adsorção, porém uma avaliação mais criteriosa é necessária para comprovar esta hipótese.

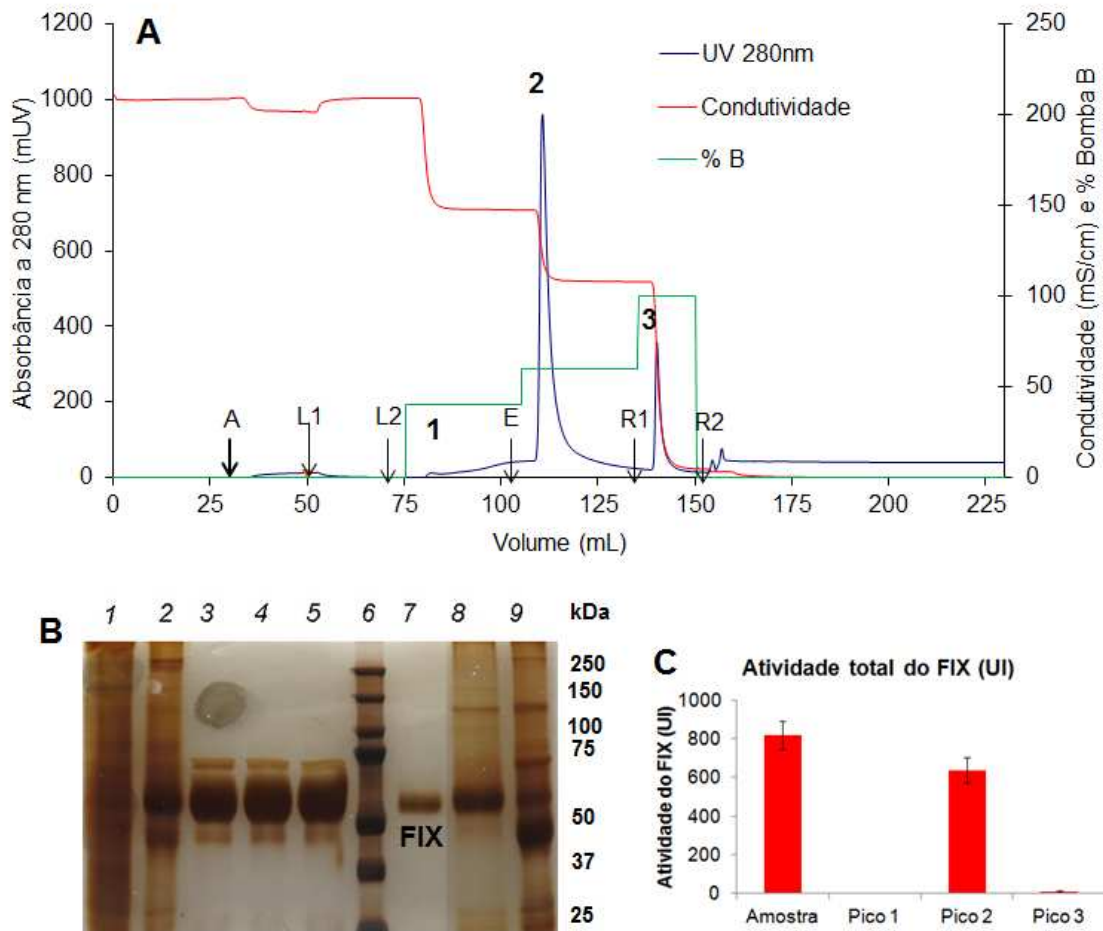
Buscando adsorver com eficácia o FIXr à membrana, foi utilizado, segundo recomendação do fabricante, um tampão Tris-HCl 50 mM, 1,8 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7. O sulfato de amônio é um sal que promove um grande efeito de *salting-out*, ou seja, é um dos mais efetivos para precipitar proteínas de soluções aquosas, uma vez que causa maior exposição de áreas hidrofóbicas das proteínas (QUEIROZ *et al.*, 2001). Em função disto, primeiramente foi testada a concentração de 1,8 M de sulfato de amônio e se verificou que não era suficiente para precipitar o fator IX, possibilitando a seleção deste tampão para a fase de adsorção do FIXr à membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*. Portanto, o eluído da etapa de troca aniônica foi submetido a uma diafiltração (membrana de 10 kDa de corte), sendo o tampão de destino o Tris-HCl 50 mM, 1,8 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7. Após confirmar que o FIXr foi adsorvido com sucesso à membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*, um gradiente linear de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7 foi aplicado para estudar o perfil de eluição do processo e descobrir a condutividade necessária para dessorver o FIXr. A Figura 5.11A mostra o cromatograma obtido, no qual é possível observar que o gradiente linear proporcionou uma boa resolução dos picos. A análise por SDS-PAGE (Figura 5.11B) do maior pico obtido (pico que concentrava a atividade de FIX, como pode ser visualizado na Figura 5.11C) mostrou que vários contaminantes foram removidos, sendo possível visualizar apenas uma banda no gel além da banda do FIX (mais concentrada). A concentração do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7 (% B) necessária para a dessorção do FIX da membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* foi de aproximadamente 60%.



**Figura 5.11.** Cromatograma da segunda etapa do processo de purificação do FIXr utilizando a membrana Sartobind® *Phenyl* (A): A – alimentação; L – lavagem com o tampão de equilíbrio e E – início do gradiente de eluição. Eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE (B): raia 1 (sobrenadante); raia 2 (amostra injetada - eluído do monolito CIM® Q); raia 3 (eluído da Sartobind® *Phenyl*, pico 1 do cromatograma); raia 4 (marcador de massa molar) e raia 5 (padrão de FIX derivado do plasma). Gráfico mostrando a atividade total recuperada na fração correspondente ao pico 1 (C).

. Com o objetivo de buscar evitar a necessidade da etapa de ultrafiltração/diafiltração, a qual inerentemente acarreta em custos e perda de rendimento, investigou-se diluir o eluído da etapa de troca aniônica com um tampão Tris-HCl 50 mM, 3,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7 para que a concentração final de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fosse de 1,8 M. Isto fez com que ocorresse a formação de um precipitado, como

observado na diluição do sobrenadante com sulfato de amônio, porém também desta vez verificou-se que o FIXr permaneceu em solução, uma vez que a atividade permaneceu constante após a precipitação. Portanto, o eluído diluído para 1,8 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi injetado na membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* e, desta vez, foi realizada uma eluição em degraus para melhorar a separação dos picos. Após a injeção da amostra, a membrana foi lavada com o tampão de equilíbrio e, na sequência, foi aplicado o primeiro degrau, uma lavagem com 40% do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7 (40 %B), removendo alguns contaminantes fracamente adsorvidos. Em seguida, foi aplicado um degrau com 60% do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7 (60 %B), sendo o pico obtido enriquecido em FIX. Um último degrau foi aplicado com 100% do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7 (100 %B) para remover as outras proteínas com maior afinidade à membrana. A Figura 5.12A mostra o cromatograma obtido. O perfil do gel de SDS-PAGE (Figura 5.12B) foi o mesmo obtido para a eluição por gradiente linear, porém tendo-se obtido um cromatograma com uma resolução melhor. Esta corrida foi realizada em duplicata e dados de rendimento em atividade e massa, fator de purificação, remoção de HCP e DNA e monitoramento do FIX ativado foram determinados. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.7, localizada no final do capítulo de Resultados e Discussão.



**Figura 5.12.** Cromatograma da purificação do FIXr com a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*, sendo a eluição por degrau (A): A – alimentação; L1 – lavagem com o tampão de equilíbrio; L2 – lavagem com 40% B; E – eluição com 60% B; R1 – regeneração com 100% B e R2 – regeneração com 30% de isopropanol. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE: raia 1 (sobrenadante); raia 2 (eluído monolito CIM<sup>®</sup> Q); raia 3 (eluído Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* eluição por gradiente); raia 4 (eluído Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*, eluição por degrau); raia 5 (eluído Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*, eluição por degrau, duplicata); raia 6 (marcador de massa molar); raia 7 (padrão de FIX derivado do plasma); raia 8 (eluído da resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate*); raia 9 (pico 3 do cromatograma A, referente à regeneração da membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*). Gráfico com a atividade total recolhida em cada pico do cromatograma (C).

O rendimento obtido com a utilização da membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* (amostra diluída e eluição em degrau) foi de  $88 \pm 5$  % em massa e  $82 \pm 3$  % em atividade. Estes valores são similares aos obtidos com a utilização da resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate* como segunda etapa do processo de purificação do FIXr. Contudo, o processo com a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* gerou um fator de purificação em relação ao sobrenadante

quase duas vezes maior, dado confirmado pelo perfil mais limpo do gel de SDS-PAGE (a comparação pode ser visualizada na Figura 5.12B, raias 3-5 versus raia 8).

A redução de proteínas da célula hospedeira (HCP) em relação ao sobrenadante foi de  $1971 \pm 387$  vezes para a resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate* e  $4592 \pm 629$  vezes para a membrana Sartobind<sup>®</sup> *phenyl*, valor que confirma o melhor desempenho da membrana. Nas condições utilizadas neste trabalho, a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* foi capaz de reduzir a quantidade de DNA residual em  $95 \pm 1\%$  ou  $18 \pm 4$  vezes em relação à carga de DNA aplicada na membrana. Isto mostra uma maior capacidade de remoção de DNA residual do que a resina Cellufine<sup>®</sup> *Sulfate*, porém ainda inferior à capacidade obtida com o monolito CIM<sup>®</sup> Q. O mecanismo de interação de moléculas de DNA genômico com ligantes hidrofóbicos é pouco compreendido, porém há sugestões mecanísticas. Uma delas sugere que o nível de exposição de bases hidrofóbicas das moléculas de DNA controla o grau de interação com ligantes hidrofóbicos, tanto que é possível separar moléculas de DNA genômico de fita simples, de bactérias (maior exposição de bases hidrofóbicas, maior interação) de moléculas de DNA de dupla-fita, tais como plasmídeos (as bases hidrofóbicas ficam protegidas no interior da molécula, menor interação) utilizando cromatografia de interação hidrofóbica (BUTLER *et al.*, 2009; DIOGO *et al.*, 2005). GUSE *et al.* (1994) aplicaram, em experimentos individuais, 1 mg de DNA em três colunas cromatográficas (troca aniônica, interação hidrofóbica e gel filtração). Após a utilização da coluna de interação hidrofóbica, a quantidade de DNA remanescente foi de 592 ng, ou seja, uma redução de 1700 vezes, porém a troca aniônica ainda apresentou desempenho melhor, fator de redução maior que  $10^5$  vezes (GUSE *et al.*, 1994). A combinação da cromatografia de troca aniônica e de interação hidrofóbica utilizando monolitos (material com transporte de massa convectivo) também foi efetiva na remoção de DNA genômico durante o processo de purificação de um DNA plasmidial (SMREKAR *et al.*, 2013).

Portanto, a combinação das duas etapas cromatográficas utilizadas neste trabalho, combinando o monolito CIM<sup>®</sup> Q e a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*, tem um grande potencial para remoção de DNA residual. Contudo, a quantidade de DNA residual após estas etapas encontra-se em 20,5 ng/mL o que corresponde a  $68,8 \pm 2,1$  ng de DNA/dose (considerando uma dose de 500 UI de FIX), enquanto o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) é de 10

ng/dose. O valor obtido neste trabalho está satisfatório, levando-se em consideração que foram utilizadas apenas duas etapas cromatográficas no processo de purificação e que, geralmente, o processo de purificação de um biofármaco possui 3 ou mais etapas cromatográficas. Após a purificação com a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*, a razão FIXa/FIX permaneceu inalterada, ficando em  $2,33 \pm 1,98$  %. Portanto, com as condições empregadas não foi possível separar o FIXa do FIX. Talvez com alguma alteração nas condições de eluição seja possível separar as duas formas de FIX, como, por exemplo, utilizando a eluição por agentes caotrópicos.

O teor de endotoxinas foi medido no eluído das corridas cromatográficas com a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* como segunda etapa. Observou-se uma redução significativa de endotoxinas após esta etapa, de até 173 vezes em relação ao sobrenadante (Tabela 5.6). A discrepância entre os resultados das duas corridas é atribuída ao fato de os materiais utilizados nas corridas não terem sido despirogenados. O procedimento para inativação de endotoxinas inclui tratamento químico, com hipoclorito de sódio, por exemplo, e por calor seco em estufas a 250°C no mínimo (FUKUMORI, 2008). Na corrida que apresentou o menor valor de endotoxinas ( $5,45 \pm 1,34$  UE/mL), os frascos dos tampões foram autoclavados, provavelmente, somente o procedimento de autoclavagem pode ter apresentado algum efeito. Por este experimento, considerando um paciente adulto, o processo utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q e a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* foi capaz de reduzir o teor de endotoxinas a níveis seguros para injeção em humanos, menor que 5 unidades por kg do paciente (CHEN *et al.*, 2009). Para esta correlação, foi considerada uma dose de 500 UI de FIXr, o que corresponde a ,aproximadamente, 6,5 mL do eluído. Neste caso, até o valor de  $12,27 \pm 1,21$  seria aceitável para um indivíduo adulto. Contudo, a farmacopeia europeia atual exige um teor de endotoxinas menor que 0,03 UE/UI de FIX (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0, 2011). Neste caso, os valores estariam próximos ao exigido. No entanto, na produção de biofármacos devem ser realizados procedimentos de despirogenização para todos os materiais que irão entrar em contato com o produto final, caso este venha a ser utilizado em humanos (por exemplo, em ensaios clínicos ou já na fase comercial), procedimento que reduziria ainda mais o nível de endotoxinas.

**Tabela 5.6.** Nível de endotoxinas do sobrenadante e do eluído final após duas etapas cromatográficas (monolito CIM<sup>®</sup> Q e Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl*), partindo-se do lote 2 de FIXr (batelada alimentada).

Corridas Cromatográficas em duas etapas (monolito CIM <sup>®</sup> Q - Sartobind <sup>®</sup> <i>phenyl</i> )	Teor de endotoxinas (UE/mL)		Atividade de FIX no eluído da CIH (UI/mL)	UE/UI de FIX
	Sobrenadante	Eluído CIH <sup>a</sup>		
1	943 ± 247 <sup>b</sup>	12,27 ± 1,21	75,18	0,16
2	943 ± 247	5,45 ± 1,34	73,7	0,07 <sup>c</sup>

a – CIH – Cromatografia de Interação Hidrofóbica;

b – Os erros correspondem ao desvio padrão da análise pelo ensaio LAL (n=2);

c – A média referente às duas corridas cromatográficas foi de 0,12 ± 0,06 UE/UI de FIX.

A Tabela 5.7 resume os dados obtidos com os experimentos de purificação realizados neste trabalho para a etapa de captura e para a segunda etapa. Considerando-se o processo empregando o monolito CIM<sup>®</sup> Q (etapa de captura) e a membrana Sartobind<sup>®</sup> *Phenyl* como segunda etapa, pode-se dizer que os resultados são promissores devido aos valores de fator de purificação cumulativo (298) e rendimento global (69%), assim como pelo fato de os valores de DNA, endotoxinas e FIXa/FIXr se enquadrarem dentro das recomendações da literatura, ou estarem muito próximos do recomendado, já após a segunda etapa cromatográfica.

**Tabela 5.7.** Resultado global das purificações realizadas, empregando-se o lote 2 de FIX, produzido em batelada alimentada.

Etapas	Materiais	R <sub>m</sub> (%)	R <sub>s</sub> (%)	FPc	HCP (ng/mg de FIX ou ppm)	FRc de HCP	DNA (µg/mL)	FR de DNA	FIX <sub>s</sub> /FIX (%)
Sobrenadante	-	-	-	-	9424338 ± 66111	-	23,76 ± 2,11	-	0,83 ± 0,33
Etapa de Captura	Monolito CIM® Q (8 mL)	48 ± 10	84 ± 11	150 ± 17	7499 ± 1086	1256 ± 176	0,12 ± 0,04	7182 ± 1464	1,94 ± 0,08
	Sartobind® P <sup>heptyl</sup>	ND	83	ND	170512	55	ND	ND	ND
Segunda etapa	Cellufine® <i>Sulfate</i>	91 ± 7	93 ± 4	168 ± 9	4876 ± 958	1971 ± 387	0,03 ± 0,01	1,6 ± 0,2	4,67*
	Sartobind® P <sup>heptyl</sup>	88 ± 5	82 ± 3	298 ± 81	2071 ± 284	4592 ± 629	0,02 ± 0,01**	18,9 ± 3,9	2,33 ± 1,94

R<sub>m</sub> = rendimento em massa (em relação à etapa anterior), %;

R<sub>s</sub> = rendimento em atividade (em relação à etapa anterior), %;

FPc = Fator de purificação cumulativo (em relação ao sobrenadante), número de vezes;

HCP = ppm de proteínas da célula hospedeira em relação ao FIX, ng de HCP/mg de FIX ou ppm;

FRc de HCP = Fator de redução cumulativo de HCP (em relação ao sobrenadante), número de vezes;

DNA = Concentração de ácidos dextranucleicos, µg/mL;

FR de DNA = Fator de redução de DNA (em relação à etapa anterior), número de vezes;

FIX<sub>s</sub>/FIX = Porcentagem em atividade de FIXa em relação à atividade total do FIX, %;

ND = Não determinado;

\*não foi realizada a análise das duas corridas cromatográficas, por isso não tem o desvio padrão (n=2);

\*\*Corresponde a 68,8 ± 2,1 ng de DNA por dose (considerando uma dose de 500 UI de FIXa) – atividade de FIXa no eluído da membrana Sartobind® P<sup>heptyl</sup> = 156 UI/mL.



Através dos dados da Tabela 5.7 infere-se um melhor resultado, em termos de eficiência de purificação do fator IX recombinante, ao uso do monolito CIM<sup>®</sup> Q para a etapa de captura e a membrana Sartobind<sup>®</sup> *phenyl* na segunda etapa. O produto, após estas duas etapas, obteve especificações próximas aos requerimentos dos principais órgãos regulatórios do mundo e segundo informações obtidas da literatura. A Tabela 5.8 compara a proximidade dos valores obtidos neste trabalho, para todas as análises, com os valores exigidos ou recomendados para o produto final.

**Tabela 5.8.** Comparação dos valores obtidos neste trabalho, após duas etapas de purificação, com os valores exigidos/recomendados pelas agências regulatórias.

Ensaio	Resultados obtidos no trabalho	Valores exigidos/recomendados para o produto final
Eletroforese – SDS-PAGE (pureza qualitativa)	Aparecimento no gel de uma banda concentrada de FIX e uma banda fraca correspondente a algum contaminante.	Exigência de aparecimento de uma única banda no gel, correspondente à proteína de interesse.
HCP (ng/mg da proteína de interesse ou ppm)	2071 ± 284	Não há uma exigência clara, porém as agências regulatórias normalmente se baseiam na maior parte dos biofármacos aprovados pelo FDA, que possuem entre 1-100 ppm de HCP.
DNA residual (ng/dose)	68,8 ± 2,1	Exigência de 10 ng/dose.
FIXa (razão FIXa/FIX, %)	2,33 ± 1,94	Valor abaixo de 2,4%, recomendação baseada em artigos científicos.
Endotoxinas (UE/UI de FIX)	0,12 ± 0,06	Exigência da farmacopeia europeia do FIX (0,03 UE/UI de FIX).

## 6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 6.1. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

- ✓ O emprego da cromatografia de troca aniônica na etapa de captura do processo de purificação do fator IX recombinante apresentou melhor resultado em relação à remoção de proteínas da célula hospedeira do que a mesma etapa sendo realizada por cromatografia de interação hidrofóbica;
- ✓ O monolito CIM<sup>®</sup> Q apresentou a maior capacidade adsortiva dinâmica para o FIXr presente no sobrenadante de células CHO dentre os materiais para troca aniônica avaliados: resinas Q Sepharose<sup>®</sup> e Fractogel<sup>™</sup> TMAE, membrana Sartobind<sup>®</sup> Q e o monolito CIM<sup>®</sup> Q. Portanto, este novo material mostrou ser capaz de agrupar alta capacidade adsortiva dinâmica e possibilidade de emprego de altas vazões, resultando em elevadas produtividades;
- ✓ No estudo do processo de purificação do FIXr com o monolito CIM<sup>®</sup> Q utilizando a eluição do FIXr por afinidade aos íons Ca<sup>2+</sup>, através de um planejamento experimental, foi observado um comportamento diferenciado em relação à condutividade necessária para a dessorção do FIXr comparado com os resultados encontrados na literatura para resinas de troca aniônica. Provavelmente, a interação nos poros do monolito é mais fraca ou o deslocamento do FIXr é facilitado devido às condições estruturais da matriz;
- ✓ Este trabalho reuniu uma coletânea de informações importantes para o estudo da etapa de captura do processo de purificação do FIXr utilizando o monolito CIM<sup>®</sup> Q, como: rendimento em massa ( $48 \pm 10\%$ ), rendimento em atividade ( $84 \pm 11\%$ ), fator de purificação ( $150 \pm 17$  vezes), fator de remoção de HCP ( $1256 \pm 176$ ), nível de HCP ( $7499 \pm 1086$  ppm), fator de remoção de DNA ( $7182 \pm 1464$  vezes), quantidade de DNA/dose ( $575$  ng/dose) e a razão de FIXa/FIXr após a etapa cromatográfica com o monolito ( $1,94 \pm 0,08$ );

- ✓ Os resultados do processo de purificação do FIXr obtidos na etapa de captura, como atividade em FIX ativado, remoção de DNA residual e remoção de HCP são pouco explorados na literatura para processos de purificação do FIX recombinante. Com isso, este trabalho agregou à literatura informações importantes sobre o processo de purificação do FIXr, que poderão servir de base para outras pesquisas;
- ✓ A segunda etapa do processo de purificação do FIXr também foi avaliada com dois materiais cromatográficos diferentes e com tipos de cromatografia diferentes: a resina Cellufine<sup>®</sup> Sulfate (pseudo-afinidade) e a membrana Sartobind<sup>®</sup> Phenyl (interação hidrofóbica). Os resultados mostraram uma remoção de contaminantes da primeira para a segunda etapa do processo bem mais eficiente com o emprego da membrana Sartobind<sup>®</sup> Phenyl. Além disto, a segunda etapa cromatográfica do processo de purificação do FIXr utilizando a interação hidrofóbica é uma inovação do processo, já que não há relatos na literatura utilizando este tipo de cromatografia para este propósito;
- ✓ O conjunto de dados obtidos após a segunda etapa do processo de purificação do FIXr utilizando-se a membrana Sartobind<sup>®</sup> Phenyl foram: rendimento em massa somente da segunda etapa ( $88 \pm 5$ ), rendimento em atividade somente da segunda etapa ( $82 \pm 3$ ), rendimento em massa cumulativo (42%), rendimento em atividade cumulativo (69%), fator de purificação cumulativo ( $298 \pm 81$ ), fator de remoção de DNA ( $18,9 \pm 3,9$  vezes), quantidade de DNA/dose após a segunda etapa ( $68,8 \pm 2,1$  ng/dose, considerando uma dose de 500 UI de FIX), fator de remoção de HCP cumulativo ( $4592 \pm 629$  vezes), nível de HCP após duas etapas ( $2071 \pm 284$  ppm), valor da razão FIXa/FIXr após duas etapas ( $2,33 \pm 1,94$ ) e nível de endotoxinas (corrida 1 –  $12,27 \pm 1,21$  UE/mL, 0,16 UE/UI de FIX e corrida 2 –  $5,45 \pm 1,34$  UE/mL, 0,07 UE/UI de FIX, média de 0,11 EU/UI de FIX). Vale ressaltar que os valores de DNA e HCP estão satisfatórios para apenas duas etapas do processo, considerando que os valores exigidos pela OMS são: 10 ng/dose de DNA e 1-100 ppm de HCP. Além disto, foi utilizado um sobrenadante resultante de uma batelada alimentada que estava em desenvolvimento, e por este motivo, a colheita foi realizada com 70% de viabilidade, ou seja, o sobrenadante possuía uma quantidade de contaminantes

maior do que a normalmente presente quando a viabilidade está próxima a 100%. O nível de endotoxinas mesmo depois de 2 etapas cromatográficas está próximo ao exigido pela farmacopeia europeia (0,03 UE/UI de FIX). Foi encontrado na literatura apenas um artigo que relatou que uma razão FIXa/FIXr acima de 2,4% tem maior probabilidade de causar trombose em pacientes, sendo o valor obtido neste trabalho, após duas etapas cromatográficas, inferior a este valor;

- ✓ Os resultados obtidos nesta tese direcionam para implementação de um novo processo de purificação do FIXr recombinante com tecnologias mais atuais, como monolitos e membranas que permita o uso de altas vazões proporcionando, portanto, alta produtividade. Além disto, monolitos e membranas eliminam a necessidade de empacotamento de colunas, que em larga escala pode ser uma etapa crítica, e permitem o seu uso como materiais descartáveis, o que elimina custos de sanitização e validação após cada ciclo, reduzindo requerimentos de mão-de-obra e produtos químicos, ganhando tempo operacional e, em muitos casos, levando a uma redução de custos.

## 6.2. Sugestões

Com base na experiência adquirida ao longo do presente trabalho, é sugerido para futuros trabalhos o seguinte:

- ✓ Ajustes na operação do processo poderão ser realizados em busca de melhores resultados com a interação hidrofóbica na etapa de captura, como por exemplo, a utilização de eluição por degrau ou com dessorção por ação de agentes caotrópicos.
- ✓ Apesar do alto fator de purificação obtido na etapa de captura com o monolito CIM<sup>®</sup> Q, um ajuste correto da condutividade empregada na adsorção e em uma etapa de lavagem antes da eluição pode tornar o processo ainda melhor. A otimização desta etapa pode ser tema de trabalhos futuros. Além disto, existem colunas monolíticas de 80, 800 e 8L, portanto seria interessante avaliar o aumento da produtividade em colunas maiores, próximas à escala piloto de

produção, com o objetivo de manter o alto rendimento e pureza obtidos nas escalas menores de 1 e 8 mL.

- ✓ É preciso realizar um ensaio para determinar a capacidade adsortiva dinâmica da membrana Sartobind® *Phenyl* nas condições empregadas neste trabalho. Desta forma será possível realizar uma projeção de custos do processo. No entanto, outras condições de operação podem ser empregadas na tentativa de aumentar o desempenho da separação de proteínas, como por exemplo, o uso de agentes caotrópicos na eluição da segunda etapa, ajustes de condutividade ao longo do processo e avaliação do emprego de outros sais na etapa de adsorção. Além disto, mais testes de reprodutibilidade deverão ser realizados para avaliar a durabilidade do material.
- ✓ A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), utilizando o íon cobre, poderia ser empregada como a terceira etapa do processo de purificação do fator IX recombinante. Contudo, seria necessário ajustar as condições de eluição da membrana hidrofóbica para que não fosse necessário utilizar uma etapa de diafiltração antes de alimentar a coluna IMAC.
- ✓ Ensaios de estabilidade com o FIXr produzido no laboratório auxiliariam a avaliação da necessidade do uso de aditivos estabilizantes ou de redução da temperatura entre as etapas cromatográficas para manter a atividade do FIXr.
- ✓ Análises de custo comparando a utilização, no processo de purificação do FIXr, de monolitos e membranas versus a utilização de resinas cromatográficas, levando-se em consideração a demanda pelo produto, equipamentos e procedimentos necessários para a utilização de determinada tecnologia e espaço físico necessário na indústria.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

- ABDULRAHEEM, A., MUSTAFA, S., AL-SAFFAR, N., *et al.*, 2012, “Detection of bacterial endotoxin in drinking tap and bottled water in Kuwait”, *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 184, pp. 7323-7328.
- AHAMED, T., CHILAMKURTHI, S., NFOR, B.K., *et al.*, 2008, “Selection of pH-related parameters in ion-exchange chromatography using pH-gradient operations”, *Journal of Chromatography A*, v. 1194, pp. 22-29.
- ALBRECHT, W., SCHAUBER, J., WEIGEL, T., *et al.*, 2006, “Preparation of novel composite membranes: reactive coating on microporous poly(ether imide) support membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 269, pp. 49–59.
- ALBRECHT, W., SCHAUBER, J., WEIGEL, T., Weigel *et al.*, 2007, “Modification of poly(ether imide) membranes with brominated polyvinylpyrrolidone”, *Journal of Membrane Science*, v. 291, pp. 10–18.
- ALVES, A. K., ANDRADE, P. A., BERUTTI, F. A., *et al.*, 2006, “Caracterização de nanofibras de zircônia obtidas por electrospinning” 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais/ CBECIMat, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 15-19 Novembro.
- ANICETTI, V. R., KEYT, B. A. & HANCOCK, W. S., 1989, “Purity analysis of protein pharmaceuticals produced by recombinant DNA technology”, *Trends in Biotechnology*, v.7, pp. 342-349.
- ANTONY, J., 2003, “Design of experiments for engineers and scientists”, chapter 4, first edition, ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.

- ARAKAWA, T., 1986. "Thermodynamic analysis of the effect of concentrated salts on protein interaction with hydrophobic and polysaccharide columns", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 248, pp. 101–105.
- ARAKAWA, T., TIMASHEFF, S.N., 1984, "Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding", *Biochemistry*, v. 23, pp. 5912–5923.
- ARRUA, R.D., TALEBIA, M., CAUSONA, T. J., *et al.*, 2012, "Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules", *Analytica Chimica Acta*, v.738, pp. 1– 12.
- ARTUR, M, HASSLACHER, M. & FIEDLER, C., 2013, "Method for the purification of recombinant blood coagulation factor IX enriched in sulfated and/or phosphorylated molecules", *US patent* 8399632 B2.
- ASTERMARK, J., BJORK, I., OHLIN, A., *et al.*, 1991, "Structural requirements for Ca<sup>2+</sup> binding to the  $\gamma$ -carboxyglutamic acid and epidermal growth factor-like regions of factor IX", *Journal Biological Chemistry*, v. 266, pp. 2430-2437.
- BARROSO, T., TEMTEM, M., HUSSAIN, A., *et al.*, 2010, "Preparation and characterization of cellulose affinity membrane for human immunoglobulin G(IgG) purification, *Journal of Membrane Science*, v. 348, pp. 224-230.
- BEEKOW, T. C., KUSHARYOTO, W., ANSPACH, F. B., 1995, "Surface modification of microporous polyamide membranes with hydroxyethyl cellulose and their application as affinity membranes", *Journal of Chromatography A*, v. 715, pp. 49-65.

- BELATTAR, N., 2007, “Affinity adsorption of human vitamin K-dependent coagulation factor IX onto heparin-like poly (styrene sodium sulfonate) adsorbent”, *Materials Science and Engineering*, v. 27, pp. 849–854.
- BERKNER, K. L., 2005, “The vitamin K-dependent carboxylase”, *Annual Review of Nutrition*, v. 25, pp. 127-49.
- BERKNER, K. L., 2008, “Vitamin K-dependent carboxylation”, *Vitamins and Hormones*, v. 78, pp. 131-156.
- BERTINA, R.M., 2004, “Elevated clotting factor levels and venous thrombosis” *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, v. 33, pp. 399-400.
- BHUT, B., CHRISTENSEN, K. A., HUSSON, S. M., 2010, “Membrane chromatography: protein purification from *E. coli* lysate using newly designed and commercial anion-exchange stationary phases”, *Journal of Chromatography A*, v. 1217, pp. 4946–4957.
- BIGGS, R., DOUGLAS, A. S., MACFARLANE, R. G., *et al.*, 1952, “Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia”, *British Medical Journal*, v. 2, pp. 1378-1382.
- BIO-RAD, 2010, “CHT™ ceramic hydroxyapatite – instruction manual”. Disponível em: [www.bio-rad.com.br](http://www.bio-rad.com.br). Acesso em: outubro de 2009.
- BISPO, C. E. R. M., 2008, “Efeito do Envelhecimento da Poliamida 11 em Petróleo Sobre as Propriedades Térmicas e Mecânicas”, Dissertação de MSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BOI, C., 2007, “Membrane adsorbents as purification tools for monoclonal antibody purification”, *Journal of Chromatography B*, v. 848, pp. 19–27.



- BOI, C., ALGERI, C., SARTI, G. C., 2008, "Preparation and Characterization of Polysulfone Affinity Membranes Bearing a Synthetic Peptide Ligand for the Separation of Murine Immunoglobulins", *Biotechnol. Prog.*, v. 24, pp. 1304-1313.
- BOND, M., JANKOWSKI, M., PATEL, H., *et al.*, 1998, "Biochemical characterization of recombinant factor IX", *Seminars in Hematology*, v. 35, pp. 11-17.
- BRANOVIC, K., BUCHACHER, A., BARUT, M., *et al.*, 2000, "Application of monoliths for downstream processing of clotting factor IX", *Journal of Chromatography A*, v. 903, pp. 21-32.
- BRANOVIC, K., BUCHACHER, A., BARUT, M., *et al.*, 2003, "Application of semi-industrial monolithic columns for downstream processing of clotting factor IX", *Journal Chromatography B*, v. 790, pp. 175-82.
- BRESOLIN, I. T. L., MIRANDA, E. A., BUENO, S. M. A., 2009, "Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas", *Química Nova*, v. 32, PP. 1288-1296.
- BRIGLES, M., CLIFTON, J., WALSH, R., *et al.*, 2011, "Selectivity of monolithic supports under overloading conditions and their use for separation of human plasma and isolation of low abundance proteins", *Journal of Chromatography A*, v. 1218, pp. 2389-2395.
- BRIGGS, J. AND PANFILI, P.R., 1991, "Quantitation of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals", *Analytical Chemistry*, v. 63, pp. 850-859.
- BROOKS, C.A. & CRAMER, S.M., 1992, "Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients", *AIChE Journal*, v. 38, pp. 1969-1978.

- BROWN, P. W., CONSTANTZ, B., 1994, "Hydroxyapatite and related materials", ed. CRC, Flórida, EUA.
- BURNOUF, T., RADOSEVICH, M., 2001, "Affinity chromatography in the industrial of plasma proteins for therapeutic use", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, pp. 575-86.
- BUTENAS, S., MANN, K. G., 2002, "Blood coagulation", *Biochemistry (Moscow)*, v. 67, pp. 3-12.
- BUTLER, M., 2005, "Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals", *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 68, pp. 283-291.
- BUTLER, M.D., KLUCK, B. AND BENTLEY, T., 2009, "DNA spike studies for demonstrating improved clearance on chromatographic media", *Journal of Chromatography A*, v. 1216 pp. 6938–6945.
- CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R. , 2003, "Biosseparações". In: LIMA, N., MOTA, M., *Biotechnologia: fundamentos e aplicações*, 1º edição, capítulo 4, Editora Lidel, Lisboa, Portugal.
- CAPILA, I., LINHARDT, R. J., 2002, "Heparin - protein interactions", *Angewandte Chemie International Edition*, v. 41, pp. 390-412.
- CASTILHO, L. R., ANSPACH, F. B. and DECKWER, W-D., 2002, "Comparison affinity membranes for the purification of immunoglobulins", *Journal Membrane Science*, v. 207, p. 253-264.
- CIÊNCIA E O CRIADOR, 2011, disponível em [http://ciencia-religiao.blogspot.com.br/2011\\_09\\_01\\_archive.html](http://ciencia-religiao.blogspot.com.br/2011_09_01_archive.html), acessado em 20/01/2013.

- CHAMPION, K., MADDEN, H., DOUGHERTY, J., *et al.*, 2005, “Defining your product profile and maintaining control over it, part 2”, *BioProcess International*, v. 3, pp.52–57.
- CHANG, Y-K., HORNG, J-T., HUANGA, R-Z., *et al.*, 2006, “Direct recovery of clotting factor IX from unclarified human plasma by expanded bed ion exchange chromatography”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, pp. 138–146.
- CHARCOSSET, C., 1998, “Purification of proteins by membrane chromatography”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.*, v. 71, pp. 95-110.
- CHARLTON, A., ZACHARIOU, M., 2008, “Immobilized metal ion affinitychromatography of histidine-tagged fusion rotation”, In: Zachariou, M., *Affinity chromatography: methods and protocols (methods in molecular biology: vol 421)*, capítulo 10, 2ª edição, ed. Humana Press, Nova Jersey.
- CHEN, J., TETRAULT, J. AND LEY, A., 2008b, “Comparison of standard and new generation hydrophobic interaction chromatography resins in the monoclonal antibody purification process”, *Journal of Chromatography A*, v. 1177, pp.272–281.
- CHEN, J., YANG, T. AND CRAMER, S. M., 2008a, “Prediction of protein retention times in gradient hydrophobic interaction chromatographic systems”, *Journal of Chromatography A*, v. 1177, pp. 207–214
- CHEN, R.H., HUANG, C.-J., NEWTON, B.S., *et al.*, 2009, “Factors affecting endotoxin removal from recombinant therapeutic proteins by anion exchange chromatography”, *Protein Expression and Purification*, v. 64, pp. 76-81.
- CHOUDHARI, P.B., BHATIA, M.S. AND BHATIA, N.M., 2013, “Application of pocket modeling and k-nearest neighbor molecular field analysis (kNN-MFA) for designing of some anticoagulants: potential factor IXa inhibitors”, *Medicinal Chemistry Research*, v. 22, pp. 976-985.

- CIPRIANO, D., BURNHAM, M. and HUGHES, J.V., 2012, “Chapter 18: Effectiveness of various processing steps for viral clearance of therapeutic proteins: database analyses of commonly used steps”, In: Voynov, V. and Caravella, J.A., Therapeutic proteins: methods and protocols, *Methods in Molecular Biology*, v. 899, pp. 277-292.
- COHN, E. J., STRONG, L. E., HUGHES, W. L., *et al.*, 1946, “Preparation and Properties of serum and plasma proteins. IV. A system for separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids”, *Journal American Chemical Society*, v. 68, p. 459-475.
- COSTA, P., PILLI, R., PINHEIRO, S., VASCONCELLOS, M., 2003, “Substâncias carboniladas e derivados”, ed. Bookman, Porto Alegre – RS.
- CRANFORD, R. J., DARMSTADT, H., YANG, J., *et al.*, 1999, “Polyetherimide/polyvinylpyrrolidone vapor permeation membranes”, *Physical and chemical characterization*, v. 155, pp. 231-240.
- DAHBACK, B., 2005, “Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases”, *Journal of Internal Medicine*, v. 257, pp. 209-223.
- DANDLIKER, W. B., ALONSO, R., DE SAUSSURE, V. A. *et al.*, 1967, “The effect of chaotropic ions on the dissociation of antigen-antibody complexes”, *Biochemistry*, 1967, v. 6, pp. 1460–1467.
- DEPHILLIPS, P. and LENHOFF, A.M., 2001, “Determinants of protein retention characteristics on cation-exchange adsorbents”, *Journal of Chromatography A*, v. 933, pp. 57–72.
- DIOGO, M.M., QUEIROZ, J.A. AND PRAZERES, D.M.F., 2005, “Chromatography of plasmid DNA”, *Journal of Chromatography A*, v. 1069, pp. 3–22.

- DISMER, F. & HUBBUCH, J., 2007, “A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins”, *Journal of Chromatography A*, v. 1149, pp. 312-320.
- DISMER, F., PETZOLD, M. AND HUBBUCH, J., 2008, “Effects of ionic strength and mobile phase pH on the binding orientation of lysozyme on different ion-exchange adsorbents”, *Journal of Chromatography A*, v. 1194, pp. 11-21.
- DONEANU, C.E., XENOPOULOS, A., FADGEN, K., *et al.*, 2012, “Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry”, *Landes Bioscience*, v. 4, pp. 24-44.
- EDWARDS, J., KIRBY, N., 1999, “Recombinant coagulation factor IX (Benefix<sup>®</sup>)”. In: Walsh, G. and Murphy, B., *Biopharmaceuticals and industrial perspective*, 1<sup>o</sup> ed., capítulo 3, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- EL-SAYED, MMH & CHASE, HA, 2010, “Simulation of the breakthrough curves for the adsorption of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin to SP Sepharose FF cation-exchanger”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, pp. 221-228.
- FARIA, A.M., BOTTOLI, C.B.G., JARDIM, I.C.S.F., *et al.*, 2006, “Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas”, *Química Nova*, v. 29, pp. 300-309.
- FARINAS, C. S., REIS, P. C., FERRAZ, H. C., *et al.*, 2007, “Adsorption of myoglobin onto hydroxyapatite modified with metal ions”, *Adsorption Science & Technology*, v. 25 pp. 717-727.
- FILHO, F. M. e MENDIETA-TABOADA, O., 2005, “Cromatografia de interação hidrofóbica”. In: Pessoa Jr., A. e Kilikian, B.V., *Purificação de produtos biotecnológicos*, 1<sup>o</sup> Ed, capítulo 10, editora Manole, Burueri, SP.

- FOSTER, W.B., COSTIGAN, R.J., BONAM, D., *et al.*, 1998, “Factor IX purification methods”, United State Patent US 6627737.
- FRAUD, NATHALIE, FABER, R., KISS, C., *et al.*, 2009, “Hydrophobic-interaction membrane chromatography for large-scale purification of biopharmaceuticals”, *BioProcess International*, disponível em [www.sartorius.com](http://www.sartorius.com). Acessado em 22/07/10.
- FUKUMORI, N. T. O., 2008, ”Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação”, Dissertação de MSc., IPEN-CNEN, São Paulo, SP, Brasil.
- GAGNON, P., 2012, “Technology trends in antibody purification”, *Journal of Chromatography A*, v. 1221, pp. 57– 70.
- GAGNON, P., 2006, “Monoliths seen to revitalize bioseparations”, *GEN*, v. 26.
- GAGNON, P., CHEUNG, C-W., YAZAKI, P. J., 2009a, “Reverse calcium affinity purification of Fab with calcium derivatized hydroxyapatite”, *Journal of Immunological Methods*, v. 342, pp. 115–118.
- GAGNON, P., CHEUNG, C-W., YAZAKI, P. J., 2009b, “Monoclonal antibody purification with hydroxyapatite”, *New Biotechnology*, v. 25, pp. 287-293.
- GALAN, A.M., REVERTER, J.C., BOZZO, J., *et al.*, 1999, “Assessment of potential thrombogenicity of coagulation factor ix concentrates in an in vitro model of human thrombogenesis”, *Thrombosis Research*, v. 96, pp. 383–389.
- GAUCI, V.J., WRIGHT, E.P. AND COORSEN, J.R., 2011, “Quantitative proteomics: assessing the spectrum of in-gel protein detection methods”, *Journal of Chemical Biotechnology*, v.4, pp. 3-29.

GE HEALTHCARE HANDBOOKS, 2004, “Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods”, disponível em [www.gehealthcare.com](http://www.gehealthcare.com). Acessado em setembro de 2010.

GENG, X., GUO, L. AND CHANG, J., 1990, “Study of the retention mechanism of proteins in hydrophobic interaction chromatography”, *Journal of Chromatography*, v. 507, pp. 1–23.

GERSTNER, J. A., HAMILTON, R., CRAMER, S. M., 1992, “Membrane chromatographic systems for high-throughput protein separations”, *Journal of Chromatography A*, v. 596, pp. 173-180.

GILLIS, S., FURIE, B.C., FURIE, B., *et al.*, 1997, “Gamma-Carboxyglutamic acids 36 and 40 do not contribute to human factor IX function”, *Protein Science*, v. 6, pp.185-196.

GORBUNOFF, M. J., TIMASHEFF, S. N., 1984, “The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism”, *Analytical Biochemistry*, v. 136, pp. 440-445.

GUO, W., SHANG, Z., YU, Y., *et al.*, 1994, “Membrane affinity chromatography of alkaline phosphatase”, *J. Chromatograph A*, v. 685, pp. 344-348.

GUSE, A.H., MILTON, A.D., SCHULZE-KOOPS, H., *et al.*, 1994, “Purification and analytical characterization of an anti-CD4 monoclonal antibody for human therapy”, *Journal of Chromatography A*, v. 661, pp. 13-23.

- GUTIERREZ, A.H., MOISE, L., TERRY, F., *et al.*, 2012, “Immunoinformatic analysis of Chinese hamster ovary CHO protein contaminants in therapeutic protein formulations”, *ACM Conference on Bioinformatics Computational Biology and Biomedicine*, pp. 637-642.
- HALLGREN, K. W., HOMMEMA, E. L., MCNALLY, B. A., *et al.*, 2002, “Carboxylase overexpression effects full carboxylation but poor release and secretion of factor IX: implications for the release of vitamin K-dependent proteins”, *Biochemistry*, v.41, pp. 15045-15055.
- HARRIS, R. C., CHUNG, E., COFFEY R. J., 2003, "EGF receptor ligands", *Experimental Cell Research*, v. 284, pp. 2-13.
- HARRISON, S., ADAMSON, S., BONAM, D., *et al.*, 1998, “The manufacturing process for recombinant factor IX”, *Seminars in Hematology*, v. 35, pp. 4-10.
- HARTMANN, R., DOCKAL, M., KAMMLANDER, W., *et al.*, 2009, “Factor IX mutants with enhanced catalytic activity”, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, pp. 1656–1662.
- HEMOBRÁS, 2012, “Plano anual de atividades de auditoria interna exercício de 2012”, disponível em <http://www.hemobras.gov.br/site/downloads/PAINT-2012.pdf>, acessado em 20/03/2013.
- HOFFER, L., SCHWINN, H., JOSIC, D., 1999, “Production of highly purified clotting factor IX by a combination of different chromatographic methods”, *Journal of Chromatography A*, v. 844, pp. 119–128.
- HOFFMAN, M., 2004, “Remodeling the blood coagulation cascade”, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 16, pp. 17-20.



- HU, M. X., WAN, L. S., XU, Z. K., 2009, “Multilayer adsorption of lectins on glycosylated microporous polypropylene membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 335, pp. 111–117.
- HUBBUCH, J., LINDEN, T., KNEIPS, E., *et al.*, 2002, “Dynamics of protein uptake within the adsorbent particle during packed bed chromatography”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, pp. 359–368.
- HUNT, B., GODDARD, C., MIDDELBERG, A. P.J., O’NEILL, B. K., 2001, “Economic analysis of immunoabsorption systems”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 9, pp. 135–145.
- HUSI, H., WALKINSHAW, M. D., 1999, “Separation of human vitamin K-dependent coagulation proteins using hydrophobic interaction chromatography”, *Journal of Chromatography A*, v. 736, pp. 77-88.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6B, 1999, disponível em [www.ich.org](http://www.ich.org), acessado em 23 de Janeiro de 2013.
- JENNISSEN, H.P., 1986 “Protein binding to two-dimensional hydrophobic binding the lattices: Sorption kinetics of phosphorylase *b* on immobilized butyl residues”, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 111, pp. 570–586.
- JEÓLAS, L.C. (1979), “Síndrome do coágulo intratorácico”, *Jornal de Pneumologia*, vol. 5, pp. 161-162.
- JIANG, C., LIU, J., RUBACHA, M. *et al.*, 2009, “A mechanistic study of protein A chromatography resin lifetime”, *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 5849-5855.

- JIN, M., SZAPIEL, N., ZHANG, J., *et al.*, 2010, “Profiling of host cell proteins by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Implications for downstream process development”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 105, pp. 306-316.
- JORGENSEN, M. J., CANTOR, A. B., FURIE, B. C., *et al.*, 1987, “Recognition site directing vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation resides on the propeptide of factor IX”, *Cell*, v. 48, pp. 185-191.
- JOSIC, D., HOIN, H., SCHULZ, P., *et al.*, 1998, “Size-exclusion chromatography of plasma proteins with high molecular masses”, *Journal of Chromatography A*, v. 796, pp. 289-298.
- JUNGBAUER, A. AND HAHNA, R., 2008, “Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies”, *Journal of Chromatography A*, v. 1184, pp. 62–79.
- KARLSSON, E. AND HIRSH, I., 2011, “Ion exchange chromatography”. In: Janson, J.-C. *Protein purification – principles, high resolution methods, and applications*, 3<sup>o</sup> ed., ed. Wiley, New Jersey.
- KAUFMAN, R. J., WASLEY, L. C., FURIE, B. C., *et al.*, 1986, “Expression, Purification, and Characterization of Recombinant  $\gamma$ -Carboxylated Factor IX Synthesized in Chinese Hamster Ovary Cells”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 261, pp. 9622-9628.
- KAWAI, T., SAITO, K., LEEB, W., 2003, “Protein binding to polymer brush, based on ion-exchange, hydrophobic, and affinity interactions”, *Journal of Chromatography B*, v. 790, pp. 131–142.

- KIM, W.H., KIM, J-S., YOON, Y., *et al.*, 2009, “Effect of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentration in culture medium on the activation of recombinant factor IX produced in Chinese hamster ovary cells”, *Journal of Biotechnology*, v. 142, pp. 275-278.
- KLEIN, E., 2000, “Affinity membranes: a 10-year review”, *Journal of Membrane Science*, v. 179, pp. 1-27.
- KLEIN, E., EICHHOLZ, E., YEAGER, D. H., 1994, “Affinity membranes prepared from hydrophilic coatings on microporous polysulfone hollow fibers”, *Journal of Membrane Science*, v. 90, pp. 69-80.
- KLEINSCHNITZ, C., STOLL, G., BENDSZUS, M., *et al.*, 2006, “Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis”, *Journal of Experimental Medicine*, v. 203, pp. 513-518.
- KNUDSEN, H. L., FAHRNER, R. L., XU, Y., *et al.*, 2001, “Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification”, *Journal of Chromatography A*, v. 907, pp. 145-154.
- KRAUSE, S., KRONER, K.H., DECKWER, W.D., 1991, “Comparison of affinity membranes and conventional affinity matrices with regards to protein purification”, *Biotechnology Techniques*, v. 5, pp. 199-204.
- KUCZEWSKI, M., FRAUD, N., FABER, R., *et al.*, 2010, “Development of a polishing step using a hydrophobic interaction membrane adsorber with a PER.C61-derived recombinant antibody”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 105, pp. 296-305.
- KURACHI, K., KURACHI, S., FURUKAWA, M., *et al.*, 1993, “Biology of factor IX”, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 4, pp. 953-974.

- LEYTUS, S. P., FOSTER, D. C., KURACHI, K., *et al.*, 1986, "Gene for human factor X: a blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IX and protein C", *Biochemistry*, v. 25, pp. 5098-5102.
- LI, Y-L. & PINTO, N.G., 1994, "Influence of lateral interactions on preparative protein chromatography: I. Isotherm behavior", *Journal of Chromatography A*, v. 658, pp. 445-457.
- LIANG, H-C., CHANG, W-H., LIANG, H-F., *et al.*, 2004, "Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 91, pp. 4017-4026.
- LIN, F.-Y., CHEN, W.-Y. AND HEARN, M.T.W., 2001, "Microcalorimetric studies on interaction mechanism between proteins and hydrophobic solids Surfaces in Hydrophobic Interactions Chromatography: Effects of Salt, Hydrophobicity of the Sorbent, and Structure of the Protein", *Analytical Chemistry*, v.73, pp. 3875-3883.
- LIN, P-C., LIN, S-C., HSU, W-H., 2008, "Adsorption behaviors of recombinant proteins on hydroxyapatite-based immobilized metal affinity chromatographic adsorbents", *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v. 39, pp. 389-398.
- LINHARDT, R., J., 2003, "Heparin: Structure and activity", *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, pp. 2551-2564.
- LIU, H.F., McCOOEY, B., DUARTE, T., *et al.*, 2011, "Exploration of overloaded cation exchange chromatography for monoclonal antibody purification", *Journal of Chromatography A*, v. 1218, pp. 6943-6952.
- LOWE, G.D.O., 2001, "Factor IX and thrombosis", *British Journal of Haematology*, v. 115, pp. 507-513.

- MA, A., LAN, Z., MATSUURA, T., *et al.*, 2009, “Electrospun polyethersulfone affinity membrane: Membrane preparation and performance evaluation”, *Journal of Chromatography B*, v. 877, pp. 3686–3694.
- MA, R., FAN, D.-D., XUE, W.-J., *et al.*, 2010, “Endotoxin Removal during the Purification Process of Human-like Collagen”, *Separation Science and Technology*, v. 45., p. 2400-2405.
- MA, Z., MASAY, Z., MASAY, K., *et al.*, 2006, “Immobilization of Cibacron blue F3GA on electrospun polysulphone ultra-fine fiber surfaces towards developing an affinity membrane for albumin adsorption”, *Journal of Membrane Science*, v. 282, pp. 237–244.
- MACGREGOR, I., MCLAUGHLIN, L., DRUMMOND, O., *et al.*, 1995, “In vivo models of thrombogenic potential: usefulness and limitations”. *Acta Haematologica* , v. 94, pp. 18-23.
- MAH, K. Z., GHOSH, R., 2010, “Paper-based composite lyotropic salt-responsive membranes for chromatographic separation of proteins”, *Journal of Membrane Science*, v. 360, pp. 149–154.
- MAZIN, A. P., FERRAZ, H. C., CASTILHO, L. R., 2009, “Desenvolvimento de membranas adsorptivas para purificação do Fator IX”, *Simpósio de processos de Separação com Membranas/SIMPAM*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 20-24 Julho.
- MELANDER, W., CORRADINI, D. AND HORVÁTH, C., 1984, “Salt mediated retention of proteins in hydrophobic interaction chromatography: application of solvophobic theory”, *Journal of Chromatography*, v. 317, pp. 67–85.
- MELLADO, M. C., 2005, “Purificação de eritropoetina recombinante empregando membranas de afinidade”, Dissertação de MSc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- MELTER, L., BUTTE, A. AND MORBIDELLI, M., 2008, “Preparative weak cation-exchange chromatography of monoclonal antibody variants I. Single-component adsorption”, *Journal of Chromatography A*, v. 1200, pp. 156–165.
- MILTRA, G., HALL, E, MITRA, I., 1986, “Application of immobilized heparins for isolation of human antithrombin III”, *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 217–222.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008, *Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil – 2007*, editora MS, Brasília, DF. Disponível em: [www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/perfil\\_coagulopatias\\_hereditarias\\_brasil\\_2007.pdf](http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_2007.pdf), acessado em 15 de fevereiro de 2009.
- MITULOVIC, G. AND MECHTLE, K., 2006, “HPLC techniques for proteomics analysis-a short overview of latest developments”, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. v. 5, pp. 249-260.
- MORAES, A.M, CASTILHO, L.R., BUENO, S.M., 2008, “Processos de purificação dos produtos”. In: MORAES, A.M., CASTILHO, L.R., AUGUSTO, E.F.P., *Tecnologia do cultivo de células animais – De biofármacos a terapia gênica*, 1º edição, capítulo 12, Editora ROCA, São Paulo – SP.
- NAKAJIMA, N., IKADA, Y., 1995, “Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media”, *Bioconjugate Chemistry*, v. 6, pp. 123-130.
- NAM, K., KIMURA, T., KISHIDA, A., 2008, “Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents”, *Macromolecular Bioscience*, v. 8, pp. 32–37.
- NELSON, D.L. AND COX, M.M., 2011, “Princípios de bioquímica de Lehninger”, 5ª edição, ed. Artmed, Porto Alegre, RS.

- NORDSTRÖM, T., SENKAS, A., ERIKSSON, *et al.*, 1999, “Generation of a new protein purification matrix by loading ceramic hydroxyapatite with metal ions - demonstration with poly-histidine tagged green fluorescent protein”, *Journal of Biotechnology* v. 69, pp. 125-133.
- O’NEILL, M., MCPARTLIN, J., ARTHURE, K., *et al.*, 2011, “Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system”, *Journal of Physics: Conference Series*, v. 307, pp. 1-6.
- OGAWA, T., HIRAIDE, T., 1995, “Effect of pH on gradient elution of proteins on two types of CHT™ Ceramic Hydroxyapatite”, apresentado por Dr. Tetsuro Ogawa na PrepTech 95, Industrial Separation Science Conference, East Rutherford, NJ, USA, 13-15 Fevereiro.
- OLDE DAMINK, L.H.H., DIJKSTRA, P.J., VAN LUYN, *et al.*, 1996, “Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide”, *Biomaterials*, v. 17, pp. 765-773.
- OLDENBURG, J., MARINOVA, M., MULLER-REIBLE, C., *et al.*, 2008, “The Vitamin K Cycle”, *Vitamins and Hormones*, v. 78, pp. 35-62.
- OPITZ, L., LEHMANN, S., REICHL, U., *et al.*, 2009, “Sulfated membrane adsorbents for economic pseudo-affinity capture of influenza virus particles”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, pp. 1144-1154.
- OSCARSSON, S., 1995, “Influence of salts on protein interactions at interfaces of amphiphilic polymers and adsorbents”, *Journal of Chromatography B*, v. 666, pp. 21-31.
- OSTERUD, B., BOUMA, B.N. & GRIFFIN, J.H., 1978, “Human blood coagulation factor IX: purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XI”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 253, pp. 5946-5951.

- PABBY, A. K., RIZVI, S. S. H., SASTRE, A. M., 2009, “Handbook of membrane separations: Chemical, pharmaceutical, food, and biotechnological applications”, In: Capítulo 3- Membrane chromatography, Editora CRC Press, Nova York.
- PODGORNIK, A., JANCAR, J., MERHAR, M., *et al.*, 2004, “Large-Scale Methacrylate Monolithic Columns: Design and Properties”, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 60, pp. 179-189.
- PURRELLO, M., ALHADEFF, B., ESPOSITO, D., *et al.*, 1985, “The human genes for haemophilia A and haemophilia B flank the X chromosome fragile site at Xq27.3”, *The EMBO Journal.*, v. 4, pp. 725-729.
- QUEIROZ, J.A., TOMAZ, C.T., *et al.*, 2001, “Hydrophobic interaction chromatography of proteins”, *Journal of Biotechnology*, v. 87, pp. 143–159.
- RAW, I., MARTINS, E.A.L., HIGASHI, H.G., 2007, “Métodos de fracionamento do plasma”. In: BORDIN, J.O., JUNIOR, D.M.L., COVAS, D.T., *Hemoterapia – Fundamentos e prática*, 1º edição, capítulo 29, Editora Atheneu, São Paulo – SP.
- REIS, R. V., ZYDNEY , A., 2007, “Bioprocess membrane technology”, *Journal of Membrane Science*, v. 297, pp. 16–50.
- RIBEIRO, D. A., 2009, “Co-expressão dos Genes do Fator IX e das enzimas  $\gamma$ -carboxilase, VKORC1 e PACE em Células CHO”, Dissertação de MSc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- RIDDEL, J. P., AOUIZERAT, B. E., MIASKOWSKI, C., *et al.*, 2007, “Theories of blood coagulation”, *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, v. 24, pp. 123-131.



- RIVIECCIO, V., ESPOSITO, A., BELLOWORE, P., *et al.*, 2007, “High-level expression and efficient purification of recombinant human long pentraxin PTX3 in Chinese hamster ovary cells”, *Protein Expression and Purification*, v. 51, pp. 49-58.
- RODRIGUES, A. T. A., MORO, A. M., 2008, “Aspectos regulatórios”. In: Moraes, A.M., Castilho, L.R., Augusto, E.F.P., *Tecnologia do cultivo de células animais – de biofármacos a terapia gênica*, 1º edição, capítulo 14, ed. ROCA, São Paulo – SP.
- ROETTGER, B.F., MYERS, J.A., LADISCH, M.R., *et al.*, 1989, “Adsorption phenomena in hydrophobic interaction chromatography”, *Biotechnology Progress*, v. 5, pp. 79–88.
- SAKODA, Y., OKAMATSU, M., ISODA, N., *et al.*, 2012, “Purification of human and avian influenza viruses using cellulose sulfate ester (Cellufine Sulfate) in the process of vaccine production”, *Microbiology and Immunology*, v. 56, pp. 490-495.
- SAM, S., TOUAHIR, L., SALVADOR, J., *et al.*, 2010, “Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces”, *Langmuir*, v. 26, pp. 809–814.
- SANTOSO, F., ALBRECHT, W., SCHROETER, *et al.*, 2003, “A novel technique for preparation of aminated polyimide membranes with microfiltration characteristics”, *Journal of Membrane Science*, v. 223, pp. 171–185.
- SARTORIUS STEDIM BIOTECH, 2009, “*Phenyl* membranes adsorber for bioprocess”, disponível em: [www.sartorius.com](http://www.sartorius.com). Acessado em 12/08/09.
- SCHENAUER, M. R., FLYNN, G. C. AND GOETZE, A.M., 2012, “Identification and quantification of host cell protein impurities in biotherapeutics using mass spectrometry”, *Analytical Biochemistry*, v. 428, pp. 150–157.

- SCOPE, R. K., 1993, *Protein purification: principles and practice*, 3<sup>o</sup> ed., New, York, USA, ed. Springer.
- SMREKAR, V., SMREKAR, F., STRANCAR, A., et al., 2013, “Single step plasmid DNA purification using methacrylate monolith bearing combination of ion-exchange and hydrophobic groups”, *Journal of Chromatography A*, v. 1276, pp. 58– 64.
- SOFER, G. & ZABRISKIE, D.W., 2000, “Biopharmaceutical process validation”, ed. Marcel Dekker, NY, USA.
- SOLOMONS, G., FRYLE, C., 2002, “Química orgânica”, 7<sup>a</sup> edição, ed. LTC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SRAJER, G.M., CLIFTON, J. AND JOSIC, DJ. 2012, “Sample displacement chromatography as a method for purification of proteins and peptides from complex mixtures”, *Journal of Chromatography A*, v.1239, pp. 1-9.
- STABY, A., JENSEN, I.H. AND MOLLERUP, I, 2000, “Comparison of chromatographic ion-exchange resins I. Strong anion-exchange resins”, *Journal of Chromatography A*, v. 897, pp. 99-111.
- STENFLO, J., 1976, “A new vitamin K-dependent protein”, *Journal Biological Chemistry*, v. 251, pp. 355-363.
- STRACKE, M.L., KRUTZSCH, H.C., UNSWORTH, E.J., et al., 1992, “Identification, purification and partial sequence analysis of Autotaxin, a novel motility-stimulating protein”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, pp. 2524–2529.

- STROHL, W. R. & KNIGHT, D. M., 2009, “Discovery and development of biopharmaceuticals: current issues”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, pp. 1-5.
- SUGIYAMA, S., SHIMIZUC, Y., MANABE, T., *et al.*, 2009, “Preparation of a hydroxyapatite film and its application in the removal and regeneration of aqueous cations “, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 332, pp. 439–443.
- SUN, Y-L., CHANG, Y-S., LIN, Y-S, *et al.*, 2012, “Pilot production of recombinant human clotting factor IX from transgenic sow milk”, *Journal of Chromatography B*, v. 898, pp. 78-89.
- SUNNERHAGEN, M., FORSEN, S., HOFFREN, A., *et al.*, 1995, “Structure of Ca<sup>2+</sup> - free GLA domain sheds light on membrane binding of blood coagulation proteins”. *Nature Structural Biology*, v. 2, pp. 504-509.
- SUZUKI, N., FUJIMOTO, Z., MORITA, T., *et al.*, 2005, “pH-dependent structural changes at Ca(2+)-binding sites of coagulation factor IX-binding protein”, *Journal of Molecular Biology.*, v. 353, pp. 80-87.
- THOMPSON, S. A., HIGASHIYAMANLL, S., WOODS, K., 1994, “Characterization of sequences within heparin-binding EGF-like growth factor that mediate interaction with heparin”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, pp. 2541-2549.
- TISELIUS, A., 1948, “Adsorption separation by salting out. Arkiv for Kemi”, *Mineralogi Geologi*, v. 26B, pp. 1–5.
- VILANI, C., 2006, “Modificação superficial por plasma de rádio-freqüência de membranas de poliuretano para pervaporação de misturas metanol/mtbe”, Tese de DSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- VLAKH, E.G. AND TENNIKOVA, T.B., 2009, "Applications of polymethacrylate-based monoliths in high-performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 1216, pp. 2637–2650.
- WAJIH, N., HUTSON, S. M., OWEN, J., *et al.*, 2005, "Increased production of functional recombinant human clotting factor IX by baby hamster kidney cells engineered to overexpress VKORC1, the vitamin K 2,3-epoxide-reducing enzyme of the vitamin K cycle", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, pp. 31603-31607.
- WAJIH, N., HUTSON, S. M., WALLIN R., 2006, "siRNA silencing of calumenin enhances functional factor IX production", *Blood*, v. 108, pp. 3757-3760.
- WAJIH, N., SANE D. C., HUTSON, S. M., *et al.*, 2004, "The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system: characterization of the system in normal and warfarin resistant rats", *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, pp. 25276-25283.
- WALLIN, R., HUTSON, S. M., 2004, "Warfarin and the vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation system", *TRENDS in Molecular Medicine*, v. 10, pp. 299-302.
- WALLIN, R., HUTSON, S. M., CAIN, D., *et al.*, 2001, "A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in rat", *The FASEBJ Journal.*, v. 15, pp. 2542-2544.
- WANG, X. HUNTER, A.K. AND MOZIER, N.M., 2009, "Host cell proteins in biologics development: identification, quantitation and risk assessment", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, pp. 446-458.
- WASLEY, L. C., REHEMTULLA, A., BRISTOL, J. A., *et al.*, 1993, "PACE/Furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway", *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, pp. 8458-8465.

- WEAVER, J., HUSSON, S.M., MURPHY, *et al.*, 2013, “Anion exchange membrane adsorbers for flow-through polishing steps: part II. virus, host cell protein, DNA clearance, and antibody recovery”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 110, pp. 500-510.
- WENSEL, D. L., KELLEY, B. D., COFFMAN, J. L., 2008, “High-Throughput screening of chromatographic separations: III. Monoclonal antibodies on ceramic hydroxyapatite”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, pp. 839-854.
- YAMAMOTO, S., NAKAMURA, M., TARMANN, C., *et al.*, 2007, “Retention studies of DNA on anion-exchange monolith chromatography: Binding site and elution behavior”, *Journal of Chromatography A*, v. 1144, pp. 155-160.
- YAN, S. B., 1996, “Review of conformation-specific affinity purification methods for plasma vitamin K-dependent proteins”, *Journal of Molecular Recognition*, v. 9, pp. 211-218.
- YAN, S.B., 1991, “Method for the purification of vitamin k-dependent proteins”, U.S. Patent 4981952.
- YANG, L., MANITHODY, C., REZAIE, A. R., 2002, “Localization of the heparin binding exosite of factor IXa”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, pp. 50756–50760.
- YOSHIDA, N. and ISHIDA, K., 2007, “Spherical sulfated cellulose and production process for the same”, US patent 0049746 A1.
- YOSHITAKE, S., SCHACH, B. G., FOSTER, D. C., *et al.*, 1985, “Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B)”, *Biochemistry*, v. 24, pp. 3736-3750.

- ZANGI, R., HAGEN, M. AND BERNE, B.J., 2007, "Effect of ions on hydrophobic interaction between two plates", *Journal American Chemical Society*, v. 129, pp. 4678-4686.
- ZENG, X. F., RUCKENSTEIN, E., 1998, "Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations", *Journal of Materials Science*, v. 148, pp. 195-205.
- ZHANG, H., WU, C., ZHANG, Y., *et al.*, 2010, "Elaboration, characterization and study of a novel affinity membrane made from electrospun hybrid chitosan/nylon-6 nanofibers for papain purification", *Journal of Materials Science*, v. 45, pp. 2296-2304.
- ZOU, H., LUO, Q., ZHOU, D., 2001, "Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, pp. 199-240.