



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS ADSORVENTES PARA PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE PSEUDO-AFINIDADE

S. I. B. CARDOSO¹, P. A. PESSOA¹, F. SOUSA², A. R. AZZONI¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, Brasil

² Centro de Investigação de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Portugal

E-mail para contato: sara.cardoso@usp.br

RESUMO –*Técnicas de purificação de DNA plasmidial (pDNA) para vacinas e terapia gênica através de adsorção em resinas cromatográficas encontram limitações de capacidade de adsorção e seletividade. Neste trabalho, diferentes ligantes peptídicos baseados em arginina foram imobilizados em resinas de agarose. Através de estudos em batelada finita em diferentes pHs, verificou-se que a adsorção de pDNA e RNA nestas matrizes pode ser modelada por isotermas de Langmuir. Observou-se uma diminuição da afinidade e capacidade de adsorção de pDNA com o aumento do pH, causada provavelmente pela menor efetividade da carga positiva da arginina. Através do uso do di-peptídeo de arginina em pH 8,0, obteve-se um aumento da capacidade de adsorção significativo, de 0,48 mg ml resina⁻¹ para 1,36 mg ml resina⁻¹. A pH 8,0 foi ainda possível diminuir a afinidade da matriz pelo RNA, principal impureza do processo.*

1. INTRODUÇÃO

O avanço no número de estudos na área vacinas de DNA e terapia gênica tem aumentado a demanda por DNA plasmidial (pDNA) de alta pureza que atendam necessariamente aos requisitos das agências reguladoras (EMEA, FDA, ANVISA) para ensaios pré-clínicos. No entanto, DNA plasmidial representa geralmente menos de 3% das macromoléculas presentes em lisados celulares de *E. coli*, de onde é purificado. Além disso, algumas das principais impurezas possuem características físico-químicas similares, como é o caso do RNA, DNA genômico e até mesmo endotoxinas. O pDNA é também uma molécula grande (600 - 1500 nm) e razoavelmente sensível a forças de cisalhamento (Freitas *et al.*, 2007).

A grande maioria dos estudos de purificação por cromatografia descritos na literatura utiliza resinas cromatográficas apropriadas para adsorção de proteínas, mas não para adsorção de pDNA, levando conseqüentemente a baixas capacidades de adsorção (Lowe *et al.*, 2001). Portanto, faz-se

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

necessário o desenvolvimento e caracterização de novos adsorventes capazes de recuperar seletivamente DNA plasmidial, mantendo, entretanto, altas capacidades de adsorção (Sousa *et al.*, 2008). Vários trabalhos têm surgido mostrando a capacidade de alguns aminoácidos de interagir com o pDNA. Entre os aminoácidos, foi verificado que no caso da arginina, esta interação é muito específica a forças iônicas baixas, indicando interação eletrostática com os fosfatos carregados do pDNA (Sousa *et al.*, 2008). Além disso, têm sido descritas uma série de características da arginina que são adequadas para suportar esses mecanismos de reconhecimento específico, como o comprimento suficiente da sua cadeia lateral, a habilidade para interagir com diferentes conformações e a capacidade para produzir geometrias de ligação estratégicas com a isoforma superenovelada. Além disso, estudos têm revelado um favorecimento da interação específica da arginina com a base guanina através interações bidentadas, com formação de pontes de hidrogênio da estrutura enovelada com as bases de arginina (Sousa *et al.*, 2008).

Quando comparado com proteínas, existe uma falta de dados e compreensão sobre os processos de adsorção dos plasmídeos em suportes cromatográficos. Questões específicas como dados de capacidades, constantes de adsorção, taxas de interação, não só de pDNA como de RNA ou outras impurezas, foram pouco levantadas em estudos da literatura presente.

Neste estudo, diferentes ligantes peptídicos baseados em arginina foram imobilizados em resinas de agarose previamente ativadas (Epoxy-activated Sepharose 6B, GE Healthcare, EUA). Através de um estudo de equilíbrio de adsorção das várias resinas, foi possível levantar informações relativas ao desempenho e mecanismos de adsorção, bem como avaliar as melhores condições de adsorção, fazendo-se variar parâmetros como o pH no processo de purificação do DNA plasmidial, bem como da interação com a sua principal impureza (RNA).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ligantes peptídicos de arginina, di-arginina e tri-arginina foram sintetizados comercialmente (Aminotech, Brasil) e imobilizados em agarose (Epoxy-activated Sepharose 6B, GE Healthcare, EUA) segundo os protocolos de imobilização fornecidos pelos fabricantes das resinas, de forma a se obter a mesma densidade de ligantes nas três matrizes.

A produção de DNA plasmidial (pDNA) para os estudos de adsorção foi realizada através do crescimento de *E. coli* DH5 α transformada com o plasmídeo pVAX1GFP. O crescimento celular foi realizado em frasco agitado contendo meio Luria Bertani (LB) e kanamicina (30 g mL⁻¹) a 37°C e 250 rpm. No final da fase exponencial, as células foram recolhidas através de centrifugação. Amostras de pDNA purificadas foram obtidas através do kit comercial *Illustra plasmidPrep Midi Flow Kit* (GE Healthcare, EUA), seguindo-se o protocolo do fabricante. Já a extração e purificação de RNA foi realizada através do método descrito por Georges Mikhael (USP - Universidade de São Paulo, dados em publicação). O pDNA e o RNA purificados foram quantificados e avaliados quanto a sua pureza através de absorbância a 260 nm, e através da relação de absorbância a 260nm/280nm. A integridade do pDNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



Os estudos de adsorção em batelada finita foram realizados utilizando várias amostras (concentrações decrescentes) de pDNA e RNA purificadas em 10 mM Tris a pH 6, 7, 8 e 9. Um volume de 0,5 mL de soluções purificadas de pDNA e RNA, com diferentes concentrações iniciais, foram colocadas em contato com 10 μ L de resina contendo o respectivo ligante em tubos *Eppendorf*. Cada mistura foi incubada a 25 °C a velocidade branda e constante, até que o equilíbrio fosse atingido. Considerou-se equilíbrio o ponto em que o sistema mostrou duas medições de concentração consecutivas praticamente iguais. Essas concentrações de equilíbrio do pDNA e RNA foram medidas a 260 nm (1 unidade equivale a 50 μ g pDNA ou RNA por ml).

$$q = q_{m\acute{a}x} K_a \frac{C}{1 + K_a C} \quad (1)$$

A quantidade de pDNA e RNA adsorvidas foi calculada através de um balanço de massa à solução, antes e depois do equilíbrio. Os valores das capacidades máximas ($q_{m\acute{a}x}$, mg ml⁻¹) e as constantes de associação (K_a , ml μ g⁻¹) foram obtidos para cada condição testada, através do melhor ajuste dos pontos experimentais obtidos, nomeadamente os valores de capacidade (q , mg ml⁻¹) e concentração de equilíbrio (C , mg ml⁻¹), ao modelo de Langmuir, representados na Equação 1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Arginina como ligante de afinidade

A adsorção isotérmica surge como uma relação empírica utilizada para prever quanto adsorbato pode ser adsorvido por camada de adsorvente, mostrando a distribuição do adsorbato entre as fases líquida e sólida nas várias concentrações de equilíbrio. O estudo em batelada finita fornece informações termodinâmicas da interação biomolécula-resina (incluindo capacidade, constante de afinidade e seletividade entre o produto e as impurezas do processo), permitindo um rastreio de uma vasta gama de condições com pequenas quantidades de produto.

A escolha do pH de trabalho é um dos pontos importantes a se considerar na escolha das condições de processo de processos de purificação por adsorção. Em nosso caso, a comparação de perfis de isotermas determinadas em tampões com diferentes valores de pH, permite verificar a as diferenças do processo de adsorção do pDNA e RNA (principal impureza de processo) na matriz, através da variação da eficácia das cargas da arginina, não desconsiderando ainda o envolvimento de outras interações não covalentes. Desta forma, é possível controlar fatores como seletividade e rendimento de processo pela escolha do pH de adsorção. Além disso, procura-se também fatores que influenciam a própria efetividade de ligação, como efeitos estereoquímicos, e ainda efeitos de competição. Os dados do processo de adsorção obtidos a pH's fixos (6, 7, 8 e 9) para a arginina foram representados para ambas as moléculas, pDNA e RNA, e os parâmetros associados ao equilíbrio de adsorção foram quantificados através do ajuste de modelos de isotermas dependentes do pH, baseados na isoterma de Langmuir (Figuras 1 e 2).

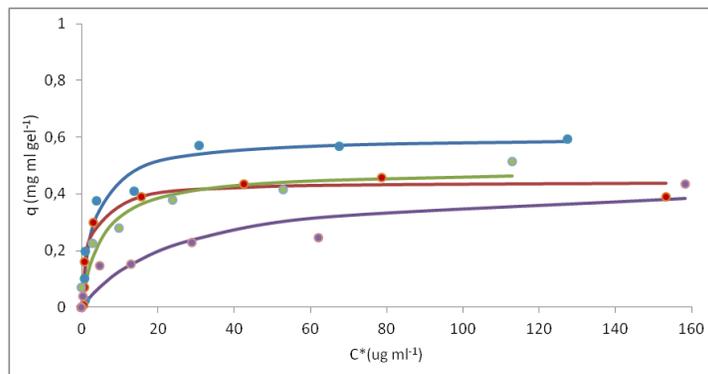


Figura 1 - Dados experimentais obtidos (pontos) e isoterma de adsorção (linhas) ajustadas segundo o modelo Langmuir do **pDNA** em arginina a pH 6 (azul), 7 (vermelho), 8 (verde) e 9 (roxo), com o ligante de arginina a 25°C.

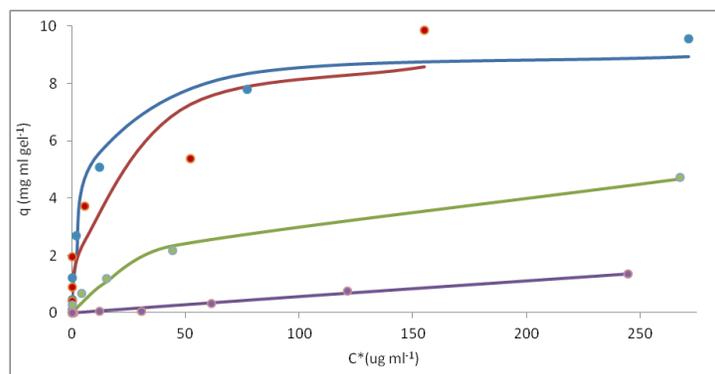


Figura 2 - Dados experimentais obtidos (pontos) e isoterma de adsorção (linhas) ajustadas segundo o modelo Langmuir do **RNA** em arginina a pH 6 (azul), 7 (vermelho), 8 (verde) e 9 (roxo), com o ligante arginina a 25°C.

Nos quatro pHs testados (Figuras 1 e 2), verifica-se que os dados experimentais obtidos podem ser representados por isoterma considerada favoráveis (inclinação não linear e côncava em relação à abscissa), e têm um ajuste suficientemente próximo dos pontos experimentais, como podemos verificar com ambas as curvas traçadas resultantes desse ajuste. A isoterma de Langmuir assume adsorção em monocamada sobre uma superfície, que contém um número finito de sítios de adsorção, sem que haja uma "migração" do adsorbato ao longo dessa superfície. Neste caso, o comportamento das isoterma indica que, para valores de concentração mais altos, se atingiu esse valor de capacidade máxima típico do modelo de Langmuir.

Na Tabela 1 é possível observar os fatores de regressão do ajuste dos modelos de Langmuir aos dados experimentais obtidos para as moléculas de pDNA e RNA, bem como os parâmetros calculados através desse ajuste. Pode-se concluir que o modelo adotado representa os dados de equilíbrio de forma eficiente, uma vez que todos os valores de R^2 para são superiores a 0,90. A dispersão verificada nos dados experimentais em torno da isoterma ajustada pode ser atribuída a erros experimentais durante a quantificação de soluções a baixas concentrações, por espectroscopia a 260 nm. Por outro lado, a distribuição de cargas no pDNA, ao contrário das proteínas que por vezes têm as suas cargas localizadas em domínios espaciais desigualmente acessíveis da molécula, encontra-se uniformemente distribuída ao longo das moléculas, podendo promover a interação entre moléculas adsorvidas de pDNA, indo contra as hipóteses assumidas pelo modelo de Langmuir (Ferreira *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Fatores de regressão resultantes do ajuste do modelo de Langmuir e parâmetros $q_{máx}$ ($mg\ ml^{-1}$) e k_a ($ml\ \mu g^{-1}$) do ligante arginina com o pDNA e RNA

pH	pDNA			RNA		
	R^2	$q_{máx}$ ($mg\ ml^{-1}$)	K_a ($ml\ \mu g^{-1}$)	R^2	$q_{máx}$ ($mg\ ml^{-1}$)	K_a ($ml\ \mu g^{-1}$)
6	0,98	0,60	0,29	0,99	9,19	0,127
7	0,98	0,44	0,47	0,95	9,46	0,0644
8	0,98	0,49	0,19	0,99	5,83	0,0152
9	0,97	0,47	0,04	0,99	32,7	0,00018

A isoterma é representada pelos parâmetros de capacidade máxima ($q_{máx}$) e constante de associação (K_a), que se referem à máxima capacidade da superfície adsorvente e a afinidade de adsorção, respectivamente. Dos resultados representados na Tabela 1, verifica-se que o valor de capacidade máxima para a molécula de pDNA apresenta um máximo no menor valor de pH. Este aumento de retenção de pDNA no pH de valor mais baixo seria de esperar uma vez que o valor de pK_a para o aminoácido arginina é de 12 (Lee *et al.*, 2013). Isto é, um pH de adsorção inferior pode aumentar a eficácia das cargas positivas da arginina, permitindo uma interação mais forte com o pDNA, enquanto que um pH mais elevado pode conduzir a uma fraca interação. Porém, nos restantes valores de pH testados, as capacidades máximas foram bastante semelhantes. Fazendo uma analogia com a molécula de RNA, verifica-se uma tendência de diminuição da capacidade máxima com o aumento de pH, atingindo valores maiores com relação aos obtidos para a molécula de pDNA. Sendo o RNA uma molécula de cadeia simples, requer um menor volume para a sua ligação com a matriz em relação ao pDNA. O alto valor de capacidade obtido pela isoterma de RNA a pH 9 é justificado pelo carácter linear da isoterma, cuja quantidade adsorvida é proporcional à concentração no seio da solução, não fornecendo um valor indicativo de capacidade máxima. Com relação à constante de associação, k_a , observa-se uma diminuição do seu valor com o aumento do valor de pH para ambas as



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

moléculas de pDNA e RNA. Uma vez tratar-se de um parâmetro que traduz diretamente a afinidade adsorvente-adsorbato, estes valores apresentam-se superiores para menores valores de pH. No entanto, no geral, essas constantes apresentam-se, no mínimo, em uma ordem de grandeza mais baixas em relação aos valores obtidos para o pDNA, que é racionalmente explicado pela estrutura superenovelada que permite ao pDNA ligar-se de forma mais eficaz e instantânea por múltiplos contatos (covalentes e não covalentes), quando comparado com a molécula de cadeia simples de RNA, que apresenta uma estrutura mais relaxada, com maiores espaçamentos entre possíveis pontos de ligação. O desvio de tendência verificado a pH para o pDNA também poderá ser justificado pela existência de uma quantidade considerável de íons positivos no seio da solução de Tris, que podem interagir com as cargas negativas dos fosfatos, competindo com a arginina.

O controle da efetividade das ligações entre moléculas alvo e impurezas com a matriz de arginina deve ser tido em conta, principalmente com relação à adsorção de impurezas com a mesma carga, como é o caso do RNA, molécula abundante em lisados celulares. Pelos resultados obtidos, verifica-se uma perda da capacidade a valores de pH superiores. Por outro lado, a valores mais baixos de pH, verifica-se uma queda na seletividade de adsorção. Este estudo preliminar reforça uma estratégia de cromatografia positiva para o pDNA, e que um possível pH de trabalho se deve situar entre 7 e 8, sendo a escolha deliberada pesando o compromisso entre capacidade e seletividade.

3.2. Di e tri peptídeos como ligantes de afinidade

Os dados do processo de adsorção foram igualmente obtidos a pHs fixos, para os ligantes di e tri peptídeos do aminoácido arginina, porém apenas a pH 7 e 8, visto se terem mostrado os valores de pH mais promissores relativamente à efetividade de ligação, com os ligantes de arginina, bem como de seletividade entre pDNA e a impureza RNA. Na Tabela 2, encontram-se os fatores de regressão resultantes e parâmetros do ajuste para ambas as moléculas, com os di e tri peptídeos de arginina. É possível verificar, de novo, bons ajustes das isotermas, confirmados pelos valores de R^2 .

Estudos realizados envolvendo o efeito do comprimento do peptídeo de arginina na estrutura e ligação com os grupos fosfato de moléculas de RNA envolvidas em entrega gênica, mostraram que maiores razões de carga N/P resultam em complexos mais condensados, de menor dimensão. Contudo, ao atingir-se um determinado valor dessa razão, verificou-se que o número de pontos de ligação não se altera (Ouyang *et al.*, 2010). Outro estudo mostrou que peptídeos mais longos podem conter resíduos de arginina que não interatuam no complexo, e que podem consequentemente repelir-se entre eles eletrostaticamente, resultando num peptídeo menos denso (Kim *et al.*, 2013). Comparando os parâmetros obtidos para as isotermas do pDNA para os três tipos de ligantes, observa-se que o aumento do peptídeo, que idealmente se traduz em mais sítios de ligação disponíveis na matriz, nem sempre se traduziu em num aumento de capacidade quando se mudou para o di ou tri peptídeo na gama das concentrações de pDNA ajustada pela isoterma. Porém, ressalta-se o caso do significativo aumento de capacidade verificado no di peptídeo para o pDNA a pH 8 (Figura 3). Porém, num mesmo valor de pH e com o tri peptídeo, verificou-se uma queda na capacidade de ligação causada provavelmente por efeitos de impedimento estereoquímico. Verifica-se também uma

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



mudança significativa de capacidade no caso da molécula de RNA com o di peptídeo, porém a um valor de pH 7. Apesar de serem moléculas diferentes, que conseqüentemente interagem, respondem e se apresentam numa conformação diferente, é possível reforçar o resultado vantajoso de um aumento do aminoácido para um di peptídeo, em condições determinadas.

Tabela 2 - Fatores de regressão resultantes do ajuste do modelo de Langmuir e parâmetros $q_{\text{máx}}$ (mg ml^{-1}) e k_a ($\text{ml } \mu\text{g}^{-1}$) dos ligantes de arginina, di arginina e tri arginina com o pDNA e RNA

Ligante	pDNA						RNA					
	R^2		$q_{\text{máx}}$ (mg ml^{-1})		K_a ($\text{ml } \mu\text{g}^{-1}$)		R^2		$q_{\text{máx}}$ (mg ml^{-1})		K_a ($\text{ml } \mu\text{g}^{-1}$)	
	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8
arg	0,98	0,98	0,44	0,48	0,47	0,19	0,95	0,99	9,46	5,83	0,060	0,015
di arg	0,91	0,99	0,48	1,36	0,16	0,02	0,99	0,78	14,5	0,25	0,00087	0,0045
tri arg	0,95	0,92	0,43	0,41	0,067	0,24	0,99	0,98	4,28	2,39	0,024	0,0033

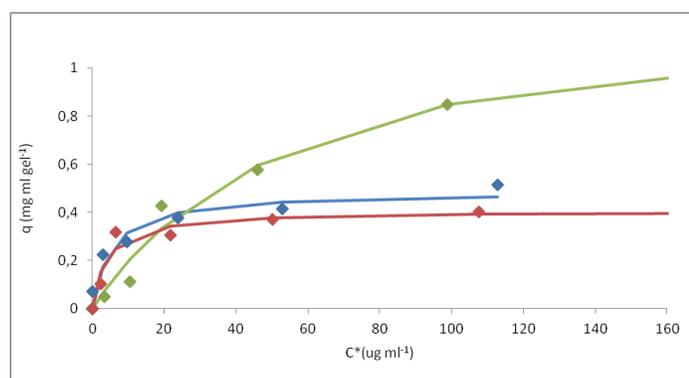


Figura 3 - Dados experimentais obtidos (pontos) e isoterma de adsorção (linhas) ajustadas segundo o modelo Langmuir do pDNA em arginina a pH 8 para o ligante arginina (azul), di arginina (verde) e tri arginina (vermelho), a 25°C.

Verificando as constantes de afinidade, confirma-se o uso de uma estratégia de cromatografia positiva com este tipo de ligante. Apesar da perda de afinidade verificada com o aumento do tamanho do peptídeo, estas apresentam-se sempre consideravelmente superiores para o pDNA. Torna-se pertinente verificar que nos dois casos mencionados acima, em que a capacidade aumenta significativamente, estas constantes caem em uma ordem de grandeza, mostrando uma perda de



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

afinidade. Ressalva-se, de novo, o caráter preliminar destes resultados, em que mais estudos serão necessários de forma a compreender a fundo os mecanismos específicos envolvidos nesta interação.

4. CONCLUSÕES

Dos estudos, verificou-se que é possível adotar uma estratégia de cromatografia positiva para a purificação de pDNA, aproveitando a vantagem das maiores afinidades da matriz em relação ao RNA. Verificou-se que a escolha do pH do processo de adsorção, é fundamental para melhorar a seletividade da matriz relativamente à molécula de interesse e suas impurezas, bem como de aumentar as capacidades de ligação, principal desafio neste tipo de matrizes. Apesar do aumento dos valores de capacidade de ligação verificou-se, em geral, perda de afinidade, que se traduz numa diminuição da força de ligação entre as biomoléculas e a matriz, com o aumento do tamanho do peptídeo. Perante a carência de dados na literatura de adsorção de ácidos nucleicos, os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações valiosas para o desenvolvimento futuro e implementação de ligantes baseados em arginina, de um processo direcionado para a purificação de ácidos nucleicos.

5. REFERÊNCIAS

FREITAS, S.; AZZONI, A.; SANTOS, L.; MONTEIRO, G.; PRAZERES, D. On the stability of plasmid DNA vectors during cell culture and purification. *Mol. Biotechnol.*, v. 36, p. 151–158, 2007.

KIM, M.; KIM, H.; CHAE, S.; LARSON, R.; LEE, H.; PARK, J. Effect of arginine-rich peptide length on the structure and binding strength of siRNA-peptide complexes. *J. Phys. Chem. B*, v. 117, p. 6917–26, 2013.

LEE, D.; LEE, J.; Seok, C. What stabilizes close arginine pairing in proteins? *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 15, p. 5844–53, 2013.

LOWE, C.; LOWE, A.; Gupta, G. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *J. Biochem. and Biophys. Methods*, v. 49, p. 561–574, 2001.

OUYANG, D.; ZHANG, H.; PARREKH, H.; SMITH, S. Structure and dynamics of multiple cationic vectors-siRNA complexation by all-atomic molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B*, v. 114, p. 9231–9237, 2010.

SOUSA, F.; MATOS, T.; PRAZERES, D.; QUEIROZ, J. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Analyt. Biochem.*, v. 374, p. 432–434, 2008.

SOUSA, F.; PRAZERES, D.; QUEIROZ, J. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends Biotechnol.*, v. 26, p. 518–525, 2008.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO

