

A ARTE DE PURIFICAR PROTEÍNAS

Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico

Muitos dos produtos de uso clínico humano ou veterinário são proteínas ou polipeptídeos. Podemos citar como exemplos a albumina, o hormônio de crescimento, a insulina, a eritropoietina, os interferons, entre outros. Estes produtos biotecnológicos podem ser obtidos extrativamente, como é o caso da albumina, obtida a partir do plasma humano, ou a partir de sua produção por organismos geneticamente modificados, que são rotulados genericamente de proteínas recombinantes, como é também a albumina humana produzida na levedura *Pichia pastoris*, ou o hormônio de crescimento, a partir de bactérias *Escherichia coli*. Tanto no caso extrativo como no caso dos produtos recombinantes, existe a necessidade de purificação da proteína de interesse. Muitas vezes, esta é uma etapa crucial para o processo biotecnológico em si.

Nesse caso, o desenho de um processo otimizado de purificação de uma proteína dependerá de suas características físico-químicas, de suas propriedades biológicas, da fonte da qual a proteína será purificada e da tecnologia de purificação disponível. O produto final deverá ser resultado dos compromissos definidos no desenho do processo, ou seja: custo, velocidade, volume e pureza.

Tipicamente, um processo de purificação de uma proteína é composto por múltiplas etapas. O uso de cromatografias de adsorção tem sido o sistema corrente de purificação de proteínas. Porém, existe uma etapa inicial prévia, que consiste na clarifica-



Figura 1. Uso do leito expandido em um protocolo tradicional de purificação

ção da amostra para as etapas cromatográficas posteriores. Essa etapa representa um grande problema a ser solucionado. Na maioria das vezes, utilizam-se técnicas de precipitação por centrifugação ou de filtração. Ainda assim, tais técnicas podem não resolver o problema de clarificação da sua amostra, trazendo uma série de transtornos como a obtenção de uma solução ainda particulada, entupimento das membranas de filtração, manipulação de um grande volume num tempo excessivamente longo, custo elevado, entre outros. Esses transtornos são gerados em função da fonte que é usada na purificação da proteína de interesse.

Paulo Lee Ho

Centro de Biotecnologia,
Instituto Butantan
Pleeboib@quim.iq.usp.br

Érika Kitahara

Amersham Pharmacia
Biotech do Brasil

Diogo M.O. Ogawa

Centro de Biotecnologia,
Instituto Butantan

**Álvaro R. B. Prieto
da Silva**

Centro de Biotecnologia,
Instituto Butantan

**Celso Raul Romero
Ramos**

Centro de Biotecnologia,
Instituto Butantan

**Ana Lúcia Tabet
Oller do Nascimento**

Centro de Biotecnologia,
Instituto Butantan

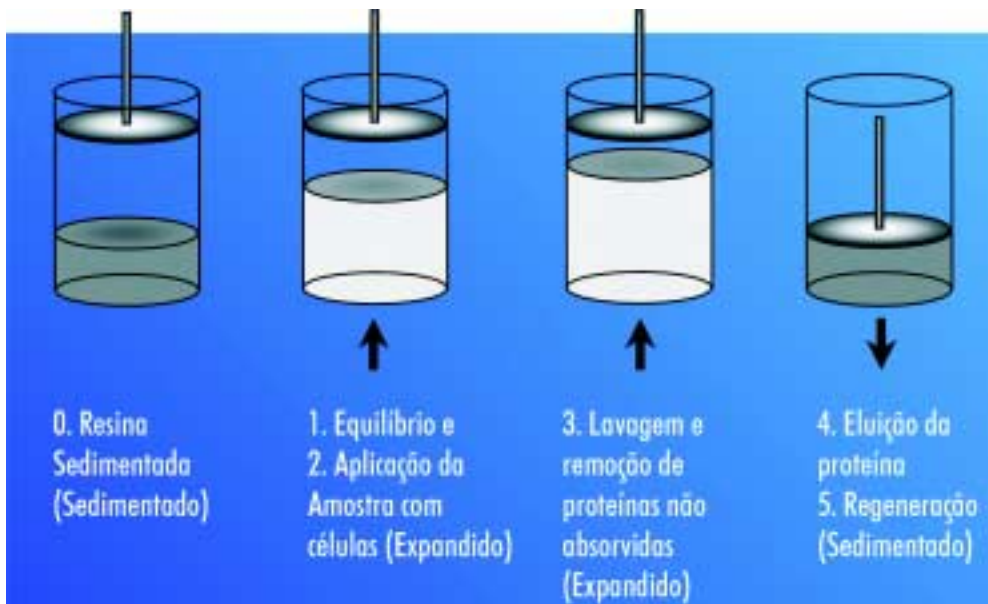


Figura 2. Etapas de um sistema de leito expandido

Em geral, as proteínas de interesse estão presentes em fluidos naturais como plasma sanguíneo, fluido de cultura de células de mamífero, de cultura de microorganismos, extratos de tecidos ou células rompidas de microorganismos. Recentemente, avanços têm sido alcançados no sentido de simplificar o processo de “downstream”. Um deles é diminuir o número de etapas iniciais de clarificação das amostras para posterior adsorção em resinas cromatográficas.

Foram desenvolvidas resinas cromatográficas que, ao contrário das convencionais, permitem a adsorção de amostras contendo materiais particulados e/ou células. Este novo conceito é conhecido como sistema de leito expandido. A figura 1 mostra a implementação do leito expandido em um esquema clássico de purificação de proteína extracelular.

Princípio da técnica de leito expandido:

A fase estacionária (resina/ adsorvente) do leito expandido é equilibrada, na forma expandida, com o tampão de equilíbrio (Figura 2). A amostra contendo as células é aplicada, no sentido de baixo para cima, no leito estabilizado. Desta forma, a proteína de interesse e alguns contaminantes adsorvem na resina, enquanto as células saem pela parte superior da coluna. A tela existente na parte su-

perior da coluna é aberta o suficiente para permitir a saída dos debrís celulares e outras partículas que estiverem presentes. O tempo para que a proteína alvo seja adsorvida depende do fluxo de aplicação da amostra, bem como da quantidade de resina que foi utilizada para se fazer a expansão (tempo de retenção).

Após a aplicação da amostra, a resina é lavada de baixo para cima, com o tampão de lavagem, para remoção dos debrís celulares e das proteínas que não se adsorveram na resina.

A etapa de eluição da proteína de interesse é feita de cima para baixo, ou seja, após sedimentação do leito. Em seguida, a coluna é limpa e regenerada para um novo uso. A idéia desta tecnologia é combinar as etapas de clarificação e adsorção em uma só, a fim de aumentar o rendimento, diminuir o tempo de processo, os custos, etc.

O processo de “downstream” clássico mostrado na figura 1 apresenta a etapa de captura da amostra (purificação inicial), as de purificações intermediárias e final, que podem ou não ser necessárias, dependendo da pureza final requerida pela amostra. A necessidade de maior ou menor pureza é determinada pelo uso do produto, ou seja, uso humano, diagnóstico ou veterinário.

O planejamento da estratégia de purificação deverá considerar :

- As necessidades regulamentadoras: especificações determinadas pela farmacopeia de referência, Ministério da Saúde e órgãos reguladores.
- Aplicação final do produto: humano, veterinário, diagnóstico.
- Fase de desenvolvimento do projeto.
- Escala de manufatura para atender à demanda do produto.
- Viabilidade econômica.
- Existência de facilidades de produção ou não, devendo ser considerada, inclusive, a terceirização da produção, etc.

O grande desafio dos processos de purificação de proteínas é o exaustivo trabalho de desenvolvimento para adequar a melhor técnica ao processo, a transferência da metodologia para a escala de produção, garantindo que o produto final tenha todas as características estabelecidas anteriormente para seu uso em humanos, para diagnóstico ou uso veterinário. E tudo isto se passa, muitas vezes, no decorrer de anos. É como se fosse uma grande escultura que pouco a pouco se esculpe para se chegar à concepção final.

Aplicação biotecnológica

O Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan vem buscando desenvolver vacinas e biofármacos para uso humano, alguns obtidos a partir de extratos ou fluidos humanos, outros a partir da expressão da proteína de interesse em organismos engenheirados. Nesse caso, é importante ressaltar que o uso de sistemas cromatográficos de leito expandido pode representar uma forma de obter a proteína de interesse por um custo menor, com uma maior produção em um menor tempo. O fato do sistema ser de alta capacidade de adsorção em conjunto com a possibilidade de realizar a cromatografia sem a clarificação da amostra, economizando etapas de trabalho nesse processo, torna

este sistema cromatográfico altamente atraente para o setor produtivo, ainda que o seu custo seja relativamente alto.

Por tratar-se de um sistema especializado, existe a necessidade de equipamentos especiais para garantir a performance do sistema. Por exemplo, as colunas são próprias do sistema, não sendo possível a utilização de colunas convencionais. A resina também é própria. Além disso, conforme as características de expansão do leito de resina, existe a necessidade de se trabalhar com fluxos maiores do que aqueles usados em sistemas convencionais, a fim de atingir a expansão requerida. Neste sentido, os sistemas de bombas também necessitam ter características especiais, ainda que não haja necessidade de se usar uma bomba de uma marca ou tipo especializado. Dependendo das condições de cada Laboratório, um sistema cromatográfico de leito expandido pode ser bastante automatizado, com vários tipos de detectores e válvulas. Porém, é possível ter um sistema manual simples.

O Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan está empenhado no desenvolvimento de novos processos ou de novos produtos para uso humano. Um desses produtos em desenvolvimento é produzido em bactérias *E. coli* na forma de fusão, com uma sequência N-terminal de 6 histidinas (6XHis). Dessa forma, a proteína recombinante pode ser facilmente purificada usando-se cromatografia de afinidade por metal, no caso de Ni²⁺. Inicialmente, o cDNA da proteína foi subclonado em vetor plasmidial que permite a sua expressão na bactéria *E. coli*. Após transformação da bactéria com esse plasmídeo, o clone é selecionado pela capacidade de crescer em meio contendo antibiótico apropriado, e, posteriormente inoculado em meio nutritivo contendo o antibiótico de seleção. A cultura é crescida até atingir uma densidade óptica (OD_{600 nm} = 0.5) quando se adiciona o indutor da expressão. A cultura é crescida por cerca de 3 horas e as células são coletadas por centrifugação ou filtração e ressuspensas em tampão apropriado contendo 8 M uréia. Neste

momento, as células são lisadas e a proteína recombinante presente nos corpúsculos de inclusão é solubilizada. Pela forma convencional de purificação, haveria a necessidade de uma etapa prévia de clarificação



Figura 3. Análise em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) em condições redutoras. O padrão de massa molecular de proteínas foi aplicado na canaleta 1. Nas canaletas 2-11, foram aplicadas 10 µl das frações coletadas da cromatografia de leito expandido, após eluição com solução 1 M imidazol da coluna quelante carregada com Ni²⁺. A proteína recombinante de interesse está indicada com uma seta

deste material para posterior entrada no sistema cromatográfico. Entretanto, no caso de sistemas de leito fluidizado, a suspensão toda é injetada na coluna de baixo para cima (Figura 2). Os debris celulares e materiais particulados são eliminados por cima sem que haja necessidade de uma clarificação prévia do material. A coluna é lavada de baixo para cima e a eluição do material adsorvido é feito com o leito empacotado, injetando-se o tampão de eluição contendo imidazol de cima para baixo. A eluição pode ser monitorada de diversas maneiras. A figura 3 mostra a análise de algumas frações coletadas em gel de poliacrilamida contendo o detergente aniônico dodecil-sulfato de sódio em condições redutoras. Podemos perceber que desta forma, foi possível a purificação da proteína recombinante, com um alto grau de pureza, a partir da cromatografia

de um material particulado de bactéria.

Referências Bibliográficas

1 - Expanded Bed Adsorption - Principles and Methods. Pharmacia Biotech.

2 - McCormick, D.K. (1993) Expanded Bed Adsorption. The first new unit process operation in decades. *Bio/Technol.* 11: 1059.

3 - Sulkowski, E. (1985) Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnol.* 3:1.

4 - Batt, B.C., Yabannavar, V.M and Singh, V. (1995) Expanded bed adsorption process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. *Bioseparation* 5: 41-52.

5 - Barnfield Frej A.K. (1996) Expanded bed adsorption for recovery of renatured human recombinant interleukin 8 from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Bioseparation* 6: 265-271.

6 - Johansson, H.J., Jagersten C. and Shiloach, J. (1996) Large scale recovery and purification of periplasmic recombinant protein from *E. coli* using expanded bed adsorption chromatography followed by new ion exchange media. *J. Biotechnol.* 18: 9-14.

7 - Hjorth R. (1997) Expanded bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments. *Trends in Biotechnol.* 15: 230-235.

8 - Degener, A., Belew, M. and Velandar, W.H. (1998) Zn(2+)-selective purification of recombinant proteins from the milk of transgenic animals. *J. Chromatogr. A* 799: 125-137.

9 - Willoughby, N.A., Kirschner, T., Smith, M.P., Hjorth, R. and Titchener-Hooker, N.J. (1999) Immobilised metal ion affinity chromatography purification of alcohol dehydrogenase from baker's yeast using an expanded bed adsorption system. *J. Chromatogr. A* 840: 195-204.

10 - Clemmitt, R.H and Chase, H.A. (2000) Facilitated downstream processing of a histidine-tagged protein from unclarified *E. coli* homogenates using immobilised metal affinity expanded-bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 67: 206-216.