**Desenvolvimento de processo cromatográfico para
purificação de fator VIII humano. Emprego de anticorpos
contra fragmentos específicos da proteína na avaliação
da pureza e estabilidade durante as etapas de purificação**

DANIELA JINZENJI

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

**São Paulo
2008**

**Desenvolvimento de processo cromatográfico para
purificação de fator VIII humano. Emprego de anticorpos
contra fragmentos específicos da proteína na avaliação da
pureza e estabilidade durante as etapas de purificação**

DANIELA JINZENJI

**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:

Profa. Dra. Elizabeth Angélica Leme Martins

Co-orientadora:

Profa. Dra. Elisabeth Cheng

São Paulo

2008

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

© reprodução total

Jinzenji, Daniela.

Desenvolvimento de processo cromatográfico para purificação de fator VIII humano. Emprego de anticorpos contra fragmentos específicos da proteína na avaliação da pureza e estabilidade durante as etapas de purificação / Daniela Jinzenji. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Elizabeth Angélica Leme Martins.

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.

Versão do título para o inglês: Process development for human factor VIII purification by chromatography, the use of specific antibodies against fragments of the protein for evaluation of purity and stability during purification processes.

Descritores: 1. Purificação de proteínas de plasma 2. Fator VIII de coagulação 3. Biofármacos derivados de plasma 4. Cromatografia de proteínas 5. Hemofilia 6. Produção de Fator VIII I. Martins, Elizabeth Angélica Leme II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB179/2008

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

Candidato(a): Daniela Jinzenji.

Título da Dissertação: Desenvolvimento de processo cromatográfico para purificação de fator VIII humano. Emprego de anticorpos contra fragmentos específicos da proteína na avaliação da

Orientador(a): Elizabeth Angélica Leme Martins.

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:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 289/06, sobre o projeto intitulado “Inovação de processo de purificação de fatores de coagulação VIII e IX e do fator de von Willebrand a partir de plasma humano”, sob a responsabilidade de Elizabeth Angélica Leme Martins está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/04/2006.

São Paulo, 11 de Abril de 2006.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

AGRADECIMENTOS

- À Prof. Dra. Elizabeth Angélica Leme Martins, por toda a orientação, interesse e paciência comigo, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e por toda a dedicação e esforço à pesquisa e ao seu laboratório.
- À Prof. Dra. Elisabeth Cheng, por toda a orientação, aconselhamento e compreensão comigo, e pela persistência e profundidade alcançadas na análise de nossos resultados.
- Ao Prof. Dr. Isaias Raw, por toda sua contribuição à ciência e pelo incansável trabalho de desenvolvimento e pesquisa para o Instituto Butantan.
- Ao Prof. Dr. Joaquin Cabrera-Crespo, pelas muitas informações sobre cromatografia e pela valiosa contribuição na banca de qualificação.
- Às Profs. Drs. Aparecida Sadae Tanaka e Ana Marisa Chudzinski Tavassi, pelas valiosas contribuições na banca de qualificação.
- Às Dras. Anita Tanaka e Ana Paula Lorthiois, por seus trabalhos prévios de purificação de FVIII, que construíram a base e trouxeram informações de valor inestimável para este trabalho.
- Aos Profs. Drs. Mari Cleide Sogayar e Marcos Ângelo Almeida Demasi, do Departamento de Bioquímica do IQ-USP, pelo gentil fornecimento de anticorpos monoclonais anti-FVIII.
- Aos Profs. Drs. Sunao Sato e João Carlos Monteiro de Carvalho, e Rachel Pacheco Abisag Chávez, do Departamento de Tecnologia Farmacêutica da FCF-USP, pela oportunidade de iniciação científica em seu laboratório, que primeiro me mostrou as possibilidades da vida científica.
- Aos Profs. Drs. Walter Colli, Maria Julia Manso Alves e Luiz Claudio Miletto, do Departamento de Bioquímica do IQ-USP pela oportunidade de iniciação científica em seu laboratório e por todo o conhecimento e experiência obtidos nesse período.
- Às minhas amigas Camilla Mota Mendes, Estela Rodriguez de Souza, Erika Nakajima, Luana Melo Lopes e Patrícia Placona Diniz, por todo o muito que me ensinaram, por tantos favores prestados e por toda a amizade e companheirismo durante o período de mestrado.

- À minha amiga Roberta Rodrigues de Carvalho, pela amizade, esforço, dedicação e capricho na realização de nossos experimentos.
- À minha amiga Tatiana Rodrigues Fraga, pelo auxílio nessa dissertação, pela amizade, por todos os favores e informações trazidos e pelo modelo de verdadeira organização e interesse pelo trabalho.
- A tantos amigos do Centro de Biotecnologia, pelo auxílio direto ou indireto, pelo apoio e pela amizade.
- À Dona Luisa, Arleide e Sueli, pela realização de todos os trabalhos tão necessários no laboratório.
- À bibliotecária Maria José de Jesus Carvalho, do ICB-USP, pela orientação na normalização e correção das referências.
- À minha prima Ângela Tiemi Tanamachi, pelo apoio material e emocional.
- Às agências financiadoras FAPESP, Fundação Butantan, Fundap, CNPq, que apoiaram financeiramente no desenvolvimento deste e de outros projetos do laboratório.
- Aos meus pais, pelo apoio e suporte pessoal, que ultimamente possibilitaram que eu realizasse esses estudos.

RESUMO

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

A hemofilia A é a coagulopatia mais freqüente em humanos, caracterizada por deficiência ou ausência de atividade do fator VIII (FVIII). Seu tratamento é feito com a reposição do fator obtido por purificação a partir de plasma ou como proteína recombinante, resultante de engenharia genética. O método tradicional para purificação de FVIII de plasma baseia-se em crioprecipitação e fracionamento por precipitação alcoólica. No Instituto Butantan foi proposto o desenvolvimento de métodos alternativos de purificação, utilizando cromatografias, visando melhorar a eficiência e diminuir os custos de produção. Este projeto teve por objetivo comparar dois métodos cromatográficos de purificação do FVIII: 1 - gel filtração direta do plasma (método validado) e 2 - pré purificação de FVIII de plasma por cromatografia de troca iônica, seguida de gel filtração. A cromatografia de troca iônica concentraria o FVIII na fração de pré-purificação e permitiria a utilização de coluna de gel filtração menor. Foram testadas as resinas de troca aniônica Q-Sepharose FF, Q-Sepharose XL, Q-Sepharose Big Beads e ANX-Sepharose, e as resinas de gel filtração Sepharose 4FF, Sepharose 6FF e Sephacryl S-200. Frações de cromatografias foram testadas quanto a atividade específica de FVIII, recuperação e fator de purificação. Os resultados mostraram que o FVIII pode ser purificado nas resinas de troca aniônica utilizadas, mas ocorre co-eluição com fatores de coagulação IX e X e provavelmente outros fatores dependentes de vitamina K. Também foi evidenciado que a eluição do FVIII da resina de troca iônica, feita por aumento da concentração de NaCl, induz redução da massa molecular dos complexos protéicos que contêm o FVIII. Levantou-se a hipótese que multímeros de fator de von Willebrand (FvW) ligados a FVIII eram dissociados pelo sal. A hipótese foi testada por "western blot" usando eletroforese de proteínas em gel de agarose e anticorpos anti-FvW. A resina Sepharose 4FF, usada em gel filtração de plasma, separa o FVIII das proteínas de menor massa molecular. Porém, com a redução dos complexos protéicos de FVIII na fração obtida da cromatografia de troca iônica, a gel filtração nesta resina não foi eficiente para separar o FVIII das proteínas menores. A substituição da resina

Sepharose 4FF pela resina Sepharose 6FF resultou em melhor separação. Além dos ensaios de purificação de FVIII, foram feitas clonagens de fragmentos do gene de FVIII para expressão de fragmentos protéicos para produção de anticorpos policlonais. Os soros policlonais foram utilizados em ensaios de "western blot" para avaliar sua capacidade de detecção de FVIII nas frações de cromatografia. Anticorpos monoclonais anti-FVIII são comercializados, mas de difícil acesso e caros. Os anticorpos produzidos no laboratório seriam usados para avaliar a purificação e integridade de FVIII durante os processos de purificação. Os fragmentos gênicos de parte de cada domínio de FVIII foram clonados em vetores de expressão pAE e pAEsox, e os fragmentos protéicos expressos em *Escherichia coli* foram usados na imunização de camundongos. Os resultados de "western blot" indicam que os soros obtidos reconhecem as cadeias leve e pesada de FVIII.

Palavras-chave: Purificação de proteínas do plasma. Fator VIII de coagulação. Biofármacos derivados de plasma. Cromatografia de proteínas. Hemofilia. Produção de fator VIII.

ABSTRACT

JINZENJI, D. **Process development for human factor VIII purification by chromatography. The use of specific antibodies against fragments of the protein for evaluation of purity and stability during purification.** 194 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The Haemophilia A is the most frequent human coagulopathy, characterized by deficiency or absence of factor VIII (FVIII) activity. The treatment consists on the reposition of FVIII purified from plasma or recombinant FVIII, obtained by genetic engineering. Traditionally, FVIII from plasma is purified by cryoprecipitation and fractionation by alcoholic precipitation. At the Instituto Butantan, an alternative methodology was proposed for FVIII purification using only chromatography, targeting process improvement and decreasing on production costs. The main objective of this project was to compare two chromatographic methods for FVIII purification: 1 - direct plasma gel filtration (validated method) and 2 - pre-purification of FVIII from plasma by anion exchange chromatography, followed by gel filtration. Anion exchange chromatography would concentrate FVIII in the pre-purification step, allowing the use of a smaller gel filtration column. We tested the anion exchange resins Q-Sepharose FF, Q-Sepharose XL, Q-Sepharose Big Beads and ANX-Sepharose and the gel filtration resins Sepharose 4FF, Sepharose 6FF and Sephacryl S-200. Chromatographic fractions were analyzed by determination of FVIII specific activity, percentage of recuperation and purification factor. Results showed FVIII can be purified by anion exchange chromatography, but with the co-elution of coagulation factors IX, X and, probably, other vitamin-K dependent factors. It was also shown that FVIII elution from anion exchange resins, made by increasing NaCl concentration, leads to reduction of the molecular mass of the FVIII-containing protein complexes. It was hypothesized that multimers of von Willebrand factor (FvW) bound to FVIII were being dissociated by salt. The hypothesis was tested by western blot using electrophoresis of proteins in agarose gel and anti-FvW antibodies. Sepharose 4FF resin, used for plasma direct gel filtration, separates FVIII from the lower molecular mass proteins. However, with the reduction of FVIII protein complexes in anion exchange chromatography, gel filtration in Sepharose 4FF resin was not able to separate FVIII from smaller proteins. Substitution of Sepharose 4FF by Sepharose 6FF resulted in improvement of the separation. Besides FVIII

purification assays, fragments of FVIII gene were cloned to express the fragments of the protein for animal immunization and for polyclonal antibody production. Sera with polyclonal antibodies anti-FVIII were used in western blot assays to evaluate the quality of FVIII detection in chromatographic fractions. Monoclonal antibodies anti-FVIII are commercially available, but it is difficult to purchase, moreover expensive. Antibodies produced in laboratory would be used to evaluate purity and stability of FVIII during purification processes. Fragments of FVIII related to each domain of the protein were cloned into pAE and pAEsox expression vectors. Protein fragments expressed in *Escherichia coli* were used for mice immunization. Western blot results indicated that the anti-sera prepared in the laboratory recognized the light and heavy chain of FVIII.

Key words: Plasma proteins purification. Coagulation factor VIII. Biopharmaceuticals plasma derivative. Chromatography of proteins. Haemophilia. Factor VIII production.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- (a) após o fator de coagulação: fator ativado
- Abs.: absorbância
- Abs_{280nm}: absorbância a 280 nm
- aa: aminoácidos
- Ativ. esp.: atividade específica
- b: bases
- BSA: albumina sérica bovina
- CL: fragmento cadeia leve de FVIII
- CP: fragmento cadeia pesada de FVIII (sem domínio B)
- DB: fragmento domínio B de FVIII
- DO₆₀₀: densidade óptica a 600 nm
- fCL: fragmento reduzido de cadeia leve de FVIII
- fCP: fragmento reduzido de cadeia pesada de FVIII (sem domínio B)
- fDB: fragmento reduzido de domínio B de FVIII
- FL: fosfolipídio
- FT: fração “flow through” de cromatografia
- FVIII: fator VIII
- FvW: fator de von Willebrand
- kb: kilobase
- kDa: kilodalton
- mDa: megadalton
- MM: marcador moleculares
- nm: nanômetro
- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
- pb: pares de base
- PVDF: difluoreto de polivinilideno
- Q: amônio quaternário
- qsp: quantidade suficiente para
- Reeq.: fração de reequilíbrio de cromatografia
- SDS: dodecil sulfato de sódio
- TEMED: N,N,N',N' tetrametilenodiamina
- U: unidade de fator VIII
- UV: ultravioleta
- VC: volumes de coluna

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Hemoderivados no Brasil	15
1.1.1 Hemoderivados no Instituto Butantan	16
1.2 Hemofilia A	17
1.3 Mecanismos de coagulação sanguínea	19
1.4 Fator VIII	24
1.4.1 Biossíntese e estrutura do fator VIII	24
1.4.2 Ativação e inativação do FVIII	25
1.4.3 Associação do fator FVIII com o fator de Von Willebrand	27
1.5 Métodos cromatográficos	28
1.5.1 Cromatografias por gel filtração	29
1.5.2 Cromatografias de troca iônica	29
1.5.3 Processos de purificação de hemoderivados por precipitação fracionada	29
1.5.4 Processos de purificação de hemoderivados por cromatografia	30
1.5.5 Purificação de fator VIII por cromatografia	31
1.5.6 Resinas para troca iônica e para gel filtração utilizadas neste trabalho	32
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Métodos analíticos	35
4.1.1 Determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford	35
4.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	35
4.1.3 Eletroforese de proteínas em gel de agarose	36
4.1.4 Análise das frações protéicas por "western blot"	36
4.1.5 Coloração de proteínas em gel de poliacrilamida com prata	38
4.1.6 Determinação de reatividade de soro policlonal por ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay")	38
4.1.7 Determinação da atividade de FVIII pelo método cromogênico	39
4.1.8 Determinação da atividade de FVIII pelo método de um estágio de coagulação modificado	40
4.2 Purificação de Fator VIII de coagulação por cromatografias de troca aniônica e de gel filtração a partir de plasma humano	41
4.2.1 Cromatógrafos e resinas cromatográficas	41
4.2.2 Preparo do plasma	41
4.2.3 Soluções utilizadas nas cromatografias	41
4.2.4 Regeneração e manutenção das resinas	42
4.2.5 Empacotamento das colunas de troca aniônica	42
4.2.6 Avaliação do empacotamento da coluna de troca iônica – teste com acetona	42
4.2.7 Cromatografia de troca aniônica – método geral	43
4.2.8 Determinação das condições de eluição de FVIII em resina de troca aniônica usando concentrações crescentes de NaCl	44
4.2.9 Aumento do volume de plasma aplicado em Q-Sepharose BB	44
4.2.10 Retorno de "flow through" (FT) para a coluna de Q-Sepharose FF	45
4.2.11 Concentração por ultrafiltração tangencial	45
4.2.12 Empacotamento das colunas de Sepharose 4FF e Sepharose 6FF	45
4.2.13 Avaliação do empacotamento da coluna de gel filtração – teste com azul de dextran e riboflavina	46
4.2.14 Determinação do volume de eluição de padrões de massa molecular na coluna de gel filtração Sepharose 4FF	46
4.2.15 Gel filtração em Sepharose 4FF e 6FF – método geral	46
4.2.16 Aumento do volume de plasma aplicado em Sepharose 4FF	47
4.2.17 Cromatografia de plasma contendo 500 mM NaCl em coluna de Sepharose 4FF	47
4.2.18 Cromatografia de Q300 em Sepharose 4FF	47
4.2.19 Gel filtração em Sephacryl S-200	47
4.3 Clonagem de fragmentos gênicos de FVIII para expressão de proteína recombinante, obtenção de anticorpos contra fragmentos de FVIII e análise das frações cromatográficas por "western blot"	48
4.3.1 Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose	48

4.3.2	Purificação de DNA em gel de agarose	48
4.3.3	Oligonucleotídeos utilizados	48
4.3.4	Amplificação de DNA por PCR (Polimerase Chain Reaction)	50
4.3.5	Seqüenciamento de DNA	50
4.3.6	Linhagens bacterianas utilizadas	51
4.3.7	Meios de cultura para bactérias	51
4.3.8	Preparação de bactérias competentes	52
4.3.9	Transformação de bactérias competentes por choque térmico	52
4.3.10	Vetores recombinantes utilizados	53
4.3.11	Clonagem dos fragmentos de DNA nos vetores pGemT-Easy, pAE e pAEsox	55
4.3.11.1	Clonagem em vetor pGemT-Easy	55
4.3.11.2	Clonagem em vetores pAE e pAEsox	55
4.3.12	Extração e purificação do DNA plasmidial	57
4.3.13	Método fenol:clorofórmio para análise de plasmídeos	57
4.3.14	Método de PCR de colônia para análise de plasmídeos	57
4.3.15	Expressão de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	58
4.3.16	Expressão de proteínas recombinantes em volume maior de cultura	59
4.3.17	Purificação de proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal	59
4.3.18	Purificação de proteína recombinante por eletroeluição	60
4.3.19	Imunização de camundongos com fragmentos protéicos de FVIII para obtenção de anticorpos policlonais	61
5	RESULTADOS	62
5.1	Purificação de Fator VIII de coagulação por cromatografias de troca aniônica e de gel filtração a partir de plasma humano	63
5.1.1	Cromatografia de plasma humano em resinas de troca aniônica	64
5.1.1.1	Avaliação do empacotamento das colunas de troca iônica – teste com acetona	64
5.1.1.2	Cromatografia de plasma humano em resina de troca iônica Q-Sepharose FF	66
5.1.1.3	Análise comparativa de cromatografias de plasma humano em resina de troca iônica Q-Sepharose FF	70
5.1.1.4	Análise da eluição de proteínas e de FVIII na cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF usando diversas concentrações de NaCl	72
5.1.1.5	Avaliação da capacidade de ligação de FVIII das resinas de troca iônica Q-Sepharose em cromatografia de plasma	75
5.1.1.5.1	Análise da perda de FVIII no FT da cromatografia de plasma em Q-Sepharose FF	76
5.1.1.5.2	Avaliação da capacidade da resina Q-Sepharose BB por aumento do volume de plasma aplicado	78
5.1.1.5.3	Cromatografia de plasma com retorno de FT para a coluna de Q-Sepharose FF	80
5.1.1.6	Avaliação das resinas de troca iônica Q-Sepharose FF, XL e BB para purificação de FVIII	82
5.1.1.7	Cromatografia de plasma em resina de troca iônica ANX-Sepharose 4FF	84
5.1.1.8	Deteção de fator IX e fator X nas frações das cromatografias de plasma nas resinas de troca iônica em Q-Sepharose FF, XL e BB	86
5.1.1.9	Deteção de fator de von Willebrand e fator V nas frações de cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF	88
5.1.2	Cromatografia de plasma ou de frações Q500 em resinas de gel filtração	90
5.1.2.1	Avaliação do empacotamento das colunas de gel filtração – teste com azul de dextran e riboflavina	90
5.1.2.2	Determinação da correlação entre volume de eluição e massa molecular de proteína eluída na coluna de gel filtração Sepharose 4FF	91
5.1.2.3	Gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF	92
5.1.2.4	Deteção de fator IX, fator X e fator de von Willebrand nas frações de gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF	95
5.1.2.5	Análise da capacidade de separação da resina Sepharose 4FF por aumento do volume de plasma aplicado	97
5.1.2.6	Gel filtração de frações Q500 obtidas das cromatografias de plasma em resinas de troca iônica em resina Sepharose 4FF	100
5.1.2.7	Deteção de fator IX, fator X e fator de von Willebrand nas frações de gel filtração de Q500 em Sepharose 4FF	106
5.1.2.8	Avaliação da eluição do complexo fator VIII/fator von Willebrand em gel filtração de plasma em Sepharose 4FF, em presença de 500 mM de NaCl	109
5.1.2.9	Gel filtração de Q300 em resina Sepharose 4FF	111
5.1.2.10	Gel filtração de plasma e de frações Q500 em resinas Sephacryl S-200 e Sepharose 6FF	114
5.1.2.10.1	Gel filtração de plasma em resina Sephacryl S-200	114
5.1.2.10.2	Gel filtração de Q500 em resina Sephacryl S-200	117

5.1.2.11 Detecção de fator X nas frações de gel filtração de plasma e de Q500 em resina Sephacryl S-200	120
5.1.2.12 Gel filtração de plasma em resina Sepharose 6FF	121
5.1.2.13 Gel filtração de Q500FF em resina Sepharose 6FF	123
5.1.2.14 Detecção de fator IX e fator X nas frações de gel filtração de plasma e de Q500 em resina Sepharose 6FF	127
5.1.2.15 Detecção de multímeros de fator de von Willebrand nas frações de gel filtração de plasma e de Q500 em resina Sepharose 4FF e 6FF por eletroforese em gel de agarose e "western blot"	128
 5.2 Clonagem de fragmentos gênicos de FVIII para expressão de proteína recombinante, obtenção de anticorpos contra fragmentos de FVIII e análise das frações cromatográficas por "western blot"	132
5.2.1 Amplificação e clonagem de fragmentos gênicos de FVIII	132
5.2.2 Expressão de fragmentos protéicos de FVIII	134
5.2.3 Clonagem de fragmentos gênicos reduzidos de FVIII	136
5.2.4 Expressão de fragmentos protéicos reduzidos de FVIII	137
5.2.5 Purificação de fragmento protéico fCL	140
5.2.6 Purificação de fragmento protéico fCP e fDB	141
5.2.7 Purificação de fragmento protéico fCP por eletroeluição	141
5.2.8 Imunização de camundongos com fragmentos protéicos de FVIII para obtenção de anticorpos policlonais e determinação da reatividade dos soros obtidos (por ELISA)	142
5.2.9 SDS-PAGE de amostras de FVIII comercial	144
5.2.10 "Western blot" utilizando soro com anticorpos contra cadeia leve (anti-fCL) produzido no laboratório	144
5.2.11 "Western blot" utilizando soro com anticorpos contra cadeia pesada (anti-fCP) produzido no laboratório	148
5.2.12 Comparação de "western blot" utilizando diversos anticorpos contra FVIII comercial	149
 6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	152
6.1 Purificação de Fator VIII de coagulação por cromatografias de troca aniônica e de gel filtração a partir de plasma humano	152
6.1.1 Cromatografia de plasma humano em resinas de troca aniônica	152
6.1.2 Gel filtração de plasma e Q500	156
6.1.3 Comparação gel filtração x troca iônica + concentração + gel filtração	160
6.1.4 Considerações finais e perspectivas	163
6.2 Clonagem de fragmentos gênicos de FVIII para expressão de proteína recombinante, obtenção de anticorpos contra fragmentos de FVIII e análise das frações cromatográficas por "western blot"	165
 REFERÊNCIAS	168
 ANEXOS	176

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemoderivados no Brasil

Dados do Ministério da Saúde de 2006 mostram que, no Brasil, foram coletadas aproximadamente 3,1 milhões de doações de sangue nos serviços de hemoterapia públicos ou contratados pelo Sistema Único de Saúde – SUS.

Os componentes celulares do sangue (hemácias e plaquetas) são utilizados quase integralmente em transfusões, enquanto o plasma separado tem indicações de uso terapêutico restritas. Cerca de 500.000 litros de plasma são armazenados por ano no Brasil, a um custo de aproximadamente R\$ 200,00/L, sendo a maior parte desse plasma descartada ao final do período de validade. O valor do plasma fresco congelado, no mercado mundial, varia de US\$ 70 a 120 dólares/L.

A partir do plasma armazenado, o Brasil produz somente albumina, ainda assim em quantidade insuficiente para atender o consumo nacional. Os demais biofármacos derivados de plasma, como os concentrados de fatores da coagulação, são importados pelo Ministério da Saúde.

O Brasil importa mais de 400 milhões de dólares por ano em hemoderivados, mas precisaria ainda mais para atender as reais necessidades clínicas, mostrando ser essencial o aproveitamento do plasma disponível. O Ministério da Saúde, ao comprar hemoderivados de empresas estrangeiras, paga pelo plasma e pelo processamento, ao mesmo tempo em que descarta o plasma internamente.

Considerando os 6.881 pacientes de Hemofilia A cadastrados em 2007 (Cadastro Nacional de Portadores de Coagulopatias Hereditárias/MS) e o quantitativo estimado de 40.000 UI de fator/ano/paciente, o Brasil necessitaria de aproximadamente 270 milhões unidades de fator VIII por ano, a um custo atual aproximado de 80 milhões de dólares por ano (esse valor varia de 5 a 10% em cada compra). Para suprir as necessidades internas do país, o Ministério da Saúde vem adquirindo os concentrados de fatores da coagulação para distribuição aos Estados, com aumento progressivo na quantidade e na variedade de produtos.

Existe orçamento previsto para a aquisição de fatores de coagulação pelo Ministério da Saúde, mas há dificuldades de coordenação das compras e consumo, que devem seguir a legislação e política nacional, muitas vezes resultando em atrasos e falta dos medicamentos para atendimento dos pacientes (MAC DOWELL-SOARES, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

1.1.1 Hemoderivados no Instituto Butantan

O Instituto Butantan possui ampla experiência tecnológica de geração de produtos protéicos (incluindo soros hiperimunes) e diferentes vacinas (contra difteria, tétano, Pertussis, BCG e recombinante contra hepatite). Iniciou o projeto em hemoderivados com o desenvolvimento de processos de purificação de proteínas com a utilização do sangue retido em placentas. Foram isoladas proteínas como albumina, imunoglobulina, catalase, fosfatase alcalina, entre outras (GONÇALVES *et al.*, 1999; CABRERA-CRESPO *et al.*, 2000; GRELLET *et al.*, 2001). Em paralelo, foram desenvolvidos processos de purificação de fator VIII de coagulação a partir de plasma suíno utilizando cromatografia (TANAKA, 1996; LORTHIOIS, 2002), confirmando a possibilidade de uso de resinas de troca iônica nesta separação.

Atualmente, foi instalada no Instituto Butantan uma planta piloto para a produção de hemoderivados, e outra de maior escala está em construção pelo governo de São Paulo, com investimentos de cerca de R\$ 60 milhões. A fábrica terá 10.000 m² de área construída e processará 150 mil litros de plasma por ano. O Instituto propôs a construção de uma planta moderna para produção dos biofármacos derivados de plasma, utilizando processos cromatográficos ao invés da tecnologia clássica de Cohn e dispensando etapas de manipulação do plasma gelado e as muitas etapas de centrifugação. A purificação deverá ser complementada com processos de remoção viral, como previsto na legislação. Considerando-se o alto valor de mercado dos hemoderivados, observa-se que o investimento na planta será logo recuperado. Além de albumina, imunoglobulinas e fatores de coagulação, há a possibilidade de produção de imunoglobulinas específicas e outras proteínas de interesse terapêutico, como a proteína C e a α_1 -antitripsina.

Um processo inteiramente cromatográfico para purificação de fator VIII, IX, albumina e IgG em grande escala (~1000 L plasma por processo) foi validado e está sendo comercializado pela GE Healthcare. O processo utiliza como primeira etapa de purificação a gel filtração do plasma. Embora exija colunas grandes e grandes volumes de resinas, ainda é um procedimento mais barato e com melhor rendimento que o processo de separação de crioprecipitado (RAW *et al.*, 2007).

Novas metodologias vêm sendo desenvolvidas, a fim de permitir a aquisição de processos, tecnologia e equipamentos. Um dos projetos em desenvolvimento,

descrito aqui, destina-se à purificação de fator VIII de coagulação sanguínea a partir de plasma humano, empregando cromatografia em resina de troca iônica em substituição à resina de gel filtração. Este processo resulta em concentração do fator VIII, permitindo a utilização de uma coluna de gel filtração menor na etapa seguinte de purificação, partindo-se do mesmo volume inicial de plasma. Mesmo com a adição de uma etapa cromatográfica, é previsto a diminuição do tempo total do processo, já que a duração da eluição em colunas de gel filtração é bastante longa em comparação com o tempo gasto em colunas de troca iônica. Além disso, há previsão de diminuição no custo total das resinas, pois resinas de troca iônica são mais baratas e apresentam maior resistência a tratamentos de limpeza e sanitização. Estas diferenças se tornam ainda mais significativas quando o processo é escalonado para produção.

1.2 Hemofilia A

A hemofilia, documentada como uma tendência familiar ao sangramento desde o século V, persiste ainda hoje como a desordem hemorrágica humana mais comumente encontrada (ROSNER, 1968). Foi associada à deficiência de um componente plasmático desde 1938, quando Patek e Taylor (1938) mostraram que o defeito de coagulação de um plasma hemofílico poderia ser corrigido com o plasma de um indivíduo normal. Este componente foi chamado “fator anti-hemofílico” ou “fator VIII” (FVIII), de acordo com a nomenclatura mais recente (LENTING *et al.*, 1998). A ausência ou deficiência de atividade do FVIII causa a chamada hemofilia A.

A hemofilia A é uma anomalia recessiva, causada por mutações no gene do fator VIII (FAY, 2004). A taxa de incidência de hemofilia de 1/5.000 a 1/10.000 homens, podendo atingir entre 6 a 12 mil pessoas no Brasil.

A hemofilia A pode ser classificada em três níveis de severidade, de acordo com a concentração plasmática do FVIII e da frequência dos episódios hemorrágicos: grave (menos que 1% de atividade de FVIII), com a média de um episódio de sangramento por semana; moderada (1% a 5% de atividade de FVIII), com a média de um episódio de um sangramento por mês e leve (5% a 30% de atividade de FVIII), com menos de um episódio de sangramento por mês (NILSSON, 1994).

Os hemofílicos têm episódios de sangramento prolongados após traumas e cirurgias, podendo ser muito graves e até fatais, especialmente naqueles com hemofilia grave. Tais pacientes freqüentemente apresentam hemorragias espontâneas (sem relação com trauma), as quais começam a se manifestar já no primeiro ano de vida. As partes do corpo mais afetadas são as articulações, os músculos, o trato gastrointestinal e o sistema nervoso central (COTRAN *et al.*, 2001).

A expectativa de vida dos portadores de hemofilia, décadas atrás, era inferior a 20 anos. Entre 1950 e 1972, surgiram os primeiros tratamentos para a hemofilia. Tais tratamentos eram à base de transfusão de sangue total de um paciente sadio para um hemofílico. Posteriormente, apenas o plasma fresco era administrado; contudo o volume a ser transfundido era muito grande.

Atualmente, o tratamento da hemofilia A se baseia na reposição do fator da coagulação deficiente (concentrados de FVIII em diferentes graus de purificação), obtido principalmente a partir de plasma humano (ANDERSON *et al.*, 1986; BLOOM, 1991).

O custo de purificação de fator VIII humano é elevado, por causa de sua baixa concentração no plasma, de cerca de 150 ng/mL, além de o fator ser uma proteína muito lábil (FURIE e FURIE, 1988).

Na década de 80, muitos pacientes hemofílicos foram contaminados com os vírus HIV, hepatite e sífilis. A partir disso, os órgãos reguladores passaram a exigir que todos os hemoderivados sofressem pelo menos dois tratamentos para desinfecção viral, além dos testes do plasma a ser utilizado como matéria prima. Ultimamente, a possibilidade de transmissão de príons, proteínas modificadas causadoras de doenças neurodegenerativas, trouxe nova preocupação com a contaminação de hemoderivados (FARRUGIA, 2002).

Além de concentrados de fator VIII humano, apresentados em diferentes graus de pureza, e do fator VIII suíno, existem produtores de fator VIII recombinante. A obtenção de fatores de coagulação recombinantes nos últimos 20 anos foi motivada pelo problema de infecções virais em produtos hemoderivados (KAUFMAN, 1990; LEE, 1999). Recentemente, tem se estudado a terapia gênica para o tratamento da hemofilia (PIPE, 2004).

A comparação entre os custos de tratamento entre a proteína recombinante e os concentrados plasmáticos mostrou que os produtos recombinantes são muito caros e inacessíveis aos países em desenvolvimento (HOOTS, 2001; SRIVASTAVA, 2001).

Com a entrada dos produtos recombinantes no mercado, houve a suposição que a diminuição do uso de fator VIII e fator IX derivados do plasma em países desenvolvidos iria aumentar a disponibilidade de produtos para os países em desenvolvimento. Entretanto, isso pode não ser economicamente viável; mais que isso, a mudança para produtos recombinantes pode inviabilizar a aquisição dos produtos derivados de plasma, que não teriam mais o preço subsidiado pelos altos valores pagos pelos países desenvolvidos. Portanto, torna-se importante o desenvolvimento de novas tecnologias de processamento e inativação viral, que garantam o uso seguro do plasma local disponível pelos países em desenvolvimento (BURNOUNF, 2007).

1.3 Mecanismos de coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea é um sistema de defesa do organismo que auxilia na manutenção da integridade do sistema circulatório de mamíferos. A cascata é um fenômeno complexo que envolve vários fatores (Tabela 1.1), desde a sinalização por um dano vascular até a formação de fibrina e a aglutinação de plaquetas, formando o coágulo (FURIE e FURIE, 1988; DAHLBÄCK, 2000).

No desencadeamento do processo de coagulação induzido seja pela via intrínseca ou extrínseca (dano tecidual), pro-enzimas plasmáticas são convertidas em suas formas enzimáticas por proteólise limitada (Figura 1.1). Essas glicoproteínas, incluindo os fatores XII, XI, IX, X, VII e protrombina, são seqüencialmente ativadas de zimogênios a serina-proteases. Entretanto, a maioria destas enzimas são efetivas apenas quando formando complexos em associação a cofatores (como os cofatores V e VIII) em superfícies de membranas. Íons Ca^{2+} são importantes em muitas reações do processo de coagulação, quer seja para enzimas que são dependentes de cálcio ou para interação das proteínas com as superfícies de membranas.

Tabela 1.1 Dados relativos às proteínas envolvidas na cascata de coagulação

Componente	Massa molecular	Característica	mg/mL plasma	Função
Protrombina	72.000	Serina protease/ PDVK* procoagulante	100	Zimogênio de protease
Fator X	56.000	Serina protease/ PDVK* procoagulante	10	Zimogênio de protease
Fator IX	56.000	Serina protease/ PDVK* procoagulante	5	Zimogênio de protease
Fator VII	50.000	Serina protease/ PDVK* procoagulante	0,5	Zimogênio de protease
Fator VIII	330.000	Procoagulante	0,15	Cofator
Fator V	330.000	Procoagulante	10	Cofator
Fator XI	160.000	Serina protease	5	Zimogênio de protease
Fator XII	80.000	Serina protease	30	Zimogênio de protease
Fibrinogênio	340.000	Procoagulante	3000	Estrutural
Proteína C	62.000	Serina protease / PDVK* regulador anticoagulante	4	Zimogênio de protease
Proteína S	80.000	PDVK* / regulador anticoagulante	25	Cofator
von Willebrand	225.000 x n	Estabilização de FVIII/ Agregador	10	Adesão plaquetária
Fator tissular (TF)	37.000	Procoagulante	0	Cofator/iniciador

Fonte: Furie e Furie, 1988

*PDVK: proteína dependente de vitamina K.

O coágulo se forma pela conversão pela trombina de fibrinogênio à fibrina, e esta formando polímeros. O coágulo formado pela lesão no tecido é composto de plaquetas ativadas e fibrina. Após a cicatrização do tecido, o coágulo é gradualmente dissolvido pelo sistema fibrinolítico.

A coagulação sanguínea pode ser iniciada através da via intrínseca, onde todos os componentes estão presentes no sangue, ou através da via extrínseca, onde a proteína de membrana fator tissular funciona como iniciadora. As vias convergem para um ponto comum, o complexo fator Xa/fator Va. A iniciação da via intrínseca envolve a ativação do fator XII, uma reação promovida por superfícies carregadas negativamente (como o colágeno exposto no subendotélio após dano vascular). O fator XIIa, com o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) como cofator, converte o fator XI em sua forma ativa. Na presença de Ca^{2+} , o fator XIa

ativa o fator IX. O fator IXa, em complexo com o fator VIIIa em superfície de membranas, catalisa a ativação de fator X. O fator Xa ativa a protrombina à trombina na presença de Ca^{2+} e fator Va em superfície de membranas. A trombina enfim converte o fibrinogênio à fibrina.

A iniciação da coagulação sangüínea associada com injúria vascular envolve a expressão de fator tissular na superfície de células danificadas. O fator tissular inicia a via extrínseca pela participação como cofator na ativação do fator VII à sua forma ativa. O complexo VIIa-fator tissular ativa o fator X e IX na presença de Ca^{2+} . Fator Xa ativa a protrombina à trombina, e a trombina converte o fibrinogênio à fibrina (FURIE e FURIE, 1988).

Figura 1.1 Vias intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação sangüínea.

Atualmente, é proposto o modelo celular de coagulação, em que a hemostasia ocorre como um processo em etapas, regulado por componentes celulares "in vivo" (Figura 1.2). O processo se inicia com a exposição ou ativação de fator tissular subendotelial, que ocorre como consequência de dano da parede vascular ou ativação do endotélio por produtos químicos, citocinas ou processos inflamatórios. O fator tissular se liga à serina protease fator VIIa, presente no sangue em pequenas quantidades, formando o complexo fator tissular/fator VII ativado, que ativa os zimogênios fator IX e fator X. A pequena quantidade de fator Xa produzido gera concentrações picomolares de trombina, que ativa parcialmente as plaquetas e cliva os procofatores fator V e fator VIII. O fator VIIIa, junto com o fator IXa, forma o complexo fator Xase intrínseco na superfície de membrana de plaquetas, micropartículas e células endoteliais e ativa o fator X a uma taxa de 50 a 100 vezes maior que o do complexo fator tissular/fator VII ativado. O fator Xa forma o complexo protrombinase com o fator Va em superfícies de membrana, que é o principal ativador da protrombina. A trombina produzida amplifica ainda mais sua própria geração pela ativação de fator XI e a ativação completa de plaquetas e fator V e VIII. A trombina então cliva o fibrinogênio e ativa o fator XIII para formar o coágulo insolúvel de fibrina.

Os fatores VIII e V, cofatores em passos intermediários da cascata, podem funcionar na regulação da taxa de ativação da coagulação sanguínea. Este efeito é mediado pelas proteínas C e S, anticoagulantes plasmáticos. A proteína C é convertida em sua forma ativa em membranas de células endoteliais pelo complexo trombomodulina-trombina. A proteína C ativada, junto com a proteína S em membranas celulares, converte o fator Va e VIIIa às suas formas inativas por proteólise limitada. O processo coagulante é ainda atenuado por vários inibidores, que inativam serinas proteases ou cofatores. A antitrombina III parece ser a mais importante quantitativamente, neutralizando todas as serina proteases de coagulação (BUTENAS e MANN, 2002; HOFFMAN e MONROE, 2007).

1.4 Fator VIII

1.4.1 Biossíntese e estrutura do fator VIII

O fator VIII de coagulação (FVIII) funciona como cofator do fator IX ativado, na ativação do fator X pela via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea (WANG *et al.*, 2003). Seu tamanho grande, sua concentração muito baixa no plasma e sua instabilidade durante a purificação dificultou por muito tempo o estudo de sua bioquímica. Somente em 1984 o isolamento de seu cDNA permitiu a predição de sua estrutura primária (FURIE e FURIE, 1988).

O gene do fator VIII humano, com 180 kb, é um dos maiores genes conhecidos, ocupando quase 0,1% do cromossomo X. Consiste em 26 exons, com tamanhos entre 69 a 3106 pb e introns de até 32,4 kb (GITSCHIER *et al.*, 1984).

A proteína é codificada a partir de um RNA mensageiro de cerca de 9 kb. É traduzida como uma cadeia polipeptídica única com 2351 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 19 aminoácidos. A proteína madura contém 2332 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 265 kDa (Figura 1.3). Considerando os potenciais sítios de glicosilação, esta massa pode se aproximar a 330 kDa, observada em SDS-PAGE em condições não redutoras (WOOD *et al.*, 1984).

O fator VIII possui três tipos distintos de domínios estruturais; uma triplicata de domínios A, com 330 aminoácidos; uma região singular com 980 aminoácidos (domínio B) e uma região carboxi-terminal com 150 aminoácidos, que se repete duas vezes (domínios C), distribuídos na ordem A1 – A2 – B – A3 – C1 – C2 (VEHAR, 1984). O FVIII contém principalmente estruturas de folha- β . Uma pequena quantidade de α -hélices são encontradas nos domínios A (WANG *et al.*, 2003)

Os domínios A possuem homologia de aproximadamente 30% entre si e significativa homologia à ceruloplasmina (proteína plasmática carreadora de cobre). Os domínios A são limitados por espaçadores curtos (a1, a2 e a3) que contém regiões ricas em resíduos de ácidos aspártico e glutâmico, as “regiões ácidas”.

O domínio B não apresenta homologia com nenhuma estrutura conhecida. É uma região rica em carboidratos e sua função parece estar relacionada com a secreção da proteína fator VIII. Esta subunidade é altamente glicosilada e representa 50% da massa de fator VIII.

Os dois domínios C1 e C2 são homólogos à lectina discoidina I e à região ligante de lipídios da aglutinina da ameba *Dictyostelium discoideum*. A subunidade C2 apresenta sítio de ligação para fosfolipídios (LOLLAR *et al.*, 1993).

O RNA mensageiro de FVIII pode ser encontrado em vários tecidos, como pulmão e baço, mas estudos indicam o fígado como sendo a fonte principal de FVIII. Dentro do fígado, os hepatócitos parecem ser as células que mais produzem FVIII. Finalmente, dentro dos hepatócitos, o FVIII foi detectado no retículo endoplasmático rugoso e no complexo de Golgi. Dentro do retículo endoplasmático, o FVIII sofre N-glicosilações, que, no complexo de Golgi, são transformadas em O-glicosilações, estruturas do tipo complexa e sulfatação de resíduos de tirosina específicos.

O FVIII sofre ainda uma proteólise intracelular, que quebra a ligação covalente entre a cadeia pesada (A1–a1–A2–a2–B) e a cadeia leve (a3–A3–C1–C2), resultando na molécula heterodimérica que circula no plasma. As cadeias leve e pesada se mantêm ligadas não covalentemente através dos domínios A1 e A3, em uma ligação dependente de íons metálicos (WANG *et al.*, 2003).

1.4.2 Ativação e inativação do FVIII

O FVIII apresenta atividade de cofator mínima antes da sua ativação proteolítica pela trombina ou pelo fator Xa, com máxima ativação induzida por trombina de 40 a 80 vezes. O FVIIIa se liga ao fator IXa em proporção 1:1, através de múltiplos sítios de interação em A2 e A3. FVIIIa, fator IXa, íons cálcio e fosfolipídeos formam o complexo FXase.

A trombina cliva o FVIII em um sítio específico da cadeia leve na posição Arg1689 e na cadeia pesada nas posições Arg372 e Arg740. As clivagens nas posições Arg372 e Arg1689 são essenciais para a atividade da proteína. Contudo, a clivagem na posição Arg740 entre os domínios A2 e B não contribui para geração de atividade (LOLLAR *et al.*, 1993). O fator VIII ativado pela trombina é um heterotrímero FVIII_{A1/A2/A3-C1-C2} com massa molecular estimada de 180kDa, com cadeia pesada de cerca de 90kDa e cadeia leve de 73kDa (Figura 1.3). De modo similar à trombina, o FXa cliva o FVIII nas posições Arg372, Arg740 e Arg1689. Contudo, também há clivagem na posição Arg336, a qual é o mesmo sítio de ligação para PCa. O FVIII ativado pelo FXa é um heterotrímero com massa molecular

semelhante ao FVIII ativado pela trombina, diferindo apenas na massa molecular da cadeia leve, sendo esta de cerca de 67kDa (FAY, 1999; WANG, 2003).

A inativação do fator VIII compreende duas vias distintas: a degradação proteolítica e a dissociação espontânea. Uma vez ativado, a atividade do fator VIII é rapidamente perdida (LOLLAR *et al.*, 1993). A instabilidade intrínseca do FVIIIa pode ser atribuída à fraca interação entre o domínio A2 e o dímero A1-A3-C1-C2. A degradação proteolítica do fator VIIIa envolve clivagens na cadeia pesada nas posições 336 e 562 as quais podem ser efetuadas pelos fatores IXa, Xa e PCa. Tanto o FVIII quanto o FVIII ativado pela trombina podem ser substratos da PCa, a qual tem sua atividade aumentada pelo cofator S. A inativação do FVIIIa pela PCa necessita da presença de superfície de fosfolipídios e de íons Ca^{2+} (O'BRIEN *et al.*, 2000). Os sítios de clivagem para inativação do fator VIII são as posições Arg336, Arg562 e Arg740 na cadeia pesada, e Arg1689 na cadeia leve. A clivagem na posição Arg562 geralmente precede a clivagem na posição Arg336, e está mais relacionada com a perda de atividade (O'BRIEN *et al.*, 2000).

Figura 1.3 Estrutura, função e processamento de FVIII. Os sites de interação com outros fatores de coagulação, FvW, fosfolípidos (PL) e íons metálicos (M^{2+}) estão ilustrados nos círculos tracejados (WANG *et al.*, 2003).

1.4.3 Associação do fator FVIII com o fator de Von Willebrand

O FvW é uma glicoproteína adesiva plasmática sintetizada pelas células endoteliais e megacariócitos (KAUFMAN, 1990). Ele possui um papel crucial na aderência das plaquetas ao sub-endotélio de vasos lesados, processo este que depende de muitas proteínas adesivas tais como fibronectina, laminina e trombospondina (VLOT *et al.*, 1998). Além de funções adesivas, o FvW atua como estabilizante do FVIII. A deficiência do fator de von Willebrand determina sintomas semelhantes à hemofilia.

Imediatamente após sua liberação para a circulação, o heterodímero de FVIII interage com o fator de Von Willebrand, para formar um forte complexo não covalente. Cada monômero do multímero de fator Von Willebrand é capaz de se

ligar a uma molécula de FVIII com alta afinidade. Duas ligações peptídicas estão implicadas na ligação do FVIII ao FvW: uma na região amino-terminal e outra na região carboxi-terminal da cadeia leve do FVIII. Aparentemente, as duas regiões agem sinergisticamente na ligação (LENTING *et al.*, 1998). Outras moléculas de von Willebrand se ligam ao complexo VIII-vW formando multímeros que podem atingir até 20 MDa (KAUFMAN e PIPE, 1999).

Através da interação não-covalente entre as duas proteínas, o FVIII é impedido de se ligar a superfícies de membranas e é protegido de ataques proteolíticos de diversas serina-proteases (RUGGERI, 1999). A afinidade de FVIII pelo FvW é aproximadamente 100 vezes maior que a afinidade por fator IXa, prevenindo a sua ligação prematura ao complexo FXase. O mecanismo de inibição não é conhecido, pois os sítios de ligação desses fatores se apresentam em diferentes partes da molécula (LENTING *et al.*, 1998).

1.4 Métodos cromatográficos

A cromatografia é baseada na separação de solutos do solvente, através da diferença de migração produzida pela interação entre duas fases, a móvel, que pode ser líquida ou gasosa, e a fase estacionária (resina) (COLLINS, 1988). A disponibilidade de grande variedade de resinas comerciais permite a separação de solutos (proteínas, neste estudo) muito específicos, segundo suas características de massa e carga.

Os métodos cromatográficos se apresentam como ferramentas essenciais na extração de componentes biológicos em escala laboratorial. Estes métodos oferecem alta especificidade e seletividade, permitindo a recuperação de compostos biológicos com pureza adequada e sob condições que mantêm suas características biológicas.

Na escala industrial, a cromatografia tem sido utilizada na produção de agentes terapêuticos, como glicoproteínas e proteínas recombinantes (JAGSCHIES, 1984; BURNOUF, 1995).

1.5.1 Cromatografias por gel filtração

Uma das características mais marcantes das proteínas é seu tamanho elevado, o que torna possível a aplicação de métodos simples para a separação de proteínas de moléculas menores, bem como de métodos para separar misturas de proteínas de tamanhos distintos. Na cromatografia de exclusão molecular (ou gel filtração), as moléculas sofrem partição em virtude das diferenças no tamanho das espécies, entre um solvente e a fase estacionária de porosidade definida. Pode ser empregada de duas maneiras: na separação de grupos, com a separação dos componentes em duas populações principais, de acordo com sua faixa de tamanho; ou no fracionamento de alta resolução, com a separação dos componentes de acordo com as diferenças em sua massa molar (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

1.5.2 Cromatografias de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é comumente utilizada para purificar proteínas, pois, em comparação com outros métodos de purificação, é simples, de fácil ampliação de escala, alta resolução, alta capacidade de adsorção e versátil. Seu princípio básico é a competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da matriz (fase estacionária). São utilizados grupos trocadores iônicos carregados positiva (trocadores aniônicos) ou negativamente (trocadores catiônicos), classificados como fortes (se mantêm ionizados em ampla faixa de pH) ou fracos (possuem faixa de pH de operação mais estreita). As proteínas possuem tanto uma carga líquida positiva quanto negativa, dependendo do pH do meio e de seu ponto isoelétrico. A escolha do trocador iônico depende da estabilidade da proteína em função do pH (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

1.5.3 Processos de purificação de hemoderivados por precipitação fracionada

O fracionamento do plasma iniciou-se com o desenvolvimento do método de COHN, em 1946. É, ainda hoje, o método principal para purificação de proteínas do plasma humano, e baseia-se na precipitação fracionada do plasma com diferentes concentrações de sais e etanol. As proteínas de maior interesse são albumina, imunoglobulinas e fatores de coagulação. As frações protéicas são mais estáveis, podendo ser mantidas a baixa temperatura por tempo muito maior que o plasma

total. Os precipitados de diferentes etapas são separados por centrifugação e as proteínas de interesse, presentes nos sobrenadantes ou nos precipitados, seguem sendo fracionadas na linha de purificação.

As vantagens deste método incluem sua simplicidade, baixa toxicidade, efeito bacteriostático e inativação/eliminação do HIV. Contudo, há desvantagens significativas tais como a baixa especificidade na purificação de proteínas em baixa concentração plasmática e efeitos desnaturantes do etanol e do baixo pH frente a proteínas lábeis, como os fatores da coagulação (BURNOUF, 1995).

O sangue usualmente é coletado em anticoagulante citrato a pH 7 e o plasma separado da fração celular por centrifugação e imediatamente congelado. O passo inicial da purificação é a separação do crioprecipitado, com o descongelamento do plasma a 2-4 °C restando uma fração ainda sólida, que concentra o fator VIII de coagulação e é retirada por centrifugação (ARRIGHI *et al.*, 1993; TANAKA *et al.*, 1998; ROCK, 1990). Esta é uma etapa cara, pois exige manipulação do plasma em sala gelada e centrifugação contínua de grande volume, além de implicar em grande perda de proteína e de atividade.

1.5.4 Processos de purificação de hemoderivados por cromatografia

A cromatografia tem sido utilizada na extração de derivados de plasma desde o início dos anos 70 e conseguiu larga aceitação nos anos 80, demonstrando benefícios como o aumento de pureza e segurança, especialmente para os fatores de coagulação e inibidores de protease.

O plasma humano é um material biológico complexo, constituído de mais de 100 proteínas, presentes em concentrações muito diferentes com funções fisiológicas muito diversas. Do conteúdo protéico total de 60 g/L, as proteínas mais abundantes são: a albumina (~45 g/L), as imunoglobulinas G (~8 a 11 g/L) e o fibrinogênio (2 a 3 g/L). Os fatores de coagulação, como fatores IX, X e VII e fator de Von Willebrand estão presentes na concentração de 5 a 10 mg/L, enquanto que o FVIII está presente em concentração <1 mg/L. O custo / benefício do fracionamento de plasma poderia ser aumentado com métodos cromatográficos de purificação mais efetivos, desenhados para aumentar rendimentos e extrair novos produtos. Além disso, em países em desenvolvimento, a implementação de esquemas de fracionamento por cromatografia é frequentemente considerado como sendo mais

fácil, mais flexível e menos custoso que as tecnologias baseadas na extração com etanol (BURNOUNF, 1995).

1.5.5 Purificação de fator VIII por cromatografia

A purificação de FVIII por cromatografia apresenta dificuldades pelo risco potencial de ativação e a instabilidade na presença de proteases plasmáticas co-eluindo como o FVIII.

Métodos combinando a crioprecipitação tradicional com a cromatografia apresentam resultados satisfatórios. A purificação de FVIII de crioprecipitado por cromatografia em troca iônica foi realizada por Arrighi *et al.* (1993), Burnouf *et al.* (1991), entre outros; purificação por cromatografia de afinidade com anticorpos murinos foi obtida por Weinstein (1989).

A purificação direta de FVIII plasmático por cromatografia de troca iônica foi obtida por Teh e Froger (1994), com a utilização de tratamento prévio com DEAE-Sephadex A50. Te Booy *et al.* (1989, 1990), construíram matrizes sintéticas de afinidade para a captura de FVIII.

A cromatografia de imunoafinidade, apesar de eficiente, apresenta a desvantagem de ser cara e apresentar a instabilidade dos anticorpos ligantes. Recentemente, foram desenvolvidos ligantes peptideomiméticos para a purificação de FVIII (KNOR *et al.*, 2007), que eliminam estas dificuldades.

A purificação do fator VIII com a aplicação direta do plasma pode ser realizada ainda pelo método de gel filtração (KAERSGAARD e BARINGTON, 1998; BARINGTON e KAERSGAARD, 1999). Este método foi escalonado e validado para a produção de FVIII e está sendo utilizado neste trabalho para comparação com o método proposto.

1.5.6 Resinas para troca iônica e para gel filtração utilizadas neste trabalho

Quatro tipos de resinas de troca aniônica foram utilizadas nos estudos: Q-Sepharose Fast Flow (FF), Q-Sepharose XL, Q-Sepharose Big Beads (BB) e ANX-Sepharose 4FF.

As resinas Q-Sepharose têm características de trocadoras aniônicas fortes e matriz de agarose 'cross-linked' 6%. As capacidades de fluxo linear dessas resinas são 400 a 700 cm/h para FF, 300 a 500 cm/h para a XL e 1200 a 1800 cm/h para a BB. A utilização de fluxo linear alto promoveria processos mais rápidos, especialmente interessantes para produtos sujeitos a perdas por proteólise. A resina Q-Sepharose XL possui cadeias de dextran acopladas à matriz de agarose; a resina Q-Sepharose BB tem tamanho de partícula maior (100 a 300 μm , enquanto a FF e XL possuem 45 a 165 μm), o que facilitaria a purificação inicial de produtos com alta viscosidade.

A resina ANX-Sepharose 4FF (high sub) ANX-Sepharose 4FF (high sub) é uma trocadora aniônica fraca, com grupos amino terciário (grupos dietilaminopropil) ligados a uma matriz de agarose "cross-linked" 4% (Sepharose 4FF). A distribuição de poros dessa resina foi otimizada para a separação de proteínas de tamanho grande, que aumenta a capacidade de ligação enquanto separa moléculas maiores. A capacidade de fluxo linear dessa resina é de 300 a 500 cm/h.

Três tipos de resinas de gel filtração foram utilizadas nos estudos: Sepharose 4FF, Sepharose 6FF e Sephacryl S-200. As Sepharose 4FF e 6FF são meios de gel filtração baseados em matriz de agarose 'cross-linked' a 4 e 6%, respectivamente, e foram desenvolvidas para atender a processos de separação industrial com grandes volumes. A resina Sepharose 6FF é usada para separação de proteínas na faixa de peso molecular 1×10^4 e 4×10^6 kDa. A resina Sepharose 4FF separa proteínas na faixa de peso molecular 6×10^4 e 2×10^7 kDa. A resina Sephacryl S-200, um copolímero de alila-dextran e metileno-bisacrilamina, é usada na separação de proteínas na faixa de peso molecular 5 a 250 kDa, sendo normalmente utilizada na purificação de anticorpos, proteínas do soro e proteínas de tamanho médio (GE HEALTHCARE - Chromatography on-line support).

2 JUSTIFICATIVA

A demanda de hemoderivados no país, o número de doações de sangue e a quantidade de plasma de boa qualidade armazenado, requerem o estabelecimento de fabricas de produção desses biofármacos. A obtenção do conhecimento de novas tecnologias de purificação de proteínas e a formação de recursos humanos nessa área, fortemente justificam projetos de desenvolvimento de processos para obtenção de hemoderivados. Nesse contexto, a produção de fator VIII de coagulação, como uma proteína de difícil purificação e com alta demanda para aplicação clinica, constitui-se em importante desafio.

3 OBJETIVOS

Este trabalho está inserido na série de estudos de purificação de hemoderivados e de fator VIII de coagulação iniciados anteriormente no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

Os objetivos particulares deste trabalho foram:

1. Desenvolvimento de processos de purificação de fator VIII (FVIII) de coagulação por cromatografias de troca iônica e gel filtração a partir de plasma humano, comparação deste método com a gel filtração direta de plasma e análise da distribuição de fatores de coagulação nas frações das cromatografias;
2. Clonagem de fragmentos gênicos de FVIII e expressão e purificação dos fragmentos protéicos recombinantes, tendo como finalidade a produção de anticorpos em camundongos e utilização destes anticorpos em “western blot” para detecção de FVIII.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Métodos analíticos

4.1.1 Determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford

A determinação de concentração de proteína foi realizada conforme método de Bradford (1976) adaptado, utilizando-se solução de BSA (2 mg/mL) como padrão. A curva de calibração foi construída com massas de BSA variando de 0 a 25 µg.

A determinação de proteína total foi realizada com a adição de 800 µL de reagente de Bradford a 200 µL de solução de BSA ou amostra diluídas em NaCl 0,9%. A absorbância da mistura foi lida a 595 nm; a massa de proteína das amostras foi obtida com o auxílio da curva de calibração.

4.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os géis de eletroforese em poliacrilamida foram preparados conforme Laemmli (1970) e Sambrook *et al.* (1989), utilizando-se solução estoque de acrilamida 30% (acrilamida 29% (p/v), N,N'-metilenobisacrilamida 1% (p/v)), tampão do gel de empilhamento (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,1% (p/v)) ou tampão do gel de separação (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,1% (p/v)), persulfato de amônio 10% (p/v) e TEMED. Os géis de empilhamento foram feitos com concentração de 5% e os géis de separação foram feitos com concentrações entre 4 e 20% (em gradiente ou homogêneos) e espessura entre 0,75 e 1,5 mm. As corridas foram realizadas em tampão de eletroforese (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v)), sob voltagem de 120 V, à temperatura ambiente. Os géis foram corados utilizando-se corante de Coomassie Blue (ácido acético glacial 10%, etanol 45%, azul de Coomassie R250 0,25%) ou por tratamento com prata ou transferidos para membrana de PVDF.

Em eletroforeses em condições redutoras, foi utilizado tampão de amostra 5x com agente redutor (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1% (p/v), glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β-mercaptoetanol 100 mM) e aquecimento da amostra à 96°C por 10 minutos. Em eletroforeses em condições não redutoras, o tampão não continha agente redutor (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1% (p/v), glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v)) e a amostra foi aplicada sem aquecimento. Géis em condições não-redutoras foram usados na maioria dos ensaios de “western blot”.

Os padrões de massa molecular usados foram o Unstained Protein Molecular Weight Marker, PageRuler Unstained Protein Ladder e PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Burlington, ON, Canada).

4.1.3 Eletroforese de proteínas em gel de agarose

A preparação dos géis de eletroforese de proteína em agarose foi adaptada de Krizek e Rick (2000), derretendo-se agarose 0,8% (p/v) em tampão de eletroforese (Tris-acetato 40 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, SDS 0,1% (p/v)). As corridas foram realizadas sob corrente inicial de 30 mA (30 minutos) seguida por corrente de 50-70 mA (3,5 a 5,5 horas), em banho de gelo, até que a frente de corante atingisse a extremidade do gel.

As amostras foram pré-tratadas em tampão de amostra 10x (Na_2HPO_4 100 mM pH 7, iodoacetamida 370 mM, SDS 10% (p/v)) e incubadas a 37 °C por 60 minutos. Após incubação, foi adicionado 1:10 volume de solução de glicerol 50% (v/v) com azul de bromofenol 1% (p/v). 10 μL da mistura foram aplicados no gel. Os géis foram corados utilizando-se corante de Coomassie Blue ou transferidos para membrana de PVDF.

4.1.4 Análise das frações protéicas por “western blot”

Os experimentos de “western blot” foram realizados conforme Towbin (1979) (SDS-PAGE) e Krizek e Rick (2000) (agarose).

Após separação das proteínas das amostras por SDS-PAGE, a transferência para membrana de PVDF foi realizada em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM, metanol ou etanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v)), sob corrente de 350-400 mA, por 2,5 a 4 horas, em banho de gelo.

Após separação das proteínas das amostras por eletroforese em gel de agarose, a transferência para membrana de PVDF foi realizada em tampão de transferência diluído (Tris-HCl 2,5 mM pH 8,8, glicina 19,2 mM, etanol 20% (v/v), SDS 0,01% (p/v)), sob corrente de 70 mA, por 15 horas, em banho de gelo.

Após a transferência, as membranas foram lavadas em tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% (v/v)) e coradas com solução de Ponceau (Ponceau S 0,003% (p/v), ácido acético glacial 10% (v/v)) ou Memcode

(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) para avaliação da eficiência e registro de transferência. Após a retirada do corante, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio (leite desnatado ou BSA 5% (p/v) em TBS-T), por pelo menos 2 horas à temperatura ambiente, ou “overnight” a 4 °C. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio, em tempo e temperatura adequados. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho conjugado com enzima peroxidase) diluído em tampão de bloqueio, por pelo menos 2 horas, à temperatura ambiente.

As membranas foram lavadas com TBS-T e as bandas reveladas na presença de substrato DAB (3,3 diaminobenzidina 0,05% (p/v), água oxigenada 0,03% (v/v), em tampão PBS ou TBS) ou de substrato quimioluminescente (luminol, SuperSignal West Pico, Pierce) e exposição da membrana a um filme fotográfico.

Os anticorpos primários utilizados foram:

- Anticorpos monoclonais anti Fator IX humano (Clone HIX-1), anti Fator X humano (Clone HX-1) e anti Fator V humano (Clone HV-1), produzidos em camundongo (Sigma, Saint Louis, MO, EUA)
- Anticorpo anti Fator de von Willebrand humano produzido em coelho (Sigma)
- Anticorpo monoclonal anti Cadeia leve de Fator VIII humano (MAB 38), produzido em camundongo (Chemicon, Billerica, MA, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti Cadeia pesada de Fator VIII humano (GTX26345), produzido em camundongo (Genetex, San Antonio, TX, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti Cadeia leve de Fator VIII humano (GTX408377), produzido em camundongo (Genetex)
- Anticorpo policlonal anti fragmento CL, produzido em camundongo, obtido no laboratório
- Anticorpo policlonal anti fragmento CP, produzido em camundongo, obtido no laboratório

Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase utilizados foram:

- Anticorpo anti-IgG de camundongo (ImmunoPure), produzido em coelho (Pierce)
- Anticorpo anti-IgG de coelho, produzido em cabra (Sigma)

4.1.5 Coloração de proteínas em gel de poliacrilamida com prata

Para a coloração com nitrato de prata, após a eletroforese, os géis foram imersos em solução fixadora (etanol 6,25 mL, ácido acético 1,5 mL, formaldeído 37% 6,25 µL, água MilliRiOs qsp 12,5 mL), lavados com solução de lavagem (etanol 25 mL, água MilliRiOs 25 mL) e tratados com solução de tiosulfato de sódio (tiosulfato de sódio 0,01 g, água MilliRiOs 50 mL). Após lavagem com água MilliRiOs, os géis foram incubados com solução corante (nitrato de prata 0,05 g, formaldeído 37% 18,75 µL, água MilliRiOs qsp 25 mL), lavados com água e revelados com solução reveladora (carbonato de sódio 1,5 g, formaldeído 37% 12,5 µL, solução tiosulfato de sódio 0,5 mL, água MilliRiOs qsp 25 mL). A reação foi interrompida com a adição de solução stop (etanol 2,5 mL, ácido acético 600 µL, água MilliRiOs 19 mL).

4.1.6 Determinação de reatividade de soro policlonal por ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)

Os experimentos de ELISA foram realizados conforme protocolo de Ausubel (1990). As placas foram sensibilizadas com proteína diluída em tampão carbonato (bicarbonato de sódio 0,05 M, carbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6) ou PBS (KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM) em concentração 500 ng/100µL/poço, e incubação por 16 horas, a 4 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com água MilliRiOs ou PBS-T (PBS, Tween 20 0,01% (v/v)) e bloqueadas com tampão de bloqueio (leite desnatado ou BSA 10% (p/v) em tampão PBS-T) por pelo menos 2 horas a 37 °C. Após o bloqueio, o soro dos animais imunizados foi aplicado em diluições seriadas em tampão de bloqueio. As placas foram incubadas por pelo menos 2 horas a 37 °C e lavadas 3 vezes. Após as lavagens, o anticorpo secundário (anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase) foi aplicado em concentração 1:5000 (v/v) em tampão de bloqueio. As placas foram incubadas por pelo menos 2 horas a 37 °C e lavadas 3 vezes.

A reação foi desenvolvida com a adição de solução de revelação (ortofenilenodiamina (1,2 benzenodiamina) 0,04% (p/v), água oxigenada 0,015% (v/v), em tampão citrato 0,1 M / fosfato de sódio 0,2 M, pH 5,0). A reação foi interrompida com ácido forte (H₂SO₄ 4,5 M ou HCl 3 M). A intensidade da coloração foi medida em leitor de microplaca em comprimento de onda 492 nm. O branco da reação foi um poço com todos reagentes, exceto soro dos animais imunizados.

4.1.7 Determinação da atividade de FVIII pelo método cromogênico

A dosagem de atividade do FVIII foi realizada pelo método cromogênico, utilizando-se os reagentes do kit Coatest Factor VIII® e Coatest SP₄ FVIII® (Chromogenix, Lexington, MA, EUA). Neste ensaio, o fator X é ativado pelo fator IXa na presença de cálcio e fosfolípideo. Esta ativação é potencializada pelo FVIII, cofator desta reação. Utilizando-se quantidades ótimas de cálcio, fosfolípeos e excesso dos fatores IXa e X, a taxa de ativação do fator X depende exclusivamente da quantidade de FVIII. O fator Xa promove a hidrólise do substrato cromogênico (Coatest Factor VIII - S-2222 e Coatest SP₄ FVIII - S-2765) com conseqüente liberação do grupo cromofórico p-nitroanilida (pNa), cujo máximo de absorbância é 405 nm (Figura 4.1). O substrato cromogênico também pode ser hidrolisado pela trombina, o que é prevenido por adição de inibidor sintético de trombina (I-2581).

Figura 4.1 Reações envolvidas na determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

O ensaio foi realizado em microplacas. Foram adicionados 25 µL de amostra a 50 µL de solução com fosfolípideo, FIXa e FX, seguidos por 25 µL de CaCl₂ 25 mM e 50 µL de solução com o substrato cromogênico e o inibidor de trombina. Após cada adição, os componentes foram homogeneizados e incubados em estufa a 37°C por 5 minutos. Ao fim da última incubação, foram adicionados 25 µL de ácido acético 20% para que a reação fosse interrompida. A absorbância das amostras foi lida a 405 nm e 492 nm (“branco” de placa) em leitor de microplacas.

Não temos disponibilidade de padrões universais de calibração de atividade de FVIII. Por esse motivo, a curva de calibração foi construída a partir do “pool” de plasma inicial, utilizando diferentes diluições. A amostra não diluída é considerada como 100% de atividade de FVIII. Substituindo-se os valores de absorbâncias (A^{405} - A^{492}) das amostras na equação da reta da curva de calibração, foram obtidas as % de atividade de FVIII correspondentes. Considerando 100 Unidades de FVIII por mL de amostra inicial, obteve-se que 100% atividade = 100 U/mL.

4.1.8 Determinação da atividade de FVIII pelo método de um estágio de coagulação modificado

A dosagem de atividade do FVIII foi realizada pelo método de um estágio de coagulação modificado (LOLLAR *et al.*, 1993), medindo o tempo de coagulação com auxílio do coagulômetro (Ral[®], modelo clot-1a). Neste ensaio, o processo de coagulação é desencadeado pela via intrínseca, com a utilização de plasma deficiente em FVIII, ácido elágico, cefalina e íons cálcio, além da amostra a ser testada. O ácido elágico fornece as cargas negativas necessárias para a ativação do FVIII, a cefalina ativada substitui a superfície fosfolipídica e os íons cálcio são necessários em diversas reações da via intrínseca da coagulação.

Foram misturados 80 µL de uma solução contendo cefalina ativada e ácido elágico (Dade Behring, Marburg, Alemanha), 80 µL de plasma deficiente em FVIII (Dade Behring) e 10 µL de amostra em cubeta de plástico e mantidos a 37°C, por 3 minutos. Em seguida, foi adicionados 80 µL de CaCl₂ 25 mM, previamente aquecido a 37 °C, para o desencadeamento do processo de coagulação.

Para cada ensaio foi construída uma curva de calibração (log tempo x log % atividade) com o “pool” de plasma inicial. Substituindo-se os valores do log tempo médio das amostras na equação da reta encontrou-se o log % atividade correspondente. Considerou-se 100 unidades (U) de FVIII a concentração do fator em 1 mL de plasma humano normal, citratado e congelado imediatamente após a coleta.

4.2 Purificação de Fator VIII de coagulação por cromatografias de troca aniônica e de gel filtração a partir de plasma humano

4.2.1 Cromatógrafos e resinas cromatográficas

Os cromatógrafos utilizados foram o ÄKTA Explorer® e Biopilot® (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), controlados por software Unicorn V.3.1. Os ensaios foram acompanhados nos cromatógrafos por absorbância em ultravioleta (280 nm), condutividade e pH.

As resinas usadas para a cromatografia de troca iônica foram Q-Sepharose Fast Flow (FF), Q-Sepharose XL e Q-Sepharose Big Beads (BB) e ANX-Sepharose 4FF. As resinas usadas para a cromatografia de gel filtração foram Sepharose 4 Fast Flow (4FF), Sepharose 6 Fast Flow (6FF) e Sephacryl S-200. Todas as resinas são produzidas pela GE Healthcare.

4.2.2 Preparo do plasma

O plasma humano fresco congelado foi cedido pelo Hemocentro de Ribeirão Preto em bolsas individuais com volume aproximado de 200 mL de plasma. A coleta do sangue foi realizada na presença de tampão CPDA-1 (pH aproximado de 7,5). As bolsas fornecidas foram aprovadas nos testes sorológicos e identificadas com o tipo sangüíneo, lote da bolsa e validade do plasma.

Para as cromatografias, as bolsas de plasma foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, reunidas em “pool”, e o pH foi ajustado para 6,0 com ácido cítrico 250 mM.

4.2.3 Soluções utilizadas nas cromatografias

As soluções utilizadas nas cromatografias foram:

- Tampão de equilíbrio: tampão citrato 25 mM, pH 6,0, CaCl₂ 5 mM, NaCl 85 mM
- Tampão citrato com 150 a 1000 mM NaCl: tampão citrato 25 mM pH 6,0, CaCl₂ 5 mM, NaCl 150 a 1000 mM
- NaOH 0,1, 0,2, 0,5 e 1,0 M
- NaCl 1,0 e 2,0 M

4.2.4 Regeneração e manutenção das resinas

As colunas de troca iônica, após as cromatografias, foram lavadas com NaCl 2,0 M, NaOH 0,5 a 1,0 M e mantidas em NaOH 0,2 M. Nos experimentos em que foram feitas duas corridas no mesmo dia, este procedimento de limpeza foi feito somente após a última corrida. Entre os experimentos, as colunas foram lavadas com NaCl 1,0 M e reequilibradas com tampão de equilíbrio.

As colunas de gel filtração, após as cromatografias, foram lavadas com NaOH 0,5 M e mantidas em NaOH 0,2 M.

4.2.5 Empacotamento das colunas de troca aniônica

As resinas Q-Sepharose (100 mL) foram empacotadas em coluna XK50 (GE Healthcare) com cerca de 5 cm de altura. A resina ANX Sepharose (72 mL) foi empacotada em coluna XK 26 (GE Healthcare) com cerca de 13,5 cm de altura. O empacotamento foi realizado com fluxos 30% mais altos que os utilizados nas corridas: nas Q-Sepharoses, foi utilizado um fluxo linear de 22,3 cm/h (fluxo volumétrico de 40 mL/min); na ANX Sepharose, foi utilizado um fluxo linear de 678 cm/h (fluxo volumétrico de 60 mL/min). Após a sedimentação da resina, as colunas foram compactadas com pelo menos 5 volumes de coluna (VC) de água. A eficiência do empacotamento foi verificada com o teste com acetona.

4.2.6 Avaliação do empacotamento da coluna de troca iônica – teste com acetona

A eficiência de empacotamento da coluna de troca aniônica foi medida em termos de altura equivalente de cada prato teórico (HEPT), número de pratos teóricos por metro de resina (N/m) e pelo fator de assimetria do pico (As). Esses dados são calculados através do cromatograma obtido com acetona. A Figura 4.2 ilustra os parâmetros medidos.

Figura 4.2 Exemplo de cromatograma utilizado na determinação da eficiência de empacotamento de uma coluna de troca iônica.

Valores considerados ideais para colunas de troca iônica seriam: assimetria 0,8 a 1,8 e a altura de um prato teórico deveria ser da ordem de 3 vezes o diâmetro médio dos “beads” da resina empacotada. Para a Q-Sepharose utilizada com “beads” de 90 μm , o HEPT ideal seria 0,018 a 0,027 cm.

Os testes em colunas XK50 foram realizados com a aplicação de 1,5 mL de acetona 1% (v/v) às colunas em fluxo linear de 30,6 cm/h (10 mL/min) e eluição com água ou NaCl 0,9%.

4.2.7 Cromatografia de troca aniônica – método geral

O fluxo linear utilizado nas cromatografias em Q-Sepharose foi de 91,7 cm/h (30 mL/min). O fluxo linear utilizado nas cromatografias em ANX-Sepharose foi de 170 cm/h (15 mL/min) (entrada de amostra) e 226 cm/h (20 mL/min) (entrada de tampões). As colunas foram equilibradas com 5 VC de tampão de equilíbrio e, em seqüência, foi aplicada a amostra (5 VC na Q-Sepharose de plasma com pH 6,0, 7 a 10 VC na ANX-Sepharose). A primeira lavagem foi feita com 5 a 10 VC de tampão de equilíbrio. A lavagem intermediária foi feita com 5 a 10 VC do tampão citrato contendo 200 ou 250 mM de NaCl. O FVIII foi eluído com 5 a 10 VC do tampão citrato contendo 500 mM de NaCl. As frações recolhidas foram denominadas “flow

through” - FT (fração contendo as proteínas que não se ligam à coluna), “reequilíbrio” – Reeq. (fração da primeira lavagem), “Q200” ou “Q250” (lavagem intermediária) e “Q500” (fração de eluição do produto). Conforme o propósito do experimento, houve necessidade de se variar este protocolo. Tais variações estão descritas com os experimentos.

As frações das purificações foram analisadas por determinação de concentração de proteínas nas frações (pelo método de Bradford), determinação de atividade de FVIII (pelo método cromogênico e/ou de um estágio de coagulação), perfil protéico por SDS-PAGE e presença dos fatores IX, X, Von Willebrand e V por “western blot”.

4.2.8 Determinação das condições de eluição de FVIII em resina de troca aniônica usando concentrações crescentes de NaCl

Foram realizados experimentos de cromatografia de plasma em resina de troca aniônica para a verificação do perfil de eluição de proteínas com o aumento da concentração de NaCl no tampão. O experimento representativo foi realizado com a utilização de resina Q-Sepharose FF (100 mL). O volume de plasma aplicado foi de 500 mL, com lavagem com 700 mL de tampão de equilíbrio e eluição com 200 mL de tampões citrato contendo 100 a 1000 mM de NaCl.

4.2.9 Aumento do volume de plasma aplicado em Q-Sepharose BB

Os experimentos foram realizados com a aplicação de 700 mL de plasma à coluna de 100 mL. O equilíbrio e as lavagens foram feitos de acordo com o método geral. A fração FT foi subdividida em fração inicial “FT1”, com 500 mL e frações “FT2”, “FT3”, “FT4” e “FT5”, com 50 mL cada fração. A fração Q500 foi subdividida em fração inicial “Q500A”, com 200 mL (contendo a maior parte das proteínas da fração), e fração final “Q500B”, com 300 mL.

4.2.10 Retorno de "flow through" (FT) para a coluna de Q-Sepharose FF

O experimento foi realizado com a reaplicação do FT à coluna ao fim de sua coleta (aplicação em "loop"). A lavagem foi feita de acordo com o método geral. A fração Q500 foi subdividida em fração inicial "Q500A", com 200 mL (contendo a maior parte das proteínas da fração), e fração final "Q500B", com 300 mL.

4.2.11 Concentração por ultrafiltração tangencial

O método empregado para a concentração de frações Q500 foi a ultrafiltração tangencial utilizando o equipamento Labscale[®] TFF System (Millipore, Billerica, MA, EUA). Foram utilizados três cassetes conjuntamente, para diminuir o tempo de concentração. Os cassetes utilizados foram do tipo Pellicon XL[®] com área de 50 cm² e corte nominal de 30 kDa.

O Q500 concentrado foi obtido através da concentração da fração Q500A (primeiros 200 mL da fração de eluição do FVIII) proveniente de duas corridas consecutivas, partindo-se de 500 mL de plasma em cada corrida. Após o equilíbrio dos cassetes com tampão, as frações sofreram processo de concentração a uma velocidade de filtração de 0,013 mL/min e pressão de entrada variando entre 20 a 30 psi, sob agitação. Para aumentar a recuperação da amostra, os cassetes foram lavados 3 vezes com 5 mL de tampão de equilíbrio após a concentração. O volume inicial de 400 mL foi concentrado até 85 mL (para cromatografia em Sepharose 4FF) ou 110 mL (para cromatografia em Sepharose 6FF).

4.2.12 Empacotamento das colunas de Sepharose 4FF e Sepharose 6FF

As resinas (330 mL de Sepharose 4FF e 380 mL de Sepharose 6FF) foram empacotadas em colunas XK26 (GE Healthcare) com cerca de 60 cm (Sepharose 4FF) e 72 cm (Sepharose 6FF) de altura. O empacotamento foi realizado com fluxo linear de 56,5 cm/h (5 mL/min). A coluna foi compactada com pelo menos 5 VC de água. A eficiência do empacotamento e determinação do "volume vazio" da coluna foi feito com a eluição de uma mistura de riboflavina e azul de dextran.

4.2.13 Avaliação do empacotamento da coluna de gel filtração – teste com azul de dextran e riboflavina

A homogeneidade da coluna de gel filtração foi avaliada através de inspeção visual durante a passagem pela resina de uma solução colorida. O teste foi realizado com a aplicação de 3 mL de uma solução de azul dextran (2000 kDa) 0,2% (p/v) e riboflavina (0,376 kDa) 0,05% (p/v) à coluna equilibrada com NaCl 0,9%, em fluxo linear de 29,4 cm/h (2,6 mL/min) e eluição com NaCl 0,9%, verificando-se a separação e eluição dos componentes da mistura. O volume vazio foi considerado o volume de eluição do azul dextran.

4.2.14 Determinação do volume de eluição de padrões de massa molecular na coluna de gel filtração Sepharose 4FF

Padrões com massas moleculares conhecidas (kit MW-GF-1000, Sigma) foram aplicados à coluna de gel filtração e seus volumes de eluição determinados. Os padrões aplicados foram: anidrase carbônica (29 kDa), albumina (66 kDa), beta-amilase (200 kDa) e tiroglobulina (669 kDa). Foram injetados 3 mL da solução de proteína em fluxo linear de 29,4 cm/h (2,6 mL/min), verificando-se o volume de eluição da proteína. Cada proteína foi aplicada e eluída separadamente para que não houvesse interferência e os volumes de eluição não fossem confundidos.

4.2.15 Gel filtração em Sepharose 4FF e 6FF – método geral

O fluxo linear utilizado nas corridas foi de 29,4 cm/h (2,6 mL/min). Após equilíbrio com 3 VC de tampão de equilíbrio, foram aplicados 75 mL (4FF) ou 95 mL (6FF) de amostra (plasma ou frações concentradas de Q500). A eluição foi realizada com 3 VC de tampão de equilíbrio. A coleta foi iniciada entre 30 e 75 mL após a injeção e as frações foram de 25 a 50 mL.

As frações das purificações foram analisadas por determinação de concentração de proteínas nas frações (pelo método de Bradford), determinação de atividade de FVIII (pelo método cromogênico e/ou de um estágio de coagulação), perfil protéico por SDS-PAGE e presença dos fatores IX, X, Von Willebrand e V por “western blot”.

4.2.16 Aumento do volume de plasma aplicado em Sepharose 4FF

O experimento foi realizado com a aplicação de 95 mL de plasma ao invés de 75 mL (Sepharose 4FF). A cromatografia foi realizada de acordo com o método padrão. A coleta foi iniciada com 75 mL após a injeção e as frações foram de 50 mL.

4.2.17 Cromatografia de plasma contendo 500 mM NaCl em coluna de Sepharose 4FF

A cromatografia foi realizada de acordo com o método padrão, com a aplicação de 75 mL de plasma ao qual foi adicionado 500 mM de NaCl. O equilíbrio e a eluição foram realizados com 3 VC de tampão citrato contendo 500 mM de NaCl. A coleta foi iniciada com 30 mL após a injeção e as frações foram de 30 mL.

4.2.18 Cromatografia de Q300 em Sepharose 4FF

O experimento foi realizado usando o Q300 obtido em coluna Q-Sepharose BB. A eluição do FVIII da resina de troca aniônica foi feita diretamente com 500 mL de tampão citrato contendo 300 mM de NaCl. Os primeiros 300 mL desta eluição foram concentrados até o volume de 85 mL, do qual 75 mL foram utilizados na cromatografia em Sepharose 4FF. O equilíbrio e a eluição foram realizados com 3 VC de tampão de equilíbrio. A coleta foi iniciada com 30 mL após a injeção e as frações foram de 30 mL.

4.2.19 Gel filtração em Sephacryl S-200

A coluna Sephacryl S-200 utilizada foi uma coluna de 320 mL, pré-empacotada, de 2,6 cm de diâmetro e 60 cm de altura. O fluxo linear utilizado nas corridas foi de 29,4 cm/h (2,6 mL/min). Após equilíbrio com 3 VC de tampão de equilíbrio, 13 mL de plasma ou Q500 concentrado foram aplicados à coluna. A eluição foi realizada com 2 VC do tampão de equilíbrio. A coleta foi iniciada com 13 mL após a injeção e as frações foram de 50 mL. No experimento com Q500 concentrado, as frações 3 e 4 foram subdivididas em frações de 25 mL.

4.3 Clonagem de fragmentos gênicos de FVIII para expressão de proteína recombinante, obtenção de anticorpos contra fragmentos de FVIII e análise das frações cromatográficas por "western blot"

4.3.1 Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose

Os géis de eletroforese em agarose foram preparados derretendo-se agarose (0,8 a 1% (p/v)) em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM), com a adição de solução de brometo de etídio (10 mg/mL) para concentração final de 0,4 µg/mL. As amostras foram aplicadas nos géis com a adição de solução de amostra 10x (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol FF 0,5% (p/v), glicerol 50% (v/v)). As corridas foram feitas em tampão TAE, sob voltagem de 60 a 80 V, até que a frente do corante atingisse a extremidade do gel. O DNA foi visualizado sob luz UV para análise ou excisão para purificação.

O padrão de massa molecular usado nos geis de agarose foi o GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

4.3.2 Purificação de DNA em gel de agarose

A mistura de reação (produto de PCR ou de digestão de plasmídeos) foi submetida a eletroforese em gel de agarose e a banda de interesse foi excisada para purificação. O DNA foi purificado com a solubilização da agarose e ligação a colunas de sílica, utilizando-se kits de purificação comerciais (Gibco ou Qiagen).

4.3.3 Oligonucleotídeos utilizados

Os oligonucleotídeos foram ressuspensos em água MilliQ para concentração final entre 3,2 a 10 µM. Os oligonucleotídeos utilizados nas amplificações de DNA e seqüenciamentos estão nas Tabelas 4.1 e 4.2:

Tabela 4.1 Oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento de plasmídeos pGem-T Easy, pAE e pAEsox

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' – 3'
M13F	GTT TTC CCA GTC ACG AC
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC
SP6	TAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
PrSetUp	CTT TGA GTG AGC TGA TAC CG
PrSetRev	ATG CTA GTT ATT GCT CAG CGGTGG
SoxMeio	CCG CTA CGT TTC GCA ACT TC

Tabela 4.2 Oligonucleotídeos com seqüência de FVIII utilizados nas amplificações de DNA e seqüenciamentos

Oligonucleotídeos	Posição cDNA FVIII	Seqüência 5' – 3' e sítios de restrição
Pesada F 1	171	<u>ctc gag</u> gcc acC ATG CAA ATA GAG CTC TCC AC Xho I
Pesada R 1	2444	<u>ccg cGG</u> TTC AAT GGC ATT GTT TTT ACT C Sac II
Domínio B F 1	2449	<u>ccg cgg</u> AGC TTC TCC CAG AAT TCA AGA C Sac II
Domínio B R 1	5176	TTT CCC GTT GAT GGC GTT TC
Domínio B F 2	2449	<u>ctc gag</u> AGC TTC TCC CAG AAT TCA AGA C Xho I
Domínio B R 2	5176	<u>cca tgg</u> TTT CCC GTT GAT GGC GTT TCA AG Nco I
Leve F 1	5167	CAA CGG GAA ATA ACT CGT ACT
Leve F 2	5167	<u>ctc gag</u> CAA CGG GAA ATA ACT CGT ACT AC Xho I
Leve R 2	7227	<u>cca tgg</u> TCA GTA GAG GTC CTG TGC CTC G Nco I

4.3.4 Amplificação de DNA por PCR (Polimerase Chain Reaction)

As reações de PCR foram realizadas em volume de 50 µL: 5 µL de tampão para PCR 10x, 2 a 5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,4 µL de mistura de dNTPs 25 mM (ou 1 µL, 10 mM), 0,5 a 1 µL de enzima DNA polimerase, 0,5 a 1 µL de DNA molde (cedido pelo Dr. Marcelo Brígido, Universidade de Brasília), 10 picomol de cada oligonucleotídeo (“forward” e “reverse”) e água MilliQ qsp 50 µL.

As reações foram realizadas utilizando-se termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc). As características dos ciclos foram otimizadas para cada produto. As fases 2 a 4 foram repetidos por 30 a 40 ciclos, dependendo do produto desejado. As fases de desnaturação, anelamento e amplificação do DNA estão na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Ciclos de amplificação de fragmentos de DNA por PCR

	Temperatura	Tempo
1. Desnaturação inicial	94 °C	2 minutos
2. Desnaturação	94 °C	30 segundos
3. Anelamento	55-58 °C	20 segundos
4. Amplificação	72-74 °C	3 minutos
5. Amplificação final	72-74 °C	3 minutos

4.3.5 Seqüenciamento de DNA

A análise da seqüência de DNA de plasmídeos recombinantes foi feita com a utilização do método de Didesoxi de Sanger (SAMBROOK *et al.*, 1989), adaptado para seqüenciador automático capilar ABI3100 (Perkin Elmer) disponível no Centro de Biotecnologia.

O seqüenciamento foi feito utilizando-se 150 ng de DNA plasmidial recombinante e 1,6 picomol de oligonucleotídeos. O seqüenciador utiliza o kit de BigDye Terminator (Perkin Elmer), segundo protocolo do fabricante.

Os fragmentos clonados em vetor pGEM-T-Easy foram seqüenciados com os oligonucleotídeos M13F, M13R e SP6; os fragmentos clonados em pAE foram seqüenciados com os oligonucleotídeos T7, PrSetRev e PrSetUp; os fragmentos clonados em pAEsox foram seqüenciados com os oligonucleotídeos T7, PrSetRev, PrSetUp e SoxMeio. No seqüenciamento dos fragmentos longos, também foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores e oligonucleotídeos internos de FVIII.

4.3.6 Linhagens bacterianas utilizadas

As linhagens de *Escherichia coli* usadas na clonagem de fragmentos de DNA e expressão de proteínas recombinantes estão na Tabela 4.4:

Tabela 4.4 Linhagens bacterianas utilizadas e características

Linhagem	Características
DH5- α	Para clonagem de fragmentos e amplificação de grande quantidade de plasmídeos. Permite seleção de clones positivos por colônias brancas / azuis quando transformadas com vetores com sistema LacZ e na presença de X-gal
BL21 (DE3) Star PlysS	Para expressão de proteínas recombinantes por indução com IPTG, do gene T7 RNA polimerase, a qual atua sobre promotor T7 que controla a expressão dos genes clonados. Clo ^R
BL21 (DE3) Codon Plus RP (Stratagene)	Semelhante à Star Plys. Possui plasmídeos com cópias extras de genes de tRNA para arginina e prolina.
BL21 (DE3) Rosetta (Novagen)	Semelhante à Star Plys. Possui plasmídeo pRARE com genes de tRNA para arginina, leucina, isoleucina, prolina e glicina.
BL21 TrxB (DE3)	Semelhante à Star Plys. Permite a formação de pontes dissulfeto no citoplasma da bactéria.
BL21 (DE3) c43	Semelhante à Star Plys, com maior controle na expressão. Usada para expressão de proteínas recombinantes tóxicas
BL21 SI	Para expressão de proteínas recombinantes com indução do gene T7 RNA polimerase por NaCl, sob controle de promotor proU.

4.3.7 Meios de cultura para bactérias

Os meios de cultura sem antibiótico foram esterilizados em autoclave a 121 °C, por 20 minutos. Os antibióticos foram esterilizados por filtração em membrana 0,22 μ m. A ampicilina foi utilizada em concentração final 0,01% (p/v) e o cloranfenicol foi utilizado em concentração final 0,003% (p/v).

- 2YT: triptona 1,6% (p/v), extrato de levedura 1,0% (p/v), NaCl 0,5% (p/v)
- 2YT-amp: meio 2YT com ampicilina
- 2YT-ágar: meio 2YT com ágar 1,5% (p/v)
- 2YT-ágar-amp meio 2YT-ágar com ampicilina
- 2YT-amp-clo: meio 2YT com ampicilina e cloranfenicol
- 2YT-ágar-amp-clo: meio 2YT-ágar com ampicilina e cloranfenicol
- 2YT-ON: triptona 1,6% (p/v), extrato de levedura 1,0% (p/v)
- LB: triptona 1,0% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1,0% (p/v)

4.3.8 Preparação de bactérias competentes

As bactérias *Escherichia coli* foram preparadas utilizando-se o método de competência por tratamento com cálcio, que induz um estado transiente de competência pela fragilização da parede das células, tornando-as competentes para transformação pelo método de choque térmico.

Uma colônia isolada de bactérias estriadas em placa 2YT-ágar foi inoculada em 2 mL de meio LB por 16 horas a 37 °C, sob agitação. O pré-inóculo foi transferido para 100 mL de meio LB e incubado por 2 a 3 horas a 37 °C, sob agitação, até que a DO₆₀₀ alcançasse 0,6. Neste momento, o inóculo foi resfriado em gelo e foram adicionados 4 mL de solução de MgCl₂ 1 M. Após 15 minutos, o inóculo foi centrifugado a 2700 rcf por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL de solução RF I (acetato de potássio 30 mM pH 5,8, CaCl₂ 10 mM, MnCl₄ 50 mM, KCl 100 mM, glicerol 15%) e novamente centrifugado a 2700 rcf por 15 minutos a 4 °C. A lavagem foi repetida 2 vezes. O precipitado de bactérias foi ressuspenso em 1 mL de solução RF II (MOPS 10 mM pH 6,8, CaCl₂ 75 mM, MgCl₂ 20 mM, KCl 10 mM, glicerol 15%), aliquoteado em frações de 50 µL e estocado a -80 °C.

4.3.9 Transformação de bactérias competentes por choque térmico

A técnica de transformação por choque térmico foi usada para introdução de plasmídeos em bactérias e sua manutenção como um elemento autônomo autoreplicativo. Clones contendo os plasmídeos foram selecionados pela característica de resistência à ampicilina.

Alíquotas de 50 µL de bactérias quimicamente competentes foram descongeladas em gelo por 10 minutos e após adição de 1 a 5 µL de plasmídeos, foram mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, foram submetidas a choque térmico à 42 °C por 2 minutos, seguido de banho de gelo por 5 minutos. Após adição de 450 µL de meio 2YT, a suspensão de bactérias foi mantida por 90 minutos a 37 °C, sob agitação. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio 2YT-ágar (contendo X-gal e/ou antibióticos) e incubadas por 16 horas a 37 °C.

4.3.10 Vetores recombinantes utilizados

Os vetores utilizados na clonagem de fragmentos de DNA e expressão de proteínas recombinantes estão na Tabela 4.5:

Tabela 4.5 Vetores de clonagem e de expressão utilizados e características

Vetores	Características
pGemT-Easy Vetor de clonagem (Promega)	Para clonagem por ligação A-T de produtos de PCR e transferência para outros vetores por digestão com enzimas de restrição. Possui pUC ori para amplificação em <i>E. coli</i> , amp ^R , <i>lacZ</i> .
pAE Vetor de expressão	pRSET (Invitrogen) modificado. Possui pUC ori <i>E. coli</i> , amp ^R , sítio RBS, código de iniciação seguido de código para 6 histidinas na posição N terminal e sítio de múltiplas clonagens. Indução de expressão com IPTG
pAEsox Vetor de expressão	Vetor pAE com inserção da sequência soxRpsoxS para indução de expressão com paraquat.

O vetor pGem-T Easy (Figura 4.3), com 3015 pb, possui origem de replicação (ori) que permite a propagação em bactérias e uma marca genética que confere resistência à ampicilina. Este vetor linear possui uma base T livre em cada extremidade, permitindo a clonagem do produto de PCR que sofreu adição de uma base A nas extremidades durante a reação de PCR, sem necessidade de digestão prévia do fragmento ou do vetor.

Figura 4.3 Vetor de clonagem pGemT-Easy com a descrição do sítio de múltiplas clonagens.

O vetor pAE (Figura 4.4) foi derivado do vetor pRSET (Invitrogen) e possui código de iniciação seguido de código para 6 histidinas, resultando na proteína recombinante híbrida com cauda de histidina na posição N terminal (RAMOS *et al.*, 2004). Este sistema possibilita a purificação da proteína recombinante através de coluna de afinidade a metal.

O vetor pAE foi modificado no laboratório (Figura 4.4) por inserção do sistema controlador do regulon “soxRS” (DEMPLE *et al.*, 1996), o gene *soxR* e promotor de *soxS*, de modo a controlar a expressão de genes de interesse por estresse oxidativo. O regulon “soxRS” é ativado por ânions superóxido e óxido nítrico e promove a expressão de várias proteínas relacionadas com a atividade antioxidante. O sensor desse regulon é a proteína *soxR* que, ativada, se liga ao promotor do gene *soxS*, induzindo forte transcrição. Este vetor (“pAEsox”) permite indução de expressão do gene de interesse “in vitro” por exposição das bactérias a paraquat, droga que promove o estresse oxidativo.

Figura 4.4 Vetores de expressão pAE e pAEsox com a descrição dos sítios de múltiplas clonagens.

4.3.11 Clonagem dos fragmentos de DNA nos vetores pGemT-Easy, pAE e pAEsox

4.3.11.1 Clonagem em vetor pGemT-Easy

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram clonados em vetor pGemT-Easy. As reações de ligação utilizaram 1 µL de T4 DNA Ligase, 5 µL de tampão Rapid Ligation 2x, 0,5 µL de pGemT-Easy linear, quantidade ótima de fragmento purificado e água MilliQ qsp 10 µL. A reação foi incubada por 16 horas a 4 °C. Foram utilizados 5 µL desta reação na transformação de bactérias competentes *Escherichia coli*, cepa DH5-α, pelo método de choque térmico. As bactérias foram plaqueadas em placas 2YT-amp-ágar com X-gal. As colônias resistentes à ampicilina foram selecionadas e incubadas em 3 mL de meio 2YT-amp, por 16 horas a 37 °C, sob agitação, e testadas pelo método de fenol:clorofórmio. Em caso de bactérias com plasmídeos fragmento-positivos, o plasmídeo foi extraído e purificado. A clonagem dos fragmentos foi confirmada por seqüenciamento. As colônias de interesse foram congeladas em glicerol 15% à -80 °C.

4.3.11.2 Clonagem em vetores pAE e pAEsox

Foram realizadas duas construções para cada cadeia de FVIII (pesada, domínio B e leve), uma com a clonagem do fragmento completo e outra com o fragmento reduzido. Os vetores pGemT-Easy foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas (Xho I / Pst I / Nco I / Hinc II / Pvu II) para a recuperação do fragmento de interesse. Os vetores pAE e pAEsox foram digeridos com as mesmas enzimas, para ligação nos respectivos sítios de restrição. A cadeia pesada teve sua construção completa reduzida com a digestão direta do vetor pAE/pAEsox com a enzima Hind III para retirada da parte final do fragmento e posterior religação do vetor. A Tabela 4.6 mostra os sítios de restrição utilizados na ligação de fragmentos de DNA de FVIII e vetores pAE e pAEsox

Tabela 4.6 Sítios de restrição utilizados na ligação de fragmentos de DNA de FVIII e vetores pAE e pAEsox

	Sítios de enzimas de restrição usados para os fragmentos	Sítios de enzimas de restrição usados para os vetores pAE e pAEsox
Cadeia Pesada	Xho I	Xho I
	Pst I (pGem-T)	Pst I
Domínio B	Xho I	Xho I
	Nco I	Nco I
Cadeia Leve	Xho I	Xho I
	Nco I	Nco I
Cadeia Pesada Reduzida	Hind III	Vetores pAEsox e pAEsox com cadeia pesada digeridos para remoção de fragmento
Domínio B Reduzida	Xho I	Xho I
	Hinc II (blunt)	Pvu II (blunt)
Cadeia Leve Reduzida	Xho I	Xho I
	Hinc II (blunt)	Pvu II (blunt)

Os fragmentos e vetores digeridos e purificados foram usados em reações de ligação. As reações de ligação utilizaram 1 µL de T4 DNA Ligase, 1 µL de Tampão T4 DNA Ligase 10x, quantidades ótimas de fragmento purificado e vetores pAE ou pAEsox e água MilliQ qsp 10 µL. A reação foi incubada por 1 hora a 25 °C, 3 horas a 22 °C ou 16 horas a 15 °C (dependendo da enzima e do fragmento). Foram utilizados 5 µL desta reação na transformação de bactérias competentes *Escherichia coli*, cepa DH5-α, pelo método de choque térmico. As colônias foram plaqueadas em placas 2YT-amp-clo-ágar. As colônias resistentes à ampicilina e cloranfenicol foram selecionadas e incubadas em 2YT-amp-clo por 16 horas à 37 °C, sob agitação, e testadas pelo método de fenol:clorofórmio. Em caso de bactérias com plasmídeos fragmento-positivos, o plasmídeo foi extraído e purificado. A clonagem dos fragmentos foi confirmada por seqüenciamento. As colônias de interesse foram congeladas em glicerol 15% à -80 °C.

4.3.12 Extração e purificação do DNA plasmidial

As colônias bacterianas transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT-amp por 16 horas a 37 °C, sob agitação. Para a extração de DNA plasmidial foram utilizados kits de purificação de plasmídeos (Promega, Qiagen ou GE-Amersham), baseados no método de lise com solução de SDS-alcalina, precipitação de macromoléculas com potássio (K-SDS) e purificação em coluna de Sephadex.

4.3.13 Método fenol:clorofórmio para análise de plasmídeos

O método de fenol:clorofórmio (BEUKEN e BRUGGEMAN, 1998) foi usado para verificar a presença e o tamanho de fragmentos clonados em plasmídeos diretamente de culturas de bactérias.

As colônias em análise e uma colônia com vetor vazio (controle negativo) foram inoculadas em 2 mL de meio 2YT-amp e incubadas por 16 horas a 37 °C, sob agitação. Uma alíquota de 500-700 µL foi retirada e centrifugada a 16000 rcf por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de solução de amostra 2x (azul de bromofenol 0,05% (p/v), xileno cianol FF 0,1% (p/v), glicerol 10% (v/v)) e 38 µL de solução de fenol:clorofórmio (fenol pH 7,6 50% (v/v), clorofórmio 50% (v/v)). Após agitação vigorosa, a amostra foi novamente centrifugada e 15 µL do sobrenadante foi aplicado em gel de agarose. A análise foi feita por comparação com o controle negativo.

4.3.14 Método de PCR de colônia para análise de plasmídeos

A reação de PCR de colônia utiliza o DNA diretamente de bactérias como molde, sem extração prévia de plasmídeos, para verificação de clonagem do fragmento de interesse.

Colônias bacterianas transformadas foram inoculadas em meio 2YT-amp por 16 horas a 37 °C, sob agitação. As reações de PCR foram realizadas em volume de 50 µL: 5 µL de Tampão para PCR 10x, 2 a 5 µL de MgCl₂ 25mM, 0,4 µL de mistura de dNTPs 25 mM, 0,25 µL de enzima DNA polimerase, 1 a 5 µL de cultura bacteriana, 10 picomol de cada oligonucleotídeo (“forward” e “reverse”) e água MilliQ qsp 50 µL. Os oligonucleotídeos utilizados pertencem a regiões do vetor pGemT-Easy (M13F, M13R) ou a regiões do fragmento de interesse.

As reações foram realizadas utilizando-se termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc). As características dos ciclos foram otimizadas para cada produto. As fases 2 a 4 foram repetidos por 30 a 40 ciclos, dependendo do produto desejado. As fases de desnaturação, anelamento e amplificação do DNA estão na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 Ciclos de amplificação de fragmentos de DNA por PCR de colônia

	Temperatura	Tempo
1. Desnaturação inicial	94 °C	2 minutos
2. Desnaturação	94 °C	30 segundos
3. Anelamento	55-58 °C	20 segundos
4. Amplificação	72-74 °C	3 minutos
5. Amplificação final	72-74 °C	3 minutos

4.3.15 Expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Plasmídeos com resultados positivos nos seqüenciamentos foram utilizadas na transformação de bactérias *Escherichia coli* (cepas BL21 (DE3) Star PlysS, BL21 (DE3) Codon Plus RP, Rosetta, BL21 c43, BL21 TrxB (DE3) e BL21-SI) para expressão de proteínas recombinantes “in vitro”.

As colônias transformadas foram incubadas em 2YT-amp-clo ou 2YT-on-amp (bactérias SI) por 16 horas à 37 °C, sob agitação. A cultura foi diluída para uma DO₆₀₀ de 0,15 e dividida em duas frações de 15 mL. Ambas culturas foram incubadas à 37 °C, sob agitação, até alcançarem a DO₆₀₀ de 0,5-0,8. Nesse momento, foi adicionado o indutor de expressão (18 µL de IPTG 0,84 M para clones com vetor pAE, 30 µL de paraquat 0,1 M para clones com vetor pAEsox ou 900 µL NaCl 5 M para clones de bactérias SI) a uma das frações. As culturas foram mantidas por períodos de 2 a 20 horas, à 37 °C ou 30 °C (bactérias SI), sob agitação.

Após o período de indução, as culturas foram centrifugadas a 2700 rcf por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso e lavado em solução de NaCl 0,9%. O precipitado foi transferido para microtubo, lavado e reservado em congelador a -20 °C.

O precipitado de bactérias foi ressuspenso em solução de NaCl 0,9% e as bactérias foram lisadas por quebra mecânica em sonicador e centrifugadas a 16000 rcf por 5 minutos. O sobrenadante (com proteínas solúveis) foi separado do precipitado (com proteínas insolúveis).

A concentração de proteínas solúveis totais foi estimada por absorbância em UV (280 nm). Considera-se a concentração de 1,0 µg de proteína por µL para uma solução com $Abs_{280nm}=1,0$. A concentração de proteínas insolúveis no precipitado foi considerada proporcional à concentração de proteínas solúveis.

4.3.16 Expressão de proteínas recombinantes em volume maior de cultura

As colônias com expressão de proteínas recombinantes foram selecionadas e incubadas em 30 mL de 2YT-amp-clo por 16 horas à 37 °C, sob agitação. A cultura foi diluída para uma DO_{600} de 0,15 em 500 mL de 2YT-amp-clo. A cultura foi incubada à 37 °C, sob agitação, até alcançar a DO_{600} de 0,5-0,8. Nesse momento, foi adicionado o indutor de expressão (1000 µL de paraquat 0,1 M). A cultura foi mantida por um período de 20-24 horas, à 37 °C, sob agitação.

Após o período de indução, a cultura foi centrifugada a 7500 rcf por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso e lavado em solução de NaCl 0,9%. O precipitado foi centrifugado a 2700 rcf por 10 minutos e reservado em congelador a -20 °C.

4.3.17 Purificação de proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal

O precipitado de bactérias reservado foi descongelado e ressuspenso em Tampão Tris-HCl 20 mM pH 6,5, 8,0 ou 9,25 (dependendo da proteína recombinante). As bactérias foram lisadas por 3 passagens em prensa hidráulica (French Pressure) a 1.500 psi e centrifugadas a 12000 rcf por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi separado do precipitado e o sobrenadante descartado.

O precipitado foi lavado 2 vezes com Tampão Tris-HCl 20 mM (pH adequado), NaCl 0,5 M, uréia 1 ou 2 M e Triton X-100 0,1% (v/v). Após a segunda lavagem, o precipitado foi solubilizado em 4 a 5 mL de Tampão Tris-HCl 20 mM (pH adequado), NaCl 0,5 M, β-mercaptoetanol 10 mM e uréia 8 M, por 3 a 16 horas de agitação, à temperatura ambiente.

A renaturação foi feita com a adição lenta do precipitado solubilizado ao tampão (Tris-HCl 20 mM (pH adequado), NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM), sob agitação branda, à temperatura ambiente. A agitação foi mantida por 7 a 16 horas.

A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade a metal, utilizando coluna His-Trap de 1 mL (GE-Amersham). A coluna foi lavada com 15 mL de água MilliRiOs, carregada com 10 mL de NiSO₄ 300 mM e equilibrada com 10 mL de tampão Tris-HCl 20 mM (pH adequado), NaCl 0,5 M e imidazol 10 mM. A proteína foi introduzida na coluna na velocidade de 1 mL/min. A eluição foi feita com a lavagem da coluna com tampões com concentrações crescentes de imidazol (20 a 1000 mM).

A fração eluída contendo a proteína recombinante foi dialisada em membrana semi-permeável de 14 kDa para a remoção de imidazol e NaCl. A diálise inicial foi feita em Tampão Tris-HCl 20 mM (pH adequado) e NaCl 100 mM, por 8 a 16 horas. A segunda diálise foi feita com PBS e solução de NaCl 0,9%, glicina 0,1% (p/v), por 8 a 16 horas. A proteína dialisada foi armazenada a -20 °C.

4.3.18 Purificação de proteína recombinante por eletroeluição

O precipitado de bactérias reservado foi descongelado e ressuspenso em Tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. As bactérias foram lisadas por 3 passagens em prensa hidráulica (French Pressure) a 1.500 psi e centrifugadas a 12000 rcf por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi separado do precipitado e o sobrenadante descartado.

A purificação desta proteína (fragmento CP) foi realizada através de eletroeluição a partir de géis de poliacrilamida. A fração insolúvel foi diluída em NaCl 0,9% e aplicada em condições desnaturantes a géis de poliacrilamida de 12,5% com 1,5 mm de espessura e 5 poços. As bandas de interesse (~16 kDa) foram excisadas e armazenadas em tampão de corrida até eletroeluição. A eletroeluição foi realizada em tubos especiais para eletroeluição (GEBA Flex-tubes), em 100 V, por aproximadamente 2,5h. A proteína eletroeluída foi dialisada em PBS e armazenada a -20 °C.

4.3.19 Imunização de camundongos com fragmentos protéicos de FVIII para obtenção de anticorpos policlonais

Soro com anticorpos específicos foram obtidos por imunização de camundongos (fêmeas, da linhagem Balb/C, com aproximadamente 20 g) com as proteínas recombinantes de interesse. As proteínas purificadas foram injetadas por via intraperitoneal (ip) ou subcutânea (sc) na concentração de 5 µg/dose, diluídas em 250 e 150 µL de NaCl 0,9% (vias ip e sc, respectivamente), usando hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) como adjuvante. Soro controle negativo foi obtido com a injeção de NaCl 0,9% e hidróxido de alumínio. Foram realizadas três ou quatro imunizações em intervalos de 14 dias.

O soro foi obtido por sangrias através do plexo retro-orbital do olho. O soro pré-imune foi obtido para comparação após as imunizações. Para a proteína fCL, foram feitas sangrias intermediárias, dois dias antes das imunizações. A sangria final foi feita quinze dias depois da última imunização.

O sangue recolhido foi incubado por 30 minutos a 37 °C para formação do coágulo, resfriado a 4 °C, centrifugado a 2300 rcf por 5 minutos e o soro separado e aliquoteado para armazenamento a -20 °C.

5 RESULTADOS

São descritos a seguir os resultados de duas partes experimentais distintas:

1. Purificação de fator VIII (FVIII) de coagulação por cromatografias de troca iônica e gel filtração a partir de plasma humano e análise da distribuição de fatores de coagulação nas frações das cromatografias;

2. Clonagem de fragmentos gênicos de FVIII e expressão e purificação dos fragmentos protéicos recombinantes, tendo como finalidade a produção de anticorpos em camundongos e utilização destes anticorpos em “western blot” para detecção de FVIII.

5.1 Purificação de Fator VIII de coagulação por cromatografias de troca aniônica e de gel filtração a partir de plasma humano

O processo básico de purificação de FVIII a partir de plasma humano utilizado neste trabalho está esquematizado na Figura 5.1. O processo consiste em etapas de cromatografia de troca iônica, concentração da fração contendo FVIII e cromatografia por gel filtração.

Figura 5.1 Esquema para purificação de FVIII a partir de plasma humano por cromatografias de troca iônica e gel filtração. Este processo, que utiliza uma etapa inicial de purificação de FVIII de plasma por cromatografia de troca aniônica seguida de fracionamento por gel filtração, foi comparado com o processo validado de purificação por gel filtração direta do plasma.

5.1.1 Cromatografia de plasma humano em resinas de troca aniônica

Ensaio anteriores do laboratório mostraram que o FVIII de plasma humano podia ser purificado usando cromatografia em resina Q-Sepharose FF. Nas condições utilizadas, a maior parte das proteínas plasmáticas eram eluídas no Flow through (FT) das cromatografias, enquanto o FVIII era eluído com aumento da concentração de NaCl.

Os testes de cromatografia de troca iônica aqui descritos tinham por objetivo avaliar diferentes condições de cromatografia de plasma e comparar as eficiências das resinas Q-Sepharose Fast Flow (FF), Q-Sepharose XL, Q-Sepharose Big Beads (BB) e ANX Sepharose 4FF na purificação de FVIII.

Além de diferentes resinas, foram testadas também diferentes concentrações de NaCl, tanto no plasma aplicado como no tampão de equilíbrio da coluna e nos tampões de eluição, para observar a interferência da condutividade na ligação do FVIII às resinas.

Foram realizados experimentos para avaliar a capacidade das resinas de capturar o FVIII, variando-se o volume de plasma aplicado em relação ao volume de resina. São descritos ainda experimentos de aplicação da amostra “em loop” (reaplicação do FT duas vezes), para verificar a capacidade e afinidade da ligação de FVIII às resinas.

As cromatografias foram avaliadas medindo-se o conteúdo total de proteínas e a atividade de FVIII nas frações coletadas, calculando-se a recuperação, a atividade específica e o fator de purificação de FVIII.

5.1.1.1 Avaliação do empacotamento das colunas de troca iônica – teste com acetona

As colunas com as diferentes resinas foram montadas no laboratório e o empacotamento de cada coluna foi avaliado como descrito em 4.2.6. Ilustramos aqui a avaliação de empacotamento de uma coluna de troca iônica com resina Q-Sepharose BB, utilizando teste com acetona. Os parâmetros medidos no cromatograma (Figura 5.2) foram usados para os cálculos de assimetria e altura de pratos teóricos (Tabela 5.1). Os resultados para as outras colunas de troca iônica foram similares.

Figura 5.2 Teste de empacotamento por cromatografia de acetona em coluna de Q-Sepharose BB. Absorbância em UV – 280 nm. Coluna XK50 com 100 mL de resina. Injeção de 1,5 mL de acetona 1%.

Tabela 5.1 Análise do empacotamento da coluna Q-Sepharose BB.

L (cm)	h (cm)	Wr (cm)	Vr (cm)	N	HEPT	N/m	a (cm)	b (cm)	As
5,5	14	2,5	8,4	62,5	0,088	1136	1,55	3,2	2,0

O valor de assimetria, As , reflete a qualidade do empacotamento, sendo o valor ideal $As=1$. O valor obtido para a coluna testada, $As=2,0$, é aceitável para colunas de troca iônica. A altura média de pratos teóricos (HETP) é também um parâmetro importante, sendo o valor ideal igual a 3 vezes o diâmetro dos “beads” da resina usada. No caso da Q-Sepharose-BB, cujo diâmetro varia de 100 a 300 μm , o valor de HETP ideal é 0,03 a 0,09 cm. O valor obtido $HETP=0,088$ é aceitável. Esses valores foram usados como referência para avaliar as condições das colunas. O teste era repetido após algumas corridas cromatográficas como controle e para comparação.

5.1.1.2 Cromatografia de plasma humano em resina de troca iônica Q-Sepharose FF

A purificação inicial de FVIII por cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose FF foi baseada em experimentos realizados anteriormente no laboratório, no desenvolvimento das teses de mestrado de Anita Tanaka (1996), trabalhando com plasma suíno, e Ana Paula Lorthiois (2002), trabalhando com plasmas suíno e humano.

O protocolo aqui proposto para purificação de FVIII humano utiliza uma etapa de captura das moléculas em resina de troca aniônica e posterior cromatografia em gel filtração.

O experimento a seguir ilustra uma cromatografia de plasma em resina de troca aniônica Q-Sepharose FF. À coluna de 100 mL de resina, aplicou-se 500 mL de plasma. O cromatograma mostrado (Figura 5.4) é muito similar aos obtidos em uma série de experimentos realizados para avaliar a reprodutibilidade do ensaio. Os ensaios confirmaram a ligação de FVIII em resinas de troca aniônica, com certa variabilidade relacionada com a diversidade natural da matéria prima utilizada.

Figura 5.4 Cromatografia de plasma humano em resina de troca aniônica Q-Sepharose FF. O cromatograma mostra absorbância em 280 nm (azul) e condutividade (rosa) da solução sendo eluída da coluna. As frações coletadas da cromatografia estão indicadas com barras vermelhas.

A identificação das frações como Q250 e Q500 referem-se às concentrações de NaCl utilizada nos tampões de eluição (250 mM e 500 mM). Essa nomenclatura será usada ao longo do trabalho.

A dosagem de proteínas realizada pelo método de Bradford utiliza curva de calibração com padrão de BSA (2 mg/mL). A Figura 5.5 mostra a curva de calibração obtida e a equação linear gerada para o cálculo de massa nas amostras.

BSA (μ g)	Abs. 595nm
0	0,410
5	0,585
10	0,832
15	1,011
20	1,094
25	1,273

Figura 5.5 Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

A equação gerada na curva de calibração permite calcular a massa de proteína nas amostras de plasma e frações cromatográficas. A massa em cada fração é calculada considerando a diluição usada na dosagem e o volume total da fração. Os valores estão apresentados na Tabela 5.2. A forma de dosagem de massa de proteína foi mostrada para ilustrar as medidas realizadas em todas as cromatografias.

Tabela 5.2 Dosagem de proteínas nas frações coletadas da cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF

Fração	Volume fração (mL)	Absorbância 595 nm	Massa protéica calculada (μ g)	Volume dosado (μ L)	[proteína] (mg/mL)	Proteína total na fração (mg)
Plasma	500	0,686	7,23	0,1	72,27	36134
FT	500	0,660	6,47	0,1	64,71	32355
Reeq	500	0,789	10,22	1,25	8,18	4088
Q250	500	0,564	3,68	5	0,74	368
Q500A	200	0,685	7,20	10	0,72	144
Q500B	300	0,698	7,58	200	0,04	11

A determinação de atividade de FVIII é feita pelo método cromogênico, conforme instruções do fabricante do kit (Chromogenix), como descrito em 4.1.7. Ilustramos aqui a forma de dosagem usada para todas as determinações de FVIII ao longo do trabalho.

A curva de calibração de atividade de FVIII é feita utilizando a amostra inicial aplicada à cromatografia, preparada a partir do “pool” de bolsas de plasma. Portanto, cada ensaio prevê a elaboração de uma curva de calibração referente ao plasma daquele ensaio. Para elaboração da curva, cada diluição da amostra inicial é considerada como porcentagem de atividade na determinação da reação cromogênica. A amostra não diluída é considerada como 100% de atividade, e considera-se 100 unidades de FVIII por mL de amostra inicial.

% Atividade (diluições)	Abs. 405 nm	Abs. 492 nm	Abs. 405 - Abs. 492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,077	0,001	0,076
25	0,161	0,002	0,159
50	0,298	0,004	0,294
70	0,416	0,003	0,413
100	0,517	0,004	0,513

Figura 5.6 Elaboração da curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

A equação determinada pela curva de calibração é usada na dosagem de atividade das amostras. A Tabela 5.3 apresenta os dados de absorbâncias medidas e os resultados calculados de atividade de FVIII, utilizando a curva de calibração.

Tabela 5.3 Determinação de atividade total de FVIII nas frações da cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF

Fração	Volume fração (mL)	Abs. 405 nm	Abs. 492 nm	Abs. 405- 492 nm	% Atividade	Atividade na fração (U)	Recuper. atividade **
Plasma	500	0,517	0,004	0,513	94,42	47212	100
FT	500	0,017	0,004	0,013	-1,73	-865	0
Reeq	500	0,009	0,000	0,009	-2,50	-1250	0
Q200	500	0,177	0,002	0,175	29,42	14712	31,16
Q500 A	200	0,689	0,002	0,687	127,88	25577	54,18
Q500 B	300	0,030	0,002	0,028	1,15	346	0,73

A Tabela 5.4 foi construída com os valores de concentração de proteínas e proteína total, atividade de FVIII e com os cálculos de recuperação e atividade específica de FVIII.

Tabela 5.4 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF

Fração	Volume fração (mL)	[proteína] (mg/mL)	Proteína total na fração (mg)	% Atividade	Atividade total na fração	Recuper. atividade **	Atividade espec. (U/mg)	Fator de purif. ***
Plasma	500	72,27	36134	94,42	47212	100	1,31	1
FT	500	64,71	32355	-1,73	0	0	0	0
Reeq	500	8,18	4088	-2,50	0	0	0	0
Q200	500	0,74	368	29,42	14712	31,16	39,97	30,5
Q500 A	200	0,72	144	127,88	25577	54,18	177,7	135,6
Q500 B	300	0,04	11	1,15	346	0,73	30,46	23,3

**A recuperação de atividade refere-se à atividade de FVIII na amostra inicial.

***O fator de purificação foi calculado como: $\frac{\text{Atividade específica na fração}}{\text{Atividade específica na amostra inicial}}$

As amostras das frações coletadas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 5.7).

Figura 5.7 Análise das frações coletadas da cromatografia de plasma em resina de troca iônica em Q-Sepharose FF por SDS-PAGE. Gel 7,5%. Canaletas: 1. Plasma (0,8 µL); 2. FT (0,8 µL); 3. Reeq. (0,8 µL); 4. Q250 (16 µL); 5. Q500A (16 µL); 6. Q500B (16 µL).

Observou-se que na cromatografia mostrada houve boa recuperação de atividade de FVIII na fração Q500, com 54% da atividade total da amostra inicial. Não houve escape de FVIII no FT ou no reequilíbrio. Foi observada perda de 31% da atividade do plasma aplicado na fração de lavagem (Q250). Apesar da perda relativamente alta na lavagem, a remoção de muitas proteínas contaminantes possibilitou recuperação de FVIII na fração Q500, com alta atividade específica, alcançando 177,7 U/mg.

A atividade total recuperada na cromatografia foi de 86% (soma de atividade em todas as frações em relação à atividade total aplicada).

O ensaio mostrado acima ilustra uma série de ensaios em resina Q-Sepharose FF.

5.1.1.3 Análise comparativa de cromatografias de plasma humano em resina de troca iônica Q-Sepharose FF

O protocolo básico de purificação de FVIII por cromatografia de plasma em Q-Sepharose FF foi utilizado na realização de vários experimentos, para avaliar a recuperação do FVIII, considerando a variabilidade intrínseca da matéria prima. Os dados de alguns desses experimentos estão sumarizados na Tabela 5.5.

Observa-se que a purificação do FVIII, apesar da variação dos resultados, pode ser realizada por cromatografia em troca iônica, atingindo valores altos de recuperação na fração de mais alta pureza Q500 (69%), com atividade específica de até 245 U/mg e fatores de purificação de até 153 vezes.

A atividade de FVIII eluída na fração Q250 alcançou valores altos, representando perdas de até 45%. No entanto, essa lavagem determina recuperação de FVIII com alta atividade específica na fração Q500. Para maior recuperação, a concentração de NaCl na lavagem (250 mM) poderia ser diminuída. Esta etapa poderia ser até retirada, estabelecendo o compromisso rendimento e pureza.

Tabela 5.5 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de cromatografias de plasma em resina Q-Sepharose FF

Fração		Cromatografias de plasma em Q-Sepharose FF					
		1°	2°	3°	4°	5°	6°
Plasma	Atividade total (U)	46554	47747	47747	66529	47212	47212
	Atividade específica (U/mg)	1,7	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
FT	Atividade total (U)	2105	0	736	0	0	192
	(%)	5	0	2	0	0	0
Q250	Atividade (U)	16564	17517	14126	29728	14712	16058
	(%)	36	37	30	45	31	34
	Atividade específica (U/mg)	7.4	29	22	37	40	40
Q500	Atividade (U)	31889	20437	21931	22993	2592	27634
	% Recuperação	69	43	46	35	55	59
	Atividade específica (U/mg)	209	110	119	107	167	245
	Fator purificação	123	68	74	69	104	153
Q250 + Q500	Atividade (U)	48453	37954	36057	52721	40635	43692
	% Recuperação	105	79	76	79	86	93
Perda ativ. FVIII no processo (U)		0	979	10954	13808	6577	3328
% Perda em relação ao total aplicado		0	21	23	21	14	7

5.1.1.4 Análise da eluição de proteínas e de FVIII na cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF usando diversas concentrações de NaCl

Os experimentos de cromatografia de plasma usando eluição com tampões citrato com concentrações crescentes de NaCl foram realizados para verificar o perfil de eluição de proteínas do plasma.

O cromatograma abaixo (Figura 5.8) se refere ao ensaio no qual a coluna de resina Q-Sepharose FF (100 mL) foi equilibrada com tampão de equilíbrio (85 mM NaCl), seguido de aplicação de 500 mL de plasma. A coluna foi lavada com 700 mL de tampão de equilíbrio e a eluição foi realizada em passos de 200 mL de tampão citrato com concentrações crescentes de 50 mM de NaCl, entre 100 a 1000 mM. A variação de concentração foi programada para ser realizada automaticamente pelo cromatógrafo.

Figura 5.8 Cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF, usando concentrações crescentes de NaCl na eluição. O cromatograma mostra absorbância em 280 nm (preto) e condutividade (cinza) da solução sendo eluída da coluna. Observa-se pico de eluição de proteínas na eluição com tampão citrato 270 mM de NaCl. A atividade de FVIII foi medida nas frações.

Comparando os valores de condutividade, observou-se que houve desvio dos valores de concentração de NaCl esperados. Os valores corrigidos por medida de condutividade estão apresentados na Tabela 5.6. A Tabela apresenta a concentração e massa total de proteína e a atividade de FVIII nas frações. As curvas de calibração de dosagem de proteína e atividade de FVIII, bem como os valores de absorbância obtidos nessas determinações, estão no Anexo A.

Tabela 5.6 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de cromatografias de plasma em resina Q-Sepharose FF usando concentrações crescentes de NaCl

Fração - [NaCl] nas frações eluidas	Volume fração (mL)	% Atividade FVIII	Atividade FVIII na fração (U)	Recuperação atividade (%)	Concentração protéica (mg/mL)	Proteína na fração (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Plasma	500	102,43	51216	100	68,4	34212	1,5	1
FT	500	-1,75	0	0	63,9	31927	0	0
Reeq	700	-2,34	0	0	8,4	5855	0	0
103mM	200	-4,58	0	0	0,8	164	0	0
159mM	200	-0,25	0	0	0,8	154	0	0
196mM	200	3,48	696	1,36	1,0	200	3,5	2,3
270mM	200	59,9	11979	23,4	1,9	379	32	21
321mM	200	91,09	18218	35,6	0,9	188	97	65
376mM	200	61,84	12367	24,2	0,2	40	306	204
431mM	200	14,82	2964	5,79	0,03	7	436	291
483mM	200	0,79	158	0,31	0,02	4	40	26
535mM	200	-2,34	0	0	0,02	5	0	0
583mM	200	-2,64	0	0	0,02	5	0	0
944mM	200	-3,39	0	0	0,01	3	0	0

A Figura 5.9 foi elaborada a partir dos resultados apresentados na Tabela 5.6. Observa-se que a maior parte das proteínas plasmáticas não se ligou à coluna e saiu diretamente no FT. Das frações eluídas, a fração com maior quantidade de proteínas foi recuperada em 270 mM, enquanto a maior atividade de FVIII foi encontrada na fração 321 mM (36%), seguida das frações 376 mM (24%) e 270 mM (23%). Não foi encontrada atividade de FVIII no FT, Reeq. ou nas frações iniciais e finais de eluição com NaCl. A recuperação total de atividade de FVIII foi de 89%.

Figura 5.9 Distribuição de proteína total e atividade de FVIII recuperada nas frações da cromatografia de plasma em Q-Sepharose FF, usando concentrações crescentes de NaCl.

Este teste permitiu verificar que uma lavagem intermediária empregando tampão citrato 250 mM NaCl pode ser interessante para remover proteínas e aumentar a atividade específica do FVIII, mas pode resultar em perda significativa de atividade. Se o objetivo for maior recuperação do FVIII, uma lavagem com o tampão 200 mM NaCl seria mais recomendável.

Este resultado está de acordo com as perdas observadas em ensaios prévios nas lavagens com tampão citrato 250 mM NaCl. Esta concentração foi utilizada seguindo protocolos descritos anteriormente para purificação de FVIII suíno. Nesses experimentos, não se observava perda de atividade de FVIII na lavagem intermediária. Porém, além da matéria prima ser intrinsecamente diferente, a solução anticoagulante utilizada na coleta de sangue suíno era diferente da solução usada na coleta de sangue humano, o que poderia resultar em diferente condutividade da amostra inicial, interferindo na cromatografia.

Os testes das resinas Q-Sepharose FF e Q-Sepharose BB com tampões citrato com diversas concentrações de NaCl apresentaram resultados semelhantes de eluição de proteínas e atividade de FVIII.

Em outro teste, foi investigada a possível interferência na ligação de FVIII à resina usando a concentração de 150 mM NaCl (em lugar do 85 mM geralmente utilizado) no tampão de equilíbrio e lavagem da coluna. Verificou-se que não houve alterações no perfil de ligação ou eluição de FVIII.

Ainda em outro ensaio, foi investigada a possível interferência de ligação de FVIII à resina utilizando como amostra inicial o plasma diluído 1:1 em tampão citrato sem NaCl e realizando o equilíbrio e reequilíbrio com tampão citrato 75 mM NaCl. Verificou-se que a diminuição da força iônica do tampão de equilíbrio e a condição de menor condutividade do plasma inicial não alteraram o perfil de ligação ou de eluição do FVIII.

5.1.1.5 Avaliação da capacidade de ligação de FVIII das resinas de troca iônica Q-Sepharose em cromatografia de plasma

A matéria prima utilizada, além de intrinsecamente complexa, pode apresentar variabilidade como conteúdo de gordura, tempo de armazenamento e tipo sangüíneo, o que poderia explicar certa variação observada na recuperação e perfil de distribuição do FVIII em frações cromatográficas. Em uma série de experimentos, foram observadas perdas de FVIII no FT das cromatografias. Não era possível afirmar se as perdas estavam relacionadas com a variabilidade das amostras iniciais ou com a limitação da capacidade de ligação de FVIII à resina. Para precisar a capacidade de ligação de FVIII na resina, alguns testes foram realizados: 1) avaliação de perdas no FT por coleta em pequenas frações (0,5 VC); 2) aplicação de maior volume de plasma (7VC) e análise de perdas no FT; 3) retorno do FT à coluna ("loop").

5.1.1.5.1 Análise da perda de FVIII no FT da cromatografia de plasma em Q-Sepharose FF

Para avaliar as perdas de FVIII durante cromatografia de plasma em Q-Sepharose FF e precisar a capacidade da resina, o FT foi coletado em frações subdivididas para dosagem de atividade. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações estão na Tabela 5.7. Neste experimento, também realizamos medidas comparativas de atividade de FVIII usando o método cromogênico e o método de tempo de coagulação.

Como geralmente observado, a maior parte das proteínas plasmáticas não se ligou à resina Q-Sepharose, saindo diretamente no FT. Por outro lado, a porcentagem de atividade de FVIII perdida no FT foi pequena (0,10 a 0,74% nas frações finais), totalizando perda de 4,21% (usando método cromogênico). Considerando o método de um estágio de coagulação, a perda de FVIII foi de 0,51 a 1,41%, com total de 4,52%. A baixa perda de atividade de FVIII até as frações finais de FT neste experimento sugeria que a capacidade de ligação de FVIII nessa resina fosse maior e que as perdas observadas em outros experimentos estariam mais relacionadas com as condições das amostras iniciais.

A eluição de FVIII na fração Q250 do ensaio foi de aproximadamente 41% e a recuperação de FVIII em Q500, 38% (método cromogênico), confirmando que a condição de ligação é boa, mas a concentração do tampão citrato 250 mM NaCl para lavagem é alta e induz perdas significativas.

Tabela 5.7 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de cromatografias de plasma em resina Q-Sepharose FF - coleta de FT em frações subdivididas

Fração	Volume fração (mL)	[prot.] (mg/ml)	Proteína fração (mg)	Atividade FVIII – Método Cromogênico					Atividade FVIII Método Tempo de Coagulação				
				Ativ. (%)	Ativ. fração (U)	Rec. ativ. (%)	Ativ. espec. (U/mg)	Fator purif.	Ativ. (%).	Ativ. fração (U)	Rec. ativ. (%)	Ativ. espec. (U/mg)	Fator purif.
Plasma	450	54,13	24358	100,7	45328	100	1,86	1	103,5	46554	100	1,91	1
QFT 1	50	7,64	382	1,35	68	0,15	0,18	0,10	2,36	236	0,51	0,09	0,05
QFT 2	50	36,88	1844	0,94	47	0,10	0,03	0,02					
QFT 3	50	56,45	2822	1,56	78	0,17	0,03	0,02	3,55	353	0,76	0,05	0,03
QFT 4	49,5	62,35	3086	2,40	119	0,26	0,04	0,02					
QFT 5	50	61,71	3085	4,48	224	0,49	0,07	0,04	4,34	434	0,93	0,06	0,03
QFT 6	50	58,03	2902	5,10	255	0,56	0,09	0,05					
QFT 7	49,5	62,41	3089	6,15	304	0,67	0,10	0,05	6,55	659	1,41	0,10	0,05
QFT 8	51	60,30	3075	6,56	335	0,74	0,11	0,06					
QFT 9	49,5	65,90	3262	6,77	335	0,74	0,10	0,05	5,91	423	0,91	0,11	0,06
QFT 10	22	65,60	1443	6,77	149	0,33	0,10	0,05					
QFT-soma	471,5	-	24990	-	1914	4,21	0,08	0	-	2105	4,52	-	0
Reeq.	500	9,88	4938	1,98	990	2,18	0,20	0,11	-	-	-	-	-
Q250	500	0,15	75	37,19	18594	41,02	248	133	33,13	16564	35,58	220	116
Q500 1	200	0,13	26	86,56	17313	38,19	666	358	70,87	14173	30,44	545	285
Q500 2	250	0,11	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A comparação dos resultados de atividade dos dois métodos mostrou que estes resultados são semelhantes (Figura 5.10). Além destes, anteriormente realizamos a comparação entre os métodos com frações de outros experimentos, obtendo-se sempre resultados bastante semelhantes. A literatura indica o método cromogênico como mais preciso (CHANDLER, 2003), e esse método foi escolhido para ser utilizado na dosagem de FVIII.

Figura 5.10 Comparação entre as atividades totais de FVIII obtidos pelo método cromogênico e pelo método de um estágio de coagulação.

5.1.1.5.2 Avaliação da capacidade da resina Q-Sepharose BB por aumento do volume de plasma aplicado

A partir da confirmação de que ocorria apenas pequena perda de atividade de FVIII no FT das cromatografias de plasma em Q-Sepharose FF, foi desenhado um ensaio para precisar a capacidade de ligação de FVIII usando maior volume de plasma e avaliando as perdas no FT. Nesse momento, estávamos avaliando o comportamento da resina Q-Sepharose BB para capturar o FVIII do plasma. Esta resina foi proposta como mais robusta para escalonamento e com o mesmo trocador iônico. No ensaio foram aplicados 700 mL de plasma à coluna de 100 mL de resina. O FT foi recolhido em fração inicial de 500 mL e os 200 mL seguintes foram subdivididos em frações de 50 mL. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações estão na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de cromatografias de plasma em resina Q-Sepharose BB com o aumento de volume de plasma aplicado

Fração	Volume fração (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Plasma	700	98,29	68806	100	64,00	44799	1,54	1
FT 1	500	13,00	6500	9,45	46,10	23052	0,28	0,2
FT 2	50	20,45	1023	1,49	56,84	2842	0,36	0,2
FT 3	50	23,00	1150	1,67	57,97	2898	0,40	0,3
FT 4	50	27,12	1356	1,97	58,58	2929	0,46	0,3
FT 5	50	23,20	1160	1,69	58,48	2924	0,40	0,3
FT – Total	700	-	11188	16,26	-	34645	0,32	0,2
Reeq	500	-0,33	0	0	5,09	2543	0	0
Q250	500	49,86	24931	36,23	0,81	406	61,43	39,9
Q500 A	200	119,47	23894	34,73	0,84	167	143	92,8
Q500 B	300	10,25	3076	4,47	0,09	27	115	74,4

A maior parte das proteínas plasmáticas não se ligou à coluna Q-Sepharose BB e saiu diretamente no FT. Entretanto, a porcentagem de atividade de FVIII perdida no FT foi maior que em ensaios anteriores (16%), sendo que 9,5% já na fração inicial de 500 mL (o dobro da perda obtida no experimento com frações menores de FT), indicando que a capacidade de ligação do FVIII à coluna estava menor neste experimento. Por outro lado, a perda de 1,69% de atividade de FVIII na fração final de FT sugere que a capacidade de ligação do FVIII à coluna não estava esgotada.

Apesar das altas perdas no FT (16%) e na fração de lavagem Q250 (36%) e da recuperação de atividade FVIII na fração Q500 ter sido reduzida (35%), a atividade específica na Q500 foi alta, 142 U/mg. A recuperação de FVIII total nesta cromatografia foi boa, de 91% do total de atividade aplicada.

O ensaio foi repetido no mesmo dia e posteriormente, com lote de plasma armazenado por mais tempo. Os testes reproduziram as perdas de atividade de FVIII nas frações. Entretanto, em outros ensaios (como no seguinte), os perfis cromatográficos foram diferentes, indicando que as eventuais perdas no FT estão relacionadas com fator ainda não compreendido.

5.1.1.5.3 Cromatografia de plasma com retorno de FT para a coluna de Q-Sepharose FF

Considerando as perdas de atividade de FVIII no FT, este experimento de cromatografia de plasma em Q-Sepharose FF foi desenhado para reaplicar o FT à coluna por duas vezes (retorno “em loop”), investigando se a maior afinidade de FVIII à resina resultaria em deslocamento de outras proteínas. Essa estratégia foi somente investigativa e não poderia ser proposta para escalonamento de processo. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações estão na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de cromatografias de plasma em resina Q-Sepharose FF com retorno de FT

Fração	Volume da fração (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. de atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Plasma	500	95,49	47747	100	79,75	39873	1,20	1
FT1	500	1,47	736	1,54	42,70	21350	0,03	0
rFT1	445	-2,90	0	0	57,81	25724	0	0
rFT2	440	-4,28	0	0	54,59	24020	0	0
Reeq	500	-4,51	0	0	5,37	2685	0	0
Q250	500	28,25	14126	29,59	1,06	531	26,58	22,2
Q500 A	200	71,24	14248	29,84	1,00	201	70,93	59,1
Q500 B	300	25,61	7683	16,09	0,05	15	512	-

O fenômeno de perda de FVIII no FT não se reproduziu neste ensaio e a ligação da maior parte de FVIII ocorreu já na primeira passagem do plasma (1,5% de atividade em FT1). Dessa maneira, não foi possível avaliar se o FVIII poderia se ligar em maior quantidade com uma nova passagem em coluna de troca iônica.

As perdas de atividade de FVIII no FT das cromatografias de plasma em resina Q-Sepharose FF e BB parecem estar relacionadas com variáveis intrínsecas ainda não controláveis nos ensaios (condição da matéria prima ou do ensaio), que interfere na recuperação do FVIII.

Observamos que o tratamento das resinas com alta concentração de sal após cada corrida foi determinante para a manutenção da capacidade de ligação.

Em geral, quatro a sete bolsas de plasma são descongeladas para cada experimento, para manter certa uniformidade da amostra. Entretanto, podem ser observadas diferenças de volume e de coloração em cada bolsa, sugerindo diferenças nos plasmas. De fato, é esperado que o plasma preparado de cada doação apresente variações intrínsecas em sua composição. Essa variação poderia explicar, ao menos parcialmente, a diversidade de resultados encontrados em nossos experimentos.

5.1.1.6 Avaliação das resinas de troca iônica Q-Sepharose FF, XL e BB para purificação de FVIII

As cromatografias nas resinas de troca aniônica Q-Sepharose FF, XL e BB foram realizadas para investigar possíveis vantagens em escalonamento de processos. As três resinas têm o mesmo ligante, amônio quaternário, mas características diferentes dos 'beads' de suporte que poderiam produzir resultados diferentes. As concentrações de proteína e de atividades de FVIII nas frações coletadas de cromatografias com as 3 resinas estão na Tabela 5.10.

A perda de atividade na fração de reequilíbrio da Q-Sepharose XL pode ter sido pontual e não foi confirmada em repetição do ensaio. A análise dos dados obtidos com as diferentes resinas indica que a resina Q-Sepharose BB permitiu maior recuperação de atividade total de FVIII (94%), seguida da Q-Sepharose XL (73%) e da Q-Sepharose FF (57%). Nas três cromatografias ocorreram perdas parciais em Q250 (BB: 43%, XL: 11%, FF: 17%). A fração principal de cada cromatografia, Q500, mostrou recuperação razoável (FF: 35%, XL: 31%; BB: 44%).

Tabela 5.10 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de cromatografias de plasma na comparação de resinas Q-Sepharose FF, Q-Sepharose XL e Q-Sepharose BB

Fração	Volume fração (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Q-Sepharose FF								
Plasma	500	101,83	50915	100	66,85	33423	1,52	1
FT	500	2,04	1021	2,01	48,88	24438	0,04	0
Reeq	500	2,89	1447	2,84	5,61	2803	0,52	0,3
Q250	500	16,94	8468	16,6	0,98	492	17,21	11,3
Q500	500	35,87	17936	35,2	0,38	191	93,72	61,7
Q-Sepharose XL								
Plasma	500	101,83	50915	100	66,85	33423	1,52	1
FT	500	0,98	489	0,96	54,45	27224	0,02	0
Reeq	500	30,77	15383	30,2	5,85	2925	5,26	3,5
Q250	440	12,26	5392	10,6	0,78	342	15,79	10,4
Q500	500	31,40	15702	30,8	0,18	90	173,90	114,4
Q-Sepharose BB								
Plasma	500	101,83	50915	100	66,85	33423	1,52	1
FT	500	6,94	3468	6,81	61,28	30638	0,11	0,1
Reeq	500	0,55	277	0,54	8,25	4124	0,07	0
Q250	500	43,32	21660	42,5	0,86	429	50,54	33,2
Q500	500	44,81	22404	44,0	0,52	260	86,13	56,7

A Figura 5.11 foi elaborada a partir dos resultados da Tabela 5.10.

Figura 5.11 Distribuição de atividades de FVIII nas frações das cromatografias de plasma em resinas Q-Sepharose FF, XL e BB.

A resina Q-Sepharose BB, por seu resultado, facilidade de manuseio e possibilidade de altos fluxos lineares, seria a indicada para escalonamento de processo.

5.1.1.7 Cromatografia de plasma em resina de troca iônica ANX-Sepharose 4FF

Mais recentemente, foi testada uma nova resina de troca aniônica, a ANX-Sepharose 4 FF. A resina ANX-Sepharose 4FF possui um trocador aniônico fraco, com o tamanho de distribuição de poro otimizada para a separação de proteínas com alta massa molecular. A cromatografia na resina ANX Sepharose 4FF foi realizada com 10 VC (717 mL) de plasma como amostra inicial. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações estão na Tabela 5.11.

Observa-se que, mesmo após a aplicação de toda a amostra (10 VC), a perda de atividade de FVIII no FT é muito baixa (menos de 1% de atividade de FVIII do plasma inicial). Sugere-se que a resina teria capacidade maior de ligação de FVIII. A atividade não recuperada nas frações foi de 25,46%. A perda na fração de lavagem foi de apenas 14% e a recuperação na fração de eluição foi bastante alta, de 57%. Os bons resultados sugerem que esta resina também poderia ser utilizada na purificação de FVIII por cromatografia de troca iônica.

Tabela 5.11 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de cromatografias de plasma na resinas ANX-Sepharose 4FF

Frações	Volume fração (mL)	Atividade FVIII (%)	Atividade na fração (U)	Recup. atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Ativ. específica (U/mg)	Fator de purificação
Plasma	725	99,77	72333	100	61,16	44342	1,63	1
FT 1	81	-0,92	0	0	29,38	2379	-0,03	0
FT 2	72	-0,23	0	0	59,02	4249	0,00	0
FT 3	74	1,61	119,1	0,16	61,52	4552	0,03	0,02
FT 4	74	0,92	68,1	0,09	61,88	4579	0,01	0,01
FT 5	73	1,84	134,3	0,19	61,34	4478	0,03	0,02
FT 6	73	2,53	184,6	0,26	61,25	4471	0,04	0,03
FT 7	73	3,22	234,9	0,32	61,07	4458	0,05	0,03
FT8	73	3,68	268,5	0,37	56,61	4132	0,06	0,04
FT9	74	4,14	306,2	0,42	56,16	4156	0,07	0,05
FT10	73	5,75	419,5	0,58	55,89	4080	0,10	0,06
FT pool	740	0,46	340,2	0,47	63,21	46779	0,01	0
Reeq 1	715	0,46	328,7	0,45	3,34	2385	0,14	0,08
Q200 1	153	58,85	9004	12,45	1,16	178	50,62	31,06
Q200 2	565	2,30	1299	1,80	0,50	280	4,63	2,84
Q500 1	148	226,21	33479	46,28	1,78	263	127,06	77,95
Q500 2	180	44,83	8069	11,16	0,08	15	543,95	334

5.1.1.8 Detecção de fator IX e fator X nas frações das cromatografias de plasma nas resinas de troca iônica em Q-Sepharose FF, XL e BB

Experimentos anteriores do laboratório haviam mostrado que os fatores de coagulação IX e X estavam presentes, juntamente com o FVIII, nas frações Q500 das cromatografias de troca iônica. Esse dado foi determinante para o delineamento da segunda etapa de purificação de FVIII, propondo a utilização de coluna de gel filtração para separar as moléculas de FVIII dos demais fatores de coagulação.

A coeluição dos fatores IX e X sugere que outros fatores dependentes de vitamina K (fatores II, VII e proteína S), poderiam também estar presentes na fração. A presença da proteína C na fração Q500 foi determinada pelo método cromogênico. Essas proteínas de menor massa molecular que o FVIII (ou FVIII complexado com fator de von Willebrand) seriam separadas por gel filtração.

As frações cromatográficas de plasma nas resinas de troca iônica Q-Sepharose FF, XL e BB foram analisadas por "western blot" com anticorpos anti-fator IX e anti-fator X. As Figuras 5.12 e 5.13 mostram os resultados dos "western blots" com amostras das frações de Q-Sepharose FF. Os resultados dos "western blots" para as outras duas resinas foram muito semelhantes.

Figura 5.12 Análise da presença de fator X em frações de duas cromatografias de plasma em resina Q-Sepharose FF por "western blot", usando anticorpo monoclonal anti-fator IX (diluição 1:1000). SDS-PAGE (gradiente em poliacrilamida 4 a 16%, condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas 1. Plasma (1,2 μ L); 2. FT (corrida 1) (1,2 μ L); 3. FT (corrida 2) (1,2 μ L); 4. Reeq. (corrida 1) (24 μ L); 5. Q250 (corrida 1) (24 μ L); 6. Q250 (corrida 2) (24 μ L); 7. Q500 A (corrida 1) (24 μ L); 8. Q500 A (corrida 2) (24 μ L); 9. Q500 B (corrida 1) (24 μ L).

Figura 5.13 Análise da presença de fator X em frações de duas cromatografias de plasma em resina Q-Sepharose FF por "western blot", usando anticorpo monoclonal anti-fator X (diluição 1:1000). SDS-PAGE (gradiente em poliacrilamida 4 a 16%, condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas 1. Plasma (1,2 μ L); 2. FT (corrida 1) (1,2 μ L); 3. FT (corrida 2) (1,2 μ L); 4. Reeq. (corrida 1) (24 μ L); 5. Q250 (corrida 1) (24 μ L); 6. Q250 (corrida 2) (24 μ L); 7. Q500 A (corrida 1) (24 μ L); 8. Q500 A (corrida 2) (24 μ L); 9. Q500 B (corrida 1) (24 μ L).

Nos "western blots" usando os anticorpos monoclonais anti-fator IX e anti-fator X, a presença dos dois fatores nas frações de lavagem (Q250) e nas frações principais de eluição de FVIII (Q500) foi confirmada através das bandas em torno de 60 kDa. Nessas mesmas frações, nota-se o reconhecimento de algumas proteínas de mais alto peso molecular, possivelmente reações espúrias.

Nas amostras de plasma, FT e reequilíbrio uma forte banda pode ser observada em torno de 120 kDa. Inicialmente, pensou-se que ela poderia refletir a dimerização dos fatores IX e X, que poderiam estar associados pelas suas características moleculares, pelo padrão semelhante das bandas e também por suas funções intrínsecas sobre o mesmo processo biológico. Ou cada fator poderia estar associado com outras proteínas do plasma, que não seriam dissociadas nas condições desnaturantes utilizadas no gel. Porém, observamos que em muitos de nossos ensaios com anticorpos, essa banda era revelada, sugerindo reconhecimento espúrio. Para confirmar essa hipótese realizamos um teste usando anticorpo não-específico (feito em camundongo contra proteína bacteriana), e novamente foi observada reatividade com a proteína do plasma. Poderia ser uma proteína ligante de anticorpos ou com atividade peroxidase, mas qualquer explicação necessitaria maiores investigações. Assim, a detecção de proteínas em torno de 120 kDa pode sofrer interferência, e de fato essa seria uma posição

importante em nossos ensaios com anticorpo anti-FV, anti-FVIII e anti-fator de Von Willebrand, descritos a seguir.

5.1.1.9 Detecção de fator de von Willebrand e fator V nas frações de cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF

As frações de cromatografia das resinas de troca iônica Q-Sepharose FF foram analisadas por "western blot" com anticorpos anti-fator de Von Willebrand (FvW) (Figura 5.14) e anti-fator V (Figura 5.15).

O FvW é uma glicoproteína adesiva plasmática sintetizada pelas células endoteliais e megacariócitos; uma de suas funções é atuar como estabilizante do FVIII no sangue. Moléculas de von Willebrand formam complexos com o FVIII e também multímeros entre si, que atingem até 20 MDa.

Figura 5.14 Análise da presença de fator de Von Willebrand nas frações de cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF, por "western blot" usando anticorpo monoclonal anti-FvW (diluição 1:1000). SDS-PAGE (gradiente de poliácridamida 4 a 16%, condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Plasma (1,2 μ L); 2. FT (1,2 μ L); 3. Reeq (24 μ L); 4. Q250 (24 μ L); 5. Q500 A (24 μ L).

O perfil das bandas da Figura 5.13 indica que o FvW foi detectado principalmente nas frações Q250 e Q500. A sua recuperação na fração Q250, fração com pouca atividade de FVIII, indica que este fator é lavado principalmente com esta concentração salina. A presença de FvW na fração Q500 deve ser devido à sua participação no complexo com o FVIII, que se liga mais fortemente à coluna. Espera-se que nessas frações, os multímeros de von Willebrand sejam ao menos dímeros com cerca de 500 kDa, portanto bandeadas no topo do gel. Novamente, observa-se as bandas inespecíficas em torno de 120 kDa.

O fator V e o FVIII apresentam várias similaridades: atuam como cofatores de proteínas dependentes de vitamina K com atividade enzimática sobre outras proteínas dependentes de vitamina K da cascata de coagulação; ambos são inativados por proteólise limitada; possuem identidade de 40% na sequência de aminoácidos na região amino-terminal da cadeia pesada e na região carboxi-terminal da cadeia leve, assim como seqüências repetitivas internas semelhantes. O "western blot" com anti-FV visava detectar o padrão de bandas de FV para verificar posteriormente possível reatividade cruzada com anticorpos anti-FV e anti-FVIII.

Figura 5.15 Análise da presença de fator V nas frações de cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF, por "western blot" usando anticorpo anti-FV (diluição 1:1000). SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida 4 a 16%, condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Plasma (1,2 μ L); 2. FT (1,2 μ L); 3. Reeq (24 μ L); 4. Q250 (24 μ L); 5. Q500 A (24 μ L).

O FV é uma proteína de aproximadamente 330 kDa, tem domínios homólogos ao FVIII e se apresenta em concentração quase 100 vezes mais alta no plasma. É possível que a banda de fator V seja aquela revelada nas posições de alta massa molecular nas frações de plasma, FT, reequilíbrio, Q250 e na fração Q500. A banda inespecífica de aproximadamente 120 kDa indica que a reatividade nesse western foi menor que nos ensaios anteriores, não permitindo definir se haverá interferência de FV nos ensaios com FVIII.

5.1.2 Cromatografia de plasma ou de frações Q500 em resinas de gel filtração

Como segunda etapa na purificação de FVIII foi proposta a gel filtração da fração mais rica em FVIII, obtida da cromatografia de plasma em Q-Sepharose. A gel filtração poderia separar o complexo de alto peso FVIII-FvW das moléculas de menor massa molecular, como as proteínas dependentes de vitamina K.

Os testes de cromatografia de gel filtração visaram avaliar o perfil de recuperação de FVIII usando como amostra inicial plasma ou as frações de FVIII purificadas nas cromatografias de troca iônica. As resinas testadas foram Sepharose 4FF, Sepharose 6FF e Sephacryl S-200, com diferentes volumes de amostra inicial e diferentes condições de eluição.

5.1.2.1 Avaliação do empacotamento das colunas de gel filtração – teste com azul de dextran e riboflavina

As colunas para gel filtração foram empacotadas no laboratório e a qualidade do empacotamento e capacidade de separação foram avaliados utilizando-se padrões de peso molecular. O cromatograma (Figura 5.16) ilustra o teste realizado em coluna XK26 com 330 mL de resina Sepharose 4FF (60 cm altura) com azul de dextran e a riboflavina.

Figura 5.16 Teste de empacotamento de coluna de Sepharose 4FF com azul de dextran e riboflavina.

Através de inspeção visual, observamos durante a eluição da amostra que a coluna foi empacotada homogeneamente. O volume de eluição após injeção do azul de dextran foi de 152 mL (indicando o volume vazio da coluna), e o de riboflavina, foi de 370 mL. Diferentes polímeros de azul de dextran são excluídos em volumes intermediários usando solução com NaCl para eluição.

5.1.2.2 Determinação da correlação entre volume de eluição e massa molecular de proteína eluída na coluna de gel filtração Sepharose 4FF

Diferentes padrões de massa molecular foram cromatografados na coluna Sepharose 4FF para estabelecer a correlação dos volumes de eluição e massas moleculares (Figura 5.17).

Figura 5.17 Determinação do volume de eluição de padrões de massa molecular na coluna de gel filtração Sepharose 4FF.

Os valores de massas moleculares e volumes de eluição (medidos no centro dos picos) obtidos, bem como os volumes de eluição de azul de dextran e riboflavina, estão na Tabela 5.12.

Tabela 5.12 Volumes de eluição de padrões de massa molecular da coluna Sepharose 4FF.

Amostra	Massa Molecular (kDa)	Volume (mL)
Riboflavina	0,3764	370
Anidrase-carbônica	29	316
Albumina	66	304
β -Amilase	200	304
Tiroglobulina	669	262
Azul-dextran	2.000.000	152

Os dados de volume de eluição versus massa molecular foram usados para avaliar a massa molecular do complexo FVIII/FvW na cromatografia de gel filtração de plasma e verificar a separação das proteínas de mais baixa massa molecular. Algumas proteínas do plasma facilmente identificáveis, como albumina, foram usadas como padrão.

Considerando que o intervalo de fracionamento atribuído à resina Sepharose 4FF pelo fabricante, entre 6×10^4 e 2×10^7 , construímos uma curva de calibração usando somente o azul dextran, a tiroglobulina e a β -amilase, que possuem massas moleculares dentro deste intervalo (Figura 5.18).

Figura 5.18 Curva de calibração para a coluna Sepharose 4FF correlacionando a massa molecular da proteína e seu volume de eluição.

5.1.2.3 Gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF

A resina Sepharose 4FF separa proteínas na faixa de peso molecular 6×10^4 e 2×10^7 kDa. Está descrito na literatura um processo de separação de complexos contendo atividade de FVIII nos volumes iniciais (0,5 VC) da cromatografia de plasma nessa resina. Elaboramos ensaios de gel filtração de plasma para posteriormente comparar com a gel filtração de frações com maior atividade de FVIII (Q500) das cromatografias de plasma em resinas de troca iônicas.

Apresentamos abaixo o resultado da cromatografia realizada com aplicação de 75 mL de plasma na coluna de 330 mL de resina Sepharose 4FF. O plasma foi aplicado diretamente à coluna pré-equilibrada com tampão citrato 85 mM NaCl.

O perfil da cromatografia está apresentado na Figura 5.19. Foram coletadas frações de 50 mL para dosagem de proteína e atividade de FVIII. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações foram calculadas e os dados estão na Tabela 5.13.

Figura 5.19 Cromatografia de plasma em resina de gel filtração (Sephacrose 4FF). O cromatograma mostra absorvância em 280 nm (contínuo) e atividade de FVIII (tracejado) da solução sendo eluída da coluna.

A atividade de FVIII foi encontrada nas frações iniciais da gel filtração de plasma, em volume equivalente ao de eluição do azul de dextran, denotando massa molecular da ordem de 2 milhões de Da. A atividade se distribui nas regiões de mais alta massa molecular, em acordo com a massa esperada do complexo FVIII/Fator de von Willebrand. Na verdade, a distribuição da atividade de FVIII infere que a maior parte do FVIII está incluída em grandes complexos de von Willebrand.

Amostras das frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 5.20).

Figura 5.20 SDS-PAGE de cromatografia gel filtração de plasma em Sepharose 4FF. Gel 7,5% Canaletas: 1. Plasma (1 μ L); 2. GF1 (20 μ L); 3. GF2 (20 μ L); 4. GF3 (20 μ L); 5. GF4 (1 μ L); 6. GF5 (1 μ L); 7. GF6 (1 μ L); 8. GF7 (1 μ L); 9. GF8 (20 μ L); 10. GF9 (20 μ L).

Tabela 5.13 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF.
Aplicação de 75 mL de amostra

Fração	Volume da fração (mL)	Volume médio de eluição (mL)	% Atividade	Atividade total na fração (U)	Recuperação de atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total na fração (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Plasma	75	-	94,42	7082	100	72,27	5420	1,31	1
GF1	50	75	-4,04	0	0	0,04	2	0	0
GF2	50	125	1,73	87	1,22	-0,01	0	0	0
GF3	50	175	67,50	3375	47,66	0,10	5	691,48	527,8
GF4	50	225	35,38	1769	24,98	-0,17	0	0	0
GF5	50	275	20,58	1029	14,53	16,55	827	1,24	0,9
GF6	50	325	6,15	308	4,34	39,34	1967	0,16	0,1
GF7	50	375	-0,58	0	0	4,49	225	0	0
GF8	50	425	-0,77	0	0	0,06	3	0	0
GF9	50	475	-2,12	0	0	0	0	0	0

Observa-se que a fração 6 (volume médio de eluição 325 mL) apresentou a maior quantidade de proteínas e a fração 3 (volume médio de eluição 175 mL) apresentou maior atividade de FVIII, portanto com boa definição de separação entre as frações com maior atividade de FVIII e frações com mais proteínas. A recuperação de atividade total de FVIII nesta cromatografia foi de 87%.

5.1.2.4 Detecção de fator IX, fator X e fator de von Willebrand nas frações de gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF

As frações de cromatografia de plasma em resina Sepharose 4FF foram analisadas por “western blot” usando anticorpos monoclonais anti-FIX e anti-FX. O objetivo desses ensaios era o de estimar a separação destes fatores em relação às frações com maior atividade de FVIII. De acordo com a literatura, a resinas seria adequada para separar o complexo de alta massa FVIII FvW (>400 kDa) dos demais fatores de coagulação, com massa molecular em torno de 60 kDa. O resultado do ensaio de “western blot” com anti FIX confirma essa separação (Figura 5.21).

Figura 5.21 Análise da presença de fator IX nas frações de gel filtração plasma em resina Sepharose 4FF, por "western blot" usando anticorpo monoclonal anti-FIX (diluição 1:1000). SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida 4 a 16%, condição não redutora). Revelação com DAB. Canaletas: 1. Plasma (2 µL); 2. GF1 (28 µL); 3. GF2 (28 µL); 4. GF3 (28 µL); 5. GF4 (20 µL); 6. GF5 (15 µL); 7. GF6 (15 µL); 8. GF7 (15 µL); 9. GF8 (25 µL).

Nas frações de gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF, o fator IX foi detectado nas frações 5, 6 e 7 (eluídas com volume médio 275, 325 e 375 mL) em posições de massa molecular aproximada 60kDa. Novamente foi observada a banda inespecífica de 120 kDa.

O gráfico abaixo (Figura 5.22) ilustra a separação encontrada entre frações com atividade de FVIII e as frações com fator IX e supostamente outros fatores de coagulação dependentes de vitamina K.

Figura 5.22 Distribuição da atividade de FVIII e detecção de fator IX nas frações da gel filtração de plasma em Sepharose 4FF. Atividade de FVIII medida por método cromogênico. Detecção de FIX por "western blot".

As frações de cromatografia de plasma em resina Sepharose 4FF foram analisadas quanto à distribuição de fator de von Willebrand por "western blot" (Figura 5.23).

Figura 5.23 Análise da presença de fator de Von Willebrand nas frações de gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF, por "western blot" usando anticorpo monoclonal anti-FvW (diluição 1:1000). SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida 4 a 20%, condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Plasma (2 μ L); 2. GF1 (24 μ L); 3. GF2 (24 μ L); 4. GF3 (24 μ L); 5. GF4 (20 μ L); 6. GF5 (15 μ L); 7. GF6 (15 μ L); 8. GF7 (15 μ L); 9. GF8 (23 μ L).

O monômero do fator de Von Willebrand, com massa de 220 kDa, forma multímeros e se apresentaria no plasma ao menos como dímero. O fator é detectado nos volumes iniciais da gel filtração e também nas frações de mais baixa massa molecular, indicando as diferentes formas de multímeros. Novamente, a proteína de ligação inespecífica de anticorpo é detectada, determinando banda forte na posição em torno de 120 kDa.

5.1.2.5 Análise da capacidade de separação da resina Sepharose 4FF por aumento do volume de plasma aplicado

O ensaio descrito a seguir foi realizado com a aplicação de 95 mL de plasma (30% do VC) para avaliar a capacidade de separação de frações com atividade FVIII das frações com mais massa protéica. A recomendação para essa resina no ensaio é de aplicação de 25% do VC, porém avaliamos se o processo poderia ser mais produtivo. O plasma foi aplicado diretamente à coluna de 320 mL de resina pré-equilibrada com tampão citrato 85 mM NaCl.

O perfil da cromatografia está apresentado na Figura 5.24. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações estão na Tabela 5.14.

Figura 5.24 Gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF. O cromatograma mostra absorbância em 280 nm (contínuo) e atividade de FVIII (tracejado) da solução sendo eluída da coluna. A atividade de FVIII foi medida pelo método cromogênico.

Tabela 5.14 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF. Aplicação de 95 mL de amostra

Fração	Volume da fração (mL)	Volume médio eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Plasma	95	-	95,49	9072	100	79,75	7576	1,20	1
GF1	50	100	-4,16	0	0	-0,01	0	0	0
GF2	50	150	34,57	1729	19,06	0,08	4	432,18	360
GF3	50	200	63,08	3154	34,77	0,61	31	103,17	86,0
GF4	50	250	18,37	918	10,12	4,66	233	3,95	3,3
GF5	50	300	6,07	303	3,34	3,13	156	1,94	1,6
GF6	50	350	-1,63	0	0	2,36	118	0	0
GF7	50	400	-3,13	0	0	0,41	20	0	0
GF8	50	450	-3,93	0	0	1,35	67	0	0
GF9	50	500	-4,05	0	0	-0,01	0	0	0

Observa-se que a fração 4 (volume médio de eluição 250 mL) apresentou a maior quantidade de proteínas e a fração 3 (volume médio de eluição 200 mL) apresentou maior atividade de FVIII. A recuperação de FVIII total nesta cromatografia foi de 67%.

Mesmo com o aumento de volume de 25 para 30% do VC, o perfil cromatográfico não se alterou, resultando em separação da atividade de FVIII da maior parte das proteínas plasmáticas.

A Figura 5.25 mostra que as atividades totais recuperadas nos experimentos com 75 ou 95 mL foram semelhantes, com mais alta atividade específica recuperadas nas frações GF2 ou GF3. Mais alta atividade específica foi atingida no ensaio em que se aplicou 75 mL de plasma, porém no ensaio com 95 mL de plasma houve perda de atividade total, uma variável mais relacionada com a matéria prima do que com o processo. Acreditamos que seria possível trabalhar com volume de plasma 30% de VC, mas para indicação em escalonamento isso deveria ser analisado mais cuidadosamente. As massas de proteína recuperadas foram compatíveis com os volumes de amostra aplicados.

Figura 5.25 Comparação entre as massas de proteína e atividades de FVIII recuperadas nos experimentos em que se aplicou 75 ml ou 95 ml de plasma a Sepharose 4FF.

5.1.2.6 Gel filtração de frações Q500 obtidas das cromatografias de plasma em resinas de troca iônica em resina Sepharose 4FF

A matriz das resinas Q-Sepharose XL e Q-Sepharose BB apresentam características ligeiramente diferentes da Q-Sepharose FF. Diferentes amostras Q500, obtidas de cromatografias de plasma nas 3 resinas de troca iônica, foram cromatografadas em resina de gel filtração Sepharose 4FF.

Nos ensaios de gel filtração, as amostras Q500A (200 mL iniciais) de duas cromatografias eram somadas e concentradas por ultrafiltração tangencial em sistema Labscale® com membranas tipo Pellicon, como descrito em 4.2.11. Em geral, as amostras de 400 mL eram concentradas cerca de 4 vezes para aplicação em Sepharose 4FF ou Sepharose 6FF.

Os perfis das cromatografias e distribuição da atividade de FVIII nas frações estão apresentados na Figura 5.26. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações estão nas Tabelas 5.15 a 5.17.

Diferente da gel filtração direta de plasma, na qual se recuperou o FVIII nas frações iniciais da cromatografia (volumes de eluição de proteínas de alta massa molecular), na gel filtração de Q500 obtido de troca iônica, a atividade de FVIII foi recuperada em frações correspondentes à eluição de proteínas de menor massa molecular. Experimentos anteriores do laboratório mostraram a eluição de FVIII em pico único nestas frações.

Nas gel filtrações de Q500 obtidos de Q-Sepharose FF e de Q-Sepharose BB, observa-se recuperação de atividade de FVIII em uma faixa ampla de eluição, entre as frações 3 a 6, com volumes de eluição médios entre 175 e 325 mL. Observa-se dois picos de atividade, sendo que a fração 5 (volume médio de eluição 275 mL) apresentou maior quantidade de proteínas e de atividade de FVIII. O primeiro pico de eluição (fração 3, em 175 mL) apresenta mais alta atividade específica de FVIII.

Na gel filtração de Q500 XL, observa-se apenas um pico de eluição de FVIII deslocado para volume de eluição de proteínas de mais baixa massa molecular. A fração 5 (volume médio de eluição 275 mL), novamente, apresentou a maior quantidade de proteínas e de atividade de FVIII.

A recuperação de FVIII nas gel filtrações de Q500FF, Q500BB e Q500 XL foi 139%, 111% e 48% respectivamente em relação à amostra aplicada. É possível que a perda de atividade de FVIII na gel filtração de Q500XL e a ausência dos complexos de FVIII de mais alta massa molecular estejam relacionadas. Outras hipóteses foram consideradas, porém não podemos explicar o padrão diferente sem mais ensaios.

As amostras das frações da gel filtração de Q500FF foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 5.27).

Figura 5.27 Análise das frações de gel filtração de Q500FF em Sepharose 4FF por SDS-PAGE. Gel 7,5%. Amostras 1. Plasma (0,8 μ L); 2. Q500 concentrado (0,8 μ L); 3. GF1 (16 μ L); 4. GF2 (16 μ L); 5. GF3 (16 μ L); 6. GF4 (16 μ L); 7. GF5 (0,8 μ L); 8. GF6 (0,8 μ L); 9. GF7 (16 μ L); 10. GF8 (16 μ L).

Q-Seph FF

Q-Seph XL

Q-Seph

Figura 5.26 Gel filtração de frações Q500 de cromatografias de troca iônica em resina Sepharose 4FF. Frações Q500 de cromatografias em Q-Sepharose FF, Q-Sepharose XL ou Q-Sepharose BB foram concentradas e aplicada para gel filtração. Os cromatogramas mostram absorvância em 280 nm (linha contínua) e atividade de FVIII (linha tracejada) da solução sendo eluída da coluna. A atividade de FVIII foi medida pelo método cromogênico.

Tabela 5.15 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de gel filtração de Q500 de cromatografia de troca iônica de **Q-Sepharose FF** em resina Sepharose 4FF

Fração	Volume fração (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. Atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Ativ. Espec. (U/mg)	Fator purific.
Primeira Q-Sepharose FF								
Plasma	500	94,42	47212	100	72,27	36134	1,31	1
FT	500	-1,73	0	0	64,71	32355	0	0
Reeq	500	-2,50	0	0	8,18	4088	0	0
Q250	500	29,42	14712	31,16	0,74	368	40,0	30,5
Q500A	200	127,88	25577	54,18	0,72	144	178	135,6
Q500B	300	1,15	346	0,73	0,04	11	30,5	23,3
Segunda Q-Sepharose FF								
Plasma	500	94,42	47212	100,00	72,27	36134	1,31	1
FT	500	0,38	192	0,41	58,60	29302	0,01	0
Reeq	500	0,00	0	0,00	7,25	3623	0	0
Q250	500	32,12	16058	34,01	0,80	400	40,14	30,6
Q500A	200	132,69	26538	56,21	0,75	150	177	134,7
Q500B	300	3,65	1096	2,32	0,03	10	106	81,1
Concentração por ultrafiltração								
Pool	400	147,69	59077	100	0,80	319	185,0	141,2
Perm	320	-1,92	0	0	0	0	0	0
Q500 Conc	80	298,65	23892	40	3,59	287	83,2	63,5

Fração	Volume fração (mL)	Volume médio eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Ativ. Espec. (U/mg)	Fator purific.
Gel filtração									
Q500 Conc	75	-	298,65	22399	100	3,59	269	83,23	63,5
GF1	50	75	-0,58	0	0	0	0	0	0
GF2	50	125	15,77	788	3,52	0	0	9353	7140
GF3	50	175	135,38	6769	30,22	0,02	1	6268	4785
GF4	50	225	96,15	4808	21,46	0,78	39	123,8	94,5
GF5	50	275	213,65	10683	47,69	2,67	134	79,96	61,0
GF6	50	325	164,62	8231	36,75	2,32	116	71,03	54,2
GF7	50	375	4,62	231	1,03	0,14	7	33,38	25,5
GF8	50	425	-2,88	0	0	0	0	0	0

Tabela 5.16 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de gel filtração de Q500 de cromatografia de troca iônica de **Q-Sepharose XL** em resina Sepharose 4FF

Fração	Volume fração (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Ativ. Espec. (U/mg)	Fator purific.	
Primeira Q-Sepharose FF									
Plasma	500	105,47	52733	100	75,58	37790	1,40	1	
FT	500	9,47	4733	8,98	66,99	33495	0,14	0,1	
Reeq	500	8,80	4400	8,34	2,55	1274	3,45	2,5	
Q200	500	10,13	5067	9,61	1,14	569	8,91	6,4	
Q500A	200	80,13	16027	30,39	0,96	192	83,47	59,6	
Q500B	300	10,13	3040	5,76	0,07	21	144,76	103,4	
Segunda Q-Sepharose FF									
Plasma	500	105,47	52733	100	75,58	37790	1,40	1	
FT	500	10,80	5400	10,24	69,36	34680	0,16	0,1	
Reeq	500	9,47	4733	8,98	5,29	2647	1,79	1,3	
Q200	500	8,80	4400	8,34	0,64	322	13,7	9,8	
Q500A	200	51,47	10293	19,52	1,05	210	49,0	35,0	
Q500B	300	12,13	3640	6,90	0,07	21	173,3	123,8	
Concentração por ultrafiltração									
Pool	400	74,80	29920	100	0,91	364	82,2	58,7	
Perm	320	6,13	1963	7	0	1	1648	1177	
Q500 Conc	85	284,13	24151	81	5,0	425	56,9	40,6	
Fração	Volume fração (mL)	Volume médio eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. Ativ. (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Ativ. Espec. (U/mg)	Fator purific.
Gel filtração									
Q500 Conc	75	-	284,13	21310	100	5,00	375	56,88	40,6
GF1	50	75	8,80	440	2,06	0	0	0	0
GF2	50	125	8,80	440	2,06	0,01	0	1421	1015
GF3	50	175	11,47	573	2,69	0,04	2	284,2	203,0
GF4	50	225	22,80	1140	5,35	0,89	45	25,6	18,3
GF5	50	275	84,13	4207	19,74	3,15	158	26,7	19,0
GF6	50	325	58,13	2907	13,64	2,82	141	20,6	14,7
GF7	50	375	8,80	440	2,06	0,28	14	31,0	22,2

Tabela 5.17 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de gel filtração de Q500 de cromatografia de troca iônica de **Q-Sepharose BB** em resina Sepharose 4FF

Fração	Volume fração (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. Atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Ativ. Espec. (U/mg)	Fator purific.
Primeira Q-Sepharose FF								
Plasma	500	105,37	52685	100,00	63,55	31773	1,66	1
FT	500	9,07	4537	8,61	56,57	28285	0,16	0,1
Reeq	500	6,85	3426	6,50	7,18	3588	0,95	0,6
Q200	500	16,85	8426	15,99	0,42	211	39,92	24,1
Q500A	200	121,30	24259	46,05	1,32	265	91,58	55,2
Q500B	300	8,70	2611	4,96	0,10	29	90,65	54,6
Segunda Q-Sepharose FF								
Plasma	500	105,37	52685	100,00	63,55	31773	1,66	1
FT	500	11,67	5833	11,07	57,44	28721	0,20	0,1
Reeq	500	7,22	3611	6,85	7,60	3798	0,95	0,6
Q200	500	12,41	6204	11,78	0,35	177	35,10	21,1
Q500A	200	83,52	16704	31,70	1,26	252	66,41	40,0
Q500B	300	7,59	2278	4,32	0,10	30	76,53	46,1
Concentração por ultrafiltração								
Pool	400	65,37	26148	100	1,14	458	57,13	34,4
Perm	320	7,59	2430	9	0	0	0,00	0
Q500 Conc	85	195,37	16606	64	4,30	365	45,46	27,4

Fração	Volume fração (mL)	Volume médio eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Ativ. Espec. (U/mg)	Fator purific.
Gel filtração									
Q500 Conc	75	-	195,37	14653	100	4,30	322	45,46	27,4
GF1	50	75	7,59	380	2,59	0	0	0	0
GF2	50	125	13,15	657	4,49	0,01	0	1753	1056
GF3	50	175	73,89	3694	25,21	0,07	4	1056	636
GF4	50	225	56,85	2843	19,40	0,53	26	107,93	65,0
GF5	50	275	86,85	4343	29,64	3,58	179	24,27	14,6
GF6	50	325	67,22	3361	22,94	3,08	154	21,79	13,1
GF7	50	375	8,33	417	2,84	1,25	62	6,67	4,0
GF8	50	425	11,67	583	3,98	0	0	3401	2049

5.1.2.7 Detecção de fator IX, fator X e fator de von Willebrand nas frações de gel filtração de Q500 em Sepharose 4FF

Os fatores de coagulação IX e X são eluídos juntamente com o FVIII, nas frações Q500 das cromatografias de troca iônica. Sua presença sugere ser provável a presença de outros fatores dependentes de vitamina K que apresentam atividade degradativa do FVIII. A segunda etapa de purificação de FVIII, em uma coluna de gel filtração, tinha por objetivo a separação do FVIII destes fatores.

Frações de gel filtração de plasma ou de Q500 em resina Sepharose 4FF foram analisadas por "western blot" com anticorpos anti-FIX e anti-FX. O objetivo desses ensaios era avaliar a separação desses fatores das frações contendo FVIII. A Figura 5.27 mostra os "western blots" das frações de gel filtração de Q500FF. Os resultados foram semelhantes para as gel filtrações com Q500XL e Q500BB.

Figura 5.27 Análise da presença de fatores IX e X nas frações de gel filtração de Q500FF em Sepharose 4FF, por "western blot" usando anticorpo monoclonal anti-IX e anti-X (diluição 1:1000). SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida 4 a 16%, condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Q500 concentrado (15 μ L); 2. GF1 (28 μ L); 3. GF2 (28 μ L); 4. GF3 (28 μ L); 5. GF4 (28 μ L); 6. GF5 (26 μ L); 7. GF6 (26 μ L); 8. GF7 (26 μ L); 9. GF8 (28 μ L).

Usando as análises de “western blot” de frações das gel filtrações dos três Q500 e as dosagens de FVIII, elaboramos os gráficos representativos das sobreposições dos fatores (Figura 5.28).

Figura 5.28 Distribuição da atividade de FVIII e presença de fatores IX e X nas frações de gel filtração de Q500FF, XL e BB em Sepharose 4FF. Volume de coluna 330 mL. Nos gráficos estão indicadas as posições das frações com FIX e FX detectados por “western blot”.

A Figura 5.28 ilustra a sobreposição de eluição de FVIII com os fatores IX e X nas três gel filtrações. A comparação entre as frações com atividade de FVIII e as frações com detecção de fatores IX e X mostra que a maior parte do FVIII é eluído nas mesmas frações que estes, sugerindo que a resina Sepharose 4FF não é indicada para a purificação de FVIII a partir de Q500.

Comparando a eluição de FVIII na gel filtração de plasma com as de Q500 observamos que o processo induz a diminuição do complexo que contém FVIII, deslocando o volume de eluição para região de massa molecular mais baixa.

As frações de gel filtração de Q500 em resina Sepharose 4FF foram analisadas quanto à presença de fator de Von Willebrand, por "western blot" (Figura 5.29).

Figura 5.29 Análise da presença de fator de Von Willebrand nas frações gel filtração de Q500FF em resina Sepharose 4FF, por "western blot" usando anticorpo monoclonal anti-FvW (diluição 1:1000). SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida 4 a 20%, condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Q500 concentrado (15 μ L); 2. GF1 (24 μ L); 3. GF2 (24 μ L); 4. GF3 (24 μ L); 5. GF4 (24 μ L); 6. GF5 (22,5 μ L); 7. GF6 (22,5 μ L); 8. GF7 (24 μ L); 9. GF8 (24 μ L).

O fator de Von Willebrand foi detectado nas frações GF4 a GF7 (canaletas 5 a 8). em posição bem acima de 200 kDa, em volume médio de eluição entre 275 e 375 mL, frações em que se observa atividade de FVIII.

5.1.2.8 Avaliação da eluição do complexo fator VIII/fator von Willebrand em gel filtração de plasma em Sepharose 4FF, em presença de 500 mM de NaCl

A comparação de perfis de gel filtração de plasma e de Q500 indicou que após a cromatografia de troca iônica, a maior parte de FVIII era recuperada em frações de mais baixa massa molecular. O FVIII recuperado de gel filtração de plasma eluiu nos volumes iniciais da cromatografia, ~0,5VC (175 mL), enquanto na gel filtração de Q500 o FVIII eluiu em ~0,8 VC (275 mL) juntamente com a maior parte das proteínas de massa molecular mais baixa.

Uma das hipóteses levantadas era que a menor massa molecular estaria relacionada com ativação de FVIII, o qual se torna um heterotrímero de menor massa molecular. Como se verificou que a atividade de FVIII na fração eluída de gel filtração de Q500 era mantida, essa hipótese foi descartada.

Também foi cogitado que a coluna de troca iônica Q-Sepharose ou as condições de eluição com alta concentração de NaCl (500 mM) poderiam dissociar os grandes complexos FVIII / Von Willebrand. Dados da literatura indicam que altas concentrações de CaCl_2 ou NaCl podem causar essa dissociação. Para avaliar essa hipótese, NaCl foi adicionado ao plasma para concentração final 500 mM, e esse plasma foi aplicado à coluna de Sepharose 4FF. A mesma concentração de sal foi usada no equilíbrio da coluna e na solução de eluição.

O perfil da cromatografia está apresentado na Figura 5.30. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações estão na Tabela 5.18.

Figura 5.30 Gel filtração de plasma contendo 500 mM de NaCl em resina Sepharose 4FF. O cromatograma mostra absorbância em 280 nm (contínuo) e atividade de FVIII (tracejado) da solução sendo eluída da coluna. A atividade de FVIII foi medida pelo método cromogênico.

Tabela 5.18 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de gel filtração de plasma com 500 mM de NaCl, em resina Sepharose 4FF

Fração	Volume da fração (mL)	Volume médio de eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Plasma	75	-	96,42	7231	100	63,32	4749	1,52	1
GF1	30	45	-6,37	0	0	-0,01	0	0	0
GF2	30	75	-6,60	0	0	-0,01	0	0	0
GF3	30	105	-5,91	0	0	0,00	0	0	0
GF4	30	135	-4,05	0	0	0,06	2	0	0
GF5	30	165	-2,88	0	0	0,14	4	0	0
GF6	30	195	-4,51	0	0	0,54	16	0	0
GF7	30	225	43,40	1302	18,0	3,19	96	13,60	8,9
GF8	30	255	73,40	2202	30,5	17,20	516	4,27	2,8
GF9	30	285	32,00	960	13,3	52,34	1570	0,61	0,4
GF10	30	315	4,79	144	1,99	65,35	1960	0,07	0
GF11	30	345	-1,02	0	0	40,64	1219	0	0
GF12	30	375	-2,88	0	0	12,03	361	0	0
GF13	30	405	-5,91	0	0	0,35	10	0	0
GF14	30	435	-5,91	0	0	0,09	3	0	0
GF15	30	465	-5,67	0	0	0,04	1	0	0
GF16	30	495	-5,91	0	0	0,02	1	0	0

Observa-se que a fração 10 (volume médio de eluição 315 mL) apresentou a maior quantidade de proteínas e a fração 8 (volume médio de eluição 255 mL) apresentou maior atividade de FVIII. A recuperação de FVIII nesta cromatografia foi de 64%.

Verifica-se que também houve deslocamento da fração de eluição do plasma contendo 500 mM de NaCl, embora não tão acentuado como quando se trabalhou com a fração Q500. Houve deslocamento do pico de eluição de FVIII, se comparado as cromatografias de plasma realizadas com equilíbrio com tampões citrato com 85 mM NaCl. Os resultados corroboram os dados antigos da literatura, de que a presença de NaCl em alta molaridade afeta o complexo protéico que inclui o FVIII, diminuindo a massa do multímero, quando comparado ao do plasma.

5.1.2.9 Gel filtração de Q300 em resina Sepharose 4FF

O perfil de distribuição de FVIII na gel filtração de plasma difere do perfil na gel filtração de Q500, o que pode estar relacionado com a presença de alta concentração de NaCl dissociando complexos protéicos. O experimento descrito a seguir visava analisar se a concentração de sal ou a resina de troca iônica promoviam as modificações na distribuição do FVIII.

Foi desenhada uma cromatografia de plasma em resina de troca iônica, sendo a eluição feita com tampão contendo 300 mM de NaCl, ao invés da concentração usual de 500 mM. Os experimentos de eluição de troca iônica com gradiente de sal mostraram que quantidade considerável de FVIII era eluída na concentração de 300 mM de NaCl. Essa fração de eluição, Q300, foi concentrada e utilizada para gel filtração. A resina de troca iônica utilizada nesse ensaio foi Q-Sepharose BB. O perfil da cromatografia está apresentado na Figura 5.31. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações estão na Tabela 5.19.

Figura 5.31 Gel filtração de fração Q300 BB concentrada em resina Sepharose 4FF. O cromatograma mostra absorvância em 280 nm (contínuo) e atividade de FVIII (tracejado) da solução sendo eluída da coluna. A atividade de FVIII foi medida pelo método cromogênico.

Observa-se que a fração 9 (volume médio de eluição 285 mL) apresentou a maior quantidade de proteínas e a fração 8 (volume médio de eluição 255 mL) apresentou maior atividade de FVIII. A recuperação de FVIII nesta cromatografia foi de 111%.

Verificou-se que os picos de atividade de FVIII e de proteínas não correspondem, mas a distância entre eles é significativamente maior que a observada em gel filtração de Q500 e bastante semelhante à observada com gel filtração de plasma com 500 mM de NaCl. Esses resultados confirmam a hipótese de interferência do sal, diminuindo a massa molecular do complexo protéico que contém o FVIII.

Tabela 5.19 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de gel filtração de Q300 de cromatografia de troca iônica de Q-Sepharose BB em resina Sepharose 4FF

Fração	Vol. fração (mL)	Vol. médio eluição (mL)	% Atividade	Ativ. total (U)	Recup. ativ. (%)	[prot.] (mg/ml)	Prot. total (mg)	Ativ. espec. (U/mg)	Fator de purif.
Troca iônica –Q-Sepharose BB									
Plasma	500	-	99,35	49676	10	66,50	33251	1,49	1
FT	500	-	20,97	10485	21,11	59,71	29855	0,35	0,2
Reeq	350	-	1,12	391	0,79	4,00	1401	0,28	0,2
Q300A	300	-	72,15	21644	43,57	1,52	457	47,35	31,8
Q300B	200	-	30,24	6047	12,17	0,34	68	88,93	59,7
Concentração									
Q300A	300	-	72,15	21644	100	1,52	457	47,35	31,8
Perm	225	-	0,68	152	0	0,01	3	54,94	36,9
Conc	85	-	180,09	15308	71	4,36	371	41,30	27,7
Gel filtração									
Conc	75	-	180,09	13507	100	4,36	327	41,30	27,7
GF1	30	45	0,53	16	0,12	-0,01	0	0	0
GF2	30	75	0,53	16	0,12	-0,01	0	0	0
GF3	30	105	0,97	29	0,22	-0,01	0	0	0
GF4	30	135	5,09	153	1,13	0,00	0	0	0
GF5	30	165	5,38	161	1,20	0,03	1	184,20	123,6
GF6	30	195	65,24	1957	14,5	0,22	7	290,72	195,1
GF7	30	225	117,44	3523	26,1	0,91	27	128,51	86,2
GF8	30	255	139,06	4172	30,9	2,56	77	54,28	36,4
GF9	30	285	89,65	2689	19,9	3,60	108	24,89	16,7
GF10	30	315	56,71	1701	12,6	3,20	96	17,70	11,9
GF11	30	345	19,65	589	4,36	1,34	40	14,68	9,8
GF12	30	375	-0,94	0	0,00	0,25	7	0	0
GF13	30	405	0,38	11	0,08	0,04	1	10,45	7,0
GF14	30	435	-0,94	0	0,00	0,01	0	0,00	0
GF15	30	465	-1,24	0	0,00	0,00	0	0,00	0

5.1.2.10 Gel filtração de plasma e de frações Q500 em resinas Sephacryl S-200 e Sepharose 6FF

Como comprovado em nossos ensaios, a fração Q500 das cromatografias de plasma em resina de troca iônica é enriquecida de FVIII, dos fatores IX e X e, provavelmente, dos outros fatores de coagulação dependentes de vitamina K.

Verificamos que a massa molecular do complexo protéico que contém o FVIII é diminuída no processo de troca iônica utilizado e que a gel filtração em Sepharose 4FF não foi eficiente em separar o FVIII dos outros fatores. Propusemos, então, investigar a possibilidade de utilização de outras resinas de gel filtração, usadas para separação de proteínas de massas moleculares menores. Foram testadas as resinas Sephacryl S-200 e a Sepharose 6 FF.

5.1.2.10.1 Gel filtração de plasma em resina Sephacryl S-200

A resina Sephacryl S-200 é usada para separação de proteínas na faixa de massa molecular 5 a 250 kDa. A gel filtração de Q500 nessa resina tinha por objetivo analisar a separação de FVIII, o qual deveria ser encontrado, supostamente no volume vazio da coluna.

Para comparação foi feita gel filtração de plasma aplicando-se 13 mL de amostra em 320 mL de resina (4%VC). Essa proporção é recomendada pelo fabricante para boa separação de proteínas da faixa de inclusão, embora fosse prevista a saída do FVIII no volume de exclusão.

Os perfis de distribuição de proteínas e de atividade de FVIII nas frações coletadas da gel filtração de plasma em Sephacryl S-200 estão na Figura 5.32. os dados das dosagens estão na Tabela 5.20.

Figura 5.32 Gel filtração de plasma em Sephacryl S-200. O gráfico mostra a distribuição de proteínas (dosagem por Bradford) (linha contínua) e a atividade de FVIII (dosada por cromogênico) (linha tracejada) nas frações coletadas.

As amostras das frações foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 5. 33).

Figura 5.33 Análise de amostras das frações de gel filtração de plasma em resina Sephacryl S-200, por SDS-PAGE. Gel de poliácridamida 7,5%. Amostras 1. GF1 (16 μ L); 2. GF2 (16 μ L); 3. GF3 (16 μ L); 4. GF4 (16 μ L); 5. GF5 (16 μ L); 6. GF6 (16 μ L); 7. GF7 (16 μ L); 8. GF8 (16 μ L); 9. GF9 (16 μ L); 10. "Pool" de Q500 (16 μ L); 11. Q500 concentrado (16 μ L).

Observa-se que a fração 4 (volume médio de eluição 208 mL) apresentou a maior quantidade de proteínas e a fração 3 (volume médio de eluição 158 mL) apresentou maior atividade de FVIII. A recuperação de FVIII nesta cromatografia foi de 74%. A fração de eluição de proteínas foi próxima à fração contendo FVIII, a despeito do baixo volume de amostra aplicado, porém houve separação considerável. Para melhor avaliação da separação seria necessário coletar frações de menor tamanho.

Tabela 5.20 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de gel filtração de Q500 de cromatografia plasma em resina Sephacryl S-200

Fração	Volume da fração (mL)	Volume médio de eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. de atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Plasma	13	-	100,04	1301	100	64,49	838	1,55	1
GF1	50	58	-3,93	0	0	0	0	0	0
GF2	50	108	-4,07	0	0	0,02	1	0	0
GF3	50	158	19,16	958	73,7	5,47	274	3,50	2,3
GF4	50	208	-2,46	0	0	10,08	504	0	0
GF5	50	258	-4,07	0	0	0,09	5	0	0
GF6	50	308	-3,19	0	0	0,01	1	0	0
GF7	50	358	-2,90	0	0	0	0	0	0,
GF8	50	408	-	-	0	0	0	0	0
GF9	50	458	-3,19	0	0	0,01	0	0,	0

5.1.2.10.2 Gel filtração de Q500 em resina Sephacryl S-200

A amostra Q500FF concentrada foi aplicada para gel filtração em 330 mL de resina Sephacryl S-200. Os perfis de distribuição de proteína e de atividade FVIII estão apresentados na Figura 5.34 e os dados de dosagem estão na Tabela 5.21.

Figura 5.34 Gel filtração de Q500 concentrado em Sephacryl S-200. O gráfico mostra a distribuição de proteínas (dosagem por Bradford) (linha contínua) e a atividade de FVIII (dosada por cromogênico) (linha tracejada) nas frações coletadas.

As amostras das frações de gel filtração de Q500 em resina Sephacryl S-200 foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 5.35).

Figura 5.35 Análise de amostras das frações de gel filtração de Q500 em resina Sephacryl S-200, por SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida 7,5%. Amostras 1. GF1 (16 μ L); 2. GF2 (16 μ L); 3. GF3.1 (16 μ L); 4. GF3.2 (16 μ L); 5. GF4.1 (16 μ L); 6. GF4.2 (16 μ L); 7. GF5 (16 μ L); 8. GF6 (16 μ L); 9. GF7 (16 μ L); 10. GF8 (16 μ L); 11. GF9 (16 μ L).

Tabela 5.21 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de cromatografia de troca iônica de Q-Sepharose FF para concentração e gel filtração em resina Sephacryl S-200

Fração	Volume da fração (mL)	Volume médio de eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recup. atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Troca iônica - Q-Sepharose FF									
Plasma	500	-	100,04	50022	100	64,49	32245	1,55	1
FT	500	-	-2,60	0	0	59,73	29863	0	0
Reeq	500	-	-4,51	0	0	5,21	2606	0	0
Q250	500	-	38,28	19140	38,26	1,63	813	23,53	15,2
Q500A	218	-	54,01	11775	23,54	0,79	173	68,02	43,9
Q500B	282	-	-1,72	0	0	0,03	9	0	0
Plasma	665	-	100,04	66529	100	64,49	42886	1,55	1
FT	500	-	-0,54	0	0	68,96	34481	0	0
Reeq	500	-	-2,46	0	0	4,60	2298	0	0
Q250	500	-	59,46	29728	44,68	1,59	793	37,47	24,2
Q500A	200	-	111,81	22362	33,61	1,02	204	110	70,8
Q500B	300	-	2,10	631	0,95	0,04	11	59,99	38,7
Concentração									
Pool Q500	418	-	111,51	46613	100	0,74	311	150	96,7
Permeado	388	-	0,04	9359	0	0,00	1	25,64	16,5
Conc	30	-	311,96	17	20	18,27	548	17,08	11,0

Tabela 5.22 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações de gel filtração de Q500 de cromatografia de troca iônica de Q-Sepharose FF em resina Sephacryl S-200

	Volume da fração (mL)	Volume médio de eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recuperação de atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Gel filtração									
Conc.	13	-	311,96	4055	100	18,27	237	17,08	11
GF1	50	58	0,19	10	0,24	0	0	39,34	25,4
GF2	50	108	-0,54	0	0	0,01	0	0	0
GF3A	25	145,5	149,75	3744	92,31	0,96	24	156,6	101
GF3B	25	170,5	52,54	1314	32,39	3,32	83	15,81	10,2
GF4A	25	195,5	13,28	332	8,19	0,66	16	20,25	13,1
GF4B	25	220,5	0,93	23	0,57	0,03	1	32,56	21,0
GF5	50	258	7,69	385	9,48	0,01	1	556	359
GF6	50	308	8,57	429	10,57	0,01	0	1030	665
GF7	50	358	-0,10	0	0	0	0	0	0
GF8	50	408	-	-	0	0	0	0	0
GF9	50	458	-3,34	0	0	0	0	0	0

Na gel filtração de Q500 concentrado em resina Sephacryl S-200, a fração GF3 foi coletada em duas partes e se pode verificar que a fração GF3A, com mais FVIII, foi separada da fração com mais proteína, GF3B. A recuperação de FVIII nesta cromatografia foi de 98%.

A coluna Sephacryl S-200 HR foi utilizada de maneira informativa, para análise do volume de eluição do FVIII e distribuição de proteínas em gel filtração de plasma e de Q500 e para investigar a separação de FVIII das outras proteínas do plasma envolvidas na cascata de coagulação. Era previsto que a molécula de FVIII estivesse complexada ao menos a uma molécula de von Willebrand e, portanto, com massa molecular maior que 400 kDa. Nesse caso o FVIII seria eluído no volume de exclusão, separado das outras proteínas dependentes de vitamina K.

5.1.2.11 Detecção de fator X nas frações de gel filtração de plasma e de Q500 em resina Sephacryl S-200

Os ensaios de “western blot” foram realizados com as frações coletadas de cromatografias de plasma em troca iônica e frações de gel filtração de plasma e de Q500FF em resina Sephacryl S-200, para confirmar se o FVIII era eluído separadamente dos fatores IX e X. Usando gel filtração em Sephacryl S-200, seria esperado eluir o fator X em frações de inclusão das resinas (Figura 5.36).

Figura 5.36 Análise da presença de fator X nas frações de cromatografia de plasma em resina Q-Sepharose FF e em frações gel filtração de plasma ou de Q500 em Sephacryl S-200 por "western blot" usando anticorpo monoclonal anti-FX (diluição 1:1000). SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida 5 a 20%, condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Plasma (1,5 μ L); 2. GF3-plasma (16 μ L); 3. GF4-plasma (16 μ L); 4. Q500 concentrado (10 μ L); 5. GF3A-Q500 (16 μ L); 6. GF3B-Q500 (16 μ L); 7. GF4A-Q500 (16 μ L); 8. FT-QFF (16 μ L); 9. Q250 QFF (16 μ L).

Das frações amostradas no “western blot”, a atividade de FVIII foi encontrada em GF3-plasma da gel filtração de plasma (canaleta 2) e GF3A-Q500 da gel filtração de Q500 (canaleta 5). Nessas frações podem ser detectadas bandas tênues de fator X. Nota-se que o fator X foi eluído nas frações subseqüentes nessas gel filtrações (GF4-plasma, e GF3B-Q500), indicando a separação de FVIII das proteínas dependentes de vitamina K. No FT de troca iônica, o fator X não é detectado, mas sim nas frações Q250 e Q500, como mostrado anteriormente.

5.1.2.12 Gel filtração de plasma em resina Sepharose 6FF

A resina Sepharose 6FF é usada para separação de proteínas na faixa de massa molecular 1×10^4 e 4×10^6 kDa, enquanto a resina Sepharose 4FF separa proteínas na faixa de 6×10^4 e 2×10^7 kDa. Os ensaios de gel filtração de plasma e de Q500 em resina Sepharose 6FF foram propostos para avaliar a separação de FVIII das proteínas dependentes de vitamina K e comparação com gel filtração em resina Sepharose 4FF.

No ensaio descrito, foram aplicados 95 mL de plasma a 380 mL de coluna pré-equilibrada com tampão citrato 85 mM NaCl. O volume de coluna era maior que o usado com Sepharose 4FF, mas manteve-se a porcentagem de volume de amostra aplicado.

O perfil da cromatografia está apresentado na Figura 5.37 e as concentrações de proteína e as atividades de FVIII dosadas nas frações estão apresentadas na Tabela 5.23. Amostras das frações foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 5.38).

Figura 5.37 Gel filtração de plasma em resina Sepharose 6FF. O cromatograma mostra absorbância em 280 nm (contínuo) e atividade de FVIII (tracejado) da solução sendo eluída da coluna. A atividade de FVIII foi medida pelo método cromogênico.

Tabela 5.23. Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da gel filtração de plasma em resina Sepharose 6FF

Fração	Volume da fração (mL)	Volume médio de eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recuperação de atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Plasma	95	-	97,92	9302	100	51,56	4898	1,90	1
GF5	30	135	-1,92	0	0	0,00	0,06	0	0
GF6	30	165	29,89	897	9,64	0,09	2,64	340,12	179,0
GF7	30	195	92,18	2765	29,73	0,27	8,11	341,13	179,5
GF8	30	225	70,38	2111	22,70	1,19	35,68	59,17	31,1
GF9	30	255	18,25	547	5,88	3,49	104,8	5,22	2,7
GF10	30	285	3,98	120	1,28	10,77	323,2	0,37	0,2
GF11	31	315,5	1,69	52	0,56	29,38	910,6	0,06	0
GF12	29	344,5	-0,77	0	0	51,01	1479	0	0
GF13	30	375	-4,38	0	0	31,36	940,8	0	0
GF14	39	409,5	-4,70	0	0	19,61	764,9	0	0
GF15	21	439,5	-5,20	0	0	7,84	164,6	0	0
GF16	30	465	-5,52	0	0	0,90	26,9	0	0
GF17	30	495	-5,36	0	0	0,04	1,14	0	0
GF18	30	525	-2,90	0	0	0,03	0,97	0	0
GF19	30	555	-3,39	0	0	0,02	0,63	0	0

Figura 5.38 Análise de amostras das frações de gel filtração de plasma em resina Sepharose 6FF, por SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida 4 a 20%. Amostras: 1. Plasma (4,5 μ g); 2. GF5 (0,03 μ g); 3. GF6 (1,4 μ g); 4. GF7 (4,5 μ g); 5. GF8 (4,5 μ g); 6. GF9 (4,5 μ g); 7. GF10 (4,5 μ g); 8. GF11 (4,5 μ g); 9. GF12 (4,5 μ g); 10. GF13 (4,5 μ g); 11. GF14 (4,5 μ g). Obs: foi aplicado o volume máximo possível nos poços das frações GF5 e GF6.

Observa-se que a fração GF12 (volume médio de eluição 345 mL) apresentou a maior quantidade de proteínas e a fração GF7 (volume médio de eluição 195 mL) apresentou maior atividade de FVIII. A recuperação de FVIII nesta cromatografia foi de 70%. O perfil de eluição de FVIII em Sepharose 6FF foi bastante semelhante ao obtido em Sepharose 4FF, mas a eluição de proteínas de baixa massa molecular ocorreu em volume maior, portanto melhorando a separação da fração de interesse.

Semelhante à resina Sepharose 4FF, a resina Sepharose 6FF permite trabalhar com fluxo alto e 25% de volume de amostra aplicado. A resina Sepharose 6FF é recomendada para uso industrial e mostrou-se interessante para o processo proposto.

5.1.2.13 Gel filtração de Q500FF em resina Sepharose 6FF

A gel filtração de fração Q500FF em resina Sepharose 6FF foi proposta para avaliar purificação de FVIII a partir de fração Q500 e comparar com a separação obtida em resina Sepharose 4FF.

No ensaio foram aplicado 95 mL de Q500 concentrado (2 X Q500A, concentrado 4 vezes) à coluna pré-equilibrada com tampão citrato contendo 85 mM NaCl.

O perfil da cromatografia está apresentado na Figura 5.39. As concentrações de proteína e a atividade de FVIII nas frações coletadas estão na Tabela 5.24 e 5.25. Amostras das frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 5.40).

Figura 5.39 Gel filtração de fração Q500 concentrada em resina Sepharose 6FF. O cromatograma mostra absorbância em 280 nm (contínuo) e atividade de FVIII (tracejado) da solução sendo eluída da coluna. A atividade de FVIII foi medida pelo método cromogênico.

Figura 5.40 Análise de amostras das frações de gel filtração de Q500 em resina Sepharose 6FF, por SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida 4 a 20%. Amostras: 1. Q500 (5 µg); 2. GF5 (0,15 µg); 3. GF6 (0,73 µg); 4. GF7 (1,94 µg); 5. GF8 (5 µg); 6. GF9 (5 µg); 7. GF10 (5 µg); 8. GF11 (5 µg); 9. GF12 (5 µg); 10. GF13 (5 µg); 11. GF14 (5 µg). Obs: foi aplicado o volume máximo possível nos poços das frações GF5, GF6 e GF7.

Tabela 5.24 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações das cromatografias de plasma em Q-Sepharose FF e na fração Q500 concentrada preparada para o próximo passo de purificação.

Fração	Volume da fração (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recuperação de atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Troca iônica – Q Sepharose 6FF								
Plasma	491	97,92	48078	100	51,56	25317	1,90	1
FT	491	0	0	0	44,58	21887	0	0
Reeq	981	0	0	0	3,16	3102	0	0
Q200	491	7,59	3727	7,75	0,44	217,5	17,13	9,0
Q500A	294	74,64	21944	45,64	0,93	272,4	80,56	42,4
Q500B	196	3,16	620	1,29	0,03	6,34	97,79	51,5
Plasma	461	97,92	45140	100	51,56	23770	1,90	1
FT	491	0	0	0	47,33	23241	0	0
Reeq	981	0	0	0	3,36	3296	0	0
Q200	491	0,54	266	0,59	0,43	209,9	1,27	0,7
Q500A	294	48,25	14184	31,42	0,92	269,7	52,60	27,7
Q500B	196	4,31	845	1,87	0,04	6,95	121,53	64,0
Concentração								
Pool	588	90,21	53045	100	1,05	615,0	86,25	45,4
Perm	488	-1,26	0	0	0	2,02	0	0
Conc	110	307,26	33799	64	4,35	478,0	70,71	37,2

Tabela 5.25 Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da gel filtração de Q500 concentrado em resina Sepharose 6FF.

Fração	Volume da fração (mL)	Volume médio de eluição (mL)	% Atividade	Atividade total (U)	Recuperação de atividade (%)	[proteína] (mg/ml)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Gel filtração em resina Sepharose 6FF									
Q500 Conc.	95	-	307,26	29190	100	4,35	412,83	70,71	37,2
GF5	30	135	-0,93	0	0	0,01	0,27	0	0
GF6	30	165	137,59	4128	14,14	0,05	1,36	3036	1598,1
GF7	30	195	273,49	8205	28,11	0,12	3,65	2251	1184,6
GF8	30	225	299,07	8972	30,74	0,31	9,41	953,6	501,9
GF9	30	255	133,82	4015	13,75	0,73	21,98	182,7	96,1
GF10	30	285	81,85	2456	8,41	1,93	57,96	42,37	22,3
GF11	30	315	113,66	3410	11,68	3,92	117,57	29,00	15,3
GF12	30	345	107,10	3213	11,01	3,76	112,72	28,50	15,0
GF13	30	375	65,46	1964	6,73	1,72	51,45	38,17	20,1
GF14	30	405	-1,26	0	0	0,52	15,55	0	0
GF15	30	435	9,89	297	1,02	0,05	1,46	202,55	0
GF16	30	465	-1,75	0	0	0,01	0,20	0	0

Observa-se que a fração GF11 (volume médio de eluição 315 mL) apresentou a maior quantidade de proteínas e a fração GF8 (volume médio de eluição 225 mL) maior atividade de FVIII. O perfil de eluição de FVIII se alterou em comparação ao da Sepharose 4FF, sendo que as frações com maior parte da atividade de FVIII (~75% do total recuperado) estavam próximas do volume vazio, restando uma parte menor de atividade recuperada (~25% do total recuperado) juntamente com as proteínas de mais baixa massa molecular. Portanto, a separação do FVIII da maior parte das proteínas contaminantes foi mais efetiva nesta resina, Sepharose 6FF.

5.1.2.14 Detecção de fator IX e fator X nas frações de gel filtração de plasma e de Q500 em resina Sepharose 6FF

Como mencionado, a etapa de gel filtração foi proposta como segunda etapa de purificação para separar o FVIII dos demais fatores de coagulação.

As frações de cromatografia de gel filtração de Q500 em Sepharose 6FF foram analisadas por "western blot" com anticorpos anti-FIX e anti FX (Figura 5.41).

Figura 5.41 Análise da presença de fatores IX e X nas frações de gel filtração de Q500FF em Sepharose 6FF, por "western blot" usando anticorpo monoclonal anti-IX e anti-X (diluição 1:1000). SDS-PAGE (7,5%, condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Q500 concentrado (16 µL); 2. GF5 (16 µL); 3. GF6 (16 µL); 4. GF7 (16 µL); 5. GF8 (16 µL); 6. GF9 (16 µL); 7. GF10 (16 µL); 8. GF11 (16 µL); 9. GF12 (16 µL); 10. GF13 (16 µL); 11. GF14 (16 µL); 12. GF15 (16 µL); 13. GF16 (16 µL).

Os “western blots” mostram detecção das bandas de fator IX e X nas frações GF10 a GF14 (canaletas 7 a 11), eluídas nos volumes médios entre 285 a 405 mL. Uma análise comparativa da distribuição dos fatores IX e X e atividade de FVIII dosada nas frações está esquematizada na Figura 5.42.

Fig 5.42 Distribuição da atividade de FVIII e presença de fatores IX e X nas frações de gel filtração de Q500FF em Sepharose 6FF. Volume de coluna 380 mL. Nos gráficos estão indicadas as posições das frações com FIX e FX detectados por “western blot”.

Por estes ensaios, diferentemente do observado em gel filtração em resina Sepharose 4FF, a sobreposição da eluição da atividade de FVIII com os fatores IX e X continua ocorrendo, mas em uma fração proporcionalmente muito menor. Verificamos, assim, que esta resina seria mais apropriada para a purificação de FVIII.

5.1.2.15 Detecção de multímeros de fator de von Willebrand nas frações de gel filtração de plasma e de Q500 em resina Sepharose 4FF e 6FF por eletroforese em gel de agarose e “western blot”

Como mencionado, o fator de von Willebrand é uma glicoproteína de cerca de 220 kDa, que se associa formando multímeros que atingem até 20 MDa. O fator de von Willebrand é a proteína carregadora do FVIII no plasma, protegendo-o da ativação fora do sítio de coagulação.

Uma possibilidade considerada para a diferença entre o volume de eluição do FVIII em nossos processos de gel filtração de plasma ou de Q500 é o tamanho do complexo FVIII/fator von Willebrand, especialmente relacionado com o número de moléculas de von Willebrand associadas.

A associação de moléculas de FVIII e FvW na proporção 1:1, formaria um complexo de massa molecular de aproximadamente 450 kDa. A adição de cada molécula de von Willebrand ao complexo adicionaria 220 kDa, obtendo-se complexos de tamanho 670, 890, 110 kDa, etc (com proporções FVIII/FvW 1:2, 1:3, 1:4, etc).

A literatura descreve o fator de von Willebrand circulante no plasma com um mínimo de duas moléculas, formando um dímero. É possível que a associação com FVIII também seja por adição de dímeros de von Willebrand, formando complexos nas proporções FVIII/FvW 1:2, 1:4, 1:6, etc..., com adição de cerca de 440 kDa para cada dímero associado.

Para se avaliar o tamanho dos complexos FVIII/FvW nas frações das cromatografias por gel filtração de plasma e de Q500, realizamos ensaios de “western blot”, utilizando como matriz de separação de proteínas um gel de agarose 0,8% em condições não redutoras. As proteínas separadas por eletroforese eram transferidas para membranas de PVDF, procedendo-se com o “western blot” com anticorpos monoclonais anti-FvW.

A Figura 5.43 apresenta o resultado do “western blot” de frações de gel filtração de plasma.

Figura 5.43 Análise da presença e da massa molecular de multímeros de von Willebrand nas frações de gel filtração de plasma em resina Sepharose 6FF (380 mL), por “western blot” usando anticorpo monoclonal anti-FvW (diluição 1:1000). Eletroforese em gel de agarose 0,8% (condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com substrato quimioluminescente. Volume de amostra aplicada: 5 µL/poço. Canaletas: 1. Plasma; 2. GF5; 3. GF6; 4. GF7; 5. GF8; 6. GF9; 7. GF10; 8. GF11; 9. GF12; 10. GF13; 11. GF14; 12. GF15; 13. GF16; 14. GF17.

O ensaio de “western blot” revelou os multímeros de von Willebrand. Como esperado, frações coletadas em menor volume de eluição apresentam complexos de maior massa, e, à medida que se aumenta o volume de eluição, o tamanho dos multímeros vai diminuindo. É possível detectar complexos de alta massa molecular sendo eluídos a partir da fração GF6 (volume de eluição da coluna 165 mL) (canaleta 3) com a diminuição gradativa do tamanho desses complexos.

A definição do gel e os marcadores de massa molecular não permitiram avaliar a massa molecular dos complexos pela distância das bandas detectadas. Não se pode assegurar se moléculas de FVIII nestas frações estariam ligados a monômeros, dímeros ou outros múltiplos de von Willebrand.

As amostras de frações de gel filtração de Q500 também foram analisadas, para avaliar distribuição dos complexos FVIII/FvW na cromatografia e comparar os tamanhos dos complexos com amostras da gel filtração do plasma. As Figuras 5.44 e 5.45 mostram “western blots” de fração de gel filtração de Q500 em resinas Sepharose 6FF e Sepharose 4FF, respectivamente.

Figura 5.44 Análise da presença e da massa molecular de multímeros de von Willebrand nas frações de gel filtração de Q500 em resina Sepharose 6FF (380 mL), por “western blot” usando anticorpo monoclonal anti-FvW (diluição 1:1000). Eletroforese em gel de agarose 0,8% (condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com substrato quimioluminescente. Volume de amostra aplicada: 5 μ L/poço. Canaletas: 1. Q500; 2. GF5; 3. GF6; 4. GF7; 5. GF8; 6. GF9; 7. GF10; 8. GF11; 9. GF12; 10. GF13; 11. GF14; 12. GF15.

Figura 5.45 Análise da presença e da massa molecular de multímeros de von Willebrand nas frações de gel filtração de Q500 em resina Sepharose 6FF (380 mL), por “western blot” usando anticorpo monoclonal anti-FvW (diluição 1:1000). Eletroforese em gel de agarose 0,8% (condição não redutora). **A.** Membrana corada por Ponceau; **B.** Revelação com substrato quimioluminescente. Volume de amostra aplicada: 5 μ L/poço. Canaletas: 1. Q500; 2. GF2; 3. GF3; 4. GF4; 5. GF5; 6. GF6; 7. GF7; 8. GF8.

Observa-se que nas frações de gel filtração de Q500, tanto em Sepharose 4FF quanto em Sepharose 6FF, que as bandas de alta massa molecular estão em alturas próximas às banda da gel filtração de plasma, indicando Q500 contém ainda FvW formando complexos de tamanho semelhante ao encontrado no plasma. Mas este dado requer mais experimentos para ser confirmado.

A diferença observada entre as quantidade de amostras das gel filtrações de Q500 se deve a diferença de coleta das frações de eluição Sepharose 4FF e 6FF; entretanto, o padrão observado é muito parecido.

Essas observações confirmam a diferença na distribuição de FvW de tamanhos variados nas frações de eluição da gel filtração. Considerando que o FVIII está protegido por molécula(s) de FvW, sugere-se que o FVIII eluído nas frações iniciais de gel filtração está complexado com FvW de alta massa molecular, enquanto que o FVIII eluído nas frações seguintes está complexado com moléculas de baixa massa molecular de FvW; provavelmente por causa da concentração de NaCl no tampão de eluição da cromatografia de troca iônica.

Comparando as resinas Sepharose 4FF e Sepharose 6FF, os resultados indicam que a fração Q500 contém complexos FVIII / FvW de diferentes tamanhos e que na resina Sepharose 6FF, por ser indicada para separação de proteínas menores, parte dos complexos que estavam no segundo pico da Sepharose 4FF eluíram na frente, separando o complexo FVIII / FvW mais eficientemente.

5.2 Clonagem de fragmentos gênicos de FVIII para expressão de proteína recombinante, obtenção de anticorpos contra fragmentos de FVIII e análise das frações cromatográficas por "western blot"

5.2.1 Amplificação e clonagem de fragmentos gênicos de FVIII

Para a amplificação inicial de fragmentos gênicos de FVIII por PCR, utilizaram-se três plasmídeos que compunham o cDNA de FVIII. Os plasmídeos eram disponíveis pela ATCC e foram cedidos pelo Dr. Marcelo Brígido (Universidade Federal de Brasília). Os três segmentos gênicos foram amplificados para posicionar precisamente os fragmentos codificadores dos domínios A1-A2 (cadeia pesada sem domínio B), domínio B e domínios A3-C1-C2 (cadeia leve) da proteína e os domínios protéticos seriam expressos separadamente.

As amplificações foram feitas por PCR usando oligonucleotídeos iniciadores com sítios de restrição adequados para reclonagem. Os produtos de PCR foram clonados em vetor pGem-T Easy (Promega), o qual possui um sítio de múltiplas clonagens conhecido.

As características dos fragmentos de FVIII amplificados e clonados estão descritas na Tabela 5.26; a seqüência do cDNA do FVIII utilizada está descrita no Anexo B. Os produtos de amplificação por PCR, aplicados em gel de agarose, estão mostrados na Figura 5.38.

Tabela 5.26 Fragmentos gênicos de FVIII selecionados para clonagem em pGem-T Easy

Fragmento gênico de FVIII	Posição no cDNA	Fragmento gênico (b)	Posição proteína FVIII	Massa da proteína expressa (kDa)
Domínios A1-A2 (Cadeia pesada (CP) sem domínio B))	171-2444	2273	-19 a 738	87
Domínio B (DB)	2449-5176	2727	741 a 1649	101
Domínios A3, C1, C2 (Cadeia leve (CL))	5167-7227	2060	1647 a 2332	79

Figura 5.38 Análise dos produtos de amplificação por PCR (fragmentos gênicos de FVIII) em gel de agarose. Amostras: 1. Cadeia pesada (2273 pb); 2. Domínio B (2727 pb); 3. Cadeia leve (2060 pb). Foram aplicados 3 μ L das reações no gel.

Os vetores pGem-T Easy com os fragmentos clonados foram utilizados na transformação de bactérias *Escherichia coli* (cepa DH5- α). A seleção dos clones de interesse foi feita por resistência à ampicilina e geração de colônias brancas (sistema beta-galactosidase), e a presença do inserto foi confirmada por PCR de colônia ou pelo método de fenol-clorofórmio. Os plasmídeos de interesse foram extraídos e analisados por digestão com enzimas de restrição e sequenciamento.

A Figura 5.39 mostra a análise pelo método de fenol-clorofórmio dos plasmídeos das colônias de *E. coli* transformadas. As colônias possivelmente contendo os vetores com os fragmentos de cadeia pesada (CP), Domínio B (DB) e cadeia leve (CL) estão indicadas na Figura 5.39.

Figura 5.39 Análise pelo método de fenol-clorofórmio da presença de fragmentos gênicos de interesse nos plasmídeos de clones de bactérias transformadas. Os plasmídeos que contem os fragmentos de interesse (+) apresentam bandas em posição de massa molecular mais alta. Colônias possivelmente contendo fragmentos de interesse estão indicados.

Os vetores pGem-T Easy contendo os fragmentos gênicos de FVIII foram adequadamente digeridos para a liberação destes fragmentos e sua transferência para os vetores de expressão pAE e pAEsox. Os vetores pAE e pAEsox foram digeridos com as mesmas enzimas (Figura 5.40).

Figura 5.40 Fragmentos gênicos de FVIII e vetores pAE e pAEsox digeridos. Amostras: 1. CP (2,3 kb) obtido da digestão com Xho I e Pst I; 2. pAE (2,8 kb) digerido com Xho I e Pst I; 3. pAEsox (3,4 kb) digerido com Xho I e Pst I; 4. pAEsox não digerido; 5. pAE (2,8 kb) digerido com Xho I e Nco I; 6. pAEsox (3,4 kb) digerido com Xho I e Nco I; 7. DB (2,7 kb) obtido da digestão com Xho I e Nco I; 8. CL (2,0 kb) obtido da digestão com Xho I e Nco I.

Após a ligação dos fragmentos nos vetores pAE e pAEsox, estes foram utilizados na transformação de bactérias *Escherichia coli* (cepa DH5- α). A seleção das bactérias com vetores de interesse foi feita pelo método de fenol-clorofórmio. Os plasmídeos de interesse foram extraídos e suas seqüências foram confirmadas por seqüenciamento.

5.2.2 Expressão de fragmentos protéicos de FVIII

Os vetores pAE contendo os fragmentos gênicos de FVIII foram utilizados na transformação de bactérias de expressão *Escherichia coli* (cepa BL21 (DE3) Star PlysS).

As bactérias com vetor pAE foram induzidas para expressão com IPTG e os perfis protéicos de extratos bacterianos, frações de sobrenadante e frações insolúveis foram analisados por SDS-PAGE (Figura 5.41).

Figura 5.41 Perfil protéico de extratos de *E. coli* BL21 (DE3) Star PlysS com vetores pAE após indução por IPTG. Canaletas: 1 a 8. Frações de sobrenadante dos extratos; 9 a 16. Frações insolúveis dos extratos; 1 e 9. CP não induzido; 2 e 10. CP induzido; 3 e 11. DB não induzido; 4 e 12. DB induzido; 5 e 13. CL não induzido; 6 e 14. CL induzido; 7 e 15. pAE vazio não induzido; 8 e 16. pAE vazio induzido.

Não se observou expressão das proteínas usando estas construção em vetor pAE. Por esse motivo, os fragmentos gênicos foram transferidos para o vetor pAEsox (com um promotor mais forte). A indução de expressão de proteínas foi realizada diretamente em bactérias *E. coli* cepa DH5- α por exposição das culturas a paraquat. O perfil protéico das frações de sobrenadante e insolúvel dos extratos bacterianos foi analisado por SDS-PAGE (Figura 5.42). Também não se observou expressão das proteínas com o vetor pAEsox.

Figura 5.42 Perfil protéico de extratos de *E. coli* DH5- α com vetores pAEsox após indução por paraquat. Canaletas: 1 a 8. Frações de sobrenadante dos extratos; 9 a 16. Frações insolúveis dos extratos; 1 e 9. CP não induzido; 2 e 10. CP induzido. 3 e 11; DB não induzido; 4 e 12. DB induzido; 5 e 13. CL não induzido; 6 e 14. CL induzido; 7 e 15. pAEsox vazio não induzido; 8 e 16. pAEsox vazio induzido.

5.2.3 Clonagem de fragmentos gênicos reduzidos de FVIII

A dificuldade de expressão dos fragmentos de FVIII poderia ser explicada pelo tamanho desses fragmentos (>79 kDa) e a diferença entre o sistema de expressão procarioto e a gene original de eucarioto superior (que utilizam diferentes códons usuais).

Para superar estas dificuldades, decidiu-se utilizar a estratégia de redução do tamanho das proteínas a serem expressas. A seqüência gênica foi analisada e os fragmentos gênicos reduzidos foram obtidos utilizando-se sítios de restrição encontrados. As características dos fragmentos reduzidos de FVIII são sumarizadas na Tabela 5.27.

Tabela 5.27 Fragmentos gênicos reduzidos de FVIII obtidos pela digestão de vetores pGem-T Easy, pAE e pAEsox

Fragmento de FVIII	Posição cDNA	Fragmento gênico (b)	Massa da proteína (kDa)	Posição proteína FVIII	Massa da proteína c/ aa extras (kDa)*
Cadeia pesada reduzida (fCP)	171-548	377	15,9	-19 a 106	~16
Domínio B reduzido (fDB)	2449-3125	676	22,3	741 a 965	~27
Cadeia leve reduzida (fCL)	5167-5751	584	24,3	1647 a 1841	~27

* A análise do seqüenciamento das construções gênicas mostrou que algumas proteínas seriam traduzidas com aminoácidos extras.

O fragmento reduzido CP foi obtido por digestão do gene clonado nos vetores pAE ou pAEsox e religação, eliminando parte da seqüência 3' do gene. Os fragmentos reduzidos fDB e fCL foram obtidos por nova digestão do vetor pGem-T Easy e reclonagem nos vetores pAE e pAEsox (Figura 5.43).

Figura 5.43 Fragmentos gênicos reduzidos de FVIII e vetores pAE e pAEsox digeridos. Amostras: 1. pAE (2,8 kb) digerido com Xho I e Pvu II; 2. pAEsox (3,4 kb) digerido com Xho I e Pvu II; 3. DB (676 b) obtido da digestão com Xho I e Hinc II; 8. CL (584 b) obtido da digestão com Xho I e Hinc II; 5. pAEsox-CP (3,8 kb) digerido com Hind III; 6. pAE-CP (3,2 kb) digerido com Hind III.

Após a ligação dos fragmentos nos vetores pAE e pAEsox, estes foram utilizados na transformação de bactérias *Escherichia coli* (cepa DH5-α). A seleção das bactérias com vetores de interesse foi feita pelo método de fenol-clorofórmio. Os plasmídeos de interesse foram extraídos e o DNA seqüenciado.

5.2.4 Expressão de fragmentos protéicos reduzidos de FVIII

Os vetores pAE contendo os fragmentos gênicos reduzidos de FVIII foram utilizados na transformação de bactérias de expressão *Escherichia coli* (cepa BL21 (DE3) Star PlysS).

As bactérias com construções gênicas em vetor pAE foram induzidas com IPTG e o perfil protéico dos extratos bacterianos, frações de sobrenadante e insolúveis, foram analisados por SDS-PAGE (Figura. 5.44).

Figura 5.44 Perfil protéico de extratos de *E. coli* BL21 (DE3) Star PlysS com clonagens de fCP, fCL e fDB em vetor pAE, após indução por IPTG. Canaletas: 1 a 8; Frações de sobrenadante dos extratos bacterianos; 9 a 16. Frações insolúveis dos extratos; 1 e 9. fCP não induzido; 2 e 10. fCP induzido; 5 e 13. fCL não induzido; 6 e 14. fCL induzido; 7 e 15. pAE vazio não induzido; 8 e 16. pAE vazio induzido. Obs.: a análise da construção fDB (3, 4 e 11, 12) mostrou-se incorreta e não deve ser considerada.

No gel pode-se observar a banda de proteína de tamanho esperado apenas nas frações insolúveis das bactérias contendo o fragmento fCL (com 27 kDa), inclusive nas bactérias que não sofreram indução (indicando escape de indução).

Para minimizar o possível efeito da diferença de códons usuais (“codon usage”) entre a bactéria de expressão e o gene heterólogo, utilizamos bactérias *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RP. Essas bactérias apresentam plasmídeos com cópias extras de genes de tRNA para os aminoácidos arginina e prolina, auxiliando na expressão de proteínas heterólogas. Essas bactérias foram usadas para clonagem dos vetores pAE e pAEsox com os fragmentos gênicos reduzidos de FVIII. A expressão dos fragmentos protéicos nos clones com vetor pAE foi induzida com IPTG e os clones com vetor pAEsox foram induzidos com paraquat.

O perfil protéico dos extratos bacterianos, frações de sobrenadante e insolúveis, foram analisadas por SDS-PAGE. Não se observou expressão das proteínas nos clones com o vetor pAE (Figura 5.45). Com o vetor pAEsox, observou-se novamente a expressão da proteína fCL de tamanho esperado (27 kDa) na fração insolúvel (Figura 5.46). A intensidade da banda indica alta concentração desta proteína na fração. Também foram observadas bandas de tamanho esperado para os fragmentos fCP (16 kDa) e fDB (27 kDa), ainda que de intensidade muito mais fraca.

Figura 5.45 Perfil protéico de extratos de *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RP com vetores pAE após indução por IPTG. Canaletas: 1 a 8. Frações de sobrenadante dos extratos; 9 a 16. Frações insolúveis dos extratos; 1 e 9. pAE vazio não induzido; 2 e 10 pAE vazio induzido; 3 e 11. fCP não induzido; 4 e 12. fCP induzido; 7 e 15. fCL não induzido; 8 e 16. fCL induzido. Obs.: a construção fDB mostrou-se incorreta e não pode ser considerada (5, 6, 13 e 14).

Figura 5.46 Perfil protéico de extratos de *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RP com vetores pAEsox após indução por paraquat. SDS-PAGE dos extratos. Canaletas: 1 a 8. Frações de sobrenadante; 9 a 16. Frações insolúveis; 1 e 9. pAEsox vazio não induzido; 2 e 10 pAEsox vazio induzido; 3 e 11. fCP não induzido; 4 e 12. fCP induzido. 5 e 13; fDB não induzido; 6 e 14. fDB induzido; 7 e 15. fCL não induzido; 8 e 16. fCL induzido. Observa-se a presença de banda de expressão na fração insolúvel, principalmente do fragmento fCL.

Com este resultado positivo de expressão dos fragmentos protéicos, foram testadas outras bactérias para melhorar a expressão dos fragmentos fCP e fDB. A bactéria testada inicialmente foi a bactéria *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta que possui, como a bactéria *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RP, plasmídeos codificando para cópias extras de genes de tRNA para aminoácidos de menor 'codon usage' da bactéria. Essa bactéria possui, além dos genes para os tRNA de arginina e prolina, genes para tRNA de leucina, isoleucina e glicina. Outras bactérias testadas foram a *E. coli* BL21 (DE3) TrxB, que permite a formação de pontes dissulfeto no citoplasma da bactéria e a *E. coli* BL21 SI, com a ativação do promotor proU e indução por NaCl. Não foram obtidos resultados satisfatórios com nenhuma destas cepas, utilizando-se os vetores pAE ou pAEsox.

Finalmente, foi utilizada a bactéria *E. coli* BL21 (DE3) c43, que facilita a expressão de proteínas recombinantes tóxicas, como último teste de expressão dos fragmentos de FVIII. Observou-se uma pequena diferença no padrão de proteínas nas frações insolúvel das bactérias, sugerindo a indução de expressão do fragmento CP nos clones com construção em vetor pAE (Figura 5.47).

Figura 5.47 Perfil protéico de extratos de *E. coli* BL21 (DE3) c43 com vetores pAE após indução por IPTG. SDS-PAGE dos extratos. Canaletas: 1 a 10. Frações de sobrenadante; 11 a 20. Frações insolúveis; 1 e 11. pAE vazio não induzido; 2 e 12. pAE vazio induzido; 3 e 13. fCP-A não induzido; 4 e 14. fCP-A induzido; 5 e 15. fCP-B não induzido; 6 e 16. fCP-B induzido; 7 e 17. fDB-A não induzido; 8 e 18. fDB-A induzido; 9 e 19. fDB-B não induzido; 10 e 20; fDB-B induzido. Possível expressão de proteína CP (~16 kDa) nas frações insolúveis não induzido e induzido (frações 13 a 16).

5.2.5 Purificação de fragmento protéico fCL

Bactérias *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RP contendo o vetor pAEsox-fCL foram induzidas para expressão em maior escala (500 mL de cultura) do fragmento fCL. A expressão do fragmento fCL ocorreu na forma de corpúsculos de inclusão, sendo obtido na fração insolúvel dos lisados bacterianos.

A fração insolúvel foi lavada com tampão Tris-HCl com uréia 1M e a solubilização foi realizada com tampão com uréia 8M. A proteína foi renaturada por diluição lenta em tampão sem uréia e purificada em coluna de afinidade com níquel. A eluição foi feita com tampões com imidazol nas concentrações 300, 500 e 1000 mM. Após a eluição, a proteína foi dialisada para a remoção de imidazol e NaCl. As amostras destas frações foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 5.48).

Figura 5.48 Análise das etapas de purificação do fragmento de cadeia leve (fCL) (27 kDa) em SDS-PAGE. Canaletas: 1. Fração insolúvel (sem tratamento); 2. Sobrenadante do lavado da fração insolúvel com uréia 1M; 3. Fração insolúvel solubilizada com uréia 8M (2 µL); 4, 5. Solução de proteína renaturada, diluição 200x (20 µL); 6. FT; 7. Fração eluída com imidazol 20 mM; 8. Fração eluída com imidazol 40 mM; 9. Fração eluída com imidazol 60 mM; 10. Fração eluída com imidazol 100 mM; 11. Fração eluída com imidazol 300 mM; 12. Fração eluída com imidazol 500 mM; 13. Fração eluída com imidazol 1000 mM.

5.2.6 Purificação de fragmento protéico fCP e fDB

No gel para análise de expressão dos fragmentos protéicos de FVIII, foram observadas bandas tênues nas posições de fCP e fDB, sugerindo baixa expressão na bactérias *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RP. Várias estratégias para melhorar a expressão foram testadas (mudança de tempo e temperatura de indução, de concentração de indutor, de meio de cultura, de estágios de crescimento para adição do indutor), sem diferença significativa. Mesmo com estes resultados, as bactérias foram induzidas em maior escala (500 mL de cultura), para obtenção por concentração da proteína e purificação por coluna de afinidade. O sobrenadante e a fração insolúvel do lisado destas culturas foram cromatografados em colunas de afinidade com níquel, porém não se obteve recuperação das proteínas purificadas.

5.2.7 Purificação de fragmento protéico fCP por eletroeluição

Existia uma indicação da expressão do fragmento fCP pelas bactéria *E. coli* BL21 (DE3) c43 contendo o vetor pAE-fCP (Figura 5.43). Mesmo com a baixa expressão, essa bactéria foi induzida em maior escala (500 mL de cultura), para obtenção por concentração da proteína em coluna de afinidade a metal, se presente. Novamente, não se observa a proteína de interesse nas frações. Considerando-se a possibilidade da proteína não se ligar à coluna de afinidade, foi realizada a tentativa de purificação por eletroeluição.

A eletroeluição foi realizada com a fração insolúvel do lisado bacteriano. A fração insolúvel foi aplicada a géis de poliacrilamida e as bandas de interesse (16 kDa) foram excisadas (Figura 5.49). A proteína eletroeluída em várias eletroeluições foi reunida em “pool” e aplicada em gel para a estimativa de concentração protéica.

Figura 5.49 **A.** Perfil protéico da fração insolúvel de lisados bacterianos de *E. coli* BL21 c43 com vetor pAE-fCP após indução por IPTG, em SDS-PAGE (12,5%). Canaletas: 1 a 5: fração insolúvel, com excisão da banda de 16 kDa e eletroeluição. **B.** Proteína eletroeluída: Canaletas 6 a 10: 5, 10, 15 e 20 µL de amostra, respectivamente; 9. BSA (1 µg).

5.2.8 Imunização de camundongos com fragmentos protéicos de FVIII para obtenção de anticorpos policlonais e determinação da reatividade dos soros obtidos (por ELISA)

As proteínas purificadas fCL (por coluna de afinidade a níquel) e fCP (por eletroeluição) foram utilizadas na imunização em camundongos para a produção de anticorpos policlonais. Os soros obtidos foram testados por ELISA para a determinação da reatividade contra a proteína recombinante.

A proteína fCL foi utilizada na imunização de 20 camundongos (fêmeas, linhagem Balb/C), 10 deles por via intraperitoneal (ip) e 10 por via subcutânea (sc), para verificarmos possíveis diferenças na produção de anticorpos devido à via de imunização. Foram feitas quatro imunizações em intervalos de 14 dias. O sangue dos animais foi coletado após cada imunização (a partir da segunda imunização), e o soro preparado para análise de anticorpos.

Resultados de ELISA estão no gráfico (Figura 5.50), que mostra que a proteína fCL induz resposta imune maior quando injetada por via intraperitoneal. Também pode ser observado que, na imunização via ip, a terceira imunização induziu resposta máxima, com a diminuição da concentração de IgG anti-fCL após a quarta.

Figura 5.50 Determinação de reatividade de soro de camundongos imunizados por via intraperitoneal (ip) e por via subcutânea (SC) contra a proteína purificada fCL. Os soros preparados de quatro sangrias foram introduzidos nas placas por diluição seriada 1:2, iniciando com diluição 1:50 (controle salina e pré-imune) e 1:200 (soros anti-fCL). Placas sensibilizadas com 500 ng de proteína fCL /poço.

A proteína fCP purificada por eletroeluição foi utilizada na imunização de um grupo de 8 camundongos (fêmeas, linhagem Balb/C) pela via intraperitoneal. Foram feitas três imunizações em intervalos de 14 dias e coleta de sangue quinze dias após a última imunização.

O gráfico da Figura 5.51 mostra que a proteína fCP purificada induz resposta quando injetada por via intraperitoneal.

Figura 5.51 Determinação de reatividade de anticorpo policlonal anti fCP no soro coletado na sangria final dos camundongos imunizados via ip com a proteína fCP purificada. Os soros foram introduzidos nas placas por diluição seriada 1:2, iniciando com diluição 1:50. Placas sensibilizadas com 500 ng proteína fCP/poço.

Os soros dos animais imunizados mostraram reatividade satisfatória nos ELISA contra as proteínas fCP e fCL. Os soros foram usados em ensaios de “western blot” contra as próprias proteínas recombinantes, contra FVIII comercial e contra frações das cromatografias de plasma humano.

5.2.9 SDS-PAGE de amostras de FVIII comercial

O FVIII comercial utilizado como padrão positivo (Hemofil M , 50 U/mL, Baxter Healthcare Corporation, Los Angeles, CA, EUA) foi utilizado como controle positivo em ensaios de “western blot”. Para definirmos uma quantidade ótima de massa protéica para visualização em SDS-PAGE, foram aplicadas quantidades crescentes de FVIII comercial, e realizada a coloração por Coomassie blue e por prata para a visualização das bandas mais fracas. Nota-se a banda predominante correspondente à albumina na preparação, usada como estabilizante (Figura 5.52).

Figura 5.52 Perfil protéico de amostra de FVIII comercial em SDS-PAGE (7,5%). **A.** coloração por Coomassie blue. **B.** Coloração por prata. Canaletas: 1 a 4. FVIII comercial 1, 2, 5 e 10 μ L, respectivamente; 5. Plasma; 6. Fração Q500; 7. Fração GF3 de gel filtração de plasma; 8 a 13. FVIII comercial 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 2 μ L, respectivamente.

5.2.10 “Western blot” utilizando soro com anticorpos contra cadeia leve (anti-fCL) produzido no laboratório

Os soros dos animais imunizados com fragmento recombinante de cadeia leve de FVIII (fCL), contendo anticorpos policlonais anti-fCL, foram utilizados em ensaios de “western blot” para o reconhecimento da proteína FVIII.

O ensaio inicial foi realizado com o soro obtido da segunda sangria (depois de duas imunizações com a proteína fCL) na diluição 1:1000. As amostras utilizadas foram plasma e a proteína fCL recombinante usada na imunização dos animais.

A membrana foi corada com Memcode (Pierce) e o “western” revelado com DAB. Apesar da forte reatividade com a proteína recombinante, não se observa banda de reconhecimento da proteína FVIII no plasma, possivelmente devido à sua baixa concentração. Observa-se uma banda de reconhecimento não-específico em albumina (~66 kDa) (Figura 5.53).

Figura 5.53 Análise do reconhecimento de FVIII pelo soro de animais imunizados contra fCL por “western blot” (2ª sangria, diluição 1:1000). **A.** Coloração da membrana por Memcode; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Plasma (1,5 μ L); 2. Fragmento CL recombinante (fCL) (12 μ L).

Novo “western blot” foi realizado com o soro obtido da quarta sangria, na diluição 1:1000. As amostras utilizadas foram plasma, frações cromatográficas com atividade de FVIII e a proteína fCL recombinante. Para verificar especificidade do soro, foi acrescentada amostra de extrato de bactéria expressando proteína recombinante não relacionada com fCL, com cauda de histidina (Figura 5.54).

Figura 5.54 Análise do reconhecimento de anticorpos do soro de camundongos imunizados com fCL por FVIII em diferentes amostras. “Western blot” com soro preparado após 4 imunizações (diluição 1:1000). SDS-PAGE 5 a 20%. **A.** Coloração da membrana por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Plasma (1,5 μ L); 2. GF2-plasma (24 μ L); 3. GF3-plasma (24 μ L); 4. Q250 (24 μ L); 5. Q500 concentrado (10 μ L); 6. GF4-Q500 (24 μ L); 7. GF5-Q500 (24 μ L); 8. fCL recombinante (10 μ L); 9. Extrato de bactéria expressando proteína não relacionada para análise de reconhecimento inespecífico (5 μ L). Obs.: a proteína fCL e a proteína inespecífica possuem seqüência His-tag (6 histidinas).

No “western blot” (Figura 5.54) observa-se forte reatividade do soro anti-fCL com proteínas do extrato de *E. coli* (canaleta 9). Nota-se a determinação de uma banda forte de reconhecimento de uma proteína do extrato bacteriano, provavelmente relacionada com o reconhecimento da cauda de histidina. Além disso, o reconhecimento de outras bandas de *E. coli* pode ser visto. O soro reconhece a banda de fCL purificada e ainda proteínas contaminantes da purificação (canaleta 8). Nesse ensaio, os anticorpos do soro não reconheceram a proteína FVIII nas amostras de frações de cromatografias de plasma.

Para aumentar a sensibilidade do ensaio, foi utilizado o soro da quarta sangria em menor diluição (1:500); foram testadas as amostras de plasma, frações cromatográficas com atividade de FVIII e FVIII comercial (Figura 5.55).

Figura 5.55 Análise do reconhecimento de FVIII por soro de camundongos imunizados com fCL em diferentes amostras. “Western blot” com soro preparado após 4 imunizações (diluição 1:500). SDS-PAGE 4 a 16%. **A.** Coloração da membrana por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. Plasma (2 μ L); 2. Q500 concentrado (15 μ L); 3. GF3-plasma (em Sepharose 4FF) (24 μ L); 4. FVIII comercial (5 μ L/0,25 U).

No ensaio de “western blot” com soro na diluição 1:500 (Figura 5.55), observamos reconhecimento de bandas específicas, ou seja, em posições com muito pouca massa de proteína (vide membrana corada com Ponceau), nas posições aproximadas ~150 kDa (na amostra de plasma - 1), em ~80 kDa (amostras Q500 e FVIII comercial - 2 e 4) e ainda em 72 kDa (amostra GF3 de plasma - 3). Também se observa bandas de reconhecimento não-específico (principalmente de albumina). A cadeia leve de FVIII apresenta massa molecular de 80 kDa no heterodímero circulante no plasma, e 73 kDa no heterotrímero ativado, sugerindo a presença destas formas de cadeia leve nas amostras analisadas de Q500, FVIII comercial e amostra de gel filtração (GF3) de plasma. O reconhecimento da banda

de 150 kDa em plasma sugere que este não seja um reconhecimento de FVIII, mas causado pelo reconhecimento de outras proteínas por anticorpos não específicos dos camundongos.

Para análise da especificidade dos anticorpos preparados no laboratório, foi utilizado anticorpo monoclonal comercial anti cadeia leve de FVIII (MAb-38, Chemicon), para comparação do reconhecimento de FVIII em plasma e nas amostras de purificação (Figura 5.56).

Figura 5.56 Comparação do reconhecimento de FVIII por soro anti-fCL e anticorpo monoclonal anti-CL. "Western blot" com dois diferentes anticorpos anti FVIII-CL. SDS-PAGE 4 a 16%. **A.** Coloração da membrana por Ponceau. **B.** Revelação com DAB. Canaletas 1 a 4. Anticorpo monoclonal anti cadeia leve (MAb-38) (diluição 1:1000). 5 a 8. Soro com anticorpos policlonais anti-fCL (4ª sangria, diluição 1:500). Canaletas: 1. e 5. Plasma (2 µL); 2. e 6. Q500 concentrado (15 µL); 3. e 7. GF3-plasma (em Sepharose 4FF) (24 µL); 4. e 8. FVIII comercial (5 µL/0,25 U).

Observa-se na posição 80 kDa uma banda contra FVIII comercial semelhante, usando o anticorpo monoclonal ou usando o soro, indicando que o reconhecimento é, realmente, da proteína FVIII. Esta é a única banda reconhecida pelo anticorpo monoclonal, diferentemente do reconhecimento do soro policlonal, que reconhece bandas também nas amostras de purificação.

É preciso considerar que o FVIII é encontrado em concentrações muito baixas no plasma e nas frações cromatográficas. Possivelmente, a diluição utilizada no anticorpo monoclonal foi muito alta para a sensibilidade desta detecção. A detecção de banda na mesma posição pelo soro policlonal, também nas frações de purificação, sugere que a diluição utilizada para este soro seja suficiente para a detecção de FVIII (apesar do reconhecimento também de bandas inespecíficas). Observa-se que a quantidade de proteína aplicada no gel, a diluição e tempo de incubação dos soros e antisoros e o sistema de revelação são variáveis importantes a serem consideradas na avaliação dos resultados de detecção.

5.2.11 “Western blot” utilizando soro com anticorpos contra cadeia pesada (anti-fCP) produzido no laboratório

O soro produzido por imunização de animais com fragmento recombinante de cadeia pesada de FVIII, fCP, foram utilizados em ensaios de “western blot” para o reconhecimento da proteína FVIII. Utilizou-se o soro da sangria final (após três imunizações com a proteína fCP) na diluição 1:500. As amostras utilizadas para o ensaio foram proteína recombinante fCP (usada na imunização dos animais), plasma, frações cromatográficas com atividade de FVIII e FVIII comercial (Figura 5.57).

Figura 5.57 Análise do reconhecimento de FVIII por soro de camundongos imunizados com fCL em diferentes amostras. “Western blot” com soro preparado após 3 imunizações (diluição 1:500). SDS-PAGE 4 a 20%. **A.** Coloração da membrana por Ponceau; **B.** Revelação com DAB. Canaletas: 1. fCP recombinante (~16 kDa) (15 μ L); 2. Plasma (2 μ L); 3. Q500 concentrado (15 μ L); 4. GF3-plasma (20 μ L); 5. FVIII comercial (10 μ L/0,5 U).

Apesar da forte reatividade com a própria proteína recombinante usada nas imunizações dos animais, o soro não determinou banda de reconhecimento de FVIII em nenhuma outra amostra. Com esse estudo, não é possível confirmar que tenhamos obtido o fragmento fCP desejado, e portanto, não tenha se gerado anticorpos contra a cadeia pesada de FVIII. Também seria possível que o pequeno fragmento determine anticorpos contra epítopos que não são apresentados nas amostras em teste.

5.2.12 Comparação de “western blot” utilizando diversos anticorpos contra FVIII comercial

Os soros anti-fCL e anti-fCP produzidos no laboratório, e anticorpos adquiridos comercialmente, foram utilizados em ensaios de "western blot" para comparação das bandas de proteína detectadas em amostras de FVIII comerciais. FVIII comercial é bastante difícil de ser adquirido fora do Ministério da Saúde. As amostras usadas eram sobras descartadas de frascos já utilizados por pacientes, com histórico impreciso de armazenamento, e, portanto, a integridade do fator e as atividades não eram garantidas.

A comparação por "western blot", usando anticorpo comercial monoclonal anti-cadeia leve de FVIII e o soro anti-fCL preparado no laboratório, está na Figura 5.58.

Figura 5.58 Comparação do reconhecimento de FVIII comercial por soro de camundongos imunizados com fCL e anticorpo comerciais anti cadeia leve de FVIII por “western blot”. SDS-PAGE 4 a 20%. Amostra: 5 μ L de FVIII com 0,25 U/poço. **A.** Coloração da membrana por Ponceau; **B.** Revelação com substrato quimioluminescente. Canaletas: 1. Soro policlonal anti-fCL preparado no laboratório (diluição 1:500); 2. Anticorpo monoclonal anti-CL MAB 38 (Chemicon) (diluição 1:1000); 3. Anticorpo monoclonal anti-CL GTX408377 (Genetex) (diluição 1:1000). MM. marcador de massa molecular; MMc. marcador de massa molecular para revelação quimioluminescente.

Este ensaio confirma o reconhecimento correto da cadeia leve de FVIII, de tamanho esperado de 80 kDa, pelo soro policlonal produzido no laboratório, considerando a similaridade com o reconhecimento pelos anticorpos comerciais. Observou-se que, com o aumento da exposição, o soro policlonal reconhece outras proteínas (não mostrado). Não foi feita a quantificação de anticorpos específicos no soro, mas os resultados sugerem que a concentração de anticorpos anti-fCL seja

alta, já que a revelação da membrana exposta a esse soro foi bastante mais rápida que com os anticorpos comerciais (1 minuto VS 10 minutos). O soro poderia, portanto, ser utilizado na detecção de FVIII por "western blot" após padronização.

Foram realizados ensaios de "western blot" para comparação do reconhecimento de cadeia pesada de FVIII por anticorpo anti-cadeia pesada comercial e o soro com anti-fCP preparado no laboratório (Figura 5.59). A Figura 5.59 mostra resultados de dois ensaios de "western blot" usando amostras de FVIII comercial sendo reconhecidas por soro anti-fCP ou anticorpos anti-CP comercial.

É preciso notar que, nos ensaios, o gel de separação era diferente (primeiro - gradiente de poliacrilamida 4 a 20% e no segundo - gel homogêneo 7,5%). Esperava-se o reconhecimento de fragmentos de cadeia pesada de FVIII com massas entre 90 e 210 kDa (dependendo de quantos fragmentos do domínio B tivessem sido eliminados).

Figura 5.59 Comparação do reconhecimento de FVIII comercial por soro de camundongos imunizados com fCP e anticorpo comercial anti cadeia pesada de FVIII em ensaios de "western blot". **A/B** (SDS-PAGE gradiente de poliacrilamida 4 a 20%). Amostras: 5 µL de FVIII com 0,25 U/poço. **A**. Coloração da membrana por Ponceau; **B**. Revelação com substrato quimioluminescente. Anticorpos: 1. Soro policlonal anti-fCP preparado no laboratório (diluição 1:100); 2. Anticorpo monoclonal comercial anti-CP (Genetex GTX26345) (diluição 1:100). **C/D** (SDS-PAGE poliacrilamida 7,5%) **C**. Coloração da membrana por Ponceau; **D**. Revelação com substrato quimioluminescente. Anticorpo monoclonal comercial anti-CP (Genetex GTX26345) (diluição 1:100). MM-marcador de massa molecular; MMc-marcador de massa molecular para revelação quimioluminescente. Obs.: lotes diferentes de FVIII comercial foram usadas nos dois "western blots".

Os resultados de "western blot" mostram que várias bandas de proteína de massa molecular alta foram determinadas quando usamos o soro policlonal produzido no laboratório. Também bandas de massa menores que o esperado (~40 kDa) são determinadas, sugerindo degradação do FVIII comercial (B1 e D1').

Os resultados dos "western blots" mostram que o soro anti-fCP esta reconhecendo bandas de FVIII com padrão semelhante ao reconhecimento por anticorpo comercial anti-CP (B1 e D1'), embora o anticorpo monoclonal comercial anti-CP, no primeiro ensaio, tenha determinado somente uma banda muito tênue na posição em torno de 150 kDa (B2).

Os resultados de "western blot", de maneira global, indicam que soros anti-fCL e anti-fCP foram obtidos no laboratório, embora sua utilização para o acompanhamento de ensaios de purificação de FVIII e a detecção das cadeias, na avaliação da degradação da proteína, tenham se mostrado bastante mais complexos do que o esperado.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

6.1 Purificação de Fator VIII de coagulação por cromatografias de troca aniônica e de gel filtração a partir de plasma humano

Ao início deste projeto, dados do laboratório (LORTHIOIS, 2002) haviam mostrado que uma fração enriquecida com FVIII era obtida por cromatografia de plasma em coluna de troca iônica Q-Sepharose FF. Havia sido observado que no processo para eluição de FVIII eluíam também as proteínas FIX e FX, sugerindo que outros fatores de coagulação dependentes de vitamina K poderiam estar sendo eluídas na mesma fração. Paralelamente, foi descrito por KAERSGAARD e BARINGTON (1998) o uso de cromatografia de gel filtração de plasma em resina Sepharose 4FF para purificação de FVIII. Com esta resina, os pesquisadores haviam conseguido separar o complexo FVIII/FvW de proteínas de menor massa molecular, incluindo as dependentes de vitamina K. Baseados nessas informações, a proposta deste projeto consistiu em utilizar a fração rica em FVIII eluída de troca iônica de plasma (Q500) para aplicação em resina de gel filtração, verificar a possibilidade de separação da proteína FVIII das proteínas dependentes de vitamina K e comparar os resultados com os obtidos da gel filtração de plasma.

A cromatografia de troca iônica como etapa inicial, seguindo com a fração de FVIII para gel filtração, poderia representar uma forma de concentração da amostra, evitando a manipulação de grandes volumes de plasma e aumentando a relação volume de plasma / volume de resina, promovendo economia de tempo por lote cromatográfico e de material.

6.1.1 Cromatografia de plasma humano em resinas de troca aniônica

Foram testadas de quatro resinas de cromatografia de troca iônica, Q-Sepharose FF (QFF), Q-Sepharose XL (QXL), Q-Sepharose Big Beads (QBB) e ANX Sepharose FF. As três resinas Q-Sepharose são trocadores de ânion fortes e possuem as mesmas características químicas, porém a resina XL possui cadeias de dextran ligadas à matriz de agarose, o que aumentaria a capacidade de ligação de proteínas. A resina BB, com “beads” maiores, é recomendada para processos industriais por permitir trabalhar com fluxos mais altos, resultando em processos

rápidos, o que seria interessante para a recuperação de proteínas lábeis. Também é recomendada para uso com soluções viscosas, sem perda da capacidade ligante, o que seria interessante para utilização com plasma. A resina ANX Sepharose FF possui um trocador aniônico fraco, com o tamanho de poro otimizado para a separação de proteínas com alta massa molecular.

Experimentos iniciais, empregando a resina Q-Sepharose FF, foram realizados com base nas condições experimentais empregadas por Lorthiois (2002) e Tanaka (1996) e perdas da ordem de 30-45% observadas na fração de lavagem (Q250) nos levaram a testar o efeito da variação da concentração de sal na solução de lavagem e na ligação do FVIII à coluna.

Em relação às condições de lavagem, o teste permitiu verificar que uma lavagem intermediária empregando tampão citrato 250 mM NaCl poderia ser interessante para remover proteínas contaminantes e aumentar a atividade específica do FVIII recuperado, mas resultaria em perda significativa de atividade. Se o objetivo for maior recuperação do FVIII, seria recomendável uma lavagem com o tampão 200 mM NaCl, estabelecendo o compromisso rendimento e pureza (Figura 5.9). É importante observar que a concentração de 250 mM NaCl no tampão citrato foi utilizada anteriormente para purificação de FVIII suíno e nesses experimentos, não se observava perda de atividade de FVIII na lavagem intermediária. Essa lavagem era necessária para a eliminação de fator de von Willebrand suíno, que deve ser totalmente retirado de preparações de FVIII suíno, uma vez que causa trombocitopenia quando entra em contato com sangue humano. Para o desenvolvimento do processo de purificação de FVIII humano, por outro lado, a presença do FvW tem sido apontada como um fator importante para a menor incidência de inibidores em tratamentos de reposição empregando FVIII derivado de plasma em comparação com FVIII recombinante (GOUDEMANT *et al.*, 2006; FEDERICI *et al.*, 2008; BERNTORP *et al.*, 2008). Este fato, aliado à necessidade de mais uma etapa de purificação para a separação de FVIII dos fatores dependentes de vitamina K, justificariam a eliminação da etapa intermediária de lavagem.

Também foi investigada a possível interferência na ligação de FVIII à resina usando a tampão de equilíbrio com 150 mM NaCl (mais concentrado que o com 85 mM de NaCl geralmente utilizado) e a aplicação do plasma na forma diluída (em tampão sem NaCl). Verificou-se que a diminuição da força iônica do tampão de

equilíbrio e a condição de menor condutividade do plasma inicial não alteraram o perfil de ligação ou de eluição do FVIII.

Em relação à capacidade de ligação de FVIII às resinas Q-Sepharose, ficou claro que é possível aplicar pelo menos 5 volumes de coluna de plasma. Os resultados obtidos no experimento em que se aplicou 7 volumes de coluna de plasma em Q-Sepharose BB sugerem que capacidade de ligação de FVIII da coluna ainda não estava esgotada.

No estudo comparativo das 3 resinas Q-Sepharose, a análise dos dados obtidos com as diferentes resinas indica que a resina Q-Sepharose BB permitiu maior recuperação de atividade total de FVIII (94%), seguida da Q-Sepharose XL (73%) e da Q-Sepharose FF (57%). Nas três cromatografias ocorreram perdas parciais em Q250 (BB: 43%, XL: 11%, FF: 17%). A fração principal de cada cromatografia, Q500, mostrou recuperação razoável (BB: 44%, XL: 31% e FF: 35%,). A resina Q-Sepharose BB, por seu resultado e facilidade de manuseio, seria a indicada para escalonamento de processo.

Em outro experimento foi testada a resina ANX-Sepharose FF. Foram aplicados 10 volumes de coluna de amostra de plasma e a perda de atividade nos FTs não foi significativa, indicando que ainda não foi atingida a capacidade máxima de ligação de FVIII à coluna. O resultado é promissor, mas são necessários mais testes para podermos avaliar corretamente esta resina.

A análise da fração Q500 mostrou a presença dos fatores de coagulação FIX, FX e a Proteína C nesta fração. Este resultado está de acordo com dados da literatura no qual as proteínas dependentes de vitamina K ligam-se às resinas de troca aniônica em condições experimentais semelhantes às empregadas para a purificação de FVIII (TEH e FROGER, 1994). Considerando o fato de o FVIII ser o substrato natural de FIIa (trombina) e apresentar sítios de clivagem para o FXa, esta estratégia para purificação de FVIII não seria aconselhável, pois a eventual ativação durante a purificação poderia levar à perda total de atividade. Entretanto, o uso de tampão citrato, que é anticoagulante, pH 6,0, e não ao redor de 7,0, que é o pH comumente descrito para a purificação de FVIII (BURNOUNF *et al.*, 1991), podem estar prevenindo a ativação destes fatores, uma vez que em nenhum experimento foi observada a formação de coágulo e concomitante inativação do FVIII. Existem trabalhos descritos na literatura em que a resina DEAE Sephadex A-50 foi utilizada para separar as proteínas dependentes de vitamina K diretamente do plasma (TEH e

FROGER, 1994; TE BOOY *et al.*, 1990). A DEAE Sephadex A-50 é uma resina de troca aniônica de poro pequeno e por esta razão, ligam-se a ela preferencialmente proteínas de menor massa molecular. O uso desta resina tem a vantagem se poder recuperar posteriormente as proteínas que se ligam a ela, ao contrário do tratamento com hidróxido de alumínio, usado freqüentemente como pré-tratamento em purificações de FVIII a partir de crioprecipitado (JOSIC *et al.*, 1994; BURNOUF *et al.*, 1991). Entretanto, características intrínsecas das resinas Sephadex, como baixo fluxo de trabalho, limitam o seu uso em amostras viscosas e/ou em amostras contendo proteínas lábeis, especialmente nas etapas iniciais de purificação.

Salientamos ainda que os testes realizados neste trabalho foram realizados na ausência de outros estabilizantes como heparina ou aminoácidos, por exemplo, glicina e histidina, por se tratar de testes em escala pequena. A adição destes reagentes é considerada para o escalonamento do processo.

Além das proteínas dependentes de vitamina K, também foram analisada por “western blot” a presença do fator V e do fator de von Willebrand. O fator V e o FVIII apresentam várias similaridades: atuam como cofatores de proteínas dependentes de vitamina K com atividade enzimática sobre outras proteínas dependentes de vitamina K da cascata de coagulação; ambos são inativados por proteólise limitada; possuem identidade de 40% na seqüência de aminoácidos na região amino-terminal da cadeia pesada e na região carboxi-terminal da cadeia leve, assim como seqüências repetitivas internas semelhantes (KANE e DAVIE, 1988; ASSELTA *et al.*, 2006). O “western blot” com anti-FV visava detectar o padrão de bandas de FV para verificar posteriormente possível reatividade cruzada com anticorpos anti-FV e anti-FVIII. O FvW é uma glicoproteína adesiva plasmática sintetizada pelas células endoteliais e megacariócitos; uma de suas funções é atuar como estabilizante do FVIII no sangue. Moléculas de von Willebrand formam complexos com o FVIII e também multímeros entre si, que atingem até 20 MDa (RUGGERI, 2007). Nas amostras de plasma, FT e reequilíbrio uma forte banda é freqüentemente observada em torno de 120 kDa, interfere em nossos resultados. Essa proteína poderia ser uma proteína ligante de anticorpos ou com atividade peroxidase, mas qualquer explicação necessitaria maiores investigações. A detecção de FV e de FvW, com massa molecular mais alta, é prejudicada por essa detecção inespecífica.

6.1.2 Gel filtração de plasma e Q500

As resinas de troca iônica foram usadas na preparação de fração Q500 a ser aplicada em coluna de gel filtração.

Para aumentar a concentração de proteína das amostras, foram realizadas duas cromatografias de troca iônica, sendo as frações Q500 somadas e concentradas para a cromatografia em gel filtração.

Esta concentração é uma etapa crítica para a recuperação de FVIII. A diminuição da atividade específica do FVIII em alguns experimentos indica que esta etapa não está sendo eficiente. A perda de atividade de FVIII pode ser tanto devido ao tipo de membrana usado como às forças de cisalhamento durante a filtração. Não se pode descartar também o fato de a concentração calculada da amostra concentrada ser mais baixa que o valor real por apresentar leitura no espectrofotômetro acima do ponto mais concentrado da curva de calibração.

A resina Sepharose 4FF exclui moléculas de massa molecular maiores que 10^7 Da e supostamente separa moléculas na faixa de 60 mil a 20 milhões de daltons. Em nossos experimentos de gel filtração de plasma em Sepharose 4FF, observa-se eluição de FVIII em aproximadamente 175 mL (0,58 VC, equivalente a massa molecular maior que 1000kDa).

Os resultados das cromatografias de gel filtração de Q500 (Figura 6.1) mostram a recuperação da atividade máxima de FVIII em volume médio de eluição em 275 mL (0,9VC, massa molecular da ordem de 400 kDa), bastante superior ao volume de recuperação de FVIII na gel filtração de plasma. Entretanto, a gel filtração de Q500 concentrado proveniente de resina Q-Sepharose FF e Q-Sepharose BB apresentaram uma fração extra com alta atividade de FVIII, eluída em volume médio 175 mL (Figura 6.1). Essa distribuição de atividade de FVIII em dois picos distintos na gel filtração de Q500 sugeria a presença de diferentes complexos protéicos contendo FVIII, determinando massas moleculares discretas passíveis de separação. Em experimento empregando as mesmas condições experimentais com amostra de Q500 XL, foi observada a presença de apenas um pico eluído em 275 mL.

Figura 6.1 Gel filtração de Q500 em Sepharose 4FF - Comparação da eluição da atividade de FVIII entre cromatografias De Q500 provenientes de Q-Sepharoses FF, XL e BB.

Propusemos que o processo de troca iônica causava a dissociação de grandes complexos de alto peso molecular contendo FVIII. Talvez essa dissociação estivesse relacionada à alta concentração de sal utilizada na eluição de Q500. Não era possível concluir o grau de dissociação do complexo e se o FVIII era totalmente separado do seu fator protetor, o Fator de von Willebrand. Não se poderia afirmar ainda se havia ativação de FVIII promovendo diminuição das suas cadeias protéicas.

Questionamos se a dissociação do complexo protéico contendo FVIII ocorria devido à alta concentração de sal no tampão de eluição ou se era causada pela interação das moléculas com a resina.

Para investigarmos essas hipóteses, aplicamos plasma contendo 500 mM de NaCl para cromatografia de gel filtração. Observamos que a adição de sal afeta a massa molecular do complexo protéico, sendo o FVIII recuperado em volumes de eluição mais altos que o do plasma sem sal, (250 mL, ~0,8VC, correspondente a massa molecular da ordem de 500 kDa).

Em experimentos de cromatografia de plasma em Q-Sepharose FF, nos quais utilizamos variação da concentração de sal nas soluções de lavagens, verificamos que a lavagem com concentração de 300 mM de NaCl eluía uma parte considerável do FVIII ligado à coluna. Essa fração de eluição Q300 foi aplicada à coluna para gel filtração em Sepharose 4FF. A fração de eluição com maior atividade de FVIII se iguala ao resultado obtido no experimento com plasma adicionado 500 mM NaCl.

Os resultados de experimentos com variação da concentração de sal indicam que a dissociação do complexo de FVIII pode ser causada pela presença de NaCl, e que essa dissociação é aumentada no processo de cromatografia de troca iônica. Investigando a literatura mais antiga verificamos que a dissociação devido ao aumento da concentração de sal havia sido observada por Weiss e Hoyer (1973) e Rick e Hoyer (1973). Estes pesquisadores descreveram que na presença de altas concentrações de NaCl (aproximadamente 800 mM) ocorria a separação das atividades coagulante e de agregação, embora não se conhecesse na época a estrutura do complexo FVIII/Fator de von Willebrand.

Figura 6.2. Gel filtração de plasma, plasma com sal, Q500 e Q300 em Sepharose 4FF - Comparação da eluição da atividade de FVIII entre as cromatografias de gel filtração em Sepharose 4FF em diferentes condições de condutividade (plasma: eluição de plasma com tampão citrato 85 mM NaCl; plasma com 500 mM NaCl: eluição de plasma contendo 500 mM NaCl em tampão citrato 500 mM NaCl; Q300: eluição da fração Q300 da cromatografia de troca iônica com tampão citrato 85 mM NaCl; Q500: eluição da fração Q500 da cromatografia de troca iônica com tampão citrato 85 mM NaCl).

Um dos objetivos dessa segunda purificação por gel filtração é separar o FVIII dos fatores IX, X e outros dependentes de vitamina K. Entretanto, na gel filtração da fração Q500 em Sepharose 4FF, observa-se a sobreposição de eluição de FVIII com os fatores IX e X (Figura 5.28), sugerindo que esta resina não é indicada para a purificação de FVIII a partir de Q500. Comparando a eluição de FVIII na gel filtração de plasma com as de Q500, observa-se o deslocamento do volume de eluição para região de massa molecular mais baixa. A diminuição da massa molecular dos complexos contendo FVIII após o processo de faz com que o FVIII seja eluído incluído na faixa de separação dessa resina.

Assim, foi proposta a utilização de outras resinas de gel filtração. Inicialmente a resina Sephacryl S-200 foi utilizada. Esta resina é indicada para separação de moléculas de massa molecular menores do que a resina Sepharose 4FF. Esperávamos com isso separar a fração com atividade FVIII da fração de massa molecular menor, contendo maior quantidade de proteínas. Os resultados obtidos mostram que a separação dos fatores IX e X do FVIII foi muito mais eficiente em Sephacryl S-200 que em Sepharose 4FF.

Mais recentemente, investigamos a resina Sepharose 6FF. Indicada para resolução de proteínas menores que a Sepharose 4FF, essa resina de gel filtração apresentou uma separação de FVIII de FIX e FX da fração Q500 muito mais eficiente que a Sepharose 4FF (Figura 6.3).

Figura 6.3 Gel filtração de Q500 em Sepharose 4FF e Sepharose 6FF - Comparação da eluição da atividade de FVIII entre gel filtrações de Q500 em Sepharose 4FF e Sepharose 6FF.

A análise de multímeros de fator de FvW nas frações de gel filtração de Q500 em resinas Sepharose 4FF ou 6FF, por eletroforese em gel de agarose e detecção por "western blot" mostraram que o FvW está presente nas frações onde se detecta atividade de FVIII tanto nas frações de maior como também nas frações de menor massa molecular. Este resultado está de acordo com resultados anteriores que indicam que o FVIII presente frações de menor massa molecular estaria ainda complexado com o FvW.

6.1.3 Comparação gel filtração X troca aniônica + concentração + gel filtração

Um dos objetivos do projeto era comparar dois métodos cromatográficos de purificação de FVIII: 1 - gel filtração direta do plasma e 2 - pré purificação de FVIII de plasma por cromatografia de troca iônica, concentração da fração rica em FVIII e gel filtração.

Foi elaborada uma avaliação comparativa de gastos considerando as etapas básicas dos dois processos propostos. Nas Tabelas 6.1 e 6.2, estão apresentadas considerações sobre três aspectos de um processo hipotético: volumes de resinas, volumes de água e tempo gastos para o processamento de 500 L de plasma.

Tabela 6.1 Estimativa de gastos para o processamento de 500 L de plasma por gel filtração direta de plasma

Processo 1 - gel filtração direta de plasma		Estimativas de gastos
Resina 1	Sepharose 4FF	500 L
	Custo US\$/10L= 5.873,00	US\$ 293.750,00
Amostra	Plasma (4 ciclos de 125 L)	500 L
Água	Tampão de equilíbrio (3VC) e eluição (1VC x 4 ciclos). Total 7 VC	3500 L
	Limpeza: NaOH 3VC, água 3VC	3000 L
	Total	6500 L
Tempo	Corrida: fluxo 25 cm/h, supondo coluna de 1 m de diâmetro (= 250L/h)	16h
	Limpeza: fluxo 25 cm/h, supondo coluna de 1 m de diâmetro (= 250L/h)	12h
	Total	28h

Tabela 6.2 Estimativa de gastos para o processamento de 500 L de plasma por cromatografia em resina de troca iônica, concentração e gel filtração

Processo 2 - Cromatografia de plasma em resina de troca iônica, concentração e gel filtração		Estimativas de gastos
Resina 1	Q-Sepharose FF	100 L
	Custo US\$/10L = 7.660,00	US\$ 76.600,00
Amostra	Plasma	500 L
Água	Tampão de equilíbrio e reequilíbrio: 10 VC	1000 L
	Eluições de lavagens 5 VC	500 L
	Eluição da amostra 5V	500 L
	Limpeza (soluções NaOH, NaCl e água): 13 VC	1300 L
	Total	3300 L
Tempo coluna 1	Corrida: fluxo 400 cm/h, supondo coluna de 50 cm de diâmetro (= ~800 L/h)	~3,2h
	Limpeza: fluxo 115 cm/h + 1 hora molho	~6,6h
	Total	9,8h
Concen- tração	Fluxo de concentração 500 L → 50L	50 L
	Tempo	~2h
Resina 2	Sepharose 6FF	50 L
	Custo US\$/10L = 6.505,00	US\$ 32.525,00
Amostra	Concentrado (4 ciclos de 12,5 L)	50 L
Água	Tampão de equilíbrio (3VC) e eluição (1VC x 4 ciclos). Total 7VC	350 L
	Limpeza: NaOH 3VC, água 3VC	300 L
	Total	650 L
Tempo coluna 2	Corrida: fluxo: 25 cm/h, supondo coluna de 50 cm de diâmetro (= 31,5 L/h)	12,7h
	Limpeza: 25 cm/h, supondo coluna de 50 cm de diâmetro (= 31,5 L/h)	9,5h
	Total	22,2h

Sumarizando os dados obtidos nas Tabelas 6.1 e 6.2 e adicionando-se dados de rendimento e fator de purificação obtidos em experimentos do laboratório, construímos a Tabela 6.3.

Tabela 6.3 Comparação do processamento de 500 L de plasma pelos processos de gel filtração direta de plasma e cromatografia de troca iônica seguida de gel filtração.

	Processo 1 - Gel filtração	Processo 2 - Troca iônica + Gel filtração
Custo de resinas	500 L Sepharose 4FF US\$ 293.750,00	100 L Q-Sepharose FF US\$ 76.600,00 50 L Sepharose 6 FF US\$ 32.525,00 Total US\$ 109.125,00
Volume de água	Corrida 3500 L Limpeza 3000L	Corrida 1650 L Limpeza 3600 L
Tempo de processo	Corrida 16 h Limpeza 12 h Total 28 h	Corrida 5,9h Limpeza 16,1h Concentração 2h Total 34h
Dados de purificação dos processos realizados no laboratório		
Fator de purificação	116*	Troca iônica 99 ** Gel filtração 10 *** Total 990
Rendimento (%)	53*	Troca iônica 51% ** Gel filtração 87% *** Total 45%

- * Tabela 5.14: frações 2 e 3
- ** Tabela 5.5: média
- *** Tabela 5.25: frações 6 a 9

Inicialmente, observando-se o total de resina utilizado em cada cromatografia, a quantidade necessária para o processo 1 é bastante maior que o processo 2, o que eleva o custo desse item em aproximadamente três vezes. Considerando que a resina é o material mais custoso do processo (com exceção do plasma), essa diferença pode ser uma vantagem para o processo 2.

Quanto ao consumo de água nos processos de purificação e limpeza das colunas, observa-se que o processo 2 utiliza aproximadamente 1500 L a menos que o processo 1. Apesar de ser um volume grande de água, na grandeza relativa aos processos, essa diferença pode não ser tão significativa.

O tempo gasto no processo 1 é ligeiramente menor que no processo 2. Considerando-se que esse tempo envolve gastos com mão de obra humana, um item consideravelmente dispendioso, além de implicar em menor capacidade produtiva, essa diferença pode ser significativa na escolha de um processo.

Neste processo, fixamos o volume de plasma a ser purificado nos dois processos e desenhamos um esquema de purificação. Considerando-se o processo 2, é preciso enfatizar que este processo pode ser desenhado de maneira mais otimizada, modificando-se relações de tamanho de coluna, tamanho de lote de plasma a ser purificada e proporção resina de troca iônica e resina de gel filtração. A gel filtração é a etapa limitante do tempo e pode ser relativamente melhor aproveitada com o aumento do diâmetro da coluna e aumento da amostra aplicada.

O fator de purificação encontrado no processo 2 é significativamente maior que o encontrado no processo 1, enquanto que o rendimento é um pouco menor, embora o processo 2 tenha seja composta de duas etapas.

No processo 2 realizamos duas etapas de purificação, em que a primeira é uma etapa de captura de vários fatores de coagulação, incluindo o FVIII de interesse e várias proteínas dependentes de vitamina K, como o fator IX, X e proteína C. Após a obtenção de FVIII, a fração restante pode seguir para a purificação de outras proteínas de interesse clínico.

6.1.4 Considerações finais e perspectivas

Devemos considerar que o FVIII é uma molécula de alta labilidade e presente no plasma em baixa quantidade (~150 ng/mL). Além disso, o plasma coletado também apresenta variações na sua composição que pode ser devido ao tipo sangüíneo, dieta do doador, velocidade de separação e de congelamento do plasma. Portanto, a amostra inicial, geralmente um “pool” de bolsas de plasma, possui uma variação em quantidade e qualidade de FVIII. Ainda, a manipulação do plasma, o tratamento e condições da resina, as condições de e o tempo de duração dos processos cromatográficos, o modo de determinação de atividade são fatores que podem influenciar nos resultados experimentais.

Um outro problema relevante a ser considerado é a dificuldade confirmação dos resultados de determinação de atividade devido à perda de atividade das amostras contendo o FVIII ao longo do tempo. Segundo Lamboo *et al.* (2007),

dezesseis por cento da atividade é perdida após 6 horas à temperatura ambiente. Devido à baixa solubilidade da proteína, a realização de experimentos de purificação de FVIII em câmaras frias não é recomendada porque leva a baixos rendimentos. Além disso, mais de 30% de atividade é perdida em 24 h de armazenamento a 4 °C (LAMBOO *et al.*, 2007). Mesmo quando se verifica alguma inconsistência nos resultados, a repetição do teste de uma amostra deixada por uma noite a 4 °C não é confiável. Ainda assim, os dados desse documento mostram que é possível separar FVIII por processos cromatográficos utilizando-se resina de troca iônica, resultando em amostras com alta atividade específica. Convém salientar novamente que nos ensaios aqui descritos, não foram usados estabilizantes de proteína. Está prevista no laboratório nova etapa de ensaios com adição de estabilizantes para verificar o efeito protetor sobre FVIII e/ou interferências nos processos cromatográficos.

Os dados mostrados na Tabela 6.3 indicam que se empregar na primeira etapa de purificação de FVIII uma troca iônica é viável e que os dados de purificação empregando a resina ANX-Sepharose FF são promissores. Portanto seguiremos fazendo experimentos com esta resina. Uma alternativa que pode ser considerada na substituição da segunda gel filtração é a utilização de uma resina mais seletiva na captura de FVIII, o que possibilitaria o aumento do volume processado e a obtenção de produto com alta pureza. O laboratório realiza estudos com a IMAC, cromatografia de afinidade a metal, que pode ter indicações interessantes na purificação de fatores de coagulação. Além disso, resinas de afinidade por anticorpos, utilizadas rotineiramente na purificação de FVIII comercial e a resina Select VIII, desenvolvida para purificação de FVIII recombinante, são alternativas potencialmente interessantes como segunda etapa de purificação do FVIII após a cromatografia de troca aniônica. Finalmente, estudos sobre o efeito de NaCl no tamanho dos multímeros de FvW devem ser aprofundados, para que se possa compreender melhor a formação dos complexos no plasma e os efeitos do sal na coluna de troca aniônica.

6.2 Clonagem de fragmentos gênicos de FVIII para expressão de proteína recombinante, obtenção de anticorpos contra fragmentos de FVIII e análise das frações cromatográficas por "western blot"

A comparação entre os testes de atividade de FVIII pelos métodos tempo de coagulação ou cromogênico foi realizada neste trabalho e foi confirmada a compatibilidade dos resultados. Além destes ensaios de atividade, consideramos que ensaios de "western blot" poderiam auxiliar na análise dos resultados das cromatografias, indicando a distribuição da proteína FVIII nas frações e seu estado de ativação, uma vez que as atividades parciais relacionam-se com clivagens da proteína e mudanças em sua massa molecular. Com anticorpos específicos contra as cadeias do FVIII, a observação de bandas diferentes do padrão esperado poderia inferir a ocorrência de hidrólise ou dissociações na molécula, ou ainda dissociação dos complexos protéicos com fator de von Willebrand.

De fato, a estratégia de utilização de "western blot" para análise de fragmentos de FVIII já foi descrita por Rotblat *et al.* (1985) que mostrou o padrão de bandas de separação eletroforética de FVIII purificado e de FVIII ativado por trombina. Andersson *et al.* (1986) analisou o padrão de FVIII de plasma e de crioprecipitado gel-filtrados na presença ou ausência de inibidores de proteases.

O FVIII é uma proteína com 2332 aminoácidos e peso molecular variando entre 280 e 330 kDa (WOOD *et al.*, 1984). Circula no plasma na forma de heterodímeros ligados ao fator de von Willebrand, o qual pode formar complexos de até 20 MDa. A cadeia pesada de FVIII apresenta tamanho variando entre 90 e 210 kDa, e a cadeia leve tem 80 kDa. As cadeias são ligadas não covalentemente por íon de Ca^{++} . A trombina é o principal ativador fisiológico do FVIII, clivando sítios nas cadeias pesada e leve. O FVIII ativado é um heterotrímero com subunidades de tamanhos 50, 43 e 73 kDa (WANG *et al.*, 2003).

Anticorpos anti-FVIII estão disponíveis comercialmente, mas são proibitivamente caros e de difícil importação para uso freqüente. Uma possibilidade para facilitar a produção de anticorpos anti-FVIII seria a utilização do produto comercial, porém, a grande quantidade de albumina ou fator de von Willebrand nos concentrados de FVIII (além da dificuldade de aquisição) impedem o seu uso para esta finalidade.

A produção de anticorpos contra pequenos fragmentos recombinantes de FVIII expressos em *Escherichia coli*; poderia ser uma forma mais precisa para imunização de animais e obtenção de soro com anticorpos específicos.

Essa proposta foi semelhante a de Huang *et al.* (2004), os quais obtiveram anticorpos monoclonais contra diversos fragmentos de FVIII expressos em *E. coli*, usados para imunizar camundongos. Esses anticorpos foram utilizados na detecção de FVIII recombinante em sobrenadante de culturas de células.

Em nosso laboratório, foram clonados três fragmentos da molécula de FVIII, para expressão com cauda de histidina. Somente o fragmento de cadeia leve foi expresso, purificado satisfatoriamente e usado para imunizar animais. O fragmento de cadeia pesada foi supostamente expresso, mas não se obteve purificação por coluna de afinidade, deixando incerta sua identidade. Esse fragmento foi purificado por eletroeluição e usado para imunizar animais.

A dificuldade para a expressão dos fragmentos de FVIII poderia estar relacionada a várias questões, sendo a mais imediata a diferença no 'codon usage' da bactéria e da sequência gênica do fragmento de eucarioto. Essa dificuldade foi ultrapassada com o uso de bactérias Codon Plus, resultando em maior expressão de fCL. A mesma estratégia não funcionou para os outros fragmentos. O uso da bactéria Rosetta, com maior variedade de tRNAs raros na bactéria, também não foi efetivo. Supõe-se que outros fatores inerentes à sequência utilizada dificultaram a expressão desses fragmentos de FVIII.

Camundongos foram imunizados e soros com anticorpos anti fragmento de cadeia leve e anti fragmento de cadeia pesada foram produzidos. Os soros com anticorpos anti-fCL e anti-fCP foram utilizados em ensaios de "western blot" contra plasma e frações cromatográficas. Enquanto os resultados indicam que o anti-fCL realmente possui reatividade contra a cadeia leve da proteína FVIII, a reatividade do anti-fCP não pode ser claramente confirmada.

"Western blots" usando soros com anticorpos policlonais anti-fCL e anti-fCP e anticorpos monoclonais comerciais anti-CL e anti-CP mostram que a detecção do FVIII no plasma ou nas frações de cromatografia pode ser bastante complexa.

Em nossos ensaios com anticorpos monoclonais anti-FIX e anti-FX, encontramos freqüentemente uma banda inespecífica, com massa molecular aproximada de 120 kDa. Sugeriu-se que essa fosse a detecção de uma proteína ligante de anticorpo ou com atividade de peroxidase. Essa banda é detectada

fortemente em frações de plasma e de FT de cromatografias, e mais fracamente nas frações purificadas Q250 e Q500. Essa detecção prejudica enormemente a avaliação dos resultados, principalmente a detecção de cadeia pesada de FVIII, por se tratar de banda de alta massa molecular.

A separação de amostras protéicas em SDS-PAGE para os "western blots" foi feita em condições não redutoras. Isso impede a dissociação de complexos e a separação esperada no gel, dificultando o reconhecimento das bandas com a distribuição mostrada na literatura. Muitas vezes, são encontrados agregados difíceis de dissociar, mesmo na presença de SDS. Porém, o uso de condições redutoras, em muitos casos, impede o reconhecimento da proteína de interesse pelo anticorpo monoclonal. Por esse motivo, os "westerns blots" foram realizados na condição não redutora.

Possivelmente, por causa das condições não redutoras, ocorre a detecção de bandas em faixa de massa molecular muito alta, sugerindo que o FVIII possa estar ainda ligado, pelo menos parcialmente, à moléculas de fator de von Willebrand. Por esses motivos, e por motivos inerentes ao ensaio de "western blot" (quantidade de proteína no gel, eficiência de transferência, diluição e tempo de incubação de soros e antisoros, sensibilidade do sistema de detecção, tempo de reação de detecção, detecção inespecífica, etc), a quantificação das proteínas detectadas é extremamente difícil.

Pock *et al.* (1998) sugere que ensaios de SDS-PAGE e, principalmente, de "western blot", podem ser úteis na avaliação da qualidade de concentrados de FVIII. Ensaio qualitativo de "western blot", depois de padronizados, podem ser úteis na detecção e acompanhamento de proteínas no processo de purificação.

Nossa experiência sugere que ensaios de "western blot" poderiam ser úteis para avaliação de qualidade de amostras de FVIII mais purificadas, como por exemplo, em testes de estabilidade de armazenamento ou a tratamentos antivirais. Para as etapas iniciais de purificação, a baixa concentração de FVIII e interferência de outras proteínas das amostras dificultam a análise dos resultados de "western blot", tornando-o inviável como ensaio de rotina.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, L.O.; FORMAN, N.; HUANG, K.; LARSEN, K.; LUNDAN, A.; PAVLU, B.; SANDERG, H.; SEWRIN, K.; SMART, J. Isolation and characterization of human factor VIII: molecular forms in commercial factor VIII concentration, cryoprecipitate and plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 83, p. 2979-2983, 1986.

ARRIGHI, S.; PACENTI, L.; BORRI, M.G. Factor VIII:c concentrated virus inactivated: progress in purification by using classic chromatographic methods. **Vox Sang.**, v. 64, p. 13-18, 1993.

ASSELTA, R.; TENCHINI, M.L.; DUGA, S. Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side. **J. Thromb. Haemost.**, v. 4, n. 1, p. 26-34, 2006.

AUSUBEL, M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1990.

FEDERICI, B.; MANNUCCI, P.M.; MARCO, P. Von Willebrand factor in high-purity factor VIII complex concentrates: chaperone protein or key to therapies? A meeting report. **Haemophilia**, v. 14, p. 133-139, 2008.

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

BERNTORP, E.; ARCHEY, W.; AUERSWALD, G.; FEDERICI, A.B.; FRANCHINI, M.; KNAUB, S.; KREUZ, W.; LETHAGEN, S.; MANNUCCI, P.M.; POLLMANN, H.; SCHARRER, I.; HOOTS, K. A systematic overview of the first pasteurised VWF/FVIII medicinal product Haemate P/ Humate-P: history and clinical performance. **Eur. J. Haematol.**, v. 70, p. 3-35, 2008.

BEUKEN, E.; VINK, C.; BRUGGEMAN, C.A. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. **Biotechniques**, v. 24, n. 5, p. 748-751, 1998.

BLOOM, A.L. Progress in clinical management of haemophilia. **Thromb. Haemostasis**, v. 66, n. 1, p. 166-177, 1991.

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.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referência: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BURNOUF, T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. **J. Chromatogr. B Biomed. Appl.**, v. 664, p. 3-15, 1995.

BURNOUF, T. Modern plasma fractionation. **Transf. Med. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 101-117, 2007.

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

BUTENAS, S.; MANN, K.G. Blood coagulation. **Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 5-15, 2002.

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.

CHANDLER, W.L.; FERREL, C.; LEE, J.; TUN, T.; KHA, H. Comparison of three methods for measuring factor viii levels in plasma. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 120, p. 34-39, 2003.

CHROMOGENIX INSTRUMENTATION LABORATORY COMPANY. **Manual do kit Coatest SP4 FVIII**. Lexington, USA: CILC. Revisão maio 2006.

COHN, E.J.; STRONG, L.E.; HUGHES, W.L.J.; MULFORD, D.J.; ASHWORTH, J.N.; MELIN, M.; TAYLOR, H.L. Preparation and properties of serum and plasma protein. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein compounds of biological tissues and fluids. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 68, p. 459-475, 1946.

COLLINS, H.C.; BRAGA, L.G. **Introdução a métodos cromatográficos**. 3.ed. Campinas: Unicamp, 1988. p. 298.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.K.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

DEMPLE, B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon-a review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 53-7, 1996.

FARRUGIA, A. Evolving perspectives in product safety for haemophilia. **Haemophilia**, v. 8, p. 236-243, 2002.

FAY, P.J. Regulation of factor VIIIa in the intrinsic factor Xase. **Thromb. Haemost.**, v.82, n. 2, p. 193-200, 1999.

FAY, P.J. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. **Blood Rev.**, v. 18, p. 1-15, 2004.

FEDERICI, A.B. The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues. **Haematologica**, v. 88, n. 6, 2003

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

GE HEALTHCARE. **Chromatography online support**. Available from: <http://www1.gelifesciences.com/Aptrix/upp01399.nsf/content/chromatography_main_page>. Acesso em: 23 jan. 2005.

GITSCHIER, J.; WOOD, W.I.; GORALKA, T.M.; WION, K.L.; CHEN, E.Y.; EATON, D.H.; VEHAR, G.A.; CAPON, D.J.; LAWN, R.M. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature**, v. 312, p. 326-330, 1984.

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

GOUDEMAND, J.; ROTHSCCHILD, C.; DEMIGUEL, V.; VINCIGUERRAT, C.; LAMBERT, T.; CHAMBOST, H.; BOREL-DERLON, A.; CLAEYSSSENS, S.; LAURIAN, Y.; CALVEZ, T. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 46-51, 2006.

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.

HEMOFIL M: injetável. BAXTER HOSPITALAR LTDA. **Método M. Purificação Monoclonal**. Bula de remédio. Fator Anti-Hemofílico (Humano).

HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 21, p. 1-11, 2007.

HOOTS, W.K. The future of plasma-derived clotting factor concentrates. **Haemophilia**, v. 7, p. 4-9, 2001.

HUANG, C.C.; LI, L.T.; SHEN, M.C.; CHEN, J.Y; LIN, S.W. Domain specific monoclonal anti-factor VIII antibodies generated by inclusion body-renaturated factor VIII peptides. **Thromb. Res.**, v. 101, p. 405-415, 2001.

JAGSCHIES, G. Process-scale chromatography. In: **ULLMANN'S encyclopedia of industrial chemistry**. Verlagsgesellschaft: Weinheim, 1988. v. 3B, p. 10-12.

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

KAUFMAN, R.J.; PIPE, S.W. Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor. **Thromb. Haemostasis**, v. 82, n. 2, p. 201-208, 1999.

KAUFMAN, R. J. The impact of gene technology on plasma proteins. In: **BLOOD separation and plasma fractionation**. New York: James Robinson Harris, 1990. p. 449-466.

KNOR, S.; KHRENOV, A.V.; LAUFER, B.; SAENKO, E.L.; HAUSER, C.A.E.; KESSLER, H. Development of a peptidomimetic ligand for efficient isolation and purification of factor viii via affinity chromatography. **J. Med. Chem.**, v. 50, p.4329-4339.

KRIZEK, D.R.; RICK, M.E. A rapid method to visualize von Willebrand factor multimers by using agarose gel electrophoresis, immunolocalization and luminographic detection. **Thrombosis Res.**, v. 97, p. 457-462, 2000.

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

LAMBOO, M.; POLAND, D.C.W.; EIKENBOOM, C.J.; HARVEY, M.S.; GROOT, E.; BRAND, A. Coagulation parameters of thawed fresh-frozen plasma during storage at different temperatures. **Transf. Med.**, v. 17, p. 18-186, 2007.

LEE, B. Recombinant clotting factors in the treatment of hemophilia. **Thromb. Haemostasis**, v. 82, n. 2, p. 516-524, 1999.

LENTING, P.J.; VAN MOURIK, J.A.; MERTENS, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. **Blood**, v. 92, n. 11, p. 3983-3996, 1998.

LOLLAR, P.; FAY, P.J.; FASS, D.N. Factor VIII and Factor VIIIa. **Methods Enzymol.**, v. 222, p. 128-142, 1993.

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

MAC-DOWELL SOARES, B. **Política de hemoderivados no Brasil**: desafios e perspectivas. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília. Brasília, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Especializada. **Perfil das Coagulopatias Hereditárias no Brasil 2007** - Série G. Estatística e Informação em Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_2007.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2008.

NILSSON, I. M. **Haemophilia**. Sweden: Phamacia plasma products, 1994. 100p.

O'BRIEN, L.M.; MASTRI, M.; FAY, P.J. Regulation of factor VIIIa by human activated protein C and S: inactivation of cofactor in the intrinsic factor Xase. **Blood**, v. 96, p. 1714-1720, 2000.

PATEK, A.J.; TAYLOR, F.H.L. Hemophilia II. Some properties of a substance obtained from normal plasma effective in accelerating the clotting of hemophilic blood. **J. Clin. Invest.**, v. 16, p. 113, 1938.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Rio de Janeiro: Manole, 2005. p. 166-211.

PIPE, S.W.; SAINT-REMY, J.M.; WALSH, C.E. New high-technology for the treatment of haemophilia. **Haemophilia**, v. 10, s. 4, p. 55-63.

POCK, K.; JUNGBAUER, A.; KANNICHT, C.; LOSTER, K.; BUCHACHER, A.; JOSIC, D. Electrophoretic analyses of clotting factor VIII concentrates. **Anal. Chim. Acta.**, v. 372, p. 219-229, 1998.

RAMOS, C.R.; ABREU, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; HO, P.L. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 8, p. 1103-9, 2004.

RAW, I.; MARTINS, E.A.L.; HIGASHI, H.G. MÉTODOS DE FRACIONAMENTO DO PLASMA. In: BORDIN, J.O.; LANGHI-JR, D.M.; COVAS, D.T. **Hemoterapia**. São Paulo: Atheneu, 2007.

RICK, M.E.; HOYER, L.W. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII). V. Immunologic properties of AHF subunits produced by salt dissociation. **Blood**, v. 42, n. 5, p. 737-47, 1973.

ROCK, G. Purification of factor VIII procoagulant from plasma. In: **BLOOD separation and plasma fractionation**. New York: James Robinson Harris, 1990. p. 241-259.

ROSNER, F. Hemophilia in the talmud and rabbinic writings. **Ann. Intern. Med.**, v. 70, p. 833, 1968.

ROTLAT, F.; O'BRIEN, D.P.; O'BRIEN, F.J.; GOODALL, A.H.; TUDDENHAN, E.G.D. Purification of human factor VIII:C and its characterization by western blotting using monoclonal antibodies. **Biochemistry**, v. 24, p. 4294-4300, 1985.

RUGGERI, Z.M. Structure and function of von Willebrand factor. **Thromb. Haemos.**, v. 82, n. 2, p. 576-584, 1999.

RUGGERI, Z.M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. **Thrombosis Res.**, v. 120, 2007. Suppl. 1: 5-9

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SRIVASTAVA, A. Choice of factor concentrates for haemophilia: a developing world perspective. **Haemophilia**, v. 7, n. 1, p. 117-122, 2001.

TANAKA, A. **Purificação de fator VIII a partir de sangue suíno**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

TANAKA, K.; ARASHIRO, F.; SAWATANI, E.; DIAS, G.A.; CAMPOS, T.X.B.; SHIGUEOKA, E.M.; NAKAO, H.C.; ROCHA, T.R.F.; CHAMONE, D. Purificação de fator VIII pelo método de cromatografia com gel de troca iônica. **Laes & Haes**, v. 113, p. 130-136, 1998.

TE BOOY, M.P.; FABER, A.; DE JONGE, E.; WOLTERINK, E.P.; RIETHORST, W.; BEUGELING, T.; BANTJES, A.; OVER, J.; KÖNIG, B.W. Large-scale purification of factor VIII by affinity chromatography: optimization of process parameters. **J. Chromatogr.**, v. 9, n. 503(1), p.103-14, 1990.

TE BOOY, M.P.; 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.

TEH, L.C.; FROGER, M. Direct capture of plasma factor VIII:C by ion exchange chromatography. **Vox Sang.**, v. 67, p. 8-13, 1994.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

VEHAR, G.A.; KEYT, B.; EATON, D.; RODRIGUEZ, H.; O'BRIEN, D.P.; ROTBLAT, F.; OPPERMANN, H.; KECK, R.; WOOD, W.I.; HARKINS, R.N.; TUDDENHAM, E.G.D.; LAWN, R.M.; CAPON, D.J. Structure of human factor VIII. **Nature**, v. 312, p. 337-342, 1984.

VLOT, A.J.; KOPPELMAN, S.J.; BAUMA, B.M.; SIXMA, J.J. Factor VIII and von Willebrand factor. **Thromb. Haemos.**, v. 79, p. 456-465, 1998.

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

WEINSTEIN, R.E. Immunoaffinity purification of factor VIII. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 19, n. 2, p. 84-91, 1989.

WEISS, H.J.; HOYER, I.W. Von Willebrand factor: dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. **Science**, v. 182, n. 117, p. 1149-51, 1973.

WOOD, W.I.; CAPON, D.J.; SIMONSEN, C.C.; EATON, D.L.; GITSCHIER, J.; KEYT, B.; SEEBURG, P.H.; SMITH, D.H.; HOLLINGSHEAD, P.; WION, K.L.; DELWART, E.; TUDDENHAM, E.G.D.; VEHAR, G.A.; LAWN, R.M. Expression of active human factor VIII from recombinant clones. **Nature**, v. 312, p. 330-337, 1984.

ANEXOS

ANEXO A - Curvas de calibração para determinação de concentração de proteínas, determinação de atividade e determinação de proteína e atividade de FVIII nas frações de cromatografia em diferentes ensaios.

Ensaio 1 - Determinação das condições de eluição de FVIII em resina de troca aniônica usando concentrações crescentes de NaCl:

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,654
5	0,954
10	1,165
15	1,282
20	1,647
25	1,850

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,126	0,000	0,126
25	0,177	-0,001	0,178
50	0,320	-0,001	0,321
100	0,706	0,003	0,703

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm	% Ativ 405-492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	[]prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Plasma	500	0,706	0,003	0,703	102,43	51216	1,154	10,26	0,15	68,42	34212
FT	500	0,005	0,000	0,005	-1,75	-873	1,122	9,58	0,15	63,85	31927
Reeq	700	0,001	0,000	0,001	-2,34	-1640	0,870	4,18	0,50	8,36	5855
Q150	200	0,000	0,014	-0,014	-4,58	-916	0,866	4,10	5,00	0,82	164
Q200	200	0,018	0,003	0,015	-0,25	-51	1,034	7,69	10,00	0,77	154
Q250	200	0,043	0,003	0,040	3,48	696	0,908	5,00	5,00	1,00	200
Q300	200	0,418	0,000	0,418	59,90	11979	0,940	5,68	3,00	1,89	379
Q350	200	0,627	0,000	0,627	91,09	18218	1,114	9,41	10,00	0,94	188
Q400	200	0,430	-0,001	0,431	61,84	12367	0,863	4,03	20,00	0,20	40
Q450	200	0,114	-0,002	0,116	14,82	2964	0,990	6,75	200,00	0,03	7
Q500	200	0,024	0,002	0,022	0,79	158	0,864	4,05	200,00	0,02	4
Q550	200	0,000	-0,001	0,001	-2,34	-469	0,898	4,78	200,00	0,02	5
Q600	200	0,000	0,001	-0,001	-2,64	-528	0,901	4,85	200,00	0,02	5
Q1000	200	-0,007	-0,001	-0,006	-3,39	-678	0,806	2,81	200,00	0,01	3

Ensaio 2 - Análise da perda de FVIII no FT da cromatografia de plasma em Q-Sepharose FF:

BSA (mg)	Abs (595 nm)
0	0,419
5	0,610
10	0,842
15	1,034
20	1,268
25	1,369

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

FVIII IU/mL	Abs 405	Abs 492	Abs.405-492
100	0,471	0	0,471
70	0,313	0	0,313
50	0,251	0	0,251
25	0,074	-0,003	0,077
10	0,04	0,001	0,039
0	0	0	0

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

tempo (s)	% ativ	log % ativ	log tempo
51,1	100	2,0	1,71
56,8	50	1,7	1,75
63,7	20	1,3	1,80
73,4	10	1,0	1,87
76,8	5	0,7	1,89
155	0

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método de tempo de coagulação. O ensaio é feito com diluições do plasma considerando 100 % a atividade medida no plasma sem diluição. Na curva Y representa o log do tempo de coagulação (s) e X = log % de atividade em relação ao plasma não diluído.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

Fração	Bradford				Atividade de FVIII							
	Abs 595 nm	Prot (µg)	Fator corr – diluição	[Prot] (µg/µL)	Método Cromogênico			Método Tempo de coagulação				
					Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 492-Abs 405	% Ativ	Tempo	% Ativ	Log Tempo	Log % Ativ
Plasma	0,812	9,66	5	54,13	0,471	0	0,471	100,73	51,1	103,45	1,71	2,01
QFT 1	0,520	2,28	3	7,64	-0,006	0	-0,006	1,35	87,1	2,36	1,94	0,37
QFT 2	0,722	7,38	5	36,88	-0,006	0,002	-0,008	0,94				
QFT 3	0,886	11,54	5	56,45	-0,005	0	-0,005	1,56	82,2	3,55	1,91	0,55
QFT 4	0,921	12,43	5	62,35	-0,004	-0,003	-0,001	2,40				
QFT 5	0,938	12,85	5	61,71	0,008	-0,001	0,009	4,48	79,9	4,34	1,90	0,64
QFT 6	0,895	11,76	5	58,03	0,007	-0,005	0,012	5,10				
QFT 7	0,931	12,68	5	62,41	0,021	0,004	0,017	6,15	75,4	6,55	1,88	0,82
QFT 8	0,898	11,83	5	60,30	0,025	0,006	0,019	6,56				
QFT 9	0,974	13,76	5	65,90	0,024	0,004	0,02	6,77	76,5	5,91	1,88	0,77
QFT 10	0,961	13,43	5	65,60	0,021	0,001	0,02	6,77				
Qreeq	0,546	2,93	3	9,88	-0,003	0	-0,003	1,98	-	-	-	-
Q250	0,490	1,50	0,1	0,15	0,167	0,001	0,166	37,19	60,0	33,13	1,78	1,52
Q500 1	0,481	1,29	0,1	0,13	0,403	0	0,403	86,56	53,9	70,87	1,73	1,85
Q500 2	0,473	1,07	0,1	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-

Ensaio 3 - Aumento do volume de plasma aplicado em Q-Sepharose BB

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,425
5	0,906
10	1,083
15	1,401
20	1,504
25	1,713

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,059	0,001	0,058
25	0,143	0,003	0,140
50	0,279	0,001	0,278
70	0,367	0,004	0,363
100	0,513	0,003	0,510

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	Conc prot (mg/mL)	Prot total (mg)
Plasma	700	0,513	0,003	0,510	98,29	68806	1,187	12,80	0,2	64,00	44799
FT 1	500	0,078	0,003	0,075	13,00	6500	1,012	9,22	0,2	46,10	23052
FT 2	50	0,117	0,004	0,113	20,45	1023	1,117	11,37	0,2	56,84	2842
FT 3	50	0,130	0,004	0,126	23,00	1150	1,128	11,59	0,2	57,97	2898
FT 4	50	0,149	0,002	0,147	27,12	1356	1,134	11,72	0,2	58,58	2929
FT 5	50	0,131	0,004	0,127	23,20	1160	1,133	11,70	0,2	58,48	2924
Reeq 1	500	0,009	0,002	0,007	-0,33	-167	0,872	6,36	1,25	5,09	2543
Q250 1	500	0,265	0,002	0,263	49,86	24931	0,958	8,12	10	0,81	406
Q500 A1	200	0,621	0,003	0,618	119,47	23894	0,970	8,36	10	0,84	167
Q500 B1	300	0,064	0,003	0,061	10,25	3076	0,999	8,96	100	0,09	27

Ensaio 4 - Retorno de "flow through" (FT) para a coluna de Q-Sepharose FF

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,384
5	0,664
10	0,883
15	1,041
20	1,147
25	1,259

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,120	-0,001	0,121
25	0,279	0,001	0,278
50	0,502	0,001	0,501
70	0,672	0,002	0,670
100	0,869	0,001	0,868

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	[]prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Plasma	500	1,017	0,002	1,015	95,49	47747	0,878	11,96	6,67	79,75	39873
FT1	500	0,052	0,002	0,050	1,47	736	0,907	12,81	3,33	42,70	21350
FT2	445	0,012	0,000	0,012	-2,90	-1289	1,062	17,34	3,33	57,81	25724
FT3	440	0,003	0,003	0,000	-4,28	-1881	1,029	16,38	3,33	54,59	24020
Reeq	500	0,000	0,002	-0,002	-4,51	-2253	0,524	1,61	3,33	5,37	2685
Q250	500	0,286	0,003	0,283	28,25	14126	0,687	6,38	0,17	1,06	531
Q500 A	200	0,658	0,001	0,657	71,24	14248	0,675	6,03	0,17	1,00	201
Q500 B	300	0,260	0,000	0,260	25,61	7683	0,831	10,59	0,01	0,05	15

Ensaio 5 - Comparação entre cromatografias de plasma em resinas de troca iônica Q-Sepharose FF, XL e BB

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,391
5	0,657
10	0,893
15	1,063
20	1,205
25	1,326

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,046	0,001	0,045
25	0,111	0,000	0,111
50	0,228	0,004	0,224
70	0,307	0,000	0,307
100	0,464	-0,010	0,474

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Fator corr dil	[]prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Plasma	500	0,464	-0,010	0,474	101,83	50915	0,831	10,03	6,67	66,85	33423
FT FF	500	-0,003	-0,008	0,005	2,04	1021	0,731	7,33	6,67	48,88	24438
Reeq FF	500	-0,003	-0,012	0,009	2,89	1447	0,667	5,61	1,00	5,61	2803
Q250 FF	500	0,065	-0,010	0,075	16,94	8468	0,824	9,84	0,10	0,98	492
Q500 FF	500	0,153	-0,011	0,164	35,87	17936	0,601	3,83	0,10	0,38	191
Plasma	500	0,464	-0,010	0,474	101,83	50915	0,831	10,03	6,67	66,85	33423
FT XL	500	0,001	0,001	0,000	0,98	489	0,762	8,17	6,67	54,45	27224
Reeq XL	500	0,130	-0,010	0,140	30,77	15383	0,676	5,85	1,00	5,85	2925
Q250 XL	440	0,039	-0,014	0,053	12,26	5392	0,747	7,76	0,10	0,78	342
Q500 XL	500	0,130	-0,013	0,143	31,40	15702	0,526	1,81	0,10	0,18	90
Plasma	500	0,464	-0,010	0,474	101,83	50915	0,831	10,03	6,67	66,85	33423
FT BB	500	0,030	0,002	0,028	6,94	3468	0,8	9,19	6,67	61,28	30638
Reeq BB	500	-0,001	0,001	-0,002	0,55	277	0,765	8,25	1,00	8,25	4124
Q250 BB	500	0,194	-0,005	0,199	43,32	21660	0,777	8,57	0,10	0,86	429
Q500 BB	500	0,218	0,012	0,206	44,81	22404	0,652	5,20	0,10	0,52	260

Ensaio 6 - Cromatografia de plasma contendo 500 mM NaCl em coluna de Sepharose 4FF

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,679
5	0,984
10	1,177
15	1,197
20	1,438

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,062	0,000	0,062
25	0,152	0,010	0,142
50	0,304	0,009	0,295
70	0,311	0,000	0,311
100	0,445	0,006	0,439

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	Conc prot (mg/mL)	Prot total (mg)
Plasma	75	0,445	0,006	0,439	96,42	7231	1,187	12,66	0,2	63,32	4749
GF1	30	-0,006	-0,003	-0,003	-6,37	-191	0,706	-1,24	200	-0,01	0
GF2	30	-0,005	-0,001	-0,004	-6,60	-198	0,702	-1,35	200	-0,01	0
GF3	30	-0,002	-0,001	-0,001	-5,91	-177	0,747	-0,05	200	0,00	0
GF4	30	0,008	0,001	0,007	-4,05	-121	1,134	11,13	200	0,06	2
GF5	30	0,010	-0,002	0,012	-2,88	-87	1,247	14,40	100	0,14	4
GF6	30	0,009	0,004	0,005	-4,51	-135	1,217	13,53	25	0,54	16
GF7	30	0,213	0,002	0,211	43,40	1302	1,301	15,96	5	3,19	96
GF8	30	0,343	0,003	0,340	73,40	2202	1,344	17,20	1	17,20	516
GF9	30	0,162	0,000	0,162	32,00	960	1,111	10,47	0,2	52,34	1570
GF10	30	0,043	-0,002	0,045	4,79	144	1,201	13,07	0,2	65,35	1960
GF11	30	0,017	-0,003	0,020	-1,02	-31	1,030	8,13	0,2	40,64	1219
GF12	30	0,012	0,000	0,012	-2,88	-87	1,165	12,03	1	12,03	361
GF13	30	-0,001	0,000	-0,001	-5,91	-177	1,352	17,43	50	0,35	10
GF14	30	-0,001	0,000	-0,001	-5,91	-177	1,077	9,49	100	0,09	3
GF15	30	0,000	0,000	0,000	-5,67	-170	1,007	7,46	200	0,04	1
GF16	30	0,001	0,002	-0,001	-5,91	-177	0,889	4,05	200	0,02	1

Ensaio 7 - Cromatografia de Q300 em Sepharose 4FF

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,679
5	0,984
10	1,177
15	1,197
20	1,438

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,051	0,004	0,047
25	0,201	0,000	0,201
50	0,320	0,009	0,311
100	0,677	-0,001	0,678

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm	% Ativ 405-492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	Conc prot (mg/mL)	Prot total (mg)
Plasma	500	0,677	-0,001	0,678	99,35	49676	1,209	13,30	0,2	66,50	33251
FT	500	0,145	0	0,145	20,97	10485	1,162	11,94	0,2	59,71	29855
Reeq	350	0,011	0,001	0,01	1,12	391	1,095	10,01	2,5	4,00	1401
Q300 A	300	0,495	0,002	0,493	72,15	21644	1,276	15,24	10	1,52	457
Q300 B	200	0,207	-0,001	0,208	30,24	6047	1,337	17,00	50	0,34	68
Perm	225	0,003	-0,004	0,007	0,68	152	0,834	2,46	200	0,01	3
Conc	85	1,224	-0,003	1,227	180,09	15308	1,126	10,90	2,5	4,36	371
Conc	75	1,224	-0,003	1,227	180,09	13507	1,126	10,90	2,5	4,36	327
GF1	30	0,003	-0,003	0,006	0,53	16	0,703	-1,32	200	-0,01	0
GF2	30	0,003	-0,003	0,006	0,53	16	0,708	-1,18	200	-0,01	0
GF3	30	0,007	-0,002	0,009	0,97	29	0,693	-1,61	200	-0,01	0
GF4	30	0,034	-0,003	0,037	5,09	153	0,742	-0,20	200	0,00	0
GF5	30	0,037	-0,002	0,039	5,38	161	0,951	5,84	200	0,03	1
GF6	30	0,444	-0,002	0,446	65,24	1957	1,137	11,22	50	0,22	7
GF7	30	0,802	0,001	0,801	117,44	3523	1,065	9,14	10	0,91	27
GF8	30	0,95	0,002	0,948	139,06	4172	1,192	12,81	5	2,56	77
GF9	30	0,62	0,008	0,612	89,65	2689	1,372	18,01	5	3,60	108
GF10	30	0,392	0,004	0,388	56,71	1701	1,303	16,02	5	3,20	96
GF11	30	0,138	0,002	0,136	19,65	589	1,212	13,39	10	1,34	40
GF12	30	0,005	0,009	-0,004	-0,94	-28	1,176	12,35	50	0,25	7
GF13	30	0,004	-0,001	0,005	0,38	11	1,002	7,32	200	0,04	1
GF14	30	0,003	0,007	-0,004	-0,94	-28	0,812	1,83	200	0,01	0
GF15	30	0,007	0,013	-0,006	-1,24	-37	0,762	0,38	200	0,00	0

Ensaio 8 - Cromatografia de plasma utilizando resina de gel filtração Sepharose 4FF

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,410
5	0,585
10	0,832
15	1,011
20	1,094
25	1,273

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,077	0,001	0,076
25	0,161	0,002	0,159
50	0,298	0,004	0,294
70	0,416	0,003	0,413
100	0,517	0,004	0,513

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Fator corr dil	[]prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Plasma	75	0,517	0,004	0,513	94,42	7082	0,686	7,23	10,000	72,27	5420
GF1	50	0,016	0,015	0,001	-4,04	-202	0,730	8,51	0,005	0,04	2
GF2	50	0,037	0,006	0,031	1,73	87	0,386	-1,49	0,005	-0,01	0
GF3	50	0,383	0,010	0,373	67,50	3375	1,109	19,52	0,005	0,10	5
GF4	50	0,216	0,010	0,206	35,38	1769	0,379	-1,70	0,050	-0,17	-8
GF5	50	0,137	0,008	0,129	20,58	1029	0,722	8,27	2,000	16,55	827
GF6	50	0,067	0,013	0,054	6,15	308	1,114	19,67	2,000	39,34	1967
GF7	50	0,028	0,009	0,019	-0,58	-29	0,592	4,49	1,000	4,49	225
GF8	50	0,035	0,017	0,018	-0,77	-38	0,823	11,21	0,005	0,06	3
GF9	50	0,017	0,006	0,011	-2,12	-106	0,419	-0,53	0,005	0,00	0

Ensaio 9 - Cromatografia de plasma utilizando resina de gel filtração Sepharose 4FF. Aumento do volume de plasma aplicado em Sepharose 4FF

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,384
5	0,664
10	0,883
15	1,041
20	1,147
25	1,259

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,120	-0,001	0,121
25	0,279	0,001	0,278
50	0,502	0,001	0,501
70	0,672	0,002	0,670
100	0,869	0,001	0,868

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	[]prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Plasma	95	1,017	0,002	1,015	95,49	9072	0,878	11,96	6,67	79,75	7576
GF1	50	0,003	0,002	0,001	-4,16	-208	0,413	-1,63	0,01	-0,01	-1
GF2	50	0,340	0,002	0,338	34,57	1729	1,029	16,38	0,01	0,08	4
GF3	50	0,588	0,002	0,586	63,08	3154	0,678	6,11	0,10	0,61	31
GF4	50	0,198	0,001	0,197	18,37	918	1,265	23,28	0,20	4,66	233
GF5	50	0,092	0,002	0,090	6,07	303	1,004	15,65	0,20	3,13	156
GF6	50	0,027	0,004	0,023	-1,63	-82	0,873	11,82	0,20	2,36	118
GF7	50	0,010	0,000	0,010	-3,13	-156	0,539	2,05	0,20	0,41	20
GF8	50	0,004	0,001	0,003	-3,93	-197	0,699	6,73	0,20	1,35	67
GF9	50	0,003	0,001	0,002	-4,05	-202	0,434	-1,02	0,01	-0,01	-1

Ensaio 10 - Gel filtração de Q500 obtido de cromatografia de plasma em Q-Sepharose FF

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,410
5	0,585
10	0,832
15	1,011
20	1,094
25	1,273

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492
0	0,000	0,000	0,000
10	0,077	0,001	0,076
25	0,161	0,002	0,159
50	0,298	0,004	0,294
70	0,416	0,003	0,413
100	0,517	0,004	0,513

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Fator corr dil	[] prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Plasma	500	0,517	0,004	0,513	94,42	47212	0,686	7,23	10,000	72,27	36134
FT 1	500	0,017	0,004	0,013	-1,73	-865	0,660	6,47	10,000	64,71	32355
Reeq 1	500	0,009	0,000	0,009	-2,50	-1250	0,789	10,22	0,800	8,18	4088
Q200 1	500	0,177	0,002	0,175	29,42	14712	0,564	3,68	0,200	0,74	368
Q500 A1	200	0,689	0,002	0,687	127,88	25577	0,685	7,20	0,100	0,72	144
Q500 B1	300	0,030	0,002	0,028	1,15	346	0,698	7,58	0,005	0,04	11
Plasma	500	0,517	0,004	0,513	94,42	47212	0,686	7,23	10,000	72,27	36134
FT 2	500	0,025	0,001	0,024	0,38	192	0,639	5,86	10,000	58,60	29302
Reeq 2	500	0,022	0,000	0,022	0,00	0	0,749	9,06	0,800	7,25	3623
Q200 2	500	0,203	0,014	0,189	32,12	16058	0,575	4,00	0,200	0,80	400
Q500 A2	200	0,714	0,002	0,712	132,69	26538	0,696	7,52	0,100	0,75	150
Q500 B2	300	0,044	0,003	0,041	3,65	1096	0,674	6,88	0,005	0,03	10
Pool	400	0,807	0,017	0,790	147,69	59077	0,712	7,98	0,100	0,80	319
Perm	320	0,027	0,015	0,012	-1,92	-615	0,425	-0,36	0,005	0,00	-1
Conc	80	1,586	0,011	1,575	298,65	23892	0,746	8,97	0,400	3,59	287
Q500 conc	75	1,586	0,011	1,575	298,65	22399	0,746	8,97	0,400	3,59	269
GF1	50	0,020	0,001	0,019	-0,58	-29	0,415	-0,65	0,005	0,00	0
GF2	50	0,105	0,001	0,104	15,77	788	0,449	0,34	0,005	0,00	0
GF3	50	0,729	0,003	0,726	135,38	6769	0,586	4,32	0,005	0,02	1
GF4	50	0,528	0,006	0,522	96,15	4808	0,571	3,88	0,200	0,78	39
GF5	50	1,133	0,000	1,133	213,65	10683	0,897	13,36	0,200	2,67	134
GF6	50	0,881	0,003	0,878	164,62	8231	0,836	11,59	0,200	2,32	116
GF7	50	0,050	0,004	0,046	4,62	231	0,913	13,83	0,010	0,14	7
GF8	50	0,008	0,001	0,007	-2,88	-144	0,337	-2,92	0,005	-0,01	-1

Ensaio 11 - Gel filtração de Q500 obtido de cromatografia de plasma em Q-Sepharose XL

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,410
5	0,585
10	0,832
15	1,011
20	1,094
25	1,273

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0	0	0
10	0,004	0,001	0,003
25	0,013	0,001	0,012
50	0,058	0,006	0,052
70	0,097	0,002	0,095
100	0,148	0,003	0,145

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Fator corr dil	[]prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Plasma	500	0,244	0,069	0,175	105,47	52733	0,691	7,56	10,000	75,58	37790
FT 1	500	0,101	0,070	0,031	9,47	4733	0,663	6,70	10,000	66,99	33495
Reeq 1	500	0,099	0,069	0,030	8,80	4400	0,547	3,19	0,800	2,55	1274
Q200 1	500	0,100	0,068	0,032	10,13	5067	0,633	5,69	0,200	1,14	569
Q500 A1	200	0,208	0,071	0,137	80,13	16027	0,769	9,64	0,100	0,96	192
Q500 B1	300	0,102	0,070	0,032	10,13	3040	0,951	14,93	0,005	0,07	21
Plasma	500	0,244	0,069	0,175	105,47	52733	0,691	7,56	10,000	75,58	37790
FT 2	500	0,106	0,073	0,033	10,80	5400	0,676	6,94	10,000	69,36	34680
Reeq 2	500	0,100	0,069	0,031	9,47	4733	0,665	6,62	0,800	5,29	2647
Q200 2	500	0,098	0,068	0,030	8,80	4400	0,548	3,22	0,200	0,64	322
Q500 A2	200	0,162	0,068	0,094	51,47	10293	0,799	10,51	0,100	1,05	210
Q500 B2	300	0,104	0,069	0,035	12,13	3640	0,887	13,07	0,005	0,07	21
Pool	400	0,202	0,073	0,129	74,80	29920	0,749	9,06	0,100	0,91	364
Perm	320	0,101	0,075	0,026	6,13	1963	0,463	0,74	0,005	0,00	1
Conc	85	0,526	0,083	0,443	284,13	24151	0,867	12,49	0,400	5,00	425
Q500 Conc	75	0,526	0,083	0,443	284,13	21310	0,867	12,49	0,400	5,00	375
GF1	50	0,098	0,068	0,030	8,80	440	0,435	-0,07	0,005	0,00	0
GF2	50	0,098	0,068	0,030	8,80	440	0,480	1,24	0,005	0,01	0
GF3	50	0,102	0,068	0,034	11,47	573	0,715	8,07	0,005	0,04	2
GF4	50	0,116	0,065	0,051	22,80	1140	0,744	8,91	0,100	0,89	45
GF5	50	0,210	0,067	0,143	84,13	4207	0,980	15,77	0,200	3,15	158
GF6	50	0,168	0,064	0,104	58,13	2907	0,922	14,09	0,200	2,82	141
GF7	50	0,101	0,071	0,030	8,80	440	0,730	8,51	0,033	0,28	14

Ensaio 12 - Gel filtração de Q500 obtido de cromatografia de plasma em Q-Sepharose BB

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,410
5	0,585
10	0,832
15	1,011
20	1,094
25	1,273

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
10	-0,002	-0,009	0,007
25	0,026	-0,010	0,036
50	0,097	-0,010	0,107
70	0,163	-0,009	0,172
100	0,255	-0,011	0,266

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Fator corr dil	[]prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Plasma	500	0,255	-0,011	0,266	105,37	52685	0,656	6,35	10,000	63,55	31773
FT 1	500	-0,004	-0,01	0,006	9,07	4537	0,632	5,66	10,000	56,57	28285
Reeq 1	500	-0,011	-0,011	0,000	6,85	3426	0,746	8,97	0,800	7,18	3588
Q200 1	500	0,020	-0,007	0,027	16,85	8426	0,510	2,11	0,200	0,42	211
Q500 A1	200	0,300	-0,009	0,309	121,30	24259	0,893	13,24	0,100	1,32	265
Q500 B1	300	-0,005	-0,01	0,005	8,70	2611	1,098	19,20	0,005	0,10	29
Plasma	500	0,255	-0,011	0,266	105,37	52685	0,656	6,35	10,000	63,55	31773
FT 2	500	0,009	-0,004	0,013	11,67	5833	0,635	5,74	10,000	57,44	28721
Reeq 2	500	-0,006	-0,007	0,001	7,22	3611	0,764	9,49	0,800	7,60	3798
Q200 2	500	0,054	0,039	0,015	12,41	6204	0,559	3,53	0,100	0,35	177
Q500 A2	200	0,264	0,057	0,207	83,52	16704	0,870	12,58	0,100	1,26	252
Q500 B2	300	0,010	0,008	0,002	7,59	2278	1,120	19,84	0,005	0,10	30
Pool	400	0,166	0,008	0,158	65,37	26148	0,831	11,44	0,100	1,14	458
Perm	320	0,008	0,006	0,002	7,59	2430	0,344	-2,72	0,005	-0,01	-4
Conc	85	0,506	-0,003	0,509	195,37	16606	0,807	10,74	0,400	4,30	365
Q500 conc	75	0,506	-0,003	0,509	195,37	14653	0,807	10,74	0,400	4,30	322
GF1	50	0,010	0,008	0,002	7,59	380	0,411	-0,77	0,005	0,00	0
GF2	50	0,028	0,011	0,017	13,15	657	0,489	1,50	0,005	0,01	0
GF3	50	0,189	0,008	0,181	73,89	3694	0,919	14,00	0,005	0,07	4
GF4	50	0,143	0,008	0,135	56,85	2843	0,528	2,63	0,200	0,53	26
GF5	50	0,224	0,008	0,216	86,85	4343	1,053	17,90	0,200	3,58	179
GF6	50	0,173	0,01	0,163	67,22	3361	0,968	15,42	0,200	3,08	154
GF7	50	0,011	0,007	0,004	8,33	417	0,867	12,49	0,100	1,25	62
GF8	50	0,031	0,018	0,013	11,67	583	0,461	0,69	0,005	0,00	0

Ensaio 13 - Gel filtração em Sephacryl S-200

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,594
5	0,804
10	1,105
15	1,402
20	1,515
25	1,726

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm
0	0,000
10	0,063
25	0,195
50	0,331
70	0,479

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	% Ativ 405	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	[]prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Plasma	500	0,801	100,04	50022	1,060	9,67	0,15	64,49	32245
FT 1	500	-0,014	-2,60	-1301	1,027	8,96	0,15	59,73	29863
Reeq 1	500	-0,027	-4,51	-2257	1,215	13,03	2,50	5,21	2606
Q250 1	500	0,264	38,28	19140	1,064	9,76	6,00	1,63	813
Q500 A1	218	0,371	54,01	11775	0,980	7,94	10,00	0,79	173
Q500 B1	282	-0,008	-1,72	-485	0,910	6,43	200,00	0,03	9
Plasma	665	0,801	100,04	66529	1,060	9,67	0,15	64,49	42886
FT 2	500	0	-0,54	-272	1,091	10,34	0,15	68,96	34481
Reeq 2	500	-0,013	-2,46	-1228	1,144	11,49	2,50	4,60	2298
Q250 2	500	0,408	59,46	29728	1,053	9,52	6,00	1,59	793
Q500 A2	200	0,764	111,81	22362	1,084	10,19	10,00	1,02	204
Q500 B2	300	0,018	2,10	631	0,937	7,01	200,00	0,04	11
Pool	418	0,762	111,51	46613	0,957	7,44	10,00	0,74	311
Conc	30	2,125	311,96	9359	1,457	18,27	1,00	18,27	548
Perm	388	0,004	0,04	17	0,629	0,34	200,00	0,00	1

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	% Ativ 405	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	[]prot. (µg/µl)	Prot tot (mg)
Conc	13	2,125	311,96	4055	1,457	18,27	1,00	18,27	237
GF1	50	0,005	0,19	10	0,658	0,97	200,00	0,00	0
GF2	50	0,000	-0,54	-27	0,681	1,47	200,00	0,01	0
GF3A	25	1,022	149,75	3744	1,055	9,56	10,00	0,96	24
GF3B	25	0,361	52,54	1314	1,381	16,62	5,00	3,32	83
GF4A	25	0,094	13,28	332	0,916	6,56	10,00	0,66	16
GF4B	25	0,01	0,93	23	0,876	5,69	200,00	0,03	1
GF5	50	0,056	7,69	385	0,741	2,77	200,00	0,01	1
GF6	50	0,062	8,57	429	0,690	1,66	200,00	0,01	0
GF7	50	0,003	-0,10	-5	0,646	0,71	200,00	0,00	0
GF8	50	-	-	-	0,645	0,69	200,00	0,00	0
GF9	50	-0,019	-3,34	-167	0,638	0,54	200,00	0,00	0
Plasma	13	0,801	100,04	1301	1,060	9,67	0,15	64,49	838
GF1	50	-0,023	-3,93	-196	0,636	0,50	200,00	0,00	0
GF2	50	-0,024	-4,07	-204	0,818	4,44	200,00	0,02	1
GF3	50	0,134	19,16	958	0,866	5,47	1,00	5,47	274
GF4	50	-0,013	-2,46	-123	1,079	10,08	1,00	10,08	504
GF5	50	-0,024	-4,07	-204	1,047	9,39	100,00	0,09	5
GF6	50	-0,018	-3,19	-160	0,743	2,81	200,00	0,01	1
GF7	50	-0,016	-2,90	-145	0,657	0,95	200,00	0,00	0
GF8	50	-	-	-	0,648	0,76	200,00	0,00	0
GF9	50	-0,018	-3,19	-160	0,671	1,25	200,00	0,01	0

Ensaio 14 - Gel filtração em Sepharose 6FF

BSA (ug)	Abs (595nm)
0	0,663
5	1,047
10	1,340
15	1,553
20	1,822
25	2,059

Curva de calibração para determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford.

% Ativ	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405-Abs 492
0	0,000	0,000	0,000
2,5	0,028	0,003	0,025
5	0,049	0,003	0,046
10	0,084	-0,004	0,088
25	0,189	-0,003	0,192
50	0,335	-0,004	0,339
70	0,452	-0,001	0,453
100	0,610	-0,006	0,616

Curva de calibração para determinação de atividade de FVIII pelo método cromogênico.

Determinação de proteína e atividade total de FVIII nas frações da cromatografia

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	Conc prot (mg/mL)	Prot total (mg)
Plasma	491	0,610	-0,006	0,616	97,92	48077,75	1,295	10,31	0,2	51,56	25317,19
FT 1	491	-0,013	-0,003	-0,010	-4,70	-2310,11	1,219	8,92	0,2	44,58	21887,41
Reeq 1	981	-0,018	-0,001	-0,017	-5,85	-5741,26	1,164	7,90	2,5	3,16	3101,69
Q200 1	491	0,063	-0,002	0,065	7,59	3726,77	1,216	8,86	20	0,44	217,52
Q500A 1	294	0,469	-0,005	0,474	74,64	21943,97	1,238	9,26	10	0,93	272,38
Q500B 1	196	0,036	-0,002	0,038	3,16	620,13	1,086	6,47	200	0,03	6,34
Plasma	461	0,610	-0,006	0,616	97,92	45140,21	1,295	10,31	0,2	51,56	23770,31
FT 2	491	-0,009	-0,005	-0,004	-3,72	-1827,16	1,249	9,47	0,2	47,33	23241,27
Reeq 2	981	-0,025	-0,008	-0,017	-5,85	-5741,26	1,191	8,40	2,5	3,36	3296,45
Q200 2	491	0,019	-0,003	0,022	0,54	265,62	1,199	8,55	20	0,43	209,85
Q500A 2	294	0,304	-0,009	0,313	48,25	14184,30	1,233	9,17	10	0,92	269,68
Q500B 2	196	0,039	-0,006	0,045	4,31	845,05	1,120	7,10	200	0,04	6,95
Pool	588	0,565	-0,004	0,569	90,21	53045,31	1,303	10,46	10	1,05	615,02
Perm	488	0,007	-0,004	0,011	-1,26	-616,00	0,779	0,83	200	0,00	2,02
Conc	110	1,888	-0,005	1,893	307,26	33798,85	1,325	10,86	2,5	4,35	478,01

	Vol fração (mL)	Abs 405 nm	Abs 492 nm	Abs 405- 492 nm	% Ativ 405- 492	Ativ tot (U)	Abs 595 nm	Massa prot (ug)	Vol (uL)	Conc prot (mg/mL)	Prot total (mg)
Plasma	95	0,610	-0,006	0,616	97,92	9302,21	1,295	10,31	0,2	51,56	4898,44
GF5	30	0,007	0,000	0,007	-1,92	-57,54	0,755	0,39	200	0,00	0,06
GF6	30	0,201	0,000	0,201	29,89	896,56	1,212	8,79	100	0,09	2,64
GF7	30	0,580	-0,001	0,581	92,18	2765,41	1,469	13,51	50	0,27	8,11
GF8	30	0,449	0,001	0,448	70,38	2111,31	1,381	11,89	10	1,19	35,68
GF9	30	0,128	-0,002	0,130	18,25	547,38	1,209	8,73	2,5	3,49	104,78
GF10	30	0,045	0,002	0,043	3,98	119,51	1,320	10,77	1	10,77	323,16
GF11	31	0,024	-0,005	0,029	1,69	52,34	1,533	14,69	0,5	29,38	910,63
GF12	29	0,007	-0,007	0,014	-0,77	-22,34	1,289	10,20	0,2	51,01	1479,32
GF13	30	-0,016	-0,008	-0,008	-4,38	-131,31	1,587	15,68	0,5	31,36	940,81
GF14	39	-0,016	-0,006	-0,010	-4,70	-183,49	1,801	19,61	1	19,61	764,94
GF15	21	-0,027	-0,014	-0,013	-5,20	-109,13	1,800	19,60	2,5	7,84	164,60
GF16	30	-0,031	-0,016	-0,015	-5,52	-165,74	1,709	17,92	20	0,90	26,88
GF17	30	-0,029	-0,015	-0,014	-5,36	-160,82	1,148	7,61	200	0,04	1,14
GF18	30	-0,019	-0,02	0,001	-2,90	-87,05	1,086	6,47	200	0,03	0,97
GF19	30	-0,022	-0,02	-0,002	-3,39	-101,80	0,962	4,19	200	0,02	0,63
Q500	95	1,888	-0,005	1,893	307,26	29189,92	1,325	10,86	2,5	4,35	412,83
GF5	30	0,006	-0,007	0,013	-0,93	-28,03	0,833	1,82	200	0,01	0,27
GF6	30	0,862	0,004	0,858	137,59	4127,70	1,227	9,06	200	0,05	1,36
GF7	30	1,679	-0,008	1,687	273,49	8204,75	1,395	12,15	100	0,12	3,65
GF8	30	1,835	-0,008	1,843	299,07	8971,97	1,587	15,68	50	0,31	9,41
GF9	30	0,829	-0,006	0,835	133,82	4014,59	1,531	14,65	20	0,73	21,98
GF10	30	0,513	-0,005	0,518	81,85	2455,57	1,785	19,32	10	1,93	57,96
GF11	30	0,710	-0,002	0,712	113,66	3409,67	1,267	9,80	2,5	3,92	117,57
GF12	30	0,666	-0,006	0,672	107,10	3212,95	1,245	9,39	2,5	3,76	112,72
GF13	30	0,411	-0,007	0,418	65,46	1963,77	1,667	17,15	10	1,72	51,45
GF14	30	0,002	-0,009	0,011	-1,26	-37,87	1,298	10,37	20	0,52	15,55
GF15	30	0,077	-0,002	0,079	9,89	296,56	1,265	9,76	200	0,05	1,46
GF16	30	0,003	-0,005	0,008	-1,75	-52,62	0,808	1,36	200	0,01	0,20

Anexo B - Fator VIII – sequência de cDNA utilizado na análise por seqüenciamento dos plasmídeos com fragmentos de interesse

(gi10518504 / ref NM_000132.2) Homo sapiens coagulation factor VIII, procoagulant component (hemophilia A) (F8), transcript variant 1, mRNA)

GCTTAGTGCTGAGCACATCCAGTGGGTAAAGTTCCTTAAATGCTCTGCAAAGAAATTGGGACTTTTCATTAAATCAG
AAATTTTACTTTTTTCCCCTCCTGGGAGCTAAAGATATTTTAGAGAAGAATTAACCTTTTGCTTCTCCAGTTGAACATTT
GTAGCAATAAGTCATGCAAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGGCATTCTGCTTTAGTGCCACCAG
AAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAAGTGTATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGC
AAGATTTCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAAT
TCACGGATCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAGGCCACCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCCAGGCTGA
GGTTTATGATACAGTGGTCACTTAAAGACATGGCTTCCCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTATCCT
ACTGGAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTTCC
CTGGTGAAGCCATACATATGTCTGGCAGGTCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTAC
CTACTCATATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAAAAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAG
AAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGCACAAATTTATCTACTTTTGTGTATTTGATGAAGGGAA
AAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAAT
GCACACAGTCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCAT
GTGATTGGAATGGGCACCACTCTGAAGTGCATCAATATTCCTCGAAGGTCACACATTTCTTGTGAGGAACCATC
GCCAGGCGTCTTGGAATCTCGCCAATAACTTTCTTACTGCTCAAACACTCTTGATGGACCTTGACAGTTTTCTA
CTGTTTTGTCTATCTCTTCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCCAGAGGAAC
CCCAACTACGAATGAAAAATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGT
CAGGTTTGATGATGACAACTCTCCTTCTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTAAAACCTGGGTAC
ATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCCTTAGTCTCGCCCCCGATGACAGAAGTTATAAAG
TCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAGTCCGATTTATGGCATAACAGATGAA
ACCTTTAAGACTCGTGAAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACA
CACTGTTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCT
TTGTATTCAAGGAGATTACCAAAAGGTGTAAACACTTTGAAGGATTTTCCAATTTGCCAGGAGAAATATTCAAATA
TAAATGGACGACTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCTGACCCGCTATTACTTCTAGTTTC
GTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAA
GAGGAAACCAGATAATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCT
CACAGAGAATATACAACGCTTTCTCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAA
CATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTTTGATAGTTTGCAGTTGTGAGTTGTTTGCATGAGGTGGCATACTGGT
ACATTTCAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCCCTTCTGCTCTTCTCTGATATACCTTCAAACACAAAATGGTC
TATGAAGACACACTCACCTATTCCCATTCAGGAGAAATCTTCTCATGTGCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGA
TTCTGGGGTGCCCAACTCAGACTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCTAGTTGTGACAAGAA
CACTGGTGATTATTACGAGGACAGTTATGAAGATATTTTCAAGCATACTTGTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCA
AGAAGCTTCTCCAGAAATCAAGACACCCTAGCACTAGGCAAAAGCAATTTAATGCCACCACAATTCCAGAAAATG
ACATAGAGAAGACTGACCCTTGGTTTGCACACAGAACACCTATGCCTAAAATACAAAATGTCTCCTCTAGTGATT
GTTGATGCTCTTCCGACAGAGTCTTCTCCACATGGGCTATCCTTATCTGATCTCCAAGAAGCCAAATATGAGACT
TTTCTGATGATCCATCACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAGCCTGTCTGAAATGACACACTTCAAGGCCACAGCT
CCATCACAGTGGGGACATGGTATTTACCCCTGAGTCAGGCCTCCAATTAAGATTAATGAGAACTGGGGACAAC
GCAGCAACAGAGTTGAAGAACTTGATTTCAAAGTTTCTAGTACATCAAATAATCTGATTTCAACAATTCATCAGA
CAATTTGGCAGCAGGTACTGATAATACAAGTTTCTTAGGACCCCAAGTATGCCAGTTCATTATGATAGTCAATTAG
ATACCACTCTATTTGGCAAAAAGTCACTCTCCCTTACTGAGTCTGGTGGACCTCTGAGCTTGAGTGAAGAAAAATAAT
GATTCAAAGTTGTTAAGTCAAGTTAATGAATAGCCAAGAAAGTTTCAAGGAAAGAAATGTTCTGTTCAACAGAGA
GTGGTAGGTTATTTAAGGGAAAAGAGCTCATGGACCTGCTTGTGACTAAAGATAATGCCTTCAAGGTTAGC
ATCTCTTTGTTAAAGACAAACAAAACCTTCCAATAATTCAGCACTAATAGAAAGACTCACATTGATGGCCCATCATT
ATTAATTGAGAATAGTCCATCAGTCTGGCAAAATATATTAGAAAGTGACACTGAGTTTAAAAAAGTGACACCTTTGA
TTCATGACAGAATGCTTATGGACAAAATGCTACAGCTTTGAGGCTAAATCATATGTCAAATAAAACTACTTCATCA
AAAAACATGGAAATGGTCCAACAGAAAAAAGAGGGCCCCATTCCACCAGATGCACAAAATCCAGATATGTCGTT
TTTAAGATGCTATTCTTGCCAGAATCAGCAAGGTGGATACAAAGGACTCATGGAAAGAACTCTCTGAATCTGGGC
AAGGCCCCAGTCCAAAGCAATTAGTATCCTTAGGACCAGAAAAATCTGTGGAAGGTGAGAATTTCTGTCTGAGAA
AAACAAAGTGGTAGTAGGAAAGGGTGAATTTACAAAGGACGTAGGACTCAAAGAGATGGTTTTTCCAAGCAGCAG
AAACCTATTTCTTACTAATCTGGATAATTTACATGAAAATAATACACACAATCAAGAAAAAATTCAGGAAGAAA
TAGAAAAGAAGGAAACATTAATCCAAGAGAATGTAGTTTTGCCTCAGATACATACAGTGAAGTGGCACTAAGAATTT
CATGAAGAACCTTTTCTTACTGAGCACTAGGCAAAATGTAGAAGGTTTCAATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTT
CAAGATTTTAGGTCAATTAATGATTCAACAAATAGAACAAAGAAACACACAGCTCATTTCTCAAAAAAGGGGAGG
AAGAAAACCTTGGAAAGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAAATTTAGAGAAATATGATGACCAACAAAGGATATCTC
CTAATACAAGCCAGCAGAATTTTGTACGCAACGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTCAGACTCCCACTAGAAGA
AACAGAACTTGAAGAAAGGATAATTGTGGATGACACCTCAACCCAGTGGTCCAAAAACATGAAACATTTGACCCC

GAGCACCCCTCACACAGATAGACTACAATGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTACTCAGTCTCCCTTATCAGATTGCCTT
 ACGAGGAGTCATAGCATCCCTCAAGCAAAATAGATCTCCATTACCCATTGCAAAGGTATCATCATTTCCATCTATTAG
 ACCTATATATCTGACCAGGGTCTATTCCAAGACAACCTTTCTCATCTTCCAGCAGCATCTTATAGAAAAGAAAGATT
 CTGGGGTCCAAGAAAGCAGTCATTTCTTACAAGGAGCCAAAAAAATAACCTTTCTTTAGCCATTCTAACCTTGGA
 GATGACTGGTGTCAAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGGACAAGTGCCACAAATTGATCAGTACATACAAGAAAGTTGA
 GAACACTGTTCTCCCGAAACCAGACTTGCCCAAAACATCTGGCAAAGTTGAATTGCTTCCAAAAGTTACATTTATC
 AGAAGGACCTATTCCCTACGGAAACTAGCAATGGGTCTCCTGGCCATCTGGATCTCGTGGAAGGGAGCCTTCTTCA
 GGGAAACAGAGGGAGCGATTAAAGTGAATGAAGCAAAACAGACCTGGAAAAGTTCCCTTTCTGAGAGTAGCAACAG
 AAAGCTCTGCAAAGACTCCCTCCAAGCTATTGGATCCTCTTGCTTGGGATAACCACTATGGTACTCAGATACCAAA
 AGAAGAGTGAAAATCCCAAGAGAAGTCACCAGAAAAAACAGCTTTTAAAGAAAAGGATACCATTTTGTCCCTGAA
 CGCTTGTAAGCAATCATGCAATAGCAGCAATAAATGAGGGACAAAAATAAGCCCGAAATAGAAGTCACCTGGGC
 AAAGCAAGGTAGGACTGAAAGGCTGTGCTCTCAAAACCCACCAGTCTTGAAACGCCATCAACGGGAAATAACTCG
 TACTACTCTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTTT
 GACATTTATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTGCAG
 TGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGCCAGTGCC
 CTCAGTTCAAGAAAGTTGTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGTGGAGAATAAAT
 GAACATTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGCAGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACTTTTCAAGAAATCAGG
 CCTCTCGTCCCTATTCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAA
 AACTTTGTCAAGCCTAATGAAACCAAACTTACTTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGT
 TTGACTGCAAAGCCTGGGCTTATTTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCT
 TCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAACCCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTTTTC
 ACCACTTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACTGAAAAATATGGAAGAAAAGTGCAGGGCTCCCTGCAATATCC
 AGATGGAAGATCCCACTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGG
 CTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTGATGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATT
 CATTTCACTGAGCATGTGTTCACTGTACGAAAAAAGAGGAGTATAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTG
 TTTTGAGACAGTGGAATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTGAATGCCTTATTGGCGAGCATCTACA
 TGCTGGGATGAGCACACTTTTTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTGACAGTCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATT
 AGAGATTTTCAGATTACAGCTTCCAGACAATATGGACAGTGGGCCCAAAGCTGGCCAGACTTCATTATCCGGAT
 CAATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTTCTTGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTATTCACGG
 CATCAAGACCCAGGGTGCCCGTCAGAAGTTCTCCAGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCATGTATAGTCTTGATG
 GGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGAAATTCAGTGAACCTTAATGGTCTTCTTTGGCAATGTGGATTCTATCTGG
 GATAAAACACAATATTTTTAACCCTCCAATTATTGCTCGATACATCCGTTTGCACCCAACTCATTATAGCATTGCA
 GCCTCTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGCAGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAAGCAAT
 ATCAGATGCACAGATTACTGCTTCATCCTACTTTACCAATATGTTTGGCACATGCTCCTTCAAAGCTCGACTTC
 ACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGA
 AGACAATGAAAGTCACAGGAGTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCT
 CATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAAGATGGCAAAGTAAAGGTTTTTTCAGGGAAAT
 CAAGACTCCTTCACACCTGTGGTGAAGTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGCTACCTTCGAATTCACCCCCAGA
 GTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCTACTGAGGGTGGCCA
 CTGCAGCACCTGCCACTGCCGTACCTCTCCCTCCTCAGTCCAGGGCAGTGCCCTCCCTGGCTTGCTTCTACCT
 TTGTGCTAAATCCTAGCAGACACTGCCCTTGAAGCCTCCTGAAATTAACATATCATCAGTCTGCTTCTTTGGTGGGG
 GCCAGGAGGGTGCATCCAATTTAACTTAACTCTTACCTATTTTCTGCAGCTGCTCCAGATTACTCCTTCTTCCAATA
 TAACTAGGCAAAAAGAAGTGAGGAGAAACCTGCATGAAAGCATTCTTCCCTGAAAAGTTAGGCCTCTCAGAGTCACC
 ACTTCTCTGTTGTAGAAAACTATGTGATGAACTTTGAAAAAGATATTTATGATGTTAACATTTTCAAGTTAAGCCTCA
 TACGTTTAAATAAACTCTCAGTTGTTTATTATCCTGATCAAGCATGGAACAAAGCATGTTTCAGGATCAGATCAATA
 CAATCTTGGAGTCAAAAGGCAAAATCATTTGGACAATCTGCAAAATGGAGAGAATAACAATACTACTACAGTAAAGTCT
 GTTCTGCTTCCCTTACACATAGATATAATTATGTTATTTAGTCATTATGAGGGGCACATTCTTATCTCCAAAACATGAT
 TCTTAACTGAGAATTATAGATGGGGTTCAAGAATCCCTAAGTCCCCTGAAATTATATAAGGCATTCTGTATAAATGCA
 AATGTGCATTTTTCTGACGAGTGTCCATAGATATAAAGCCATTTGGTCTTAATTCTGACCAATAAAAAAATAAGTCAGG
 AGGATGCAATTGTTGAAAGCTTTGAAATAAAATAACAATGTCTTCTTGAATTTGTGATGGCCAAGAAAGAAAATGATG
 ATGACATTAGGCTTCTAAAGGACATACATTTAATATTTCTGTGGAAATATGAGGAAAATCCATGGTTATCTGAGATAGG
 AGATACAACTTTGTAATTCTAATAATGCACTCAGTTTACTCTCTCCCTCTACTAATTTCTGCTGAAAATAACACAACA
 AAAATGTAACAGGGGAAATTATATACCGTGACTGAAAACTAGAGTCCCTACTTACATAGTTGAAATATCAAGGAGGTCA
 GAAGAAAATTGGACTGGTGAAGAACAGAAAAAACACTCCAGTCTGCCATATCACCACACAATAGGATCCCCCTTCTTGC
 CCTCCACCCCCATAAGATTGTGAAGGGTTTACTGCTCCTTCCATCTGCCTGACCCCTTCACTATGACTACACAGAATC
 TCCTGATAGTAAAGGGGGCTGGAGGCAAGGATAAGTTATAGAGCAGTTGGAGGAAGCATCCAAAGATTGCAACCCA
 GGGCAAAATGGAAGAACAGGAGATCCTAATATGAAAGAAAATGGATCCCAATCTGAGAAAAGGCAAAAAGAAATGGCTAC
 TTTTCTATGCTGGAGTATTTTCTAATAATCCTGCTTGACCCTTATCTGACCTCTTTGGAACTATAACATAGCTGTCA
 CAGTATAGTCACAATCCAAATGATGCAGGTGCAAAATGTTTTATGCCCTGTGAAGTTCTTAAAGTTTAGAGGCTAA
 CTTACAGAAATGAATAAGTTGTTTTGTTTTATAGCCCGGTAGAGGAGTTAACCCCAAAGGTGATATGGTTTTATTTCT
 GTTATGTTTAACTTGATAATCTTATTTTGGCATTCTTTTCCATTGACTATATACATCTCTATTTCTCAAATGTTTCATGGA
 ACTAGCTCTTTTATTTTCTGCTGTTTCTTCAGTAATGAGTTAATAAAACATTGACACATACA