

ANDRÉ LUÍS INOCENCIO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FRAGMENTO FAB
ANTI-DIGOXINA OBTIDO PELA TÉCNICA DE *PHAGE DISPLAY***

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

São Paulo
2016

ANDRÉ LUÍS INOCENCIO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FRAGMENTO FAB ANTI-DIGOXINA
OBTIDO PELA TÉCNICA DE *PHAGE DISPLAY***

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Maria Moro

Co-orientadora: Dra. Lilian Rumi Tsuruta

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

Inocencio, André Luís.

Purificação e caracterização do fragmento Fab anti-digoxina obtido pela técnica de *phage display* / André Luís Inocencio. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Moro.

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: Anticorpos monoclonais.

Versão do título para o inglês: Purification and characterization of anti-digoxin Fab fragments by phage display technology.

1. Digitálicos 2. Cromatografia 3. Fragmento Fab monoclonal 4. *Phage display* 5. Digoxina 6. Ressonância plasmonica de superfície
I. Moro, Profa. Ana Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB04/2016

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

Candidato(a): André Luís Inocencio.

Título da Dissertação: Purificação e caracterização do fragmento Fab anti-digoxina obtido pela técnica de *phage display*.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Maria Moro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a23...../.....03...../2016....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: Irene Fernandes
Nome: IRENE FERNANDES
Instituição: INSTITUTO BUTANTAN

Examinador(a): Assinatura: ENEAS DE CARVALHO
Nome: ENEAS DE CARVALHO
Instituição: Instituto Butantan

Presidente: Assinatura: Ana Maria Moro
Nome: ANA MARIA MORO
Instituição: INSTITUTO BUTANTAN



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 14 de março de 2012.

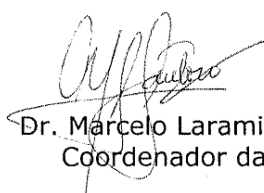
Protocolo: I-1016/13

Dra. Ana Maria Moro
Laboratório de Biofármacos em Células Animais
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Purificação e caracterização do fragmento Fab anti-digoxina obtido pela técnica de *Phage Display*".

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,



Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho Arthur, que sempre me recebia com um grande sorriso, quando chegava tarde, muitas vezes quase dormindo.

À Claudia por ser esta esposa maravilhosa e compreensiva.

Aos meus pais Eugely e Sandra pelo carinho e amor.

À Prof. Dra. Ana Maria Moro, pela orientação, confiança, por dividir seus conhecimentos e permitir que eu faça parte de sua equipe.

À Dra. Lilian Rumi Tsuruta pelos ensinamentos e ajuda na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Michael Philip Eddleston, Universidade de Edimburgo, por doar o fragmento Fab comercial - DigiFab[®], utilizado como referência nos ensaios.

Ao Dr. Wagner Quintilio, por todo o auxílio na elaboração das estratégias cromatográficas, por nossas discussões científicas e pela realização dos ensaios de SPR.

À Dra. Mariana Lopes dos Santos Curcio por todo o companheirismo e pela revisão da dissertação.

À Dra. Maria Teresa Alves Rodrigues pelos valiosos conselhos.

À Angélica Garbuio e à Roselaine Campos Targino, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao José Marcelino de Oliveira no suporte na realização das cromatografias.

À Monica Gomes de Oliveira e à Stephanie Murari do Nascimento pela ajuda na realização dos ensaios.

Aos amigos do Laboratório de Biofármacos em Células Animais: Caio César Irineu, Camila Maria Lucia da Silva, Carla Ploeger Mansueli, Cosminiana Silva Ferreira, Daniela Yumi Takata, Fatima Ap. Mendonça de Oliveira, José Ricardo de Almeida Ferreira, Maria José Alves da Silva, Mateus Dalcin Luchese, Priscila Mitsue Kayano Kushima, Rozelita Pereira do Nascimento, Silmara Ap. Vieira, Sônia de Fátima G. de Oliveira, Suzi Alcântara do Nascimento, na ajuda em diferentes áreas possibilitando a realização deste trabalho.

Aos amigos que passaram pelo laboratório, Mariana Costa Braga Schmidt, Elisa Emiko Oshiro, Eduardo Aliprandini e Viviane Midori Murata

À Dra. Elisabeth Angelica Leme Martins e sua equipe (Dra. Elisabeth Cheng, Claudia, Erika e Juliano) por permitir a utilização de seus equipamentos.

RESUMO

INOCENCIO, A. L. **Purificação e caracterização do fragmento Fab anti-digoxina obtido pela técnica de *phage display***. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A digoxina é um dos medicamentos indicados para o tratamento da insuficiência cardíaca. Possui janela terapêutica estreita, sendo responsável por casos de intoxicação. O único antídoto disponível para a desintoxicação é o anticorpo policlonal – DigiFab[®], no formato Fab. O seu uso é eficaz, porém de custo elevado. Clones bacterianos produtores de fragmento Fab monoclonal anti-digoxina foram obtidos previamente pelo nosso grupo, pela técnica de *phage display*. Neste trabalho as variantes Fab dos 4 clones foram expressas em *E.coli* para estabelecer o método para a purificação. Com a obtenção dos fragmentos Fab purificados, foi caracterizada a sua afinidade ao antígeno e especificidade, em ensaios de inibição por digoxina, digitoxina, digoxigenina e ouabaina. Os parâmetros cinéticos da ligação dos fragmentos Fab dos 4 clones e do DigiFab[®] foram avaliados por ressonância plasmônica de superfície. Nas condições experimentais, não foram verificadas diferenças significativas entre os produtos dos 4 clones e o comercial, demonstrando o potencial dos fragmentos Fab monoclonais obtidos como antídoto à digoxina.

Palavras-chave: Digitálicos. Cromatografia. Fragmento Fab monoclonal. *Phage display*. Digoxina. Ressonância plasmônica de superfície.

ABSTRACT

INOCENCIO, A. L. **Purification and characterization of anti-digoxin Fab fragments obtained by phage display technology.** 2016. 92 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Digoxin is a medication indicated for heart failure treatment. Its therapeutic window is narrow, being responsible for intoxication cases. The only antidote available for the detoxification is a polyclonal antibody - DigiFab[®] in Fab format. Its use is effective, but costly. Bacterial clones producing anti-digoxin monoclonal Fab fragments were previously obtained by our group using phage display technology. In this work the Fab variants of the 4 clones were expressed in *E.coli* to establish the purification method. The purified fragments were characterized regarding the affinity to the antigen and the specificity through inhibition assays with digoxin, digitoxin, digoxigenin and ouabain. The binding kinetic parameters of Fab fragments of the 4 clones and the commercial product to Dig-BSA conjugate were assessed by surface plasmon resonance. Under the experimental conditions no significant differences were observed among the 4 clones and the commercial product, demonstrating the potential of monoclonal Fab fragments as an antidote to digoxin.

Keywords: Digitalics. Chromatography. Monoclonal Fab fragment. Phage display. Digoxin. Surface plasmon resonance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Estrutura química da digoxina ($C_{41}H_{64}O_{14}$).....	16
Figura 2 — Esquema da inibição da bomba de sódio/potássio pelos glicosídeos cardíacos.....	17
Figura 3 — Estrutura da imunoglobulina da classe IgG.	22
Figura 4 — Resultados da digestão enzimática de anticorpos.....	23
Figura 5 — Vetor fagomídeo pComb3XTT.....	30
Figura 6 — <i>Western blotting</i> para verificação da presença dos fragmentos Fab anti-digoxina no sobrenadante do cultivo celular, no periplasma e no sobrenadante do lisado bacteriano total.	47
Figura 7 — SDS-PAGE (12%), corado por prata, das amostras que contém fragmento Fab anti-digoxina do clone 10.	47
Figura 8 — Avaliação da pureza do fragmento Fab anti-digoxina presente no sobrenadante da cultura de <i>E. coli</i> pela cromatografia em resina de afinidade Proteína G.....	49
Figura 9 — SDS-PAGE (12%) para avaliação da pureza dos fragmentos Fab anti-digoxina expressos pelos 4 clones purificados.....	50
Figura 10 — SDS-PAGE (12%) corado por prata dos fragmentos Fab anti-digoxina purificados do sobrenadante e pela lise do periplasma.....	51
Figura 11 — SDS PAGE (12%) - Corado por prata. Estratégia 1 - Cromatografia em resina de proteína G seguida pela cromatografia de troca catiônica.....	53
Figura 12 — SDS PAGE (12%) - Corado por prata. Estratégia 2 - Cromatografia em resina de proteína G seguida pela cromatografia de troca catiônica.....	55
Figura 13 — SDS PAGE (12%) - Corado por prata. Estratégia 3 - Cromatografia de troca catiônica.	56
Figura 14 — SDS PAGE (12%) - Corado por prata. Cromatografia de troca aniônica.	58
Figura 15 — SDS PAGE (12%) – Coloração por prata. Cromatografia em resina de afinidade como segunda etapa cromatográfica após troca aniônica– alíquota 1.	59
Figura 16 — SDS-PAGE (12%) Coloração por prata. Cromatografia em resina de afinidade como segunda etapa cromatográfica após troca aniônica– alíquota 2.	60
Figura 17 — SDS-PAGE (12%) Corado por prata. Cromatografia em resina de troca catiônica, primeira etapa cromatográfica.....	61

Figura 18 — SDS-PAGE (12%) Cromatografia de afinidade - segunda etapa cromatográfica – 1.....	62
Figura 19 — SDS-PAGE (12%) Cromatografia de afinidade - segunda etapa cromatográfica – 2.....	62
Figura 20 — Cromatogramas das purificações dos sobrenadantes dos 4 clones em coluna S Sepharose FF.....	64
Figura 21 — Cromatogramas das purificações em resina de proteína G das frações contendo os fragmentos Fab provenientes da cromatografia em coluna S Sepharose.	65
Figura 22 — SDS PAGE (12%). Pureza dos fragmentos Fab anti-digoxina.	67
Figura 23 — Focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida pH 3 a 10. Corado por prata.	68
Figura 24 — Avaliação da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina à Dig-BSA e BSA.	69
Figura 25 — ELISA método 2 para avaliar o perfil de ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina à Dig-BSA e BSA.	70
Figura 26 — ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e a Dig-BSA pela digoxina.	71
Figura 27 — IC ₅₀ obtida pelo uso da digoxina como inibidor.....	72
Figura 28 — ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e a Dig-BSA pela digoxigenina.....	72
Figura 29 — IC ₅₀ obtida pelo uso da digoxigenina como inibidor.....	73
Figura 30 — ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e a Dig-BSA pela digitoxina.....	74
Figura 31 — IC ₅₀ obtida pelo uso da digitoxina como inibidor.....	75
Figura 32 — ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e a Dig-BSA pela ouabaína.....	75
Figura 33 — IC ₅₀ obtida pelo uso da ouabaína como inibidor.	76
Figura 34 — Sensorgramas das titulações cinéticas.....	77
Figura 35 — Velocidade de associação x velocidade de dissociação.....	78
Figura 36 — Afinidade entre os fragmentos Fab dos 4 clones e DigiFab [®] com o conjugado Dig-BSA.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Técnicas Cromatográficas e seus princípios.	25
Tabela 2 — Concentração inicial dos inibidores e fator de diluição seriada.....	44
Tabela 3 — Concentração do fragmento Fab anti-digoxina do clone 10, obtida por ELISA, presente no sobrenadante da cultura de <i>E. coli</i> , periplasma e no lisado bacteriano total, a partir de 50 mL de cultura.	48
Tabela 4 — Balanço de massa dos fragmentos Fab anti-digoxina expressos pelos 4 clones, pré e pós purificação por cromatografia em resina de afinidade proteína G.	51
Tabela 5 — Rendimento obtido pela estratégia 1.	54
Tabela 6 — Rendimento obtido pela estratégia 2.	55
Tabela 7 — Rendimento obtido pela estratégia 3.	57
Tabela 8 — Balanço de massa dos fragmentos Fab dos 4 clones.....	66
Tabela 9 — Valores de IC ₅₀	76
Tabela 10 — Parâmetros cinéticos obtidos por SPR	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo	- Anticorpo Monoclonal
<i>ampR</i>	- resistência à ampicilina.
ARBs	- bloqueador de receptor da angiotensina (<i>angiotensin receptor blockers</i>)
BSA	- albumina do soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	- DNA complementar (<i>complementary DNA</i>)
CDR	- regiões determinantes de complementariedade (<i>complementarity determining regions</i>)
C _H	- região constante da cadeia pesada (<i>constant heavy</i>)
C _L	- região constante da cadeia leve (<i>constant light</i>)
DAB	- 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DIG	- Digoxin Investigation Group
Dig-BSA	- digoxina conjugada a BSA
DMSO	- dimetilsulfóxido
ECA	- enzima conversora da angiotensina
EDC	- hidrocloreto de 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	- Fragmento de ligação ao antígeno (<i>Fragment antigen binding</i>)
Fc	- Fragmento cristalizavel (<i>Fragment crystallizable</i>)
FDA	- Food and Drug Administration
H ₂ SO ₄	- ácido sulfúrico
HA	- hemaglutininas
HC	- cadeia pesada (<i>heavy chain</i>)
His6	- cauda contendo seis histidinas
IEF	- isoelectric focusing electrophoresis
Ig	- imunoglobulina
IPTG	- Isopropil-β-D-Thiogalactosídeo
k _a	- constante de associação
K _D	- constante de afinidade

k_d	- constante de dissociação
kDa	- quilodalton
LB	- Luria-Bertani
LC	- cadeia leve (<i>light chain</i>)
LMW	- marcador de baixo peso molecular (<i>low molecular weight</i>)
MOPS	- Ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico
NaCl	- cloreto de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
NHS	- N-Hidroxisuccinimida
<i>ompA</i>	- <i>outer membrane protein</i>
PBS	- solução salina tamponada com fosfato (<i>phosphate buffered saline</i>)
<i>pelB</i>	- <i>pectate lyase B</i>
pI	- ponto isoelétrico
PROMISE	- prospective randomized milrinone survival evaluation
PROVED	- prospective randomized study of ventricular function and efficacy of digoxin
PVDF	- fluoreto de polivinilideno
RADIANCE	- randomized assessment of digoxin on inhibitors of the angiotensin converting enzyme
RENAME	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SB	- Super Broth
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SPR	- ressonância plasmônica de superfície (<i>surface plasmon resonance</i>)
SUS	- Sistema Único de Saúde
TAG	- códon de terminação âmbar
TMB	- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
V_H	- região variável da cadeia pesada (<i>heavy chain variable region</i>)
V_L	- região variável da cadeia leve (<i>light chain variable region</i>)
ϵ	- coeficiente de absorção molar
κ	- <i>kappa</i>
λ	- <i>lambda</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Insuficiência cardíaca	15
1.2	Glicosídeos cardíacos	15
1.3	Intoxicação digitalica	18
1.4	Cenário econômico para o fragmento Fab anti-digoxina	20
1.5	Anticorpos	21
1.6	<i>Phage display</i>	24
1.7	Purificação	25
1.7.1	Métodos cromatográficos	25
1.7.2	Purificação de anticorpos monoclonais	27
1.7.3	Purificação de fragmentos Fab de anticorpos	27
1.8	Obtenção dos fragmentos Fab monoclonal anti-digoxina	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo Geral	31
2.2	Objetivos Específicos	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Linhagem bacteriana, meios, suplementos e soluções utilizadas nos cultivos bacterianos	32
3.2	Colunas e resinas cromatográficas	32
3.3	Soluções e materiais utilizados nos ensaios de caracterização	32
3.4	Anticorpos utilizados nos ensaios de caracterização	33
3.5	Equipamentos	34
3.6	Transformação por choque térmico	34
3.7	Expressão de fragmentos Fab anti-digoxina solúveis	35
3.8	Lise bacteriana	35
3.8.1	Lise bacteriana total por ultrassom	35
3.8.2	Lise do periplasma bacteriano por choque osmótico	36
3.9	Purificação	37
3.9.1	Cromatografia líquida em resina de afinidade Proteína L	37
3.9.2	Cromatografia líquida em resina de afinidade Proteína G	37
3.9.3	Ensaio de otimização da purificação dos fragmentos Fab anti-digoxina	38

3.10	Quantificação dos fragmentos Fab solúveis	40
3.10.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) – Método 1	40
3.10.2	Dosagem de proteína pela Absorbância 280 nm.....	41
3.10.3	Dosagem dos fragmentos Fab por ressonância plasmônica de superfície - SPR	41
3.11	Ensaio analítico	42
3.11.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE)	42
3.11.2	Determinação do ponto isoelétrico	42
3.11.3	Western Blotting	42
3.11.4	Ensaio de ligação dos clones Fab anti-digoxina ao antígeno pelo teste de ELISA – Método 2	43
3.11.5	ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos anti-digoxina e a Dig-BSA pela digoxina e seus análogos – Método 3.	43
3.11.6	Determinação de parâmetros cinéticos por SPR	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Expressão dos fragmentos Fab anti-digoxina em <i>E. coli</i>	46
4.2	Avaliação da presença do fragmento Fab intracelular e no sobrenadante do cultivo bacteriano	46
4.3	Purificação dos fragmentos Fab anti-digoxina expressos em <i>E. coli</i>	48
4.4	Obtenção de fragmentos Fab no espaço periplasmático.....	51
4.5	Aprimoramento das estratégias cromatográficas.....	52
4.6	Caracterização dos fragmentos Fab anti-digoxina	67
4.6.1	Determinação do ponto isoelétrico dos fragmentos Fab anti-digoxina	67
4.6.2	Caracterização da afinidade e especificidade do fragmento Fab anti-digoxina	68
4.6.3	Determinação dos parâmetros cinéticos de ligação	76
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	86
	REFERÊNCIAS*	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Insuficiência cardíaca

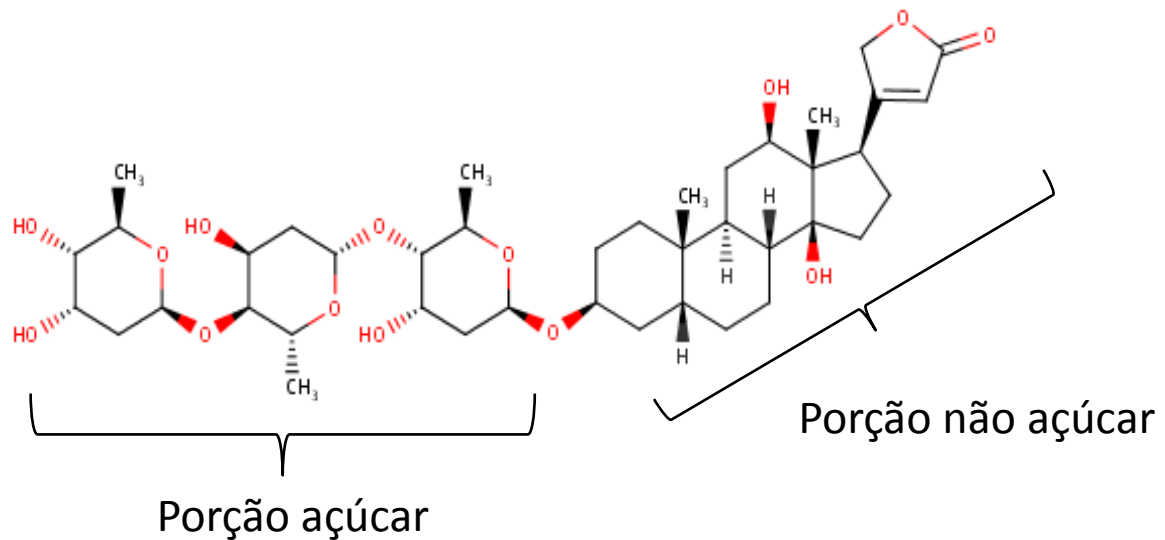
Define-se insuficiência cardíaca como síndrome clínica onde ocorre a modificação funcional ou estrutural do coração que acarreta na incapacidade cardíaca de realizar a ejeção e/ou acomodação do sangue em valores pressóricos fisiológicos. Estima-se que 23 milhões de pessoas são portadoras de insuficiência cardíaca, sendo que 2 milhões de novos casos são diagnosticados no mundo anualmente (BARROS, 2008). A falta de estudos epidemiológicos a respeito da incidência da insuficiência cardíaca no Brasil dificulta o levantamento do número de pacientes que sofrem com esta patologia. De acordo com dados de outros países, estima-se que a incidência desta patologia no Brasil possa ser de até 6,4 milhões de pessoas (GUIMARÃES et al., 2002).

No ano de 2007 o Sistema Único de Saúde (SUS) registrou 111.309.325 internações. As doenças cardiovasculares, com 1.156.136 internações, foram a terceira causa das hospitalizações, sendo a insuficiência cardíaca crônica o tipo mais frequente (BOCCHI et al., 2009).

1.2 Glicosídeos cardíacos

Digitálicos são glicosídeos cardíacos prescritos para o tratamento de doenças cardíacas, sendo a digoxina o mais usado. Os digitálicos são formados por uma porção açúcar (glicona) e uma porção não açúcar (aglicona) composta por um esteroide e uma lactona (Figura 1). A solubilidade em água e as propriedades farmacocinéticas dos digitálicos são influenciadas pela porção glicona da molécula, enquanto a porção aglicona é responsável pela atividade farmacológica (HUNTER et al., 1982; SMITH et al., 1984). Os digitálicos diferem entre si no tamanho da cadeia de açúcar ou no número de grupos hidroxila na porção não açúcar da molécula. A digoxina, por exemplo, possui um grupo hidroxila a mais que a digitoxina e essa pequena alteração é responsável por características farmacocinéticas diferentes (KATZ et al., 2010).

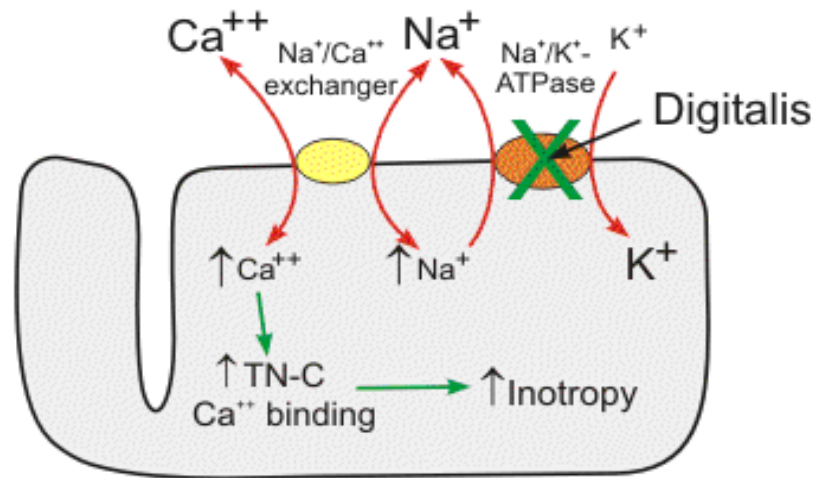
Figura 1 — Estrutura química da digoxina ($C_{41}H_{64}O_{14}$).



Fonte: adaptado de <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00390>

O uso terapêutico dos digitálicos em humanos iniciou com uma publicação de Willian Withering em 1785 (EICHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). Os digitálicos foram inicialmente utilizados no tratamento de estados edematosos e insuficiência cardíaca crônica. De acordo com Withering os digitálicos diminuíam a frequência cardíaca, em particular dos pacientes com pulsos irregulares, e aumentava a diurese (EICHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). A partir de 1927 muitos estudos em animais e em humanos demonstraram as propriedades inotrópicas positivas dos digitálicos no miocárdio (EICHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). Este efeito inotrópico positivo está relacionado com a capacidade dos digitálicos de inibir a atividade da enzima $Na^+K^+ATPase$ (GHEORGHIADÉ; PITT, 1997), conhecida como bomba de sódio-potássio, através da ligação da digoxina à subunidade α desta enzima. A inibição da enzima $Na^+K^+ATPase$ causa um aumento na concentração de sódio intracelular, estimulando o intercâmbio da bomba de sódio-cálcio, que tem como consequência o aumento da concentração do cálcio intracelular. Este cálcio é utilizado pelas proteínas contráteis e gera um aumento na força de contração do miocárdio (EICHORN; GHEORGHIADÉ, 2002) (Figura 2).

Figura 2 — Esquema da inibição da bomba de sódio/potássio pelos glicosídeos cardíacos.



A ligação dos digitálicos cardíacos à subunidade α da bomba de sódio-potássio eleva o nível intracelular de sódio, o que estimula o intercâmbio pela bomba de sódio-cálcio, aumentando a concentração do cálcio intracelular utilizado pelas proteínas contráteis. Isto aumenta a força de contração do miocárdio.

Fonte: <http://www.cvpharmacology.com/cardiostimulatory/digitalis>

Em 1998 o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso da digoxina para o tratamento da insuficiência cardíaca e fibrilação atrial, com base nos testes clínicos realizados pela PROVED (*Prospective Randomized Study of Ventricular Function and Efficacy of Digoxin*), RADIANCE (*Randomized Assessment of Digoxin on Inhibitors of the Angiotensin Converting Enzyme*) e DIG (*Digoxin Investigation Group*) (GHEORGHIADÉ et al., 2006). Apesar da aprovação da digoxina, o seu uso em pacientes com insuficiência cardíaca vem diminuindo (GOLDBERGER; ALEXANDER, 2014). Um dos fatores é o desenvolvimento de novos medicamentos como β -bloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueador de receptor da angiotensina (ARBs, *angiotensin receptor blockers*) e bloqueadores de aldosterona. Os estudos clínicos mostraram que a digoxina, em combinação com as drogas recentes, melhorou o estado clínico e reduziu a hospitalização do paciente, confirmando a sua importância no tratamento da insuficiência cardíaca crônica (GHEORGHIADÉ et al., 2006). A análise conjunta dos testes clínicos RADIANCE e PROVED sugeriu que a associação tripla formada pela digoxina, um inibidor ECA e um diurético diminuiu o risco de agravamento do quadro clínico da insuficiência cardíaca (< 5%) e também se verificou uma significativa redução do custo relacionado com a hospitalização dos pacientes (GHEORGHIADÉ et al., 2006). No ensaio clínico DIG observou-se que os pacientes com insuficiência

cardíaca crônica acima de 65 anos e tratados previamente com inibidores de ECA e diuréticos, ao receber digoxina apresentaram redução de 34% na readmissão hospitalar no intervalo de 30 dias, independente da causa, em comparação aos pacientes que receberam placebo (BOURGE et al., 2013).

A digoxina, por ser uma droga de baixo custo, tem sua importância aumentada em países em desenvolvimento onde os pacientes têm acesso limitado aos medicamentos de última geração. Quando a digoxina é administrada em doses apropriadas é bem tolerada e segura (GHEORGHIADÉ et al., 2006). No Brasil o uso da digoxina é descrito na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) para o tratamento da insuficiência cardíaca (BRASIL, 2015).

1.3 Intoxicação digitálica

A janela terapêutica dos digitálicos é estreita, sendo sua toxicidade a principal reação adversa verificada pelos clínicos (ANDRES, 2000). No ensaio clínico DIG a concentração sérica da digoxina foi considerada terapêutica na faixa entre 0,5 e 2 ng/mL. Entretanto, os guias mais recentes recomendam que a concentração sérica da digoxina deva ser entre 0,5 e 0,9 ng/mL, após análise posterior do DIG e dos resultados de outros ensaios clínicos (AMBROSY et al., 2014). No ensaio clínico PROMISE - PROSPECTIVE RANDOMIZED MILRINONE SURVIVAL EVALUATION foi verificado um aumento de 38% da mortalidade em pacientes com concentração sérica de digoxina superior a 1,1 ng/mL (EICHHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). Foi observada em outro estudo uma redução da mortalidade e da hospitalização em pacientes acima de 65 anos quando a concentração sérica da digoxina era baixa (0,5 a 0,9 ng/mL) (AHMED, 2007). A concentração sérica da digoxina não é determinada somente pela quantidade administrada, mas também em função de interações com outros medicamentos e das condições renais do paciente, visto que a eliminação predominante da digoxina é efetuada por esta via (ANTMAN; SMITH, 1985; EICHHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). A maior incidência na intoxicação causada pela digoxina foi verificada em pacientes com a função renal debilitada (SMITH; BUTLER; HABER, 1970).

A incidência de toxicidade da digoxina observada tem sido menor que 1% e no máximo 5% e em mais de 95% dos casos ocorreram em pacientes com concentração sérica de digoxina maior que 2 ng/mL (AMBROSY et al., 2014). Em

2010 foram registrados nos Estados Unidos 2.458 casos de intoxicação por glicosídeos cardiogênicos, sendo 166 casos graves e 32 óbitos (GALVÃO et al., 2013). Espera-se um aumento na exposição aos digitálicos no Brasil, uma vez que os casos de insuficiência cardíaca com a indicação de tratamento farmacológico são crescentes (GALVÃO et al., 2013).

A intoxicação por digitálicos pode ser fatal, principalmente em pacientes com disfunção cardíaca grave, pela ingestão acidental de alta dose de digitálicos ou pela intenção de suicídio. Os efeitos causados pela intoxicação são hipercalemia, bloqueio atrioventricular e taquiarritmia ventricular maligna (ANTMAN et al, 1990). O tratamento de primeira linha recomendado atualmente nas intoxicações graves por digitálicos é a utilização de anticorpos policlonais anti-digoxina na forma de fragmentos Fab (*fragment antigen binding*). Infelizmente este tratamento é indicado somente quando outras opções de tratamento falham, devido ao seu alto custo (FLANAGAN; JONES, 2004).

Para o tratamento da intoxicação por digoxina, há tempos buscou-se desenvolver um antídoto, na forma de anticorpos neutralizantes. Por possuir apenas 780,92 Daltons, a digoxina não é antigênica, sendo necessária a ligação covalente a um carreador proteico para a produção de anticorpos específicos anti-digoxina. Em 1967, a digoxina foi conjugada com albumina sérica bovina, para a obtenção de anticorpos específicos em coelhos (BUTLER; CHEN, 1967). Para a produção comercial dos anticorpos anti-digoxina, os autores imunizaram ovelhas, obtendo anticorpos policlonais com alta afinidade e especificidade, que foram purificados e clivados pela enzima papaína, para gerar os fragmentos Fab (PROTHERICS, 2001).

O uso de fragmentos Fab anti-digoxina como tratamento da intoxicação causada pela digoxina foi reportado inicialmente em 1976 (ANTMAN et al., 1990). Estes fragmentos Fab quando administrados por via intravenosa em pacientes com intoxicação digitálica, ligam-se tanto aos glicosídeos circulantes livres como também removem os glicosídeos ligados à bomba de sódio e potássio. Isso ocorre porque a afinidade dos fragmentos Fab anti-digoxina à digoxina é superior à afinidade de ligação entre o receptor endógeno (subunidade α da bomba de sódio e potássio) e a digoxina, formando complexos estáveis antígeno-Fab. Tanto estes complexos quanto os fragmentos Fab livres são excretados de forma relativamente rápida pela urina, resultando em uma rápida reversão da toxicidade, sendo portanto um produto adequado para o tratamento da intoxicação ocasionada pelo excesso de digitálicos.

Não obstante, o processo de excreção é menos eficiente em pacientes com função renal comprometida (CHAN; BUCKLEY, 2014; FLANAGAN; JONES, 2004).

1.4 Cenário econômico para o fragmento Fab anti-digoxina

Nos EUA até o ano de 2011 existiam dois produtores comerciais do fragmento Fab policlonal anti-digoxina gerado em ovelha, o Digibind[®] (GlaxoSmithKline, Parma, Itália) e o DigiFab[®] (BTG, Londres, Inglaterra) com preços similares (Digibind[®] US\$ 797,00 por frasco contendo 38 mg e DigiFab[®] US\$ 786,00 por frasco contendo 40 mg). Entretanto, a GlaxoSmithKline descontinuou a venda do seu produto em 2011. A BTG com a obtenção do monopólio da comercialização do fragmento Fab policlonal anti-digoxina, neste mesmo ano, elevou o preço do DigiFab[®] em 15% (US\$ 903 por frasco contendo 40 mg). Diante deste cenário a falta de concorrência permitiu que a BTG continuasse a elevar o preço do seu produto. Em março de 2014 o produto atingiu o valor de US\$ 2.370,00 o frasco com 40 mg (JOHNSON et al, 2015). Para a reversão de casos agudos de intoxicação o fabricante recomenda a utilização de até 20 frascos do antídoto, correspondendo a US\$ 47.400,00. A utilização de um número maior de frascos pode ser necessária, dependendo da quantidade de digoxina consumida (BTG, 2012).

Para a utilização dos fragmentos Fab anti-digoxina no Brasil é necessária a importação, que é autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária conforme resolução RDC n° 28, de 09 de maio de 2008 atualizada pela RDC n.º 8, de 28 de fevereiro de 2014, destinado exclusivamente para uso hospitalar ou sob prescrição médica, sendo sua importação vinculada a uma entidade hospitalar ou entidade civil representativa. A importação para fins comerciais é proibida (BRASIL, 2008; BRASIL, 2014).

O futuro no uso dos fragmentos Fab anti-digoxina não está limitado a casos de intoxicação por digitálicos, uma vez que estes fragmentos têm capacidade de neutralizar moléculas endógenas denominadas esteroides cardiotônicos, ou *digitalis like* através da reação cruzada. Estas moléculas endógenas possuem efeitos semelhantes aos glicosídeos cardíacos, inibindo a bomba de sódio-potássio e aumentando a pressão arterial. Verificou-se um aumento dos níveis circulantes destas moléculas em grávidas com hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia. Apesar da pré-eclâmpsia ocorrer em apenas 3 a 5% do total de grávidas, trata-se de uma

complicação grave, podendo causar mortalidade materna e fetal (BAGROV et al., 2009; ZAZERSKAYA et al., 2013). Em 2012 a empresa Glenveigh Medical, que possui a licença intelectual do fragmento Fab anti-digoxina – DigiFab[®], recebeu do FDA a designação de “*Fast track*” o que possibilita a redução no tempo para a aprovação do uso deste medicamento para o tratamento da pré-eclâmpsia (REUTERS, 2012).

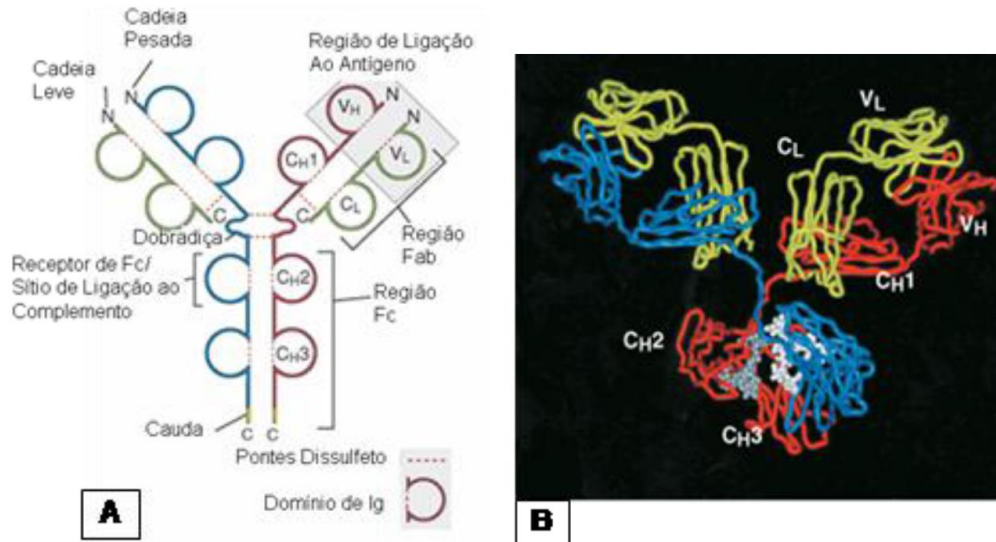
1.5 Anticorpos

Anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas estruturalmente semelhantes produzidas pelos linfócitos B, que possuem como principais funções: ligar-se especificamente a antígenos e recrutar células e/ou moléculas capazes de eliminar o patógeno ao qual foi apresentado. O anticorpo possui sequência única, permitindo a ligação a um epítipo específico presente no antígeno. Estruturalmente eles possuem as mesmas características básicas, mas apresentam elevada variabilidade na região de ligação aos antígenos.

Os anticorpos são representados em classes determinadas pelo tipo de cadeia pesada presente, podendo ser divididos em IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A classe mais frequente em humanos é a IgG, subdividido em várias subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4). Existem 2 classes de cadeias leves: *lambda* (λ) e *kappa* (κ). Uma molécula de anticorpo apresenta 2 cadeias leves idênticas κ ou λ , não sendo possível a coexistência dos 2 tipos a uma mesma molécula de anticorpo. Em seres humanos, 60% dos anticorpos apresentam cadeia leve do tipo κ e cerca de 40%, cadeias leves λ . Em camundongos os anticorpos contendo cadeia κ são cerca de 10 vezes mais abundantes do que os portadores da cadeia leve λ (ABBAS, 2011).

O peso molecular do anticorpo da classe IgG é de aproximadamente 150 kDa, com variações conforme o isotipo. São formados por cadeias polipeptídicas leves (LC, *light chain*) idênticas com peso aproximado de 25 kDa e duas cadeias pesadas (HC, *heavy chain*) idênticas de 50 kDa. Ambas possuem uma região aminoterminal variável (V_H , *Variable Heavy* e V_L , *Variable Light*) de reconhecimento e ligação ao antígeno e regiões carboxiterminais constantes (C_H , *Constant Heavy* e C_L , *Constant Light*) (Figura 3).

Figura 3 — Estrutura da imunoglobulina da classe IgG.



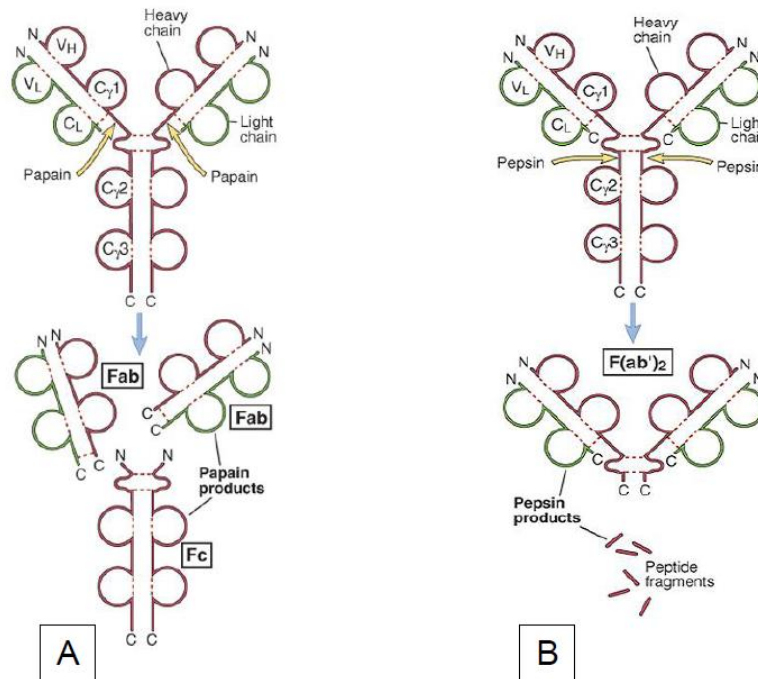
A) diagrama esquemático de uma IgG secretada; B) cristalografia de raios X, cadeias pesadas em azul e vermelho, cadeias leves em verde; os carboidratos em cinza.
 FONTE: ABBAS et al., 2011.

As 2 cadeias pesadas de cada molécula de anticorpo são ligadas covalentemente por pontes de dissulfeto. As cadeias leves e pesadas são também unidas por pontes de dissulfeto formadas entre resíduos de cisteína na região carboxiterminal da cadeia leve e o domínio C_{H1} da cadeia pesada. Ambas as cadeias possuem unidades de estrutura semelhante, com cerca de 110 aminoácidos, que se dobram de maneira independente em um formato globular, nomeado de domínio da imunoglobulina. As cadeias leves possuem 2 domínios (V_L e C_L) enquanto as cadeias pesadas contêm 4 (V_H , C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) para as imunoglobulinas G (ABBAS, 2011).

As regiões variáveis pesadas e leves possuem 3 regiões hipervariáveis, também conhecidas como regiões determinantes de complementariedade (CDRs, *complementarity determining regions*), nomeadas a partir da porção aminoterminal de CDR1, CDR2 e CDR3, sendo o CDR3 a mais variável. Entre estas regiões estão presentes sequências mais conservadas chamadas de arcabouço ou *framework regions*. A ligação do anticorpo ao alvo ocorre pelas regiões de CDR das cadeias leve e pesada. As cadeias pesadas também determinam as funções efetoras dos anticorpos, pela interação da região carboxiterminal com receptores presentes na superfície de alguns tipos celulares.

Em 1972, Rodney Porter tratou imunoglobulinas G de coelhos com enzimas proteolíticas, resultando na clivagem da mesma em fragmentos com estrutura e funções diferentes. Quando utilizada a enzima papaína, originaram-se três fragmentos. O fragmento formado pelos domínios C_{H2} e C_{H3} da molécula de IgG, ligados entre si por pontes dissulfeto, era capaz de se auto-associar e cristalizar, por isso denominado Fc (*Fragment cristalizável*). Dois fragmentos idênticos formados pela cadeia leve completa (V_L e C_L) associada a um fragmento V_H-C_{H1} da cadeia pesada, foram chamados de Fab (*Fragment antígeno binding*) e apresentaram como características a manutenção da capacidade de ligação ao antígeno por conterem os domínios V_L e V_H pareados (Figura 4A). Porter realizou o mesmo experimento, com a substituição da papaína pela pepsina, resultando em apenas um fragmento denominado $F(ab')_2$, o qual continha a região de ligação ao antígeno e pontes dissulfeto intercaladas e intactas, sendo o restante da molécula degradada (Figura 4B) (ABBAS, 2011). Entre outras características, os fragmentos Fab são menos imunogênicos do que a IgG inteira, possuem melhor difusão no espaço intersticial e são facilmente eliminados por filtração glomerular (FLANAGAN; JONES, 2004).

Figura 4 — Resultados da digestão enzimática de anticorpos.



A) Fragmentos de uma molécula de IgG submetida ao tratamento com papaína, resultando em dois fragmentos Fab (V_L , C_L , V_H e C_{H1}) e um fragmento Fc (C_{H2} e C_{H3}). B) Tratamento com pepsina resultando em um fragmento $F(ab')_2$.

FONTE: ABBAS et al., 2011.

Em 1975 Milstein e Köhler desenvolveram a metodologia para obtenção de anticorpos monoclonais (AcMos), sendo laureados pelo prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1984. Esta técnica se baseia na imunização de animais com o antígeno de interesse seguido do isolamento das células B do baço ou linfonodos do animal e a fusão destas células às células de mielomas, originando híbridos produtores de AcMo (KÖHLER; MILSTEIN, 1975).

O primeiro AcMo aprovado pelo FDA para uso terapêutico em humanos foi o anticorpo murino Muromab-CD3 (Orthoclone-OKT3, Johnson & Johnson) com aplicação na prevenção e controle da rejeição aguda a transplantes. O sucesso obtido pelo OKT3 estimulou o desenvolvimento de outros AcMos para tratamento ou diagnóstico de doenças humanas, obtidos pelas técnicas de humanização dos AcMos murinos através da engenharia de anticorpos (MORO; RODRIGUES, 2001). Uma das ferramentas disponíveis para a seleção dos AcMos recombinantes e fragmentos de anticorpos é a técnica de *phage display*.

1.6 Phage display

A tecnologia de *phage display* foi descrita por George Smith em 1985 como um método de apresentação de polipeptídios exógenos em fusão com uma proteína da superfície do bacteriófago (fago), correlacionando o genótipo e o fenótipo dos fagos (SMITH, 1985). Neste trabalho a construção da biblioteca de polipeptídeos permitiu a apresentação dos mesmos pelos fagos e a seleção de ligantes específicos para um determinado anticorpo (SMITH, 1985). Desde então a tecnologia de *phage display* tem sido bastante utilizada em estudos que envolvem peptídeos e proteínas tanto na área acadêmica como em diagnóstico e na terapêutica. A técnica pode ser utilizada nos estudos de interação proteína-ligante, análise dos sítios de ligação do receptor e para aumentar ou alterar a afinidade das proteínas pelos seus ligantes. Além disso, esta tecnologia pode ser aplicada na obtenção de AcMos e para aumentar a afinidade entre o anticorpo e seu antígeno (BAZAN, 2012). Em relação à obtenção de AcMos, inicia-se pela construção de bibliotecas de genes de fragmentos de anticorpos no formato Fab ou scFv, provenientes de diversas fontes, animal ou humana (após imunização ou não), hibridoma, entre outras. Antes de selecionar os clones que expressam um anticorpo específico, a biblioteca pode ser enriquecida com clones que apresentam afinidade

ao antígeno através de algumas rodadas de *panning*. Este processo é composto das seguintes etapas: amplificação da biblioteca, ligação dos fragmentos expressos pelo fago ao antígeno imobilizado numa superfície, eluição dos fagos que se ligaram ao antígeno e amplificação da nova biblioteca para uma nova rodada de enriquecimento (WINTER et al., 1994).

1.7 Purificação

Para o uso clínico de biomoléculas é imprescindível à obtenção de alto grau de pureza, fazendo-se necessário a utilização de variadas técnicas de purificação para alcançar o nível exigido.

A purificação de biomoléculas pode ser realizada por diversas técnicas, tais como precipitação, centrifugação, eletroforese, cromatografia líquida dentre outros. O fator determinante para o uso de uma técnica ou outra, ou até mesmo o conjunto de técnicas, recai no tipo de aplicação da molécula de interesse, por exemplo, proteínas com fins terapêuticos requerem elevado grau de pureza, assim como algumas finalidades acadêmicas como estudos de cristalização.

As características físico-químicas das moléculas biológicas, como afinidade biológica, carga elétrica, tamanho molecular, hidrofobicidade podem ser exploradas nos processos cromatográficos. Atualmente está disponível comercialmente uma vasta gama de resinas cromatográficas com diferentes metodologias para a separação dos contaminantes. Os métodos cromatográficos com maior utilização são: cromatografia de afinidade, troca iônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica (Tabela 1) (SILVA, 2004).

Tabela 1 — Técnicas Cromatográficas e seus princípios.

Técnica	Princípio
Afinidade	Ligação específica
Troca iônica	Carga elétrica
Exclusão molecular	Tamanho
Interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
Fase reversa	Hidrofobicidade

1.7.1 Métodos cromatográficos

A cromatografia de afinidade baseia-se na interação específica e reversível entre uma proteína a ser purificada e um ligante, acoplado a uma matriz (ROY;

GUPTA, 2003). Esta metodologia permite a obtenção de proteínas com elevado grau de pureza em apenas uma etapa cromatográfica (HERMANS; ADAMS; DETMERS, 2014).

A cromatografia de troca iônica permite a separação de proteínas explorando as diferenças entre as cargas superficiais líquidas das proteínas. A carga superficial da proteína, que pode variar em função do pH da solução onde se encontra, interage com a carga oposta presente no meio cromatográfico (KARLSSON; RYDEN; BREWER, 1998). Quando uma proteína está presente em um ambiente com pH acima do seu ponto isoelétrico (pI) ela estará carregada negativamente permitindo a sua interação com resinas de troca aniônica, enquanto que, quando presente em um ambiente com pH inferior ao seu pI, estará carregada positivamente, possibilitando o uso de resinas com troca catiônica para a separação.

O processo cromatográfico de exclusão molecular ou também chamado de gel filtração explora o tamanho molecular para proceder à separação. Para tanto, a substância a ser purificada é aplicada à matriz cromatográfica, a qual é composta por grânulos (“beads”) com poros de tamanhos diferentes; as substâncias que possuem maior tamanho molecular são eluídas antes da coluna cromatográfica por não penetrarem nos poros, e as substâncias de tamanhos menores penetram nos poros presentes nos grânulos retardando a sua eluição.

As características de hidrofobicidade das moléculas são exploradas pela cromatografia de interação hidrofóbica, a qual se baseia na interação entre os ligantes hidrofóbicos (presentes no meio cromatográfico) e os resíduos hidrofóbicos na superfície das proteínas (ERIKSSON, 1998). Em ambientes com elevadas concentrações salinas as proteínas expõem seus grupamentos hidrofóbicos, conferindo maior adsorção com o meio cromatográfico, para a reversão da interação obtida nesta estratégia, é realizada a redução da concentração de sal (força iônica), podendo chegar à total ausência de sal (passagem de água) (GHOSE et al., 2009). Usualmente, esta metodologia é realizada como um passo de purificação posterior aos métodos que resultam na eluição em grandes concentrações de sais, como exemplo, precipitação por sulfato de amônio ou eluatos contendo altas concentrações de sais oriundos de cromatografias de troca iônica. Uma variante desta metodologia que também tem por princípio a interação hidrofóbica é a cromatografia de fase reversa que possui um meio cromatográfico com alta hidrofobicidade promovendo uma forte interação entre a resina cromatografia e a

molécula, sendo necessário o uso de solventes orgânicos para a reversão desta interação. Os solventes orgânicos representam condições drásticas que podem alterar a conformação das proteínas (WHEELWRIGHT, 1991).

1.7.2 Purificação de anticorpos monoclonais

Com o isolamento e a caracterização de proteínas bacterianas capazes de interagir com as imunoglobulinas, foi possível a utilização destas proteínas para o isolamento de anticorpos. A proteína A oriunda dos *Staphylococcus aureus* e a proteína G obtida dos *Streptococcus grupos C e G* são as de maior aplicação para o isolamento das imunoglobulinas da classe G, estas duas proteínas ligam-se predominantemente na porção Fc das imunoglobulinas (NILSON et al., 1993).

O processo de purificação de AcMos terapêuticos é tradicionalmente realizado pelo uso de colunas cromatográficas intercalado com o uso de etapas de concentração e troca de tampão (diafiltração) (CHON; ZARBIS-PAPASTOITSIS, 2011). Tipicamente, a purificação de AcMos é composta pela etapa de clarificação do sobrenadante da cultura celular, seguido pelas etapas cromatográficas de:

- Afinidade em resina de proteína A ou G – captura dos anticorpos e redução do volume;
- Catiônica - remoção de resíduos de proteína A, proteínas da célula hospedeira e DNA;
- Aniônica - remoção de vírus, proteínas da célula hospedeira, endotoxinas e DNA;

Também são realizadas etapas de inativação viral que podem ser efetuadas com a exposição dos AcMos a condições de pH ácido, seguida de neutralização (pH *shifting*), geralmente realizada durante a cromatografia por afinidade em proteína A, visto o uso de tampões com pH ácido para a remoção do material adsorvido na coluna cromatográfica. Outros métodos utilizados para a inativação viral incluem tratamentos com detergentes/solventes ou filtração (MARQUES; ROUSH; GÖKLEN, 2009).

1.7.3 Purificação de fragmentos Fab de anticorpos

As resinas de afinidade proteína A e G, além de serem vastamente utilizadas para a purificação de anticorpos, também podem ser utilizadas para a purificação de

fragmentos Fab, apesar da diminuída atividade de interação que possuem com os fragmentos Fab. A proteína A é restrita à porção V_HIII, e a especificidade da proteína G é dirigida ao C_H1 da imunoglobulina. Outra proteína obtida de bactérias que possui interação com os fragmentos de anticorpos é a proteína L, obtida da espécie bacteriana *Peptostreptococcus magnus*, com especificidade para a região variável da cadeia leve das imunoglobulinas, sem interferência no sítio de ligação ao antígeno (NILSON, 1993; RODRIGO; GRUVEGARD; ALSTINE, 2015).

Na purificação de fragmentos Fab de anticorpos existem alguns aspectos que devem ser levados em conta, como a forma de obtenção do fragmento (digestão dos anticorpos inteiros por papaína ou obtidos pelo uso de técnicas de engenharia genética), a espécie de origem (humano, murino, etc.) e a existência ou não de caudas ou marcadores que facilitarão o isolamento com a utilização de resinas de afinidade, como por exemplo, a purificação de proteínas contendo cauda de histidina com o uso de resinas de afinidade por metal.

A purificação dos fragmentos de anticorpos também pode ser realizada com a utilização de resinas de troca catiônica, as quais em situações bem estabelecidas, permitem a obtenção de níveis dinâmicos de ligação dos fragmentos de anticorpos superiores a 100 g/L (RODRIGO; GRUVEGARD; ALSTINE, 2015).

1.8 Obtenção dos fragmentos Fab monoclonal anti-digoxina

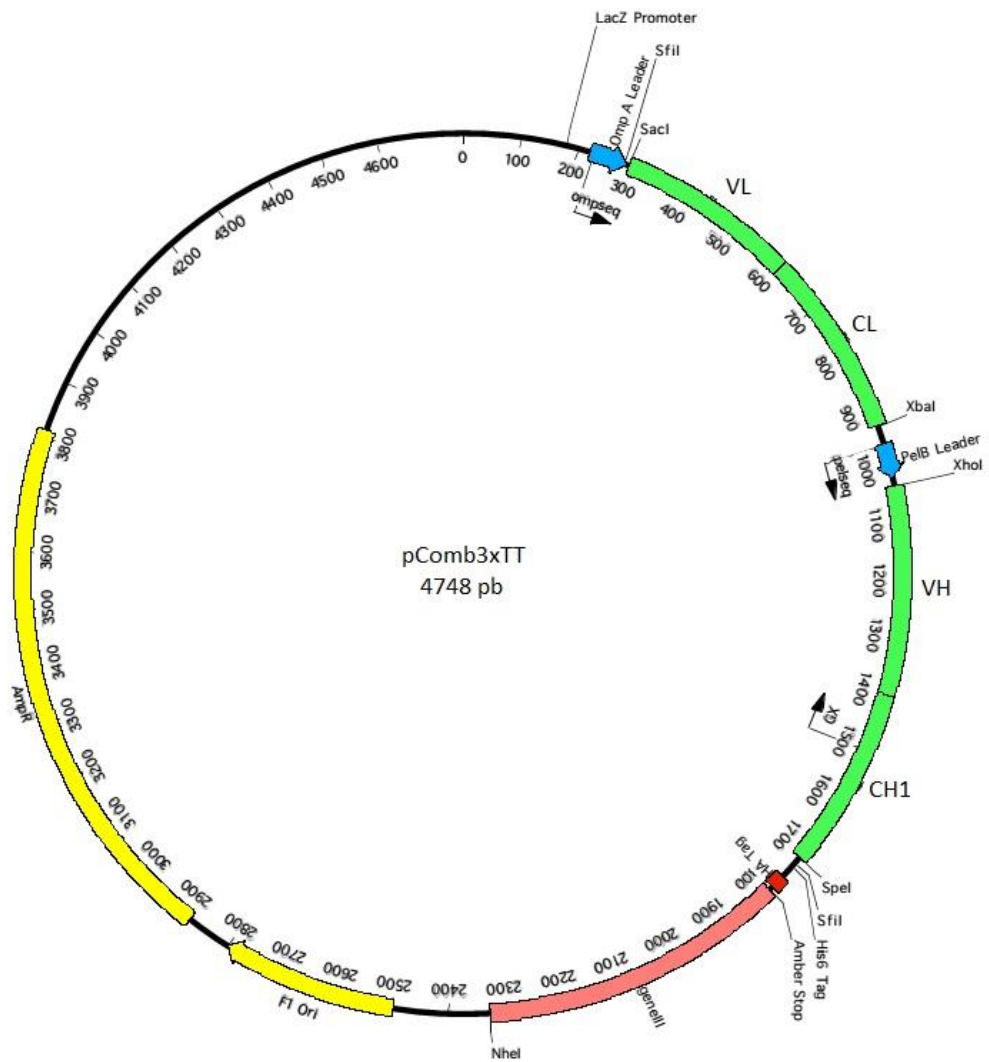
A tecnologia de *phage display* foi utilizada em um trabalho anterior do nosso laboratório para a seleção de clones do fragmento Fab anti-digoxina, expressos em *Escherichia coli* (*E. coli*). Para a obtenção desses clones, partiu-se da extração do RNA total do hibridoma anti-digoxina. Os genes da cadeia leve e pesada dos fragmentos Fab foram amplificados com oligonucleotídeos específicos após síntese de cDNAs e clonados sequencialmente em vetor fagomídeo para a construção da biblioteca combinatória anti-digoxina. Em seguida, a biblioteca foi enriquecida por rodadas de *panning* através da ligação do fragmento Fab expresso pelo fago à digoxina conjugada com BSA (Dig-BSA). Após o enriquecimento, 10 clones foram selecionados aleatoriamente e a presença dos insertos da cadeia leve e pesada nos clones foi avaliada. Dos clones analisados, 6 apresentaram os 2 insertos e tiveram os genes das 2 cadeias sequenciados. Os clones sequenciados apresentaram seqüências de aminoácidos idênticas para a cadeia pesada. Quatro clones

apresentaram diferenças na sequência de aminoácidos na região do *framework* 1 da cadeia leve. O clone 9 apresentou um resíduo de aminoácido diferente no CDR2 da cadeia leve em relação aos outros clones. O fragmento Fab solúvel dos 4 clones foi expresso em *E. coli* e o anticorpo presente no lisado bacteriano foi quantificado e avaliado em relação à afinidade ao antígeno (MURATA, 2012; MURATA et al., 2013).

O vetor fagomídeo pComb3XTT (BARBAS et al., 2001) (Figura 5), utilizado para clonagem dos fragmentos Fab, foi obtido do Instituto Scripps (*The Scripps Research Institute*, EUA). Este vetor pertence à família pComb3X (*Genbank* AF268281) e é composto pelos genes da cadeia leve (LC) e cadeia pesada (HC) do fragmento Fab humano para a toxina tetânica “TT”, por um promotor *lacZ*, pela origem de replicação *F1 Ori*, resistência à ampicilina *ampR*, cauda de seis histidinas (His6) e de 10 hemaglutininas (HA) que facilitam a detecção e purificação do fragmento Fab. As cadeias polipeptídicas são direcionadas para o espaço periplasmático pela existência de dois peptídeos sinais, *ompA* (*outer membrane protein*) para LC e (*pelB*) *pectate lyase B* para HC. Possui também um códon de terminação âmbar (TAG), que com o uso de linhagens bacterianas não supressoras permite a expressão da proteína solúvel sem a proteína p3. A existência dos sítios de restrição *SpeI* e *NheI* possibilita a remoção do gene da proteína p3, através da digestão pelas respectivas enzimas de restrição e religação do vetor, permitindo a expressão da proteína solúvel com o uso de bactérias supressoras. Neste trabalho optou-se pelo uso de bactérias supressoras, com a remoção do gene da proteína p3. Como consequência da estratégia usada para a expressão dos fragmentos Fab, perdeu-se a região contendo a cauda de histidinas.

No presente trabalho os fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones anteriormente selecionados foram expressos em cultivos bacterianos para estabelecer o método de purificação dos fragmentos Fab e proceder à sua caracterização. A presença do anticorpo foi verificada tanto no lisado bacteriano como no sobrenadante do cultivo, sendo observada maior quantidade de fragmento Fab no sobrenadante. Foram testadas várias estratégias de purificação como a utilização de resinas de afinidade, de troca catiônica e aniônica, para a obtenção de fragmentos Fab anti-digoxina purificados.

Figura 5 — Vetor fagomídeo pComb3XTT.



Os genes das cadeias LC e HC do fragmento humano para a toxina tetânica “TT”, foram clonados nos sítios de restrição SacI - XbaI e XhoI – SpeI, respectivamente.

FONTE: http://www.scripps.edu/mb/barbas/content/pcomb_images/pcomb_image_files/pComb_Maps/pComb3X_Maps.pdf, adaptado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar estratégias cromatográficas para a purificação dos fragmentos Fab anti-digoxina visando um alto grau de pureza e caracterizar os fragmentos Fab purificados em relação à afinidade de ligação à digoxina e seus análogos, comparando com o produto comercial (DigiFab[®]), para a definição do clone principal.

2.2 Objetivos Específicos

- Expressar o fragmento Fab anti-digoxina dos 4 clones pré-selecionados para obtenção de massa para ensaios.
- Avaliar estratégias de purificação dos fragmentos Fab anti-digoxina através de processos cromatográficos.
- Caracterizar a interação entre os fragmentos Fab anti-digoxina purificados com o antígeno e a especificidade do anticorpo à digoxina e seus análogos (digitoxina, digoxigenina e ouabaina).
- Realizar ensaios de cinética de ligação e dissociação ao conjugado Dig-BSA.
- Selecionar o clone que apresente melhor especificidade à digoxina e seus análogos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagem bacteriana, meios de cultura, suplementos e soluções utilizadas nos cultivos bacterianos

- Ampicilina 100 mg/mL - solução estoque.
- Cloreto de magnésio 2 M - solução estoque.
- *E. coli* XL1-Blue *Competent Cells* (Stratagene Corporation, EUA).
- Isopropil- β -D-Tiogalactosideo (IPTG) 1 M - solução estoque.
- *Luria-Bertani* (LB) – ágar: triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; ágar 1,5%.
- SOC: triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,05%; KCl 20 mM; MgCl₂ 1 mM; glicose 20 mM.
- *Super Broth* (SB): triptona 3%; extrato de levedura 2%; MOPS 1%, pH 7,0.

3.2 Colunas e resinas cromatográficas

- Coluna cromatográfica: C10/10 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Coluna cromatográfica: XK 26/20 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- HiTrap™ Protein L 1 mL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Hitrap™ S Sepharose FF 1 mL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Proteína G Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Q Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- S Sepharose® FF (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

3.3 Soluções e materiais utilizados nos ensaios de caracterização

- 3,3'Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Broad pl marker 3-10 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Digitoxina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Digoxigenina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Digoxina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

- HBS-EP: HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0,05% pH 7,4
- Kit *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare, EUA).
- Kit de imobilização covalente *Amine Coupling* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), contendo:
 - EDC: hidrocloreto de 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.
 - NHS: N-Hidroxisuccinimida.
- *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Membrana de PVDF (Millipore, EUA; GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Microplaca MaxiSorp de 96 poços (Nunc Immuno™ Plates, Dinamarca).
- Ouabaina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Phast Gel® IEF 3-9 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)
- Sensor tipo CM5 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Solução de sensibilização: carbonato de sódio 15 mM; bicarbonato de sódio 35 mM, pH 9,6.
- Solução reveladora: 10 mL de tampão acetato/ácido cítrico 0,1 M pH 6,0; 100 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) a 1% em dimetilsulfóxido (DMSO); 1,5 µL de água oxigenada 31,5%.

3.4 Anticorpos utilizados nos ensaios de caracterização

- Fragmento F(ab')₂ de coelho anti-IgG específico para F(ab')₂ de camundongo – 315-006-047 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA).
- Fragmento Fab de IgG de camundongo – 015-000-007 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA).
- Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo fragmento F(ab')₂ específico conjugado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA).
- Anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase – A4174 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

- DigiFab[®] (BTG, Londres, Inglaterra): Fragmento Fab policlonal anti-digoxina produzido em ovelha.

3.5 Equipamentos

- Äkta Purifier (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Biacore[™] – T200 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).
- Bomba peristáltica P50 (GE Healthcare Uppsala, Suécia).
- Cartucho de filtração tangencial - PrepScale 10 kDa (Millipore, EUA).
- Centrífuga 5804 R (Eppendorf AG, Alemanha).
- Centrífuga Beckman Avanti[™] J-25 (Beckman, Fullerton, CA, EUA).
- Concentrador Spin X 10 kDa (Corning, NY, EUA).
- Espectrofotômetro Ultrospec 6300 pro (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia).
- Leitor de microplacas (LabSystem iEMS Analyzer, Finlândia) com o software de controle e análise Genesis Lite (LabSystems and Life Sciences International UK).
- Misturador térmico - Thermomixer compact (Eppendorf AG, Alemanha)
- Monitor UV com filtro de 280 nm (GE Healthcare Uppsala, Suécia).
- Phast System[™] (Pharmacia, Uppsala, Suécia)
- Registrador (GE Healthcare Uppsala, Suécia).
- Sistema de eletroforese Mini-PROTEAN[®] (Bio-Rad, EUA).
- Sistema de transferência semi-seca - Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).
- Ultrassom para lise celular (Microson[™] Ultrasonic – (Misonix, Farmingdale, NY, EUA)

3.6 Transformação por choque térmico

Cinquenta microlitros de bactéria *E. coli* XL1-Blue foram incubados com 1 µL de vetor por 10 min em gelo seguido de incubação por 45 s a 42 °C no aparelho *Thermomixer compact* e 5 min no gelo. Foram adicionados 450 µL de meio SOC e a cultura foi incubada por 1 h a 37 °C, sob agitação. Dessa cultura 40 µL foram plaqueados em placa de Petri contendo meio LB – ágar suplementado com

ampicilina a 100 µg/mL. Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C durante aproximadamente 18 h.

3.7 Expressão de fragmentos Fab anti-digoxina solúveis

A expressão dos fragmentos Fab anti-digoxina no vetor pComb3X foi realizada conforme descrito por Murata et al. (2013) com algumas modificações. As 4 construções plasmidiais foram transformados em bactérias *E. coli* XL1-Blue por choque térmico, conforme descrito no item 3.6. Após o crescimento bacteriano as colônias foram coletadas e inoculadas em 60 mL de meio SB suplementado com cloreto de magnésio 20 mM e ampicilina 100 µg/mL, sendo incubadas a 37 °C durante 2 h sob agitação de 210 rpm. Após a incubação, 8 mL do cultivo foram inoculados em frasco contendo 400 mL de meio SB com cloreto de magnésio 20 mM e ampicilina 100 µg/mL. Esta suspensão foi incubada a 37 °C a 210 rpm até a densidade óptica (DO) a 600 nm atingir entre 0,8 e 1,0. A expressão dos fragmentos Fab anti-digoxina foi induzida pela adição de IPTG 0,5 mM ao cultivo e incubação a 30 °C, sob agitação de 210 rpm durante aproximadamente 18 h, que, por conveniência realizava-se durante a noite. Após este período, o cultivo foi centrifugado a 17700 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante e o sedimento foram armazenados a -80 °C para verificar a presença de fragmentos Fab.

3.8 Lise bacteriana

O sobrenadante da cultura bacteriana foi dividido em 4 alíquotas contendo 50 mL cada e centrifugado a 5400 x g. Os sedimentos bacterianos das 4 alíquotas foram lisados em um protocolo para a lise total e em 3 protocolos diferentes para a lise do espaço periplasmático.

3.8.1 Lise bacteriana total por ultrassom

O sedimento do cultivo foi ressuspendido em 2,5 mL de PBS estéril e lisado por sonicação com 10 pulsos de 10 s, intercalado entre um pulso e outro por incubação de 2 min em gelo. A suspensão foi centrifugada a 15500 x g por 30 min a 4 °C, sendo o sobrenadante armazenado a -20 °C.

3.8.2 Lise do periplasma bacteriano por choque osmótico

3.8.2.1 Lise periplasma protocolo 1 (THORSTENSON et al., 1997)

O sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 5 mL de sacarose 500 mM; Tris 200 mM; EDTA 0,5 mM e incubado em gelo por 15 min. Após a incubação foram adicionados 20 mL do tampão Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM, seguido de incubação em gelo por 30 min. Ao final o material foi centrifugado a 5400 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C.

3.8.2.2 Lise periplasma protocolo 2 (Sigma Flag® E. coli Expression system manual)

Para ressuspender o sedimento bacteriano, foram adicionados 40 mL da solução de sacarose 500 mM; Tris 30 mM; EDTA 1 mM pH 8,0 para cada grama de bactéria, seguido pela centrifugação a 5400 x g por 10 min a 10 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado e o sedimento ressuspensionado em 20 mL de água purificada gelada para cada grama de bactéria e centrifugado a 5400 x g por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos nas duas etapas foram misturados e armazenados a -20° C.

3.8.2.3 Lise periplasma protocolo 3 (ROUET et al., 2012)

Foram adicionados 2,5 mL do tampão sacarose 20%; Tris 100 mM; EDTA 1 mM pH 8,0 gelado para ressuspender o sedimento bacteriano. Esta suspensão foi incubada em gelo por 30 min. Após a incubação a suspensão foi centrifugada a 5400 x g por 10 min a 10 °C. O sobrenadante foi separado e o sedimento ressuspensionado em 2,5 mL de cloreto de magnésio 5 mM e incubado por 20 min em gelo. Depois da incubação o material foi centrifugado a 5400 x g por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos nas duas etapas foram misturados e armazenados a -20 °C.

3.9 Purificação

3.9.1 Cromatografia líquida em resina de afinidade Proteína L

Para a purificação o sobrenadante foi descongelado, dialisado com solução salina fosfatada (PBS) e concentrado por filtração tangencial em cartucho PrepScale 10 kDa.

O ensaio foi realizado com resina pré-empacotada HiTrap™ Proteína L 1 mL, conectada ao sistema automatizado Äkta Purifier. Para o equilíbrio da coluna utilizou-se tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. A amostra a ser purificada foi injetada na coluna, ao final da injeção passou-se o tampão de equilíbrio para remover possíveis ligações inespecíficas e reequilibrar a coluna. Para eluição optou-se pelo uso de um gradiente de pH com a utilização dos tampões: A - citrato de sódio 100 mM pH 3,5 e B – ácido cítrico 100 mM pH 2,0 nas condições de 0 a 100% de B, em 20 volumes de coluna. A regeneração da coluna foi realizada com a passagem de hidróxido de sódio 15 mM e repouso de 10 min de contato. O enxágue do tampão de regeneração foi realizado com o tampão de equilíbrio, em seguida a resina foi armazenada em solução de álcool etílico 20%. O fluxo utilizado nas etapas foi de 1 mL/min em temperatura ambiente.

3.9.2 Cromatografia líquida em resina de afinidade Proteína G

Os sobrenadantes foram tratados, conforme descrito no item 3.9.1, ou através de uma etapa de diálise contra PBS para os fragmentos Fab obtidos pela lise do espaço periplasmático. Após o tratamento o material a ser purificado foi aplicado em 5 mL de *resina proteína G Sepharose™ 4 FF* empacotada em coluna C10/10 de 1 cm de diâmetro x 10 cm de altura e a coluna foi acoplada a um sistema de bomba peristáltica, monitor UV 280 nm e registrador. A coluna foi equilibrada com o tampão Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. Posteriormente o sobrenadante da cultura contendo 25% (v/v) da solução de equilíbrio foi aplicado à coluna. Após o carregamento, passou-se pela coluna a solução de equilíbrio para remover possíveis ligações inespecíficas. A eluição foi realizada com o tampão ácido acético 200 mM pH 3,0. O eluato foi neutralizado com a adição de Tris 1 M com quantidade suficiente para elevar o pH a 7,0 e dialisado duas vezes contra PBS durante 18 h. A regeneração da coluna foi realizada com tampão ácido acético 1 M pH 2,5. Na etapa

de carregamento foi utilizado o fluxo de 0,5 mL/min e as demais etapas foram realizadas com fluxo de 1 mL/min a 4 °C.

3.9.3 Ensaio de otimização da purificação dos fragmentos Fab anti-digoxina

Os ensaios cromatográficos foram realizados com a utilização do sistema automatizado Äkta Purifier em temperatura ambiente ou com o uso de bomba peristáltica, monitor UV 280 nm e registrador com temperatura de 4-8 °C. Devido ao processo de purificação possuir as mesmas etapas descritas nos itens 3.9.1 e 3.9.2 são apresentados apenas os tampões utilizados em cada etapa.

3.9.3.1 Cromatografia líquida em resina de proteína G FF

3.9.3.1.1 Proteína G - Protocolo 1

Foi utilizada a mesma estratégia cromatográfica descrita no item 3.9.2

3.9.3.1.2 Proteína G - Protocolo 2

O sobrenadante foi diafiltrado com o tampão glicina 1,5 M, NaCl 150 mM pH 9,0 e concentrado por filtração tangencial em cartucho PrepScale 10 kDa. Para o equilíbrio da resina e reequilíbrio após a aplicação da amostra utilizou-se o tampão glicina 1,5 M, NaCl 3 M, pH 9,0, seguido pela eluição 1 com o tampão citrato de sódio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0 e eluição 2 com o tampão citrato de sódio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 3,0. A regeneração da resina foi realizada pela passagem dos tampões glicina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 2,3 e do tampão tris 50 mM, NaCl 1 M, pH 8,6.

3.9.3.1.3 Proteína G – Protocolo 3

Para o equilíbrio e reequilíbrio da resina foi utilizada a solução de fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, a eluição foi realizada pela passagem da solução de glicina 100 mM pH 2,7 e para a regeneração da resina foi aplicada a solução ácido acético 1 M pH 2,4. As frações correspondentes aos eluatos foram dialisadas com a solução de acetato de sódio 20 mM pH 4,5.

3.9.3.2 Cromatografia em resina S Sepharose FF

3.9.3.2.1 S Sepharose - Protocolo 1

A amostra a ser purificada era diafiltrada com o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e concentrado por filtração tangencial em cartucho PrepScale 10 kDa, ou pelo uso de concentradores Spin X 10 kDa. A resina pré-empacotada contendo 1 mL de resina S Sepharose FF - Hitrap 1 mL foi equilibrada e lavada após a aplicação da amostra com o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, seguido pela eluição em gradiente de NaCl com a utilização dos tampões: A – acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e B – acetato de sódio 50 mM, NaCl 1 M nas condições de 0 a 100% de B, em 20 volumes de coluna. A regeneração da resina foi realizada pela passagem de NaOH 0,1 M.

3.9.3.2.2 S Sepharose - Protocolo 2

O sobrenadante do cultivo foi diluído por aproximadamente 4 vezes com a adição do tampão acetato de sódio 15 mM pH 5,0 para atingir a condutividade de 5,0 mS/cm, o pH foi ajustado para 5,0 com a adição de HCl 6 N, sendo filtrado em 0,45 µm, posteriormente. A resina S Sepharose FF foi empacotada em coluna XK 26/20 com 2,6 cm de diâmetro x 20 cm de altura, o volume de resina obtido após o empacotamento foi de 40 mL. Para o equilíbrio da resina e reequilíbrio após a aplicação da amostra utilizou-se o tampão acetato de sódio 15 mM pH 5,0, seguido pela eluição 1 com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 e eluição 2 com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,5 M pH 7,0. A regeneração da resina foi realizada pela passagem de NaOH 0,1 M.

3.9.3.3 Cromatografia em resina Q Sepharose

O sobrenadante do cultivo foi centrifugado a 17700 x g, filtrado a 0,45 µm e adicionado de Tween 20 para a concentração final de 0,05%, seguido pela injeção da amostra à coluna cromatográfica com 5 mL de resina Q SepharoseTM FF empacotada em coluna C10/10 de 1 cm de diâmetro x 10 cm de altura, contendo 6,8 cm de leito de resina. A resina foi equilibrada e reequilibrada após a aplicação da amostra com o tampão Tris 20 mM pH 7,0. A eluição foi realizada com o tampão

Tris 20 mM, NaCl 200 mM pH 7,0. Para a regeneração da resina foram utilizados os tampões Tris 20 mM NaCl 1 M e ácido acético 1 M pH 2,5.

3.10 Quantificação dos fragmentos Fab solúveis

3.10.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) – Método 1

Em microplaca MaxiSorp de 96 poços realizou-se a sensibilização da placa com a adição de 100 µL por poço da solução sensibilizadora contendo o fragmento F(ab')₂ de coelho anti-IgG específico para F(ab')₂ de camundongo, a 1,5 µg/mL. A microplaca foi incubada em câmara úmida por aproximadamente 18 h a 4 °C. No dia seguinte a placa foi lavada com PBS-Tween 20 0,05% por 3 vezes, bloqueada com 300 µL de PBS-leite desnatado 10% e incubada por 2 h a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a placa foi lavada com PBS-Tween 20 0,05% por 3 vezes.

A curva-padrão foi preparada com o fragmento Fab de IgG de camundongo, com concentração inicial de 0,176 µg/mL diluído em PBS-leite desnatado 5%. Os fragmentos Fab foram diluídos em concentração apropriada em PBS-leite desnatado 5%. Após a diluição inicial da curva-padrão e dos fragmentos Fab anti-digoxina a serem quantificados, procedeu-se à diluição seriada das mesmas na razão de 1:2, em placa de apoio e a posterior transferência de 100 µL de cada poço para a placa sensibilizada, seguida de incubação em câmara úmida a 37 °C por 1 h. Após a incubação a placa foi lavada com PBS-Tween 20 0,05% por 3 vezes. Foram adicionados 100 µL por poço do anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo fragmento F(ab')₂ específico conjugado com peroxidase, diluído 1:7000 em PBS-leite desnatado 5% para incubação em câmara úmida a 37 °C por 1 h. A placa foi lavada com PBS-Tween 20 0,05% por 3 vezes. Foram adicionados 100 µL da solução reveladora a cada poço, seguido pela incubação da placa por 20 min a temperatura ambiente, ao abrigo de luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de H₂SO₄ 4,7 N. A medida da absorbância a 450 nm foi realizada em leitor de placas com o software de controle e análise Genesis Lite. O cálculo das concentrações foi efetuado pela interpolação da curva padrão. O ajuste da curva padrão utilizado foi método dos quatro parâmetros realizado pelo software Genesis.

3.10.2 Dosagem de proteína pela Absorbância 280 nm

Para a quantificação dos fragmentos Fab anti-digoxina purificados por absorbância foi utilizado o espectrofotômetro Ultrospec 6300 *pro*. Para tanto, 80 µL das amostras, foram colocados em cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm e procedido a medida da absorbância a 280 nm. Como branco foi utilizado PBS ou tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5. O coeficiente de absorção molar (ϵ) utilizado para os fragmentos Fab foi de 1,53 (ANDREW; TITUS, 2000). Para a obtenção das concentrações em mg/mL utilizou-se a seguinte fórmula: $C = A/\epsilon$, onde C: concentração, A: absorbância e ϵ : coeficiente de absorção molar.

3.10.3 Dosagem dos fragmentos Fab por ressonância plasmônica de superfície - SPR

A concentração do fragmento Fab (analito) foi determinada utilizando o equipamento Biacore™ – T200. O conjugado Dig-BSA foi imobilizado no sensor tipo CM5 (célula de fluxo 4) por ligação do tipo amina. Para tanto, foram usados os reagentes do kit de imobilização covalente *Amine Coupling*: EDC, NHS e etanolamina 1 M-HCl pH 8,5. O conjugado Dig-BSA foi diluído em tampão acetato de sódio 10 mM pH 4,0 para a concentração de 50 µg/mL para a imobilização, sendo obtida 8779 RU (unidades de ressonância). Como controle negativo foi realizada a imobilização de BSA no sensor (célula de fluxo 3), nas mesmas condições realizadas para o Dig-BSA.

A curva padrão foi preparada partindo-se de uma solução estoque de DigiFab® a 50 µg/mL em solução acetato de sódio 20 mM pH 4,5, e diluída em - tampão de corrida - HBS-EP nas seguintes concentrações: 0, 2, 4, 8 e 10 µg/mL. Como controle positivo para garantir a reprodutibilidade do ensaio utilizou-se uma solução de DigiFab® com 5 µg/mL. As amostras foram diluídas 1:10, na mesma solução tampão que a curva padrão.

O ensaio foi realizado a 37 °C, fluxo de 10 µL/min, tempo de contato de 180 s. A concentração dos analitos foi verificada 5 s após o término da injeção dos mesmos. A regeneração foi realizada com a passagem de um pulso de 20 µL da solução de SDS 0,5%, glicina 100 mM pH 2,0.

3.11 Ensaios analíticos

3.11.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As corridas eletroforéticas foram realizadas com géis de poliacrilamida com concentração de 12%, com espessura de 0,75 mm. Quando necessário, as amostras foram diluídas em PBS e preparadas com tampão de amostra com ou sem agente redutor (β -Mercaptoetanol). Como marcador de massa molecular foi utilizado o *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis*. O sistema utilizado foi o *Mini-PROTEAN*[®]. A coloração foi realizada por nitrato de prata ou corante Azul de Coomassie R250.

3.11.2 Determinação do ponto isoelétrico

A determinação do ponto isoelétrico (pI) dos fragmentos Fab anti-digoxina foi realizada pelo ensaio de focalização isoelétrica realizado no equipamento automatizado Phast System[™], com o uso de gel de poliacrilamida Phast Gel[®] IEF 3-9 com faixa de pH entre 3 a 9, próprio para o equipamento. Como marcador de ponto isoelétrico foi utilizado o Broad pI marker 3-10.

O método utilizado é composto pelas etapas de pré-focalização (formação do gradiente de pH no gel) realizada a 15 °C com voltagem de 2000 V e duração de 75 Vh, seguida pela aplicação da amostra a 15 °C, 200 V e 15 Vh, finalizando pela etapa de focalização realizada a 15 °C, 2000 V e 410 Vh. Ao término da focalização das amostras o gel foi submetido à coloração por nitrato de prata.

3.11.3 Western Blotting

Para a imunodeteção dos fragmentos Fab purificados dos 4 clones, as amostras foram aplicadas em dois géis idênticos de poliacrilamida a 12% e submetidas à corrida eletroforética.

No gel referência realizou-se a coloração por prata, o segundo gel foi transferido para uma membrana de PVDF com a utilização do sistema *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*, com voltagem de 10 V e tempo de transferência de 30 min. Após a transferência, realizou-se o bloqueio da membrana com PBS-leite desnatado a 10% e incubação por 2 h em temperatura ambiente.

Após o bloqueio a membrana foi lavada 4 vezes com PBS Tween 20 0,05% e realizada a imunodeteção com a incubação das membranas com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo fragmento F(ab')₂ específico, conjugado com peroxidase, diluído 1:15000 em PBS-leite desnatado 5%, por 1 h em temperatura ambiente. Após a incubação do anticorpo conjugado com peroxidase a membrana foi lavada 4 vezes com PBS Tween 20 0,05% e revelada com DAB ou pela utilização do kit *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*.

Para a análise da ligação dos fragmentos Fab ao antígeno, amostras de Dig-BSA e BSA foram aplicadas em géis de poliacrilamida 12% e submetidos à eletroforese. O gel referência foi corado por Coomassie e os outros géis foram transferidos para a membrana PVDF, como descrito anteriormente. Após o bloqueio, cada membrana foi incubada com o fragmento Fab anti-digoxina de cada clone e do DigiFab[®] diluídos para 0,25 µg/mL em PBS-leite desnatado 5% por 1 h a 37 °C. A imunodeteção da membrana incubada com o DigiFab[®] foi realizada com a utilização do anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase, diluído 1:10000 em PBS-leite desnatado 5%. A imunodeteção das membranas incubadas com os fragmentos dos 4 clones e a revelação de todas as membranas foram realizadas conforme descrito acima.

3.11.4 Ensaio de ligação dos clones Fab anti-digoxina ao antígeno pelo teste de ELISA – Método 2

A metodologia foi realizada conforme descrito no item 3.10.1. Com as seguintes modificações:

- Sensibilização da placa com Dig-BSA ou BSA (controle negativo) na concentração de 4 µg/mL;
- Diluição dos fragmentos Fab purificados à concentração inicial de 1 nM;
- Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo fragmento F(ab')₂ específico, conjugado com peroxidase, diluído 1:5000.

3.11.5 ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos anti-digoxina e a Dig-BSA pela digoxina e seus análogos – Método 3.

As microplacas foram sensibilizadas com Dig-BSA na concentração de 4 µg/mL, conforme descrito no item 3.10.1.

Como inibidores da ligação foram utilizados: digoxina, digitoxina, digoxigenina e ouabaina. Como diluente para o ensaio foi utilizado PBS-leite desnatado 5%. As concentrações iniciais e os fatores das diluições seriadas foram ajustados, para a obtenção das curvas de IC₅₀ (Tabela 2). A diluição seriada dos inibidores foi realizada em uma placa de apoio. Setenta microlitros de cada diluição dos inibidores foram misturadas com 70 µL dos fragmentos Fab anti-digoxina a 1 nM, em uma segunda placa de apoio e homogeneizados por 10 vezes. Os fragmentos Fab foram avaliados em duplicata.

A mistura contendo o inibidor e fragmento Fab anti-digoxina foi transferida para a placa sensibilizada, seguindo com metodologia descrita no item 3.10.1. Com as seguintes modificações:

- Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo fragmento F(ab')₂ específico, conjugado com peroxidase, diluído 1:5000, para os fragmentos Fab dos 4 clones.
- Anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase, diluído 1:5000, para o DigiFab®.

Tabela 2 — Concentração inicial dos inibidores e fator de diluição seriada.

Inibidor	Concentração Inicial µM	Concentração Final µM	Fator de diluição seriada
Digoxina	0,36	3,64x10 ⁻⁸	10
Digitoxina	20	2,00x10 ⁻⁶	10
Digoxigenina	1,1	6,44x10 ⁻⁹	15
Ouabaína	1370	4,89x10 ⁻³	6

O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado com a utilização da seguinte fórmula:

$$\left(\frac{DO_{m\acute{a}xima} - DO_{amostra}}{DO_{m\acute{a}xima}} \right) * 100 = \%$$

onde:

$DO_{m\acute{a}xima}$ = Absorbância obtida sem a adição de inibidor

$DO_{amostra}$ = Absorbância obtida pela adição de cada inibidor

A concentração necessária para inibir 50% da ligação do fragmento Fab (IC₅₀) foi calculada com a utilização do programa GraphPad PRISM® Version 5.00, através

dos seguintes parâmetros: ajuste da curva por regressão não linear e análise pela opção dose resposta sigmoide (declive variável).

3.11.6 Determinação de parâmetros cinéticos por SPR

Com a utilização do equipamento Biacore[®] T200 (GE Healthcare), os parâmetros cinéticos de ligação dos fragmentos Fab anti-digoxina purificados dos 4 clones e do DigiFab[®] (analitos) com o conjugado Dig-BSA (ligante) foram determinados.

Para o ensaio foi utilizado o mesmo sensor imobilizado com Dig-BSA utilizado para a quantificação dos fragmentos Fab anti-digoxina (item 3.10.3).

A análise da cinética da ligação foi realizada nas seguintes condições:

- Concentrações das amostras: 0; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 µg/mL em solução HBS-EP.
- Cinética em ciclo único, a 37° C, fluxo de 30 µL/min, tempo de contato de 120 s e dissociação por 720 s.
- Regeneração com a passagem de um pulso de 20 µL da solução de SDS 0,5%, glicina 100 mM pH 2,0.
- Ajuste da curva conforme o modelo de Langmuir (1:1 - ligação entre uma molécula do analito com uma do ligante).

4 RESULTADOS

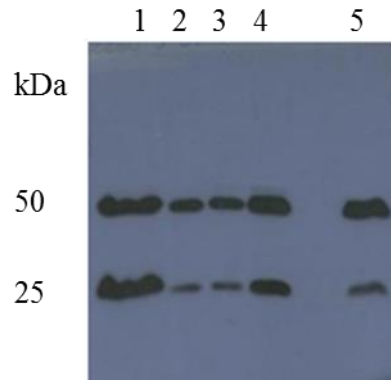
4.1 Expressão dos fragmentos Fab anti-digoxina em *E. coli*

Para a expressão dos fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones o DNA plasmidial de cada clone foi transformado em bactérias *E. coli* da linhagem XL1-Blue. Para a indução da expressão do Fab solúvel foi adicionado IPTG ao cultivo bacteriano, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os fragmentos Fab podem ser obtidos do sobrenadante de cultivo, pelo uso de bactérias supressoras e também ficam retidos no espaço periplasmático. Qual a fonte a explorar para a purificação dos fragmentos Fab constituiu o primeiro ponto de decisão. Para tanto foi escolhido um clone, de número 10, com base nos resultados da análise inicial dos fragmentos no sobrenadante bruto (MURATA et al., 2013).

4.2 Avaliação da presença do fragmento Fab intracelular e no sobrenadante do cultivo bacteriano

A avaliação da presença do fragmento Fab solúvel anti-digoxina do clone 10 expresso pelo cultivo bacteriano foi realizada através de *Western blotting*. Foram analisadas amostras do sobrenadante e do sedimento bacteriano oriundo de 50 mL de cultivo que foram lisados por ultrassom (lise total) ou por choque osmótico (lise do periplasma) oriundos de 3 protocolos diferentes. As amostras foram aplicadas no gel de SDS-PAGE 12% sem diluição. Verificou-se a existência de 2 componentes de massa molecular em todas as amostras analisadas, uma com massa molecular aproximada de 50 kDa, correspondente ao fragmento Fab anti-digoxina e outra de aproximadamente 25 kDa, que é o tamanho da cadeia leve ou pesada na forma reduzida (Figura 6).

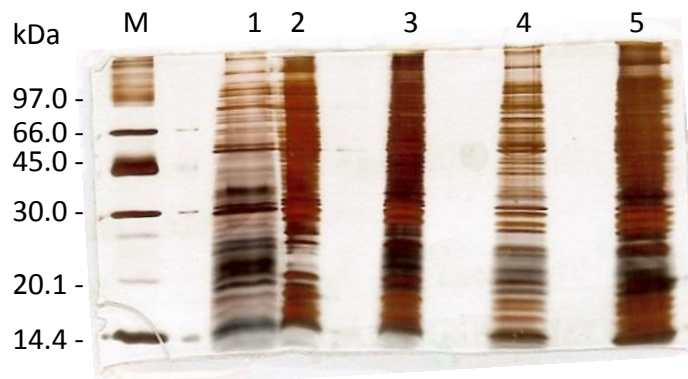
Figura 6 — *Western blotting* para verificação da presença dos fragmentos Fab anti-digoxina no sobrenadante do cultivo celular, no periplasma e no sobrenadante do lisado bacteriano total.



Foram aplicados 20 μ L das amostras em gel de poliacrilamida 12%, seguido pelo *Western blotting*. A imunodeteccção foi realizada com incubação da membrana com o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento $F(ab')_2$ conjugado com peroxidase e detectado com o sistema *ECL*. Poços: 1- sobrenadante do cultivo bacteriano; 2- lise periplasma protocolo 1; 3- lise periplasma protocolo 2; 4- lise periplasma protocolo 3; 5- lise bacteriana total

Com o intuito de verificar o perfil das amostras que contém o fragmento Fab, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, onde as amostras foram diluídas para a concentração de 1 μ g/mL do fragmento Fab anti-digoxina (Figura 7).

Figura 7 — SDS-PAGE (12%), corado por prata, das amostras que contém fragmento Fab anti-digoxina do clone 10.



Foram aplicados a cada poço 20 μ L de amostra a 1 μ g/mL do fragmento Fab anti-digoxina. Poços: M – marcador de baixo peso molecular; 1- sobrenadante do cultivo bacteriano; 2- lise periplasma protocolo 1; 3- lise periplasma protocolo 2; 4- lise periplasma protocolo 3; 5- lise bacteriana total.

Confirmada a presença do fragmento Fab anti-digoxina em todas as condições avaliadas, a concentração do anticorpo foi determinada pelo método de ELISA (método 1). A maior concentração de fragmento Fab foi obtida no

sobrenadante do cultivo bacteriano: 114,50 µg. Não foram observadas diferenças significativas nas demais amostras (Tabela 3). Ainda que aparentemente metade do conteúdo esteja presente com massa de 25 kDa, ainda se trata da amostra com maior representação. Com a verificação da maior quantidade do fragmento Fab anti-digoxina no sobrenadante do cultivo bacteriano (Tabela 3) optou-se pela sua utilização na avaliação das estratégias cromatográficas.

Tabela 3 — Concentração do fragmento Fab anti-digoxina do clone 10, obtida por ELISA, presente no sobrenadante da cultura de *E. coli*, periplasma e no lisado bacteriano total, a partir de 50 mL de cultura.

	Concentração µg/mL	Volume mL	µg/Totais
Sobrenadante da cultura	2,3	50	114,5
Lise periplasma - protocolo 1	1,1	25	28,5
Lise periplasma - protocolo 2	1,0	23	23,2
Lise periplasma - protocolo 3	4,9	5	24,5
Lise bacteriana total	14,8	2	29,6

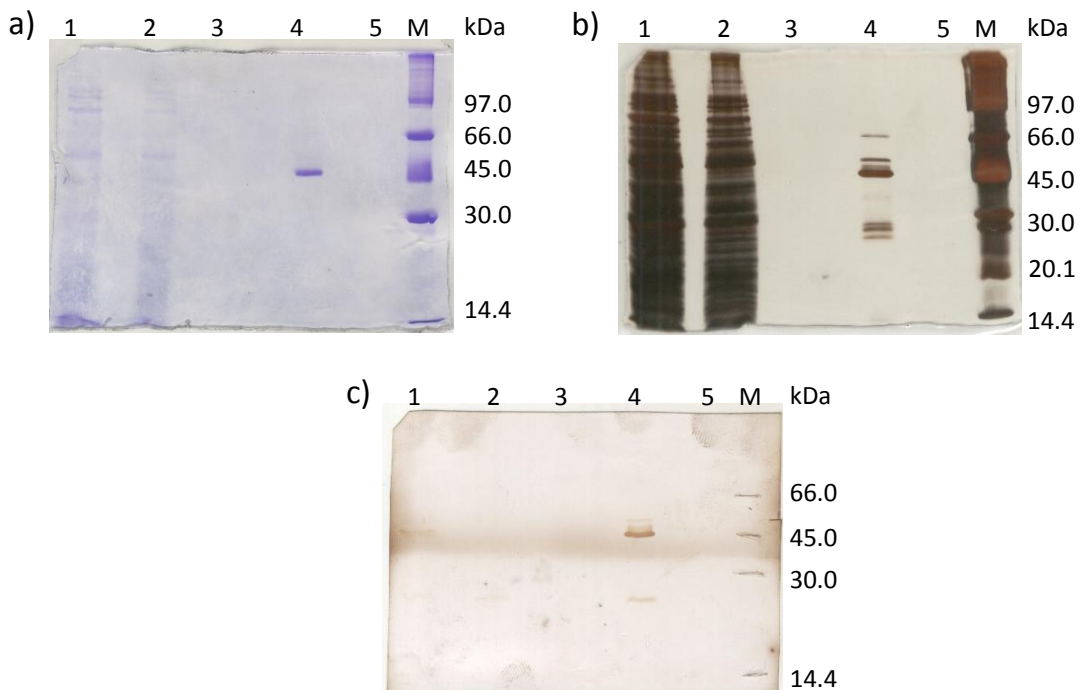
4.3 Purificação dos fragmentos Fab anti-digoxina expressos em *E. coli*

A utilização da resina de afinidade pré-empacotada com 1 mL Hitrap protein L foi a primeira escolha, por ser uma resina com especificidade para a cadeia leve, que se encontra completa no fragmento Fab. Tem a capacidade de interagir com a cadeia leve do tipo *Kappa* dos anticorpos, permitindo o seu uso na purificação de fragmentos de anticorpos. Para tanto, o sobrenadante da cultura do clone 10 foi diafiltrado contra PBS e concentrado 7,7 vezes. A coluna foi carregada com 39 mL do material inicial. Através da análise do cromatograma, não foram observados picos a 280 nm, durante a eluição, regeneração ou enxágue da coluna, indicando que o material alvo não foi adsorvido pela resina, possivelmente saindo na fração não ligada durante o carregamento.

Outra estratégia cromatográfica avaliada foi a utilização da resina de afinidade proteína G. A coluna foi carregada com 160 mL do sobrenadante da cultura bacteriana do mesmo clone 10. O eluato recuperado da cromatografia foi dialisado contra PBS e concentrado 21 vezes e avaliado para a presença do fragmento. Foram preparados 3 géis de poliácridamida a 12%, dos quais 2 géis foram corados, um por Coomassie (Figura 8a) e o outro por prata (Figura 8b). O terceiro gel foi

transferido para membrana de PVDF para a verificação da ligação entre a amostra do eluato e o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para o fragmento F(ab')₂ (Figura 8c). Como se pode observar nas Figuras 8a e 8b, no poço 4 dos géis o fragmento Fab anti-digoxina aparece puro pela coloração de Coomassie e com bandas adicionais pela coloração mais sensível de prata. A comparação do eluato com a amostra inicial carregada na coluna (poço 1) evidencia a capacidade desta etapa de cromatografia para a purificação do fragmento anti-digoxina. O resultado do *Western blotting* confirmou a capacidade de ligação entre o fragmento Fab anti-digoxina purificado e o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para o fragmento F(ab')₂, (Figura 8c – poço 4).

Figura 8 — Avaliação da pureza do fragmento Fab anti-digoxina presente no sobrenadante da cultura de *E. coli* pela cromatografia em resina de afinidade Proteína G.

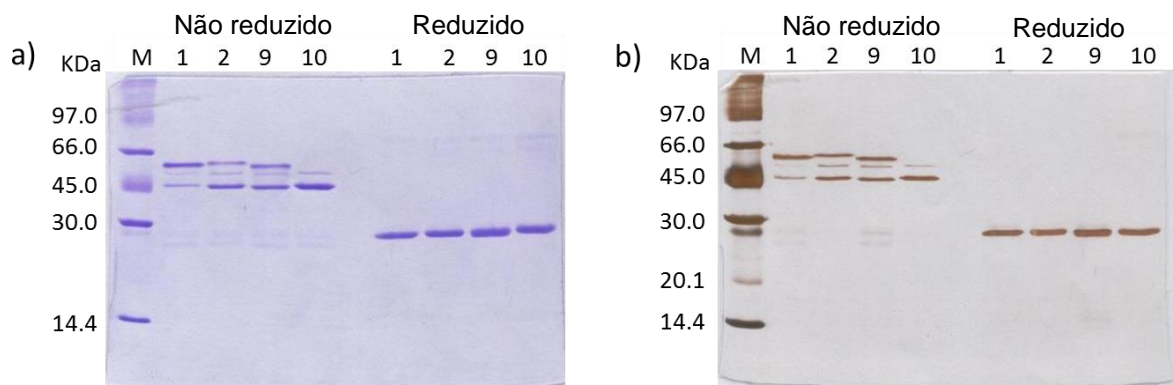


SDS-PAGE (12%) em 3 géis onde a) coloração por Coomassie, b) coloração por prata e c) Western blotting realizado com o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')₂ conjugado com peroxidase e detecção com o DAB. Foram aplicados 20 µL/poço. Poços: 1- sobrenadante do cultivo bacteriano; 2- fração não ligada; 3- lavagem; 4- eluato concentrado 21 vezes; 5- enxágue e M – marcador de baixo peso molecular.

Visto a possibilidade de uso desta metodologia para a purificação dos fragmentos Fab do clone 10, procedeu-se à expressão dos outros clones para os testes de purificação. Os fragmentos Fab dos 4 clones foram quantificados por

ELISA (método 1) e o grau de pureza verificado por SDS-PAGE a 12%. Os fragmentos Fab foram analisados nos géis na forma não-reduzida e reduzida com adição de β -mercaptoetanol. No primeiro gel foram aplicados 2,5 μ g de fragmento Fab por poço e corado com Coomassie, no outro gel, foram aplicados 0,6 μ g de fragmento Fab por poço e corados por prata (Figura 9). Observam-se diferenças nos níveis de pureza das amostras na forma não reduzida, sendo o clone 10 o que apresentou o maior nível de pureza. Quando avaliados na forma reduzida não são observadas diferenças, indicando uma possível agregação ou modificação estrutural dos fragmentos Fab na forma não reduzida.

Figura 9 — SDS-PAGE (12%) para avaliação da pureza dos fragmentos Fab anti-digoxina expressos pelos 4 clones purificados.



a) gel corado por Coomassie com 2,5 μ g de amostra por poço e b) gel corado por prata com 0,6 μ g de amostra por poço.

M – marcador de baixo peso molecular.

Os rendimentos dos fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones foram avaliados através da concentração dos fragmentos, pelo método 1 de ELISA, no sobrenadante do cultivo bacteriano antes e após a purificação. O balanço de massa e a percentagem de recuperação do produto após a etapa de purificação foram calculados em função dos volumes (Tabela 4). O maior nível de expressão do fragmento Fab anti-digoxina no sobrenadante do cultivo foi obtido pelo clone 2 (3,52 μ g/mL). O maior rendimento de purificação foi verificado pelo clone 10 (44%) seguido pelos clones 2 (29%), 9 (23%) e 1 (21%).

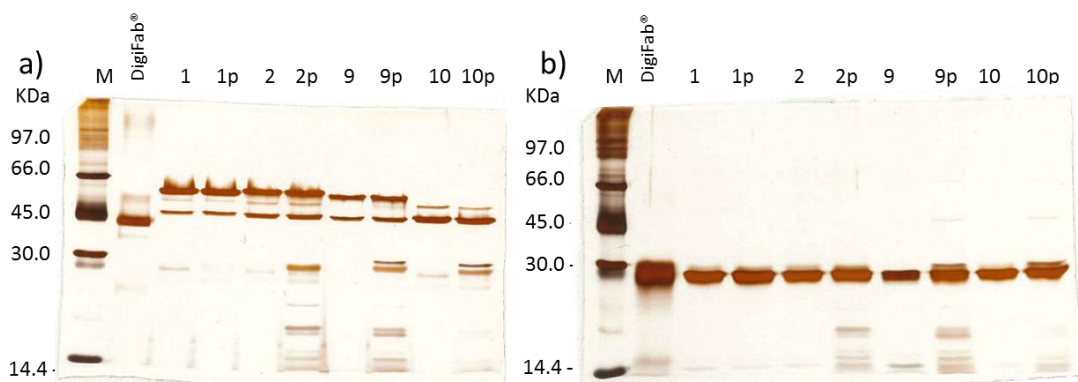
Tabela 4 — Balanço de massa dos fragmentos Fab anti-digoxina expressos pelos 4 clones, pré e pós purificação por cromatografia em resina de afinidade proteína G.

	Pré-purificação			Pós-purificação			Rendimento purificação %
	Concentração	Volume	Total	Concentração	Volume	Total	
	µg/mL	mL	µg	µg/mL	mL	µg	
Clone 1	0,96	620	595,2	255,3	0,5	127,7	21
Clone 2	3,52	600	2112,0	381,9	1,6	611	29
Clone 9	0,58	420	243,6	149,3	0,38	56,75	23
Clone 10	1,51	350	528,5	178,3	1,3	231,8	44

4.4 Obtenção de fragmentos Fab do espaço periplasmático

A obtenção dos fragmentos Fab do espaço periplasmático dos 4 clones foi realizada conforme descrito no item 3.8.2.3, a escolha deste protocolo de lise foi motivada pela obtenção dos fragmentos Fab em um menor volume, o que facilita a purificação. Este ensaio foi realizado para verificar o nível de pureza obtido pelos fragmentos Fab presentes neste compartimento após o processo de purificação e a possibilidade de uso destes materiais aumentando o rendimento dos fragmentos Fab. Pela análise do gel de SDS-PAGE (Figura 10) observa-se uma pureza inferior das amostras dos fragmentos Fab obtidos pela lise do espaço periplasmático, quando comparados com os produtos obtidos no sobrenadante. Neste mesmo ensaio foi verificado o nível de pureza do fragmento Fab policlonal anti-digoxina comercial DigiFab[®].

Figura 10 — SDS-PAGE (12%) corado por prata dos fragmentos Fab anti-digoxina purificados do sobrenadante e pela lise do periplasma.



a) amostras não reduzidas; b) amostras reduzidas. p = periplasma. Foram aplicados a cada poço 0,6 µg de proteína total.

Os fragmentos Fab eluídos da cromatografia em proteína G foram utilizados para os ensaios de caracterização, apresentando características semelhantes entre si tanto nos ensaios de ligação ao conjugado Dig-BSA, quanto nos ensaios de inibição da ligação à digoxina e aos análogos digoxigenina, digitoxina e ouabaína (dados não mostrados).

4.5 Aprimoramento das estratégias cromatográficas

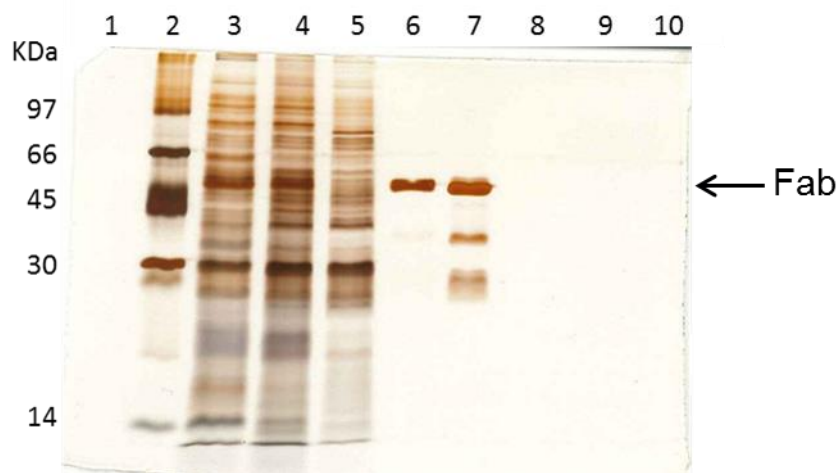
Ainda que a cromatografia em proteína G tenha resultado em purificação específica do fragmento Fab, as amostras não reduzidas (Figuras 8 e 9) contém fração de 25 kDa (apenas a cadeia pesada) ou formatos com maior massa (agregados). Para obter a purificação completa dos fragmentos expressos pelos clones anti-digoxina, foi necessária incluir uma segunda etapa. Primeiramente foi analisado o comportamento de uma etapa cromatográfica posterior à cromatografia por proteína G. A escolha de uma segunda resina teve como base o resultado de ponto isoelétrico apresentado pelos fragmentos semi-purificados (dados não mostrados). A resina de troca catiônica – S Sepharose FF - foi testada em 2 estratégias diferentes na segunda etapa da purificação. Uma terceira estratégia consistiu em usar esta resina como a primeira etapa de purificação.

Para esses testes, o fragmento Fab do clone 2 (maior rendimento de expressão) foi expresso e o sobrenadante da cultura separado em 3 alíquotas contendo aproximadamente 800 mL de sobrenadante em cada uma.

Na primeira estratégia avaliada, nomeada de estratégia 1, foi utilizado o ensaio cromatográfico em resina de proteína G, com a abordagem cromatográfica empregada anteriormente na purificação dos sobrenadantes (item 3.9.3.1.1), composta pelo tratamento da amostra com a diafiltração com PBS e concentração por filtração tangencial, equilíbrio e lavagem da resina com a solução Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 e eluição com o tampão acetato de sódio 200 mM pH 3,0. Neste ensaio não foi realizada a etapa de neutralização do pH do eluato. O eluato obtido seguiu para a purificação em resina S Sepharose Hitrap 1 mL, conforme item 3.9.3.2.1. Para o equilíbrio e lavagem da resina foi utilizada a solução acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e eluição com gradiente crescente de NaCl. O nível de pureza foi verificado por SDS-PAGE (12%), o eluato proveniente da primeira etapa de cromatografia (proteína G) apresentou um componente de massa molecular de

aproximadamente 50 kDa, correspondendo ao fragmento Fab anti-digoxina (Figura 11 poço 6). Entretanto, ao concentrar o eluato para seguir para a segunda etapa de cromatografia, verificou-se a presença de componentes de massa molecular menor (Figura 11 poço 7). Não foram observados fragmentos Fab na segunda etapa cromatográfica - S Sepharose (Figura 11 poços 8 a 10).

Figura 11 — SDS PAGE (12%) - Corado por prata. Estratégia 1 - Cromatografia em resina de proteína G seguida pela cromatografia de troca catiônica.



Poços 1 - vazio; 2 - Marcador peso molecular; 3 - sobrenadante cultura do Clone 2; 4 - sobrenadante tratado pré-coluna - proteína G; 5 - fração não ligada - proteína G; 6 - eluato - proteína G; 7 - eluato concentrado - proteína G pré-coluna S Sepharose; 8 - fração não ligada - S Sepharose; 9 - eluato fr. 1 - S Sepharose e 10 - eluato fr. 2 - S Sepharose.

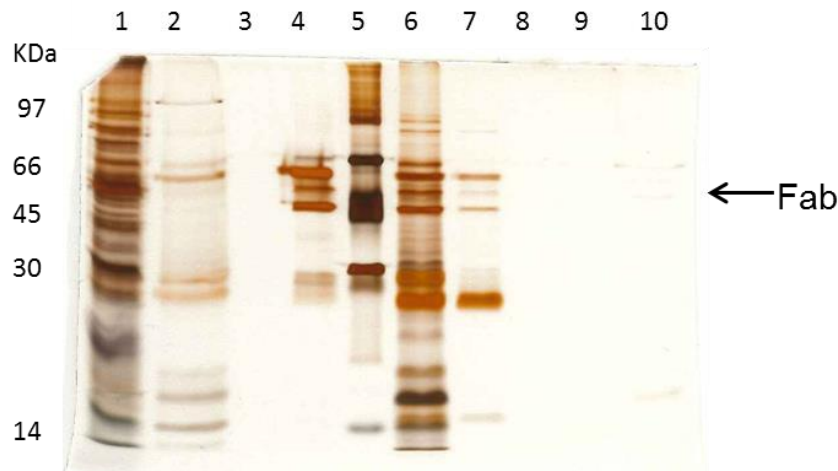
Com a quantificação dos fragmentos Fab pelo ensaio de ELISA método 1, os rendimentos obtidos nesta estratégia cromatográfica foram avaliados (estratégia 1). O cálculo do balanço de massa e da porcentagem de recuperação do produto foi realizado em função dos volumes (Tabela 5). Verificou-se a baixa recuperação do fragmento Fab (42%) pela etapa de concentração e diafiltração do sobrenadante do cultivo (tratamento da amostra). Na primeira etapa cromatográfica com o uso da resina de proteína G, foram recuperados 11% do fragmento Fab. Na etapa seguinte (cromatografia em resina S Sepharose) não foram detectados fragmentos Fab no ensaio de quantificação.

Tabela 5 — Rendimento obtido pela estratégia 1.

Identificação	Concentração	Volume	Total	Rendimento (%)	
	$\mu\text{g/mL}$	mL	μg	Etapa	Geral
Sobrenadante Cultura	2,0	790	1611	100	100
Tratamento pré-coluna	2,2	300	672	42	42
Proteína G	101	1,8	182	27	11
S Sepharose	0,0	0,11	0	0	0

A seguir, foi feita a avaliação da segunda metodologia cromatográfica (estratégia 2), que difere da estratégia 1 apenas nas soluções utilizadas na cromatografia em resina de proteína G (item 3.9.3.1.2). Para o equilíbrio e lavagem da resina utilizou-se a solução glicina 1,5 M, NaCl 3 M, pH 9,0; para a eluição foram usadas as soluções citrato de sódio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0 e citrato de sódio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 3,0, aplicadas sequencialmente na coluna. O material obtido com o eluato pH 6,0, foi tratado e aplicado na segunda etapa cromatográfica em resina S Sepharose Hitrap 1 mL, item 3.9.3.2.1 (equilíbrio e lavagem da resina com a solução acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e eluição com gradiente crescente de NaCl). Avaliando o nível de pureza obtido em gel de SDS-PAGE a 12%, verificou-se a existência de impurezas nos eluatos pH 6,0 e 3,0, (Figura 12, poços 2 e 4 respectivamente). O eluato pH 6,0 concentrado e tratado (pré-coluna S Sepharose), permitiu uma melhor visualização das impurezas existentes (Figura 12, poço 6). Não foram verificados fragmentos Fab nos eluatos obtidos pelo uso da resina catiônica, observou-se apenas traços na fração não adsorvida e com presença de impurezas (Figura 12, poço 7).

Figura 12 — SDS PAGE (12%) - Corado por prata. Estratégia 2 - Cromatografia em resina de proteína G seguida pela cromatografia de troca catiônica.



Poços 1 – sobrenadante da cultura Clone 2 tratado pré-coluna proteína G; 2 – eluato pH 6,0 - coluna proteína G; 3 – eluato pH 3,0 fração 1 concentrado - coluna proteína G; 4 – eluato pH 3,0 fração 2 concentrado - proteína G; 5 – marcador de peso molecular; 6 – eluato pH 6,0 concentrado e tratado pré-coluna S Sepharose; 7 – fração não ligada - S Sepharose; 8 – eluato fração 1 concentrado - S Sepharose; 9 - eluato fração 2 concentrado - S Sepharose e 10 - eluato fração 3 - S Sepharose.

O balanço de massa e a porcentagem de recuperação do produto foram calculados (quantificação por ELISA método 1). Apesar de resultar em maior rendimento na etapa de tratamento pré-coluna do que o observado na estratégia 1 (70% ante 42% da estratégia 1), o rendimento na etapa de captura (Proteína G) foi menor, sendo 2,3% para o eluato pH 6.0 e de 0,6% para o eluato pH 3,0 (Tabela 6). Semelhante ao observado na estratégia 1, não foram detectados fragmentos Fab na segunda etapa cromatográfica (resina S Sepharose).

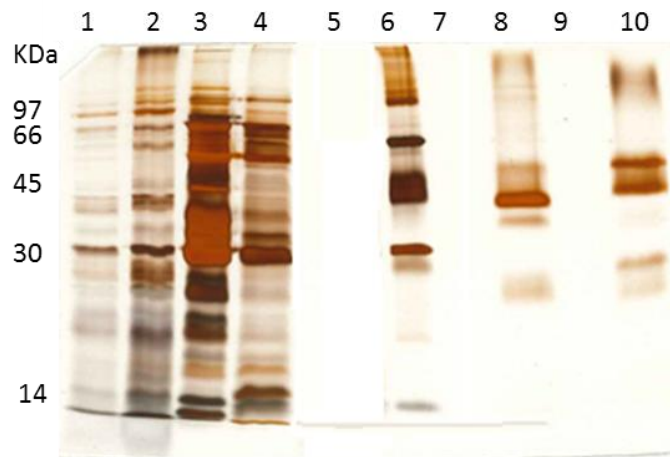
Tabela 6 — Rendimento obtido pela estratégia 2.

Identificação	Concentração µg/mL	Volume mL	Total µg	Recuperação (%)	
				Etapa	Geral
Sobrenadante Cultura	2,0	780	1591,2	100	100
Tratamento pré-coluna	3,6	310	1116,0	70	70
Proteína G - Eluato pH 6,0	16,9	2,20	37,2	3,3	2,3
Proteína G - Eluato pH 3,0	40,6	0,25	10,2	0,9	0,6
S Sepharose	0,0	0	0,0	0,0	0,0

Continuando a avaliação das diferentes estratégias de purificação, utilizou-se a resina S Sepharose em uma primeira etapa cromatográfica (estratégia 3). A metodologia aplicada foi similar a utilizada nas estratégias 1 e 2 (item 3.9.3.2.1), sendo modificada pela aplicação do sobrenadante da cultura tratado à resina de

troca catiônica. O SDS-PAGE a 12% (Figura 13) mostrou que as frações correspondentes aos eluatos (Figura 13 poços 3 e 4) apresentaram impurezas compreendendo toda a faixa de massa molecular analisada (14 a 97 kDa) e em maior quantidade quando comparada às estratégias 1 e 2. Para a verificação das estratégias abordadas, foram aplicados ao gel de SDS-PAGE o fragmento policlonal anti-digoxina comercial e também o fragmento Fab IgG de camundongo comercial (Figura 13 poços 8 e 10, respectivamente).

Figura 13 — SDS PAGE (12%) - Corado por prata. Estratégia 3 - Cromatografia de troca catiônica.



Poços 1 – sobrenadante da cultura Clone 2 tratado pré-coluna catiônica; 2 – fração não ligada; 3 – eluato fração 1 concentrado 5x; 4 – eluato fração 2 concentrado 4x; 5 – vazio; 6 - marcador de peso molecular; 7 – vazio; 8 – DigiFab[®] 0,6 µg; 9 – vazio; 10 – *ChromPure Mouse IgG Fab fragment* 0,6 µg.

Com os dados obtidos pelo balanço de massa e pela recuperação do fragmento Fab, verificamos que a estratégia 3 alcançou a taxa de recuperação total na etapa de tratamento pré-coluna (Tabela 7), o que pode sugerir que a utilização da solução de acetato de sódio 50 mM pH 5,0 seja a melhor condição para a diafiltração dos sobrenadantes. Entretanto, o baixo nível de pureza obtido pelo uso da resina de troca catiônica, nas condições avaliadas, em conjunto com a baixa recuperação dos fragmentos Fab, não justificaram a continuação desta estratégia.

Tabela 7 — Rendimento obtido pela estratégia 3.

Identificação	Concentração	Volume mL	Total µg	Recuperação (%)	
	µg/mL			Etapa	Geral
Sobrenadante Cultura	2,0	790	1611,6	100	100
Tratamento pré-coluna	5,9	280	1646,4	102*	102*
S Sepharose fração 1	155,3	1,00	155,3	9,4	10
S Sepharose fração 2	0,7	6,50	4,3	0,3	0

* Variações experimentais no ensaio de ELISA pode justificar a taxa calculada superior a 100%.

Das três estratégias avaliadas, a que apresentou melhor capacidade de purificação foi a estratégia 1, entretanto apresentou a menor taxa de recuperação dos fragmentos Fab durante o tratamento do sobrenadante da cultura. Outro dado obtido pela estratégia 1, foi a presença de um único componente de massa molecular correspondente ao fragmento Fab, o que sugere que o fragmento possa sofrer alteração estrutural durante a etapa de neutralização do eluato, visto que neste experimento não foi realizada a neutralização em virtude do passo seguinte de cromatografia (S Sepharose) necessitar de condições ligeiramente ácidas.

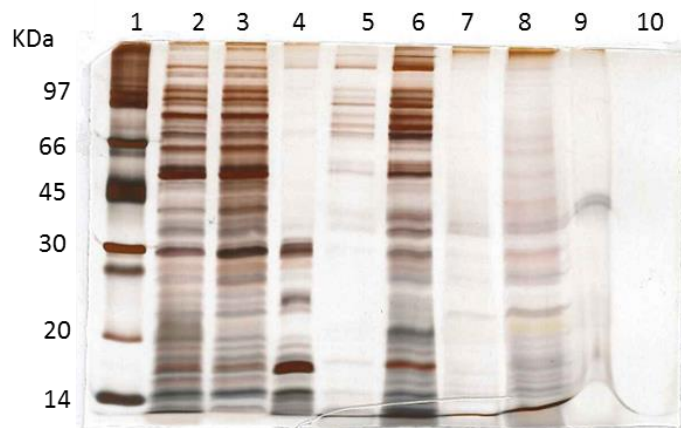
Com os resultados obtidos pela estratégia 1, testou-se o uso desta estratégia sem a etapa de tratamento da amostra, aplicando o sobrenadante do cultivo apenas clarificado (centrifugado e filtrado 0,45 µm) à resina de proteína G. Nesta abordagem os fragmentos Fab anti-digoxina não foram removidos da resina com passagem da solução de eluição (ácido acético 200 mM pH 3,0). A remoção dos fragmentos Fab adsorvidos à resina de proteína G, só seria possível com a passagem da solução de regeneração (ácido acético 1 M pH 2,5). Na tentativa de remoção do produto em uma condição menos agressiva do que o uso da solução de regeneração, foram realizados diversos ensaios com modificações na solução para eluição (adição de concentrações fixas e gradientes de NaCl, diminuição do pH), porém sem êxito.

Prosseguindo com os ensaios para purificação dos fragmentos Fab, utilizou-se a resina de troca aniônica (Q Sepharose FF) como primeiro passo cromatográfico (item 3.9.3.3). Nesta abordagem o material de interesse estaria na fração não ligada. Para tanto, o sobrenadante do cultivo bacteriano do clone 10 foi clarificado e adicionado Tween 20 a 0,05%. O pH e a condutividade da amostra inicial foram medidos, obtendo 7,34 e 7,7 mS/cm, respectivamente. Esse material foi aplicado à resina cromatográfica previamente equilibrada em solução de Tris 20 mM pH 7,0.

Pelo gel SDS-PAGE a 12%, verificou-se que apesar da existência de impurezas em todas as amostras provenientes da eluição e das etapas de regeneração (Figura 14, poços 4 a 9), não foi possível atestar a diminuição nos níveis de contaminantes da fração não ligada (Figura 14, poço 3), quando comparada à amostra inicial.

Pelo ensaio de ELISA método 1 foi possível constatar que não houve perda de fragmentos Fab durante este passo cromatográfico, com a obtenção da massa de 718 µg no sobrenadante da cultura e 720 µg na fração não ligada.

Figura 14 — SDS PAGE (12%) - Corado por prata. Cromatografia de troca aniônica.

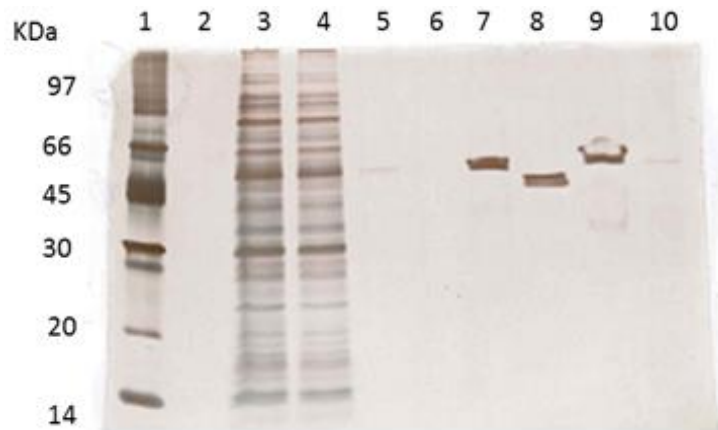


Poços 1 – marcador de peso molecular; 2 - sobrenadante da cultura Clone 10 pré-coluna aniônica (1:10); 3 – fração não ligada (1:10); 4 – eluato fração 1; 5 – eluato fração 2 (1:10); 6 – eluato fração 2; 7 – regeneração 1; 8 – regeneração 1 (1:10); 9 – regeneração 2; 10 – vazio.

A fração não ligada à resina Q Sepharose foi dividida em duas partes, contendo 200 mL cada, que foram purificadas em resina de proteína G com duas abordagens diferentes. A uma alíquota procedeu-se à purificação descrita no item 3.9.3.1.1, (equilíbrio e reequilíbrio da resina com Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0, eluição com acetato de sódio 200 mM pH 3,0 e para a regeneração ácido acético 1 M pH 2,5). Pela análise do gel de SDS-PAGE a 12%, observou-se que, semelhante ao verificado com os ensaios de cromatografia em proteína G, quando o material inicial não foi diafiltrado e concentrado, a solução usada para a eluição não foi capaz de remover os fragmentos Fab adsorvidos na coluna (Figura 15, poços 5 e 6). Também neste caso a eluição do fragmento Fab só foi possível com a utilização da solução de regeneração (Figura 15 poço 7). Na tentativa de confirmar se a etapa de neutralização do material purificado foi responsável por alterações estruturais ou

agregação dos fragmentos Fab, foram analisados em gel de SDS-PAGE a 12% os materiais pré e pós-neutralização (Figura 15, poços 7 a 9), os quais, apresentaram diferenças nos perfis eletroforéticos, comprovando que esta etapa foi responsável pelas modificações estruturais ou formação de agregados nos fragmentos Fab.

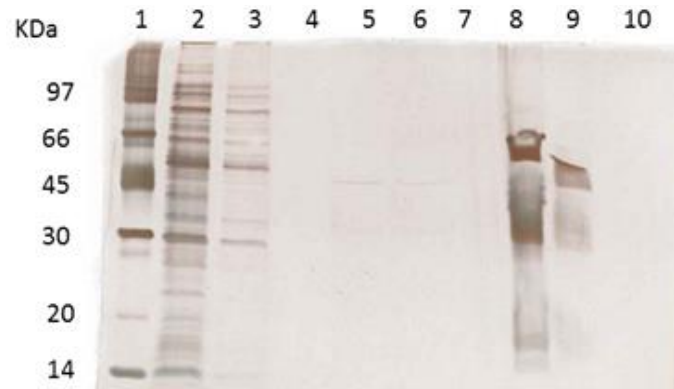
Figura 15 — SDS PAGE (12%) – Coloração por prata. Cromatografia em resina de afinidade como segunda etapa cromatográfica após troca aniônica–alíquota 1.



Poços 1 – marcador de peso molecular; 2 – vazio; 3 – fração não ligada da coluna de troca aniônica pré-coluna de proteína G (1:10); 4 – fração não ligada – Proteína G (1:10); 5 – eluato fração 1; 6 – eluato fração 2; 7 – regeneração fração 1 pré-neutralização; 8 – regeneração fração 1 neutralizada; 9 – regeneração fração 2 não neutralizada; 10 – enxágue.

A segunda alíquota foi processada de forma semelhante à primeira, com modificação apenas na solução de equilíbrio e reequilíbrio da resina sendo utilizada a solução de glicina 1,5 M, NaCl 3,0 M pH 9,0. Como visto na primeira alíquota a solução de eluição não foi capaz de remover os fragmentos Fab (Figura 16, poços 5 a 7), sendo retirados apenas pela solução de regeneração. O grau de pureza observado com esta abordagem mostrou-se inferior ao obtido pelo processo utilizado na primeira alíquota. Também foram verificadas diferenças entre os fragmentos Fab pré e pós-neutralização (Figura 16, poços 8 e 9, respectivamente).

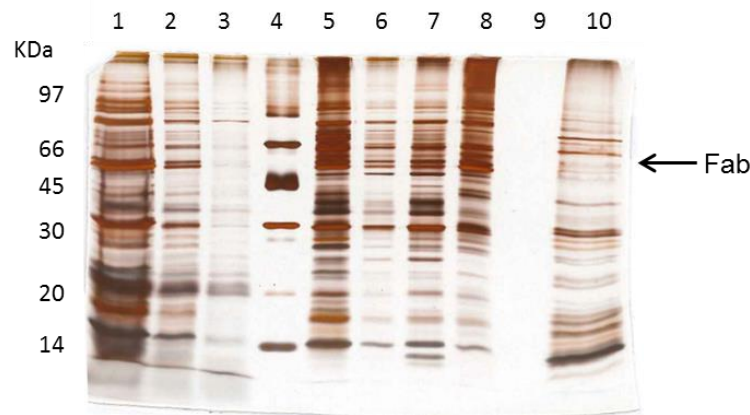
Figura 16 — SDS-PAGE (12%) Coloração por prata. Cromatografia em resina de afinidade como segunda etapa cromatográfica após troca aniônica—alíquota 2.



Poços 1 – marcador de peso molecular; 2 – fração não ligada da coluna de troca aniônica pré-coluna de proteína G (1:10); 3 – fração não ligada – Proteína G (1:10); 4 – vazio; 5 – eluato fração 1 pré-neutralização; 6 – eluato fração 1 neutralizado; 7 – eluato fração 2; 8 – regeneração pré-neutralização; 9 – regeneração pós-neutralização; 10 – enxágue.

Devido aos resultados cromatográficos obtidos, avaliou-se novamente o uso da resina de troca catiônica S Sepharose com a abordagem descrita no item 3.9.3.2.2, em uma etapa de captura. Para tanto, o sobrenadante da cultura do clone 2, contendo 190 mL, foi diluído em solução de acetato de sódio 15 mM pH 5,0 para o ajuste da condutividade e do pH. A amostra foi aplicada à resina S Sepharose FF previamente equilibrada com a solução de acetato de sódio 15 mM pH 5,0. A eluição foi realizada com a passagem sequencial das soluções de fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 (eluato 1) e da solução fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,5 M pH 7,0 (eluato 2). Neste passo cromatográfico inicial, não foi verificada melhoria no nível pureza nos eluatos utilizados (Figura 17, poços 5 a 10), porém, foi possível concentrar o material e também permitiu a aplicação dos eluatos na resina de proteína G sem a necessidade de tratamento prévio, visto que os materiais obtidos nos eluatos possuem condições próximas às iniciais do processo seguinte.

Figura 17 — SDS-PAGE (12%) Corado por prata. Cromatografia em resina de troca catiônica, primeira etapa cromatográfica.

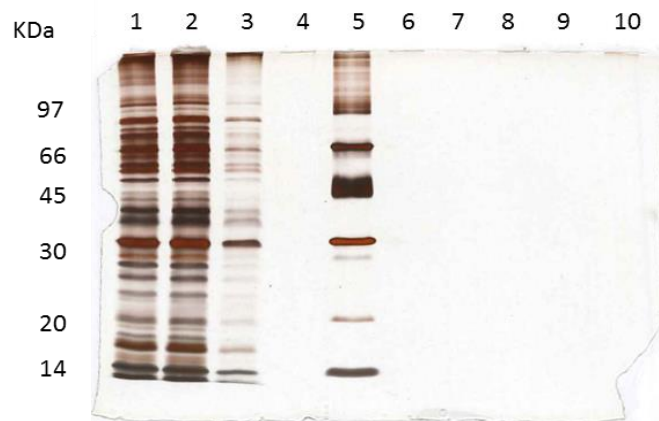


Poços: 1 – sobrenadante clone 2 pré-tratamento; 2 – sobrenadante clone 2 pós-tratamento; 3 - fração não ligada; 4 – marcador de peso molecular; 5 – eluato 1 fração 1; 6 – eluato 1 fração 2; 7 – eluato 1 fração 3; 8 – eluato 2 fração 1; 9 – vazio; 10 – eluato 2 fração 2.

Prosseguindo com o processo cromatográfico, foram realizadas duas purificações em resina de proteína G, sendo um processo para a mistura das frações do eluato 1 e um para a mistura das frações do eluato 2, obtidos na etapa de captura.

As frações 1 a 3 do eluato 1 obtido pela passagem da solução de fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 (eluição 1), na coluna S Sepharose, foram misturadas e aplicadas à resina de proteína G e realizada a cromatografia conforme descrito no item 3.9.3.1.3 (equilíbrio e reequilíbrio com solução de fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 e eluição com solução de glicina 100 mM pH 2,7). Na análise do gel de SDS-PAGE não foram visualizados fragmentos Fab na eluição e na regeneração (Figura 18, poços 6 e 8, respectivamente).

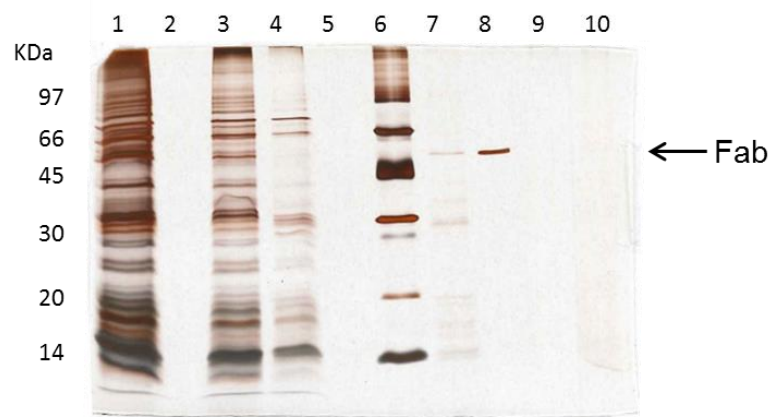
Figura 18 — SDS-PAGE (12%) Cromatografia de afinidade - segunda etapa cromatográfica – 1.



Poços: 1 – eluato 1 frações 1 a 3 obtidos na cromatografia inicial (S Sepharose) pré coluna de proteína G; 2 – fração não ligada; 3 – lavagem/reequilíbrio da resina; 4 – vazio; 5 – marcador de peso molecular; 6 – eluato; 7 – vazio; 8 – regeneração; 9 – vazio; 10 – enxágue.

A mistura das frações 1 e 2 do eluato 2 obtidas com a passagem da solução de fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,5 M pH 7,0 (eluição 2), na coluna S Sepharose foi processada em coluna de proteína G (item 3.9.3.1.3). Diferente ao observado na cromatografia das frações obtidas pelo eluato 1 da coluna S Sepharose, o fragmento Fab foi visualizado por SDS-PAGE, nos poços correspondentes à eluição, em duas frações distintas. Na primeira fração foram visualizados fracamente o material de interesse com a presença de impurezas (Figura 19, poço 7) e na segunda fração que correspondente ao segundo pico da eluição, foram obtidos os fragmentos Fab com o grau de pureza desejado (Figura 19, poço 8).

Figura 19 — SDS-PAGE (12%) Cromatografia de afinidade - segunda etapa cromatográfica – 2.



Poços: 1 – eluato 2 frações 1 e 2 obtidos na cromatografia inicial (S Sepharose) pré coluna de proteína G; 2 – vazio; 3 – fração não ligada; 4 – lavagem/reequilíbrio da resina; 5 – vazio; 6 – marcador de peso molecular; 7 – eluato fração 1; 8 – eluato fração 2; 9 – regeneração; 10 – enxágue.

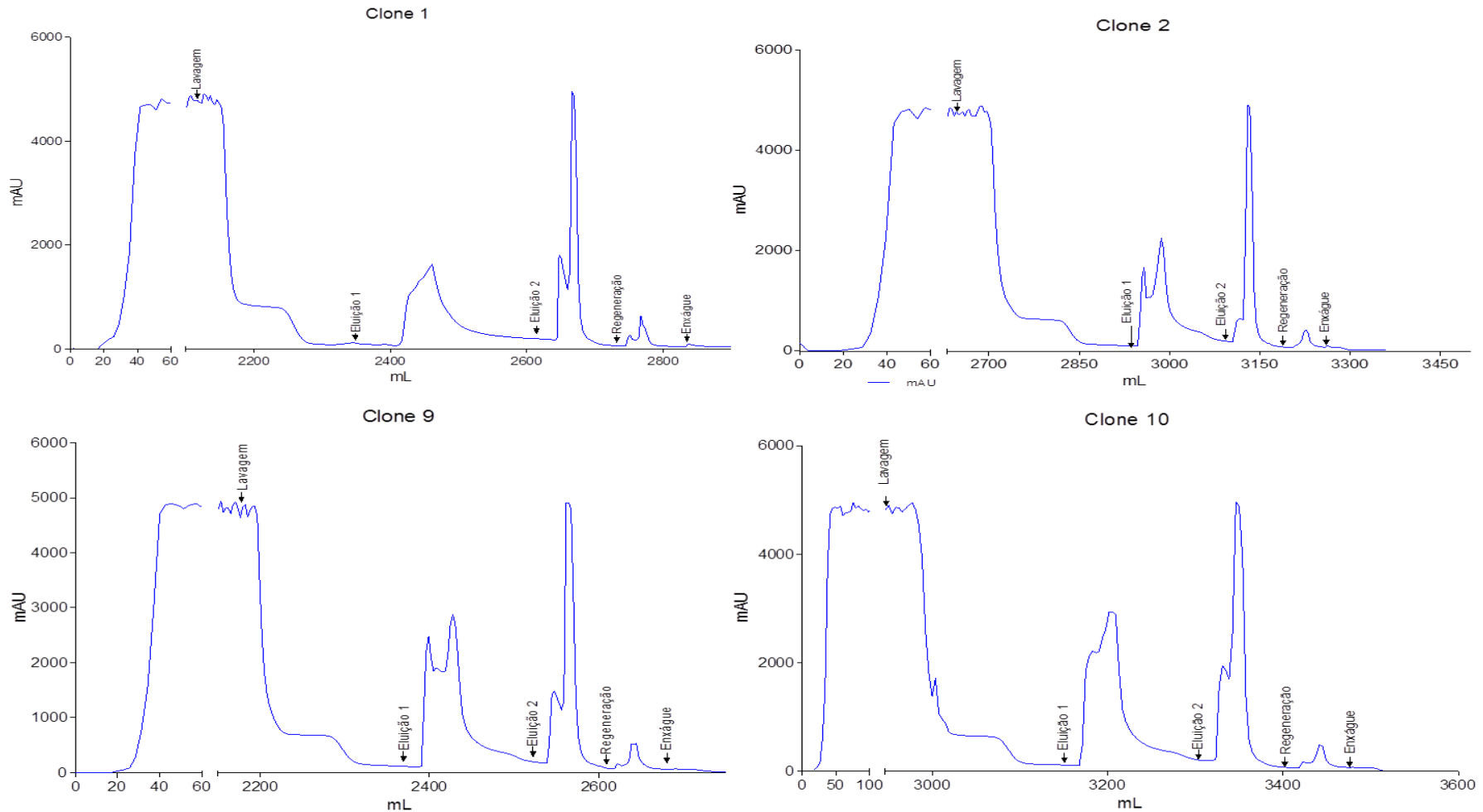
Com os resultados obtidos nessa estratégia (cromatografia em S Sepharose e cromatografia em proteína G), foi realizada a expressão dos fragmentos Fab dos 4 clones e a utilização desta metodologia para avaliar os padrões cromatográficos.

Na primeira etapa cromatográfica em resina de troca catiônica, observa-se a existência de picos cromatográficos tanto com a passagem da solução de fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 – eluição 1, quanto pela passagem da mesma solução contendo NaCl 1,5 M – eluição 2, em todos os sobrenadantes avaliados (Figura 20). Apesar da existência de picos cromatográficos nos dois eluatos obtidos na cromatografia de troca catiônica, os fragmentos Fab dos clones 1 e 10 foram removidos com a solução de eluição 1, enquanto que os dos clones 2 e 9 pela solução de eluição 2. Estas alterações observadas na eluição dos fragmentos Fab podem ter sido motivadas por diferenças na força de interação com a resina catiônica e/ou por possíveis variações entre os pontos isoelétricos dos produtos de cada clone.

Seguindo para a segunda etapa cromatográfica, as frações contendo os fragmentos Fab foram purificadas em resina de proteína G e os cromatogramas estão apresentados na Figura 21. Os eluatos estão ampliados para permitir a verificação dos picos cromatográficos e a fração contendo os fragmentos Fab, verificada em gel de poli(acrilamida) a 12%, encontra-se hachurada.

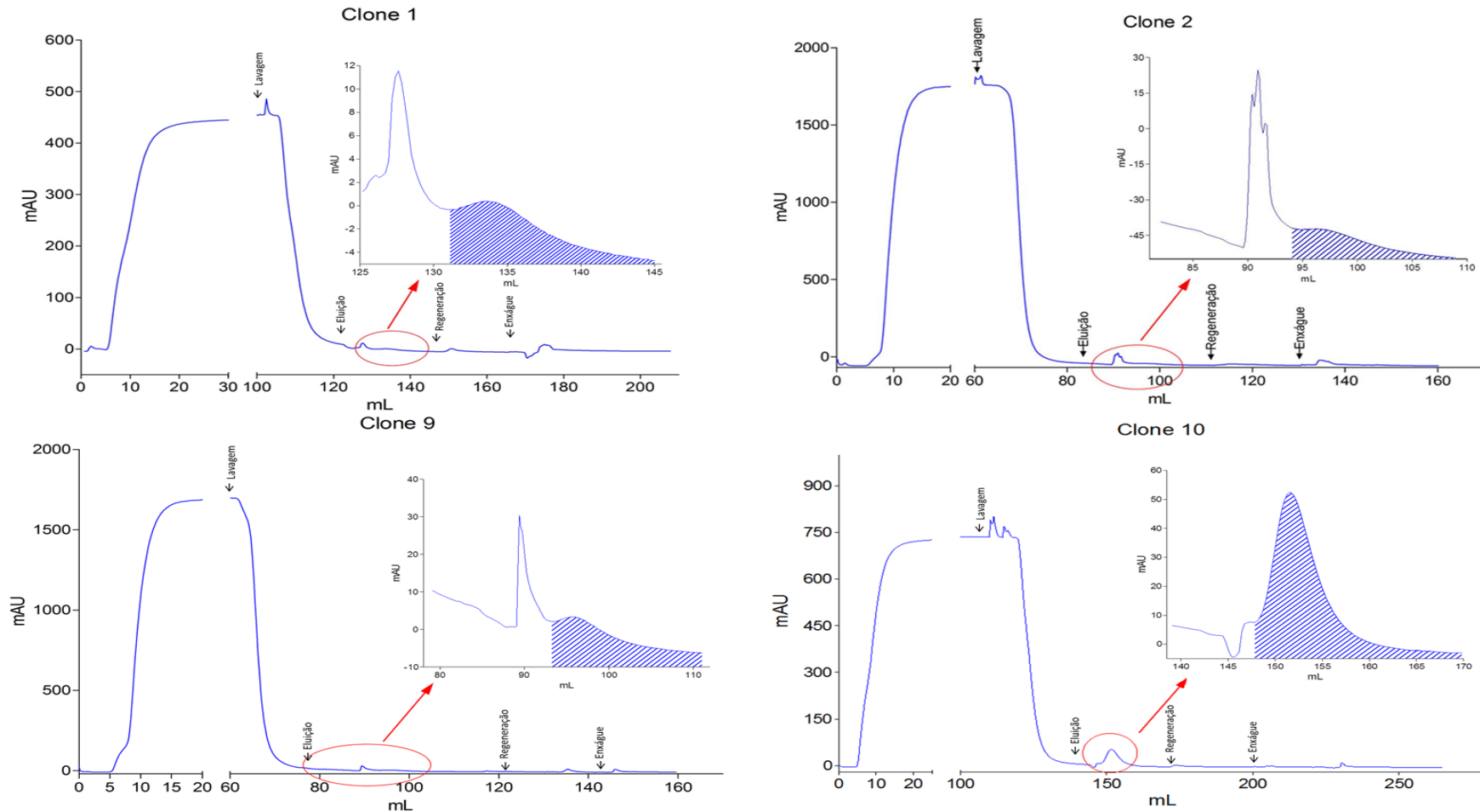
Com a quantificação dos fragmentos Fab dos 4 clones por ELISA, o balanço de massa foi realizado em função dos volumes e a taxa de recuperação calculada (Tabela 8). Os sobrenadantes dos clones 1, 2 e 10 apresentaram a mesma concentração de fragmentos Fab. O clone 9 apresentou a menor concentração de produto no sobrenadante da cultura. A utilização da resina S Sepharose apresentou diminuída taxa de recuperação do fragmento Fab para todos os clones, especialmente para os clones 1 e 2 obtendo-se 2% e 5%, respectivamente. A melhor taxa de recuperação total foi alcançada pelo fragmento Fab do clone 10 (25%), os produtos dos clones 2 e 9 apresentaram uma taxa de 2% e a menor taxa de recuperação total foi obtida pelo clone 1 (0,2%) (Tabela 8).

Figura 20 — Cromatogramas das purificações dos sobrenadantes dos 4 clones em coluna S Sepharose FF.



Sobrenadante diluído 4 vezes com acetato de sódio 15 mM pH 5,0 e correção do pH para 5,0 e aplicado à coluna S Sepharose FF. Equilíbrio, lavagem e enxágue: acetato de sódio 15 mM pH 5,0; Eluição 1: fosfato de sódio 20 mM pH 7,0; Eluição 2: fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,5 M pH 7,0; Regeneração: NaOH 0,1 M.

Figura 21 — Cromatogramas das purificações em resina de proteína G das frações contendo os fragmentos Fab provenientes da cromatografia em coluna S Sepharose.



As frações contendo os fragmentos Fab, provenientes da coluna S Sepharose foram aplicadas a coluna Proteína G FF. Equilíbrio, lavagem e enxágue: fosfato de sódio 20 mM pH 7,0; Eluição: glicina 100 mM pH 2,7; Regeneração: ácido acético 1 M. Em hachurado está representada a fração da eluição que contém os fragmentos purificados.

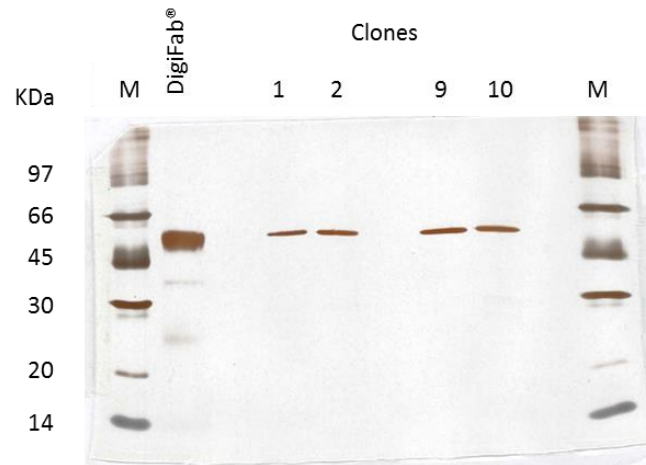
Tabela 8 — Balanço de massa dos fragmentos Fab dos 4 clones.

	Identificação	Concentração	Volume	Total	Recuperação (%)	
		$\mu\text{g/mL}$	mL	μg	Etapa	Geral
Clone 1	Sobrenadante Cultura	1,17	580	678,6	100	100
	Tratamento pré-coluna	0,29	2225	645,3	95	95
	S Sepharose pré-coluna Prot. G	0,13	105	13,3	2	2
	Proteína G	0,15	12	1,7	13	0,2
Clone 2	Sobrenadante Cultura	1,18	580	684,4	100	100
	Tratamento pré-coluna	0,25	2350	587,5	86	86
	S Sepharose pré-coluna Prot. G	0,38	71	27,0	5	4
	Proteína G	1,14	13	14,8	55	2
Clone 9	Sobrenadante Cultura	0,42	580	243,6	100	100
	Tratamento pré-coluna	0,10	2160	216,0	89	89
	S Sepharose pré-coluna Prot. G	0,53	59	31,5	15	13
	Proteína G	0,48	13	6,0	19	2
Clone 10	Sobrenadante Cultura	1,22	590	719,8	100	100
	Tratamento pré-coluna	0,25	2386	606,0	84	84
	S Sepharose pré-coluna Prot. G	1,69	137	231,5	38	32
	Proteína G	12,97	14	181,6	78	25

Após a verificação das características de purificação para cada clone, os mesmos foram expressos e purificados para a obtenção de massa para a realização dos ensaios de caracterização. As frações correspondentes aos fragmentos Fab de cada clone foram misturadas e o nível de pureza avaliado por SDS-PAGE a 12%, onde, foram aplicados 0,6 μg de proteína total de cada amostra no gel (Figura 22). Os fragmentos Fab dos 4 clones exibiram elevado grau de pureza, não sendo verificadas diferenças entre os clones, apresentando-se como um componente de massa molecular único com cerca de 50 kDa.

Com a obtenção dos fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones com a quantidade de massa e o grau de pureza desejados, deu-se início aos ensaios de caracterização.

Figura 22 — SDS PAGE (12%). Pureza dos fragmentos Fab anti-digoxina.



M: marcador de peso molecular

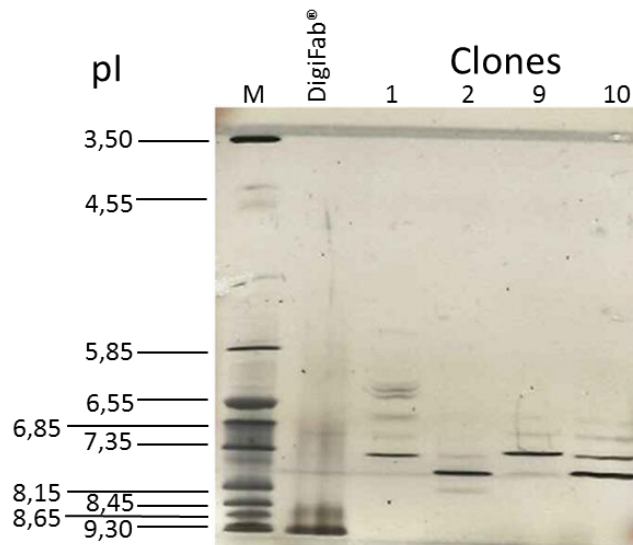
4.6 Caracterização dos fragmentos Fab anti-digoxina

4.6.1 Determinação do ponto isoelétrico dos fragmentos Fab anti-digoxina

O pI dos fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones e também do DigiFab[®] foi verificado pelo ensaio de focalização isoelétrica (IEF) no equipamento Phast System[™] (Figura 23). Pela análise do gel verificou-se um pI alcalino para o DigiFab[®] com 2 isoformas evidentes, uma de pI 8,65 e outra de pI 9,30. Os fragmentos Fab dos clones 2 e 10 apresentaram perfis isoelétricos mais alcalinos, enquanto que os obtidos pelos clones 1 e 9 foram mais ácidos.

Os fragmentos Fab dos clones 2, 9 e 10 compreendem a faixa de pI entre 6,85 a 8,1, e o clone 1 a faixa de 5,85 a 7,35. Nota-se também diferenças nas quantidades de isoformas, com a existência de 5 para os fragmentos Fab do clone 1, 4 para os clones 9 e 10 e a presença de 3 isoformas para o clone 2.

Figura 23 — Focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida pH 3 a 10. Corado por prata.



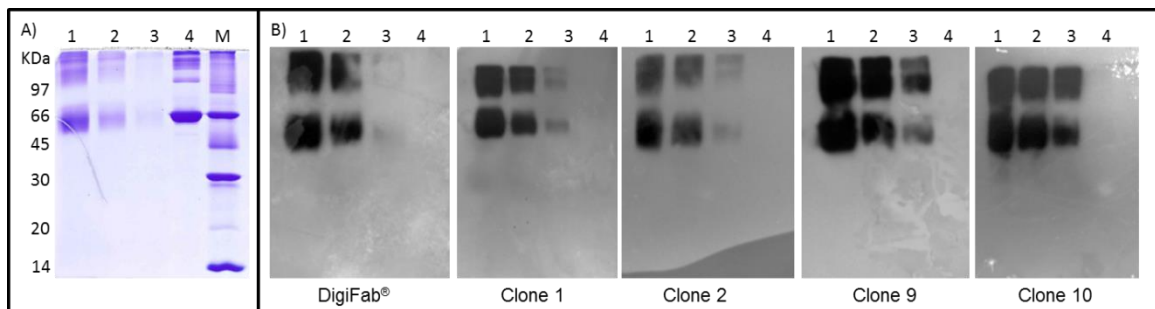
M – Marcador de ponto isoelétrico.

4.6.2 Caracterização da afinidade e especificidade do fragmento Fab anti-digoxina

A concentração dos fragmentos Fab dos 4 clones utilizada nos ensaios de caracterização foi determinada pelo ensaio de ressonância plasmônica de superfície (SPR) realizado no equipamento Biacore T200 (item 3.10.3).

Para avaliar a ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina purificados dos 4 clones e o DigiFab[®] com o conjugado Dig-BSA foi realizado o ensaio de *Western blotting*. Para tanto, a Dig-BSA foi aplicada em géis de SDS-PAGE a 12% nas concentrações de 0,250; 0,125 e 0,063 mg/mL, além de BSA na concentração de 0,250 mg/mL como controle negativo. Após a corrida eletroforética, os géis foram transferidos para membranas de PVDF. O resultado, apresentado na Figura 24, mostra, conforme esperado, que os fragmentos Fab anti-digoxina purificados dos 4 clones e o DigiFab[®] reconhecem especificamente a porção digoxina do conjugado, uma vez que não houve ligação com a BSA presente no composto Dig-BSA.

Figura 24 — Avaliação da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina à Dig-BSA e BSA.

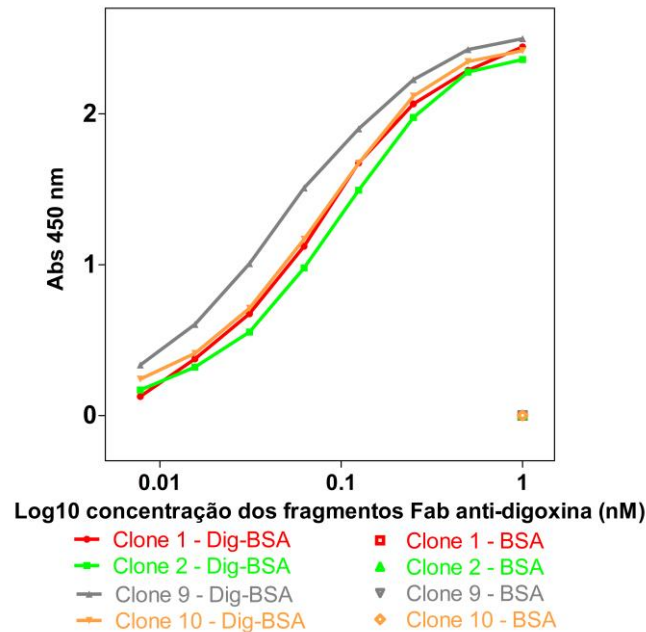


A) Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado por Coomassie. B) Western blotting. As membranas foram incubadas com os fragmentos Fab anti-digoxina dos clones e DigiFab[®] (0,25 µg/mL), seguida pela incubação da membrana com o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')₂ conjugado com peroxidase para os fragmentos Fab dos 4 clones e com o anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase para o DigiFab[®]. A detecção foi realizada com ECL. Poços M - marcador de baixo peso molecular; 1- Dig-BSA 0,250 mg/mL; 2- Dig-BSA 0,125 mg/mL; 3- Dig-BSA 0,063 mg/mL; 4- BSA 0,250 mg/mL.

O perfil de ligação dos fragmentos Fab anti-digoxina à Dig-BSA e BSA foi analisado por ELISA método 2 (Figura 25). Verificou-se a ligação específica entre os fragmentos Fab dos clones à Dig-BSA, não havendo ligação com a BSA, confirmando o resultado do *Western blotting*. O fragmento Fab obtido pelo clone 9 apresentou as maiores medidas de absorvância a 450 nm, enquanto que o do clone 2, as menores. Os produtos dos clones 1 e 10 tiveram perfis de ligação ao conjugado Dig-BSA semelhantes.

Para avaliar a especificidade de ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina purificados dos 4 clones e o DigiFab[®] com a digoxina e os análogos digitoxina, digoxigenina e ouabaína, foi realizado o ensaio de ELISA de inibição (método 3). O ensaio foi realizado nas mesmas condições para os fragmentos Fab avaliados para permitir a comparação da especificidade de ligação à digoxina e aos análogos avaliados, com modificação apenas no anticorpo conjugado com peroxidase utilizado para o DigiFab[®], em virtude de sua origem ser ovina enquanto que os fragmentos Fab dos 4 clones são de origem murina.

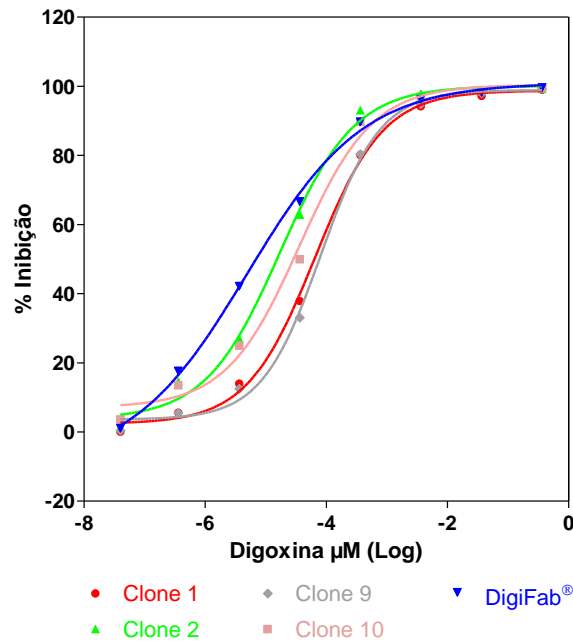
Figura 25 — ELISA método 2 para avaliar o perfil de ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina à Dig-BSA e BSA.



Sensibilização da placa com Dig-BSA ou BSA a 4 µg/mL. Os fragmentos Fab foram aplicados na concentração inicial de 1 nM e diluídos serialmente na razão 1:2. Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')₂ conjugado com peroxidase.

Com a utilização da digoxina como inibidor entre a ligação dos fragmentos Fab e o conjugado Dig-BSA sensibilizado à placa, foi verificada a formação de complexos dos fragmentos Fab e DigiFab[®] com cada inibidor, demonstrando a especificidade de ligação à digoxina livre. Na Figura 26 é apresentada a porcentagem de inibição da ligação dos Fabs anti-digoxina e o produto comercial ao conjugado Dig-BSA. A digoxina foi capaz de inibir a ligação entre o DigiFab[®] e à Dig-BSA com as menores concentrações. Entre os 4 clones, as menores concentrações de digoxina que possibilitaram a inibição foram obtidas pelo fragmento Fab do clone 2.

Figura 26 — ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e a Dig-BSA pela digoxina.



Sensibilização da placa com Dig-BSA a $4 \mu\text{g/mL}$. Os fragmentos Fab e o DigiFab[®] foram diluídos para 1 nM em duplicata e misturados a digoxina diluída de modo seriado na razão 10, com concentração inicial de $0,36 \mu\text{M}$. Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')_2 conjugado com peroxidase para os fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones e para o DigiFab[®] foi utilizado o anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase.

A concentração necessária de digoxina para inibir em 50% a ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e a Dig-BSA (IC_{50}) foi calculada, com o uso do programa GraphPad Prism. O DigiFab[®] apresentou o menor valor de IC_{50} $4,9 \times 10^{-6}$, enquanto que os fragmentos Fab do clone 9 apresentaram o maior valor ($8,1 \times 10^{-5}$) (Figura 27). No ensaio ANOVA não foram verificadas diferenças estatísticas entre os fragmentos Fab dos clones 2 e 10 ao produto comercial, os fragmentos Fab dos clones 1 e 9 apresentaram diferenças significativas ao DigiFab[®].

Para a verificação da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina aos análogos da digoxina, utilizou-se como inibidor a digoxigenina, que difere estruturalmente da digoxina pela ausência da porção glicona. Como observado para a digoxina a digoxigenina também foi capaz de inibir a ligação dos fragmentos Fab à Dig-BSA (Figura 28). Verificou-se também que a inibição da ligação entre o DigiFab[®] e a Dig-BSA foi obtida com as menores concentrações de digoxigenina. Entre os fragmentos Fab dos clones, as menores concentrações de digoxigenina que

possibilitaram a inibição foram obtidas pelos fragmentos Fab do clone 2, repetindo o comportamento observado para a digoxina.

Figura 27 — IC_{50} obtida pelo uso da digoxina como inibidor.

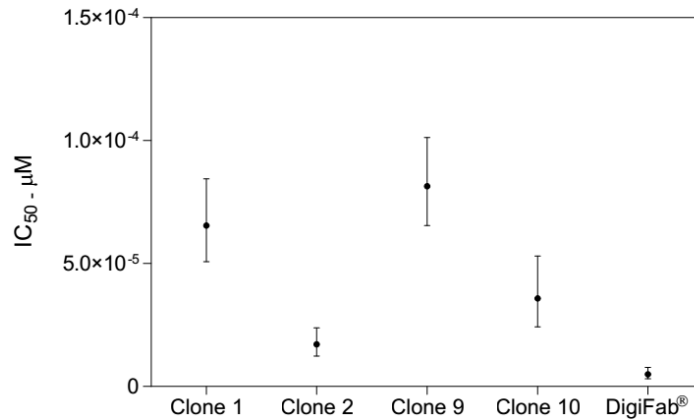
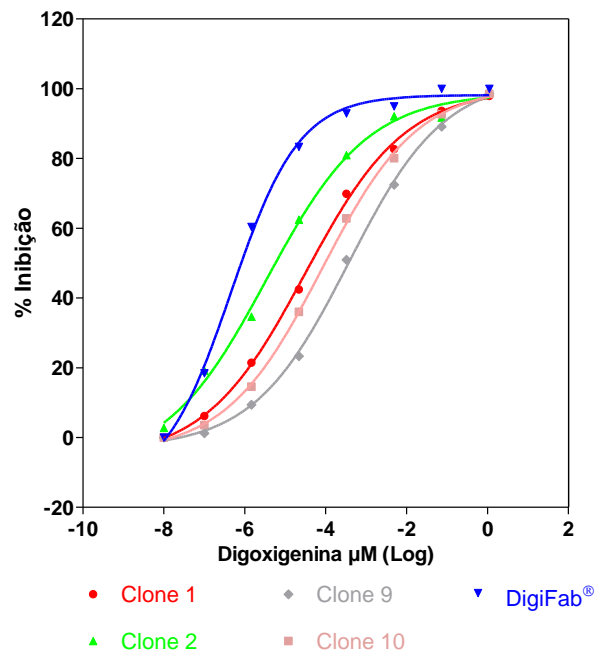


Figura 28 — ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e a Dig-BSA pela digoxigenina.

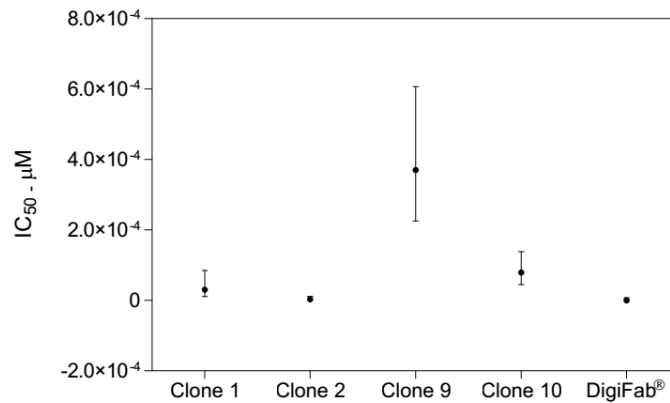


Sensibilização da placa com Dig-BSA a 4 $\mu g/mL$. Os fragmentos Fab e o DigiFab[®] foram diluídos para 1 nM em duplicata e misturados a digoxigenina diluída de modo seriado na razão 15, com concentração inicial de 1,10 μM . Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')₂ conjugado com peroxidase para os fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones e para o DigiFab[®] foi utilizado o anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase.

Com a obtenção do IC_{50} da digoxigenina, pode-se verificar que o fragmento Fab comercial apresentou o menor valor de IC_{50} ($4,6 \times 10^{-7}$) e o fragmento Fab do

clone 9 o maior valor ($3,7 \times 10^{-4}$) (Figura 29). Não foram verificadas diferenças significativas entre os fragmentos Fab dos 4 clones e o DigiFab[®], pelo ensaio ANOVA.

Figura 29 — IC₅₀ obtida pelo uso da digoxigenina como inibidor.



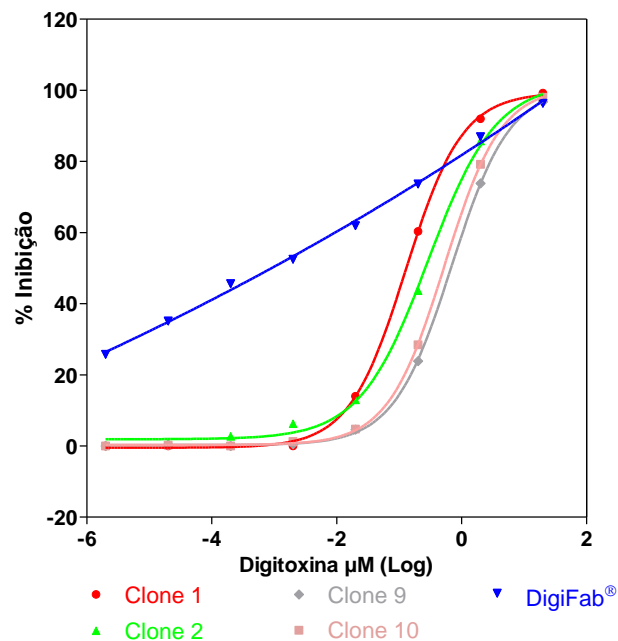
Continuando os ensaios de inibição utilizou-se a digitoxina como inibidor, que se diferencia da digoxina pela ausência de um grupo hidroxila na porção aglicona da molécula. Nas condições ensaiadas, não foi obtido o platô inferior correspondente a 0% de inibição para o DigiFab[®] (Figura 30), contudo o perfil apresentado na curva, sugere que menores concentrações de inibidor seriam capazes de interferir na ligação entre o DigiFab[®] e o conjugado Dig-BSA. Neste ensaio também se verificou que os fragmentos Fab do clone 1 necessitaram de menores concentrações de digitoxina para inibir a ligação ao conjugado Dig-BSA. Os resultados obtidos com os fragmentos Fab dos clones 9 e 10 foram semelhantes, mostrando que maiores concentrações de digitoxina são necessárias para impedir a ligação.

Com a ausência de uma curva de inibição compreendendo a faixa de 0 a 100% de inibição para o DigiFab[®], não foi possível realizar o cálculo do IC₅₀ e a análise estatística ANOVA para este material. Dos fragmentos Fab dos clones o menor valor de IC₅₀ foi obtido pelo clone 1, seguido pelos clones 2, 10 e 9 (Figura 31). Pelo ensaio ANOVA verificou-se diferença significativa entre os 4 clones.

Finalizando os ensaios de inibição, a ouabaína foi utilizada como inibidor, esta se diferencia da digoxina por possuir estruturalmente apenas um açúcar frente a três existentes na digoxina e também pela mudança na posição de um grupo hidroxila. Os resultados obtidos pelo DigiFab[®], devem ser avaliados com cautela visto que,

não foi obtida a curva compreendendo 0 e 100% de inibição, porém os resultados obtidos indicam que menores concentrações de ouabaína seriam capazes de inibir a ligação à Dig-BSA. Os perfis de inibição encontrados foram semelhantes para os fragmentos Fab dos clones 1, 2, e 10. O clone 9 precisou de maiores concentrações de ouabaína para inibir a ligação com o material sensibilizado (Figura 32). Em virtude da falta de uma curva completa de inibição não foi possível fazer a análise ANOVA para o DigiFab[®]. Os fragmentos Fab dos clones 1, 2 e 10 não apresentaram diferenças significativas entre si, porém o fragmento Fab do clone 9 apresentou diferença significativa aos fragmentos Fab dos clones 1, 2 e 10.

Figura 30 — ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e a Dig-BSA pela digitoxina.



Sensibilização da placa com Dig-BSA a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os fragmentos Fab e o DigiFab[®] foram diluídos para 1 nM em duplicata e misturados a digitoxina diluída de modo seriado na razão 10, com concentração inicial de 20 μM . Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento $\text{F}(\text{ab}')_2$ conjugado com peroxidase para os fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones e para o DigiFab[®] foi utilizado o anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase.

Figura 31 — IC_{50} obtida pelo uso da digitoxina como inibidor.

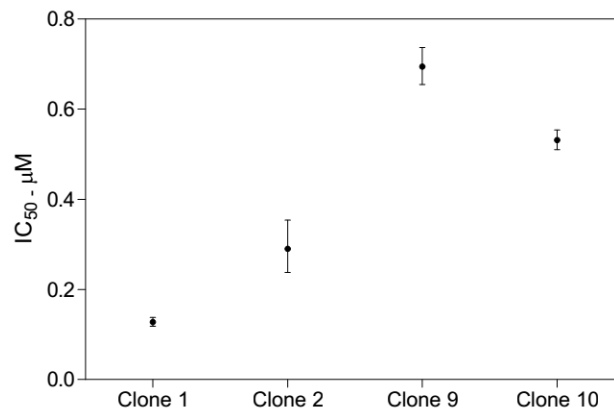
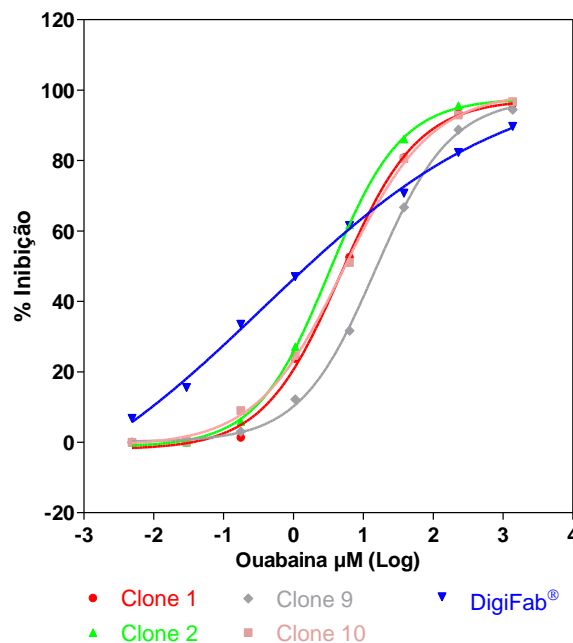


Figura 32 — ELISA de inibição da ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e a Dig-BSA pela ouabaína.



Sensibilização da placa com Dig-BSA a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os fragmentos Fab e o DigiFab[®] foram diluídos para 1 nM em duplicata e misturados a ouabaína diluída de modo seriado na razão 6, com concentração inicial de 1370 μM . Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento $F(ab')_2$ conjugado com peroxidase para os fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones e para o DigiFab[®] foi utilizado o anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase.

Pelo cálculo da IC_{50} para a ouabaína verifica-se uma tendência do DigiFab[®] em necessitar de uma menor quantidade de inibidor para impedir a ligação com à Dig-BSA, a medida que possui o menor valor de IC_{50} , porém com elevado intervalo de confiança. Os valores de IC_{50} foram semelhantes entre os fragmentos Fab dos

clones 1, 2, e 10. Os fragmentos Fab do clone 9 apresentou o maior valor de IC_{50} (Figura 33).

Na Tabela 9 estão apresentados os valores de IC_{50} obtidos nos ensaios de inibição com a digoxina e análogos avaliados. Entre os 4 clones de fragmentos Fab, o clone 9 apresentou os maiores valores de IC_{50} em todos os ensaios realizados, o clone 2 exibiu os menores valores de IC_{50} para a digoxina, digoxigenina e ouabaina, porém para a digitoxina a menor IC_{50} foi obtida pelo clone 1.

Figura 33 — IC_{50} obtida pelo uso da ouabaína como inibidor.

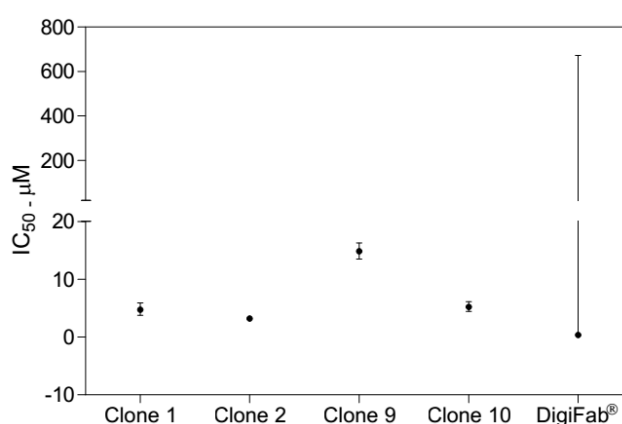


Tabela 9 — Valores de IC_{50} .

	IC_{50} μM			
	Digoxina	Digoxigenina	Digitoxina	Ouabaína
Clone 1	$6,5 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^{-5}$	0,13	4,7
Clone 2	$1,7 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-6}$	0,29	3,2
Clone 9	$8,1 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-4}$	0,69	14,8
Clone 10	$3,6 \times 10^{-5}$	$7,9 \times 10^{-5}$	0,53	5,2
DigiFab®	$4,9 \times 10^{-6}$	$4,6 \times 10^{-7}$	NC	0,4

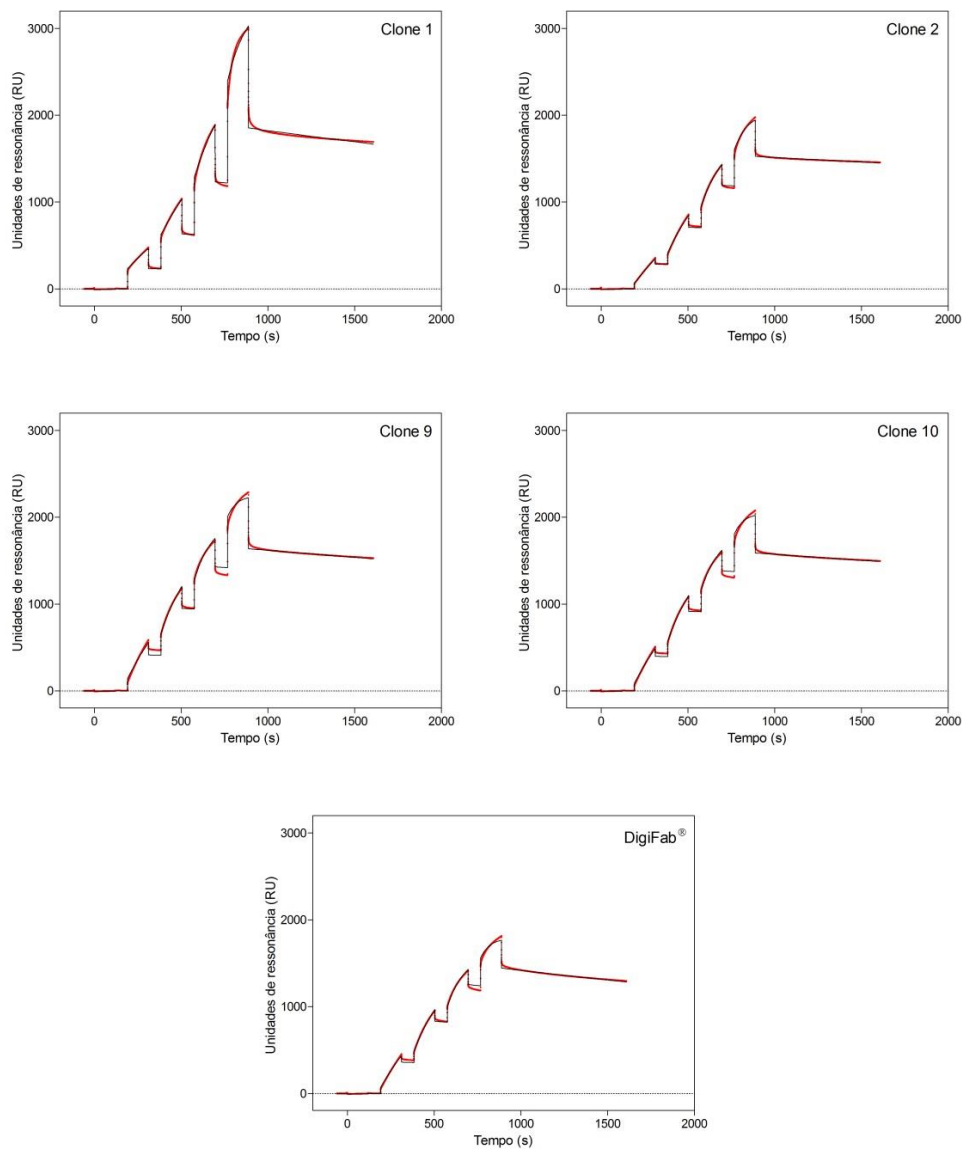
NC – Não calculado

4.6.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de ligação

Os parâmetros cinéticos da ligação entre os fragmentos Fab dos 4 clones e DigiFab® (analitos) com o conjugado Dig-BSA (ligante) foram avaliados por SPR no equipamento Biacore T200. A metodologia utilizada foi a de titulação cinética, onde o conjugado Dig-BSA imobilizado no sensor recebeu a aplicação sequencial de concentrações crescentes dos analitos.

Para a realização da titulação cinética foram obtidos os sensorgramas e o ajuste da curva conforme o modelo de Langmuir (1:1 - ligação de uma molécula do analito com uma do ligante). Na Figura 34 estão apresentadas as curvas observadas e calculadas para os fragmentos Fab, demonstrando, em todos os ensaios, que o ajuste (curva calculada) está adequado, o que significa que os dados cinéticos obtidos são coerentes.

Figura 34 — Sensorgramas das titulações cinéticas.

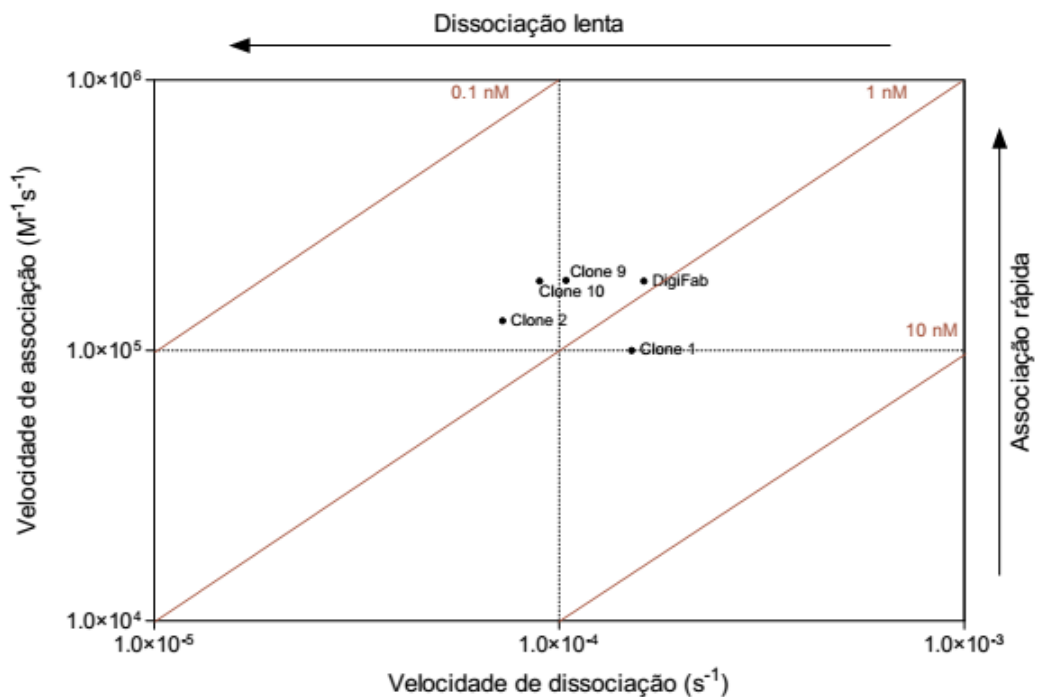


Titulação cinética, a 37° C, fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, contato de 120s e dissociação por 720s. Amostras diluídas a 0; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em solução HBS-EP. Regeneração com um pulso de 20 μL da solução de SDS 0,5%, glicina 100 mM pH 2,0. Linha vermelha RU observada, linha preta RU calculada.

As velocidades de associação representadas pela constante de associação (k_a), que corresponde ao tempo para a formação do complexo analito-ligante, foram determinadas. Os fragmentos Fab dos clones 9, 10 e o DigiFab[®], apresentaram as mais altas k_a , enquanto que o clone 1 mostrou o menor valor de k_a (Figura 35, Tabela 10).

Com a determinação das velocidades de dissociação representadas pela constante de dissociação (k_d), que demonstram a estabilidade do complexo formado. Verificou-se que a menor k_d foi obtida pelos fragmentos Fab do clone 2, e a maior pelo DigiFab[®] (Figura 35, Tabela 10).

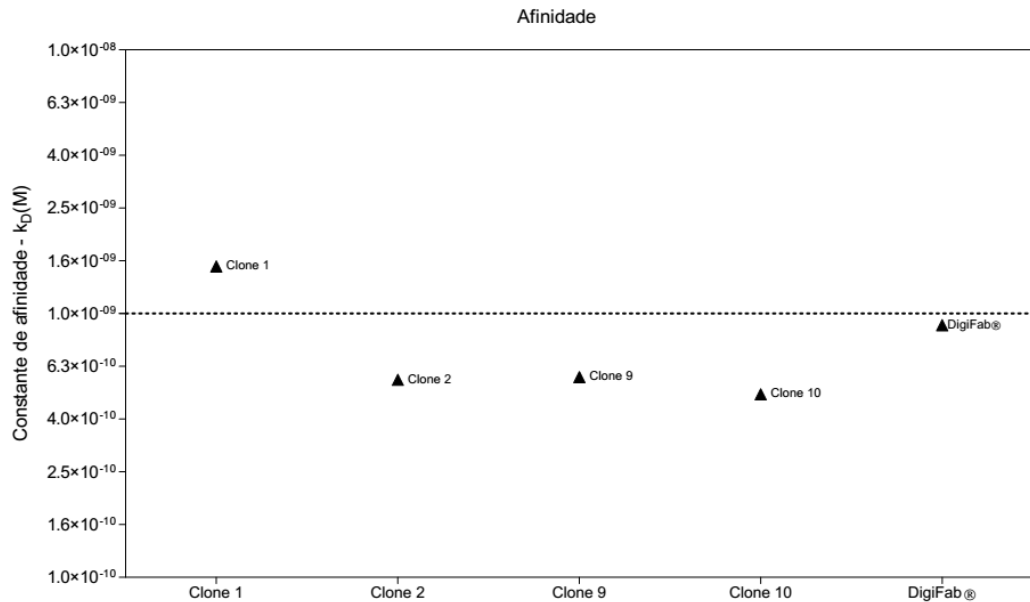
Figura 35 — Velocidade de associação x velocidade de dissociação



Com a obtenção dos parâmetros cinéticos, foi possível calcular as constantes de afinidade - k_D (relação entre as velocidades de associação e dissociação dos materiais analisados).

Os fragmentos Fab dos 4 clones e o DigiFab[®] apresentaram k_D similares, com variação entre $1,5 \times 10^{-9}$ M (Clone 1) a $4,9 \times 10^{-10}$ M (clone 10) (Figura 36, Tabela 10).

Figura 36 — Afinidade entre os fragmentos Fab dos 4 clones e DigiFab® com o conjugado Dig-BSA.



No ensaio estatístico ANOVA não foram observadas diferenças significativas entre as amostras analisadas.

Tabela 10 — Parâmetros cinéticos obtidos por SPR

	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (M)
Clone 1	$1,00 \times 10^5$	$1,51 \times 10^{-4}$	$1,51 \times 10^{-9}$
Clone 2	$1,29 \times 10^5$	$7,25 \times 10^{-5}$	$5,61 \times 10^{-10}$
Clone 9	$1,82 \times 10^5$	$1,04 \times 10^{-4}$	$5,74 \times 10^{-10}$
Clone 10	$1,81 \times 10^5$	$8,95 \times 10^{-5}$	$4,94 \times 10^{-10}$
DigiFab®	$1,81 \times 10^5$	$1,62 \times 10^{-4}$	$9,04 \times 10^{-10}$

5 DISCUSSÃO

Linhagens bacterianas Gram negativas como a *E. coli* possuem em sua estrutura uma membrana interna e outra externa, dividindo o organismo em 2 compartimentos: o citoplasma e o periplasma. Proteínas recombinantes, após expressão no citoplasma bacteriano, podem ser direcionadas para qualquer um destes compartimentos ou serem liberadas para o sobrenadante da cultura (CHOI et al., 2006). A presença dos peptídeos sinais *ompA* e *pelB* no vetor fagomídeo pComb3XTT, direcionam respectivamente a cadeia leve e a porção V_H e C_H1 da cadeia pesada do fragmento Fab anti-digoxina para o espaço periplasmático. No periplasma os peptídeos sinais são clivados por peptidases sinal (CHOI; LEE, 2004).

As vantagens obtidas no transporte das cadeias polipeptídicas para o periplasma em relação ao citoplasma são: ser um local com menor atividade proteolítica; simplificar a purificação da proteína recombinante, por conter apenas 4% do total de proteína celular; facilitar a correta formação de pontes dissulfeto, por ser um ambiente mais oxidativo e possuir proteínas da família da tioredoxina (DsbA, DsbB e DsbC) que catalisam a formação de pontes dissulfeto, de fundamental importância para as formações das 4 pontes intra-cadeia e uma intercadeia necessárias para a integridade estrutural e funcional requeridas pela molécula de Fab (LU; HOLMGREN, 2014; SCHUMANN; FERREIRA, 2004; WHITE, 2007).

A expressão do fragmento Fab solúvel foi verificada no sobrenadante do cultivo, no espaço periplasmático e no lisado bacteriano total, pelo ensaio de *Western blotting*, onde se detectou a existência de dois componentes, um correspondente ao fragmento Fab anti-digoxina com massa de 50 kDa e outro com 25 kDa (Figura 6). A existência de material com peso molecular de 25 kDa pode indicar uma dissociação dos fragmentos Fab, visto que a cadeia leve (V_L, C_L) e a V_H, C_H1 da cadeia pesada, possuem 25 kDa. Outra hipótese deve-se à expressão das cadeias serem realizadas de forma isolada e não terem sido unidas pela ponte de dissulfeto.

A maior concentração de fragmentos Fab foi verificada no sobrenadante da cultura (Tabela 3), possivelmente pelo fato das proteínas de baixo peso molecular presentes no periplasma bacteriano serem liberadas para o meio extracelular,

devido ao aumento da permeabilidade da membrana externa em longos períodos de incubação (CHOI; LEE, 2003). A obtenção da proteína de interesse no sobrenadante do cultivo ou no espaço periplasmático possibilita maior facilidade no processamento *downstream* e a redução no custo do processo quando comparado com a produção da proteína no citoplasma celular (YOON et al., 2010), além de não necessitar de processo de desnaturação e renaturação.

Estão disponíveis poucas metodologias para a purificação de fragmentos Fab, dentre elas a utilização de resinas de afinidade e resinas de troca iônica - catiônica e aniônica. Além de poucas alternativas, ainda não foi desenvolvido um método aplicável de forma genérica a diferentes fragmentos de anticorpos com elevada pureza e rendimento (RODRIGO; GRUVEGÅRD; ALSTINE, 2015), fazendo-se necessária a avaliação de diferentes estratégias para o isolamento deste material.

Para a purificação dos fragmentos Fab anti-digoxina foram testadas as resinas de afinidade Cpto™ L, proteína G Sepharose 4 FF e as resinas de troca iônica Q Sepharose FF e S Sepharose FF. A utilização da resina Cpto™ L que possui afinidade pelo tipo *kappa* da cadeia leve, subtipos humanos 1, 3, 4 e subtipo murino 1, não foi eficaz para a purificação dos fragmentos Fab anti-digoxina na condição avaliada, sugerindo que o fragmento Fab não seja do subtipo *kappa* 1. A resina proteína G, que possui alta taxa de afinidade à porção Fc do anticorpo e afinidade fraca pela região constante da cadeia pesada (C_H1) apresentou capacidade de purificação. No entanto, houve variação na pureza dos fragmentos Fab de cada clone (Figura 9). A diferença na pureza entre os clones obtidos pela purificação em resina de proteína G pode ter sido ocasionada pela suscetibilidade de agregação dos clones quando expostos a diferentes condições de estresse. Esta hipótese é baseada na ausência desta diferença quando os fragmentos Fab foram aplicados na forma reduzida ao gel de eletroforese (Figura 9b). Em geral os anticorpos e os fragmentos de anticorpos tendem a agregar quando estão em alta concentração, ciclos de congelamento e descongelamento, agitação, baixo pH, elevadas temperaturas e por longos períodos de armazenamento (CHOI, et al., 2006; PERCHIACCA, TESSIER, 2012). Fragmentos de anticorpos contendo agregados exibem imunogenicidade e toxicidade aumentadas e alterações nas propriedades terapêuticas e farmacocinéticas (GIL; SCHRUM, 2013), portanto devem ser eliminadas do material final.

Com a finalidade de se obter maior quantidade de fragmentos Fab e avaliar o nível de pureza a ser obtido pela purificação dos fragmentos Fab presentes no periplasma, foi realizada a lise da membrana externa por choque osmótico seguida pela purificação em coluna de proteína G. Foi observado que o nível de pureza obtido pelos produtos provenientes da lise do periplasma foi inferior ao obtido com a purificação do sobrenadante da cultura (Figura 10).

Com a disponibilidade, nesta etapa do trabalho, de uso do fragmento Fab comercial - DigiFab[®] como referência para os ensaios de caracterização dos fragmentos Fab, a comparação só seria possível com o mesmo nível de pureza para todos os produtos.

Visando a melhoria no grau de pureza dos fragmentos monoclonais avaliou-se a adição de uma etapa cromatográfica em resina S Sepharose, posterior à etapa de captura em resina de proteína G em dois ensaios com abordagens distintas. Entretanto, os resultados não foram satisfatórios (Figuras 11 e 12).

O uso da resina Q Sepharose FF foi avaliado, com a aplicação do sobrenadante da cultura à coluna cromatográfica. Nesta abordagem, moléculas com pH ácido como endotoxinas e DNA presentes no sobrenadante se ligariam à resina, enquanto que os fragmentos Fab seriam coletados na fração não ligada (SPITALI, 2009). Além da existência de contaminantes em todas as frações analisadas, não foi observada melhoria neste procedimento. Contudo, a etapa foi importante para verificar que as modificações estruturais ou agregados dos fragmentos Fab ocorreram durante a etapa de ajuste do pH (Figura 15), como também foi observado por Shukla et al. (2005).

Utilizando das observações dos resultados anteriores, foi desenhada a abordagem cromatográfica com o uso em uma etapa inicial da coluna S Sepharose seguida pela utilização da coluna de proteína G, condição em que foi obtido o nível de pureza desejado para os fragmentos Fab dos 4 clones (Figura 22). Na etapa inicial desta abordagem cromatográfica foi verificada que, apesar dos perfis cromatográficos serem semelhantes (Figura 20), existiu diferença na interação dos materiais à resina catiônica, sendo que os produtos dos clones 1 e 10 foram removidos da coluna com o aumento do pH, enquanto que para os clones 2 e 9 era necessário, além do aumento de pH, o aumento da força iônica na solução de eluição. Na etapa cromatográfica posterior (proteína G) foi observada que a fração

contendo o fragmento Fab do clone 10 possui um pico definido, com boa resolução e os produtos dos clones 1, 2 e 9, resolução mais baixa. O material do clone 10 também apresentou os melhores rendimentos nas duas etapas cromatográficas. Com base nestas informações pode-se dizer que esta estratégia cromatográfica foi mais adequada para a purificação do fragmento Fab do clone 10 (Figura 21, Tabela 8).

Diferentemente do observado por Jalalirade (2013) na purificação do fragmento Fab D1.3 anti-lisozima (proveniente de cultivo bacteriano e com a utilização apenas da resina de proteína G para o seu isolamento), que verificou um baixo rendimento de purificação (1%), o produto do clone 10 alcançou rendimento de 44% (Tabela 4), utilizando a mesma resina. O uso sequencial das resinas S Sepharose e proteína G para a purificação do fragmento Fab D1.3 também foi avaliado por Jalalirade (2013), que neste caso observou uma recuperação de 83%. O rendimento obtido pelo produto do clone 10, com o uso desta abordagem foi de 25% (Tabela 7).

A avaliação do perfil isoelétrico dos fragmentos Fab dos 4 clones, mostrou diferenças tanto na quantidade de isoformas existentes quanto no ponto isoelétrico (Figura 23), o que pode justificar os graus diferentes de interação com a resina catiônica. O DigiFab[®], um anticorpo policlonal, apresentou o pI mais alcalino do que o observado para os fragmentos Fab dos clones, com um certo grau de arraste, resultado comum para anticorpos policlonais.

A especificidade de ligação entre os fragmentos Fab anti-digoxina e o antígeno Dig-BSA foi confirmada pelos ensaios de *Western blotting* (Figura 24) e ELISA método 2 (Figura 25), não sendo verificadas ligações entre os fragmentos Fab com a BSA, demonstrando a especificidade de ligação dos materiais à porção digoxina do conjugado Dig-BSA.

Com o ensaio de ELISA de inibição foi possível verificar a especificidade entre os fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones e do DigiFab[®] à digoxina, digoxigenina, digitoxina e a ouabaína (Figuras 26, 28, 30 e 32). De modo semelhante ao observado no trabalho realizado por Pullen et al. (2008) que verificou a baixa afinidade do DigiBind[®] e DigiFab[®] à ouabaína em um ensaio competitivo, os fragmentos Fab dos 4 clones e o DigiFab[®], também apresentaram baixa afinidade a este análogo, no ensaio de ELISA de inibição.

Os valores de IC_{50} obtidos sugerem que, nas condições experimentais, as alterações estruturais dos análogos avaliados, quando presentes na porção não açúcar, tiveram maior interferência na formação dos complexos inibidor-Fab, do que quando existentes na porção açúcar. A digitoxina difere da digoxina apenas pela ausência de um grupo hidroxila na porção aglicona e a ouabaína, na quantidade de açúcar e na mudança da posição de um grupo hidroxila na porção aglicona (KATZ et al., 2010). Para estes análogos foram obtidos os maiores valores de IC_{50} , enquanto aqueles obtidos pela digoxigenina, que não possui a porção glicona (KATZ et al., 2010) e a digoxina apresentaram os menores valores (Figuras 27, 29, 31 e 33; Tabela 9). O DigiFab[®], apesar de não ter resultado em valor de IC_{50} para digitoxina e apresentar um elevado intervalo de confiança para a ouabaína, nas condições avaliadas, obteve os menores valores de IC_{50} . Cabe ressaltar que, sendo este um produto de origem policlonal, as variações existentes entre os glicosídeos testados exerceriam uma menor influência na ligação destes ao DigiFab[®]. Todavia, os fragmentos Fab dos 4 clones, que são monoclonais, tiveram seus valores de IC_{50} próximos aos obtidos pelo produto policlonal (Tabela 9).

Com o uso do ensaio de titulação cinética por SPR foi possível determinar os parâmetros cinéticos de interação entre os fragmentos Fab dos 4 clones e do DigiFab[®] com o conjugado Dig-BSA (Figura 34). As características desejadas para os fragmentos Fab são: possuir alta velocidade de associação (k_a), revertendo rapidamente a toxicidade causada pela digoxina; baixa velocidade de dissociação (k_d), possibilitando a eliminação do complexo fragmento Fab-digoxina pela via renal e elevada taxa de afinidade (K_D), o que permitiria o uso de menores quantidades de fragmentos Fab.

Apesar das características almejadas para os parâmetros cinéticos é necessário que a sua avaliação seja efetuada com critério e em conjunto, visto que materiais com a mesma K_D podem possuir diferenças nas velocidades de associação e dissociação, como o observado pelos fragmentos dos clones 2 e 9 que possuem afinidades semelhantes, porém com velocidades de associação e dissociação diferentes (Figura 35, Tabela 10). A estabilidade entre o complexo antígeno-anticorpo, que é avaliada pela velocidade de dissociação no ensaio de SPR, tem fundamental importância na escolha de um clone produtor de anticorpos (CANZIANI; KLAKAMP; MYSZKA, 2004; HAHNEFELD; DREWIANKA; HERBERG,

2004). A afinidade descrita do DigiFab[®] à digoxina compreende a faixa de 10^{-9} a 10^{-10} M (PROTHERICS, 2001). Nas condições avaliadas observou-se que tanto o DigiFab[®] quanto os fragmentos Fab dos clones 2, 9 e 10 apresentaram este mesmo nível de afinidade (Figura 36, Tabela 10).

Em suma, nas condições experimentais, o produto do clone 1 foi inferior aos demais tanto no rendimento de purificação quanto na afinidade verificada por SPR. Os produtos dos clones 2 e 9 apresentaram rendimentos de purificação e constantes de afinidade semelhantes, porém o clone 9 obteve uma baixa concentração de fragmentos Fab no sobrenadante da cultura, aproximadamente $1/3$ inferior ao obtido pelos outros clones. O clone 10 atingiu os melhores rendimentos de purificação e de afinidade ao conjugado Dig-BSA.

A avaliação de diferentes estratégias cromatográficas para a purificação dos fragmentos Fab anti-digoxina, aliada a possibilidade de obtenção de um produto monoclonal homogêneo, produzido sem o uso de animais e com características semelhantes ao produto disponível, tornou atraente a realização do presente trabalho e as suas conclusões.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os experimentos de purificação e caracterização realizados com os fragmentos Fab dos 4 clones selecionados permitem a escolha do clone mais adequado para otimizar o processo *upstream*, visando escalonamento do produto.

A estratégia de purificação utilizada traz vantagens como a aplicação direta do sobrenadante do cultivo bacteriano sem a necessidade de diafiltração e a aplicação direta do eluato da troca iônica na resina de afinidade, que proporciona concentração do produto no eluato. O conjunto de procedimentos *downstream* realizado proporciona fácil escalonamento.

A existência de especificidade entre os fragmentos Fab produzidos e a digoxigenina (metabólito ativo da digoxina) permite a utilização também no mercado da pesquisa e diagnóstico, visto que o uso da digoxigenina como marcador para detecção de ácidos nucleicos e proteínas vem aumentando fortemente nos últimos anos. Este aumento deve-se à necessidade de evitar o uso de sistemas de detecção por radioatividade, tanto em pesquisa quanto em laboratórios clínicos. A utilização deste método com digoxigenina possui diversas vantagens, destacando o curto tempo de desenvolvimento do ensaio, alta resolução histológica e alta sensibilidade de detecção. A sonda de digoxigenina marcada tem menor custo do que as sondas marcadas com radioisótopos, que necessitam de instalações especiais, além do acúmulo de lixo radioativo e o risco causado pela radiação. Este método de detecção de ácidos nucleicos utiliza anticorpos com alta afinidade pela digoxigenina, conjugados ou não, para a identificação por quimioluminescência ou colorimetria (HART, BASU, 2009; McCREERY, 1997), podendo ser uma segunda aplicação do produto obtido no presente projeto.

As vantagens obtidas pelo produto gerado por engenharia genética em relação ao fragmento Fab anti-digoxina comercial são: ser um produto monoclonal, portanto, possível de ser produzido com homogeneidade, e não utilizar animais para a produção, contribuindo para evitar a contaminação por agentes infectantes de origem animal.

Os objetivos propostos neste trabalho foram alcançados, porém, para tornar viável a produção em maior escala dos fragmentos Fab obtidos, é necessária a realização de ensaios de otimização do nível de expressão do fragmento Fab anti-

digoxina na cultura bacteriana, como: a avaliação de diferentes vetores e linhagens bacterianas; otimização das condições de expressão, pelo ajuste nas concentrações de IPTG, temperatura e tempo de indução; utilização de biorreatores, permitindo o controle do pH e o aumento da aeração.

O conjunto de resultados obtidos indica a possibilidade de desenvolvimento de um fragmento Fab monoclonal, obtido por fermentação bacteriana, como antídoto para a toxicidade da digoxina, seja no controle da medicação utilizada na cardiologia como em outros acidentes causados por ingestão, deliberada ou não, de plantas contendo digitálicos.

REFERÊNCIAS*

- ABBAS, A. et al. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592 p.
- AHMED, A. Digoxin and reduction in mortality and hospitalization in geriatric heart failure: importance of low doses and low serum concentrations. **Journal of Gerontology: Medical Sciences**, v. 62^a, p. 323-329, 2007.
- AMBROSY, A. P. et al. The use of digoxin in patients with worsening chronic heart failure: reconsidering an old drug to reduce hospital admissions. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, p. 1823-1832, 2014.
- ANDRÉS, V. L. G. Revisión sistemática sobre la efectividad e indicaciones de los anticuerpos antidigoxina en la intoxicación digitalica. **Revista Española de Cardiología**, v. 53, p. 49-58, 2000.
- ANDREW, S. M.; TITUS, J. A. Purification of immunoglobulin G. **Current protocols in cell biology**, p. 16.3.1-16.3.12, 2000.
- ANTMAN, E. M. et al. Treatment of 150 cases of life-threatening digitalis intoxication with digoxin-specific Fab antibody fragments. Final report of a multicenter study. **Circulation**, v. 81, p. 1744-1752, 1990.
- ANTMAN, E. M.; SMITH, T. W. Digitalis toxicity. **Annual Review of Medicine**, v. 36, p. 357-367, 1985.
- BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology and novel therapeutic targets. **Pharmacology Reviews**, v. 61, n. 9, p. 9-38, 2009.
- BARBAS, C. F. et al. **Phage display: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- BARROS, I. C. M. **Monitorização terapêutica das concentrações plasmáticas da digoxina em pacientes com insuficiência cardíaca**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, 2008.
- BAZAN, J.; CALKOSINSKI, I.; GAMIAN, A. Phage display – A powerful technique for immunotherapy. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 12, p. 1817-1828, 2012.

*De acordo com:

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

BOCCHI, E. A. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 93, p. 1-71, 2009. Supl. 1.

BOURGE, R. C. et al. Digoxin reduces 30-day all-cause hospital admission in older patients with chronic systolic heart failure. **The American Journal of Medicine**, v. 126, p. 701-708, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n.º 8, de 28 de fevereiro de 2014**. Brasil, 2014. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ba66ce00433dbaa5a974ab9a53009513/RDC_7_2014+\(suspens%C3%A3o_arq_temp\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ba66ce00433dbaa5a974ab9a53009513/RDC_7_2014+(suspens%C3%A3o_arq_temp).pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 18 dez. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n.º 28, de 09 de maio de 2008**. Brasil, 2008. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0028_09_05_2008.html>. Acesso em: 18 dez. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME**. Brasil, 2015. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_essenciais_rename_2014.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2015.

BTG. **DigiFab® Technical Leaflet**, London, 2012

BUTLER, V. P. JR; CHEN, J. P. Digoxin-specific antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 57, p. 71-78, 1967.

CANZIANI, G. A.; KLAKAMP, S.; MYSZKA, D. G. Kinect screening of antibodies from crude hybridoma sample using Biacore. **Analytical Biochemistry**, v. 325, p. 301-307, 2004.

CHAN, B. S.; BUCKLEY, N. A. Digoxin-specific antibody fragments in the treatment of digoxin toxicity. **Clinical Toxicology**, v. 52, n. 8, p. 824-836, 2014.

CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 876-885, 2006.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 625-635, 2004.

EICHHORN, E. J.; GHEORGHIADÉ, M. Digoxin. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 44, n. 4, p. 251-266, 2002.

ERIKSSON, K.-O. Hydrophobic interaction chromatography. In: JANSON, J.-C.; RYDEN, L. (Ed.). **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 283-309.

FLANAGAN, R. J.; JONES A. L. Fab antibody fragments. **Drug Safety**, v. 27, n. 14, p. 1115-1133, 2004.

GALVÃO, T. F. et al. Antídotos e medicamentos utilizados para tratar intoxicações no Brasil: necessidades, disponibilidade e oportunidades. **Caderno de Saúde Pública**, v. 29, S167-S177, 2013. Sup.

GHEORGHIADÉ, M. et al. Contemporary use of digoxin in the management of cardiovascular disorders. **Circulation**, v. 113, p. 2556-2564, 2006.

GHEORGHIADÉ, M.; PITT B. Digitalis Investigation Group (DIG) trial: a stimulus for further research. **American Heart Journal**, v. 134, p. 3-12, 1997.

GHOSE, S. et al. Integrated polishing steps for monoclonal antibody purification. In: GOTTSCHALK, U. (Ed.) **Process scale purification of antibodies**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p. 145-167.

GIL, D.; SCRUM, A. Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 73-84, 2013.

GOLDBERGER, Z. D.; ALEXANDER, G. C. Digitalis use in contemporary clinical practice: refitting the foxglove. **JAMA Internal Medicine**, v. 174, n. 1, p. 151-154, 2014.

GUIMARÃES, J. I. et al. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 1-30, 2002.

HAHNEFELD, C.; DREWIANKA, S.; HERBERG, F. W.; DECKER, J (Ed); REISCHL, E(Ed), Determination of kinetic data using surface resonance biosensors. **Molecular Diagnosis of infectious Diseases**, v. 94 2 ed, p. 299-320, 2004.

HART, S. M.; BASU, C. Optimization of a Digoxigenin-based Immunoassay System for Gene Detection in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of biomolecular techniques**, v. 20, p. 96-100, 2009.

HERMANS, P; ADMAS, H; DETMERS, F. Purification of antibodies and antibody fragments using CaptureSelect™ affinity resins. In: OSSIPOV, V.; FISCHER, N. (Ed.). **Monoclonal antibodies methods and protocols**. 2nd ed. New York: Humana Press, 2014. p. 297-314.

JALALIRAD, R. Efficient chromatographic processes for elevated purification of antibody fragment (Fab D1.3) from crude *Escherichia coli* culture. **Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 74-80, 2013.

JOHNSON, A. R.; CROUCH, B.; ZANE HOROWITZ, B. Discrepancies in reported US pricing information for digoxin-Fab. **Clinical Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 71, 2015.

KARLSSON, E.; RYDEN, L.; BREWER, J. Ion-Exchange Chromatography. In: JANSON, J.-C.; RYDEN, L. (Ed.). **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 145-205.

KATZ, A. et al. Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na, K-ATPase. **Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19582-19592, 2010.

KOHLER, G.; MILSTEIN, G. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 7, n. 256, p. 495-497, 1975.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin superfamily in oxidative protein folding. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 3, p. 457-470, 2014.

MARQUES, B. F.; ROUSH, D. J.; GÖKLEN, K. E. Virus filtration of high-concentration monoclonal antibody solutions. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 483-491, 2009.

McCREERY, T. Digoxigenin labeling. **Molecular Biotechnology**, v. 7, p. 121-124, 1997.

MORO, A. M.; RODRIGUES, M. T. A. Anticorpos monoclonais para a clínica. **Biociência**, v. 4, n. 22, p. 32-35, 2001.

MURATA, V. M. et al. Anti-Digoxin Fab variants generated by Phage Display. **Molecular Biotechnology**, v. 54, p. 269-277, 2013

MURATA, V. M. **Produção e caracterização da porção Fab do anticorpo anti-digoxina utilizando a tecnologia de *phage display***. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2012.

PERCHIACCA, J. M.; TESSIER, P. M. Engineering aggregation-resistant antibodies. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 3, p. 263-286, 2012.

PROTHERICS. **DigiFab™ Digoxin Immune Fab (Ovine) Clinical Product Monograph**. Brentwood, 2001.

PULLEN, M. A. et al. Comparison of non-digitalis binding properties of digoxin-specific Fabs using direct binding methods. **Journal of Immunological Methods**, v. 336, n. 1, p. 235-241, 2008.

REUTERS. Glenveigh medical receives FDA fast track designation for development of preeclampsia drug. 2012. Disponível em: <<http://www.reuters.com/article/idUS193020+12-Nov-2012+BW20121112>>. Acesso em: 15 set. 2014.

ROUET, R. et al. Expression of high-affinity human antibody fragments in bacteria. **Nature Protocols**, v. 7, n. 2, p. 364-373, 2012.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Selectivity in affinity chromatography. In: HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. (Ed.). **Isolation and purification of proteins**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 57-94.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 442-453, 2004.

SHUKLA, A. A. et al. Strategies to address aggregation during protein A chromatography. **BioProcess International**, v. 3, n. 5, p. 36-45, 2005.

SIGMA-ALDRICH. **Sigma Flag® E. coli expression system manual**. EUA. 2005.

SILVA, G. J. JR. **Cromatografia de proteínas guia teórico prático**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. 111 p.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, T. W.; BUTLER, V. P. JR; HABER, E. Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digoxin. **Biochemistry**, v. 9, p. 331-337, 1970.

SPITALI, M.; GOTTSCHALK, U. (Ed.) Downstream processing of monoclonal antibody fragments. **Process scale purification of antibodies**, p. 349-372, 2009.

THORSTENSON, Y. R. et al. Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5333-5339, 1997.

WHEELWRIGHT, S. M. **Protein purification design and scale up of downstream processing**. New York: John Wiley & Sons, 1991. 228 p.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. New York: Oxford University Press, 2007. 583 p.

WINTER, G. et al. Making antibodies by phage display technology. **Annual Review of immunology**, v. 12, p. 433-455, 1994.

YOON, S. H. et al. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 4, p. 23-29, 2009.

ZAZERSKAYA, I. E. et al. Magnesium sulfate potentiates effect of Digifab on marinobufagenin-induced Na/K-ATPase inhibition. **American Journal of Hypertension**, v. 26, n. 11, p. 1269-1272, 2013.