



**Manuel João de Almeida Albuquerque  
Brandão Matos**  
Licenciado em Bioquímica

**Process development and optimization  
towards the production of a non-  
antibody scaffold-based biotherapeutic**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: António Cunha, Director Unidade Piloto iBET  
Co-orientador: Rute Castro, PhD, Investigadora iBET

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista, FCT-UNL  
Arguente: Prof. Doutor José Paulo Barbosa Mota, FCT-UNL  
Vogal: Prof. Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista, FCT-UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2015

**LOMBADA**





**Manuel João de Almeida Albuquerque  
Brandão Matos**  
Licenciado em Bioquímica

**Process development and optimization  
towards the production of a non-  
antibody scaffold-based biotherapeutic**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: António Cunha, Director Unidade Piloto iBET  
Co-orientador: Rute Castro, PhD, Investigadora iBET

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista, FCT-UNL  
Arguente: Prof. Doutor José Paulo Barbosa Mota, FCT-UNL  
Vogal: Prof. Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista, FCT-UNL

**Process development and optimization towards the production of a non-antibody scaffold-based biotherapeutic.**

**Copyrights © pertencem a Manuel João de Almeida Albuquerque Brandão Matos e à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

Quero começar por agradecer ao meu orientador, António Cunha, que foi o responsável pelo começo desta minha viagem pela Unidade Piloto. Obrigado por me ter aceite como seu mestrando, e pelos seus conselhos sábios e apoio que me deu ao longo do ano. Queria também agradecer à Rute Castro, que foi sem dúvida quem mais me “aturou” este ano, mas que tinha sempre um bom conselho ou opinião a dar mesmo quando estava super atarefada com trabalho.

Quero também dar um grande agradecimento à Leninha que foi a pessoa que mais acreditou em mim, mesmo quando cheguei naquele primeiro dia à Piloto caído de para-quadras e quando no final do dia não me despedi de ninguém. Só lhe tenho a agradecer todas as horas de almoço e partidas divertidas que passei consigo. Queria ainda agradecer aos meus restantes colegas da Piloto, principalmente à Mónica e ao João que foram essenciais para o meu desenvolvimento de capacidades tanto no *upstream* como no *downstream*.

Como não podia deixar de ser queria agradecer à Sílvia. Sempre foste e serás o meu porto seguro e só te posso agradecer por me incentivares a ir mais longe mesmo quando eu próprio duvidava que conseguisse. Tens uma paciência de santa e tens lugar garantido no céu. Para o ano, sou eu a fazer o teu papel, e já sabes vais ter que estar “sempre a pensar na prática Sílvia!”. Por último mas não menos importante queria agradecer à minha família inteira principalmente aos meus pais, sem vocês nada disto era possível (literalmente), ao meu irmão, e à minha fabulo...fantásti... espanto... à minha irmã vá. Obrigado por aturarem o meu mau humor matinal (se calhar não foi só matinal) e por todos os fim-de-semanas que não pude ir a casa por estar a trabalhar. Sei que vos custou mas acho que concordam comigo quando digo que valeu a pena pelo resultado final atingido.



## Resumo

Num contexto de biotecnologia “verde” a tendência em investir em métodos que incorporem microrganismos para produção de compostos biológicos é cada vez maior. O uso destas metodologias, ao contrário de metodologias com métodos químicos, traduzem-se numa maior sustentabilidade a nível económico, social e ambiental.

O desenvolvimento do *upstream* está muito relacionado com o cultivo de microrganismos que expressam proteínas recombinantes. No âmbito deste trabalho foi estudado um tipo específico de proteínas recombinantes chamadas nanofitinas. As nanofitinas tratam-se de proteínas geradas pela técnica de *ribosome display* onde através de diversos ciclos de seleção consegue-se gerar proteínas sintéticas com afinidade para um *target*.

O objetivo deste trabalho experimental foi de implementar um protocolo de produção e purificação de uma nanofitina à escala piloto. No que diz respeito ao *upstream* foram testadas diferentes taxas específicas de crescimento durante a administração do *fed-batch* num bioreactor de 30L, assim como otimização de tempos de operação e condições de cultura à pequena escala foram testados. Foi concluído que o uso de uma taxa específica de crescimento de  $0,175h^{-1}$  durante o *fed-batch* permite maximizar o crescimento microbiano e biomassa produzida assim como o uso de apenas um antibiótico de resistência, ampicilina, otimiza estes mesmos parâmetros. No *downstream* foram estudadas condições que permitissem purificar com sucesso a nanofitina, nomeadamente as técnicas de cromatografia de permuta iónica e interação hidrofóbica. Foi também testada a técnica de filtração tangencial, onde foi concluído que a operação sequencial de dois *cutoffs* diferentes, 30kDa e 5kDa, seguido da técnica de cromatografia de permuta iónica é a metodologia que apresenta produtividades mais elevadas com maior grau de pureza. Visando atingir parâmetros GMP, foi ainda testada a remoção de endotoxinas do produto final. O uso de uma Sartobind STIC nano mostrou remover com sucesso 97% o conteúdo de endotoxinas no produto final.

Palavras-chave: biotecnologia, *upstream*, *downstream*, nanofitina, indústria farmacêutica.



## Abstract

In a context of “green” biotechnology the tendency is to increase investment in methods that rely on microorganisms for the production of biological compounds. The use of these methodologies, contrary to those that rely on the use of chemical components, translate into a higher sustainability in the economical, social and environmental sectors.

The upstream development is deeply connected with the cultivation of microorganisms expressing all kind of recombinant proteins. Regarding this work, special attention was given to a specific type of recombinant protein, nanofitins. Nanofitins are artificial proteins created through the technique of ribosome display which consists in several cycles of selection with the goal of creating a synthetic protein with affinity to a specific target.

The objective in this experimental work was to implement a protocol for the production and purification of a nanofitin at a pilot scale. Regarding upstream analysis, different specific growth rates were tested during fed-batch administration on a 30L bioreactor, as well as operation times and small scale growth conditions were optimized. At upstream it was concluded that the use of a specific growth rate of  $0,175h^{-1}$  during fed-batch is sufficient to maximize the microbial growth and its biomass production, as well as the use of only one resistance antibiotic, ampicillin, managed to optimize these parameters. At the downstream level different conditions were studied, namely the techniques of ion exchange chromatography and hydrophobic interaction. The technique of tangential flow filtration was also tested, showing that the use of this technique with two cutoffs, 30kDa and 5kDa, followed by a cationic exchange chromatography is the combination of techniques which presented higher productivities with higher purity ratio. To fulfill GMP requirements, the remotion of the content of endotoxins in the final product was also assessed. The use of Sartobind STIC nano successfully removed up to 97% of endotoxins content on the final product.

Keywords: biotechnology, upstream, downstream, nanofitin, pharmaceutical industry.



## Índice de matérias

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>III</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Biotecnologia na sociedade.....	1
1.2 Sistemas de expressão de proteínas recombinantes.....	2
1.2.1 Sistemas de expressão procariontes.....	3
1.2.2 Sistemas de expressão eucariontes.....	5
1.3 Síntese de proteínas artificiais: <i>Ribosome display</i> e outras.....	8
1.4 Produção em bioreactores.....	9
1.5 Purificação de proteínas.....	11
1.6 Good Manufacturing Practices (GMP).....	14
1.7 Projeto SADEL.....	14
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>17</b>
2.1. Material Biológico e meios de cultura.....	17
2.2. Cell Bank.....	18
2.3. Fermentações em frasco.....	19
2.4. Fermentações em bioreactor.....	19
2.5. Disrupção celular/Centrifugação.....	20
2.6. Filtração/Clarificação.....	20
2.7. Filtração tangencial (TFF) / Unidades de filtração por centrifuga.....	20
2.8. Cromatografia de permuta iónica (IEX).....	21
2.9. Precipitação fracionada por sulfato de amónia.....	21
2.10. Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC).....	21
2.11. Cromatografia de filtração-gel ou exclusão molecular (SEC).....	22
2.12. Concentração/Troca de tampão.....	22
2.13. Ensaio de deteção de bacteriófagos.....	22
2.14. Análise de metabolitos.....	23
2.15. Análise de clones recombinantes.....	23
2.16. Quantificação de proteína .....	24
2.17. SDS-PAGE/Electroforese em gel de agarose.....	24
2.18. Quantificação de endotoxinas.....	24

<b>3. Resultados e Discussão</b>	<b>25</b>
3.1. Otimização do processo de produção da nanofitina ( <i>upstream processing</i> )	25
3.1.1. Fermentação <i>fed- batch</i> à escala de 30L para produção da S2-modificada	25
3.1.2. Influência de diferentes taxas específicas de crescimento em fermentações <i>fed-batch</i> à escala de 30L	27
3.1.3. Produtividades celulares obtidas em bioreactor	28
3.1.4. Análise de concentração de metabolitos	29
3.1.5. Otimização condições cultura em pequena escala	30
3.1.6. Seleção de clones	32
3.1.7. Detecção de bacteriófagos	34
3.2. Otimização do processo de purificação da nanofitina ( <i>downstream processing</i> )	34
3.2.1. Uso combinado das técnicas de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica (S2-modificada)	35
3.2.2. Otimização das condições de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica (S2-modificada)	37
3.2.3. Efeito do Triton X-100 na filtração tangencial e na cromatografia de permuta iónica (S2-modificada)	39
3.2.4. Efeito de um <i>cutoff</i> de 50kDa na filtração tangencial e na cromatografia de permuta iónica (S2-modificada)	40
3.2.5. Efeito do uso de DTT durante a filtração tangencial (S2-modificada)	42
3.2.6. Efeito combinado do Triton X-100 e DTT na cromatografia de permuta iónica (S2-modificada)	44
3.2.7. Uso combinado de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica com o dímero (S2(L30)S2)	48
3.2.8. Uso combinado da técnica de precipitação fracionada por sulfato de amónia e cromatografia de interação hidrofóbica (S2-modificada)	50
3.2.9. Uso combinado das técnicas de cromatografia de permuta iónica, precipitação fracionada por sulfato de amónia e cromatografia de interação hidrofóbica (S2-modificada)	52
3.2.10. Análise de conformações por filtração-gel (S2-modificada)	55
3.2.11. Remoção de endotoxinas (S2-modificada)	56
3.2.12. Produtividades obtidas nos diferentes processos de purificação de nanofitina testados	57
<b>4. Conclusão</b>	<b>61</b>
<b>5. Bibliografia</b>	<b>63</b>

## Índice de Figuras

Figura 1.1- Comparação de recursos utilizados entre a química tradicional e a biotecnologia num caso de processamento intermediário de antibióticos.....	1
Figura 1.2- Comparação do valor anual total de vendas no mercado biofarmacêutico com o valor anual de vendas dos 10 produtos do mercado mais comercializados.....	2
Figura 1.3- Representação generalizada da estrutura de um LPS.....	4
Figura 1.4-Comparação de sistemas de expressão para produção de biofarmacêuticos: a) Comparação ao longo dos anos da percentagem de aprovação de produtos entre sistemas de expressão mamíferos e não-mamíferos; b) Comparação de aprovação de produtos no período 2010-2014 e cumulativo (1982-2014) nos diferentes sistemas de expressão existentes.....	8
Figura 1.5- Representação da técnica de <i>ribosome display</i> e dos ciclos de seleção utilizados para produção das nanofitinas com especificidade para o <i>target</i> (TNF- $\alpha$ ).....	9
Figura 1.6- Comparação dos diferentes regimes de operação em bioreactor.....	10
Figura 1.7- Representação dos passos sequenciais de <i>downstream</i> visando a purificação de um composto biológico.....	12
Figura 2.1- Representação esquemática dos crescimentos microbianos realizados numa fermentação de escala piloto até ao momento da inoculação no bioreactor.....	19
Figura 2.2- Representação do esquema de montagem do Sistema de TFF implementado.....	21
Figura 3.1- A) Evolução das densidades óticas do microrganismo ao longo do tempo da fermentação, assim como respetivas taxas específicas de crescimento para cada momento. B) Evolução dos diferentes parâmetros controláveis ( <i>Air flow</i> , pO <sub>2</sub> , Temperatura, <i>Anti-foam</i> , agitação e pressão) ao longo do tempo da fermentação. C) Comparação, em percentagem, entre os perfis de consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono ao longo do tempo da fermentação. D) Comparação dos perfis de administração dos dois feedings ao longo do tempo da fermentação.....	25
Figura 3.2- Comparação das pressões, agitações e pO <sub>2</sub> ao longo do tempo de duas fermentações à escala de 30L com dois microrganismos distintos, SHuffle S2-modificada e Acella S1-modificada.....	26
Figura 3.3- A) Comparação da evolução das densidades óticas do microrganismo ao longo do tempo das fermentações, assim como respetivas taxas específicas de crescimento para cada momento. B) Comparação de pressões, agitações e pO <sub>2</sub> de fermentações com $\mu$ de 0.2h <sup>-1</sup> e 0.175h <sup>-1</sup> ao longo do tempo.....	27
Figura 3.4- Concentração de Glucose, magnésio e acetato ao longo do tempo da fermentação da SHuffle S2-modificada.....	29
Figura 3.5- Perfil de crescimento da SHuffle S2-modificada em diferentes condições.....	30
Figura 3.6-Representação gráfica dos diferentes valores de células (em logaritmo) em função do tempo para cada uma das condições estudadas.....	31
Figura 3.7- SDS-PAGE das diferentes condições de crescimento microbiano. ....	31
Figura 3.8- A) Número de cópias de plasmídeo por célula dos diferentes clones estudados. B) Gel de agarose referente aos diferentes clones estudados.....	32

Figura 3.9- SDS-PAGE referente às produtividades em nanofitina dos diferentes clones estudados.....	33
Figura 3.10- A) Resultados do teste, em placas de Petri, acerca da presença de bacteriófagos T2 em <i>E. Coli Acella</i> e <i>E. coli DH5α</i> . B) Resultados do teste, em placas de Petri, acerca da presença de bacteriófagos phiX174 em <i>E. Coli Acella</i> e <i>E. coli DH5α</i> .....	34
Figura 3.11- Processo de purificação para nanofitinas iniciais do projeto SADEL.....	35
Figura 3.12- Processo de purificação para a S2-modificada com o uso combinado das técnicas de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica.....	35
Figura 3.13- A) SDS-PAGE referente às filtrações tangenciais de 30kDa e 5kDa do processo 3.2.1. B) SDS-PAGE referente à eluição da IEX do processo 3.2.1.....	36
Figura 3.14- Cromatograma referente à eluição da IEX do processo 3.2.1.....	36
Figura 3.15- SDS-PAGE referente à determinação do ponto isoeléctrico da S2-modificada (pH 5, 6 e 7).....	37
Figura 3.16- Processo de purificação para a S2-modificada com condições otimizadas para o uso combinado das técnicas de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica.....	37
Figura 3.17- SDS-PAGE referente à operação na filtração tangencial (30kDa+5kDa) e na IEX do processo 3.2.2.....	38
Figura 3.18- Cromatograma referente à eluição da IEX do processo 3.2.2.....	38
Figura 3.19- SDS-PAGE referente ao estudo do efeito do Triton X-100 na membrana de 30kDa durante a filtração tangencial do processo 3.2.3. ....	39
Figura 3.20- SDS-PAGE referente à operação de TFF (50kDa+5kDa) e da IEX do processo 3.2.4.....	40
Figura 3.21- Cromatograma referente à primeira eluição da IEX do processo 3.2.4.....	40
Figura 3.22- Cromatograma referente à segunda eluição da IEX do processo 3.2.4.....	41
Figura 3.23- SDS-PAGE referente ao teste de eluição por passos na IEX do processo 3.2.4.....	41
Figura 3.24- SDS-PAGE referente ao estudo do efeito do DTT na membrana de 30kDa de TFF do processo 3.2.5.....	43
Figura 3.25 – Processo de purificação do processo 3.2.6.....	44
Figura 3.26- Cromatograma referente à primeira eluição da IEX do processo 3.2.6.....	44
Figura 3.27- SDS-PAGE referente à operação na IEX do processo 3.2.6.....	45
Figura 3.28- Cromatograma referente à segunda eluição da IEX do processo 3.2.6.....	46
Figura 3.29- SDS-PAGE referente à segunda operação na IEX do processo 3.2.6.....	46
Figura 3.30- SDS-PAGE referente à operação de TFF com o eluído da figura 3.29.....	47
Figura 3.31- A) SDS-PAGE referente à clarificação e à operação de TFF do processo 3.2.7. B) SDS-PAGE referente à eluição da IEX do processo 3.2.7. ....	48
Figura 3.32- Cromatograma referente à eluição da IEX do processo 3.2.7.....	49
Figura 3.33- SDS-PAGE referente aos testes de precipitação fracionada por sulfato de amónia.....	50
Figura 3.34- Cromatograma referente à eluição da HIC do processo 3.2.8.....	51
Figura 3.35- SDS-PAGE referente à operação na HIC do processo 3.2.8.....	51

Figura 3.36- Processo de purificação usando as técnicas de IEX, precipitação fracionada por sulfato de amónia e HIC juntas. ....	52
Figura 3.37- Cromatograma referente à primeira eluição da HIC do processo 3.2.9. ....	52
Figura 3.38- SDS-PAGE referente à precipitação fracionada por sulfato de amónia e à operação na HIC do processo 3.2.9. ....	53
Figura 3.39- Cromatograma referente à segunda eluição da HIC do processo 3.2.9. ....	53
Figura 3.40- SDS-PAGE referente à segunda operação na HIC do processo 3.2.9. ....	54
Figura 3.41- Cromatograma referente à operação em filtração-gel das condições A e B. ....	55
Figura 3.42- Cromatograma referente à operação em filtração-gel das condições C, D e E. ....	55



## Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Tabela dos 10 produtos biofarmacêuticos mais vendidos em 2013.....	3
Tabela 1.2- Comparação entre os diferentes sistemas de expressão.....	7
Tabela 2.1- Composição do meio 2YT usado no Cell Bank e nas fermentações em frasco.....	17
Tabela 2.2- Composição do meio quimicamente definido usado nas fermentações do bioreactor.....	17
Tabela 2.3- Composição da solução stock de Cloreto de Ferro.....	18
Tabela 2.4- Composição da solução stock de <i>Trace Elements</i> .....	18
Tabela 2.5- Composição do Feeding 1 usado nas fermentações do bioreactor.....	18
Tabela 2.6- Composição do Feeding 2 usado nas fermentações do bioreactor.....	18
Tabela 3.1- Comparação das diferentes condições de crescimento das fermentações e respectivas biomassas obtidas para cada processo.....	28
Tabela 3.2- Comparação dos diferentes valores de taxas específicas de crescimento obtidas para cada uma das condições estudadas.....	31
Tabela 3.3- Comparação dos diferentes pesos moleculares da nanofitina nas condições estudadas em filtração-gel com base na recta de calibração realizada.....	56
Tabela 3.4- Diferentes parâmetros relativos à credibilidade e confiança da leitura do teor de endotoxinas antes e depois da passagem na STIC.....	57
Tabela 3.5- Comparação de diferentes parâmetros entre os processos estudados em <i>downstream</i> tais como quantidade de proteína produzida, produtividades e relatividade de impurezas.....	58
Tabela 3.6- Comparação de diferentes parâmetros entre os processos estudados em <i>downstream</i> .....	58



## Listas de abreviaturas, siglas e símbolos

$\mu$ - Taxa específica de crescimento  
AC- Cromatografia de afinidade  
Acella S1-modificada- *E. coli* *Acella pLysS*  
AcMNPV- *Autographa californica* multiple NPV  
Albumina de soro bovino- BSA  
BHK- Baby hamster kidney  
CHO- Chinese hamster ovary  
CSTR- Continuous flow stirred-tank reactor  
DCW- Dry cell weight  
DNA- Ácido desoxirribonucleico  
DTT- Ditioneitol  
GMP- Good Manufacturing Practices  
HEK- Human embryo kidney  
HIC- Cromatografia de interação hidrofóbica  
IEX- Cromatografia de permuta iônica  
IPTG- Isopropil  $\beta$ -D-tiogalacto-piranozideo  
IVC- in vitro compartmentalization  
LAL- Limulus amoebocyte lysate  
LPS- Lipopolissacarídeo  
NS0- Mouse myeloma  
OD<sub>595nm</sub>- Densidade óptica a 595nm  
PES- Poliétersulfona  
PFR- Plug Flow Reactor  
PFU – Plaque Forming Unit  
RF- Release Factors  
RPC- Cromatografia de fase reversa  
S1- Sequência 1  
S1-modificada – Sequência 1 modificada  
S2- Sequência 2  
S2-modificada – Sequência 2 modificada  
SHuffle S2-modificada- *E. coli* *SHuffle T7 Express pLysY*  
SADEL- Scaffolds for Alternative Delivery  
SDS-PAGE- Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis  
SEC- Cromatografia de exclusão molecular  
TFF- Filtração tangencial  
TNF  $\alpha$ - Tumour necrosis factor  $\alpha$



# 1. Introdução

## 1.1 Biotecnologia na sociedade

Quando no século XIX começaram a surgir os primeiros relatos que determinados compostos poderiam ser transformados noutros, inclusivamente em compostos que não existiam na natureza, os cientistas estavam longe de imaginar que esse era o ponto de viragem para uma revolução na sociedade científica que via os compostos orgânicos segundo uma ideologia de vitalismo, em que os mesmos eram dotados de uma força vital que não era passível de ser explicada nem transformada. O ponto de viragem deu-se em 1828 quando Friedrich Wöhler conseguiu transformar cianato de amónia em ureia por um método que acabou por ficar conhecido como a síntese de Wöhler. O cientista alemão foi o primeiro a conseguir realizar uma transformação de uma espécie química em ureia sem recurso ao material biológico inicial, neste caso rinos como era o procedimento usual da época. Seguindo as pisadas de Wöhler outros cientistas conseguiram criar espécies químicas a partir de outras, algumas completamente sintéticas e que não existiam na natureza como foi o caso da criação de corantes, drogas, polímeros e fármacos.

Apesar de estes processos iniciais terem sido revolucionários para a época e terem sido um ponto de partida para a descoberta e desenvolvimento de novos compostos, estes processos encontram-se desatualizados e descontextualizados da realidade atual principalmente por serem métodos exclusivamente químicos. Cada vez mais no contexto farmacêutico atual as empresas deparam-se com um desinvestimento na produção de fármacos através do processo de síntese química, estando este a ser gradualmente substituído por processos de síntese biológica através do uso de microrganismos geneticamente modificados.<sup>1</sup> De facto o uso de processos tradicionais de síntese orgânica traz consequências a longo prazo, destacando-se notoriamente as consequências relativamente à poluição ambiental. Cada vez mais a sociedade exige que os processos industriais sejam sustentáveis, e para isso acontecer o processo tem de se reger por três critérios para poder ser considerado como tal: economicamente sustentável; socialmente sustentável e ambientalmente sustentável. Como é evidente todos estes parâmetros têm a sua devida importância; se um processo não for economicamente sustentável, isto é, se a sua atividade não der lucro não se trata de um bom investimento. O mesmo se aplica se um processo não for socialmente sustentável isto é, se o processo não for aceite por parte da sociedade em que está inserido dificilmente se conseguirá enraizar na sociedade. Porém, o que faz com que haja uma maior procura por processos de biotecnologia é o facto de se tratarem de processos ambientalmente sustentáveis. Como a Figura 1.1 mostra, num caso de processamento de antibióticos o processo químico tradicional acaba por consumir muito mais eletricidade, água e produzir mais dióxido de carbono do que quando comparado com um processo alternativo de biotecnologia. Ser ambientalmente sustentável faz com que ao mesmo tempo o processo seja economicamente viável pois ao ter sistemas que consumam menos eletricidade, água e que produzam menos poluentes existirá uma margem de lucro potencial muito maior. Constata-se então que os produtos gerados pela biotecnologia são mais rentáveis, têm maior durabilidade, são menos tóxicos e mais facilmente são recicláveis e biodegradáveis.<sup>2,3</sup>

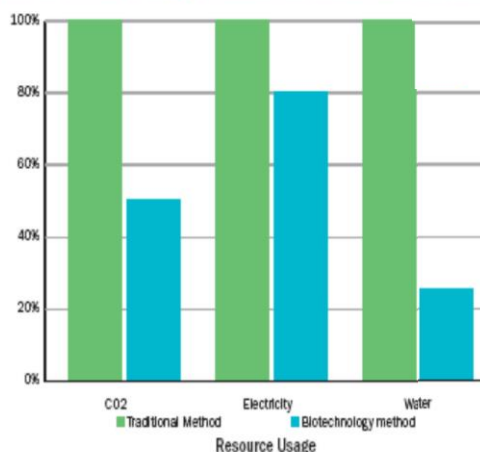


Figura 1.1- Comparação de recursos utilizados entre a química tradicional e a biotecnologia num caso de processamento intermediário de antibióticos.<sup>3</sup>

Grande parte do mercado da biotecnologia destina-se à produção de proteínas recombinantes sendo estimado que no final de 2013 se tenha atingido neste setor um valor de 140 mil milhões de euros mundialmente, como mostra a Figura 1.2.<sup>4</sup> A implementação e enraizamento da biotecnologia na sociedade atual só se tornou possível devido aos inúmeros avanços que a área da biologia celular e molecular sofreu ao longo das décadas, nomeadamente na produção de proteínas recombinantes. Esta evolução tornou possível fazer inserções, mutações ou até mesmo deleções nos genomas de diferentes microrganismos, permitiu obter microrganismos produtores de certos compostos de interesse que de outra forma seriam considerados exógenos para o próprio sistema.<sup>5</sup>

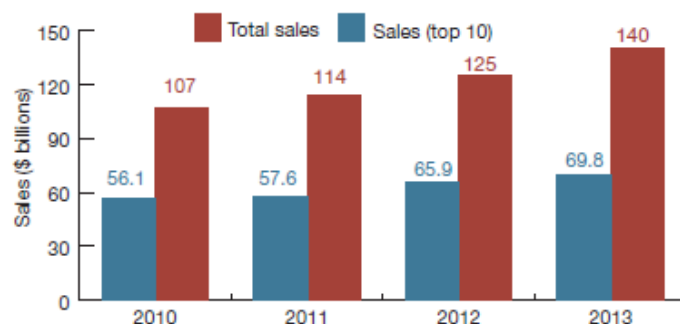


Figura 1.2- Comparação do valor anual total de vendas no mercado biofarmacêutico com o valor anual de vendas dos 10 produtos do mercado mais comercializados.<sup>4</sup>

Hoje em dia é praticamente rotineira a produção de uma proteína recombinante sendo para tal apenas preciso que se consiga fazer com que o gene de interesse seja clonado num determinado vetor, vetor esse que vai ser inserido no organismo em que se pretende expressar a proteína de interesse, que depois será responsável pela produção da mesma. Apesar da metodologia para obter uma proteína recombinante parecer simples, este processo tem de ser cuidadosamente pensado de modo a que se consiga obter o máximo de produtividade, com o mínimo custo e com o máximo de pureza.

## 1.2 Sistemas de expressão de proteínas recombinantes

Quando se pretende produzir um composto de interesse num microrganismo geneticamente modificado (quer seja uma proteína recombinante, um antibiótico, uma vitamina, uma enzima ou uma hormona) é importante analisar as características do mesmo pois estas irão influenciar a escolha do microrganismo de expressão. Existem inúmeras plataformas de expressão possíveis para produzir um composto recombinante entre as quais se destacam as bactérias, as leveduras, as células de mamífero e de inseto, os fungos e ainda as plantas. Todos estes organismos têm as suas particularidades e características que fazem com que seja essencial o estudo do composto que se pretende expressar pois as suas especificações podem não ir de acordo às que o microrganismo consegue corresponder. Como tal, o passo da escolha do sistema de expressão assume-se como crucial pois irá delinear todas as tecnologias, ferramentas moleculares, equipamentos e reagentes necessários para executar o bioprocessamento.<sup>6</sup> Fatores como qualidade da proteína, tempo e velocidade de produção, rendimento e custo do processo são critérios que têm um peso preponderante na hora de escolher o sistema de expressão adequado.

Na tabela seguinte encontram-se representados os 10 produtos biofarmacêuticos que maior receita geraram em 2013, assim como a empresa responsável pela produção e venda do produto e também o sistema de expressão utilizado na produção da proteína recombinante.<sup>4</sup>

Tabela 1.1 – Tabela dos 10 produtos biofarmacêuticos mais vendidos em 2013.<sup>4</sup>

Ranking	Nome produto	Vendas (em milhar de milhões de €)	Empresa produtora	Sistema de expressão
1	Humira	11.00	AbbVie & Eisai	Células de mamífero ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
2	Enbrel	8.76	Amgen, Pfizer, Takeda Pharmaceuticals	Células de mamífero ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
3	Remicade	8.37	J&J, Merck & Mitsubishi Tanabe Pharma	Células de mamífero ( <i>Murine Myeloma</i> )
4	Lantus	7.95	Sanofi	Células bacterianas ( <i>Escherichia coli</i> )
5	Rituxan/MabThera	7.91	Biogen-IDEC, Roche	Células de mamífero ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
6	Avastin	6.97	Roche/Genentech	Células de mamífero ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
7	Herceptin	6.91	Roche/Genentech	Células de mamífero ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
8	Neulasta	4.39	Amgen	Células bacterianas ( <i>Escherichia coli</i> )
9	Lucentis	4.27	Roche/Genentech, Novartis	Células bacterianas ( <i>Escherichia coli</i> )
10	Epogen/Procrit/Eporex/ESPO	3.35	Amgen, J&J, KHK	Células de mamífero ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )

É notória desde logo a relevância e incidência que as células de mamífero possuem na tabela anterior. De facto as células de mamífero acabam por acarretar grande parte dos lucros existentes na produção de proteínas recombinantes na indústria biotecnológica, porém existem muitos outros sistemas de expressão que serão de seguida descritos.

### 1.2.1 Sistemas de expressão procariontes

Nos sistemas de expressão bacterianos, o organismo mais utilizado para produção de proteínas recombinantes é inequivocamente a *Escherichia coli*. A *E. coli* reúne diversas características que fizeram dela a bactéria de eleição no universo biotecnológico para produções deste tipo. As vantagens da utilização deste microrganismo são bem conhecidas e irão ser descritas de seguida. A cinética de crescimento que a *E. coli* possui é extremamente rápida podendo atingir um tempo de duplicação celular de apenas 20 minutos em condições ótimas de crescimento.<sup>7</sup> Uma das características que se procura em todos os bioprocessos da indústria farmacêutica é também a maximização da produtividade. Em *E. coli* é possível realizar cultivos de alta densidade celular em bioreactores, o que implica aumento do número de células disponíveis para produzir um composto específico e portanto aumento da respetiva produtividade. Com o cultivo de *E. coli* facilmente se consegue potenciar o seu crescimento até elevadas densidades celulares, existindo relatos de estirpes deste microrganismo que atingem valores tão altos como de 200g[DCW(*dry cell weight*)]/L<sup>8</sup>. O uso de *E. coli* para produções de proteínas recombinantes tem ainda as vantagens de ser rápida a expressão da proteína desejada, de facilmente ser cultivada em diferentes tipos de meio (definido e rico) e de ser um organismo que permite modificações genéticas sem ser necessário recorrer a técnicas de biologia molecular complexas.

Com todo o progresso que o mundo da biologia molecular sofreu, com a compreensão de fenómenos complexos como a transcrição, a tradução e o *fold*ing de proteínas em *E. coli*, juntamente com a maior disponibilidade de diversas ferramentas genéticas, estão a tornar este

microrganismo mais versátil, podendo adaptá-lo para produção de proteínas naturalmente presentes em organismos eucariontes. Além de ser fácil a manipulação genética em *E. coli*, o controle dos promotores não é difícil de atingir e consegue-se acumular até 80% do seu DCW em proteína recombinante.<sup>5</sup>

Apesar de todas estas vantagens, o uso de *E. coli* pode trazer alguns inconvenientes tais como a formação de corpos de inclusão, problemas em produzir proteínas que necessitam de modificações pós-translacionais (mais evidente em proteínas com glicosilações) e a presença de endotoxinas no produto final. A expressão de elevados níveis de proteínas heterólogas em *E. coli* tem muitas vezes um efeito adverso no sistema metabólico do organismo acabando por levar à formação de corpos de inclusão. Corpos de inclusão são agregados de proteína inativa, insolúvel, com a conformação errada e que se encontra desprovida de atividade biológica.<sup>5,9,10</sup> De volta a formar proteína com função biológica seguem-se passos de destruição dos corpos de inclusão através do uso de agentes desnaturantes, de destruição de pontes dissulfeto com agentes redutores, sendo apenas depois que a proteína é renaturada. Este processo acaba por pecar pela sua morosidade e por ser um processo caro do qual nunca se consegue obter a totalidade da proteína conseguindo-se apenas aproveitar entre 15 a 25% da proteína total<sup>9,10,11</sup>. Como tal, outras estratégias surgiram para evitar a formação de corpos de inclusão como o cultivo de *E. coli* a temperaturas baixas, o que promove a estabilidade e funcionalidade de chaperones e diminui a atividade de proteases, e também o uso de estirpes especializadas que conseguem suportar o fardo metabólico que é a produção de proteínas heterólogas e que conseguem expressar as mesmas de forma solúvel.<sup>6,10</sup> A clonagem de um gene de interesse juntamente a outro que codifica uma proteína cuja solubilidade na célula é conhecida formando então uma proteína de fusão, como a *maltose binding protein* e a *Glutathione-S-transferase*, é ainda outra possibilidade de aumentar a solubilidade da proteína.<sup>12,13</sup> O uso destas técnicas de engenharia genética para criação deste tipo de proteínas de fusão é útil também no que diz respeito ao *downstream* ao auxiliar passos posteriores de purificação.<sup>14</sup>

Como já foi referido outro dos impedimentos do uso de *E. coli* para produção de qualquer tipo de proteína é o facto de este microrganismo não ter a capacidade para realizar modificações pós-translacionais. Como tal, quando este tipo de modificações como glicosilações, acetilações entre outras são estritamente necessárias para a atividade e estabilidade da proteína, outro sistema de expressão é requerido. A produção de proteínas recombinantes em *E. coli* visando as aplicações clínicas tem ainda a desvantagem da produção de endotoxinas. Endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) que se encontram presentes na membrana celular de bactérias gram-negativas como a *E. coli*. Uma representação generalista destes LPS encontra-se na Figura 1.3. Estes LPS são constituídos por 3 regiões distintas cada uma com composições distintas: o lípido A, o oligossacarídeo central e o Antígeno-O. As endotoxinas exercem a sua ação interagindo com componentes do sistema imunitário ativando-o. Destacam-se particularmente os monócitos e macrófagos que são ativados e que como resposta libertam diversos compostos como mediadores (por exemplo *tumour necrosis factor  $\alpha$*  (TNF  $\alpha$ )), interleucinas, prostaglandinas e radicais livres. A libertação destes compostos tem consequências fisiológicas como alterações na estrutura e função dos órgãos e células, alterações metabólicas, aumento de temperatura corporal, indução de choque anafilático e ativação da cascata de coagulação.<sup>15-17</sup> Existindo relatos que a uma concentração de apenas 1ng/mL de endotoxinas no produto final é suficiente para induzir algum dos efeitos referidos, percebe-se que tenha de existir um controlo e monitorização de endotoxinas rígido para que um biofármaco possa passar os testes clínicos e assim se poder proceder à sua formulação como bioterapêutico<sup>17</sup>.

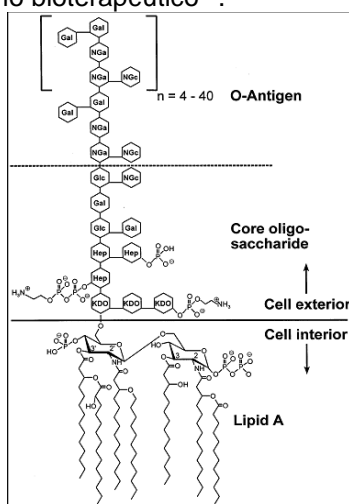


Figura 1.3- Representação generalizada da estrutura de um LPS.<sup>15</sup>

Apesar de a *E. coli* ser a bactéria que é mais regularmente usada quer no contexto académico quer no contexto industrial, esta bactéria não é a única a ser utilizada podendo destacar-se outras bactérias pertencentes ao género *Bacillus*, como a *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus licheniformis*. Este género de bactérias reúne algumas características favoráveis à produção de proteínas recombinantes como o facto de não existir produção de endotoxinas por se tratarem de bactérias gram-positivas e de as proteínas serem secretadas para o meio de crescimento, reduzindo assim custos de *downstream processing* evitando a disrupção celular. Existe porém uma desvantagem associada ao uso deste microrganismo que é a produção de muitas proteases que muitas vezes destroem o composto-alvo inviabilizando portanto produtividades muito elevadas.<sup>18</sup>

### 1.2.2 Sistemas de expressão eucariontes

Quando a proteína recombinante desejada não consegue ser produzida em *E. coli* devido a não ter a capacidade de realizar modificações pós-translacionais para garantir a atividade e estabilidade da proteína, muitas vezes o sistema de expressão alternativo escolhido são as leveduras, destacando-se a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Pichia pastoris*. As leveduras apresentam um conjunto de vantagens sobre os restantes organismos para a produção de proteínas, tais como: boas produtividades mesmo em meio definido; inexistência de endotoxinas; manipulação genética relativamente simples; capacidade de realizar modificações pós-translacionais como fosforilação, acetilação, glicosilação; e capacidade de excretar a proteína para o meio de fermentação.<sup>5,19</sup>

A levedura *Pichia pastoris* acaba por se distinguir das restantes por reunir algumas características que se assumem como potencialmente interessantes na exploração deste organismo na produção de proteínas recombinantes. Este organismo é uma levedura metilotrófica, isto é, possui uma via metabólica que lhe permite servir-se do metanol como fonte de carbono, substrato esse que para a maioria dos outros organismos é tóxico. Isto aliado ao facto de os promotores associados ao metabolismo do metanol encontrarem-se entre os mais estritamente regulados e os mais fortes que a *Pichia pastoris* possui, permite que esta levedura possa sofrer indução da produção da proteína desejada apenas mudando a fonte de carbono para metanol na altura indicada (isto tudo implica que a sua expressão esteja associada aos promotores dos genes que codificam para as enzimas que regulam o metabolismo do metanol).<sup>5,20-22</sup>

Uma das características já referidas que faz com que a implementação deste sistema de expressão seja cada vez maior é o facto de realizar modificações pós-translacionais de onde se destaca a realização de glicosilações. As glicosilações são das modificações pós-translacionais mais comuns e ao mesmo tempo mais complexas da biologia. Estas modificações muitas vezes são o que determinam a atividade biológica, além de permitirem um maior tempo de meia-vida em circulação, são importantes também para a sua termoestabilidade, a sua imunogenicidade e a sua solubilidade. Porém, as glicosilações são específicas para cada organismo e no caso dos humanos são ainda específicas de tecido para tecido. É o facto de cada organismo glicosilar de uma maneira diferente as proteínas que traz problemas na produção de proteínas heterólogas nalguns sistemas de expressão. No caso das leveduras, tipicamente estas glicosilam apenas com resíduos de manose. As glicosilações podem ser N ou O-linked sendo que estas últimas têm uma incidência biológica muito menor. Estas acontecem no grupo hidroxilo das cadeias laterais dos aminoácidos serina e treonina das proteínas e enquanto que nos organismos eucariontes superiores ocorrem adições de diferentes tipos de açúcares como galactose, N-acetilgalactosamina e ácido siálico, nas leveduras a adição são apenas de resíduos de manose.<sup>5,20,22</sup>

As glicosilações N-linked já são mais comuns e as etapas do seu processo de formação começam no átomo de nitrogénio presente na cadeia lateral de uma asparagina. Existe de seguida diferentes fases do processamento deste tipo de glicosilação tais como: *assembling* do oligossacarídeo central; a sua transferência para o sítio específico na proteína, sucessiva eliminação de alguns resíduos por parte de glucosidases e  $\alpha$ -1,2 manosidases e substituição por resíduos de manose.<sup>1,5,20,22,23</sup> É justamente estes resíduos de manose em excesso (hipermanosilações) que se apresentam como uma desvantagem do uso de leveduras para produção de proteínas heterólogas. Estas hipermanosilações acarretam problemas como aumento de imunogenicidade, redução de atividade e redução de afinidade a receptores.<sup>5</sup> Uma das tentativas de ultrapassar esta desvantagem passa por tentar “humanizar” a glicosilação. Visando atingir este objetivo, foram eliminados genes de levedura que codificam enzimas

responsáveis por reações características de levedura, como a manosiltransferase, e estes foram substituídos por genes funcionais de mamíferos que codificam enzimas características da glicosilação humana, como as manosidases e outras transferases.<sup>23,24</sup>

Até agora, todos os sistemas de expressão referidos baseiam-se em organismos unicelulares, sendo que nenhum dos sistemas abordados incidiu nas células animais. As células animais revolucionaram o mundo da biotecnologia principalmente devido às características semelhantes que apresentam em relação às células humanas, evitando assim problemas de incompatibilidade. Um dos sistemas de expressão possíveis de ser utilizado trata-se das células de inseto através de infecção por baculovirus. Até à primeira metade do século XX, o uso destas células destinava-se apenas para estudo da fisiologia dos insetos e produção *in vitro* de baculovirus como agente biológico no controlo de pestes. Desde que se descobriu que é possível modificar geneticamente os baculovirus, e ao mesmo tempo conhecendo o seu modo de infecção com ciclo de vida lítico em linhas celulares de inseto, foi possível desenvolver bioprocessos visando a produção de proteínas recombinantes.

O baculovirus mais comumente utilizado em biotecnologia é o *Autographa californica* multiple NPV (AcMNPV), que apresenta grande capacidade de infetar células de inseto lepidópteros, mais notoriamente as Sf-9 e High-Five. Este tipo de baculovirus tem uma primeira fase de infecção em que após serem ingeridos os corpos de oclusão (partículas constituídas por nucleocapsídeos que são revestidas por uma matriz de polihedrina) pelas células e de ser libertado o seu material genético para o interior do hospedeiro, o seu ácido desoxirribonucleico (DNA) é replicado e transcrito no núcleo, é feita de seguida o *budding* dos nucleocapsídeos que vão por sua vez perpetuar a transmissão da infecção. No final da fase de infecção através da lise celular provocada, novos corpos de oclusão são libertados que são responsáveis por continuar a transmissão da infecção<sup>25</sup>.

Este sistema de expressão apresenta algumas características que podem ser vistas como vantagens, tais como por exemplo a segurança no uso deste tipo de material biológico visto que os baculovirus não têm a capacidade de infetar células de vertebrados garantindo portanto segurança para os humanos. Este sistema é capaz também de produzir altos níveis da proteína heteróloga devido ao facto de a expressão da mesma estar associada a promotores muito fortes que estão associadas à produção da polihedrina. Como se tratam de células eucariontes estas têm ainda a capacidade de realizar modificações pós-translacionais. Destaca-se ainda o facto de estas linhas celulares poderem ser adaptadas para crescerem de em suspensão e na ausência de soro animal facilitando o *scale-up*. Por último, de salientar ainda a possibilidade de se poder produzir diferentes proteínas heterólogas ao mesmo tempo devido à capacidade de se poder fazer múltiplos *inserts* no genoma destes baculovirus que têm um genoma flexível e de grande dimensão ou da possibilidade de co-infecção usando para este efeito diversos baculovirus<sup>25-27</sup>.

No entanto o uso deste tipo de sistema tem as suas desvantagens, tais como mudanças fisiológicas e morfológicas das células de inseto à medida que o número de passagens realizadas é maior. Estas mudanças, causadas pelo *passage effect* têm como consequência um decréscimo na produtividade e no crescimento celular. Outra desvantagem é muitas vezes a expressão da proteína não atingir os níveis desejados pois os promotores associados (polihedrina ou p10) só serem expressos em maior atividade na última fase de infecção, altura em que a maquinaria celular poderá não estar preparada para produzir à taxa máxima a proteína heteróloga. As modificações pós-translacionais nestas células eucariontes poderá também não ser a mais adequada, pois ocorrem vestígios de fucose na estrutura que não ocorrem em mamíferos. Muitas das vezes não é realizada também a sialização dos resíduos o que diminui o tempo de circulação e estabilidade da proteína.<sup>25</sup>

Outro sistema de expressão existente são as células de mamífero que muitas das vezes são o sistema de expressão predileto na produção de proteínas recombinantes, tratando-se inclusivamente do sistema mais utilizado na produção de anticorpos monoclonais. Esta preferência recai maioritariamente devido ao facto de os padrões de mecanismos regulatórios serem os mesmos que sucedem nos humanos e como tal existe produção de uma proteína que não é considerada exógena pelo sistema imunitário humano. As células de mamífero passaram por alterações significativas desde os meados dos anos 80, tendo não só ultrapassado os sistemas de expressão microbianos em número de aplicações terapêuticas como também em volume de vendas. O que mais contribuiu para este aumento de vendas neste sistema de expressão foi o seu aumento de produtividade específica de onde se passou de processos que rendiam mg/L para processos que atualmente rendem g/L de produto. Este aumento de produtividade deve-se a anos de estudo e investigação que levou a uma melhor

compreensão da fisiologia das células de mamífero, do seu metabolismo, dos seus mecanismos regulatórios de transcrição e tradução e também fruto de um maior conhecimento da sua cinética de crescimento e de morte<sup>28,29</sup>. Melhoramentos a nível de otimização do meio de cultura, de métodos de *screening* de clones, de técnicas e vetores de transfecção foram cruciais para o desenvolvimento do cultivo das células de mamífero no panorama biotecnológico. Células de mamífero como as *Chinese Hamster Ovary* (CHO), as *Mouse myeloma* (NS0), as *Baby hamster kidney* (BHK) e as *Human embryo kidney* (HEK) são as células mais comumente utilizadas tendo diferentes características em padrões de glicosilação, produtividades, sensibilidades a fatores externos e regime de cultivo.

Por último, dois sistemas de expressão menos comumente utilizados mas que necessitam de ser referenciados: as plantas transgênicas e os fungos. As plantas transgênicas têm características que se assumem como vantajosas tais como a sua segurança, o seu custo baixo e rápida expressão, a existência de compartimentalização e armazenamento em órgãos da planta. Como já foi referido outra das vantagens é o baixo custo de produção pois para o seu cultivo bastam sais minerais, água e luz solar para se desenvolverem. Os fungos, mais notoriamente *Aspergillus niger*, têm capacidade de realizar modificações pós-translacionais e possuem estabilidade genética elevada devido à existência de *tandem repeats* nos seus cromossomas. Existem porém problemas na produtividade pois apesar de existirem integrações de plasmídeos *high copy number*, tal não se reflete na quantidade de proteína produzida. O maior problema da produtividade neste microrganismo passa-se a nível transcricional por falta de maquinaria regulatória suficiente na célula e também devido à elevada quantidade de proteases existentes nos fungos.<sup>5</sup>

Tabela 1.2- Comparação entre os diferentes sistemas de expressão.

Características	Bactérias	Leveduras	Células de inseto	Células de mamífero
Crescimento celular	<b>Rápido</b>	<b>Lento</b>	<b>Lento</b>	<b>Lento</b>
Complexidade do meio de crescimento	<b>Complexo/Definido</b>	<b>Complexo/Definido</b>	<b>Definido (Serum-free medium)</b>	<b>Definido</b>
Custo do meio de crescimento	<b>Barato/Caro</b>	<b>Barato/Caro</b>	<b>Caro</b>	<b>Caro</b>
Rapidez de expressão	<b>Rápido</b>	<b>Lenta</b>	<b>Lenta</b>	<b>Lenta</b>
<i>Folding</i> de proteínas heterólogas	<b>Incorreto se proteína tiver pontes S-S</b>	<b>Correto</b>	<b>Correto</b>	<b>Correto</b>
Modificações pós-translacionais	<b>Não é capaz</b>	<b>Sim (Resíduos de manose)</b>	<b>Sim (Resíduos de fucose)</b>	<b>Sim</b>
Endotoxinas	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>

Como a Figura 1.4 mostra, o nível de aprovações de produtos biofarmacêuticos ao longo dos anos produzidos em sistemas de expressão de células de mamífero representa mais de metade das aprovações existentes até 2014, sendo que por si só as células CHO apresentam mais aprovações que qualquer outra plataforma de expressão, informação que vem a corroborar a Tabela 1.1.

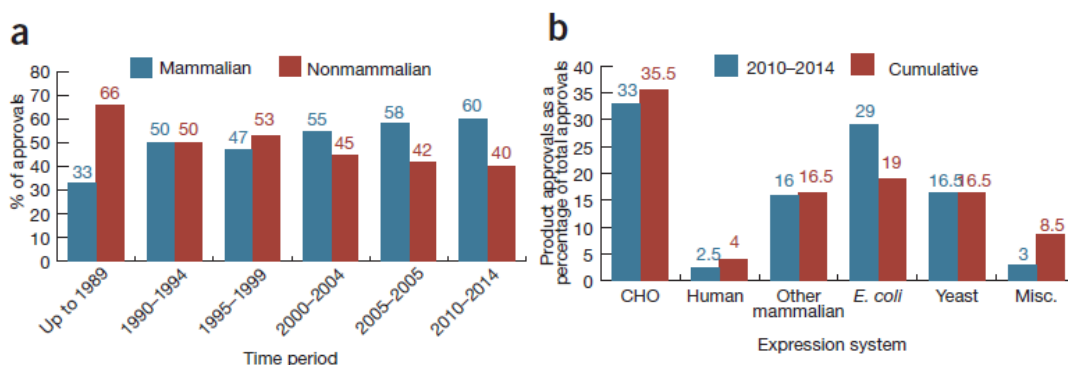


Figura 1.4- Comparação de sistemas de expressão para produção de biofarmacêuticos: a) Comparação ao longo dos anos da percentagem de aprovação de produtos entre sistemas de expressão mamíferos e não-mamíferos; b) Comparação de aprovação de produtos no período 2010-2014 e cumulativo (1982-2014) nos diferentes sistemas de expressão existentes.<sup>4</sup>

### 1.3 Síntese de proteínas artificiais: *Ribosome display* e outras

A produção de proteínas recombinantes artificiais pode ser conseguida através de diversas metodologias. No âmbito do projeto *Scaffolds for Alternative Delivery* (SADEL), a técnica de biologia molecular utilizada para detetar e seleccionar proteínas artificiais que ligam a um ligando específico foi a técnica de *ribosome display*. *Ribosome display* é uma técnica que permite gerar, seleccionar e evoluir proteínas *in vitro*, através de diversos ciclos de mutagenese e respetiva seleção e purificação dos clones ligantes.<sup>30</sup> Existem outras técnicas além de *ribosome display* que têm a mesma capacidade de seleccionar e purificar clones recombinantes. Destacam-se as técnicas de *phage display*, de *mRNA display*, de *bacterial display* e de *in vitro compartmentalization* (IVC). Apesar de serem bastante complexas, todas estas técnicas têm em comum o facto de reunirem uma grande quantidade de diversidade e complexidade biológica estrutural com o objetivo de fazer uma seleção eficaz de um composto que interaja com um alvo predeterminado.

O princípio científico da técnica de *ribosome display* consiste inicialmente na transcrição *in vitro* do DNA existente numa biblioteca genómica que contém informação genética que codifica diversas variantes da proteína desejada. Segue-se uma posterior tradução do mRNA correspondente usando um número limitado de ribossomas, que acabam por ditar a dimensão funcional da biblioteca.<sup>31</sup> O processo de tradução do mRNA nesta técnica não é o que acontece usualmente na biologia molecular, pois as moléculas de RNA em questão não contêm codão *stop*. Nesta técnica, que se encontra representada na Figura 1.5, a tradução inicia-se normalmente, havendo reconhecimento do ribossoma pelo codão de iniciação na sequência de mRNA. O processo de tradução mantém-se, existindo formação do polipéptido respetivo, até o ribossoma atingir o último aminoácido presente na sequência, de onde não se consegue libertar. Como não existe codão *stop*, o complexo formado entre polipéptido-ribossoma-mRNA não se consegue dissociar, pois só com a presença do codão *stop* é que as *Release Factors* (RF) que são as proteínas responsáveis pela dissociação do polipéptido e do tRNA conseguem atuar. Por sua vez, o mRNA também não se consegue dissociar pois é necessário que o polipéptido e o tRNA já não se encontrem complexados. Esta técnica faz portanto que o genótipo (mRNA) se encontre ligado ao fenótipo (proteína), ao obrigar a tradução de uma molécula de mRNA que não contém codão *stop* e que portanto obriga à formação de um complexo que contém ribossomas, material genético e o polipéptido correspondente.<sup>31,32</sup> À medida que a tradução ocorre o polipéptido começa a adquirir a sua estrutura tri-dimensional o que faz com que seja possível que a proteína ligue o ligando desejado mesmo que esteja conectado ao complexo. Uma adição de um *spacer* ao C terminal da proteína faz com que exista maior flexibilidade potenciando a correta formação da estrutura tri-dimensional proteica. Para garantir a estabilidade do complexo formado utilizam-se elevadas concentrações de Magnésio e o procedimento é normalmente realizado a baixas temperaturas. Se a proteína estiver na sua conformação correta, ela irá manter a afinidade para o seu ligando, como tal, o passo seguinte trata-se da adição do composto-alvo, e eluição dos clones

recombinantes que ligam ao composto (por adição de um agente quelante, ou competição de substrato). De seguida procede-se a uma *Reverse Transcription* seguido de PCR (RT-PCR) para isolar e identificar os clones ligantes. Para aumentar a diversidade dos clones, e portanto da biblioteca genómica, pode-se realizar mutagénese aleatória através do PCR, usando por exemplo uma polimerase sem a capacidade de *proofreading*.<sup>31,32</sup> Esta técnica permite portanto realizar uma evolução Darwiniana de proteínas ao fazer o *screening* de mutantes e gerar proteínas *in vitro* que têm afinidade para um ligando específico.

As restantes técnicas apesar de terem o mesmo princípio subjacente diferem na maneira de selecionar os clones recombinantes. Nas técnicas de *phage display* e *bacterial display* a biblioteca de DNA é clonada juntamente com proteínas membranares da bactéria (no caso de *bacterial display*), ou juntamente com proteínas do envelope viral (no caso de *phage display*). Estas duas técnicas têm a desvantagem de ser sempre necessário transformar a biblioteca de DNA em bactérias, o que torna o processo moroso.<sup>33</sup> Na técnica de *mRNA display* é necessário a existência de um *linker*, normalmente a puromicina, que ao romper a tradução do ribossoma é responsável pela ligação do polipéptido à sequência nucleotídica via *linker*. O uso deste *linker* de puromicina complica a purificação dos clones pois não permite que haja um correto *folding* da proteína. Na técnica de IVC são criadas emulsões que com a ajuda de surfactantes permite misturar fases aquosas, que contêm a maquinaria suficiente para a transcrição e tradução, com fases hidrofóbicas. Dentro de cada partícula desta emulsão encontra-se apenas um gene passível de ser processado. Como cada partícula da emulsão é independente existe uma compartimentalização, fazendo que os genes que forem transcritos e traduzidos sejam possíveis de serem selecionados consoante a sua afinidade para o ligando em questão.

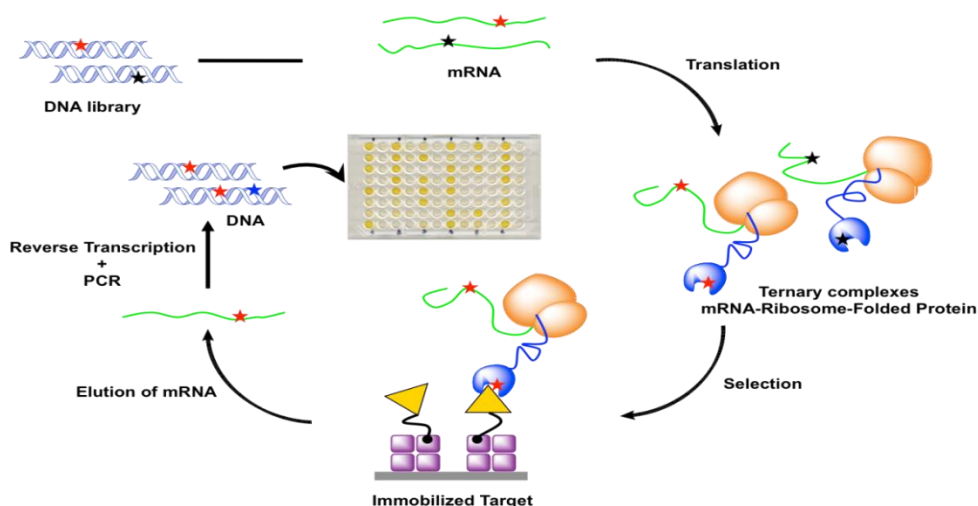


Figura 1.5- Representação da técnica de *ribosome display* e dos ciclos de seleção utilizados para produção das nanofitinas com especificidade para o *target* (TNF- $\alpha$ ).

#### 1.4 Produção em bioreactores

Apesar de o aparecimento dos bioreactores remontar apenas à segunda metade do século XX, estes revolucionaram por completo a maneira de controlar e influenciar os bioprocessos. Os bioreactores tratam-se de uma ferramenta mecânica construída para respeitar parâmetros que suportem o acondicionamento de diferentes tipos de microrganismos fornecendo-lhes condições para crescerem de maneira controlada, e com capacidade para realizar conversões biológicas específicas.<sup>34</sup> A evolução dos bioreactores acaba por estar intimamente ligada à da biologia molecular pois atualmente qualquer microrganismo pode ser modificado para receber genes exógenos, podendo esse mesmo microrganismo ser cultivado em grandes volumes. Sem a biologia molecular, o cultivo de microrganismos em bioreactores estaria restrito aos microrganismos não-modificados que não têm a versatilidade de produção de compostos que organismos geneticamente modificados têm. Sendo assim, constata-se que os bioreactores começaram a ganhar peso e espaço na indústria farmacêutica e alimentar,

assumindo-se atualmente como a opção mais viável para produção industrial de compostos através de organismos geneticamente modificados.

Uma das características dos bioreactores que se apresenta como uma vantagem é o facto de ser uma ferramenta muito versátil pois suporta diferentes tipos de regime de operação que permite que microrganismos e produtos dos mais variados tipos possam ser produzidos em bioreactores. Entre os diferentes tipos de operação de bioreactores destacam-se o *batch*, *fed-batch* e contínuo (distinguindo-se entre *Plug Flow Reactor* (PFR) e o *Continuous Stirred Tank Reactor* (CSTR)). Todos estes regimes de operação do bioreactor estão representados na Figura 1.6.

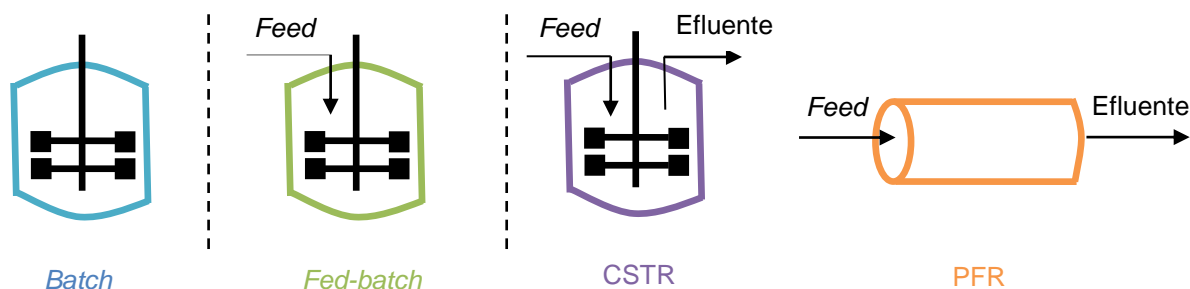


Figura 1.6- Comparação dos diferentes regimes de operação em bioreactor.

No regime de operação de *batch* todos os reagentes e componentes do meio de cultura incluindo o material biológico são adicionados ao reactor, não existindo depois qualquer tipo de entrada ou saída de materiais aquando o início da bioreacção. Deste modo, a concentração de reagentes decresce ao longo do tempo, e a concentração do produto aumenta ao longo do tempo sem que haja alteração de volume. Algumas das vantagens deste tipo de operação prendem-se à sua versatilidade e flexibilidade estando o seu uso normalmente associado a processos que se encontram em fases iniciais de teste em pequena escala. Das desvantagens destacam-se a possibilidade de formação de produtos tóxicos.<sup>35,36,37,38</sup>

No regime contínuo em CSTR existe uma adição e remoção simultânea de meio de cultura do vaso mecânico. Com a existência de condições de mistura perfeita e tendo a condição da taxa de entrada de nutrientes igual à taxa de saída não ocorre alteração de volume dentro do bioreactor. Se não ocorrer alterações das condições exteriores, não acontece acumulação de reagentes ou produtos no reactor, pois no momento em que o reagente é adicionado ao vaso é instantaneamente consumido e transformado em produto que é retirado do reactor. Das vantagens do CSTR salienta-se a facilidade de operação e a inexistência da necessidade de monitorização rigorosa ao longo do processo. A desvantagem principal deste tipo de alimentação é a baixa taxa de conversão por unidade de volume. No regime contínuo em PFR existe entrada dos reagentes por um lado do reactor e a reacção acontece progressivamente ao longo do reactor na direcção axial do mesmo. Como a Figura 1.6 mostra, existe um decréscimo da concentração de reagentes e um aumento da concentração de produto ao longo do eixo do Y, enquanto que na direcção radial (eixo X) as concentrações permanecem inalteráveis. No que diz respeito às vantagens do PFR possui elevadas taxas de conversão por unidade de volume mas por outro lado não é de fácil operação, e a manutenção é mais cara do que o CSTR. Ambos os regimes apresentam no entanto a possibilidade o uso de células ou enzimas imobilizadas o que se afigura como uma vantagem.<sup>35,36,37,38</sup>

Por último, existe ainda um outro tipo de alimentação de reactores que é o *fed-batch* que acaba por reunir características intermédias dos princípios de *batch* e contínuo. Em *fed-batch* existe a adição ao longo do tempo de um determinado nutriente, ou conjunto de nutrientes, havendo portanto aumento de volume dentro do vaso mecânico ao longo do processo. Normalmente, este processo é iniciado como um *batch* isto é, todos os nutrientes são adicionados no início do processo e quando a fonte de energia se esgota (quer seja de carbono, fosfatos ou outro composto) o *fed-batch* é sinalizado para iniciar. O *fed-batch* é bastante implementado em processos quando se lida com culturas cujas cinéticas de crescimento são inibidas pelo substrato, no caso da existência de organismos auxotróficos e também quando são necessárias altas densidades celulares, como no caso do projeto SADEL.<sup>35,36,37,39</sup>

Por vezes a existência de altas concentrações da fonte de carbono principal tem um efeito inibitório no crescimento celular. Este efeito é tipicamente observável com a glucose em sistemas de expressão bacterianos, no qual devido a um excesso de glucose no meio a bactéria metaboliza rapidamente o substrato acumulando compostos tóxicos, como acetato ou etanol. Este efeito tem consequências ainda mais acentuadas quando se pretende cultivar organismos com altas densidades celulares, onde além de níveis tóxicos de metabolitos secundários, a limitação por oxigénio é outra questão que tem de ser controlada. De modo a evitar esta situação o regime de operação *fed-batch* é ideal pois existe uma administração controlada do nutriente a uma determinada taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) que permite que o organismo possua um metabolismo normal e comedido sem que haja acumulação de substâncias tóxicas. Torna-se evidente portanto que é necessário determinar previamente para cada estirpe o  $\mu$  ideal. Quanto à limitação de oxigénio que ocorre no reactor em cultivos de elevada densidade celular o problema é contornado existindo uma pressão e agitação no reactor que é variável e aumenta ou diminui consoante as necessidades aeróbias do microrganismo.

Em *fed-batch*, a administração dos nutrientes ao longo do tempo, comumente denominadas como *Feedings* rege-se pela equação 1:

$$Q = Q_0 * e^{\mu t} \quad (1)$$

Em que:

Q – caudal de administração ao momento t (L/min)

Q<sub>0</sub> – caudal de administração inicial (L/min)

$\mu$  - taxa específica de crescimento do microrganismo (h<sup>-1</sup>)

t – tempo decorrido desde o início do *fed-batch* (h)

A equação que expressa o crescimento microbiano ao longo do tempo é dada pela equação 2:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

Em que:

X- concentração de células ao momento t (g/L)

X<sub>0</sub>- concentração de células inicial (g/L)

$\mu$ - taxa específica de crescimento (h<sup>-1</sup>)

t- tempo decorrido desde o início do crescimento microbiano (h)

Caso se pretenda determinar parâmetros como o  $\mu$  a equação anterior pode ser desenvolvida formando a equação 3:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (3)$$

Todos os tipos de reactores referidos anteriormente são adequados para utilização em processos *single phase*. Existem portanto reactores mais adequados para situações em que sejam necessárias a presença de mais do que uma fase, como por exemplo para processos que envolvem imobilização de enzimas ou células. No que diz respeito a reactores multifásicos existentes destacam-se o bioreactor de leito empacotado, o bioreactor *air-lift*, o bioreactor de leito fluidizado, e ainda o bioreactor de membranas.<sup>37,38</sup>

Quando se pretende obter o máximo de produtividade e rendimento possível num processo de produção de um composto num bioreactor diversas estratégias podem ser implementadas em diferentes passos do processo para tentar otimizá-lo. Como já foi referido no projeto SADEL atinge-se elevadas densidades celulares através de *fed-batch* e uma das estratégias mais implementadas no desenvolvimento de processos de produção trata-se de tentar otimizar o meio de cultura e também os *feedings* administrados. Em *fed-batch* o controlo dos *feedings* é essencial pois como já foi dito pode ditar uma boa produtividade de um lote do bioterapêutico em questão.

## 1.5 Purificação de proteínas

Com o aumento de produtividades obtidas em *upstream* em que processos que rendiam mg/L passaram a render g/L de produto, o *downstream* teve de se adaptar quer a nível de equipamentos quer a nível de inovação tecnológica para poder corresponder às exigências requeridas pelo universo biotecnológico onde se exige produtos com alta pureza e qualidade com o mínimo de tempo despendido.<sup>40</sup> Compreende-se portanto que o *downstream processing* pode acarretar até cerca de 70% dos custos totais do desenvolvimento de um processo de

produção e purificação de proteínas e que, como tal, o delineamento de um plano de ação para poder economizar os custos sem comprometer na eficácia e rendimento do processo é de cariz obrigatório.<sup>41</sup> Apesar de existirem esforços para que *upstream* e *downstream processing* trabalhem em modo contínuo otimizando assim os recursos humanos e materiais existentes, tipicamente o *downstream* ocorre em modo *batch*.<sup>42,43</sup> O uso de diversas colunas cromatográficas a funcionarem em simultâneo em modo contínuo através de técnicas como cromatografia em leito móvel simulado é possível atingindo por vezes maiores purezas, maiores produtividades por secção de fase estacionária, e ainda menos consumo de reagentes.<sup>44,45</sup>

Cada processo de purificação irá depender das características da proteína em questão, como tal um estudo prévio das especificidades da mesma é necessário. Características como a gama de estabilidade de pH, o ponto isoelétrico, sequência de aminoácidos, afinidade para certos ligandos, peso molecular e hidrofobicidade da proteína são parâmetros que têm de ser estudados e conhecidos de modo a reunir toda a informação necessária para poderem ser escolhidos os equipamentos e materiais mais adequados para o processo. Uma representação generalista dos passos de purificação de um produto biológico encontram-se representados na Figura 1.7.

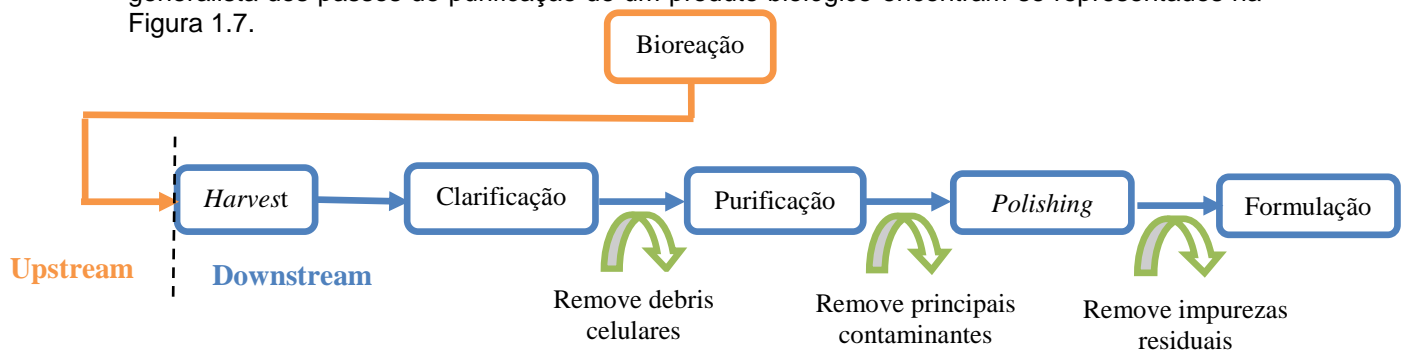


Figura 1.7- Representação dos passos sequenciais de *downstream* visando a purificação de um composto biológico.

A maioria dos processos de purificação de proteínas envolve um ou mais passos de cromatografia, sendo que um processo típico deste género tenta adotar uma estratégia de purificação a 3 passos: captura, purificação intermédia e *polishing*.<sup>46,47</sup> Antes de proceder a um passo de cromatografia tem sempre que existir um passo de extração de amostra e clarificação da amostra. O objetivo deste passo é bem definido e consiste na remoção da proteína alvo do material biológico em que se encontra. Neste passo é essencial que a metodologia escolhida seja robusta e escalável, caso se pretenda aumentar de escala no processo. No caso de produtos extracelulares, uma centrifugação consegue clarificar de maneira eficiente a amostra biológica. No caso de produtos intracelulares é necessário libertar o conteúdo intracelular, podendo optar-se por métodos químicos ou métodos mecânicos de ruptura celular. Os métodos químicos, tais como lise enzimática, uso de detergentes ou métodos de secagem, apesar de apresentarem bons resultados a uma escala laboratorial, são processos extremamente dispendiosos e morosos quando se aumenta a escala e portanto impraticáveis. Os métodos mecânicos, como o uso de homogeneizadores de alta pressão e o uso do moinho de bolas, são robustos e escaláveis apresentando-se como os mais indicados para um processo à escala industrial. No entanto, é sempre essencial o estudo prévio do material biológico a disruptar pois fatores como sensibilidade do material à temperatura e a forças de tensão de corte podem fazer com que se opte por outro método de disruptação mais adequado.<sup>38</sup> Com o avanço da biologia molecular tornou-se possível otimizar algumas características destes passos iniciais de disruptação e clarificação. Técnicas de engenharia genética tornaram possível aumentar velocidades de sedimentação que auxilia durante a centrifugação, assim como secreções da proteína alvo para o meio extracelular mesmo em microrganismos que naturalmente não o fariam. Tornaram ainda possível a ocorrência de uma apoptose de *E. coli* após a indução com Isopropil β-D-tiogalacto-piranozideo (IPTG) evitando a necessidade de um passo de disruptação. Tudo isto são ferramentas de engenharia genética que já foram aplicadas e que auxiliam o *downstream processing*.<sup>14</sup> Como método de clarificação, destaca-se ainda o uso de filtração por membranas através de técnicas como filtração tangencial (TFF) e todas as suas variantes existentes que permite de maneira eficaz filtrar e separar componentes biológicos,

quer se tratem de proteínas ou microrganismos, com base no tipo de membrana utilizada e nas condições de operação escolhidas.<sup>40,42,48</sup>

O passo de captura consiste num passo de purificação inicial da molécula alvo logo a seguir à sua extração do material biológico inicial. Neste passo o objetivo é isolar, concentrar e estabilizar a proteína no mínimo de tempo possível, para introduzi-la num ambiente em que seja preservada a sua atividade. Isto é atingido escolhendo uma técnica de alta capacidade que remova contaminantes críticos como proteases ou glicosidases, e que ao mesmo tempo permita concentrar a amostra para reduzir o volume da mesma, permitindo usar colunas mais pequenas nos passos posteriores de purificação. O passo de purificação intermédia tem como objetivo fazer a separação da proteína alvo da maioria das impurezas presentes em solução, tais como outras proteínas, ácidos nucleicos, endotoxinas e vírus. Neste passo de purificação dá-se maior importância à resolução da metodologia para uma eficiente separação dos componentes, tal como a uma elevada capacidade. Por último, o passo de *polishing* consiste na remoção final de contaminantes residuais como variantes estruturais da proteína que causam heterogeneidade, de endotoxinas e de reagentes usados durante o processo. Permite ainda fazer um ajuste final de pH e de certificar que a proteína se encontra em condições de ser armazenada. Neste passo é portanto importante ter uma metodologia que tenha alta resolução e que permita discriminar entre variantes estruturais da proteína.<sup>46,47</sup>

Existem diferentes técnicas de cromatografia que se regem por diferentes princípios, e é justamente o conhecimento das características da proteína alvo que permite explorar as diferenças entre as diversas técnicas existentes de modo a escolher a combinação de técnicas mais correta para o processo em questão. O objetivo de qualquer processo de purificação de uma proteína é poder atingir o nível de pureza desejada no mínimo de passos possíveis, como tal um encadeamento lógico de metodologias compatíveis umas com as outras com o máximo rendimento global do processo é desejado.

Conhecendo o ponto isoelétrico da proteína alvo pode-se optar por uma cromatografia de permuta iónica (IEX). O princípio científico desta metodologia baseia-se na ligação reversível entre a resina cromatográfica e uma proteína que se encontra com determinada carga dependendo do pH. Se se operar a um pH inferior ao ponto isoelétrico da proteína, a mesma encontra-se positivamente carregada como tal irá ligar-se a uma resina com ligandos negativos. Obviamente se a amostra estiver a um pH superior ao ponto isoelétrico o inverso se observa. A eluição neste tipo de técnica tipicamente acontece com um gradiente crescente de sal, usualmente cloreto de sódio a altas concentrações, ou realizando um gradiente de pH. Esta técnica é de alta capacidade, ou seja, permite elevados volumes de amostra o que a torna uma metodologia indicada para um processo de captura ou purificação intermédia.<sup>49</sup> Apesar de usualmente a proteína de interesse se ligar à resina, poderá aplicar-se este processo para que as impurezas se liguem quando se aplica a amostra à coluna, ao contrário da proteína alvo que saíria no *flowthrough*.

Outra técnica de cromatografia comumente utilizada é a cromatografia de afinidade (AC). Nesta cromatografia a resina utilizada possui ligandos que têm afinidade para a proteína alvo (e outros contaminantes que tenham a mesma apetência para ligar). Estes ligandos estabelecem uma ligação reversível mas altamente específica, tais como antigénio-anticorpo, enzima-substrato ou recetor-ligando. Nesta técnica a eluição pode ser realizada especificamente, através do uso de um ligando a competir pelo local de ligação, ou inespecificamente, através de alteração de pH, polaridade ou força iónica.<sup>50</sup>

Destaca-se ainda a cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e a cromatografia de fase reversa (RPC). Estas técnicas partilham o mesmo princípio científico explorando a hidrofobicidade dos resíduos da proteína que vão interagir reversivelmente com a estrutura hidrofóbica da resina. Esta técnica é potenciada e tem uma maior eficácia quando a amostra se encontra num tampão com elevada força iónica, como por exemplo na presença de altas concentrações de sais, o que a torna ideal para um passo seguinte a uma permuta iónica. A diferença principal entre estas duas técnicas é o tipo de ligando utilizado na resina sendo que a cromatografia de fase reversa apresenta ligandos que estabelecem ligações muito mais fortes às proteínas do que os ligandos da cromatografia de interação hidrofóbica.<sup>51</sup> Como tal, a eluição em fase reversa acaba por ser muito mais agressiva para as proteínas pois são necessários solventes orgânicos para desfazer as ligações estabelecidas, podendo comprometer a estrutura tri-dimensional da proteína e consequentemente comprometer a sua atividade biológica. A eluição em cromatografia de interação hidrofóbica costuma ser feita com um gradiente decrescente de sal apresentando-se como uma vantagem comparativamente ao modo de operação da cromatografia de fase reversa.

Filtração-gel, ou cromatografia de exclusão molecular (SEC) é uma técnica de cromatografia que se baseia na separação de proteínas com base na sua diferença de peso molecular. Como a resina neste tipo de cromatografia possui canais estreitos, proteínas com maior peso molecular não conseguirão entrar por esses canais deslocando-se mais rapidamente ao longo da coluna, enquanto que proteínas de baixo peso molecular conseguem entrar nesses canais e como tal irão demorar mais a percorrer todo o percurso existente e irão sair da coluna mais tarde. Trata-se das poucas técnicas de cromatografia que não dependem de um tampão de eluição, pois o tampão em que a amostra se encontra é trocado pelo tampão existente na coluna. Esta técnica é ideal como uma técnica de *polishing*, quando os volumes de amostra são mais pequenos para não afetar a resolução da resina.<sup>52</sup>

## 1.6 Good Manufacturing Practices (GMP)

Uma das características a considerar no *scale-up* de um bioprocessamento com vista à produção em grande escala de um produto terapêutico, é se o produto e respetivo modo de produção preenchem todos os requisitos necessários para poder ser considerado que foi fabricado de acordo com as diretrizes *Good Manufacturing Practices* (GMP). Estas diretrizes são essenciais para as empresas biotecnológicas e farmacêuticas pois estas asseguram que o produto que está pronto a ser comercializado foi fabricado respeitando certos parâmetros que atestam a sua qualidade e validade tanto do ponto de vista científico como do ponto de vista legal, não comprometendo ou metendo em risco a saúde do consumidor.<sup>53</sup>

Neste caso específico de produção de uma proteína recombinante em bioreactores para fins terapêuticos há alguns detalhes que têm de ser controlados para se poder dizer que o composto foi produzido de acordo com regras GMP. Alguns parâmetros como por exemplo os componentes da cultura do microrganismo (quer sejam os meios de cultura ou os antibióticos a utilizar) ou até mesmo o sistema de introdução e expressão do composto de interesse tem de ser estudado para melhor se adequar às diretrizes GMP. Nomeadamente em relação aos meios de cultura, um produto feito de acordo com parâmetros GMP não poderá conter no seu processo de produção qualquer componente que possa ter origem animal, visto esses mesmos compostos poderem ser uma plataforma para infeção de agentes patogénicos.

Do ponto de vista GMP, apenas os meios de crescimento quimicamente definidos poderão ser usados no processo de crescimento do microrganismo e conseqüentemente do biofármaco que irá ser produzido. Este tipo de meio é o único que possui composições químicas dos nutrientes conhecidas e exatas e que portanto consegue assegurar que não existe qualquer vestígio animal ou vegetal que poderá servir como um foco de contaminação de lotes clínicos. O uso de antibióticos também terá de ser cuidado pois tem de ser escolhido cautelosamente para evitar potenciais reações secundárias, tais como alergias aos pacientes que irão beneficiar do produto final.<sup>54</sup> Dentro dos antibióticos, alergias aos  $\beta$ -lactâmicos são os mais críticos.

Também no *downstream* é necessário operar sobre algumas diretrizes segundo a regulamentação GMP. Destacam-se substâncias como agentes redutores, surfactantes e detergentes que poderão ser usadas no decorrer do processo como aditivos para melhorar a eficácia de um determinado passo, mas que na validação do processo de purificação tem que se garantir que já não se encontram presentes no produto final. Trata-se portanto de um controlo dos reagentes a utilizar, todos eles têm de ser passíveis de ser detetados e a sua origem rastreada. Os materiais a serem utilizados merecem também a atenção do operador, devendo existir preferência sobre materiais descartáveis de uso único pois estes têm a certificação do fabricante que estão em condições de ser utilizados e não existe qualquer possibilidade de contaminação por usos prévios. Por último, de salientar ainda que para um processo de purificação ser considerado GMP tem que ter todo um conjunto de fatores validado e certificado, tais como procedimentos de limpeza de equipamentos, manutenção de equipamentos, reprodutibilidade dos resultados, entre outros.<sup>55,56</sup>

## 1.7 Projeto SADEL

O projeto SADEL trata-se de um projeto financiado por fundos europeus e que tem como objetivo principal o desenvolvimento de uma nanofitina para aplicações clínicas nomeadamente na área das doenças inflamatórias. As nanofitinas são proteínas com baixo peso molecular (cerca de 10kDa) geradas artificialmente através de diversos ciclos do processo de *ribosome display* já descrito anteriormente. Estas proteínas têm a capacidade de

ligar seletivamente a antígenos, mimetizando portanto a atividade dos anticorpos. É justamente esta a principal aplicação das nanofitinas exibindo diversas vantagens em relação aos anticorpos como: tamanho reduzido (eliminando o problema existente dos anticorpos de penetração nos tecidos); uma grande estabilidade (quer a níveis térmicos, de pH como também de resistência mecânica); grande afinidade para o alvo (atinge a gama dos sub-nanomolares nos monómeros); boa versatilidade e adaptabilidade (possibilidade criação dímeros ou outros complexos para potenciar afinidade).<sup>30</sup>

No contexto deste projeto, pretende-se desenvolver nanofitinas com alta afinidade para *targets* envolvidos na incidência de doenças inflamatórias crônicas, nomeadamente Doença de Crohn e a Colite Ulcerosa. Estas doenças apesar de possuírem semelhanças na sintomatologia, possuem as suas diferenças na extensão da doença. A colite ulcerosa é uma doença inflamatória crônica que causa inflamações e úlceras apenas no colon enquanto que a doença de Crohn pode afectar todo o tracto gastrointestinal, desde a boca ao ânus. No entanto ambas são doenças inflamatórias crônicas com causa incerta, sendo que uma mistura de fatores genéticos e ambientais mostram-se como preponderantes para a incidência da doença. Nestas doenças a interação entre estes fatores levam a que, por razão desconhecida, exista um excesso de células desreguladas do sistema imunitário que sinalizam certos componentes da flora intestinal para destruição. O conjunto de sintomas que estas doenças provocam incluem diarreia, febre, dor abdominal e perda de peso.<sup>57,58</sup> Como se trata de uma doença que está envolvida em processos inflamatórios existe libertação de diferentes mediadores tais como as interleucinas, TNF  $\alpha$  e interferão, que contribuem para a diversidade de sintomas que esta doença acarreta. Como a doença é crônica e a causa idiopática, as terapêuticas existentes passam por atenuar os sintomas ao invés de tratar a origem do problema. O uso de antibióticos e probióticos permitem manipular, e de certa maneira, influenciar o crescimento da flora intestinal no paciente, enquanto que o uso de fármacos anti-inflamatórios permite neutralizar mediadores inflamatórios.<sup>59</sup> As nanofitinas irão ter um mecanismo semelhante aos fármacos anti-inflamatórios interagindo por inibição competitiva com o receptor de TNF  $\alpha$  presente nos macrófagos inibindo a libertação deste composto. As nanofitinas apresentam afinidades muito altas para este *target* chegando inclusivamente à gama das pM.

O objetivo final do projeto SADEL no iBET passa por estabelecer um processo otimizado tanto a nível de *upstream* como de *downstream* e produzir uma nanofitina *lead* de acordo com as especificações GMP trabalhando para tal efeito em associação com os parceiros com certificação GMP, a Genibet. No início do projeto SADEL existia um leque de diferentes nanofitinas que ao longo do decurso do projeto têm vindo a ser gradualmente reduzidas visando a eleição de uma nanofitina *lead* que reúna as características desejadas para posterior desenvolvimento. Alguns critérios de eliminação de nanofitinas passam por ensaios de atividade e estabilidade que se apresentaram como baixas. Apesar de existirem algumas nanofitinas disponíveis, atualmente a nanofitina *lead* ainda não foi escolhida estando ainda esta decisão aberta para discussão com os parceiros europeus do projeto SADEL. Apesar o objetivo principal para já não ser atualmente de produzir a nanofitina de acordo com parâmetros GMP, foram estudados no curso das produções que se realizaram a influência de algumas condições e seu impacto na produtividade das nanofitinas. Entre as condições estudadas incluem-se por exemplo o efeito de usar um meio quimicamente definido, de tentar obter um produto livre de endotoxinas e de qualquer outra fonte de contaminação como bacteriófagos lisogénicos. No fundo o objetivo trata-se de definir e implementar um processo que facilitará a transição para um contexto GMP.

No âmbito desta tese e visando a implementação de um processo de produção com a máxima produtividade foram testadas diferentes condições nas fermentações no bioreactor tais como o efeito da taxa específica de crescimento e também o efeito de parâmetros como tempos de inoculação e indução ótimos para o microrganismo. Em pequena escala foram também estudadas condições ótimas para o crescimento microbiano, assim como a seleção de clones recombinantes que mostram ser superiores em termo de produtividade da nanofitina. No *downstream processing* houve espaço também para diversas otimizações do processo, tendo sido testadas diferentes técnicas de cromatografia como IEX e HIC, em diferentes condições de tampões de cromatografia. Técnicas complementares de purificação como o TFF e a determinação de endotoxinas no produto final e análise de diferentes conformações da nanofitina por SEC tiveram também lugar no projeto SADEL. Entre as nanofitinas estudadas estão a Sequência 2 (S2), o dímero S2(L30)S2 e ainda a S2 com sequência modificada (S2-modificada). É referida ainda para efeitos de comparação a Sequência 1 (S1) modificada (S1-modificada). As proteínas com sequências modificadas tiveram origem nas suas originais mas

possuem alteração de alguns aminoácidos na sua sequência. Embora tenham sido estudadas todas as nanofitinas referidas foi dado maior destaque à S2-modificada por apresentar resultados mais satisfatórios quer a nível de atividade, como de estabilidade e toxicidade.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Material biológico e meios de cultura

No âmbito deste projeto europeu e visando a escolha de uma estirpe ideal para produção em larga escala de nanofitinas diferentes estirpes foram testadas ao longo do tempo, de onde se destacam a *E. coli* *Acella pLysS*, *E. coli* *DH5α F'IQ* e *E. coli* *SHuffle T7 Express pLysY*. A estirpe *E. coli* *SHuffle T7 Express pLysY* foi a que mereceu maior atenção e destaque pois trata-se da estirpe escolhida para fazer a produção final da nanofitina. A estirpe *E. coli* *SHuffle* (New England Biolabs) trata-se de um microrganismo geneticamente modificado a partir de uma estirpe parental, a *E. coli* *K12*, para permitir a formação de pontes dissulfeto entre proteínas no citoplasma. As estirpes sofreram uma transformação, tendo incorporado o plasmídeo pQE-30 (Qiagen, Venlo, Holanda) que possui o gene de interesse que codifica a nanofitina em questão. A Affilogic, parceiro do iBET no projeto SADEL, foi quem forneceu as estirpes transformadas prontas para a produção.

Diferentes meios de cultura foram destinados ao cultivo das estirpes, tendo sido utilizados para esse fim tanto meios ricos como meios quimicamente definidos. Nas tabelas seguintes encontram-se descritas as composições dos diferentes meios de cultura utilizados, concentrações dos componentes e método de esterilização utilizado.

Tabela 2.1- Composição do meio 2YT usado no Cell Bank e nas fermentações em frasco.

Componente	Concentração final	Procedimento de esterilização
Peptona	16 g/L	Preparado em 80-90% do volume total, ajustado o pH a 7, esterilizado a 121°C durante 60 minutos.
Extrato de levedura	10 g/L	
Cloreto de sódio	5 g/L	
Ampicilina	1 g/L	Preparada uma solução concentrada, esterilizada por filtração em 0.22µm.
Cloramfenicol	0.5 g/L	
Glucose	10 g/L	

Tabela 2.2- Composição do meio quimicamente definido usado nas fermentações do bioreactor.

Componente	Concentração final	Procedimento de esterilização
Monohidrogenofosfato de dipotássio	18 g/L	Preparado em 80-90% do volume total, ajustado o pH a 7, esterilizado a 121°C durante 60 minutos.
Dihidrogenofosfato de monopotássio	5.2 g/L	
Citrato de sódio	5.6 g/L	
Sulfato de amónia	2.5 g/L	
Sulfato de magnésio	1 g/L	Preparada uma solução concentrada, esterilizada a 121°C durante 60 minutos.
Glucose	10 g/L	Preparada uma solução concentrada, esterilizada a 121°C durante 60 minutos.
Solução stock de Cloreto de ferro	2.5 mL/L	Preparada uma solução concentrada, esterilizada por filtração em 0.22µm.
Ampicilina	0.1 g/L	Preparada uma solução concentrada, esterilizada por filtração em 0.22µm.
Cloramfenicol	0.05 g/L	
Tiamina	0.005 g/L	
Solução stock de Trace Elements	2.5 mL/L	Preparada uma solução concentrada, esterilizada por filtração em 0.22µm.

Tabela 2.3- Composição da solução stock de Cloreto de Ferro.

<b>Solução stock de Cloreto de ferro</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
Cloreto de ferro	6.46 g/L

Tabela 2.4- Composição da solução stock de *Trace Elements*.

<b>Solução stock de <i>Trace Elements</i></b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
Cloreto de Manganésio (II) tetrahidratado	0.8 g/L
Cloreto de Zinco (II)	1.36 g/L
Molibdato (VI) de sódio dihidratado	0.2 g/L
Ácido bórico	0.04 g/L
Sulfato de Cobalto (II) heptahidratado	0.25 g/L
Cloreto de Cálcio dihidratado	6.8 g/L
Cloreto de Cobre (II) dihidratado	1.73 g/L

Tabela 2.5- Composição do Feeding 1 usado nas fermentações do bioreactor.

<b>Componente</b>	<b>Concentração final</b>	<b>Procedimento de esterilização</b>
Glucose	700 g/L	Preparado em 80-90% do volume total, ajustado o pH a 7, esterilizado a 121°C durante 60 minutos.
Sulfato de magnésio	40 g/L	Preparado em 80-90% do volume total, ajustado o pH a 7, esterilizado a 121°C durante 60 minutos.
Solução stock de <i>Trace Elements</i>	12.5 mL/L	Preparada uma solução concentrada, esterilizada por filtração em 0.22µm.
Solução stock de Cloreto de ferro	12.5 mL/L	Preparada uma solução concentrada, esterilizada por filtração em 0.22µm.
Ampicilina	0.1 g/L	Preparada uma solução concentrada, esterilizada por filtração em 0.22µm.
Cloramfenicol	0.05 g/L	
Tiamina	0.05 g/L	

Tabela 2.6- Composição do Feeding 2 usado nas fermentações do bioreactor.

<b>Componente</b>	<b>Concentração final</b>	<b>Procedimento de esterilização</b>
Monohidrogenofosfato de dipotássio	212g/L	Preparado em 80-90% do volume total, ajustado o pH a 7, esterilizado a 121°C durante 60 minutos.
Dihidrogenofosfato de monopotássio	106g/L	

Por último, de salientar ainda que todos os meios de cultura a que também é adicionado IPTG, indutor de expressão da nanofitina, que é usado a concentrações de 1mM.

## 2.2 Cell bank

Para a construção dos bancos celulares foi inoculada a estirpe parental em meio 2YT, os quais foram deixados a incubar *overnight* a uma temperatura de 37°C e uma agitação de 125rpm até que atingisse uma OD<sub>595nm</sub> (Densidade ótica a 595nm) entre 2 e 3. Foi também preparada uma solução de 20% Glicerol, que foi adicionada à suspensão celular na razão 1:1.

De seguida, a mistura foi distribuída em alíquotas de 1mL em *cryovials* que foram conservadas a -80°C.

### 2.3 Fermentações em frasco

Para o crescimento do inóculo foi retirado um *cryovial* do *cell bank* respetivo e foi adicionado o seu conteúdo ao meio de cultura 2YT que foi deixado a incubar *overnight* a uma temperatura de 37°C e agitação de 150rpm. Quando a OD<sub>595nm</sub> atingiu um valor de aproximadamente 4 transferiu-se uma quantidade do inóculo para um novo recipiente com meio 2YT juntamente com um indutor da expressão da proteína, o IPTG. A incubação da cultura mantém-se até 4-5 horas depois da indução, onde após esse tempo a solução é centrifugada a 7460xg a 4°C durante 20 minutos. Após centrifugação descarta-se o sobrenadante e o *pellet* é pesado e armazenado a -20°C para posterior purificação da amostra. Retira-se também uma amostra antes da centrifugação, destinada a fins analíticos.

### 2.4 Fermentações em bioreactor

Todas as fermentações em escala piloto do projeto SADEL foram realizadas no bioreactor Bioengineering LP351 (Bioengineering, Sagenrainstrasse, Suíça). Dois crescimentos microbianos foram realizados antes da respetiva inoculação no bioreactor. Na figura 2.1 estão representados os crescimentos realizados até ao momento da inoculação no bioreactor.

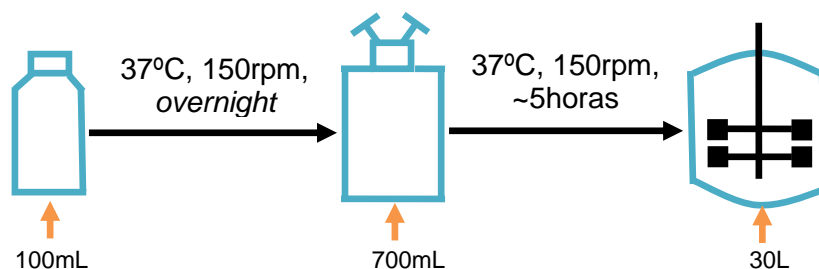


Figura 2.1- Representação esquemática dos crescimentos microbianos realizados numa fermentação de escala piloto até ao momento da inoculação no bioreactor.

O primeiro crescimento foi realizado *overnight* a 37°C e com agitação de 150rpm. No dia seguinte transferiu-se uma quantidade de volume suficiente da cultura primária para que a cultura secundária possuísse uma OD<sub>595nm</sub> entre 0.1 e 0.2. O microrganismo é deixado a crescer a 37°C a 150rpm até ao momento da adição ao bioreactor. Enquanto as culturas crescem, os sistemas de adição e tubagens do bioreactor são montados, existindo nestas fermentações três sistemas de adição:

-Sistema de Adição 1: Destinado à adição de Sulfato de Magnésio; de Glucose; de Ampicilina/Cloramfenicol/Cloridrato de Tiamina; Solução *Stock* de *Trace Elements*; Solução *Stock* de Ferro; IPTG; e do *Feeding 1*;

-Sistema de Adição 2: Destinado à adição de base para controlo de pH (NH<sub>4</sub>OH a 25%);

-Sistema de Adição 3: Destinado à adição de Anti-espuma Simethicone; do Inóculo; e de *Feeding 2*.

Como se pode constatar existem duas soluções de *Feeding* independentes, porém estas são administradas ao longo do tempo simultaneamente. Como o controlo das adições das soluções do *Feeding 1*, do *Feeding 2*, da base e do Anti-espuma são feitos ao longo do tempo e através de controladores presentes no bioreactor (isto é, não são adições de uma vez só) estas soluções estão ligadas bombas peristálticas, que estão configuradas no sistema de monitorização e controlo UBICON que funciona automaticamente de acordo com os sinais fornecido pelo bioreactor.

As condições gerais de operação do bioreactor durante a bioreacção são as seguintes:

- Temperatura constante a 37°C;
- pH ajustado a 7.0 antes da bioreacção e controlado a esse valor com solução de amónia durante o bioprocesso;
- Agitação variável de acordo com as necessidades de pO<sub>2</sub>, estando compreendida na gama de 200 a 1000 rpm;
- Pressão variável de acordo com as necessidades de pO<sub>2</sub>, estando compreendida na gama de 100 a 800 mbar;
- Fluxo de ar a 30L/min;
- pO<sub>2</sub> controlado através da agitação e pressão no reactor para se manter a 30%;
- Anti-espuma era administrada com pulsos de 1 segundo em ciclos de 1 minuto;

O início da administração dos Feedings ocorre após aumento de pH derivado do facto de o microrganismo consumir todo o substrato presente no meio inicial presente no bioreactor, e a partir desse momento o mesmo começa a consumir os intermediários metabólicos subindo assim o pH da solução. Isto sinaliza o bioreactor para começar a administrar as soluções de Feeding, começando então o *fed-batch* que se pretende implementar no bioprocesso seguindo a equação 1 descrita anteriormente.

Para o Feeding 1 optou-se por um caudal inicial (Q<sub>0</sub>) de 40g/h sendo o  $\mu$  variável a cada fermentação indo desde 0.175h<sup>-1</sup> até 0.35h<sup>-1</sup>. Para o Feeding 2 optou-se por um Q<sub>0</sub> de 4g/h e um  $\mu$  também variável desde 0.175h<sup>-1</sup> até 0.35h<sup>-1</sup>. A indução ocorre com IPTG quando se atinge um caudal de 900g/h. Após 4 horas da indução a bioreacção é suspensa, e procede-se à recolha da cultura. De seguida centrifugou-se a cultura crescida a 7460xg a 4°C durante 20 minutos. Após centrifugação descarta-se o sobrenadante e o *pellet* é pesado e aliquoteado. Posteriormente estes são armazenados a -20°C para futura purificação da amostra.

Durante todo o processo de bioreacção foram retiradas amostras do bioreactor de hora a hora (antes da indução) e de meia hora em meia hora (após indução) para serem medidas as OD<sub>595nm</sub>. Essas amostras retiradas do fermentador destinam-se também à determinação de metabolitos.

## 2.5 Disrupção celular/Centrifugação

A biomassa proveniente de 3.1.2 com  $\mu$  de 0,2h<sup>-1</sup> foi ressuspendida em tampão de disrupção numa razão de 4mL/g de biomassa. De seguida a solução foi colocada no homogeneizador Avestin C-5 (Avestin, Ottawa, Canadá) ou APV-2000 (SPX, Charlotte, Estados Unidos da América) (consoante a escala do processo) onde foi submetida a uma passagem sem pressão e duas passagens a 900bar cada. Estando a etapa de homogeneização completa, a suspensão celular foi centrifugada a 17500xg a 4°C durante 30 minutos, seguindo-se um ajuste de pH.

## 2.6 Filtração/Clarificação

Na purificação em pequena escala, é realizada uma filtração em vácuo com filtros Vacuicap 0,8/0,2 $\mu$ m (Pall Corporation, New York, USA) após centrifugação. No caso da purificação em grande escala, foi realizada uma filtração em série com dois filtros com tamanho de poro diferentes. Nestes dois passos de filtração sequencial a solução passou primeiro num filtro de poliétersulfona (PES) Maxicap Sartopore 0,45 $\mu$ m (Sartorius, Göttingen, Alemanha) e de seguida num outro filtro PES Maxicap Sartopore 0,2 $\mu$ m.

## 2.7 Filtração tangencial (TFF)/Unidades de filtração por centrífuga

O passo seguinte é variável consoante a escala do processo. Em pequena escala são usadas unidades de filtração por centrífuga, em grande escala é realizado um passo de filtração tangencial. No caso de pequena escala são usados os Vivaspin 20 de 30kDa (Sartorius, Göttingen, Alemanha), onde foram realizados ciclos de centrifugação a 4000xg a 4°C durante 5 minutos.

No caso de se realizar TFF, a amostra clarificada foi então aplicada num sistema de membranas semelhante ao que está representado na Figura 2.2. Como a Figura 2.2 mostra a amostra clarificada é primeiro aplicada a uma membrana de PES Sartoclon Slice Disposable com *cutoff* de 30kDa (Sartorius, Göttingen, Alemanha). Como a proteína-alvo tem um peso molecular de sensivelmente 10kDa, a mesma irá permear esta membrana, estando o retentado

a recircular para o frasco de administração inicial. O permeado da membrana de 30kDa é então recolhido para um frasco independente e é administrado a uma membrana de PES Sartoco Slice Disposable com *cutoff* de 5kDa (Sartorius, Göttingen, Alemanha). Neste passo a proteína não passa a membrana, logo o que interessa recolher é o retentado da membrana de 5kDa. Este passo permite-nos portanto diminuir drasticamente o volume de solução que irá ser aplicado à coluna de cromatografia ao mesmo tempo que remove bastantes impurezas, nomeadamente compostos pirogénicos. A pressão transmembranar de operação foi entre 0.5 e 1 bar.

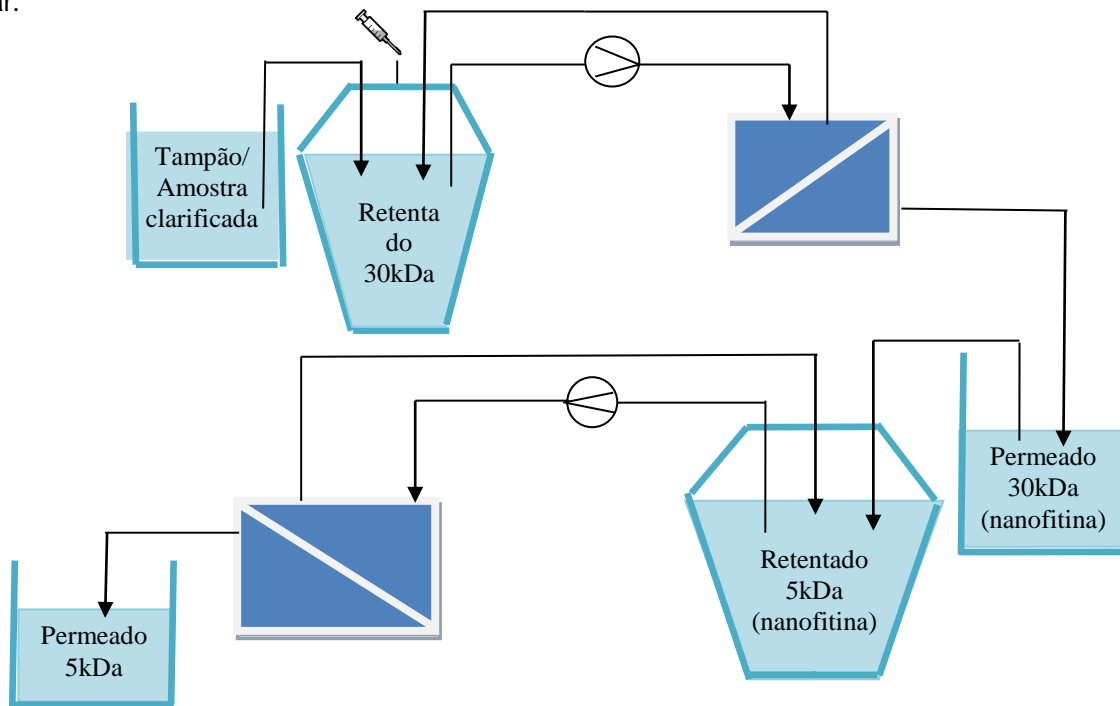


Figura 2.2- Representação do esquema de montagem do Sistema de TFF implementado.

## 2.8 Cromatografia de permuta iónica (IEX)

O processo de cromatografia de permuta iónica foi realizado num Äkta Explorer 100 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) numa coluna xk16 ou xk26 consoante a escala do processo, sendo que o bioprocessamento foi controlado através do *software Unicorn 5.11*. A resina utilizada foi a Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) que foi empacotada a um caudal de 20mL/min. Após a coluna ter sido equilibrada com o Tampão de equilíbrio respetivo a amostra foi aplicada à coluna a um caudal de 7mL/min com um alarme de pressão de 0.5MPa. Seguiu-se a lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio e por último foi feita a eluição da coluna com um gradiente linear crescente de NaCl de 0 a 100% do tampão de eluição respetivo realizado a um caudal de 7mL/min durante 8 volumes de coluna.

## 2.9 Precipitação fracionada por sulfato de amónia

Esta metodologia consiste na precipitação de proteínas ao reagirem com uma solução de sulfato de amónia a uma concentração elevada. Adiciona-se a solução de 100% de saturação de sulfato de amónia (~4,1M) gota a gota à solução que se pretende analisar. A amostra é deixada a incubar *overnight* com agitação à temperatura ambiente. De seguida a amostra foi centrifugada a 31000xg durante 30 minutos, de onde se aproveitou o sobrenadante que prosseguiu para a cromatografia de interação hidrofóbica.

## 2.10 Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)

O processo de cromatografia de interação hidrofóbica foi realizado num Äkta Explorer 100 numa coluna pré-empacotada de 1mL Resource Phe (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), sendo que o bioprocessamento foi controlado através do *software Unicorn 5.11*. Após a

coluna ter sido equilibrada com o Tampão de equilíbrio respetivo a amostra foi aplicada à coluna a um caudal de 4mL/min com um alarme de pressão de 1.5MPa. Seguiram-se as lavagens da coluna com o tampão de equilíbrio e de seguida foi feita a eluição da coluna com um gradiente decrescente de sal com o tampão de eluição respetivo realizado a um caudal de 4mL/min durante 20 volumes de coluna.

## 2.11 Cromatografia de filtração-gel ou exclusão molecular (SEC)

O processo de cromatografia de filtração-gel foi realizado num Äkta Explorer 100 numa coluna Superdex 75 HR10/30 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), sendo que o bioprocessamento foi controlado através do *software Unicorn 5.11*. Após a coluna ter sido equilibrada com o Tampão de equilíbrio respetivo a amostra foi aplicada à coluna a um caudal de 0.5mL/min com um alarme de pressão de 0.3MPa. A coluna foi calibrada usando para tal efeito proteínas de peso conhecido que foram injetadas, e cujo tempo de eluição na coluna nos fornece um padrão de comportamento típico da mesma. Foi construída a curva de calibração com esses padrões de proteína fazendo uma equação de  $K_{av}$  (coeficiente de partição) vs log (peso molecular da proteína padrão). Os valores de  $K_{av}$  foram calculados segundo a equação 4:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0} \quad (4)$$

Em que,

$K_{av}$ - Coeficiente de partição

$V_e$ - Volume de eluição da coluna (mL)

$V_c$ - Volume geométrico da coluna (mL)

$V_0$ - Volume "morto" da coluna (mL)

Esta curva de calibração irá fornecer informação acerca do peso molecular das proteínas analisadas consoante o seu tempo de residência na coluna.

## 2.12 Concentração/Troca de tampão

Para o envio da proteína purificada para os parceiros europeus, normalmente é imposto que seja aliquotado a concentrações elevadas. Como tal, quando o processo é de pequena escala geralmente a amostra é concentrada usando uma unidade de filtração por centrifuga, Vivaspin 6 ou 20, com uma membrana PES de 3kDa. Os ciclos feitos foram de 5000xg a cada 5 minutos. Este passo de concentração é associado ainda a um passo de troca de tampão. A troca de tampão é necessária pois a proteína após eluição encontra-se num solvente com concentrações elevadas de sais ou outros eluentes que não são adequados para estudos fisiológicos ou testes animais. Torna-se portanto necessário trocar de tampão para um fisiológico, recaindo a escolha normalmente sobre o *Phosphate Buffer Solution* (PBS).

No caso de ser um processo de grande escala, após a eluição da proteína da coluna procedeu-se à sua concentração e troca de tampão utilizando para tal efeito um passo de TFF, por Vivaflow 200 de PES com *cutoff* de 5kDa (Sartorius, Göttingen, Alemanha) ou, caso o volume seja muito elevado, por uma membrana PES Sartoclon Slice Disposable com *cutoff* de 5kDa.

## 2.13 Ensaio de deteção de bacteriófagos

Após preparação de controlos positivos para os bacteriófagos (T2 e phiX174) com a gama de *Plaque Forming Unit* (PFU) correta para o ensaio, as culturas que se pretendem testar se possuem bacteriófagos lisogénicos foram incubadas em 100mL de meio 2YT até atingir uma  $OD_{595nm}$  entre 0.15 e 0.2. Uma vez atingido essa gama de valores adicionou-se Mitomicina C para atingir uma concentração na cultura de 35ng/mL. Deixou-se a cultura crescer até atingir o valor máximo de densidade ótica possível, sendo que a partir desse valor foi seguido um decréscimo das OD's, presumivelmente devido à lise efetuada pelos bacteriófagos. A cultura foi de seguida centrifugada 2 vezes a 17.000xg durante 15 minutos a 4°C, tendo-se aproveitado o sobrenadante.

Estando os controlos positivos e as amostras a testar preparadas, iniciou-se o ensaio que consistiu em adicionar uma mistura de 1mL estirpe a testar (*E. coli* *Acella* ou *E. coli* *DH5α*) com 100μL de uma cultura sensível à infeção de bacteriófagos lisogénicos para caixas de Petri com meio 2YT suplementado com 15g/L de agar. Estas caixas de Petri foram deixadas a incubar *overnight* a 37°C e verificou-se a formação de nodos no dia seguinte.

## 2.14 Análise de metabolitos

Com o objetivo de detetar e quantificar a presença de certos metabolitos no crescimento das culturas microbianas foram realizados testes de deteção dos seguintes metabolitos: Glucose (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) Magnésio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) e Acetato (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América). As amostras retiradas durante cada fermentação tiveram de ser centrifugadas a 10000xg durante 10 minutos, de onde se guardou o sobrenadante a -20°C. Os testes de quantificação que foram realizados seguiram o procedimento fornecido pelo fabricante.

## 2.15 Análise de clones recombinantes

Para o *screening* e seleção de clones recombinantes primeiro realizou-se um crescimento *overnight* a 37°C com agitação 180rpm da estirpe *E. coli* *SHuffle T7 Express pLysY (S2-modificada)* (SHuffle S2-modificada) em meio 2YT. No dia seguinte diferentes diluições da cultura ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) foram plaqueadas em caixas de Petri com a mesma composição do meio 2YT suplementado mas com 15g/L de Agar que foram deixadas a incubar *overnight* a 37°C. No dia seguinte, transferiram-se as colónias isoladas, presentes nas caixas de Petri, para meio 2YT suplementado que foi deixado a incubar *overnight* a 37°C com agitação de 180rpm. Foram analisadas no dia seguinte as OD<sub>595nm</sub> das culturas e para garantir que se está a analisar a mesma quantidade de células, os valores das densidades foram normalizados para um volume de cultura entre 1 e 2mL que foram utilizados para extração de DNA plasmídico, utilizando o GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos da América). Os plasmídeos extraídos foram quantificados no Nanodrop 2000-C (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos da América) e o número de cópias do plasmídeo em cada clone bacteriano foi determinado segundo a equação 5:

$$n^{\circ} \text{ de cópias de plasmídeo por célula} = \frac{\text{Quantidade de proteína} \times \text{Número de Avogadro}}{\text{Tamanho DNA} \times 650 \times n^{\circ} \text{ de células}} \quad (5)$$

Em que,

Quantidade de proteína- Fornecido pela quantificação no Nanodrop 2000-C (g);

Número de Avogadro-  $6.022 \times 10^{23}$  (nº de cópias/mol);

Tamanho DNA- Tamanho do plasmídeo pQE30 (3584 par de bases);

650- Peso molecular de um par de base do DNA (Dalton/bp);

Nº de células- Fornecido pela relação de OD<sub>600nm</sub> com número de células (células/mL).

Tendo em conta os resultados tidos do GeneJET Plasmid Miniprep Kit foram selecionados os clones que representavam toda a gama de número de cópias de plasmídeo/célula, para efetuar a análise de concentrações de produto em cada clone. Das culturas previamente crescidas foram inoculados 100μL de cada clone em 10mL de meio suplementado 2YT, o qual foi deixado a crescer *overnight* a 37°C com uma agitação de 180rpm. No dia seguinte foram medidas as absorvâncias e transferiu-se quantidade necessária de cada cultura para um novo Erlenmeyer com meio fresco 2YT para que este ficasse com uma OD de 1. O meio continha também indutor de expressão, IPTG, sendo de seguida deixado a incubar durante 4 horas a 37°C a 180rpm. Após as 4 horas retirou-se entre 1 a 2mL de cultura (as OD's foram normalizadas para comparar o mesmo número de células) para análise da produtividade. Os eppendorfs foram centrifugados a 12100xg durante 20 minutos de onde se descartou o sobrenadante e aplicou-se o reagente Bugbuster Protein Extraction Reagent (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) ao pellet obtido que irá provocar a lise celular por ação

de detergentes libertando o conteúdo intracelular. Deixou-se o Bugbuster surtir efeito incubando à temperatura ambiente durante 20 minutos, seguindo-se depois nova centrifugação a 12100xg aproveitando-se desta feita o sobrenadante que posteriormente foi analisado por electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

## 2.16 Quantificação de proteína

Durante o processo de purificação a concentração proteica das várias amostras foi acompanhada através do método de quantificação da Bio-Rad e do método de quantificação por coeficiente de extinção. O método da Bio-Rad é mais utilizado no início do processo quando ainda existe uma grande quantidade de proteínas em solução, sendo que a leitura por coeficiente de extinção é aplicada em fases mais tardias da purificação. O método Bio-Rad baseia-se no princípio de Bradford e consiste na leitura da absorvância a 595nm de 5mL de um reagente corante *standard* (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos da América) com 100µL da diluição da amostra necessária. O método de quantificação por coeficiente de extinção baseia-se na lei de Beer-Lambert descrita na equação 6:

$$A = \epsilon lc \quad (6)$$

Em que,

A- Absorvância a 280nm

$\epsilon$ - Coeficiente de extinção da proteína ( $M^{-1}cm^{-1}$ )

l- Percurso ótico da cuvette (cm)

c- Concentração do composto em solução (mol/L)

O coeficiente de extinção da proteína foi calculado pelo *software* EXPASy, sendo que para ter o valor da concentração basta possuir o valor da absorvância medida a 280nm na diluição desejada (assumindo que o percurso ótico da cuvette é 1cm). Como o  $\epsilon$  é uma característica específica de cada proteína, este método só pode ser aplicado em fases finais do *downstream* em que a proteína já se encontra pura.

Foi ainda usada a técnica de densitometria para determinação de concentrações proteicas em géis SDS-PAGE. Para esta técnica utilizou-se o *software* ImageJ que permitiu analisar a densidade das bandas do gel, e com uma curva de calibração de Albumina de Soro Bovino (BSA) foi permitido calcular os valores da concentração desejados.

## 2.17 SDS-PAGE / Eletroforese em gel de agarose

Com o objetivo de avaliar o processo geral de purificação, as amostras a cada passo da purificação foram submetidas a um SDS-PAGE em géis 4-12% Bis-Tris. As condições de operação da eletroforese foram 200V; 400mA; 50W durante 40 minutos e o tampão de eletroforese de corrida usado foi o MES. Para visualização das bandas após a corrida foi adicionado SimplyBlue SafeStain.

Foi também realizado por vezes electroforese em géis de agarose (1%) para análise de amostras de DNA. O gel tem na sua composição o corante Redsafe Nucleic Acid Staining que permitirá a visualização mais tarde. O tampão de corrida é o TAE e as condições foram 100V; 200mA; 30W durante 60 minutos.

## 2.18 Quantificação de endotoxinas

Procedeu-se à leitura de endotoxinas no Endosafe-PTS (Charles River, Wilmington, Estados Unidos da América) através do kit de deteção Limulus amoebocyte lysate (LAL). Foram adicionados 25µL da amostra a uma determinada diluição a 4 poços do cartucho e foram anotados os parâmetros que o dispositivo fornece sobre as características da amostra tais como: Sample EU/mL; Sample RT CV; Spike RT CV; Spike Recovery. No caso da amostra ter valores de endotoxinas muito elevados procedeu-se à sua remoção através do uso de uma Sartobind STIC nano (Sartorius, Göttingen, Alemanha) a um caudal de 0.2mL/min.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Otimização do processo de produção da nanofitina (*upstream processing*)

Um dos objetivos do projeto SADEL consiste na implementação de um processo de produção da nanofitina em larga escala. A otimização do *upstream* é portanto um dos objetivos mais importantes do plano do projeto. Como já foi referido no projeto SADEL optou-se por realizar fermentações em *fed-batch* com o objetivo de obter culturas com elevadas densidades celulares potenciando desta forma a produtividade volumétrica. Estas culturas de elevadas densidades celulares têm de ser rigorosamente controladas de modo a evitar acumulação de substâncias tóxicas e limitações por falta de oxigénio que inibem o crescimento do microrganismo em questão. No decurso das otimizações *upstream* foram estudados diferentes  $\mu$  de modo a respeitar as condicionantes do microrganismo, assim como condições específicas do crescimento da cultura tais como tempos ótimos de inoculação, de recolha e temperatura ótima de cultivo. Foi ainda feito um *screening* de clones de modo a detetar colónias super produtoras da nanofitina desejada.

##### 3.1.1 Fermentação *fed-batch* à escala de 30L para produção da S2-modificada

À semelhança do que já foi referido as fermentações *fed-batch* realizadas no SADEL têm uma fase inicial de *batch*, em que todos os nutrientes estão presentes no meio de crescimento. Assim que ocorre a depleção da fonte de carbono do meio, o pH irá aumentar o que irá sinalizar os controladores para se iniciar o *fed-batch* a um  $\mu$  constante através da alteração dos caudais de solução, equação 1.

Os resultados obtidos referentes à primeira fermentação de larga escala utilizando a SHuffle S2-modificada com um  $\mu$  de  $0.35\text{h}^{-1}$  estão representados na figura 3.1.

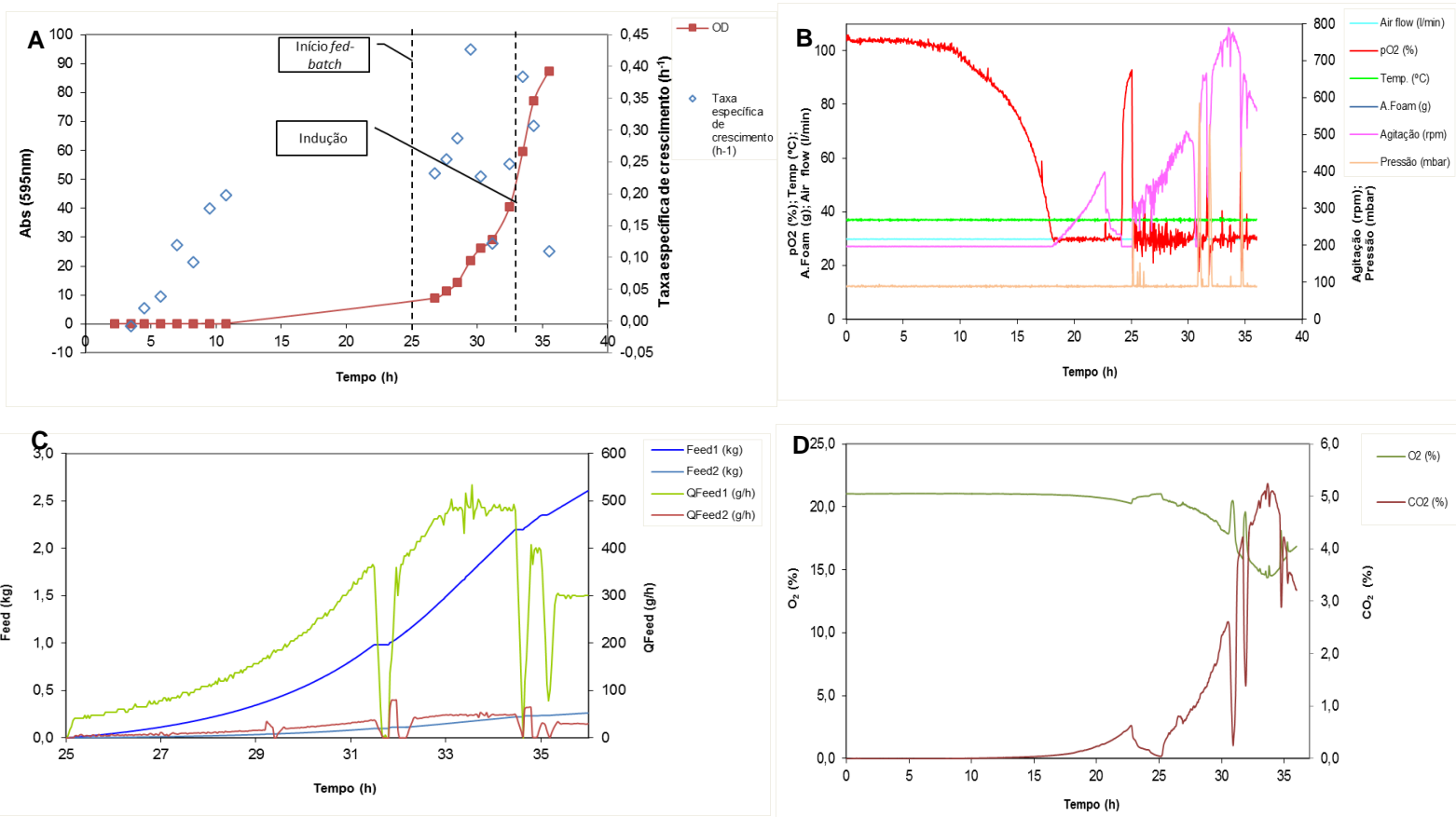


Figura 3.1- A) Evolução das densidades óticas do microrganismo ao longo do tempo da fermentação, assim como respetivas taxas específicas de crescimento para cada momento. B) Evolução dos diferentes parâmetros controláveis (*Air flow*,  $pO_2$ , Temperatura, *Anti-foam*, agitação e pressão) ao longo do tempo da fermentação. C) Comparação, em percentagem, entre os perfis de consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono ao longo do tempo da fermentação. D) Comparação dos perfis de administração dos dois feedings ao longo do tempo da fermentação.

Como a figura 3.1 (A) mostra, apesar de nesta fermentação a estirpe ter crescido até valores razoáveis (OD máxima de 87,5) as condições que foram atingidas não reúnem de todo as características desejadas para uma fermentação a nível industrial. Analisando a figura 3.1 (B) observa-se que existe uma *lag phase* de aproximadamente 12 horas até se começar a observar alterações nos níveis de pO<sub>2</sub>. Ora, a existência de uma fermentação a nível industrial em que 12 das horas contempladas no processo não ocorre crescimento microbiano nem formação de produto não é de todo desejável.

A figura 3.1 (B) diz respeito ao controlo de diversos parâmetros durante o decurso da fermentação. Como se pode constatar a temperatura é mantida a 37°C, o *airflow* a 30L/min e a pressão e a agitação dentro do reactor variam de maneira a manter os valores de pO<sub>2</sub> nos 30%. No início da fermentação os valores de pO<sub>2</sub> estão a 100% vindo a decrescer gradualmente ao longo do tempo à medida que a bactéria começa a dividir-se e metabolizar os nutrientes presentes no meio de cultura. Porém, quando chega aos 30% este valor é mantido, primeiro, através da agitação que conforme se observa começa a aumentar e, secundariamente, quando a agitação não é suficiente, através do aumento de pressão (o que não se veio a verificar neste caso pois não foi necessário). O momento da manutenção do valor de pO<sub>2</sub> a 30% coincide com um período em que a bactéria começa a ter uma maior atividade metabólica começando portanto a atingir valores de densidade ótica mais altos. Isso comprova-se tanto pelo aumento na taxa de produção de CO<sub>2</sub> patente na figura 3.1 (D) como também pelos valores mais elevados de densidades óticas a 595nm presentes na figura 3.1 (A). Na figura 3.1 (C) estão representados os caudais de administração de ambos os *feedings* ao longo do tempo. Como já foi dito anteriormente no decurso das fermentações de grande escala estabeleceu-se a implementação de dois *feedings* independentes, sendo o *feeding* principal constituído maioritariamente pela fonte de carbono primária (glucose) e o *feeding* 2 constituído por uma solução de fosfatos. A manutenção de um caudal constante de *feedings* como se verifica a partir das 32,5 horas de fermentação deve-se ao facto de este ser o momento da indução da produção da nanofitina pela adição de IPTG, mantendo um valor constante até ao término da mesma.

Como se pode observar esta fermentação teve uma *lag phase* acentuada. Efetivamente, esta *lag phase* não tinha estado presente em fermentações anteriores com outros microrganismos. Na figura 3.2 estão representadas as comparações entre duas fermentações *fed-batch* à escala de 30L, a que foi anteriormente referida e uma fermentação de uma *E. coli* *Acella pLysS S1-modificada* (*Acella S1-modificada*), microrganismo previamente utilizado em fases iniciais do projeto SADEL.

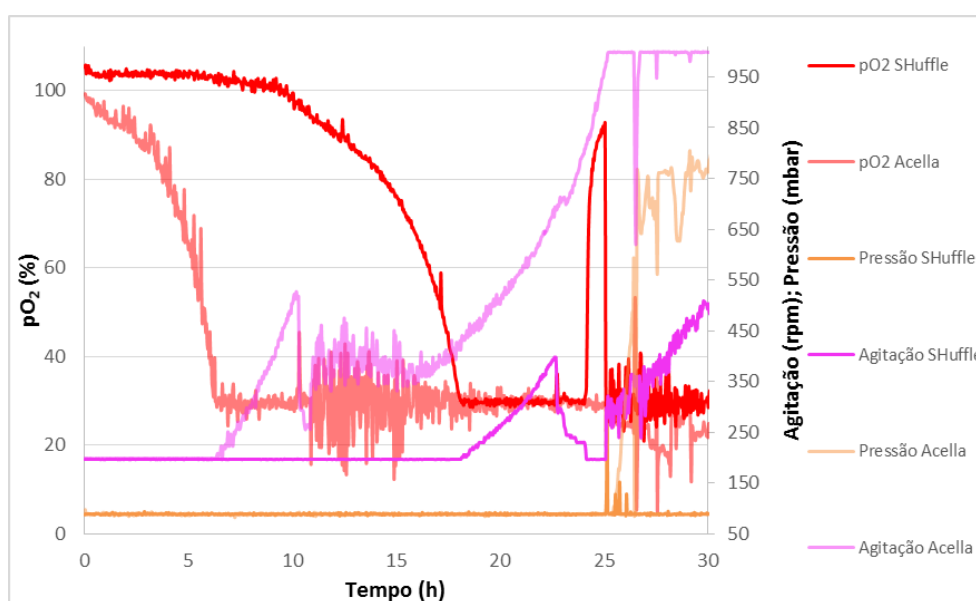


Figura 3.2- Comparação das pressões, agitações e pO<sub>2</sub> ao longo do tempo de duas fermentações à escala de 30L com dois microrganismos distintos, SHuffle S2-modificada e Acella S1-modificada.

Como a figura 3.2 mostra, uma fermentação de larga escala com a mudança do material biológico tem diferenças drásticas no decurso do processo, destacando-se logo de início a *lag phase* de ambas as estirpes que é consideravelmente diferente. A duração da *lag phase* no reactor está intimamente ligada ao crescimento do inóculo e à fase em que o mesmo é transferido para o vaso mecânico.<sup>60</sup> Neste caso específico a SHuffle S2-modificada possui cinéticas de crescimento diferentes da Acella S1-modificada o que fez com que a cultura quando fosse transferida para o reactor tenha provocado uma *lag phase* como a que é visível na figura. De facto, o ideal é algo como o que se verifica na figura 3.2 em que a estirpe Acella S1-modificada mal é inoculada começa a metabolizar os nutrientes presentes no meio de fermentação e rapidamente começa a crescer e a multiplicar-se, diminuindo rapidamente o pO<sub>2</sub>.

Como já foi referido, para as fermentações em bioreactor são realizados dois crescimentos microbianos, o pré-inóculo e o inóculo. Nesta fermentação de SHuffle S2-modificada realizou-se um pré-inóculo que foi deixado a crescer durante 16 horas e um inóculo que foi deixado a crescer 16 horas e 40 minutos. Estes tempos de crescimento geralmente são suficientes para que a estirpe cresça até densidades óticas elevadas, e em alguns casos de algumas estirpes que até chegue à fase estacionária. No entanto, para a SHuffle S2-modificada foi assumido que estes valores se aplicariam a esta estirpe e se manteriam reprodutíveis quando na verdade esta poderia necessitar de tempos de crescimento maiores ou menores. Como tal, foram estudados nas fermentações seguintes tempos de inoculação diferentes como será descrito de seguida.

Durante esta fermentação também se optou por um  $\mu$  de 0.35h<sup>-1</sup> que se revelou manifestamente elevado para as necessidades do microrganismo. A escolha de um  $\mu$  tem de ser ponderada pois se esta variável possuir um valor elevado demais terá implicações na acumulação de substâncias tóxicas para o microrganismo. Neste caso, este valor foi excessivo pois como se verificou durante a bioreacção quando se parava por instantes as bombas de administração dos *feedings* não se verificava qualquer alteração no pH da cultura o que significa que a cultura estaria a acumular glucose. Quando é interrompido o fornecimento de fonte de carbono à cultura, se esta não estiver a acumular glucose, existem uns instantes em que não está presente no meio de fermentação nenhuma fonte de carbono do *feeding*. Como tal, o microrganismo tem de consumir certos compostos, como lactato ou acetato, para poder obter energia. Como estes compostos têm carácter ácido o consumo destes fará aumentar o pH. Como o metabolismo do microrganismo durante esta fermentação não foi o desejado, a fermentação não decorreu até atingir um caudal de 900g/h (como inicialmente definido), e a cultura foi induzida quando se encontrava a um caudal de 485g/h do *feeding 1* e passadas 2 horas e 50 minutos foi feita a recolha do bioreactor obtendo-se 811.8g de biomassa.

### 3.1.2 Influência de diferentes taxas específicas de crescimento em fermentações *fed-batch* à escala de 30L

Do processo anterior verificou-se que a administração dos *feedings* durante o *fed-batch* a um  $\mu$  de 0.35h<sup>-1</sup> era excessiva para a SHuffle S2-modificada. Como tal estudou-se o efeito de ter um  $\mu$  de 0.2h<sup>-1</sup> e de 0.175h<sup>-1</sup> em duas fermentações *fed-batch* de 30L independentes. Os resultados destas operações estão representados na figura 3.3.

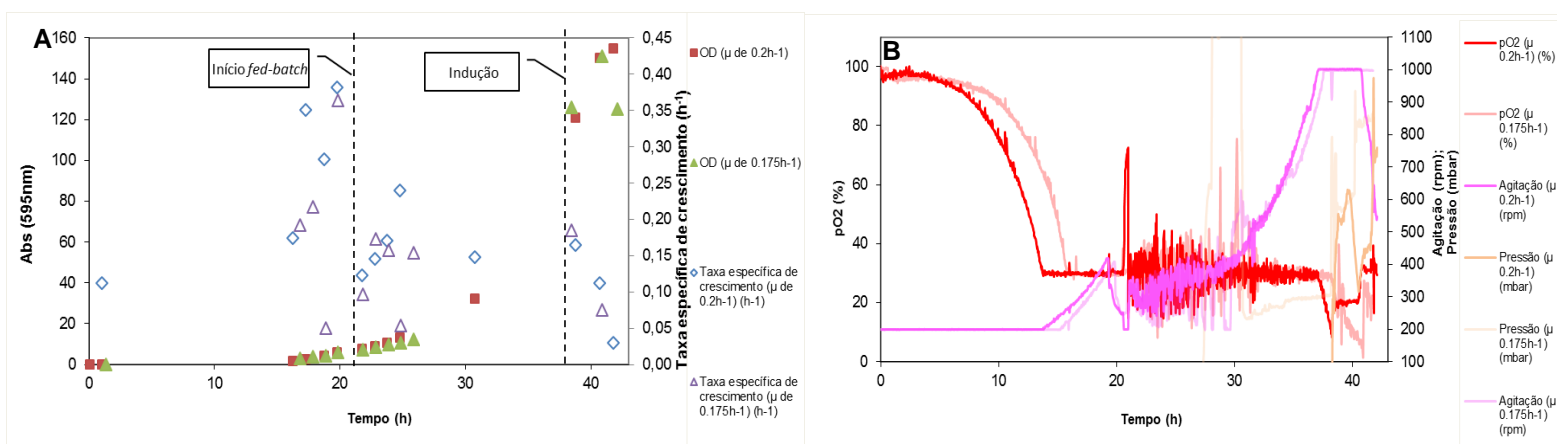


Figura 3.3- A) Comparação da evolução das densidades óticas do microrganismo ao longo do tempo das fermentações, assim como respetivas taxas específicas de crescimento para cada momento. B) Comparação de pressões, agitações e pO<sub>2</sub> de fermentações com  $\mu$  de 0.2h<sup>-1</sup> e 0.175h<sup>-1</sup> ao longo do tempo.

Os dois processos comportaram-se de maneira muito semelhante ao longo do tempo, como é visível na figura 3.3. Como seria de prever destaca-se ainda que a partir do momento do início do *fed-batch* (aproximadamente 21 horas em ambas as fermentações) os valores calculados de  $\mu$  para cada ponto durante a fermentação baixou em comparação com os  $\mu$  verificados durante a fase *batch*, aproximando-se dos valores que foram impostos através dos *feedings*. Como durante o *fed-batch* é imposto ao microrganismo uma taxa de administração de nutrientes, este não pode apresentar um ritmo de metabolismo tão elevado como apresentava durante a fase *batch*, em que todos os nutrientes estavam disponíveis para serem metabolizados.

Como foi referido anteriormente verificou-se novamente uma *lag phase* em que apenas após cerca de 8 horas (para a fermentação com  $\mu$  de  $0,2h^{-1}$ ) e de 9 horas (para a fermentação com  $\mu$  de  $0,175h^{-1}$ ) é que se verificaram mudanças no  $pO_2$ . Os tempos de crescimento e OD's respetivas desta e das restantes fermentações encontram-se resumidas na tabela 3.1. No entanto, para esta fermentação os tempos de incubação do pré-inóculo e do inóculo foram superiores aos que foram apresentados em 3.1.1, que acabaram por representar também um decréscimo da *lag phase* observada durante a fase *batch*. Os resultados mostram que a estirpe SHuffle S2-modificada necessita de tempos de incubação de inóculo superiores para poder crescer até valores de densidades óticas mais elevadas para quando a cultura for transferida para o bioreactor diminuir portanto a duração da *lag phase*.

### 3.1.3 Produtividades celulares obtidas em bioreactor

Quando se referem produtividades obtidas em bioreactor, estas têm sempre o objetivo de maximizar a biomassa obtida que por sua vez é conseguido fornecendo condições ótimas de crescimento ao microrganismo para que este alcance valores de densidades óticas elevadas. Está na tabela seguinte um resumo das três fermentações em bioreactor realizadas e respetivas produtividades celulares

Tabela 3.1- Comparação das diferentes condições de crescimento das fermentações e respetivas biomassas obtidas para cada processo.

Processo	$\mu$ implementado ( $h^{-1}$ )	Biomassa obtida (g)	OD máxima atingida	Tempo de indução (h)	Tempo de pré-inóculo (h)	Tempo de inóculo (h)	OD inóculo
3.1.1	0.35	811.8	87.5	2h:50m	16h	16h:40m	1.73
3.1.2	0.175	4333.70	155	3h	24h	23h:15m	3.02
3.1.2	0.2	3593.74	151	3h:40m	24h	22h:40m	4.42

A tabela 3.1 mostra que o processo que produziu mais biomassa foi a fermentação com  $\mu$  de  $0,175 h^{-1}$  atingindo 4333,7g. Foi também o processo onde o microrganismo atingiu as OD's mais elevadas. Este processo foi em tudo muito semelhante ao com  $\mu$  de  $0,2h^{-1}$  pois tiveram valores de OD's e tempos de cultura e indução muito aproximados. Existe porém, uma substancial diferença na biomassa produzida que foi de 3593,74g. A densidade ótica que o inóculo do microrganismo atingiu nestas duas fermentações foi menor na com  $\mu$  de  $0,175 h^{-1}$  mas devido ao facto de as condições de operação para esta fermentação serem mais favoráveis conseguiu atingir no decurso da bioreacção valores mais altos de densidade ótica. Por último salienta-se o processo com  $\mu$  de  $0,35h^{-1}$  onde apenas 811,8g de biomassa foram produzidas e uma OD máxima de 87,5 foi atingida. Tal como foi referido este processo com estas condições de operação não se mostra favorável não só pelos valores obtidos como pelas possíveis alterações metabólicas ao produto que poderão ter ocorrido no decurso da fermentação. Sendo assim, conclui-se que uma fermentação em reator de 30L terá mais benefícios na fase *fed-batch* se se impuser um  $\mu$  de  $0,175h^{-1}$ . Desta maneira a biomassa é maximizada sendo no entanto importante referir que o uso de um  $\mu$  de  $0,2h^{-1}$  não deve ser descartado pois favorece os tempos de operação da fermentação sendo portanto um benefício a nível de gestão de equipamento e recursos.

### 3.1.4 Análise de concentração de metabolitos

Com o objetivo de caracterizar e analisar o consumo e produção de certos metabolitos pela SHuffle S2-modificada durante a fermentação do processo 3.1.2 com  $\mu$  de  $0,2h^{-1}$ , foram determinadas as concentrações de glucose, magnésio e acetato no decurso da bioreacção.

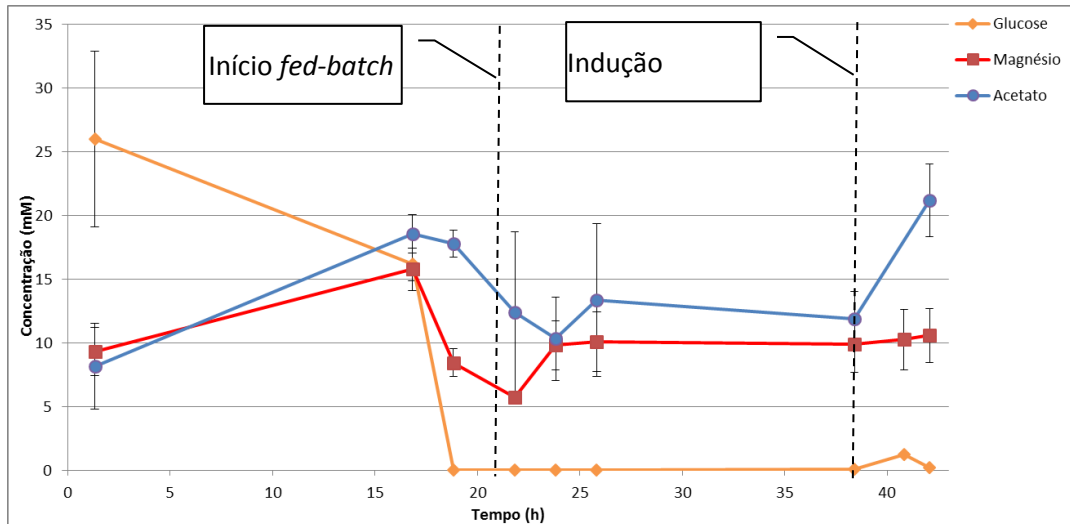


Figura 3.4- Concentração de Glucose, magnésio e acetato ao longo do tempo da fermentação da SHuffle S2-modificada.

O ião magnésio entra na composição do meio de cultura e dos feedings através do reagente sulfato de magnésio que se apresenta a baixas concentrações (cerca de 8mM). A figura 3.4 mostra que as medições referentes a este metabolito foram todas muito equilibradas e apresentam valores de aproximadamente 10mM tanto antes como depois da administração do feedings mantendo o valor até ao final do processo mostrando portanto ser também um método que representa a dinâmica intracelular.

A glucose e o acetato são talvez os compostos mais importantes para medir a sua concentração ao longo de uma bioreacção. Estes compostos são indicadores em tempo real do estado da fermentação e da capacidade metabólica do microrganismo. A glucose por ser a fonte de carbono principal interessa monitorizar para averiguar se o microrganismo se encontra a metabolizar este hidrato de carbono e se portanto não nos encontramos numa situação de acumulação de glucose. O acetato por ser um metabolito que com a acumulação se torna tóxico pretende-se evitar durante a bioreacção.

A figura 3.4 mostra um valor de 26mM de glucose quando a cultura possui 1 hora e meia de crescimento no bioreactor, sendo que a partir deste valor a concentração de glucose tende a decrescer. Como já foi referido, quando o bioreactor é inoculado existe uma fase inicial em que se está a operar no modo *batch*, existindo no meio de fermentação nutrientes suficientes para que o microrganismo consiga metabolizar e crescer. Quando a fonte de carbono principal (glucose neste caso) acaba, o microrganismo começa a produzir e consumir certos produtos (como acetato) que por terem caracter ácido vão provocar uma subida de pH no meio de fermentação que serve de sinal para que se comece o *fed-batch*. Na fase *batch*, quando existe uma grande abundância de fonte de carbono para metabolizar a tendência é que o microrganismo metabolize este composto rapidamente e desta forma que promova a acumulação de intermediários metabólicos. Este efeito é visível na figura 3.4 em que a glucose é metabolizada durante a fase *batch* (das 0 às 21 horas de cultivo), tendo inclusivamente depletado do meio de fermentação às 19 horas, mesma altura em que os níveis de acetato atingiram o seu patamar máximo. A partir deste momento em que a glucose já não se encontra presente no meio coincide com uma diminuição dos níveis de acetato que por sua vez irão provocar o aumento de pH que indicará o *fed-batch*. A partir deste momento não se deteta glucose no meio de cultura o que é de esperar visto que se não estivermos a operar a um  $\mu$  excessivo, o microrganismo encontra-se capaz de metabolizar toda a glucose que lhe for fornecida através dos *feedings*. Os níveis de glucose mantêm-se negligentes até ao final da

bioreacção, e os de acetato mantêm-se baixos até ao momento de indução (38 horas), momento em que este metabolito tende a aumentar a sua concentração no meio de fermentação. Isto pode ser indicador de uma alteração do estado metabólico da bactéria que pode provocar um aumento dos níveis de acetato até ao momento da recolha da cultura.

Pode-se concluir portanto que esta fermentação do ponto de vista metabólico cumpriu o seu objetivo principal que foi impedir a acumulação de substâncias tóxicas no meio de fermentação e potenciar a completa metabolização de glucose através da escolha de um  $\mu$  de  $0,2h^{-1}$  durante o *fed-batch*.

### 3.1.5 Otimização condições cultura em pequena escala

Durante a otimização do *upstream* foram testadas em pequena escala diferentes condições de cultura da SHuffle S2-modificada e sua influência na taxa específica de crescimento. Foram estudadas duas temperaturas de crescimento, 37°C e 30°C. Estes dois testes referidos foram realizados apenas com um antibiótico de resistência, a ampicilina, a uma concentração de 100 $\mu$ g/mL. No entanto foi realizado um teste adicional a 37°C com uma concentração de cloramfenicol de 50 $\mu$ g/mL juntamente com ampicilina a 100 $\mu$ g/mL. No fundo esta última condição acaba por funcionar como controlo positivo pois é a condição que é utilizada nas fermentações de pequena e grande escala. Os resultados referentes aos diferentes crescimentos realizados estão apresentados nas figuras seguintes.

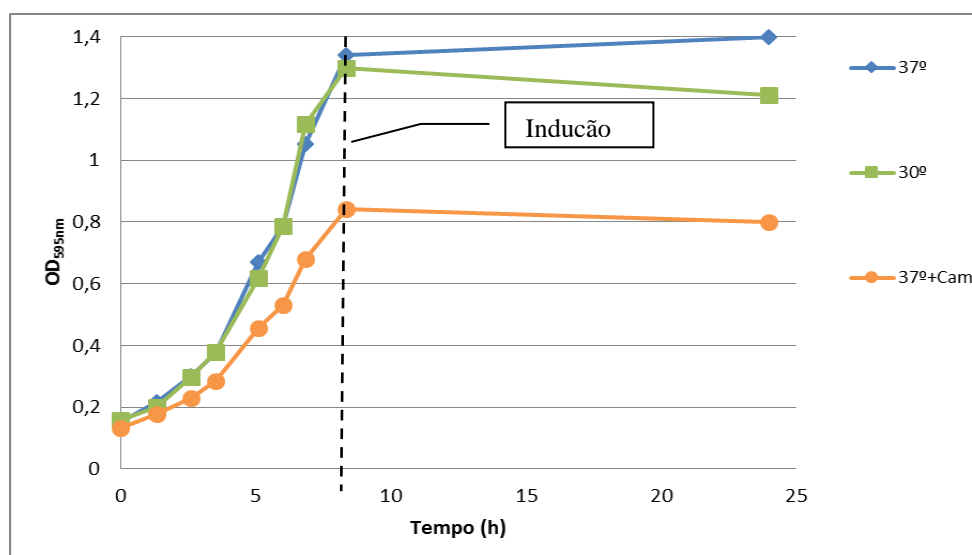


Figura 3.5- Perfil de crescimento da SHuffle S2-modificada em diferentes condições.

A opção de remover o cloramfenicol como antibiótico de resistência nestes testes foi para analisar qual o efeito deste composto no crescimento microbiano e a respetiva produtividade. Efetivamente, ao analisar o plasmídeo de inserção na estirpe verificou-se que este não possui qualquer gene de resistência ao cloramfenicol mas sim apenas à ampicilina. A resistência ao cloramfenicol é característica da própria estirpe e não da construção do plasmídeo. Ao trabalhar com este antibiótico, não se está a contribuir para um aumento da pressão seletiva com o objetivo de separar as bactérias que integraram o plasmídeo das restantes. Não existe portanto nenhuma vantagem significativa que possa vir do uso deste antibiótico. Além deste facto todos os cultivos realizados com este antibiótico estavam a ser realizados com uma concentração excessiva do mesmo (50 $\mu$ g/mL) o que pode provocar uma inibição no crescimento devido ao stress que proporciona ao microrganismo.

A figura 3.5 mostra desde logo um claro atraso no que diz respeito ao crescimento microbiano do controlo positivo o que acaba por confirmar o que foi referido relativamente à concentração excessiva de cloramfenicol que estava a ser usada. Com os valores das densidades óticas ao longo do tempo foi possível calcular a taxa específica de crescimento para cada microrganismo em cada uma das condições usando para tal efeito a equação 3.

Tabela 3.2- Comparação dos diferentes valores de taxas específicas de crescimento obtidas para cada uma das condições estudadas.

Condição	$\mu$ ( $h^{-1}$ )
Crescimento a 30°C com ampicilina	0,286
Crescimento a 37°C com ampicilina	0,288
Crescimento a 37°C com cloramfenicol e ampicilina	0,243

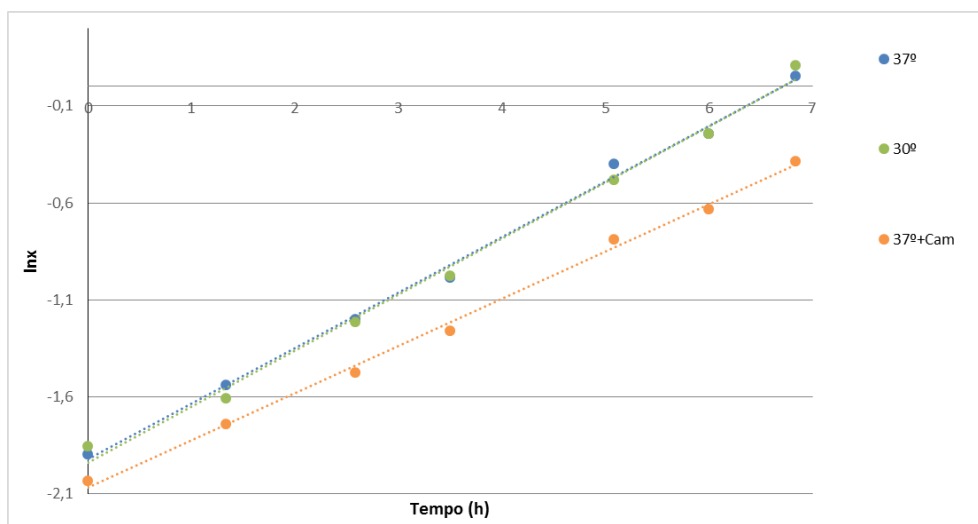


Figura 3.6-Representação gráfica dos diferentes valores de células (em logaritmo) em função do tempo para cada uma das condições estudadas.

A figura 3.6 e a tabela 3.2 mostram claramente uma diferença entre a condição que possui cloramfenicol das restantes. Essa diferença é visível não só graficamente mas também numericamente pelo seu valor de taxa específica de crescimento que foi calculado em  $0,243h^{-1}$ . Os restantes microrganismos têm comportamentos bastante semelhantes apresentando valores de  $\mu$  entre  $0,286$  e  $0,288h^{-1}$ . O objetivo seguinte foi de analisar se as diferenças a nível de crescimento microbiano se traduzem em diferenças a nível de produção de nanofitina. Como tal analisaram-se por SDS-PAGE extratos celulares correspondentes a cada uma das condições estudadas, utilizando padrões de concentrações conhecidas de BSA e um lote de S2-modificada purificada.

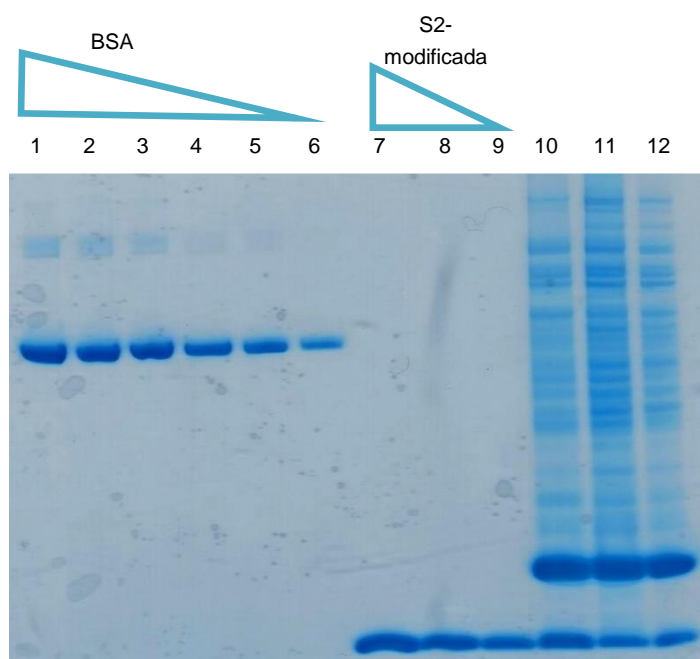


Figura 3.7- SDS-PAGE das diferentes condições de crescimento microbiano. 1-6 Diferentes concentrações de BSA; 7-9 Diferentes concentrações de S2-modificada purificada; 10- Condição de 37°C com cloramfenicol e ampicilina; 11- Condição de 30°C; 12- Condição de 37°C.

A análise das bandas da figura 3.7 por densitometria com o *software* ImageJ mostra que a condição de crescimento a 37°C com cloramfenicol e ampicilina, banda 10, produz mais nanofitina do que as restantes condições. Este resultado leva a concluir que apesar de o uso de cloramfenicol afetar a taxa de crescimento específico do microrganismo, o uso desse antibiótico não aparenta dificultar a produção da nanofitina. Apesar deste resultado, o efeito do cloramfenicol pode estar disfarçado devido à escala do processo em que nos encontramos (Erlenmeyer de 500mL com 50mL de cultura). Efetivamente, a OD final atingida no teste de 37°C com ampicilina e cloramfenicol foi de 0,84 contra uma OD de 1,34 na condição de 37°C. O objetivo da escolha de uma condição ideal de crescimento terá que ser aplicável à escala final que se deseja, que neste caso é um bioreactor de 30L. Como tal, o facto de realizar um volume de cultura de 50mL se mostrar suficiente para verificar diferenças a nível de crescimento microbiano poderá não ser uma escala suficientemente grande ainda para poder analisar diferenças a nível de proteína. Efetivamente, a produtividade da condição de 37°C com dois antibióticos de resistência terá de ser muito menor pois o microrganismo não consegue crescer a um ritmo tão elevado e não irá portanto sintetizar tanta nanofitina como nas condições restantes. Das restantes condições verifica-se que a condição de 37°C, banda 12, com ampicilina poderá ser a condição ideal pois tem uma menor concentração de contaminantes presentes no extrato celular, além de uma banda mais intensa de nanofitina quando comparada com a condição de 30°C com ampicilina, banda 11.

### 3.1.6 Seleção de clones

Como já foi referido anteriormente a otimização no *upstream* pode ocorrer a diversos níveis sendo que usualmente se investe bastante na otimização de meios de cultura e tempos de operação. Porém, a estirpe a utilizar também poderá ser otimizada visando o seu aumento de produtividade. Efetivamente, as culturas bacterianas tratam-se de um conjunto heterogéneo de bactérias que possuem características intrínsecas distintas, como por exemplo características metabólicas, que por sua vez poderão influenciar a produção da proteína desejada. Neste caso específico, foi estudada a análise de clones recombinantes de SHuffle S2-modificada com o objetivo de escolher uma colónia com produtividades elevadas da nanofitina desejada.

Foram portanto analisadas colónias isoladas de SHuffle S2-modificada relativamente ao número de cópia de plasmídeos por célula e também o conteúdo em DNA dos plasmídeos extraídos de cada clone que foram aplicados num gel de agarose.

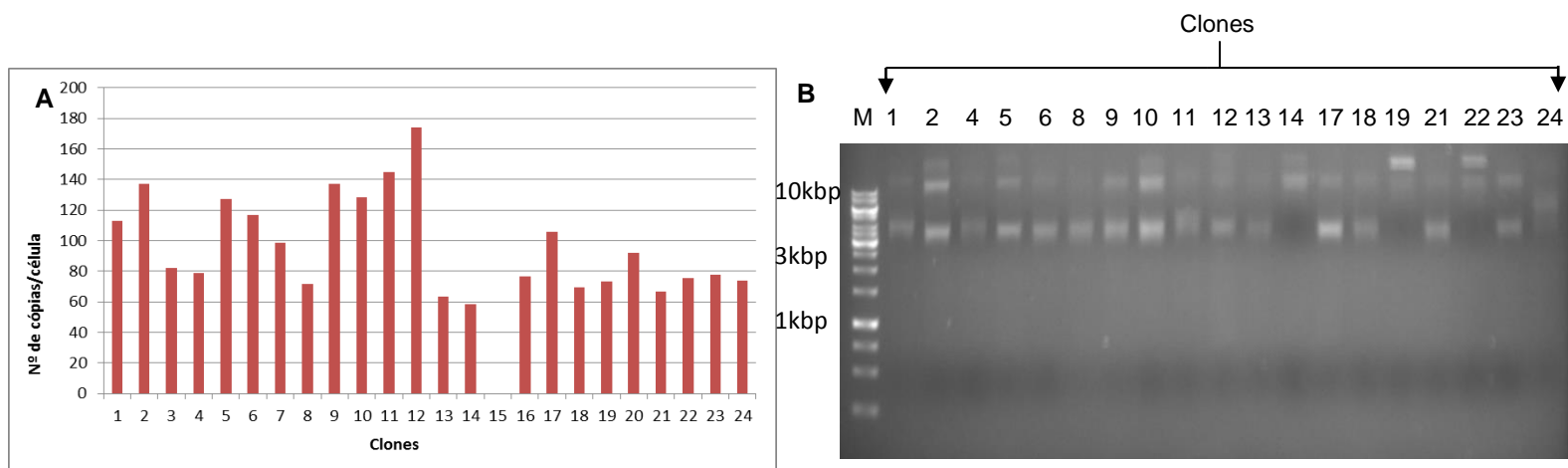


Figura 3.8- A) Número de cópias de plasmídeo por célula dos diferentes clones estudados. B) Gel de agarose referente aos diferentes clones estudados.

Pela análise da figura 3.8 (A) verifica-se que apesar de a maioria dos valores se centrar no valor de 100 cópias/célula existem alguns valores que sobressaem. Nomeadamente o clone 12, 11, 9 e 2 por apresentarem valores elevados de cópias/célula. Por outro lado, os clones 13, 14 e 21 por apresentarem baixos valores de cópia/célula destacam-se pelo motivo contrário.

A figura 3.8 (B) mostra um gel de agarose que possui bastante heterogeneidade entre os diferentes clones apresentados. Uma vez que os plasmídeos se encontram na sua forma

circular, estes apresentam diferentes conformações que migram de modo diferente originando assim várias bandas no gel. Todos os clones com exceção do clone 14, 19 e 22 apresentam uma banda que diz respeito ao plasmídeo pQE30 na forma de super enrolada. Esta é a forma que ocorre naturalmente no microrganismo e é também a forma que tem uma velocidade de migração mais rápida no gel. No que diz respeito aos restantes clones todos apresentam duas bandas visíveis, em que uma como já foi referido pertence ao plasmídeo na forma super enrolada, e a outra pertence ao plasmídeo na forma em que o mesmo permitirá acesso da maquinaria celular ao DNA (forma relaxada). No entanto alguns dos clones apresentam ainda uma outra banda visível que está presente em todos os clones sem plasmídeo na forma super enrolada. Como estes plasmídeos não foram linearizados, a explicação poderá passar por uma degradação do plasmídeo no ambiente intracelular apresentando assim velocidades de migração menores.

Os valores de cópia de plasmídeo/célula apresentados na figura 3.8 (A) não correspondem inteiramente às intensidades relativas apresentadas no gel de agarose, pois certos valores apresentados por alguns dos clones possuem intensidades mais baixas do que o esperado quando comparados com outros clones que deveriam ser menos intensos. Isto realça a importância de analisar as diferentes formas do plasmídeo apresentadas pelos diferentes clones e respetiva comparação com o número de cópias por célula. Tomando estes dados em consideração, 11 clones foram selecionados para avaliar a sua produtividade da S2-modificada. Com o objetivo de analisar uma população heterogénea foram selecionados clones que apresentassem valores de cópia de plasmídeo/célula baixos e altos, assim como os clones que apresentaram resultados interessantes no gel de agarose. Estes clones foram lisados através do protocolo referido com o Bugbuster, e foram aplicados num SDS-PAGE. Os valores foram normalizados para o extrato celular para melhor comparar diferenças entre produtividades de nanofitina.

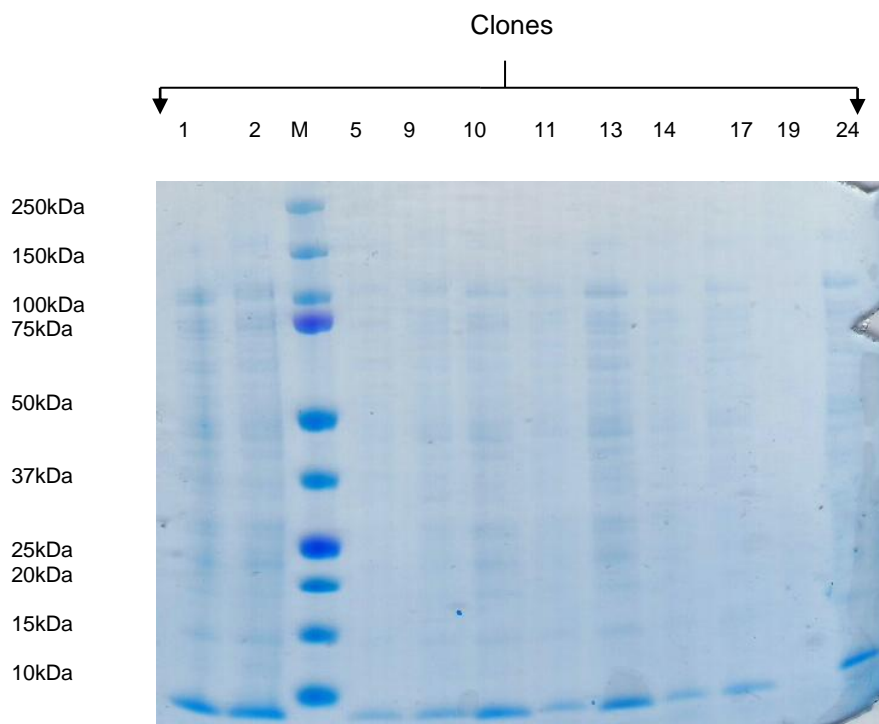


Figura 3.9- SDS-PAGE referente às produtividades em nanofitina dos diferentes clones estudados.

O SDS-PAGE mostra certas diferenças a nível de produção da S2-modificada entre os diferentes clones. Destacam-se principalmente os clones 1, 2, 10, 13 e 24. Estes clones são os que apresentam maior produção da nanofitina, e analisando os valores de cópia de plasmídeo/célula de cada um observa-se que não existe uma regra geral no que diz respeito ao número de cópia de plasmídeo/célula e respetiva produtividade da nanofitina. De facto, os clones 1, 2 e 10 apresentam valores na ordem dos 120 cópias de plasmídeo/célula mas o clone 13 e 24 apresentam valores na ordem das 60 cópias de plasmídeo/célula.

No entanto pode-se concluir que o clone que aparenta ser a opção mais viável para ser usada como super produtora da proteína poderá ser o clone 10. Este clone é o que aparenta ter um melhor ratio de nanofitina/extrato celular o que auxilia no decurso do downstream pois elimina a existência de contaminantes permitindo assim uma maior pureza no decurso do processo.

### 3.1.7 Detecção de bacteriófagos

A nanofitina que será eleita para proceder à sua formulação para aplicação clínica terá que passar por inúmeros testes de validação e comprovação de eliminação de qualquer vestígio de contaminação por qualquer agente biológico. Desta categoria de agentes biológicos destacam-se os bacteriófagos por serem vírus que infetam bactérias assumindo-se portanto como um agente biológico cuja presença deve ser analisada. Neste caso específico pretendeu-se estudar a presença de bacteriófagos lisogénicos, os quais foram induzidos a serem expressos pela adição de mitomicina C ao meio de cultura.

Foi portanto estudada a presença de bacteriófagos T2 e do bacteriófago phiX174 em *E. coli Acella pLySs* e de *E. coli DH5α*. Os resultados referentes a este teste estão representados nas figuras seguintes.

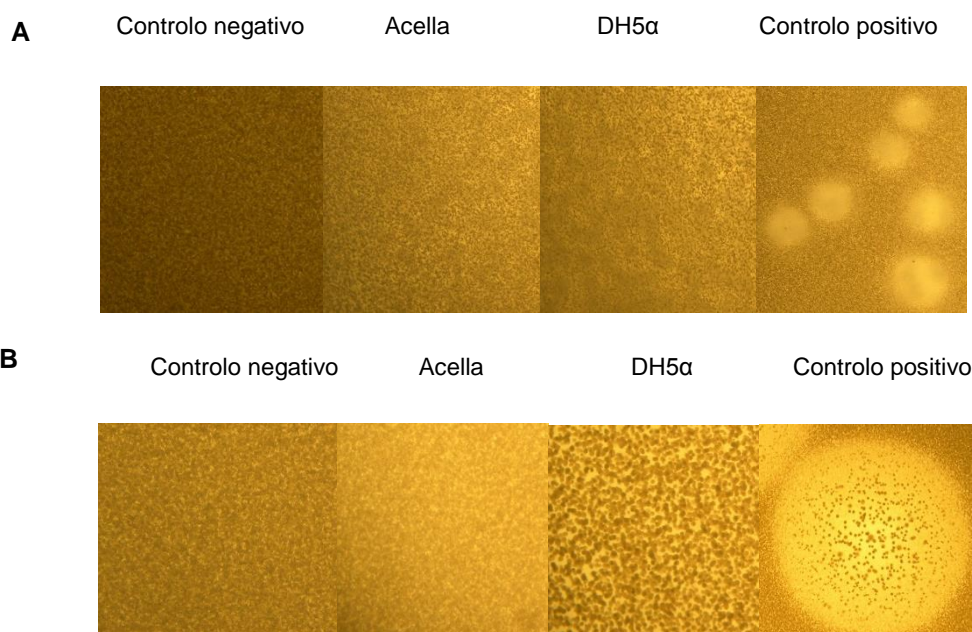


Figura 3.10- A) Resultados do teste, em placas de Petri, acerca da presença de bacteriófagos T2 em *E. Coli Acella* e *E. coli DH5α*. B) Resultados do teste, em placas de Petri, acerca da presença de bacteriófagos phiX174 em *E. Coli Acella* e *E. coli DH5α*.

Como as figuras 3.10 (A e B) mostram tanto a estirpe *E. coli Acella pLysS* como a *E. coli DH5α F'IQ* não apresentaram nodos para nenhum dos bacteriófagos estudados. A ausência de nodos nas caixas de Petri mostram que ambas as estirpes não possuem no seu genoma nenhuma sequência de profago que poderia ser uma fonte de contaminação biológica no durante o seu cultivo. Estas validações de isenções de contaminações biológicas do ponto de vista GMP são obrigatórias para garantir a qualidade e segurança do produto final.

### 3.2 Otimização do processo de purificação da nanofitina (downstream processing)

Grande parte do tempo dispendido no projeto foi gasto na otimização de um processo de purificação da nanofitina. A existência de um processo de purificação com o maior rendimento possível no menor período de tempo e com resultados reprodutíveis é desejável.<sup>42</sup> Ao contrário do que acontece em laboratórios de investigação onde se dá maior importância à

pureza da proteína do que à quantidade produzida, na escala industrial verifica-se o inverso em que o número de passos de purificação deverá ser o mínimo possível para minimizar a perda de proteína a cada passo.<sup>56</sup> No decurso do projeto SADEL para purificação das nanofitinas iniciais, a seguinte sequência de passos de purificação foi estudada.



Figura 3.11- Processo de purificação para nanofitinas iniciais do projeto SADEL.

Devido às características que as nanofitinas atuais possuem, e tendo o processo anterior de purificação como referência, diferentes metodologias de purificação foram estudadas como: uso de diferentes *cutoffs* na técnica de TFF; uso combinado de diferentes técnicas de cromatografia como a HIC e a IEX; uso de substâncias aditivas como agentes redutores e surfactantes durante a disrupção e durante a técnica de TFF; estudo da técnica de precipitação fracionada por sulfato de amónia; otimização de tampões de cromatografia e condições de eluição.

### 3.2.1 Uso combinado das técnicas de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica (S2-modificada)

Como já foi referido a técnica de TFF foi estudada nas primeiras nanofitinas produzidas. Devido à semelhança de tamanho molecular dessas proteínas com as que estão a ser atualmente estudadas (cerca de 10kDa) estudou-se esta técnica na separação da S2-modificada dos restantes produtos biológicos. Foi estudado o uso combinado de uma membrana com *cutoff* de 30kDa e de outra com 5kDa. A escolha de uma membrana de 30kDa deve-se ao facto de ter um *cutoff* de cerca de três vezes superior ao peso molecular da nanofitina o que permitirá a sua passagem pela membrana ao mesmo tempo que irá reter contaminantes de pesos moleculares superiores, o uso da membrana de 5kDa é usada com o intuito de reduzir o volume de amostra para poder ser aplicada na coluna cromatográfica. Esta técnica tem ainda a vantagem de as membranas serem de fácil operação e reutilizáveis o que diminui bastante os custos de operação quando comparados com técnicas de cromatografia.

As condições de operação do processo de purificação estudado está representado na figura 3.12.

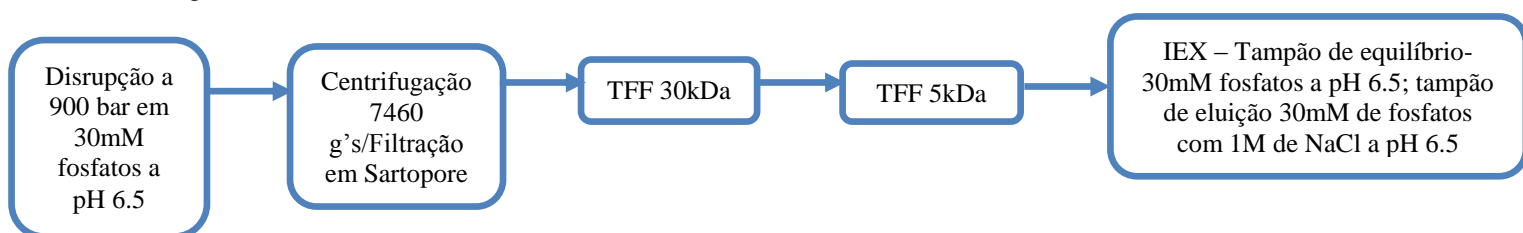


Figura 3.12- Processo de purificação para a S2-modificada com o uso combinado das técnicas de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica.

Além do tampão de equilíbrio servir também como tampão de lavagem da coluna, existe um outro tampão de lavagem com composição de 30mM de fosfatos com 0.1% de Triton X-100 a pH 6.5. Como irá ser explicado posteriormente o efeito mais detalhado do Triton X-100 durante o processo de purificação será estudado, mas neste caso específico foi usado numa tentativa não só de lavagem da coluna das restantes impurezas que poderão existir, mas também como método de remoção de endotoxinas durante a IEX.<sup>17</sup> Foi ainda realizado um teste de deteção de endotoxinas durante este processo como será referido posteriormente (3.2.11).

A operação da filtração tangencial e da IEX está representada na figura 3.13 e 3.14.

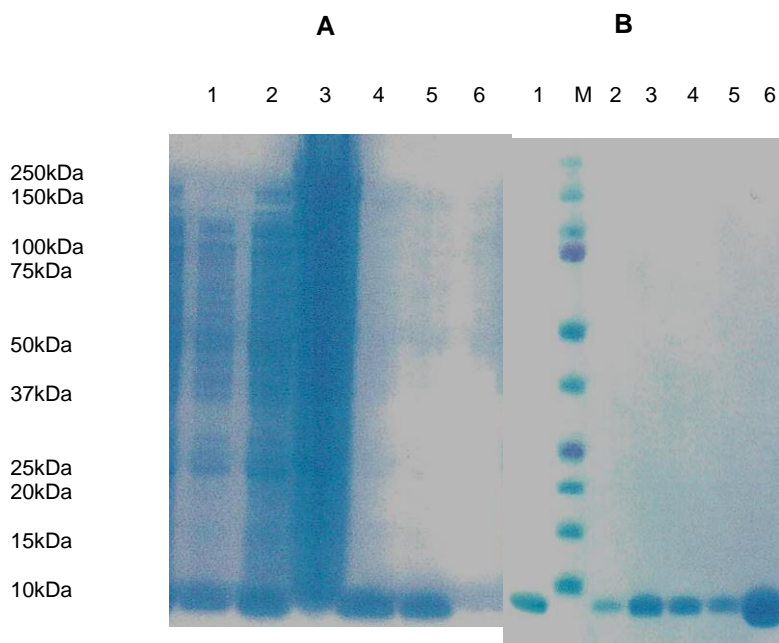


Figura 3.13- A) SDS-PAGE referente às filtrações tangenciais de 30kDa e 5kDa do processo 3.2.1. 1- Retentado 30kDa antes diálise; 2-Retentado 30kDa após diálise; 3- Retentado 30kDa após diálise sem diluição; 4- Permeado 30kDa; 5- Retentado 5kDa; 6-Permeado 5kDa. B) SDS-PAGE referente à eluição da IEX do processo 3.2.1. 1- Carga (Retentado 5kDa); 2- *Flowthrough*; 3- Lavagem com tampão de equilíbrio; 4- Lavagem com Triton X-100; 5- 2º Lavagem com tampão de equilíbrio; 6-Pool 33-59.

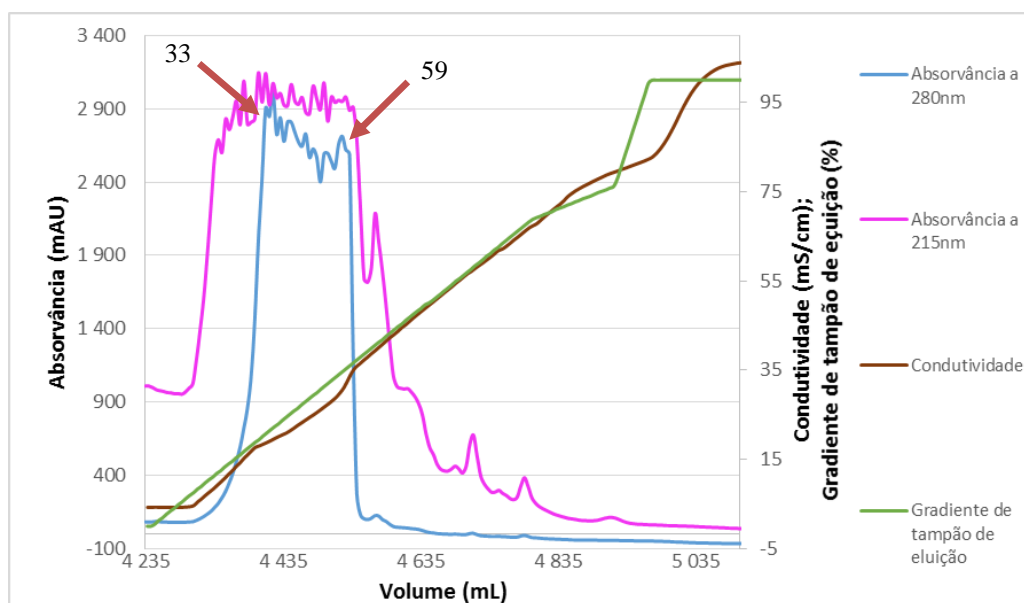


Figura 3.14- Cromatograma referente à eluição da IEX do processo 3.2.1.

Destaca-se desde logo na figura 3.13 (A), bandas 1 e 2, que existe uma grande quantidade de nanofitina que ficou retida na membrana de 30kDa. Como as bandas estão diretamente comparáveis umas com as outras, pode-se afirmar que fica retido cerca de 50% da nanofitina na membrana de 30kDa, quando comparado com o que é permeado, banda 4. Para melhorar a eficácia e o rendimento da filtração tangencial, após toda a solução de administração ser aplicada ao sistema são realizadas lavagens com tampão de disrupção. Neste caso específico o retentado da membrana de 30kDa foi concentrado para 1,5L e o volume de diálise que foi aplicado foi igualmente de 1,5L (é considerado portanto uma unidade

de volume de diálise). A amostra da banda 1 refere-se a antes da diálise realizada com 30mM de fosfatos a pH 6.5, enquanto que a amostra da banda 2 refere-se a após a diálise realizada. Não se verificam diferenças assinaláveis levando a concluir portanto que apenas um volume de diálise na membrana de 30kDa não é suficiente para ajudar a permeação da S2-modificada.

No que diz respeito à operação na IEX constata-se pela figura 3.13 (B) que apesar do elevado grau de pureza apresentado perde-se bastante proteína durante o *flowthrough*, durante as lavagens com o tampão de equilíbrio e com o tampão de lavagem com Triton X-100. Isto pode indicar uma certa instabilidade da carga da proteína a este pH de operação. A pH 6.5 a proteína deveria apresentar uma carga positiva (o ponto isoeléctrico calculado através do ExPASy é de 8.01) ficando portanto ligado à resina que apresenta carga negativa. Uma vez que tal não se verificou efetuaram-se testes de ligação com 1mL de resina Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup> a diferentes pH's. Testaram-se gamas de pH desde 5 a 7 com uma alíquota de S2-modificada pura deste processo referido. Os resultados deste teste estão na figura 3.15.

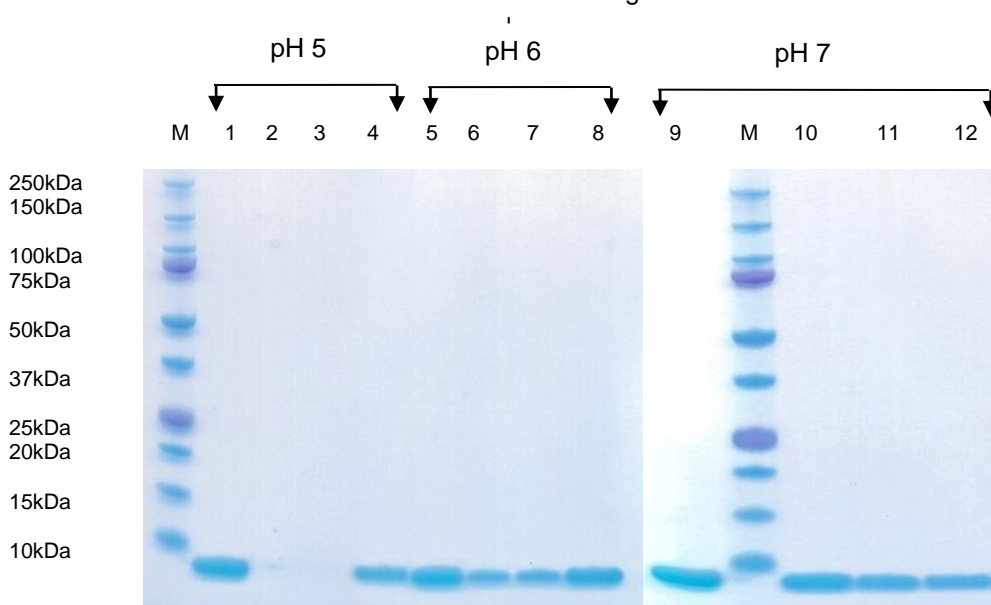


Figura 3.15- SDS-PAGE referente à determinação do ponto isoeléctrico da S2-modificada (pH 5, 6 e 7). 1- Carga a pH 5; 2- Flowthrough a pH 5; 3- Lavagem a pH 5; 4- Eluição a pH 5; 5- Carga a pH 6; 6- Flowthrough a pH 6; 7- Lavagem a pH 6; 8- Eluição a pH 6.; 9- Carga a pH 7; 10- Flowthrough a pH 7; 11—Lavagem a pH 7; 12- Eluição a pH 7.

Analisando a figura 3.15 observa-se que apenas a operação a pH 5 permite eluir com sucesso a totalidade da S2-modificada sem que ocorram perdas de proteína quer no *flowthrough* quer na lavagem da resina. A operação a pH superior mostra ser numa gama que a proteína não consegue agarrar com força suficiente à resina devido à carga que a mesma apresenta.

### 3.2.2 Otimização das condições de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica (S2-modificada)

Do capítulo 3.2.1 verificou-se que a operação a pH inferior a 6.5 durante a IEX é desejável devido à perda de proteína no *flowthrough* e nas lavagens. No entanto, para não operar em TFF com pH muito baixo estudou-se a seguinte sequência de passos de purificação representados na figura 3.16.

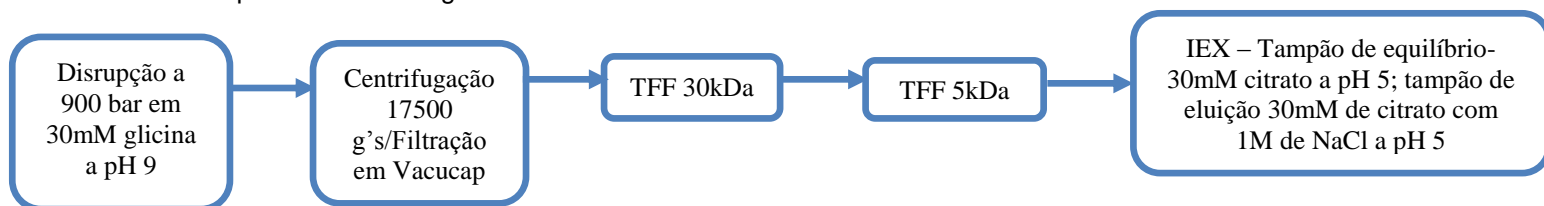


Figura 3.16- Processo de purificação para a S2-modificada com condições otimizadas para o uso combinado das técnicas de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica.

Na figura 3.17 e 3.18 estão representados os resultados referente à operação em TFF e na IEX.

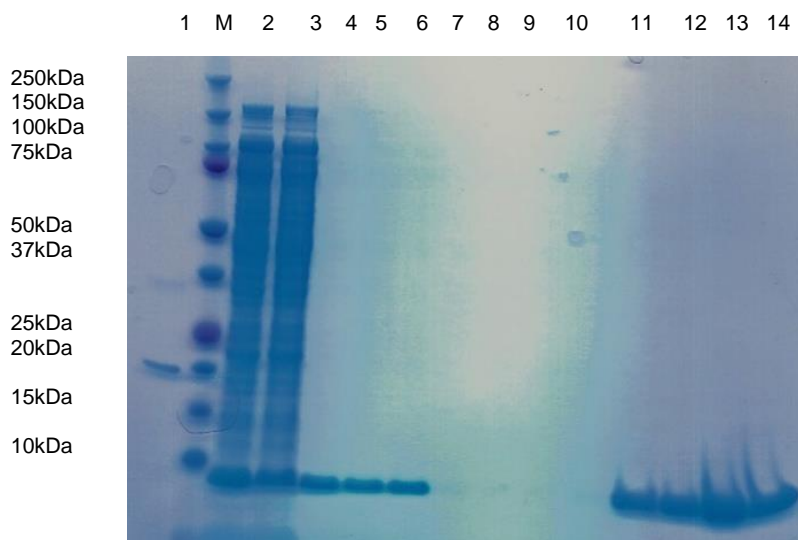


Figura 3.17- SDS-PAGE referente à operação na filtração tangencial (30kDa+5kDa) e na IEX do processo 3.2.2. 1- Fração A6; 2-Após filtração; 3-Retentado 30kDa; 4- Permeado 30kDa; 5- Retentado 5kDa; 6- Carga coluna; 7- Permeado 5kDa; 8- *Flowthrough*; 9- Lavagem com Triton X-100; 10-Lavagem com tampão de equilíbrio; 11- Fração C1; 12- Fração C12; 13- Fração D6; 14- Fração E12.

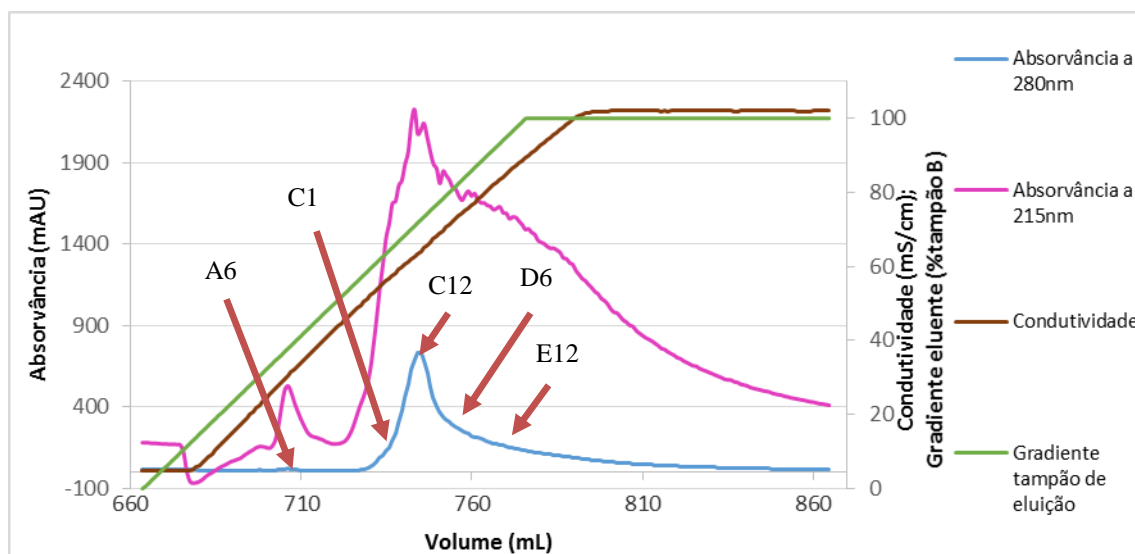


Figura 3.18- Cromatograma referente à eluição da IEX do processo 3.2.2.

As bandas 4 e 5 da figura 3.17 mostram que a nanofitina sai praticamente pura à saída da membrana de 30kDa o que se apresenta como uma vantagem competitiva desta metodologia. Porém, a banda 3 mostra que neste processo de filtração tangencial cerca de 50% da nanofitina acabou novamente por ficar retida na membrana. A escolha do material da membrana da ultrafiltração influencia fortemente o resultado da adsorção da proteína à superfície da membrana.<sup>61,62</sup> No projeto SADEL foi sempre escolhido o uso de membranas PES, o que neste caso poderão provocar adsorções não-específicas responsáveis por um aumento de *fouling* na membrana de 30kDa, e como tal conseqüente perda de proteína. O facto de este ser o primeiro passo de separação de produtos biológicos logo após clarificação dificulta também a permeação da nanofitina pela membrana pois existem contaminantes de elevados pesos moleculares que irão adsorver à superfície da membrana. No entanto, pode-se

ainda destacar que estes resultados poderão ser indicadores da existência de isoformas ou complexos da proteína que podem não permear a membrana com tanta facilidade.

As bandas 11, 12, 13, e 14 da figura 3.17 dizem respeito à eluição da cromatografia e mostram que a S2-modificada foi purificada com sucesso e sem contaminantes a destacar. A banda 1, que corresponde à fração A6, refere-se à eluição inicial da coluna onde não é revelado existir qualquer presença da nanofitina em solução mas sim de outros contaminantes mostrando portanto ser uma metodologia que permitiu resolver as restantes impurezas presentes. Tal é comprovado pela elevada pureza apresentada pelas bandas referentes a frações posteriores do gradiente de eluição, mostrando também que a eluição em 8 volumes de coluna, figura 3.18, foi bem sucedida.

### 3.2.3 Efeito do Triton X-100 na filtração tangencial e na cromatografia de permuta iónica (S2-modificada)

Para tentar diminuir a retenção da nanofitina na membrana de 30kDa foi estudado o efeito da adição de Triton X-100 ao retentado da membrana de 30kDa do processo 3.2.2. Triton X-100 é um detergente não-iónico que ajuda a solubilizar certas proteínas, como por exemplo proteínas membranares.<sup>63</sup> Foi feita a adição de Triton X-100 a uma concentração de 0.1% ao retentado em questão e a amostra foi deixada a concentrar. Foram ainda realizados 5 volumes de diálise com tampão 30Mm de Glicina a pH 9 com 0.1% de Triton X-100, estando os resultados deste teste representados na Figura 3.19.

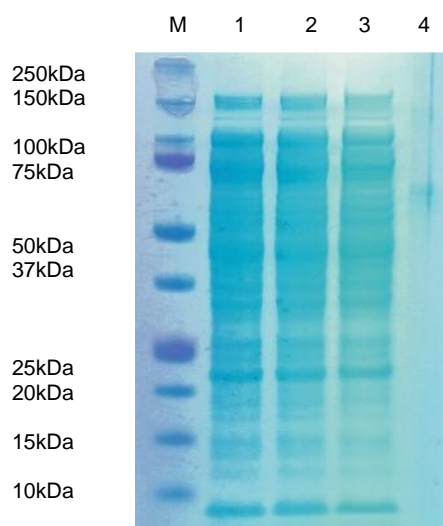


Figura 3.19 SDS-PAGE referente ao estudo do efeito do Triton X-100 na membrana de 30kDa durante a filtração tangencial do processo 3.2.3. 1-Retentado 30kDa Processo 3.2.2; 2- Retentado 30kDa tratado com Triton X-100 antes TFF; 3-Retentado 30kDa após tratamento com Triton X-100 após TFF; 4-Permeado 30kDa após tratamento com Triton X-100 após TFF.

A figura 3.19 mostra que a adição de Triton X-100 não traz vantagens significativas pois como se pode comprovar pela banda 3, no retentado continua a existir e reter uma grande percentagem da nanofitina na membrana. Apesar de a banda 3 na zona dos 10kDa parecer ligeiramente inferior à banda 1 e 2 na mesma zona, a inexistência de proteínas na banda 4 mostra que o Triton X-100 não foi eficaz na solubilização da nanofitina, e que portanto não auxiliou na permeação da mesma através da membrana. O uso de detergentes, apesar de poder beneficiar alguns processos na extração de determinadas proteínas, não são desejáveis pois tratam-se de compostos extremamente complicados de remover dos processos de purificação pois mesmo após alguns passos de cromatografia, de respetivas lavagens e procedimentos de limpeza, as soluções poderão conter mesmo assim vestígios dos detergentes utilizados.<sup>63,41</sup> Por serem compostos de difícil remoção concentrações baixas dos mesmos têm de ser usadas (até 1%). Neste caso específico, como o Triton X-100 não trouxe nenhuma vantagem, o seu uso não será implementado como aditivo durante o TFF.

O problema de retenção da nanofitina na membrana de 30kDa tornou-se recorrente nas operações de filtração tangencial realizadas e a falta de métodos analíticos para acompanhar o processo de purificação da nanofitina dificulta por vezes a análise de certos

resultados. Como método analítico usado neste projeto o SDS-PAGE assumiu um papel principal por permitir analisar por diferenças de peso molecular entre proteínas. Porém, este método não é infalível e peca quando o SDS-PAGE não tem resolução suficiente para permitir discernir entre bandas de peso molecular ligeiramente diferentes que poderão ser ou não o produto desejado. Nestas situações a incubação de anticorpos específicos para a proteína desejada e consequente visualização das bandas através da técnica de *Western Blot* seria útil quando pretendemos averiguar se determinada banda é efetivamente a proteína que pretendemos purificar ou não. Neste caso específico no retentado da membrana de 30kDa seria útil ter um método analítico como o *Western Blot* para saber se a banda retida é de facto a nanofitina desejada, se não se trata de um contaminante com peso molecular ligeiramente superior ou até de uma conformação não ativa da nanofitina. Em alternativa, procedeu-se a uma análise por espectrometria de massa tendo-se confirmado a presença de S2-modificada no retentado.

### 3.2.4 Efeito de um *cutoff* de 50kDa na filtração tangencial e na cromatografia de permuta iónica (S2-modificada)

Para estudar se o efeito de retenção conseguia ser evitado, uma membrana de filtração tangencial de PES de 50kDa foi usada em associação com uma membrana de PES de 5kDa. As condições de operação foram iguais às da figura 3.16 com exceção no *cutoff* do 1º TFF, que neste caso é de 50kDa. Nas figuras 3.20 e 3.21 encontram-se representados os cromatogramas referentes a essas operações assim como os SDS-PAGE realizados.

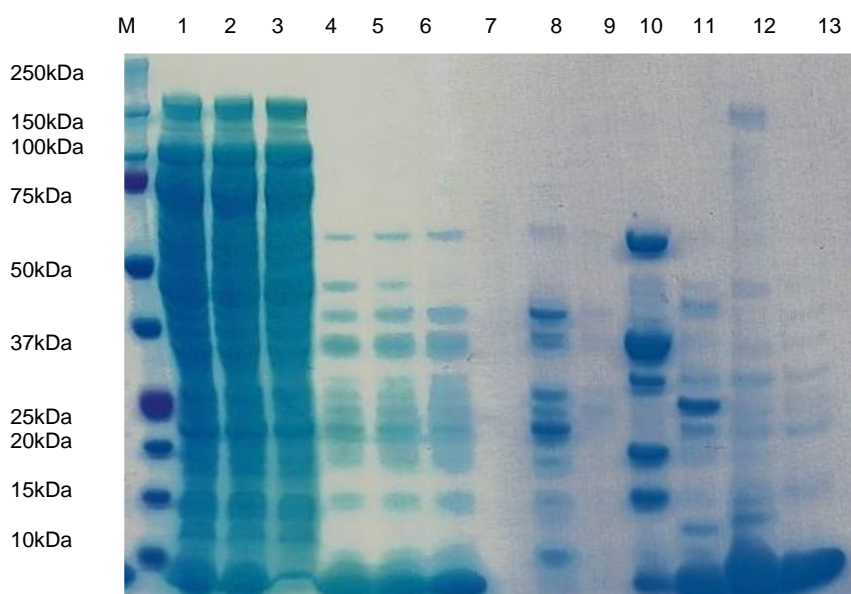


Figura 3.20- SDS-PAGE referente à operação de TFF (50kDa+5kDa) e da IEX do processo 3.2.4. 1-Após centrifugação; 2- Após filtração; 3-Retentado 50kDa; 4- Permeado 50kDa; 5- Retentado 5kDa; 6- Carga coluna; 7- Permeado 5kDa; 8- Flowthrough; 9- Lavagem coluna com tampão de equilíbrio; 10-Fração B6; 11-Fração E3; 12-Fração F10; 13- Fração H5.

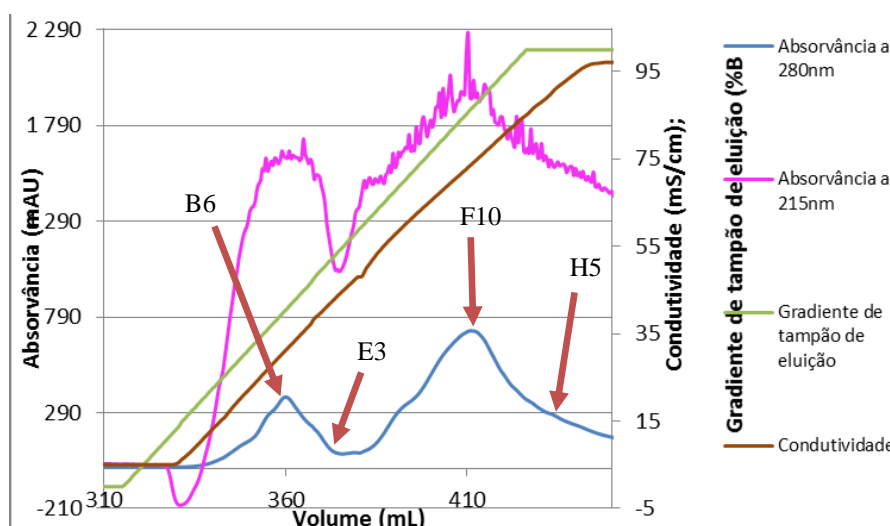


Figura 3.21- Cromatograma referente à primeira eluição da IEX do processo 3.2.4.

A figura 3.20 mostra, pela banda 3, que o retentado da membrana de 50kDa retém uma menor quantidade de nanofitina do que quando comparado com processos anteriores. A implementação deste tipo de membrana com este *cutoff* aparenta portanto resolver o problema de retenção da nanofitina. No que diz respeito à operação na IEX apesar de não existir perda de nanofitina no *flowthrough* ou nas lavagens da coluna, a figura 3.20 mostra que a eluição, bandas 10 a 13, não permite separar com sucesso a proteína desejada das restantes. O mesmo se pode observar na figura 3.21 que mostra a existência de diversos picos obtidos na eluição que se sobrepõem e que tornam impossível a separação de contaminantes. Com o objetivo de tentar resolver as impurezas, foi feito o *pool* de todas as frações eluídas e estas foram de novo aplicadas à Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup> mas desta vez foi testada uma eluição por passos ou *steps* (em substituição de uma eluição com gradiente linear). Uma eluição por passos é um parâmetro a ser otimizado em qualquer processo de purificação de uma proteína pois permite uma separação eficaz dos restantes contaminantes em solução. Isto implica um estudo prévio do comportamento de eluição dos contaminantes para poder estabelecer um protocolo de eluição bem sucedido. Os resultados referentes a esta operação estão nas figuras 3.22 e 3.23.

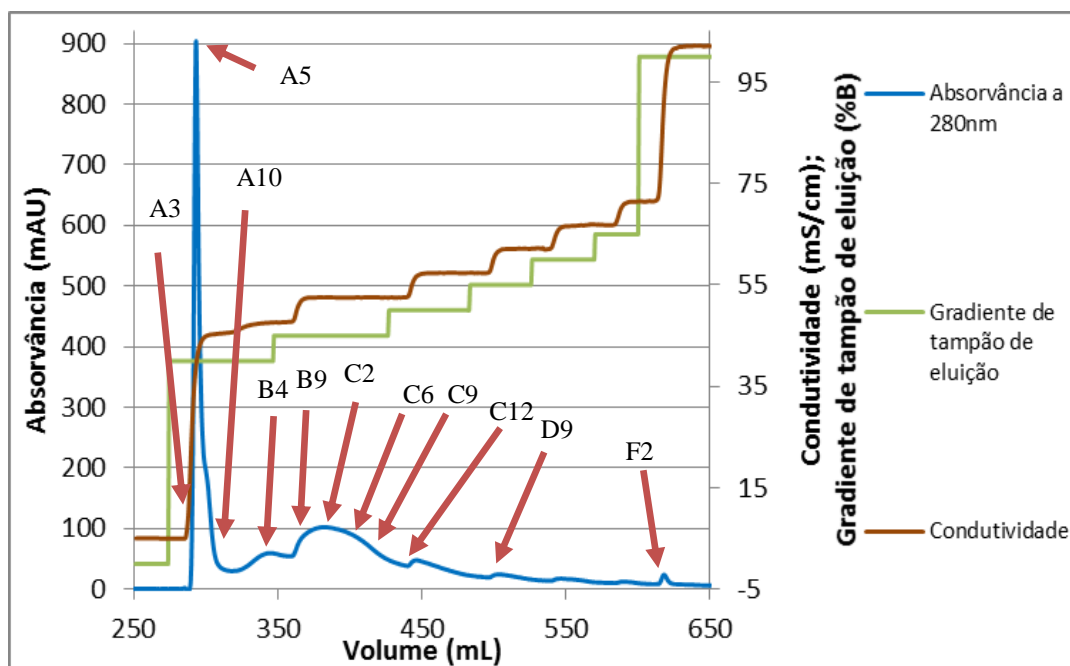


Figura 3.22- Cromatograma referente à segunda eluição da IEX do processo 3.2.4.

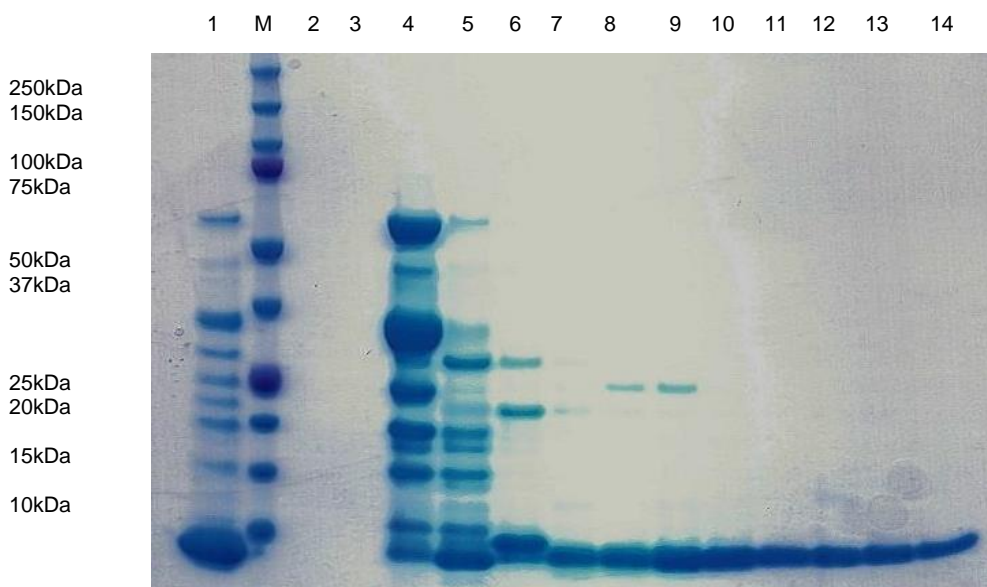


Figura 3.23- SDS-PAGE referente ao teste de eluição por passos na IEX do processo 3.2.4. 1- Carga coluna; 2- 41 Flowthrough; 3- Lavagem coluna com tampão de equilíbrio; 4- Fração A3; 5- Fração A5; 6- Fração A10; 7- Fração B4; 8- Fração B9; 9- Fração C2; 10- Fração C6; 11- Fração C9; 12- Fração C12; 13- Fração D9; 14- Fração F2.

A figura 3.22 mostra um pico bastante intenso que analisando o SDS-PAGE, figura 3.23 (bandas 4, 5 e 6), mostra pertencer a um conjunto de proteínas que se encontravam a estabelecer ligações moderadamente fracas à fase estacionária. A partir de um *step* inicial de 40% de tampão de eluição (400mM de cloreto de sódio), onde estão presentes inúmeros contaminantes (assim como a nanofitina) houve um aumento de 5% a cada *step* realizado. A figura 3.22 mostra a ocorrência de um pico a cada *step* realizado que tende a diminuir de intensidade ao longo da eluição. Os resultados do cromatograma levam a crer que poderá ser a mesma proteína que está a ser eluída pelos diferentes gradientes feitos. Os resultados do SDS-PAGE corroboram esta afirmação pois mostram que a partir da banda 7 apenas a nanofitina é eluída, com exceção de um ligeiro contaminante presente na banda 8 e 9. Observa-se também que a nanofitina está a ser continuamente eluída ao longo do tempo o que poderá indicar que existem diferentes isoformas ou conformações da proteína que interagem de diferente maneira e com intensidades diferentes à fase estacionária da coluna. O facto de continuar a existir nanofitina a ser eluída e ocorrer a existência de um pico com um gradiente de 100% de tampão de eluição (correspondente a uma eluição a 1M de cloreto de sódio) mostra isso mesmo.

Com o uso da eluição por passos a separação da nanofitina dos restantes contaminantes foi bem sucedida, no entanto a eluição deverá ser posteriormente otimizada devido à perda de nanofitina no gradiente inicial. O uso de uma membrana com *cutoff* de 50kDa parece ajudar a purificar com sucesso a nanofitina, principalmente quando existe uma eluição por passos devidamente otimizada. Porém, mais estudos são necessários para poder validar este método como o método predileto para purificação nomeadamente no que diz respeito a algumas preocupações a nível de contaminações de peso molecular elevado que a IEX não conseguiu resolver completamente. De modo a evitar a presença desses contaminantes o *pool* poderia ser realizado com menos frações mas o rendimento do processo acabaria por ser bastante mais baixo pois trata-se de volumes elevados de proteína que seriam descartados. Resumindo, apesar de necessitar de algumas melhorias esta metodologia apresenta-se como uma opção viável para purificação da S2-modificada.

### **3.2.5 Efeito do uso de DTT durante a filtração tangencial (S2-modificada)**

Um outro teste foi realizado para estudar a diminuição do efeito de retenção da S2-modificada na membrana de 30kDa. Desta feita foi testado o uso de ditioneitol (DTT) como aditivo durante a filtração tangencial. O DTT é um agente redutor que é bastante usado para quebrar pontes dissulfeto que se formam entre resíduos de cisteína existentes nas proteínas. Neste âmbito o uso de DTT serve para quebrar possíveis ligações dissulfeto entre nanofitinas que possam existir e que sejam responsáveis por uma possível agregação junto à membrana. As condições de operação foram semelhantes às da figura 3.16 com exceção na suplementação do DTT no tampão de disrupção, no tampão de diálise e no retentado da membrana. Para melhor comparar o efeito do DTT, e para funcionar como um controlo, foi começado um processo em paralelo com as mesmas condições de operação exceto na suplementação do DTT. As condições do controlo foram iguais às da figura 3.16. Os resultados da filtração tangencial estão representados na figura 3.24.

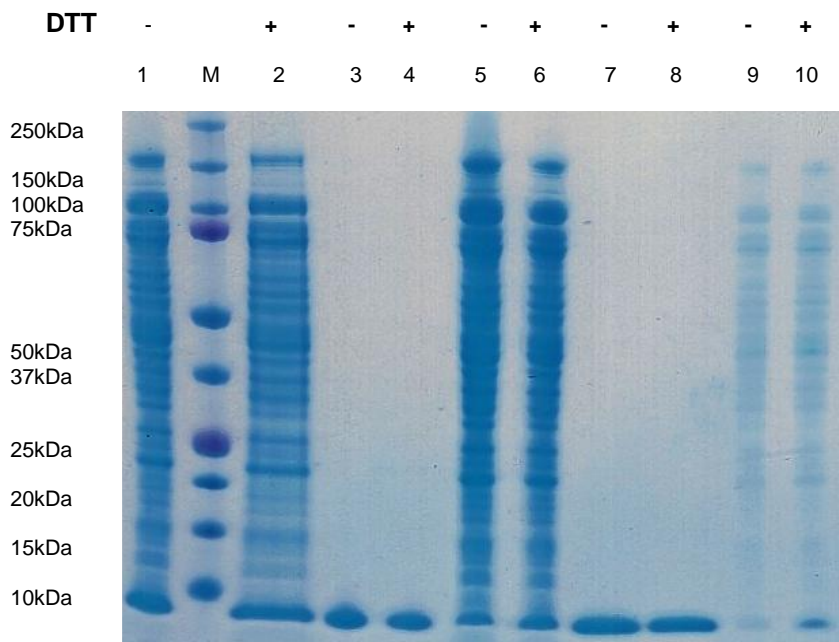


Figura 3.24- SDS-PAGE referente ao estudo do efeito do DTT na membrana de 30kDa de TFF do processo 3.2.5. 1- Retentado 30kDa sem DTT antes diálise; 2- Retentado 30kDa com DTT antes diálise; 3- Permeado 30kDa sem DTT antes diálise; 4- Permeado 30kDa com DTT antes diálise; 5- Retentado 30kDa sem DTT depois diálise; 6- Retentado 30kDa com DTT depois diálise; 7- Permeado 30kDa sem DTT depois diálise; 8- Permeado 30kDa com DTT depois diálise; 9- CIP membrana processo sem DTT; 10- CIP membrana processo com DTT.

As bandas 1 e 2 referem-se ao retentado da membrana de 30kDa antes dos 5 volumes de diálise, sendo que as bandas 5 e 6 referem-se ao final da operação (após os 5 volumes de diálise). Da banda 1 para a banda 2 não parece haver grande diferença na retenção da nanofitina junto à membrana de 30kDa. O facto de a banda 1 ser a primeira banda do gel faz com que tipicamente ocorra um efeito de afunilamento que muitas das vezes dificulta a comparação com outras bandas. Porém, a semelhança entre as bandas 3 e 4, permeados da membrana antes diálise, mostra que não deverá haver grande diferença entre os dois retentados antes dos 5 volumes de lavagem realizados. Quanto à eficácia da diálise na diminuição da retenção, as amostras dos retentados retiradas após os cinco volumes de diálise, bandas 5 e 6, mostram em ambos os casos ter diminuído a quantidade de nanofitina retida na membrana, quando comparadas com as bandas 1 e 2 referentes ao retentado respetivo antes da diálise. Isto mostra ser um possível parâmetro a ser otimizado na operação da filtração tangencial.

Porém, no que diz respeito ao DTT, estes resultados mostram que este composto não previne a retenção de nanofitina junto à membrana de 30kDa. As bandas 5 e 6 mostram alguma diferença na retenção da membrana de 30kDa, nomeadamente a banda 5, sem DTT, parece ter menor quantidade de nanofitina retida na membrana do que a amostra que foi sujeita à ação do DTT, banda 6. A banda 7 está coerente com a banda 5 pois apresenta uma banda mais intensa junto à zona dos 10kDa (aumento da banda 7 com uma consequente diminuição da banda 5). A figura mostra ainda que as bandas 9 e 10 correspondentes ao CIP realizado após utilização das membranas (1M de hidróxido de sódio durante uma hora, e administração de água até baixar o pH) possuem ainda bastante proteína em solução. As membranas de filtração tangencial utilizadas são reutilizadas e apesar de todas terem um protocolo de *Cleaning in place* (CIP), muitas das vezes não se consegue garantir que todos os contaminantes foram eliminados e que a membrana esteja pronta a utilizar. Como tal, a existência de um CIP das membranas cuidadoso e eficiente é desejado de modo a prevenir contaminações futuras.<sup>56</sup> De facto, a sequência da S2-modificada não possui cisteínas, o que invalida um possível mecanismo de ação do DTT, o que está de acordo com os resultados obtidos.

### 3.2.6 Efeito combinado do Triton X-100 e DTT na cromatografia de permuta iônica (S2-modificada)

Como já foi referido anteriormente a existência de alguns arrastamentos de picos, sobreposição de picos e retenção na membrana de 30kDa durante a filtração tangencial mostram poderem ser indicadores de diferentes isoformas da S2-modificada. Como a existência de diferentes conformações afeta a maneira que a proteína liga à fase estacionária das resinas, estudou-se o efeito de realizar uma disrupção em PBS suplementado com 10mM de DTT e 1% Triton X-100 a pH 7.4. Apesar de o efeito do Triton X-100 e do DTT já terem sido avaliados individualmente em processos diferentes, o seu efeito conjunto na disrupção não foi considerado. O objetivo desta disrupção ao usar estes compostos é fazer com que a S2-modificada após disrupção esteja toda na mesma conformação, e que imediatamente após este passo, para não perder o efeito do DTT e do Triton X-100 (que se encontram a manter a conformação da nanofitina) o conjunto de proteínas seja aplicada numa cromatografia de permuta iônica. No fundo, o passo de IEX é de importância extrema pois está a funcionar como um passo de captura, em que o objetivo é carregar a solução proteica numa técnica de cromatografia para a estabilizar e remover de um meio em que possa estar instável e se possam alterar algumas das suas propriedades. As condições iniciais de operação foram as que estão representadas na figura 3.25.

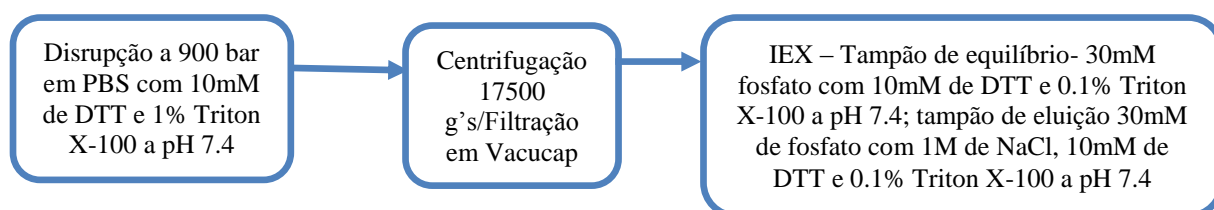


Figura 3.25 – Processo de purificação do processo 3.2.6.

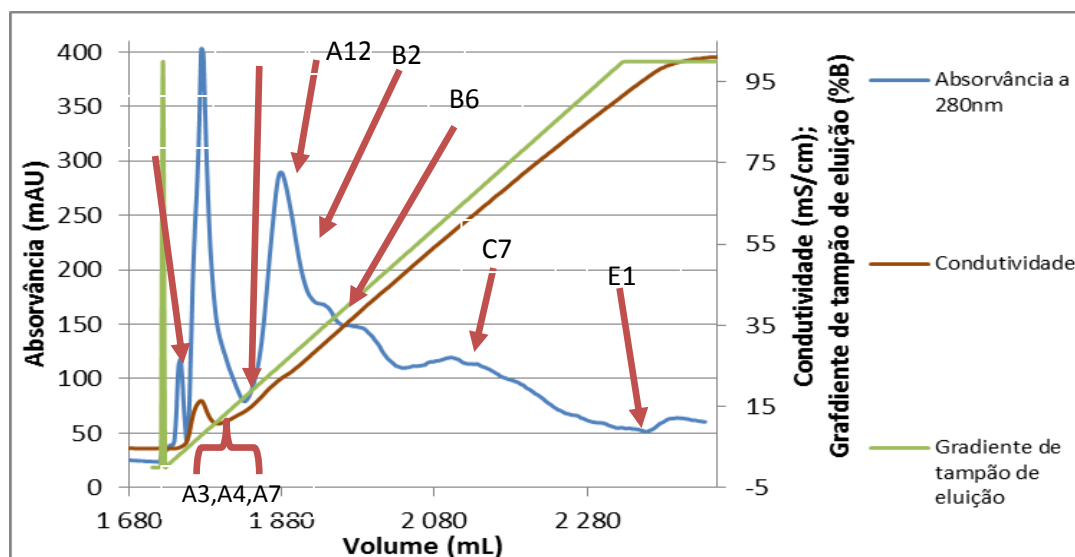


Figura 3.26- Cromatograma referente à primeira eluição da IEX do processo 3.2.6.

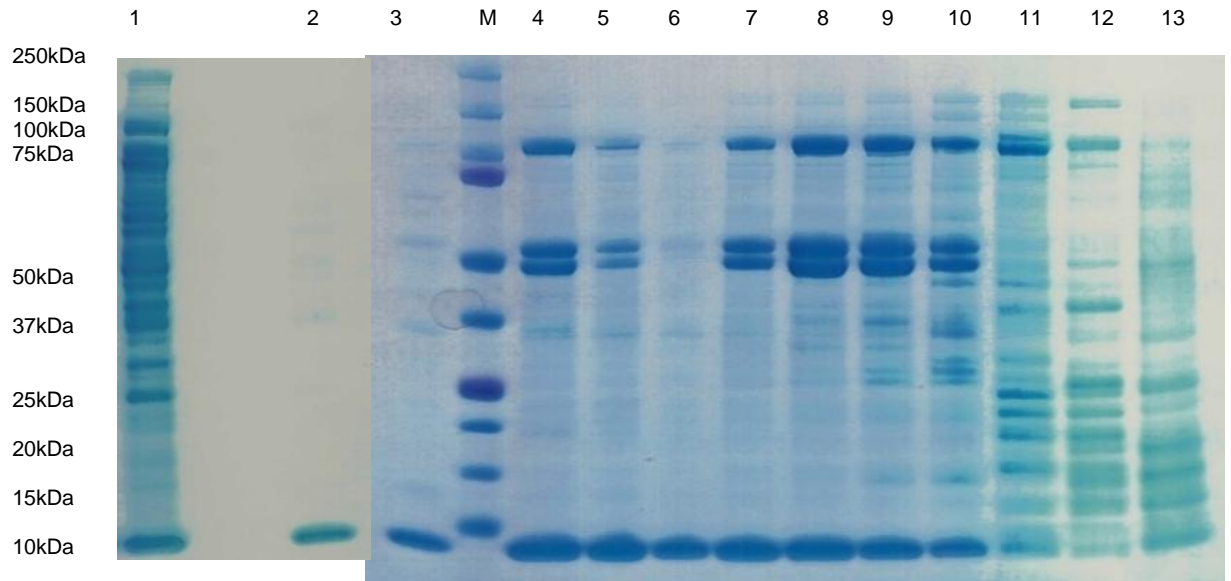


Figura 3.27- SDS-PAGE referente à operação na IEX do processo 3.2.6. 1- Flowthrough; 2- Lavagem coluna; 3- Fração A1; 4- Fração A3; 5- Fração A4; 6- Fração A7; 7- Fração A10; 8- Fração A12; 9- Fração B2; 10- Fração B6; 11- Fração C7; 12- Fração E1; 13- CIP coluna.

A figura 3.26 mostra uma visível sobreposição de picos na eluição da IEX. O facto de este ser o primeiro passo de purificação logo após disrupção torna um pouco difícil a separação de produtos biológicos com base em apenas um método cromatográfico. No entanto, é de salientar que o objetivo deste teste não é a purificação da nanofitina mas sim a avaliação da presença de diferentes isoformas da S2-modificada que possam interferir em posteriores métodos de purificação. Como a figura 3.27 mostra pelas bandas 1 e 2, a perda de nanofitina no *flowthrough* e lavagens da coluna é notória, no entanto observa-se que em todas as frações analisadas da eluição existe bastante nanofitina em solução, mesmo após se ter perdido bastante no *flowthrough* e nas lavagens. Nesta figura foi também analisado o CIP realizado à coluna, banda 13, onde se verifica que existe nanofitina a ligar-se à fase estacionária da coluna e que não é eluída no gradiente crescente de sal realizado, mas apenas durante o CIP realizado. O facto de haver uma parte da nanofitina que durante a carga não consegue ligar à coluna, outra quota parte que é eluída durante o gradiente e ainda uma outra parte da nanofitina que a sua ligação à coluna apenas é desfeita durante o CIP parece realçar cada vez mais a aparente heterogeneidade de isoformas da S2-modificada existentes em solução.

A parte da nanofitina que não é capaz de ligar à coluna consegue ser explicada pelo pH que se está a operar na IEX. O ponto isoelétrico da S2-modificada pode explicar a perda de proteína durante as cargas visto estas terem sido feitas ao pH do tampão de disrupção (7.4). Visto o pH da carga ser muito próximo ao ponto isoelétrico da proteína, a nanofitina não tem força suficiente para se ligar à coluna e como tal sai no *flowthrough*. Deste modo, foi realizada uma outra carga na coluna para averiguar se a nanofitina se consegue ligar com sucesso à coluna. Para esta carga foi aproveitado o *flowthrough* referido anteriormente e o seu pH foi ajustado para 5.7. Esta foi de seguida aplicada na coluna mantendo-se as mesmas condições de operação exceto nos tampões de equilíbrio e de eluição que passaram a ter um pH de 5.7. Nas figuras seguintes estão os dados da operação da IEX.

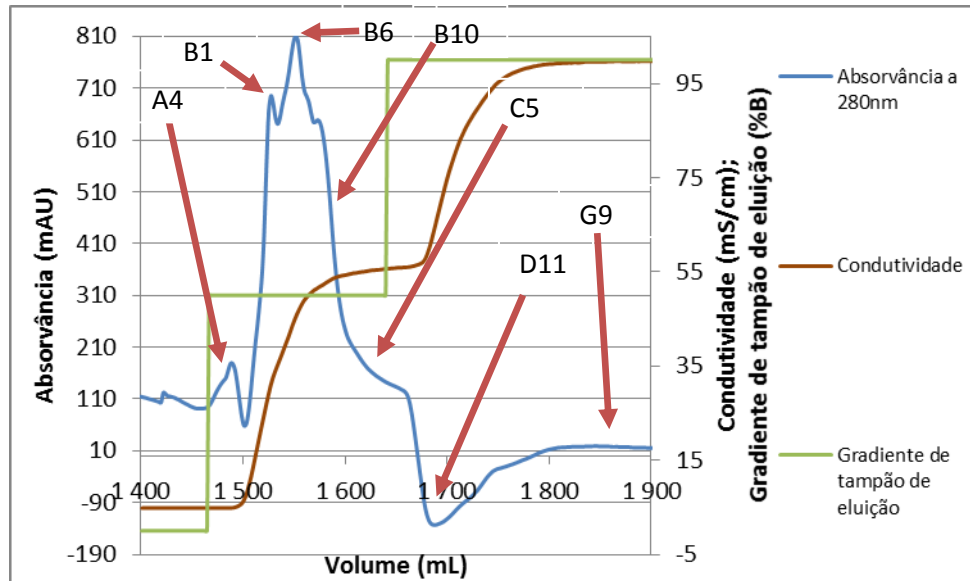


Figura 3.28- Cromatograma referente à segunda eluição da IEX do processo 3.2.6.

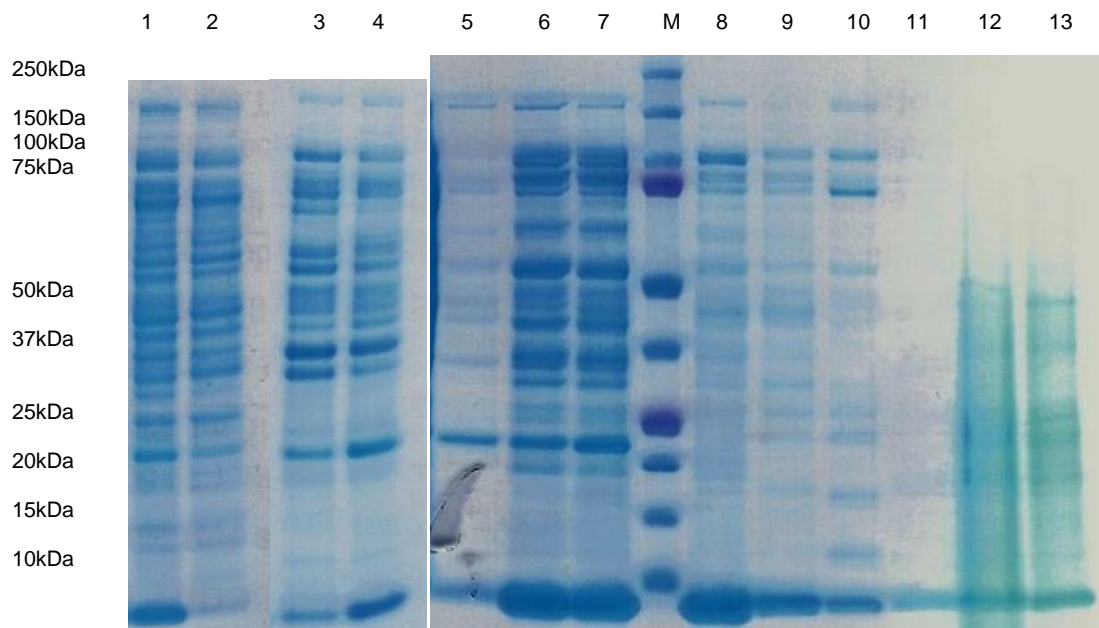


Figura 3.29- SDS-PAGE referente à segunda operação na IEX do processo 3.2.6. 1- Carga coluna com abaixamento do pH; 2- Flowthrough; 3-Início da lavagem da coluna com tampão de equilíbrio; 4- Lavagem final da coluna com tampão de equilíbrio. 5- Fração A4; 6- Fração B1; 7- Fração B6; 8- Fração B10; 9- Fração C5; 10- Fração D11; 11- Fração G9; 12- CIP coluna em condições redutoras; 13- CIP coluna em condições não redutoras.

A figura 3.29 mostra que o *flowthrough* da IEX, banda 2, não tem nanofitina em solução, aparentando então estarem reunidas condições para esta se ligar à coluna. No entanto verifica-se que a lavagem com tampão de equilíbrio após a carga começa a perder nanofitina tanto no início da lavagem como no final da mesma. Este resultado é surpreendente tendo em conta as condições em que se está a operar pois tendo sido diminuído o pH do tampão de equilíbrio seria de esperar que a S2-modificada tivesse força suficiente para se manter ligada à fase estacionária. Considerando o ponto isoelétrico da proteína de 8.01, a literatura refere que operando no mínimo a uma unidade de pH abaixo do ponto isoelétrico seria suficiente para garantir uma ligação à coluna.<sup>64</sup> Se o problema desta perda na lavagem não é referente ao pH de operação, poderá dever-se sim a um problema de estabilidade desta

conformação. Mais uma vez, o facto de não terem sido desenvolvidos analíticos específicos para a detecção da nanofitina na forma ativa invalida de certa forma a ilação de algumas conclusões. Neste caso específico poderia ser possível detetar se a nanofitina que se perde nas lavagens se encontra ativa ou se por outro lado se se trata de uma conformação sem função biológica. Apesar de não se ter desenvolvido nenhuma técnica analítica no iBET, os parceiros europeus do SADEL desenvolveram algumas técnicas analíticas para avaliação da atividade e estabilidade das diferentes nanofitinas como serão referidas.

No que diz respeito à eluição da coluna, como seria de esperar a resolução de impurezas não foi possível tendo ocorrido uma grande sobreposição de picos. Destaca-se no entanto que durante todas as frações analisadas a S2-modificada foi eluída, incluindo a fração G9, banda 11, figura 3.29, que apenas é eluída a 100% do tampão de eluição. Foi ainda analisado o CIP da coluna, bandas 12 e 13, onde se observa que bastante nanofitina se agarrou durante a operação e não conseguiu ser eluída pelo gradiente realizado. Esta amostra do CIP foi submetida no gel tanto em condições não redutoras, banda 12, como em condições redutoras, banda 13, para averiguar se a nanofitina adquiriu outro tipo de conformação que influenciasse o seu peso molecular nestas duas condições. O perfil de bandas nas duas amostras é muito semelhante mostrando mais uma vez que o DTT não possui qualquer efeito na homogeneidade de conformações.

Para tentar averiguar se a S2-modificada eluída da IEX se encontra numa conformação que consiga permear a membrana de filtração tangencial de 30kDa foi feito o *pool* das frações eluídas da primeira carga e esta solução foi aplicada a um sistema de TFF de 30kDa. Os resultados deste teste estão na figura seguinte.

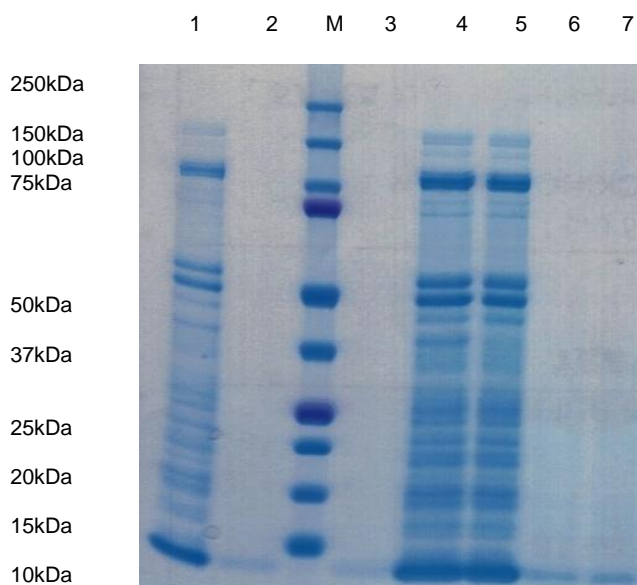


Figura 3.30- SDS-PAGE referente à operação de TFF com o eluído da figura 3.29. 1- Pool Fração A1-F2; 2- Permeado 30kDa em condições redutoras; 3- Permeado 30kDa em condições não-redutoras; 4- Retentado 30kDa em condições redutoras; 5- Retentado 30kDa em condições não-redutoras; 6- CIP membrana 30kDa em condições redutoras; 7- CIP membrana 30kDa em condições não-redutoras.

Na figura 3.30 todas as amostras foram aplicadas tanto em condições redutoras como em condições não redutoras. Como se consegue observar pelas bandas 4 e 5, a nanofitina ficou praticamente toda retida na membrana de 30kDa, sendo praticamente nula a quantidade de nanofitina presente nas bandas 2 e 3. Não se destacam diferenças, quer a nível da nanofitina como também a nível de outras proteínas, entre as amostras quando são aplicadas no gel em condições redutoras e em condições não redutoras. O CIP da membrana, representado pelas bandas 6 e 7, mostra a presença de nanofitina em solução mas não muito concentrada. Resumindo, o objetivo deste teste não foi bem sucedido pois o uso combinado de DTT e Triton X-100 não foi suficiente para manter a nanofitina em apenas uma conformação estável e ativa. O facto de algumas conformações não se agarrarem à coluna, de algumas conformações serem eluídas normalmente mas não conseguirem permear a membrana de 30kDa, e de outras apenas se desligarem da coluna com o CIP mostra que a heterogeneidade da S2-modificada é elevada. De facto, um dos parceiros do projeto SADEL, da Universidade de

Genebra, através da análise de espectroscopia de massa da S2-modificada verificou que existem dois picos distintos com massas moleculares muito aproximadas. Efetivamente, uma parte da S2-modificada sofre uma clivagem em um aminoácido quando se encontra em ambiente intracelular. Esta clivagem é mais acentuada na S2-modificada do que por exemplo para outras nanofitinas, e explica a existência de diferentes populações presentes em solução após disruptão. O facto de existir uma clivagem num aminoácido da S2-modificada por si só pode não explicar o facto de existir retenção durante a filtração tangencial, ou o facto de a S2-modificada por vezes não ser eluída durante o gradiente normal, mas poderá significar que a nanofitina poderá ter mais apetência para ter mais modificações pós-translacionais que essas sim poderão afetar o comportamento durante o processo de purificação. Numa perspetiva futura com o objetivo de verificar se ocorrem modificações pós-translacionais e quais as mais incidentes pode-se realizar uma análise por espectrometria de massa que é uma técnica com resolução suficiente para discernir entre estas isoformas da proteína, ao contrário da técnica de SDS-PAGE que não permite este detalhe pormenorizado.

### 3.2.7 Uso combinado de filtração tangencial e cromatografia de permuta iónica com o dímero (S2(L30)S2)

Como já foi referido anteriormente existem outras nanofitinas que foram desenvolvidas no decurso do projeto SADEL, como por exemplo a formação de dímeros. Como tal, foi estudado um protocolo de purificação de um dímero, S2(L30)S2. Este dímero é formado pela junção de dois monómeros S2 ligados por um *linker* de 30 aminoácidos, possuindo um peso molecular de aproximadamente 18kDa e apresenta um ponto isoelétrico de 9. O processo de purificação estudado foi igual ao da figura 3.16, com exceção dos tampões da IEX que se optou por um tampão de equilíbrio de 30mM de fosfatos a pH 6.5 e um tampão de eluição de 30mM de fosfatos com 1 M de cloreto de sódio a pH 6.5. Os resultados referentes à operação do TFF e da IEX estão representados nas figuras seguintes.

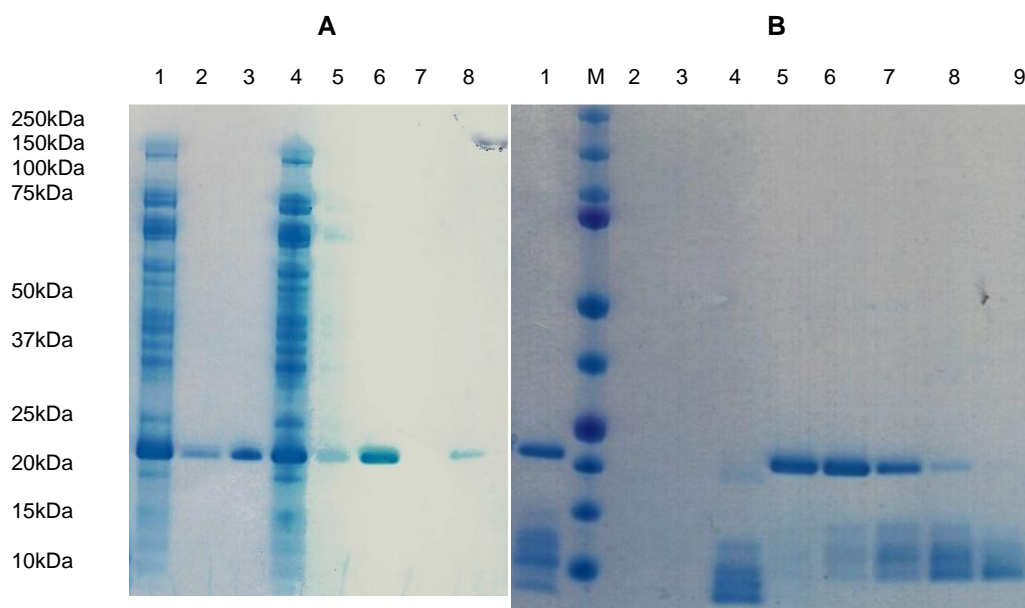


Figura 3.31- A) SDS-PAGE referente à clarificação e à operação de TFF do processo 3.2.7. 1- Após filtração; 2- Permeado 30kDa antes diálise; 3- Permeado 30kDa após diálise; 4- Retentado 30kDa; 5- CIP membrana 30kDa; 6- Retentado 5kDa; 7- Permeado 5kDa; 8- CIP membrana 5kDa. B) SDS-PAGE referente à eluição da IEX do processo 3.2.9. 1- Carga coluna; 2- Flowthrough; 3- Lavagem coluna com tampão de equilíbrio; 4- Fração A7; 5- Fração A9; 6- Fração A10; 7- Fração A11; 8- Fração A12; 9- Fração B1.

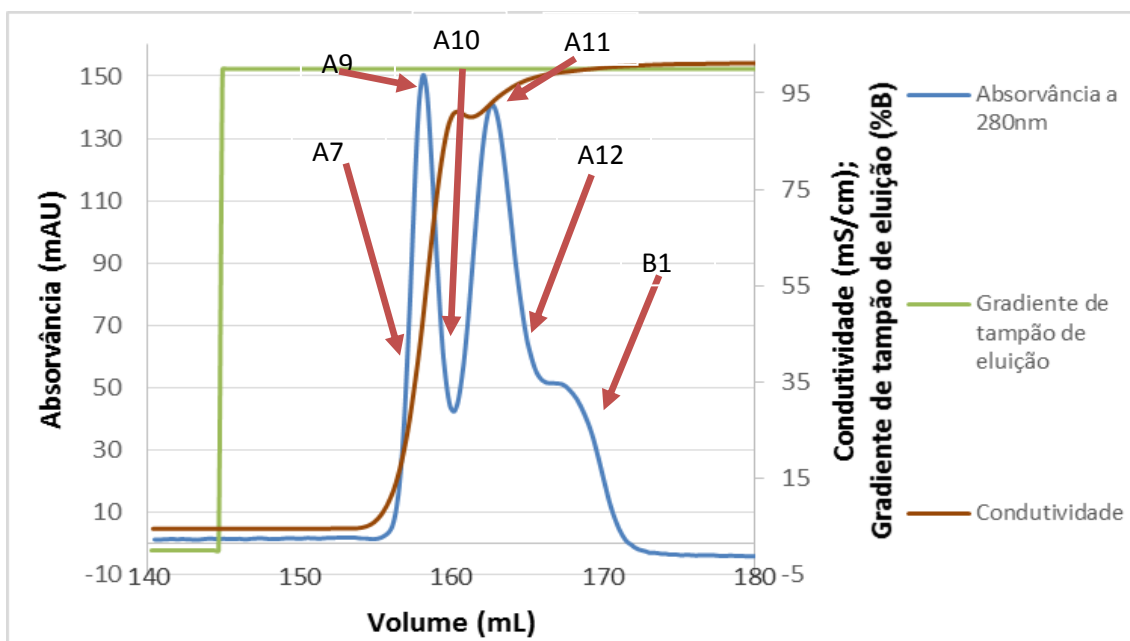


Figura 3.32- Cromatograma referente à eluição da IEX do processo 3.2.7.

A figura 3.31 (A) mostra alguns dados interessantes no que diz respeito à operação da filtração tangencial. À semelhança do que acontece com a S2-modificada, a banda 4 mostra que existe uma grande quantidade de nanofitina a ficar retida na membrana. No entanto a banda 2 e 3 mostram um dado curioso. A amostra referente à banda 2 diz respeito ao permeado da membrana de 30kDa antes de ocorrer diálise na membrana, enquanto que a banda 3 diz respeito a uma amostra retirada apenas quando os 5 volumes de diálise na membrana acabaram. Isto mostra portanto, à semelhança do que já tinha sido referido, que a retenção da nanofitina na membrana está intimamente ligada aos volumes de diálise que são realizados na membrana. O que isto pode significar é que a nanofitina adere à membrana e forma uma espécie de equilíbrio químico entre a nanofitina que fica retida e a nanofitina que é permeada. Os volumes de diálise na membrana ajudam a romper este equilíbrio ao arrastar a nanofitina para que esta consiga permear a membrana. O desejável seria realizar a diálise em volumes infinitos de tampão de lavagem minimizando assim a perda da nanofitina. Porém, em termos de scale-up tal é impossível pois significaria um aumento de custos substancial devido ao aumento de volume de operação que significaria também um aumento do tempo de operação significativo tornando portanto impraticável a operação da filtração tangencial nestas condições. Por último o CIP de ambas as membranas mostra existir nanofitina em solução, à semelhança de processos anteriores.

No que diz respeito à eluição da IEX foi feito um gradiente direto de 0 a 100% do tampão de eluição que como se observa na figura 3.32 são visíveis dois picos de grande intensidade. As frações analisadas por SDS-PAGE, figura 3.31 (B), mostram que a maioria do primeiro pico diz respeito à eluição do dímero, enquanto que o segundo se encontra mais contaminado pela presença de outras proteínas. Assim sendo, conclui-se que este conjunto de técnicas permitiu purificar o dímero S2(L30)S2, sendo no entanto importante otimizar algumas questões relativas à eluição na coluna de IEX, e à operação na filtração tangencial nomeadamente a influência da diálise na remoção da nanofitina retida.

### 3.2.8 Uso combinado da técnica de precipitação fracionada por sulfato de amónia e cromatografia de interação hidrofóbica (S2-modificada)

O uso de diferentes técnicas de cromatografia num mesmo processo de purificação permite explorar diferentes propriedades biológicas das proteínas eliminando a presença de contaminantes aumentando portanto a percentagem de pureza da amostra.<sup>56</sup> No âmbito do projeto foi testada a técnica de precipitação fracionada por sulfato de amónia em combinação com a HIC. Na figura 3.33 encontram-se os resultados em SDS-PAGE do teste de precipitação fracionada por sulfato de amónia a diferentes concentrações do reagente, indo de valores desde 50% até 80% de saturação do reagente. O teste foi realizado logo após disrupção em 30mM de glicina a pH 9 a 900bar, centrifugação a 17500xg e filtração em 0,22µm.

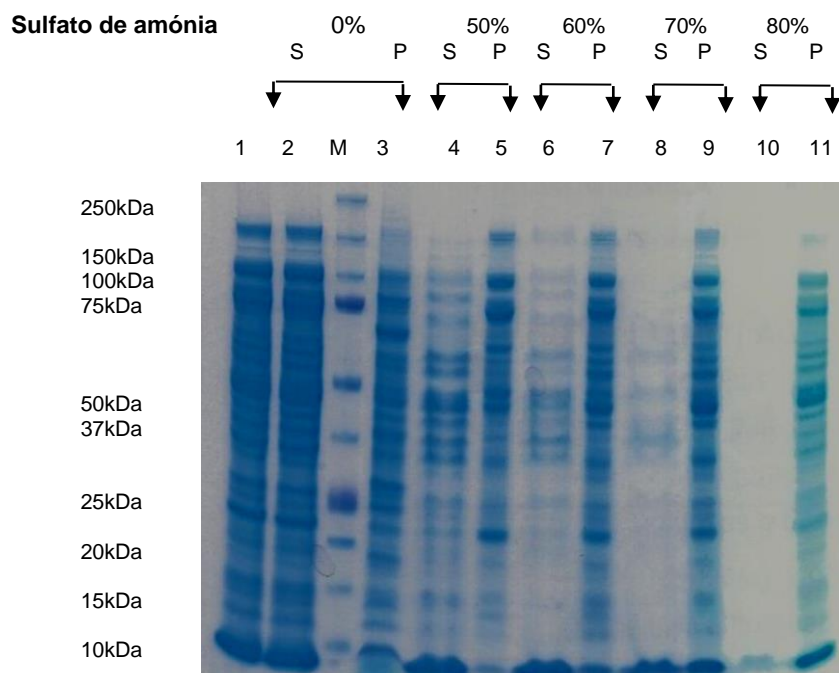


Figura 3.33- SDS-PAGE referente aos testes de precipitação fracionada por sulfato de amónia. 1- Após filtração; 2- Sobrenadante 0% saturação; 3- Pellet 0% saturação; 4- Sobrenadante 50% saturação; 5- Pellet 50% saturação; 6- Sobrenadante 60% saturação; 7- Pellet 60% saturação; 8- Sobrenadante 70% saturação; 9- Pellet 70% saturação; 10- Sobrenadante 80% saturação; 11- Pellet 80% saturação.

Na figura 3.33 é visível que começa a ocorrer uma separação de componentes do sobrenadante para o pellet logo a partir de saturações de 50%. A estas concentrações alguns dos contaminantes começam a estar presentes no pellet ao contrário da nanofitina que se mantém no sobrenadante. Esta informação levou a que se optasse por operar na cromatografia de interação hidrofóbica com uma saturação de 60% de sulfato de amónia sendo portanto o tampão de equilíbrio composto por 30mM de citrato com 2.4M de sulfato de amónia a pH 5 e o tampão de eluição composto por 30mM de citrato a pH 5. A coluna utilizada foi a coluna de 1mL pré-empacotada Resource Phe. Os resultados referentes a esta cromatografia estão representadas nas figuras 3.34 e 3.35.

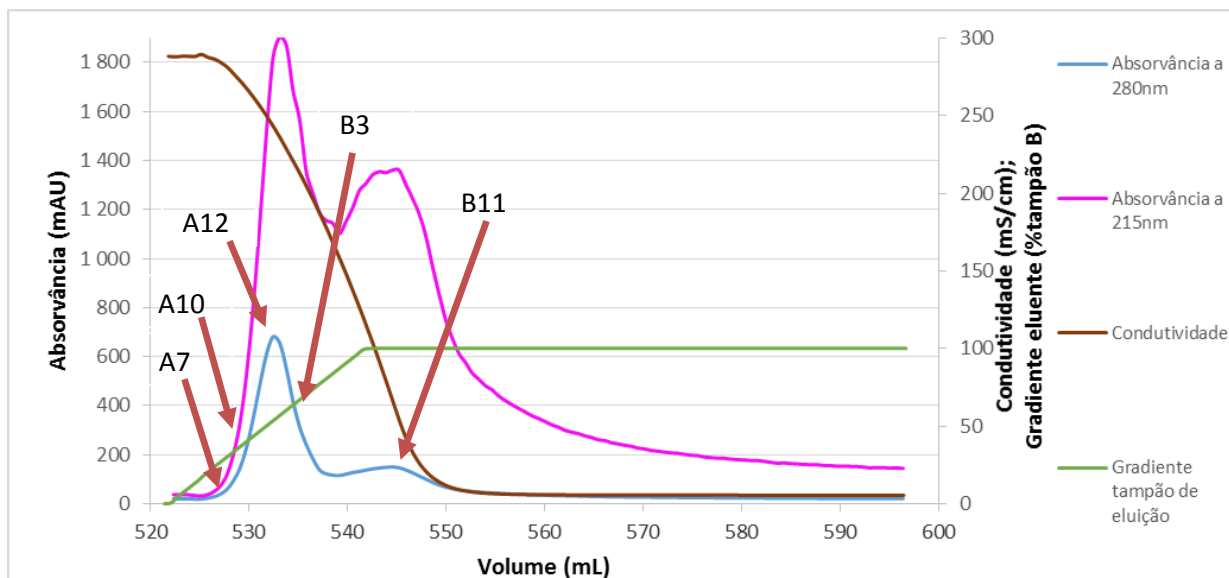


Figura 3.34- Cromatograma referente à eluição da HIC do processo 3.2.8.

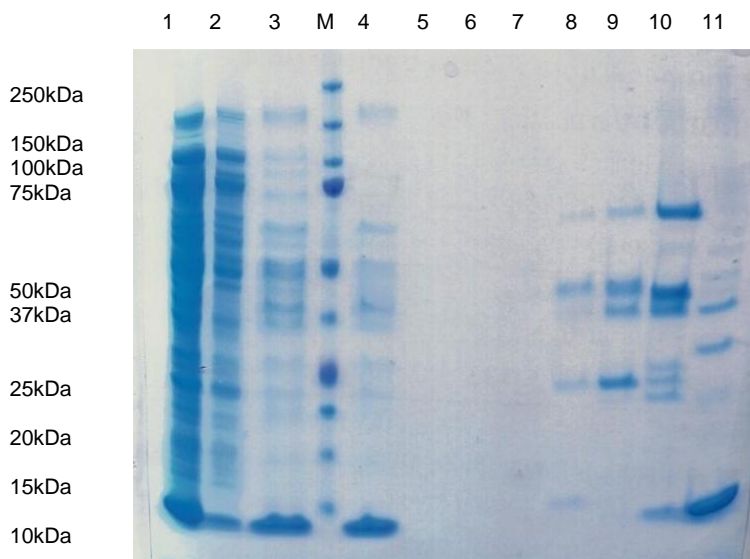


Figura 3.35- SDS-PAGE referente à operação na HIC do processo 3.2.8. 1- Após filtração; 2- Pellet 60% saturação; 3- Sobrenadante 60% saturação; 4- Carga coluna; 5- Flowthrough; 6- Lavagem coluna com tampão de equilíbrio; 7- Fração A7; 8- Fração A10; 9- Fração A12; 10- Fração B3; 11- Fração B11.

Como se pode constatar na figura 3.34 existe a ocorrência de um pico de elevada intensidade e a de um pico de menor intensidade. As amostras retiradas em diferentes alturas da eluição mostram que a fração B11, banda 11 da figura 3.35, corresponde à proteína S2-modificada que foi eluída com sucesso da coluna. No entanto é importante assinalar alguns pontos importantes desta operação. Na figura 3.35 o pico da banda 11, que corresponde à fração B11, é bastante menos intenso do que quando comparado com o pico composto pelas frações A10, A12 e B3 (bandas 8, 9 e 10 da figura 3.35) representando apenas cerca de 15% da intensidade total do pico. Outro ponto a assinalar é a presença de contaminantes no pico da eluição. Este é um fator a ter de ser otimizado que terá de passar pela tentativa de eluição por *steps* ou pela adição de um passo extra de cromatografia para eliminar boa parte dos contaminantes. Parte dos contaminantes podem dever-se ao facto de a carga ter sido realizada num tampão diferente do de equilíbrio (30mM glicina com 2,4M de sulfato de amónia a pH 9) o que não é considerado como uma metodologia correta pois o facto de fazer uma carga com um tampão a um pH diferente terá consequências a nível de hidrofobicidade das proteínas e consequente movimentação das moléculas de água circundantes na fase estacionária o que poderá provocar ligações de outros compostos biológicos que ao pH suposto não

aconteceriam.<sup>65</sup> Conclui-se portanto que apesar de um resultado positivo, é necessário efetuar uma posterior otimização da técnica.

### 3.2.9 Uso combinado das técnicas de cromatografia de permuta iónica, precipitação fracionada por sulfato de amónia e cromatografia de interação hidrofóbica (S2-modificada)

Numa fase inicial de testes do uso combinado das técnicas de IEX e HIC verificou-se que o conjunto de proteínas que eram eluídas da IEX e que eram aplicadas logo de seguida na HIC não tinham força suficiente para ligar à fase estacionária da HIC. Como tal, estudou-se o uso da técnica de precipitação fracionada por sulfato de amónia como técnica intermédia entre ambas as técnicas de cromatografia. Os resultados prévios do estudo da precipitação fracionada por sulfato de amónia (figura 3.33) mostraram que uma saturação de 60% de sulfato de amónia apresentam bons resultados no que diz respeito à eliminação de contaminantes apesar de já se observar alguma perda da nanofitina no pellet. No âmbito deste teste, foi usada a amostra resultante da eluição de IEX (30mM de citrato com 1M de NaCl a pH 5), e devido à força iónica moderada do tampão em que já se encontrava, optou-se por tratar a amostra com uma saturação de 50% de sulfato de amónia. Neste caso, as condições de operação da HIC estão representadas na figura 3.36.

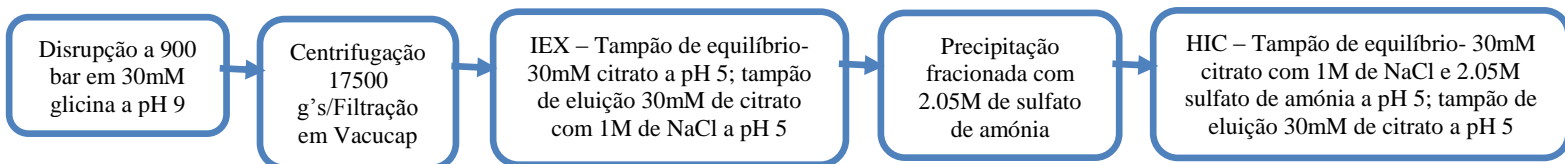


Figura 3.36- Processo de purificação usando as técnicas de IEX, precipitação fracionada por sulfato de amónia e HIC juntas.

Os resultados referentes a este teste estão apresentados nas figuras 3.37 e 3.38.

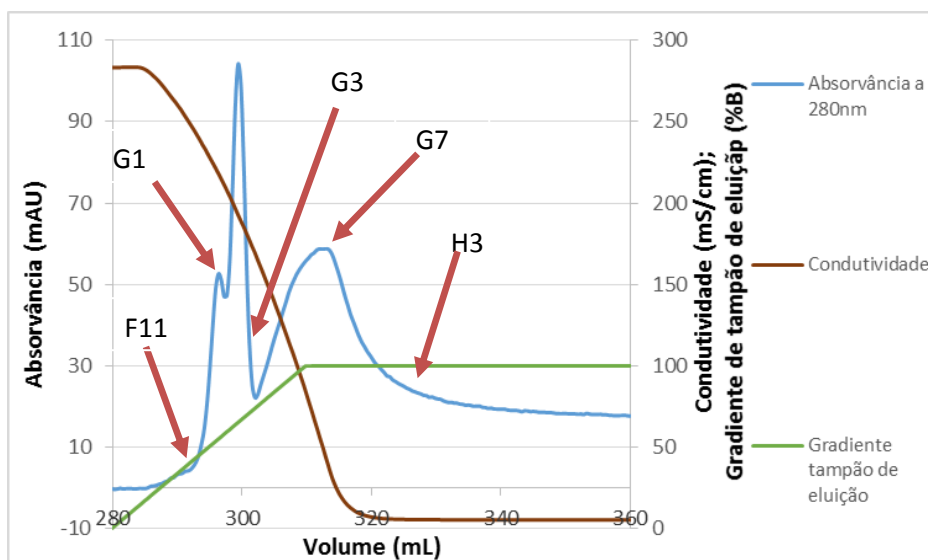


Figura 3.37- Cromatograma referente à primeira eluição da HIC do processo 3.2.9.

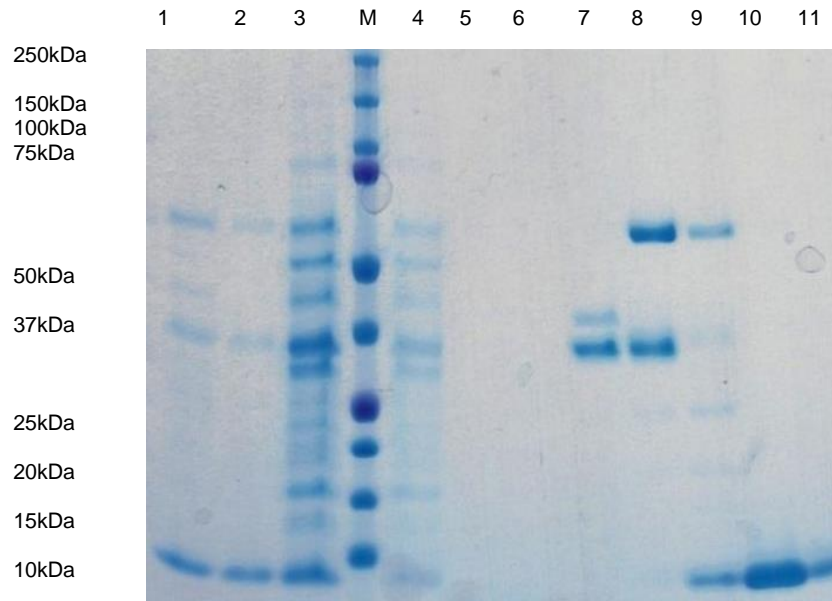


Figura 3.38- SDS-PAGE referente à precipitação fracionada por sulfato de amónia e à operação na HIC do processo 3.2.9. 1- Amostra após adição de sulfato de amónia; 2- Sobrenadante 50% saturação (carga coluna); 3- Pellet 50% saturação; 4- Pellet 50% saturação diluído; 5- Flowthrough; 6- Lavagem coluna com tampão de equilíbrio; 7- Fração F11; 8- Fração G1; 9- Fração G3; 10- Fração G7; 11- Fração H3.

A eluição da coluna, figura 3.37, mostra a existência de dois picos mais intensos, e de um pico pouco intenso com algum arrastamento. As frações analisadas mostram que os dois picos mais intensos pertencem na sua maioria a contaminantes que se encontravam na carga. A partir da fração G7 apenas a nanofitina é eluída, demonstrando que a proteína a estas concentrações de sulfato de amónia e cloreto de sódio possui força iónica suficiente para se ligar à coluna durante o processo de purificação, e que o uso conjunto das técnicas de IEX e HIC permite separar com eficácia a S2-modificada das restantes. A figura 3.38 mostra uma evolução em relação às experiências anteriores demarcando-se desde logo pela inexistência da nanofitina no *flowthrough* e na lavagem da coluna (representados pelas bandas 5 e 6). De salientar ainda que o uso de uma saturação de 50% poderá ser excessiva devido à perda da nanofitina no pellet observável na banda 3. Existe portanto espaço para otimizar a percentagem de saturação ideal, mas que tem de ser cuidadosamente escolhida pois um abaixamento neste parâmetro apesar de poder significar mais nanofitina solúvel poderá também significar mais contaminantes em solução.

Por apresentar resultados prometedores estas condições de operação foram recriadas na tentativa de obter um processo reproduzível. No decurso deste teste, as condições foram iguais às da figura 3.36, havendo apenas alteração da saturação de sulfato de amónia na amostra (de 50% para 45%) e também da tentativa de realizar uma eluição por passos na HIC.

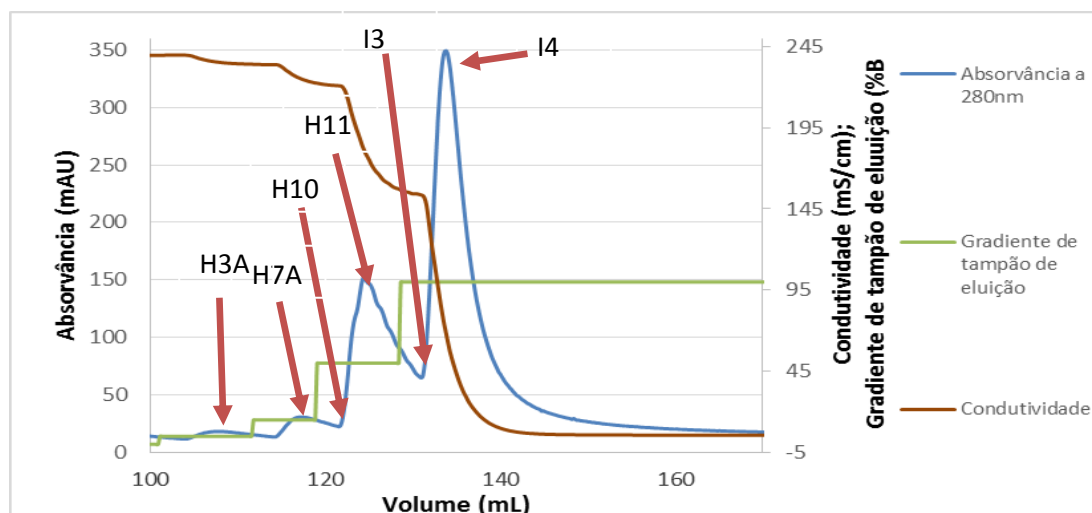


Figura 3.39- Cromatograma referente à segunda eluição da HIC do processo 3.2.9.

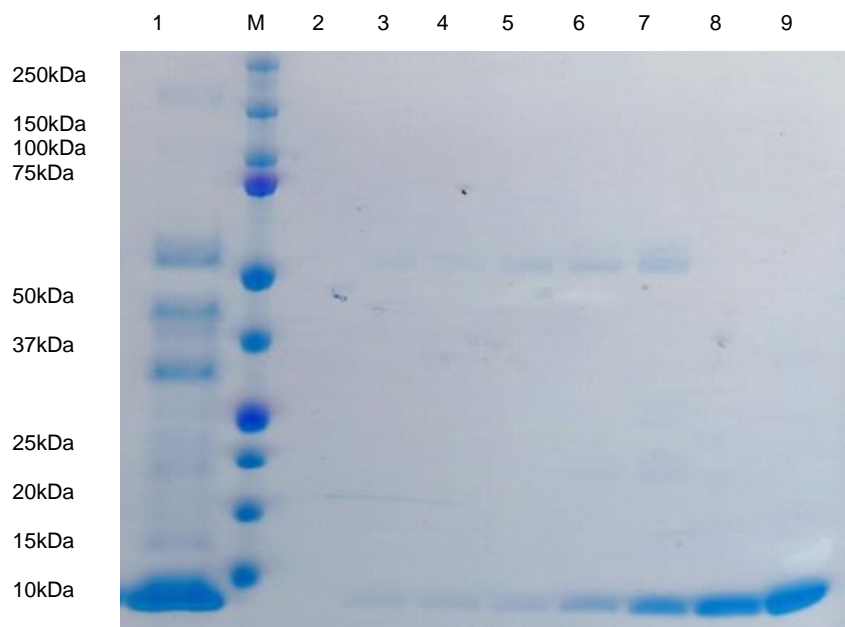


Figura 3.40- SDS-PAGE referente à segunda operação na HIC do processo 3.2.9. 1- Sobrenadante 45% saturação (carga coluna); 2- Flowthrough; 3-Lavagem coluna com tampão de equilíbrio; 4- Fração H3; 5- Fração H7; 6- Fração H10; 7- Fração H11; 8- Fração I3; 9- Fração I4.

A figura 3.39 mostra desde logo uma homogeneidade no tipo de pico de eluição. Isto é, os picos que ocorreram não parecem pertencer a contaminantes pois estão todos bastante homogêneos entre eles. Esta suspeição é confirmada pelo grau de pureza apresentado nas frações analisadas, correspondentes das bandas 4 à 9, figura 3.40. Pode-se concluir portanto que mais uma vez as técnicas combinadas de IEX e HIC com o método de precipitação fracionada com sulfato de amónia permitiu separar com eficácia a nanofitina das restantes proteínas em solução.

No entanto, existem diferenças entre este teste apresentado quando comparado com o teste anterior que se tentou reproduzir. Um processo de purificação em que diferentes fatores e condicionantes interagem de forma dinâmica pode implicar que os processos não se tornem reprodutíveis. Neste caso específico, nota-se um comportamento diferente entre a eluição do teste anterior em que existe a eluição de bastantes contaminantes, para este teste realizado em que praticamente apenas a S2-modificada foi eluída. Destaca-se também uma diferença entre as cargas que foram aplicadas à coluna, e que deveriam ser semelhantes. Diferentes fatores podem ter contribuído para esta diferença não só na operação da HIC mas em todo o processo desde o seu início. No que diz respeito à operação na HIC destaca-se por exemplo o pH a que está a ser efetuada a operação. Apesar de o pH ter sido ajustado para 5 à temperatura que se vai operar, sucede que a solução é deixada ao pé do equipamento durante horas estando sujeita a ciclos de temperatura que poderão influenciar fortemente o pH da solução. Alterações significativas do pH poderão ditar diferentes ligações de diferentes proteínas à resina, como já foi referido. Porém, assinala-se que a magnitude em que o pH iria variar seria mais pequena do que aquela que poderia justificar uma diferença tão significativa no perfil de eluição das proteínas. No que diz respeito ao sulfato de amónia, este reagente também influencia o processo no passo em que a solução saturada é adicionada à amostra biológica. Neste caso, diferenças entre *stocks* e manutenção das respetivas propriedades são críticas pois poderão proporcionar resultados diferentes às experiências. Por último, destaca-se um outro fator que poderá ser o que mais influencia para a inexistência de reprodutibilidade em alguns dos resultados que é a disrupção mecânica com o homogeneizador de alta pressão. Apesar de o homogeneizador de alta pressão ser um método de disrupção mais facilmente escalável do que por exemplo métodos químicos, é também um método que poderá não apresentar resultados reprodutíveis de experiência para experiência. Apesar de todas as disrupções terem sido realizadas a 900 bar, se o equipamento não estiver a funcionar corretamente e não estiver realmente a fornecer uma pressão à amostra biológica de 900 bar, as células poderão não estar totalmente disruptadas o que poderá influenciar o rendimento e pureza do processo pois uma maior disrupção implica não só uma maior libertação da nanofitina desejada mas também de outros contaminantes. Todas estas explicações poderão

justificar não só o facto de existirem cargas diferentes nestas duas experiências realizadas como também do perfil de eluição na coluna.

### 3.2.10 Análise de conformações por filtração-gel (S2-modificada)

Um dos desafios a nível de *downstream* no SADEL tem sido a tentativa de deslindar o porquê da existência de diferentes conformações da nanofitina e qual o procedimento para evitar ou pelo menos prevenir a ocorrência das mesmas. Para análise de diferentes conformações foi escolhida a técnica de filtração-gel. Foram injetadas na coluna Superdex 75 HR10/30 diferentes alíquotas de S2-modificada pura em diferentes tampões, e através da análise das diferenças nos tempos de eluição foi estudada a existência de diferentes conformações. Os tampões escolhidos para a análise em filtração-gel foram os tampões em que se verificou por vezes que a nanofitina pudesse ter isoforma nessas condições destacando-se: 30mM de glicina a pH9 (condição A); 30mM de glicina a pH 9 com 10mM de DTT (condição B); 30mM de citrato a pH 5 (condição C); 30mM de citrato com 1M de cloreto de sódio a pH 5 (condição D) e PBS com 10mM de DTT e 0.1% de Triton X-100 a pH 7.4 (condição E). Para efeitos de comparação a coluna foi calibrada usando três padrões de proteína de pesos moleculares conhecidos: 5mg/mL de aprotinina (6,5kDa); 3mg/mL de ribonuclease A (13,7kDa); e 2mg/mL de anidrase carbónica (29kDa). As proteínas da calibração foram ressuspensas em tampão PBS a pH 7.4. Foi de seguida calculada a recta de calibração usando a equação 4. Os resultados estão representados nas figuras seguintes.

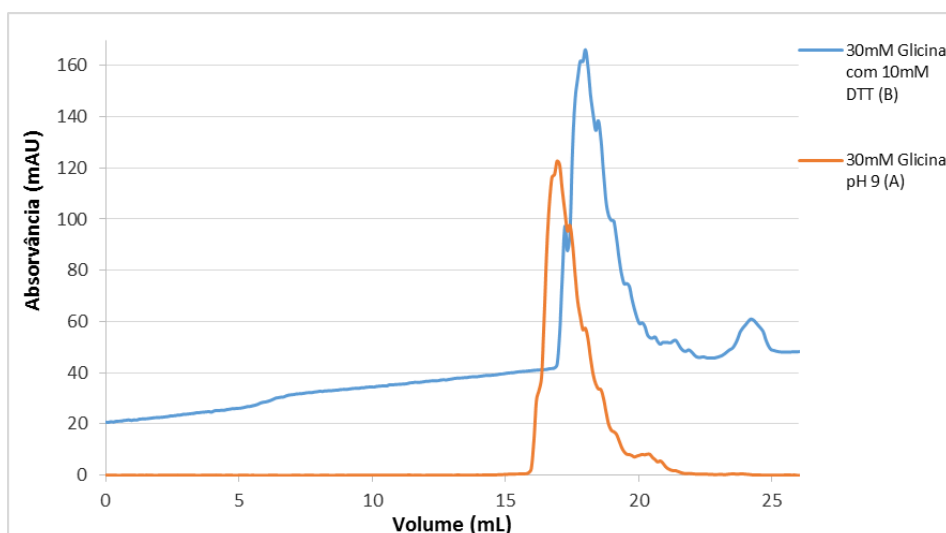


Figura 3.41- Cromatograma referente à operação em filtração-gel das condições A e B.

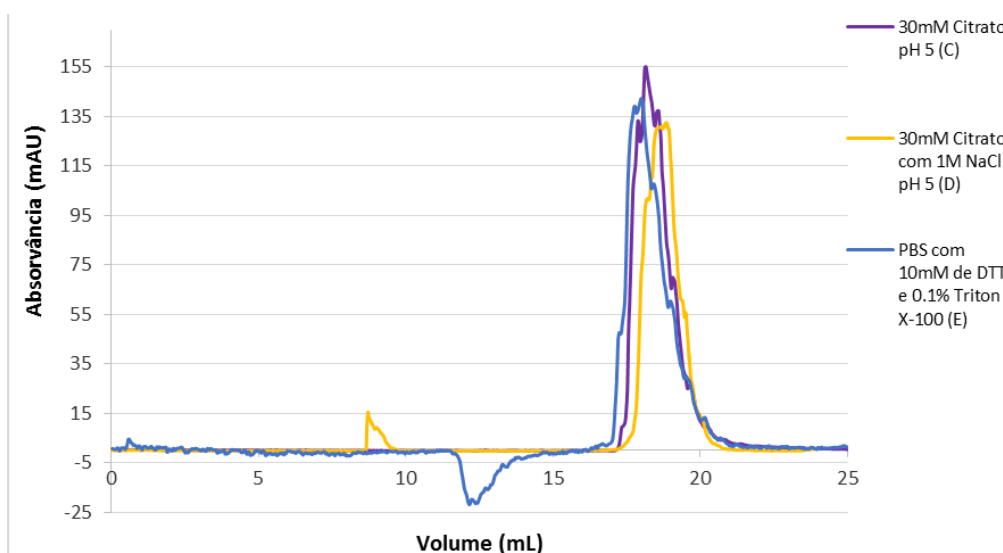


Figura 3.42- Cromatograma referente à operação em filtração-gel das condições C, D e E.

Tabela 3.3- Comparação dos diferentes pesos moleculares da nanofitina nas condições estudadas em filtração-gel com base na recta de calibração realizada.

Condição	Volume de eluição (mL)	Peso molecular (kDa)
30mM de glicina a pH 9 (A)	16,94	28,21
30mM de glicina com 10mM de DTT a pH 9 (B)	17,99	20,54
30mM de citrato a pH 5 (C)	18,16	19,52
30mM de citrato com 1M de NaCl a pH 5 (D)	18,85	15,85
PBS com 10mM de DTT e 0.1% de Triton X-100 a pH 7.4 (E)	18,00	20,48

Analisando os valores de pesos moleculares obtidos para a S2-modificada que a tabela 3.3 fornece para os diferentes tampões constata-se que estes valores são superiores quando comparados com o peso molecular que seria de esperar.

A figura 3.41 mostra que as condições A e B apesar de saírem com uma diferença de cerca de 1mL da coluna saem com um perfil bastante semelhante entre as duas operações. A figura 3.42 mostra tempos de eluição também bastante semelhantes, no entanto a condição D mostra um segundo pico a um volume de eluição de 8,7mL. Esta é a única condição estudada que nos fornece dois picos na operação da SEC e mostra existirem duas formas da S2-modificada quando a mesma se encontra nestas condições de operação. Um pico tão cedo como o que ocorre normalmente é indício de que a proteína forma agregados de alto peso molecular e como tal, é rapidamente eluída da SEC. O facto de a nanofitina formar agregados nestas condições de operação pode justificar parcialmente o porquê de a nanofitina eluída da IEX em 3.2.6 não ter conseguido permear a membrana de 30kDa.

A análise por SEC de diferentes condições de tampões em que a nanofitina se encontra nos diferentes testes realizados revelou resultados bastante heterogéneos com diferentes tempos de eluição na coluna levando a concluir que o tampão em que se encontra a S2-modificada influencia fortemente a conformação que a mesma adquire. Apenas as condições B, C e E pareceram ser concordantes entre si, mostrando diferença de apenas 1kDa. Outro facto a realçar nesta análise é que todas as conformações que foram estudadas, por SEC mostram tratar-se de um dímero ou variantes do mesmo com tempos de retenção diferentes. No entanto, estas mesmas amostras por SDS-PAGE em condições não-redutoras, e por análise de espectrometria de massa mostram tratar-se de um monómero. Porém, é importante assinalar dois factos que podem influenciar fortemente estes resultados. Apesar de os testes terem sido realizados em diferentes tampões de cromatografia, a calibração foi apenas feita num tampão. Para poder estabelecer uma correlação direta do peso molecular da proteína desejada com a curva de calibração dos padrões deveria ter sido feito uma curva de calibração com os padrões de proteína dissolvidos no tampão em questão. No que diz respeito à curva de calibração, a mesma deveria ter sido realizada com 5 ou 6 padrões de proteína para dar maior confiança à análise efetuada. Destaca-se ainda o facto de se estar a realizar estes testes com S2-modificada já pura vinda de um processo prévio de purificação de TFF e IEX. Torna-se óbvio portanto que podemos estar a realizar estas análises de conformações com uma proteína que durante o seu processo de purificação tenha vindo a ser selecionada naturalmente em função da conformação que apresentava levando a concluir que a análise deste tipo de metodologia com esta amostra pode não representar as diferentes conformações que a S2-modificada apresenta *in vivo*.

Embora a extensão das diferenças observadas não seja possível de ser avaliado, conclui-se que para efeitos meramente qualitativos e comparativos pode-se constatar que o tampão em que a proteína se encontra influencia a conformação da mesma, destacando-se principalmente o resultado referente à condição da eluição da IEX que mostra a existência de agregados e as evidentes assimetrias de picos presentes na eluição.

### 3.2.11 Remoção de endotoxinas (S2-modificada)

Como foi referido anteriormente, a remoção de endotoxinas do produto final é um dos objetivos do *downstream processing* no SADEL. Como tal, foi testado o uso de uma Sartobind STIC nano visando a remoção de endotoxinas do produto final. Para este efeito foi testado no

processo 3.2.1 a remoção de endotoxinas através da STIC na S2-modificada que se encontrava em PBS. As endotoxinas e outros parâmetros foram de seguida quantificados pelo Endosafe-PTS. A tabela seguinte traduz a diferença entre as endotoxinas antes e depois de a amostra passar na STIC.

Tabela 3.4- Diferentes parâmetros relativos à credibilidade e confiança da leitura do teor de endotoxinas antes e depois da passagem na STIC.

Parâmetros	Antes STIC	Depois STIC
Endotoxinas (EU/mL)	1218	31.9
EU/mg proteína	54.9	1.2
RT CV Amostra (%)	0.7	1
Spike (EU/mL)	2.81	2.89
RT CV Spike (%)	4.6	85.2
Spike Recovery (%)	260	268

Todos os parâmetros apresentados dizem respeito a fatores que contabilizam para a credibilidade do teste realizado. O RT CV da amostra diz respeito aos coeficientes de variação temporais que os diferentes canais de teste analisados apresentam. O spike diz respeito à reação da amostra com uma quantidade conhecida de endotoxinas presente no próprio teste, o RT CV spike, à semelhança do RT CV da amostra, diz respeito aos coeficientes de variação temporais desse mesmo spike. Quanto ao spike recovery diz respeito à percentagem de amostra que conseguiu ser recuperada do controlo positivo.

Apesar de alguns dos parâmetros estarem fora da gama para este teste ser considerado válido (destaca-se o spike recovery que devia encontrar-se entre 50 e 200%) considera-se que no geral a STIC foi eficaz na remoção de endotoxinas, diminuindo cerca de 97% no teor de endotoxinas apresentado na amostra final.

Diferentes fatores podem ser implementados e estudados no que diz respeito à remoção de endotoxinas do produto final. Com os resultados apresentados, o uso da Sartobind STIC, é sem dúvida, uma opção confiável para passos finais do processo de purificação. Destaca-se no entanto que a diminuição observada apesar de ser bastante acentuada após uso da STIC, outros fatores auxiliaram a que a amostra antes de ser aplicada já tivesse um conteúdo de endotoxinas reduzido. O facto de ter sido usado um processo de cromatografia de permuta iónica com uma resina aniónica, como a Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup> ajudou a que fosse removido com eficácia grande parte das endotoxinas. As endotoxinas por terem uma carga negativa não irão ligar à fase estacionária e como tal irão sair no *flowthrough*. Outro fator que foi estudado durante este processo foi o uso de surfactantes como o Triton X-100 como componente dos tampões de lavagem de cromatografia, que auxilia na remoção de LPS no processo de purificação e que portanto auxiliou também para que a amostra tivesse um conteúdo em LPS menor do que possuiria sem estes fatores.

Apesar da diminuição referida o valor apresentado poderá mesmo assim não ser suficiente para ser considerado como aceitável. O fator determinante que condicionará a aceitação ou não deste valor de endotoxinas no produto final será a dosagem do fármaco. Por exemplo, a *Federal Drug Administration* define um limite máximo de 5EU/mL para fármacos injetáveis por via da corrente sanguínea, enquanto que o limite máximo para fármacos que penetrem a barreira hematoencefálica é de 0.2EU/mL.<sup>66,67</sup> Conhecendo a dose de cada fármaco necessária para cada paciente facilmente se verifica se é aceitável o número de endotoxinas que se irá injetar em cada caso específico. No caso do projeto SADEL, ainda não foi determinado a dose necessária para o fármaco pois ainda não foi escolhida nem produzida a nanofitina final que irá ser comercializada.

### 3.2.12 Produtividades obtidas nos diferentes processos de purificação de nanofitina testados

Na escolha de um processo de purificação à escala industrial acaba por pesar sempre maioritariamente o rendimento global do processo. Como tal, a tabela 3.5 apresenta um resumo das purificações efetuadas assim como a respetiva produtividade de nanofitina obtida.

Na tabela 3.6 está presente uma comparação de diferentes parâmetros de operação usados no *downstream*.

Tabela 3.5- Comparação de diferentes parâmetros entre os processos estudados em *downstream* tais como quantidade de proteína produzida, produtividades e relatividade de impurezas.

Técnicas envolvidas	Processo	Biomassa de partida (g)	Quantidade de proteína produzida (mg)	Produtividade (g/L)	Impurezas
TFF(30kDa+5kDa)+IEX	3.2.1	695.8	3551	0.965	-
TFF(30kDa+5kDa)+IEX	3.2.2	30	85.77	0.706	-
TFF(50kDa+5kDa)+IEX xk16	3.2.4	30	38.06	0.240	+++
TFF(30kDa+5kDa)+IEX com dímero	3.2.7	5.6	3.38	0.114	+
Precipitação fracionada+HIC	3.2.8	1.2	4.8	0.757	++
IEX+precipitação fracionada+HIC	3.2.9	30	42.8	0.270	+

Tabela 3.6- Comparação de diferentes parâmetros entre os processos estudados em *downstream*.

Técnicas envolvidas	Processo	Área útil 1º TFF utilizada (m²)	Área útil 2º TFF utilizada (m²)	Capacidade resina (mg)	Rendimento cromatografia (%)
TFF(30kDa+5kDa)+IEX	3.2.1	0,125	0,114	3570	81,69
TFF(30kDa+5kDa)+IEX	3.2.2	0,025	0,019	500	52,90
TFF(50kDa+5kDa)+IEX	3.2.4	0,063	0,057	500	34,73
TFF(30kDa+5kDa)+IEX com dímero	3.2.7	0,025	0,023	500	54,87
Precipitação fracionada+HIC	3.2.8	-	-	25	10,70
IEX+precipitação fracionada+HIC	3.2.9	-	-	500 (IEX) 50 (HIC)	21,08 (IEX) 41,18 (HIC)

Analisando a tabela 3.5 constata-se que a nível de produtividades o processo que acabou por render mais proteína foi o processo de filtração tangencial (30kDa+5kDa) seguidos de cromatografia de permuta iónica. Este processo acabou mesmo por ditar uma produtividade de cerca de 1g/L apresentando também um elevado grau de pureza.

Os processos que apresentam produtividades mais baixas tratam-se dos processos de filtração tangencial de 50kDa e de 5kDa, do processo de filtração tangencial de 30kDa e de 5kDa com o dímero S2(L30)S2 e ainda do processo combinado de cromatografia de permuta iónica com interação hidrofóbica e precipitação fracionada. No processo com *cutoff* de 50kDa a produtividade acabou por baixar devido à grande quantidade de contaminantes presentes que acabaram por se refletir na escolha de um *pool* de frações mais reduzido numa tentativa para desta forma aumentar a pureza da proteína. No processo de filtração tangencial com o dímero na membrana de 30kDa o maior problema foi a retenção de proteína junto à membrana que

acabou por ter como consequência a diminuição da produtividade. No processo combinado de IEX+HIC+precipitação fracionada a produtividade acabou por diminuir devido a perdas da proteína ao longo do processo destacando-se a perda no pellet da precipitação fracionada por sulfato de amónia.

Apresentando purezas intermédias está o processo combinado de precipitação fracionada e de cromatografia de interação hidrofóbica e ainda do processo de filtração tangencial com membrana de 30kDa e de 5kDa com os tampões otimizados. O processo combinado de precipitação fracionada e de cromatografia de interação hidrofóbica mostrou não ser totalmente eficaz no que diz respeito à separação da nanofitina dos restantes contaminantes, e mostrou também a existência de uma quantidade considerável de nanofitina no pellet da precipitação fracionada que se estivesse otimizada aumentaria este valor de produtividade. No que diz respeito ao processo de filtração tangencial com membrana de 30kDa e de 5kDa com os tampões otimizados, este mostrou ser eficaz na separação da nanofitina das restantes proteínas mas com uma produtividade menor do que o processo original sem tampões otimizados (3.2.1). Este resultado mostra mais uma vez a falta de reprodutibilidade e imprevisibilidade da operação na filtração tangencial que retém grande parte da nanofitina. Porém, este resultado pode dever-se também à falta de eficiência da disrupção mecânica. De facto, não existe maneira de garantir que duas disrupções são realizadas da mesma maneira pois o equipamento poderá não estar a operar à pressão que está a debitar, sendo mais um fator que pode justificar o menor conteúdo de proteína quando as condições se encontram supostamente otimizadas.

Na tabela 3.6 estão representados parâmetros de operação durante a purificação dos diferentes testes realizados. Destaca-se que a área de membrana que deveria ser utilizada durante a filtração tangencial é semelhante à que é efetivamente utilizada durante a sua operação. De salientar ainda que os rendimentos das cromatografias nos diferentes processos foi baixa, com excepção da cromatografia de permuta iónica do processo 3.2.1 onde o rendimento atingiu os 80% mostrando mais uma vez ser um conjunto de metodologias que permite obter elevados rendimentos com elevados graus de pureza.



## 4. Conclusão

O universo biotecnológico, particularmente o que trabalha na interface com a indústria farmacêutica, é cada vez mais exigente nas restrições que apresenta nos produtos biológicos que comercializa. Estas exigências traduzem-se em elevadas purezas do produto final, com elevados rendimentos no mínimo de tempo possível sem descurar na segurança do produto. O *upstream processing* sofreu inúmeros avanços no último século aumentando exponencialmente as produtividades apresentadas o que causou que o *downstream* fosse a etapa mais morosa e exaustiva na sucessão de passos que existem desde a produção de um biofármaco até a sua formulação. Isto aliado aos seus elevados custos de operação traduziu-se numa emergente necessidade de criar processos de purificação de biofármacos baratos, inovadores e flexíveis sem que seja prejudicada nenhuma das características do produto final.<sup>40,42,43</sup> O uso deste tipo de metodologias foi um dos alicerces do projeto SADEL, que pretendia produzir nanofitinas para aplicações clínicas com elevadas produtividades sem que isso se refletisse no custo de desenvolvimento do projeto.

O objetivo deste trabalho experimental foi de definir e implementar um processo otimizado de produção e purificação de uma nanofitina à escala piloto. Como ainda não foi eleita a nanofitina *lead* foi dada especial atenção à S2-modificada por apresentar resultados mais promissores que as restantes. Pode-se concluir que para esta nanofitina foi encontrado com sucesso um protocolo a nível de bioreacção que respeita todas as condicionantes e características do microrganismo, e que permite ter grandes quantidades de biomassa produzida. Foi encontrado com sucesso também um conjunto de técnicas de purificação que permite separar a S2-modificada dos restantes contaminantes com grande produtividade e pureza.

Foi verificado que o uso de um  $\mu$  de  $0,175\text{h}^{-1}$  durante a administração do *fed-batch* permite que a SHuffle S2-modificada não acumule substratos tóxicos como o acetato, e que toda a fonte de carbono que é disponibilizada durante os *feedings* seja imediatamente metabolizada pelo microrganismo. Como se verificou, esta ausência de acumulação de fonte de carbono e de intermediários metabólicos durante a bioreacção são essenciais para maximizar e potenciar o crescimento microbiano, atingindo um valor máximo de densidade ótica de 155, e respetiva biomassa (4333,7g). Foi verificado ainda que as condições de cultura podiam ser otimizadas, em particular a condição de crescimento com meio quimicamente definido a  $37^{\circ}\text{C}$  com apenas um antibiótico de resistência,  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina, mostrou valores de  $\mu$  mais altos atingindo  $0,288\text{h}^{-1}$ . A análise de clones recombinantes mostra também que foi encontrado com sucesso um clone que apresenta uma maior produção de nanofitina do que dos restantes contaminantes podendo ser um possível candidato para uma estirpe otimizada.

Em relação à purificação da S2-modificada o conjunto de técnicas de filtração tangencial com o uso sequencial de dois *cutoffs*, 30kDa e 5kDa, seguido de uma cromatografia de permuta iónica em Fractogel  $\text{SO}_3^-$  foi o conjunto de técnicas que mostrou ser mais eficaz mostrando maiores produtividades, até  $0,965\text{g}/\text{L}$ , e com maior pureza. No entanto, este conjunto de técnicas apresenta alguns problemas que terão de ser investigados mais detalhadamente para poder ter um protocolo completamente otimizado e reprodutível.

Destaca-se a retenção que ocorre na membrana de 30kDa que acaba por se traduzir numa perda de cerca de 50% do conteúdo total da nanofitina. Este problema poderá ter origem em diferentes fatores tais como adsorções não específicas, ser uma técnica de separação que é usada logo após clarificação em que o extrato celular se encontra ainda com muitas impurezas, e também a existência de diferentes conformações. Perspetiva-se que usando maiores volumes de diálise na membrana, ou através do uso de um polímero diferente na membrana este problema possa ser contornado. O DTT e o Triton X-100 mostraram não ser eficazes na diminuição da retenção da nanofitina junto à membrana como tal, o seu uso não será implementado nesta fase do processo. No que diz respeito à operação da cromatografia de permuta iónica as condições utilizadas com tampão de equilíbrio de 30mM de citrato a pH 5 e tampão de eluição de 30mM de citrato e 1M de NaCl a pH 5 foram as escolhidas para evitar perda de proteína no *flowthrough* e lavagens da coluna. Apesar de nestas condições não ter sido testada uma eluição por passos, outras condições mostraram ser possível aplicar uma eluição por passos com sucesso diminuindo portanto os tempos de operação e tampões de cromatografia gastos.

No entanto esta condição escolhida por um lado mostra nanofitina que se liga à fase estacionária de forma quase irreversível só sendo eluída no CIP e por outro lado existe

nanofitina que nem sequer se liga à resina. Destaca-se portanto a necessidade de analisar a atividade de diferentes conformações de proteína que ocorrem no processo consoante o tampão em que as mesmas se encontram. Apesar da falta de plausibilidade nos resultados referentes à filtração-gel pode-se afirmar que existem diferenças de conformações na S2-modificada em diferentes condições. No entanto diferenças de 13kDa, como se verificam em alguns casos, não devem representar a realidade pois nenhum dos outros analíticos confirmam diferenças desse nível. A remoção de endotoxinas na S2-modificada mostrou ser eficaz através do uso de uma Sartobind STIC nano mostrando uma redução de cerca de 97%. Para potenciar esta diminuição do teor de endotoxinas recomenda-se o uso de Triton X-100 como componente dos tampões de cromatografia.

Destaca-se por último a necessidade de existência de um protocolo de disrupção celular reprodutível e que permita que as células sejam lisadas de uma maneira semelhante a cada processo realizado. Apesar de se tratar de uma bactéria pode ser realizado um teste adaptado de Trypan Blue para visualização ao microscópio das células que se encontram viáveis após disrupção, ajudando deste modo a perceber se a mesma está a ser eficaz. Existem ainda outros métodos de determinação da viabilidade celular bacteriana mas que envolve outro tipo de equipamento mais sofisticado. As restantes metodologias estudadas mostraram ser incapazes de purificar a nanofitina em grandes quantidades com o grau de pureza desejado, sendo portanto consideradas apenas como técnicas complementares de purificação.

A nível futuro no projeto SADEL estes testes de otimização terão de ser novamente realizadas com a nanofitina *lead* pois o que se verificou para a S2-modificada pode não ser representativo do que irá acontecer para a nanofitina final, abrindo espaço para o teste de técnicas não contempladas neste estudo. Destaca-se ainda a necessidade do desenvolvimento de analíticos específicos para a deteção da nanofitina *lead* nomeadamente o desenvolvimento de um anticorpo específico contra a nanofitina que permita a sua visualização por Western Blot assim como a sua quantificação por ELISA. No que diz respeito aos objetivos deste trabalho experimental pode-se concluir que foram cumpridos pois foi estabelecido com sucesso um protocolo de produção e purificação da S2-modificada à escala piloto.

## 5. Bibliografia

1. Gerngross, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1409–1414 (2004).
2. Gavrilescu, M. & Chisti, Y. Biotechnology - A sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* **23**, 471–499 (2005).
3. Erickson Brent & J. Hessler Christopher. *New Biotech Tools for a cleaner Environment: Industrial Biotechnology for Pollution Prevention, Resource Conservation, and Cost Reduction.* (2004).
4. Walsh, G. Biopharmaceutical\_benchmarks\_2014. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1–10 (2014).
5. Demain, A. L. & Vaishnav, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* **27**, 297–306 (2009).
6. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. a. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 1–17 (2014).
7. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* **189**, 8746–8749 (2007).
8. Lee, S. Y. High cell density culture of Escherichia coli. *Trends Biotechnol.* **14**, 98–105 (1996).
9. Singh, S. M. & Panda, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 303–310 (2005).
10. Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. *Microb. Cell Fact.* **4**, 1 (2005).
11. Vasina, J. a & Baneyx, F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the Escherichia coli cspA and tac promoter systems. *Protein Expr. Purif.* **9**, 211–218 (1997).
12. Maxwell, K. L., Mittermaier, a K., Forman-Kay, J. D. & Davidson, a R. A simple in vivo assay for increased protein solubility. *Protein Sci.* **8**, 1908–1911 (1999).
13. Nakayama, M. & Ohara, O. A system using convertible vectors for screening soluble recombinant proteins produced in Escherichia coli from randomly fragmented cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 825–830 (2003).
14. Flaschel, E. & Friehs, K. Improvement of downstream processing of recombinant proteins by means of genetic engineering methods. *Biotechnol. Adv.* **11**, 31–77 (1993).
15. Anspach, F. B. & Hilbeck, O. Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J. Chromatogr. A* **711**, 81–92 (1995).
16. Raetz, C. R. *et al.* Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.* **5**, 2652–2660 (1991).
17. De Oliveira Magalhães, P. *et al.* Methods of endotoxin removal from biological preparations: A review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **10**, 388–404 (2007).

18. Wu, X. C., Lee, W., Tran, L. & Wong, S. L. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J. Bacteriol.* **173**, 4952–4958 (1991).
19. Weinacker, D. *et al.* Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian J. Microbiol.* **44**, 1043–1048 (2013).
20. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. & Harvey, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249–270 (2005).
21. Jahic, M., Rotticci-Mulder, J., Martinelle, M., Hult, K. & Enfors, S.-O. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **24**, 385–393 (2002).
22. Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 45–66 (2000).
23. Choi, B.-K. *et al.* Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5022–5027 (2003).
24. Chiba, Y. *et al.* Production of human compatible high mannose-type (Man5GlcNAc2) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 26298–26304 (1998).
25. Hu, Y. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 405–416 (2005).
26. Galibert, L. & Merten, O.-W. Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. *J. Invertebr. Pathol.* **107 Suppl**, S80–S93 (2011).
27. Drugmand, J. C., Schneider, Y. J. & Agathos, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1140–1157 (2012).
28. Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1393–1398 (2004).
29. Andersen, D. C. & Krummen, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 117–123 (2002).
30. Mouratou, B., Béhar, G., Paillard-Laurance, L., Colinet, S. & Pecorari, F. in *Ribosome Display and Related Technologies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* **805**, 191–212 (2012).
31. Lipovsek, D. & Plückthun, A. In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J. Immunol. Methods* **290**, 51–67 (2004).
32. Rothe, A., Hosse, R. J. & Power, B. E. In vitro display technologies reveal novel biopharmaceutics. *FASEB J.* **20**, 1599–1610 (2006).
33. Benhar, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol. Adv.* **19**, 1–33 (2001).
34. Williams, J. A. Keys to Bioreactor Solutions. *CEP Magazine* 34–41 (2002).
35. Fonseca, M. & Teixeira, J. *Reactores Biológicos- Fundamentos e Aplicações.* (LIDEL, 2007).

36. Nunes dos Santos, A. *Reactores Químicos - Conceitos básicos e projecto de reactores ideais*. (Fundação Calouste Gulbenkian, 1990).
37. Rao, D. G. *Introduction to Biochemical Engineering*. (Tata McGraw-Hill Education, 2010). at <<https://books.google.com/books?id=5RUMRF5jplUC&pgis=1>>
38. Lima, N. & Mota, M. *Biotechnologia - Fundamentos e aplicações*. (LIDEL, 2003).
39. Qureshi, N. & Blaschek, H. Evaluation of recent advances in butanol fermentation, upstream, and downstream processing. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **24**, 219–226 (2001).
40. Dizon-Maspat, J., Bourret, J., D'Agostini, A. & Li, F. Single pass tangential flow filtration to debottleneck downstream processing for therapeutic antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 962–970 (2012).
41. Nestola, P. *et al.* Improved virus purification processes for vaccines and gene therapy. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, n/a–n/a (2015).
42. Zydney, A. L. *Continuous downstream processing for high value biological products - A review*. *Biotechnology and Bioengineering* (2015). doi:10.1002/bit.25695
43. Tarafder, A., Strohlein, G., Aumann, L. & Morbidelli, M. Role of recycling in improving the performance of chromatographic solvent gradient purifications. *J. Chromatogr. A* **1183**, 87–99 (2008).
44. Silva, S. P. M. & Rodrigues, E. A. Modeling and simulation of an Industrial-Scale Parex Process. *AIChE J.* **7**, 405–410 (2015).
45. Mota, J. P. B. & Araújo, J. M. M. Single-column simulated-moving-bed process with recycle lag. *AIChE J.* **51**, 1641–1653 (2005).
46. Hagel, L., Jagschies, G. & Sofer, G. *Handbook of Process Chromatography. Handbook of Process Chromatography* (2008). doi:10.1016/B978-012374023-6.50010-5
47. Deyl, Z. Protein purification. Principles, high resolution methods and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **532**, 207–208 (1990).
48. Reis, R. Van & Zydney, A. Membrane separations in biotechnology.pdf. *Curr. Opin. Biotechnol.* 208–211 (2001).
49. Healthcare, G. E. *Ion-exchange chromatography & chromatofocusing*. at <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60261a020>>
50. Healthcare, G. E. *Affinity chromatography: principles and methods*. at <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Affinity+Chromatography#7>>
51. Healthcare, G. E. *Hydrophobic interaction and reversed phase chromatography: principles and methods*.
52. Healthcare, G. E. *Size Exclusion Chromatography: methods and principles*.
53. WHO. *WHO good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles*. (2011).

54. Uematsu, S. & Akira, S. Toll-like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb. Exp. Pharmacol.* **183**, 1–20 (2008).
55. Peine, I. *Quality Assurance Compliance: Procedures for Pharmaceutical and Biotechnology Manufacturers*. (CRC Press; Lslf edition, 1994).
56. Chisti, Y. Strategies in Downstream Processing. *Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook* **2**, 3 – 30 (1998).
57. Chandel, S., Prakash, A. & Medhi, B. Current scenario in inflammatory bowel disease: Drug development prospects. *Pharmacol. Reports* **67**, 224–229 (2015).
58. Strober, W. & James, S. P. The immunologic basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Immunol.* **6**, 415–432 (1986).
59. Schirbel, A. & Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J. Dig. Dis.* **11**, 266–276 (2010).
60. Stanbury, P., Whitaker, A. & Hall, S. *Principles of Fermentation Technology*. (Butterworth-Heinemann, 1995).
61. Seetharam, R. & Sharma, Satish, K. *Purification and Analysis of Recombinant Proteins*. (CRC Press; Lslf edition, 1991).
62. Ghosh, R. *Principles of bioseparations engineering*. (World Scientific, 2006).
63. Kalipatnapu, S. & Chattopadhyay, A. Membrane protein solubilization: recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. *IUBMB Life* **57**, 505–512 (2005).
64. Ahamed, T. *et al.* Selection of pH-related parameters in ion-exchange chromatography using pH-gradient operations. *J. Chromatogr. A* **1194**, 22–29 (2008).
65. Xia, F., Nagrath, D. & Cramer, S. M. Effect of pH changes on water release values in hydrophobic interaction chromatographic systems. *J. Chromatogr. A* **1079**, 229–235 (2005).
66. Federal Drug Administration. *Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing : Questions and Answers*. (2012).
67. Dawson, M. E. Endotoxin limits. *LAL Updat.* 1–3 (1995).