CLAUDIA IWASHITA

**NOVAS ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DOS FATORES DE
COAGULAÇÃO FATOR VIII E PROTEÍNA C A PARTIR DE
PLASMA HUMANO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2012

CLAUDIA IWASHITA

**NOVAS ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DOS FATORES DE
COAGULAÇÃO FATOR VIII E PROTEÍNA C A PARTIR DE
PLASMA HUMANO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elisabeth Cheng

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Iwashita, Claudia.

Novas estratégias de purificação dos fatores de coagulação Fator VIII e Proteína C a partir de plasma humano empregando cromatografia líquida / Claudia Iwashita. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Elizabeth Cheng.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Purificação de proteínas do plasma humano

Versão do título para o inglês: New strategies of purification of coagulation Factor VIII and Protein C from human plasma using liquid chromatography.

Descritores: 1. FVIII 2. Proteína C 3. IMAC 4. Cromatografia 5. Purificação de Proteínas I. Cheng, Elizabeth II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB029/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Claudia Iwashita.

Título da Dissertação: Novas estratégias de purificação dos fatores de coagulação Fator VIII e Proteína C a partir de plasma humano empregando cromatografia líquida.

Orientador(a): Elizabeth Cheng.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

*À minha mãe Maria Kato e ao meu namorado
Michel de Abreu Verinaud por todo amor,
carinho, apoio e incentivo.*

*À todos aqueles que um dia se beneficiarão das
pesquisas realizadas com Hemoderivados.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por direcionar-me à procura da felicidade e da sabedoria e por guiar meu caminho a todo momento.

Ao programa de **Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT**, em nome da coordenadora do curso **Dra Ana Clara G. Schenberg**, pela oportunidade de desenvolver o mestrado por este programa.

Ao **CNPq** e à **Fundação Butantan** pelo suporte financeiro concedido.

À minha orientadora **Dra Elisabeth Cheng** (Beth Cheng), a quem devo muito pela confiança depositada, pelos ensinamentos práticos e teóricos diariamente no laboratório e, acima de tudo, pelo exemplo de pessoa correta. Beth, gostaria que soubesse que eu a admiro muito por toda sua dedicação ao trabalho, nunca deixando a família de lado. Obrigada por ter me convidado e me incentivado a desenvolver o mestrado após o aprimoramento, por estar sempre disposta a conversar, seja discutindo resultados e futuros experimentos, ou me aconselhando na vida pessoal e profissional.

À **Dra Elizabeth Angelica Martins Leme** (Beth Martins), pela companhia e risadas no laboratório e pelos inúmeros aprendizados. Beth, obrigada pela oportunidade de aprender a trabalhar em processos em escala piloto, tanto na área de Hemoderivados, quanto na área de desenvolvimento de vacinas. Também agradeço pelas valiosas sugestões na apresentação da qualificação.

Ao **Dr Alexandre Yague** Lopes (Alê), pela companhia no laboratório. Alê, obrigada por todas as sugestões valiosas na apresentação da qualificação.

À **Dra Anita Mítico Tanaka-Azevedo** (Anita), por ter me ajudado além da qualificação. Anita, obrigada por ser tão amiga, por ter se disposto a conversar detalhadamente sobre meu trabalho e por todo carinho.

À **Dra Mickie Takagi** (Mickie), pelas sugestões após a qualificação. Mickie, obrigada pela gentileza em se dispor a sugerir mudanças no meu trabalho, mesmo não participando formalmente da minha banca de qualificação. Obrigada por todo apoio emocional e por todo carinho.

À todos os **pesquisadores** do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan por disponibilizarem o espaço físico e os equipamentos, pelos ensinamentos em aulas e seminários.

Aos membros da banca de qualificação: **Dra Anita Mítico Tanaka-Azevedo**, **Dra Ana Marisa Chudzinski Tavassi** e **Dra Saartje Hernalsteens** pela participação e pelas sugestões na qualificação.

À minha família, em especial à minha mãe **Maria Kato**, que sempre me incentivou a procurar o melhor para minha carreira, mesmo com as dificuldades e a quem eu devo muito pelos ensinamentos sobre a vida e valores morais. Mãe, você é uma mulher batalhadora e guerreira e espero um dia ser um pouco do que você é.

Ao meu namorado **Michel de Abreu Verinaud** (Morzão), por tanto amor, carinho, paciência e incentivo. Morzão, obrigada por estar comigo em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins e me proporcionar tanta alegria. Obrigada por sempre me incentivar a continuar os estudos e a buscar uma vida melhor e por entender os meus feriados e finais de semana de trabalho. Sem todo o seu apoio eu não teria concluído este trabalho. Obrigada por me fazer tão feliz e me fazer sentir a pessoa mais especial do mundo!

À minha dentista **Dra Emiko Clarice Okamoto** (Dra Emiko), que é mais do que uma dentista, é uma amiga e conselheira. Obrigada por sempre estar pronta para dizer belas palavras confortantes em momentos difíceis e por sempre me fazer acreditar na realização dos meus objetivos com pensamentos positivos.

À **Roberta Rodrigues de Carvalho** (Rô), por ter sido a primeira a me ajudar no laboratório e a me ensinar a dar os primeiros passos para fazer uma cromatografia. Rô, obrigada pela amizade, pelas caronas e companhia na volta para casa, pelas

conversas e inúmeras risadas. Obrigada por continuar sempre por perto mesmo em outro laboratório e por tornar os dias mais engraçados e divertidos. Obrigada por tanto carinho sempre! Também gostaria de agradecer à sua filha **Danna**, que fez parte do meu dia-a-dia, tornando a volta para casa mais divertida.

À **Erika Nakajima** (Erikita), por tantas ajudas no laboratório, por sempre estar disposta a me ajudar em tudo, independente do que fosse. Erikita, obrigada por tantas conversas e desabafos e pelas mil e uma ajudas, por sempre me levar na secretaria da Biotec e nos outros lugares que precisei ir durante esses 3 anos, inclusive para comer hot dog. Obrigada por toda ajuda na qualificação, desde a paciência em me ouvir reclamando, até arrumar a sala e os equipamentos para apresentação e anotar tudo durante a argüição. Obrigada por todo apoio emocional neste final de trabalho e pelo carinho nestes anos!

À **Daniela Jinzenji** (Dani), por ser tão paciente, prestativa e atenciosa. Dani, obrigada pelos conselhos e discussões sobre os meus experimentos, pelas ajudas nas revelações dos western, pelos ensinamentos e pelas conversas diariamente. Obrigada também pelos ensinamentos na planta piloto.

À **Patrícia Placoná Diniz** (Patota), por ser tão alto astral e me fazer rir sempre. Patota, obrigada por alegrar o laboratório e tornar o trabalho mais leve, por cantar músicas que ninguém gosta, mas que mesmo assim todos se divertem. Você faz falta no laboratório!

À **Beatriz Isva Gonçalves** (Bia), pela amizade desde o primeiro dia do programa de aprimoramento. Bia, obrigada por todas as conversas, por sempre me ouvir, pelas caminhadas, pela companhia no almoço e por ser tão dedicada nos trabalhos que tivemos que fazer nestes anos. Obrigada pela ajuda na qualificação e por todo carinho nestes 3 anos!

Ao **Juliano Ventura** (Jú), pela companhia, conversas e risadas no laboratório e no almoço. Jú, obrigada por trazer toda sua calma ao laboratório e obrigada por me ensinar a usar o AKTA Pilot.

Ao **Bruno Vitório Marthos** (Bruno), pela amizade, companhia e risadas nas aulas e no almoço.

Ao **Paulo Vinícius Sanches Daltro de Carvalho** (Vinícius), pelas discussões sobre diluições, pela companhia, conversas e risadas no laboratório e no SBBq.

A **Laís de Lara Capurro Guimarães** (Laís), pela companhia no laboratório e por ser tão alto astral e engraçada. Laís obrigada por cada momento de alegria que você trouxe ao laboratório nos últimos meses.

À todos que estiveram juntos no processo da Sm TSP-2 na planta piloto de produtos recombinantes e que muito contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional: **Beth Martins, Beth Cheng, Mickie, Erika, Dani, Jú, Juliano Buba, Felipe Cintra, Fernando, Ivana, Celso, Nelson, Marilene, Raimunda, Paulo Lee Ho, Enéas, Léa, Adriano e aos funcionários da área de lavagem e esterilização de materiais da planta da Influenza.**

À todos aqueles que passaram pelo laboratório neste período, seja para trabalhar ou para conversar: **Cris, Hebert, Aline, Léa, Paulo, Lud, Henrique, Vivian, Fernanda, Naty, Camila e Mariana (Vet), Mariana (Rocilda) e Rafa.**

À **Sueli**, por sempre estar disposta a ajudar com as coisas do laboratório e por ser tão alto astral. Ao **Joselino**, por sempre estar de bom humor e lavar nosso material com tanta dedicação. Ao segurança **André** por sempre se preocupar comigo quando ficava até tarde no laboratório. À **Marisa**, por alegrar meus dias com doces deliciosos. E à todos os outros funcionários do Centro de Biotecnologia que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do Programa Interunidades em Biotecnologia, **Marcos, Fábria e Eliane** por todo serviço prestado durante o mestrado.

Às bibliotecárias **Maria do Socorro e Valéria**, da biblioteca do ICB-USP, que fizeram a revisão do trabalho e foram tão atenciosas e prestativas.

*"Uma vida sem desafios não vale a pena
ser vivida".*
(Rubem Alvez)

*"Plante seu jardim e decore sua alma, ao
invés de esperar que alguém lhe traga
flores. E você aprende que realmente
pode suportar, que realmente é forte, e
que pode ir muito mais longe depois de
pensar que não se pode mais. E que
realmente a vida tem valor e que você
tem valor diante da vida."*
(William Shakespeare)

RESUMO

IWASHITA, C. **Novas estratégias de purificação dos fatores de coagulação Fator VIII e Proteína C a partir de plasma humano empregando cromatografia líquida.** 2012. 142 f. [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)], Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Neste trabalho estudou-se alguns métodos de purificação de fator VIII de coagulação (FVIII) e da Proteína C (PC) por cromatografia. O concentrado de FVIII é utilizado no tratamento de hemofilia A, enquanto que concentrados de PC são usados em pacientes em risco de sofrer trombose venosa profunda. Concentrados de PC ativada podem ser usados no tratamento de septicemias. O emprego da coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF como primeira etapa de purificação do plasma permite a eluição do FVIII e da PC com bom fator de purificação. Neste contexto, propomos a separação de FVIII e PC empregando cromatografia de afinidade a metal (IMAC) através de um estudo sistemático empregando colunas IMAC-Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ e Fe³⁺ e os métodos de dessorção empregando imidazol, cloreto de amônio e variação de pH. Em colunas com os metais Fe³⁺ e Ni²⁺ as proteínas da amostra de entrada praticamente não se ligaram à resina. De um modo geral, a PC ligou-se muito mais fracamente às colunas de IMAC do que o FVIII. Em IMAC-Co²⁺, a PC não é adsorvida pela resina enquanto o FVIII pode ser eluído com imidazol 100 mM. Em IMAC-Cu²⁺ a PC pode ser eluída com imidazol 10mM e o FVIII com 200mM. As proteínas ligaram-se muito mais fortemente ao Cu²⁺ do que aos outros metais estudados. Não foi possível eluir as proteínas da coluna IMAC-Cu²⁺ nem com NH₄Cl 1M nem quando o pH foi abaixado até 4,0. Em IMAC-Zn²⁺ a PC não é adsorvida e o FVIII pode ser eluído com imidazol 200mM ou NH₄Cl 1M. Diminuindo-se o pH, as proteínas foram eluídas, mas a recuperação da atividade do FVIII foi baixa, quando partiu-se de pH 7,0, ou nenhuma, quando partiu-se de pH 6,0. Concluímos que as proteínas FVIII e a PC podem ser bem separadas empregando IMAC-Cu²⁺, IMAC-Zn²⁺ e IMAC-Co²⁺, sendo esta última coluna apresentou os melhores rendimentos e melhores fatores de purificação para as 2 proteínas.

Palavras-chave: FVIII. Proteína C. IMAC. Cromatografia. Purificação de proteínas.

ABSTRACT

IWASHITA, C. **New strategies of purification of coagulation Factor VIII and Protein C from human plasma using liquid chromatography.** 2012. 142p. [Masters thesis (Biotechnology)], São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In this work purification methods for the coagulation factor VIII (FVIII) and Protein C (PC) by chromatography was studied. Coagulation FVIII concentrate is used for Hemophilia A treatment, while PC concentrates is used in patients at risk of deep vein thrombosis. Activated PC concentrates can be used for the treatment of sepsis. The use of the anion exchange column ANX Sepharose FF as the first purification step allows the elution of FVIII and PC with good purification factors. In this context, we proposed the separation of FVIII and PC using immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). A systematic study was carried out using IMAC-Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ and Fe³⁺ columns and the desorption methods employing imidazole, ammonium chloride and pH variation. In the columns containing Fe³⁺ and Ni²⁺ metal ions, proteins from the loading samples did not adsorb to the resin. In general, PC interacted much weakly with IMAC columns than FVIII. In IMAC-Co²⁺, PC was not adsorbed to the resin, while FVIII could be eluted with 100 mM imidazole. In IMAC-Cu²⁺ PC could be eluted with 10 mM imidazole and FVIII with 200 mM. Proteins were much more strongly attached to Cu²⁺ than to the other studied metals. It was not possible to elute the proteins from IMAC-Cu²⁺ column with either 1M NH₄Cl or when pH was decreased to 4,0. In IMAC-Zn²⁺, PC was not adsorbed and FVIII could be eluted with 200 mM imidazole or 1 M NH₄Cl. By decreasing the pH, proteins could be eluted, but the recovery of the FVIII was very low, when the decreasing of the pH started at pH 7,0, or none, when the decreasing of the pH started at pH 6,0. We conclude that FVIII and PC could be well separated using IMAC-Cu²⁺, IMAC-Zn²⁺ and IMAC-Co²⁺, and that the Co²⁺ column gave the best yield and purification factors for the 2 proteins.

Keywords: FVIII. Protein C. IMAC. Chromatography. Purification of proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1 - Fracionamento de plasma pelo método de Cohn-Oncley.</i>	26
<i>Figura 2 - Ativação da resina e imobilização do metal.</i>	1
<i>Figura 3 - Modelo clássico da cascata de coagulação proposto nos anos 60.</i>	31
<i>Figura 4 - Ilustração do modelo celular da cascata de coagulação.</i>	1
<i>Figura 5 - Via da Proteína C no mecanismo de controle da coagulação.</i>	1
<i>Figura 6 - Estrutura, função e processamento do FVIII.</i>	34
<i>Figura 7 - Estrutura das proteínas dependentes de vitamina K presentes no plasma humano.</i>	39
<i>Figura 8 - Reação de γ-carboxilação do resíduo glutamil pela enzima γ-glutamil carboxilase.</i>	40
<i>Figura 9 - Pico de acetona usado para determinação da eficiência do empacotamento a partir de um cromatograma.</i>	45
<i>Figura 10 - Fluxograma mostrando a estratégia utilizada para purificação de FVIII e PC a partir de plasma humano.</i>	50
<i>Figura 11 - Reações do teste cromogênico para determinação da atividade do FVIII nas frações cromatográficas.</i>	54
<i>Figura 12. Etapas do teste cromogênico do FVIII.</i>	54
<i>Figura 13 - Reações do teste cromogênico para determinação da atividade da PC nas frações cromatográficas.</i>	55
<i>Figura 14 - Etapas do teste cromogênico da Proteína C.</i>	55
<i>Figura 15 - Avaliação do empacotamento da resina ANX Sepharose FF em coluna XK 26/40.</i>	58
<i>Figura 16 - Perfil cromatográfico da purificação de plasma em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).</i>	60
<i>Figura 17 - Curva de calibração utilizada no teste cromogênico para determinação de atividade do FVIII nas frações da purificação de plasma em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).</i>	60
<i>Figura 18 - Curva de calibração utilizada no teste cromogênico para determinação de atividade da PC nas frações da purificação de plasma em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).</i>	61
<i>Figura 19 - Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford da purificação de plasma em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).</i>	61
<i>Figura 20 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação de plasma em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).</i>	62
<i>Figura 21 - Gel de poliacrilamida 7,5% (em condições redutoras) das frações obtidas na purificação em ANX Sepharose FF (Experimento 1).</i>	62
<i>Figura 22 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).</i>	65
<i>Figura 23 - Gel de poliacrilamida 7,5% (em condições redutoras) das frações obtidas na cromatografia de troca iônica com ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).</i>	66
<i>Figura 24 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Cu²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol.</i>	68

Figura 25 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Cu ²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.	70
Figura 26 - Atividade de FVIII e PC (A) e Proteína total (B) da purificação em MAC-Cu ²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH.	72
Figura 27 - Atividade de FVIII (A) e Proteína total (B) das frações da purificação em MAC-Cu ²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampão citrato com concentrações crescentes de NH ₄ Cl.	74
Figura 28 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Ni ²⁺	76
Figura 29 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas na purificação em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol.	78
Figura 30 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas na purificação em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.	80
Figura 31 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas a partir da purificação com IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH=7,0.	82
Figura 32 - Atividade FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas na purificação em IMAC-zinco, utilizando tampões em diferentes pH para dessorção das proteínas.	84
Figura 33 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas na purificação em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e variação de pH a partir de pH 6,0.	86
Figura 34 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HiTrap de 1 mL e dessorção com NH ₄ Cl.	88
Figura 35 - Atividade de FVIII (A) e proteína total (B) das frações da purificação em IMAC-Co ²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 25 mM.	90
Figura 36 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total das frações da purificação em IMAC- Co ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e tampões citrato 10 mM.	92
Figura 37 - Atividade total de FVIII nas frações obtidas a partir da purificação em IMAC-Co ²⁺ , utilizando uma coluna Chelating Sepharose Fast Flow de 10 mL e tampões citrato 10 mM.	94
Figura 38 - Atividade do FVIII e da PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Fe ³⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 10 mM.	95
Quadro 1 – Comparação dos resultados da purificação de plasma em resinas ANX Sepharose e Q Sepharose.	97

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Produtos de FVIII derivados de plasma humano avaliados nos EUA. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 2 - Avaliação do empacotamento da coluna ANX-Sepharose FF. ....</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 3 - Purificação de FVIII em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1). ..</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 4 - Purificação de PC em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1). ..</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 5 - Resumo dos resultados obtidos para a purificação de FVIII e PC em ANX Sepharose FF empregando a Condição Experimental 1.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 6 - Purificação de FVIII nas frações da purificação em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).....</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 7 - Purificação de PC nas frações da purificação em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).....</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 8 - Purificação de FVIII em IMAC- Cu^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5mL e dessorção com imidazol. ....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 9 - Purificação de PC em IMAC- Cu^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5ml e dessorção com imidazol. ....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 10 - Purificação de FVIII empregando coluna Chelating Sepharose FF- Cu^{2+} de 10 mL e dessorção com imidazol. ....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 11 - Purificação de PC empregando coluna Chelating Sepharose FF- Cu^{2+} de 10 mL e dessorção com imidazol. ....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 12 - Purificação de FVIII em IMAC- Cu^{2+} empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH. ....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 13 - Purificação de PC em IMAC- Cu^{2+} empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH. ....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 14 - Purificação de FVIII em IMAC- Cu^{2+} empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampão citrato com concentrações crescentes NH_4Cl.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 15 - Purificação de FVIII em IMAC-Ni^{2+}.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabela 16 - Purificação de PC em IMAC-Ni^{2+}.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabela 17 - Purificação de FVIII em IMAC- Zn^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol. ....</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 18 - Purificação de PC em IMAC- Zn^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol. ....</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 19 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn^{2+} empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol. ....</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 20 - Purificação de PC em IMAC-Zn^{2+} empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol. ....</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 21 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH 7,0. ....</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 22 - Purificação de PC em IMAC-Zn^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH 7,0. ....</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 23 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn^{2+} empregando coluna HisTrap de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 7,0. ....</i>	<i>85</i>
<i>Tabela 24 - Purificação de PC em IMAC-Zn^{2+} empregando coluna HisTrap de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 7,0. ....</i>	<i>85</i>
<i>Tabela 25 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e variação de pH a partir de pH 6,0.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 26 - Purificação de PC em IMAC-Zn^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e variação de pH a partir de pH 6,0.....</i>	<i>87</i>

Tabela 27 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HiTrap de 1 mL e dessorção com NH ₄ Cl.	89
Tabela 28 - Purificação de PC em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HiTrap de 1 mL e dessorção com NH ₄ Cl.	89
Tabela 29 - Purificação de FVIII por IMAC- Co ²⁺ em coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL empregando tampões citrato 25 mM.	91
Tabela 30 - Purificação de FVIII por IMAC- Co ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL empregando tampões citrato 10 mM.	93
Tabela 31 - Purificação de PC por IMAC- Co ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL empregando tampões citrato 10 mM.	93
Tabela 32 - Purificação de FVIII em IMAC-Co ²⁺ , utilizando coluna Chelating Sepharose Fast Flow de 10 mL e tampões citrato 10 mM.	94
Tabela 33 - Purificação de FVIII em IMAC-Fe ³⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 10 mM.	96
Tabela 34 - Purificação de FVIII em IMAC-Fe ³⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 10 mM.	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **Abs:** Absorbância
- **ANX:** Dietilaminopropil
- **APS:** Ammonium Persulfate (Persulfato de amônio)
- **BSA:** Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)
- **CPDA-1:** Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina
- **EDTA:** Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etileno-diamino-tetracético)
- **HEPES:** ácido 4- (2- hidroxietil) – 1- piperazinaetanosulfônico
- **HEPT:** altura de cada prato teórico
- **IDA:** Iminodiacetic acid (ácido iminodiacético)
- **IMAC:** Immobilized metal ion affinity chromatography (Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado)
- **N/m:** números de pratos teóricos por metro de resina
- **NMWL:** Nominal molecular weight limit (Limite nominal de peso molecular)
- **NTA:** Nitrilotriacetic Acid (ácido nitrilotriacético)
- **PAGE:** PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
- **PC:** Proteína C
- **PFC:** plasma fresco congelado
- **pNa:** p-nitroanilina
- **SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)
- **TED:** tris (carboxymethyl) ethylene-diamine (N, N, N – tris (carboximetil) etilenodiamina)
- **TEMED:** N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina)
- **TFPI:** Tissue factor pathway inhibitor (Inibidor da via de fator tecidual)
- **TREN:** Tris(2-aminoethyl)amine (Tris (2-aminoetil) amina)
- **UI:** Unidades Internacionais
- **VC:** Volume de coluna

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Hemoderivados e o seu uso	22
1.2 Hemoderivados no Brasil	22
1.3 Hemoderivados no Instituto Butantan.....	24
1.4 Purificação de proteínas plasmáticas pelo método de Cohn.....	26
1.5 Purificação de proteínas por Cromatografia.....	27
1.5.1 <i>Cromatografia de Troca iônica .....</i>	<i>27</i>
1.5.2 <i>Cromatografia de Afinidade.....</i>	<i>28</i>
1.6 Coagulação sanguínea	30
1.7 Fator VIII humano	33
1.7.1 <i>Estrutura.....</i>	<i>33</i>
1.7.2 <i>A hemofilia e a doença de von Willebrand .....</i>	<i>35</i>
1.7.3 <i>Purificação de FVIII .....</i>	<i>35</i>
1.8 Proteína C	38
1.8.1 <i>Estrutura.....</i>	<i>38</i>
1.8.2 <i>Purificação de Proteína C.....</i>	<i>40</i>
2 OBJETIVOS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Material.....	43
3.2 Empacotamento das colunas.....	44
3.3 Avaliação do empacotamento das colunas	44
3.4 Preparo do plasma	46
3.5 Preparação de soluções	46
3.6 Purificação de FVIII de coagulação e Proteína C por cromatografia de troca aniônica em ANX Sepharose FF	48
3.6.1 <i>Determinação da concentração de NaCl para eluição do FVIII e da Proteína C na purificação de plasma em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF.....</i>	<i>49</i>
3.7 Purificação de FVIII da coagulação e Proteína C empregando cromatografia de afinidade a metal (IMAC).....	50
3.7.1 <i>Purificação com IMAC-Cu²⁺ .....</i>	<i>51</i>
3.7.2 <i>Purificação com IMAC-Ni²⁺ .....</i>	<i>52</i>
3.7.3 <i>Purificação com IMAC-Zn²⁺ .....</i>	<i>52</i>

3.7.4 Purificação com IMAC-Co ²⁺	52
3.7.5 Purificação com IMAC-Fe ³⁺	53
3.8 Métodos analíticos	53
3.8.1 Determinação da atividade de FVIII pelo método cromogênico	53
3.8.2 Determinação da atividade da PC pelo método cromogênico.....	55
3.8.3 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford	56
3.8.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	56
4 RESULTADOS e discussão	58
4.1 Purificação de Fator VIII de coagulação e Proteína C por cromatografia de troca aniônica ANX Sepharose FF	58
4.1.1 Avaliação do empacotamento da coluna ANX Sepharose FF	58
4.1.2 Determinação da concentração de NaCl para a purificação do FVIII e da proteína C em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF a partir de plasma (Condição Experimental 1)	59
4.1.3 Determinação da concentração de NaCl para a purificação do FVIII e da proteína C em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF a partir de plasma (Condição Experimental 2)	64
4.2 Purificação com IMAC-Cu²⁺	68
4.2.1 IMAC-Cu ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol	68
4.2.2 IMAC-Cu ²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.....	70
4.2.3 IMAC-Cu ²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH ..	72
4.2.4 IMAC-Cu ²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com NH ₄ C	74
4.3 Purificação com IMAC-Ni²⁺	76
4.4 Purificação com IMAC-Zn²⁺	78
4.4.1 IMAC-Zn ²⁺ empregando HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol.....	78
4.4.2 IMAC-Zn ²⁺ empregando Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.....	80
4.4.3 IMAC-Zn ²⁺ empregando HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH 7,0.....	82
4.4.4 IMAC-Zn ²⁺ empregando HisTrap HP de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 7,0.....	84

4.4.5 IMAC-Zn ²⁺ empregando HisTrap HP de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 6,0.....	86
4.4.6 IMAC-Zn ²⁺ empregando HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com NH ₄ Cl....	88
4.5 Purificação com IMAC-Co²⁺	90
4.5.1 IMAC-Co ²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 25 mM.....	90
4.5.2 IMAC-Co ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e tampões citrato 10 m.	92
4.5.3 IMAC-Co ²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e tampões citrato 10 mM.....	94
4.6 Purificação com IMAC-Fe³⁺	95
5 DISCUSSÃO GERAL	97
5.1 Purificação de FVIII de coagulação e Proteína C por cromatografia de troca aniônica ANX Sepharose FF.....	97
5.2 Purificação de FVIII da coagulação e Proteína C empregando Cromatografia de Afinidade a Metal (IMAC)	98
6 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS	109

ANEXO A – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações obtidas na determinação da concentração de NaCl para eluição de FVIII e da PC na purificação de plasma em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).	110
ANEXO B – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações obtidas na determinação da concentração de NaCl para eluição de FVIII e da PC na purificação de plasma em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).	112
ANEXO C – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Cu ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol.	114

ANEXO D – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Cu ²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.	116
ANEXO E – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Cu ²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH. ...	118
ANEXO F – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Cu ²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com NH ₄ Cl.	120
ANEXO G – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Ni ²⁺	122
ANEXO H – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com imidazol.	124
ANEXO I – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.	126
ANEXO J – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH 7,0.	128
ANEXO K – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 7,0.	130
ANEXO L – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn ²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 6,0.	132

<i>ANEXO M – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com NH₄Cl. ....</i>	<i>134</i>
<i>ANEXO N – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Co²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 25 mM. ....</i>	<i>136</i>
<i>ANEXO O – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Co²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e tampões citrato 10 mM. ....</i>	<i>138</i>
<i>ANEXO P – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Co²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e tampões citrato 10 mM.....</i>	<i>140</i>
<i>ANEXO Q – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Fe³⁺. ....</i>	<i>141</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemoderivados e o seu uso

O sangue e seus derivados são de grande importância no âmbito da saúde pública, uma vez que podem ser utilizados na prevenção e tratamento de diversas doenças, traumas, desordens imunológicas, infecções (BURNOUNF, 2007) e deficiências congênitas (FARRUGIA et al., 2009).

Após a coleta, o sangue total é submetido a centrifugações que separam as hemácias, leucócitos, plaquetas e o plasma e são denominados hemocomponentes. A partir do fracionamento do plasma, pode-se obter proteínas, denominadas de hemoderivados.

Dados divulgados pelo Ministério da Saúde informam que dos cerca de 11.000 pacientes diagnosticados com coagulopatias congênitas (FARRUGIA et al., 2009) 62,7% apresentam Hemofilia A, 11,7% Hemofilia B, 21,2% Doença de von Willebrand, 2,4% outras coagulopatias e 2% outras desordens hemorrágicas não identificadas (REZENDE et al., 2009).

Entre as proteínas do plasma, destacam-se os fatores de coagulação cujos concentrados podem ser utilizados no tratamento de coagulopatias. Concentrados de FVIII são utilizados no tratamento de Hemofilia A, podendo ser também usado para o tratamento da doença de von Willebrand. A deficiência de Proteína C também é tratada com concentrados desta proteína. Além disso, a forma ativada desta proteína, a Proteína C ativada, apresenta atividade anticoagulante, antiinflamatória, citoprotetora e antiapoptótica. A terapia de APC reduz a mortalidade em pacientes com sepse severa (GRIFFIN et al., 2006). Além destes produtos podemos citar a comercialização de produtos de FVII, FIX, FXI, FXIII, FvW, fibrinogênio, antitrombina, IgG, α 1-Antitripsina, Albumina e Complexo Protrombínico.

1.2 Hemoderivados no Brasil

A questão dos hemoderivados é de grande importância, uma vez que engloba questões de saúde pública, econômica e ética.

O fato de a Constituição Federal Brasileira, de 1988, ter proibido o comércio de sangue, seus componentes e derivados, reflete as questões éticas e aumenta a

responsabilidade do Estado em garantir estes produtos essenciais e de alto custo à saúde pública.

O Brasil arrecada cerca de 4 milhões de bolsas de sangue por ano (FARRUGIA et al., 2009). De cada bolsa de sangue total coletada, separam-se os hemocomponentes do plasma. Estes são armazenados em diferentes temperaturas, para fins transfusionais e têm durabilidade de três a 42 dias, dependendo do tipo de concentrado e do tipo de bolsa plástica usada na coleta do sangue. Os hemocomponentes são transfundidos quase que integralmente. Em geral, os estoques de concentrados de hemácias e de plaquetas estão sempre no limite das necessidades nos serviços de hemoterapia. Muitas bolsas de plasma são inutilizadas e descartadas devido à baixa demanda de uso nos centros de Hemoterapia.

O plasma fresco congelado no período de até oito horas após a coleta do sangue pode ser congelado por um ano à -20°C ou a -30°C por dois anos, e usado em transfusões ou para a produção industrial de fatores da coagulação, sendo chamado de plasma fresco congelado (PFC). Quando congelado após as primeiras oito horas da coleta ou armazenado por tempo superior ao referido, transforma-se em plasma preservado, normal ou comum. Nesse caso, as proteínas lábeis, principalmente o Fator VIII da coagulação, perdem a atividade e o plasma torna-se indicado somente para a produção industrial de albumina e de imunoglobulinas (SOARES, 2002).

Apesar do consumo de PFC brasileiro ser considerado alto, o excedente de PFC ainda é grande e requer a implementação de alternativas que viabilizem o maior aproveitamento possível desta matéria-prima, evitando o seu desperdício.

O Ministério da Saúde compra de empresas estrangeiras os medicamentos derivados de plasma para atender a necessidade da população ao mesmo tempo em que está descartando bolsas de plasma que poderiam ser processadas no país, caso houvesse plantas de Hemoderivados. Dados do Ministério da Saúde indicam que o impacto do custo da importação destes produtos (FVIII, FIX, Albumina e Imunoglobulina intravenosa) para o país é da ordem de US\$ 282 milhões de dólares por ano, enquanto que para Protrombina parcialmente ativada, Complexo Protrombínico e concentrados de FvW/FVIII, o valor é de US\$ 33 milhões de dólares por ano (FARRUGIA et al., 2009).

Em relação à disponibilidade dos hemoderivados, observa-se ainda que mesmo com a produção do Fator VIII recombinante, que veio tentar substituir o fator derivado do plasma, também há limite de suprimento. Além do limite de produção, os recombinantes têm como desvantagem o alto custo, sem definição sobre o benefício do seu uso em relação aos fatores da coagulação oriundos do plasma (SOARES, 2002).

Devido aos dados apresentados, o Ministério da Saúde discute a criação de fábricas para o processamento de plasma no país. Estão em construção duas plantas de Hemoderivados no Brasil, uma no Instituto Butantan, em São Paulo, e a outra em Goiana, em Pernambuco, denominada Hemobrás.

1.3 Hemoderivados no Instituto Butantan

O Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan desde a sua criação em meados da década de 1980 tem projetos voltados para a purificação de hemoderivados. Inicialmente foram desenvolvidos projetos de purificação de proteínas a partir de placentas humanas, uma vez que o plasma humano não era disponível. Proteínas, tais como albumina, catalase, IgG e superóxido dismutase foram obtidas em processos em que um ou mais produtos são purificados concomitantemente com pureza comparável aos produtos comerciais (CABRERA-CRESPO et al., 2000; GONÇALVES et al., 1999; GRELLET et al., 2001). Mais tarde foram feitos estudos para a purificação de fator VIII suíno (TANAKA et al., 2000 e LORTHIOIS, 2002), usado em tratamento de Hemofilia A com inibidores (GRIBBLE; GARVEY, 2000). Com a disponibilização do plasma humano pelo Hemocentro de Ribeirão Preto, foram iniciados estudos de purificação de fator VIII de coagulação humana (LORTHIOIS, 2002). Em abril de 2008, foi assinado um acordo com o então governador de São Paulo, José Serra, no qual seriam investidos 57 milhões de reais pelo governo estadual para a implantação de uma fábrica de Hemoderivados no Instituto Butantan. Além da fábrica, que está em construção, há uma Planta Piloto, onde está sendo testada, em menor escala, a obtenção dos produtos a serem purificados na fábrica, e o Laboratório de Desenvolvimento de Processos, onde estão sendo estudadas novas estratégias para a purificação das proteínas da fábrica de Hemoderivados e o desenvolvimento de processos de purificação de novas de proteínas de interesse biotecnológico.

Em vista das perspectivas da construção da fábrica para a produção de hemoderivados no Instituto Butantan, foram surgindo projetos desenhados, em princípio, para serem compatíveis com o processo da fábrica. O processo de fracionamento de plasma humano a ser implantado no Instituto Butantan consiste da purificação sequencial de quatro proteínas: fator VIII de coagulação, fator IX de coagulação, albumina e IgG apenas por cromatografia.

Neste contexto, foi realizado um estudo para verificar a introdução de uma troca aniônica antes da gel filtração, que, no processo da fábrica, seria a primeira etapa de purificação do fator VIII (CHENG et al., 2010; JINZENJI, 2008). A coluna de troca aniônica teria como função principal a concentração do fator VIII e, assim, seria possível utilizar um coluna de gel filtração menor. O acréscimo de uma etapa de purificação seria compensada pela economia de tempo e de custos. Foi observado por Jinzenji (2008) e Carvalho (2008) que a concentração de NaCl nos tampões empregados na troca aniônica, utilizando a resina Q-Sepharose, tem influência sobre o tamanho do complexo FVIII/FvW, o que, conseqüentemente, interfere no perfil de separação na coluna de gel filtração. Portanto, um estudo mais detalhado para verificar o efeito da variação da concentração de sais presentes no tampão sobre o tamanho do complexo é necessário para o sucesso da gel filtração.

A purificação da Proteína C foi iniciada em um projeto de iniciação científica de Rodriguez (2007) empregando coluna de afinidade a metal (IMAC) para purificação de FVIII e PC a partir de plasma. Existe um processo muito elegante descrito na literatura para a purificação do fator IX de coagulação humano em que várias proteínas dependentes de vitamina K são purificadas a partir do complexo protrombínico (MATEJTSCHUK, 1997). Neste processo, em que o fator IX foi obtido em escala de kg, o complexo protrombínico de partida foi obtido a partir de coluna de troca aniônica usada na primeira etapa do processo de purificação de fator IX da fábrica de hemoderivados e em apenas uma etapa, a Proteína C foi separada dos fatores II, VII, IX, mas não do fator X. Seria necessário ainda mais uma etapa de cromatografia para a separação destas 2 proteínas. Rodriguez (2007) verificou que era possível separar o FVIII de coagulação e o complexo protrombínico em IMAC- Cu^{2+} .

1.4 Purificação de proteínas plasmáticas pelo método de Cohn

O principal método para purificação de proteínas do plasma humano baseia-se no método desenvolvido por Cohn na década de 1940 e modificado posteriormente (BURNOUNF, 2007; OFOSU; FREEDMAN; SEMPLE, 2008). Baseia-se na precipitação fracionada de proteínas do plasma com etanol em baixas temperaturas, com variação de pH. Os precipitados são separados por centrifugação e as proteínas de interesse seguem sendo fracionadas na linha de purificação (Figura 1).

No método de Cohn, o sangue usualmente é coletado em solução citratada (anticoagulante) e o plasma separado da fração celular por centrifugação é imediatamente congelado. O passo inicial da purificação é a separação do crioprecipitado. O plasma é descongelado a 2-4° C. A esta temperatura, algumas proteínas, entre as quais o fator VIII de coagulação, continuam insolúveis e são separadas por centrifugação. A etapa de separação desta fração enriquecida de fator VIII por crioprecipitação tem alto custo, uma vez que exige manipulação do plasma em ambiente refrigerado, centrifugação contínua de grande volume, além de implicar em grande perda de proteína e de atividade.

Figura 1 - Fracionamento de plasma pelo método de Cohn-Oncley.

FONTE: (OFOSU et al., 2008)

1.5 Purificação de proteínas por Cromatografia

Atualmente, a maioria das plantas de Hemoderivados utiliza um processo misto de purificação por precipitação pelo método de Cohn e cromatografia. A proposta do Instituto Butantan é produzir os hemoderivados utilizando apenas métodos cromatográficos.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada por meio da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles seja seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

1.5.1 *Cromatografia de Troca iônica*

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, e solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária ou por variação de pH (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As resinas de troca aniônica são trocadoras de cargas negativas, ou seja, a resina é carregada positivamente. Por outro lado, as resinas de troca catiônica são trocadoras de cargas positivas, sendo assim carregada negativamente.

Os termos forte e fraca se referem à extensão na qual o estado de ionização dos grupos funcionais variam com o pH. Trocadores iônicos fortes não apresentam variação da capacidade com variações de pH, não ganhando e nem perdendo prótons. Já os trocadores iônicos fracos podem ganhar ou perder prótons com alteração do pH, variando a sua capacidade. Esses termos não se referem a intensidade com que os grupos funcionais se ligam às proteínas (GE HEALTHCARE, 2004).

A resina ANX Sepharose 4FF apresenta grupos aminos terciários (grupos dietilaminopropil) ligados a uma matriz de agarose com 'cross-linking' de 4%. A distribuição de poros desta resina foi otimizada para a separação de proteínas de tamanho grande, que aumenta a capacidade de ligação enquanto separa moléculas maiores. O fluxo linear de trabalho recomendado é de ≥ 200 cm/h.

1.5.2 Cromatografia de Afinidade

A metodologia da cromatografia por afinidade envolve a preparação de uma fase estacionária seletiva, por imobilização covalente de ligantes específicos à matriz ou suporte sólido. A amostra é aplicada à coluna contendo o ligante imobilizado ao suporte sólido. As moléculas que não possuem nenhuma afinidade com o ligante passam pela coluna sem serem retidas, enquanto as macromoléculas capazes de se unirem a ele são diferencialmente retidas, em função da intensidade da afinidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados, também conhecida pela sigla IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) é uma modalidade da cromatografia de afinidade, em que moléculas ligam-se reversivelmente a metais, imobilizados nas resinas, formando complexos. Essa técnica foi proposta por Everson e Parker e popularizou-se com o trabalho publicado por Porath e colaboradores em 1975 (BRESSOLIN;

Figura 2 - Ativação da resina e imobilização do metal.

Se necessário, pode-se acoplar um braço espaçador, por exemplo, aminohexil, entre as etapas 2 e 3.

1. Matriz "in natura"
2. Matriz ativada com epícloridrina
3. Acoplamento do agente quelante IDA
4. Imobilização do íon metálico Ni^{2+}

FONTE: (BRESSOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009)

MIRANDA; BUENO, 2009).

Esta técnica permite a separação de proteínas que possuam histidina, triptofano ou cisteína em sua superfície, os quais formam complexos com íons Cu^{2+} , Ni^{+2} , Zn^{+2} e Co^{+2} (BRESSOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009; CHARCOSSET, 1998). Estes íons metálicos interagem com o nitrogênio aromático dos grupamentos imidazol, indol e com enxofre do grupamento tiol, respectivamente de cada aminoácido. Os íons metálicos Fe^{3+} e Al^{3+} ligam-se a fosfato e fosfoésteres primários, podendo ser utilizado para fosfoproteínas, e o íon Ca^{2+} coordena de maneira estável o átomo de oxigênio presente em grupos carboxílicos dos resíduos dos aminoácidos ácidos aspártico e glutâmico, podendo ser utilizado para purificação de proteínas ricas em grupamentos carboxílicos, tais como fibrinogênio e calmodulina (BRESSOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

Íons metálicos como Cu^{2+} , Ni^{+2} , Zn^{+2} e Co^{+2} podem ser facilmente imobilizados em resinas cromatográficas contendo agentes quelantes, tais como ácido iminodiacético (IDA), N,N,N-tris(carboximetil)etilenodiamina (TED), tris(2-aminoetil)amina (TREN) e ácido nitrilotriacético (NTA) (BRESSOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

De acordo com Porath et al. (1975), a estabilidade dos quelatos formados entre IDA com alguns íons metálicos decresce na seguinte ordem: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Co}^{+2} \gg \text{Ca}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$. O agente quelante é acoplado a uma matriz sólida por meio de ligações covalentes. O íon metálico, por sua vez, é imobilizado ao agente quelante por ligações de coordenação formadas entre o íon metálico e átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre presentes na estrutura do agente quelante (Figura 2).

De modo geral, quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os complexos formados com os íons metálicos, porém, menor quantidade de sítios permanece disponível para ligação com a biomolécula e, conseqüentemente, a mesma é mais fracamente absorvida (BRESSOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

O IDA, o agente quelante presente na resina Chelating Sepharose FF usada neste trabalho, é tridentado (possui um átomo de nitrogênio e dois átomos de oxigênio para a coordenação), isto é, quela o íon metálico ocupando três sítios de coordenação (BRESSOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

IMAC explora a interação entre espécies doadoras de elétrons presentes na superfície de biomoléculas em solução e íons metálicos imobilizados em um suporte sólido (BRESSOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). Uma outra aplicação muito

conhecida para IMAC é a purificação de proteínas recombinantes que possuem calda de poli(histidina).

As moléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies doadoras de elétrons (por exemplo, com imidazol ou com um agente quelante solúvel, como EDTA) ou por protonação de grupos doadores de elétrons presentes na proteína adsorvida (redução de pH). De forma geral, íons metálicos imobilizados em uma matriz podem ser removidos pela adição de EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético), sem que haja perda de capacidade da matriz, ou seja, ela pode ser carregada novamente com os diferentes metais (BRESSOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

As colunas HiTrap IMAC High Performance (HP) e HisTrap HP são pré-empacotadas, com volume de 1 ou 5ml. Possuem uma matriz de agarose com 'cross-linking' de 6% ligado covalentemente com um grupo quelante que é confidencial. O tamanho pequeno do 'bead' confere uma alta resolução.

A resina Chelating Sepharose Fast Flow apresenta grupos ácidos iminodiacético (IDA) ligados a Sepharose 6 Fast Flow por ligações éter, com braços longos. A matrix base Sepharose Fast Flow é à base de agarose com 'cross-linking' de 6%. O tamanho da partícula é de 90µm e o fluxo linear de trabalho recomendado para esta resina é de 300 a 400cm/h.

1.6 Coagulação sanguínea

A cascata de coagulação do sangue é um fenômeno complexo que envolve vários fatores, desde a sinalização por um dano vascular, a aglutinação de plaquetas até a formação do coágulo (DAHLBÄCK, 2000; FURIE; FURIE, 1988).

Nos anos 60 dois grupos de pesquisadores propuseram um modelo de cascata de coagulação compostos por uma série de etapas em que a ativação de um fator levava a ativação de outro, resultando na geração de trombina (HOFFMAN; MONROE, 2007). Segundo este modelo duas vias levam à formação da trombina, as vias intrínseca (ou via de contato) e extrínseca (ou via do fator tissular), como ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Modelo clássico da cascata de coagulação proposto nos anos 60.

Neste modelo a coagulação possui 2 vias, a via intrínseca e a via extrínseca, que convergem para a via comum para formação de um coágulo de fibrina.
 FONTE: (CHENG, 2009)

Na década de 90 foi proposto um modelo mais completo, o modelo celular, (Figura 4), no qual as reações ocorrem em três estágios: iniciação, amplificação e propagação (HOFFMAN; MONROE, 2007).

Após uma lesão vascular, o objetivo principal da hemostasia é produzir uma rede de fibrin¹a insolúvel capaz de interromper a perda sanguínea. A Iniciação (Figura 4A) ocorre nas células capazes de expressar fator tecidual, uma proteína transmembrana presente nas células da matriz subendotelial (fibroblastos) e nos monócitos e células endoteliais em estados inflamatórios. O fator tecidual é o grande iniciador fisiológico da coagulação. Exposto ao plasma pela lesão vascular, liga-se ao fator VIIa e dá início a geração de uma pequena quantidade de trombina a partir da ativação dos fatores Xa e Va. A pouca quantidade de trombina produzida nessa etapa é incapaz de iniciar a formação de fibrina, já que a formação do fator Xa é rapidamente interrompida quando o inibidor da via do fator tecidual (TFPI - *Tissue*

* CHENG. São Paulo, 2009.

Factor Pathway Inhibitor) liga-se ao fator Xa e inativa o complexo fator VIIa/Fator tecidual (MONROE; HOFFMAN, 2006).

A Amplificação (Figura 4B) ocorre com a mudança do processo do fibroblasto para a superfície plaquetária. O estímulo é amplificado à medida que a plaqueta adere, se ativa e acumula cofatores ativados em sua superfície. A trombina gerada na fase de iniciação é um potente ativador plaquetário. Neste momento, a plaqueta, através da ativação dos cofatores V e VIII e subsequente ligação aos seus respectivos receptores, tem parcialmente montados em sua superfície os dois complexos que irão dar origem a propagação da geração de trombina subsequente (MONROE; HOFFMAN, 2006).

A Propagação (Figura 4C) ocorre pela combinação das proteases ativas com seus cofatores

e formação dos complexos “tenase” e “protrombinase” na superfície da plaqueta, fisiologicamente o local melhor adaptado para a geração de quantidades hemostáticas de trombina. A trombina gerada em grandes quantidades cliva então o fibrinogênio em monômeros de fibrina e se responsabiliza também pelo “cross-linking” destes monômeros através da ativação do fator XIII, dando assim firmeza ao coágulo (MONROE; HOFFMAN, 2006).

Figura 4 - Ilustração do modelo celular da cascata de coagulação.

(A) Iniciação, (B) Amplificação,
(C) Propagação.

FONTE: (HOFFMAN; MONROE, 2007)

A via da Proteína C é considerada por alguns autores como a principal via de controle da coagulação (Figura 5). Após a lesão vascular ou inflamação, o fator tecidual é expresso na superfície endotelial e inicia uma série de reações proteolíticas que resulta na geração de trombina e formação de coágulo de fibrina. A ligação da trombina com a trombomodulina acelera a ativação da PC. A Proteína C ativada (APC) proteolicamente inativa os cofatores Va e VIIIa, prevenindo desta forma, a propagação da cascata de coagulação e inibindo a formação de trombina (LUST; VULCANO; DANESE, 2008).

Figura 5 - Via da Proteína C no mecanismo de controle da coagulação (círculo azul).

A formação de uma grande quantidade de trombina pode levar à ligação com a trombomodulina, ativando a PC na presença. A APC, na presença da PS, inativa os fatores V e VIII, evitando desta forma a propagação da coagulação.

FONTE: (DAHLBÄCK; VILLOUTREIX, 2005)

1.7 Fator VIII humano

1.7.1 Estrutura

O gene do fator VIII humano é um dos maiores conhecidos, com cerca de 180 Kb e com 25 introns (FURIE; FURIE, 1988). O FVIII é sintetizado nos hepatócitos como multidomínio, uma molécula de cadeia simples com 2332 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 300 kDa (TAKEYAMA et al., 2009). O plasma humano contém cerca de 150 ng/ml de fator VIII (FURIE; FURIE, 1988).

O fator VIII possui domínios A1-A2-B-A3-C1-C2. Entre os domínios A existem espaçadores (a1, a2 e a3), que contém regiões ricas em resíduos de Asp e Glu. Após sua síntese, a molécula passa por mudanças pós-traducionais, incluindo glicosilações e sulfatações nos resíduos de Tyr nos espaçadores dos domínios A. Após a liberação na circulação sanguínea, a molécula sofre uma clivagem entre os

domínios B e A3 originando duas cadeias, a pesada (A1-a1-A2-a2-B) e a leve (a3-A3-C1-C2), ligadas não covalentemente pelo metal divalente Ca^{2+} , através dos domínios A1 e A3 (Figura 6). O domínio B, que representa aproximadamente 40% da massa do FVIII, não tem função conhecida (D' AMICI et al., 2011).

O FVIII é estabilizado no sangue pelo fator de von Willebrand (FvW), que forma um complexo com o FVIII através da interação com o domínio A3. Outras moléculas de von Willebrand ligam-se ao complexo FVIII-vW formando um multímero que pode atingir até 20MDa (KAUFMAN; PIPE 1999). A associação do FVIII com o FvW faz com que o FvW proteja o FVIII de proteólise por diversas serina-proteases, incluindo a proteína C ativada e o FXa (TAKEYAMA et al., 2009). A primeira etapa da ativação do FVIII consiste da dissociação do complexo FVIII/FvW pela trombina.

Figura 6 - Estrutura, função e processamento do FVIII.

O FVIII é produzido nos hepatócitos e é secretado na sua forma madura com 290 kDa, contendo 3 domínios, A, B e C. Na forma circulante é encontrado na forma de heterodímero, com uma cadeia pesada de 90 a 210 kDa e uma cadeia leve com 80 kDa. Os locais de interação com outros fatores de coagulação, FvW, fosfolípidos (PL), e íons metálicos (Me^{2+}) estão ilustrados nos círculos tracejados.

FONTE: (WANG et al., 2003)

1.7.2 A hemofilia e a doença de von Willebrand

A Hemofilia A é uma doença genético-hereditária que se caracteriza pela desordem no mecanismo de coagulação do sangue, ocorrendo predominantemente em homens. Existem três tipos de hemofilia: A, B e C. Nestas doenças há deficiência de Fator VIII, IX e XI, respectivamente (FRANCHINI; MANNUCCI, 2011). Além da desordem da hemostasia, a hemofilia é caracterizada por sangramento espontâneo ou provocado nas articulações, músculos, estômago, intestino e sistema nervoso central (WONG; RECHT, 2011).

Antes dos anos 40, o tratamento da hemofilia A se limitava à prática de transfusão sanguínea total ou de plasma fresco. Na década de 70 iniciou-se o uso de crioprecipitado (WONG; RECHT, 2011). Atualmente, o tratamento da hemofilia A consiste principalmente na reposição empregando concentrados de Fator VIII, provenientes do plasma ou recombinante (MAMMEN, 2002; MANNUCCI, 2003).

O principal obstáculo no uso de concentrado de FVIII consiste no desenvolvimento de anticorpos pelo sistema imunológico dos pacientes. Aproximadamente 20 a 30% dos pacientes com Hemofilia A severa desenvolvem anticorpos utilizando tanto FVIII proveniente de plasma, quanto FVIII recombinante (D' AMICI et al., 2011). Estes pacientes são chamados hemofílicos com inibidores (KEMPTON; WHITE, 2009).

A doença de von Willebrand caracteriza-se por aumento do tempo de sangramento e sintomas decorrentes da desestabilização do fator VIII. O fator de von Willebrand (FvW) forma um complexo com o FVIII e tem a função de protegê-lo de hidrólises e transportá-lo. Também é necessário para a adesão de plaquetas no endotélio, assim como para a agregação de plaquetas sob condições de estresse. A doença é geralmente tratada com uma droga sintética denominada desmopressina (DDAVP) ou com terapia de reposição utilizando concentrados desta proteína (MORI et al., 2008).

1.7.3 Purificação de FVIII

A purificação do complexo FVIII/FvW é particularmente difícil, uma vez que o FVIII circula em pequenas concentrações no sangue (100 a 200 ng/ml) e é

extremamente lábil. É, portanto, difícil de obter um produto com alta atividade específica e alto rendimento (MORI et al., 2008).

Concentrados de FVIII derivados de plasma disponíveis comercialmente podem ou não conter o FvW, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Produtos de FVIII derivados de plasma humano avaliados nos EUA.

Product name	Manufacturer	vWf: FVIII ratio
Immunoaffinity purified FVIII products		
Hemofil M™	Baxter	NA
Monarc-M™	Baxter (from American Red Cross-collected plasma)	NA
Monoclate-P®	CSL Behring	NA
FVIII products containing vWF		
Alphanate®	Grifols	1 : 1
Humate-P®	CSL Behring	2 : 1
Koate®-DVI	Talecris	Unknown

NA = não aplicável; vWf = Fator de von Willebrand.

FONTE: (WONG; RECHT, 2011)

Segundo Josic et al. (1994), nos produtos de FVIII que não contém FvW, é necessário adicionar, por exemplo, a albumina para evitar a degradação proteolítica e perda de atividade biológica do FVIII.

A purificação com aplicação direta de plasma em cromatografia de gel filtração foi utilizada por Kaersgaard e Barington (1998) para purificação do complexo FVIII-FvW. Neste estudo foram testadas várias resinas de gel filtração e os melhores resultados foram obtidos com a resina Sepharose 4FF, em que houve cerca de 90% de rendimento. Estes mesmos pesquisadores descreveram um processo para produção de FvW contendo FVIII a partir de plasma que inicia-se por cromatografia de gel filtração em Sepharose 4FF e prossegue em Q Sepharose HP, SP Sepharose HP e Superose 12 (BARINGTON; KAERSGAARD, 1999). Neste processo, após o processamento de 700 Kg de plasma, o FvW é obtido com 95% de pureza. A purificação do complexo FVIII/FvW por gel filtração é uma estratégia eficiente, uma vez que o complexo apresenta massa molecular muito maior que a grande maioria das proteínas presentes no plasma. No entanto, do ponto de vista industrial, utilizar essa técnica como primeira etapa de purificação tem a desvantagem de apresentar baixa capacidade em comparação com outras técnicas

cromatográficas, mesmo levando-se em consideração que a resina Sepharose 4FF é uma resina de aplicação industrial e que permite a aplicação de amostras de até 20% do volume de coluna.

A purificação de FVIII por cromatografia de afinidade foi utilizada por Te Booy et al. (1989) que estudaram 6 ligantes (2 aminoalquil e 4 aminoalquil-carbamilalquil) acoplados à resina Sepharose CL-4B. Os resultados mostram que em 3 resinas Sepharose acopladas a aminoalquil-carbamilalquil, o FVIII foi recuperado com atividades entre 50 e 65%. A matriz dimetilaminopropilcarbamilpentil- Sepharose CL-4B apresentou os melhores resultados e em seguida um processo otimizado e em maior escala foi descrito empregando esta resina para a produção de FVIII (TE BOOY et al. 1990.). O FVIII foi recuperado com 46% de atividade, que é maior que os 40% normalmente recuperados quando se utiliza crioprecipitado. Zhou, Burnouf-Radosevich e Burfouf (1994) utilizou lentil lectina imobilizada e recuperou cerca de 45% de atividade de FVIII. Kelley et al. (2004) e Knor et al. (2008) desenvolveram métodos de purificação de FVIII recombinante e FVIII derivado de plasma, respectivamente, utilizando um peptídeo anti-FVIII. Thim et al. (2010) relataram um processo de purificação de FVIII recombinante utilizando cromatografia de imunoafinidade com anticorpo monoclonal recombinante, troca iônica e gel filtração. A técnica de cromatografia por imunoafinidade, apesar de bastante eficiente por apresentar uma ligação específica entre a proteína e o ligante, apresenta alto custo. Em colunas de afinidade a Ca^{2+} , Mantovaara, Pertoft e Porath (1991) purificaram FVIII recombinante em apenas uma etapa, obtendo fator de purificação de 85 vezes.

A cromatografia de troca iônica é uma técnica bastante utilizada, explorando as cargas das proteínas para adsorção à coluna. Essa técnica permite a concentração do eluato, além de purificar proteínas baseadas nas características de força iônica e pH. Esse tipo de cromatografia foi utilizado por Burnouf et al. (1991) para purificação de FVIII a partir de crioprecipitado utilizando a resina DEAE Fractogel TSK 650 M. A recuperação de FVIII foi de cerca de 80 a 90%. Josic et al. (1994) também partiram do crioprecipitado e utilizaram a resina de troca iônica Fractogel EMD TMAE ou DEAE G 650(S) para separação do complexo FVIII/ FvW. Essa separação foi feita na presença de 50 mM de cálcio no tampão. Mori et al. (2008) partiram do crioprecipitado e testaram várias resinas de troca iônica para purificação do complexo FVIII/FvW, mostrando que a resina Fractogel EMD TMAE apresentou melhores resultados, com recuperação de 86% de atividade de atividade

específica de 140 U/mg. Além disso, determinaram que para os trocadores fortes é necessário 450 mM a 600 mM de NaCl para eluir o FVIII, enquanto que para os trocadores fracos, 250 mM. Cheng et al. (2010) descreveram um estudo comparativo entre as resinas Q Sepharose aplicando o plasma diretamente à coluna, visando a concentração da amostra para posterior purificação em uma gel filtração. A resina Q Sepharose FF foi a que apresentou melhores resultados com recuperação de atividade de FVIII em cerca de 50% e fator de purificação de 55 vezes.

Foi descrito em 2010 um processo de purificação do Complexo Protrombínico, Complexo FVIII/ FvW, IgG, Alfa 1 antitripsina, Albumina e Transferrina pelo método de cromatografia por adsorção em leito expandido, em que 40% do complexo FVIII/FvW foi recuperado em relação ao plasma (LIHME et al., 2010).

1.8 Proteína C

1.8.1 Estrutura

A proteína C é uma glicoproteína dependente de vitamina K, de massa molecular 62kDa, formada de duas cadeias, denominadas cadeia leve e cadeia pesada, ligadas através de ponte dissulfeto. A cadeia leve contém o domínio de ácidos γ -glutâmicos carboxiglutâmicos, responsáveis pela interação com Ca^{2+} , com as membranas fofoslipídicas (importante para a atividade anticoagulante da proteína C ativada) e pela interação com o receptor endotelial da proteína C. Encontram-se na cadeia leve também os dois domínios do fator de crescimento epitelial, cuja função pode estar relacionada à interação com a proteína S, fator V ativado e fator VIII ativado. A cadeia pesada contém o domínio da serina protease. A ativação da proteína C consiste na remoção de um peptídeo N-terminal da cadeia pesada catalisada pela trombina (DAHLBÄCK; VILLOUTREIX, 2005).

A proteína C, juntamente com os fatores de coagulação II, VII, IX, X, proteína S e a proteína Z, cuja função ainda não é conhecida, pertencem ao grupo das proteínas dependentes de vitamina K. Em conjunto, essas proteínas são denominadas de complexo pró-trombínico. Essas proteínas apresentam em comum um domínio amino-terminal chamado de domínio GLA (Figura 7). Esses domínios contêm múltiplos resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico (GLA) que são formados a

partir da carboxilação do ácido glutâmico pela carboxilase dependente de vitamina K (YAN, 1996) – (Figura 8).

Figura 7 - Estrutura das proteínas dependentes de vitamina K presentes no plasma humano.

Essas proteínas em conjunto são denominadas de Complexo Protrombínico. Exceto a PS, todas são serina proteases. Todas apresentam o domínio GLA na porção amino-terminal, que contém múltiplos resíduos GLA que são resultados da modificação pós-traducional do ácido glutâmico das proteínas pela enzima γ -glutamil carboxilase dependente de vitamina K.

FONTE: (HANSSON; STENFLO, 2005)

A deficiência homozigótica da PC está associada ao alto risco de trombose venosa e a heterozigótica causa uma doença conhecida como púrpura fuminans, que pode ser tratada com terapia de reposição com a Proteína C (BAE; YANG; REZAIE, 2007). Até a disponibilização de concentrados de PC, a reposição era realizada utilizando plasma fresco congelado em homozigotos, enquanto que para os heterozigotos, o tratamento era feito a base de anticoagulante oral ou terapia de heparina (Radosevich et al., 2003). Quando ativada, possui atividades anti-inflamatória e citoprotetora, sendo usada no tratamento da sepse (BAE; YANG; REZAIE, 2007; O'BRIEN et al., 2007).

Figura 8 - Reação de γ -carboxilação do resíduo glutamil pela enzima γ -glutamil carboxilase.

Reação de γ -carboxilação do resíduo glutamil pela enzima γ -glutamil carboxilase, na presença de CO_2 , O_2 e vitamina K. Sem a presença de vitamina K, essa reação não ocorre, podendo prejudicar na atividade biológica destas proteínas .

FONTE: (HANSSON; STENFLO, 2005)

1.8.2 Purificação de Proteína C

Cromatografia de troca iônica na purificação de Proteína C foi utilizada por Radosevich et al. (2003) que partiram do plasma pobre, utilizando colunas de troca iônica e chegando a uma concentração de PC de 58 U/ mL, com atividade específica de 215 U/ mg de proteína, e fator de purificação de 12000 vezes em relação ao plasma. Yan (1996) estudou a separação das vitamina K dependentes, entre elas a PC, utilizando pseudoafinidade em coluna de troca iônica, variando a concentração de cloreto de cálcio. Orthner et al. (1995) produziram PC ativada em larga escala utilizando uma coluna de troca iônica, seguida de uma coluna de imunoafinidade e outra de troca iônica para ativação da PC. Na etapa de purificação por imunoafinidade, obteve-se a PC com fator de purificação de 13600 vezes e atividade específica de 231 U/mg.

A proteína C foi parcialmente purificada a partir de coluna de afinidade por metal em um processo de purificação de FIX em que o plasma criopobre é utilizado como matéria prima (MATEJTSCHUK et al., 1997). Wu; Bruley (2002) utilizaram esta técnica para separar PC de algumas proteínas do leite. Lee; Bruley e Kang (2007) verificaram o efeito do pH na adsorção das proteínas e dessorção utilizando imidazol, na tentativa de separar a PC do FII a partir da fração IV de Cohn por IMAC.

Este estudo concluiu que entre pH 6,0 e 8,0 não há diferença de adsorção destas duas proteínas, o que resulta na não separação delas.

Nos métodos descritos na literatura para a purificação de FVIII derivado de plasma, o material de partida é sempre o crioprecipitado e esta fração não é a fração que contém as proteínas dependentes de vitamina K. Nos processos de fracionamento de plasma, as proteínas dependentes de vitamina K encontram-se na fração criopobre. Em purificações de plasma em resinas de troca aniônica o FVIII e as proteínas dependentes de vitamina K coeluem. Embora o fator de purificação do FVIII seja muito bom, porque nas condições empregadas grande parte das proteínas plasmáticas não são adsorvidas na coluna, 2 proteínas dependentes de vitamina K, o FII e o FX, quando ativadas, são enzimas que primeiramente ativam e em seguida inativam o FVIII. Portanto, ao se iniciar a purificação de plasma em coluna de troca aniônica, a segunda etapa deve separar o FVIII dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K. Neste trabalho, estudamos a separação de FVIII das proteínas dependentes de vitamina K, família a que a PC pertence, empregando cromatografia de afinidade a metal.

2 OBJETIVO

Estudar novas estratégias de purificação de proteínas plasmáticas com aplicação biotecnológica, em especial, os fatores de coagulação FVIII e proteína C, empregando cromatografia de troca aniônica e cromatografia de afinidade a metal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As bolsas de plasma humano utilizadas foram cedidas gentilmente pelo Hemocentro de Ribeirão Preto. O plasma foi coletado em bolsas com volume de aproximadamente 200 mL, contendo tampão CPDA-1 (Citrato – Fosfato – Dextrose – Adenina), com pH aproximadamente 7,4. Todas as bolsas recebidas foram aprovadas por uma triagem sorológica e armazenadas em freezer -80 °C.

Os equipamentos utilizados foram: Cromatógrafos Akta Explorer® e o Biopilot®, ambos da GE Healthcare (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) controladas pelo programa UNICORN® versão 3.1; Bomba Peristáltica P-1, da GE Healthcare; Leitor de microplacas Multiskan EX da Thermo (Thermo, Shanghai, China); Espectrofotômetro Ultraspec 2000 da Pharmacia Biotech (Pharmacia, Uppsala, Suécia); Fonte para eletroforese – Electrophoresis Power Supply EP5600 – Pharmacia Biotech.

As resinas da GE Healthcare utilizadas foram: Q Sepharose Fast Flow (FF), ANX Sepharose 4 Fast Flow (FF), HiTrap IMAC High Performance (HP) de 1 mL, HisTrap HP de 1 e 5 mL e Chelating Sepharose Fast Flow.

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada do sistema MilliRiOs e para os testes analíticos foi utilizado o sistema MilliQ, ambos da Millipore® (Millipore, Billerica, EUA).

Os reagentes utilizados para o preparo de tampões foram: ácido cítrico [Synth(Synth, Diadema, Brasil)], cloreto de sódio [Merck (Merck, Darmstadt, Alemanha)], cloreto de cálcio (Merck), HEPES [Amresco (Amresco, Ohio, EUA)], cloreto de amônio (Merck), Imidazol [USB (USB, Alemanha)], EDTA Dissódico [VETEC (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil)], NaOH [F. Maia (F. Maia, Cotia, Brasil)], HCl (Merck).

As colunas de afinidade a metal foram carregadas com os metais utilizando soluções de concentração 0,1 M com os seguintes reagentes: CuSO₄ [Neon (Neon, São Paulo, Brasil)], NiSO₄ [Sigma (Sigma, St Louis, EUA)], ZnSO₄ [The Coleman & Bell Co (The Coleman & Bell Co, Ohio, EUA)], CoCl₂ [Spectrum (Spectrum, New Brunswick)], FeCl₃ (Synth).

Para os métodos analíticos foram utilizados: Ácido acético glacial (Synth), Etanol (Synth), Metanol (Synth), Coomassie Blue R250 (Sigma), Reagente de Bradford [Fermentas (Fermentas, EU)], Acrilamida [Amersham Biosciences (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)], Tris (Sigma), Persulfato de amônio (Amersham Biosciences), TEMED (Sigma), azul de bromofenol (Synth), Glicerol (Merck), SDS (Amresco), β -mercaptoetanol (Merck), Glicina (Merck), padrão de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas), kit COATEST® SP₄ FVIII [Chromogenix (Chromogenix, EUA)], kit COAMATIC® Protein C (Chromogenix) e kit SilverXpress, da Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

3.2 Empacotamento das colunas

A resina ANX Sepharose Fast Flow (aproximadamente 70 mL) foi empacotada em uma coluna XK 26/40 (GE Healthcare) com um fluxo de 50 ml/min.

A resina Chelating Sepharose Fast Flow (aproximadamente 10 mL) foi empacotada utilizando uma coluna C16/20 (GE Healthcare) com um fluxo de 13 mL/min.

3.3 Avaliação do empacotamento das colunas

A altura de cada prato teórico (HEPT), o número de pratos teóricos por metro de resina (N/m) e o fator de assimetria do pico (As) foram calculados por meio das seguintes equações:

$$\text{HEPT} = \text{altura de um prato teórico} = L/N \quad (1)$$

- em que L = altura da coluna
N = Número de pratos teóricos

O número de pratos teóricos (N) é calculado através da fórmula:

$$N = \text{número de pratos teóricos} = 5,54 (V_r/W_r)^2 \quad (2)$$

- em que V_r = volume de eluição da amostra medido a partir da aplicação da amostra
 W_r = largura do pico na metade da altura

O número de pratos teóricos por metro de resina (N/m) é calculado dividindo-se o número de pratos teóricos pela altura da coluna, em metros:

$$N/m = \text{número de pratos teóricos por metro de resina} = N/L \quad (3)$$

O fator de assimetria da coluna é calculada dividindo-se a largura da segunda metade do pico (b) pela largura da primeira metade do pico medidos a 10% da altura do pico (a) (Figura 8).

$$As = b/a \quad (4)$$

O teste é realizado aplicando-se 1% de uma solução de acetona 1% (v/v) à coluna previamente equilibrada com água ou NaCl 0,9% (m/v).

Figura 9 - Pico de acetona usado para determinação da eficiência do empacotamento a partir de um cromatograma.

L = altura da coluna

W_r = largura na metade da altura do pico

V_R = distância de eluição do pico

h = altura do pico

a = largura da primeira metade do pico a 10% da altura

b = largura da segunda metade do pico a 10% da altura

$HEPT = L/N$

N = número de pratos teóricos calculados = $5,54 (V_r/W_r)^2$

$N/m = N/L$

$As = b/a$

FONTE: (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1999)

3.4 Preparo do plasma

As bolsas de plasma que estavam armazenadas em freezer -80 °C foram descongeladas em banho-maria a 37 °C. Foi feito um “pool” com 3 a 5 bolsas, o volume foi mensurado e o pH ajustado para 6,0 ou 7,0 (o plasma tem pH aproximadamente igual a 7,4), utilizando uma solução de ácido cítrico 0,25 M.

3.5 Preparação de soluções

As soluções utilizadas nos experimentos foram:

- a) tampão A: tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 85 mM, pH 6,0;
- b) tampão B: tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 200 mM, pH 6,0;
- c) tampão C: tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 500 mM, pH 6,0;
  - tampão C1: tampão C com imidazol 10 mM, pH 6,0,
  - tampão C2: tampão C com imidazol 30 mM, pH 6,0,
  - tampão C3: tampão C com imidazol 50 mM, pH 6,0,
  - tampão C4: tampão C com imidazol 100 mM, pH 6,0,
  - tampão C5: tampão C com imidazol 200 mM, pH 6,0,
  - tampão C6: tampão C com imidazol 500 mM, pH 6,0,
  - tampão C7: tampão C com EDTA 50 mM, pH 6,0,
- d) tampão D: tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 500 mM, pH 5,0;
- e) tampão E: tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 500 mM, pH 4,0;
  - tampão E1: tampão E com EDTA 50 mM, pH 4,0,
- f) tampão F: tampão citrato 10 mM, contendo CaCl_2 1 mM e NaCl 85 mM, pH 6,0;
- g) tampão G: tampão citrato 10 mM, contendo CaCl_2 1 mM e NaCl 150 mM, pH 6,0;
- h) tampão H: tampão citrato 10 mM, contendo CaCl_2 1 mM e NaCl 250 mM, pH 6,0;
- i) tampão I: tampão citrato 10 mM, contendo CaCl_2 1 mM e NaCl 500 mM, pH 6,0;
- j) Tampão J: tampão citrato 10 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 500 mM, pH 6,0;
  - tampão J1: tampão J com imidazol 100 mM, pH 6,0,
  - tampão J2: tampão J com imidazol 500 mM, pH 6,0,
- k) tampão K: tampão HEPES 25 mM e citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 85 mM, pH 7,0;
- l) tampão L: tampão HEPES 25 mM e citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 200 mM, pH 7,0;

- m) tampão M1: tampão HEPES 25 mM e tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 500 mM, pH 7,0;
- tampão M2: tampão HEPES 25 mM e tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM e imidazol 10 mM, pH 7,0,
  - tampão M3: tampão HEPES 25 mM e tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM e imidazol 30 mM, pH 7,0,
  - tampão M4: tampão HEPES 25 mM e tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM e imidazol 50 mM, pH 7,0,
  - tampão M5: tampão HEPES 25 mM e tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM e imidazol 100 mM, pH 7,0,
  - tampão M6: tampão HEPES 25 mM e tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM e imidazol 200 mM, pH 7,0,
  - tampão M7: tampão HEPES 25 mM e tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500mM, pH 7,0,
  - tampão M8: tampão HEPES 25 mM e citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM, pH 6,0,
  - tampão M9: tampão HEPES 25 mM e citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM, pH 5,0,
  - tampão M10: tampão HEPES 25 mM e citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM, pH 4,0,
  - tampão M11: tampão HEPES 25 mM e citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM e EDTA 50 mM, pH 4,0,
- n) tampão N1: tampão citrato 25 mM, contendo NH_4Cl 250mM, pH 6,0;
- tampão N2: tampão citrato 25 mM, contendo NH_4Cl 500mM, pH 6,0,
  - tampão N3: tampão citrato 25 mM, contendo NH_4Cl 750mM, pH 6,0,
  - tampão N4: tampão citrato 25 mM, contendo NH_4Cl 1M, pH 6,0,
  - tampão N5: tampão citrato 25 mM, contendo NH_4Cl 1M e EDTA 50mM, pH 6,0;
- o) Ácido cítrico 0,25 M para ajustar o pH do plasma;
- p) Soluções 0,1 M de CuSO_4 , NiSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , FeCl_3 para cromatografia de afinidade a metal;
- q) NaOH 0,2 M, 0,5 M, 1 M e 6 M;
- r) HCl 1:1 e 1:2 (v/v);
- s) NaCl 0,9% (m/v);
- t) NaCl 500 mM, 1 M e 2 M;

- u) solução de acrilamida 30% (acrilamida 29% (m/v), N,N'-metilenobisacrilamida 1% (m/v));
- v) tampão do gel de empilhamento Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8 e SDS 0,1% (m/v);
- x) tampão do gel de separação Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 e SDS 0,1% (m/v);
- w) tampão de corrida: tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3
- y) APS (persulfato de amônio) 10% (m/v);
- z) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine);
- aa) tampão de amostra Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, azul de bromofenol 0,1% (m/v), glicerol 10% (v/v), SDS 2% (m/v), β -mercaptoetanol 100 mM;
- bb) corante Coomassie Blue (ácido acético glacial 10% (v/v), etanol 45% (v/v), azul Coomassie R250 0,25% (m/v));
- cc) descorante (Etanol 30% (v/v), Ácido acético 10% (v/v), água).

Os tampões foram preparados dissolvendo-se os sais em água, sob agitação. Após ajuste dos pHs com soluções de NaOH ou HCl, o volume final dos tampões foi completado em provetas.

As soluções contendo EDTA utilizadas na lavagem das colunas foram preparadas dissolvendo-se o EDTA dissódico 50 mM com solução de NaOH 1M em tampão previamente preparado, sob agitação.

3.6 Purificação de FVIII de coagulação e Proteína C por cromatografia de troca aniônica em ANX Sepharose FF

O equilíbrio da coluna foi feito com tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 85 mM, pH 6,0 (Tampão A) e em seguida foi aplicado plasma, preparado conforme item 3.4. A fração coletada foi denominada “flowthrough” (FT). A lavagem das proteínas não adsorvidas na coluna após aplicação do plasma foi feita com o tampão de equilíbrio. A fração coletada foi denominada “reequilíbrio” (Reeq.). Foram feitas lavagens sucessivas com concentrações crescentes de NaCl até a eluição das proteínas de interesse. Após cada purificação foi realizada a limpeza da coluna com NaOH 1 M, NaCl 2 M e água. A coluna foi armazenada com NaOH 0,2 M.

As frações coletadas foram submetidas ao teste cromogênico para determinação de atividade do FVIII e da PC, assim como dosagem de proteínas pelo método de Bradford e análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE.

A partir dos dados de atividade (U) e concentração de proteína (mg) foram calculados os valores de atividade específica e o fator de purificação de FVIII e PC:

a) atividade específica = Atividade total (U) / Proteína total (mg);

b) fator de purificação = Atividade específica da fração / Atividade específica do plasma.

3.6.1 Determinação da concentração de NaCl para eluição do FVIII e da Proteína C na purificação de plasma em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF

Para a determinação da concentração de NaCl para a eluição do FVIII e da Proteína C foram realizados experimentos com a coluna ANX Sepharose FF (com aproximadamente 70 mL) seguindo os procedimentos descritos no item anterior, empregando as seguintes condições experimentais:

a) condição Experimental 1: O equilíbrio da coluna foi feito com 10 VC de tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 85 mM, pH 6,0 (Tampão A) e em seguida foi aplicado 10 VC de plasma em pH 6,0. A primeira lavagem após aplicação do plasma (Reequilíbrio) foi feita com 10 VC do tampão de equilíbrio. Foram eluídos 10 VC de tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 200 mM, pH 6,0 (Tampão B) e 6,5 VC de tampão citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM e NaCl 500 mM, pH 6,0 (Tampão C). A última fração foi coletada em 2 etapas, a primeira até a eluição de 4,5 VC de tampão, denominada A500A e a segunda com o restante da fração, denominada A500B.

b) condição Experimental 2: O equilíbrio da coluna foi feito com 10 VC de tampão citrato 10 mM, contendo CaCl_2 1 mM e NaCl 85 mM, pH 6,0 (Tampão F) e em seguida foi aplicado 10 VC de plasma em pH 6,0. A primeira lavagem após aplicação do plasma (Reequilíbrio) foi feita com 10 VC do tampão de equilíbrio. Foram eluídos 10 VC de tampão citrato 10 mM, contendo CaCl_2 1 mM e NaCl 150 mM, pH 6,0 (Tampão G) e 7 VC de tampão citrato 10 mM, contendo CaCl_2 1 mM e NaCl 250 mM, pH 6,0 (Tampão H) e 7 VC de tampão citrato 10 mM, contendo CaCl_2 1 mM e NaCl 500 mM, pH 6,0 (Tampão I). A última fração foi coletada em 2 etapas,

a primeira até a eluição de 4,5 VC de tampão, denominada A500A e a segunda com o restante da fração, denominada A500B.

Após a definição da melhor condição experimental, foram realizados vários experimentos para obtenção da fração A500A para os estudos em IMAC. Essa estratégia de purificação pode ser observada na Figura . Alguns experimentos em ANX Sepharose FF foram realizados em pH 7,0.

Figura 10 - Fluxograma mostrando a estratégia utilizada para purificação de FVIII e PC a partir de plasma humano.

O plasma é aplicado à coluna de troca iônica ANX Sepharose FF e a fração coletada contendo ambas as proteínas é aplicada à coluna de afinidade a metal (IMAC) para separar o FVIII e a PC.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

3.7 Purificação de FVIII da coagulação e Proteína C empregando cromatografia de afinidade a metal (IMAC).

Estudo sistemático foi realizado com os metais cobre, níquel, zinco, cobalto e ferro. Foram estudados 3 métodos de dessorção das proteínas, utilizando concentrações crescentes de imidazol e NH_4Cl e variação de pH. Foram utilizadas 3 colunas: HiTrap IMAC HP, HisTrap HP e Chelating Sepharose FF.

As colunas foram carregadas com soluções de CuSO_4 , NiSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , ou FeCl_3 na concentração de 0,1 M, por pelo menos 24 horas.

Inicialmente, o excesso da solução do metal foi lavado com água e, em seguida, a coluna foi equilibrada com tampão citrato e a amostra A500A aplicada. A fração recolhida foi denominada “flow through” (FT). As proteínas não adsorvidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio. A fração recolhida foi denominada “reequilíbrio” (Reeq.).

Os tampões utilizados para a dessorção das proteínas foram eluídos sequencialmente. Para os experimentos com imidazol foram utilizados tampões citrato com concentrações crescentes de imidazol até 500 mM. Para os experimentos com NH_4Cl foram utilizados tampões citrato com concentrações crescentes deste sal até 1M. Para os experimentos com variação de pH, foram realizados experimentos variando o pH de 6 a pH 4.

Após cada experimento a coluna foi lavada seguindo o seguinte procedimento: NaCl 0,9% (m/v), Tampão citrato com EDTA 50 mM, NaCl 0,9% (m/v), NaOH 1 M, água, NaCl 1 M, água. O armazenamento da coluna foi feito com solução 0,1 M do metal a ser utilizado no próximo experimento.

Foram realizados os testes cromogênicos para determinação de atividade do FVIII e da PC, assim como dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford e análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE com as amostras das purificações.

3.7.1 Purificação com IMAC- Cu^{2+}

Foram utilizadas as colunas HiTrap IMAC HP de 1 mL, HisTrap HP de 5 mL e Chelating Sepharose FF de 10 mL.

Os tampões utilizados nos experimentos com imidazol foram os tampões citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM e imidazol em concentrações crescentes (tampões da série C).

No estudo em que se verificou o pH de dessorção da proteínas foram empregados os tampões citrato 25 mM, contendo CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM em pH 7, 6, 5 e 4 (tampões M7 a M11).

No experimento de dessorção das proteínas utilizando NH_4Cl foram utilizados os tampões citrato 25 mM, contendo concentrações crescentes de NH_4Cl (tampões N1 a N5).

3.7.2 Purificação com IMAC-Ni²⁺

Os experimentos com IMAC-Ni²⁺ foram realizados utilizando a coluna de 1mL HisTrap HP.

O estudo para verificar a concentração de imidazol necessária para a dessorção das proteínas foi realizado empregando-se os tampões citrato 25 mM, contendo CaCl₂ 5 mM, NaCl 500 mM e concentrações crescentes de imidazol (tampões da série C).

3.7.3 Purificação com IMAC-Zn²⁺

Foram utilizadas as colunas HiTrap IMAC HP de 1 mL, HisTrap HP de 5 mL e Chelating Sepharose FF de 10 mL.

Os tampões utilizados nos experimentos com imidazol foram os tampões citrato 25 mM, contendo CaCl₂ 5 mM, NaCl 500 mM e concentrações crescentes de imidazol (tampões da série C (pH 6,0) e M1 a M7 (pH 7,0)).

No estudo em que se verificou o pH de dessorção de proteínas foram empregados os tampões citrato 25 mM, contendo CaCl₂ 5 mM e NaCl 500 mM (tampões C, D, E para pH 6,0 e tampões M1, M8 a M10 para pH 7,0).

No experimento de dessorção das proteínas utilizando NH₄Cl foi utilizado o tampão citrato 25 mM, contendo NH₄Cl 1M (tampão N4).

3.7.4 Purificação com IMAC-Co²⁺

Os experimentos com cobalto foram realizados com as colunas HiTrap IMAC HP de 1 mL, HisTrap HP de 5 mL e Chelating Sepharose FF de 10 mL.

O estudo para verificar a concentração de imidazol necessária para a dessorção das proteínas foi realizado empregando-se o tampão citrato 10 mM e 25 mM. Nos experimentos com citrato 10 mM os tampões empregados foram os tampões citrato 10 mM, contendo CaCl₂ 5 mM, NaCl 500 mM e imidazol 100 mM e 500 mM (tampões da série J) e nos experimentos com citrato 25 mM os tampões empregados foram os tampões citrato 25 mM, contendo CaCl₂ 5 mM, NaCl 500 mM (tampões da série C).

A amostra A500A empregada no experimento com citrato 10 mM foi diluída 2,5 vezes com solução de NaCl 500 mM.

3.7.5 Purificação com IMAC-Fe³⁺

Para os experimentos com IMAC-Fe³⁺ foi utilizada a coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL.

O estudo para verificar a concentração de imidazol necessária para a dessorção das proteínas foi realizado empregando-se o tampão citrato 10 mM e 25 mM. Nos experimentos com citrato 10 mM os tampões empregados foram os tampões citrato 10 mM, contendo CaCl₂ 5 mM, NaCl 500 mM e imidazol 100 mM e 500 mM (tampões da série J) e nos experimentos com citrato 25 mM os tampões empregados foram os tampões citrato 25 mM, contendo CaCl₂ 5 mM, NaCl 500 mM (tampões da série C).

A amostra A500A empregada no experimento com citrato 10 mM foi aplicada à coluna sem diluição.

3.8 Métodos analíticos

3.8.1 Determinação da atividade de FVIII pelo método cromogênico

A atividade de FVIII nas frações obtidas nas cromatografias foi determinada pelo método cromogênico, com uso do kit COATEST® SP₄ FVIII (Chromogenix). Este kit é utilizado em análises clínicas, no diagnóstico ou monitoramento de pacientes com deficiência de FVIII.

Neste teste, o FX é ativado em FX ativado pelo fator IXa, na presença de cálcio e fosfolípido e o FXa ativa o FVIII, que atua como cofator da reação. Utilizando quantidades ótimas de Ca²⁺ e fosfolípido não reveladas pelo fabricantes, além de um excesso de fator IXa e fator X, a taxa de ativação de fator X depende exclusivamente da quantidade de FVIII. O fator Xa promove a hidrólise do substrato cromogênico S-2765, liberando o grupo cromofórico p-nitroanilina (pNa) (Figura). A intensidade da cor é mensurada por espectrofotômetro a 405nm. A geração de Fator Xa e a intensidade de cor é proporcional à atividade de FVIII na amostra, uma vez

que o FVIII é um cofator da reação. A hidrólise do substrato cromogênico S-2765 pela trombina é prevenido pela adição de inibidor de trombina (I-2581) ao substrato.

Figura 11 - Reações do teste cromogênico para determinação da atividade do FVIII nas frações cromatográficas.

FONTE: (CHROMOGENIX, 2006)

Este teste foi realizado em microplacas, seguindo a seqüência mostrada na Figura 16. Após a adição de cada reagente, a microplaca foi incubada a 37° C, por 5 minutos. O ácido acético 20% foi utilizado para parar a reação. A leitura da microplaca foi feita utilizando Leitor de microplacas Multiskan EX da Thermo.

A curva de calibração foi construída a partir do “pool” de plasma e para cada “pool” de plasma foi construída uma curva de calibração. Considerou-se 1 unidade de FVIII (U) a quantidade de FVIII em 1 mL de plasma humano normal.

A leitura da absorbância em 492nm serviu como “branco da microplaca”. Deste modo, aplicando os valores de absorbância ($A^{405} - A^{492}$) na equação da reta da curva de calibração, pode-se obter a atividade do FVIII em cada fração.

Figura 12. Etapas do teste cromogênico do FVIII.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

3.8.2 Determinação da atividade da PC pelo método cromogênico

Para análise da atividade de PC nas frações obtidas nas cromatografias foi utilizado o método cromogênico, com uso do kit COAMATIC® Protein C (Chromogenix).

A Proteína C no plasma é ativada por uma enzima específica do veneno da cobra Cabeça de cobre (*Agkistrodon Contortrix Contortrix*). A quantidade de proteína C ativada é determinada pela taxa de hidrólise do substrato cromogênico S-2366. A intensidade da cor devido à liberação do grupo cromofórico p-nitroanilina (pNa) é mensurada por espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda de 405nm, sendo proporcional ao nível de Proteína C no plasma.

Figura 13 - Reações do teste cromogênico para determinação da atividade da PC nas frações cromatográficas.

FONTE: (CHROMOGENIX, 2006)

Este teste foi realizado em microplacas, seguindo sequência mostrada na Figura 18. Após a adição de cada reagente, a microplaca foi incubada a 37° C, por 10 minutos. O ácido acético 20% (v/v) foi utilizado para parar a reação.

Figura 14 - Etapas do teste cromogênico da Proteína C.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Para curva de calibração utilizamos o pool de plasma utilizado no dia de cada experimento correspondente. A amostra não diluída foi considerada como 100% de atividade da PC. Para todas as amostras foi feita a seguinte diluição: 50µL de amostra + 150 µL de água. Considerou-se 1 unidade de PC (U) a quantidade de PC em 1 mL de plasma humano normal.

A leitura da absorbância em 492 nm serviu como “branco da microplaca”. Deste modo, aplicando os valores de absorbância ($A^{405} - A^{492}$) na equação da reta da curva de calibração, pode-se obter a % de atividade de PC nas frações.

3.8.3 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

A determinação da concentração protéica total das frações obtidas nos experimentos foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA (2 mg/mL) como padrão. Para curva de calibração a concentração de BSA variou de 0 a 2,5 µg em um volume total de 200µL ao qual foram adicionados 800 µL do reagente de Bradford.

As amostras foram diluídas, quando necessárias, em NaCl 0,9% (m/v), para um volume total de 200 µL. Foi adicionado o volume de 800 µL do reagente de Bradford.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 595nm.

A equação da reta da curva de calibração permitiu o cálculo da quantidade de massa de proteína nas frações das purificações. A massa de proteína em cada fração é calculada considerando a diluição usada na dosagem e o volume total da fração.

3.8.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970). O gel de separação foi feito a uma concentração de 7,5% (v/v), com 1mm de espessura. Após polimerização deste gel, foi aplicado sobre este, o gel de empilhamento 5% (v/v).

As amostras foram preparadas utilizando tampão de amostra 5 vezes concentrado. O tampão de amostra utilizado foi: Tris-HCl 50mM, pH 6,8, azul de

bromofenol 0,1% (m/v), glicerol 10% (v/v), SDS 2% (m/v), β -mercaptoetanol 100 mM. Após essa mistura, as amostras foram aquecidas a 96 °C, por aproximadamente 5 minutos.

As amostras foram aplicadas ao gel e a corrida foi realizada a uma tensão de 120V, utilizando como tampão de corrida Tris-Glicina, contendo SDS. As corridas tiveram um tempo médio de duração de 1 hora e 40 minutos. O padrão de massa molecular utilizado foi Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas), tanto para os géis corados com Coomassie como os corados com Prata.

Os géis foram corados sob agitação com o corante Coomassie Blue (ácido acético glacial 10% (v/v), etanol 45% (v/v), azul Coomassie R250 0,25% (m/v)) por aproximadamente 1 hora, sendo depois descorados até as bandas de proteínas ficarem evidentes.

Para as amostras com quantidade menor que 30 μ g de proteínas totais, previamente determinado pelo método de Bradford, os géis foram corados com Prata, utilizando o kit SilverXpress, Invitrogen. O volume de cada solução determinado pelo fabricante do kit foi diminuído para uso, no entanto, mantendo a proporção estabelecida. O tempo de cada etapa foi o estabelecido pelo fabricante do kit.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação de Fator VIII de coagulação e Proteína C por cromatografia de troca aniônica ANX Sepharose FF

4.1.1 Avaliação do empacotamento da coluna ANX Sepharose FF

O empacotamento da resina ANX Sepharose FF em coluna XK 26/40 foi avaliado de acordo método descrito no item 3.3.

O cromatograma obtido está mostrado na Figura 15. As constantes medidas e os demais parâmetros usados para o cálculo estão mostrados na Tabela 2.

Figura 15 - Avaliação do empacotamento da resina ANX Sepharose FF em coluna XK 26/40.

Foi injetado o volume de 1% de VC de uma solução de acetona 1% (v/v). A detecção foi feita em UV 280 nm. As constantes (a) e (b) são os valores das larguras na primeira e na segunda metade do pico, respectivamente, medidos a 10% da altura do pico.

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Tabela 2 - Avaliação do empacotamento da coluna ANX-Sepharose FF.

L (cm)	H (cm)	Wr (cm)	Vr (cm)	N	HETP (μm)	N/m	a (cm)	b (cm)	As
15,5	6,8	1,4	9,7	265,94	0,058	17,15	1	1,4	1,4

FONTE:(IWASHITA, 2012)

O número de pratos teóricos por metro calculado (N/m) a partir do cromatograma, empregando as equações descritas no item 1.3, foi de 17,15 e a assimetria (As) 1,4.

O valor de assimetria (As) é um parâmetro importante, pelo qual pode-se verificar a qualidade do empacotamento. O valor ideal de As é 1,0. O valor obtido para a coluna ANX Sepharose 4FF, As=1,4, é aceitável para colunas de troca iônica. A altura média de pratos teóricos (HETP) é outro parâmetro importante, sendo o valor ideal igual a 3 vezes o diâmetro dos “beads” da resina utilizada. Uma vez que o diâmetro desta resina varia de 45 a 165 μm , o valor de HETP ideal é de 0,013 a 0,049. O valor obtido de HETP de 0,058 ainda foi considerado aceitável para nossos estudos com coluna de troca iônica. Este valor é usado como referência, pois a coluna pode perder a eficiência após algum tempo de uso e um dos parâmetros que pode ser usado para verificar as condições da coluna é o valor de HETP.

Essa avaliação foi feita para todas as colunas empacotadas no laboratório.

4.1.2 Determinação da concentração de NaCl para a purificação do FVIII e da proteína C em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF a partir de plasma (Condição Experimental 1)

A determinação das condições experimentais de lavagem e de eluição de proteínas em cromatografia de troca iônica são importantes para se obter produtos com maior pureza.

Neste trabalho foi utilizada a resina de troca aniônica ANX Sepharose FF. Foram testadas 2 condições experimentais para lavagem intermediária e eluição de FVIII e PC.

Na Condição Experimental 1 foram empregadas condições usadas para purificações em Q Sepharose FF no laboratório. Em estudo sistemático com a coluna de Q Sepharose FF foi verificado que com uma lavagem intermediária com 200 mM de NaCl seria possível eluir proteínas contaminantes, com perda mínima de FVIII. Também foi verificado que o FVIII elui com 500 mM de NaCl e que os fatores de coagulação IX e X também são recuperados nesta fração (CHENG et al., 2010).

O perfil cromatográfico da purificação de plasma em coluna ANX Sepharose FF nestas condições pode ser observado na Figura 16.

As frações coletadas foram submetidas ao teste cromogênico para a determinação das atividades do FVIII e da PC. As curvas de calibração estão

mostradas nas Figuras 17 e 18, respectivamente. As tabelas detalhadas com os resultados obtidos e os valores calculados a partir da curva de calibração de atividade e proteína encontram-se no ANEXO A.

Figura 16 - Perfil cromatográfico da purificação de plasma em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).

A detecção foi feita em UV 280 nm. O plasma foi aplicado à coluna e as proteínas que não se ligaram à ela foram recolhidas no FT, que corresponde ao primeiro pico na figura. Foram realizadas 2 lavagens usando tampão citrato contendo NaCl 200 mM e 500 mM de NaCl, respectivamente.

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Figura 17 - Curva de calibração utilizada no teste cromogênico para determinação de atividade do FVIII nas frações da purificação de plasma em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,143	-0,015	0,158
100	0,271	-0,015	0,286

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Figura 18 - Curva de calibração utilizada no teste cromogênico para determinação de atividade da PC nas frações da purificação de plasma em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).

FONTE:(IWASHITA, 2012)

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford. A figura 19 mostra a curva da calibração obtida e a equação gerada para obtenção dos valores de massas de cada fração.

Figura 19 - Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford da purificação de plasma em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Os resultados obtidos neste experimento estão mostrados nas Tabelas 3 e 4 e a representação gráfica dos resultados está mostrado na Figura 20. As atividades do FVIII e da PC encontram-se na fração A500A. Não houve perda de atividade na fração de lavagem com 200 mM de NaCl (FIGURA 20A). A maior porcentagem de proteínas foi encontrada no “flowthrough” (FT) (Figura 20B).

O perfil protéico da purificação em gel de poliácridamida das frações coletadas está mostrado na Figura 21.

Figura 20 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação de plasma⁰ em ANX Sepharose FF (Condição Experimental¹).

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), A200 (lavagem com tampão contendo NaCl 200 mM) e A500 (lavagem com tampão contendo NaCl 500 mM). A fração A500 foi recolhida em 2 etapas, a fração A500A corresponde ao pico e a A500B ao restante da lavagem.

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Figura 21 - Gel de poliácridamida 7,5% (em condições redutoras) das frações obtidas na purificação em ANX Sepharose FF (Experimento 1).

Canaletas: 1. Plasma (36 µg); 2. FT (35,8 µg); 3. Reeq (28,8 µg); 4. A200 (5,6 µg); 5. A500A (11,2 µg); 6. A500B (Pelo método de Bradford não foi detectada a presença de proteínas nesta fração). As amostras de plasma, FT e Reeq foram diluídas 25 vezes para que o perfil proteico pudesse ser visto. As demais amostras não foram diluídas.

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Tabela 3 - Purificação de FVIII em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
Plasma	716,7	90,6	64933	100696	100	1,5	1,0
FT	716,7	75,1	53824	717	1	-	-
Reeq.	684,7	2,5	1712	-1712	-	-	-
A200	716,7	0,3	208	0	-	-	-
A500A	358,3	1,4	490	79733	79	162,8	105
A500B	143,3	0,0	-	-287	-	-	-

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Tabela 4 - Purificação de PC em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
Plasma	716,7	90,6	64933	70667	100	1,1	1,0
FT	716,7	75,1	53824	14191	20	0,3	0,2
Reeq.	684,7	2,5	1712	-959	-	-	-
A200	716,7	0,3	208	-1720	-	-	-
A500A	358,3	1,4	490	64216	91	131	121,3
A500B	143,3	0,0	-	-631	-	-	-

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Dados calculados a partir de vários experimentos utilizando essa condição experimental possibilitaram a determinação da média e desvio padrão para os resultados da purificação de FVIII e PC (Tabela 5).

Tabela 5 - Resumo dos resultados obtidos para a purificação de FVIII e PC em ANX Sepharose FF empregando a Condição Experimental 1.

	FVIII (5)*	PC (4)*
Atividade específica do plasma (U/mg)	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,1
% de recuperação de atividade	69 ± 18	67 ± 22
Atividade específica na fração A500A (U/mg)	139 ± 15	119 ± 18
Fator de purificação	110 ± 11	107 ± 19

* Número de experimentos

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Observa-se que há uma variação muito grande de recuperação de atividade, que pode ser explicada pela variabilidade da amostra inicial, mesmo partindo-se de “pools” de plasma para minimizar este problema. O fator de purificação para o FVIII foi de 110 vezes. Este valor é 2 vezes maior que o observado para a purificação de plasma em Q Sepharose FF (CHENG et al. 2010), indicando que a resina ANX Sepharose FF é mais eficiente para a purificação de FVIII. Entretanto, semelhantemente à resina Q Sepharose FF, o FVIII coeluiu com a PC, e provavelmente as demais proteínas dependentes de vitamina K, na fração de eluição contendo 500 mM de NaCl.

4.1.3 Determinação da concentração de NaCl para a purificação do FVIII e da proteína C em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF a partir de plasma (Condição Experimental 2)

Nesta purificação foram empregadas as condições experimentais descritas por Mori et al. (2008) para a purificação de FVIII em diversas resinas de troca aniônica. Empregando resinas de troca aniônica fraca, o crioprecipitado era adsorvido na resina com tampão citrato contendo NaCl 120mM e o fator de coagulação eluído com o mesmo tampão contendo 250 mM de sal. Para as resinas de troca aniônica forte, o FVIII foi eluído com 450 mM a 600 mM de sal. Sendo ANX Sepharose FF uma resina de troca aniônica fraca, nosso objetivo era verificar se seria possível eluir o FVIII com 250 mM de sal.

As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO B.

Os resultados obtidos neste experimento mostram que a atividade de FVIII e PC não foram observadas nas frações de lavagem com tampões contendo 150 mM e 250 mM de NaCl (Tabelas 6 e 7), ambas as proteínas eluíram na fração contendo 500mM de NaCl (Figura 22A). Portanto, não foi possível eluir o FVIII e a PC da resina ANX Sepharose FF nas condições experimentais descritas por Mori et al. (2008).

Figura 22 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), A150 (lavagem com tampão contendo NaCl 150 mM), A250 (lavagem com tampão contendo NaCl 250 mM) e A500 (lavagem com tampão contendo NaCl 500 mM). A fração A500 foi recolhida em 2 etapas, a fração A500A corresponde ao pico e a A500B ao restante da lavagem.

FONTE:(IWASHITA, 2012)

A partir da determinação da quantidade de proteínas totais nas frações pelo método de Bradford, pode-se observar que a maior porcentagem de proteínas recuperadas encontra-se no FT (Figura 22B), o que demonstra que o FVIII e a PC encontram-se bem separados da maioria das outras proteínas presentes no plasma.

Neste experimento o fator de purificação do FVIII foi de 84 vezes, enquanto para a PC foi de 167 vezes.

A concentração de NaCl presente no tampão de eluição tem influência sobre o tamanho do complexo FVIII/FvW. Quanto maior a concentração de sal, maior a

razão entre o FVIII e o FvW (MORI et al., 2008). Somente os concentrados de FVIII que contém complexos FVIII/FvW de alta massa molecular, isto é, aqueles em que a razão FVIII/FvW é pequena, podem também ser utilizados no tratamento da doença de von Willebrand. O perfil protéico das frações da purificação pode ser observado no gel de poliacrilamida mostrado na Figura 23. O perfil protéico da fração de eluição do FVIII e da PC das purificações é bastante semelhante nas duas condições experimentais estudadas (canaleta 5 da Figura 21 e canaleta 6 da Figura 23).

Figura 23 - Gel de poliacrilamida 7,5% (em condições redutoras) das frações obtidas na cromatografia de troca iônica com ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).

Canaletas: 1. Plasma (78,40 µg); 2. FT (67,92 µg); 3. Reeq (1,52 µg); 4. A150 (3,6 µg); 5. A250 (10,4 µg); 6. A500A (22 µg); 7. A500B (0,4 µg). As amostras de plasma, FT e Reeq foram diluídas 25 vezes para que o perfil protéico pudesse ser visto. As demais amostras não foram diluídas.

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Uma vez que não foi possível eluir as proteínas de interesse no tampão citrato com menor concentração de sal e também que o fator de purificação obtido do FVIII foi menor nesta Condição Experimental 2, as purificações com IMAC foram, então, realizadas usando-se a fração A500A obtida da purificação de plasma em coluna de ANX Sepharose FF empregando-se a Condição Experimental 1.

Tabela 6 - Purificação de FVIII nas frações da purificação em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
Plasma	716,7	78,40	56186,6	74688	100	1,3	1,0
FT	716,7	67,92	48681,5	2880	3,9	-	-
Reeq.	716,7	1,52	1087,2	-836	-	-	-
A150	716,7	0,18	128,5	-571	-	-	-
A250	322,5	0,52	167,0	-450	-	-	-
A500A	322,5	1,10	355,4	39762	53,2	111,9	86,1
A500B	83,0	0,02	2,0	1302	1,7	651	500,8

FONTE:(IWASHITA, 2012)

Tabela 7 - Purificação de PC nas frações da purificação em ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína Total (MG)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
Plasma	716,7	78,4	56186,6	70734	100	1,2	1,0
FT	716,7	67,92	48681,5	23783	34	0,5	0,4
Reeq.	716,7	1,52	1087,2	2574	4	2,4	2,0
A150	716,7	0,18	128,5	380	1	3,0	2,5
A250	322,5	0,52	167	1422	2	8,5	7,1
A500A	322,5	1,1	355,4	77113	109	217	180,8
A500B	83,0	0,02	2,0	180	0,25	90	75

FONTE:(IWASHITA, 2012)

4.2 Purificação com IMAC-Cu²⁺

Inicialmente foram realizados estudos utilizando imidazol para dessorver as proteínas. Somente com os metais em que os resultados foram considerados bons foram estudadas a dessorção com variação de pH e diferentes concentrações de NH₄Cl. Além disso, para estes metais testou-se utilizar a coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL.

4.2.1 IMAC-Cu²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol

Os resultados obtidos neste experimento estão mostrados nas tabelas 8 e 9 e na Figura 24. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO C. A PC foi eluída com tampão citrato contendo 10 mM de imidazol, enquanto que o FVIII, com 200 mM de imidazol. Boa parte das proteínas contaminantes foram eliminadas nas frações contendo 30 e 50 mM de imidazol, o que possibilitou o aumento da pureza das 2 proteínas. O fator de purificação do FVIII foi de 7,9 e da PC 3,2 vezes.

Figura 24 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Cu²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 10 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol no tampão citrato 25 mM contendo NaCl 500 mM, pH 6,0 utilizadas na lavagem e eluição das proteínas de interesse.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 8 - Purificação de FVIII em IMAC- Cu^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5mL e dessorção com imidazol.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	25	0,81	20,24	1915,7	100,0	94,6	1,0
FT	25	-0,01	-0,24	-148,6	-	-	-
Reeq	75	-0,01	-0,62	-424,3	-	-	-
10mM	75	0,06	4,19	-424,3	-	-	-
30mM	75	0,07	5,32	-424,3	-	-	-
50mM	75	0,07	5,50	-424,3	-	-	-
100mM	75	0,03	2,12	-210,0	-	-	-
200mM	75	-0,01	1,06	797,1	41,6	752	7,9
500mM	75	-0,01	-0,52	-488,6	-	-	-

FORNTE:(IWASHITA, 2012)

Tabela 9 - Purificação de PC em IMAC- Cu^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5ml e dessorção com imidazol.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	25	0,81	20,24	2332,6	100,0	115,2	1,0
FT	25	-0,01	-0,24	-18,8	-	-	-
Reeq	75	-0,01	-0,62	-67,4	-	-	-
10mM	75	0,06	4,19	1552,2	66,5	370,4	3,2
30mM	75	0,07	5,32	-2,2	-	-	-
50mM	75	0,07	5,50	-56,5	-	-	-
100mM	75	0,03	2,12	-67,4	-	-	-
200mM	75	-0,01	1,06	-78,3	-	-	-
500mM	75	-0,01	-0,52	-67,4	-	-	-

FORNTE:(IWASHITA, 2012)

4.2.2 IMAC-Cu²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol

Uma coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL foi testada. Esta é uma resina também usada para cromatografia de afinidade a metal, mas seu grupo ligante (ácido imidodiacético) é diferente ao grupo ligante das colunas HiTrap IMAC, cujo ligante, segundo o fabricante das 2 colunas (GE Healthcare), tem afinidade muito maior aos metais e sua estrutura é segredo industrial.

Os resultados obtidos neste experimento estão mostrados nas tabelas 10 e 11 e na Figura 25. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO D. Em todas as frações recolhidas havia atividade de FVIII, sendo em maior porcentagem na fração eluída com 200 mM de imidazol. A PC por sua vez se liga fracamente à coluna e eluiu com imidazol 10 mM. A maior parte das proteínas são encontradas na fração eluída com imidazol 10 mM.

Na coluna HisTrap HP a fração contendo imidazol 30 mM e 50 mM eram as frações com maior concentração de proteína. Na coluna Chelating Sepharose FF a maior parte das proteínas ligaram-se mais fracamente e eluíam na mesma fração da PC (imidazol 10 mM), diminuindo a atividade específica desta proteína. A diferença de afinidade das proteínas pelo metal pode ser explicada pela diferença da estrutura dos grupos ligantes das 2 resinas.

Figura 25 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Cu²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 10 mM, 200 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol no tampão citrato 25 mM contendo NaCl 500 mM, pH 6,0 utilizados na lavagem e eluição das proteínas de interesse.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 10 - Purificação de FVIII empregando coluna Chelating Sepharose FF- Cu²⁺ de 10 mL e dessorção com imidazol.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500	50,0	0,97	48,5	6593,1	100,0	136	1,0
FT	50,0	-0,01	-0,3	551,4	8,4	-	-
Reeq	150	-0,01	-1,4	1279,2	19,4	-	-
10mM	150	0,17	24,8	1529,2	23,2	62	0,4
200mM	150	0,07	10,1	3279,2	49,7	324	2,3
500mM	150	-0,01	-1,25	862,5	13,1	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 11 - Purificação de PC empregando coluna Chelating Sepharose FF- Cu²⁺ de 10 mL e dessorção com imidazol.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500	50,0	0,97	48,5	2194,8	100,0	45	1,0
FT	50,0	-0,01	-0,3	-366,6	-	-	-
Reeq	150	-0,01	-1,4	-1090,5	-	-	-
10Mm	150	0,17	24,8	814,4	37,1	33	0,7
200mM	150	0,07	10,125	-1099,7	-	-	-
500mM	150	-0,01	-1,25	-1108,9	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.2.3 IMAC-Cu²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH

Como os estudos de IMAC-Cu²⁺ empregando imidazol para dessorção das proteínas apresentaram bons resultados, decidiu-se prosseguir os estudos utilizando variação de pH e diferentes concentrações de NH₄Cl para dessorção das proteínas.

Os resultados estão mostrados nas tabelas 12 e 13 e na Figura 26. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO E. Foi observada uma pequena atividade de FVIII no FT, mas não houve recuperação da atividade em nenhuma fração de lavagem. A PC somente foi recuperada quando se adicionou EDTA ao tampão. A figura 12B mostra que somente 50 % das proteínas foram recuperadas e na presença de EDTA.

Figura 26 - Atividade de FVIII e PC (A) e Proteína total (B) da purificação em IMAC-Cu²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH.

As frações foram recolhidas utilizando variação decrescente de pH, de pH 7,0 a pH 4,0. Também foi feita uma lavagem com tampão em pH 4,0 contendo EDTA.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

A ausência de atividade de FVIII nas frações pode ser explicada pelo fato de a proteína não ser estável no pH de dessorção, pois este fator de coagulação liga-se muito fortemente ao Cu²⁺. Resultado semelhante ao da PC foi observado por Vançan et al. (2002) durante a purificação de IgG em colunas de afinidade a metal. Em coluna de afinidade a Cu²⁺ esta proteína somente foi recuperada na presença de EDTA. Portanto, este método não foi eficiente para a separação de FVIII e PC.

Tabela 12 - Purificação de FVIII em IMAC- Cu²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500 pH 7,0	9,6	1,59	15,25	1274	100,0	83,5	1,0
FT pH 7,0	9,6	0,02	0,18	86	6,8	477	5,7
Reeq pH 7,0	24,0	0,00	-0,09	-	-	-	-
pH 6	24,0	-0,01	-0,16	-	-	-	-
pH5	24,0	-0,01	-0,13	-	-	-	-
pH4	24,0	-0,01	-0,17	-	-	-	-
pH 4 EDTA	24,0	0,34	8,09	-	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 13 - Purificação de PC em IMAC- Cu²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500 pH 7,0	9,6	1,59	15,25	1649	100,0	108	1,0
FT pH 7,0	9,6	0,02	0,18	-	-	-	-
Reeq pH 7,0	24,0	0,00	-0,09	-	-	-	-
pH 6	24,0	-0,01	-0,16	-	-	-	-
pH5	24,0	-0,01	-0,13	-	-	-	-
pH4	24,0	-0,01	-0,17	-	-	-	-
pH 4 EDTA	24,0	0,34	8,09	327	19,8	40	0,3

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.2.4 IMAC-Cu²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com NH₄Cl

Neste estudo de IMAC-Cu²⁺ empregando NH₄Cl para a dessorção de FVIII, também não houve recuperação de atividade de FVIII. Não foi observada atividade de FVIII (Tabela 14 e Figura 27A) e presença de proteínas nas frações lavadas com concentrações crescentes de NH₄Cl, as proteínas adsorvidas na coluna foram eluídas somente na presença de EDTA (Figura 27B).

As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO F.

Desta forma, NH₄Cl não foi eficiente para recuperar o FVIII da coluna até a concentração de 1 M. Aumentar ainda mais a concentração de sal poderia resultar na precipitação das proteínas.

Figura 27 - Atividade de FVIII (A) e Proteína total (B) das frações da purificação em IMAC-Cu²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampão citrato com concentrações crescentes de NH₄Cl.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 250 mM, 500 mM, 750 mM e 1 M que correspondem às concentrações de NH₄Cl no tampão citrato 25 mM contendo NaCl 500 mM, pH 6,0 utilizadas para lavagem e eluição das proteínas. Também foi feita uma lavagem com tampão citrato 25 mM contendo NaCl 500 mM, NH₄Cl 1 M e EDTA 50mM, pH 6,0.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 14 - Purificação de FVIII em IMAC- Cu^{2+} empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampão citrato com concentrações crescentes NH_4Cl .

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	12,5	0,96	12,0	1047	100	87	1,0
FT	12,5	-0,01	-0,1	-	-	-	-
Reeq	25	-0,01	-0,2	-	-	-	-
250mM	24	-0,01	-0,2	-	-	-	-
500mM	26	-0,01	-0,2	-	-	-	-
750mM	27	-0,01	-0,3	-	-	-	-
1M	25	-0,01	-0,3	-	-	-	-
1M com EDTA	20	0,43	8,6	-	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.3 Purificação com IMAC-Ni²⁺

A presença de um número grande de resíduos de histidina na sequência do FVIII e o fato da coluna HisTrap HP ser a mais comumente utilizada para a purificação de proteínas recombinantes indicavam que esta coluna poderia ser eficiente para a separação desejada.

Os resultados deste experimento estão mostrados na Figura 28 e nas tabelas 15 e 16. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO G. Pode-se observar que a maior porcentagem das proteínas aplicadas à coluna HisTrap HP são encontradas no reequilíbrio, isto é, não são adsorvidas na coluna. Nas frações “Reeq” e “10mM” são encontradas as maiores porcentagens de atividade do FVIII e a sua atividade específica nestas frações é menor do que a da amostra inicial A500A. A atividade da PC encontra-se somente na fração “Reeq”.

Portanto, nas condições experimentais empregadas, a ligação de ambas as proteínas com o níquel foi muito fraca e não foi possível obter uma boa separação. É possível que para que haja uma boa interação com Ni²⁺ seja necessário a presença de várias histidinas alinhadas ou espacialmente muito próximas entre si, requisito preenchido por proteínas recombinantes, mas não pelo FVIII ou PC.

Figura 28 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Ni²⁺.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 10 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol no tampão citrato 25 mM contendo NaCl 500 mM, pH 6,0 utilizadas na lavagem e eluição das proteínas de interesse.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 15 - Purificação de FVIII em IMAC-Ni²⁺.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500	9,6	1,7	16,2	820	100	50,6	
FT	9,6	0,1	1,0	27	3,29	27	0,53
Reeq	24	0,6	13,7	253	30,88	18,4	0,36
10mM	10	0,2	2,3	105	12,87	45,6	0,90
30mM	10	0,1	0,7	9	1,06	12,8	0,25
50mM	10	0,1	1,0	2	0,28	2,4	0,05
100mM	10	0,1	0,8	5	0,67	6,5	0,12
200mM	10	0,1	1,0	2	0,28	2,0	0,03
500mM	10	0,1	1,3	-4	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 16 - Purificação de PC em IMAC-Ni²⁺.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500	9,6	1,7	16,2	1281,3	100,0	79,0	1,0
FT	9,6	0,1	1,0	177,9	13,9	177,9	2,25
Reeq	24	0,6	13,7	778,8	60,8	56,8	0,71
10mM	10	0,2	2,3	33,2	2,6	14,4	0,18
30mM	10	0,1	0,7	-24,8	-	-	-
50mM	10	0,1	1,0	-33,5	-	-	-
100mM	10	0,1	0,8	-33,5	-	-	-
200mM	10	0,1	1,0	-32,0	-	-	-
500mM	10	0,1	1,3	-32,0	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.4 Purificação com IMAC-Zn²⁺

4.4.1 IMAC-Zn²⁺ empregando HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol

Iniciamos os estudos com IMAC-Zn²⁺ utilizando imidazol para dessorção das proteínas. Os resultados deste experimento estão mostrados nas tabelas 17 e 18 e na Figura 29. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO H. O FVIII é eluído utilizando imidazol 200 mM e sua recuperação foi de 55%. Nesta etapa o fator de purificação de FVIII foi de 5,8 vezes. A PC não se liga à matriz da coluna e sua recuperação foi de 65% no FT. A PC coeluiu com a maioria das proteínas no FT. Na fração “10 mM” também há recuperação de uma parte de proteínas, o que permite uma lavagem intermediária para que o FVIII e a PC possam ser bem separados.

Em experimentos anteriores em que várias lavagens intermediárias foram testadas, foi observado que o FVIII elui em várias frações e que a fração contendo maior atividade foi a da lavagem com imidazol 100 mM. Entretanto, a recuperação de FVIII atinge o valor de pouco mais que 50 % somente se a lavagem for realizada com imidazol 200 mM.

Figura 29 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas na purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 10 mM, 200 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol no tampão citrato 25 mM contendo NaCl 500 mM, pH 6,0 utilizadas para lavagem e eluição das proteínas.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 17 - Purificação de FVIII em IMAC- Zn^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500	25,0	1,06	26,57	2541,7	100,0	95,6	1,0
FT	25,0	0,25	6,33	116,7	4,6	18,4	0,2
Reeq	75	0,00	0,00	375,0	14,8	-	-
10mM	75	0,05	3,80	375,0	14,8	98,6	1,0
200mM	75	0,03	2,51	1400,0	55,1	557,7	5,8
500mM	75	-0,01	-0,43	325,0	12,8	-	-

FORNE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 18 - Purificação de PC em IMAC- Zn^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500	25,0	1,06	26,57	4290,9	100,0	161,5	1,0
FT	25,0	0,25	6,33	2825,4	65,8	446,3	2,7
Reeq	75	0,00	0,00	420,3	9,8	-	-
10mM	75	0,05	3,80	-187,5	-4,4	-	-
200mM	75	0,03	2,51	-213,4	-5,0	-	-
500mM	75	-0,01	-0,43	-213,4	-5,0	-	-

FORNE: (IWASHITA, 2012)

4.4.2 IMAC- Zn^{2+} empregando Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol

Os resultados deste experimento estão mostrados nas tabelas 19 e 20 e na Figura 30. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO I. A atividade de FVIII foi encontrada predominantemente nas frações FT e Reeq e a atividade de PC somente nestas duas frações. As proteínas carregadas na coluna também foram recuperadas somente no FT e no Reeq. Desta maneira, não há uma separação eficiente do FVIII e da PC.

Os resultados obtidos com Zn^{2+} são semelhantes aos encontrado com Cu^{2+} , as proteínas também se ligam mais fracamente ao metal na coluna Chelating Sepharose FF em comparação com a coluna His Trap HP.

Figura 30 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas na purificação em IMAC- Zn^{2+} empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 10 mM, 200 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol no tampão citrato 25 mM contendo NaCl 500 mM, pH 6,0 utilizadas para lavagem e eluição das proteínas.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 19 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	50	0,97	48,3	5454,2	100	113	1,0
FT	50	0,43	21,6	2829,2	51,9	131	1,1
Reeq	150	0,09	14,0	2112,5	38,7	151	1,3
10mM	150	-0,01	-1,6	737,5	13,5	-	-
200mM	150	-0,01	-1,4	737,5	13,5	-	-
500mM	150	-0,01	-1,4	654,2	12,0	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 20 - Purificação de PC em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	50	0,97	48,3	7280	100	151	1,0
FT	50	0,43	21,6	3806	52,28	176	1,1
Reeq	150	0,09	14,0	1901	26,11	136	0,9
10mM	150	-0,01	-1,6	-401	-	-	-
200mM	150	-0,01	-1,4	-427	-	-	-
500mM	150	-0,01	-1,4	-401	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.4.3 IMAC-Zn²⁺ empregando HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH 7,0

Visando realizar experimentos de dessorção através da variação de pH para dessorver as proteínas, realizamos um teste inicial com imidazol, em pH 7,0 para verificar se as proteínas seriam adsorvidas. Os resultados deste experimento são mostrados nas Tabelas 21 e 22 e na Figura 31. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO J. A atividade de FVIII foi encontrada em maior porcentagem na fração “50 mM” de imidazol. A atividade de PC foi encontrada nas frações Reeq. e na fração eluída com imidazol 10 mM. A maioria das proteínas foram encontradas nas frações eluídas com tampão citrato contendo imidazol, 10 e 30 mM havendo uma boa separação das duas proteínas. Este perfil é semelhante ao obtido em pH 6,0, se analisarmos em conjunto as frações “30 mM”, “50mM” e “100 mM” da Tabela 20. A soma das atividades de FVIII nas 3 frações foi de 2044U, a soma das massas das proteínas 10,45mg resultando numa atividade específica de 195,5 e fator de purificação de 1,76 vezes.

Figura 31 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas a partir da purificação com IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH=7,0.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 10 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol no tampão citrato 25 mM contendo NaCl 500 mM, pH 6,0 utilizadas na lavagem e eluição das proteínas.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 21 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH 7,0.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500	25	1,5	37,4	4150	100	111	1,0
FT	25	0,2	5,2	-50	-	-	-
Reeq	75	-0,1	-9,3	-150	-	-	-
10mM	75	0,3	19,2	-56	-	-	-
30mM	75	0,1	10,4	469	11	45,0	0,4
50mM	75	0,0	0,05	1294	31	25880	233,1
100mM	75	0,0	-0,4	281	7	-	-
200mM	75	0,0	-0,2	-131	-	-	-
500mM	75	0,0	0,1	-206	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 22 - Purificação de PC em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH 7,0.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500	25	1,5	37,4	4971	100	133	1,0
FT	25	0,2	5,2	213	4	40,9	0,30
Reeq	75	-0,1	-9,3	1788	36		
10mM	75	0,3	19,2	963	19	50,1	0,37
30mM	75	0,1	10,4	-613	-	-	-
50mM	75	0,0	0,0	-638	-	-	-
100mM	75	0,0	-0,4	-663	-	-	-
200mM	75	0,0	-0,2	-650	-	-	-
500mM	75	0,0	0,1	-675	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.4.4 IMAC-Zn²⁺ empregando HisTrap HP de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 7,0

Após verificar que o FVIII liga-se à coluna em pH 7,0, foi estudada a dessorção das proteínas com variação de pH em IMAC-Zn²⁺. Os resultados deste experimento são mostrados nas Tabelas 23 e 24 e na Figura 32. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO K. A atividade de FVIII foi observada apenas na fração eluída com pH 5,0, enquanto que a atividade de PC, nas frações eluídas com pH 7,0 e 6,0. A dosagem de proteína das frações mostrou que a maioria das proteínas coeluiu com o FVIII na fração em pH 5,0.

Portanto, o FVIII pode ser separado da PC variando-se o pH de eluição, embora a recuperação da atividade de FVIII tenha sido baixa, provavelmente porque esta proteína seja menos estável neste pH do que em pHs mais próximos do pH neutro. É interessante notar que a fração que apresenta o maior conteúdo proteico é a fração pH 5,0, razão pela qual a atividade específica do FVIII nesta fração é menor do que na fração A500A. A diminuição da atividade específica e da atividade de FVIII indicam que este método de purificação não é apropriado para a purificação desta proteína. Por outro lado, se as 3 primeiras frações fossem coletadas juntas a recuperação de atividade de PC seria de 73% e o fator de purificação de 1,7 vezes. Isto indica que este método foi mais adequado para a purificação de PC.

Figura 32 - Atividade FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas na purificação em IMAC-zinco, utilizando tampões em diferentes pH para dessorção das proteínas.

As frações foram recolhidas de acordo com a variação decrescente de pH, de pH 7,0 a pH 4,0 no tampão citrato 25 mM, contendo CaCl₂ 5 mM e NaCl 500 mM.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 23 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 7,0.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	25	1,51	37,76	3981,3	100	105,4	1,0
FT	25	0,22	5,57	-43,8	-	-	-
pH7	75	0,04	2,81	-93,8	-	-	-
pH 6	75	0,10	7,86	-56,3	-	-	-
pH5	75	0,28	20,95	768,8	19,3	36,7	0,34
pH4	75	0,00	0,09	-168,8	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 24 - Purificação de PC em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 7,0.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	25	1,51	37,76	5116,7	100,0	135,5	1,0
FT	25	0,22	5,57	420,8	8,2	75,5	0,55
pH7	75	0,04	2,81	2125,0	41,5	756,2	5,58
pH6	75	0,10	7,86	1212,5	23,7	154,2	1,13
pH5	75	0,28	20,95	-37,5	-	-	-
pH4	75	0,00	0,09	-87,5	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.4.5 IMAC-Zn²⁺ empregando HisTrap HP de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 6,0

Os resultados deste experimento estão mostrados nas Tabelas 25 e 26 e Figura 33. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO L. Nas condições empregadas, não foi observada atividade de FVIII, a atividade de PC foi encontrada no FT e as proteínas foram recuperadas nas frações FT, Reeq. e pH 5,0.

Novamente perdeu-se a atividade de FVIII em experimento de variação de pH, indicando que esta proteína é muito sensível à variação de pH. A diferença no perfil da Figura 33B em comparação à Figura 32B, indica que as proteínas aplicadas à coluna ligaram-se mais fortemente ao metal em pH 7,0, ainda assim considerando-se os valores das frações FT e Reeq. da Tabela 26 juntas, a PC seria recuperada sem diminuição da atividade específica.

Desta forma, em IMAC-Zn²⁺, partindo-se de pH 6,0, os resultados indicam que este método não é adequado para purificar nem a PC nem para o FVIII.

Figura 33 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações obtidas na purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e variação de pH a partir de pH 6,0.

As frações foram recolhidas de acordo com a variação de pH no tampão citrato 25 mM, contendo CaCl₂ 5 mM e NaCl 500 mM, de pH 6,0 a pH 4,0.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 25 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e variação de pH a partir de pH 6,0.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500 pH 6,0	25	0,78	19,54	1101	100	56	1,0
FT pH 6,0	25	0,18	4,38	-134,3	-	-	-
Reeq pH 6,0	75	0,09	6,40	-488,6	-	-	-
pH 5,0	75	0,08	5,89	-338,6	-	-	-
pH 4,0	75	-0,01	-0,72	-445,7	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 26 - Purificação de PC em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e variação de pH a partir de pH 6,0.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A pH 6,0	25	0,78	19,54	2568	100	131	1
FT pH 6,0	25	0,18	4,38	1517	59,09	346	2,64
Reeq pH 6,0	75	0,09	6,40	95,7	3,72	15	0,11
pH 5,0	75	0,08	5,89	-360,9	-	-	-
pH 4,0	75	-0,01	-0,72	-360,9	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.4.6 IMAC-Zn²⁺ empregando HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com NH₄Cl

Prosseguindo os experimentos com IMAC-Zn²⁺, estudou-se a dessorção das proteínas variando-se a concentração de NH₄Cl nos tampões de eluição. Os resultados deste experimento estão mostrados nas Tabelas 27 e 28 e Figura 34. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO M. O FVIII foi eluído com 100% de NH₄Cl, que corresponde a uma solução 1M de NH₄Cl, enquanto a PC não se ligou à coluna. O fator de purificação do FVIII foi 8,3 vezes. Cerca de 83% das proteínas foram recuperadas no FT.

O FVIII e a PC puderam ser bem separados por IMAC-Zn²⁺ utilizando NH₄Cl, que é uma alternativa de custo mais baixo para substituir o imidazol.

Figura 34 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HiTrap de 1 mL e dessorção com NH₄Cl.

Foi feito um gradiente linear, aumentando a concentração de NH₄Cl 1 M. As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100% e 100%. 100% corresponde a NH₄Cl 1 M em tampão citrato 25 mM, contendo NaCl 500 mM.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 27 - Purificação de FVIII em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HiTrap de 1 mL e dessorção com NH₄Cl.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	9,6	1,13	10,89	1056,0	100	97,0	1,0
FT	9,6	0,10	0,98	22,4	2,1	22,8	0,2
Reeq	28,8	0,32	9,08	192,0	18,2	21,1	0,2
0-20%	2	0,10	0,20	22,7	2,1	113,5	1,1
20-40%	2	0,09	0,19	24,7	2,3	130	1,3
40-60%	2	0,06	0,13	24,7	2,3	190	2,0
60-80%	2	0,06	0,12	30,7	2,9	255,8	2,6
80-100%	2	0,06	0,12	45,3	4,3	377,5	3,8
100%	18	0,03	0,52	414,0	39,2	796,1	8,2

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 28 - Purificação de PC em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HiTrap de 1 mL e dessorção com NH₄Cl.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	9,6	1,13	10,89	1694,4	100	155,6	1,0
FT	9,6	0,10	0,98	142,4	8,4	145,3	0,9
Reeq	28,8	0,32	9,08	1339,2	79,0	147,5	0,9
0-20%	2	0,10	0,20	22,7	1,3	113,5	0,7
20-40%	2	0,09	0,19	19,7	1,2	103,6	0,6
40-60%	2	0,06	0,13	7,7	0,5	59,2	0,4
60-80%	2	0,06	0,12	9,3	0,6	77,5	0,5
80-100%	2	0,06	0,12	4,7	0,3	39,1	0,2
100%	18	0,03	0,52	-3,0	-0,2	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.5 Purificação com IMAC- Co^{2+}

4.5.1 IMAC- Co^{2+} empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 25 mM

Os resultados deste experimento estão mostrados na Tabela 29 e na Figura 35. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO N.

Neste experimento foi observado que a cor vermelho claro da coluna carregada com o metal foi gradativamente diminuindo de intensidade, indicando que o Co^{2+} foi arrastado, provavelmente pelo tampão citrato. A presença de proteínas e de atividade de FVIII somente nas frações FT e Reeq estão de acordo com esta observação. Segundo Porath (1988) e Ueda; Gout e Morganti (2003) a estabilidade do complexo formado entre o ligante IDA e o metal decresce na ordem $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$. Os resultados deste experimento indicam que esta sequência é válida também para a nossa coluna, embora o ligante não seja IDA. O Co^{2+} foi arrancado da coluna, mesmo utilizando uma concentração de citrato 2,4 vezes mais diluída que a concentração máxima recomendada pelo fabricante da resina (GE Healthcare), enquanto o Cu^{2+} , o Ni^{2+} e o Zn^{2+} formaram complexos estáveis com o ligante. Embora seja um agente quelante, o citrato também tem atividade anticoagulante, razão principal pela qual é utilizado como tampão nestes experimentos.

Figura 35 - Atividade de FVIII (A) e proteína total (B) das frações da purificação em IMAC- Co^{2+} empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 25 mM.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 10 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol utilizadas no tampão citrato para lavagem e eluição das proteínas.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 29 - Purificação de FVIII por IMAC- Co^{2+} em coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL empregando tampões citrato 25 mM.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	9,6	1,15	11,01	1061	100	96,3	1,0
FT	9,6	0,17	1,61	24	2,2	14,9	0,1
Reeq	24	0,30	7,29	540	50,9	74,0	0,7
10mM	24	0,03	0,69	24	2,2	34,7	0,3
30mM	24	0,00	-0,04	-36	-	-	-
50mM	24	-0,01	-0,31	-36	-	-	-
100mM	24	-0,01	-0,29	-48	-	-	-
200mM	24	-0,01	-0,27	-24	-	-	-
500mM	24	-0,01	-0,25	-60	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.5.2 IMAC- Co^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e tampões citrato 10 mM

Os resultados desse experimento estão mostrados nas Tabelas 30 e 31 e Figura 36. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO O. Empregando tampão citrato 10 mM ao invés de 25 mM, não foi observado escape de metal durante a purificação. O FVIII se liga ao metal nestas condições e pode ser eluído com tampão citrato 10 mM, contendo 500 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 e imidazol 100mM, pH 6,0 (Tampão J4). A Proteína C coelui com a maioria das proteínas e não se liga a coluna, saindo no FT e Reeq. o que resulta em uma boa separação do FVIII e da PC.

Em experimento realizado com lavagens empregando tampões citrato contendo concentrações intermediárias de imidazol, foi observada atividade de FVIII em todas as frações até 100 mM, enquanto que a PC foi encontrada apenas no FT e Reeq., o que levou à escolha deste tampão para eluir o FVIII.

Figura 36 - Atividade de FVIII e PC (A) e proteína total das frações da purificação em IMAC- Co^{2+} empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e tampões citrato 10 mM.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 100 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol utilizadas no tampão citrato para lavagem e eluição das proteínas.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 30 - Purificação de FVIII por IMAC- Co²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL empregando tampões citrato 10 mM.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	62,0	0,40	24,95	3803	100	152,4	1,0
FT	62,0	0,23	14,47	434	11,41	30,0	0,20
Reeq	74	0,06	4,59	271	7,14	59,0	0,38
100Mm	73	0,02	1,20	2750	72,31	2291,6	15
500mM	75	0,00	-0,22	250	6,57	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 31 - Purificação de PC por IMAC- Co²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL empregando tampões citrato 10 mM.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	62,0	0,40	24,95	4352	100	174,4	1,0
FT	62,0	0,23	14,47	4055	93,16	280,2	1,6
Reeq	74	0,06	4,59	133	3,06	29,0	0,1
100Mm	73	0,02	1,20	-175	-	-	-
500mM	75	0,00	-0,22	-180	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.5.3 IMAC-Co²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e tampões citrato 10 mM

Os resultados deste experimento estão mostrados na Tabela 32 e na Figura 37. As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO P. Nesta purificação não se observou escape de metal. Entretanto atividade de FVIII foi principalmente na fração FT, o que indica que a proteína não se liga muito bem à essa coluna.

Como já foi discutido em experimento com Cu²⁺ e Zn²⁺, essa coluna apresenta o quelante IDA, enquanto que as colunas HiTrap IMAC HP e HisTrap HP apresentam um quelante que não é divulgado. Esta diferença do quelante pode explicar a diferença dos resultados.

Tabela 32 - Purificação de FVIII em IMAC-Co²⁺, utilizando coluna Chelating Sepharose Fast Flow de 10 mL e tampões citrato 10 mM.

Amostra	Volume da fração (mL)	Atividade total (U)	% de Recuperação
A500A	120	7015,7	100
FT	120	6072,9	86,6
Reeq	120	1430,4	20,4
100Mm	150	734	10,5
500Mm	150	698	9,9

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Figura 37 - Atividade total de FVIII nas frações obtidas a partir da purificação em IMAC-Co²⁺, utilizando uma coluna Chelating Sepharose Fast Flow de 10 mL e tampões citrato 10 mM.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 100 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol utilizadas no tampão citrato para lavagem e eluição das proteínas.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

4.6 Purificação com IMAC-Fe³⁺

Utilizando ferro como metal imobilizado em IMAC, foram realizados experimentos empregando o tampão citrato 10 mM e 25 mM. No experimento com citrato 25 mM foi observado que o metal era arrancado da coluna pelo tampão de equilíbrio. A da coluna carregada com o metal apresenta esta coloração alaranjada. Após a eluição do tampão de equilíbrio a coluna ficou praticamente incolor.

As curvas de calibração para determinação das atividades de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas encontram-se no ANEXO Q.

Empregando o tampão citrato 10 mM, a coluna continuou apresentando coloração característica após a realização do experimento, indicando que o metal continuava ligado à coluna. Os resultados mostrados nas Tabelas 33 e 34 e na Figura 38 indicam que o FVIII e a PC não se ligam à coluna, assim como as demais proteínas, sugerindo que, nas condições experimentais empregada, o Fe³⁺ não é adequado para purificação destas proteínas.

Figura 38 - Atividade do FVIII e da PC (A) e proteína total (B) nas frações da purificação em IMAC-Fe³⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 10 mM.

As frações recolhidas foram: FT (proteínas que não se ligam à coluna), Reeq. (lavagem das proteínas que não se ligam à coluna), 100 mM e 500 mM, que correspondem às concentrações de imidazol utilizadas no tampão citrato para lavagem e eluição das proteínas.

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 33 - Purificação de FVIII em IMAC-Fe³⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 10 mM.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	% de atividade recuperada	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500	9,6	1,4	13,2	1586	100	120	1,0
FT	9,6	1,1	11,0	1176	74	107	0,9
Reeq	24	0,0	-0,2	49	3	-	-
100mM	24	0,0	-0,2	-49	-	-	-
500mM	24	0,0	-0,2	-49	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Tabela 34 - Purificação de FVIII em IMAC-Fe³⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 10 mM.

Amostra	Volume da fração (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Atividade total (U)	% de Recuperação	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
A500A	9,6	1,4	13,2	1297	100	98,2	1,0
FT	9,6	1,1	11,0	907	70	82,4	0,8
Reeq	24	0,0	-0,2	19	1	-	-
100mM	24	0,0	-0,2	-119	-	-	-
500mM	24	0,0	-0,2	-133	-	-	-

FONTE: (IWASHITA, 2012)

5 DISCUSSÃO GERAL

5.1 Purificação de FVIII de coagulação e Proteína C por cromatografia de troca aniônica ANX Sepharose FF

Em estudos anteriores do laboratório utilizou-se tampão citrato contendo 500 mM de NaCl para eluição do FVIII humano e suíno em cromatografias de troca aniônica em resina de Q Sepharose FF (CHENG et al., 2010; LORTHIOIS, 2002; TANAKA, 2000).

Neste trabalho foram testadas 2 condições experimentais para determinar as concentrações de NaCl no tampão citrato para eluição de FVIII e PC.

Na condição experimental 1 foram empregadas condições experimentais anteriormente usadas para purificações em Q Sepharose FF. Em estudo sistemático, foi verificado que com uma lavagem intermediária com NaCl 200 mM seria possível eluir proteínas contaminantes, com perda mínima de FVIII. Também foi verificado que os fatores de coagulação IX e X coeluem com o FVIII na fração de eluição com 500 mM de NaCl (CHENG et al., 2010). Empregando a resina ANX Sepharose FF, os resultados foram semelhantes em relação ao perfil de atividade das frações coletadas, o FVIII eluiu com NaCl 500 mM, não houve perda de atividade na lavagem com NaCl 200 mM e a PC, que, como os fatores de coagulação FIX e FX, pertence à família dos fatores dependentes de vitamina K, coeluiu com o FVIII. O rendimento e o fator de purificação obtidos com a ANX Sepharose FF, no entanto, foram superiores aos obtidos com a Q Sepharose FF.

Quadro 1 – Comparação dos resultados da purificação de plasma em resinas ANX Sepharose e Q Sepharose.

	ANX(5)*	Q (3)*
% de recuperação de atividade	69 ± 18	48 ± 19
Fator de purificação	110 ± 11	55

FONTE: (IWASHITA, 2012)

Na condição experimental 2 foram testadas as condições experimentais empregadas por Mori et al. (2008) para purificação de FVIII em colunas de troca aniônica fraca. O objetivo foi verificar se o FVIII poderia ser eluído com NaCl 250 mM empregando a resina ANX Sepharose FF, condição experimental em que estes pesquisadores eluíram o FVIII, empregando diversas resinas de troca aniônica fraca. Nossos resultados demonstraram que não é possível eluir o FVIII e a PC com apenas 250 mM de NaCl.

As purificações de plasma em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF realizadas neste trabalho para os estudos em IMAC foram realizadas nas condições experimentais 1.

5.2 Purificação de FVIII da coagulação e Proteína C empregando Cromatografia de Afinidade a Metal (IMAC)

Resinas de afinidade têm sido cada vez mais utilizadas em processos de purificação devido, principalmente, à possibilidade de obtenção de produtos com alto grau de pureza. IMAC tem sido uma técnica muito utilizada devido ao seu baixo custo (quando comparadas à técnicas de Imunoafinidade), à especificidade e alta capacidade de adsorção. Além disso, diferentes íons metálicos podem ser imobilizados usando o mesmo adsorvente, podendo ser utilizados em mais de 100 ciclos (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). É importante observar que não é de nosso conhecimento que a purificação de FVIII por cromatografia de afinidade a metal já tenha sido descrita na literatura.

Uma das desvantagens é o desprendimento ou escape do metal. Caso a proteína alvo purificada seja utilizada para fins terapêuticos, a presença de íon metálico pode ocasionar problemas, pois muitos metais são cancerígenos (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009; UEDA; GOUT; MORGANTI, 2003). Isso pode ser resolvido utilizando colunas de gel filtração, que em muitos processos são usadas como última etapa de purificação, seja para troca de tampão ou para a separação de multímeros.

O FVIII possui 75 resíduos de histidinas na seqüência primária e a Proteína C, de 12 (BURNOUNF; RADOSEVICH, 2001) a 15 resíduos (LEE; BRULEY; KANG, 2007) na superfície. A presença de resíduos de histidina indicam que o uso de IMAC pode ser eficiente para a separação destas proteínas.

Neste estudo foram testados os íons cobre, níquel, zinco, cobalto e ferro para purificação de FVIII e PC.

De acordo com Porath (1988) e Ueda, Gout e Morganti (2003), a estabilidade dos quelatos formados entre IDA e alguns íons metálicos decresce na seguinte ordem: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$. Observamos que o ligante das colunas utilizadas também formam complexos de estabilidades diferentes com os metais utilizados, alguns metais ligam-se mais fortemente à resina que outros. Nas mesmas condições experimentais o Cu^{2+} , o Ni^{2+} , o Zn^{2+} permanecem ligados à coluna, enquanto o Co^{2+} e o Fe^{3+} não. Experimentos com estes 2 últimos somente foram possíveis após a diluição do tampão citrato de 25 mM para 10 mM, embora a concentração usada seja 2,4 vezes mais baixa que a concentração máxima recomendada pelo fabricante da resina.

Inicialmente foram realizados experimentos utilizando imidazol para dessorção das proteínas. A amostra aplicada em IMAC foi a fração A500A da coluna ANX Sepharose FF e o tampão de equilíbrio e adsorção das proteínas utilizado foi o tampão de eluição da coluna ANX Sepharose FF (tampão sem imidazol).

Entre as colunas testadas, a força de interação entre proteínas e resina foi decrescente na seguinte sequência: IMAC- Cu^{2+} , IMAC- $\text{Zn}^{2+} \cong$ IMAC- Co^{2+} , IMAC- $\text{Ni}^{2+} \cong$ IMAC- Fe^{3+} .

Não foi observado adsorção de proteínas na coluna de IMAC- Fe^{3+} . Embora a descrição do uso deste metal seja escassa na literatura e nem apareça na sequência descrita por Porath (1988), Wu e Bruley (2002) descreveram a separação de PC de várias proteínas do leite, utilizando IMAC- Fe^{3+} . A dessorção com imidazol 15 mM indica que a PC ligou-se fracamente à resina.

Os resultados com níquel, utilizando imidazol para dessorção das proteínas, demonstraram que nas condições empregadas, nem FVIII nem PC ligam-se bem à coluna. A presença de um número grande de resíduos de histidina na sequência do FVIII e o fato de esta coluna ser a mais comumente utilizada para a purificação de proteínas recombinantes indicavam que esta coluna poderia ser eficiente para a separação desejada. Entretanto, observamos que a ligação do FVIII à coluna é muito fraca. É possível que para uma boa interação com Ni^{2+} seja necessária a presença de várias histidinas alinhadas ou espacialmente muito próximas entre si, requisito preenchido por proteínas recombinantes, mas não pelo FVIII ou PC.

Os resultados obtidos com zinco foram melhores que os encontrados para níquel, já que o FVIII ligou-se à coluna e a proteína C não. Grande parte do FVIII pode ser recuperado com tampão citrato contendo 50 mM de imidazol. Houve uma perda de atividade de FVIII nas frações contendo 100 e 200 mM de imidazol, o que justificaria a definição da concentração de imidazol 200 mM para eluição de FVIII.

Purificações com cobalto foram realizadas após a diluição do tampão citrato 25mM para 10 mM. Quando se utiliza várias concentrações de imidazol a partir de 10 mM, verificou-se que o FVIII sai em várias frações de lavagem, enquanto a PC não se liga à coluna. Desta forma, foi definido que a melhor concentração de imidazol para o FVIII é de 100 mM.

Em coluna IMAC-Cu²⁺, as 2 proteínas foram adsorvidas pela resina. A PC foi eluída com imidazol 10 mM e FVIII com imidazol 200 mM. Além disso, foi possível realizar uma lavagem intermediária com imidazol 30 e 50 mM.

Em resumo, a concentração de imidazol definida como a mais conveniente para eluir o FVIII das colunas de IMAC-Cu²⁺, IMAC-Zn²⁺, e foi de 200 mM e 100 mM para colunas de IMAC-Co²⁺. Na coluna IMAC-Cu²⁺, o rendimento de FVIII foi de 42 % e o fator de purificação de 8 vezes. Na coluna IMAC-Zn²⁺, o rendimento de FVIII foi de 55% e o fator de purificação de 6 vezes. Na coluna IMAC-Co²⁺, o rendimento de FVIII foi de 72% e o fator de purificação de 15 vezes. A PC ligou-se muito mais fracamente que o FVIII e foi recuperado nas 3 colunas ou no FT e Reeq, ou com apenas imidazol 10 mM. Portanto, IMAC-Co²⁺ apresentou os melhores resultados nos experimentos de dessorção com imidazol.

O pH padrão dos experimentos foi o pH 6,0, porque em estudos anteriores do laboratório foi observado que o FVIII é mais estável neste pH. Como seria interessante verificar o perfil de purificação do estudo de dessorção com variação de pH a partir de pH 7,0, foi realizado um experimento a partir da purificação de plasma em ANX Sepharose FF e dessorção do IMAC-Zn²⁺ com imidazol em pH 7,0. Foram realizados experimentos de dessorção a partir de pH 7,0 e de pH 6,0. Os resultados obtidos mostraram que as proteínas ligaram-se mais fortemente à resina em pH 7,0. Em IMAC-Cu²⁺ as proteínas ligam-se de uma maneira tão forte à resina que não foi possível dessorvê-las mesmo em pH 4,0, somente na presença de EDTA. Resultado semelhante foi observado por Vançan et al. (2002) durante a purificação de IgG em colunas de afinidade a metal. O IgG foi adsorvido à coluna em pH 7,0 na coluna afinidade a Zn²⁺ e eluído em 6,0, enquanto em coluna de afinidade a Cu²⁺ esta

proteína somente foi recuperada na presença de EDTA. Tanto na coluna IMAC-Zn²⁺ como na coluna IMAC-Cu²⁺ foi observada perda de atividade de FVIII, provavelmente devido à instabilidade desta proteína em pHs mais baixos que 6,0. A dessorção de proteínas através da diminuição de pH não foi eficiente.

O último método de dessorção estudado foi realizado empregando o NH₄Cl. Como o cloreto de amônio tem o custo mais baixo do que o imidazol, seria uma alternativa na purificação. O estudo foi realizado com IMAC-Zn²⁺ e IMAC-Cu²⁺. Com IMAC-Zn²⁺ pode-se observar que o NH₄Cl pode ser utilizado no lugar do imidazol para dessorver as proteínas. A PC não se liga à coluna e o FVIII pode ser eluído com NH₄Cl 1 M. Com IMAC-Cu²⁺ não foi possível dessorver as proteínas com NH₄Cl 1M, somente na presença de EDTA.

Em resumo, foi possível separar o FVIII da PC, e provavelmente de todos os fatores de coagulação dependentes de vitamina K, empregando colunas de afinidade a metal empregando diversos métodos de dessorção. Com imidazol foi possível a separação de FVIII e PC em colunas de IMAC-Cu²⁺, IMAC-Zn²⁺ e IMAC-Co²⁺. Variando-se o pH na dessorção das proteínas não foi possível recuperar o FVIII e com NH₄Cl, foi possível separar FVIII da PC somente em IMAC-Zn²⁺.

Três tamanhos de colunas foram utilizadas ao longo do trabalho porque nas colunas de 1 mL a massa de proteína recuperada era muito pequena ou abaixo da faixa de detecção. Assim, começamos a trabalhar com colunas de 5 mL. Ao mesmo tempo, estava disponível no laboratório a resina Chelating Sepharose FF, que é uma resina usada para estudos de cromatografia de afinidade a metal, cujo ligante IDA é o mais comumente descrito na literatura. Uma coluna de Chelating Sepharose FF de 10 mL foi empacotada no laboratório.

A principal diferença entre Chelating Sepharose FF e a HiTrap IMAC HP é que as 2 resinas possuem ligantes diferentes. O ligante da Chelating Sepharose FF é o ácido iminodiacético (IDA) enquanto o da HiTrap IMAC HP é segredo industrial. Segundo o fabricante das 2 resinas, a GE Healthcare, na resina de HiTrap IMAC HP o metal liga-se mais fortemente e conseqüentemente ocorre pouco vazamento do metal. Nossos resultados com as colunas de Cu²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺ indicam que as proteínas também ligam-se mais fortemente à HiTrap IMAC HP do que à Chelating Sepharose FF, somente na coluna de Cu²⁺ as proteínas ligaram-se à resina, as proteínas não se ligaram nem ao Zn²⁺, nem ao Co²⁺. Portanto a coluna HiTrap IMAC HP é mais adequada para a purificação de FVIII e separação de FVIII e PC.

6 CONCLUSÕES

- Em coluna ANX Sepharose FF, o FVIII e a PC são eluídos com 500 mM de NaCl, apresentando perfil de eluição semelhante ao das resinas de troca iônica forte.
- O fator de purificação de FVIII em coluna ANX Sepharose FF é duas vezes maior que em coluna Q Sepharose FF, o que torna a coluna ANX Sepharose FF mais eficiente.
- Em colunas IMAC-Ni²⁺ e IMAC-Fe³⁺ não foi possível realizar as purificações porque, nas condições experimentais empregadas, as proteínas de interesse, FVIII e PC, tiveram pouca ou nenhuma afinidade aos metais.
- Empregando imidazol para a dessorção das proteínas, o FVIII e a PC foram separados em colunas IMAC-Cu²⁺, IMAC-Zn²⁺ e IMAC-Co²⁺.
- O método de dessorção através da variação de pH não é adequado para a purificação dos fatores de coagulação estudados devido à perda de atividade do FVIII em pHs mais baixos que 6,0.
- O NH₄Cl como agente de dessorção, foi eficiente para separar o FVIII e a PC em colunas IMAC-Zn²⁺.
- Experimento em IMAC-Co²⁺ apresentou os melhores resultados neste estudo, houve boa separação do FVIII e da PC, maior % de recuperação de atividades e melhores fatores de purificação.

REFERÊNCIAS*

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. Protein Purification: handbook, Uppsala: Amersham Pharmacia Biotech AB, 1999. 97p.

BAE, J. S.; YANG, L.; REZAIE, A. R. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, p. 2867–2872, 2007.

BARINGTON, K. A.; KAERGAARD, P. A very-high-purity von Willebrand factor preparation containing high-molecular-weight multimers. **Vox Sang.**, v. 76, p. 85-89, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-274, 1976.

BRASIL. **Constituição (1988)**. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado, 1988.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de Afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de Biomoléculas: Aspectos Fundamentais e Aplicações Tecnológicas. **Quim. Nova**, v. 32, p.1288-1296, 2009.

BURNOUF, T.; BURNOUF-RADOSEVICH, M.; HUART, J. J.; GOUDEMAND, M. A high purified Factor VIII:c concentrate prepared from cryoprecipitate by ion-exchange chromatography. **Vox Sang.**, v.60, p. 8-15, 1991.

BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 49, p. 575-586, 2001.

BURNOUF, T. Modern plasma fractionation. **Transfus. Med. Rev.**, v. 21, p. 101-17, 2007.

CABRERA-CRESPO, J.; GONÇALVES, V. M.; MARTINS, E. A. L.; GRELLET, S.; LOPES, A. Y. & RAW, I. Albumin Purification from Human Placenta. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, p. 101-106, 2000.

CARVALHO, R. R. **Desenvolvimento de processos para purificação de Fator VIII de coagulação a partir de plasma humano**. 2008. 111f. Monografia (Aprimoramento em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006, p. 456.

---

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHARCOSSET, C. Purification of Proteins by Membrane Chromatography. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 71, p. 95-110, 1998.

CHENG, E.; JINZENJI, D.; LORTHIOIS, A. P. A. A.; CARVALHO, R. R.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; RAW, I.; MARTINS, E. A. L. Purification of coagulation factor VIII using chromatographic methods. Direct chromatography of plasma in anion exchange resins. **Biotechnol. Lett**, v. 32, p.1207-1214, 2010.

D'AMICI, G. M.; BLASI, B.; D'ALESSANDRO, A.; VAGLIO, S.; ZOLLA, L. Plasma-derived clotting factor VIII: Heterogeneity evaluation in the quest for potential inhibitory-antibody stimulating factors. **Electrophoresis**, v. 32, p. 1-10, 2011.

DAHLBÄCK, B. & VILLOUTREIX, B. O. The anticoagulant protein C pathway. **FEBS Letters**, v. 579, p. 3310-3316, 2005.

DAHLBACK B. Blood coagulation. **Lancet** , v. 355, p. 1627-1632, 2000.

FARRUGIA, A.; EVERS, T.; FALCOU, P. F.; BURNOUF, T.; AMORIM, L.; THOMAS, S. Plasma fractionation issues. **Biologicals**, v.37, p. 88-93, 2009.

FRANCHINI, M.; MANNUCI, P. M. Inhibitors of propagation of coagulation (factors VIII, IX and XI): a review of current therapeutic practice. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 72, n. 4, p. 553-562, 2011.

FURIE, B.; FURIE, B. C. The molecular basis of blood coagulation. **Cell**, v. 53, p. 505-518, 1988.

GONÇALVES, V. M.; LEITE, L. C. C.; RAW, I. & CABRERA-CRESPO, J. Purification of catalase from human placenta. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 29, Pt 1, p. 73-7, 1999.

GRELLET S.; MARTINS, E. A. L.; GONÇALVES, V. M.; LOPES, A. P. Y.; RAW, I.; CABRERA-CRESPO, J. An associated process for the purification of immunoglobulin G, catalase, superoxide dismutase and albumin from haemolysed human placenta blood. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 34, p. 135-142, 2001.

GRIBBLE, J.; GARVEY, M. B. Porcine factor VIII provides clinical benefit to patients with high levels of inhibitors to human and porcine factor VIII. **Haemophilia**, v.6, n. 5, p. 482-485, 2000.

GRIFFIN, J.; FERNÁNDEZ, J. A.; MOSNIER, L. O.; LIU, D.; CHENG, T.; GUO, H.; ZLOKOVIC, B. V. The promise of protein C. **Blood Cell Mol. Dis.**, v. 36, p. 211-216, 2006.

HANSSON, K.; STENFLO, J. Post translational modifications in proteins involved in blood coagulation. **J. Thromb. Haemost.**, v.3, p. 2633-2648, 2005.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis. **Hematol. Oncol. Clin. North. AM.**, v. 21, p. 1-11, 2007.

JINZENJI, D. **Desenvolvimento de processo cromatográfico para purificação de fator VIII humano. Emprego da anticorpos contra fragmentos específicos da proteína na avaliação da pureza e estabilidade durante as etapas de purificação.** 2008. 194 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

JOSIC, Dj.; SCHWINN, H.; STADLER, M.; STRANCAR, A. Purification of factor VIII and von Willebrand factor from human plasma by anion-exchange chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 662, p. 181-190, 1994.

KAESGAARD, P.; BARINGTON, K. A. Isolation of the factor VIII-von Willebrand factor complex directly from plasma by gel filtration. **J. Chromatogr. B**, v. 715, p. 357-367, 1998.

KAUFMAN, R. J.; PIPE, S. W. Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor. **Thromb. Haemost.**, v. 82, p. 201-208, 1999.

KELLEY, B. D.; TANNATT, M.; MAGNUSSON, R.; HAGELBERG, S.; BOOTH, J. Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of Factor VIII. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 87, p. 400-412, 2004.

KEMPTON, C. L.; WHITE, G. C. How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor. **Blood**, v. 113, p. 11-17, 2009.

KNOR, S.; KHRENOV, A.; LAUFER, B.; BENHIDA, A.; GRAILLY, S.C.; SCHWAAB, R.; OLDENBURG, J.; BEAUFORT, N.; MAGDOLEN, V.; SAINT-REMY, J.M.R.; SAENKO, E. L.; HAUSER, C. A. E.; KESSLER, H. Efficient factor VIII affinity purification using a small synthetic ligand. **J. Thromb. Haemost.**, v.6, p. 470-477, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LIHME, A.; HANSEN, M. B.; ANDERSEN, I. V.; BURNOUF, T. A novel core fractionation process of human plasma by expanded bed adsorption chromatography. **Anal Biochem.**, v. 399, n. 1, p. 102-109, 2010.

LEE J. J.; BRULEY D. F.; KANG K. A. Effect of pH and imidazole on protein C purification from Cohn fraction IV-1 by IMAC. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 599, p. 61-6, 2007.

LORTHIOIS, A. P. A. A. **Estudo para purificação de fator VIII humano e suíno. Ensaio de sensibilidade a tratamentos antivirais.** 2002. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LUST, M.; VULCANO, M.; DANESE, S. The protein C pathway in inflammatory bowel disease: the missing link between inflammation and coagulation. **Trends Mol. Med.**, v. 14, 2008.

MAMMEN, E. F. Recombinant Factor VIII Products and Hemophilia A: Efficacy, Safety, and Inhibitor Development. **Sem. Thromb. Hemost.**, v. 28, p. 239-240, 2002.

MANNUCCI, P. M. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. **J. Thromb. Haemost.**, v. 1, p. 1349-55, 2003.

MANTOVAARA, T.; PERTOFT, H.; PORATH, J. Purification of Factor VIII:c coagulant activity from rat liver nonparenchymal cell culture medium by immobilized metal ion affinity chromatography. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.13, p. 120-126, 1991.

MATEJTSCHUK, P.; FELDMAN, A.; ROTT, J.; MORE, J. Affinity separations of proteins. In: MATEJTSCHUK, P. **Affinity separations: a practical approach**. New York: IRL PRESS, 1997, p.61-97.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, p. 41-48, 2006.

MORI, F.; NARDINI, I.; ROSSI, P.; NARDINI, C.; FARINA, C. Progress in large-scale purification of factor VIII/von Willebrand factor concentrates using ion-exchange Chromatography. **Vox Sang.**, v. 95, p. 298-307, 2008.

O'BRIEN, J. M.; ALI, N. A.; ABEREGG, S. K.; ABRAHAM, E. Sepsis. **Am. J. Med.**, v. 120, p.1012-1022, 2007.

OFOSU, F. A.; FREEDMAN, J.; SEMPLE, J. W. Plasma-derives biological medicines used to promote Haemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 99, p. 851-862, 2008.

ORTHNER, C. L.; RALSTON, A. H.; GEE, D.; KENT, R.; KOLEN, B.; MCGRIF, J. D.; DROHAN, W. Large-scale production and properties of immunoaffinity-purified human activated protein C concentrate. **Vox Sang.**, v. 69, p. 309-318, 1995.

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, J.; BELFRAGE, G. Metal Chelate Affinity Chromatography: A New Approach to Protein Fractionation, **Nature**, v. 258, p. 598-599, 1975.

PORATH, J. IMAC-Immobilized metal ion affinity based chromatography. **Trends Analyt. Chem.**, v. 7, p. 254-259, 1988.

RADOSEVICH, M.; ZHOU, F. L.; HUART, J. J.; BURNOUF, T. Chromatographic purification and properties of a therapeutic human protein C concentrate. **J. Chromatogr. B Analyt.**, v. 790, p. 199-207, 2003.

REZENDE, S. M.; PINHEIRO, K.; CARAM, C.; GENOVEZ, G.; BARCA, D. Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. **Haemophilia**, v. 15, p. 142-149, 2009.

RODRIGUEZ, E. S. **Purificação de proteína C e fator VIII de coagulação a partir de plasma humano empregando técnicas cromatográficas**. 2007. 67f. Trabalho

de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2007. [Projeto FAPESP 2007/07764-5].

SOARES, B. M. **Política de Hemoderivados no Brasil: Desafios e Perspectivas**. 101f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) – Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

TAKEYAMA, M.; NOGAMI, K.; OKUDA, M.; SHIMA, M. Von Willebrand factor protects the Ca^{2+} -dependent structure of the factor VIII light chain. **Br. J. Haematol.**, v.146, p. 531-537, 2009.

TANAKA, A. M.; TANAKA, A. S.; LOPES, A. P. Y.; TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J., RAW, I. Purification of porcine plasma Factor FVIII using chromatographic methods. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p.257-260, 2000.

TE BOOY, M. P.; FABER, A. DE JONGE. E. WOLTERINK, E. P.; RIETHORST, W.; BEUGELING, T.; BANTJES, A.; OVER, J.; KONIG, B. W. Large-scale purification of factor VIII by affinity chromatography: optimization of process parameters. **J. Chromatogr.**, v. 503, p. 103-113, 1990.

TE BOOY, M. P.W.M.; RIETHORST, W.; FABER, A.; OVER, J.; KONIG B. W. Affinity purification of plasma proteins: characterization of six affinity matrices and their application for the isolation of human factor VIII. **Thromb. Haemost.**, v. 61, n. 2, p. 234-237, 1989.

THIM, L.; VANDAHN, B.; KARLSSON, J.; KLAUSEN, N. K.; PEDERSEN, J.; KROGH, T. N.; KJALKE, M.; PETERSEN, J. M.; JOHNSEN, L. B.; BOLT, G.; NORBY, P. L.; STEENSTRUP, T. D. Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8). **Haemophilia**, v. 16, p. 349–359, 2010.

UEDA, E. K. M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. **J. Chromatogr. A.**, v. 988, p. 1-23, 2003.

VANÇAN, S.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems. **Proc. Biochem.**, v. 37, p.573-579, 2002.

WANG, W., WANG, Y. J., KELNER, D. N. Coagulation factor VIII: structure and stability. **Int. J. Pharm**, v. 259, p. 1-15, 2003.

WONG, T.; RECHT, M. Current options and new developments in the treatment of Haemophilia. **Drugs**, v. 71, p. 305-320, 2011.

WU, H.; BRULEY, D.F. Chelator, metal ion and buffer studies for Protein C separation. **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, v. 132, p. 213-220, 2002.

YAN, S. B. Review of conformation-specific affinity purification methods for plasma vitamin K-dependent proteins. **J. Mol. Recognit.**, v. 9, p. 211-218, 1996.

ZHOU, F. L.; BURNOUF-RADOSEVICH, M.; BURNOUF, T. Purification of Factor VIIIr von Willebrand factor from human plasma on immobilized lentil lectin. **Protein Expr. Purif.**, v.5, p.138–143, 1994.

ANEXOS

ANEXO A – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações obtidas na determinação da concentração de NaCl para eluição de FVIII e da PC na purificação de plasma em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF (Condição Experimental 1).

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,143	-0,015	0,158
100	0,271	-0,015	0,286

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
Plasma	716,7	0,286	140,5	100696,4	100
FT	716,7	0,007	1,0	716,7	0,7
Reeq	684,75	0	-2,5	-1711,9	-
A200	716,7	0,005	0,0	0,0	-
A500A	358,35	0,45	222,5	79732,9	79,2
A500B	143,34	0,001	-2,0	-286,7	-

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,103	0,017	0,086
20	0,156	0,006	0,15
50	0,328	0,012	0,316
75	0,501	0,015	0,486
100	0,541	0,018	0,523

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
Plasma	716,7	0,523	98,6	70666,6	100
FT	716,7	0,129	19,8	14190,7	20,1
Reeq	684,75	0,023	-1,4	-958,7	-
A200	716,7	0,018	-2,4	-1720,1	-
A500A	358,35	0,926	179,2	64216,3	90,9
A500B	143,34	0,008	-4,4	-630,7	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,784
5	1,271
10	1,497
15	1,706
20	1,922
25	2,113

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Plasma	716,7	0,1	10.000	1,372	9,1	90,6	64933
FT	716,7	0,2	1.000	1,67	15,0	75,1	53824
Reeq	684,75	0,2	10.000	0,944	0,5	2,5	1712
A200	716,7	20	10	1,209	5,8	0,29	208
A500A	358,35	10	20	1,603	13,7	1,368	490
A500B	143,34	200	-	0,984	1,3	0,01	1

ANEXO B – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações obtidas na determinação da concentração de NaCl para eluição de FVIII e da PC na purificação de plasma em coluna de troca aniônica ANX Sepharose FF (Condição Experimental 2).

Curva de calibração para determinação da atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm
0	0	0	0
50	0,286	0,002	0,284
100	0,545	0,003	0,542

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Frações	Volume da fração (mL)	Abs 405- 492 nm	Atividade	Atividade total	% de atividade recuperada
Plasma	716,75	0,567	104,20	74688	100
FT	716,75	0,026	4,02	2880	3,9
Reeq	716,75	-0,002	-1,17	-836	-
A150	716,75	0	-0,80	-571	-
A250	332,53	-0,003	-1,35	-450	-
A500 A	332,53	0,65	119,57	39762	53,2
A500 B	83	0,089	15,69	1302	1,7

Curva de calibração para determinação da atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm
0	0	0	0
10	0,04	-0,006	0,046
20	0,113	-0,005	0,118
50	0,253	0,002	0,251
75	0,39	0,002	0,388
100	0,494	0,005	0,489

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Frações	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total	% de atividade recuperada
Plasma	716,7	0,489	98,69	70734	100
FT	716,7	0,168	33,18	23783	33,6
Reeq	716,7	0,023	3,59	2574	-
A150	716,7	0,008	0,53	380	-
A250	322,51	0,027	4,41	1422	-
A500 A	322,51	1,177	239,10	77113	109,0
A500 B	83	0,016	2,16	180	0,3

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595 nm
0	0,772
5	0,987
10	1,17
15	1,318
20	1,967
25	2,009

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)
Plasma	716,7	0,2	10.000	1,539	15,68	78,40	56186,6
FT	716,7	0,2	10.000	1,428	13,58	67,92	48681,5
Reeq.	716,7	10	20	1,512	15,17	1,52	1087,2
A150	716,7	50	4	1,183	8,96	0,18	128,5
A250A	322,5	20	10	1,257	10,36	0,52	167,0
A500A	322,5	20	10	1,876	22,04	1,10	355,4
A500B	83	200	-	0,966	4,87	0,02	2,0

ANEXO C – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Cu²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,178	-0,004	0,182
100	0,347	0	0,347

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da Fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500A	25	0,271	76,6	1915,7	100
FT	25	-0,018	-5,9	-148,6	-
Reeq	75	-0,017	-5,7	-424,3	-
10mM	75	-0,017	-5,7	-424,3	-
30mM	75	-0,017	-5,7	-424,3	-
50mM	75	-0,017	-5,7	-424,3	-
100mM	75	-0,007	-2,8	-210,0	-
200mM	75	0,04	10,6	797,1	41,61
500mM	75	-0,02	-6,5	-488,6	-

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,077	0,001	0,076
20	0,152	0,002	0,15
50	0,357	0,003	0,354
75	0,507	0,009	0,498
100	0,715	0,011	0,704

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da Fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade Total (U)	% de atividade Recuperada
A500A	25	0,649	93,3	2332,6	100
FT	25	0	-0,8	-18,8	-
Reeq	75	-0,001	-0,9	-67,4	-
10Mm	75	0,148	20,7	1552,2	66,54
30Mm	75	0,005	0,0	-2,2	-
50mM	75	0	-0,8	-56,5	-
100Mm	75	-0,001	-0,9	-67,4	-
200Mm	75	-0,002	-1,0	-78,3	-
500mM	75	-0,001	-0,9	-67,4	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (ug)	Abs 595nm
0	0,533
5	0,761
10	0,911
15	1,014
20	1,135
25	1,246

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (μL)	Fator de Diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (μg)	Volume amostra (μL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500A	25	10	20	0,813	8,09	10	0,81	20,24
FT	25	200	-	0,539	-1,91	200	-0,01	-0,24
Reeq	75	200	-	0,546	-1,65	200	-0,01	-0,62
10mM	75	200	-	0,897	11,16	200	0,06	4,19
30mM	75	200	-	0,98	14,19	200	0,07	5,32
50mM	75	200	-	0,993	14,66	200	0,07	5,50
100mM	75	200	-	0,746	5,65	200	0,03	2,12
200mM	75	200	-	0,669	2,84	200	0,01	1,06
500mM	75	200	-	0,553	-1,39	200	-0,01	-0,52

ANEXO D – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Cu²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,149	-0,004	0,153
100	0,361	-0,003	0,364

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade Total (U)	% de atividade recuperada
A500A	50,0	-0,031	131,86	6593,1	100
FT	50,0	-0,031	11,03	551,4	8,36
Reeq	150	-0,031	8,53	1279,2	19,40
10mM	150	-0,031	10,19	1529,2	23,19
200mM	150	-0,031	21,86	3279,2	49,74
500mM	150	-0,031	5,75	862,5	13,08

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,302	0,006	0,296
20	0,56	0,013	0,547
50	1,094	0,033	1,061
75	1,288	0,053	1,235
100	1,297	0,057	1,24

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade Total (U)	% de atividade recuperada
A500A	50,0	0,838	43,90	2194,8	100
FT	50,0	0,003	-7,33	-366,6	-
Reeq	150	0,004	-7,27	-1090,5	-
10mM	150	0,211	5,43	814,4	37,1
200mM	150	0,003	-7,33	-1099,7	-
500mM	150	0,002	-7,39	-1108,9	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,51
5	0,758
10	0,951
15	1,068
20	1,203
25	1,272

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Prot total (mg)
A500	50,0	10	20	0,875	9,7	0,97	48,50
FT	50,0	50	4	0,575	-0,3	-0,01	-0,30
Reeq	150	50	4	0,57	-0,5	-0,01	-1,40
10mM	150	50	4	0,832	8,3	0,17	24,80
200mM	150	200	-	0,989	13,5	0,07	10,13
500mM	150	200	-	0,534	-1,7	-0,01	-1,25

ANEXO E – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Cu²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e variação de pH.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,213	-0,001	0,214
100	0,453	0	0,453

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500 pH 7	9,6	0,527	132,750	1274,4	100,00
FTpH 7	9,6	0,032	9,000	86,4	6,78
Reeq pH 7	24,0	-0,011	-1,750	-42,0	-
pH 6	24,0	-0,011	-1,750	-42,0	-
pH5	24,0	-0,011	-1,750	-42,0	-
pH4	24,0	-0,011	-1,750	-42,0	-
pH 4 EDTA	24,0	-0,012	-2,000	-48,0	-

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,088	0,003	0,085
20	0,16	0,001	0,159
50	0,414	0,008	0,406
75	0,568	0,01	0,558
100	0,693	0,018	0,675

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500 pH 7	9,6	1,19	171,72	1648,56	100,00
FT Ph 7	9,6	0,00	-0,16	-1,53	-
Reeq pH 7	24,0	0,00	-0,30	-7,30	-
pH 6	24,0	0,00	-0,59	-14,26	-
pH5	24,0	0,00	-0,59	-14,26	-
pH4	24,0	0,00	-0,59	-14,26	-
pH 4 EDTA	24,0	0,10	13,61	326,61	19,81

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595 nm
0	0,489
5	0,722
10	0,885
15	1,011
20	1,122
25	1,195

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de Diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500 pH 7	9,6	10	20	0,99	15,89	1,59	15,25
FT pH 7	9,6	200	-	0,66	3,81	0,02	0,18
Reeq pH 7	24,0	200	-	0,54	-0,74	0,00	-0,09
pH 6	24,0	200	-	0,52	-1,30	-0,01	-0,16
pH5	24,0	200	-	0,53	-1,07	-0,01	-0,13
pH4	24,0	200	-	0,52	-1,44	-0,01	-0,17
pH 4 EDTA	24,0	10	20	0,65	3,37	0,34	8,09

ANEXO F – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC- Cu^{2+} empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com NH_4Cl .

Curva de calibração para determinação da atividade de FVIII.

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500A	12,5	0,296	83,8	1047,1	100,0
FT	12,5	-0,020	-6,5	-81,4	-
Reeq	25	-0,021	-6,8	-170,0	-
250mM	24	-0,020	-6,5	-156,3	-
500mM	26	-0,017	-5,7	-147,1	-
750mM	27	-0,020	-6,5	-175,9	-
1M	25	-0,019	-6,2	-155,7	-
1M com EDTA	20	-0,022	-7,1	-141,7	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações das purificações.

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de Amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500A	12,5	10	20	0,796	9,63	0,96	12,04
FT	12,5	200	-	0,486	-1,85	-0,01	-0,12
Reeq	25	200	-	0,485	-1,89	-0,01	-0,24
250mM	24	200	-	0,501	-1,30	-0,01	-0,16
500mM	26	200	-	0,503	-1,22	-0,01	-0,16
750mM	27	200	-	0,482	-2,00	-0,01	-0,27
1M	25	200	-	0,478	-2,15	-0,01	-0,27
1M com EDTA	20	10	20	0,652	4,30	0,43	8,59

ANEXO G – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Ni²⁺.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 Nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,166	0,003	0,163
100	0,308	0,002	0,306

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	9,6	0,268	85,39	820	100
FT	9,6	0,012	2,81	27	3,29
Reeq	24	0,036	10,55	253	30,88
10Mm	10	0,036	10,55	105	12,87
30mM	10	0,006	0,87	9	1,06
50mM	10	0,004	0,23	2	0,28
100mM	10	0,005	0,55	5	0,67
200mM	10	0,004	0,23	2	0,28
500mM	10	0,002	-0,42	-4	-

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm
0	0	0	0
10	0,086	0,001	0,085
20	0,166	0,006	0,16
50	0,419	0,015	0,404
75	0,589	0,021	0,568
100	0,694	0,027	0,667

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade Recuperada
A500	9,6	0,943	133,46	1281	100
FT	9,6	0,15	18,54	178	13,89
Reeq	24	0,246	32,45	779	60,78
10mM	10	0,045	3,32	33	2,59
30mM	10	0,005	-2,48	-25	-
50mM	10	-0,001	-3,35	-33	-
100mM	10	-0,001	-3,35	-33	-
200mM	10	0	-3,20	-32	-
500mM	10	0	-3,20	-32	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,329
5	0,437
10	0,48
15	0,513
20	0,588
25	0,671

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500A	9,6	10	20	0,548	16,8	1,68	16,16
FT	9,6	200	-	0,603	21,4	0,11	1,03
Reeq	24	30	6,6	0,551	17,1	0,57	13,67
10mM	10	50	4	0,481	11,3	0,23	2,25
30mM	10	200	-	0,517	14,3	0,07	0,71
50mM	10	200	-	0,574	19,0	0,10	0,95
100mM	10	200	-	0,549	16,9	0,08	0,85
200mM	10	200	-	0,574	19,0	0,10	0,95
500mM	10	200	-	0,658	26,0	0,13	1,30

ANEXO H – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com imidazol.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,149	-0,004	0,153
100	0,361	-0,003	0,364

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	25,0	0,30	101,67	2541,67	100
FT	25,0	0,01	4,67	116,67	4,59
Reeq	75	0,01	5,00	375,00	14,75
10mM	75	0,01	5,00	375,00	14,75
200mM	75	0,05	18,67	1400,00	55,08
500mM	75	0,00	4,33	325,00	12,79

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,069	0	0,069
20	0,134	0,003	0,131
50	0,361	0,012	0,349
75	0,497	0,018	0,479
100	0,58	0,023	0,557

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	25,0	1,01	171,64	4290,95	100
FT	25,0	0,67	113,02	2825,43	65,85
Reeq	75	0,05	5,60	420,26	9,79
10mM	75	0,00	-2,50	-187,50	-
200mM	75	0,00	-2,84	-213,36	-
500mM	75	0,00	-2,84	-213,36	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,508
5	0,725
10	0,905
15	1,005
20	1,122
25	1,206

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de Diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500	25,0	10	20	0,857	10,6	1,06	26,57
FT	25,0	30	6,6	0,775	7,6	0,25	6,33
Reeq	75	10	20	0,57	0,0	0,00	0,00
10mM	75	30	6,6	0,611	1,5	0,05	3,80
200mM	75	200	-	0,751	6,7	0,03	2,51
500mM	75	200	-	0,539	-1,1	-0,01	-0,43

ANEXO I – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e dessorção com imidazol.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,149	-0,004	0,153
100	0,361	-0,003	0,364

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500A	50	0,38	109,08	5454,17	100
FT	50	0,19	56,58	2829,17	51,9
Reeq	150	0,04	14,08	2112,50	38,7
10mM	150	0,01	4,92	737,50	13,5
200mM	150	0,01	4,92	737,50	13,5
500mM	150	0,01	4,36	654,17	12,0

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,069	0	0,069
20	0,134	0,003	0,131
50	0,361	0,012	0,349
75	0,497	0,018	0,479
100	0,58	0,023	0,557

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500A	50	0,863	145,60	7280	100
FT	50	0,460	76,12	3806	52,3
Reeq	150	0,092	12,67	1901	26,1
10mM	150	0,003	-2,67	-401	-
200mM	150	0,002	-2,84	-427	-
500mM	150	0,003	-2,67	-401	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteína nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,512
5	0,753
10	0,929
15	1,039
20	1,155
25	1,265

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500	50,0	10	20	0,859	9,7	0,97	48,28
FT	50,0	10	20	0,704	4,3	0,43	21,55
Reeq	150	200	-	1,12	18,7	0,09	13,99
10mM	150	200	-	0,516	-2,2	-0,01	-1,63
200mM	150	200	-	0,523	-1,9	-0,01	-1,45
500mM	150	200	-	0,526	-1,8	-0,01	-1,37

ANEXO J – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com imidazol em pH 7,0.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,213	-0,001	0,214
100	0,453	0	0,453

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	25	0,660	166,00	4150,00	100,00
FT	25	-0,012	-2,00	-50,00	-1,20
Reeq	75	-0,012	-2,00	-150,00	-3,61
10mM	75	-0,007	-0,75	-56,25	-1,36
30mM	75	0,021	6,25	468,75	11,30
50mM	75	0,065	17,25	1293,75	31,17
100mM	75	0,011	3,75	281,25	6,78
200mM	75	-0,011	-1,75	-131,25	-3,16
500mM	75	-0,015	-2,75	-206,25	-4,97

Curva de calibração para determinação da atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,088	0,003	0,085
20	0,16	0,001	0,159
50	0,414	0,008	0,406
75	0,568	0,01	0,558
100	0,693	0,018	0,675

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	25	1,194	198,83	4971	100
FT	25	0,052	8,50	213	4,27
Reeq	75	0,144	23,83	1788	35,96
10mM	75	0,078	12,83	963	19,36
30mM	75	-0,048	-8,17	-613	-12,32
50mM	75	-0,050	-8,50	-638	-12,82
100mM	75	-0,052	-8,83	-663	-13,33
200mM	75	-0,051	-8,67	-650	-13,08
500mM	75	-0,053	-9,00	-675	-13,58

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,541
5	0,812
10	0,975
15	1,094
20	1,225
25	1,354

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína Total (mg)
A500	25	10	20	1,022	13,2	1,32	33,00
FT	25	30	6,6	0,774	5,2	0,17	4,33
Reeq	75	200	-	0,827	6,9	0,03	2,59
10mM	75	30	6,6	0,811	6,4	0,21	15,98
30mM	75	30	6,6	0,688	2,4	0,08	6,06
50mM	75	200	-	0,591	-0,7	0,00	-0,26
100mM	75	200	-	0,551	-2,0	-0,01	-0,75
200mM	75	200	-	0,559	-1,7	-0,01	-0,65
500mM	75	200	-	0,577	-1,2	-0,01	-0,43

ANEXO K – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 7,0.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,213	-0,001	0,214
100	0,453	0	0,453

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 Nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500A pH 7,0	25	0,633	159,25	3981,25	100
FT pH 7,0	25	-0,011	-1,75	-43,75	-
Reeq Ph 7,0	75	-0,009	-1,25	-93,75	-
pH 6,0	75	-0,007	-0,75	-56,25	-
pH 5,0	75	0,037	10,25	768,75	19,31
pH 4,0	75	-0,013	-2,25	-168,75	-

Curva de calibração para determinação da atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,088	0,003	0,085
20	0,16	0,001	0,159
50	0,414	0,008	0,406
75	0,568	0,01	0,558
100	0,693	0,018	0,675

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostras	Volume da Fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade Recuperada
A500A pH 7,0	25	1,229	204,7	5116,7	100
FT Ph 7,0	25	0,102	16,8	420,8	8,2
Reeq pH 7,0	75	0,171	28,3	2125,0	41,5
pH 6,0	75	0,098	16,2	1212,5	23,7
pH 5,0	75	-0,002	-0,5	-37,5	-
pH 4,0	75	-0,006	-1,2	-87,5	-

Curva de calibração para determinar a concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,502
5	0,765
10	0,907
15	1,046
20	1,178
25	1,253

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500A pH 7,0	25	10	20	1,013	15,1	1,51	37,76
FT pH 7,0	25	30	6,6	0,769	6,7	0,22	5,57
Reeq pH 7,0	75	200	-	0,792	7,5	0,04	2,81
pH 6,0	75	50	4	0,727	5,2	0,10	7,86
pH 5,0	75	50	4	0,98	14,0	0,28	20,95
pH 4,0	75	200	-	0,582	0,2	0,00	0,09

ANEXO L – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e dessorção com variação de pH a partir de pH 6,0.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,178	-0,004	0,182
100	0,347	0	0,347

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500 pH 6,0	25	0,157	44	1101	100
FT pH 6,0	25	-0,016	-5	-134	-
Reeq pH 6,0	75	-0,020	-7	-489	-
pH 5,0	75	-0,013	-5	-339	-
pH 4,0	75	-0,018	-6	-446	-

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,077	0,001	0,076
20	0,152	0,002	0,15
50	0,357	0,003	0,354
75	0,507	0,009	0,498
100	0,715	0,011	0,704

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500 pH 6,0	25	0,714	103	2568	100
FT pH 6,0	25	0,424	61	1517	59,09
Reeq pH 6,0	75	0,014	1	96	3,72
pH 5,0	75	-0,028	-5	-361	-
pH 4,0	75	-0,028	-5	-361	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,534
5	0,743
10	0,885
15	1,035
20	1,157
25	1,21

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500A	25	10	20	0,797	7,8	0,78	19,54
FT	25	30	6,6	0,728	5,3	0,18	4,38
Reeq	75	200	-	1,047	17,1	0,09	6,40
pH=5	75	50	4	0,692	3,9	0,08	5,89
pH=4	75	200	-	0,534	-1,9	-0,01	-0,72

ANEXO M – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Zn²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e dessorção com NH₄Cl.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 Nm
0	0	0	0
50	0,173	-0,005	0,178
100	0,344	-0,002	0,346

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	9,6	0,331	110	1056	100
FT	9,6	0,008	2,3	22,4	2,1
Reeq	28,8	0,021	6,7	192,0	18,2
0-20%	2	0,035	11,3	22,7	2,1
20-40%	2	0,038	12,3	24,7	2,3
40-60%	2	0,038	12,3	24,7	2,3
60-80%	2	0,047	15,3	30,7	2,9
80-100%	2	0,069	22,7	45,3	4,3
100%	18	0,07	23,0	414,0	39,2

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,087	0,007	0,08
20	0,177	0,01	0,167
50	0,415	0,027	0,388
75	0,574	0,033	0,541
100	0,708	0,036	0,672

Determinação da atividade de PC nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	9,6	1,079	176,5	1694,4	100
FT	9,6	0,109	14,8	142,4	8,4
Reeq	28,8	0,299	46,5	1339,2	79,0
0-20%	2	0,088	11,3	22,7	1,3
20-40%	2	0,079	9,8	19,7	1,2
40-60%	2	0,043	3,8	7,7	0,5
60-80%	2	0,048	4,7	9,3	0,6
80-100%	2	0,034	2,3	4,7	0,3
100%	18	0,019	-0,2	-3,0	-0,2

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,772
5	1,221
10	1,469
15	1,717
20	1,917
25	2,063

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de diluição	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500	9,6	10	20	1,465	11,3	1,13	10,89
FT	9,6	60	3,3	1,203	6,1	0,10	0,98
Reeq	28,8	30	6,6	1,371	9,5	0,32	9,08
0-20%	2	200	-	1,884	19,7	0,10	0,20
20-40%	2	200	-	1,825	18,5	0,09	0,19
40-60%	2	200	-	1,535	12,7	0,06	0,13
60-80%	2	200	-	1,517	12,4	0,06	0,12
80-100%	2	200	-	1,48	11,6	0,06	0,12
100%	18	200	-	1,185	5,7	0,03	0,52

ANEXO N – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Co²⁺ empregando coluna HiTrap IMAC HP de 1 mL e tampões citrato 25 mM.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm
0	0	0	0
50	0,145	0,004	0,141
100	0,254	0,004	0,25

Determinação da atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade Total (U)	% de atividade recuperada
A500	9,6	0,226	110,5	1061	100
FT	9,6	0,01	2,5	24	2,26
Reeq	24	0,05	22,5	540	50,90
10mM	24	0,007	1,0	24	2,26
30mM	24	0,002	-1,5	-36	-
50mM	24	0,002	-1,5	-36	-
100mM	24	0,001	-2,0	-48	-
200mM	24	0,003	-1,0	-24	-
500mM	24	0	-2,5	-60	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,716
5	1,198
10	1,446
15	1,652
20	1,892
25	2,063

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de purificação	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500A	9,6	10	20	1,435	11,5	1,15	11,01
FT	9,6	60	3,3	1,362	10,0	0,17	1,61
Reeq	24	30	6,6	1,315	9,1	0,30	7,29
10mM	24	50	4	0,923	1,4	0,03	0,69
30mM	24	200	-	0,833	-0,3	0,00	-0,04
50mM	24	200	-	0,72	-2,5	-0,01	-0,31
100mM	24	200	-	0,726	-2,4	-0,01	-0,29
200mM	24	200	-	0,736	-2,2	-0,01	-0,27
500mM	24	200	-	0,743	-2,1	-0,01	-0,25

ANEXO O – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Co²⁺ empregando coluna HisTrap HP de 5 mL e tampões citrato 10 mM.

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,149	-0,004	0,153
100	0,361	-0,003	0,364

Determinação de atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade Total (U)	% de atividade recuperada
A500	62,0	0,175	61,3	3802,7	100
FT	62,0	0,012	7,0	434,0	11,4
Reeq	74	0,002	3,7	271,3	7,1
100mM	73	0,104	37,7	2749,7	72,3
500mM	75	0,001	3,3	250,0	6,6

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,069	0	0,069
20	0,134	0,003	0,131
50	0,361	0,012	0,349
75	0,497	0,018	0,479
100	0,58	0,023	0,557

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	62,0	0,369	70,2	4352,4	100
FT	62,0	0,345	65,4	4054,8	93,2
Reeq	74	0,027	1,8	133,2	3,1
100mM	73	0,006	-2,4	-175,2	-
500mM	75	0,006	-2,4	-180,0	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595nm
0	0,521
5	0,772
10	0,838
15	1,05
20	1,145
25	1,269

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de purificação	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500	62,0	10	20	0,687	4,0	0,40	24,95
FT	62,0	10	20	0,638	2,3	0,23	14,47
Reeq	74	200	-	0,93	12,4	0,06	4,59
100Mm	73	200	-	0,666	3,3	0,02	1,20
500Mm	75	200	-	0,553	-0,6	0,00	-0,22

ANEXO P – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Co²⁺ empregando coluna Chelating Sepharose FF de 10 mL e tampões citrato 10 mM.

Curva de calibração para determinação da atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm
0	0	0	0
50	0,141	0,002	0,139
100	0,278	0,002	0,276

Determinação da atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostra	Volume da fração (mL)	Abs 405- 492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% atividade recuperada
A500A	120	0,164	58,5	7015,7	100
FT	120	0,142	50,6	6072,9	86,6
Reeq	120	0,027	9,5	1430,4	20,4
100Mm	150	0,028	9,9	734	10,5
500Mm	150	0,027	9,4	698	9,9

ANEXO Q – Curvas de calibração utilizadas para determinação de atividade de FVIII e PC e para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação em IMAC-Fe³⁺.

Curva de calibração para determinação da atividade de FVIII.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
50	0,114	0	0,114
100	0,223	0,004	0,219

Determinação da atividade de FVIII nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	9,6	0,365	165,2	1586,2	100
FT	9,6	0,271	122,5	1176,0	74,1
Reeq	24	0,006	2,0	49,1	3,1
100mM	24	-0,003	-2,0	-49,1	-
500mM	24	-0,003	-2,0	-49,1	-

Curva de calibração para determinação de atividade de PC.

% Atividade	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm
0	0	0	0
10	0,083	0,013	0,07
20	0,178	0,039	0,139
50	0,357	0,039	0,318
75	0,467	0,042	0,425
100	0,516	0,043	0,473

Determinação de atividade de PC nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Abs 405-492 nm	Atividade	Atividade total (U)	% de atividade recuperada
A500	9,6	0,692	135,1	1296,6	100
FT	9,6	0,493	94,4	906,7	69,9
Reeq	24	0,034	0,8	18,6	1,4
100mM	24	0,006	-4,9	-118,5	-
500mM	24	0,003	-5,6	-133,2	-

Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

BSA (µg)	Abs 595 nm
0	0,54
5	0,79
10	0,892
15	1,099
20	1,183
25	1,284

Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume de amostra (µL)	Fator de purificação	Abs 595 nm	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
A500	9,6	10	20	1,003	13,8	1,4	13,2
FT	9,6	10	20	0,935	11,5	1,1	11,0
Reeq	24	30	6,6	0,592	-0,3	0,0	-0,2
100mM	24	200	-	0,547	-1,8	0,0	-0,2
500mM	24	200	-	0,548	-1,8	0,0	-0,2